

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07110

研究課題名(和文) 網羅的アミノ酸置換による光化学系IIの水素結合ネットワークの機能に関する研究

研究課題名(英文) Study on PSII hydrogen bond networks by exhaustive amino acid substitution

研究代表者

黒田 洋詩 (Kuroda, Hiroshi)

岡山大学・異分野基礎科学研究所・特別契約職員(講師)

研究者番号：80381903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：光化学系IIのMnクラスターとルーメンを繋ぐ複数の水素結合ネットワークのうち、D1-Y161 (YZ)などから構成されるネットワークに関する D1-N298などのアミノ酸置換を行なった変異株を作出し様々な解析を行ったところ、この水素結合ネットワークはプロトン排出には関与していない可能性が高いことが分かった。D1-N298残基はYZの機能に重要であることが明らかになった。別の水素結合ネットワークである D1-D61から始まる経路は複数存在するが、D1-R334, D2-E302, D2-E323側ではなく、D1-E65および D2-E312側がプロトン排出に関与していることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：In oxygenic photosynthesis, there are several hydrogen bond networks between Mn cluster and lumen. To study role of these hydrogen bond networks, we have transformed *Chlamydomonas chloroplast* to substitute the participating amino acid residues of chloroplast-encoded PSII subunits with 19 other amino acids. We have examined their photosynthetic growth, PSII accumulation and activity. Analysis of the resulting transformants, we found that one of the hydrogen bond networks including D1-D61, D1-E65 and D2-E312 could be involved in excretion of protons generated during water oxidation at the Mn cluster. One of the hydrogen bond networks starting from YZ does not seem to be proton exit pathway.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：光合成 光化学系II 葉緑体形質転換 水素結合ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

酸素発生型光合成では、光化学系 II (PSII) 複合体の Mn_4CaO_5 において、電子供与体である水分子の酸化が起こり、酸素とプロトンが生成する(1)。2011年に好熱性シアノバクテリアの PSII の微細構造が報告され、 Mn_4CaO_5 とルーメンを繋ぐ3つの水素結合ネットワークの存在が明らかになった(2)。これらは PSII サブユニットのアミノ酸残基と水分子から構成されており、水分子の流入やプロトン排出に関与すると考えられている。これらのネットワークを構成するアミノ酸残基は進化的に保存されており、何らかの重要な機能を持つことが予想されるが、その機能はよく分かっていない。

近年、水素結合ネットワークのアミノ酸残基への変異導入や結晶構造に基づいたコンピューター・シミュレーション解析が行われるようになってきており(3,4)、D1-D61、D2-K317などを含む水素結合ネットワークや Y_z (D1-Y161)、D1-H190、D1-N298を含む別のネットワークがプロトン排出に関与する可能性が示唆されている。また、 HCO_3^- イオンがプロトンの受容体として働くことが報告され(5)、水素結合ネットワークの一部のみがプロトン排出に関与する可能性も出てきている。

申請者らは緑藻クラミドモナスを用いて、水素結合ネットワークを構成するアミノ酸残基を別の19種類のアミノ酸へ置換した変異株を網羅的に作出し、PSII 活性に対する影響を調べている。例えば、D1-N298変異株の多くが PSII を蓄積しているのに酸素発生できず、活性のある変異株においても、 Mn_4CaO_5 が極めて不安定だった(6)。このことは、D1-N298が Mn_4CaO_5 の存在状態や機能に非常に重要な役割を果たしていることを示している。一方、同じ水素結合ネットワークのルーメンに近いアミノ酸残基への変異株のいくつかは嫌気条件下でしか光合成できない。このような表現型はプロトン排出と無関係と考えられ、水素結合ネットワークが必ずしもプロトン排出だけに働いている訳ではないことを示唆している。

<参考文献>

2. 研究の目的

- (1) クラミドモナス葉緑体形質転換体を用いて、様々な手法で光合成活性を測定し、水素結合ネットワークの機能について様々な可能性を導き出す。
- (2) 活性測定と並行して、まだ変異を導入していないアミノ酸残基を19種類の別のアミノ酸に置換した形質転換体を作成する。
- (3) 変異を導入した PSII 複合体を迅速かつ簡便に精製するために、アフィニティ精製のタグを導入し、精製標品を用いてしか行えない物理化学的な測定を行うための準備を行う。

備を行う。

3. 研究の方法

(1) 緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) を用いて研究を行った。

(2) 水素結合ネットワークを構成するアミノ酸残基への葉緑体形質転換法による部位特異的変異の導入

D1 タンパク質 (*psbA* 遺伝子産物) への変異導入には、*psbA* を欠損する Fud7 株をホストとして行い、形質転換体をスペクチノマイシン耐性で選抜した。

CP47、CP43、D2 タンパク質をコードする *psbB*、*psbC*、*psbD* 遺伝子の周辺には重要な遺伝子が存在し、薬剤耐性 *aadA* マーカーを挿入すると、それらの発現が悪影響を受ける可能性がある。そのため、Fud7 株から *psbB*、*psbC* または *psbD* 遺伝子をノックアウトした欠損株を作成し、変異を導入した *psbB*、*psbC* または *psbD* ベクターと *psbA-aadA* ベクターを用いて共形質転換した。

(3) 水素結合ネットワーク変異株の解析

変異株が光独立栄養的に生育できるかを調べた。最小寒天培地 (HSM) 上に培養液を乗せ、様々な光強度の下で、大気、約 5% CO_2 /約 15% O_2 、約 20% CO_2 /0% O_2 条件下で培養を行った。

液相酸素電極測定システムを用いて酸素発生活性を測定し、PSII 活性や Mn_4CaO_5 への変異の影響を調べた。

アミノ酸置換による PSII 複合体の蓄積への影響を調べるため、ウェスタン分析を行った。

チラコイド膜を調製し、原子吸光分光法で PSII の Mn_4CaO_5 の蓄積量を調べた。

生細胞を用いて熱発光の測定を行った。光合成電子伝達阻害剤存在下で Q-band を測定し、 S_1 から S_2 への S 状態遷移を調べた。また、阻害剤非存在下で閃光の連続照射を行い、B-band の四周期振動を調べることで、S 状態の遷移への変異の影響を調べた。

ポンプ&プローブ法による測定が可能な蛍光検出器を用いて、光合成電子伝達阻害剤存在下、非存在下で閃光照射後の Q_A^- の再酸化速度を測定した。

4. 研究成果 (図が必要)

(1)葉緑体形質転換体の作出

D1 タンパク質のアミノ酸置換

D1 タンパク質をコードする *psbA* 遺伝子欠損株 Fud7 を用いて、PSII の二次電子供与体である D1-Y161 (Y_Z) を Phe に置換した変異株を作出した。

D2 タンパク質のアミノ酸置換

Fud7 から D2 タンパク質をコードする *psbD* 遺伝子を欠損させた株の共形質転換を行い、D2-Y160F 変異株、D2-E302 変異株、D2-E323 変異株、D2-E312 変異株の作出を行なった。途中まで進んでいた D2-R294 変異株の作出を完成させた。さらに、D2-Y160F と D2-R294 変異を持つ二重変異株も作出した。ただし、二重変異株の D2-R294 へのアミノ酸置換は Ala, Val, Asn, Lys, Tyr のみ行った。

D1, D2 タンパク質の二重変異株の作出

D2-Y160F 変異および D1-N298 を Glu, Asp または Phe に変異した二重変異株を作出した。

アフィニティタグの導入

D1-N298G, D1-N298Q, D1-D319S または D1-D319R をもつ変異 PSII 精製のために、PSII サブユニットの一つである CP47 タンパク質の C 末端に Strep tag II を導入した変異株を作出した。形質転換には CP47-Strep tag II ベクターと変異 *psbA* ベクターを用いて、Fud7 から CP47 タンパク質をコードする *psbB* 遺伝子を欠損させた変異株の共形質転換を行なった。

(2)D1-Y161 (Y_Z), D1-H190, D1-N298 を含む水素結合ネットワーク (Y_Z 経路) についての研究成果

D1-Y161F (Y_Z) 変異株の解析

PSII の二次電子供与体である D1-Y161 (Y_Z) を Phe に置換すると Mn_4CaO_5 からの電子が一次電子供与体である P_{680}^+ へ伝達されないため、光合成できなくなる。この変異株を用いることで、 Q_A と P_{680}^+ の電荷再結合速度を測定することができた。また、この変異株において PSII は蓄積するが、 Mn_4CaO_5 が構築されないことが分かった。

D1-N298 変異株の解析

D1-N298 は PSII の二次電子供与体である Y_Z と D1-H190 を介して水素結合ネットワークを形成している。このアミノ酸残基の変異株の多くに酸素発生活性がなく、活性のある変異株でも Mn_4CaO_5 の光感受性が高く、このアミノ酸残基が Mn_4CaO_5 の機能と安定性に非常に重要であると以前に報告した。

変異株の PSII の Mn 含有量を調べたところ、酸素発生活性の有無にかかわらず、Pro に置換した変異株以外では Mn が蓄積していた。

多くの酸素発生しない変異株 (Val, Leu, Ile, Thr, Lys, Arg, Phe, Tyr, Trp へ置換した株) では熱発光の Q-band や B-band が現れなかった。これらの変異株では、Mn が蓄積しているにもかかわらず、S 状態遷移が全く起こらなかった。これらの変異株の Q_A の再酸化速度を測定したところ、Arg へ置換した株以外では Q_A の電子が Q_B へ伝達されるより早く P_{680}^+ と再結合することが分かった。これらの変異株では Y_Z が正常に機能していない可能性が高く、D1-N298 が Y_Z の機能に重要な役割を果たすことが示唆された。

一方、酸素発生活性のない Asp や Glu に置換した変異株では S_1 から S_2 への S 状態遷移を示す Q-band が観測できた。しかし、酸素発生する株と異なり、B-band の四周期振動は観察されなかった。この時、 S_3 状態を示す B_1 -band が観察されたことから、S 状態遷移は S_3 までは進行することが分かった。

多くの D1-N298 変異株の熱発光を測定したところ、45~50 °C 付近に A_G -band または C-band が検出された。C-band は D2-Y160 (Y_D) に由来すると考えられているため、D1-N298 変異と D2-Y160F 変異を持つ二重変異株を作出し、熱発光を測定した。 Y_D に変異を導入しても 45~50 °C 付近のシグナルに変化はなかったことから、この熱発光シグナルは Y_D に由来しないことが分かった。

これまで D1-N298 変異株の酸素発生活性の測定にはクラーク型酸素電極を用いていた。D1-N298 変異株の Mn_4CaO_5 クラスタは極めて不安定で、活性測定中に晒された強光により損傷を受け、酸素発生活性が検出できない可能性があった。そこで、スウェーデン Uppsala University の Fikret Mamedov 研究室と共同研究を行い、閃光照射により発生する酸素を検出できるジョリオ型酸素電極を用いて変異株の酸素発生活性を測定した。その結果、クラーク型酸素電極で酸素発生活性がなかった D1-N298 変異株からはジョリオ型酸素電極でも酸素発生活性が全く観察されなかった。

Y_Z 経路に関連する他のアミノ酸残基の変異株の解析

Mn_4CaO_5 とルーメンを繋ぐ水素結合ネットワークの一つである Y_Z 経路の中間に位置する CP43-A411 および D1-N322 やルーメンに近い D1-Q304, D1-D319, D1-R323 を水素結合できないアミノ酸残基へ置換しても光合成的生育が大きく損なわれることはなかった。この結果は Y_Z 経路がプロトン排出に関与していない可能性を示唆している。

(3)D1-D61 を含む水素結合ネットワークについての研究成果

D1-D61 からルーメンへ続く水素結合ネットワークは少なくとも 3 つの経路に枝分かれしている。(i) D1-E65, D2-E312 を介してル

ーメンへ繋がる経路 . (ii) D1-D61 から D2-K317, D2-E302, D2-E323, D2-R294 などを通じてルーメンへ繋がる経路 . (iii) D1-N338 の方へ続く経路である .

D1-D61 変異株の解析

19 種類の別のアミノ酸残基へ置換した変異株のうち、光合成的に生育できたのは Glu または Cys へ置換した株のみであった . 酸素発生活性を測定したところ、Glu 置換株では約 50%、Cys 置換株では約 25%、その他の形質転換体ではほとんど酸素発生活性が見られなかった .

ウェスタン分析により PSII の蓄積量を見積もると、Trp へ置換した株ではほとんど蓄積せず、Tyr 置換株では約 20%、Thr, Arg 置換株では約 40%、その他では 50-90%であった . 多くの変異株で D1 タンパク質当たりの Mn 量は 40%程度減少していた . D1-D61 は PSII や Mn_4CaO_5 の蓄積には必須ではないが酸素発生活性には重要であることが示された .

変異株のうち、His, Tyr, Trp へ置換した変異株では DCMU 存在下で Q-band が観察されなかったが、その他の変異株ではコントロール株と同様に Q-band が検出された . しかし、ピークの温度が高温側にシフトしていたり、複数のシグナルが重なり合っている変異株が多かった . このことは、D1-D61 変異株の多くで、Mn クラスターの状態に異常があることを示唆している . また、DCMU 非存在下で B-band を測定したところ、Glu へ置換した株のみ B-band の四周期振動が観察されたが、Cys 置換株を含むその他の変異株では B-band の四周期振動は観察されなかった .

Q_A の再酸化速度を測定したところ、DCMU 非存在下では、Arg, Phe, Tyr, Trp へ置換した株を除き、 Q_A から Q_B への電子伝達速度がコントロール株とほぼ同程度であった . Arg, Phe, Tyr, Trp へ置換した株では Q_A の再酸化速度が非常に速く、これらの変異株では Q_A の持つ電子が P_{680}^+ または Y_Z と再結合すると考えられる .

D1-D61 から始まる水素結合ネットワークに關与する変異株の解析

経路(i)に關与する D1-E65 や D2-E312 への変異は PSII 蓄積量にあまり大きな影響を及ぼさなかったにもかかわらず、PSII 活性は大きく損なわれた . このことはこれらのアミノ酸残基が PSII 活性に重要な役割を果たしていることを示しており、 Mn_4CaO_5 で生成する 4 つのプロトンのうち少なくとも 1 つは D1-D61, D1-E65, D2-E312 を介してルーメンへ排出される可能性が示唆された . 一方、D1-D61 から続く別の経路に關与する D1-R334, D2-E302 や D2-E323 への変異は、PSII 蓄積量や光合成的生育にそれほど影響しなかった . このことから、D1-R334, D2-E302, D2-E323 が關与する経路はプロトン排出とは無関係であると考えられた .

D2-R294 変異株の解析

D1-D61 が關与する水素結合ネットワークのうち、D1-R334, D2-E302, D2-E323 よりルーメンに近い D2-R294 残基は、経路(ii)の CP47-E364 と塩橋しているが、PSII の二次電子供与体の一つである D2-Y160 (Y_D) の機能に重要な D2-H189 と水素結合しており、PSII において何らかの重要な役割を果たしている可能性が考えられた .

このアミノ酸残基への変異は PSII 蓄積量や活性を大きく低下させた . 通常、PSII への変異により PSII 蓄積量や活性が低下する場合、それは光阻害によるもので、変異株は強光に弱いことが予想されたが、D2-R294 変異株の多くは弱光下で生育させるよりむしろ強光下で生育させた方が PSII 蓄積量が高くなり (PSII 複合体の安定化? PSII 複合体または Mn_4CaO_5 の構築に強い光が必要?)、それに伴いクロロフィル当たりの PSII 活性が高くなった . この結果は D2-R294 への変異により PSII が不安定になったというよりはむしろ、PSII の構築により強い光が必要である可能性を示唆している .

得られた成果の国内外における位置付けとインパクト

PSII の酸素発生系とルーメンを繋ぐ水素結合ネットワークに關して、主に 2 つのアプローチで国内外で研究が進んでいる . 一つの方法は私たちが行っているような部位特異的変異導入で、もう一つは QM/MM によるシミュレーション解析である .

部位特異的変異導入の場合、その多くはシアノバクテリアを用いた研究であり、葉緑体での研究は相変わらず少なく、葉緑体における水素結合ネットワークの役割の研究結果、特に水素結合ネットワークに關与するアミノ酸残基を別の 19 種類のアミノ酸に置換する方法は大きなインパクトを与えた .

本研究で得られた成果は QM/MM 法による構造に基づいた解析の結果とほぼ一致しており、研究結果の信頼性をお互いに高めることとなった .

また、本研究を通じて、いくつかの共同研究が生まれた . それは水素結合ネットワークに關するものだけでなく、PSII の光阻害、PSII の分子構築などの基礎研究であるが、我々の解析手法が広く受け入れられた結果であると捉えている .

今後の展望

本研究において、プロトン排出に關してはどの水素結合ネットワークが關与しているかを大まかに絞ることができた .

本研究の成果が QM/MM 法による構造解析の結果とほぼ一致することは、対象としたア

ミノ酸残基や変異の導入法が正しかったことを示している。今後はより詳細なメカニズムを明らかにするため、チラコイド膜標品および PSII 精製標品を用いた活性測定などを行う予定である。また、必要があれば、二重、三重変異株を含めた新たな変異株の作出も行う予定である。

D2-R294 変異株はプロトン排出経路でないと考えられる水素結合ネットワークに関与している。この D2-R294 変異株では PSII の分子構築により強い光が必要であると考えられ、この水素結合ネットワークと Mn₄CaO₅ クラスターや PSII の分子集合の関連性を調べる必要があると考えられる。

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](計0件)

[学会発表](計14件)

黒田洋詩, 兒玉なつ美, 孫小羽, 菓子野康浩, 高橋裕一郎, D1 タンパク質の N298 残基は Y_Z の機能に重要である, 第 9 回日本光合成学会年会およびシンポジウム, 2018 年 5 月 26 日~27 日, 東北大学青葉山新キャンパス 青葉山コモンズ(宮城県仙台市)

黒田洋詩, 兒玉なつ美, 孫小羽, 菓子野康浩, 高橋裕一郎, PSII の水素結合ネットワーク Y_Z 経路はプロトン排出に関与するか?, 第 59 回日本植物生理学会年会, 2018 年 3 月 28 日~29 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

黒田洋詩, 上田和世, 岡本真奈, 二宮亮, 肥田千聖, 高橋裕一郎, 光化学系 II サブユニットへのアミノ酸置換と系 II 活性への影響, 日本植物学会第 81 回大会, 2017 年 9 月 8 日~10 日, 東京理科大学野田キャンパス(千葉県野田市)

黒田洋詩, 岡本真奈, 高橋裕一郎, PSII 活性における D2 タンパク質の R294 残基の役割, 第 8 回日本光合成学会年会およびシンポジウム, 2017 年 5 月 27 日~28 日, 龍谷大学瀬田キャンパス(滋賀県瀬田市)

Hiroshi Kuroda, Kazuyo Ueda, Mana Okamoto, Ryo Ninomiya, Chisato Hida, Yuichiro Takahashi, Role of Arg-294 of D2 subunit on photosystem II activity in *Chlamydomonas reinhardtii*, 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017 年 3 月 16 日~17 日, 鹿児島大学郡山キャンパス(鹿児島県鹿児島市)

Hiroshi Kuroda, Natsumi Kodama, Kazuyo Ueda, Yasuhiro Kashino, Yuichiro Takahashi,

Mutation at Asn298 of D1 subunit on photosystem II impairs S state transition, Satellite Meeting on Photosynthesis, 2016 年 7 月 1 日~2 日, Seminar House, Kyoto University Yoshida Campus (Kyoto, Japan)

Hiroshi Kuroda, Natsumi Kodama, Kazuyo Ueda, Yasuhiro Kashino, Yuichiro Takahashi, Mutation at Asn298 of D1 subunit on photosystem II impairs S state transition, 17th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, 2016 年 6 月 26 日~7 月 1 日, Kyoto International Conference Center (Kyoto, Japan)

黒田洋詩, 岡本真奈, 高橋裕一郎, 緑藻クラミドモナスにおける光化学系 II 反応中心 D2 タンパク質の R294 への変異の影響, 第 7 回日本光合成学会年会およびシンポジウム, 2016 年 5 月 27 日~28 日, 東京理科大学葛飾キャンパス(東京都葛飾区)

Kazuyo Ueda, Hiroshi Kuroda, Natsumi Kodama, Yasuhiro Kashino, Yuichiro Takahashi, The effects of amino acid substitutions of D1-Asp-61 on the function of the oxygen evolving Mn₄CaO₅ cluster, 第 57 回日本植物生理学会年会, 2016 年 3 月 18 日~20 日, 岩手大学上田キャンパス(岩手県盛岡市)

Hiroshi Kuroda, Mana Okamoto, Yuichiro Takahashi, Effect of amino acid substitutions at Arg-294 of D2 subunit on photosystem II activity in *Chlamydomonas reinhardtii*, 第 57 回日本植物生理学会年会, 2016 年 3 月 18 日~20 日, 岩手大学上田キャンパス(岩手県盛岡市)

黒田洋詩, 岡本真奈, 高橋裕一郎, 緑藻クラミドモナスにおける光化学系 II サブユニットのアミノ酸置換と活性への影響, 日本植物学会第 79 回大会, 2015 年 9 月 6 日~8 日, 朱鷺メッセ・新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)

黒田洋詩, 岡本真奈, 高橋裕一郎, クラミドモナス葉緑体形質転換による光化学系 II サブユニットのアミノ酸置換とその影響, 第 12 回クラミドモナス研究会, 2015 年 9 月 3 日~4 日, 中央大学後楽園キャンパス(東京都文京区)

上田和世, 黒田洋詩, 兒玉なつ美, 菓子野康浩, 高橋裕一郎, 光化学系 II 酸素発生系近傍の水素結合ネットワークに関与 D1 タンパク質上の Asp-61 の役割の解析, 第 6 回日本光合成学会年会および公開シンポジウム, 2015 年 5 月 22 日~23 日, 岡山国際交流センター(岡山県岡山市)

黒田洋詩, 兒玉なつ美, 上田和世, 孫小羽,

菓子野康浩，高橋裕一郎，PSII 反応中心 D1 サブユニットの Asn-298 への変異導入と酸素発生活性への影響，第 6 回日本光合成学会年会および公開シンポジウム，2015 年 5 月 22 日～23 日，岡山国際交流センター（岡山県岡山市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒田 洋詩 (KURODA, Hiroshi)
岡山大学・異分野基礎科学研究所・特別契約職員 (講師)
研究者番号：80381903

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()