

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14780

研究課題名(和文)植物葉緑体と藍藻におけるポリアミンによる光エネルギー利用効率化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of polyamine-induced enhancement of light energy utilization efficiency in plant chloroplasts and cyanobacteria

研究代表者

辻井 雅 (Tsuji, Masaru)

東北大学・工学研究科・助教

研究者番号：30865887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物葉緑体や葉緑体の祖先である藍藻の光合成制御機構の解明を目指した。チラコイド膜内外のプロトン濃度は光合成電子伝達を適切に制御するために重要な要素となる。生理活性物質の一つであるポリアミンはアミン基を複数持っていることから、細胞内 pH によってはプロトンの緩衝剤となりうる性質を持っている。申請者は、ポリアミン合成酵素を精製し、活性測定を行い、藍藻内におけるポリアミン生合成経路を特定することに成功した。また、プロトン輸送体の解析も同時に行い、光合成電子伝達の調節に重要なプロトン輸送体の局在、輸送活性を明らかに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

植物や葉緑体の祖先である藍藻は生態系の一次生産者であると同時に、大気中の二酸化炭素を有機物へと変換できる光合成生物である。光合成生物の成長・環境応答機構の解明は現代社会の課題となる大気中の二酸化炭素濃度の上昇や食糧不足を改善するために必須となる。本成果により、藍藻光合成活性に寄与すると考えられるポリアミンの機能同定を行うことに成功した。また、光合成活性に重要なプロトン輸送体を明らかとした。これらの成果は光合成モデル生物となる藍藻の成長・環境応答機構を解明し、食料問題や地球温暖化の改善に繋がる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the photosynthetic control mechanisms in plant chloroplasts and their ancestors, cyanobacteria. pH within and outside the thylakoid membranes is crucial for proper regulation of photosynthetic electron transfer. Polyamines, a class of bioactive substances, possess multiple amine groups and can act as proton buffers depending on the intracellular pH. The applicant successfully purified the polyamine synthesis enzyme, performed activity measurements, and identified the polyamine biosynthetic pathway in cyanobacteria. Furthermore, simultaneous analysis of proton transporters led to the identification of the subcellular localization and transport activity of proton transporters that are crucial for regulating photosynthetic electron transfer.

研究分野：シアノバクテリア

キーワード：シアノバクテリア 葉緑体 光合成

### 1. 研究開始当初の背景

近年、世界的な人口増加による食料問題や大気中二酸化炭素濃度の上昇から、生態系の一次生産者である植物ならびに藍藻など光合成生物の環境応答ストレス機構を解明することが求められている。その実現には、光合成による光エネルギー利用の効率化が不可欠と考えられる。野外環境において光環境は短い時間軸で変動するため、植物は得られる光量に応じて迅速に光エネルギー利用効率を調整する必要がある。植物が過剰な光エネルギーに晒された時は、チラコイド膜内のプロトンを利用して光エネルギーを散逸する機構を保持する。植物のチラコイド膜内腔でポリアミンの一種であるプトレシンはプロトンと結合することで光エネルギー散逸を抑制し、光エネルギー利用を効率化できることが知られている。しかし、植物葉緑体や藍藻においてポリアミン産生をになう生合成酵素やチラコイド膜を介した輸送経路は不明であった。

### 2. 研究の目的

藍藻のポリアミン生合成はアルギニンを出発点としてアグマチン、プトレシン、カルボキシスペルミジンを経てスペルミジンを最終産物とする。当研究室により、ポリアミン生合成経路の初発酵素であるアルギニン脱炭酸酵素がスペルミジン生合成を担うことは報告していた。しかし、アルギニン脱炭酸酵素の下流であるアグマチンウレオヒドロラーゼ、カルボキシスペルミジン脱水素酵素、カルボキシスペルミジン脱炭酸酵素の機能は明らかとなっていなかった。また、それぞれの欠損株の解析を行うことでポリアミン生合成への影響を確かめた。

### 3. 研究の方法

それぞれの酵素について大腸菌を用いた発現系により発現・精製を行い、活性の測定を行なった。また、欠損株を作製し、細胞内ポリアミン量の測定を行なった。また、各ポリアミン生合成酵素による藍藻の細胞成長、光合成活性への影響を観察するために、クロロフィル蛍光測定により各欠損株の光合成収率の測定を行なった。また、細胞内プロトン濃度の制御機構を解明するために、プロトン輸送体の解析も並行して行なった。プロトン輸送体を大腸菌に発現させ、輸送体活性測定を行なった。また、GFPと各輸送体の融合タンパク質を発現させた株を作製し、局在解析も行なった。さらに、変異体の取得により、プロトン輸送体と光合成活性、光環境応答への寄与を明らかとした。

### 4. 研究成果

藍藻のポリアミン生合成経路はアルギニン脱炭酸酵素、アグマチンウレオヒドロラーゼ、カルボキシスペルミジン脱水素酵素、カルボキシスペルミジン脱炭酸酵素により構成される。大腸菌を用いて各酵素を発現させ、精製を行った。Ni アフィニティークロマトグラフィーで精製を行なった結果、各タンパク質の精製に成功した。まず、アグマチンウレオヒドロラーゼの活性を測定した結果、アグマチンウレオヒドロラーゼ活性を持つタンパク質の同定に成功した。次に、カルボキシスペルミジン脱水素酵素、カルボキシスペルミジン脱炭酸酵素の活性測定を行なった。その結果、カルボキシスペルミジン脱炭酸酵素活性を持つタンパク質の同定に成功した。

各酵素をコードする遺伝子欠損株の作製を試みた。その結果、各遺伝子の欠損株もしくは減少株の作製に成功した。それぞれの変異株を用いて細胞内ポリアミン量の測定を行なった。その結果、ポリアミン産生をになうアグマチンウレオヒドロラーゼ変異体とカルボキシスペルミジン脱炭酸酵素変異体において細胞内ポリアミン量が有意に減少していることが明らかとなった。また、BG11 培地において塩ストレスの有無における生育試験を行なった結果、一部変異体において有意に生育が減少することも明らかとなった。クロロフィル蛍光測定解析においては、光合成収率が減少する変異体と上昇する変異体の両方が見られることが明らかとなった。これらは、ポリアミンによる複雑な光合成制御機構が存在することを示唆していることとなる。

チラコイド膜を介したポリアミン輸送を解析するために、チラコイド膜タンパク質を可溶化し、リボソームへと導入した。チラコイド膜導入リボソームを用いてポリアミン輸送活性を測定した結果、チラコイド膜を介したポリアミン輸送経路が存在することが明らかとなった。また、変異体を用いた解析により、ポリアミン輸送経路も同定することに成功した。

藍藻における細胞内 pH 制御機構を包括的に理解するために、プロトン輸送体の解析も並行して行なった。各輸送体の輸送体を大腸菌変異体に各輸送体を発現させ、活性測定を行なった。その結果、全ての輸送体においてプロトン輸送活性が存在することが示唆された。また、GFP 融合タンパク質を発現させ、細胞内局在の解析を行なった。その結果、原形質膜に局在するプロトン輸送体とチラコイド膜に局在するプロトン輸送体の同定に成功した。さらに、各欠損株の作製を試みたところ、一部遺伝子が欠損できない遺伝子であることが明らかとなった。また、各変異体の生育試験を行なったところ、各光環境において生育に重要なプロトン輸送体の同定を行う

ことに成功した。プロトン輸送体変異体の光合成解析を行なったところ、光合成収率の低下、光阻害率の上昇が見られた。また、Na が少ない培地で光環境応答ができなくなったことから、藍藻は Na を利用して細胞内 pH を制御することも明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanudjaja Ellen, Hoshi Naomi, Yamamoto Kaneyoshi, Ihara Kunio, Furuta Tadaomi, Tsujii Masaru, Ishimaru Yasuhiro, Uozumi Nobuyuki	4. 巻 299
2. 論文標題 Two Trk/Ktr/HKT-type potassium transporters, TrkG and TrkH, perform distinct functions in Escherichia coli K-12	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102846 ~ 102846
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102846	査読の有無 無
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 Kobayashi Ayumu, Nakamura Masamune, Tsujii Masaru, Makino Kohei, Nagayama Tatsuya, Nakamura Kensuke, Nanatani Kei, Kota Kera, Furuuchi Yuki, Kayamori Shunsuke, Furuta Tadaomi, Suzuki Iwane, Hayakawa Yoshihiro, Tanudjaja Ellen, Ishimaru Yasuhiro, Uozumi Nobuyuki	4. 巻 119
2. 論文標題 Two cyanobacterial response regulators with diguanylate cyclase activity, Rre2 and Rre8, participate in biofilm formation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 599 ~ 611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mmi.15057	査読の有無 無
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 Du Xu, Chang Di, Kaneko Shingo, Maruyama Hisataka, Sugiura Hirofumi, Tsujii Masaru, Uozumi Nobuyuki, Arai Fumihito	4. 巻 -
2. 論文標題 Dynamic Deformation Measurement of an Intact Single Cell via Microfluidic Chip with Integrated Liquid Exchange	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Engineering	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） 10.1016/j.eng.2022.08.020	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ayumu KOBAYASHI, Masaru TUJII, Yasuhiro ISHIMARU, Nobuyuki UOZUMI
2. 発表標題 Functional analysis of the Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter responsible for high-light adaptation in cyanobacteria
3. 学会等名 Pacifichem2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ellen, 星直美, 古田忠臣, 山本兼由, 辻井雅, 石丸泰寛, 魚住信之
2. 発表標題 大腸菌のTrk 系K トランスポーターの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山梨太郎, 東大起, 内山剛志, 白川由美子, 池田隼人, 菊永英寿, 須田利美, 山上睦, Ellen, 辻井雅, 石丸泰寛, 魚住信之
2. 発表標題 シロイヌナズナの地上部に発現するカリウムイオン輸送体KUP12の解析
3. 学会等名 日本植物生理学会年会2022年
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金子真悟, 辻井 雅, 魚住信之, 新井史人
2. 発表標題 マイクロ流体チップ内の高速液滴置換による単一細胞の浸透圧ストレス応答計測
3. 学会等名 Robomech2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本胡桃, 齋藤俊也, 辻井雅, Ryoung Shin, 石丸泰寛, 魚住信之
2. 発表標題 植物 K <sup>+</sup> チャネルのカリウム欠乏の感知と調節
3. 学会等名 生物工学会北日本支部2021 年度第一回オンライン若手シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山梨太郎, 東大起, 内山剛志, 池田隼人, 菊永英寿, 須田利美, 佐々木翔太, 高島圭介, 金子俊郎, 山上睦, Ellen, 辻井雅, 石丸泰寛, 魚住信之
2. 発表標題 植物K+トランスポーターによる 他イオン吸収の調節
3. 学会等名 生物工学会北日本支部2021 年度第一回オンライン若手シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nobuyuki Uozumi, Ellen Tanudjaja, Masaru Tsujii, Yasuhiro Ishimaru
2. 発表標題 The Structural Characteristics and Distinct Fundamental Roles of Two Types of K Transporters
3. 学会等名 IWPMB2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takeshi Uchiyama, Shunya Saito, Taro Yamanashi, Megumi Kato, Masaru Tsujii, Hayato Ikeda, Hidetoshi Kikunaga, Toshimi Suda, Sho Toyama, Misako Miwa, Shigeo Matsuyama, Yasuhiro Ishimaru, Nobuyuki Uozumi
2. 発表標題 The Role of AthKT1 in Removing Na from Flowers
3. 学会等名 IWPMB2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大塚彩葵、金澤理貴、小林歩夢、井田智明、ジョン ミンギョン、赤池 孝章、辻井雅、石丸泰寛、魚住信之
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける超硫黄分子産生経路の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2023広島年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名	辻井雅, 小林歩夢, 狩野文香, 解良康太, 児島征司, 小口理一, 彦坂幸毅, 園池公毅, 石丸泰寛, 魚住信之
2. 発表標題	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> アンチポーターによる光合成明反応の最適化
3. 学会等名	藍藻の分子生物学2022
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	吉田実央, 辻井雅, 石丸泰寛, 魚住信之
2. 発表標題	藍藻 Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> アンチポーターによるチラコイド膜内 pH 制御
3. 学会等名	藍藻の分子生物学2022
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	清水川晴人, 中村正宗, 辻井雅, 小林歩夢, 牧野恒平, 永山達也, 中村謙介, 七谷圭, 解良康太, 古内有希, 茅森俊介, 古田忠臣, 鈴木石根, 早川芳弘, Tanudjaja Ellen, 石丸泰寛, 魚住信之
2. 発表標題	二成分制御系による藍藻のバイオフィルム形成制御
3. 学会等名	藍藻の分子生物学2022
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	石丸泰寛, 小林歩夢, 金澤理貴, 辻井雅, 魚住信之
2. 発表標題	光合成に關与する超硫黄分子
3. 学会等名	第95回日本生化学会大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名 Masaru Tsujii and Nobuyuki Uozumi
2. 発表標題 Coordinated regulation of photosynthesis by Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporters in cyanobacteria
3. 学会等名 International symposium on photosynthesis and chloroplast regulation
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 KOBAYASHI A, TSUJII M, YOSHIDA M, SHIMIZUKAWA H, JUNG M, IDA T, TAKATA T, AKAIKE T, ISHIMARU Y, UOZUMI N
2. 発表標題 The regulatory mechanism of photosynthetic activity by polysulfide
3. 学会等名 The 12th International NO Conference
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田賢人, 齋藤俊也, 内海俊彦, 木原章雄, 辻井雅, 石丸泰寛, 魚住信之
2. 発表標題 シロイヌナズナ Ca 依存性キナーゼ CPK6 の脂質修飾に関する解析
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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