

令和 2 年 1 0 月 2 3 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 3 0 年

受付番号 201870010

氏 名

渡辺麻衣

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： フライブルク （国名： ドイツ ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
フィコビリソームから光化学系 I へのエネルギー分配の分子機構とその生理的役割の解明
3. 派遣期間： 平成・令和 3 0 年 9 月 1 日 ~ 令和 2 年 9 月 3 0 日
4. 受入機関名及び部局名
受入機関名： アルベルト・ルートヴィヒ大学フライブルク
部局名： Institut für Biologie III
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入也可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10—別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

5. 所期の目的の遂行状況及び成果

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

研究・調査実施状況

【背景・目的】

外環境に応じた光エネルギー分配の最適化は、最も基本的な光合成システムの調節のひとつである。シアノバクテリアの光捕集では、水溶性のフィコビリソーム (PBS) がチラコイド膜内の光化学系 I (PSI) や光化学系 II (PSII) 複合体と相互作用して光エネルギー分配を実現している。しかし、PBS が環境にตอบสนองしてどのように光化学系へのエネルギー分配を最適化しているのかについては未知のことが多い。その主な理由は、PSI 独自のアンテナの存在が知られておらず、その影響が考慮されていなかったためである。私はこれまでに、糸状性の窒素固定シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 を用いて、PSI 複合体に特異的な PBS (CpcL-PBS) の存在を生化学的に明らかにし、その結合因子 CpcL を同定した (Watanabe, M *et al.* PNAS 111: 2512-2517 (2014))。CpcL-PBS は、ロッド上のフィコビリソームであり、CpcL により PSI と直接相互作用する (Fig. 1)。一方、*Synechocystis* sp. PCC 6803 から従来型 PBS と PSII、PSI との超複合体の単離が報告されている (Liu, H *et al.* Science 342: 1104-1107 (2013))。これは従来型の PBS と CpcL-PBS の両方が PSI アンテナとして機能することを示唆する。本研究は、従来型フィコビリソームと PSI 特異的フィコビリソームの PSI アンテナとしての使い分け原理を明らかにし、環境に応じた PBS から PSI へのエネルギー分配最適化の分子機構と生理的役割の解明をめざしている。

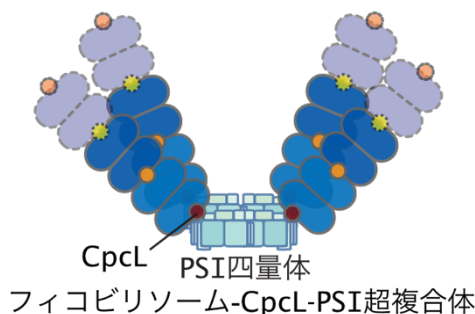


Fig. 1 PBS-CpcL-PSI 超複合体の模式図

【実施状況】

①CpcL-PBS の単離条件の検討

CpcL-PBS は PSI に強固に結合しているため、従来の PBS 単離法ではほとんどが膜画分に存在し、分画することができなかった。従来型 PBS と CpcL-PBS を同時に定量するため、PBS 単離法を改良した。共同研究により、*Leptolyngbya* sp. PCC 6406 を用いて CpcL-PBS の単離法を確立した (Hirose, Y *et al.* Molecular plant 12(5): 715-725 (2019))。改良した方法を *Anabaena* sp. PCC 7120 に応用した。最適なリン酸バッファー濃度の選定と、二種類の界面活性剤による膜画分の可溶化により、CpcL-PBS と従来型 PBS を同時に単離することが可能となった。改良した単離法により、窒素欠乏条件下での CpcL-PBS と従来型 PBS の量比の変動を調べている。

②未知の超複合体の単離と解析

Anabaena sp. PCC 7120 は、培地中の窒素源が枯渇するとヘテロシストと呼ばれる窒素固定に特化した細胞を分化させる。ヘテロシストには PSII がなく PSI による環状電子伝達活性により窒素固定に必要な ATP を供給する。これまでに、窒素欠乏条件下では CpcL のタンパク質量が増加することを示した (Watanabe, M *et al.* PNAS 111: 2512-2517 (2014))。増加した CpcL タンパク質が PBS-CpcL-PSI 超複合体の形成に影響しているのかを、ショ糖密度勾配遠心による分画で調べた。その結果、PBS-CpcL-PSI 超複合体よりも大きな画分に CpcL と PSI を含む未知の超複合体を発見した (Fig. 2)。SDS-PAGE の結果、この画分には CpcL-PBS と PSI のサブユニットに加えて、未同定の多くのタンパク質が含まれていた。*Synechocystis* sp. PCC 6803 において、CpcL (CpcG2) が PSI と環状電子伝達に関わるタンパク質複合体である NDH-1 との超複合体の形成に必要であることが報告されている。

(Gao, F *et al.* Plant Physiol. 172: 1451-1464 (2016))

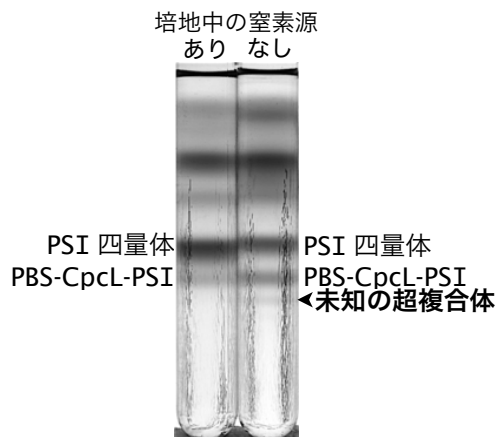


Fig. 2 窒素欠乏時に見られる未知の超複合体

PBS-CpcL-PSI 超複合体よりも大きな画分が NDH-1 を含む環状電子伝達超複合体である可能性を考え、ドイツのルール大学の Marc Nowaczyk 教授のチームとの共同研究により、マスペク

トルによる網羅的なタンパク質の同定を行っている。今後、この超複合体の活性測定や、構造解析も Marc Nowaczyk 教授のチームとの共同研究により行う予定である。

③ *cpcL*, *cpcG* の発現制御機構の解明

CpcL-PBS は、従来型フィコビリソームのロッドのサブユニットを共有している (Fig. 3)。*cpcL* 過剰発現株だけでなく、通常のフィコビリソームのリンカーである *cpcG* の破壊株で PBS-CpcL-PSI 超複合体の量が増加した。このことから、*cpcL* と *cpcG* の発現量の比が超複合体の形成を制御していると考えた。

窒素欠乏条件下では CpcL のタンパク質量の増加と、CpcG のタンパク質量の減少が見られ、PBS-CpcL-PSI 超複合体が増加する。また、RNA-seq 解析において窒素欠乏条件下で *cpcL* の発現が上昇することが報告されている (Mitschke *et al.* PNAS 108(50): 20130-20135 (2011))。そこで、窒素欠乏時における *cpcL* と *cpcG* の転写量をノザンブロットングにより調べた。その結果、窒素欠乏時における *cpcL* の発現レベルの減少は *cpcG* に比べて抑えられていることがわかった。これにより、窒素欠乏時の CpcL/CpcG のタンパク質量比が増加すると考えられる。

RNA-seq 解析の結果を精査することで、*cpcG* がアンチセンス RNA (asRNA) によって制御を受けている可能性を見出した。現在、窒素欠乏条件下での *cpcG* の asRNA の転写レベルをノザンブロットングにより定量している。さらに、*cpcG* の asRNA の過剰発現株による、*cpcG* の転写量、タンパク質量の変化を調べるため、asRNA の発現コンストラクトの設計を行っている。

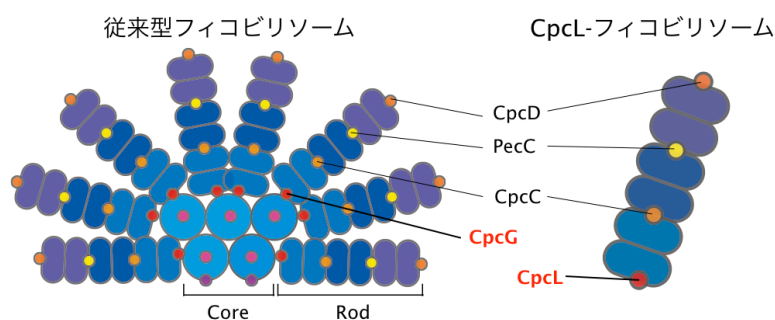


Fig. 3 従来型フィコビリソームと CpcL-フィコビリソーム

④ PBS-CpcL-PSI 超複合体の構造解析

岡山大学の沈教授のグループとの共同研究により、PBS-CpcL-PSI 超複合体のクライオ電子顕微鏡による構造解析を進めている。その一環として、PSI 四量体の構造解析を行った。

Anabaena sp. PCC 7120 の PSI 複合体は四量体であり、これまでに構造解析が行われたシアノバクテリアの三量体構造や植物の単量体構造とは異なる。そのため、PSI 複合体の四量体についても共同研究によるクライオ電子顕微鏡での構造解析を行った。その結果、3 Å の分解能で構造解析に成功した。四量体は 2 つの二量体からなっており、二量体の形成と 2 つの二量体による四量体の形成には同じサブユニットの異なる相互作用が関与していることがわかった。この結果を学術誌に発表した。

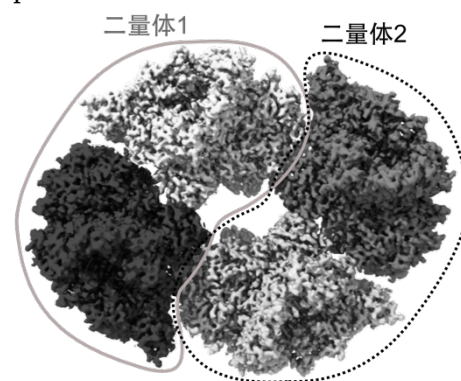


Fig. 4 PSI 四量体の構造

(Kato, K *et al.* Nature Communications 10, 4929 (2019))

⑤ 原始的シアノバクテリアのフィコビリソームの解析

ほとんどのシアノバクテリアが集光性アンテナ装置として、フィコビリソームを用いている。しかし、その構成サブユニットや構造は様々である。また、フィコビリソームの環境に適応した制御機構も多様である。現所属先の研究室では、原始的なシアノバクテリアである *Gloeobacter violaceus* のフィコビリソームの解析を始めようとしていた。その研究を引き継ぎ、*Gloeobacter violaceus* から PBS の単離を行った。単離した PBS のタンパク質組成、吸収、蛍光スペクトル解析から、完全な PBS が単離できていることを確認した。

Gloeobacter violaceus の PBS は *Anabaena* sp. PCC 7120 のものとはことなり、ロッドが束になったような構造をとることが知られているが、その詳細な構造はわかっておらず、束状になるのに寄与していると考えられているリンカータンパク質がどのように結合しているのかも不明である (Koyama *et al.* EBS Letter 580: 3457-3461 (2006))。単離した PBS のクライオ電子顕微鏡による構造解析を、スイスのチューリッヒ大学との共同研究により行っている。

【実施状況のまとめ】

派遣開始後数ヶ月は、すべての作業が新しいものであり、それらを習得するまでに時間を要した。また、研究環境が変わったことでこれまでの結果を再現するのに時間も要した。しかし、派遣開始後一年ほどで現所属先での研究が軌道に乗った。現在はドイツにて新たに始めた、RNAの実験を中心に研究を進めており、論文にまとめられそうな結果が出始めてきている。

派遣開始前から行ってきた日本国内での共同研究に加え、派遣後にはドイツ国内外での新たな共同研究を始めることができ、現在も進行中である。いくつかの共同研究は、すでに論文として報告しており、また近々発表予定のものもある。

自分の強みであった超複合体やフィコビリソームの単離をさらに強化するとともに、新たな試みである発現解析やアンチセンス RNA による制御機構の解析を進めることができた。所属研究室や近隣の研究室では、活発に RNA-seq 解析やスモール RNA、アンチセンス RNA による制御機構の解析を行っており、手法に習熟して研究を遂行するのに適した環境である。今後の研究の基盤となる部分や研究者としての基礎を強化できた。

成果の発表・関係学会への参加状況

【学会誌等への発表】

共著者として、*Leptolyngbya* sp. PCC 6406 における *cpcL* の発現と CpcL-PBS の光質による制御に関する研究論文を発表した (Hirose, Y *et al. Molecular plant* **12**(5): 715-725 (2019))。この論文において、PBS の単離法を改良し、CpcL-PBS を従来型の PBS と同時に単離することが可能になった。

PBS-CpcL-PSI 超複合体の構造解析の一環として、*Anabaena* sp. PCC 7120 の PSI 四量体のクライオ電子顕微鏡による構造解析を行った。その結果を学術誌に発表した (Kato, K *et al. Nature Communications* **10**, 4929 (2019))。

CpcL-PBS から PSI 複合体へのエネルギー伝達の詳細を、時間分解蛍光スペクトルによって解析した結果を論文としてまとめ、学術誌への投稿を準備している。PBS-CpcL-PSI 超複合体の時間分解低温蛍光スペクトル測定により、CpcL-PBS から PSI へのエネルギー伝達が高効率で起きていることを示した。また、CpcL による CpcL-PBS の蛍光の長波長シフトが高効率なエネルギー伝達を実現していることを示唆した。

PSI 複合体の光阻害からの回復に、PSI のアセンブリー因子の強化が効果的であることを示した論文を準備中である。この論文で、PSI 複合体の活性を調べるために PSI 反応中心クロロフィルである P700 の酸化と還元による吸収変化の測定を行った。測定には、ジョリオ型分光光度計を用いた。シアノバクテリアにおけるジョリオ型分光光度計での測定を確立した。この測定は、今後の *Anabaena* sp. PCC 7120 の PSI 活性測定にも応用できる。

【学会への参加状況】

2018 年 9 月にフライブルク大学にて開催された "Cyano2018" に参加し、ドイツを中心としたヨーロッパの若いシアノバクテリア研究者たちの最新の研究結果を聞くことができた。小さな研究会のようなものであったので、密なコミュニケーションをとることができ、研究者ネットワークの形成にもつながった。

2019 年 3 月に日本で開催されたゲノム微生物学会に参加した。研究発表は行わなかったが、日本にいる共同研究者の方々の発表を聞き、情報交換を行った。また、今後の研究について話し合うことができた。同月に名古屋で行われた植物生理学会では、口頭発表を行った。最新の研究結果について様々な意見をいただき、今後の研究方針の参考になった。

2019 年 7 月には、ドイツのフライブルク大学で開催された "Sensory and Regulatory RNAs in Prokaryotes" という会議に参加し、ポスター発表を行った。ドイツに留学してから始めた RNA の研究結果と今後の方針について発表し、有意義な議論ができた。本研究に適応可能な手法を扱った研究発表もあり、本研究の今後の方針決定にあたり大きな参考になった。

2020 年 9 月にオンラインで開催された、11 回ヨーロッパシアノバクテリアワークショップにてポスター形式のビデオ発表を行った。本来はポルトガルでの開催予定であったが、開催が困難になり急遽オンライン形式になったが、ヨーロッパ中のシアノバクテ

リア研究者が一同に介した会議は非常に有意義なものであった。現在中心に研究しているアンチセンス RNA についての発表もあり、とても参考になった。発表者とも議論することができ、今後の研究の可能性が広がった。

2020 年 9 月には、オンラインでのシアノバクテリアのワークショップ”Cyano2020”も開催され、そちらにも参加した。最前線の研究を数多く聴くことができ、大変勉強になった。また、質疑応答などで積極的にコミュニケーションをとることができ、共同研究の可能性やネットワークの形成につながった。