

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06701

研究課題名(和文) 光化学系II複合体のアセンブリーと修復の動的な過程における脂質の機能

研究課題名(英文) Function of lipids in the dynamic assembly and recovery processes of photosystem II complex

研究代表者

和田 元 (Wada, Hajime)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：60167202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて、光化学系II (PSII) の修復における脂質の機能、特にリン脂質であるPGと糖脂質の1つであるMGDGの代謝回転の役割について、解析を行った。その結果、PSIIの修復過程では強光によって失活したPSIIにガラクトリパーゼ (LipA) が作用して二量体を単量体に解離させ、その単量体にホスホリパーゼ (Pla) が作用してCP43の解離を促し、D1の分解と再合成を促進することでPSIIの修復が起こることが明らかになった。これは、PSIIの修復過程における脂質の代謝回転の重要な役割を初めて明らかにした大変重要な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光は光合成に必要であるが、過剰な光エネルギーはPSIIの活性を低下させてしまう。この現象は光阻害と呼ばれ、植物の成長や物質生産を低下させる大きな要因となる。光阻害はPSIIが損傷する過程とそれを修復する過程とに分けられ、両者のアンバランスによって生じる。本研究で得られた成果は、損傷を受けたPSIIの修復に脂質の代謝回転が必要であることを初めて明らかにしたという点で独創的で学術的に大変意義深いものである。また、強光耐性植物の作製などにも重要な知見や指針を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we studied roles of lipids, especially roles of turnover of phospholipid (PG) and glycolipid (MGDG), in the repair process of photosystem (PS) II complex damaged under strong light in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. The results obtained in this study indicate that photodamaged PSII dimer is monomerized by the action of galactolipase (LipA), which degrades MGDG molecules in PSII dimer, then PG molecules in the resultant monomer is digested by phospholipase (Pla2) to facilitate degradation and synthesis of D1 that is required for recovery of photodamaged PSII. This is the first evidence that the turnover of MGDG and PG plays important roles in the recovery process of PSII damaged under high light condition.

研究分野：植物生理学

キーワード：シアノバクテリア *Synechocystis* PCC 6803 脂質 光合成 光化学系II 光阻害 ホスファチジルグリセロール モノガラクトシルジアシルグリセロール

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光化学系 II 複合体 (PSII) は、約 20 種類のタンパク質、クロロフィルやカロテノイドなどの色素、ホスファチジルグリセロール (PG)、スルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG)、ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG)、モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) の 4 つの脂質、Mn、Ca、Fe などの金属原子からなる超分子複合体である。PSII は、水を光エネルギーによって分解して電子を取り出すと同時に酸素を発生する反応を行い、光合成の初期過程において最も重要な機能を担っている。近年、X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡解析により、PSII の高分解能の構造が明らかとなり、その構造を基にした各構成分子の機能解析が活発に展開されている。しかし、完成型 PSII の結晶構造から PSII のアセンブリーや修復などの動的な過程における構成分子の機能 (動的機能) を推定することは難しい。動的機能を明らかにするには、PSII がアセンブルされるときや強光などによってダメージを受けた PSII が修復されて活性を回復するときに、各構成分子が各過程のどのステップでどのような役割を果たしているのかを解析する必要がある。これまでの PSII の動的機能解析はタンパク質に限定され、その他の成分についての解析はほとんど行われていない。

2. 研究の目的

PSII のアセンブリーについては、多くのグループによって研究が進められているが、それらのほとんどはタンパク質に注目したもので、他の成分を対象とした解析例はほとんどない。本研究では、脂質分子 (親水性の極性基と疎水性のアシル基を持つために両親媒性を示す分子で、PSII のアセンブリーに欠かせない分子であると考えられる) に注目した。PSII の修復についても長年研究されているが、その分子機構は未だに明らかでない。その原因として、PSII の反応中心である D1 タンパク質の代謝回転にのみ着目して解析が行われていたことが挙げられる。申請者らは、最近、PSII が修復されるときに PG が分解される必要があることを突き止めた。本研究では、さらに修復における脂質とタンパク質 (D1) の動態および相互作用を解析することで、修復における脂質の動的な機能を解明することにした。本研究を計画した当初は、PSII のアセンブリーと修復の両方の過程における脂質の機能を解析する予定であったが、修復に関して期待以上の知見が得られつつあったため、修復の過程を中心に解析を進めることにした。

3. 研究の方法

(1) 脂質の分解と再生に関わっている遺伝子の同定

脂質の分解にはリパーゼが関わっていると推定されるため、*Synechocystis* sp. PCC 6803 のゲノムにおいてリパーゼ様のタンパク質をコードした遺伝子を検索した。見出された遺伝子がリパーゼをコードしていることを確認するために、ヒスタグを付加したタンパク質を大腸菌において発現させ、Ni-アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。大腸菌での発現が難しいタンパク質については、大腸菌無細胞翻訳系によって合成し、同様に Ni-アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。分解によって生じたリゾ体の脂質への再生には、アシル-ACP 合成酵素とアシルトランスフェラーゼが関与しているが、アシル-ACP 合成酵素の遺伝子 (*slr1609*) とリゾ-PG アシルトランスフェラーゼの遺伝子 (*slr2060*) はすでに同定されているので、それらの遺伝子を用いることにした。精製したリパーゼ様タンパク質の活性は、チラコイド膜に存在する 4 つのグリセロ脂質 (MGDG, DGDG, SQDG, PG) およびトリアシルグリセロール (TAG) を基質に用いて測定した。リパーゼの抗体は、精製したタンパク質をウサギに免疫することによって作製した。

(2) 同定した遺伝子の破壊株の作製

同定したリパーゼ様タンパク質をコードした遺伝子、アシル-ACP 合成酵素遺伝子、リゾ-PG アシルトランスフェラーゼ遺伝子に薬剤耐性遺伝子を挿入することで、各遺伝子を破壊した *Synechocystis* の株を作製した。

(3) 作製した破壊株を用いた PSII の修復における脂質の機能解析

PSII の光阻害は、通常光で培養した細胞に強光を照射したときの PSII の活性 (PSII の電子受容体存在下での酸素発生) の低下として測定した。光阻害は強光による損傷と修復のバランスによって決まるため、光損傷の測定では、タンパク質の合成阻害剤であるリンコマイシンによって修復を阻害して活性の変化を測定した。D1 の合成や分解は、放射性同位体で標識された ³⁵S-Met/Cys を細胞に与えて D1 を標識することで測定した。PSII の中間体や単量体、二量体を分析するときには、チラコイド膜に存在する複合体を界面活性剤で可溶化したのち、それらを Blue Native-PAGE で分離して解析した。分離した複合体に含まれるタンパク質は、SDS-PAGE を用いて分析した。脂質については、TLC とガスクロマトグラフィー、HPLC によって分析した。

4. 研究成果

(1) MGDG分子の機能

Synechocystis のゲノムには、3つのリパーゼ様のタンパク質をコードした遺伝子 (*slr1969*, *slr0060*, *slr0482*) が存在することが明らかになった。そこで、それぞれの遺伝子にコードされたタンパク質を大腸菌での発現または無細胞翻訳系を用いて発現させ、それらを精製してリパーゼ活性を測定した。その結果、*slr1969* は MGDG と TAG を分解する活性を持ち、*sn-1* の位置に結合した脂肪酸を切り出すリパーゼであることがわかり、このリパーゼを LipA と命名した。このリパーゼの遺伝子破壊株では、野生株に比べて MGDG の量が増加し、逆にリゾ-MGDG の量が低下していた。また、破壊株において、強光下での PSII の損傷は野生株と同様に起こるものの、修復が遅くなっていた。さらに、D1 の合成は野生株と同様に起こっていたが、分解が遅延していた。これらの結果は、MGDG の分解が強光下で失活した PSII の修復過程、特に D1 の分解を促進することを示している。

次に、*Synechocystis* から精製した PSII の単量体と二量体に LipA を作用させて PSII に結合した脂質の分解活性を測定した。LipA は PSII の二量体に結合している MGDG を特異的に分解 (反応中心あたり 1 分子を分解する) し、PSII を単量体に解離させることが明らかになった。また、LipA は PSII の二量体に局在しており、*lipA* の破壊株では強光下における PSII 二量体の存在量が野生株に比べて高く維持されていることがわかった。

以上のことから、LipA は PSII の二量体に作用して MGDG を分解することで PSII を単量体に解離させ、D1 の分解を促進させるものと考えられる。これらの研究成果は、論文として発表した (Jimbo, H. and Wada, H. (2023) *Plant Physiol.* 191:87-95)。

(2) PG分子の機能

PG の分解が *Synechocystis* の増殖や PSII の活性にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするために、エーテル型の PG 分子 (脂肪酸の炭化水素鎖が、エステルではなくエーテル結合で結合した PG 分子) を化学的に合成して、PG を合成できない *Synechocystis* の *pgsA* 変異株 (PG の合成に関わっている PG リン酸合成酵素の遺伝子 *pgsA* が破壊された株で、PG を合成できないので増殖できないが、培地中に PG が存在すると、それを取り込んで増殖することができる) に導入して、増殖や PSII の活性を相補するかを解析した。エーテル型 PG 分子は、脂肪酸の炭

化水素鎖がエーテル結合で結合しているため、リパーゼによって分解されない。エーテル型 PG は、変異株の増殖や PSII 活性を相補したが、エステル型 PG ほどには相補できなかった。このことは、PG に結合した脂肪酸がリパーゼによって切られることが増殖や PSII の活性に影響を及ぼすことを示している。また、PG の *sn*-2 の位置にエーテル結合で導入した脂肪酸の鎖長を変えて解析したところ、鎖長 16 の脂肪酸が最も増殖や PSII の活性を相補し、鎖長がそれよりも長くても短くても相補する度合いが低下した。ほとんどのシアノバクテリアにおいて、PG の *sn*-2 に C₁₆ の脂肪酸が結合しており、そのことに何らかの重要な意義があるものと考えられる。さらに、*sn*-1 がエーテル型 (ET1)、*sn*-2 がエーテル型 (ET2)、*sn*-1 と *sn*-2 の両方がエーテル型 (ETD) の PG 分子を合成して比較したところ、ET2 と ETD は ET1 と比較して増殖や PSII 活性を相補する度合いが低く、強光下での PSII の光障害が促進されることがわかり、*sn*-2 の脂肪酸がリパーゼで切られることが増殖や PSII の活性維持に重要であることが明らかとなった。これらの研究成果は、論文として発表した (Endo, K. et al. (2022) *Biochim. Biophys. Acta* 1867:159158)。

エーテル型 PG を用いた解析から、PG の *sn*-2 に結合した脂肪酸がリパーゼによって切られることが PSII の活性、特に強光下での光障害を抑えることがわかったので、そのリパーゼを同定して解析を進めることにした。*Synechocystis* のゲノムには、3つのリパーゼ様のタンパク質をコードした遺伝子が存在し、SII1969 は MGDG を分解するリパーゼだったので、残りの2つのどちらかが PG を分解するリパーゼではないかと推測し、大腸菌の無細胞翻訳系を用いて発現させたタンパク質を用いて活性を測定した。その結果、Slr0060 が PG の *sn*-2 に結合した脂肪酸を切るリパーゼであることがわかり、そのリパーゼを Pla2 と命名した。このリパーゼの遺伝子破壊株では、強光下での PSII の損傷は野生株と同様に起こるものの、修復が遅くなっていた。また、D1 の合成は野生株と同様に起こったが、分解が遅延した。PG の分解によって生じたリゾ-PG と遊離脂肪酸から PG を再生するアシル-ACP 合成酵素とリゾ-PG アシルトランスフェラーゼの遺伝子破壊株についても同様の実験を行い、同様の結果が得られた。これらの結果から、PG の分解が強光下で失活した PSII の修復過程、特に D1 の分解を促進することが明らかとなった。

次に、*Synechocystis* から精製した PSII の単量体と二量体に Pla2 を作用させて PSII に結合した脂質の分解活性を測定した。Pla2 は PSII の単量体に結合している PG を特異的に分解し、その分解に伴って単量体から CP43 が解離して RC47 が生じ、二量体に結合した PG は分解されなかった。また、Pla2 は PSII の単量体に局在しており、*pla2* の破壊株では強光下における PSII の RC47 の存在量が野生株に比べて少ないことがわかった。

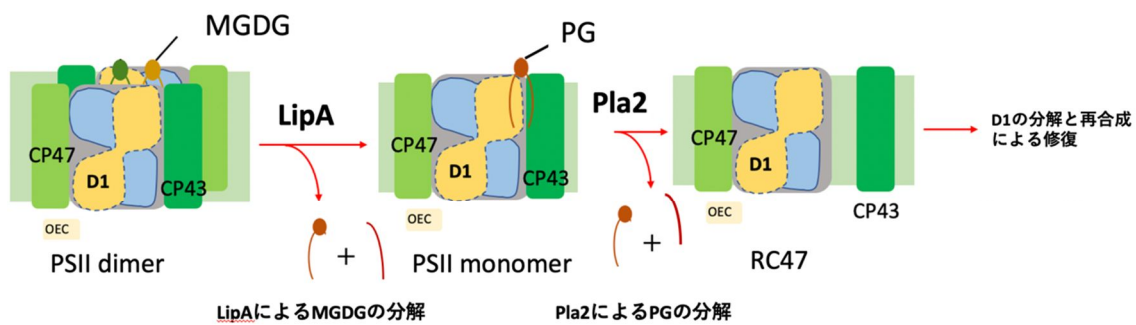
以上のことから、Pla2 は PSII の単量体に作用して PG を分解することで PSII を RC47 に解離させ、D1 の分解を促進させるものと考えられる。これらの研究成果は、すでに論文にまとめており、近いうちに投稿する予定である。

PG に Pla2 が作用すると、リゾ-PG と遊離脂肪酸が生じるが、分解された PG の再生を調べるために、強光条件下で細胞に種々の脂肪酸を取り込ませ、どの脂質のどの位置に取り込まれるかを解析した。その結果、非常に興味深いことに、取り込まれた脂肪酸は PG の *sn*-2 に特異的に取り込まれることがわかった。その過程には、アシル-ACP 合成酵素とリゾ-PG アシルトランスフェラーゼが必要であると考えられるが、それらの酵素遺伝子の破壊株では脂肪酸の取り込みが阻害されることもわかった。さらに、飽和脂肪酸は PSII の修復を促進するのに対し、多価不飽和脂肪酸は損傷を促進すること、その促進は PSII の二量体を不安定化させて単量体や RC47 に解離させることによることが明らかとなった。これらの研究成果は、論文として発表した

(Jimbo, H. et al. (2020) Int. J. Mol. Sci. 21:7509; Jimbo, H. et al. (2021) Int. J. Mol. Sci. 22:10432),

(3) まとめ

MGDG 分子と PG 分子の機能解析の結果からわかったことをまとめると、PSII の修復過程では強光で失活した PSII の二量体に LipA が作用することで MGDG を分解して二量体を単量体に解離させ、その単量体に Pla2 が作用することで CP43 を解離させて RC47 が生じ、D1 の分解と再合成を促して PSII の修復が起こることを示しており、本研究によって PSII の修復過程における脂質の代謝回転の重要な役割が初めて明らかとなった。



本研究によって明らかになったPSIIの修復過程における脂質代謝回転の役割

(4) その他

Synechocystis のゲノムに存在する3つのリパーゼ様のタンパク質をコードした遺伝子うち、SII1969はMGDGを分解するリパーゼ、Slr0060はPGを分解するリパーゼであることがわかったが、残り1つについてもリパーゼであることを確認するために、大腸菌での発現させたタンパク質を用いて活性を測定した。その結果、SII0482はチラコイド膜に存在する4つの脂質は基質とせず、最近、シアノバクテリアで発見されたアシルプラストキンを基質とするリパーゼであることが判明し、そのリパーゼをAplと命名した。現在、このリパーゼの光合成における機能について解析を進めている。

参考文献

Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J. R. and Kamiya, N. (2011) Nature 473:55-60.

Jimbo, H. and Wada, H. (2023) Plant Physiol. 191:87-95.

Endo, K., Abe, M., Kawanishi, N., Jimbo, H., Kobayashi, K., Suzuki, T., Nagata, N., Miyoshi, H. and Wada, H. (2022) Biochim. Biophys. Acta 1867:159158.

Jimbo, H., Yuasa, K., Takagi, K., Hirashima, T., Keta, S., Aichi, M. and Wada, H. (2021) Int. J. Mol. Sci. 22:10432.

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 6件）

1. 著者名 Kaichiro Endo, Masato Abe, Nobumasa Kawanishi, Haruhiko Jimbo, Koichi Kobayashi, Tomoko Suzuki, Noriko Nagata, Hideto Miyoshi and Hajime Wada	4. 巻 1867
2. 論文標題 Crucial importance of length of fatty-acyl chains bound to the sn-2 position of phosphatidylglycerol for growth and photosynthesis of <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta	6. 最初と最後の頁 159158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbaliip.2022.159158	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 Haruhiko Jimbo and Hajime Wada	4. 巻 191
2. 論文標題 Deacylation of galactolipids decomposes photosystem II dimers to enhance degradation of damaged D1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 87-95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiac460	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 Haruhiko Jimbo, Koki Yuasa, Kensuke Takagi, Takashi Hirashima, Sumie Keta, Makiko Aichi and Hajime Wada	4. 巻 22
2. 論文標題 Specific Incorporation of Polyunsaturated Fatty acids into the sn-2 position of phosphatidylglycerol accelerates photodamage to photosystem II under strong light	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms221910432	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 Jimbo, H., Takagi, K., Hirashima, T., Nishiyama, Y. and Wada, H.	4. 巻 21
2. 論文標題 Long-chain saturated fatty acids, palmitic and stearic acids, enhance the repair of photosystem II	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7509
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21207509	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 Jimbo, H., Izuhara, T., Hirashima, T., Endo, K., Nakamura, Y., Wada, H.	4. 巻 105
2. 論文標題 Membrane lipid remodeling is required for photosystem II function under low CO2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 245-253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15054	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 神保晴彦	4. 巻 31
2. 論文標題 脂質を介した光合成の機能制御	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 光合成研究	6. 最初と最後の頁 31-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 神保晴彦、和田元
2. 発表標題 シアノバクテリアの光合成におけるリパーゼの役割
3. 学会等名 日本植物脂質研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高木健輔、神保晴彦、和田元
2. 発表標題 光合成の強光順化においてジアシルグリセロールキナーゼが果たす役割
3. 学会等名 日本植物脂質研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 来間一綺、神保晴彦、齋藤勝和、和田元
2. 発表標題 シアノバクテリアの光化学系IIの光阻害に及ぼす脂肪酸の影響
3. 学会等名 日本植物脂質研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神保晴彦、和田元
2. 発表標題 光化学系II複合体の修復におけるガラクトリパーゼの役割
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 来間一綺、神保晴彦、齋藤勝和、和田元
2. 発表標題 脂肪酸の鎖長はシアノバクテリアのPSIIの光阻害に影響を及ぼす
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 神保晴彦、安部真人、和田元
2. 発表標題 光化学系II複合体の修復におけるリパーゼの役割
3. 学会等名 日本植物脂質科学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神保晴彦、和田元
2. 発表標題 光化学系IIの修復におけるガラクトリパーゼA1の役割
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高木健輔、平嶋孝志、神保晴彦、和田元
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803における膜脂質組成が光化学系II複合体に与える影響
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神保晴彦、高木健輔、平嶋孝志、出原太智、遠藤嘉一郎、中村友輝、和田元
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803における光酸化ストレスに応答した膜脂質転換
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神保晴彦
2. 発表標題 脂質を介した光合成の機能制御
3. 学会等名 日本光合成学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担 者	神保 晴彦 (Jimbo Haruhiko) (50835965)	東京大学・大学院総合文化研究科・助教 (12601)	

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