

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20608002
 研究課題名（和文） 表在性蛋白質に着目した光合成光化学系2超分子複合体のアセンブリーに関する研究
 研究課題名（英文） The study on the role of extrinsic proteins in assembly of photosystem 2 complex
 研究代表者
 水澤 直樹 (MIZUSAWA NAOKI)
 東京大学・大学院総合文化研究科・助教
 研究者番号：80342856

研究成果の概要（和文）：光化学系II複合体（PSII）の構築過程では、サブユニット、コファクター等多様な構成成分が秩序立てて組み込まれたのちにPSII二量体構造が完成する。本研究では、PSIIアセンブリーの仕組みをPSIIに結合する表在性タンパク質の機能解析の観点から明らかにすることを目的とした。Psb28はPSIIに結合する機能未知な表在性蛋白質である。シアノバクテリアを用いてPsb28をコードする遺伝子(*psb28*)を破壊したところ、遺伝子破壊株では、PSIIのアセンブリー中間体が蓄積し、PSIIの修復速度が低下することがわかった。以上の結果により、Psb28はPSIIの修復に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Mechanism of assembly of photosystem II complex (PSII) has been investigated focusing on the role of extrinsic proteins in the assembly process of PSII. Psb28 is a newly identified extrinsic protein bound to PSII but its function was unknown. In this study, we analyzed properties of PSII in a disruption mutant of *psb28* gene of cyanobacterium. It was found that, in the *psb28* mutant, PSII assembly intermediates were accumulated and that a repair process of PSII was significantly inhibited. These results suggest that Psb28 plays an important role in the repair process of PSII.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：光合成生物学

科研費の分科・細目：時限・光生命科学

キーワード：植物生理、シアノバクテリア、光合成、光化学系II、表在性蛋白質

1. 研究開始当初の背景

シアノバクテリアや植物の光合成では、チラコイド膜に埋め込まれた光化学系II(PSII)複合体が光合成反応系で最も重要な反応である酸素発生反応をおこなう。PSIIは20以上の蛋白質、クロロフィルなどの色素分

子、金属原子、キノン等から構成される超分子複合体であり、通常は二量体で存在する。反応中心は2つの相同な蛋白質D1とD2により構成され、全ての素反応（電荷分離、酸素発生、電子伝達反応）はD1/D2上でおこり、酸素発生はD1上に結合するMnクラスターに

より触媒される。Mn クラスタは単体では不安定であるため、PSII には Mn クラスタを覆うように複数の表在性蛋白質（シアノバクテリアでは5種類 Psb0、PsbU、PsbV、PsbP、PsbQ）が結合して、Mn クラスタの保護や機能の最適化に役立っている。近年、PSII の3次元構造は明らかになりつつあるが、PSII の動的側面、特に、各 PSII 構成蛋白質やコファクターのアセンブリーに関しては多くの謎が残されている。近年、私達は脂質合成を欠損したシアノバクテリア変異株では PSII のアセンブリーが異常になり、Psb27 や Psb28 等の新規表在性蛋白質を含むアセンブリー途上とみられる複合体が蓄積することを見出した。これら表在性蛋白質の機能を明らかにすることにより、PSII のアセンブリーの仕組み解明への重要な手がかりを与えることができるのではないかと、本研究を発想した。

また、シアノバクテリアでは Psb27 等の1部の表在性蛋白質はN末端において脂質修飾を受けるリポ蛋白質であると考えられているが、その脂質修飾の生理的意義はわかっていない。脂質修飾される蛋白質はN末端に特徴的なシグナル配列をもつ。このシグナル配列を付加、除去することにより、本来脂質修飾を受ける蛋白質を受けないように、逆に本来脂質修飾を受けない蛋白質を受けようにすることができることを期待される。この実験系を用いて、表在性蛋白質の脂質修飾の有無が PSII 複合体の特性に与える影響を調べることで光合成生物における脂質修飾の意義を解析できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、PSII のアセンブリーに関わると推測される表在性蛋白質に着目し、これらの機能を解明することにより、PSII のアセンブリーの分子機構を明らかにすることを第一の目的とする。

表在性蛋白質におけるN末側の脂質修飾のシグナル配列を置換することで、表在性蛋白質の脂質修飾を人工的に改変（付加したり、除去したりする）する実験系をつくり、これを用いて光合成における脂質修飾の意義を明らかにすることを第二の目的とする。

3. 研究の方法

(1) シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の CP47 C 末端に His タグを導入し

た株 (CP47-His) を遺伝子の変異を入れるホスト株として、*psb28* 遺伝子を抗生物質耐性カセットと置換することにより遺伝子破壊株を作製した。通常条件下および高温、強光等のストレス条件下で、各破壊株の増殖および光合成活性を比較した。PSII 標品を各株から単離し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) で PSII のサブユニット組成を解析した。PSII のアセンブリー状態は Blue-Native ゲル電気泳動 (Blue-Native PAGE) で解析した。

(2) Psb27、Psb28 を含む PSII アセンブリー中間体を単離するために、各蛋白質のN末端もしくはC末端に His タグを導入した *Synechocystis* sp. PCC 6803 変異株を作製した。各 His-タグ株から PSII 中間体を含むと想定される複合体を単離し、そのサブユニット組成を解析した。

(3) 脂質修飾を受ける表在性蛋白質として PsbQ (ジアシルグリセロールとアシル基による修飾)、Psb27 (ジアシルグリセロールによる修飾)、脂質修飾を受けない表在性蛋白質として Psb0 を選び、各蛋白質をコードする遺伝子の破壊株を作製した。表在性蛋白質のN末端シグナル配列をコードした領域を相互に交換したキメラ蛋白質をコードするキメラ遺伝子を作製した。次に、それらの遺伝子を各遺伝子破壊株に導入し、ゲノム中のニュートラルサイトに相同組換えによって組み込んだ。プロモーターは、それぞれのタンパク質のネイティブプロモーターを用いた。作製したキメラ蛋白質発現株を用いて光合成特性の解析を行った。

4. 研究成果

(1) PSII アセンブリーにおける Psb28 の機能解析

① *psb28* 遺伝子破壊株の解析

通常培養条件下で、 $\Delta psb28$ 株は野生株とほぼ同等に増殖し同等な光合成活性を保持していた。 $\Delta psb28$ 株のチラコイド膜を界面活性剤で可溶化後、Ni-アフィニティカラムクロマトグラフィーにより PSII 標品を調製したところ、そのサブユニット組成は Psb28 を欠失している以外は野生株と同様であった。このことは通常条件下では Psb28 がなくても PSII は正常に構築されることを意味している。

しかしながら、 $\Delta psb28$ 株は通常条件下で

は野生株と同様に増殖するが、高温条件で強光に曝すと増殖が抑えられることがわかった。すなわち、プレート培養においては通常条件 (30°C ; 20 $\mu\text{mol photons}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) では野生株と同様に増殖したが、高温条件 (38°C) で特に強光 (200 $\mu\text{mol photons}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) に曝したときに増殖が抑えられた。液体培養では上記の高温・強光条件では差がなかったが、40°C、強光条件 (200 $\mu\text{mol photons}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) では野生株に比べ、増殖遅延を示した。

Δpsb28 株は強光・高温条件で増殖阻害を示すことから、このような条件で Δpsb28 株は光合成の光阻害が促進している可能性があった。光照射下では、PSII 反応中心 D1 蛋白質は容易に光により損傷を受け、PSII の活性が失活する (光阻害と呼ばれる) ことが知られる。失活した PSII は損傷した D1 と新規に合成した D1 を入れ替え、PSII を再構築することにより修復される。通常条件では損傷速度と修復速度がつりあっているため、PSII 活性はみかけ上低下しない。高温・強光ストレス下では損傷速度が上昇するか修復速度が低下する (もしくは損傷上昇、修復低下が同時におこる) ために活性が低下してしまう (最終的に増殖が遅くなる) ことが予測された。

以上の仮説を検証するために、野生株と Δpsb28 株を用いて下記のような強光阻害実験を行った。光照射下で修復と失活は同時に進行する現象であるが、蛋白質合成阻害剤の存在下でおこる活性低下 (D1 の損傷による) と、阻害剤なしでもおこる活性低下 (D1 の損傷と修復による) を測定することで損傷速度と修復速度を区別することができる。蛋白質合成阻害剤リンコマイシン存在下で細胞を 40°C 強光処理したときに Δpsb28 株は野生株と同様な速度で PSII 活性が低下したことから、PSII の損傷は変異により影響を受けないことがわかった。一方、リンコマイシンを加えずに強光処理すると、顕著に Δpsb28 株で野生株に比べ大きな活性低下がおこることがわかった。30°C の強光処理では野生株と Δpsb28 株に活性低下速度に違いはみられなかった。以上の結果、強光・高温条件において、Psb28 の欠失は PSII 修復阻害をもたらすこと、すなわち、Psb28 は PSII 修復に関与していることが示唆された。本研究では、機能が全くわかっていなかった Psb28 について PSII の構築過程で重要な役割を果たす表在

性蛋白質であるという重要な知見を得ることができた。

Blue-Native Page 法を用いて、野生株と Δpsb28 株の PSII アセンブリー状態を解析した。野生株ではほとんどの PSII が二量体であったが、 Δpsb28 株では二量体が減少するとともに単量体が増加し、新たに CP43 サブユニットを欠いた単量体が蓄積することがわかった。ここで検出された単量体と CP43 サブユニットを欠いた単量体は PSII が二量体に構築される過程で生成するアセンブリー中間体であり、修復速度が低下しているためにこれら中間体が蓄積すると考えられた。この結果は Psb28 が PSII の修復に関与することを強く支持するものである。

②Psb27、Psb28 を含むアセンブリー中間体の単離

Psb27 の C 末端および Psb28 の N 末端もしくは C 末端に His-タグを付与した変異株から、アセンブリー中間体を単離することを試みた。しかしながら、現状ではいずれの株から単離した複合体も収率が低く、またアセンブリーに無関係のタンパク質も混入していた。今後は複合体の収率や精製度を上げる工夫が必要であると考えている。アセンブリー中間体の単離同定をさらに進め、その動的变化を明らかにすることで、PSII アセンブリーの全貌を解明したいと考えている。

(2) PSII における表在性蛋白質の脂質修飾の機能に関する解析

①キメラ蛋白質の発現解析

作製したキメラ蛋白質を発現する株からチラコイド膜を単離し、SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。その後、ウエスタン分析を行い、蛋白質の発現を調べた。その結果、PsbQ の成熟蛋白質に Psb27、PsbQ のシグナル配列を付加したものでは、蛋白質の発現が確認された。また、Psb0 の成熟タンパク質に Psb0 シグナル配列を付加したものでも、Psb0 蛋白質の発現が確認された。さらに、Psb27 の成熟蛋白質に Psb27、PsbQ のシグナル配列を付加したものでも蛋白質の発現が確認された。これらの結果から、脂質修飾を受ける蛋白質は、シグナル配列を他の脂質修飾を受ける蛋白質のシグナル配列に改変しても、蛋白質が発現するが、本来脂質修飾を受けない Psb0 のシグナル配列を付加した場合には発現しないことがわかった。また、脂質修飾を受けない Psb0 については、脂質修飾を受け

るタンパク質のシグナル配列を付加すると、蛋白質が発現しないことが明らかになった。一方、RT-PCRによる mRNA の解析により、キメラ蛋白質遺伝子の転写は正常に行われていることが確認された。蛋白質の発現レベルが株ごとに異なるのは、転写は原因ではなく、蛋白質の合成もしくは合成された蛋白質の安定性に違いがみられるためではないか、と考えられた。

②通常条件および高温・強光条件での光合成に依存する細胞増殖について

Psb0、PsbQ、Psb27、これら表在性蛋白質のうち Psb0 が光合成活性に最も重要な役割を果たすことが知られている。Psb0 欠損株 ($\Delta psb0$ 株)では、野生株に比べ光合成活性が半分以下になり、高温や強光といった環境ストレスに対して極めて弱くなる。PsbQ と Psb27 は通常条件では光合成に必須ではないが、ストレス条件下では重要な役割を示すのではないかと提唱されている。

各細胞で光合成に依存する増殖を解析したところ、予想されたように、 $\Delta psb0$ 株は野生株と比較して増殖が遅く、高温、強光条件でさらに増殖が遅くなった。Psb0 の成熟タンパク質に Psb27、PsbQ シグナル配列を付加した株についてもほぼ $\Delta psb0$ 株と同様に増殖が遅くなることがわかった。一方、元来の Psb0 シグナル配列を付加した株では、野生株と同様な増殖を示した。以上の結果は、Psb0 の発現が観察された株においてのみ、細胞は通常増殖能を示し、ストレスに対する光合成の安定性を保持していることを示している。

PsbQ と Psb27 の各々の欠損株 ($\Delta psbQ$ と $\Delta psb27$) は野生株と同様な増殖と光合成活性を示した。また、予想とは異なり、各々の株は高温・強光条件においても野生株と同等の増殖を示した。本実験での高温・強光条件には 38°C と $200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光を採用したが、 $\Delta psbQ$ と $\Delta psb27$ が野生株と増殖に違いが出るのはさらに厳しいストレス条件下なのかもしれない。

PsbQ の成熟蛋白質に他の表在性蛋白質のシグナル配列を付加した変異株群では、いずれも通常の培養条件では光合成に依存した増殖と活性は野生株と同等であった。高温・強光条件では Psb27 のシグナル配列を付加した 27-PsbQ においてのみ、特異的に増殖阻害がおこることがわかった。Psb27 の成熟蛋白質

に他の表在性蛋白質のシグナル配列を付加した変異株群も、いずれも通常の培養条件では光合成に依存した増殖と活性は野生株と同等であった。また、これもおもしろいことに、高温・強光条件で PsbQ のシグナル配列を付加した Q-Psb27 においてのみ増殖阻害がおこった。すなわち、PsbQ と Psb27 のシグナル配列を相互交換することにより、光合成装置のストレス感受性が增大することが明らかになった。PsbQ と Psb27 の脂質修飾の違いはその N 末端にアシル基による修飾があるかないかだけである。このような 1 種類の表在性蛋白質の脂質修飾様式の差が細胞のストレス感受性に大きな影響を与えるというのは、極めて興味深い発見である。これは光合成研究で脂質修飾が光合成装置の安定性に影響を与えたことを示す最初の例であると考えている。

今後は、この高温と強光に対する感受性が増大した 27-PsbQ と Q-Psb27 について各々の細胞から PSII 複合体を精製し、SDS-PAGE 後各バンドを切り出して、予想通りに脂質修飾が変化しているかどうか質量分析で確認する。また、精製 PSII 標品の特性を解析することにより、これらの変異株でストレス耐性が低下している原因を明らかにする。

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 5 件)

- ① Nanjo, Y., Mizusawa, N., Wada, H., Slabas, A. R., Hayashi, H., Nishiyama, Y. Synthesis of fatty acids de novo is required for photosynthetic acclimation of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to high temperature. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 1483-1490. (2010) 査読有り
- ② Kubota, H., Sakurai, I., Katayama, K., Mizusawa, N., Ohashi, S., Kobayashi, M., Zhang, P., Aro, E.M., Wada, H. Purification and characterization of photosystem I complex from *Synechocystis* sp. PCC 6803 by expressing histidine-tagged subunits. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 98-105. (2010) 査読有り

- ③ Mizusawa, N., Sakata, S., Sakurai, I., Sato N., Wada, H. Involvement of digalactosyldiacylglycerol in cellular thermotolerance of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch. Microbiol.* 191, 595-601. (2009) 査読有り
- ④ Mizusawa, N., Sakurai, I., Sato N., Wada, H. Lack of digalactosyldiacylglycerol increases the sensitivity of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to high light stress. *FEBS Lett.* 783, 718-722. (2009) 査読有り
- ⑤ Mizusawa, N., Sakurai, I., Kubota, H., Wada, H. Role of phosphatidylglycerol in oxygen-evolving complex of photosystem II. *In Energy from the Sun* (Allen, J.F., Gantt, E., Golbeck, J.H., Osmond, B., eds.) pp. 463-466, Springer. (2008) 査読有り

[学会発表] (計 14 件)

- ① 水澤直樹、酒田慎也、久保田寿子、桜井勇、和田元「高温ストレス下での *Synechocystis* sp. PCC 6803 における Psb28 の機能に関する研究」日本植物生理学会第 51 回年会 (2011) 3.20-22 (東北大学川内キャンパス、仙台)
- ② Mizusawa, N., Sakata, S., Sakurai, I., Kubota, H., Sato, N., Wada, H. Essential role of digalactosyldiacylglycerol for photosynthetic growth in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under high-light and high-temperature stresses. 日本-フィンランド交換セミナー2010 (2011) 3.2-5 (岡山ロイヤルホテル、岡山)
- ③ Wada, H., Katayama, K., Tanoue, R., Mizusawa, N. Roles of anionic phospholipids, phosphatidylglycerol and cardiolipin, in photosynthetic organisms. 日本-フィンランド交換セミナー2010 (2011) 3.3 (岡山ロイヤルホテル、岡山)
- ④ Mizusawa, N., Sakata, S., Sakurai, I., Kubota, H., Sato N., Wada, H. Essential role of digalactosyldiacylglycerol for photosynthetic growth in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under high-temperature stress. 15th International congress on photosynthesis. (2010) 8.22-27 (BeiJing friendship hotel, 北京)
- ⑤ 久保田寿子、水澤直樹、和田元「*Synechocystis* sp. PCC 6803 の光化学系 I における DGDG の機能」日本植物生理学会第 51 回年会 (2010) 3.18-21 (熊本大学黒髪北キャンパス、熊本)
- ⑥ 水澤直樹、酒田慎也、桜井勇、久保田寿子、佐藤直樹、和田元「高温ストレス下でのシアノバクテリアの光合成におけるジガラクトシルジアシルグリセロールの役割」かずさ DNA 研究所研究会「ラン藻の分子生物学 2009」(2009) 12.4-5 (かずさアカデミアホール、木更津)
- ⑦ 和田元、久保田寿子、片山健太、桜井勇、水澤直樹「光化学系 I 複合体の簡易精製と新規成分の同定」かずさ DNA 研究所研究会「ラン藻の分子生物学 2009」(2009) 12.5 (かずさアカデミアホール、木更津)
- ⑧ 西山佳孝、南條洋平、水澤直樹、和田元、林秀則「光化学系 II の高温適応における脂肪酸合成の役割」かずさ DNA 研究所研究会「ラン藻の分子生物学 2009」(2009) 12.5 (かずさアカデミアホール、木更津)
- ⑨ 水澤直樹、桜井勇、酒田慎也、久保田寿子、佐藤直樹、和田元「光合成を支える脂質の機能」ラン藻ゲノム研究交流会 (2009) 7.4 (東京大学教養学部、東京)
- ⑩ 久保田寿子、栗原梓、水澤直樹、和田元「シアノバクテリアにおける光化学系 II 表在性タンパク質の脂質修飾に関する研究」日本植物生理学会第 50 回年会 (2009) 3.21-24 (名古屋大学東山キャンパス、名古屋)
- ⑪ 水澤直樹、酒田慎也、桜井勇、佐藤直樹、和田元「ジガラクトシルジアシルグリセロールの欠乏は *Synechocystis* sp. PCC 6803 の熱感受性を増大させる」日本植物生理学会第 50 回年会 (2009) 3.21-24 (名古屋大学東山キャンパス、名古屋)
- ⑫ 内海真希、久保田寿子、水澤直樹、和田元「光化学系 II 複合体アセンブリーに関与する Psb27 タンパク質の機能解析」日本植物生理学会第 50 回年会 (2009) 3.21-24 (名古屋大学東山キャンパス、名古屋)
- ⑬ 酒田慎也、久保田寿子、桜井勇、水澤直樹、和田元「シアノバクテリアにおける

Psb28 タンパク質の機能解析」日本植物生理学会第 50 回年会 (2009) 3.21-24 (名古屋大学東山キャンパス、名古屋)

- ⑭ Kubota, H., Sakurai, I., Mizusawa, N., Zhang, P., Aro, E.M., Wada, H. Simple purification and characterization of PSI complex from the *Synechocystis* sp. PCC 6803 strains expressing His-tagged subunit. 7th European workshop on molecular biology of cyanobacteria (2008) 8.31-9.4 (University of South Bohemia, Ceske Budejovice, Czech Republic)

[図書] (計 1 件)

- ① Wada, H., Mizusawa, N. The role of phosphatidylglycerol in photosynthesis. In *Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Function* (Wada, H., Murata, N. eds.) pp. 243-263. Springer (2009)
査読有り

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水澤 直樹 (MIZUSAWA NAOKI)
東京大学・大学院総合文化研究科・助教
研究者番号 : 80342856

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし