

科学研究費補助金（学術創成研究費）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成17年度採択分

平成20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

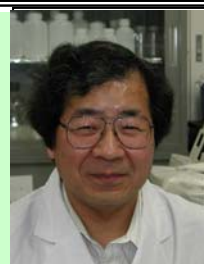
-反応機構、獲得、継承

研究課題名（英文）Analyses of 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：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物生理・分子

キーワード：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。

3. 研究の方法

シアノバクテリアを研究対象とする。ふたつの特異な研究方法を採用する。(1) 細胞内膜系を持たない始原的な種、*Gloeobacter violaceus* PCC 7421, クロロフィル(Chl)分子種として唯一 Chl *d* を持つ種、*Acaryochloris marina* MBIC 11017 の2種を採用し、性質がよく知られている種、*Synechocystis* sp. PCC 6803 との比較により解析を進める。種の多様性を実験系の摂動と捉える。(2) 分子遺伝学的手法で、進化におけ

る中間的酸素発生系をもつ「進化の中間体」を作製し、解析を行う。これも摂動と捉える。

具体的には以下の方法を進めた。(3) 色素の変化を再現するために、mono-vinyl Chl *a* (MV-Chl *a*) を持つ *Synechocystis* sp. PCC 6803 を di-vinyl Chl *a, b* (DV-Chl *a, b*) に人工的に変える。(4) 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。(5) 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) *Synechocystis* sp. PCC 6803 の Divinyl reductase (DVR) を新たに同定した上で破壊し、さらに Chl *b* 合成遺伝子を導入して、MV-Chl *a* から DV-Chl *a, DV-Chl b* への色素の獲得過程における「進化の中間体」のひとつを実験的に再現することに成功した。また、中間体の生理的な性質を解析すると、光強度に対する感受性に大きな変化が見られた。現在その原因を解明している。

(2) *Acaryochloris marina* MBIC 11017 の全ゲノム情報を解読し、報告した。この情報に基づき、Chl *d* 合成遺伝子を探索したが、相同性からは候補は見つからなかった。この種では反応中心などを構成するタンパク質のアミノ酸の変異が速いことが明らかとなった。その原因を探索中である。

(3) 水分解反応の反応機構を解明するための最重要課題であるプロトン放出過程について、FTIR法を用いてプロトン放出数を定量的に調べる手法を開発し、水分解サイクルの $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_2$, $S_2 \rightarrow S_3$, $S_3 \rightarrow S_0$ 遷移におけるプロトン放出は、およそ 1.0:1.2 であることを見出した。

(4) 細胞内膜を持たず、水分解がペリプラズムで行われる *G. violaceus* の水分解反応系を精査した結果、マンガングラスターの安定化に寄与することが知られる表在性タンパク質のアミノ酸配列は、内膜を持つ他のシアノバクテリアと比べて大きく異なり、構造予測によっても大きく構造が変わると考えられた。そこで、酸素発生活性を測定すると、予想外にほとんど影響がないことが判明した。このことは、マンガングラスターの安定化には複数の方法（構造的多様性）が許容されることを示唆し、極めて興味深い結果となった。

(5) *A. marina* においては PS I, PS II の special pair はともに、その酸化電位は変わらず、Chl *d* が獲得できる少ないエネルギーを補償するためには、電子受容体（還元）側の電位とそれに続く電子移動の担体での電位調節が必須となるという、構築原理が明らかとなった。特異な色素を持つ *A. marina* での解明により、この原理が初めて明らかにされた。

(6) 葉緑体移行シグナルの獲得機構について、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。特に、数種のシアノバクテリアについて、形質転換体の作製が可能となってきたので、分子遺伝学、逆遺伝学的手法を多用して、解析を進める予定である。

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) H. Suzuki, Y. Taguchi, M. Sugiura, A. Boussac and T. Noguchi (2006) Structural perturbation of the carboxylate ligands to the manganese cluster upon Ca^{2+}/Sr^{2+} exchange in the S-state cycle of photosynthetic oxygen evolution as studied by flash-induced FTIR difference spectroscopy. *Biochemistry*, 45: 13454-13464.
- (2) A. Soma, Onodera, A., Sugahara, J., Kanai, A., Yachie, N., Tomita, M., Kawamura, F., and Sekine, Y. (2007) Permuted tRNA genes expressed via a circular RNA intermediate in *Cyanidioschyzon merolae*. *Science*, 318: 450-453.
- (3) 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.
- (4) H. Ito, M. Yokono, R. Tanaka, and A. Tanaka (2008) Identification of a novel vinyl reductase gene essential for the biosynthesis of monovinyl chlorophyll in *Synechocystis* sp. PCC6803. *J. Biol. Chem.*, 283: 9002-9011.
- (5) W. D. Swingley, M. Chen, P. C. Cheung, A. L. Conrad, L. C. Dejesa, J. Hao, B. M. Honchak, L. E. Karbach, A. Kurdoglu, S. Lahiri, S. D. Mastrian, H. Miyashita, L. Page, P. Ramakrishna, S. Satoh, W. M. Sattley, Y. Shimada, H. L. Taylor, T. Tomo, T. Tsuchiya, Zi T. Wang, J. Raymond, **M. Mimuro**, R. E. Blankenship, and J. W. Touchman (2008) Niche adaptation and genome expansion in the chlorophyll *d*-producing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 2005-2010.

本研究費による成果と謝辞を呈した論文はこの他に 45 編ある。

ホームページ等

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