

平成17年度採択分

平成19年 3月31日現在

研究課題名(和文)

地球環境を支える光合成酸素発生系の解明-反応機構、獲得、継承

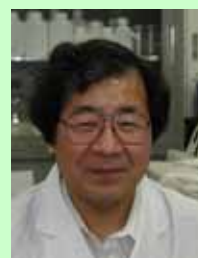
研究課題名(英文)

Analyses of the photosynthetic oxygen evolving system that sustains the global environment – Reaction mechanisms, acquisition and succession processes

研究代表者

氏名 三室 守 (Mimuro Mamoru)

所属研究機関・部局・職 京都大学・大学院地球環境学堂・教授



推薦の観点：創造的・革新的・学際的学問領域を創成する研究

研究の概要：光合成生物による酸素発生は、水の分解によって電子を供給するというエネルギー生産の根幹をなす反応である。シアノバクテリア(ラン藻)によって初めて獲得・構築された酸素発生系は陸上植物の葉緑体へと受け継がれ、地球環境とあらゆる生命活動を支えてきた。酸素発生系は+1.0Vを越える極めて高い酸化電位のもとで、複数の安定な中間体を必要とする特異な電子移動系である。その「反応機構」の解明、「誕生・獲得」や「継承・発展」の解析は、生物学だけに留まらず地球環境やエネルギー問題にとって極めて大きな課題であり、緊急に解決されるべき問題である。我々は、特異な3種のシアノバクテリアを用い、各々の進化の中間体を作成し、その解析をする、という独自の方法でこの課題の解明を行う。

研究分野/科研費の分科・細目/キーワード：生物学/基礎生物学、植物生理・分子/色素体機能(光合成)

1. 研究開始当初の背景

酸素発生系の解明は光合成の基本問題として長い間取り組まれたが、特異で複雑な反応系であるため、国内外の3グループからシアノバクテリアの光化学系II反応中心複合体の結晶構造が発表されても、その解明に大きな進展はなかった。

2. 研究の目的

酸素発生系の解明のため、(1)反応系を構成する要素の「獲得」段階、(2)光化学反応と電気化学反応が融合した「反応機構」、さらに(3)細胞内共生によるシアノバクテリアから葉緑体型酸素発生系への「継承」・発展段階、の3点についての解析を行う。

(1)チラコイド膜の有無、反応にかかわる色素分子種などに摂動を加える、(2)進化における中間的酸素発生系を分子遺伝学的手法で作製し、解析を行う、などのユニークな手法を用いる。

3. 研究の方法

(1)酸素発生を可能とする反応系の構築のための諸要素の獲得過程について、色素の獲得、反応中心タンパク質の改変とサブユニットの増加過程を、*Acaryochloris marina*を対象として分子遺伝学的方法で行う。

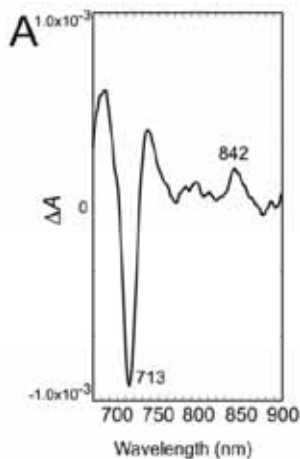
(2)酸素発生機構の解明について、分子遺

伝学的にマンガンのリガンドなどの改変を行い、赤外分光法により解析する。

(3)葉緑体の成立過程について、偶発的に核移行シグナル配列を獲得した可能性や、葉緑体遺伝子発現系を特定の葉緑体遺伝子の欠損などの分子遺伝学的手法で解明する。

4. これまでの成果

(1)クロロフィル(Chl)dを主要な光合成色素として持つ*Acaryochloris marina*のPSIIについて、構成、反応過程を詳細に解析した。光化学反応活性を保持した高純度のPSII複合体の単離精製に世界で初めて成功した。そのタンパク質組成は、D1/D2/CP47/CP43/cyt  $b_{559}$ /PsbIと未知の低分子タンパク質であり、色素組成は、2 Pheophytin (Phe) a分子あたり、55 Chl d、3.0 Chl a、17  $\alpha$ -carotene、1.4 PQ-9、1 cyt  $b_{559}$ であった。この標品にはPSIの混在はまったくなかった。この試料について、酸化還元差スペクトルとFTIRの測定から第一次電子供与体がChl d homodimerであることを明らかにした。差極大は713 nmにあり、またcation radicalのピークも840 nmに観測された。FTIRではChl dに特有の2700  $\text{cm}^{-1}$ 領域のバンドを検出した。これによって第一次電子供与体を、P680に対応するP713と命名した。さらに第一次電子受容体はPhe aであり、その電位が高くなっ



ていることを証明した。

この事実の生物学的な意義は次のように考えられる。第一次電子供与体が Chl *d* であるが、水分解反応のためには他のシアノバクテリアと同じく高い酸化電位を保つ必要がある。しかし吸収できる光エネルギーが Chl

*a* と比較して少ないために、電子受容体側の電位を上げることによってその不足を補い、全体の電子伝達反応系を維持するように調節が行われた結果と考えられる。全体として極めて目的にあった構成となっている。

(2) フィコピリン系から Chl *b* 系への光化学系の改変過程を以下の様に解析した。*Synechococcus* WH8102 はクロロフィルとして Chl *a* のみ持つが、Chl *a* からクロロフィル *b* を合成する酵素の遺伝子をシアノバクテリア *Prochlorothrix* から単離し、新たに確立した形質転換系を用いて *Synechococcus* WH8102 に導入したところ、Chl *b* が合成された。形質転換体のクロロフィルタンパク質を分析したところ、合成された Chl *b* はクロロフィルタンパク質に取り込まれていることが確認できた。色素の変換、獲得に伴う変化を直接追うことが可能となった。

(3) 遺伝子の核移行決定要因の究明について、葉緑体移行シグナルおよびプロモーターの獲得機構に焦点をあてて研究を行った。とりわけ葉緑体移行シグナルの獲得機構については大きな進展が見られた。生物のゲノム中には葉緑体への移行シグナル配列となりうる配列が潜在的に存在するのではないかと考え、種々のゲノム配列から、葉緑体移行シグナル配列の予測プログラムを用いて探索を行った。その結果、様々な生物のゲノムから多数の葉緑体移行シグナル配列の候補が予測された。これらの配列のうちいくつかを GFP 遺伝子と融合させ、タバコ細胞で発現させたところ、実際に葉緑体への移行シグナル配列として働くことが示された。この結果は、葉緑体遺伝子は核へ転移した際に偶発的に移行シグナル配列を獲得した可能性を示唆する。

## 5. 今後の計画

基本的には研究開始時に立案した内容を、年次計画として確実に進めていく方針である。

既に述べた研究方法に、(1) 反応過程に関して、水分解反応に付随する酸素障害の回避機構、(2) 継承過程に関して、色素系の多様化、それに伴う色素タンパク質の変化(進化)などを付加することによって、さらに深く考察する。

## 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む) (研究代表者は太字、研究分担者には下線)

- (1) T. Tomo, T. Okubo, S. Akimoto, M. Yokono, H. Miyashita, T. Tsuchiya, T. Noguchi, and **M. Mimuro** (2007) Identification of the special pair of photosystem II in the chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *104*, 7283-7288.
- (2) T. Tomo, T. Suzuki, E. Hirano, T. Tsuchiya, H. Miyashita, N. Dohmae, and **M. Mimuro** (2006) Reversible absorption change of chlorophyll *d* in solutions. *Chem. Phys. Lett.*, *423*, 282-287.
- (3) R. Tanaka and A. Tanaka (2007) Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* *58*, 321-346.
- (4) S. Satoh and A. Tanaka (2006) Identification of Chlorophyll *a* Oxygenase in *Prochlorococcus* Genome by Comparative Genomic Approach. *Plant Cell Physiol.* *47*, 1622-1629.
- (5) Y. Taguchi, T. Noguchi (2007) Drastic changes in the ligand structure of the oxygen-evolving Mn cluster upon Ca<sup>2+</sup> depletion as revealed by FTIR difference spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, *in press*.
- (6) H. Suzuki, Y. Taguchi, M. Sugiura, A. Boussac and T. Noguchi (2006) Structural perturbation of the carboxylate ligands to the manganese cluster upon Ca<sup>2+</sup>/Sr<sup>2+</sup> exchange in the S-state cycle of photosynthetic oxygen evolution as studied by flash-induced FTIR difference spectroscopy, *Biochemistry* *45*, 13454-13464.

本研究費による成果と謝辞を呈した論文はこの他に 19 編ある。

ホームページ等

<http://www.photosynthesis.h.kyoto-u.ac.jp/>