

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月10日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657026

研究課題名（和文） 光合成色素系のエンジニアリング

研究課題名（英文） Engineering of photosynthetic pigment system

研究代表者

田中 歩 (TANAKA AYUMI)

北海道大学・低温科学研究所・教授

研究者番号：10197402

研究成果の概要（和文）：光合成集光装置は、光合成の最初の段階を担うため、光合成の改変の標的として興味深い。そこで、N末制御ドメインを削ったクロロフィルb合成酵素（CAO）をシロイヌナズナに導入すると、クロロフィルbを過剰に蓄積し、さらに中心集光装置にもクロロフィルbが取り込まれた。この形質転換植物は、細胞死が誘導される一方、ステイグリーンの形質を示した。これらの結果は、光合成改変の農学的応用への可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：The light-harvesting apparatus is an interesting and useful target for genetic modulation of photosynthesis, because it participates in the initial and essential steps of photosynthesis. We succeeded in altering the pigment arrangement in the light-harvesting systems by introducing N-terminal truncated chlorophyllide a oxygenase, which catalyzes chlorophyll b biosynthesis, into Arabidopsis thaliana. Interestingly, this transgenic plant showed the stay green phenotype and exhibited severe photodamage. Studies of this transgenic plant suggested the potential agricultural application of photosynthesis modification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物学・生理学

キーワード：クロロフィル、葉緑体、光合成、機能改変、シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

光合成は、30億年以上にわたる進化の過程で高度に設計され、高い効率を持った装置で作られている。そのため、光合成の初期過程を担う光化学系Iと光化学系IIは、すべての生物において共通した構造を持っている。さらに、近年明らかになった光化学系の構造は、光合成色素が光化学系の中で規則正しく配置されていることを示し、さらにこの厳密な配置が効率的なエネルギー移動、および過剰エネルギーの散逸にとって重要であることが議論されている。これらの結果は、光合成の色素系にとって、人工的な改変が困難で

あることを示唆している。

しかし、以前、申請者のグループは、僅かではあるが、シアノバクテリアにクロロフィルbを機能的に導入することができ、またシロイヌナズナに過剰なクロロフィルbを蓄積させることに成功した。これらの事実は、光合成色素系は、我々が想像していたより、可塑性のある装置であることを示している。

2. 研究の目的

本研究は、この高度に保存された光化学系の構造を改変し、新規光化学系を葉緑体内に構築するという新しい挑戦を行うことを目

的としている。さらに、この改変した植物を利用して、次の3点について調べる。

- (1) 新規構築した光合成光化学系の機能特性
- (2) 新しく構築した光化学系の植物の発育に対する影響
- (3) 核遺伝子の発現に対する新規光合成の影響

この研究によって、光化学系が改変可能なことを示し、農学的な応用に有効であることを明らかにする。さらに、これらの結果を踏まえて光合成の機能に関して、新たな視点を構築したい。

3. 研究の方法

クロロフィルbはChlorophyllide a oxygenase (CAO)によってクロロフィルaから合成される。CAOは3つのドメイン、制御ドメイン、リンカードメイン、触媒ドメインからなっている。調節ドメインは、負のフィードバック制御でクロロフィルbの合成量を調節すると同時に、クロロフィルbが集光性クロロフィルa/bタンパク質複合体に優先的に取り込まれる役割を担っていると考えられる。

そこで、この制御ドメインを削ったCAOをGFPに融合させ(BC-GFP)シロイヌナズナに導入することで、クロロフィルbの配置が異なり、しかも多量のクロロフィルbが組み込まれた光合成色素系を作製する。この形質転換植物を用いて、上記、(1)、(2)、(3)の解析を行う。

4. 研究成果

- (1) 新規構築した光合成光化学系の機能特性

クロロフィルbを過剰発現させると、予想通り、集光性クロロフィルa/bタンパク質複合体(LHC)の蓄積が増加した。また、中心集光装置にもクロロフィルbが取り込まれ、全く新しい集光装置が構築された。

クロロフィルbを過剰発現した植物の二酸化炭素の固定速度は、野生型とほとんど変わらなかった。また、蛍光寿命を測定する手法によって色素間のエネルギー移動を調べたところ、クロロフィルb過剰発現植物では、クロロフィルaからのエネルギー移動が遅くなった。これはおそらく、色素複合体の中でクロロフィルaが取り込まれるサイトにクロロフィルbが入ったため、アップヒルのエネルギー移行になったためと思われる。

- (2) 新しく構築した光化学系の植物の発育に対する影響

作製したクロロフィルb過剰発現植物は、野生型と同じように生育した。さらに興味深いことに、この形質転換植物はステイグリー

ンの形質を示した(図1)。この植物は、クロロフィルを保持するだけでなく、光合成活性も高く保たれたので、機能的ステイグリーンと思われる。



図1 制御ドメインを削ったCAOを導入した株(左)。野生型に比べクロロフィルを長く保持し、ステイグリーンの形質を示した。

しかしこの植物は強光に弱く、光傷害を受けやすい。さらに、突然葉がしわしわになり、クロロフィルを失い、細胞死が誘導された(図2)。

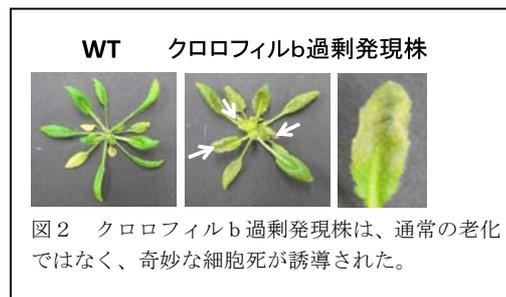
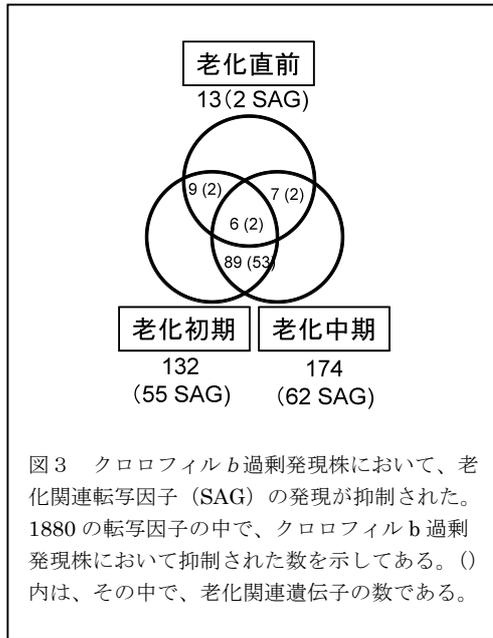


図2 クロロフィルb過剰発現株は、通常の老化ではなく、奇妙な細胞死が誘導された。

この細胞死はクロロフィル分解中間体Pheophorbide aの蓄積による細胞死とよく似ていた。そこで、過剰発現株のクロロフィル分解経路を詳しく調べたところ、一部のクロロフィルbは通常の分解経路を通らず、分解の最初のステップがMgイオンの離脱であった。そのため、クロロフィルの分解が正常に進まず、Pheophorbideの蓄積が誘導された。おそらく、光化学系の中心集光装置に取り込まれたクロロフィルbが正常に分解されなかったためと思われる。

- (3) 核遺伝子の発現に対する新規光合成の影響

クロロフィルb過剰発現植物は、老化が抑制されていたことから、何らかの遺伝子発現が制御されていると思われる。そこで、転写因子1880すべての発現を調べた。その結果、老化時に老化関連遺伝子(SAG)の発現が抑制されていることが明らかになった(図3)。



まとめと展望

本研究で、光合成の初期過程を担う色素系の改変が可能であることを示した。しかし、今回のケースでは、ステイグリーンの誘導とクロロフィルbが正常に分解できない、と言う予期せぬ現象がみられた。これらの結果は、光合成の改変の農学的応用の可能性を示すだけでなく、光合成の分解や形成に関する新たな知見を提供すると思われる。

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 13 件) 全て査読あり

(1) Yamatani H, Sato Y, Masuda Y, Kato Y, Morita R, Fukunaga K, Nagamura Y, Nishimura M, Sakamoto W, Tanaka A, Kusaba K: NYC4, the rice ortholog of Arabidopsis THF1, is involved in the degradation of chlorophyll-protein complexes during leaf senescence., *Plant journal*, in press
DOI: 10.1111/tpj.12154.

(2) Shimoda Y, Ito H, Tanaka A: Conversion of chlorophyll b to chlorophyll a precedes magnesium dechelation for protection against necrosis in Arabidopsis., *Plant journal* 72(3):501-511, 2012,
DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2012.05095.x.

(3) Nakajima S, Ito H, Tanaka R, Tanaka A: Chlorophyll b Reductase Plays an Essential Role in Maturation and Storability of

Arabidopsis thaliana Seeds., *Plant Physiology* 160(1):261-273, 2012,
DOI: 10.1104/pp.112.196881

(4) Tanaka R, Takabayashi A, Ito H and Tanaka A: Chlorophyll metabolism in photosynthetic organisms. *Handbook of Porphyrin Science*, edited by Karl M Kadish, Kevin M Smith and Roger Guillard, World Scientific, Singapore 20: 213-242, 2012
doi: 10.1142/9789814335508_fmatter05

(5) 伊藤寿、田中歩、田中亮一: クロロフィル合成系の多様性はいかにして生まれたか? *光合成研究* 22(2):98-105, 2012
<http://photosyn.jp/journal/sections/kaiho64-6.pdf>

(6) Sakuraba Y, Balazadeh S, Tanaka R, Mueller-Roeber B and Tanaka A.: Overproduction of chlorophyll b retards senescence through transcriptional re-programming in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 53(3):505-517, 2012,
DOI:10.1093/pcp/pcs006

(7) Tomo, T., Kusakabe, H., Nagao, R., Ito, H., Tanaka, A., Akimoto, S., Mimuro, M. and Okazaki, S.: Luminescence of singlet oxygen in photosystem II complexes isolated from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 containing monovinyl or divinyl chlorophyll a. *Biochim Biophys Acta*. 1817(8):1299-1305, 2012,
DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.02.018

(8) Yokono, M., Tomo, T., Nagao, R., Ito, H., Tanaka, A. and Akimoto, S.: Alterations in photosynthetic pigments and amino acid composition of D1 protein change energy distribution in photosystem II. *Biochim Biophys Acta*. 1817(5):754-759, 2012,
DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.02.009

(9) Ito, H. and Tanaka, A.: Evolution of a divinyl chlorophyll-based photosystem in *Prochlorococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(44):18014-18019, 2011,
DOI: 10.1073/pnas.1107590108

(10) Takabayashi, A., Kurihara, K., Kuwano, M., Kasahara, Y., Tanaka, R. and Tanaka, A.: The Oligomeric States of Photosystems and Light-harvesting Complexes in the Chlorophyll b-less Mutant. *Plant Cell*

Physiol. 52(12): 2103-2114, 2011,
DOI: 10.1093/pcp/pcr138

(11) Masuda, S., Harada, J., Yokono, M., Yuzawa, Y., Shimojima, M., Murofushi, K., Tanaka, H., Masuda, H., Murakawa, M., Haraguchi, T., Kondo, M., Nishimura, M., Yuasa, H., Noguchi, M., Oh-oka, H., Tanaka, A., Tamiaki, H. and Ohta, H.: A Monogalactosyldiacylglycerol Synthase Found in the Green Sulfur Bacterium *Chlorobaculum tepidum* Reveals Important Roles for Galactolipids in Photosynthesis. *Plant Cell* 23(7): 2644-2658, 2011,
DOI: 10.1105/tpc.111.085357

(12) Meguro, M., Ito, H., Takabayashi, A., Tanaka, R. and Tanaka, A.: Identification of the 7-Hydroxymethyl Chlorophyll a Reductase of the Chlorophyll Cycle in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23(9): 3442-3453, 2011,
DOI: 10.1105/tpc.111.089714

(13) Tanaka, R. and Tanaka, A.: Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biophys Biochim Acta* 1807: 968-976, 2011,
DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.01.002

[学会発表] (計 20 件)

(1) Xueyun Hu, Masanori Oshiai, Tohru Tsuchiya, Stefan Hortensteiner, Ayumi Tanaka, Ryouichi Tanaka ; Possible involvement of chlorophyllase in a plant defense system, 第 54 回日本植物生理学会、2013 年 3 月 22 日、岡山大学、岡山市

(2) 加藤由佳子、高林厚史、田中歩、田中亮一 ; シロイヌナズナにおける light-harvesting-like タンパク質 LIL8 の機能解析、第 54 回日本植物生理学会、2013 年 3 月 22 日、岡山大学、岡山市

(3) 高橋香織、高林厚史、田中歩、田中亮一 ; シロイヌナズナにおける light-harvesting-like protein, LIL3 の機能解析、第 54 回日本植物生理学会、2013 年 3 月 22 日、岡山大学、岡山市

(4) 森恭一郎、高林厚史、田中歩 ; Chlorophyllide a oxygenase(CAO) の negative feedback 制御における A ドメインの機能解析、第 54 回日本植物生理学会、2013 年 3 月 22 日、岡山大学、岡山市

(5) 佐藤玲惟、伊藤寿、田中歩 ; シロイヌナズナのクロロフィル b 還元酵素の強光適応における機能解析、第 54 回日本植物生理学会、2013 年 3 月 22 日、岡山大学、岡山市

(6) Ayumi Tanaka; Degradation of chlorophyll and chlorophyll-protein complexes, Okayama University International Symposium "Structure and Dynamics of Photosynthetic Systems", October 22, 2012, Okayama University, Okayama

(7) 高橋香織、高林厚史、田中歩、田中亮一 ; light-harvesting-like protein による geranylgeranyl reductase の安定化、ドリコールおよびイソプレノイド研究会例会、2012 年 9 月 29 日、新潟大学、新潟市

(8) 功刀基、高林厚史、田中歩 ; 緑藻の色素タンパク質複合体の生化学的手法を用いた網羅的解析、化学工学会第 44 回秋季大会、2012 年 9 月 20 日、東北大学、仙台市

(9) 功刀基、高林厚史、田中歩 ; クロロフィル b 合成酵素 CAO のユニークな分子進化と光合成の多様化、第 3 回日本光合成学会年会、2012 年 6 月 1 日、東京工業大学すずかけキャンパス、横浜市

(10) 伊藤寿、田中歩 ; 珪藻のクロロフィル合成の解析、日本藻類学会第 36 回大会、2012 年 7 月 14 日、北海道大学学術交流会館、札幌市

(11) Ayumi Tanaka; Genetic engineering of photosystems by the modification of chlorophyll metabolism, ABRC Academia Sinica seminar, April 23, 2012, Institute of Planr and Microbial Biology, Taipei, Taiwan

(12) Xueyun Hu, Tohru Tsuchiya, Stefan Hoertensteiner, Ayumi Tanaka, Ryouichi Tanaka ; Chlorophyllase1 is not involved in chlorophyll breakdown during methyl-jasmonate-induced senescence in *Arabidopsis thaliana*, 第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 18 日、京都産業大学、京都市

(13) 横野牧生、高林厚史、栗原克宜、田中歩、秋本誠志 ; BN-PAGE により精製された光合成反応中心の時間分解蛍光スペクトルの測定、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 18 日、京都産業大学、京都市

(14) 伊藤寿、田中歩；Divinyl Chlorophyllide Reductase の性質、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 18 日、京都産業大学、京都市

(15) 高林厚史、栗原克宜、田中亮一、田中歩；新規手法による葉緑体タンパク質複合体の網羅的検出、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 18 日、京都産業大学、京都市

(16) 加藤由佳子、高林厚史、田中歩、田中亮一；シロイヌナズナにおける新規 Light-harvesting-like タンパク質の機能解析、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都産業大学、京都市

(17) 高橋香織、高林厚史、田中歩、田中亮一；Light-harvesting chlorophyll-binding protein と共通するモチーフを持つタンパク質、LIL3 の機能解析、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都産業大学、京都市

(18) 下田洋輔、伊藤寿、田中歩；シロイヌナズナのクロロフィル b 分解における複数経路の検証、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都産業大学、京都市

(19) 田中歩；生体金属イオン：生命と分子をつなぐメッセンジャー、第 84 回日本生化学会大会シンポジウム、2011 年 9 月 21 日、国立京都国際会館、京都市

(20) Ayumi Tanaka；Evolution of chlorophyll metabolism. “The Evolution of Photosynthesis and Oxygenation of the Earth.” June 28-29, 2011, The University of New South Wales, Sydney, Australia

〔図書〕(計 0 件)
該当なし

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0 件)
該当なし
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)
該当なし
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://www.lowtem.hokudai.ac.jp/plantadapt/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 歩 (TANAKA AYUMI)
北海道大学・低温科学研究所・教授
研究者番号：10197402

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし