

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560952

研究課題名(和文)シアノバクテリア光化学系を最小化した水分解反応系の構築と解析

研究課題名(英文) Construction and analysis of minimized water-splitting reaction system from cyanobacterial photosystem II

研究代表者

松岡 正佳 (MATSUOKA, Masayoshi)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：10121667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：光化学系(PSII)の水分解反応に関わる全ての補因子はPSのD1/D2ヘテロ二量体サブユニット(psbA, psbD遺伝子産物)に結合している。私達は単離したD1/D2ヘテロ二量体は本質的に光化学反応を触媒できると仮定し、以下の実験方式を行う。好熱性シアノバクテリアのpsbAとpsbD遺伝子を発現する*Synechococcus elongatus* PCC 7942の株の作成、組換え株からCP47-histag PS複合体の精製、PSの熱変性と耐熱性D1/D2ヘテロ二量体の単離、D1/D2ヘテロ二量体へのMn4Caクラスターの再構成。ここではとの最近の進歩を述べる。

研究成果の概要(英文)：Water-splitting reaction in photosystem II (PSII) relies on redox cofactors all of which bind on D1/D2 heterodimeric subunits (psbA and psbD gene products). We hypothesized that D1/D2 heterodimer could intrinsically carry out the PS II redox reaction in its isolated state. To prove this, we set the following experimental scheme: (1) construction of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 strains expressing only psbA and psbD genes from a thermophilic cyanobacterium, (2) purification of PS II complex from the recombinant strains using CP47-histag affinity chromatography, (3) heat destruction of the PS II complex followed by chromatographic purification of thermostable D1/D2 heterodimer, and (4) reconstitution of Mn4Ca cluster on D1/D2 heterodimer. Here, we describe our recent progress in step (1) and (2).

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：シアノバクテリア 光化学系 遺伝子置換 耐熱性

1. 研究開始当初の背景

好熱性シアノバクテリア由来光化学系 (PS II) はその熱安定性のために結晶化やX線回折分析に適しており、20種類のサブユニットの立体構造が3.0~3.5 Åの分解能で解明されている(Ferreira KN et al., Science, 303, 1831-1838, 2004; Loll Bet al., Nature, 438, 1040-1044, 2005)。PS IIの最大の特徴である水分解系については、マンガン原子4個とカルシウム原子1個から成るMn₄Caクラスターが、D1-D2ヘテロダイマーのC末端側のアミノ酸側鎖に立方体状の金属錯体を形成している。この構造は従来考えられてきた立方体構造に近いものであるが、Caイオンを含んでいるという点で独特の錯体構造である。

一方、水分解反応はMn₄Caクラスターだけではなく、マンガンイオンから電子を奪い、高い酸化状態(Mn^{IV}~Mn^{III})をつくるクロロフィル二量体(PD1/PD2、またはP680)、およびその周辺の光エネルギー伝達系から構成されている。反応の初期過程は、光励起によりP680が酸化されP680⁺となると同時にフェオフィチン(Pheo)が還元され、P680⁺/Pheo⁻の電荷分離が誘起される光化学反応に始まる。その後、正電荷はD1タンパク質のチロシン残基(Yz)等を経て、Mn₄Caクラスターから電子を引き抜き、クラスターに結合している水分子が酸化されていく。反応収支は4光量子のエネルギーで水2分子が分解され、酸素1分子が発生する(2H₂O → 4H⁺+4e⁻+O₂)。

PS IIではMn₄Caクラスターが水分子から電子を奪う。しかも金属クラスターが配位しているD1タンパク質のアミノ酸側鎖は酸化損傷を受けやすく、損傷したD1タンパク質は特異的プロテアーゼによって分解され、ターンオーバーしている。新たに作られたD1タンパク質は、C末端の16アミノ酸を除去するプロセッシングを受けて、初めてPS IIへのアセンブリーが完結する。X線構造解析の結果、D1タンパク質がプロセッシングを受けた後のC末端残基Ala344のカルボキシル基がMn₄Caクラスターに結合していることが分かった(図1)。

このようなD1タンパク質レベルでの調節に加えて、シアノバクテリアでは外部の光強度に応じて3つのD1タンパク質をコードする*psbA*遺伝子の発現レベルでの調節も受けている。このように複雑に調節されているD1-D2ヘテロダイマーとMn₄Caクラスターの構造は静的なものではなく、動的に構造変化を起こしている可能性がある。そのような動的構造変化を検出するためには、十分な量の均一なD1-D2ヘテロダイマー標品が必要であるが、D1-D2ヘテロダイマーを単離精製した報告はない。私達は薬剤耐性マーカーの数に制限を受けずに遺伝子組換えシアノバクテリアを構築する新しい方法論を開発した(Takahama K et al., Plant Cell Physiol., 45, 333-339, 2004)。

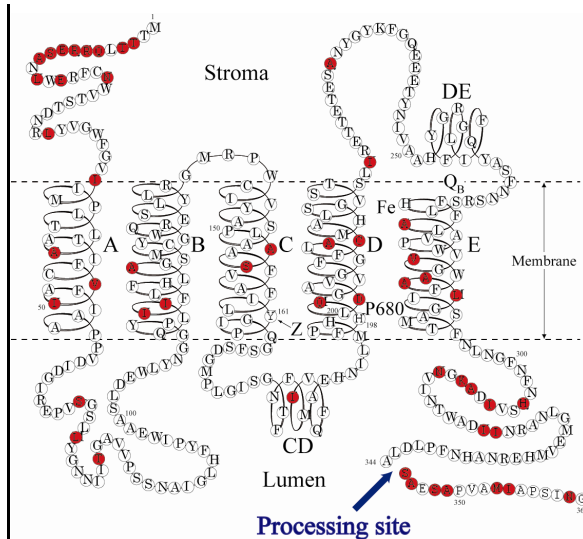


図1. 好熱性シアノバクテリア D1 タンパク質のC末端プロセッシング

印のアミノ酸残基は中温性シアノバクテリアと異なっている部位を示す。

そして、この *rps12* 媒介遺伝子置換法をD1-D2タンパク質が耐熱性のものに置換された変異株の作成に応用した。本研究では熱安定性の差を利用して、PS II複合体から耐熱性D1-D2ヘテロダイマーを高純度に精製する新しい方法論の実証を試みる。

2. 研究の目的

水分解系に関与するマンガンクラスターの反応機構解析には、PSII複合体全体では大きすぎて精密な分析が困難であった。本研究ではD1-D2サブユニットを熱安定タンパク質で置換した組換えシアノバクテリアからPSII複合体を精製し、さらに反応中心のD1-D2ヘテロダイマーを高純度に精製できる系を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

中温性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 株はD1タンパク質をコードする3つの*psbA*遺伝子、D2タンパク質をコードする2つの*psbD*遺伝子をもつ。好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* 株にも同数の遺伝子が存在する。そこで以下の計画に従って、内部アンテナタンパク質CP47のC末端にHistagを付加した菌株GRPS810を親株として、耐熱性D1,D2タンパク質の遺伝子を導入し、最後に不要な中温性D1,D2遺伝子を除去することによって、D1-D2ヘテロダイマーの精製に適した組換え体を作成する(図2)。

(1) 好熱性 *psbA1vΔC* 遺伝子の中温性シアノバクテリアへの組み込みによるD1耐熱化

(2) 好熱性 *psbD1v* 遺伝子の中温性シアノバクテリアへの組み込みによるD2耐熱化

(3) 中温性 *psbA*, *psbA*, *psbD* 遺伝子の破壊による耐熱性 D1, D2 のみをもつ組換え株の作成

最初に、PS の内部アンテナ CP47 の C 末端に Histag を付加し、PS 複合体をアフィニティークロマトグラフィーにより精製できる系を構築することがポイントである。次に D1, D2 タンパク質の遺伝子を順次置換して、最終的に耐熱性 D1-D2 タンパク質だけを発現する組換えシアノバクテリア変異株を構築する。この変異株からアフィニティークロマトグラフィーで精製した PS 複合体は、耐熱性 D1-D2 ヘテロダイマーの高純度に精製のための出発材料となる。

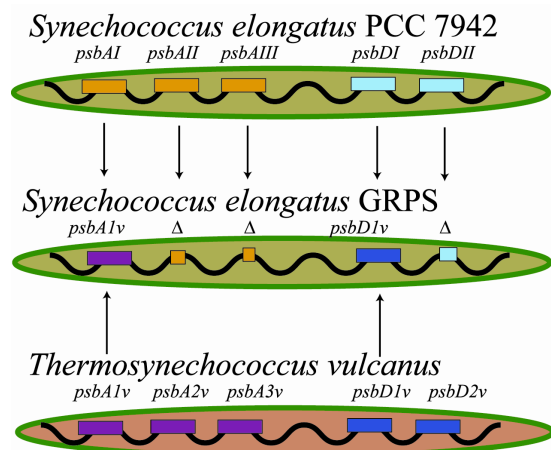


図2 .D1-D2 タンパク質をコードする遺伝子の置換と破壊

矢印 () は遺伝子置換または欠失 (Δ) を表す。GRPS は組換え株の名称。

上記の遺伝子置換で1つ問題点がある。すなわち、私達の以前の研究より *T.vulcanus* 由来 *psbA1v* 遺伝子の D1 タンパク質コード領域(ORF)全長を組み込んだ組換えシアノバクテリア株では、耐熱性 D1 タンパク質の C 末端がプロセシングされていないことが推定された(平成 15 年度~平成 16 年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2)研究成果報告書)。D1 タンパク質 C 末端のプロセシングは Mn_4Ca クラスターの形成に必須である。しかし、C 末端の 16 アミノ酸を欠失した D1 Δ C16 タンパク質も PS に正常に組み込まれ、機能できることが知られている(Lers A et al., J. Biol. Chem., **267**, 17494-17497, 1992; Nixon PJ et al. Biochemistry, **31**, 10859-10871, 1992)。したがって、C 末端延長ペプチドをもたない耐熱性 D1 タンパク質の遺伝子(*psbA1v* Δ C)を組み込むことによりプロセシングの問題を回避できると考えられた。

4. 研究成果

(1) 好熱性シアノバクテリアの *psbA* と *psbD* 遺伝子を発現する *Synechococcus elongatus* GRPS 株の作成

GRPS(Gene replacement of photosystem II) 株は図 3 の流れに従って作成した。GRPS810 は PSII 複合体の CP47 タンパク質の C 末端に histag を付加した菌株で、以降の D1/D2 タンパク質遺伝子の置換の元となる株である。GRPS810 株が正しく作成されていることは PCR 分析から確認された。GRPS810 株を元に、D1 タンパク質をコードしている *psbAI* 遺伝子の置換を行った結果、GRPS911 と GRPS912 株が得られた。GRPS911 株では好熱菌 *T. vulcanus* の D1 タンパク質のコード領域(ORF)が *psbAIORF* と置換されているのに対して、GRPS912 株では D1 タンパク質の C 末端の 16 アミノ酸配列を欠失した好熱菌の D1 タンパク質の ORF(*psbA1v* Δ C16ORF)が置換されている。

次に D2 タンパク質の置換について実験を行った。D2 タンパク質をコードしている *psbDI* 遺伝子を破壊した株 GRPS951 と GRPS952 株では、遺伝子破壊が完全ではない証拠が得られた。シアノバクテリアには細胞当たり複数の染色体 DNA が含まれているので、完全な *psbDI* 遺伝子破壊株を得るためには、遺伝子破壊株のストレプトマイシン耐性(Sm^R)復帰突然変異体を解析して元の野生型遺伝子が残存していないことを確認する必要がある。遺伝子破壊に使用している異種 *rps12* 遺伝子の発現を調節する *psbAI*(P_A)プロモーターが復帰率を上昇させることが判明したので、より安定なプロモーターとしてセルロース合成酵素遺伝子のプロモーター(P_C)を使用した遺伝子破壊を行い、GRPS961 および GRPS962 株を作成した。これらの株の形質転換により、D1/D2 が置換された変異株がより高頻度に再現性良く得られることが期待できる。

(2) 組換え株から CP47-histag PS 複合体の精製

GRPS810 株の培養細胞からチラコイド膜を調製し、ドデシルマルトシドで可溶化した後、 Ni^{2+} キレートカラムを用いてアフィニティークロマトグラフィーを行った結果、PSII 複合体が精製された。SDS-PAGE の結果、PSII 複合体に含まれている 20 種類のサブユニットの内、D1, D2, CP43, CP47, cytb559 などのバンドが確認された。D1 タンパク質を置換した GRPS911 および D1 Δ C16 タンパク質を置換した GRPS912 株についても、アフィニティークロマトグラフィーで PSII 分画が得られている。この PSII 分画に *T. vulcanus* の D1 タンパク質が組込まれているか調べるために、Western 分析を行う予定である。 Δ C16 の欠失の効果を確認し、PSII に組み込まれている組換え株を使って D2 タンパク質の置換を図 3 の方法で行っていく。好熱菌の D1/D2 タンパク質が共に PSII 複合体に組み込まれている GRPS 株が得られると、耐熱化 D1/D2 の精製を行う出発材料となるであろう。

記念館（岡山市）

5)原口典久、長濱一弘、松岡正佳：シアノバクテリアの多重遺伝子置換による光化学系 D1/D2 耐熱性ヘテロダイマーの中温性株での発現、日本植物生理学会、2012 年 3 月 18 日、京都産業大学（京都市）

6. 研究組織

(1)研究代表者

松岡 正佳 (MATSUOKA, Masayoshi)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：10121667

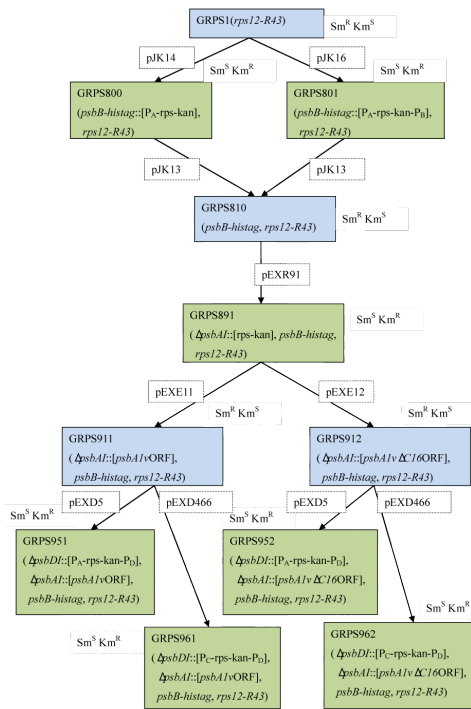


図3. GRPS株の構築スキーム

ストレプトマイシン (Sm) およびカナマイシン (Km) の耐性 (R) と感受性 (S) を交互に繰り返して遺伝子置換を行う。rps-kan は異種 rps12-6803 遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子を連結したカセット。緑色の GRPS 株は遺伝子破壊株、青色の GRPS 株は遺伝子置換株を表す。

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)

[学会発表](計 5 件)

1) 原口典久、長濱一弘、松岡正佳：シアノバクテリア rps12 媒介遺伝子置換法におけるプロモーターの影響と遺伝子組換えの効率化、日本生物工学会九州支部大会、2013 年 12 月 7 日、佐賀大学（佐賀市）

2) 原口典久、長濱一弘、松岡正佳：シアノバクテリア光化学系 複合体を最小化した水分解反応系の構築と解析、日本生物工学会、2013 年 9 月 19 日、広島国際会議場（広島市）

3) 原口典久、長濱一弘、松岡正佳：光化学系 D1/D2 耐熱性ヘテロダイマーの単離に向けた遺伝子工学、日本植物生理学会、2013 年 3 月 21 日、岡山大学（岡山市）

4) Haraguchi, N., Nagahama, K., Matsuoka, M.: A genetic approach to isolate the minimized thermostable D1/D2 heterodimer from cyanobacteria. 岡山大学国際シンポジウム、2012 年 10 月 23 日、岡山大学五十周年