

光合成細菌からシアノバクテリアへの不連続な「システムの形質転換」過程の解析

●三室 守^{1,2)} ◆土屋 徹^{1,2)} 鞆 達也¹⁾ 嶋田 友一郎¹⁾ 佐藤 壮一郎¹⁾

1) 京都大学大学院地球環境学 2) 京都大学大学院人間・環境学研究科

<研究の目的と進め方>

酸素発生をしない光合成細菌から酸素発生をするシアノバクテリアへの進化を不連続な「システムの形質転換」と捉え、全ゲノムが決定されたこと (*DNA Res.* 10, 137, 2003) によって両者の進化の中間形と考えられるようになったシアノバクテリア *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 を用いて、

- (1) 高いGC含量など特徴的な遺伝子群の塩基配列の相同性による系統性の考察、
- (2) 進化の過程で起こったと考えられる形質変化の実験的再現による系統性の解明、
- (3) 光合成関連機能タンパク質複合体の構造的進化の解析、の3点から解析する。

さらに近年、我々が発見したシアノバクテリア *Acaryochloris* sp. 淡路株 (*Science* 303, 1633, 2004) を用いて、

(4) 新たな色素 (クロロフィル *d*, Chlorophyll *d*) を獲得したことにより引き起こされたと考えられる種分化の方向とその実現方法を、現在この種について進めている全ゲノム解析を基に明らかにする。

<研究開始時の研究計画>

光合成機能の解明のためにゲノム情報を活用する。

- (1) Chl *d* を主要な色素として持つシアノバクテリア、*Acaryochloris marina* MBIC 11017株について進めている全ゲノム情報解読を、日米の研究グループの協働作業を効率的に行うことにより完成させる。07年7月末までにはannotationも終えるところまできている。
- (2) そのゲノム情報に基づいて、種分化の起こり方、特に色素が変化した時の光合成関連タンパク質の変異の起こり方に注目する。
- (3) さらにゲノム情報に基づいて、電子伝達系 *co-factor* の結合サイト周辺のアミノ酸置換を検討し、我々が見いだした色素の交換と電位との関連を考察する。特に、光化学系II (PS II) 複合体の第一次電子供与体 (Special pair) の電位を、他のシアノバクテリアと同様に高く保つ機構について、アミノ酸配列情報を基に考察する。
- (4) 我々が全ゲノム情報を決めたシアノバクテリア、*Gloeobacter violaceus* PCC 7421について、酸素発生系で機能する3種の膜表面タンパク質 (PsbO, PsbU, PsbV) の立体構造予測を行い、分子間相互作用を明らかにする。*G. violaceus*において、特異的に見られる挿入や欠失の位置と、分子間相互作用や機能との関連を精査する。
- (5) *G. violaceus*について細胞内膜形成過程を追う。他のシアノバクテリアにおいて膜形成に必須と考えられている遺伝子の産物と構造的に相互作用する可能性が高いと考えられる遺伝子産物を捜すことにより未知遺伝子を探る。
- (6) *G. violaceus*の形質転換系の完成を急ぐ。遺伝子の導入により、膜の形成を試みる。

<研究期間の成果>

A. marina に関するゲノム情報解析と、他のシアノバクテリアの光合成機能の中で PS II に関する解析が進展した。

(1) Chl *d* を主要な色素として持つシアノバクテリア、*A. marina* についての全ゲノム情報の解読が終了し、発表した。シアノバクテリアとしては例外的に9つのプラスミドを持ち、そのサイズの分布も374 kbpから2 kbp に渡り極めて稀な分布を持つこと、全ゲノムサイズが8.3 Mbpという例外的に大きいものであることが明らかになった。

Chl *d* 合成酵素に関してはゲノム情報からは候補が判然とはしなかった。

(2) 光合成反応で最も重要な反応中心タンパク質について、PS I と PS II ではアミノ酸置換の頻度が大きく異なり、PS I は置換が多く、PS II、特に光化学反応に関与する2サブユニットは小さいことが判明した。この事実は維持すべき色素の酸化還元電位との関連であると考えられる。

(3) PS II の電子受容体は他のシアノバクテリアと同じくフェオフィチンであることを我々は証明した。同時にその還元電位が他のシアノバクテリアに比べて高くなり、Chl の置換により獲得できるエネルギーが小さくなったことを補償する機構として極めて妥当な設計であることが判明した。この電位の変化に対応して、電子受容体の近傍に存在すると考えられるアミノ酸に多くの置換が見いだされた。結晶構造は未確定であるが、他のシアノバクテリアとの比較から妥当な置換と考えられた。

(4) *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 において酸素発生系で機能する3種の膜表面タンパク質 (PsbO, PsbU, PsbV) の立体構造予測を行うと、ユニークなアミノ酸配列から予想されるとおりに、他のシアノバクテリアとは異なる構造が考えられた。他のタンパク質との相互作用のサイトなどが異なっており、酸素発生型光合成生物の間では極めて保存性が高いと考えられている水分分解系に例外的な事例があることが強く示唆された。このことは、*G. violaceus* の水分分解系が細胞膜外、ペリプラズムで行われることと高い相関があると考えられる。

さらに *G. violaceus* の酸素発生活性は阻害剤である DCMU によって約 70% しか阻害されないことを見いだした。DCMU 結合サイトのアミノ酸レベルでの変異はないので、その理由がまったく判然としていない。今後の大きな研究課題となった。

(5) *G. violaceus* の細胞内膜系の形成過程を知るために、他のシアノバクテリアで候補と考えられる遺伝子を欠損させた変異体の作製を行っているが、現時点では成果は得られていない。

(6) *Synechocystis* sp. PCC 6803 について、反応過程を解析するために反応中心タンパク質を改変した幾つかの株を作成した。それらについて分光学的な解析を始めた。従来とは異なる結果を得ることができた。

<国内外での成果の位置づけ>

A. marina MBIC 11017 のゲノム解析はプラスミド数、ゲノム

サイズなどに於いて、全く予想を裏切るものであった。この結果が発表されたので、新たに比較ゲノムの対象となり、Chl *a* を持つシアノバクテリアとの対比で、種分化の過程における特異性などが明らかにされる可能性がある。その意味では世界的に意義のある研究と評価することができる。平成 19 年 4 月に発表した *A. marina* の PS II の電子伝達成分の同定とともに、大きな進展であったと考えられる。

G. violaceus は発見当時 (1974 年) にはチラコイド膜を持たない特異な種として認識されていたが、その光化学反応系が他のシアノバクテリアと比較して予想以上に変異が大きいことが我々の解析から徐々に判明してきた。今回明らかにした DCMU 不感受性はアミノ酸レベルでの変異が見あたらない系であり、従来の考えを覆す成果となった。今後の発展が期待される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

G. violaceus の形質転換系の構築が依然として進んでいない。この種は元来、極めて微弱な光の下でのみ生育することが知られ、成長速度は極めて遅い。寒天上ではその生育がさらに遅くなっており、依然として完成していない。

光合成細菌に Chl 合成遺伝子を導入し進化の再現実験を行う予定であったが、合成される色素が検出限界以下であり、現時点では進展が止まっている。

<今後の課題、展望>

光合成細菌からシアノバクテリアへの進化過程を考察するために、現在比較ゲノム解析を進めている。この進展を急ぐ必要がある。

光合成酸素発生系は不連続な進化の象徴的な反応過程であり、その獲得過程を解明することは研究進展の必須の内容である。高い酸化電位を実現するための色素の置換、反応中心タンパク質の C 末端の延長、表在性タンパク質の反応中心タンパク質との相互作用の解明、などを通して、不連続な進化過程を実験的に再現することを続けていく予定である。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

- S. Akimoto and M. Mimuro (2007) Application of the time-resolved polarization fluorescence spectroscopy in the femtosecond range to photosynthetic systems. *Photochem. Photobiol.*, 83, 163-170.
- M. Mimuro, S. Akimoto, T. Tomo, M. Yokono, H. Miyashita and T. Tsuchiya (2007) Delayed fluorescence observed in the nanosecond time region at 77K originates directly from the photosystem II reaction center. *Biochim. Biophys. Acta*, 1767, 327-334.
- 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.
- S. Akimoto, T. Tomo, Y. Naito, A. Otomo, A. Murakami and M. Mimuro (2007) Identification of a new excited state responsible for the *in vivo* unique absorption band of siphonaxanthin in the green alga *Codium fragile*. *J. Phys. Chem. B Letter*, 111, 9179-9181.
- M. Yokono, S. Akimoto, K. Koyama, T. Tsuchiya and M. Mimuro, Energy transfer processes in *Gloeobacter violaceus* PCC 7421

that posses phycobilisomes with a unique morphology, *Biochim. Biophys. Acta*, in press.

- K. Koyama, H. Suzuki, T. Noguchi, S. Akimoto, T. Tsuchiya and M. Mimuro, Oxygen evolution activities in the periplasm of cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. *Biochim. Biophys. Acta.*, in press.
- 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, Niche adaptation and genome expansion in the chlorophyll *d*-producing cyanobacterium *Acaryochloris marina*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.

2) データベース/ソフトウェア

該当無し