

## 研究紹介

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803の光化学系 I 複合体の  
アフィニティー精製と新規成分の同定<sup>§</sup>東京大学大学院・総合文化研究科  
久保田 寿子\*、水澤 直樹、和田 元

## 1. はじめに

地球上の殆ど全ての生物は、太陽光エネルギーを利用した光合成によって変換された化学エネルギーに依存して生命活動を行っている。二酸化炭素を同化するための強力な還元力を生み出す役目を担うのは、チラコイド膜に埋め込まれた光化学系I複合体 (PSI) である<sup>1,2)</sup>。PSIは高等植物においては単量体として存在しているが<sup>3-5)</sup>、シアノバクテリアでは単量体の存在量は少なく、大部分が三量体として存在している<sup>6-8)</sup>。2001年にシアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* (*T. elongatus*) のPSI三量体の結晶構造が $2.5\text{\AA}$ の分解能で報告された<sup>9)</sup>。このシアノバクテリアのPSIは、単量体当たり12種類のタンパク質サブユニット、色素分子、電子伝達成分及び脂質分子など、極めて多種に及ぶ成分により構成されている。PSIは *T. elongatus* ばかりでなく、他のシアノバクテリア<sup>10,11)</sup>や高等植物<sup>12,13)</sup>からも精製され、生化学的な分析やX線結晶構造解析などにより、複合体の構成成分や構造の詳細が明らかになってきている。植物のPSIは単量体で存在しているが、シアノバクテリアでは殆どが三量体の状態で存在している。シアノバクテリアのPSI単量体と三量体の成分、構造、機能の違いについては未だ明らかになっていない。筆者らは、それらの点を明らかにするために、*Synechocystis* sp. PCC 6803からPSIを効率よく、しかも簡便に精製する方法を確立し、PSIの生化学的解析を行っている<sup>14)</sup>。また、それらの解析によって新たに同定された新規成分の機能についても解析を進めている。本稿ではこれまでに得られた研究成果を紹介する。

## 2. PSIの精製方法の確立

従来PSIは、密度勾配遠心法やイオン交換クロマトグラフィーなどを用いて精製されてきた<sup>15,16)</sup>。しかしながら、前者では同程度の密度をもった複合体、例えばPSIと光化学系II複合体 (PSII) の単量体を互いに分離することが出来ず、後者では通常いくつかのカラムを用いて精製する必要があり操作が煩雑である。そこで、筆者らは目的の複合体を特異的、且つマイルドな条件で簡便に精製することが可能な $\text{Ni}^{2+}$ -アフィニティーカラムクロマトグラフィーに注目し *Synechocystis* sp. PCC 6803からPSIを精製する方法を確立した。現在までに論文として報告されたPSIのHisタグ精製は2報あり、TangとChitnis<sup>17)</sup>は、*Synechocystis* sp. PCC 6803を用いてPsaLまたはPsaK1のC末端にHisタグを付加して発現させることによりPSIの精製を試みた。しかし、作製した株ではHisタグを付加したサブユニットの発現量の低下やPSIの三量体化の阻害が起こり、また、双方の場合とも付加したHisタグが複合体の内側に埋まっているため、複合体を尿素により変性させてからHisタグ精製しなければならず、活性の高いPSIを精製することはできなかった。これらの結果は、Hisタグをどのサブユニットのどの位置に導入するかが、活性の高いPSIを効率よく精製する上で大変重要であることを示している。また、Gulisらは、単細胞性緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) を用いてPsaAのN末端にHisタグを付加して発現させることによりPSIの精製を得ることに成功している<sup>18)</sup>。しかし *C. reinhardtii* に存在するPSIは単量体のみであり、三量体は存在しない。そこで、筆者らはPSIの単量体、三量体が共に存在するシアノバクテ

<sup>§</sup> 第9回日本光合成研究会シンポジウム ポスター賞受賞論文

\* 連絡先 E-mail: calandrinia.longiscapa@gmail.com

リア、*Synechocystis* sp. PCC 6803を用いてPSIの解析を試みた。まず、*T. elongatus*のPSI結晶構造をもとにHisタグの導入位置を検討した。コアタンパク質、表在性タンパク質、さらに三量体化に関与する全てのサブユニットと単量体同士の境界面に位置するサブユニットは候補から除外し、最終的にHisタグを付加するサブユニットとして、三量体の外側に位置するPsaF及びPsaJを選択した。細胞質側に突出したPsaFのC末端及びPsaJのN末端にHisタグを付加することにし、それらのHisタグを付加したタンパク質を発現する株 (F-His およびJ-Hisと命名) を作製した。作製したF-HisとJ-Hisは、光独立栄養条件下において野生株と同様の速度で増殖した。また、細胞における酸素発生活性及びチラコイド膜における酸素発生活性及び酸素吸収活性を測定したところ、野生株との差が見られなかった。このため、Hisタグ付加による影響は無いと考えられた。なお、以下の全ての分析について、F-His及びJ-His間に差はなく同様の結果が得られた。

### 3. 精製したPSIの生化学的解析

#### PSIに含まれるサブユニット

F-His及びJ-Hisから調製したチラコイド膜をドデシルマルチドで可溶化した後、Ni<sup>2+</sup>-アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いてPSIを精製した。精製したPSIはグリセロール密度勾配遠心法により単量体と三量体に分離した。これらの精製PSI標品の酸素吸収活性を測定したところ、単量体では約 720 μmol O<sub>2</sub> mg Chl<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>であったのに対し、三量体ではその約 1.7倍という高い活性を有することが明らかになった。次に、三量体と単量体のそれぞれについてSDS-PAGEを用いてタンパク質の分析を行った。その結果、三量体には、PsaA、PsaB、PsaD、PsaF、PsaL、PsaE、PsaC、PsaK2、PsaK1、PsaI、PsaJ、PsaMのサブユニットが検出され、既知のPSIのサブユニット以外のタンパク質は検出されなかった。単量体ではPsaK2以外のPSIサブユニットが全て検出され、それらに加えて多くの新規のタンパク質が含まれていることが明らかになった (図1)。これらのタンパク質を質量分析によって解析したところ、NDH-1複合体の表在性領域を構成するタンパク質が 6 種類 (NdhH、NdhK、NdhI、NdhJ、NdhN、NdhM)<sup>19)</sup>、PSIIアセンブリーオペロン (PAPオペロン) にコードされるタンパク質<sup>20)</sup>が4種類、その他のタンパク質が4種

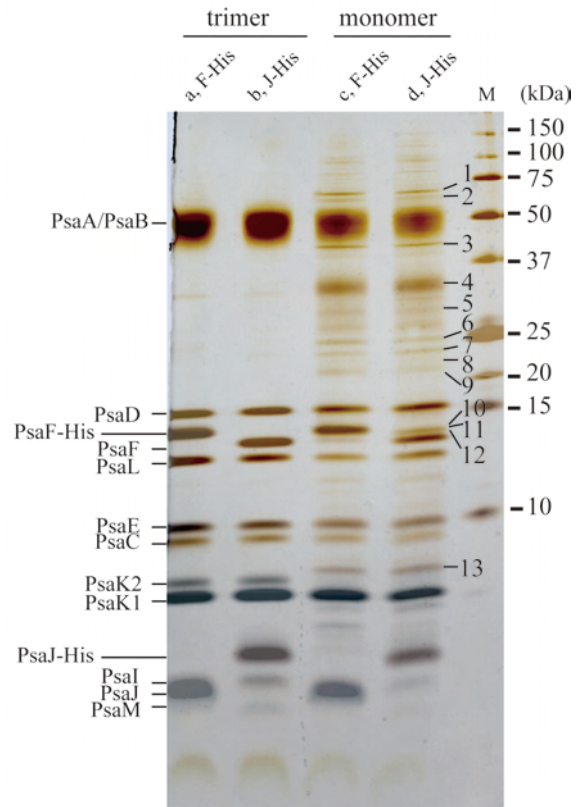


図1 精製PSIのサブユニット組成

F-His及びJ-Hisから精製したPSIの三量体と単量体のサブユニット組成をSDS-PAGE (18-24%アクリルアミドゲル) により解析した。タンパク質は銀染色により検出した。Lane a; F-Hisの三量体、Lane b; J-Hisの三量体、Lane c; F-Hisの単量体、Lane d; J-Hisの単量体、Lane M; 分子量マーカー。既知のPSIサブユニット名を左に附記。1-13は表1の番号に対応。

類、合計14種類のタンパク質が同定された (表1)。シロイヌナズナにおいてNDH-1はPSIと相互作用し、環状の電子伝達を行っていることが知られているが<sup>21)</sup>、シアノバクテリアにおいてNDH-1とPSIの相互作用を生化学的に示した報告はまだない。PSIIの表在性タンパク質であるPsbV、PsbQ、PsbPが欠損した株ではPAPオペロンの発現が促進されること<sup>20)</sup>などから、PAPオペロンはシアノバクテリアにおいてPSIIのアセンブリーに関与しているという報告がある。またPSIが欠如した株においては逆に著しく抑制されること<sup>22)</sup>から、PSIのアセンブリーや機能の維持に関与する可能性が示唆されている。*Synechocystis* sp. PCC 6803から精製したPSI単量体にNDH-1のサブユニットやPAPオペロンタンパク質が存在していたという結果は、シアノバクテリアのPSIの単量体とNDH-1が相互作用して環状の電子伝達に関与している可能性があること、PAPオペロンタンパク質がPSIIのみならずPSIに

**表1 質量分析により同定された新規タンパク質**  
F-His及びJ-Hisから精製したPSIの単量体に特異的に検出されたバンド(図1の1-13)に含まれるタンパク質14種類を質量分析により同定した。

Band No.	Protein assignment
1	Isoamylase (Slr1857)
2	Long-chain-fatty-acid CoA ligase (Slr1609)
3	NdhH (Slr0261)
4	Unknown protein (Slr0151)
5	Light-dependent NADPH-POR (Slr0506)
6	NdhK (Slr1280)
7	LexA repressor (Sll1626)
8	NdhI (Sll0520)
9	Hypothetical protein (Slr0147), NdhJ (Slr1281)
10	Hypothetical protein (Slr0146)
11	Hypothetical protein (Slr0149)
12	NdhN (Sll1262)
13	NdhO (Ssl1690)

においても重要な働きを担っていることを示唆している。今後、NDH-1サブユニット遺伝子やPAPオペロンの破壊株を用いてPSIの生化学的解析を行うことで、PSIにおいてそれらの遺伝子にコードされたタンパク質がどのような機能を担っているのかを解析する必要がある。なお、PSIサブユニットと比較して、今回新しく同定されたタンパク質の量が少なかったことから、一部のPSIにのみそれらのタンパク質が結合しているものと考えられる。

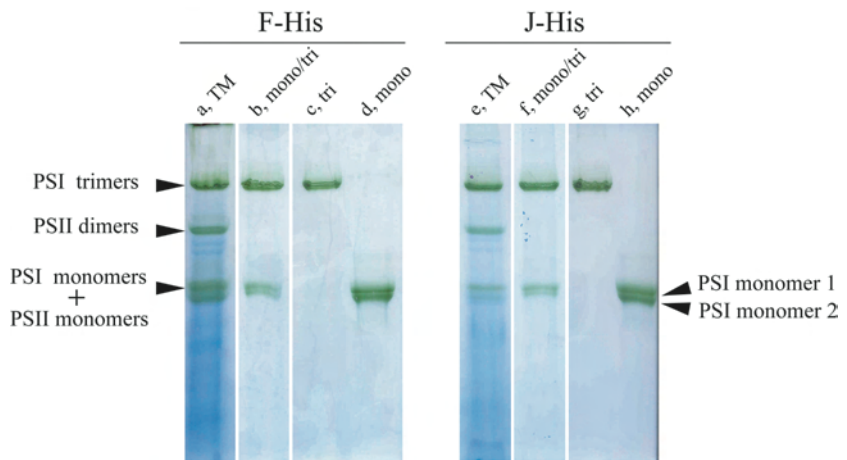
**PSIのアセンブリー状態**

次に、精製したPSI複合体のアセンブリー状態をより詳細に調べるために、精製した単量体と三量体をBlue Native-PAGEを用いて分析した。その結果、三量体は一つのバンドとして、また単量体は近接する二つのバンド(高分子側の単量体1と低分子側の単量体2)として検出された(図2)。SDS-PAGEによりこれらのバンドに含まれるタンパク質の組成を解析したところ、三量体には全てのPSIサブユニットが検出されたが、単量体にはPsaK2が検出されなかつ

た。また、単量体1にはPsaLサブユニットが含まれているが、単量体2には含まれていないことが明らかになった。PsaLはPSIの三量体化に必要であるという報告<sup>23,24)</sup>があることから、今回同定された単量体2は三量体へのアセンブリーもしくは分解の過程にある中間体であると考えられる。

**PSIに含まれる脂質**

精製したPSIに含まれる脂質についても分析を行った。*Synechocystis* sp. PCC 6803から精製したPSIの三量体から脂質を抽出して分析し、クロロフィルa'を測定することにより、PSI反応中心を見積もり、反応中心当たりの脂質分子数を計算した。その結果、反応中心当たり6分子の脂質 [2分子のモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG)、1分子のジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG)、1分子のスルホキノシルジアシルグリセロール (SQDG)、2分子のホスファチジルグリセロール (PG)] が含まれていることが明らかになった(表2)。この結果は、*Synechocystis* sp. PCC 6803のPSIには *T. elongatus* のPSIのX線結晶構造解析では同定されていないDGDGやSQDGも存在していることを示しており、これらの脂質がPSIにおいて重要な機能を担っているものと推測される。*T. elongatus*のPSIには単量体当たり3分子のPGと1分子のMGDGが結合しているが、3分子のPGのうち1分子はPsaBとPsaXの間に存在している。



**図2 BN-PAGEによるタンパク質複合体の分離**

F-His (Lane a-d) 及びJ-His (Lane e-h) のチラコイド膜 (Lane a, e)、Ni<sup>2+</sup>-アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製したPSI (Lane b, f)、精製PSIをグリセロール密度勾配遠心法により分離した三量体 (Lane c, g)、単量体(Lane d, h)をBN-PAGEを用いて分離した。Lane d 及び h に検出された移動度の異なる2つの単量体は、高分子側を単量体1、低分子側を単量体2とした。



表2 PSI三量体に含まれるクロロフィルと脂質の分子数

TLC及びガスクロマトグラフィーによってF-His及びJ-HisのPSI三量体に含まれる脂質分子を定量し、クロロフィル*a*/クロロフィル*a'*の値から反応中心あたりに含まれる脂質分子数を算出した。

Sample (Strain)	Chl <i>a</i> /Chl <i>a'</i>	Lipid			
		MGDG	DGDG	SQDG	PG
Trimer (F-His)	72.3	1.8	0.7	1.0	2.0
Trimer (J-His)	67.6	1.9	0.6	1.1	2.1
Trimer ( $\Delta$ <i>dgdA</i> /J-His)	72.5	3.7	0	3.4	3.2

*Synechocystis* sp. PCC 6803のPSIに

はPsaXが存在しないので、*T. elongatus*のPSIよりも1分子少ない2分子のPGしか存在しないのかもしれない。しかし、*Synechocystis* sp. PCC 6803ではPSIの結晶構造が報告されておらず、各脂質分子が複合体のどこに存在しているのかは明らかになっていない。今後、*Synechocystis* sp. PCC 6803のPSIにおいてもX線結晶構造解析を行い、結合位置を同定し各脂質の機能を推定する必要がある。

**PSIにおけるDGDGの機能**

*Synechocystis* sp. PCC 6803のPSIにおいて新規に同定されたDGDGのPSIにおける機能を解析するために、J-HisにおいてDGDG合成酵素をコードした*dgdA*遺伝子<sup>25,26</sup>を破壊することにより、DGDG合成欠損株を作製した( $\Delta$ *dgdA*/J-His)。作製した $\Delta$ *dgdA*/J-Hisは、通常の光独立栄養条件下では野生株やJ-His株とほぼ同様の速度で増殖した。しかし、チラコイド膜の酸素吸収活性はJ-Hisと比較して30%ほど低かった。この酸素吸収活性が低下した原因を探るために $\Delta$ *dgdA*/J-HisからPSIを精製して生化学的分析を行った。Hisタグ精製の過程において、 $\Delta$ *dgdA*/J-Hisの三量体は単量体に解離しやすい傾向にあることが明らかになり、DGDGがPSIの三量体構造の安定化に必要であることが示唆された。PSIをHisタグ精製後、グリセロール密度勾配遠心法により分離して得られた三量体の酸素吸収活性を測定したところ、J-HisのPSI三量体と比較して活性が40%ほど低いことも明らかになった。次にSDS-PAGEを用いて三量体のタンパク質組成を調べた。その結果、 $\Delta$ *dgdA*/J-Hisの三量体にはPSIを構成する全てのサブユニットが検出され、さらにいく

つかの未知のタンパク質が含まれていた。これらのタンパク質は、DGDGの欠損により不安定化した複合体の安定化などに働いている可能性があり、今後は質量分析にてこれらタンパク質を同定する必要がある。

$\Delta$ *dgdA*/J-Hisのチラコイド膜とPSIの脂質分析も行った。 $\Delta$ *dgdA*/J-Hisから調製したチラコイド膜にはDGDGが検出

されず、また、J-Hisに比べてPG及びMGDGの占める割合はほぼ同じであったが、SQDGの割合が大きく増加していた。PSIの三量体では、J-His株のPSIと比較してPG及びSQDGの占める割合に大きな変化は無かったものの、MGDGの割合が増加していた。クロロフィル*a'*を測定することにより、PSI反応中心を見積もり、反応中心当たりの脂質分子数を計算したものが表2である。反応中心当たり3分子のPG、4分子のMGDG、3分子のSQDG、合計10分子の脂質が検出され、J-His株のPSIに比べて反応中心当たり4分子の脂質が増加していた。脂質分子の増加の理由は不明であるが、DGDGが欠損したことで不安定化したPSIの構造を安定化することに寄与しているものと考えられる。以上の結果からDGDGは、PSIの三量体構造を安定化し、PSIの高い活性の維持に必要であることが明らかとなった。

**4. おわりに**

筆者らは、*Synechocystis* sp. PCC 6803からPSI複合体を簡便に精製する方法を確立した。精製したPSI三量体には、既知のPSIのサブユニットのみ同定されたが、PSI単量体には14種類の新規のタンパク質が含まれており、それらのタンパク質はPSI、特に単量体において重要な機能を担っている可能性が示唆された。また、三量体の脂質を分析したところ、反応中心当たり6分子の脂質が存在することが明らかになった。興味深いことに、*Synechocystis* sp. PCC 6803のPSIには*T. elongatus*のPSI結晶構造では同定されていないDGDGやSQDGが存在していた。PSIにおけるDGDGの機能についてDGDG合成欠損株を作製して解析したところ、DGDGが欠損することによりPSIの酸素吸収活性

が低下すること、またPSI三量体が不安定化し、単量体に解離し易くなることがわかり、DGDGがPSIの活性維持や構造の安定化に寄与していることが明らかとなった。今後はPSIの単量体で見つかった新規タンパク質の機能解析、 $\Delta dgdA/J$ -HisのPSIに検出された未知の蛋白質の同定と機能解析を行っていききたい。また、*Synechocystis* sp. PCC 6803のPSIの結晶化も進め、*T. elongatus*のPSIとの構造上の違いを明らかにするとともに、その構造を基にした各タンパク質サブユニットや脂質分子などの機能解析を行っていききたい。

Received March 8, 2010, Accepted March 23, 2010,

Published April 30, 2010

## 参考文献

- Nelson, N., and Yocum, C. F. (2006) Structure and function of photosystems I and II, *Ann. Rev. Plant Biol.* 57, 521-565.
- Grotjohann, I., and Fromme, P. (2005) Structure of cyanobacterial photosystem I, *Photosynth. Res.* 85, 51-72.
- Jensen, P. E., Bassi, R., Boekema, E. J., Dekker, J. P., Jansson, S., Leister, D., Robinson, C., and Scheller, H. V. (2007) Structure, function and regulation of plant photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 335-352.
- Amunts, A., Drory, O., and Nelson, N. (2007) The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution, *Nature* 447, 58-63.
- Ben-Shem, A., Frolow, F., and Nelson, N. (2003) Crystal structure of plant photosystem I, *Nature* 426, 630-635.
- Rogner, M., Muhlenhoff, U., Boekema, E. J., and Witt, H. T. (1990) Monomeric, Dimeric and trimeric PS I reaction center complexes isolated from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. Size, shape and activity, *Biochim. Biophys. Acta* 1015, 415-424.
- Hladik, J., and Sofrova, D. (1991) Does the trimeric form of the Photosystem I reaction center of cyanobacteria *in vivo* exist?, *Photosynth. Res.* 29, 171-175.
- Kruip, J., Bald, D., Boekema, E., and Rögner, M. (1994) Evidence for the Existence of Trimeric and Monomeric Photosystem-I Complexes in Thylakoid Membranes from Cyanobacteria, *Photosynth. Res.* 40, 279-286.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., and Krauss, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature* 411, 909-917.
- Nyhus, K. J., Ikeuchi, M., Inoue, Y., Whitmarsh, J., and Pakrasi, H. B. (1992) Purification and characterization of the photosystem I complex from the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *J. Biol. Chem.* 267, 12489-12495.
- Rogner, M., Nixon, P. J., and Diner, B. A. (1990) Purification and characterization of photosystem I and photosystem II core complexes from wild-type and phycocyanin-deficient strains of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803, *J. Biol. Chem.* 265, 6189-6196.
- Qin, X., Wang, K., Chen, X., Qu, Y., Li, L., and Kuang, T. (2006) Rapid purification of photosystem I chlorophyll-binding proteins by differential centrifugation and vertical rotor, *Photosynth. Res.* 90, 195-204.
- Croce, R., Zucchelli, G., Garlaschi, F. M., and Jennings, R. C. (1998) A thermal broadening study of the antenna chlorophylls in PSI-200, LHCI, and PSI core, *Biochemistry* 37, 17355-17360.
- Kubota, H., Sakurai, I., Katayama, K., Mizusawa, N., Ohashi, S., Kobayashi, M., Zhang, P., Aro, E. M., and Wada, H. (2010) Purification and characterization of photosystem I complex from *Synechocystis* sp. PCC 6803 by expressing histidine-tagged subunits, *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 98-105.
- Lundell, D. J., Glazer, A. N., Melis, A., and Malkin, R. (1985) Characterization of a cyanobacterial photosystem I complex, *J. Biol. Chem.* 260, 646-654.
- Witt, I., Witt, H. T., Gerken, S., Saenger, W., Dekker, J. P., and Rogner, M. (1987) Crystallization of reaction center-I of photosynthesis-low-concentration crystallization of photoactive protein complexes from the cyanobacterium *Synechococcus* sp., *FEBS Lett.* 221, 260-264.
- Tang, H. D., and Chitnis, P. R. (2000) Addition of C-terminal histidyl tags to PsaL and PsaK1 proteins of cyanobacterial photosystem I, *Indian J. Biochem. Biophys.* 37, 433-440.
- Gulis, G., Narasimhulu, K. V., Fox, L. N., and Redding, K. E. (2008) Purification of His(6)-tagged photosystem I from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Photosynth. Res.* 96, 51-60.
- Batthikova, N., and Aro, E. M. (2007) Cyanobacterial NDH-1 complexes: multiplicity in function and subunit composition, *Physiol. Plant.* 131, 22-32.
- Wegener, K. M., Welsh, E. A., Thornton, L. E., Keren, N., Jacobs, J. M., Hixson, K. K., Monroe, M. E., Camp, D. G., 2nd, Smith, R. D., and Pakrasi, H. B. (2008) High sensitivity proteomics assisted discovery of a novel operon involved in the assembly of photosystem II, a membrane protein complex, *J. Biol. Chem.* 283, 27829-27837.
- Peng, L., Shimizu, H., and Shikanai, T. (2008) The chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex interacts with photosystem I in *Arabidopsis*, *J Biol Chem* 283, 34873-34879.

22. Singh, A. K., Li, H., and Sherman, L. A. (2004) Microarray analysis and redox control of gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Physiol. Plant.* 120, 27-35.
23. Schluchter, W. M., Shen, G., Zhao, J., and Bryant, D. A. (1996) Characterization of *psaI* and *psaL* mutants of *Synechococcus* sp. strain PCC 7002: a new model for state transitions in cyanobacteria, *Photochem. Photobiol.* 64, 53-66.
24. Chitnis, V. P., and Chitnis, P. R. (1993) *PsaL* subunit is required for the formation of photosystem I trimers in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *FEBS Lett.* 336, 330-334.
25. Awai, K., Watanabe, H., Benning, C., and Nishida, I. (2007) Digalactosyldiacylglycerol is required for better photosynthetic growth of *Synechocystis* sp. PCC6803 under phosphate limitation, *Plant Cell Physiol.* 48, 1517-1523.
26. Sakurai, I., Mizusawa, N., Wada, H., and Sato, N. (2007) Digalactosyldiacylglycerol is required for stabilization of the oxygen-evolving complex in photosystem II, *Plant Physiol.* 145, 1361-1370.

Purification and Characterization of Photosystem I Complex from  
*Synechocystis* sp. PCC 6803 by Expressing Histidine-Tagged Subunits.

Hisako Kubota\*, Naoki Mizusawa, Hajime Wada  
Department of Life Sciences (Biology),  
Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo