

光合成研究

第21巻 第3号 (通巻62号) 2011年12月

NEWS LETTER Vol. 21 NO. 3 December 2011
THE JAPANESE SOCIETY OF PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

次期会長選挙のお知らせ	94
研究紹介 絶対嫌気性の光合成細菌 <i>Chlorobaculum tepidum</i> における外来遺伝子発現系 浅井 智広 (阪大、名大)、大岡 宏造 (阪大)	95
トピックス 阻害剤を用いた光化学系Iサイクリック電子伝達の研究 平 純考 (京大)、鹿内 利治 (京大)	102
トピックス 光合成生物の緊縮応答 増田 真二 (東工大)	106
解説特集「光合成の光エネルギー変換メカニズム —物理学的手法によるアプローチ— 序文	112
野口 巧 (名大)	113
解説 光合成水分解・酸素発生を可能にする光化学系IIの原子構造 沈 建仁 (岡山大)	114
解説 水分解酸素反応を可能とさせるPhotosystem IIにおけるクロロフィル上の電荷配置 石北 央 (京大、さきがけ)、斉藤 圭亮 (京大)	122
解説 光合成系での光捕集過程を構造に立脚して理解する 柴田 穰 (東北大)	128
報告記事 若手の会活動報告 ～第五回セミナー開催、サイエンスアゴラ2011出展、新幹事～ 成川 礼 (東大)	135
報告記事 光合成学会若手の会第五回セミナーに参加して 野路 智康 (名工大)	136
報告記事 サイエンスアゴラ2011報告書 —サイエンスカフェ「光と植物の不思議 —光合成研究の今と未来—」を出展して— 大西 紀和 (基生研)、浅井 智広 (名大)、岡島 公司 (大府大)、成川 礼 (東大)	137
事務局からのお知らせ	142
日本光合成学会会員入会申込書	144
日本光合成学会会則	145
幹事会名簿	147
会員名簿	148
編集後記	159
記事募集	159

賛助法人会員広告

日本光合成学会 次期会長選挙のお知らせ

「日本光合成学会会則（平成21年6月1日施行）第5条」に基づき、次期会長選挙（任期：平成25年1月1日～平成26年12月31日の2年間）を行ないます。本会では任期一年前に新会長を選出し、会の円滑、継続的な運営をはかることになっています。

この会報の末尾に添付されている投票用紙に会員の中から会長候補者1名の氏名を明記し、同封した返信用封筒に入れて選挙管理委員会宛に1月31日までにご返送下さい（消印有効）。会員名簿は本号の巻末をご覧ください。

これまでの本会会長は、宮地重遠、西村光雄、佐藤公行、金井龍二、井上頼直、高宮建一郎、村田紀夫、伊藤繁、池内昌彦（現会長：任期 平成23年1月1日～平成24年12月31日）の諸氏です。「会則5条の1では会長は二期を超えて再任されないこと」となっておりますので、今回の選挙では現会長に被選挙権はありません。

日本光合成学会 選挙管理委員会

久堀 徹（東京工業大学資源化学研究所）

太田 啓之（東京工業大学バイオ基盤支援センター）

投票用紙の送付先

〒226-8503

横浜市緑区長津田4259 R1-8

東京工業大学資源化学研究所

久堀 徹研究室内

日本光合成学会選挙管理委員会 行き

絶対嫌気性の光合成細菌 *Chlorobaculum tepidum* における 外来遺伝子発現系[§]

¹大阪大学大学院 理学研究科 生物科学専攻

²現所属：名古屋大学大学院 理学研究科 物質理学専攻（物理系）

浅井 智広^{1,2*}、大岡 宏造¹

1. はじめに

緑色硫黄細菌は偏性嫌気性のグラム陰性細菌で、還元型の硫黄化合物を電子源とした非酸素発生の光合成によって生育する光独立栄養細菌である¹⁾。その光合成系は非常に単純であり、細胞内にチラコイド様の膜系はなく、光化学系I型の光合成反応中心（RC）とシトクロム bc 複合体から構成される電子伝達系が細胞膜内で駆動している^{2,3)}。その一方、他の多くの光合成生物とは異なり、「RCコアタンパク質がホモダイマー構造である」、「光合成細菌でありながら一次電子受容体がクロロフィル a である」、「既知のものでは最大の集光装置であるクロロソームをもつ」、「Calvin回路ではなく還元的TCA回路で炭素固定を行う」など数多くの興味深い特質をもつ²⁻⁵⁾。

緑色硫黄細菌の光合成系に関する研究は、紅色光合成細菌と同じくらい古い歴史をもつ。しかしながら光合成系が酸素で失活しやすく、利用できる解析手法には限界があるため、解明すべき問題が数多く残されたままである。ようやく近年になって、好熱性の緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum (Cba.) tepidum* の全ゲノム情報と相同組換えによる形質転換系が確立され、遺伝子破壊株を使った分子生物学的な研究が報告されはじめた^{3,6,7)}。しかし緑色硫黄細菌は光合成でしか生育できないため、光合成反応に必要な遺伝子の機能解析はほとんど進んでいない。

私たちは緑色硫黄細菌のホモダイマーRCの構造と機能に注目して研究してきた。近年次々に立体構造が解かれたヘテロダイマーRCでは、電子伝達コファク

ターが軸対称な2本の電子移動経路を形成し、電子は片方の経路を排他的または優先的に移動する^{8,9)}。一方、ホモダイマーRCでは2本の電子移動経路は同等に機能すると考えられており、ホモダイマーからヘテロダイマーに進化する過程でRCは電子移動を非対称化させたと推測されている^{4,5)}。私たちは、ホモダイマーRCをモデルとして電子移動を非対称化した因子を探りたいと考えているが、ホモダイマーRCでは立体構造の決定はおろか電子伝達コファクターの同定すら完了していない。この状況を打破するためには、どうしても分子生物学的手法による解析が必要である。

そこで私たちは、光合成に必要な遺伝子を操作する技術として異なる2つの遺伝子発現系を考案した。1つは「遺伝子の偽二倍体化」であり、RCコアタンパク質への部位特異的変異の導入、およびホモダイマー型RCの人工的なヘテロダイマー化を可能にした¹⁰⁾。もう1つは「広宿主域プラスミドの開発」であり、*Cba. tepidum* にプラスミドをもたせることで、より汎用的な遺伝子発現系の構築にも成功した。ここでは私たちが開発した手法を紹介し、緑色硫黄細菌の遺伝子発現系を使った研究の今後の展開を議論したい。

2. 遺伝子の偽二倍体化

先に述べたように、私たちは、緑色硫黄細菌のホモダイマーRCの構造と機能、分子進化に興味をもって研究している。*Cba. tepidum* で相同組換えによる形質転換系が確立されて以来、RCコアタンパク質（PscA）への部位特異的な変異導入を試みてきた。しかし、こ

[§] 第2回日本光合成学会シンポジウム ポスター受賞論文

* 連絡先 E-mail: cazai@bio.phys.nagoya-u.ac.jp

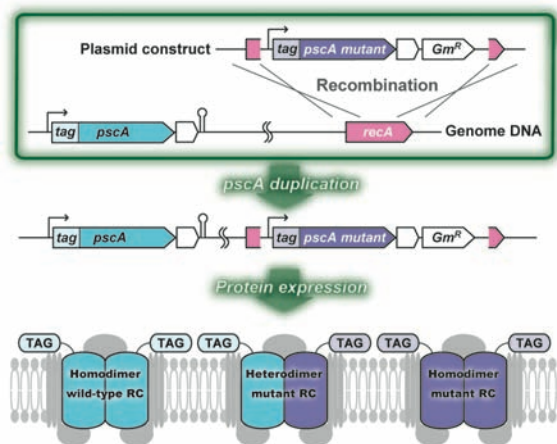


図1 RCコアタンパク質遺伝子 (*pscA*) の偽二倍体化の戦略。

あらかじめ相同組み換えで、本来の*pscA*遺伝子にタグを付加しておく。その後、それとは異なるタグを付加した変異*pscA*遺伝子を*recA*遺伝子のコード領域に挿入する。各々の*pscA*遺伝子によるホモダイマーRC以外に、ヘテロダイマーRCも発現可能である。本文中で述べた3つの戦略項目を検証するのに用いたのは*recA::(HisAB-aacC1)*株で、本来の*pscA*遺伝子にはタグを付加していないことに注意。

れまでに導入を試みた変異は全て致命的であり、私たちのグループを含め、RCコアタンパク質の変異体作製に成功したものはいない。

そこで任意の変異をRCに導入する方法として、私たちが最初に考案したのが、「RCコアタンパク質遺伝子 (*pscA*) の偽二倍体化」である(図1)。この方法では、野生型の*pscA*遺伝子を機能的なまま残し、*recA*遺伝子のコード領域に変異*pscA*遺伝子を挿入する。野生型RCの発現が変異株の生育を補償するので、任意の変異体RCの発現が可能になると考えた。この方法には以下の3つの戦略項目も同時に含まれている。①*recA*遺伝子の破壊により相同組換えを抑制し、偽二倍体化した遺伝子をゲノム上に安定に保持させること、②野生型遺伝子と変異遺伝子にそれぞれ異なるアフィニティ精製用タグ配列を付加し、変異体RCを特異的に精製すること、③野生型と変異型のコアタンパク質から成る、人工的なヘテロダイマーRCを発現することである。これらの項目の有効性について、N末端にHisタグを付加した*pscA*遺伝子を*recA*遺伝子領域に組み込んだ変異株、*recA::(HisAB-aacC1)*を作製することにより検証することにした(図2A)。

まず確認したのが偽二倍体化した遺伝子の安定的な

保持である。得られた*recA::(HisAB-aacC1)*株を継代培養したところ、偽二倍体化した2つの*pscA*遺伝子座の再編や配列の変化は全く生じなかった。また、*recA*遺伝子破壊による光合成系や生育自体への大きな影響は見られず、期待通り相同組換え能のみが著しく抑制されていた。

次に、Hisタグ付きRCコアタンパク質が発現されているかを調べた。変異株から調製した粗精製膜をn-octyl-β-D-glucosideで可溶化後、Ni²⁺固定化カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーを行ったところ、比較的高純度のRC標品を大量に得ることができた(図2B)。またこのRC標品は、電子伝達成分を全て保持しており、高い光電荷分離活性を有していた。

最後にヘテロダイマーRCの発現を確認した。先のアフィニティ精製で得られたHisタグRC標品は、Hisタ

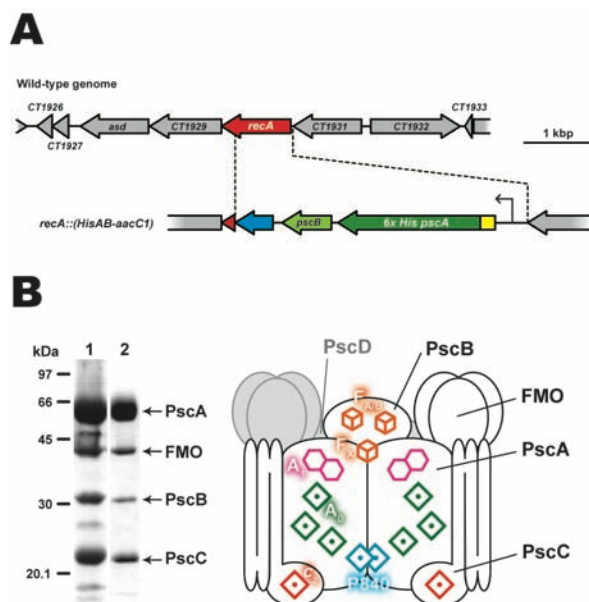


図2 (A) *recA::(HisAB-aacC1)*のゲノムの模式図。

N末端に 6x Hisタグを付加した*pscA*遺伝子と*pscB*遺伝子 (F_A/F_Bタンパク質) のクラスターを野生型*pscAB*遺伝子クラスターと同じプロモーターにつないで、野生株の*recA*遺伝子領域に相同組換えによって組み込んだ。青で示した遺伝子は選択マーカーとして使用したゲンタマイシン耐性遺伝子 (*aacC1*) 。

(B) *recA::(HisAB-aacC1)*から嫌氣的なアフィニティ精製で得られたHisタグRC標品のSDS-PAGE (左) とRC複合体モデル (右) 。

SDS-PAGEのレーン1はNi²⁺固定化カラムの溶出画分、レーン2はそれをゲルろ過 (Sephacryl S-200) にかけたもの。各種分光分析で検出された電子伝達コファクターは複合体モデルに色つきで示した。赤:ヘムc、青:バクテリオクロロフィルa、緑:クロロフィルa、ピンク:メナキノン、オレンジ:4Fe-4Sクラスター。

グ付きのPscAからなるホモダイマーRCと、Hisタグ付きとタグなしのPscAからなるヘテロダイマーRCの混合物となるはずである(図1の下段を参照:ただし、*recA::(HisAB-aacC1)*株では本来の*pscA*遺伝子にはタグを付加していない)。従って、この標品中にタグなしのPscAが含まれることがわかれば、ヘテロダイマーRCが発現している証拠となると考えた。そこでHisタグRC標品をトリプシン分解し、液体クロマトグラフィー-タンデムマスペクトル分析(LC/MS/MS)でPscAのN末端ペプチドを探索したところ、Hisタグ付きのN末端ペプチドだけでなく、タグなしのN末端ペプチドも含まれていることがわかった(図3A)。このタグなしのN末端ペプチドの信号強度は、等モルの野生型RC複合体(タグなしのホモダイマーRC)を分析した場合の約10%に相当していた。これは、HisタグRC標品中に含まれる全PscAのうち約10%がタグなしであることを意味する。タグなしのPscAは全てヘテロダイマーRCに由来するはずなので、HisタグRC標品に含まれるRC複合体の約20%がヘテロダイマーRCであると見積もることができた(図3B)。

以上の検証により、「RCコアタンパク質遺伝子(*pscA*)の偽二倍体化」はホモダイマーRCを人工的にヘテロダイマーに作りかえる方法として有効であることがわかった。実際、発現量は少ないが変異を導入したヘテロダイマー反応中心の存在を確認しており、近いうちに報告したい(未発表データ)。私たちの考案したこの方法が、*Cba. tepidum*のRCを分子生物学的に解析する非常に有効な方法論として浸透していくことを期待している。この方法は*Cba. tepidum*のゲノム上に相同な配列をもつ遺伝子を組み込むことを前提としているが、結果的に*recA*遺伝子領域は相同組換えが抑制される以外はニュートラルサイトとして機能しており、基本的にどのような遺伝子でも発現させることができる。したがって同様の方法が、他の必須タンパク質や、コファクターが多くて他の生物種では発現させられないタンパク質の解析にも適用できると考えている。

3. 広宿主域プラスミドの開発

前項の遺伝子の偽二倍体化による発現系は、遺伝子発現系として十分に機能するものの、二重交差型の相同組換えによって発現DNAコンストラクトをゲノムに組み込むため、目的の変異株の単離までには手間と時

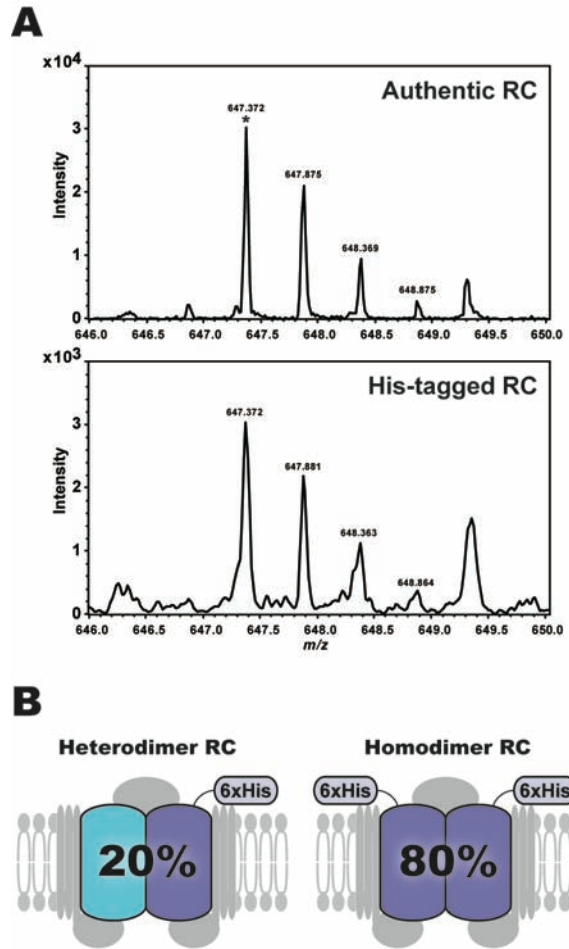


図3 (A) タグなしPscAのトリプシン消化断片のマスペクトル。

同じモル濃度の野生株から精製したタグなしのRC標品(上)と、*recA::(HisAB-aacC1)*から得られたHisタグRC標品(下)をLC/MS/MSで分析したときのマスペクトルを示している。*印はMS/MSによりタグなしPscAのN末端ペプチドであることを確認したピーク。HisタグRC標品で検出されたピークは、野生型RC標品の約1/10となっていることがわかる。

(B) LC/MS/MS分析から推定されたHisタグRC標品中に含まれるヘテロダイマーRCとホモダイマーRCの量比。

HisタグRC標品中の全PscAのうち約10%がタグなしであり、これは全てヘテロダイマーRCに由来するので、全体の約20%がヘテロダイマーRCである。

間を要する。また、組み込む遺伝子は基本的に1コピーとなるため、高発現は期待できない。さらに、必然的に*recA*遺伝子を破壊してしまうので、以後、相同組換えを利用したゲノムの改変はできなくなってしまう。これを解決するには、より広範な遺伝子を対象にした、汎用性の高い*Cba. tepidum*の遺伝子発現系の構築が必要である。

RK2やRP4 (IncPグループ)、RSF1010 (IncQグルー

プ) などの接合プラスミドは、細菌間の接合過程によって伝達されるので^{11,12)}、事実上、全てのグラム陰性細菌を宿主とすることができる(図4)。このような広宿主域プラスミドを用いた遺伝子発現系は、非光合成細菌はもちろん、紅色光合成細菌やシアノバクテリアの研究では一般的に使用されている^{11,13-16)}。緑色硫黄細菌でも接合プラスミドの導入が1995年に報告された¹⁷⁾。ところが報告された方法では誰も結果を再現することができず、緑色硫黄細菌にプラスミドを保持させるのは長い間不可能であると考えられてきた。しかし私たちが再現実験を行った際、自然変異体と思われる偽陽性のコロニーが多いことに気がついた。これまでに用いられてきた抗生物質では、プラスミドを保持したクローンの選択が不十分であったと考えられた。また報告されている抗生物質を使う限り、たとえプラスミドの導入に成功しても、その後の継代培養でプラスミドが安定には保持されないと推測された。

そこで適切な選択が可能な抗生物質を再検討し、エリスロマイシン (Em) や、ストレプトマイシンとスペクチノマイシンの混合物 (Sm/Sp) が有効であることがわかった。RSF1010由来プラスミドpDSK519¹⁸⁾に、これらの抗生物質の耐性遺伝子 (*ermC*、*aadA*) を組み込んだ新たな接合プラスミドpDSK5191、pDSK5192を作製して接合実験を行ったところ、再現よく *Cba. tepidum* にプラスミドを導入することに成功した(図5A)。また、薬剤を含む培地での継代培養では得られるプラスミドの収量や配列に変化は見られず、導入したプラスミドは非常に安定に保持されることが確認できた(図5B)。

次に、任意の遺伝子を発現させるためのプラスミドの構築に着手した。私たちのグループは、過去の研究

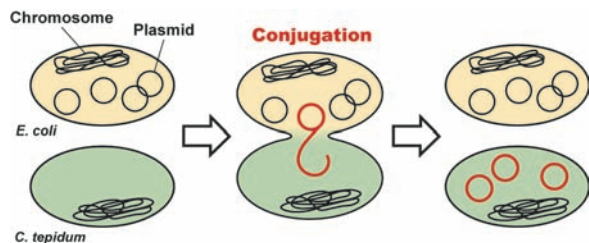


図4 接合によるプラスミド伝達の模式図。

プラスミドの伝達には、供与菌(図では *E. coli*) と受容菌(図では *C. tepidum*) の物理的な接触と、プラスミドの複製過程が必要である。また、導入されたプラスミドが受容菌に保持されるためには、細胞分裂の際に安定に複製され、娘細胞に均等に分配されなければならない。

A

Plasmid	Antibiotics	Conjugation frequency
-	Em 1 µg/ml	< 10 ⁻¹⁰
pDSK5191	Em 1 µg/ml	1.6 ± 0.8 × 10 ⁻⁶
-	Sm/Sp 100/50 µg/ml	< 10 ⁻¹⁰
pDSK5192	Sm/Sp 100/50 µg/ml	1.2 ± 0.5 × 10 ⁻⁶

B

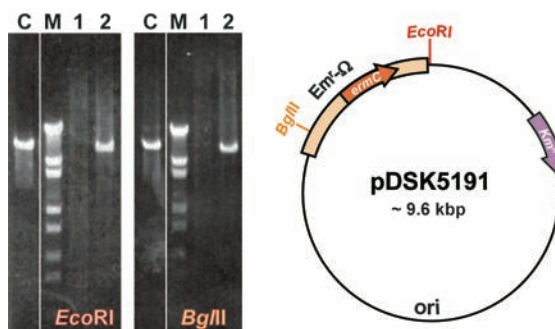


図5 (A) 大腸菌S17-1と *Cba. tepidum* 野生株との接合実験。接合プラスミドpDSK5191はエリスロマイシン (Em) 耐性遺伝子、pDSK5192はストレプトマイシン (Sm) とスペクチノマイシン (Sp) の二重耐性遺伝子をもつ。どちらを使った場合も、プラスミドなしの場合と比較して有意に *Cba. tepidum* 形質転換体の出現頻度が増える。

(B) pDSK5191を導入した *Cba. tepidum* 形質転換体から抽出したプラスミドのアガロース電気泳動像(左)とpDSK5191の遺伝子地図。

C: 導入前のpDSK5191、M: λStyI digests (分子量マーカー)、1: 野生株から抽出したプラスミド、2: 形質転換体から抽出したプラスミド。

で、野生型 *Cba. tepidum* とは生長速度が異なる変異株、Δ*cycA*株とΔ*soxB*株を作成している^{19,20)}。Δ*cycA*株は、ペリプラズムの可溶性シトクロム*c-554*をコードする遺伝子を欠失しており、培養後期の生長速度が野生株より顕著に遅くなる。Δ*soxB*株は、チオ硫酸の酸化に必要な遺伝子群の1つ*soxB*遺伝子を欠失しており、こちらは培養後期から全く生長しなくなる。これらの変異株の表現型の相補を指標にして、各々の変異株の欠損した遺伝子を発現するプラスミドの作製を試みた。その結果、*pscA*遺伝子上流領域を構成プロモーターとして使用することで、変異株の表現型を、コントロールプラスミドを導入した野生株と同等にまで回復させられることがわかった(図6)。

作製した発現プラスミドを用いてHisタグを付加した*pscA*遺伝子の発現についても調べたところ、アフィ

ニティ精製によって形質転換体からHisタグ付きのRC複合体を特異的に得ることもできた。その収量は、ゲノムから発現させた場合に比べて、3~5倍程度高かった。この発現量の上昇は、細胞内でのプラスミドのコピー数（他の細菌種では5~10コピー程度と見積もられている）とゲノムのコピー数（*Cba. tepidum* では数コピー存在すると考えられている）の相対量比を反映していると推測される。私たちが開発した新たな接合プラスミドpDSK5191、pDSK5192による遺伝子発現は、*Cba. tepidum* での興味ある遺伝子の過剰発現やタンパク質の大量生産に有効であると考えている。

一般に広宿主域プラスミドを用いた発現系は、プラスミド導入株を維持するために培地に適切な薬剤を添加する必要があり、大量培養や生理学的な実験にはやや不向きな面もある。しかし複数コピーのゲノムをもつ生物種の場合、ゲノムの相同組換えを利用した形質転換法では、形質転換体が得られても変異ゲノムが完全に分離するまでコロニーの純化を繰り返す必要がある。作業時間を考えると、DNAコンストラクトの導入から変異株の樹立までに、少なくとも1ヶ月はかかり、場合によっては最後まで純化できないこともある。それに対して接合による発現プラスミドの導入は原理的にコロニー純化を必要としない上、緑色硫黄細菌の光独立栄養性を利用して、対抗選択（プラスミド供与菌である大腸菌を殺す選択）を薬剤による形質転換体の選択と同時に行える。そのため、接合からクローンの樹立まで1週間程度で完了することができる。広宿主域プラスミドを用いた方法は、現状ではもっとも簡便かつ迅速な *Cba. tepidum* の遺伝子発現系であると言えるだろう。

4. 今後の研究展開

遺伝子発現系が構築できたことで、緑色硫黄細菌の分子生物学的な研究を行うための最低限必要なツールは整備された。これにより、これまで不可能と考えられていたような研究が可能になることを期待している。

第一に、実験進化学的な研究である。冒頭でも触れたように、緑色硫黄細菌の光合成系の特徴は、進化のごく初期の光エネルギー変換機構を持つと考えられている点にある^{4,5)}。それゆえエネルギー代謝系の進化を考察するためのよいモデルとなりうる。例えば、「2. 遺伝子の偽二倍体化」で述べたホモダイマーRCの人

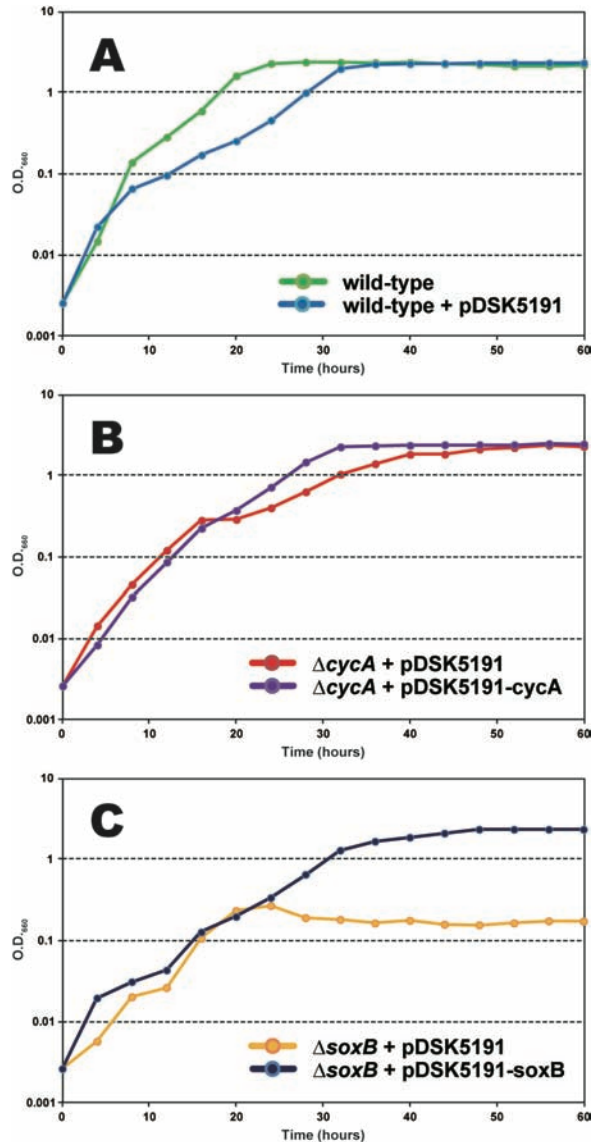


図6 *Cba. tepidum* 変異株の発現プラスミドによる表現型相補。

(A) 野生株とpDSK5191導入株のバッチ培養での生長曲線。*Cba. tepidum* は硫化物が存在するときは排他的に硫化物を電子源として使用する。培養初期(0~15時間)の生長曲線のふくらみは、硫化物酸化時に細胞外に放出される単体硫黄によるもの。pDSK5191導入株の生長が遅いのは培地にエリスロマイシンが含まれているためである。

(B) ΔcycAのpDSK5191導入株とpDSK5191-cycA相補株の生長曲線。cycA遺伝子の発現により、pDSK5191導入株に見られる培養後期の生長速度の遅れが、野生株のpDSK5191導入株(A、青線)と同等まで回復している。

(C) ΔsoxBのpDSK5191導入株とpDSK5191-soxB相補株の生長曲線。soxB遺伝子の発現により、pDSK5191導入株の培養後期での生長が、野生株のpDSK5191導入株(A、青線)と同等まで回復している。

工的ヘテロダイマー化である。今日の光化学系I、IIをはじめとするヘテロダイマーRCの構造・機能上の相関や、その成立過程を解明できるのではないかと考え

ている。他にも、緑色硫黄細菌に光化学系II型のRCを発現させて、光化学系I、IIが成立した初期段階を再現することを計画している。また、緑色硫黄細菌はバクテリオクロフィルaとクロロフィルaの両方をもつので、生合成系の改変や他の生物種由来のクロロフィル結合タンパク質の発現などにより、複雑な色素系が出来上がってきた過程を考察することも可能かも知れない。

第二に、これまで精製や解析が困難とされてきたタンパク質の研究である。緑色硫黄細菌にはゲノム情報から存在が推測されているものの、タンパク質レベルでの存在や生化学的な活性、生理的な機能が調べられていない遺伝子が未だに数多く存在する^{3,6)}。例えば、シトクロムbc複合体やNADH脱水素酵素のホモログ、末端酸化酵素であるシトクロムbd複合体などで、ゲノム情報からはサブユニット構成やアミノ酸配列などに特徴が見られる。これらは発現量が少なく、酸素に対して非常に不安定であることが生化学的解析の障害となっているが、遺伝子発現系が整備されたことで過剰発現やアフィニティタグの付加による精製の簡便化を図る試みが可能である。また *Cba. tepidum* は生長が速く、培養も比較的容易なため、ヒドロゲナーゼやニトロゲナーゼなど、嫌気性タンパク質生産のための発現ホストとして利用することもできるだろう。

今後は、これら分子生物学的ツールを駆使した研究を精力的に進め、未だ謎の多い緑色硫黄細菌の光合成系を解明していきたいと考えている。

Received November 22, 2011, Accepted November 25, 2011,
Published December 31, 2011

参考文献

- Imhoff, J.F. and V. Thiel, (2010) Phylogeny and taxonomy of Chlorobiaceae, *Photosynth. Res.* 104, 123-136.
- Hauska, G., T. Schoedl, H. Remigy, and G. Tsiotis, (2001) The reaction center of green sulfur bacteria(1), *Biochim. Biophys. Acta.* 1507, 260-277.
- Frigaard, N.U., A.G. Chew, H. Li, J.A. Maresca, and D.A. Bryant, (2003) *Chlorobium tepidum*: insights into the structure, physiology, and metabolism of a green sulfur bacterium derived from the complete genome sequence, *Photosynth. Res.* 78, 93-117.
- Olson, J.M. and R.E. Blankenship, (2004) Thinking about the evolution of photosynthesis, *Photosynth. Res.* 80, 373-386.
- Hohmann-Marriott, M.F. and R.E. Blankenship, (2011) Evolution of photosynthesis, *Annu. Rev. Plant. Biol.* 62, 515-548.
- Eisen, J.A., K.E. Nelson, I.T. Paulsen, J.F. Heidelberg, M. Wu, R.J. Dodson, R. Deboy, M.L. Gwinn, W.C. Nelson, D.H. Haft, E.K. Hickey, J.D. Peterson, A.S. Durkin, J.L. Kolonay, F. Yang, I. Holt, L.A. Umayam, T. Mason, M. Brenner, T.P. Shea, D. Parksey, W.C. Nierman, T.V. Feldblyum, C.L. Hansen, M.B. Craven, D. Radune, J. Vamathevan, H. Khouri, O. White, T.M. Gruber, K.A. Ketchum, J.C. Venter, H. Tettelin, D.A. Bryant, and C.M. Fraser, (2002) The complete genome sequence of *Chlorobium tepidum* TLS, a photosynthetic, anaerobic, green-sulfur bacterium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 9509-9514.
- Frigaard, N.U. and D.A. Bryant, (2001) Chromosomal gene inactivation in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* by natural transformation, *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2538-2544.
- Santabarbara, S., L. Galuppini, and A.P. Casazza, (2010) Bidirectional electron transfer in the reaction centre of photosystem I, *J. Integr. Plant Biol.* 52, 735-749.
- Heathcote, P., P.K. Fyfe, and M.R. Jones, (2002) Reaction centres: the structure and evolution of biological solar power, *Trends Biochem. Sci.* 27, 79-87.
- Azai, C., K. Kim, T. Kondo, J. Harada, S. Itoh, and H. Oh-oka, (2011) A heterogeneous tag-attachment to the homodimeric type 1 photosynthetic reaction center core protein in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1807, 803-812.
- Rawlings, D.E. and E. Tietze, (2001) Comparative biology of IncQ and IncQ-like plasmids, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 481-496.
- Zatyka, M. and C.M. Thomas, (1998) Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements, *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 291-319.
- Gomelsky, M. and S. Kaplan, (1997) Molecular genetic analysis suggesting interactions between AppA and PpsR in regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, *J. Bacteriol.* 179, 128-134.
- Kim, E.J., J.S. Kim, H.J. Rhee, and J.K. Lee, (2009) Growth arrest of *Synechocystis* sp. PCC6803 by superoxide generated from heterologously expressed *Rhodobacter sphaeroides* chlorophyllide a reductase, *FEBS Lett.* 583, 219-223.
- Koksharova, O.A. and C.P. Wolk, (2002) Genetic tools for cyanobacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 123-137.
- Nomata, J., L.R. Swem, C.E. Bauer, and Y. Fujita, (2005) Overexpression and characterization of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1708, 229-237.
- Wahlund, T.M. and M.T. Madigan, (1995) Genetic

- transfer by conjugation in the thermophilic green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*, *J. Bacteriol.* 177, 2583-2588.
18. Keen, N.T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger, (1988) Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria, *Gene*. 70, 191-197.
19. Azai, C., Y. Tsukatani, J. Harada, and H. Oh-oka, (2009) Sulfur oxidation in mutants of the photosynthetic green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* devoid of cytochrome c-554 and SoxB, *Photosynth. Res.* 100, 57-65.
20. Tsukatani, Y., R. Miyamoto, S. Itoh, and H. Oh-oka, (2006) Soluble cytochrome c-554, CycA, is not essential for photosynthetic electron transfer in *Chlorobium tepidum*, *FEBS Lett.* 580, 2191-2194.

Expression Systems of Exogenous Gene
in the Obligatory Anaerobic Photosynthetic Bacterium *Chlorobaculum tepidum*

Chihiro Azai^{1,2,*}, Hirozo Oh-oka¹

¹Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University

²Present affiliation: Division of Material Science (Physics), Graduate School of Science, Nagoya University

阻害剤を用いた光化学系Iサイクリック電子伝達の研究[§]

京都大学 大学院 理学研究科
平 純考*、鹿内 利治

1. はじめに

葉緑体における光合成電子伝達にはリニア電子伝達 (LET) と光化学系I (PSI) サイクリック電子伝達 (CET) の二つの経路があり、CETでは電子がPSIからプラストキノン (PQ) に輸送されることで更なるプロトン濃度勾配が形成される¹⁾。CETの発見は50年以上遡り、Arnonのグループがチラコイド膜で光のエネルギーを用いてATPを生産する反応として報告している²⁾。このような光合成 (生命と言っても過言ではない) の基本反応がいまだ完全に解明されていないことは、驚くべきことである。我々のグループは、2002年にこの経路に異常を示すシロイヌナズナの *pgr5* (*proton gradient regulation 5*) 変異体を単離し、この経路が強光下でのNPQの誘導、PSIの光阻害からの回避、さらには二酸化炭素固定あるいは光呼吸にATPを供給することを明らかにした³⁾。高等植物では、PGR5タンパク質に依存するCETの主経路に加え、NDH複合体依存の経路も機能する (図1)^{4,5)}。Arnonの見つけたPGR5依存経路は、しばしばフェレドキシン依存経路と呼ばれるが、それを触媒するフェレドキシン・キノン酸化還元酵素 (FQR) の実体は未知である。これまでにPGR5やPGRL1 (PGR5-like photosynthetic phenotype) の二つの

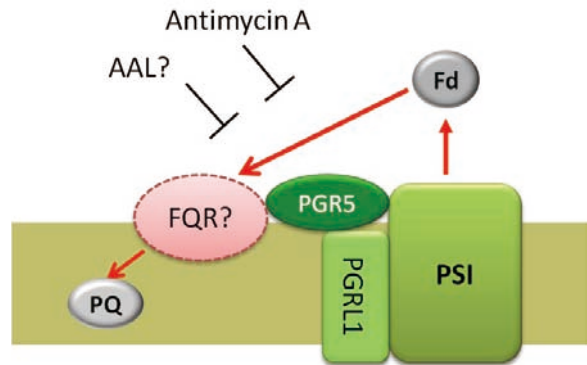


図2 PGR5依存経路の詳細。FQRの存在はこれまで明らかになっていないため疑問符をつけている。

タンパク質がこの経路に必須であることがわかっている^{3,6)} (図2)。クラミドモナスでは、PSI、シトクロム *b₆f* 複合体、FNRさらにPGRL1を含む超複合体がCETを行うことが報告された⁷⁾。クラミドモナスのCETはstate transitionに依存する点が高等植物とは異なり⁸⁾、また高等植物ではこのような超複合体の報告はない。CETの装置は、高等植物とクラミドモナスで異なっているのかもしれない。また最近我々のグループは、NDH複合体がPSIと超複合体を作り⁹⁾、フェレドキシンを電子供与体とすることを報告した¹⁰⁾。したがって、両経路ともフェレドキシンに依存する。

本稿では、我々の行っているPGR5依存CETを特異的に阻害する薬剤からのアプローチを紹介する。

2. アンチマイシン Aについて

フェレドキシンに依存す

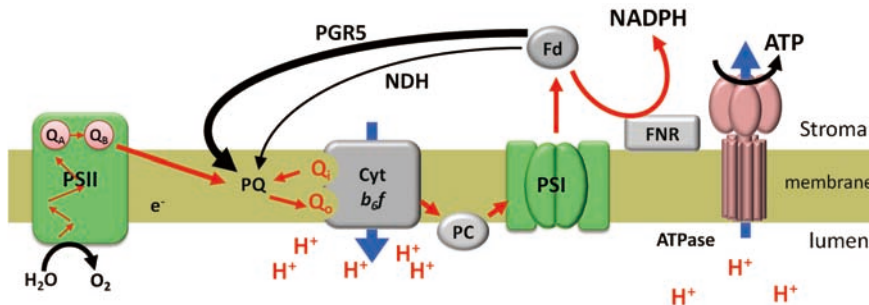


図1 葉緑体チラコイド膜上での電子伝達。CETにはPGR5依存の経路とNDH依存の二つの経路が存在する。LETを赤線、CETを黒線で示した。

[§] 第2回日本光合成学会シンポジウム ポスター賞受賞論文

* 連絡先 E-mail: y.taira@pmg.bot.kyoto-u.ac.jp

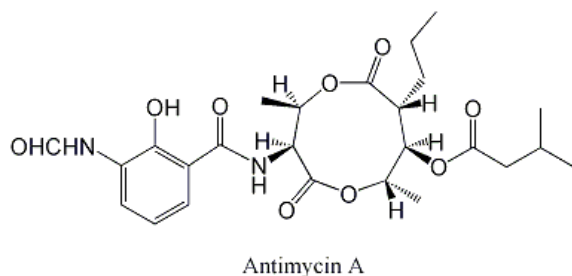


図4 アンチマイシンAの構造。

る二つのCETは遺伝学により明確に分けることができる。もう一つ、両者を区別するのはアンチマイシンA (図3) に対する感受性である⁵⁾。PGR5依存経路はアンチマイシンAに感受性であるが、NDH依存経路は阻害を受けない。アンチマイシンAによるCETの阻害は、古くにArnonのグループにより発見されており¹¹⁾、ArnonのサイクリックとPGR5依存のサイクリックを結ぶ一つの根拠になっている¹¹⁾。アンチマイシンAはもともとミトコンドリアにおける呼吸鎖電子伝達の阻害剤として見つかった化合物である¹²⁾。シトクロム bc_1 複合体のQiサイトに結合し、Q_oサイクルを阻害する。葉緑体のシトクロム b_6f 複合体はシトクロム bc_1 複合体と構造的に類似しており、アンチマイシンAが葉緑体のシトクロム b_6f 複合体のQi部位に結合するという漠然とした考えが広がっている。このことがまちがいであることはしばしば指摘されているが¹³⁾、アンチマイシンAの結合部位をきちんと調べた研究は少ない。我々は、アンチマイシンAがFQRのキノン結合部位を塞ぐ可能性が低いことを示唆する結果を得ている。

作用機作が不明なこと以外にも、アンチマイシンAをCETの研究に用いるには大きな問題がある。PGR5依存経路の阻害にはミトコンドリア電子伝達を阻害する濃度の200倍程度の高い濃度のアンチマイシンAを必要とする点である (チラコイド膜での使用で10 μ M)^{3,14)}。このような高濃度の阻害剤の使用は、様々な問題を引き起こす。葉や細胞を用いる際には、呼吸鎖の阻害がもちろん深刻であるが、葉緑体においてもNPQの誘導を阻害することが知られている¹⁵⁾。さらに高濃度では、我々のアッセイ系で、LETも阻害するようである。光合成研究におけるアンチマイシンAの使用に際しては、濃度を注意して最適化する必要がある。このような問題を解決するため、我々は、PGR5依存CETを低濃度で特異的に阻害する薬剤の選抜を

行った。この薬剤が、FQRの核心部に結合するならば、それを指標にFQRの実体を解明することができるかもしれない。

3. CET活性の測定

阻害剤の活性測定にはCETの正確な評価が必要となってくる。しかしCETは、入口と出口のない循環的な反応の宿命で、その速度の測定は困難である。現在でも、その新しい測定法についてしばしば報告がなされ、測定方法によって異なる結果が混乱の原因になっている。それぞれの測定法の問題については、総説にまとめられている¹⁶⁾。我々は、最も直接的な方法として、破壊葉緑体におけるフェレドキシン依存プラストキノ還元活性をモニターしている³⁾。この方法は、クロロフィル蛍光測定に依存するため、超弱光下で測定しており、明らかにCETにとって最適ではない。しかし、シロイヌナズナの変異株では、この活性が明瞭に低下しており、またCETを完全に欠く*crr2 pgr5*二重変異体では全く活性が見られない⁵⁾。またこのフェレドキシン依存プラストキノ還元活性は、アンチマイシンAで明瞭に阻害を受ける⁵⁾。したがって、定量性はないものの、CET活性の有無を反映していると考えられる。

我々の研究室で行っているCET測定は、しばしばその速度の遅さで批判を受ける。問題は超弱光下で測定を行っているところにある。そこで、弱光下で、LETの存在下でCET活性を測定する技術を開発した¹⁷⁾。この系では、PSIからの電子受容を制限することで、明瞭にCETがLETと競合することを示すことができた。残念ながら、この方法も定量性はないが、CET活性の有無を照射射下で評価することが可能になった。この方法を用いて、PGR5依存CETがLETと競合可能で、特にPSIからの電子受容体が充分でないときに多くの電子が分配されることが明らかになった¹⁷⁾。

NDH依存CETは、変異株の表現型から考えても、PGR5依存CETよりかなり速度が遅いことが考えられる。しかしながら、我々の破碎葉緑体を用いたCET測定法では、NDH複合体依存CETとPGR5依存CETは同程度に見積もられ⁵⁾、明らかに超弱光下では、PGR5依存CETが十分に機能していない。しかし弱光下での改良法では、NDH依存CETはほとんど検出されず、*in vivo*での速度をより反映していると考えられる¹⁷⁾。二つのCETがいかにかに制御されているか理解が乏しいが、

NDH依存CETを特異的に検出できるのは、光照射後の一過的クロロフィル蛍光の上昇である⁴⁾。この方法も定量性はないが、この蛍光変化を指標にスクリーニングを行うと、NDH複合体に異常を持つ変異株に行き着く¹⁸⁾。NDH複合体異常の明瞭な表現型として遺伝学に利用可能である。

我々の研究室で行われているCET測定の特徴と問題点を整理した。いずれの方法もクロロフィル蛍光測定に依存し、PSII周辺CETの評価のためにPSII活性に依存するクロロフィル蛍光を測定するのは、いかにも間接的である。薬剤のスクリーニングにはこのクロロフィル蛍光を測定する方法で行ったが、この問題を解決するために、我々はpmf形成に依存するECS (electrochromic shift)を測定することを試みた。これまで*pgr5*変異株で明瞭な表現型を得ることに成功しており、今回見つけたAALについてもこの方法で更に評価を進めていく予定である。これらの成果については、別の機会に報告したい。

4. アンチマイシンAに代わる阻害剤の探索

我々は、以下の二つの理由からアンチマイシンA以外にPGR5依存CETを特異的に阻害する化合物の選抜を行った。一つ目の理由は、生理学実験に用いる際に、アンチマイシンAがCET以外に様々な反応を阻害する問題の回避である。これは、CETの阻害に高濃度のアンチマイシンAを必要とすることに起因する。より低濃度で特異的にCETを阻害する薬剤が得られれば、生理学解析に極めて有効である。もう一つの理由は、もしアンチマイシンAと異なる作用機作を持つ薬剤が得られれば、いまだ明らかになっていないフェレドキシン依存プラストキノン還元活性に関わるタンパク質を同定できると考えたからである。

京都大学農学研究科の三芳秀人先生との共同研究で、PGR5依存CETを阻害する化合物のスクリーニングを行った。方法は、前述の破裂葉緑体においてフェレドキシン依存プラストキノン還元をモニターするものである。その結果、アンチマイシンAに比べ10~20分の1の低濃度でCETを阻害する化合物を発見した。この化合物は*pgr5*変異株では阻害効果がなく、NDH依存のCETを欠く*crr2*変異株でCETを完全に阻害したことから、PGR5依存経路を特異的に阻害すると考えられる。現在論文を準備中であり、ここで化合物の構造等詳細を記述することはできないが、アンチマイシンA

と同様の活性を示すことからこの化合物をAAL (Antimycin A-like)と名付け、さらに詳細な解析を行った。細胞への浸透性など、まだ解決しない問題があるものの、今後アンチマイシンAに代わるPGR5依存CETの阻害剤として期待される化合物である。

5. おわりに

生理学実験において特異的な阻害剤の利用は大きな威力を発揮する。しかし、阻害剤利用の宿命として、阻害の特異性が問題となってくる。このような場合、変異株の利用が有力となる。しかしながら、*pgr5*変異株のように、異常を持つ遺伝子の産物の機能が生化学的に明確になっていない場合、結果の判断が難しい場合がある。この研究の場合、アンチマイシンAが、*pgr5*変異株で観察される表現型と半世紀以上に発見されたArnonのCETとを結ぶ橋となった。阻害剤と遺伝学の併用により、生命についての理解は大きく進むことが考えられ、今後、AALがCET研究に貢献することを期待している。

謝辞

AALの探索は、京都大学農学研究科三芳秀人先生、安部真人先生との共同研究です。化合物の分与から、合成のご指導まで、お世話になりました。また、本研究の一部の内容は論文として投稿予定であり、せっかく執筆の機会を与えていただきながら、研究結果の詳細を記載できなかったことをお詫びいたします。

Received November 15, 2011, Accepted November 21, 2011, Published December 31, 2011

参考文献

1. Shikanai, T. (2007) Cyclic electron transport around photosystem I; genetic approaches, *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 199-217.
2. Arnon, D. I., Allen, M. B., and Whatley, F. R. (1954) Photosynthesis by isolated chloroplasts, *Nature* 174, 394-396.
3. Munekage, Y., Hojo, M., Meurer, J., Endo, T., Tasaka, M., and Shikanai, T. (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in Arabidopsis, *Cell* 110, 361-371.
4. Shikanai, T., Endo, T., Hashimoto, T., Yamada, Y., Asada, K., and Yokota, A. (1998) Directed disruption of

- the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9705-9709.
5. Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K., Endo, T., Tasaka, M., and Shikanai, T. (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis, *Nature* 429, 579-582.
 6. DalCorso, G., Pesaresi, P., Masiero, S., Aseeva, E., Schünemann, D., Finazzi, G., Joliot, P., Barbato, R., and Leister, D. (2008) A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*, *Cell* 132, 2, 273-285.
 7. Iwai, M., Takizawa, K., Tokutsu, R., Okamuro, A., Takahashi Y., and Minagawa, J. (2010) Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis, *Nature* 464, 1210-1213.
 8. Finazzi, G., Rappaport, F., Furia, A., Fleischmann, M., Rochaix, J.-D., Zito, F., and Forti, G. (2002) Involvement of state transitions in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*, *EMBO Report* 3, 280-285.
 9. Peng, L., Fukao, Y., Fujiwara, M., Takami, T., and Shikanai, T. (2009) Efficient operation of NAD(P)H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCI in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 21, 3623-3640.
 10. Yamamoto, H., Peng, L., Fukao, Y., and Shikanai, T. (2011) An Src homology 3 domain-like fold protein forms a ferredoxin-binding site for the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 23, 1480-1493.
 11. Tagawa, K., Tsujimoto, H. Y., and Arnon, D. I. (1963) Role of chloroplast ferredoxin in the energy conversion process of photosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 49, 567-572.
 12. Trumpower, B.L. (1990) The proton motive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome *bc₁* complex, *J. Biol. Chem.* 265, 11409-11412.
 13. Bendall, D. S., and Manasse, R. S. (1995) Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochim. Biophys. Acta*, 1229, 23-38.
 14. Miyoshi, H., Kondo, H., Oritani, T., Saitoh, I., and Iwamura, H. (1991) Inhibition of electron transport of rat liver mitochondria by unnatural(-)-antimycin A₃, *FEBS Lett.* 292, 61-63.
 15. Horton, P., Ruban, A. V., and Walters, R.G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 655-684.
 16. Johnson, G. N. (2005) Cyclic electron transport in C₃ plants: fact or artifact?, *J. Exp. Bot.* 56, 407-416.
 17. Okegawa, Y., Kagawa, Y., Kobayashi, Y., and Shikanai, T. (2008) Characterization of factors affecting the activity of photosystem I cyclic electron transport in chloroplasts, *Plant Cell Physiol.* 49, 825-834.
 18. Hashimoto, M., Endo, T., Peltier, G., Tasaka, M., and Shikanai, T. (2003) A nucleus-encoded factor, CRR2, is essential for the expression of chloroplast *ndhB* in *Arabidopsis*, *Plant J.* 36, 541-549.

Inhibitors of Photosystem I Cyclic Electron Transport

Yoshichika Taira*, Toshiharu Shikanai
Graduate School of Science, Kyoto University

光合成生物の緊縮応答

東京工業大学 バイオ研究基盤支援総合センター
増田 真二*

1. はじめに

生物の生存には、不断に変動する栄養状態に適応するための生体システムが必須である。栄養に依存して駆動する細胞内シグナリングにおいて、核酸分子がしばしば重要な働きをする。動物細胞ではAMP/ATP比がシグナルとなり、供給エネルギーに依存した大規模な代謝変動を引き起こされる¹⁾。細菌においては、緊縮応答と呼ばれる特殊な核酸分子による栄養依存のシグナル伝達が古くから知られている²⁾。近年、緊縮応答に関連する酵素が高等植物や藻類から見つかり、この制御機構が生物界に広く保存されていることがわかってきた^{3,4)}。光合成生物にとって「光」は一種の栄養源であり、緊縮応答が光合成の調節に関与していることは想像に難くない。本稿では、光合成生物における緊縮応答の働きについて、最近の筆者らの研究を中心に紹介する。

2. 細菌の緊縮応答

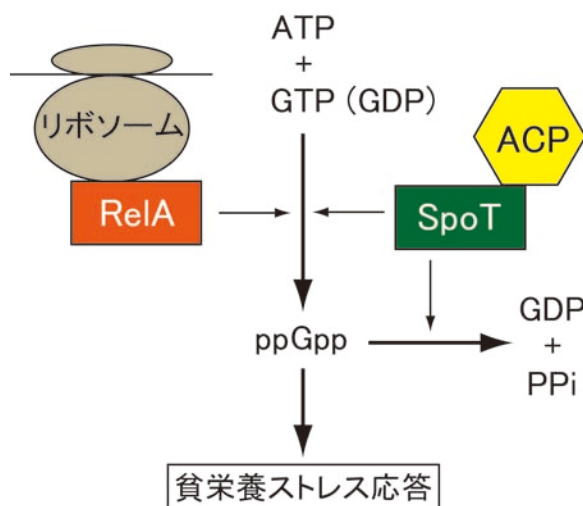


図1 大腸菌におけるppGppの合成と分解
ppGppの合成はRelAとSpoTにより触媒され、ppGppの分解はSpoTで触媒される。ACP: アシルキャリアープロテイン。

細菌がアミノ酸欠乏など栄養状態の悪い環境に遭遇すると、セカンドメッセンジャーとして機能する特殊な核酸分子、グアノシン 4 リン酸 (ppGpp) の細胞内のレベルが上昇する。ppGppはRNA合成酵素や翻訳開始因子に作用し、ゲノム上のほとんど全ての遺伝子の発現を調節する。例えば、ppGppレベルの上昇に伴い、核酸やアミノ酸代謝に関連する遺伝子の発現が上昇し、逆にrRNAの合成は抑えられる。GTPやGDPのアナログであるppGppは、核酸やアミノ酸代謝酵素の活性や、DNA複製を、競合的もしくはアロステリックに制御することも知られている。この機構により、細菌は、貧栄養環境に適応し、栄養状態が改善するまでの時間を耐え忍ぶ。このppGppによる細胞内シグナル伝達システムは、緊縮応答 (stringent response) と呼ばれている²⁾。

大腸菌におけるppGppの合成は、RelA (relaxed) およびSpoT (spotless) と名付けられた2つの酵素により触媒される (図1)。これらの酵素は、ATPの $\beta\gamma$ 位のピロリン酸をGTPもしくはGDPの3'端に転移することでppGppを合成する。図2にRelAとSpoTの一次構造の模式図を示す。それぞれのN末端にppGppの合成に関わる領域が存在する。SpoTのN末端には、ppGppの分解を司るHDドメインも存在する。すなわち、ppGppの合成はRelAとSpoTにより、ppGppの分解はSpoTにより触媒される。

RelAとSpoTの活性は、それぞれ異なった機構により調節を受ける。大腸菌がアミノ酸飢餓条件に陥ると、アミノアシル化されていないtRNAがリボソームに取り込まれアミノ酸重合 (ペプチド結合形成) の空転反応が起こる。するとリボソームに結合しているRelAのppGpp合成が活性化される²⁾。一方、SpoTタンパク質はアシルキャリアープロテイン (ACP) と相互作用している⁵⁾。このことはSpoTの活性が脂肪酸合成

* 連絡先 E-mail: shmasuda@bio.titech.ac.jp

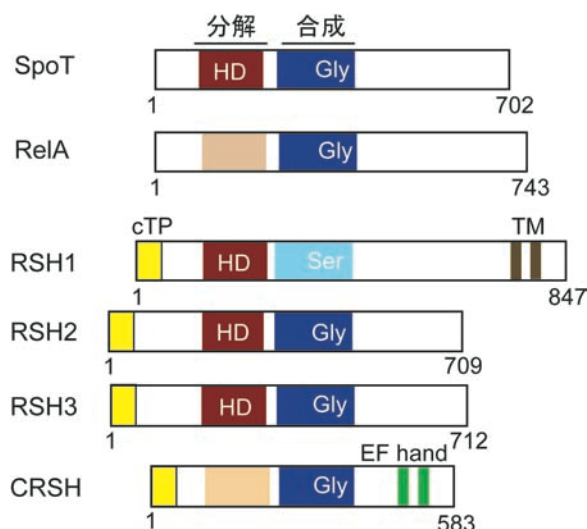


図2 RelA, SpoTとRSHの一次構造の模式図

ppGppの合成と分解を触媒するドメインを異なる色で表した。RSH1にはppGppの合成に必須なGly残基が保存されていない（Serに変わっている）。RelAとCRSHにはppGppの分解を触媒するHDドメインが保存されていない。cTP: 葉緑体移行シグナル、TM: 予測される膜貫通領域、EF hand: Ca²⁺結合ドメイン。

とリンクしていることを示唆しているが、具体的なSpoT活性化のメカニズムは明らかとなっていない。

近年のゲノム解析の進展により、relA遺伝子は、 γ および β プロテオバクテリアに属する細菌に特異的に保存されていることがわかった。またグラム陽性菌の一部からは、ppGpp合成活性領域だけからなる特異な酵素が見つかった³⁾。一方spoT遺伝子は、ほぼ全ての細菌種に保存されていた。このことから多くの細菌種では、SpoTのオーソログがppGppレベルのコントロールに関与すると考えられる⁴⁾。

3. 光合成細菌の緊縮応答

光合成細菌は、Proteobacteria、Cyanobacteria、Chlorobi、Chloroflexi、Firmicutes、Acidobacteriaの6つの門に分類される^{6,7)}。これらの門に属する全ての光合成細菌からppGpp合成酵素（RelAまたはSpoT）が見つかった（未発表）。しかしppGpp合成酵素が詳しく調べられた光合成細菌は、Proteobacteria門のRhodospirillum rubrumとCyanobacteria門のAnabaena sp. PCC7120に限られる。

R. capsulatusをはじめとしたProteobacteria門に属する多くの紅色細菌は、酸素呼吸、嫌気呼吸、光合成など異なったエネルギー代謝経路により生育すること

ができる。これらの代謝経路は、酸素や光といった外界の環境変動に反応して、極めて厳密にコントロールされる⁸⁾。筆者らは、この代謝経路の調節における緊縮応答の役割をR. capsulatusをモデルに調べた⁹⁾。 α プロテオバクテリアに属するR. capsulatusのゲノムにrelA遺伝子はなく、この菌におけるppGpp合成はSpoTタンパク質だけで行われると考えられた。spoT遺伝子欠損体は得ることができず、この遺伝子は生育に必須であることがわかった。しかし核様体構成タンパク質HvrAをコードする遺伝子の欠損により、spoT遺伝子欠損の致死性が相補され、hvrA-spoT二重変異体は得ることができた⁹⁾。HvrAはもともと光合成遺伝子発現の負の転写因子として同定されたが¹⁰⁾、その後、代謝や電子伝達に関わる様々な遺伝子の発現を調節することが明らかにされている¹⁰⁻¹²⁾。一方、hvrAの発現はレドックス応答性の二成分制御系であるRegA/Bによって調節される¹³⁾。このことは、SpoT依存の緊縮応答による遺伝子発現制御が、レドックスや光に反応した核様体変動による遺伝子発現制御とリンクしていることを示唆している（図3）。実際hvrA-spoT二重変異体は、光合成反応中心タンパク質や光捕集色素タンパク質複合体の合成量が大きく低下していた⁹⁾。

Ning (2011)らは糸状性シアノバクテリアAnabaena sp. PCC7120を用いて、ヘテロシスト形成における緊縮応答の役割を調べた¹⁴⁾。ヘテロシスト形成が誘導される窒素欠乏条件下において、ppGpp量とSpoTタンパ

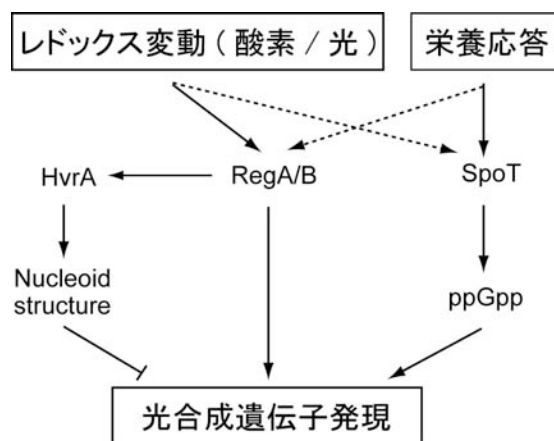


図3 紅色細菌における緊縮応答のモデル

二成分制御系のセンサーキナーゼRegBを介したレドックスシグナルと、SpoTを介した栄養シグナルは、クロストークしながら光合成遺伝子の発現を調節する。実験的に示されたシグナル伝達を実線の矢印で、予想されるシグナル伝達を破線の矢印で示す。Nucleoid: 核様体。

ク質量の上昇は見られず、緊縮応答はヘテロシストの形成には関与しないと報告された。しかし著者らは、ppGppやSpoTの量を、培養した菌全体で調べており、ヘテロシスト特異的にそれらの量が上昇している可能性は否定できない。また、窒素欠乏条件下でのppGpp量の上昇が他のシアノバクテリアを用いた研究で先に報告されている^{15,16}。シアノバクテリアにおける緊縮応答の機能を明らかにするためには、*spoT*遺伝子欠損体を作成し、その表現型を詳細に解析することが今後必要であろう。

4. 植物のppGpp合成酵素

ゲノム解析の進展により、*relA/spoT*に相同性のある遺伝子が高等植物から見つかった¹⁷⁻²³。それらはRSH (RelA/SpoT homologs) と呼ばれている。モデル植物シロイヌナズナのゲノムからは、RSH1、RSH2、RSH3、CRSH (Ca²⁺-activated RSH) と名付けられた4つのRSH遺伝子が見つかっている(図2)。これらがコードする4つのRSHタンパク質のN末端には、葉緑体移行シグナルの存在が予測されていたが、近ごろすべてが葉緑体に局在することが確認された^{20-22,24}。RSHの一次構造の中ほどに、ppGppの合成や分解に関わるSpoTと相同性のある領域が存在する。しかしRelAやSpoTにおいて、ppGppの合成活性に必要な保存されたGly残基がRSH1には保存されていない(Serに変わっている)。またCRSHでは、ppGppの分解を司るHDドメインが保存されていない(図2)。このことからRSH2とRSH3はppGppの合成と分解の両方を触媒するが、RSH1はppGppの分解だけを、CRSHはppGppの合成だけを触媒すると考えられる。生化学的解析により、CRSHのppGpp合成活性はCa²⁺で活性化されることが確認されている(C末端のEF-handにCa²⁺は結合する)^{21,22}。一方RSH2とRSH3の相同性は高く(~90%)、これらはシロイヌナズナにおけるパラログである。すなわちシロイヌナズナのRSHタンパク質は、RSH1、RSH2/3、CRSHの3つのタイプに分類でき、それぞれは機能分化していると考えられる。データベースを検索する

と、この3つのタイプのRSHタンパク質は、コケ植物*Physcomitrella*を含む陸上植物全般に保存されている。一方、緑藻クラミドモナスのゲノムには単一のRSH遺伝子が存在し、その一次構造は、RSH1、RSH2/3、CRSHいずれにも属さない⁴。高等植物のRSHタンパク質は、植物が陸上で生育するようになる際に機能分化したのかもしれない。

シロイヌナズナを用いてRSH遺伝子の詳細な発現パターンを調べたところ、それぞれの発現が異なった位相で日周変動していることがわかった²⁴。具体的には、RSH2/3、RSH1、CRSHの発現が、それぞれ昼、夕方、夜にピークをむかえていた。このことから、昼間の葉緑体内のppGppはRSH2とRSH3により比較的高いレベルに調節され、夕方になるとRSH1によりppGppが分解され、夜間のppGppレベルは低く抑えられると予想された。植物内のppGpp量は暗期に低下することがわかっており²⁵、このことは上記仮説と矛盾しない。また夜間のppGppレベルはCRSHによりCa²⁺依存的に上昇すると考えられた。葉緑体のカルシウム濃度は明暗で変動することがわかっており²⁶、この濃度変化が緊縮応答のスイッチとなる可能性がある(図4)。前述のように、細菌のRelAやSpoTは他の因子と相互作用することでその活性が調節されている(図1)。そのアナロジーから、植物のRSHの活性も、何らかのシグナル因子により翻訳後に調節を受けている可能性が高い。この仮説のもと、現在それらの相互作用因子の同定を進めている。

イネやシロイヌナズナのRSH2遺伝子の発現は、ジャスモン酸やその前駆体であるOPDA(12-oxo-phytodienoic acid)処理で誘導される²⁴。植物内のppGpp量はジャスモン酸処理により増加することがわ

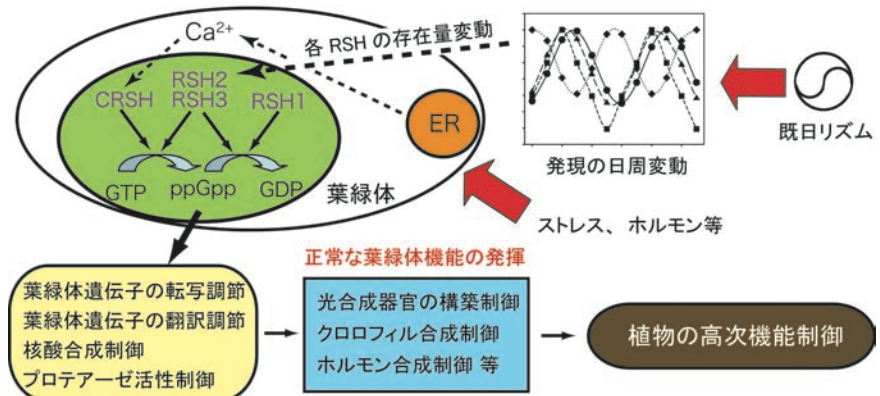


図4 高等植物における緊縮応答のモデル

かっており²⁵⁾、このppGppレベルの上昇はRSH2の発現誘導により引き起こされると考えられる。またシロイヌナズナのRSH2は、ABA処理、傷害、塩ストレス等でもその発現が誘導される^{23,24)}。様々なストレス依存性的なRSH2の発現誘導は、葉緑体の緊縮応答をコントロールする上で重要と考えられるが、その応答の生理的重要性はよくわかっていない。

5. 植物の緊縮応答

シロイヌナズナの4つのRSHタンパク質は全て葉緑体に局在することから、植物のRSHタンパク質は葉緑体の細胞内共生時に植物細胞にもたらされたとする説が有力であった²⁰⁾。しかし最近のRSHタンパク質の系統解析の結果は必ずしもこの説を支持してはならず⁴⁾、植物は水平伝播によってある種の病原性細菌からRSH遺伝子を獲得した可能性が示唆されている¹⁷⁾。いずれにしてもppGppを介した原核生物型の緊縮応答が葉緑体内で行われることは確実である。では葉緑体のどのような機能がppGppにより制御されるのであろうか？

細菌における最も知られたppGppの作用は転写の調節である。これまでにppGppによる2つの異なる転写調節機構が知られている。1つは、ppGppがRNA合成酵素(βまたはβ'サブユニット)に結合することで、その転写効率を直接変化させる機構であり²⁷⁻²⁹⁾、もう1つは、ppGpp合成によりGTPやATPが消費されることでRNA合成の基質が減少し、間接的に転写の抑制が起こるといふものである³⁰⁾。前者の機構は主に大腸菌で、後者の機構は主に*Bacillus*属の細菌で詳しく調べられている。葉緑体ゲノムの転写は、細菌型RNA合成酵素であるPEP (plastid-encoded plastid RNA polymerase) とT7ファージ型RNA合成酵素であるNEP (nuclear-encoded plastid RNA polymerase) といった異なる2種類の酵素により行われる³¹⁾。最近、ppGppがPEPに直接結合することが生化学的に示され³²⁾、ppGppによる葉緑体ゲノムの転写制御は、少なくともPEP依存でおこることが示された。しかし*Bacillus*で見られるような緊縮応答時のppGpp合成による間接的な転写抑制機構の存在もまだ否定されていない。我々が最近作成したシロイヌナズナのRSH3過剰発現体では、PEP依存の転写産物蓄積量だけでなくNEP依存の転写産物蓄積量も減少しており(未発表)、ppGpp合成による間接的な転写制御の存在が示

唆された。単離した葉緑体のmRNA合成活性は、ppGppにより濃度依存的に抑制されることから²⁵⁾、いずれの機構が働くにせよ、ppGppは葉緑体遺伝子の転写を主に負に制御するようである。

細菌における翻訳もppGppによる制御を受ける。細菌における翻訳の開始には、翻訳開始因子IF2によるGTPの脱リン酸化反応が必須である。ppGppは、IF2のGTP結合サイトに競合的に相互作用し、翻訳開始を阻害する³³⁾。葉緑体遺伝子の翻訳機構は細菌由来のシステムを引き継いでおり、葉緑体で機能する翻訳開始因子eIF2も同定されている³⁴⁾。ppGppによる葉緑体遺伝子の発現制御は、転写レベルだけではなく翻訳レベルでも行われている可能性が高い。

その他、細菌におけるプリン塩基の生合成酵素の一部がppGppによりアロステリックな制御を受けることが知られている^{35,36)}。植物細胞におけるプリン塩基の生合成は葉緑体で行われると考えられており³⁷⁾、それらの生合成もppGppにより制御を受けている可能性は高い。プリン塩基(ATPやADP)はサイトカニンの前駆体ともなり³⁸⁾、緊縮応答は間接的にサイトカニン合成を調節することも予想される。またppGppが細胞質に移動し、様々なタンパク質の活性を制御している可能性もある。シロイヌナズナのCRSHノックダウン体は花の形成が異常になり稔性が大きく低下することから²²⁾、葉緑体で行われる緊縮応答が植物の様々な高次機能を制御していることは確実である(図4)。そのメカニズムを今後明らかにする必要がある。近年、緊縮応答とは関係がないと思われたタンパク質の結晶中に、ppGppが結合していた例も報告されている³⁹⁾。従来の遺伝学的解析に加え、案外このような研究から植物型緊縮応答の実体を明らかにする手がかりが得られるかもしれない。

Received October 24, 2011, Accepted November 4, 2011,
Published December 31, 2011

参考文献

- Hoppes, S., Bierhoff, H., Cado, I., Weber, A., Tiebe, M., Grummt, I., and Voit, R. (2009) AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 17781-17786.
- Cashel, M., Gentry, D. R., Hernandez, V. J., and Vinella, D. (1996) The stringent response, in

- Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2nd ed. (Neidhardt, F. C., Curtiss, III R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. and Umberger, H. E., Eds.) pp 1458-1496, AMS Press, Washington D.C.
3. Tozawa, Y., and Nomura, Y. (2011) Signalling by the global regulatory molecule ppGpp in bacteria and chloroplasts of land plants, *Plant Biol.* 13, 699-709.
 4. Masuda, S. (2011) The stringent response in phototrophs, in *Advances in Photosynthesis* (Najafpour, M. M., Ed.) INTECH, in press.
 5. Battesti, A., and Bouveret, E. (2006) Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid, *Mol. Microbiol.* 62, 1048-1063.
 6. Bryant, D.A., and Frigaard, N.U. (2006) Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated, *Trends Microbiol.* 14, 488-496.
 7. Bryant, D.A., Costas, A.M., Maresca, J.A., Chew, A.G., Klatt, C.G., Bateson, M.M., Tallon, L.J., Hostetler, J., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F., and Ward, D.M. (2007) Candidatus *Chloracidobacterium thermophilum*: an aerobic phototrophic *Acidobacterium*, *Science* 317, 523-526.
 8. Bauer, C., Elsen, S., Swem, L. R., Swem, D. L., and Masuda, S. (2003) Redox and light regulation of gene expression in photosynthetic prokaryotes, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 358, 147-154.
 9. Masuda, S., and Bauer, C. E. (2004) Null mutation of HvrA compensates for loss of an essential *relA/spoT*-like gene in *Rhodobacter capsulatus*, *J. Bacteriol.* 186, 235-239.
 10. Buggy, J. J., Sganga, M. W., and Bauer, C. E. (1994) Characterization of a light-responding trans-activator responsible for differentially controlling reaction center and light-harvesting-I gene expression in *Rhodobacter capsulatus*, *J. Bacteriol.* 176, 6936-6943.
 11. Kern, M., Kamp, P. B., Paschen, A., Masepohl, B. and Klipp, W. (1998) Evidence for a regulatory link of nitrogen fixation and photosynthesis in *Rhodobacter capsulatus* via HvrA, *J. Bacteriol.* 180, 1965-1969.
 12. Swem D. L., and Bauer, C. E. (2002) Coordination of ubiquinol oxidase and cytochrome *cbb(3)* oxidase expression by multiple regulators in *Rhodobacter capsulatus*, *J. Bacteriol.* 184, 2815-2820.
 13. Du, S., Kouadio, J. L., and Bauer, C. E. (1999) Regulated expression of a highly conserved regulatory gene cluster is necessary for controlling photosynthesis gene expression in response to anaerobiosis in *Rhodobacter capsulatus*, *J. Bacteriol.* 181, 4334-4341.
 14. Ning, D., Qian, Y., Miao, X., and Wen, C. (2011) Role of the all1549 (*ana-rsh*) gene, a *relA/spoT* homolog, of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120, *Curr. Microbiol.* 62, 1767-1773.
 15. Akinyanju, J., and Smith, R. J. (1979) Accumulation of ppGpp and pppGpp during nitrogen deprivation of the cyanophyte *Anabaena cylindrica*, *FEBS Lett.* 107, 173-176.
 16. Friga, G., Borbely, G., and Farkas, G. L. (1981) Accumulation of guanosine tetraphosphate (ppGpp) under nitrogen starvation in *Anacystis nidulans*, a cyanobacterium, *Arch. Microbiol.* 129, 341-343.
 17. van der Biezen, E. A., Sun, J., Coleman, M. J., Bibb, M. J., and Jones, J. D. (2000) *Arabidopsis* RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 3747-3752.
 18. Kasai, K., Usami, S., Yamada, T., Endo, Y., Ochi, K., and Tozawa, Y. (2002) A RelA-SpoT homolog (Cr-RSH) identified in *Chlamydomonas reinhardtii* generates stringent factor *in vivo* and localizes to chloroplasts *in vitro*, *Nucleic. Acids Res.* 30, 4985-4992.
 19. Yamada, A., Tsutsumi, K., Tanimoto, S., and Ozeki, Y. (2003) Plant RelA/SpoT homolog confers salt tolerance in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Plant Cell Physiol.* 44, 3-9.
 20. Givens, R. M., Lin, M.H., Taylor, D.J., Mechold, U., Berry, J.O., and Hernandez, V.J. (2004) Inducible expression, enzymatic activity, and origin of higher plant homologues of bacterial RelA/SpoT stress proteins in *Nicotiana tabacum*, *J. Biol. Chem.* 279, 495-504.
 21. Tozawa, Y., Nozawa, A., Kanno, T., Narisawa, T., Masuda, S., Kasai, K., and Nanamiya, H. (2007) Calcium-activated (p)ppGpp synthetase in chloroplasts of land plants, *J. Biol. Chem.* 282, 35536-35545.
 22. Masuda, S., Mizusawa, K., Narisawa, T., Tozawa, Y., Ohta, H., and Takamiya, K. (2008) The bacterial stringent response, conserved in chloroplasts, controls plant fertilization, *Plant Cell Physiol.* 49, 135-141.
 23. Kim, T-H., Ok, S. H., Kim, D., Suh, S-C., Byun, M. O., and Shin, J. S. (2009) Molecular characterization of a biotic and abiotic stress resistance-related gene RelA/SpoT homologue (*PepRSH*) from pepper, *Plant Sci.* 176, 635-642.
 24. Mizusawa, K., Masuda, S., and Ohta, H. (2008) Expression profiling of four RelA/SpoT-like proteins, homologues of bacterial stringent factors, in *Arabidopsis*, *Planta* 228, 553-562.
 25. Takahashi, K., Kasai, K., and Ochi, K. (2004) Identification of the bacterial alarmone guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 4320-4324.
 26. Johnson, C. H., Knight, M. R., Kondo, T., Masson, P., Sedbrook, J., Haley, A., and Trewavas, A. (1995) Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants, *Science* 29, 1863-1865.
 27. Chatterji, D., Fujita, N., and Ishihama, A. (1998) The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the beta-subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, *Genes Cells* 3, 279-287.
 28. Touloukhonov, II, Shulgina, I., and Hernandez, V. J. (2001) Binding of the transcription effector ppGpp to

- Escherichia coli* RNA polymerase is allosteric, modular, and occurs near the N terminus of the beta'-subunit, *J. Biol. Chem.* 276, 1220-1225.
29. Artsimovitch, I., Patlan, V., Sekine, S., Vassilyeva, M. N., Hosaka, T., Ochi, K., Yokoyama, S., and Vassilyev, D. G. (2004) Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp, *Cell* 117, 299-310.
 30. Krasny, L., and Gourse, R. L. (2004) An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation, *EMBO J.* 23, 4473-4483.
 31. Shiina, T., Tsunoyama, Y., Nakahira, Y., and Khan, M. S. (2005) Plastid RNA polymerases, promoters, and transcription regulators in higher plants, *Int. Rev. Cytol.* 244, 1-68.
 32. Sato, M., Takahashi, K., Ochiai, Y., Hosaka, T., Ochi, K., and Nabeta, K. (2009) Bacterial alarmone, guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp), predominantly binds the β' subunit of plastid-encoded plastid RNA polymerase in chloroplasts, *ChemBioChem* 10, 1227-1233.
 33. Milon, P., Tischenko, E., Tomsic, J., Caserta, E., Folkers, G., Teana, A. L., Rodnina, M. V., Pon, C. L., Boelens, R., and Gualerzi, C. O. (2006) The nucleotide-binding site of bacterial translation initiation factor 2 (IF2) as a metabolic sensor, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 13962-13967.
 34. Miura, E., Kato, Y., Matsushima, R., Albrecht, V., Laalami, S., and Sakamoto, W. (2007) The balance between protein synthesis and degradation in chloroplasts determines leaf variegation in Arabidopsis yellow variegated mutants, *Plant Cell* 19, 1313-1328.
 35. Gallant, J., Irr, J., and Cashel, M. (1971) The mechanism of amino acid control of guanylate and adenylate biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 246, 5812-5816.
 36. Hou, Z., Cashel, M., Fromm, H. J., and Honzatko, R. B. (1999) Effectors of the stringent response target the active site of *Escherichia coli* adenylosuccinate synthetase, *J. Biol. Chem.* 274, 17505-17510.
 37. Krath, B. N., and Hove-Jensen, B. (1999) Organellar and cytosolic localization of four phosphoribosyl diphosphate synthase isozymes in spinach, *Plant Physiol.* 119, 497-505.
 38. Sakakibara, H. (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 431-449.
 39. Kanjee, U., Gutsche, I., Alexopoulos, E., Zhao, B., Bakkouri, M. E., Thibault, G., Liu, K., Ramachandran, S., Snider, J., Pai, E. F., and Houry, W. A. (2011) Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses: the structure of the inducible lysine decarboxylase, *EMBO J.* 30, 931-944.

The Stringent Response in Photosynthetic Organisms

Shinji Masuda*

Center for Biological Resources and Informatics, Tokyo Institute of Technology

解説特集

「光合成の光エネルギー変換メカニズム —物理学的手法によるアプローチ—」

Editor

野口 巧

(名古屋大学 大学院 理学研究科)

序文

野口 巧

(名古屋大学 大学院 理学研究科)

P. 113

光合成水分解・酸素発生を可能にする光化学系IIの原子構造

沈 建仁

(岡山大学 大学院 自然科学研究科)

P. 114 ~ 121

水分解酸素反応を可能とさせるPhotosystem IIにおける
クロロフィル上の電荷配置

石北 央^{1,2}、斉藤 圭亮¹

(¹京都大学 生命科学系キャリアパス形成ユニット

²JSTさきがけ 「光エネルギーと物質変換」領域)

P. 122 ~ 127

光合成系での光捕集過程を構造に立脚して理解する

柴田 穰

(東北大学 理学研究科 化学専攻)

P. 128 ~ 134

序文[‡]

名古屋大学 大学院 理学研究科

野口 巧^{*}

光合成研究の最大の特徴は、「光合成」を軸として、基礎から応用に渡り極めて広い分野にまたがって研究が行われていることであろう。応用に関しては、従来からの農学的な視点に加え、近年のエネルギー問題、地球温暖化問題を反映して、人工光合成やバイオマスなど、太陽光エネルギー利用や二酸化炭素削減の観点からの研究が目ざされ、重要性を増してきた。しかし、これらの研究は樹木で例えるならば、生い茂る葉や果樹に相当するものであり、その幹には、光合成メカニズムの解明という基礎研究が存在している。光合成のメカニズム研究は、紅色細菌型反応中心、光化学系 I や光化学系 II など、重要な光合成蛋白質の構造が解明されるに従い、植物学や植物生理学から、次第に化学や物理学の領域に広がり、励起エネルギー移動や電子移動を構造情報に基づいて定量的に語る事が可能になってきた。

この特集では、そうした光合成メカニズム研究の中で、「光合成の木」の「根っこ」の部分にあたる、物理学的な手法による研究を取り上げた。先の第二回日本光合成学会（2011年6月3-4日 於：京都大学）でのシンポジウム「光合成の光エネルギー変換と物質変換」でのセッション 1 「光合成の光エネルギー変換メカニズム—物理学的的手法によるアプローチ」における演者の方々に講演の内容を文章にさせていただいた。まずは、沈建仁氏（岡山大）による、光化学系 II 蛋白質複合体の 1.9 Å 分解能での X 線結晶構造解析の話である。これは最近の光合成研究の中で最もホットな話題であり、それまで謎であった酸素発生マンガンクラスターの構造の詳細とその周りの水分子の位置が決定された。この仕事により、酸素発生メカニズムの研究が飛躍的に前進したことはいうまでもない。こうした高分解能の X 線結晶構造は精密なエネルギー計算を可能にする。そこで次に、石北央氏（京都大学）にクロロフィルの電子構造とエナージェティックスに関する計算科学の研究について書いていただいた。如何にしてクロロフィルは水を分解できる程の高い酸化力を獲得したのか。そのメカニズムの詳細が語られる。最後は、柴田穰氏（東北大）による、クロロフィルの励起移動過程の超高速計測と、構造情報を基にした理論解析についての記事である。光合成過程はフェムト秒、ピコ秒オーダーの光吸収、励起移動から始まるが、この超高速の時間域においても光保護の巧妙な調節機構が潜んでいることが示される。これらの記事から、日本から発した物理的手法による光合成研究の進展と展望をお伝えできれば幸いである。

[‡] 解説特集「光合成の光エネルギー変換メカニズム—物理学的的手法によるアプローチ—」

^{*} 連絡先 E-mail: tnoguchi@bio.phys.nagoya-u.ac.jp

解説

光合成水分解・酸素発生を可能にする光化学系IIの原子構造[‡]

岡山大学 大学院 自然科学研究科
沈 建仁*

1. はじめに

酸素発生型光合成において、光化学 II (Photosystem II, PSII) における水分解・酸素発生反応の機構は最大で最後の謎と言っても過言ではない。なぜなら、水は地球上豊富にある極めて安定な物質であるが、PSIIではいとも簡単に分解されており、その仕組みについてはこれまで世界中で数十年間研究されてきたにも拘わらず、未だ明らかとなっていないからである。しかし、PSIIによる水分解反応が生物の進化や地球環境の維持にも極めて重要であることはいうまでもない。水の分解によって生じる電子は、チトクロム b_6/f 複合体、PSIを経由してNADP⁺の還元に使われ、また、プロトンはチラコイド膜のルーメン側に蓄積して、膜を隔てたプロトン濃度勾配の形成に貢献することによってATP合成の駆動力を供給する。何よりも、光合成にとって不要な副産物である酸素は、地球上の好氣的生物の生存を可能にし、オゾン層の形成・維持に不可欠である。今日、藻類や植物による光合成で産出される酸素の量は年間2600億トンと見積もられており、約4600年で大気中の酸素が1回入れ替わることになる。これは言い換えれば、もしPSIIによる水分解反応が止まり、酸素が産出されなければ、大気中の酸素は4600年で好気生物によって使い果たされることになる。人間などは現在の21%の酸素濃度が1/4—1/5低下すると、生活が困難になってくるため、PSIIによる水分解反応が止まれば、人類文明は1000年と維持できなくなるであろう。

PSIIにおける水分解・酸素発生反応の機構を解明するため、これまで多くの生化学、生物物理学、分子生物学的手法を用いた研究が展開され、膨大な知見が蓄積されてきた。この反応の直接の触媒中心は4つのMnと1つのCaからなるMn₄Caクラスターであり、それがKokサイクルと呼ばれる4周期サイクル (図1)

を経て、2分子の水を1分子の酸素、4つのプロトンと4つの電子に分解することが分かっている。Kokサイクル (S状態遷移) における各遷移状態は、S₄を除いてすべて実験的に捕捉できるようになった。そのうち、暗黒で安定に存在するのはS₁状態であり、一定時間 (数分—数十分) 暗順応したチラコイド膜やPSII試料では、S₀:S₁=0.25:0.75の比率で存在するが、さらに長時間 (数時間—1日) 暗順応した試料では、ほぼ100% S₁状態になる。これは、Y_Dと呼ばれる、反応中心タンパク質の一つであるD2サブユニットに結合しているチロシン残基 Tyr160により、S₀状態のMn₄Caクラスターが酸化されるからである¹⁾。

2. PSIIの結晶化

これまでの膨大な研究にも拘わらず、Mn₄Caクラスターの詳細な構造は長い間不明であり、そのため、

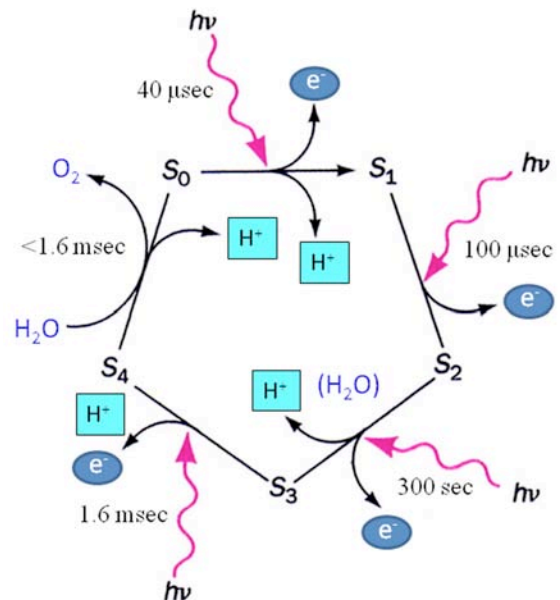


図1 酸素発生反応のKokサイクルモデル。

[‡] 解説特集「光合成の光エネルギー変換メカニズム —物理学的手法によるアプローチ—」

* 連絡先 E-mail: shen@cc.okayama-u.ac.jp

水分解・酸素発生反応の機構は未だ解明されていない。その最大の原因は、PSIIが巨大な膜タンパク質複合体であり、その高分解能結晶化が困難であったことである。PSIIの構成サブユニットは原核生物のシアノバクテリアと真核の藻類、高等植物の間で若干の違いがあるが、その中心部分やMn₄Caクラスターの周辺は高度に保存されている。これまで構造解析が行われたシアノバクテリア由来のPSIIは17種の膜貫通サブユニットと3種の膜表在性（親水性）サブユニットを含み、これ以外に35分子のクロロフィル、カロテノイド、プラストキノン、ヘム、非ヘム鉄、Mn, Ca, Clなど多数の補欠因子を持ち、総分子量が350 kDaに及ぶ複合体であり、さらに二量体として存在している。このような巨大膜タンパク質複合体の構造を解析するには、X線結晶構造解析法より他に方法がないが、そのためには、まず良質な結晶を得ることが必要不可欠である。

PSIIを結晶化するため、筆者は1990年にその精製に着手した。結晶化には、室温で高い安定性を持つPSIIが望ましいが、それまでのPSIIに関する研究は、高等植物を材料として用いたのがほとんどであった。しかし、植物から精製したPSIIコア標品（アンテナタンパク質を除いた、酸素発生能を持つPSIIの最小単位）は不安定で、常温ですぐに失活してしまうという欠点があった。

この主な原因は、酸素発生活性の維持に必要な3つの表在性タンパク質 PsbO, PsbP, PsbQ が PSII への結合が弱く、精製の段階で脱落しやすい (PsbP, PsbQ) ためであった²⁾。常温性のシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803を用いた研究も盛んに行われていたが、このシアノバクテリアからは酸素発生活性を保持したPSIIコア標品の精製すらほとんどできず、PSIIに関する研究は主に遺伝子操作技術で特定のアミノ酸を改変した変異株の細胞、あるいはチラコイド膜を用いたものであった。結晶化に適した、安定なPSIIコア標品を得るには、好熱性シアノバクテリアが有望であると考えられたので、当時入った理化学研究所太陽光エネルギー研究グループの主任研究員井上頼直さんに言われて、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus*を用いてPSIIの精製を始めた。このシアノバクテリア及びそれに近縁の *T. elongatus*からPSIIを精製した報告は以前にあったが、得られたPSIIの活性は高等植物のものとほぼ同じ1000 $\mu\text{moles O}_2/\text{mg Chl}/\text{hr}$ 程度で、表在性タンパク質としてはPsbOのみが結合しており、高等植物のPsbP, PsbQに対応するものがないとされていた³⁾。しかし、精製途中の粗PSII標品は3000 $\mu\text{moles O}_2/\text{mg Chl}/\text{hr}$ を超える活性を示していたので、純化したPSIIコア標品の活性がなぜそれより著しく低かったかという謎があった。

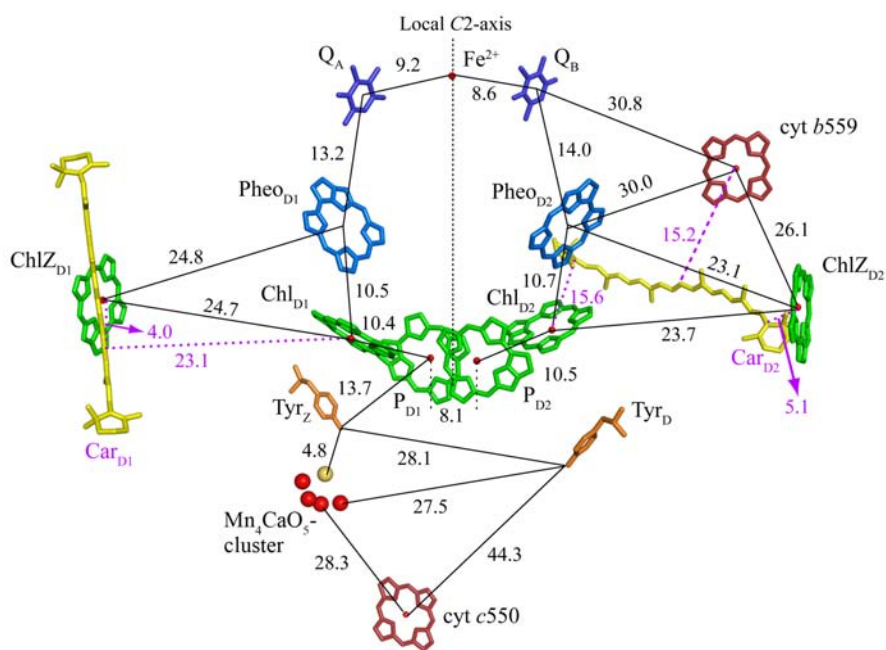


図2 PSIIにおける電子伝達成分の配置。

各補欠因子間の距離は1.9 Å分解能で解析された構造中の分子のセンター—センター間の距離を示している。

さらに、得られたコア標品にはまだ狭雑物と思われるバンドが数個あり、結晶化には適していなかった。筆者はより高純度で安定な標品を得るため、精製方法を改良した⁴⁾。その結果、酸素発生活性が3000 $\mu\text{moles O}_2/\text{mg Chl/hr}$ を超える高純度のPSIIコア標品を得ることに成功した。興味深いことに、得られた標品には新しいタンパク質が2つ含まれ、その後の研究によって、表在性タンパク質のPsbU (12 kDa) とPsbV (チトクロム c_{550})であることが分かった⁵⁻⁷⁾。

*T. vulcanus*から精製したPSII標品を用いて結晶化を始めたが、経験不足もありX線回折能を持つ結晶を得るには至らなかった。1994年の光合成ゴードン会議に結晶らしきかたまりをポスターで発表した時、WittやBarberがそれを見て、その後すぐに*T. elongatus*からPSIIの精製、結晶化に着手した。結局、WittグループのZouniらがPSIIの結晶化に最初に成功し、2001年に3.8 Å分解能の構造をいち早く報告した⁸⁾。筆者らは2003年に*T. vulcanus*からのPSII構造を3.7 Å分解能で報告し⁹⁾、さらにBarberグループは2004年に*T. elongatus*由来PSII構造を3.5 Å分解能で報告した¹⁰⁾。その後Zouniらは結晶の分解能を少しずつ向上させ、2009年に2.9 Å分解能の構造を報告した¹¹⁾。これらの構造解析により、PSIIを構成する20サブユニットすべての配置、35クロロフィル分子や10個程度のカロテノイド、2つのプラストキノン(Q_A, Q_B)、2つのヘム鉄(チトクロム b_{559} , チトクロム c_{550})、非ヘム鉄、20個以上の脂質などの配置が示され、PSII電子伝達鎖の構成成分間の相対位置関係がだいたい明らかとなった(図2)。しかし、これまで最高の2.9 Å分解能では、Mn₄Caクラスターの構造を解明するには不十分であった。4つのMnと1つのCaイオンが存在することは分かっていたが、得られた電子密度図ではこれらの原子を示すものが一つのかたまりとなっており、一つのサッカーボール中に5つの金属イオンを配置しようとするようなもので、それぞれの金属イオンの位置を決定することはできなかった。さらに金属イオン間をつないでいる酸素原子(オキソ酸素)、あるいは基質として存在するであろう水分子に対応する電子密度は全く見えなかった。また、Mn₄Caクラスターのアミノ酸配位子もすべて確定されたとは言えず、各グループ間で異なった配位パターンが報告されていた。

PSII結晶の分解能を向上させるため、筆者の研究室では*T. vulcanus* PSIIを用いて標品の純度や結晶化条件

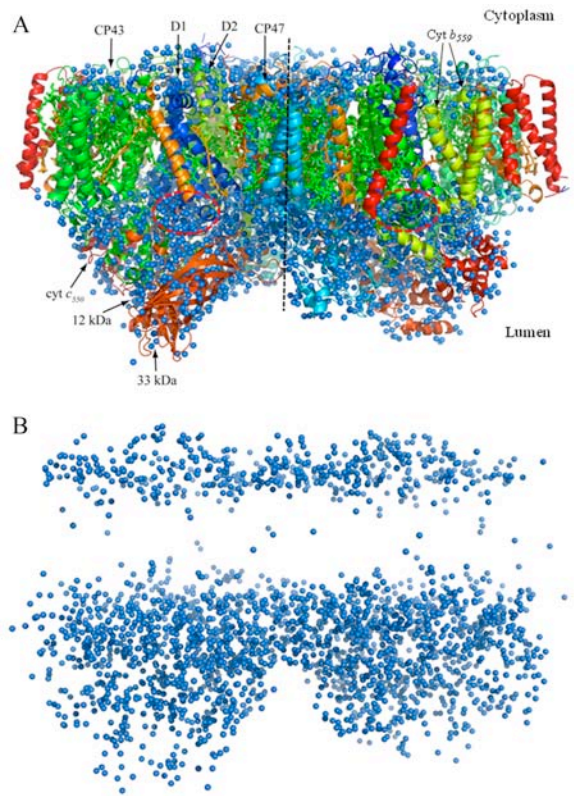


図3 A. チラコイド膜の側面から見た1.9 Å分解能におけるPSII二量体の全体構造。B. タンパク質を除いた水分子の分布。真ん中の線は2回対称軸で、2つの単量体を分けている。赤い丸はMn₄CaO₅クラスターの位置を、青色のボールは水分子を示している。

の改善を続け、2008年までに2.9—3.0 Å分解能の結晶を得ていた。しかし、これより高分解能を与える結晶を得るには標品の純度や結晶化条件の抜本的改善が必要であった。これらの改善を続けた結果、2009年夏の終わりに、当時大学院生であった川上君が実験室のX線装置を用いて2.5—2.6 Å分解能の回折スポットを与える結晶を得ることに成功した。この結晶はこれまで得た結晶と明らかに異なり、構造解析で大きな問題となる回折パターンの異方性や3.0—3.5 Å付近で見られる、不規則的な分子の配列に由来すると思われるdiffuse scatteringが極めて小さかった。この回折パターンを見た時、SPring-8のX線を用いればさらに分解能の高い回折データを取得することができると知っていたので、これまでの最高分解能である2.9—3.0 Åの壁を大きく突破したことを感じた。その後細かい改善を加え、2009年11月の終わりにSPring-8で1.9 Å分解能の回折データを収集し、さらに約1年間大阪市立大学神谷さんの研究室で構造解析を

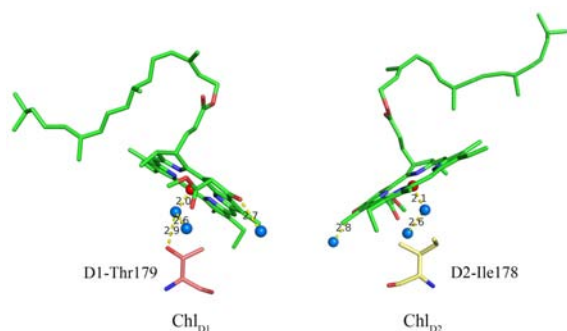


図4 水を配位子とする2つのクロロフィルの例。
反応中心にある「アクセサリー」クロロフィルChl_{D1}, Chl_{D2}を示した。赤のボールはMg, 青のボールは水分子である。

行ってもらい、最終構造を得た。この構造を報告する論文を発表したのが本年なので^{12, 13)}、結晶化を目指して好熱性シアノバクテリアからPSIIの精製に着手してから21年目ということになる。

3. PSIIの全体構造

1.9 Å分解能で解析されたPSII構造の最大の特徴の一つは、多くの水分子が見つかったことである(図3)。最終的に決定された構造では、PSII二量体あたりに2795個の水分子が同定できた。同じ結晶を用いて、1.75 ÅのX線波長で収集したデータを用いて解析された2.5 Å分解能の構造では、二量体あたり862分子の水しか見つからなかったことから¹²⁾、水分子の同定に高い分解能がいかに重要かが分かる。

PSIIに結合している水のほとんどは、チラコイド膜のストロマ表面とルーメン表面という2つの層に分布しており、膜貫通領域にはわずかな水しか結合していない(図3B)。これは膜タンパク質の一般的な特徴ともいえるが、PSIIではルーメン側により大きな親水性領域があり、より多くの水分子が分布している。これらの水分子は、膜表面から突き出ているD1, D2, CP47, CP43の親水性ループや3つの表在性タンパク質の中に多く存在し、ルーメン側に大きな親水性領域が存在することと対応している。後で述べるが、これらの水分子のうち、Mn₄Caクラスターの配位子や水素結合ネットワークの形成に参加しているものもあり、PSIIにとって重要な機能の一部を担っている。

膜貫通領域は疎水性であり、水はほとんど存在しないとされていたが、PSIIの膜貫通領域にはいくつかの水分子が存在し、それらのほとんどはクロロフィルの配位子、あるいはその水素結合相手として働いてい

る。クロロフィルのポルフィリン環の中央にあるMgは通常、Hisなどのアミノ酸によって配位されるが、PSIIにある35分子のクロロフィルのうち、7つは直接の配位アミノ酸を持っておらず、代わりに水がMgに配位している(図4)。これらのクロロフィルには、直接の水配位子以外に、さらに2つの水が近傍にあり、水素結合を形成している。つまり、アミノ酸配位子を持っていないクロロフィル1個あたりに、3つの水分子が存在することになり、これらは膜貫通領域で見つかった水のほとんどを占めている。

4. Mn₄CaO₅クラスターの構造

Mn₄Caクラスターは、これまで詳細な構造が不明であったため、Mn₄CaO_xクラスターとも書かれていた。1.9 Å分解能では、Mn, Caイオンの電子密度がはっきり分かれており、それぞれの金属イオンの位置、及び

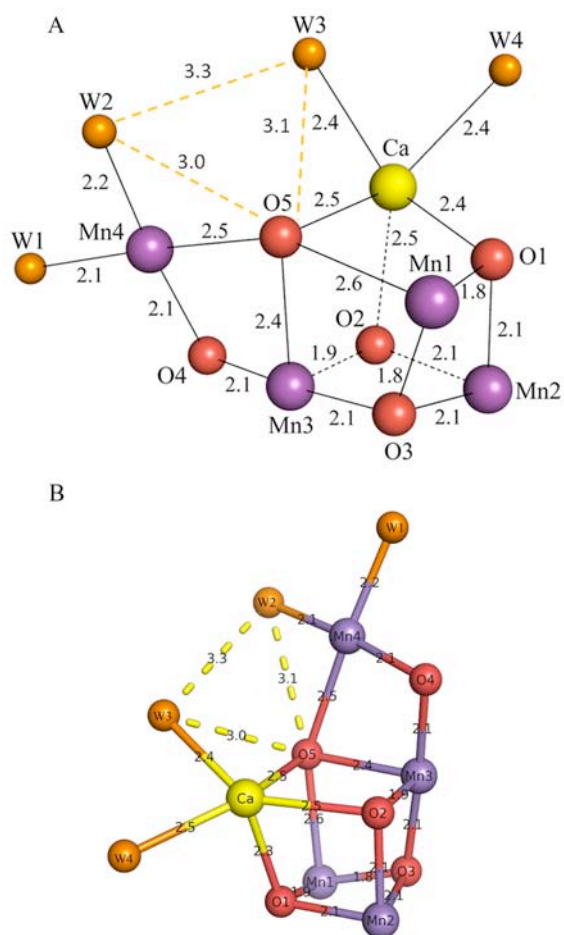


図5 A. Mn₄CaO₅クラスターの構造と各原子間の距離(Å)。W1-W4は水分子。B. ゆがんだ椅子型の形がよりはっきり見えるようにAの構造を回転したもの。

それらの間の距離をはっきりと決定することができた^{12,13}。さらに金属イオン間をつないでいるオキソ酸素に対応する電子密度もはっきり確認することができ、4つのMn、1つのCaをつないでいるのが5つの酸素原子で、全体が Mn_4CaO_5 という化学式であることが初めて分かった(図5)。

解析された Mn_4CaO_5 クラスター構造の最大の特徴は、ゆがんだ椅子型であるということが言える。このうち、3つのMn、1つのCa、4つのオキソ酸素が歪んだキューバン型のイスの座部を作り、4つ目のMnはキューバンの外側にあり、オキソ酸素を通してキューバンとつながっている。

このようなゆがんだ形を作り出している要因は2つあり、1つはMn—O間とCa—O間の結合距離の違い、もうひとつは5つのオキソ酸素の間で、金属イオンとの結合距離に違いがあることである。Mn—Oの典型的な結合距離は1.8—2.1 Åであるが、それに対して、Ca—O間の結合距離は2.3—2.5 Åと明らかに長い。キューバンの中で、金属イオンは3つのMnと1つのCaであるため、オキソ酸素との結合距離に違いが生じていた。また、5つのオキソ酸素のうち、O1—O4に比べて、O5とMn、あるいはO5とCaとの結合距離が明らかに長くなっていった。例えば、O5—Mn3の距離は2.4 Åで、O5—Mn1、O5—Mn4の距離はそれぞれ2.6 Å、2.5 Åであった。これらの距離は、無機Mn化合物と比較すると考えられないほど長く、結合していないことすら示唆している。さらにO5—Caの距離も2.7 Åで他のO—Ca間距離より長い。このことは、5つのオキソ酸素のうち、特にO5は周りの金属イオンとの結合が弱くて切れやすい、言い換えれば、O5が高い反応性を有していることを示唆している。

Mn_4CaO_5 クラスターの構造が非対称で「ゆがんでいる」ことは、水分解反応の触媒機構を考える上で重要な意味を持っているかもしれない。水分解の触媒として働くためには、それ自身が反応の過程で構造変化を行い、基質である水の分解に伴い構造が元に戻るという構造上の「柔軟性」を備え持つ必要がある。実際、水分解のS-stateサイクルでは、 Mn_4CaO_5 クラスターの構造が変化することが分光学的手法で検出されている。 Mn_4CaO_5 クラスターがもし対称的で規則正しい構造を形成していれば、反応に伴う構造の変化が容易ではなく、触媒活性が発揮できないかもしれない。これは、水分解の人工触媒を合成する上で

も重要な意味を持っており、触媒活性を持つ人工触媒を得るには、非均一触媒 (heterogeneous catalysisあるいはasymmetric catalysis) の原理を応用した非対称構造を持つ化合物を見つけることが重要かもしれない。

Mn_4CaO_5 クラスターには、4つの水分子が配位しており、そのうち、2つはキューバンの外側にあるMn4に(W1, W2)、残りの2つはCaに結合している。このことは、これら水分子のうちの1つまたは2つは水分解の基質として働いていることを示唆している。上に述べたように、O5が反応部位の一部を形成している可能性が高いことを考えると、O—O結合が形成されるのは、O5付近である可能性が高い。4つの配位水のうち、Mn4に結合しているW2とCaに結合しているW3は

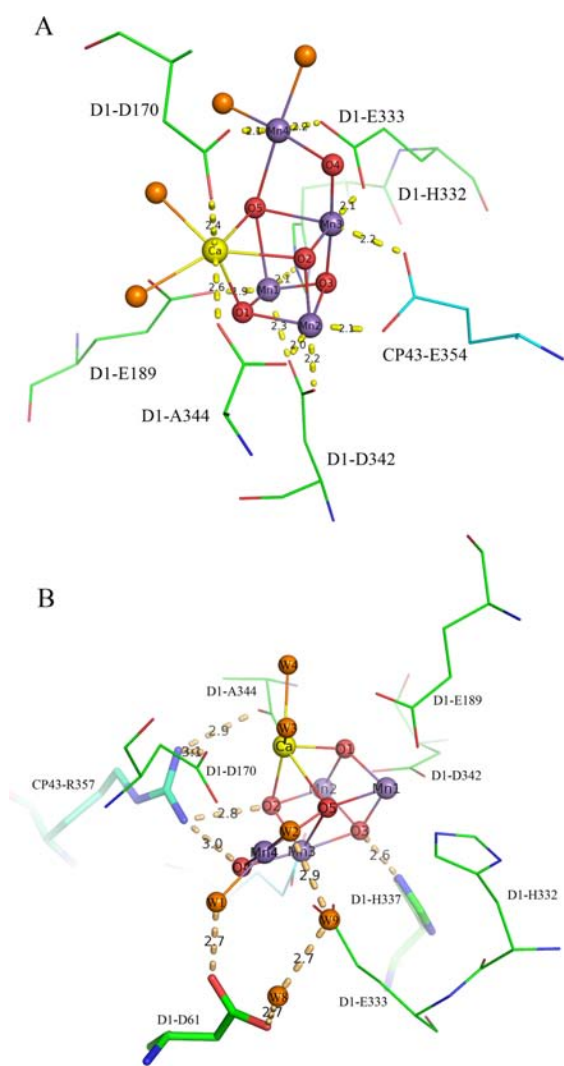


図6 A. Mn_4CaO_5 クラスターの配位構造。B. 直接の配位子以外に、 Mn_4CaO_5 クラスターに水素結合を形成する3つの残基 (CP43-R357, D1-D61, D1-H337) の構造。

O5と最も近く、それぞれO5と水素結合距離内にある。従って、O5, W2, W3のうちのどれか2つの分子種が水分解の基質として働き、O—O結合を作っていることが示唆された。

オキソ酸素と水以外に、7つのアミノ酸が Mn_4CaO_5 クラスターの配位子として働いていることが分かった(図6A)。そのうち、6つがカルボキシル基で、1つのみがHis残基であった。カルボキシル基のうち、1つのみがCP43由来のGlu354で、他はすべてD1サブユニットのものであった(D1-Asp170, Glu189, Glu333, Asp342, 及びC末端であるAla344)。そしてHis残基もD1由来のHis332であった。His残基はMnと1本の結合を作っているが、カルボキシル基のうち、D1-Asp189以外はすべてそれぞれ2つの金属イオンにブリッジする形で2本の結合(bi-dentate結合)を作っている。その結果、すべてのMnには6つの配位子、そしてCaには7つの配位子が存在していることになる。

高分解能で同定された配位子のうち、これまで報告された配位子構造と明らかに異なる点が2つある。一つはD1-Asp170で、以前の構造ではMn4にのみ結合しており、Caには配位していなかったが、新しい構造ではMn4とCaの両方に配位していた。もうひとつはD1-Glu189に関するもので、従来Mn1とCaの両方に配位していたのに対して、新しい構造ではMn1のみに配位していた。新しい構造では、4つのMnと1つのCaの配位子が飽和していたので、これ以外の配位パターンは考えられない。

以上に述べた直接の配位子以外に、 Mn_4CaO_5 クラスターのオキソ酸素に直接、あるいは間接的に水素結合しているアミノ酸残基が3つある。このうち、CP43-Arg357はオキソ酸素のO2とO4に、D1-His337はO3に直接水素結合し、D1-Asp61は水分子を通してO4に水素結合でつながっている(図6B)。これらの水素結合は、オキソ酸素をクラスターの外側に向かって引きだし、金属イオンであるMnやCaとの結合が強くなりすぎないようにする役割を持っているかもしれない。このような水素結合が存在しない場合、Mn—O、及びCa—Oの結合が強くなり、典型的な無機化合物で見られるような結合距離となり、構造が「硬く」安定的なものになるかも知れない。このような「硬い」構造は触媒に求められる構造変化能を持つことが難しく、従って触媒活性が失われることが予想される。実際に、CP47-Arg357, D1-Asp61, D1-

His337のうち、どれか一つを改変した変異株ではPSIIの活性が大きく損なわれる、あるいは失われることが知られている。

5. 水素結合ネットワーク

水分解反応において、2分子の水が分解される時、4つのプロトンが放出されることになる。 Mn_4CaO_5 クラスターはチラコイド膜の表面に存在し、大きな親水性タンパク質領域に覆われているので、放出されたプロトンが反応部位に留まると、局所的なpHが急激に低下し、活性部位を破壊してしまう可能性が高い。このため、プロトンは素早く複合体表面、ルーメン側のバルク溶液に排出される必要がある。これまでの構造では水分子が見えなかったため、水とアミノ酸残基から構成される水素結合ネットワークが特定できず、

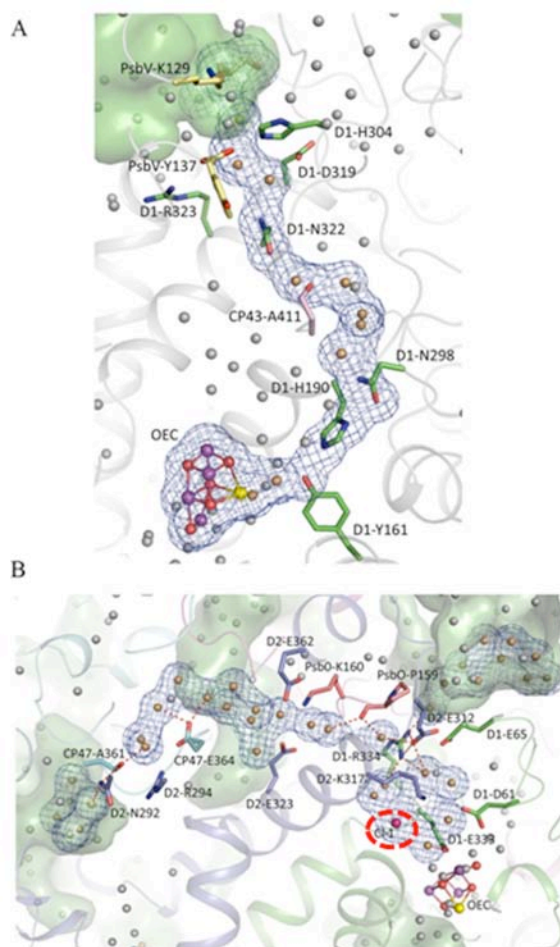


図7 A. Mn_4CaO_5 クラスターからYzを経由した水素結合ネットワーク。B. Mn_4CaO_5 クラスターからD1-D61, Cl-1を経由した水素結合ネットワーク。

両方の図において薄緑色で表した部分は、ルーメン側表面の溶液領域を表している。

プロトンの排出はタンパク質の中を通る間隙であるチャンネルの形で議論されていた¹⁴⁻¹⁶。しかし、プロトンは水素結合ネットワーク上を脱プロトン化とプロトン化のリレーの形で初めて効率的に輸送されるので、水分解の活性部位であるMn₄CaO₅クラスターから複合体のルーメン側表面までをつなぐ水素結合ネットワークの存在が必要であった。このような水素結合ネットワークは、1.9 Å 分解能の構造で初めて同定可能となった。その結果、複数個の水素結合ネットワークが見つかり、そのうちの典型的なものを2つ下に紹介する。

水素結合ネットワークの1つはY_Zと呼ばれる、D1-Tyr161残基を経由したものである。Y_ZはPSIIの反応中心であるP680に電子を渡し、その代わりにMn₄CaO₅クラスターから電子を奪い取る役割を持っている重要な電子伝達体であるが、水分解に伴うプロトンの排出にも関わっていることが以前から示唆されていた^{17, 18}。高分解能構造において、Y_ZはCaに結合している水W4と直接、またはW3、さらにMn4に結合しているW1, W2とは別の水を経由して間接的に水素結合でつながっている(図7A)。一方、Mn₄CaO₅クラスターの反対側でY_ZはD1-His190と水素結合し、D1-His190はさらにD1-Asn298や他のいくつかの荷電/親水性アミノ酸、及び水分子と水素結合ネットワークを形成し、このネットワークは最終的にPsbVのC-末端に近いPsbV-Lys129残基を経てルーメン側の溶液に出ている。従って、プロトンはこのネットワークを経由してMn₄CaO₅クラスターからルーメン側溶液に排出される可能性がある。このネットワークは、Y_Zの電子伝達活性と連動していることから、PCET (proton-coupled electron transfer) パスとも呼ばれている。しかし、最近の研究でこのパスがプロトンの排出に働いていないことも報告されており、この経路が実際に機能しているかどうかはさらなる研究を待たなければならない。

高分解能構造で見つかった典型的な水素結合ネットワークの2つ目の例は、Mn4に結合している水分子の一つであるW2を起点として、D1-Asp61, Cl-1、及びいくつかの荷電/親水性アミノ酸、水分子によって構成され、最終的にルーメン側溶液に出ている(図7B)。このうち、Cl-1はMn₄CaO₅クラスターの近傍に見つかった2つの塩素結合部位のうちの一つで^{19, 20}、これを通したプロトンチャンネルは以前の構造で示

唆されていたが、水素結合ネットワークが形成されていることは高分解能構造で初めて明らかになった。Cl-1はMn₄CaO₅クラスターからの水素結合ネットワークの起点に近い位置にあり、プロトンチャンネルの構造維持に役立っているかも知れない。

6. 今後の展望

PSIIと同程度の巨大膜タンパク質複合体の中で、1.9 Å分解能はこれまで解析された構造の中で最高のものである。これによってMn₄CaO₅クラスターの詳細な構造、水分子の存在位置、水素結合ネットワークなど多くの新しい知見が得られ、水分解・酸素発生の反応部位についても重要な情報が得られた。しかし、解析された構造は主に暗黒で安定なS₁状態のものであり、この構造のみから水分解の反応機構を決定することは困難である。O—O結合の形成についても、少なくとも3つの可能性、すなわち、O5—W2, O5—W3, W2—W3が残されている。今後はS状態遷移に伴う中間状態、少なくともS₂, S₃状態の構造を解明する必要がある。また、プロトンチャンネル、水チャンネルを明確に同定するには、各水素結合ネットワークを構成しているアミノ酸残基を改変し、得られた変異株の構造・機能解析を行う必要がある。さらに酸素チャンネルの同定も必要であるが、これは疎水性チャンネルの可能性が高く、酸素に近い性質を持つ不活性化ガスを導入した結晶構造解析を行う必要がある。そしてPSIIの多くの構成サブユニット、特に 10 kDa以下の低分子量サブユニットの機能を解明するため、それぞれの欠失変異体の構造・機能解析を行い、サブユニットの欠失により引き起こされる構造変化を明らかにする必要がある。このようなPSIIの構造・機能解析には、X線結晶構造解析だけでなく、微小な変化を検出できる振動分光法^{21, 22}を中心とした物理的測定法や理論計算を活用することが重要である。

なお、本稿で述べた筆者らの研究は、神谷信夫、梅名泰史、川上恵典諸博士との共同研究であることを附記しておく。

Received November 8, 2011, Accepted November 9, 2011, Published December 31, 2011

参考文献

1. Styring, S., and Rutherford, A. W. (1987) In the oxygen-evolving complex of photosystem II the S_0 state is oxidized to the S_1 state by D^+ (Signal II_{slow})⁺, *Biochemistry* 26, 2401-2405.
2. Ikeuchi, M., and Inoue, Y. (1986) Characterization of O_2 evolution by a wheat photosystem II reaction center complex isolated by a simplified method: disjunction of secondary acceptor quinone and enhanced Ca^{2+} demand, *Arch. Biochem. Biophys.* 247, 97-107.
3. Koike, H., Mamada, K., Ikeuchi, M., Inoue, Y. (1989) Low-molecular-mass proteins in cyanobacterial photosystem II: identification of psbH and psbK gene products by N-terminal sequencing, *FEBS Lett.* 244, 391-396.
4. Shen, J.-R., Ikeuchi, M., and Inoue, Y. (1992) Stoichiometric association of extrinsic cytochrome *c*-550 and 12 kDa protein with a highly purified oxygen-evolving photosystem II core complex from *Synechococcus vulcanus*, *FEBS Lett.* 301, 145-149.
5. Shen, J.-R., and Inoue, Y. (1993) Binding and functional properties of two new extrinsic components, cytochrome *c*-550 and a 12 kDa protein, in cyanobacterial photosystem II, *Biochemistry* 32, 1825-1832.
6. Shen, J.-R., Vermaas, W., and Inoue, Y. (1995) The role of cytochrome *c*-550 as studied through reverse genetics and mutant characterization in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *J. Biol. Chem.* 270, 6901-6907.
7. Shen, J.-R., Ikeuchi, M., and Inoue, Y. (1997) Analysis of the *psbU* gene encoding the 12 kDa extrinsic protein of photosystem II and studies on its role by deletion mutagenesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *J. Biol. Chem.* 272, 17821-17826.
8. Zouni, A., Witt, H. T., Kern, J., Fromme, P., Krauß, N., Saenger, W., and Orth, P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution, *Nature* 409, 739-743.
9. Kamiya, N., and Shen, J.-R. (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 98-103.
10. Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., and Iwata, S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Science* 303, 1831-1838.
11. Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A., and Saenger, W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9 Å resolution and role of quinones, lipids, channels and chloride, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 334-342.
12. Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.-R., and Kamiya, N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å, *Nature* 473, 55-60.
13. Kawakami, K., Umena, Y., Kamiya, N., and Shen, J.-R. (2011) Structure of the catalytic, inorganic core of oxygen-evolving photosystem II at 1.9 Å resolution, *J. Photochem. Photobiol. B* 104, 9-18.
14. Murray, J. W., and Barber, J. (2007) Structural characteristics of channels and pathways in photosystem II including the identification of an oxygen channel, *J. Struct. Biol.* 159, 228-237.
15. Ho, F. M., and Styring, S. (2008) Access channels and methanol binding site to the $CaMn_4$ cluster in Photosystem II based on solvent accessibility simulations, with implications for substrate water access, *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 140-153.
16. Gabdulkhakov, A., Guskov, A., Broser, M., Kern, J., Müh, F., Saenger, W., and Zouni, A. (2009) Probing the accessibility of the Mn_4Ca cluster in photosystem II: Channels calculation, noble gas derivatization, and cocrystallization with DMSO, *Structure* 17, 1223-1234.
17. Hoganson, C.W., and Babcock, G.T. (1997) A metalloradical mechanism for the generation of oxygen from water in photosynthesis, *Science* 277, 1953-1956.
18. Tommos, C., and Babcock, G.T. (2000) Proton and hydrogen currents in photosynthetic water oxidation, *Biochim. Biophys. Acta* 1458, 199-219.
19. Murray, J.W., Maghlaoui, K., Kargul, J., Ishida, N., Lai, T.-L., Rutherford, A. W., Sugiura, M., Boussac, A., and Barber, J. (2008) X-ray crystallography identifies two chloride binding sites in the oxygen evolving centre of Photosystem II, *Energy Environ. Sci.* 1, 161-166.
20. Kawakami, K., Umena, Y., Kamiya, N., and Shen, J.-R. (2009) Location of chloride and its possible functions in oxygen-evolving Photosystem II revealed by X-ray crystallography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 8567-8572.
21. Noguchi, T. (2008) FTIR detection of water reactions in the oxygen-evolving centre of photosystem II, *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.* 363, 1189-1194.
22. Noguchi, T. (2008) Fourier transform infrared analysis of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Coord. Chem. Rev.* 252, 336-346.

Atomic Structure of Photosystem II That Enables Photosynthetic Water-Splitting

Jian-Ren Shen*

Graduate School of Natural Science and Technology, Faculty of Science, Okayama University, Japan

解説

水分解酸素反応を可能とさせるPhotosystem IIにおける クロロフィル上の電荷配置[‡]

¹京都大学 生命科学系キャリアパス形成ユニット
²JST さきがけ 「光エネルギーと物質変換」 領域
石北 央^{1,2,*}、齊藤 圭亮¹

1. はじめに

光合成反応では、太陽光の光エネルギーを生物が利用しやすい電気化学エネルギーに変換する。この過程は、生体膜中の光合成反応中心蛋白質で行われる。シアノバクテリアから高等植物では、Photosystem II (PSII) とPhotosystem I (PSI) の二つの反応中心蛋白質が共役して行う(図1)。PSIIの反応中心ではクロロフィル (Chl) 二量体が一对(PSIIではP680)、その近傍に単量体のChl (アクセサリ-Chl) 1対、フェオフィチン (Pheo)1対、キノン (Q) 1対、そして非ヘム鉄が存在する。これらは、Chl二量体の中点と非ヘム鉄を結ぶ疑似 C₂ 対称軸に配置されているため、二つの電子

移動経路が存在するように見える。しかし、実際の電子移動は、一方の電子移動経路 (PSII : D1)でのみ観測され、もう一方の電子移動経路 (PSII : D2) は不活性である。PSIでも同様なコファクター配置が見受けられる (例えばP700と呼ばれるChl二量体を持つ) が、Pheoの代わりにChl、非ヘム鉄の代わりに3つの鉄・硫黄クラスターが存在する。さらに、疑似 C₂ 対称軸に対して存在する二つの電子移動経路共に電子移動活性がある¹⁾。なお、PSIIのP680はP_{D1}とP_{D2}、PSIのP700はP_AとP_B、と呼ばれるChl単量体のペアである。

(D1 / D2、A / B、は、各々のChl単量体が存在する蛋白質サブユニット名である。)

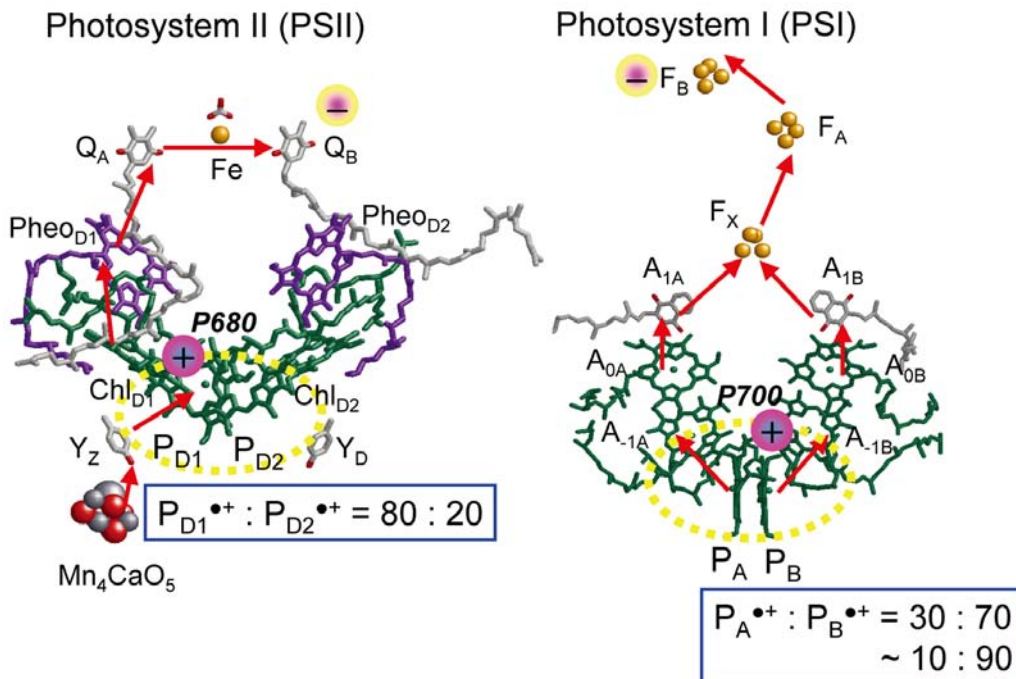


図1 PSI (右)、PSII (左) の光合成反応中心における酸化還元活性コファクターの配置および電子移動経路 (赤矢印)。

[‡] 解説特集 「光合成の光エネルギー変換メカニズム —物理学的手法によるアプローチ—」

* 連絡先 E-mail: hiro@cp.kyoto-u.ac.jp

私たちは、蛋白質立体構造を理論化学的手法で解析することにより、「蛋白質の構造と機能の関係」を明らかにすべく研究を行っている。ここでは、最新のPSII高分解能 (1.9 Å) 結晶構造²⁾をもとにPSIIを解析することで明らかになった、「PSII蛋白質環境がP_{D1} / P_{D2} クロロフィルのエンジェティクスに与える影響」について述べる。

2. PSIIおよびPSI反応中心における実験的手法によるクロロフィルの正電荷分布測定

PSIIにおける水分解反応は、反応中心に存在するクロロフィルP680における光励起・電荷分離反応によって開始される。電荷分離反応では電子がPheoからQへと流れていくのに対し、正電荷はクロロフィル上、特にP_{D1}/P_{D2}のクロロフィル2量体上に分布する。ENDOR測定によるとspinach PSIIでは (P_{D1}, P_{D2}を区別はしていないが) P_{D1}もしくはP_{D2}のいずれかに82%のスピンの局在化する³⁾。後の *Synechocystis* 6803 PSII coreにおける吸収スペクトルによる解析では、大部分の正電荷はP_{D1}側に存在することが示唆された⁴⁾。以上の二つの解析結果を勘案すれば、P_{D1}, P_{D2}における電荷 (スピン) 分布は、P_{D1}⁺/P_{D2}⁺ = ~80 / 20のように帰属できるだろう⁴⁾ (注; ここではスピンと電荷の分布は、ほぼ同義であると見なして良い)。FTIRによる *Thermosynechococcus elongatus* の PSII core における解析でも同様にP_{D1}もしくはP_{D2}のいずれかに70-80%の正電荷がある、との結論が得られている⁵⁾ (P680⁺/P680のFTIRスペクトルに関しては文献⁶⁾も参照)。

これに対し、PSIにおけるP700光励起後のスピン分布比は、P_A/P_B = 15 / 85 ~ 25 / 75 (3, 7, 8) となっている。FTIRでは、電荷分布比P_A⁺/P_B⁺ = 33 / 67 ~ 50 / 50 と決定されている⁹⁾。

3. PSII反応中心クロロフィル上の正電荷分布の解析

PSIIとPSIの電子移動の様子は大きく異なるため (図1)、電子移動のエンジェティクスの違いを議論するためにも、正電荷のP_{D1} / P_{D2}, P_A / P_B上での分布のエンジェティクスは明らかにすべきである。しかし、正電荷やスピンの分布比測定値そのものは以前から知られているものの、そのような分布比である理由や、蛋白質内の特定のアミノ酸残基やコファクターからの寄与を明示した論文は皆無であった。

私たちは最新の *Thermosynechococcus vulcanus* (*T. vulcanus*) 由来のPSII高分解能 (1.9 Å) 結晶構造²⁾の原子配置において、quantum mechanical / molecular mechanical (QM / MM) approachを用い、結晶構造中の全てのアミノ酸残基、コファクター存在下で、P_{D1} / P_{D2}クロロフィル2量体上における正電荷およびスピン分布を計算した。その結果として、PSII全原子存在下において、電荷分布比P_{D1}⁺ / P_{D2}⁺ = 77 / 23、スピン分布比P_{D1} / P_{D2} = 81 / 19を得た¹⁰⁾。これらの値は、実験的手法による測定値^{3, 4)}と良い一致を見せた。*T. vulcanus* PSII のD1 / D2サブユニットのアミノ酸配列は *T. elongatus* のそれと極めて近い。したがって、*T. elongatus* PSII core における FTIR 解析で見られた70-80%の正電荷^{5, 6)}の正体は、今回の計算結果から、「P_{D1}⁺である」と結論づけるのが妥当である。過去の文献⁵⁾に指摘されているように、ここでも電荷分布はスピン分布に比べて (わずかではあるが) 両クロロフィル分子間全体により非局在化している様子が見て取れる。なお、私たちの計算では、P_{D1} / P_{D2}クロロフィルを量子化学的に取り扱っている。従って、PSII内の全アミノ酸残基やクロロフィル等のコファクターのみならず、P_{D1}, P_{D2}の構造の影響 (P_{D1} / P_{D2}両クロロフィル分子間のビニル基、エチル基、フィトル鎖の配向の違いによる影響²⁾) も当然、電荷分布への寄与として計算に取り込まれている (詳細は文献¹⁰⁾参照)。

PSII蛋白質環境を全て取り払い、P_{D1} / P_{D2} だけが存在する状態でQM / MM計算を行うと、電荷分布比P_{D1}⁺ / P_{D2}⁺ = 57 / 43となり、P_{D1}⁺の割合が大幅に減少した¹⁰⁾。つまり、PSII蛋白質環境からの相互作用がない場では正電荷は両クロロフィルにかなり均等に分布する。従って、(P_{D1}⁺ / P_{D2}⁺ = 77 / 23のように) 非対称的に分布させる原因は、PSII蛋白質環境にあることが実証された。具体的にPSII蛋白質のどの要素・部位が P_{D1} / P_{D2} に影響を与えるかを調べるため、私たちは、D1 / D2 サブユニットとそこに埋め込まれたコファクターを残し、それ以外の原子をPSII蛋白質結晶構造から全て除去することで「D1/D2 PSII」を作った。得られたD1/D2 PSIIに対してQM / MM計算を行った。D1/D2 PSIIでは、P_{D1}⁺ / P_{D2}⁺ = 72 / 28、スピン分布比P_{D1} / P_{D2} = 76 / 24との結果を得た¹⁰⁾。依然として電荷、スピン共に圧倒的にP_{D1}側に局在化しているため、電荷・スピンの非対称分布の根源は D1 / D2 蛋白質にあることは確定的である。

なお、D1 / D2 PSII を作成するには、近接するサブユニットCP43やCP47も除去する必要がある。しかし、CP43はMn₄CaO₅のO原子と近接するCP43-Arg357やMn原子のリガンドとなるCP43-Glu354をもつため、現実の系でCP43を取り除けば少なくともMn₄CaO₅周辺の構造はintactなPSIIに比べて大きく変化するのは間違いない。同時に、電荷のバランスも崩れたりバルク溶液への露出度も変化するのでMn₄CaO₅周辺の解離性アミノ酸残基のprotonation状態も大きく変わるだろう。また、Y_D (D2-Tyr160) は水素結合ネットワークを介してD2-Arg294とつながっているが、このArgはさらにCP47-Glu364とsalt-bridgeを形成し、サブユニット間をつなぐ相互作用の一助となっている。CP47の除去は、Y_D周辺の水素結合ネットワークを乱すことになり、新たにバルク水に露出することになるD1 / D2蛋白質の表面構造は大きくリラックスする(ゆるむ)はずである。残念ながら、これに準じる蛋白質の結晶構造は現在のところ公開されておらず、起こりうる構造変化の詳細は不明である。私たちは、あくまでもintactなPSII内での相互作用を明らかにすることに興味があるので、「D1 / D2 PSII」作成においても、intact PSIIと同じ原子座標・解離性残基のprotonation状態を用いた。また、現実の系ではサブユニット除去に伴いMn₄CaO₅の構造も不安定になることが予想される。一方、私たちはサブユニット除去における電荷分布比P_{D1}⁺ / P_{D2}⁺ への影響が何より知りたかったため、CP43-Glu354とCP43-Arg357のCβ炭素をメチル化してその側鎖部位を系に含めた(つまりMn₄CaO₅配位子場環境はintact PSIIと同じである)。D1, D2, cytochrome b559, PsaIのみで構成されるRC complexのFTIR測定では、P_{D1}⁺ / P_{D2}⁺ ≈ 50 / 50であることがわかっている^{5,11)}。おそらくRC complexでは上述したような変化により、本来のintactなPSIIと異なるP_{D1} / P_{D2} 周辺環境を持つことが予想される。

4. PSII機能に重要といわれているD1/D2アミノ酸残基こそ非対称電荷分布の根源

D1 / D2 蛋白質のアミノ酸配列は比較的良好に似ているが、明らかにアミノ酸ペアの性質が異なる箇所が見受けられる。それらは、突き詰めればMn₄CaO₅がD1側に位置することに起因すると考えられる。D1側では金属性のMn₄CaO₅を保持するため負電荷を帯びた酸性アミノ酸残基が明らかに多く分布する。一方、

対応するD2側は、中性・塩基性アミノ酸残基であることが多い。そういったアミノ酸ペアがPSII蛋白質内においてP_{D1}⁺ を (P_{D2}⁺ に対して) 相対的に安定化させることで、P_{D1}⁺ / P_{D2}⁺ = 77 / 23という分布比を生み出していることが私たちの解析により明らかとなった。特に大きな影響力を与えているペアとして以下のものが挙げられる。D1-Asn181/D2-Arg180, D1-Asn298/D2-Arg294, D1-Asp61/D2-His61。電位計算の結果、これらのアミノ酸はPD1, PD2両クロロフィルの電位に40 mV以上も差を生じさせる原因となっていた¹⁰⁾。D2-Arg180変異体ではP680⁺とQ_A⁻間の電荷再結合の様子が大きく変わることが知られている¹²⁾。D2-Arg294変異体は光阻害を受けやすい¹³⁾。さらにD1-Asn298 / D2-Arg294はそれぞれY_Z / Y_Dと水素結合ネットワークを形成しており、Y_ZとY_Dの電位差の一要因となっている¹⁴⁾。またD1-Asp61は、水分解反応で放出されるプロトンH⁺の排出パスの一部である^{15,16)}。以上のようにこれらのアミノ酸はintactなPSIIでの機能、特に水分解反応との関連も深いことから、電荷分布比P_{D1}⁺ / P_{D2}⁺ = 77 / 23は水分解可能なintactなPSIIにおいて当然の帰結、と結論づけられる¹⁰⁾。

5. PSI反応中心クロロフィル上の正電荷分布

同様の解析をPSIのP700を構成する P_A / P_B クロロフィルについて行った。T. elongatus由来のPSI結晶構造(分解能2.5 Å)¹⁷⁾の原子配置においてQM/MM計算を行ったところ、私たちは電荷分布比P_A⁺ / P_B⁺ = 28 / 72、スピン分布比P_A / P_B = 22 / 78という結果を得た¹⁸⁾。この結果はスピン分布比 P_A / P_B = 15 / 85 ~ 25 / 75^{3,7,8)}に近いといえる。また、FTIRによる電荷分布比のうちP_A⁺ / P_B⁺ = 33 / 67⁹⁾に関しては今回得られた値に近い。PSIのP700におけるFTIR測定による電荷分布比とEPR測定によるスピン分布比の差は、(いくつかの文献で強調されているような)「食い違い」ではなく、「電荷分布はスピン分布よりも非局在化傾向にある」だけであり、本質的には同一の事象であることが今回の計算結果から示唆される。

PSIIではD1/D2アミノ酸ペアでP_{D1}, P_{D2}の電位差を増大させるようなペアが複数存在した。これに対し、PSIでは、P_AとP_Bの電位差 |E_m(P_A) - E_m(P_B)| を大きく生じさせるようなPsaA / PsaBアミノ酸ペアはほとんど存在しない。E_m(P_A) > E_m(P_B)に最も寄与しているペアはArg-A750 / Ser-B734であるが、それでも17 mV

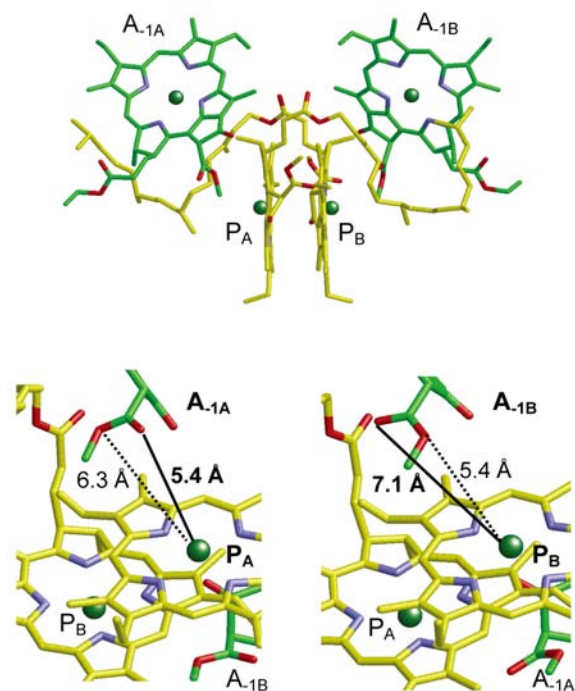


図2 (上) PSIにおけるクロロフィル2量体 P_A / P_B に対するアクセサリクロロフィル A_{-1A} 、 A_{-1B} の位置関係。(左下) A_{-1A} のmethyl-ester基と P_A との位置関係。methyl-ester基のcarbonyl酸素と Mg^{2+} との距離を太線で示す。また、ester酸素と Mg^{2+} との距離を点線で示す。(右下) A_{-1B} のmethyl-ester基と P_B との位置関係。

程度である¹⁸⁾。

一方 $E_m(P_A) < E_m(P_B)$ に最も寄与しているペアは、意外にもアクセサリクロロフィル A_{-1A} 、 A_{-1B} (28 mV)であった¹⁸⁾。さらに興味深いことに、これらのアクセサリクロロフィル A_{-1A} 、 A_{-1B} の存在は P_A と P_B の電位を下げる(= P_A^{*+} 、 P_B^{*+} を安定化させている)要因であることも今回初めて示された。それについて以下詳述する。

私たちの研究で初めて指摘した事実であるが¹⁸⁾、実はPSI結晶構造(分解能2.5 Å)¹⁷⁾では、クロロフィルのmethyl-ester基の配向が A_{-1A} と A_{-1B} において真逆である(図2)。A側においては、 P_A の Mg^{2+} に対して、 A_{-1A} のmethyl-ester基を構成するcarbonyl酸素がより近い位置(5.4 Å)に存在し、ester酸素がより遠い位置(6.3 Å)に存在する。ところがB側では、 P_B の Mg^{2+} に対して、 A_{-1B} のmethyl-ester基を構成するcarbonyl酸素はより遠い位置(7.1 Å)に存在し、ester酸素がより近い位置(5.4 Å)に存在する¹⁸⁾。つまり、(i) A_{-1A} 、 A_{-1B} のmethyl-ester基の極性酸素が、 P_A^{*+} 、 P_B^{*+} 上の正電荷を安定させることができるため、 P_A と P_B の電位を下げ

ることが可能である。さらに、(ii) carbonyl酸素の方がester酸素より極性が高いため、 P_A^{*+} の方が、 P_B^{*+} よりも安定化効果を受けやすい。

もし、 A_{-1A} 、 A_{-1B} のmethyl-ester基がPSI蛋白質環境内で自由に回転できるのなら、methyl-ester基の配向の違いに応じて異なった電荷分布比 P_A^{*+} / P_B^{*+} のバリエーションがあってもよいはずである。その考えに基づいて A_{-1A} 、 A_{-1B} のmethyl-ester基の配向を完全に反転させたコンフォメーションで計算を行うと、 A_{-1B} のcarbonyl酸素近接効果により P_B^{*+} がより安定化するので、電荷分布比 $P_A^{*+} / P_B^{*+} = 22 / 78$ 、スピン分布比 $P_A / P_B = 15 / 85$ を得る¹⁸⁾。興味深いことに、このスピン分布比は、*T. elongatus* PSIの $P_A / P_B = 15 / 85$ ⁸⁾と(偶然かもしれないが)非常に近い。EPR測定によるスピン分布比に、 $P_A / P_B = 15 / 85 \sim 25 / 75$ ^{3,7,8)}のように幅が見られることは、種や測定条件の違いだけでなく、もしかしたらこのような P_A / P_B 近傍のコンフォメーションがいくつか存在することに起因しているのかもしれない。なお、methyl-ester基のcarbonyl酸素とester酸素との区別は、分解能2.5 Åのこの構造では十分に可能であり、少なくとも結晶構造内ではこのコンフォメーションをとっていることは確実である(W. Saenger, Free University of Berlin, personal communication, 2011)。分解能2.5 Åあたりから結晶水は徐々に見えてくるので、もしかしたら未だ同定されていない結晶水が存在し、 A_{-1A} 、 A_{-1B} のmethyl-ester基の向きを指定しているのかもしれない。

上述したように、PSIでは、PsaA / PsaB 両サブユニット間において蛋白質の静電的性質に大きな差がない。そのため、電荷分布比 P_A^{*+} / P_B^{*+} は、静電場環境よりも、クロロフィル分子への水素結合の有無やクロロフィル分子骨格といった、 P_A / P_B クロロフィル分子の内部エネルギーに左右される。Thr-A743から P_A への水素結合は、水素結合の中でも決して強くはないが、 P_A のエネルギーは影響を受ける。また、Chl aのC13²異性体である P_A は、(天然に多く存在するのは異性体ではないChl aであることから想像できるように)通常のChl aと比べれば(大きくないものの)わずかにエネルギーは高いはずである。これを踏まえた上で改めてPSIIを見れば、非対称な電荷分布状態 $P_{D1}^{*+} / P_{D2}^{*+} = 77 / 23$ を作り出すPSII蛋白質の静電的性質は、D1とD2においていかに大きく異なっているか明らかであり、対照的である。PSI、PSII両蛋白質の

電子移動経路との関連からも、上述の点は今後更に考慮すべき特徴なのかもしれない。

6. おわりに 「計算」「実験」「机上の空論」

多くの蛋白質研究にとって、蛋白質の立体構造は重要である。たいていの場合は、構造を「眺める」、せいぜい「原子間距離を測る」ことで十分である。一方、原子間の相互作用は、系に原子が2個以上存在すれば必ず存在する。そして、原子間相互作用は、原子種や原子の相互配置（座標）が決まれば、物理・化学の法則により一義的に決まるはずである。それが成り立たないのなら、たとえば、高校や大学教養の授業で物理・化学の法則を習うことは無意味になってしまう。

つまり、蛋白質立体構造の適切な原子座標が得られれば、本来そこにはすでに「蛋白質内における原子、アミノ酸残基、コファクター間の相互作用」が存在していることになる。（あまりに不安定な力が存在しているのなら、そもそも蛋白質はその形で結晶化しない。）私たちの理論化学的手法では、単に、個々の計算手法の長所・短所（適応範囲）を見極め、適切に運用して「蛋白質」の物理化学的性質に関するデータを得ているに過ぎない。従って、計算によって得られたデータは、純粋に蛋白質結晶構造に基づいているものであり、また、その結果はあくまで「利用した結晶構造」の性質を反映しているものである。たとえば、結晶構造の信頼性が低く明らかに原子の置き方にミスがある場合は、得られた計算結果もおかしな結果を示すことが多い。計算結果は何らマジックやスペキュレーション、妄想ではなく、あくまで利用している構造情報を反映しているものだということを強調しておきたい。

蛋白質立体構造に基づいた理論化学的手法による研究の現実は、「対象に応じて適切な手法を選択し組み合わせる研究を進めていく実験的研究」と全く同じプロセスである。計算結果が「机上の空論」となってしまう場合とは、(1) 適応範囲を超えた計算手法の運用をした場合、(2) 得られた結果の解釈の不適切さ、である場合がほとんどである。ここで、「計算手法」を「実験手法」に置き換えて考えてみれば、実験研究においても同様に当てはまること、と理解していただけたと思う。上記 (1) には、「一つの実験的手法で全てが解き明かされるわけではない」よう

に「一つの計算手法でオールマイティなものはない」ということも含まれる。上記 (2) に関しては、検証作業の重要性が挙げられる。重要な検証作業の一つとして、私たちはかなりの時間を蛋白質構造を見ることだけに費やす。大変シンプルで当たり前の作業ではあるが、「得られた計算結果は必ず構造から説明できる」必要があり、「予期せぬ計算結果」が得られている場合は、たいてい計算過程に何らかの問題（入力ミス、あるいは適用した手法の不適切さ等）がある場合が多い。

しかし、「予期せぬ計算結果」が出ても正しい場合もある（注；ミスを一切していないという前提において）。人間の感覚は概して主観的なものである。蛋白質の立体構造を眺める際も、既存の論文で（根拠が弱くても）主張されている説があれば、ついそれを念頭に置いて見てしまいがちである。その点、計算的手法を立体構造に適用すれば、主観の陰に隠れてしまうような相互作用でも、客観的に、システムティックに考慮される。「予期せぬ計算結果」に疑いをもちつつも改めて構造を眺めると、確かに構造はそう語っており、己の主観とはいかに危険であるか、再認識させられる。また、そういった場合こそ大きな発見であることがしばしばである。たとえば、今回PSIの解析結果として、 A_{-1A} 、 A_{-1B} が P_A 、 P_B の電位を下げ、さらにmethyl-esterの配向が対称的でないことによりその影響力が異なっていたことを報告した。PSIの結晶構造¹⁷⁾が2001年に発表されてからすでに10年たつが、いったいこの間何人がこの事実を指摘して実際に研究を行ったであろうか。いきなりこの計算結果を持ち出せばにわかに信じがたいことかもしれないが、構造を改めて見れば誰でも納得できる極めて単純なことである。このように私たちは「計算を通して構造をさらに解釈する」姿勢で研究を進めていきたい。このような、単純ではあるが誰も指摘できなかった小さな「コロンプスの卵」を積み重ねていくことこそ、サイエンスには大切だと私たちは考える。先入観を持たずにサイエンスをしていかなくては、と自戒してやまない。

謝辞

第2回日本光合成学会公開シンポジウムでの講演（2011年6月3日）の機会を与えていただきました野口巧先生（名古屋大学）、池内昌彦先生（東京大学）

に感謝いたします。

Received October 25, 2011, Accepted October 28, 2011,

Published December 31, 2011

参考文献

- Guergova-Kuras, M., Boudreaux, B., Joliot, A., Joliot, P., and Redding, K. (2001) Evidence for two active branches for electron transfer in photosystem I, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4437-4442.
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.-R., and Kamiya, N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at 1.9 Å resolution, *Nature* **473**, 55-60.
- Rigby, S. E. J., Nugent, J. H. A., and O'Malley, P. J. (1994) ENDOR and special triple resonance studies of chlorophyll cation radicals in photosystem 2, *Biochemistry* **33**, 10043-10050.
- Diner, B. A., Schlodder, E., Nixon, P. J., Coleman, W. J., Rappaport, F., Lavergne, J., Vermaas, W. F. J., and Chisholm, D. A. (2001) Site-directed mutations at D1-His198 and D2-His197 of photosystem II in *Synechocystis* PCC 6803: sites of primary charge separation and cation and triplet stabilization, *Biochemistry* **40**, 9265-9281.
- Okubo, T., Tomo, T., Sugiura, M., and Noguchi, T. (2007) Perturbation of the structure of P680 and the charge distribution on its radical cation in isolated reaction center complexes of photosystem II as revealed by fourier transform infrared spectroscopy, *Biochemistry* **46**, 4390-4397.
- Sugiura, M., Rappaport, F., Brettel, K., Noguchi, T., Rutherford, A. W., and Boussac, A. (2004) Site-directed mutagenesis of *Thermosynechococcus elongatus* photosystem II: the O₂-evolving enzyme lacking the redox-active tyrosine D, *Biochemistry* **43**, 13549-13563.
- Davis, I. H., Heathcote, P., MacLachlan, D. J., and Evance, M. C. W. (1993) Modulation analysis of the electron spin echo signals of *in vivo* oxidised primary donor ¹⁴N chlorophyll centres in bacterial, P870 and P960, and plant Photosystem I, P700, reaction centres, *Biochim. Biophys. Acta* **1143**, 183-189.
- Kass, H., Fromme, P., Witt, H. T., and Lubitz, W. (2001) Orientation and electronic structure of the primary donor radical cation P700⁺ in Photosystem I: a single crystals EPR and ENDOR study, *J. Phys. Chem B* **105**, 1225-1239.
- Breton, J., Nabedryk, E., and Leibl, W. (1999) FTIR study of the primary electron donor of Photosystem I (P700) revealing delocalization of the charge in P700⁺ and localization of the triplet character in ³P700, *Biochemistry* **38**, 11585-11592.
- Saito, K., Ishida, T., Sugiura, M., Kawakami, K., Umena, Y., Kamiya, N., Shen, J.-R., and Ishikita, H. (2011) Distribution of the cationic state over the chlorophyll pair of photosystem II reaction center, *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 14379-14388.
- Noguchi, T., Tomo, T., and Inoue, Y. (1998) Fourier transform infrared study of the cation radical of P680 in the photosystem II reaction center: evidence for charge delocalization on the chlorophyll dimer, *Biochemistry* **37**, 13614-13625.
- Manna, P., LoBrutto, R., Eijkelhoff, C., Dekker, J. P., and Vermaas, W. (1998) Role of Arg180 of the D2 protein in photosystem II structure and function, *Eur. J. Biochem.* **251**, 142-154.
- Ermakova-Gerdes, S., Yu, Z., and Vermaas, W. (2001) Targeted random mutagenesis to identify functionally important residues in the D2 protein of photosystem II in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *J. Bacteriol.* **183**, 145-154.
- Ishikita, H., and Knapp, E. W. (2006) Function of redox-active tyrosine in photosystem II, *Biophys. J.* **90**, 3886-3896.
- Iwata, S., and Barber, J. (2004) Structure of photosystem II and molecular architecture of the oxygen-evolving centre, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 447-453.
- Ishikita, H., Saenger, W., Loll, B., Biesiadka, J., and Knapp, E.-W. (2006) Energetics of a possible proton exit pathway for water oxidation in Photosystem II, *Biochemistry* **45**, 2063-2071.
- 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.
- Saito, K., and Ishikita, H. (2011) Cationic state distribution over the P700 chlorophyll pair in Photosystem I, *Biophys. J.* **101**, 2018-2025.

Cationic State Distribution Over The P680 Chlorophyll Pair in Photosystem II

Hiroshi Ishikita^{1,2,*}, Keisuke Saito¹

¹Career-Path Promotion Unit for Young Life Scientists, Kyoto University

²JST, PRESTO

光合成系での光捕集過程を構造に立脚して理解する[‡]

東北大学 理学研究科 化学専攻
柴田 穰

1. はじめに

沈らの光化学系IIのX線結晶構造解析¹⁾は分解能1.9Åを実現し、まさに分子レベルの反応機構の解明につながると期待される。では、アンテナ色素系での光捕集過程を詳細な構造情報に立脚して理解出来るか、というところ簡単ではない。それは、一つのタンパク質複合体に数10個結合する各色素分子の吸収波長をいちいち決定する、という難題があるからである。構造が分かっても、色素の吸収波長は分からないのである。フェルスター機構によるエネルギー移動では、短波長の色素から長波長の色素へのエネルギー移動がその逆よりも効率が低い。そのため、光合成系での光捕集に理想的なのは、電荷分離を起こすPrimary Donorを中心としてそこから離れるにつれて吸収波長が短くなるような色素の配置であるはずだ。いわゆるロート型のエネルギー配置である。このような理想的な配置は実際の光合成系で実現されているのか？実際に非常に高い効率で光捕集が行われていることは、理想的配置が実現されている間接的な証拠にも思える。しかし、光化学系Iでは、Primary Donorよりも長波長に吸収ピークを持つ長波長クロロフィル(Chl)があることが古くからよく知られており、ロート型のエネルギー配置にはなっていない²⁾。光化学系IIでは、光化学系Iほど顕著に長波長シフトしたChlは存在しないが、それでも極低温での蛍光スペクトルの測定から同様に Primary Donor よりも若干長波長にシフトした色素があることが分かっている³⁾。これらの長波長Chlは、効率的な光捕集に対して建設的な寄与はないように思われる。では、長波長Chlにはいったいどのような生理的な機能があるのか？この問への明確な答は未だ得られていないが、筆者らは光エネルギーの利用効率を調節する非光化学消光(NPQ)との関連があるとの仮説のもと、研究を進

めてきた。この仮説を検証するには、結晶構造中のどのChl分子がそれらに対応するかを知ることは重要である。こうして結局、各Chl分子の吸収波長をなんとかして知らねばならない、という冒頭に述べた課題に行きつく。以上のような問題意識を持った研究について、筆者らの最近の研究および関連するグループの研究について、以下に解説する。

2. 光化学系Iの長波長クロロフィルを経由する光捕集経路

図1に *Thermosynechococcus elongatus* 由来光化学系Iの5 Kでの吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを示す。青線を示す吸収スペクトルには、680 nm付近のメインバンドに加えて、red-most Chl (以下、Red Chl) と呼ばれる極端に長波長シフトしたクロロフィルの吸収バンドが長波長側の裾部分、700~730 nmの領域に見られる。吸収スペクトルの面積比から、光化学系Iに結合するChlのうち約一割はRed Chlが占めていると見積もられている⁴⁻⁶⁾。P700あたり96個のクロロフィルが結合しているため、そのうち7~11個程度がRed

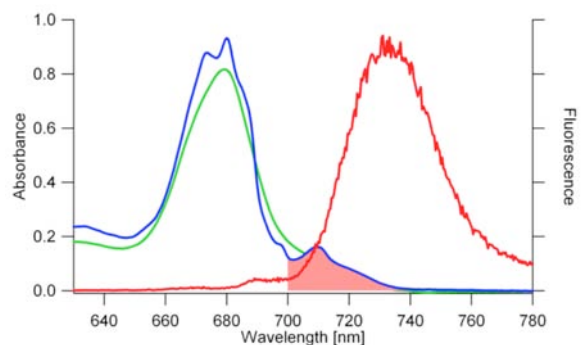


図1 *T. elongatus*由来の光化学系Iの吸収スペクトル(青線: 5 K、緑線: 室温)。5 Kの吸収スペクトルには、Red Chlの寄与部分を赤く塗りつぶして強調している。

[‡] 解説特集「光合成の光エネルギー変換メカニズム —物理学的手法によるアプローチ—」

* 連絡先 E-mail: shibata@m.tohoku.ac.jp

Chlを構成していると考えられている。Red Chlの蛍光波長は720-750 nm程度である。吸収スペクトルの強度は色素の数に比例するが、蛍光スペクトルの強度は長波長の色素からの寄与がボルツマン分布に比例して大きくなる。低温になればこの傾向は強められるため、100 K以下の極低温では光化学系Iの蛍光スペクトルはほとんどRed Chlからの寄与に占められる。

Red ChlはPS Iでの非光化学消光に関係があるだろう、という推論はいくつか報告されているが⁷⁾、未だに明快な答は得られていない。96個のChlのうち、どれがRed Chlであるかが分からない、という状況が明快な答を得ることを難しくしている。筆者は、Red ChlはPrimary Donorの近くにあるのか、遠くにあるのか、という疑問に答えることが重要であると考えた。もし前者が正解でRed ChlがPrimary Donorの近傍に位置すれば、多くのアンテナChlからの励起エネルギーが最初にRed Chlに渡りその後Primary Donorへと至る、という経路が最も高い頻度で実現されることになる。Red Chl経由の光捕集が主要な経路であ

るなら、Red Chlが非光化学消光に関与する、という説にも説得力を与えるだろう。一方後者のようにRed ChlがPrimary Donorから離れた場所に位置するならば、Red Chlをいったん経由する光捕集の経路は主要な経路にはならないため、Red Chlが非光化学消光に寄与するとしてもその効率は高くならない。

Red Chl経由の光捕集が主要経路となっているのか、との問いに答えるため、筆者らは世界で初めて15 Kという極低温においてフェムト秒時間分解蛍光測定を行った²⁾。この研究で着目するのは、励起後どれくらいの時間を経てRed Chlからの蛍光が見えてくるのか、であった。従来のピコ秒の時間分解蛍光測定では、励起後10~30 ps後にRed Chlからの蛍光が観測される、と報告されていた⁸⁾。この速度は、光合成タンパク質内部での光捕集過程の中ではそれほど高速なものではない。本当にRed Chlへのエネルギー移動に10~30 psかかるのであれば、Red Chlへのエネルギー移動は主要な光捕集経路ではなく、ほとんどの励起エネルギーは直接Primary Donorへ運ばれ残りの一部がRed Chlへ運ばれる、ということになる。

我々のフェムト秒時間分解測定の結果を、図2に示す。それまでのピコ秒の時間分解能の測定結果からの予想に反して、Red Chlからの蛍光が見られる740 nm付近の蛍光は、1 ps以下の極めて速い段階で立ち上がっているのが分かる。Red Chlからの蛍光の減衰も非常に高速で、減衰の時定数は約6 psであった。このような超高速のRed Chl蛍光の立ち上がりと減衰は全く予想していなかったもので、現時点でも完全にその理由は分かっていない。この結果は、Red Chlへ非常に高効率に光エネルギーが集まってくることを明確に示しており、Red Chl経由の光捕集が主要経路であることの証拠となっている。なお、励起光強度が強い場合に超高速の消光を引き起こすSinglet-Singlet Annihilationという現象が知られるが、蛍光減衰速度に励起光強度依存性がないことからSinglet-Singlet AnnihilationがRed Chl蛍光の超高速減衰に寄与していないことは確認している。以上の結果は、従来のピコ秒の時間分解測定の結果と矛盾している訳ではなく、我々の観測でも30 ps程度のRed Chl蛍光の立ち上がりの成分も同時に見えている。すなわち、高い時間分解能の測定を行ったことで、これまで見えていなかった速い過程が見えてきたということである。

以上の我々の観測結果をまとめて模式的に表した

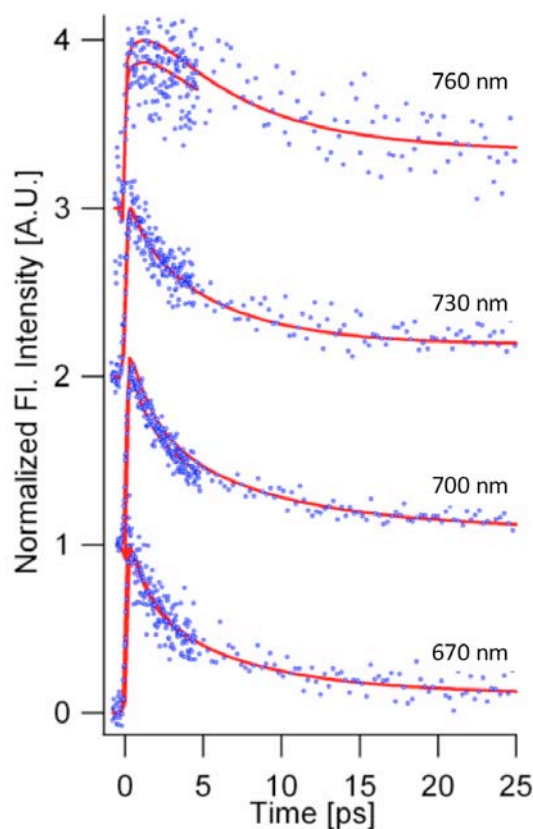


図2 *T. elongatus*由来の光化学系Iの15 Kでの蛍光減衰。青丸が実験データで、赤い実線は複数の指数関数の和によるフィッティングである。

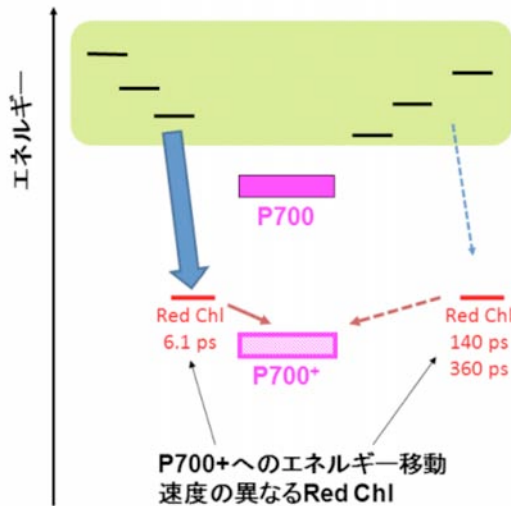


図3 光化学系Iのアンテナ色素のエネルギー配置の模式図。

3種類のRed Chlがあり、そのうちの一つは6.1 psという超高速でP700+へ励起エネルギーを渡す。このRed Chlを経由するのが主要な光捕集経路と考えられる。

のが、図3である。上でも述べたが、光化学系Iに結合する96個のChlのうちRed Chlを構成するのは7~10個である。Red Chlの長波長シフトは、色素同士が近接しているため強く励起子相互作用している結果であると考えられている。つまり、一つのRed Chlは少なくとも2つの接近したChlのペアで構成されると考えられている。一つのRed Chl当たりChlが2個であると考えると、光化学系IにはRed Chlが3~5個存在することになる。我々の観測からは、蛍光減衰時間の異なる3種類のRed Chlが確認された。それぞれ、蛍光減衰時間が6.1 ps、140 ps、360 psである。このうち6.1 psの蛍光減衰時間を持つRed Chlは、我々のフェムト秒測定で初めて明らかにあったものである。我々の実験条件では、Red Chlの蛍光減衰はスペシャルペアP700のカチオンP700+へのエネルギー移動で起こっている。つまり、測定されたRed Chlの蛍光減衰速度は、P700との距離の指標となる。したがって、6.1 psの超高速で減衰するRed Chlはスペシャルペアに極めて近い位置に存在することになる。最初に挙げた問い、Red ChlはPrimary Donorに近いのか、遠いのか?であるが、いくつかあるRed Chlのうちの一つはPrimary Donorの極めて近くに存在することが明らかとなった。このことは、アンテナ色素で集められる励起エネルギーの大部分はいったんこのRed Chlに集められ、その後P700へと渡っている、というこ

とを示唆している。他の二つのRed Chlを経由する光捕集経路は主要な経路ではなく、P700からは離れて存在していると考えられる。

3. 光化学系IIの長波長クロロフィル

光化学系IIにも、系Iほど顕著ではないがRed Chlと呼べる色素が存在する³⁾。図4に *T. vulcanus* 由来光化学系IIの蛍光スペクトルの温度依存性を示す。77 Kで685 nmと695 nm付近に二つの蛍光のピークが見られるが、これはどちらもPrimary Donorよりも長波長のアンテナChlからの蛍光である。さらに温度を下げると、685 nm付近の蛍光のピークが強くなりメインバンドとなる。光化学系Iの場合には、77 K以下の温度で蛍光ピークがシフトすることなく、図4に見られる短波長シフトは系IIの特徴である。低温で長波長のChlからの蛍光が強くなるのは、低温でのボルツマン分布に従う結果であると上で述べた。しかし、温度降下とともに蛍光波長が長波長シフトしたあと、更なる温度降下により再び短波長シフトするのは一見奇妙である。

図4に見られるような光化学系IIの蛍光スペクトルの温度依存性は、図5に示したスキームのように吸収ピークが若干異なる2種類の長波長Chl、Chl695とChl685の存在を仮定することで定性的に説明できる。どちらの長波長Chlでも、低温になるとエネルギーギャップを超えるための熱揺らぎが抑えられることによりPrimary Donorへのエネルギー移動が起こらなくなり、蛍光が強くなるようになる。より長波長にシフトしたChl695からPrimary Donorへのエネルギー移動がまず77 Kで抑制されて蛍光が強くなり、さらなる温度降下によりChl685からPrimary Donor

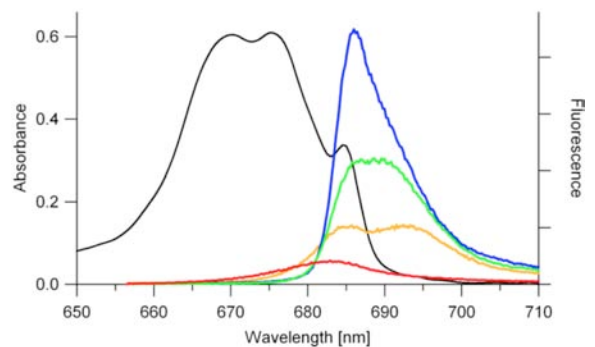


図4 *T. elongatus*由来の光化学系IIの吸収スペクトル(クロ実線: 5 K)と蛍光スペクトル(赤: 180 K、オレンジ: 77 K、青: 5 K)。

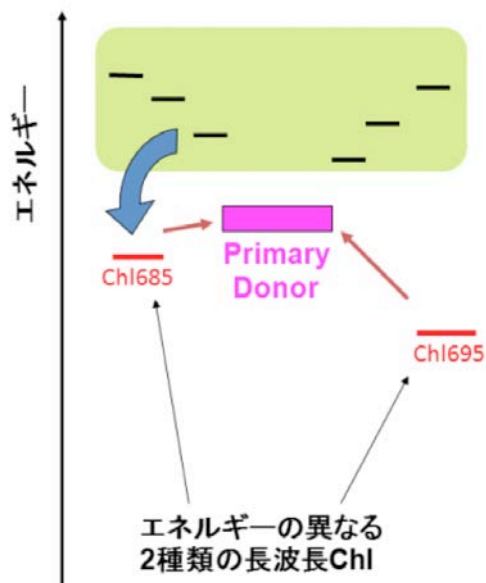


図5 光化学系IIのアンテナ色素のエネルギー配置の模式図。

2種類の長波長Chl、Chl685とChl695がある。Chl685を経由するのが主要な光補修経路と考えられる。

へのエネルギー移動も抑制されて685 nmの蛍光が強くなる。ここで、光捕集の主要な経路はChl685を経由するものでなければならない。もし光捕集の主要経路がChl695を経由するものであれば、77 Kよりも低温でも励起エネルギーはChl685より励起エネルギーの低いChl695に集まることになり、685 nmの蛍光が強くなることが説明できない。

4. 仮説：長波長Chlは励起エネルギー調節弁として働く

冒頭にも述べたが、Primary Donorよりも長波長の色素の存在は効率的な光捕集に建設的な寄与はないと考えられる。ではいったいなぜ存在するのか。筆者の考えは、励起エネルギーの調節弁として働いているのではないか、というものである。以下、推論の域を超えないことを承知の上で、上記の仮説について議論する。

室温であっても、励起エネルギーの低い長波長Chlには相対的に励起エネルギーが集中することになる。そこで、強光や乾燥などのストレス下で光化学反応を止めたい時に、長波長Chlの近傍に励起エネルギーを消光する分子を過渡的に生成することが出来れば、長波長Chlがない場合と比較してはるかに効率のよい光化学系全体の励起エネルギー消光が実現できることになる。過渡的な消光分子として有力なの

は、クロロフィルのカチオンである。Chl⁺は800 nmに幅の広い吸収スペクトルを持ち、長波長Chlからのエネルギーアクセプターとなり得る。いったんChl⁺へ渡った励起エネルギーは、速やかに熱エネルギーとして緩和するため効率的な消光分子として働くであろう。カロテノイドのカチオンも900 nmに吸収ピークを持つことが知られ、Chlカチオンと同様に過渡的な消光分子として働く可能性がある。

実際、光化学系IIではChlZと呼ばれるChl分子やカロテノイドがカチオンとなることが知られている⁹⁾。このようなカチオンが蓄積した状態で、蛍光減衰が速くなっているとの報告もあり、実際に過渡的に生成されるカチオン分子が消光分子として働くことも示されている¹⁰⁾。光化学系Iでは、P700のカチオンが同様に消光分子として働く可能性がある。ストレス下でP700への電子の供給が止まってP700⁺が蓄積した時に、速やかに励起エネルギーを消光することができる。P700⁺の蓄積で、高効率に消光が起こることは筆者らの研究で示されていることである。

以上のような仮説を検証するには、長波長Chlが結晶構造に見られるChlのどれに対応するのかを明らかにすることが重要である。光化学系IIでChlZカチオンが消光分子となるとして、本当に長波長ChlがChlZの近くに位置することが示されれば、より説得力のあるモデルとなるだろう。以下の最終節では、結晶構造中の全Chl分子の吸収波長を決定することを目指した最近の研究について概説する。

5. 各Chlの吸収波長決定への試み

これまで、各クロロフィル分子の吸収波長決定は長らく解くことの難しい問題であった。タンパク質中に結合する色素の吸収スペクトルのピーク位置は、一般に真空中に浮いている色素の吸収波長とずれている。これは、色素の周りのタンパク質アミノ酸残基との相互作用のためである。タンパク質内部の環境下での光吸収エネルギーのことは、“その場所での”という意味でon-site energyという用語で呼ばれている。ここでは以下、サイトエネルギーという。以上のことを式で表すと、

$$\omega_{\text{Site}} = \omega_{\text{vacuum}} + \Delta\omega_{\text{protein}}$$

となる。ここで、 ω_{Site} 、 ω_{vacuum} 、 $\Delta\omega_{\text{protein}}$ はそれぞれサイトエネルギー、真空中での励起状態のエネルギー、タンパク質の寄与によるシフト、である。タ

ンパク質の構造が原子レベルで決定されても、サイトエネルギーを決定するにはアミノ酸残基の影響を正しく考慮した量子化学的手法により励起状態エネルギーを解かなければならない。これは現時点でも非常に困難な問題であり、したがってサイトエネルギーを構造情報だけから予想するのは現実的にはかなり困難である。

光合成タンパク質のように、一つのタンパク質分子の中に多くの色素分子が密集しているような場合、さらに色素分子間の励起子相互作用の効果を考慮しなければ見かけの吸収波長を説明できない。例えば、紅色光合成細菌の反応中心 (RC) の吸収スペクトルにはよく知られるように近赤外領域に3つのバンドがある。860 nm、800 nm、780 nmにピークを持つものはそれぞれ、スペシャルペア、アクセサリール BChl、Bpheoが“主に寄与する”バンドであると帰属されている。スペシャルペアは近接する2分子のBChlで構成され、2分子の間には励起子相互作用と呼ばれる電気的な相互作用が強く働く。サイトエネルギーの定義は、“励起子相互作用がない場合のタンパク質の影響による吸収波長”であり、見かけの吸収スペクトルのピークとは若干異なる。実際の吸収スペクトルのピークエネルギーは、形式的には以下の式で表される。

$$\omega_{Abs} = \omega_{Site} + \Delta\omega_{\text{励起子相互作用}}$$

すなわち、光合成タンパク質の吸収スペクトルのピークエネルギーは、真空中の色素のもの (ω_{vacuum}) からタンパク質との相互作用 ($\Delta\omega_{Protein}$) によりシフトし、さらに色素分子間の励起子相互作用によりシフトする。紅色細菌RCにおけるスペシャルペアは、最も強く励起子相互作用する色素ペアであり、そのために最も長波長へシフトした吸収メインピーク位置を示すのである。

PS II の反応中心と呼ばれる標品は、バクテリオクロロフィルとクロロフィルの違いはあるにしても非常に紅色細菌の反応中心に似た色素の組成となっている。色素の配置だけに着目すれば、構造もよく似ている。しかし、Primary Donor がどの色素であるか、という基本的なことも最近まで PS II ではよく分っていなかった。これは、PS II では各色素の吸収バンドはほぼ同じ波長で重なっており、3つの吸収バンドに分かれる紅色細菌の RC の場合ほど簡単に各色素分子の吸収波長の帰属が出来なかったからである。

2005年から2006年にかけて相次いで、PS II の Primary Donor がアクセサリール Chl であることを示す報告が、実験サイド^{11,12)}および理論サイド¹³⁾の両方から出された。Grootらは、フェムト秒の時間分解赤外吸収測定により、Holzwarthらは 540 nm のフェオフィチン Qx に由来する小さな吸収バンドの精密測定により、どちらもフェオフィチンのアニオンが 1 ps 以内の短時間に生成することを示し、そのことからアクセサリール Chl が Primary Donor であるとした。一方 Raszewskiらは、極低温での吸収スペクトル、光誘起電荷分離による差スペクトル、電荷再結合後の三重項状態との差スペクトル、直線偏光異方性 (LD) スペクトルを全て矛盾なく再現できるようなサイトエネルギーの組合せを数値的に求めるようにして、8つの色素全てのサイトエネルギーを決定した。その結果、やはりアクセサリール Chl が Primary Donor であるという結論に達している。

以上の成果により、PS II の光反応初期過程の理解は大きく進んだ。Raszewskiらの理論的な研究では、Primary Donor 以外の反応中心標品に含まれる8つの色素全てについてサイトエネルギーの決定がなされた。しかし、PS II コア複合体に含まれる37個の色素分子のうち、反応中心以外のサブユニットに結合する光捕集を担う多数のChlのサイトエネルギーはこの時点では解明されていなかった。前節までに述べた“長波長Chlが光捕集の調節弁である”という仮説の検証のためには、反応中心を取り囲む CP43、CP47 というアンテナサブユニットに結合するChlのサイトエネルギーの決定が必要である。こうした中、Raszewskiらは2008年に PS II コア複合体に含まれる37個の全色素のサイトエネルギーを決定した、と報告した¹⁴⁾。彼らはそれまでに、緑色硫黄細菌のアンテナタンパク質であるFMOについて、結合する8つのBChlのサイトエネルギーを決定するという研究を行っていた¹⁵⁾が、その研究でのノウハウをPS IIのアンテナタンパク質に結合するChlのサイトエネルギー決定にも応用している。PS IIのコアアンテナ、CP43、CP47については、単離された標品でのいろいろな温度での吸収、蛍光スペクトル、CDスペクトルやLDスペクトルが報告されている。Raszewskiらは、これらの複数の光学スペクトルが全て矛盾なく再現できるようなサイトエネルギーの組合せを遺伝的アルゴリズムと呼ばれる手法により決定した。遺伝的アルゴリズムとは、まず各Chlの

サイトエネルギーにランダムに選んだ10種類程度の組合せを割り当て、それぞれの組合せについて光学スペクトルを計算する。その中で実験結果に近い上位3つの組合せを選び、そこからさらにランダムに微小変化を加えたものを再度10種程度割り当て、それぞれについて光学スペクトルの計算をして実験結果と比較する。このようなサイクルを繰り返して、最終的に実験結果に合うサイトエネルギーを得る。

彼らの論文を最初に読んだ時筆者は、遺伝的アルゴリズムという任意性の残る手法を使っているにも関わらず、決定されたCP43、CP47のサイトエネルギーが実験データを非常にうまく再現しているのに驚いた。CP43、CP47の吸収、蛍光スペクトルだけでなくLDやCDスペクトルも広い温度範囲で実験と合っている。彼らの決定したサイトエネルギーが正しいとすると、図5に示した二つの長波長 Chl、Chl695 は CP47に結合する29番のChl (LoIIらの命名¹⁶⁾) に対応することとなる。Chl129の近くにはカロテノイドが位置し、また光化学系IIのダイマー内ではChlZとの距離も近くにある。前節に説明した仮説に矛盾しない結果であると言える。

以上のように決定されたCP43、CP47に結合するChlのサイトエネルギーであるが、これらは吸収やCDなどの定常的な光学スペクトルを再現できただけにすぎず、必ずしもその信頼性が高い訳ではない。そこで、決定されたサイトエネルギーで蛍光スペクトルの時間変化をシミュレーションし、それが実験と合っているかを検証することは決定されたサイトエネルギーの信頼性を評価する上で非常に重要となる。時間分解蛍光スペクトルのシミュレーション結果の詳細については、現在筆者が執筆中の論文に譲るが、概ねよい一致を示しているとだけここでは述べておく。

さて、光化学系IのChlのサイトエネルギーであるが、その決定には未だ大きな研究の進展はない。光化学系IIの場合と同様に遺伝的アルゴリズムを用いたサイトエネルギーの決定の報告はあるが¹⁷⁾、96個もの多数のChlを結合しているため信頼性の高い結果は期待できない。Red Chl の同定も、これまで多くの Red Chl 候補の報告はあるがどれも決定的とは言えない。これまでに報告された Red Chl の候補の多くは、強い励起子相互作用による大きな長波長シフトが期待されるChlの2量体や3量体であり、ほとんどは理論的な

計算結果に基づいている。筆者らは、フェムト秒の時間分解蛍光測定の結果から Red Chl の候補を提案している。当然、自分の提案する候補が実験結果に基づいているので最も信頼性が高いと考えているが、まだまだ断言できる状況ではない。Chl周囲のタンパク質環境を適切に考慮した量子化学計算により、励起状態のエネルギーが精度高く計算できるようになれば、もっと信頼性の高い光化学系Iのサイトエネルギー決定に至るかもしれない。

謝辞

名古屋大学理学研究科物質理学専攻 野口巧教授には、本誌へ出版する機会を与えていただきました。岡山大学自然科学研究科の沈建仁教授、大阪市立大学複合先端研究機構 川上恵典博士には、光化学系II標品を提供いただきました。その他、名古屋大学理学研究科光生体エネルギー研究室に在籍された方々の努力があり、本研究成果を挙げることができました。これらの方々に対して、ここに感謝の意を表します。

Received November 10, 2011, Accepted November 11, 2011, Published December 31, 2011

参考文献

1. Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J. R., Kamiya, N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9Å. *Nature* 473, 55-61.
2. Shibata, Y.; Yamagishi, A.; Kawamoto, S.; Noji, T.; Itoh, S. (2010) Kinetically Distinct Three Red Chlorophylls in Photosystem I of *Thermosynechococcus elongatus* Revealed by Femtosecond Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy at 15 K. *J. Phys. Chem. B* 114, 2954-2963.
3. Komura, M.; Shibata, Y.; Itoh, S. (2006) A new fluorescence band F689 in photosystem II revealed by picosecond analysis at 4–77 K: Function of two terminal energy sinks F689 and F695 in PS II. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 1657-1668.
4. Pålsson, L. O.; Dekker, J. P.; Schlodder, E.; Monshouwer, R.; van Grondelle, R. (1996) Polarized site-selective fluorescence spectroscopy of the long-wavelength emitting chlorophylls in isolated Photosystem I particles of *Synechococcus elongatus*. *Photosyn. Res.* 48, 239-246.

5. Rätsep, M.; Johnson, T. W.; Chitnis, P. R.; Small, G. J. (2000) The Red-Absorbing Chlorophyll a Antenna States of Photosystem I: A Hole-Burning Study of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and Its Mutants. *J. Phys. Chem. B* 104, 836-847.
6. Zazubovich, V.; Matsuzaki, S.; Johnson, T. W.; Hayes, J. M.; Chitnis, P. R.; Small, G. J. (2002) Red antenna states of photosystem I from cyanobacterium *Synechococcus elongatus*: a spectral hole burning study. *Chem. Phys.* 275, 47-59.
7. Karapetyan, N. (2008) Protective dissipation of excess absorbed energy by photosynthetic apparatus of cyanobacteria: role of antenna terminal emitters. *Photosynth. Res.* 97, 195-204.
8. Byrdin, M.; Rimke, I.; Schlodder, E.; Stehlik, D.; Roelofs, T. A. (2000) Decay Kinetics and Quantum Yields of Fluorescence in Photosystem I from *Synechococcus elongatus* with P700 in the Reduced and Oxidized State: Are the Kinetics of Excited State Decay Trap-Limited or Transfer-Limited? *Biophys. J.* 79, 992-1007.
9. Kitajima, Y.; Noguchi, T. (2006) Photooxidation Pathway of Chlorophyll Z in Photosystem II as Studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biochemistry* 45, 1938-1945.
10. Schweitzer RH, Melkozernov AN, Blankenship RE, Brudvig GW (1998) Time-resolved fluorescence measurements of photosystem-II: The effect of quenching by oxidized chlorophyll Z. *J Phys Chem B* 102, 8320-8326.
11. Groot, M. L., Pawlowicz, N. P., van Wilderen, L. J. G. W., Breton, J., van Stokkum, I. H. M., and van Grondelle, R. (2005) Initial electron donor and acceptor in isolated Photosystem II reaction centers identified with femtosecond mid-IR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 13087-13092.
12. Holzwarth, A. R., Müller, M. G., Reus, M., Nowaczyk, M., Sander, J., and Rögner, M. (2006) Kinetics and mechanism of electron transfer in intact photosystem II and in the isolated reaction center: Pheophytin is the primary electron acceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 6895-6900.
13. Raszewski, G., Saenger, W., and Renger, T. (2005) Theory of Optical Spectra of Photosystem II Reaction Centers: Location of the Triplet State and the Identity of the Primary Electron Donor. *Biophys. J.* 88, 986-998.
14. Raszewski, G., and Renger, T. (2008) Light Harvesting in Photosystem II Core Complexes Is Limited by the Transfer to the Trap: Can the Core Complex Turn into a Photoprotective Mode? *J. Am. Chem. Soc.* 130, 4431-4446.
15. Adolphs, J., and Renger, T. (2006) How proteins trigger excitation energy transfer in the FMO complex of green sulfur bacteria. *Biophys. J.* 91, 2778-2797.
16. Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., and Biesiadka, J. (2005) Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* 438, 1040-1044.
17. Brüggemann, B., Sznee, K., Novoderezhkin, V., van Grondelle, R., and May, V. (2004) Modeling exciton dynamics in the photosynthetic antenna PS1. *J Phys Chem B* 108,13536-13546.

Toward Structure-Based Understanding of Light-Harvesting Dynamics in Photosynthesis Antenna Apparatuses

Yutaka Shibata*

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University

報告記事

若手の会活動報告

～第五回セミナー開催、サイエンスアゴラ2011出展、新幹事～

東京大学 大学院総合文化研究科
成川 礼

10月22-23日にかけて、若手の会第五回セミナー『新しい光合成研究の開拓』を東京大学本郷キャンパスにて開催し、35名近くの参加がありました。初日は参加者全員の自己・研究紹介と「太栄館」での懇親会を行いました。初日の夕方と二日目には、理論研究、人工光合成など様々な分野での先端研究に焦点を当てたセミナーを行いました。詳細は、野地智康さん（名古屋工業大学）にご執筆いただいた参加報告記事をご覧ください。これまで、若手の会は研究者コミュニティにおける研究交流活性化に努めてきました。セミナーも五回目を迎え、MLなどを介した研究交流も活発であり、若手の会設立の第一目標は達したといえます。光合成の研究分野をさらに発展していくには、コミュニティ内部の活性化に留まらず、アウトリーチ活動を介した一般社会との対話的交流が必要であると考えています。そこで、若手の会が次の段階へと移行するきっかけとして、サイエンスアゴラ2011に若手の会として出展しました。その報告記事も掲載されていますので、あわせてご覧ください。また、若手の会設立当初より幹事としてご活躍いただいた原田二郎さん（久留米大学）と鈴木博行さん（元東京理科大学）が、6月と10月にそれぞれ幹事を辞退され、後任として、浅井智広さん（名古屋大学、6月～）、辻敬典さん（筑波大学、10月～）、川上恵典さん（大阪市立大学、10月～）が新たに参画することになりました。



セミナーの集合写真

光合成学会若手の会第五回セミナーに参加して

名古屋工業大学

野地 智康

第5回光合成学会若手の会が東京大学本郷キャンパスで、10月22-23日に行われました。この会の事は、以前から聞いていたのですが、参加したのは初めてでした。会は参加者全員の自己紹介と研究紹介から始まりました。発表時間は選べたので、自由な発想でユニークな発表ができ、笑う場面も多数ありました。特に、通常の学会とは異なり、普段聞けないような裏話まで含めた発表にはユーモアがあり、和やかな雰囲気の中で研究紹介を聞き、自分の専門分野以外の研究にも興味を持つ事ができました。各個人の個々の形式で研究発表ができたこともあり、個人の研究に対する熱心さや、興味の対象などがわかりました。

約35名の参加者それぞれの研究はどれも異なり、光合成の研究が非常に多岐に渡っている事がわかりました。若手の会は他分野の専門家が集ういい機会であると思い知らされました。これらの研究紹介を通して、私自身の研究方法も見直しが必要であると痛感させられたり、あるいは、新しい研究テーマ、技術、知識から、自分の研究に活かさないかと考えながら発表を聞き、楽しむ事ができました。中でも、「なぜこうなったかよくわからない」といったデータを見せられたときの印象が強く、興味をそそられました。このような発表形式のため、聴衆側も刺激を受け、活発な議論ができたのだと思います。他に類が無いこの会の重要性和魅力を強く感じました。また、自身の研究と向き合う良い機会だと思いますので、学部生から博士課程の方々にこの会に積極的に参加されることを勧めます。

1日目の夕方から、最初の講演者、小杉 真貴子博士が「共生によって強化される乾燥耐性機構 ～地衣類研究の面白さについて～」を発表されました。地衣類は真菌と光合成生物の共生生物で、共生時のみ光合成の乾燥耐性を獲得でき、単離してしまうと藻類

の乾燥耐性が失われる事から、消光因子が菌類によってもたらされる、という事を発表されました。地衣類の水抽出成分分析と分光学的解析から、菌類の代謝産物であるアラビトールが乾燥誘導性の光阻害防御機構を促進している事をご報告されました。この発表の中で、地衣類の個々の独特な外形が光捕集について有利かどうかについての議論があり、共生する事で固有の形状を取るならば、また新しい研究につながるのではないかと、個人的に関心を持ちました。

1日目のプログラムが終了した後、懇親会の会場に向かいました。懇親会と宿が同じ場所であったので、好きなだけ談笑できました。これも、若手の会の魅力だと思います。

2日目は齊藤 圭亮博士の発表「光合成の理論研究の実際～蛋白質構造に基づいた計算によってわかること～」から始まりました。光化学系Iと光化学系IIの反応中心の中心クロロフィル二量体の正電荷分布の起源について、理論的な解析を分かりやすく発表されました。色素同士の相互作用、および周辺アミノ酸残基との相互作用を使って制御された反応中心のIとIIの精巧さは、このような理論的解析から詳細に理解できるがわかりました。理論解析の強みを再認識されました。また、発表の最後のメッセージが印象的で、「精度の高い実験結果の下に理論解析が可能」という事と、齊藤博士の実験家への敬意から、実験と理論の両方から光合成の研究は発展するだろうと期待できました。

塚谷 祐介博士は「「門」レベルで新規な光合成細菌“*Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*”の酸素耐性光化学系1型反応中心と光捕集アンテナ複合体」についての発表をされました。この光合成細菌はイエローストーン国立公園(米国モンタナ州)の温泉微生物マットから発見されたもので、酸素飽和状態下

でも酸素に弱いはずの系I型反応中心をもつ新奇の生物である事を報告されました。反応中心の分光化学的解析から、これまでの反応中心と少し異なり、「真のB840」かもしれないという話しが印象的で、非常に面白く、終始興味を持って聞きました。新しい事がわかったら是非聞いてみたいと思い、今後の研究が楽しみです。

私は「光化学系I, IIを利用した半人工光合成ナノデバイスの研究の問題と現状」について、発表しました。実用的な人工光合成のために、現存の光化学系I, IIに要求される改善点と、現在の水素発生のための応用研究についての話をしました。光化学系I, IIを安定に固定化させる新しい技術として、nmサイズの穴が空いているシリカ細孔内部に固定化する方法と金ナノ粒子表面上に固定化する方法を報告しました。発表の後、多様なアドバイスを多くの研究者から頂き、非

常に有意義な時間を過ごせました。この場をお借りして、お礼を申し上げます。

最後の講演者は宮澤 真一博士で「イネ独自の代謝酵素、葉緑体型PEPCの発見と機能解析」を発表されました。PEPCは有機酸をクエン酸回路に供給する酵素として、細胞質に存在する事が知られていましたが、葉緑体にもPEPCが存在している事が発見されました。この「葉緑体型PEPC」が地上部のアンモニア同化に関与している事を究明されました。また、植物の進化や高等植物の代謝に関して、全くの素人であった私でも理解できるような発表だったので、大変勉強になりました。

以上、最後にこの場をお借りして、若手の会の会長、成川先生をはじめ若手の会のメンバー全員に、発表の機会と報告執筆の機会を与えて下さった事に感謝致します。

報告記事

サイエンスアゴラ2011報告書 —サイエンスカフェ

「光と植物の不思議 —光合成研究の今と未来—」を出展して—

¹自然科学研究機構 基礎生物学研究所

²名古屋大学 理学研究科

³大阪府立大学 大学院 理学系研究科

⁴東京大学 大学院 総合文化研究科

¹大西 紀和、²浅井 智広、³岡島 公司、⁴成川 礼

サイエンスアゴラへの参加・出展の背景

“（世界）2位じゃダメなんですか？”

2009年の事業仕分けにおけるこの発言は、研究というものに対する理解が、国を動かす国会議員にさえも十分に得られていないことを表しており、国会議員が行政における国民の代表であることを考えると、“国民からは研究について理解を得られていない”と見ることもできる。理解が得られていないことについては様々な理由が考えられるが、私たち研究者

の国民へ向けての情報発信が不十分であったことも、理由の一つとして挙げられるであろう。

私たちの研究費は、多くの場合文部科学省や日本学術振興会、科学技術振興機構など国の機関から振り分けられたものであり、従って元手はすべて国民が支払っている税金である。私たち研究者は、スポンサーである国民に対して私たちの行っている研究について説明をする義務があり、また国民の側には知る権利があるはずである。

そういった問題意識の中、私たち光合成学会若手の会のメンバーは、去る11月18~20日に日本科学未来館においてJST主催のもと開催された、“サイエンスアゴラ2011”に出展者として参加した。サイエンスアゴラは、生命科学のみでなくあらゆる分野（宇宙科学、エレクトロニクス、医療科学など）の科学者が集まり、来場した一般の方々と研究の説明や対話を通してコミュニケーションを取り、サイエンスに関する考えを共有したり深めたりすることを目的として開かれる。私たちは、専門知識を持っていない、あるいは少ない人たちが“光合成の研究”をどの程度知っているのか、どういったイメージを持っているのかを知るべく、またそういった人たちに光合成の重要性も知ってもらうために出展し、セミナーと展示、簡単な実験を行った。

出展のコンセプトと実施内容

今回の出展は、来場者が抱いているであろう“光合成って何? ”、“どんな研究をしているの? ”、“なぜ植物には光が大切なの? ”、“私たちの生活にどう結びつくの? ”などの素朴な疑問を、研究者との対話や実験、資料を通して光合成研究に触れることで解決して光合成の面白さや重要性を実感してもらえよう行った。一方で研究者側は、光合成研究に社会が何を求めているかを理解し、光合成研究に対するイメージや意見を取り込んでいくことを念頭に置いた。

割り振られた90分の時間を二部に分け、まず第一部ではおよそ30分のセミナーを行い（担当：大西紀和）、光合成が私たちの命と生活を支えていること、地球環境の変遷に貢献してきたこと、光合成の仕組み、これを利用した新エネルギー創出の試みなどについて説明した。

第二部では以下のようなテーマに従って実験・展示ブースを用意し、来場者に実験の体験等を通して光合成研究に触れてもらった。

1) 光の吸収による酸素の発生と二酸化炭素の吸収

光合成反応では、色素によって吸収した光エネルギーを化学エネルギーに変換する。その反応過程で酸素を発生し、二酸化炭素を固定することを知ってもらった。

実験1：薄層クロマトグラフィによる光合成色素の分離（担当：浅井智広）。色の異なるいくつかの光合成生物から色素を抽出・分離することで、光合成生物が様々な色素を持っていることを示した。

実験2：水草からの酸素の泡の放出と二酸化炭素の吸収によるpH変化の可視化（担当：成川礼）。プロモチモールブルーを含んだ水道水（青色、アルカリ性）は、呼吸を吹き込むことで緑色（中性）を呈する。そこにオオカナダモを入れて、緑色光または赤色光を照射すると、赤色光を照射したサンプルで有意に青色に戻るのが確認できた。これにより、赤色光により光合成が行われ、二酸化炭素が吸収されたことを可視化した。



セミナーの様子

2) 光による糖の合成

光合成で獲得した化学エネルギーは“糖”という形で植物体内に蓄積されることについて、理解を深めてもらった。

実験：葉で合成されたデンプンの染色による観察（担当：大西紀和）。光を当てた葉の抽出物をコーヒーフィルターに写し取り、漂白した後にヨウ素液により染色した。抽出物が写った箇所が青紫色に染色され、光合成により糖が合成・蓄積されたことを可視化した。

3) 光情報の感知

光合成生物にとって、光はエネルギーであると同時に最重要な情報であることを知ってもらい、光を情報として利用するメカニズムについて解説した。

実験：光合成タンパク質と光受容体に対する光照射実験（担当：成川礼）。光合成タンパク質と光受容体に光を照射すると、前者は色が変わらなかったが、後者は色が変わった。これにより、両者の性質と役割の違いを明確に提示した。

4) 応用研究

震災により、さらに期待が高まっている光合成によるバイオマス生産や人工光合成の研究について、実際に行っている研究者が最新の研究を紹介した。(展示担当：岩井雅子)

5) 研究で扱っている光合成生物

来場者に、顕微鏡によって光合成生物を実際に観察してもらい、観察と研究者の解説を通じて、光合成生物(光合成細菌、シアノバクテリア、真核藻類、地衣類、陸上植物)の多様性を知ってもらった。(展示担当：岡島公司)。

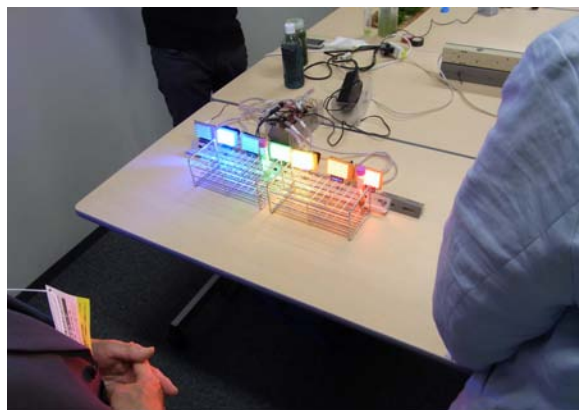
上記の実験、展示に加え、光合成について簡単に解説した小冊子を来場者に配布し、光合成と光合成研究に関する理解を深めてもらった。



左：実験全体の様子、右上：紅葉した葉をすりつぶしている様子、右下：分離の様子

来場者の意識とアウトリーチ活動の課題

当日は悪天候であったにも関わらず、30人を越える来場者があった。そのうち20名ほどがアンケートに答えて下さったが、全員からイベントの内容に関して“非常に満足した”または“満足した”という回答を頂いた。“次回も期待している”との声も多く、初の試みにしてはおおむね成功であったと思われる。



オオカナダモに緑色光と赤色光を照射している様子

当然のことではあるが、課題もいくつか明らかになった。最も大きな課題として残されたのは、光合成や研究に関する言葉の使い方や説明の仕方ではないかと思う。アンケートに答えて下さった方のうち、3分の1からは“言葉が難しかった”または“説明がやや難しかった”という回答を頂いた。アウトリーチ活動は、決して専門家の“知識のお披露目の場”ではなく、専門知識の少ない人にも知ってもらい、理解してもらうことが重要だ。わかり易く解説したつもりでも、やはりまだ十分理解してもらうには至っておらず、今後言葉の使い方を考えていく必要があることを認識さ



左：実験の様子、右：漂白、染色後の様子

せられた。しかしながら、一方では“光合成の奥の深さを感じた”などの回答もあり、光合成が重要であることや、かなり複雑なものであり、そう簡単に人工的に作れるものではない、というような大まかなイメージは掴んでもらえたようであった。また、“実験をもっとやってみたかった”という声も多かったので、今回の経験を活かして次回は出展の方法や、時間配分をより綿密に練る必要があるだろう。

私たち研究者の側にとって大きな収穫の一つは、一般の方の光合成に対する意識を垣間見ることがで



光受容体に光を照射している様子

きたことであろう。来場者の中には、光合成に関する(研究者向けではなく)一般向けのセミナーやサイエンス・カフェが開催されるのを待っていた、とい

う方もいた。私たち研究者が思っている以上に光合成について興味を持っている人は多いようであり、HPに情報をアップしての情報発信だけでなく、一般向けのセミナーなども必要であることを認識させられた。理想的には、科学全般に言えることかもしれないが、光合成や光合成研究にいつでも誰でも触れられる、あるいは楽しめるような環境を用意できれば、より一般の方と科学者の距離を縮めることができるのではないと思う。



顕微鏡による観察の様子



展示した光合成生物の様子（左：褐藻、シアノバクテリア、地衣類、右：光合成細菌）

他の出展者の方、すなわち“科学を広める立場にいるが光合成については専門知識が少ない人”の光合成に対する意識も知る事ができた。19日の夕刻に開かれた出展者交流会で知り合った他の展示ブースの方か



配布した小冊子

らは、“光合成を簡単に楽しく子供たちにも伝えたいけど、説明するのがなかなか難しい”との声も頂いた。一般だけでなく、こういった方々を対象にセミナー、あるいは勉強会を開いて、光合成について広く知ってもらうのも必要なのではないだろうか。子供むけにやさしく解説した本を出版する、というのは、究極的なアウトリーチの一つかもしれない。

アウトリーチの方法としても、私たち専門家は説明から入ろうとするが、実際には大して興味の無い人はその説明にすら耳は傾けない。興味を持ってもらう戦略も、今後真剣に考えていく必要がある。他の展示ブースについては少し見て回っただけであったが、参考になる展示が多くあった。親しみ易いイラストや写真を展示するのは定石といった感じで、模型を作る場合でもゴムボールを使ったりと、身近に感じられるような様々な工夫が見られた。逆に“最先端”を感じてもらうために、専門的な機械を置いているブースもあった。印象的だったのは、科学の面白さを伝えるには何か視覚的にインパクトのあるもの、美しいものでちょっとした感動を与えることが必要だ、と話してくださった出展者の方で、回せば月が満ち欠けするのが見える不思議な独楽を見せてくれた。確かに、私たちが科学者を目指した根底には、子供のころに、例えば夕焼けや虹がきれいだとか、どうしてアサガオは必ず朝に綺麗な花を咲かせるのだろうか、そういったものに感動して、それがどうやって起こっているのだろうか？と不思議に思い、考えたことがあるように思う。私たちが自分たちの研究に興味を持ってもらい、知ってもらうためには、“初心を思い出す”ための発想の転換が必要であるように思う。

研究者側の意識改革が必要

アウトリーチ活動は研究者側にどんなメリットがあるのかについて、疑問に思われる方もいるかもしれない。研究に使う時間を抑えてまでアウトリーチに時間と労力を割いて、研究者側にどんなフィードバックがあるのか？直接的な事としては、一般の人の生の声を聞くことで、光合成研究への具体的なニーズを知ることができ、研究の方向性を考える上で役立てることができる、ということが挙げられるだろう。場合によっては専門的でない、固定観念に捕われない視点からの意見は、発想の転換や、時として大きな発見をも導くかもしれない。また、専門知識の少ない人

と対話をしながら説明することで、自分の研究に対する理解、重要性の位置づけなどを再認識することができ、これまで以上に自分の中で消化し、次の研究につなげていくことも期待できる。あるいは、そういった論理的なことは考えずとも、“光合成研究に期待している”という声を直接聞くことは、少なからず私たちの研究に対するモチベーションを上げてくれるはずだ。

最初に述べた説明義務の観点から考えれば、私たちの研究の重要性がきちんと世間一般に浸透していれば研究に対する不信感が生まれることはなく、研究費削減の危機に晒される心配はない。かつては“研究者は何をやっているかよくわからないけど、研究だから”というような理由で特別扱いされていたかもしれないが、今は“研究者って何をしているの?”という目が私たちにしっかりと向けられた状況になってきている。従って、時間はかかったとしても私たちの研究の重要性を説明することは、今後ますます必要になってくるに違いない。

アウトリーチ活動を行ったとしても、それが論文や招待講演などのような業績として認められるシステムが十分整備されていないことは、大きな問題の一つである。上記のような観点からアウトリーチ活動の利点や重要性を十分に把握した上で、私たち研究者自身の意識も変えていくことは、後継者を育てる、あるいは研究を発展させていくためには必須であると考えられる。“日本が世界的に科学の発展に貢献していることを国会議員が理解していない”とか、“メディアで間違ったことが報道されている”などと嘆く前に、私たちがすべきことをしかるべき手段で、少しずつでも実行していかなければならない時期が訪れていると感じている。

今回実施したアンケート結果の詳細については、若手の会HPに掲載を予定しているのので、参考にして頂きたい。また、本会からの援助により印刷した小冊子は、来場者の方々から好評を頂いた。小冊子はPDF

化して、若手の会HPから無料でダウンロードできるようにすることを予定しており、アウトリーチ活動に活用して頂きたい。今後もこのように、本会と連携してアウトリーチ活動を継続して行っていくことができれば、光合成研究の将来的な発展につながるのではないかと思う。

謝辞

今回の出展にあたっては、多くの方に支援して頂きました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

後援：日本光合成学会

・小冊子制作協力

浅井（山田）歩（化学同人）、蘆田弘樹（奈良先端科学技術大学院大学）、岩井雅子（東京工業大学）

・写真・動画提供

中山剛（筑波大学）、和田正三（九州大学）、野地智康（名古屋工業大学）、今村壮輔（中央大学）、広瀬侑（豊橋技術科学大学）

・実験器具提供

高市真一（日本医科大学）、渡辺雄一郎（東京大学）、池内昌彦（東京大学）、福島佳優（名古屋大学）

・生物試料提供

小杉真貴子（国立極地研究所）、辻敬典（筑波大学）、原田二郎（久留米大学）

・資料提供

柏山祐一郎（立命館大学）、蘆田弘樹（奈良先端科学技術大学院大学）、野地智康（名古屋工業大学）

・運営スタッフ

渡邊麻衣（東京大学）、原田二郎（久留米大学）、小杉真貴子（国立極地研究所）、岩井雅子（東京工業大学）、辻敬典（筑波大学）、大島由衣（東京工業大学）、溝上祐介（東京大学）、田村洵也（東京大学）、榎本元（東京大学）、吉野宏明（東京大学）

以上、敬称略（順不同）

事務局からのお知らせ

2011年6月4日総会において報告しました会員数の動向および承認を受けました決算です。

1. 会員数動向

2010年12月末日の会員数

個人会員	413(405)
賛助会員	8(8)
計	421(413)

()内は2009年12月末の会員数

入退会者数

入会	個人会員	44
	賛助会委員	0
	計	44
退会	個人会員	36
	賛助会委員	0
	計	36

2. 決算報告

収入の部

年会費	¥1,104,500
第1回年会シンポジウム企業出展料 (2社)	¥100,000
第1回年会シンポジウム余剰金	¥57,685
計	¥1,262,185

第1回年会シンポジウム収支決算

収入	第1回年会シンポジウム準備金	¥100,000
	計	¥100,000
支出	学会講演要旨集製本代	¥42,000
	同振込手数料	¥315
	余剰金を学会に返却	¥57,685
	計	¥100,000
収支	¥0	

2010年日本光合成学会収支決算

収入の部 合計	¥1,262,185
支出の部 合計	¥1,254,957
差額 (次年度繰越金)	¥7,228

支出の部

会報印刷代 (2009年12月号)	¥302,557
会報印刷代 (2010年4月号)	¥266,017
会報印刷代 (2010年8月号)	¥416,283
会報発送代	¥90,480
光合成研究法送料 (東大>京大)	¥1,470
振込手数料	¥5,775
振込書印字サービス代	¥1,400
封筒印刷代	¥26,775
プリンタラベル	¥4,200
第1回年会シンポジウム準備金	¥100,000
光合成学会若手の会補助金	¥30,000
日本光生物学会平成22年度会費	¥10,000
計	¥1,254,957

★入会案内

本会へ入会を希望される方は、会費（個人会員年会費：¥1,500、賛助法人会員年会費：¥50,000）を郵便振替（加入者名：日本光合成学会、口座番号：00140-3-730290）あるいは銀行振込（ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキョウと入力)、当座、0730290 名前：ニホンコウゴウセイガクカイ）にて送金の上、次ページの申し込み用紙、または電子メールにて、氏名、所属、住所、電話番号、ファックス番号、電子メールアドレス、入会希望年を事務局までお知らせください。

★会員名簿管理方法の変更と会費納入のお願い

学会の運営は、皆様に納めていただいております年会費によりまかなわれております。昨年度、会費滞納者を名簿から削除するの願いをいたしました。当該年度の会費が未納の場合、光合成研究が送られてくる封筒に、会費未納が印字されています。ご都合のつくときに、会費を納入下さい。1年間会費を滞納された場合、次年度よりお名前が会員名簿から削除され、光合成研究は届かなくなります。再入会される場合は、未納の分もあわせてお支払いいただきます。2011年1月に名簿の変更を行いましたので、複数年度の会費滞納者はおられなくなりました。会費納入状況などにつきましては、ご遠慮なく事務局 (shikanai@pmg.bot.kyoto-u.ac.jp) までお問い合わせください。会員の皆様のご理解とご協力をお願い申し上げます。

日本光合成学会会員入会申込書

平成 年 月 日

日本光合成学会御中

私は日本光合成学会の趣旨に賛同し、平成 年より会員として入会を申し込みます。

]内に会員名簿上での公開承諾項目に○印をつけてください

] 氏名 (漢字) (必須)

氏名 (ひらがな)

氏名 (ローマ字)

] 所属

] 住所1

〒

] 住所2 (自宅の方または会誌送付先が所属と異なる場合にのみ記入)

〒

] TEL1

] TEL2 (必要な方のみ記入)

] FAX

] E-mail

個人会員年会費 1,500円 (会誌、研究会、ワークショップなどの案内を含む)

賛助法人会員年会費 50,000円 (上記と会誌への広告料を含む)

(振込予定日：平成 年 月 日) (会員資格は1月1日～12月31日を単位とします)

*複数年分の会費を先払いで振り込むことも可能です。その場合、通信欄に(何年度～何年度分)とお書き下さい。

連絡先

〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1

東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

池内・成川研究室内 日本光合成学会

TEL: 03-5454-6641, FAX: 03-5454-4337

E-mail: photosyn@bio.c.u-tokyo.ac.jp

ホームページ: <http://photosyn.c.u-tokyo.ac.jp>

郵便振替口座 加入者名：日本光合成学会 口座番号：00140-3-730290

銀行振込の場合 ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキョウと入力)、当座、0730290

名前：ニホンコウゴウセイガツカイ

日本光合成学会会則

第1条 名称

本会は日本光合成学会（The Japanese Society of Photosynthesis Research）と称する。

第2条 目的

本会は光合成の基礎および応用分野の研究発展を促進し、研究者相互の交流を深めることを目的とする。

第3条 事業

本会は前条の目的を達成するために、シンポジウム開催などの事業を行う。

第4条 会員

1. 定義

本会の目的に賛同する個人は、登録手続を経て会員になることができる。また、団体、機関は、賛助会員になることができる。

2. 権利

会員および賛助会員は、本会の通信および刊行物の配布を受けること、本会の主催する行事に参加することができる。会員は、会長を選挙すること、役員に選出されることことができる。

3. 会費

会員および賛助会員は本会の定めた年会費を納めなければならない。

第5条 組織および運営

1. 役員

本会の運営のため、役員として会長1名、事務局長1名、会計監査1名、常任幹事若干名をおく。役員任期は2年とする。会長、常任幹事は連続して二期を越えて再任されない。事務局長は五期を越えて再任されない。会計監査は再任されない。

2. 幹事

幹事数名をおく。幹事任期は4年とする。幹事の再任は妨げない。

3. 常任幹事会

常任幹事会は会長と常任幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。常任幹事会は本会の運営に係わる事項を審議し、これを幹事会に提案する。事務局長と会計監査は、オブザーバーとして常任幹事会に出席することができる。

4. 幹事会

幹事会は役員と幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。幹事会は、常任幹事会が提案した本会の運営に係わる事項等を審議し、これを決定する。

5. 事務局

事務局をおき、事務局長がこれを運営する。事務局は、本会の会計事務および名簿管理を行う。

6. 役員および幹事の選出

会長は会員の直接選挙により会員から選出される。事務局長、会計監査、常任幹事は会長が幹事の中から指名し、委嘱する。幹事は常任幹事会によって推薦され、幹事会で決定され

る。会員は幹事を常任幹事会に推薦することができる。

第6条 総会

1. 総会は会長が招集し、出席会員をもって構成する。議長は出席会員から選出される。
2. 幹事会は総会において次の事項を報告する。
 - 1) 前回の総会以後に幹事会で議決した事項
 - 2) 前年度の事業経過
 - 3) 当年度および来年度の事業計画
3. 幹事会は総会において次の事項を報告あるいは提案し、承認を受ける。
 - 1) 会計に係わる事項
 - 2) 会則の変更
 - 3) その他の重要事項

第7条 会計

本会の会計年度は1月1日から12月31日までとする。当該年度の経理状況は、総会に報告され、その承認を受ける。経理は、会計監査によって監査される。本会の経費は、会費および寄付金による。

付則

- 第1 年会費は個人会員1,500円、賛助会員一口50,000円とする。
- 第2 本会則は、平成14年6月1日から施行する。
- 第3 本会則施行後第一期の会長、事務局長、常任幹事にはそれぞれ、第5条に定める規定にかかわらず、平成14年5月31日現在の会長、事務局担当幹事、幹事が再任する。本会則施行後第一期の役員および幹事の任期は、平成14年12月31日までとする。
- 第4 本会則の改正を平成21年6月1日から施行する。

日本光合成学会の運営に関する申し合わせ

1. 幹事会：

幹事は光合成及びその関連分野の研究を行うグループの主催者である等、日本の光合成研究の発展に顕著な貢献をしている研究者とする。任期は4年とするが、原則として再任されるものとする。
2. 事務局：

事務局長の任期は2年とするが、本会の運営を円滑に行うため、約5期（10年）を目途に再任されることが望ましい。
3. 次期会長：

会長の引き継ぎを円滑に行うため、次期会長の選挙は任期の1年前に行う。
4. 常任幹事会：

常任幹事会の運営を円滑におこなうため、次期会長は常任幹事となる。

幹事会名簿

秋本誠志*	神戸大学大学院理学研究科	園池公毅	早稲田大学教育学部
浅田浩二	京都大学	高市真一	日本医科大学生物学教室
池内昌彦	東京大学大学院総合文化研究科	高橋裕一郎	岡山大学大学院自然科学研究科
池上 勇	帝京大学	田中 歩	北海道大学低温科学研究所
泉井 桂	近畿大学生物理工学部生物工学科	田中 寛*	東京工業大学資源化学研究所
伊藤 繁	名古屋大学	民秋 均*	立命館大学総合理工学院
井上和仁	神奈川大学理学部	都筑幹夫	東京薬科大学生命科学部
白田秀明	帝京大学医学部	出羽毅久*	名古屋工業大学大学院工学研究科
榎並 勲	東京理科大学	寺島一郎	東京大学大学院理学系研究科
遠藤 剛*	京都大学大学院生命科学研究科	徳富(宮尾)光恵	農業生物資源研究所
大岡宏造	大阪大学大学院理学研究科		光合成研究チーム
大杉 立	東京大学大学院農学生命科学研究科	鞆 達也	東京理科大学理学部
太田啓之	東京工業大学	仲本 準*	埼玉大学大学院理工学研究科
	バイオ研究基盤支援総合センター	永島賢治*	首都大学東京大学院理工学研究科
大友征宇*	茨城大学理学部	南後 守	大阪市立大学大学院理学研究科
大政謙次	東京大学大学院農学生命科学研究科	西田生郎	埼玉大学大学院理工学研究科
小川健一	岡山県農林水産総合センター	西山佳孝	埼玉大学大学院理工学研究科
	生物科学研究所	野口 巧	名古屋大学理学研究科
小野高明	茨城大学工学部生体分子機能工学科	長谷俊治	大阪大学蛋白質研究所
小俣達男	名古屋大学大学院生命農学研究科	林 秀則	愛媛大学
垣谷俊昭	名古屋大学		無細胞生命科学工学研究センター
菓子野康浩*	兵庫県立大学理工学部	原登志彦	北海道大学低温科学研究所
金井龍二	埼玉大学	彦坂幸毅	東北大学大学院生命科学研究科
神谷信夫*	大阪市立大学大学院理学研究科	久堀 徹	東京工業大学資源化学研究所
熊崎茂一*	京都大学大学院理学研究科	日原由香子*	埼玉大学大学院理工学研究科
栗栖源嗣*	大阪大学蛋白質研究所	檜山哲夫	埼玉大学
小池裕幸	中央大学理工学部	福澤秀哉	京都大学大学院生命科学研究科
小林正美	筑波大学大学院数理物質科学研究科	藤田祐一	名古屋大学大学院生命農学研究科
坂本 亘	岡山大学資源生物科学研究所	前 忠彦	東北大学
櫻井英博	早稲田大学	牧野 周	東北大学大学院農学研究科
佐藤和彦	兵庫県立大学	増田真二*	東京工業大学
佐藤公行	岡山大学		バイオ研究基盤支援総合センター
佐藤直樹	東京大学大学院総合文化研究科	増田 建	東京大学大学院総合文化研究科
佐藤文彦	京都大学大学院生命科学研究科	松浦克美	首都大学東京都市教養学部
鹿内利治	京都大学大学院理学研究科	松田祐介*	関西学院大学理工学部
重岡 成	近畿大学農学部	真野純一*	山口大学農学部
篠崎一雄*	理化学研究所植物科学研究センター	皆川 純	基礎生物学研究所
島崎研一郎	九州大学大学院理学研究院	宮下英明*	京都大学大学院地球環境学堂
嶋田敬三	首都大学東京	宮地重遠	海洋バイオテクノロジー研究所
白岩義博*	筑波大学生物科学系	村田紀夫	基礎生物学研究所
沈 建仁	岡山大学大学院自然科学研究科	山谷知行	東北大学大学院農学研究科
杉浦昌弘	名古屋市立大学	横田明穂	奈良先端科学技術大学院大学
	大学院システム自然科学研究科		バイオサイエンス研究科
杉田 護	名古屋大学遺伝子実験施設	和田 元	東京大学大学院総合文化研究科
杉山達夫	名古屋大学		
鈴木祥弘	神奈川大学理学部		

*平成23年より新幹事

編集後記

早いもので2011年も、もう終わろうとしています。東日本大震災やタイでの大洪水など、自然災害の猛威にさらされた一年であったと言えるかもしれません。私たち学会執行部は2期目の残り1年を向かえ、最終コーナーを回ろうとしています。残された来年1年の学会活動を充実したものにしていければと考えています。今号での若手の会のサイエンスアゴラにおける取り組みや、解説特集「光合成の光エネルギー変換メカニズム —物理学的手法によるアプローチ—」を読んでいると、「光合成」というキーワードの一般の人にとっての親しみやすさと同時に、その精緻な構造に含まれた奥の深さそして難しさを感じます。先端的研究を進めつつ、アウトリーチ活動にも取り組みことは、一見相反するエネルギーが必要にも感じますが、うまく融合することが出来れば、この分野を活性化する新たな手段に成り得ると思います。今後も本学会で取り組んでいくべき活動だと感じました。来年は辰年。登り龍のように、皆様の研究が発展していくことをお祈りしております。良いお年をお過ごしください。

＜東京大学 増田 建＞

記事募集

日本光合成学会では、会誌に掲載する記事を会員の皆様より募集しています。募集する記事の項目は以下の通りです。

- トピックス：光合成及び関連分野での纏まりのよいトピックス的な記事。
- 解説：光合成に関連するテーマでの解説記事。
- 研究紹介：最近の研究結果の紹介。特に、若手、博士研究員の方々からの投稿を期待しています。
- 集会案内：研究会、セミナー等の案内。
- 求人：博士研究員、専門技術員等の募集記事。
- 新刊図書：光合成関係、または会員が執筆・編集した新刊図書の紹介。書評も歓迎いたします。

記事の掲載を希望される方は、会誌編集担当、増田 (ctmasuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp) まで御連絡下さい。

「光合成研究」編集委員会

編集担当 増田 建 (東京大学)
発行担当 和田 元 (東京大学)
編集委員 栗栖源嗣 (大阪大学)
編集委員 野口 航 (東京大学)
編集委員 増田真二 (東京工業大学)

日本光合成学会 2010-2011年役員

会長 池内昌彦 (東京大学)

事務局 鹿内利治 (京都大学)

常任幹事 沈 建仁 (岡山大学) (日本光生物学協会)
常任幹事 和田 元 (東京大学) (会誌担当)
常任幹事 増田 建 (東京大学) (会誌担当)
常任幹事 佐藤直樹 (東京大学) (ホームページ担当)
常任幹事 寺島一郎 (東京大学) (企画担当)
常任幹事 高市真一 (日本医科大学) (企画担当)
常任幹事 小川健一 (岡山県農林水産総合センター生物科学研究所) (企画担当)
常任幹事 西田生郎 (埼玉大学) (企画担当)
常任幹事 小林正美 (筑波大学) (企画担当)
常任幹事 原登志彦 (北海道大学) (企画担当)
常任幹事 牧野 周 (東北大学) (企画担当)
常任幹事 伊藤 繁 (名古屋大学 名誉教授) (企画担当)
常任幹事 太田啓之 (東京工業大学) (企画担当)
常任幹事 皆川 純 (基礎生物学研究所) (企画担当)

会計監査 田中 歩 (北海道大学)

光合成研究 第21巻 第3号 (通巻62号) 2011年12月31日発行

日本光合成学会

〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1

東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

池内・成川研究室 日本光合成学会

TEL: 03-5454-6641, FAX: 03-5454-4337

E-mail: photosyn@bio.c.u-tokyo.ac.jp

ホームページ: <http://photosyn.c.u-tokyo.ac.jp>

郵便振替口座 加入者名: 日本光合成学会 口座番号: 00140-3-730290

銀行振込の場合 ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキョウと入力)、当座、0730290

名前: ニホンコウゴウセイガツカイ