

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370025

研究課題名(和文) 酸素発生反応を安定化させる光化学系 表在性タンパク質の構造・機能・進化

研究課題名(英文) The extrinsic proteins of photosystem II: structure, function and evolution

研究代表者

梶 達也 (TOMO, Tatsuya)

東京理科大学・理学部・教授

研究者番号：60300886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：光合成光化学系の機構を明らかにする上で多様性は大きな手がかりとなり得る。光合成生物はコアタンパク質間では保存性が高いが、コアタンパク質以外では多様性があり、とりわけ光化学系II表在性タンパク質は多様性に富んでいる。本研究ではシアノバクテリア、珪藻、紅藻、渦鞭毛藻などの種々の藻類から光化学系IIの単離精製を行い、多様性を利用して、機能・構造相関の解析を行った。その結果、Psb0とPsbVが膜タンパク質の二次構造に大きく影響を与えることを明らかにした。また、PsbQ'が第二次電子受容体の酸化還元電位を正方向にシフトさせることにより進化の過程で光阻害に対応できる能力を獲得したことを示した。

研究成果の概要(英文)：The photosynthetic alga has a highly diverse in species. The extrinsic proteins of photosystem II (PS II) are also rich in diversity. To clarify the role of extrinsic proteins, we successfully isolated PS II complex from cyanobacteria, red alga, diatom and Symbiodinium. Our analyses showed the Psb0 and PsbV affect the secondary structure of core subunits of PS II by Fourier transform infrared spectroscopy. PS II isolated from red alga, which is primitive red alga, contained fourth extrinsic proteins, PsbQ', which role had not been elucidated yet. We did the measurements of redox potential of secondary electron transfer component of PS II (QA) to find out the role of this subunit. We observed the positive potential shift of QA after reconstitution of PsbQ' to cyanobacterial PS II. This result indicates the role of QA reduces the yield of the triplet chlorophyll by direct charge recombination. As a result, this leads to the decrease of singlet oxygen in the red alga.

研究分野：光合成

キーワード：光化学 酸素発生 多様性

1. 研究開始当初の背景

光化学系 II 表在性タンパク質は水分解反応の安定化に関わるタンパク質である。高等植物の光化学系 II 表在性タンパク質に関しては、日本はこれまで世界の研究をリードしてきた (Miyao & Murata, *Biochim. Biophys. Acta* 725 (1983), Ono & Inoue, *FEBS Lett.* 164 (1983), Ifuku et al. *EMBO rep.* (2004) 他多数)。それらは、PsbO, PsbP, PsbQ と呼ばれる 3 種のタンパク質から構成されている。表在性タンパク質の機能に関するこれまでの考察は、表在性タンパク質遊離後の酸素発生活性回復に必要なイオン要求性や表在性タンパク質の部位特異的置換による酸素発生活性の測定等であった。シアノバクテリアにおいては、光化学系 II の表在性タンパク質は PsbO, PsbV, PsbU であることがこれまで報告されてきたが、最近になってその局在位置も沈 (岡山大学) らにより分子レベルで決定された (Umena et al. *Nature* (2011))。しかし、それらの分子レベルの機能に関しては未だ明らかになっていない。また、紅藻には第 4 番目の表在性タンパク質 PsbQ' が、珪藻にはそれに加えて第 5 番目の表在性タンパク質 Psb31 が存在していることを申請者らが明らかにした (Nagao et al. *J. Biol. Chem.* 285 (2010))。これら新規表在性タンパク質の局在位置および機能はもちろん明らかとなっていないが、光合成の進化 (二次共生) を考える上で非常に興味深い課題である。

光合成の酸素発生活性は表在性タンパク質の有無で劇的に変化する。これは表在性タンパク質が水分解の活性中心である「 Mn_4CaO_5 クラスター」の安定化に直接関わっているからである。それにも関わらず表在性タンパク質の研究は、高い酸素発生活性を保持した光化学系 II 標品の生化学的単離の困難さから遅れてきた。本研究では、多様性を持つ、種々の生物の光化学系 II 標品を用いて、これまでに知ることができなかった、表在性タンパク質の分子レベルでの機能・構造・局在位置を明らかにする。

2. 研究の目的

酸素は従属生物にとって必須の分子であり、光合成光化学系 II 複合体は水を分解し酸素を供給することに特徴を持つ。この反応は光化学系 II 表在性タンパク質によって安定化されており、表在性タンパク質が遊離すると酸素発生活性は劇的に減少する。最近になり、好熱性シアノバクテリアの結晶構造が詳細に決定されたが、表在性タンパク質の機能に関しては未だ不明である。また、表在性タンパク質は PsbO を除いて生物種ごとに多様性に富んでおり、シアノバクテリア以外では局在位置すら明らかになっていない。表在性タンパク質の機能・構造を解き明かすことが酸素の供給のみならず、光合成の進化の解明に繋がる。本研究では、それら表在性タンパク

質の性質をこれまでに行われてこなかった物理化学的方法により解析を行い、新しい知見を得、光合成による次世代エネルギー獲得に貢献する。

3. 研究の方法

(1) シアノバクテリア、珪藻、紅藻、渦鞭毛藻などの種々の藻類より酸素発生活性を保持した光化学系標品の調製を行った。調製は穏やかな界面活性剤で可溶化後、遠心分画、ショ糖密度勾配遠心あるいはカラムクロマトグラフィーを組合わせて行った。

(2) 大腸菌を用いた表在性タンパク質の大量調製を行う。PsbV タンパク質の場合は補欠分子としてヘム鉄を結合しているため、別個にヘム鉄を作製する遺伝子を組み込んで発現させた。

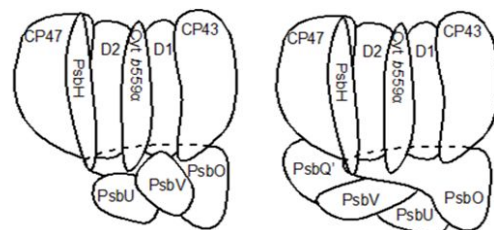
(3) 構造未知の表在性タンパク質に関しては結晶化による構造解析を行った。

(4) 光誘起差フーリエ変換赤外分光法による表在性タンパク質の機能解析を行った

(5) 表在性タンパク質が与える電子伝達成分への電位の影響と機能を考察した。

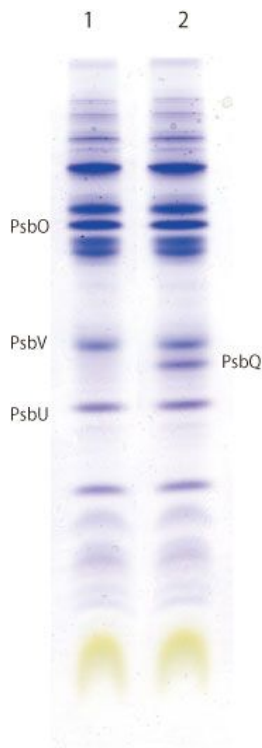
4. 研究成果

(1) 表在性タンパク質の機能・構造を解き明かすことが酸素の供給のみならず、光合成の進化の解明に繋がる。渦鞭毛藻 (*Symbiodinium* sp. OAH-1 および *Symbiodinium minutum*) *Synechocystis* sp. PCC6803、*Thermosynechococcus elongatus* BP-1、*Acaryochloris marina* MBIC11017、*Cyanidium caldarium* RK-1 (紅藻)、*Chaetoceros gracilis* (珪藻) を材料として光化学系複合体の単離を試み活性を保持した標品の精製に成功した。また、*T. elongatus*、*C. caldarium* の表在性タンパク質の大腸菌による大量発現系の構築に成功した。表在性タンパク質の中で PsbQ と呼ばれる第二次共生生物が獲得した光化学系 II の表在性タンパク質はその構造・機能は明らかになっていなかった (図 1)。そのため、単離精製した *T. elongatus* の光化学系 II に大腸菌で大量発現させた *C. caldarium* の PsbQ を再構成しすることにより、PsbQ が化学量論的に結合していることを示した (図 2)。



シアノバクテリア PS II 紅藻 PS II

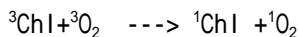
図 1 シアノバクテリアと紅藻の表在性タンパク質の違い (模式図)



lane 1:シアノバクテリア PS II, lane 2: シアノバクテリア PS II に PsbQ' を再構成した標品

図2 シアノバクテリアに PsbQ' を再構成した電気泳動プロファイル

このことは、シアノバクテリアの膜に対する表在性タンパク質結合部位に空きがあり、そこに新たな表在性タンパク質が結合できることを示している。光化学系 II の酸化側の機能を光誘起差 FT-IR の手法を用いて、また還元側の機能は第二次電子受容体である Q_A の電位より解析を行った。光誘起差 FT-IR において、水分解中心である Mn_4CaO_5 クラスターの S_1 , S_2 状態の遷移に関する寄与はほとんど観測されなかったが、第二次電子受容体で有る Q_A の電位は PsbQ の結合により正へとシフトしていた。このシフトは結果として、第一次電子受容体を経由しない直接的な電荷再結合の増加を意味する。第一次電子受容体を経由する電荷再結合は、三重項クロロフィルを生じ、それが増感作用し活性酸素の一種である一重項酸素を生じさせ光化学系の障害となり得る (Scheme 1)。第二次共生生物が獲得した PsbQ は電位シフトにより、この割合を減少させ、過剰な光に対する電子伝達逆反応において保護作用として働いていると示唆された。



Scheme 1: クロロフィルによる一重項酸素生成

(2) 二次共生藻である珪藻・渦鞭毛藻等に特異的に存在する表在性タンパク質である Psb31 の結晶構造を報告した。このタンパク質は4本のヘリックスを持ち、単独で光化学系 II に結合しても酸素発生を回復することから表在性タンパク質の構造・機能・相関において重要な知見を与えた。また、*T. elongatus* BP-1 の光化学系 II に種々の組み合わせで表在性タンパク質を結合させ、光誘起差 FT-IR の手法を用いて水分解中心である Mn_4CaO_5 クラスターの S_1 , S_2 状態の遷移に関する寄与を調べたところ、PsbO と PsbV がタンパク質の二次構造に重要な影響を与えることを明らかにした。また、PsbQ タンパク質を PsbQ を持たないシアノバクテリアに化学量論的に結合させた標品を用いて熱発光の手法 (閃光照射後の電荷再結合で観測される酸化側と還元側のエネルギー差変化を解析する方法) を用いて実験を行った結果、電子受容体 Q_A の電位が正方向にシフトしている結論が支持された。これは、紅藻が進化の過程で新たに獲得した PsbQ が過剰な光に対する電子伝達逆反応において保護作用として働いていることを裏付けるものである。

(3) 酸素発生型光合成原核生物であるシアノバクテリアの光化学系 II 表在性タンパク質は PsbO, PsbV, PsbU の3つであり、これらを取り除くと酸素発生活性が大幅に低下することが知られていた。しかし、その分子機構は不明であったため光誘起差 FTIR 法を用いて解析したところ、3種の表在性タンパク質を取り除くと、 Mn_4CaO_5 クラスター周囲のタンパク質の大きな変化が観測された、そこに PsbO を加えると構造の一部が回復し、3種の表在性タンパク質全部を加えると元の構造に戻ることが確認された (図3)。これらの回復は $CaCl_2$ 濃度変化によって差がみられたことから、表在性タンパク質をタンパク質の構造変化ばかりでなく、Ca イオン、Cl イオンの保持にも影響を与えていると考えられた。

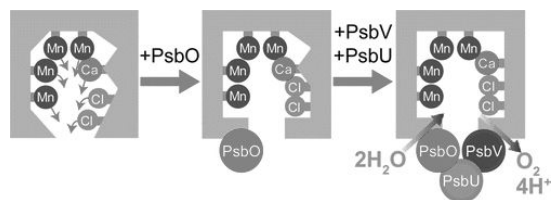


図3: 表在性タンパク質 PsbO, PsbV, PsbU による構造回復の模式図

(4) Mn-Ca 酸化物と Ce(IV)化合物との反応により水が分解され酸素発生が効率的に行われることを示した。また、Mn 酸化物とフラレンの化合物形成により水分解触媒活性の向上を示した。これは、人工光合成における水分解反応の重要な知見の一つとなり得る。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](以下の代表的なものを含め計26件)

1. Ryo Nagao, Tatsuya Tomo, Takumi Noguchi, Effects of Extrinsic Proteins on the Protein Conformation of the Oxygen-Evolving Center in Cyanobacterial Photosystem II As Revealed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Biochemistry* 54, 2022-2031 (2015) DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00053, 査読有
2. Y. Sano, K. Endo, T. Tomo, T. Noguchi, Modified molecular interactions of the pheophytin and plastoquinone electron acceptors in photosystem II of chlorophyll *d*-containing *Acaryochloris marina* as revealed by FTIR spectroscopy, *Photosynth. Res. in press* (2015) DOI: 10.1007/s11120-014-0073-x, 査読有
3. Tatsuya Tomo, Toshiyuki Shinoda, Min Chen, Suleyman I. Allakhverdiev, Seiji Akimoto, Energy transfer processes in chlorophyll *f*-containing cyanobacteria using time-resolved fluorescence spectroscopy on intact cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 1484-1489 (2014) DOI: 10.1016/j.bbabi.2014.04.009, 査読有
4. Chihiro Uno, Ryo Nagao, Hiroyuki Suzuki, Tatsuya Tomo, Takumi Noguchi, Structural Coupling of Extrinsic Proteins with the Oxygen-Evolving Center in Red Algal Photosystem II As Revealed by Light-Induced FTIR Difference Spectroscopy, *Biochemistry* 52, 5705-5707 (2013) DOI: 10.1021/bi4009787, 査読有
5. Ryo Nagao, Michihiro Suga, Ayako Niikura, Akinori Okumura, Faisal Hammad Mekky Koua, Takehiro Suzuki, Tatsuya Tomo, Isao Enami, Jian-Ren Shen, Crystal Structure of Psb31, a Novel Extrinsic Protein of Photosystem II from a Marine Centric Diatom and Implications for Its Binding and Function, *Biochemistry* 52, 6646-6652 (2013) DOI: 10.1021/bi400770d, 査読有
6. Ryo Nagao, Shuji Takahashi, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Katsuyoshi Nakazato, Tatsuya Tomo, Comparison of oligomeric states and polypeptide

compositions of fucoxanthin chlorophyll *a/c*-binding protein complexes among various diatom species, *Photosynth. Res.* 117, 281-288 (2013) DOI: 10.1007/s11120-013-9903-5, 査読有

7. Nagashima, H. and Mino, H., Highly resolved proton matrix ENDOR of oriented Photosystem II membranes in the S2 state, *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 1165-1173 (2013) DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.06.001, 査読有

8. H. Suzuki, M. Sugiura, and T. Noguchi, Determination of the miss probabilities of individual S-state transitions during photosynthetic water oxidation by monitoring electron flow in photosystem II using FTIR spectroscopy, *Biochemistry* 57, 6776-6785 (2012) DOI: 10.1021/bi300708a 査読有

9. Tatsuya Tomo, Hayato Kusakabe, Ryo Nagao, Hisashi Ito, Ayumi Tanaka, Seiji Akimoto, Mamoru Mimuro, Shigetoshi Okazaki, Luminescence of singlet oxygen in photosystem II complexes isolated from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 containing monovinyl or divinyl chlorophyll *a*, *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 1229-1305 (2012) DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.02.018, 査読有

[学会発表] (以下の代表的なものを含78件)

1. Tatsuya TOMO, Seiji AKIMOTO, Suleyman I. ALLAKHVERDIEV, DIVERSITY OF CHLOROPHYLLS IN PHOTOSYNTHESIS, International Meeting "Photosynthesis Research for Sustainability - 2014", Pushchino, Russia, 2014年6月2日 ~ 6月7日(招待講演)
2. Masato YAMADA, Tatsuya TOMO, International Meeting "Photosynthesis Research for Sustainability - 2014", Pushchino, Russia, 2014年6月2日 ~ 6月7日
3. 韮達也, 藻類の多様性と光化学系, 第5回日本光合成学会公開シンポジウム, 2014年5月30日 ~ 5月31日, 奈良・近畿大学農学部(招待講演)
4. Tatsuya Tomo, Low photon-energy utilization by cyanobacteria, 1st Korea-Japan Microalgae Symposium, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon, Korea, 2013年10月10日 ~ 10月12日(招待講演)
5. T. Tomo, T. Tsuchiya, K. Watabe, M. Araki, S. Akimoto, S.I. Allakhverdiev, International meeting "Photosynthesis Research for Sustainability - 2013", Baku, Azerbaijan, 2013年6月5日 ~ 6月9日(招待講演)

6. 鞆 達也, クロロフィル*d*を主要色素としてもつシアノバクテリアの光化学系 II 反応機構, 第 54 回日本植物生理学会年会, 岡山・岡山大学, 2013 年 3 月 21 日 ~ 3 月 23 日(招待講演)

7. 鞆 達也, 低エネルギー光による光合成光エネルギー変換, 2012 植物科学シンポジウム「植物科学最先端研究への期待」, 東京・品川コクヨホール, 2012 年 12 月 3 日(招待講演)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rs.kagu.tus.ac.jp/tomo/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鞆 達也 (TOMO, Tatsuya)
東京理科大学理学部教養学科・教授
研究者番号: 60300886

(2)研究分担者

野口 巧 (NOGUCHI, Takumi)
名古屋大学・理学(系)研究科・教授
研究者番号: 60241246

三野 広幸 (MINO, Hiroyuki)
名古屋大学・理学(系)研究科・准教授

研究者番号: 70300902

(3)連携研究者

なし