

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06295

研究課題名(和文) 光合成電子伝達に必須なシトクロムbc複合体を機能相補する新規電子伝達酵素の同定

研究課題名(英文) Identification of novel electron transfer enzymes functionally complementing cytochrome bc1 complex working in photosynthetic electron transfer pathways

研究代表者

永島 賢治 (Nagashima, Kenji)

神奈川大学・付置研究所・研究員

研究者番号：80264589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：光合成の電子伝達過程において必須の構成要素とされるシトクロムbc1複合体を、人為的に欠落させた紅色細菌変異株が、光合成生育能を維持することを初めて示した。このことはシトクロムbc1が果たすキノール酸化および水溶性電子伝達体の還元機能を肩代わりする未知の酵素タンパク質の存在を示唆している。この未知酵素タンパク質の精製には至らなかったが、この酵素によって還元され、光化学反応中心への電子供与体となる水溶性タンパク質が、本来は亜酸化窒素の還元に働く単ヘムのシトクロムcであることを突き止めた。また、光化学反応中心が供給するキノールがどのような経路でシトクロムbc1へ至るか、可視化することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光合成電子伝達という、よく研究されその構成要素も固定されてきた反応系が、別の構成要素を利用し別の電子伝達反応系と動的にリンクしうることが分かったことが最大の成果である。加えてその過程の一部を可視化できたことも学術的に大きな成果であると言える。これらの成果を活用し、シトクロム等の構成要素の欠落や導入、あるいは部位特異的変異の導入により、光合成の電子の流れを人為的に変え、有用物質の大量合成や環境浄化に利用できるようになると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Cytochrome bc1 complex has been considered as an essential component in photosynthetic electron transport processes. However, it was first shown in this study that a mutant of purple bacteria lacking the genes coding this complex is capable of photosynthetic growth ability. This suggests a presence of novel enzymes complementing the function of the cytochrome bc1 which oxidizes quinols and reduces soluble electron carriers. Although such novel enzymes could not be isolated, a soluble protein reduced by these novel enzymes and working as an electron donor to the photochemical reaction center was identified as a mono-heme cytochrome c which natural function is reduction of nitrous oxygen. And, a process of transferring the quinol molecules derived from the photochemical reaction centers to the cytochrome bc1 complex was successfully visualized.

研究分野：生体エネルギー変換

キーワード：光合成電子伝達 シトクロム 紅色細菌 遺伝子操作

1. 研究開始当初の背景

植物やシアノバクテリアの光合成では、光エネルギーを取り込む反応場として2種類のクロロフィル結合タンパク質複合体が働いている。一つは光化学系1反応中心複合体と呼ばれ、水溶性電子伝達タンパク質から電子を受け取り、光エネルギーによって高エネルギー状態となった電子で鉄-硫黄タンパク質を還元する膜結合タンパク質複合体で、もう一つは光化学系2反応中心複合体と呼ばれ、水を電子供与体として用い、光エネルギーによってその電子をキノン分子の還元利用している。2つの反応中心複合体はシトクロム b_6/f 複合体の仲介によって一連の電子伝達鎖を形成し、その過程は‘Zスキーム’として知られている。これら2種類の光化学反応中心の起源は、バクテリオクロロフィルを用いる細菌の光合成にあると考えられるが、これらのいわゆる光合成細菌は光化学系1型(鉄-硫黄型)または光化学系2型(キノン型)のいずれかの反応中心複合体の一方のみを持っている。おそらくこれら光合成細菌の光化学系のいずれかが遺伝子水平移動などを経て融合した結果がZスキームなのであろうが、興味深いのは光化学系が一つだけであっても、その電子の授受にシトクロム b_6/f のオルトログが利用されていることである。紅色光合成細菌においてはシトクロム b_{c1} 複合体として知られ、反応中心 キノンプールシトクロム b_{c1} 複合体 水溶性電子運搬体 反応中心という循環的な光合成電子伝達経路の中核をなしており、一方では酸素呼吸や各種無機呼吸の電子伝達鎖でも中心的な役割を果たし、キノールから電子を受け取るとともに生体膜を隔てたプロトン輸送を行う。このように、各種電子伝達に不可欠と見なされるシトクロム b_6/f b_{c1} オルトログは、広く古細菌(アーキア)にも見られるが、細菌の系統学上もっとも古く分岐したと考えられる繊維状非酸素発生型光合成細菌には見いだせず、代わりにACIII(Alternative Complex III)と呼ばれるシトクロム c 複合体が報告されている。いずれにせよ、光合成によるエネルギー変換過程の成立には、反応中心と対をなすこれらキノール酸化/水溶性電子伝達タンパク質還元酵素が必須である。よく研究されている紅色光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* を始め、本研究で使用する *Rubrivivax gelatinosus* のS1株においてもシトクロム b_{c1} 複合体遺伝子の欠損株は光合成による生育が不可能と報告されている。

しかし申請者は紅色光合成細菌 *Rubrivivax gelatinosus* IL144株を用いて、シトクロム b_{c1} 複合体を欠いても光合成による増殖が維持されることを見だし、同様な機能を持つ新規膜タンパク質複合体の存在を予見している。また同様に、これまで同株において、光化学反応中心複合体への電子供与体として単ヘム型のシトクロム c だけでなく、2ヘム型シトクロム c_4 や鉄-硫黄タンパク質(HiPIP)など、少なくとも5種類の電子供与体が働くことを紙上発表している。これらの電子供与体は光合成と他のエネルギー代謝で共有され、互いの電子伝達経路をリンクさせ得るものと考えられる。興味深いことは、これら5種類の電子伝達タンパク質を全て欠く変異株を作成しても光合成による生育能が失われなかったことで、他に未知の電子伝達機構があることが推測されている。

2. 研究の目的

本研究は光化学反応中心複合体によって供給される還元力、特にキノールがシトクロム b_6/f b_{c1} 複合体によって酸化されるという、よく知られた電子伝達過程が唯一の経路ではないことを示すことを目標とした。シトクロム b_6/f b_{c1} 複合体とは起源の異なるキノール酸化/水溶性シトクロム還元酵素が、光合成による生育に必要なレベルのプロトン輸送を成しうることを示し、さらにはこのような新規電子伝達タンパク質複合体の生理・生化学的同定と遺伝子解析を推進し、光合成電子伝達鎖の進化過程や、他の代謝経路との結びつきを明らかにすることを具体的な目標とした。本研究により、エネルギー変換酵素の分子進化や、各種光合成細菌における光合成の生理・生化学的位置づけが一層明確となり、さらには光合成電子伝達の人工的改変による応用研究も発展させると期待した。

3. 研究の方法

紅色光合成細菌 *Rubrivivax gelatinosus* IL144株から5種類の水溶性電子伝達タンパク質(HiPIP、低電位および高電位シトクロム c_6 、シトクロム c_4 、NirM)と反応中心結合型シトクロムサブユニットを除去した6重欠損株(光合成生育可)を親株として、さらにシトクロム b_{c1} 複合体の各サブユニット(FeSタンパク質、シトクロム b 、シトクロム c_1)をコードする遺伝子(*petABC*)と、新規酵素(ET1と仮称：4ヘム型のシトクロム c 、FeSタンパク質および膜貫通タンパク質より成る)を人為的にそれぞれ欠落させた株(*pet* および ET1株) および両方欠落させた株(*pet/ET1*株)を作成し、以下の生理・生化学試験を行った。

- (1) 変異株を好気・暗条件、嫌気・光条件など様々な環境下で培養し、生育速度や光合成器官の合成量の違いを評価した。
- (2) 変異株の膜標品(クロマトフォア)および粗精製物を用いて、定常光照射および閃光照射時間分解分光測定を行い、シトクロム等の関与や反応速度を解析した。

- (3) ET1 を構成すると考えられる 4 ヘムチトクロム c_5 FeS タンパク質、膜貫通タンパク質それぞれの遺伝子に、ヒスチジン・タグを導入し、単離・精製を試みた。また、特異的な抗体を作成して、菌体内での発現量を評価した。
- (4) 光合成培養した *pet*/ET1 株に大量のシトクロム c_5 (NosC) が蓄積していたことから、未知のキノール酸化/水溶性シトクロム還元酵素は窒素還元(脱窒)に関連する膜タンパク質の可能性があると考え、関連する遺伝子 (*nosR*: 亜酸化窒素還元酵素、*dmsABC*: DMSO 還元酵素、*norCB*: 酸化窒素還元酵素、*nosC*: 単ヘムのシトクロム c_5) を網羅的に欠落させ、光合成条件下での生育の可否を調べた。
- (5) 紅色光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* および近縁の光合成種を用いて、光捕集複合体の構成要素を遺伝子レベルで同定し、必要に応じて部位特異的変異を導入して、その構造をクライオ電子顕微鏡法(茨城大学理学部・大友征宇教授らとの共同研究)で観察した。

4. 研究成果

- (1) シトクロム bc_1 複合体欠損株 (*pet* 株) は、他の紅色細菌では光合成による生育が不可となることが知られているが、*R. gelatinosus* ではわずかな増殖が認められた(右図)。これは、*R. gelatinosus* にはシトクロム b_6f 複合体の機能を相補する未知のタンパク質複合体があることを示唆しているが、その候補として ET1 複合体と仮称するタンパク質複合体を提案した。この ET1 とシトクロム bc_1 複合体の 2 重欠損株 (*pet*/ET1 株) は光合成による生育が当初は不可と判定したが、培養を 10 日間以上継続することにより光合成生育を回復したサプレッサー変異体が現れ、第 3 のキノール酸化/水溶性チトクロム還元酵素の存在が予想された。

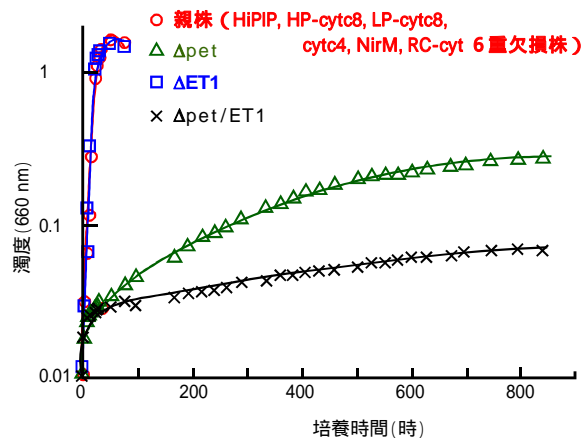


図 1 紅色光合成細菌 *R. gelatinosus* 変異株の光合成培養条件(光照射・嫌気)での成長曲線

- (2) *pet* 株の膜タンパク質画分を未変性状態でゲル電気泳動にて分画(Blue-Native PAGE)したところ、ET1 複合体は遺伝子情報から推定された通り、約 24 kDa の *c* 型シトクロムと 38 kDa の鉄-硫黄(FeS)タンパク質、および 42 kDa の膜貫通タンパク質の 3 つから成る複合体であることが示唆された。この画分に対し酸化還元滴定をおこなうと、中点電位が +194 mV および +358 mV の 2 種類の成分が、およそ 1:3 の比で検出され、後者の成分は 555 nm に吸収ピークを持つ *c* 型ヘムであることが確認された。
- (3) ET1 を構成すると思われる上記の 3 つのタンパク質のアミノ酸配列に基づく抗体をそれぞれ作成し、免疫学的な検出(ウエスタン・ブロッティング)を試みたところ、*pet* 株にも親株にも検出されなかった。また、ET1 株にこれら 3 つのタンパク質をヒスチジン・タグで修飾した遺伝子を再導入してアフィニティカラムで分離しても、何ら精製するに至らなかった。(2) で ET1 構成物として分画されたタンパク質をマス・スペクトル解析したところ、これらは ET1 とは無関係なタンパク質であることが分かった。ただし、*c* 型シトクロムについては単ヘム型のシトクロム c_5 (NosC) であることが明らかとなった。ET1 はおそらく発現量が非常に低いタンパク質複合体で、十分量の標品を得るためには遺伝子の強制発現等を検討すべきと思われる。
- (4) *pet*/ET1 サプレッサー変異株を親株として、さらに *nosC* を欠落させた多重変異株は光合成による生育能を完全に失った。このことから NosC は、第 3 のキノール酸化/水溶性チトクロム還元酵素から電子を受け取り、光化学反応中心を還元する電子伝達成分であることが明らかになった。一方、*nosR*、*dmsABC*、*norCB* の欠落は光合成による生育に何ら影響を与えなかったことから光合成電子伝達に参与しないことが示された。第 3 のキノール酸化/水溶性チトクロム還元酵素の同定は、今後の課題として残った。

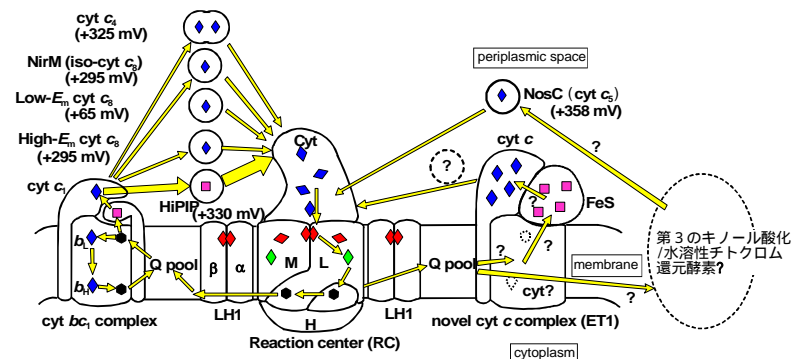


図 2 紅色光合成細菌 *R. gelatinosus* において予想される光合成電子伝達経路

- (5) 紅色非硫黄光合成細菌 *R. sphaeroides* の光捕集複合体 1(LH1) を紅

色硫黄光合成細菌 *Thermochromatium tepidum* のものに置き換えた変異株を用い、波長特性の異なる異種間でも LH1 から反応中心へのエネルギー移動が起こることと、反応中心を円環状に取り囲む LH1 複合体の存在によって反応中心からシトクロム bc_1 複合体へのキノール移動がむしろ促進されることを示した。また、*R. sphaeroides* の LH1 複合体には protein-U と名付けた新規膜タンパク質が含まれていて、キノール輸送のためのゲート構造維持に役立っていることを視覚化した。さらに、*T. tepidum* に近縁な *Allochromatium tepidum* の LH1 では LH1 のコア・サブユニットである および サブユニットに3つの異なるセットがあり、決まった量比で構造を作り上げていることや、好酸性の紅色非硫黄光合成細菌 *Rhodospila globiformis* では ・ サブユニットに加え サブユニットが等モル比で含まれ、キノール通過のための隙間を作っていることなども視覚化した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nagashima Kenji V. P., Nagashima Sakiko, Kitashima Masaharu, Inoue Kazuhito, Madigan Michael T., Kimura Yukihiro, Wang-Otomo Zheng-Yu	4. 巻 60
2. 論文標題 Photosynthetic Growth and Energy Conversion in an Engineered Phototroph Containing Thermochromatium tepidum Light-Harvesting Complex 1 and the Rhodobacter sphaeroides Reaction Center Complex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2685 ~ 2690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.1c00462	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 該当する
1. 著者名 Tani Kazutoshi, Nagashima Kenji V. P., Kanno Ryo, Kawamura Saki, Kikuchi Riku, Hall Malgorzata, Yu Long-Jiang, Kimura Yukihiro, Madigan Michael T., Mizoguchi Akira, Humbel Bruno M., Wang-Otomo Zheng-Yu	4. 巻 12
2. 論文標題 A previously unrecognized membrane protein in the Rhodobacter sphaeroides LH1-RC photocomplex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-26561-9	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 該当する
1. 著者名 Yoneda Y, Kato D, Kondo M, Nagashima KVP, Miyasaka H, Nagasawa Y, Dewa T	4. 巻 143
2. 論文標題 Sequential energy transfer driven by monoexponential dynamics in a biohybrid light-harvesting complex 2 (LH2)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Photosynthesis Research	6. 最初と最後の頁 115 ~ 128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11120-019-00677-y	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 Kimura Yukihiro, Hashimoto Kanako, Akimoto Seiji, Takenouchi Mizuki, Suzuki Kengo, Kishi Rikako, Imanishi Michie, Takenaka Shinji, Madigan Michael T., Nagashima Kenji V. P., Wang-Otomo Zheng-Yu	4. 巻 57
2. 論文標題 Biochemical and Spectroscopic Characterizations of a Hybrid Light-Harvesting Reaction Center Core Complex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 4496 ~ 4503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.8b00644	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 該当する

1. 著者名 Tani Kazutoshi, Kanno Ryo, Kikuchi Riku, Kawamura Saki, Nagashima Kenji V. P., Hall Malgorzata, Takahashi Ai, Yu Long-Jiang, Kimura Yukihiro, Madigan Michael T., Mizoguchi Akira, Humbel Bruno M., Wang-Otomo Zheng-Yu	4. 巻 13
2. 論文標題 Asymmetric structure of the native Rhodobacter sphaeroides dimeric LH1?RC complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-29453-8	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 該当する

1. 著者名 Tani Kazutoshi, Kanno Ryo, Kurosawa Keigo, Takaichi Shinichi, Nagashima Kenji V. P., Hall Malgorzata, Yu Long-Jiang, Kimura Yukihiro, Madigan Michael T., Mizoguchi Akira, Humbel Bruno M., Wang-Otomo Zheng-Yu	4. 巻 5
2. 論文標題 An LH1?RC photocomplex from an extremophilic phototroph provides insight into origins of two photosynthesis proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-04174-2	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 該当する

1. 著者名 Tani Kazutoshi, Kobayashi Kazumi, Hosogi Naoki, Ji Xuan-Cheng, Nagashima Sakiko, Nagashima Kenji V.P., Izumida Airi, Inoue Kazuhito, Tsukatani Yusuke, Kanno Ryo, Hall Malgorzata, Yu Long-Jiang, Ishikawa Isamu, Okura Yoshihiro, Madigan Michael T., Mizoguchi Akira, Humbel Bruno M., Kimura Yukihiro, Wang-Otomo Zheng-Yu	4. 巻 298
2. 論文標題 A Ca ²⁺ -binding motif underlies the unusual properties of certain photosynthetic bacterial core light-harvesting complexes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101967 ~ 101967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101967	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 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kenji V. P. Nagashima, Sakiko Nagashima, André Verméglio, Kazuhito Inoue
2. 発表標題 Cytochromes c working in the alternative cyclic electron transfer pathway of photosynthesis found in the beta-purple bacterium, Rubrivivax gelatinosus
3. 学会等名 International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永島賢治、永島咲子、佐藤剛、井上和仁
2. 発表標題 紅色細菌Rubrivivax gelatinosusの光合成における代替的な電子伝達循環経路の発見
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 嶋田 敬三、高市 真一	4. 発行年 2020年
2. 出版社 裳華房	5. 総ページ数 320
3. 書名 光合成細菌	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------