

# 研究報告書

## 「安定デバイス創製にむけた光合成光反応制御機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 伊福 健太郎

### 1. 研究のねらい

近年、石油資源の不足と地球環境悪化の両面から、バイオエネルギーやバイオ資源への期待が大きく、光合成研究への社会的注目度が高まっている。なかでも光合成生物による酸素発生反応は、光エネルギーを利用して水を酸化し電子を供給するという光エネルギー・物質転換の根幹をなす反応として非常に重要な研究対象である。

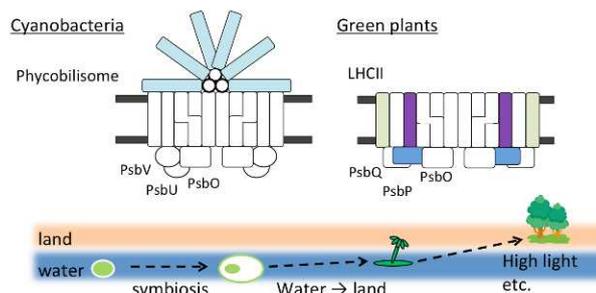


図 1. シアノバクテリアと緑色植物 PSII の周辺構造の違い

植物の光合成の水分解反応は、光化学系 II 色素タンパク質複合体 (Photosystem II、以下、PSII と略す) によって行われる。2011 年に好熱性シアノバクテリア PSII の立体構造が原子分解能で解明され、未解明な水分解-酸素発生機構が解明される期待が高まっている。一方、高等植物を始めとする緑色植物型の PSII は、シアノバクテリア型と異なる集光タンパク質や色素を有し、かつ、触媒部位である  $\text{MnCaO}_5$  クラスターを取り囲む膜表面タンパク質の組成が異なる。即ち、シアノバクテリアはフィコビリソームを集光タンパク質として持ち、膜表面タンパク質は PsbO, PsbU, PsbV であるのに対し、緑色植物は Light-harvesting complex (LHC) を集光タンパク質として用い、膜表面タンパク質は PsbO, PsbP, PsbQ となっている (図 1)。こうした変化は、生育環境の変化に合わせた光合成光反応制御機構として重要な役割を持つと考えられるが、その詳細は明らかではなかった。

そこで本研究では、緑色植物型 PSII 独自の PSII サブユニットの分子機能を詳細に解析し、緑色植物が進化の過程で独自に発達させた PSII の安定化と制御機構を明らかにすることを目指した。特にこれまでの研究の経緯から、緑色植物型 PSII の膜表面タンパク質である PsbP に着目した。PsbP は PSII において  $\text{MnCaO}_5$  クラスターの構築と正常な機能に必須な役割を持ち、植物の光独立栄養的な生育に必須であることが明らかとなっている。にもかかわらず、緑色植物型 PSII における PsbP の結合位置や機能発現の詳細は未解明であった。そこで本研究では、PsbP の分子機能解明を手がかりに、緑色植物型 PSII の構造と機能を解析することを計画した。その上で、水分解-酸素発生反応を行う天然のデバイスである PSII 複合体の活性と安定性を人為的に操作する方策を検討した。

## 2. 研究成果

### (1) 概要

PsbP の分子表面に存在するアミノ酸残基に、様々な部位特異的アミノ酸変異を導入した組換え PsbP タンパク質を作成し、in vitro PSII 活性再構成実験によって酸素発生活性の活性化能を解析した。その結果、すでに報告がある PsbP の N 末端配列に加え、PSII との機能的な相互作用に関与しているアミノ酸残基を複数同定し、PsbP の PSII に対する結合トポロジーを明確にした。また、PsbP と共に PSII に結合する PsbQ が、PsbP の結合を安定化する役割を持つことを報告した。さらにホウレンソウから単離した PSII 膜を材料に、組換え PsbP を用いた再構成実験に化学架橋とアフィニティークロマトグラフィーを組み合わせることで、PsbP 及び PsbQ タンパク質と相互作用する PSII 膜タンパク質サブユニットの同定に成功した。これらの情報を、電子顕微鏡を用いた最新の高等植物 PSII 超複合体の単粒子解析像に統合することにより、高等植物の PSII 膜表在性サブユニットの結合様式のモデルを構築した。

一方、シアノバクテリアには PsbP の祖先(ホモログ)と考えられる CyanoP タンパク質が存在し、緑色植物には、PsbP や CyanoP とアミノ酸配列相同性を示す PsbP-like protein 1 (PPL1) が存在する。CyanoP を欠損する *Synechocystis* sp. PCC 6803 細胞では PSII の活性に大きな影響が認められなかったが、PPL1 を欠損するシロイヌナズナ (*ppl1i* 株)では、光阻害からの回復能が低下するとともに、集光タンパク質と PSII 複合体との相互作用に変化が生じ、光環境が変動する環境に適応できなくなることが明らかとなった。

以上の結果から、シアノバクテリアの PsbP ホモログ (CyanoP) のアミノ酸配列が緑色植物において進化し、二つの PsbP ホモログ (PsbP と PPL1) として、PSII の活性制御のみならず、集光タンパク質 (LHC) との相互作用にも関わっていることを明らかにした。これらの知見をもとに、PsbP タンパク質のアミノ酸配列を改変し、水分解-酸素発生反応を行う天然のデバイスである PSII 複合体の活性と安定性を人為的に操作することを試みた。

### (2) 詳細

#### 研究テーマ A: 「PsbP による光化学系 II 活性制御機構の解析」

PsbP は、水分解-酸素発生反応に必須なカルシウムイオンと塩素イオンの Mn クラスター近傍への結合に重要なことが知られている。PsbP の分子表面に存在するアミノ酸残基に、様々な部位特異的アミノ酸変異を導入した組換え PsbP タンパク質を多数作成し、ホウレンソウから単離した組換え PSII 膜を用いた in vitro PSII 活性再構成実験によって酸素発生活性の活性化能を解析した。加えて、変異 PsbP の結合に伴う酸素発生系の構造変化を FTIR で解析した。その結果、すでに報告されている PsbP の N 末端配列に加え、保存された His144 周辺構造(図2)、並びに、Arg48、Lys143、Lys160 から構成される保存された塩基性領域(図3)が PSII との機能的な相互作用、特に塩素イオンの結合に関与していることを明らかにした (Ido et al. 2012; Nishimura et al. 2014)。これによって PsbP の PSII に対する結合トポロジーが明確となった。加えて、PsbP と共に PSII に結合する PsbQ が、PsbP の結合を安定化する役割を持つことを明らかにした (Kakiuchi et al. 2012)。

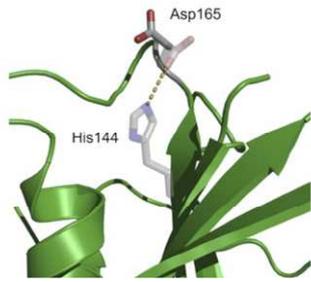


図 2. PsbP の立体構造中で、His144 は Asp165 と塩橋を形成する（透明モデル）。His144 の変異は、その相互作用を妨げ、PsbP と PSII の正常な相互作用を妨げると考えられた。（Ido et al. 2012 より）

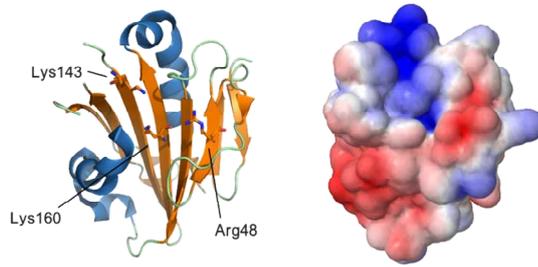


図 3. PsbP の立体構造モデルと表面電荷  
PsbP の分子表面には保存された塩基性領域（青色）が存在し、PSII との相互作用に重要である。（Nishimura et al. 2014 より）

### 研究テーマ B:「高等植物の PSII 膜表在性サブユニットの相互作用様式」

PsbP と PsbQ の C 末端にシステインを導入し、ビオチンでラベル化後、PSII に再構成した。その後、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) と N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS) を用いて化学架橋した後、架橋産物をストレプトタビジンカラムで精製した。精製産物を SDS-PAGE で分離し、トリプシン消化後、LC-MS/MS 解析した結果、PsbP 及び PsbQ タンパク質と相互作用する PSII 膜タンパク質サブユニットを複数同定することができた。その結果、PsbP と PsbQ は、各々が PSII コアサブユニットに加え、集光タンパク質とも相互作用することが明らかとなった。さらにいくつかの架橋産物に関しては、架橋されるアミノ酸残基を決定した（図4：一部を Ido et al. 2012 で発表）。これらの情報を、電子顕微鏡を用いた最新の高等植物 PSII 超複合体の単粒子解析像に統合することにより、高等植物の PSII 膜表在性サブユニットの結合様式のモデルを構築した。

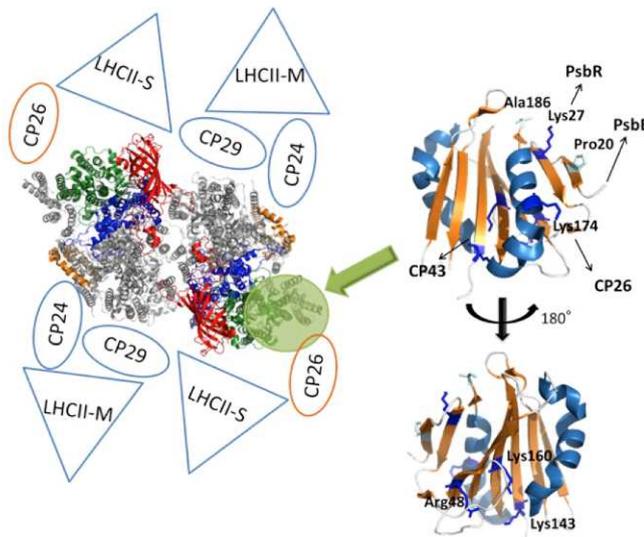


図 4. 緑色植物型 PSII-LHCII 超複合体における PsbP の結合位置とトポロジー。

PSII 反応中心は *Thermosynechococcus vulcanus* の PSII 結晶構造 (PDB ID:3ARC) を用い、集光アンテナの結合位置は [Caffarri et al. EMBO J., 28, 3052-63, 2009] をもとに作図した。D1 を青色、CP43 を濃緑色、PsbE を橙色、Psb0 を赤色のリボンモデルで示した。PsbP が結合すると思われる位置を緑色の円で示した。

### 研究テーマ C: 「PsbP ホモログによる PSII の活性制御機構の解析」

シアノバクテリアには PsbP の祖先(ホモログ)と考えられる CyanoP タンパク質が存在し、緑色植物には、PsbP や CyanoP とアミノ酸配列相同性を示す PsbP-like protein 1 (PPL1) が存在する (Ifuku, 2014)。各々の遺伝子欠損変異体を用いた解析の結果、CyanoP を欠損する *Synechocystis* sp. PCC 6803 細胞では PSII の活性に大きな影響が認められなかったのに対し (Aoi et al. 2014)、PPL1 を欠損するシロイヌナズナ (*ppl1i* 株) では、光阻害からの回復能が低下するとともに、集光タンパク質を結合した PSII-LHCII 超複合体の蓄積量が減少していた。さらに *ppl1i* 株では、非光化学消光 (NPQ) の生成が非効率となり、かつ、PSII と PSI との励起バランスを調節するステート遷移において、PSII コアから LHCII の解離が早くなることを認めた。実際に *ppl1i* 株を光環境が変動する環境で栽培した結果、野生型に比べて明らかに成長が阻害された。従って、PPL1 は植物の光環境適応に重要な役割をもち、PSII-LHCII 超複合体を安定化する機能を持つことを明らかにした。

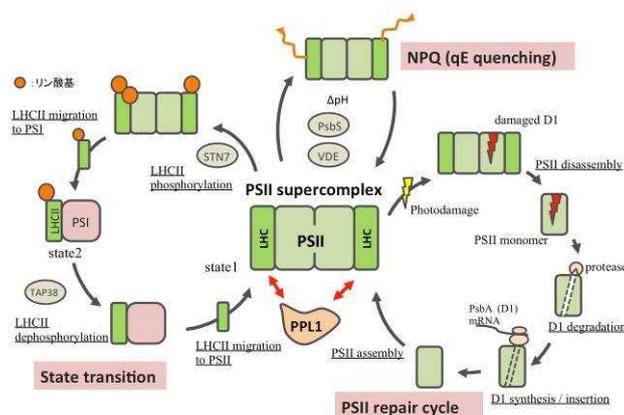


図 5 : PsbP 構造 (PsbP-Like protein) を用いた新たな PSII 活性の制御

### 3. 今後の展開

近年、原核光合成生物である好熱性シアノバクテリアの PSII 複合体の立体構造の解明が急速に進んだこともあり、PSII に関する分子レベルでの研究はシアノバクテリアを中心に進んでいる。しかしながら、PsbP を有する高等植物などの緑色植物は、作物やエネルギー資源としても重要であり、今後は緑色植物型 PSII 研究への要請が高まると考えている。本研究で得られた成果はそのさきがけとなるものであり、PSII の水分解活性、もしくはその安定性を向上させる変異を導入した PsbP を植物や藻類に発現させることで、光合成の生産性や植物の環境ストレス耐性を改善することが期待される。さらにそうした植物や藻類は、緑色植物型の PSII の複合体構造を原子レベルで解明し、その反応を試験管内で解析するための良い材料を供給することが期待される。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

原子レベルでの構造が解明されていない緑色植物の光化学系IIの研究を、本さがけ領域の化学・物理学の研究者にいかにも面白いと思ってもらうかに、随分、悩んだ時期もあった。それに捕われて、やや無理をして研究方針がぶれてしまい、成果を論文としてまとめるのが遅れてしまったのが大きな反省である。

本研究のねらいのひとつである、緑色植物型 PSII の酸素発生系(膜表面タンパク質)の機能と配置に関しては、未だ原子レベルの議論ができる段階ではないが、PsbP の相互作用に関して予想しなかった新しい知見が得られ、大きく進展があったと考えている。しかしながら化学架橋の実験においては、質量分析による架橋部位の同定ができなかった部位も多く、スピラベルを用いたパルス ESR の距離情報も完全ではなかったことから、精密化という点では課題が残った。その一方で、PsbP ホモログである PPL1 の分子機能解析については、変異植物体で明確な表現型を認め、緑色植物の PSII には二つの PsbP ホモログが違う役割で機能するということを明確に証明できた。本研究の題目である、デバイスとしての PSII 複合体の活性と安定性を人為的に操作する方策についても、まだ未発表であるが期待できる成果を得つつある。全体としては、論文化に遅れがみられるものの、全ての成果を論文としてまとめれば、当初のねらいの多くは達成できるものと考えている。

最後に、本領域に加えていただくことで、生物学的な観点からとはまったく異なる視点と、研究に対する価値観を学ばせて頂いた。お世話になった領域代表の井上先生をはじめ、激励いただいた領域アドバイザー、領域関係者すべての皆様に感謝申し上げます。

##### (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

伊福健太郎博士は、「緑色植物が営む光合成を理解し、学ぶ」視点から、特に光合成で最も重要な機能の一つである「水から電子を汲み上げる」機能を発現する光合成反応中心 PSII について、緑色植物が進化の過程で独自に発達させた PSII の安定化と制御機構を明らかにすることを旨とした意欲的な研究提案を行い採択された。

具体的には緑色植物型 PSII の膜表面タンパク PsbP に関する伊福博士のそれまでの卓越した研究実績をもとに PSII の機能修復に着目し、生物学、生物化学、遺伝子科学、化学、機器分析化学など多面的な研究手法により膜表面タンパクの構造、結合部位、機能の解明に切り込んでいる。研究開始より順調に成果を上げている。

ホウレンソウから単離した PSII 膜を用い、PsbP 及び PsbQ タンパク質と相互作用する PSII 膜タンパク質サブユニットの同定に成功し、高等植物の PSII 膜表面性サブユニットの結合様式のモデルを構築した。また、PsbP や CyanoP とアミノ酸配列相同性を示す PsbP-like protein 1 (PPL1) の機能に注目し、シアノバクテリアの PsbP ホモログ (CyanoP) のアミノ酸配列が緑色植物において進化し二つの PsbP ホモログが違う役割で機能(PSII の活性制御のみならず、集光タンパク質 (LHC)との相互作用)することを初めて明らかにした。

人工光合成の実現に挑戦する研究姿勢の中で「自然を理解し、学ぶ」視点は、人類智を獲得し蓄積する学術活動の最も基本的で普遍的なアプローチといえる。

好熱性シアノバクテリアの PSII 複合体の立体構造の解明が進みつつある現状で、伊福博士の研究成果は、今後さらに進んで、高等植物の PSII の構造解明、機能解明に踏み込む状況を切り開く突破点の一つになり得るものと期待している。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表 \*は責任著者

- |  |
|--|
| 1. Ido K, Kakiuchi S, Uno C, Nishimura T, Fukao Y, Noguchi T, Sato F, *Ifuku K (2012) "The conserved His-144 in the PsbP protein is important for the interaction between the PsbP N-terminus and the Cyt <i>b</i> <sub>559</sub> subunit of photosystem II" <i>J. Biol. Chem.</i> <b>287</b> : 26377-26387. |
| 2. Nishimura T, Uno C, Ido K, Nagao R, Fukao Y, Noguchi T, Sato F, *Ifuku K (2014) "Identification of the basic amino acid residues on the PsbP protein involved in the electrostatic interaction with photosystem II" <i>Biochim Biophys Acta (Bioenergetics)</i> , in press.                               |
| 3. Kakiuchi S, Uno C, Ido K, Nishimura T, Noguchi T, *Ifuku K, Sato F (2012) "The PsbQ protein stabilizes the functional binding of the PsbP protein to photosystem II in higher plants" <i>Biochim Biophys Acta (Bioenergetics)</i> , <b>1817</b> : 1346-1351.  |
| 4. *Ifuku K (2014) "The PsbP and PsbQ family proteins in the photosynthetic machinery of chloroplasts" <i>Plant Physiol. Biochem.</i> in press.  |
| 5. Aoi M, Kashino Y, *Ifuku K (2014) "Function and association of CyanoP in photosystem II of <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803" <i>Res. Chem. Intermed.</i> , in press.   |

### (2) 特許出願

なし

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 【国際学会等:招待講演】

1. Kentaro Ifuku, "INTERACTION AND FUNCTION OF THE MEMBRANE-EXTRINSIC PROTEINS OF PHOTOSYSTEM II IN HIGHER PLANTS" International Conference, Photosynthesis Research for Sustainability, Baku, Azerbaijan, 2013/06/06
2. Kentaro Ifuku, "Molecular Functions of the Membrane-Extrinsic Subunits of Photosystem II in Higher Plants" The 5th International Conference as the 2012 OCARINA Annual International Meeting, Osaka, 2013/03/05
3. Kentaro Ifuku, "Evolution of the OEC family proteins in chloroplasts and plant adaptation to the environment", Japan-Finnish Seminar 2012, Naantali, Finland, 2012/09/8-13
4. Kentaro Ifuku, "Functional Diversification of photosystem II extrinsic subunits in higher plants", International Conference, Photosynthesis Research for Sustainability, Baku,

Azerbaijan, 2011/07/27

【国内学会：シンポジウム講演】

1. 伊福健太郎, 「チラコイド膜タンパク質複合体の機能を支える膜表在性タンパク質の役割」, 日本植物学会第 77 回大会シンポジウム, 札幌, 2013/9/15
2. 伊福健太郎「緑色植物型の膜表在性タンパク質による光化学系 II 水分解反応の制御機構」日本植物生理学会シンポジウム, 岡山, 2013/03/21
3. Kentaro Ifuku, “Functions of Thylakoid Lumenal Proteins Against Photoinhibition of Photosystem II”, 第 54 回 日本植物生理学会年会シンポジウム, 岡山, 2013/03/23
4. 伊福健太郎「高等植物における光化学系 II 膜表在性タンパク質の配置と機能」第 85 回日本生化学会大会シンポジウム、福岡、2012/12/15

【受賞】

平成 23 年 日本農芸化学会奨励賞

「光合成電子伝達鎖を制御する葉緑体酸素発生系タンパク質の分子機能に関する研究」

【日本語総説】

1. 伊福健太郎, 「光化学系 II の光障害に対するチラコイド膜内腔タンパク質の役割」, 光合成研究 23 (2), 86-93 (2013)
2. 伊福健太郎, 「葉緑体酸素発生系タンパク質の分子進化と植物の環境適応」, 生化学 84 (11), 934-938 (2012)

【アウトリーチ活動】

サイエンスカフェ

「光合成～地球を支える植物のちから～」in 京都大学アカデミックデイ 2013

京都大学百周年時計台記念館 2013 年 12 月 21 日