

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22370017

研究課題名（和文） 特異なシアノバクテリアを用いて光合成の基本問題—光化学反応と場—を解く

研究課題名（英文） Elucidating the fundamental questions “photochemical reaction and its site” using unique cyanobacteria

研究代表者

土屋 徹 (TSUCHIYA TOHRU)

京都大学・大学院人間・環境学研究科・准教授

研究者番号：20362569

研究成果の概要（和文）：光合成を研究する上での基本問題として、光エネルギーを受容して化学エネルギーに変換する光化学反応の機構とその反応が起きる場であるチラコイド膜の形成機構について研究を進めた。クロロフィル *d* という特殊な性質を示すクロロフィルを利用して、植物では利用できない遠赤色光で光化学反応が可能なシアノバクテリアから単離した光化学系 II を解析した。その結果、植物より小さいエネルギーで駆動する光化学系の生体エネルギー論が解明された。

研究成果の概要（英文）：We studied the photochemical reaction of photosystems that convert light energy into chemical energy and thylakoid membranes formation as fundamental questions. Photosystem II complexes isolated from a chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium that can utilize near infra-red light for photochemical reaction unlike plants were analyzed. The results revealed the bioenergetics of photosystems driven by lower energy than those from plants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2012年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物生理・分子

キーワード：光誘起電子移動反応、酸化還元電位、超高速分光

## 1. 研究開始当初の背景

光合成についての研究は、植物や藻類などで精力的に進められ、多くの知見が蓄積されてきた。その結果、個々の生物種に依存する多様性とほとんど全ての酸素発生型光合成生物に共通する普遍性が明らかとなっていった。しかし、解析が進んでいる生物種が光化学反応に利用するクロロフィルはクロロフィル *a* という分子種であることから、「普遍」である性質に対する比較対象が存在しな

かった。これは、クロロフィルのみならず、光化学反応の場であるチラコイド膜についても当てはまる。ほとんど全ての酸素発生型光合成生物ではチラコイド膜を形成しているので、その意義についても研究が困難であった。そこで、これら二つの「普遍的」性質について、それぞれ例外となる生物を選択し詳細に解析することで、新たな知見が得られると考えられた。その知見と、これまでに得られていた「普遍的」性質の知見を比較する

ことで、光合成の基本問題を解くことが可能ではないかと推定された。

我々はこれまでに、クロロフィル *a* よりも小さいエネルギーを利用して光化学反応を行うことが可能なシアノバクテリアである *Acaryochloris marina* を対象として研究を進めてきた。*A. marina* は、クロロフィル *d* という特殊なクロロフィルを合成することが知られている唯一の生物で、我々は本生物より光化学系 I および光化学系 II を単離して解析してきた。一方、チラコイド膜形成については、チラコイド膜をもたないことが唯一判明している酸素発生型光合成生物である、*Gloeobacter violaceus* を対象とした研究も行ってきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、クロロフィル *d* をもつシアノバクテリアである *A. marina* の解析をさらに進めることが目的の一つである。具体的には *A. marina* の光化学系の生体エネルギー論の解明や遺伝子組換えによる色素組成の改変である。また、*Prochlorococcus* という 8-ビニル-クロロフィルをもつシアノバクテリアを新たに研究対象として加えた。チラコイド膜形成については、既知の関連遺伝子と有意な相同性を示す遺伝子が *G. violaceus* に存在することから、その機能の解析を目的とした。これらの、特異なシアノバクテリアの解析をとおして、光合成の基本問題の解明に迫ることを全体の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 光化学系 II の単離

光化学系 II は、チラコイド膜から可溶化した標品をショ糖密度勾配遠心およびイオン交換カラムクロマトグラフィーにより単離した。

### (2) 電子伝達成分の酸化還元電位の測定

単離した標品を酸素を除いて密封したセルに入れ、メディエーターで溶液をさまざまな電位に調整した。それぞれの電位で、吸収スペクトルを測定し、光を照射後に再び測定した吸収スペクトルとの差分をとって光還元活性を測定した。

### (3) 超高速分光測定

超短パルスレーザーを利用して、時間分解蛍光スペクトルを測定した。

### (4) シアノバクテリアの形質転換

*Synechocystis* sp. PCC 6803 の形質転換は、定法にしたがい、自然形質転換法で行った。*A. marina* の形質転換は、広宿主域プラスミドから作製したプラスミドベクターを、大腸菌をもちいた接合法で導入することで行った。

## 4. 研究成果

### (1) *A. marina* から単離した光化学系 II の電子伝達成分の酸化還元電位

光化学系 II の第一電子受容体であるフェオフィチン *a* と第二電子受容体であるプラストキノン ( $Q_A$ ) の酸化還元電位を測定した。*A. marina* から単離した標品に加えて、対照としてクロロフィル *a* を利用する *Synechocystis* から単離した標品についても電位を測定した。その結果、フェオフィチン *a* および  $Q_A$  ともに、*A. marina* の電位は *Synechocystis* の電位よりも低いことが判明した。これらの結果より、両者の初期電子供与体の酸化還元電位を見積ると、ほとんど同じ電位であると推定された。つまり、クロロフィル *d* とクロロフィル *a* という、利用するクロロフィルが違い、光から得られるエネルギーに差があるにもかかわらず、水を分解する際の電位は変わらず、差の調整は電子受容体の電位によって行われているということである。本研究結果は、米国科学アカデミー紀要に 2 報の論文として掲載されたことに示されるように、国際的な評価も高い。

### (2) 8-ビニル-クロロフィルをもつ光化学系の解析

*Synechocystis* のクロロフィル組成を *Prochlorococcus* と同様に 8-ビニル-クロロフィルに改変するために、8-ビニル還元酵素を破壊した変異体を解析した。対照として、*Prochlorococcus* の解析もあわせて行った。分光学的解析により、クロロフィルを 8-ビニル化しただけでは *Prochlorococcus* の性質を完全には再現できなかったことから、*Prochlorococcus* の誕生から進化の過程では、単に 8-ビニル-クロロフィルの獲得だけでなく、アポタンパク質など他の因子の至適化が必要であったことが示唆された。さらに、全てのクロロフィルが 8-ビニル-クロロフィルに置換された光化学系 II 複合体を *Synechocystis* の形質転換体から単離および解析し、野生型の *Synechocystis* から単離した光化学系 II 複合体と比較した。その結果、人工的に 8-ビニル-クロロフィルに置換した光化学系 II 複合体では、光照射により活性酸素が発生しやすいことが判明した。

### (3) クロロフィル *b* をもつシアノバクテリアの解析

天然でクロロフィル *b* を有するシアノバクテリア (原核緑藻) である *Prochlorococcus marinus*、*Prochloron didemmi* と *Prochlorothrix hollandica* の光捕集機能を解析した。また、シアノバクテリアの光環境応答について、光化学系 II-光化学系 I 間のエネルギー移動の観点から検討した。

#### (4) *A. marina* での形質転換系の開発

これまでの野生型の *A. marina* をもちいた実験で、光化学系の生体エネルギー論についての研究などが進められてきたが、研究をさらに発展させるには本生物での遺伝子組換えが可能となる必要があった。そこで、形質転換系を確立するために、接合法による *A. marina* への保持型プラスミドの導入を試みた。その結果、プラスミド（発現ベクター）を保持した形質転換体を得ることに成功した。さらに、クロロフィル *b* 合成酵素遺伝子である *CAO* 遺伝子を発現ベクターをもちいて *A. marina* に導入した。その結果、形質転換体では内在のクロロフィル *d* と微量のクロロフィル *a* に加えて、全く新奇なクロロフィルが蓄積されていた。新奇クロロフィルの構造は、クロロフィル *d* とクロロフィル *b* それぞれに特徴的な、3位と7位のホルミル基の両方をもつ構造をしていた（図1）。新奇クロロフィルは、単離した光化学系 II 複合体にも含まれており、内在のクロロフィル *d* の一部を置換していた。新奇クロロフィルからクロロフィル *d* へのエネルギー移動も観察されたことから、一遺伝子の導入により、機能的な新奇クロロフィルを光合成生物に合成させることに成功したと考えられた。本成果は、*A. marina* を標的とした分子遺伝学的解析を可能とするための大きなブレイクスルーである。確立した形質転換系を利用して、今後遺伝子ターゲティングやトランスポゾンタギングが可能となれば、光化学系 II を簡便かつ大量に単離するための形質転換体の作製やクロロフィル *d* 生合成に関わる遺伝子に変異が生じた突然変異体の作製が可能となる。よって、今後も我々が *A. marina* の研究において先頭を走り続けることが可能であることが期待される。

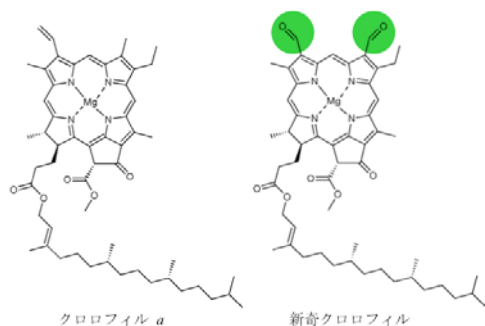


図1 新奇クロロフィルの構造

新奇クロロフィルは、クロロフィル *a* と比較すると、3位（左上）のビニル基と7位（右上）のメチル基がホルミル基に置換された構造である7-メチル-クロロフィル *d* である。

#### (5) *G. violaceus* に存在するチラコイド膜形成に関連する遺伝子の解析

チラコイド膜をもたない *G. violaceus* のゲノムには、植物や他のシアノバクテリアでチラコイド膜形成に必要であることが報告されている *Vipp1* 遺伝子と相同性を示す遺伝子が存在している。そこで、*G. violaceus* の *Vipp1* 遺伝子を *Synechocystis* に導入した後、内在の *Vipp1* 遺伝子を完全に破壊した。得られた形質転換体では、チラコイド膜が形成しており、野生型と比較しても有意な差は見られなかった。本結果より、*Vipp1* がチラコイド膜形成に特異的な因子ではないことが判明した。

#### 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16件）

- ① Hamada, F., Yokono, M., Hirose, E., Murakami, A., Akimoto, S. (2012) Excitation energy relaxation in a symbiotic cyanobacterium, *Prochloron didemni*, occurring in coral-reef ascidians, and in a free-living cyanobacterium, *Prochlorothrix hollandica*. *Biochim. Biophys. Acta* 1817: 1992-1997. (査読有) doi: 10.1016/j.bbabi.2012.06.008
- ② Tsuchiya, T., Akimoto, S., Mizoguchi, T., Watabe, K., Kindo, H., Tomo, T., Tamiaki, H., Mimuro, M. (2012) Artificially produced [7-formyl]-chlorophyll *d* functions as an antenna pigment in the photosystem II isolated from the chlorophyllide *a* oxygenase-expressing *Acaryochloris marina*. *Biochim. Biophys. Acta* 1817: 1285-1291. (査読有) doi: 10.1016/j.bbabi.2012.02.021
- ③ Tsuchiya, T., Mizoguchi, T., Akimoto, S., Tomo, T., Tamiaki, H., Mimuro, M. (2012) Metabolic engineering of the chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina*: production of a novel chlorophyll species by the introduction of the chlorophyllide *a* oxygenase gene. *Plant Cell Physiol.* 53: 518-527. (査読有) doi: 10.1093/pcp/pcs007
- ④ Tomo, T., Kusakabe, H., Nagao, R., Ito, H., Tanaka, A., Akimoto, S., Mimuro, M., Okazaki, S. (2012) Luminescence of singlet oxygen in photosystem II complexes isolated from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 containing monovinyl or divinyl chlorophyll *a*. *Biochim. Biophys. Acta* 1817: 1299-1305. (査読有) doi: 10.1016/j.bbabi.2012.02.018
- ⑤ Yokono, M., Tomo, T., Nagao, R., Ito, H., Tanaka, A., Akimoto, S. (2012) Alterations in photosynthetic pigments and amino acid

composition of D1 protein change energy distribution in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1817: 754-759. (査読有) doi: 10.1016/j.bbabi.2012.02.009

- ⑥ Allakhverdiev, S.I., Tsuchiya, T., Watabe, K., Kojima, A., Los, D.A., Tomo, T., Klimov, V.V., Mimuro, M. (2011) Redox potentials of primary electron acceptor quinone molecule (Q<sub>A</sub>)<sup>-</sup> and conserved energetics of photosystem II in cyanobacteria with chlorophyll *a* and chlorophyll *d*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 8054-8058. (査読有) doi: 10.1073/pnas.1100173108
- ⑦ Mimuro, M., Murakami, A., Tomo, T., Tsuchiya, T., Watabe, K., Yokono, M., Akimoto, S. (2011) Molecular environments of divinyl chlorophylls in *Prochlorococcus* and *Synechocystis*: Differences in fluorescence properties with chlorophyll replacement. *Biochim. Biophys. Acta* 1807: 471-481. (査読有) doi: 10.1016/j.bbabi.2011.02.011
- ⑧ Shimada, Y., Suzuki, H., Tsuchiya, T., Mimuro, M., Noguch, T. (2011) Structural coupling of an arginine side chain with the oxygen evolving Mn<sub>4</sub>Ca cluster in photosystem II as revealed by isotope-edited fourier transform infrared spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 133: 3808-3811. (査読有) doi: 10.1021/ja200186h
- ⑨ Allakhverdiev, S.I., Tomo, T., Shimada, Y., Kindo, H., Nagao, R., Klimov, V.V., Mimuro, M. (2010) Redox potential of pheophytin *a* in photosystem II of two cyanobacteria having the different special pair chlorophylls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 3924-3929. (査読有) doi: 10.1073/pnas.0913460107

[学会発表] (計 61 件)

- ① 土屋 徹、代謝工学的アプローチから探る光化学系 II の色素組成の柔軟性、第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 21 日-3 月 23 日 岡山大学 (岡山)
- ② 鞆 達也、クロロフィル *d* を主要色素としてもつシアノバクテリアの光化学系 II 反応機構、第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 21 日-3 月 23 日 岡山大学 (岡山)
- ③ Akimoto, S. Application of time-resolved fluorescence spectroscopy to studies on light adaptation of photosynthetic organisms. Transdisciplinary cooperation and application of nanoscience, 2013.2.22, Krakow, Poland
- ④ 土屋 徹、秋本 誠志、渡部 和幸、鞆 達也、三室 守、人工的に合成した[7-ホルミル]-クロロフィル *d* を含む光化学系 II の色素組成、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日-3 月 18 日 京都産業大学 (京

都)

- ⑤ 遠藤 嘉一郎、鈴木 健裕、長尾 遼、堂前 直、鞆 達也、*Acaryochloris marina* から光化学系 II 反応中心の単離・精製とその性質、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日-3 月 18 日 京都産業大学 (京都)
- ⑥ Yokono, M., Tomo, T., Nagao, R., Ito, H., Tanaka, A., Akimoto, S. Amino acid modifications improved excitation energy distribution in pigment-altered photosystem II reaction center. 5th Asia and Oceania Conference for Photobiology, 2011.7.30-8.1, Nara Prefectural New Public Hall, Nara
- ⑦ 土屋 徹、秋本 誠志、金籐 隼人、鞆 達也、三室 守、新奇クロロフィルを合成する *Acaryochloris marina* MBIC 11017 の形質転換体からの光化学系 II の単離とその性質、第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 20 日-3 月 22 日 東北大学 (仙台)
- ⑧ 小島 茜、長尾 遼、三室 守、鞆 達也、*Acaryochloris marina* の光化学系 II 色素組成、第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 20 日-3 月 22 日 東北大学 (仙台)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土屋 徹 (TSUCHIYA TOHRU)

京都大学・大学院人間・環境学研究科・准教授

研究者番号：20362569

### (2) 研究分担者

秋本 誠志 (Akimoto Seiji)

神戸大学・分子フォトサイエンス研究センター・准教授

研究者番号：40250477

鞆 達也 (Tomo Tatsuya)

東京理科大学・理学部・准教授

研究者番号：60300886

### (3) 連携研究者