

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19085

研究課題名（和文）全可視光を吸収する光合成色素蛋白質の創出

研究課題名（英文）Molecular design of light-harvesting complex absorbing whole visible light

研究代表者

長尾 遼（Nagao, Ryo）

岡山大学・異分野基礎科学研究所・特任講師

研究者番号：30633961

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、光合成生物の集光性色素タンパク質（LHC）を分子設計し、アポタンパク質に対する色素分子の結合選択制およびホロタンパク質の機能を明らかにし、広範囲の可視光を捉えることができるLHCの創出を目指す。大腸菌によるLHCの発現系を構築および色素分子の再構成し、リコンビナントLHCの機能評価を行った。タンパク質発現系によるLHCのホロタンパク質発現は困難であるため、リフォールディングによる再構成系を選択した。その結果、異種光合成生物由来の色素分子も再構成することを見出した。つまり、LHCは色素分子の結合における特異性があるわけではなく、自由に結合する可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、褐色LHCに陸上植物の色素分子が結合することを示した。このことは、どの生物種のLHCでも多様な色素分子を結合することを示唆した。この成果は、光合成生物の光捕集系を自在に変える分子デザインを基盤とした光合成の実現につながり、将来的にはどんな光エネルギーでも高効率の光合成を行う人工光合成生物の創出への展望が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aims to molecularly design light-harvesting complexes (LHCs) of photosynthetic organisms, to clarify the binding selectivity of pigment molecules to LHC apoproteins and the function of holoproteins, and to create LHCs that can capture a wide range of visible light. We constructed an expression system of LHCs by *E. coli*, and then reconstituted pigment molecules with the expressed LHCs. We also examined the function of reconstituted LHCs. Since it is difficult to make an expression of holo-LHCs by *E. coli*, we chose the reconstituted system by refolding. As a result, pigment molecules from not only diatoms but also land plants were bound to the recombinant LHCs, suggesting that LHCs do not have specificity in the binding of pigment molecules irrespective of the species of photosynthetic organisms.

研究分野：光合成

キーワード：光合成 植物・藻類 集光性色素タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光合成生物は、太陽光エネルギーを捕集するために集光性色素タンパク質 (Light-harvesting complex, LHC) を発達させてきた。LHCは光合成生物毎に種類が異なり、結果として見た目の色の違いが生じる。色の要因は可視光を吸収する色素分子にあり、主要色素としてクロロフィル (Chlorophyll, Chl) とカロテノイド (Carotenoid, Car) が存在する。ChlやCarは多種多様であり、それらが結合するLHCのタンパク質組成や構造もまた異なるため、結果として光合成生物毎に捕集する光エネルギーの波長が異なる。これは、ChlやCarの種類や数にのみ依存するのではなく、それら色素分子の相互作用も重要になる。したがって、もしLHC内のChlやCarの種類および結合様式を自在に設計することができれば、可視光領域の全波長を吸収するLHCを創ることが可能かもしれない。

褐色を呈する藻類のLHCの主要色素はChl *a*, Chl *c*, fucoxanthin, diadinoxanthinであり、緑色を呈する陸上植物や緑藻のLHCの主要色素Chl *b*, lutein, violaxanthin, zeaxanthin, neoxanthinとは吸収波長が異なる [Falkowski et al., 2004 Science]。褐色LHCの立体構造は解かれており[Wang et al., 2019 Science]、緑色LHCと比較するとタンパク質の立体構造や色素結合サイトが異なる。このように構造基盤が得られている褐色LHCであるが、各色素の選択制および結合様式さらにはタンパク質の安定性はどのようにして制御されているのだろうか？例えば、褐色LHCのChl *c*結合サイトにChl *b*は結合するのか？、fucoxanthin結合サイトにluteinは結合するのか？、各色素はタンパク質の構造安定にどのように寄与するのか？、このような問題が未だ明らかになっていない。

応募者は、光合成生物のLHCについての機能構造研究をこれまでに行っており、特に珪藻LHCの機能構造研究を通して「色素分子の種類に互換性はあるのか？、結合サイトは変えることができるのか？」などに興味を持つようになった。しかし、LHCは昆虫細胞や大腸菌といった発現系でのホロタンパク質の調製が極めて難しいことはわかっていた。この理由は「ChlやCar合成酵素は光合成生物に特有かつその数が多いため、タンパク質発現系生物への遺伝子導入が困難」という点が大きい。つまり、発現系生物の膜内にLHCを内包させつつ、色素分子を導入することは現時点では不可能である。そこで封入体を用いた色素分子の再構成系に着手した。封入体内のタンパク質を変性させリフォールディングすることにより、ホロタンパク質を再構成する系は古くから使用されている。これを褐色LHCで試した結果、色素の再構成および褐色LHCのリフォールディングができたため、この系を用いて上記の興味に対する研究を行うという着想に至った。色素分子の結合および選択メカニズムが明らかになれば、分子デザインに基づいて吸収波長を変えたLHCの創出が可能となり、ひいては可視光の全波長成分を吸収できる万能型LHCを創出することが期待できる。

2. 研究の目的

本研究は、分子設計した褐色LHCを用いてアポタンパク質に対する色素分子の結合選択制およびホロタンパク質の機能を紐解くことにより、吸収波長を変化させた褐色LHCの分子メカニズムを明らかにする。また、褐色LHCの研究を足掛かりとし、広範囲の可視光を捉えることができるLHCの創出を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、大腸菌による褐色LHCの発現系を構築および色素分子の再構成、リコンビナント褐色LHCの生化学および分光学的な機能評価、色素結合サイトへの部位特異的変異導入・

発現・機能評価、について段階的に課題を解決し、分子デザインに基づく新奇の褐色LHCを作成し、その機能を評価する。具体的な方法を以下に記述する。

大腸菌による褐色LHCの発現：予備データ(図1)であるが、褐色LHCの遺伝子をコードするプラスミドを発現系大腸菌C41(DE3)に形質転換し、IPTGによる発現誘導を行ったところ、封入体への発現を確認した。Chl *a*, Chl *c*, fucoxanthin, diadinoxanthinの混合物と共に封入体のリフォールディングを試したところ、立体構造解析によって得られた野生型褐色LHCと同程度の分子量を持つリコンビナント褐色LHCが再現できた。しかし、吸収スペクトルが野生型とリコンビナント褐色LHCでは大きく異なるため、リフォールディングの改良および精製方法を検討する。次に、色素分子を選択し、個別にリフォールディングする。Chl *a*, Chl *c*, fucoxanthin, diadinoxanthinのどれが褐色LHCの安定性に寄与するかを明らかにする。さらに、他の生物の色素分子の再構成を試みる。現在、Chlは6種類、Carは10種類が少なくとも光合成生物のLHCで確認されている。これらを再構成させ、褐色LHCにはChl *a*, Chl *c*, fucoxanthin, diadinoxanthinでなければならない理由を模索する。

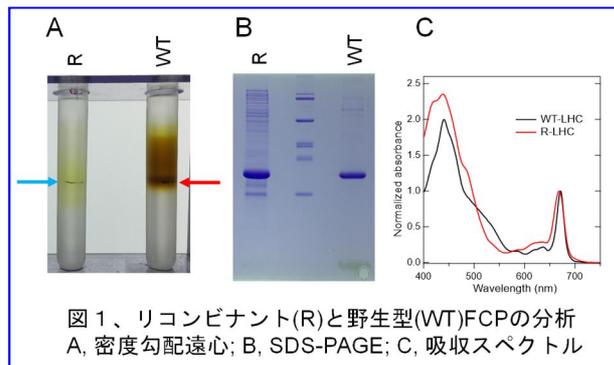


図1、リコンビナント(R)と野生型(WT)FCPの分析
A, 密度勾配遠心; B, SDS-PAGE; C, 吸収スペクトル

リコンビナント褐色LHCの機能評価：褐色LHCの評価には、タンパク質電気泳動、ゲルろ過クロマトグラフィー、紫外可視分光、高速液体クロマトグラフィーを用いる。

部位特異的変異体の作成および機能評価：色素結合サイトの周辺に部位特異的変異を挿入し、色素分子の配位子となりえるアミノ酸を同定する。変異体の機能評価により、個々の色素分子の役割を明らかにする。

4. 研究成果

リコンビナントLHCと野生型褐色LHCの吸収スペクトルの差異が課題になっていたため、より良いリコンビナントLHCの再構成条件を模索した。リフォールディングの方法と色素分子の比率など、複数の条件を試した。しかし、両方で吸収スペクトルは一致しなかった。この要因として、色素分子の安定性が挙げられる。色素分子のうち、Chl *c*とフコキサンチンが温度や精製条件に応じて、変性しやすいことが判明した。また、リコンビナントLHCの再構成において、100℃で処理する過程がある。100℃処理ではChl *c*とフコキサンチンが変性していることを確認したため、再構成の方法を一から検討する必要がある。加えて、色素分子が結合できたとしても、その結合は緩く、条件によっては容易に脱離してしまうことが判明した。

次に、褐色LHCアポタンパク質と陸上植物の色素分子の再構成を試みた。発現系大腸菌C41(DE3)を用いて、LHCを封入体へ発現させた。Chl *a*, Chl *b*, luteinといった陸上植物由来の色素混合物と封入体を混ぜ、リフォールディングを試したところ、陸上植物の色素を結合したリコンビナント褐色LHCが精製できた。これは、LHCが色素分子種に依存しない色素結合能を有していることを示唆した。しかし、褐色色素の再構成と同様に、色素分子の結合が緩く、精製条件によっては脱離してしまうことが判明した。

褐色LHCの色素結合部位と考えられるアミノ酸に部位特異的変異を導入する計画であったが、上述したように変異導入していない発現系で条件が決まらなかったため、発現評価には至らなかった。

以上のように、褐色LHCを大腸菌で発現させ、不溶性画分をリフォールディングすることによ

り、リコンビナントLHCのより良い条件を模索したが、いくつかの解決しなければならない課題が残る結果となった。緑色LHCでは本研究で示したような再構成条件で野生型LHCに匹敵する複合体が形成される。褐色LHCと緑色LHCの違いは、褐色LHC特有の性質に起因するのかもしれない。しかし、本研究により、どの生物種のLHCでも多様な色素分子を結合する可能性が示唆された。今後は、本研究で見出された課題を克服することで、光合成生物の光捕集系を自在に変える分子デザインを基盤とした光合成設計に挑戦していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kumazawa Minoru, Nishide Hiroyo, Nagao Ryo, Inoue Kashino Natsuko, Shen Jian Ren, Nakano Takeshi, Uchiyama Ikuo, Kashino Yasuhiro, Ifuku Kentaro	4. 巻 174
2. 論文標題 Molecular phylogeny of fucoxanthin chlorophyll a/c proteins from <i>Chaetoceros gracilis</i> and <i>Lhcq/Lhcf</i> diversity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 <i>Physiologia Plantarum</i>	6. 最初と最後の頁 e13598
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ppl.13598	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagao Ryo, Yokono Makio, Ueno Yoshifumi, Nakajima Yoshiki, Suzuki Takehiro, Kato Ka-Ho, Tsuboshita Naoki, Dohmae Naoshi, Shen Jian-Ren, Ehira Shigeki, Akimoto Seiji	4. 巻 1863
2. 論文標題 Excitation-energy transfer in heterocysts isolated from the cyanobacterium <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 as studied by time-resolved fluorescence spectroscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 <i>Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics</i>	6. 最初と最後の頁 148509 - 148509
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbabi.2021.148509	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koji Kato, Ryo Nagao, Yoshifumi Ueno, Makio Yokono, Takehiro Suzuki, Tian-Yi Jiang, Naoshi Dohmae, Fusamichi Akita, Seiji Akimoto, Naoyuki Miyazaki, Jian-Ren Shen	4. 巻 13
2. 論文標題 Structure of a tetrameric photosystem I from a glaucophyte alga <i>Cyanophora paradoxa</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 <i>Nature Communications</i>	6. 最初と最後の頁 1679
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-29303-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nagao Ryo, Kato Koji, Kumazawa Minoru, Ifuku Kentaro, Yokono Makio, Suzuki Takehiro, Dohmae Naoshi, Akita Fusamichi, Akimoto Seiji, Miyazaki Naoyuki, Shen Jian-Ren	4. 巻 13
2. 論文標題 Structural basis for different types of hetero-tetrameric light-harvesting complexes in a diatom PSII-FCPII supercomplex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 <i>Nature Communications</i>	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-29294-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kato Koji, Hamaguchi Tasuku, Nagao Ryo, Kawakami Keisuke, Ueno Yoshifumi, Suzuki Takehiro, Uchida Hiroko, Murakami Akio, Nakajima Yoshiki, Yokono Makio, Akimoto Seiji, Dohmae Naoshi, Yonekura Koji, Shen Jian-Ren	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural basis for the absence of low-energy chlorophylls in a photosystem I trimer from <i>Gloeobacter violaceus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.73990	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagao Ryo, Kato Koji, Hamaguchi Tasuku, Ueno Yoshifumi, Tsuboshita Naoki, Shimizu Shota, Furutani Miyu, Ehira Shigeki, Nakajima Yoshiki, Kawakami Keisuke, Suzuki Takehiro, Dohmae Naoshi, Akimoto Seiji, Yonekura Koji, Shen Jian-Ren	4. 巻 14
2. 論文標題 Structure of a monomeric photosystem I core associated with iron-stress-induced-A proteins from <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-36504-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 長尾遼
2. 発表標題 珪藻の光化学系光捕集超分子複合体の機能構造解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長尾遼
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡を用いた光合成色素タンパク質超分子複合体の立体構造解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡大学農学部 応用生命科学科 応用光合成学研究室
<https://nagaolab.wixsite.com/website>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------