

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32675

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570049

研究課題名(和文) 表在性タンパク質の脂質修飾と光合成の高温耐性に関する研究

研究課題名(英文) The study on lipid modification of extrinsic proteins and thermotolerance of photosynthesis

研究代表者

水澤 直樹 (MIZUSAWA, Naoki)

法政大学・生命科学部・准教授

研究者番号：80342856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：一部のシアノバクテリアの光合成装置は陸上植物に比べて高温耐性を示す。本研究では、2種のシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 と *Anabaena* sp. PCC 7120 を用いて光化学系 (PSII) の高温安定性の仕組みを脂質と表在性蛋白質の観点から明らかにしようとした。その結果、PSII還元側に結合する特定の脂質がPSII還元側の反応に加え酸素発生系の表在性蛋白質の結合にも影響を与えることで、PSIIを安定化していることが示唆された。*Anabaena*ではPSIIの迅速な精製を可能にするため、PSIIのサブユニットの1つにヒスチジンタグを発現する株を作製した。

研究成果の概要(英文)：Mechanism of thermotolerance of cyanobacterial photosystem II complex (PSII) has been investigated using *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Anabaena* sp. PCC 7120 focusing on the role of lipids and extrinsic proteins in stabilization of PSII. It was found that at least one phosphatidylglycerol molecule associated with the reducing side of PSII is involved in the stabilization of PSII through affecting not only the reducing-side but also the oxidizing-side of PSII, namely, functional binding of extrinsic proteins to oxygen-evolving complex. We made an *Anabaena* mutant in which a histidine-tag was attached to one of subunits of PSII to allow the isolation of highly purified PSII complex rapidly from the cells.

研究分野：光合成分子生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子生物・生理学

キーワード：光化学系2 光合成 高温ストレス シアノバクテリア 脂質

1. 研究開始当初の背景

近年の温暖化問題を解決する手段として、厳しい高温下で健全に生育する作物の開発が待望されている。植物の代謝系のうち高温ストレスに対して最も弱い過程の一つは、光合成酸素発生反応である。そのため、酸素発生を担う酸素発生複合体の安定性が高温耐性植物を作出する上で重要な鍵であると考えられる。

酸素発生はチラコイド膜に埋め込まれた光化学系複合体 (PSII) でおこる。PSII は 20 種類以上のタンパク質、色素分子、金属原子、電子伝達担体等から構成される超分子複合体であり、反応中心は 2 つの相同なタンパク質 D1 と D2 により構成され、酸素発生は主に D1 に結合するマンガン (Mn) クラスターにより触媒される。Mn クラスターは不安定であるため、PSII には Mn クラスターを覆うように複数の表在性タンパク質が結合して、Mn クラスターの保護や機能の最適化に役立っている。表在性タンパク質として陸上植物は PsbO、PsbP、PsbQ、Psb27 をもち、シアノバクテリアではそれらに加え PsbU、PsbV 等をもつ。高温ストレスにより酸素発生系が失活するのは、これらの表在性タンパク質が高温下で PSII から容易に解離し、それによって Mn クラスターが不安定になることが原因であると考えられている。

私達はシアノバクテリアの中には農作物として利用されている植物に比べ光合成装置の高温安定性が高いものがあることに注目し、シアノバクテリアの表在性タンパク質の PSII への結合様式は陸上植物と違うのではないかと着想して研究を開始した。現在までに、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 では、PsbQ と Psb27 が植物のものとは異なり、N 末端において脂質修飾を受けるリポ蛋白質で、PSII の安定化に寄与していること、シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 では PsbO の N 末端に脂質修飾を受けるための特徴的なシグナル配列をもち、リポタンパク質である可能性が高いことを見出している。以上の結果は、シアノバクテリアは表在性タンパク質の脂質修飾により膜との結合を強化することで Mn クラスターひいては光合成を安定化している可能性を示唆していた。

また近年、私達は *Synechocystis* のホスファチジルグリセロール (PG) 欠損株では、野生株に比較して酸素発生系の熱安定性が顕著に低下していることを明らかにした。詳細な *in vivo*、*in vitro* の解析により、PSII 複合体に本来結合すべき PG が除去されていることが熱安定性低下の要因であることが示唆されたが、PSII のどの部位に結合する PG が影響しているかは明らかにすることができなかった。

2. 研究の目的

本研究では、シアノバクテリアの酸素発生

系の高温安定性の仕組みを表在性タンパク質と脂質の観点から明らかにすることを目的とする。

具体的には、まず、細胞の増殖、酸素発生活性を指標として、シアノバクテリアの高温安定性を確認し、高温安定性がみられたシアノバクテリアについて、PSII の精製法を確立し PSII の諸特性を明らかにする。

次に、好熱性シアノバクテリアから単離された PSII の結晶構造解析から推定されている PG 結合部位の D1、D2 上のアミノ酸残基を改変し、特定の PG を結合不全にしたときの光合成特性と高温安定性を調べることで、高温耐性の原因を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) シアノバクテリア酸素発生系の高温耐性、乾燥耐性の解析

高温耐性をもつシアノバクテリアとして、*Synechocystis* と *Anabaena* に着目し、高温処理、乾燥処理を施したときの細胞生存率と酸素発生活性の低下を解析した。

(2) シアノバクテリアの PSII の単離

高温耐性・乾燥耐性の仕組みを調べるために、細胞から PSII 標品を単離することとした。そのために、*Anabaena* の CP47 タンパク質の C 末端にヒスチジン (His) タグを発現する株を作製し、PSII 標品の単離を試みた。

(3) 高温耐性に関係する PG 結合部位の同定の試み

PG が結合すると推定されている D1 上のアミノ酸残基を改変することにより、PG 結合不全を起こした *Synechocystis* 変異株を用いて作製し、その光合成特性を PG 欠損株と比較解析した。

4. 研究成果

(1) シアノバクテリアにおける高温耐性・乾燥耐性の解析

高温耐性を示す著名なシアノバクテリアとして *Thermosynechococcus* 属が知られ本属の細菌は 50 程度の高温でも増殖するが、通常の作物等の栽培温度である 20 -30 では増殖が停止する。本研究では 20-30 で増殖し、かつ遺伝子操作が可能であるシアノバクテリアの中から、通常の作物 (ホウレンソウを指標とする) よりも高温耐性のあるものとして、*Synechocystis* sp. PCC 6803 と *Anabaena* sp. PCC 7120 を実験材料として選定した。これまでの研究から、*Synechocystis* では酸素発生活性が最大となる測定条件はわかっているが、*Anabaena* では不明であった。そこで、*Anabaena* の細胞とチラコイド膜を用いて酸素発生活性測定の実験条件を検討したところ、加える人工的電子受容体として、*p*-ベンゾキノンを用いたときに最大活性が得られることがわかった。*Synechocystis* で高い活性を示すことがわかっている 2,5-ジメチルベンゾキノン、*p*-フェニルベンゾキノンは *Anabaena* では、あま

り効果的ではなかった。この結果は *Synechocystis* と *Anabaena* で PSII の Q_B 近傍の環境もしくは構造が異なる可能性を示唆する。

次に *Synechocystis* と *Anabaena* の細胞の高温耐性を調べた。両細胞はプレート培養、液体培養ともに 40 程度の高温までは光独立栄養をすることがわかった。酸素発生活性の高温安定性については、*Synechocystis* が *Anabaena* よりも若干高く、40 程度の高温処理後も最適増殖温度の 30 処理時の活性がほぼ保持されることがわかった。この実験の過程で *Anabaena* では高温に加えて乾燥ストレスが加わったときに、これらのストレスに対して耐性が上がることがわかった。*Anabaena* の場合、ニトロセルロースペーパー上に細胞をスポットし完全に乾燥状態にしたあとも、乾燥細胞を再湿潤させると、速やかに増殖を再開した。このような乾燥からの細胞増殖の回復は *Synechocystis* では観察されず、*Anabaena* 特異的な現象であることがわかった。

このように高温と乾燥の複合ストレスに対して耐性をもつ *Anabaena* の特異な光合成特性を解析するために、PSII を単離するための実験系確立を目指した。まず、単離チラコイド膜を界面活性剤ドデシルマルトシドで可溶化し、グリセロール密度勾配遠心法と Blue-native ゲル電気泳動法で PSII に富む画分を得ようとした。その結果、PsbO が PSII にかなり強固に結合している可能性は示唆されたが、PsbO の脂質修飾を解析するなど、さらに詳細な生化学的解析、生物物理学的解析に耐える純度の高いサンプルを得ることができなかった。そこで、PSII の構成蛋白質の一つである CP47 の C 末端に His タグを連結させた蛋白質を発現する *Anabaena* の変異株を作製した。10 個選抜したコロニーのうち、1 個はゲノム DNA のすべて (*Anabaena* では複数のゲノム DNA があり、それらがすべて置き換わる必要がある) が CP47 に His タグが連結した DNA に置き換わっていることを PCR で確認した。現在、この変異株からチラコイド膜を単離したのちに、His タグを指標としてニッケルカラムで PSII 標品を精製しようとしているところである。

(2) 高温耐性に関係する D1 上の PG 結合部位の同定

PSII に結合する PG が光合成の高温耐性に関与する仕組みを解析するために、まずどの PG 分子が高温耐性に関与するかを解析することとした。*Thermosynechococcus* から単離した PSII の X 線結晶構造解析によると、PSII は二量体で存在し、PG は PSII 単量体あたり 5 分子存在する。そこでまず、X 線結晶構造のデータを検討し、各 PG 分子と水素結合していると推定されるアミノ酸残基を選定した。PG 分子にはリン酸基の酸素とグリセロール骨格の酸素原子が存在している。これらの酸素原子と水素結合していると予測され

るアミノ酸残基は D1 と D2 蛋白質上に存在していた。そのため、これらのアミノ酸残基を遺伝子操作により改変し、水素結合を破壊し PG 結合能を部位特異的に阻害することにより、特定の PG 分子の結合が異常になったときの PSII の高温安定性の変化を解析することとした。本研究ではまず 2 つの PG 分子 (PG664、PG694) に着目し、それらの結合している D1 上のアミノ酸残基 S232 と N234 を各々アラニン (A)、アスパラギン酸 (D) に改変した *Synechocystis* 変異株 (S232AN234D 株) を作製し、その光合成特性を解析した。

S232AN234D 株は通常の光独立栄養条件 (弱光下、30) では、野生株とほぼ同等な速度で増殖し、酸素発生活性も野生株と比較して若干低い程度であった。通常、野生株ではベンゾキノン (BQ) を添加すると、酸素発生活性が増大する。しかし、興味深いことに、S232AN234D 株では BQ を添加すると、酸素発生活性が著しく阻害されることがわかった。この特性は PG 欠損株 (*pgsA* 遺伝子欠損株) で顕著に観察される特徴であった。すなわち、S232A と N234D の変異により、PG 欠損と似た現象が引き起こされることがわかった。次に、生理学的解析により、BQ 添加時に起こる現象をさらに詳しく解析した。励起光を与えたのちのクロロフィル蛍光減衰を解析することにより、PSII 還元側の Q_A^- から Q_B への電子伝達速度を見積もることができる。この測定により、BQ を加えたときに S232AN234D 株では、 Q_A^- から Q_B への電子伝達が大きく阻害されることがわかった。さらに、熱発光測定により、 Q_B の酸化還元電位が変化することがわかった (Q_A^- の酸化還元電位は変化しなかった)。すなわち、 Q_B の酸化還元電位の変化が Q_A^- から Q_B への電子伝達速度の阻害の原因であることがわかった。また、単離した PSII 標品の脂質分析により、S232AN234D 株の PSII では PG 含量が野生株に比べ PSII モノマーあたり約 1 分子減少していることが明らかになった。以上の結果は、D1 上の S232A と N234D の変異により、PG664、PG694 の少なくともどちらかの PG 分子が PSII から解離し、その結果、 Q_B 近傍の構造変化が促されると同時に Q_B の酸化還元電位が変化し Q_A^- から Q_B への電子伝達が阻害されたことを示唆している。

本研究のこれまでの解析から S232AN234D 株は主に PSII 還元側の機能の変化を及ぼすことを意味していた。しかし、PSII 標品の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の解析により、S232AN234D の変異は PSII 酸素発生系の表在性蛋白質の PsbU と PsbV の PSII への結合の不安定化をも引き起こすことが明らかになった。酸素発生活性の高温安定性の実験からも、S232AN234D 株は野生株に比較して、低い温度から酸素発生の活性低下が起こることがわかった。ただ

し、本変異株は PG 欠損株 (*pgsA* 変異株) ほどには、酸素発生が高温に対して不安定ではないことから、高温耐性に関係する PG 分子は他にも存在することが示唆された。以上の結果から、S232AN234D 株では、PG 分子が解離したことにより、PSII の還元側と同時に酸化側 (表在性蛋白質の結合) にも異常が引き起こされ、その結果、酸素発生の高温耐性能が低下していることが明らかになった。

今後、PG664、PG694 以外の PG 分子に結合するアミノ酸残基にも変異を導入した変異株の光合成特性を解析することにより、個々の PG 分子の PSII における機能、PSII の高温安定化における機能を明らかにしたいと考えている。

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)

Yuzawa, Y., Shimojima, Sato R., Mizusawa N., Yamamichi K., Suzuki, M., Iwai, M., Hori, K., Wada, H., Masuda, S., Ohta, H. Cyanobacterial

monogalactosyldiacylglycerol-synthesis pathway is involved in normal unsaturation of galactolipids and low-temperature adaptation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta* 1841:475-483 (2014) 査読あり

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. In *Photosynthesis Research for Food, Fuel and Future* (Kuang, T., Lu, C., Zhang, L., eds.) pp.620-624, Springer (2013) 査読あり

Sakata, S., Mizusawa, N., Kubota, H., Sakurai, I., Wada, H. Psb28 is involved in recovery of photosystem II at high temperature in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 50-59 (2013) 査読あり

Chan, T., Shimizu, Y., Pospíšil, P., Nijo, N., Fujiwara A., Taninaka, Y. Imai, A. Morita, N., Yoshioka-Nishimura M., Izumi Y., Yamamoto, Y., Kobayashi, H., Mizusawa, N., Wada, H., Yamamoto, Y. Quality control of photosystem II; Lipid peroxidation accelerates photoinhibition under excessive illumination. *Plos one* 7, e52100 doi:10.1371/annotation/8b0f8019-e4ba-4c35-9575-1a1313ae7b41 (2012) 査読あり

Mizusawa, N., Wada, H. The role of lipids in photosystem II. *Biochim. Biophys.*

*Acta*1817:194-208 (2012) 査読あり

[学会発表](計 10 件)

遠藤嘉一郎、水澤直樹、沈建仁、山田聖人、鞆達也、小林康一、和田元「ホスファチジルグリセロール結合部位の改変が光化学系 II に及ぼす影響」第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18 日 (富山大学、富山県)

水澤直樹、木村行宏、小野高明「アミノ酸部位特異的変異とフーリエ変換赤外分光法による光合成酸素発生複合体の研究」マイクロ・ナノテクノロジー研究センター主催「グリーンテクノロジーを支える次世代エネルギー変換システム」公開シンポジウム、2014 年 1 月 25 日 (法政大学小金井キャンパス、東京都)

水澤直樹、酒田慎也、桜井勇、佐藤直樹、和田元「膜糖脂質の欠損が光合成装置の安定性に与える影響」マイクロ・ナノテクノロジー研究センター主催「グリーンテクノロジーを支える次世代エネルギー変換システム」公開シンポジウム、2014 年 1 月 25 日 (法政大学小金井キャンパス、東京都) Mizusawa, N., Sakata, S., Kubota-Kawai, H., Sakurai, H., and Wada, H. Cyanobacterial Psb28 protein is involved in the repair of photosystem II under high-temperature stress. The 16th international congress on photosynthesis, 2013 年 8 月 11 日~16 日 (セントルイス、アメリカ合衆国)

Endo, K., Mizusawa, N., Shen, J.-R., Kobayashi, K., Wada, H. Effect of site-directed mutagenesis of amino-acid residues interacting with phosphatidylglycerol molecules on the function of photosystem II. Photosynthesis Research for Sustainability- 2013, 2013 年 6 月 5 日~9 日 (バクー、アゼルバイジャン)

遠藤嘉一郎、水澤直樹、和田元「ホスファチジルグリセロール結合部位の改変が光化学系 II に及ぼす影響」第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 23 日 (岡山大学、岡山県)

和田元、水澤直樹、桜井勇、酒田慎也、久保田寿子、佐藤直樹、小林康一「光化学系 II における DGDG の機能」第 25 回植物脂質シンポジウム、2012 年 12 月 1 日 (甲南大学、兵庫県)

Wada, H., Sakurai, I., Mizusawa, N., Ujihara, T., Tanoue, R., Endo, K., Kobayashi, K. Indispensable function of lipids in photosynthesis. Okayama university international symposium "Structure and Dynamics of Photosynthetic Systems", 2012 年 10 月 22 日~23 日 (岡山大学、岡山県)

湯澤優一、下嶋美恵、佐藤諒一、水澤直樹、

岩井雅子、和田元、増田真二、太田啓之「シアノバクテリア MGlcDG 欠損株を用いた MGlcDG の生理的影響の解析」第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日～18 日（京都産業大学、京都府）

Yuzawa, Y., Shimojima, M., Mizusawa, N., Sato, R., Iwai, M., Wada, H., Masuda, S., Ohta, H. Complementation analysis of cyanobacterial monoglucosyldiacylglycerol synthase by higher plant monogalactosyldiacylglycerol synthase in *Synechocystis* sp. PCC 6803. The 4th Asian symposium on plant lipids, 2011 年 12 月 2 日～4 日（香港大学、香港）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://kenkyu-web.i.hosei.ac.jp/Profiles/28/0002762/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水澤 直樹 (MIZUSAWA Naoki)
法政大学・生命科学部・准教授
研究者番号：80342856

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし