

光合成研究

第 27 卷 第 1 号 (通巻 78 号) 2017 年 4 月
NEWS LETTER Vol. 27 NO. 1 April 2017

THE JAPANESE SOCIETY OF PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

| | | |
|-------------------------------|---|----|
| 集会案内 | 第 8 回日本光合成学会年会・公開シンポジウム開催のお知らせ | 2 |
| トピックス | 植物が安心して光合成できるワケ～PS I を光傷害から護る P700 酸化システム～ 鳴川 銀河 三宅 親弘 (神戸大) | 4 |
| 研究紹介 | 硫化水素を電子供与体とする電子伝達系遺伝子の発現誘導： 転写制御タンパク質 SqrR の同定とその硫化水素応答機構 清水 隆之 (東工大) | 16 |
| 研究紹介 | 光応答素子のための光化学系 I とカーボンナノチューブの複合体形成 二井 大輔 他 (東京理科大) | 22 |
| 解説特集 | 「光化学系の構造・モデル計算から見えてきた光合成反応の妙」 | 31 |
| 序文 | 得津 隆太郎 (基生研) 柏山 祐一郎 (福井工業大) | 32 |
| 解説 | X 線自由電子レーザーを利用したタンパク質高分解能無損傷構造解析 平田 邦生 (理研・放射光科学, JST/CREST) | 33 |
| 解説 | Photosystem II における水素結合ネットワークを介したプロトン移動 斉藤 圭亮 (東京大) | 39 |
| 解説 | 植物の光化学系 I—集光性アンテナ複合体 I 超複合体の結晶構造とエネルギー伝達の構造基盤 菅 倫寛 (岡山大) | 48 |
| 報告記事 | 第 2 回光合成細菌ワークショップ開催報告 原田 二郎 (久留米大) | 55 |
| 集会案内 | 第 73 回藤原セミナー “The 4 th International Conference “Molecular Life of Diatoms” 松田 祐介 (関西学院大) | 57 |
| 集会案内 | 第 8 回国際会議 “Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability -2017” 梶 達也 (東京理科大) | 58 |
| 集会案内 | 第 25 回「光合成セミナー2017：反応中心と色素系の多様性」 秋本 誠志 (神戸大) | 59 |
| 報告記事 | 若手の会の幹事の交代のご報告・新会長からのごあいさつ 浅井 智広 (立命館大) 榎本 元 (東京大) | 60 |
| 事務局からのお知らせ | | 62 |
| 日本光合成学会会員入会申込書 | | 63 |
| 日本光合成学会会則 | | 64 |
| 幹事会名簿 | | 66 |
| 編集後記・記事募集 | | 67 |
| 「光合成研究」編集委員・日本光合成学会 2017 年度役員 | | 68 |
| 賛助法人会員広告 | | |

集会案内

第 8 回日本光合成学会年会および公開シンポジウム

- 日時： 2017 年 5 月 27 日（土）13:00 ～ 28 日（日）15:30
会場： 龍谷大学 瀬田キャンパス（大津市）
<http://www.ryukoku.ac.jp/seta.html>
参加費： 一般（会員）2,000 円、一般（非会員）3,000 円、学生 1,000 円
* 参加費、懇親会費は当日現金支払いです。
懇親会費： 一般 3,000 円、学生 2,000 円
参加申込： HP より参加申込 URL) <https://goo.gl/forms/6P5ICf1Wqktv1ZDQ2>
4 月 10 日～4 月 28 日
発表形式 ポスターおよび口頭（シンポジウムのみ）

シンポジウム 1 光合成の水の酸化機構と電子伝達

(5 月 27 日 13:00～15:30)

光化学系 II は、チラコイド膜にあるタンパク質複合体で、光合成電子伝達系の初発の反応を担う、機能的に非常に重要なタンパク質です。この複合体は、生体物質の中で唯一、水を酸化する機能を持っており、この反応で得た電子が電子伝達系で用いられます。長年、多くの研究者が水の酸化機構に興味をもって研究を進めて来ました。また、昨今のエネルギー問題に関連して、人工光合成分野の研究者やエネルギー開発分野の研究者などが興味をもっており、光化学系 II の水の酸化反応の分子機構の解明が期待されています。そこで本シンポジウムでは、構造や機能解析をリードしている若手研究者のトップランナーに水の酸化に関する最新の研究を紹介していただき、水の酸化機構の全貌の解明を目指して熱い議論ができればと考えています。

1. X 線自由電子レーザーを用いた光化学系 II 水分解反応の機構解明
秋田 総理（岡山大学）
2. 光合成水分解系の赤外分光解析
中村 伸（名古屋大学）
3. 光化学系 II 表在性タンパク質の分子進化と水分解反応における役割
伊福 健太郎（京都大学）

オーガナイザー：杉浦 美羽（愛媛大学）

ポスター紹介(1)

(15:50～17:00)

ポスターセッション(1)

(17:00～18:40)

懇親会

(19:00～21:00)

シンポジウム2 変動する光量への光合成機能の調節

(5月28日 9:00~11:30)

雲などの気象条件や被陰するものの影響で、植物は常に浮動する光量の中で生きています。光は光合成のエネルギーのもとでもあり植物にとって必須なものでもありながら、一方で、過剰な場合には葉緑体内に余分な酸化力を産みかねません。必要でもありまた状況においては不要ともなる両面性を有しています。植物は、刻々と変化する光量に応じるメカニズムを発達させているはずですが、これまでの一定光量で生育させる人工光環境下をもとにした研究では、この能力は過小評価されているように思います。そこで本シンポジウムでは、生理機能や生化学的解析、進化の視点から研究をリードしている若手研究者に最新の研究成果を紹介していただき、光量変動への植物の適応について、今後、全貌を知るためには何を明らかにしていけばよいのかなど、熱い議論ができればと考えています。

1. 光環境の変動に対する光合成制御メカニズム
矢守 航 (東京大学)
2. 葉緑体機能を統御するレドックス制御ネットワーク
吉田 啓介 (東京工業大)
3. *Flaveria* 属における C₄ 型光合成の段階的成立
谷口 清美 (関西学院大)

オーガナイザー：古本 強 (龍谷大学)

ポスター紹介(2)

(11:50~12:30)

ポスターセッション(2)

(12:30~14:30)

総会・受賞式

(14:30~15:30)

閉会

年会終了後、16時から9号館大会議室にて、若手の会を開催

世話人

古本 強 (龍谷大学) : 年会準備委員長

杉浦 美羽 (愛媛大学) : 年会企画委員長

トピックス

植物が安心して光合成できるワケ ～PS I を光傷害から護る P700 酸化システム～

神戸大学大学院 農学研究科 生命機能科学専攻
嶋川 銀河, 三宅 親弘*

本稿では光合成生物において普遍的に見出される生理現象「P700 酸化」について、その生理的意義および P700 酸化を支える多様な分子メカニズムを紹介する。光合成生物は強光や低 CO₂ といった過剰光環境にさらされると光化学系 I (PSI) の反応中心クロロフィルである P700 を酸化する。この事は植物生葉において 90 年代から見だされており、庭先に生えている草木などで簡単に観察できる。なぜ光合成生物は P700 を酸化する必要があるのか？どのようにして P700 は酸化されているのか？その長い歴史の中でいつから光合成生物は P700 を酸化するようになったのか？近年私たちの研究グループは P700 酸化に関するこれらの問いに対する答えを探ってきた。豊富な「光」と「O₂」に囲まれた地球上において、光合成では過剰な光によって有毒な活性酸素が生じる恐れがあり、PSI 内部で生じた活性酸素は PSI に酸化傷害をもたらしてしまう。しかしながら、ダイナミックに変動する地球環境の中において、光合成生物は P700 を酸化させる事によって PSI での活性酸素生成を未然に防いでいる。この P700 酸化は PSI のドナー側およびアクセプター側から多様な分子メカニズムによって制御されており、私たちはこれらを P700 酸化システムと定義した。P700 酸化システムは酸素発生型光合成の始原生物であるシアノバクテリアの時点で既に多様化しており、またその長い進化の歴史の中で変化してきた事が明らかとなった。一見すると何も考えずのんびり光を浴びているだけの植物、そんな彼らの壮絶な生き様に関して、一人でも多くの方々に興味をもっていただければ幸いである。

1. はじめに：光合成に潜むリスク

どうして植物は安全に光合成できるのだろうか。光合成というのは太陽光から光エネルギーを得て、水と二酸化炭素 (CO₂) を材料に有機物である糖を合成する反応である。酸素発生型光合成では反応の副産物として酸素 (O₂) が生じる。ご飯を食べて糖を摂取しなければ生きていけない私たちヒトにとって、光合成は大変「うらやましい」反応であり、また呼吸に必要な O₂ を供給してくれる「ありがたい」反応でもある。では当の光合成生物にとってはどうだろうか。光エネルギーを利用して自ら糖を作り出す、そんな便利な反応にリスクは伴わないのだろうか。副産物として生じる O₂ は彼らにとっても「ありがたい」だ

ろうか。これらの疑問は古くから多くの研究者の興味を惹き、長きに渡って光合成研究や酸素代謝研究を突き動かしてきた。

光合成を営む生物はみな、光に起因した酸化傷害を被るリスクを背負っている。地球上に降り注ぐ太陽光は光合成生物にとってしばしば過剰であり、扱いきれない余剰な光エネルギーが細胞内に存在する O₂ へと渡ってしまうと有毒な活性酸素が生じてしまう^{1,2)}。活性酸素はその反応性の高さゆえ生成すると速やかにタンパク質、核酸、脂質など生体分子を破壊し、細胞の機能障害を引き起こしてしまう³⁾。過剰な光による細胞の酸化傷害は結果として光合成活性の低下や生育障害を招くため、これらは光傷害（あるいは光障害、光阻害）として定義され⁴⁾、それぞれ光合成電子伝達系の光化学系 II (PSII) と光化学系 I (PSI) で

*連絡先 E-mail: cmiyake@hawk.kobe-u.ac.jp

起こるものに分けて研究されてきた。PSII における光傷害は、反応中心サブユニット D1 タンパク質の失活が原因であり、光合成活性やクロロフィル蛍光測定における PSII 最大量子収率の低下によって観測される⁵⁾。D1 タンパク質は失活しやすい一方で、修復のターンオーバーが非常に速く、およそ数時間で新規に合成された D1 タンパク質が機能し始め、PSII 活性が回復する事が知られている^{6,7)}。活性酸素は D1 タンパク質の修復を阻害する事で PSII 光傷害を引き起こすと考えられるが⁸⁾、PSII 光傷害と活性酸素の詳細な関係については未解明な部分が多い^{9,10)}。一方で PSI における光傷害は、実験室レベルで見られる事は少なく、例えば植物生葉を長時間の過剰光にさらしても PSI は失活しない。古くは低温感受性の植物において、低温ストレスを与えた際に PSI が *in vivo* で失活する事が見出され¹¹⁾、近年では特定の遺伝子が欠損した変異体において、常温でも強光や変動光、低 CO₂ などの過剰光環境において PSI 光傷害が起こる事が確認されている¹²⁻¹⁴⁾。PSI は、PSII と比べると頑丈で失活しにくいと言えるが、その反面で修復が非常に遅く、一度失活した PSI は完全に回復するために数日~数週間を要してしまう^{15,16)}。詳細な PSI 失活メカニズムについては未だ不明な部分が多いが、その発見から半世紀にわたって「O₂」と「PSII からの電子伝達」が PSI 光傷害に不可欠である事は多くの研究成果で一致している^{2,17,18)}。これらの事実を考慮すると、光合成が単に便利な反応ではなく酸化傷害という爆弾を内包した危険な反応である事、また光合成生物にとって O₂ は活性酸素を生み出す邪悪な老廃物である事が分かる。

では自然界において光合成生物はどのようにして活性酸素による傷害を避けているのだろうか。真夏の太陽光の下で風に揺られるヒマワリ畑を想像してほしい。彼らは酸化傷害に苦しんでいるだろうか、過剰光や O₂ に怯えながら生きているだろうか、私たちにはそうは見えない。彼ら光合成生物は安全に光合成を営むために何かしらの後ろ盾を得ているに違いない。これまで私たちの研究グループは、光合成系において最大の活性酸素生成源とも言える PSI において、どのように

して活性酸素が生成するのか、また活性酸素の生成が防がれるのか、それらのメカニズムを明らかにしてきた。以下ではそれら研究成果を順に紹介する。

2. PSI における活性酸素生成メカニズム

PSI 光傷害の引き金となっているのは PSI 内部で生成した活性酸素と考えられる (図 1)^{2,19)}。光合成電子伝達系における PSI のアクセプター側では、Mehler 反応によって電子が O₂ へと渡ることによって活性酸素の 1 種であるスーパーオキシドアニオンラジカル (O₂⁻) が生成し²⁰⁾、その O₂⁻ が不均化して生じる H₂O₂ と PSI 内部の鉄-硫黄クラスターがフェントン反応を起こす事でさらに酸化力の高い活性酸素種であるヒドロキシルラジカル (•OH) が生じる恐れがある²¹⁾。さらに PSI のアクセプター側が過還元状態にある時には、励起した P700 が励起三重項状態 (³P700) に遷移する事で一重項酸素 (¹O₂) が生成してしまう可能性がある^{19,22,23)}。生成した活性酸素による PSI の失活メカニズムについては、まず PSI アクセプター側の電子受容体である F_X や F_A/F_B などが傷害を受けて PSI 活性が低下し、その後反応中心タン

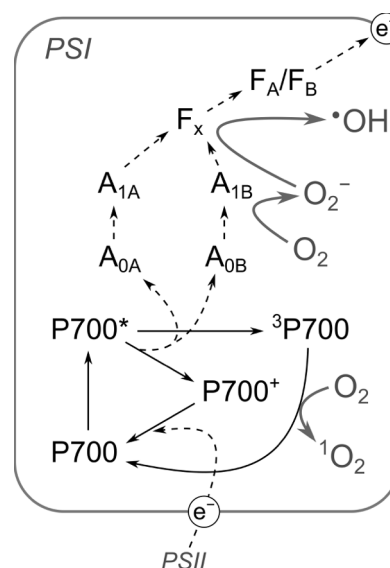


図 1. PSI 内部における活性酸素生成メカニズム Takagi et al. (2016)¹⁹⁾ を参考にして作成した。

パク質の分解が生じると考えられている^{24,25})。また面白い事に、単離チラコイド膜を用いた実験において、過剰光による PSI 光傷害は O₂⁻不均化酵素やアスコルビン酸ペルオキシダーゼといった活性酸素消去酵素を添加しても抑制されない¹⁹)。この結果は PSI 内部で生成した活性酸素が直ちに PSI 光傷害を引き起こす事を示している。つまり PSI 光傷害を防ぐためには、活性酸素の生成を未然に防ぐ必要がある。

3. PSI における活性酸素生成の抑制メカニズム

強光や低 CO₂ といった過剰光にさらされる状況に対して、光合成生物は普遍的な環境応答として P700 酸化を示す。P700 酸化とは文字通り P700 の酸化レベルが増加する事を示しており、具体的には P700 全量に対する酸化型 P700 量 (%) あるいは Y(ND) というパラメータ等で扱われる。P700 酸化は *in vivo* で非破壊的に P700 の酸化還元を測定する事が可能なパルス変調クロロフィル吸光測定などの手法を用いて容易に観察する事が可能であり、古くは植物生葉において 90 年代から見出され²⁶⁻²⁸)、近年ではシアノバクテリアやコケ植物などにおいても観測されている^{29,30})。光過剰な環境においては、NADPH の消費が光合成を律速するため、電子受容体である NADP⁺ の不足によって光合成電子伝達系は過還元状態になる。つまり P700 酸化は光過剰な環境に対して積極的に誘導され、何らかの生理的な役割をもって機能していると考えられる。しかしながら、P700 酸化の生理的な意義づけは全くなされていなかった。

私たちの研究グループは、P700 酸化の生理的意義が PSI 内部における活性酸素生成の予防すなわち光傷害に対する PSI 防御である事を初めて示した (図 2)²)。暗所においたヒマワリ生葉に飽和パルス光を連続的に照射すると実験室レベルで容易に PSI 光傷害を観察する事ができるが、この時に飽和パルス光と同時に一定強度の定常光を照射すると PSI 光傷害は抑制される²)。もちろん定常光の強度が上がるにつれて P700 が酸化していくが (図 2A)、面白い事に P700 が酸化するにつれて PSI 光傷害は見られなくなり (図 2B)、結果として飽和パルス光照射時の P700 酸

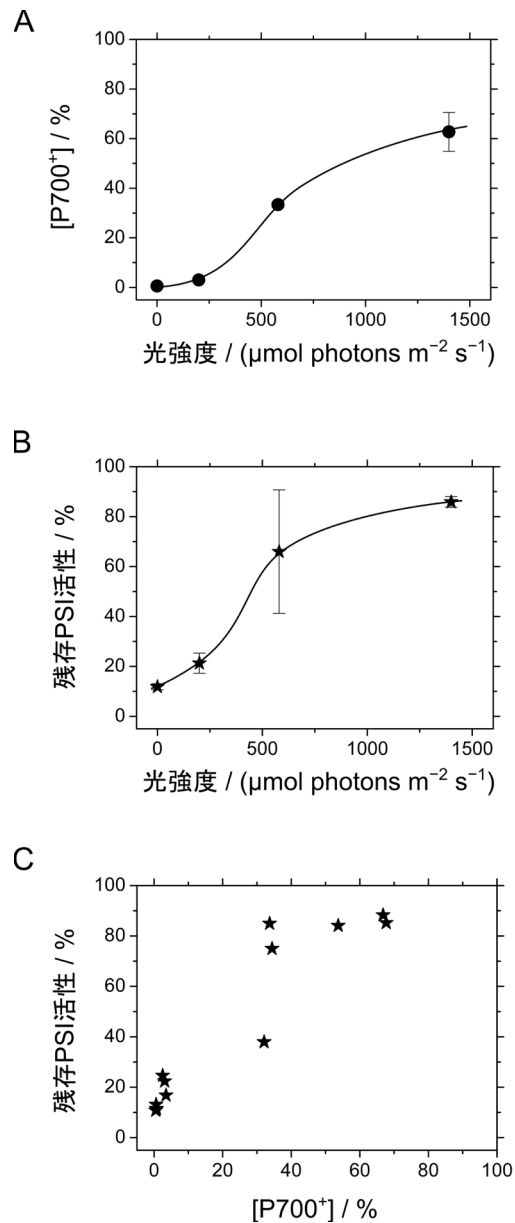


図 2. P700 酸化と PSI 光傷害の関係

(A) ヒマワリ生葉における光強度と P700 酸化の関係. (B) ヒマワリ生葉における光強度と PSI 光傷害の関係. 図 2A に示されるように、照射する定常光の光強度に依存してヒマワリ生葉の P700 は酸化されるが、この時にそれぞれ各光強度の定常光を照射しながら 4 時間の連続的飽和パルス光照射 (300 ms, 20,000 μmol photons m⁻² s⁻¹, 10 秒ごとに照射) を行った。図中の残存 PSI 活性は光酸化可能な P700 の全量 (P_m) を意味しており、連続的飽和パルス光照射を行った後、1 時間の暗順化を挟んで測定された。データは 3 度の実験の平均値と標準誤差によって示される。(C) ヒマワリ生葉における光強度と P700 酸化の関係. それぞれ図 2A および図 2B で示した P700 酸化と残存 PSI 活性をプロットした。データは全て Sejima et al. (2014)²)から引用した。

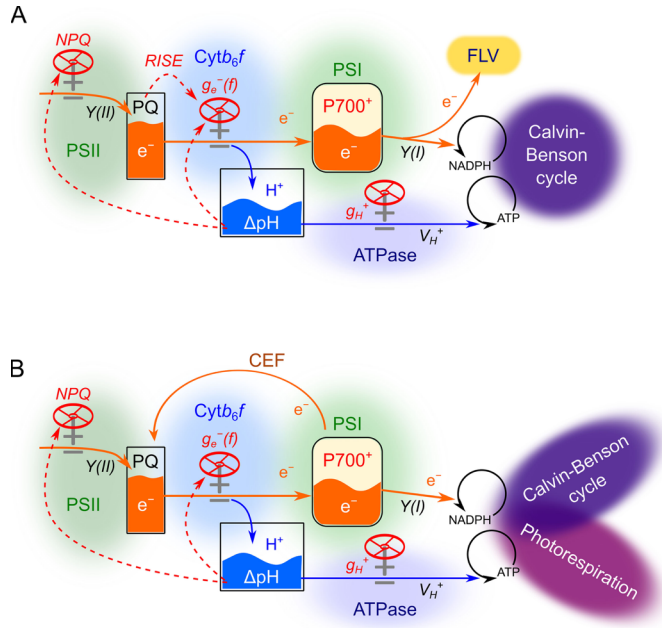


図 3. P700 酸化システムのモデル

(A) FLV 依存型の P700 酸化システムモデル。多くのシアノバクテリアや緑藻などがこちらにあてはまると考えられる。(B) 光呼吸依存型の P700 酸化システムモデル。多くの被子植物とくに C₃ 植物がこちらにあてはまる。3つのバルブはそれぞれエネルギー、電子、プロトンフラックスの安全弁を示す: NPQ, 非光化学的消光; g_e⁻(f), シトクロム b₆f 複合体周辺におけるエレクトロンコンダクタンス; g_H⁺, ATP 合成酵素におけるプロトンコンダクタンス。それぞれ NPQ と g_e⁻(f) は赤点線で示されるように ΔpH やプラストキノ (PQ) 酸化還元を感受する。また、PQ 還元起因する g_e⁻(f)の低下は RISE として定義される³⁰⁾。Y(II), Y(I)はそれぞれ PSII および PSI における光化学反応の実効量子収率を示し、V_H⁺は ATP 合成酵素におけるプロトン流出速度を示す。図は Shimakawa et al. (2017)²⁹⁾を参考にして作成した。

化と失活しなかった PSI との間に明確な相関がみられた (図 2C)²⁾。この事から P700 酸化の生理的意義は PSI の防御であり、PSI 内部における活性酸素生成を抑制するために P700 が酸化される事が分かる。酸化型の P700 が増加する事は、基底状態の P700 が減少する事を意味している。つまり P700 が酸化される事によって、O₂へ渡る電子の供給源が減少するとともに、³P700 生成のリスクが緩和され、その結果として O₂⁻や ¹O₂の生成が抑制される¹⁹⁾。

4. P700 酸化を支える分子メカニズム

光合成生物において P700 酸化は様々な分子メカニズムによって複合的に引き起こされる。本稿ではこれら分子メカニズムを「P700 酸化システム」と呼ぶ (図 3)^{14, 29, 31)}。P700 の酸化還元は PSI の電子の入口 (ドナー側) と出口 (アクセプター側) における電子伝達反応のバランスによって決定される。以下では、それぞれドナー側、アクセプター側に分けて順に P700 酸化システムを紹介する。

PSI のドナー側において最も有力な P700 酸化システムは、シトクロム b₆f 複合体におけるプロトン勾配 (ΔpH) 依存的な電子伝達反応の抑制

と考えられる。図 3 では、シトクロム b₆f 複合体における電子の流れやすさを g_e⁻(f)として表す。シトクロム b₆f 複合体においてサブユニット f の還元速度はチラコイド膜ルーメン内の酸性化に伴って顕著に低下するため³²⁾、光合成生物は ΔpH を制御して PSI への電子流入にブレーキをかける事により P700 を酸化できる。基本的に ΔpH 形成は電子伝達活性に依存するため³³⁾、光合成の駆動のみならず後述する O₂ 依存的代替的電子伝達や循環的電子伝達 (Cyclic electron flow, CEF) はルーメン内の酸性化に寄与する事が期待される^{29), 34), 35)}。また一方で、ATP 合成酵素におけるプロトンコンダクタンス (g_H⁺) が低下し、チラコイド膜外へのプロトン流出速度 (V_H⁺) が抑制される事によっても ΔpH は上昇する³⁶⁾。さらにチラコイド膜上に存在するイオンチャネル K⁺-efflux antiporter がルーメン内からのプロトン漏出を調整する事で ΔpH 形成に役立つ事も示唆されている³⁷⁾。そのほか陸上植物や緑藻においては proton gradient regulation 5 (PGR5) が ΔpH の制御に大きな役割をもつことが報告されている^{12, 38)}。

シトクロム b₆f 複合体周辺における電子伝達反応は ΔpH のみならず、プラストキノールの過還元によっても抑制される。この P700 酸化

システムはシアノバクテリアで見出され reduction-induced suppression of electron transport (RISE) として報告された^{30,39)}。RISE が生じる際には、プラストキノンプールの過還元と並行してシトクロム *f* および P700、NADPH の酸化が認められ、面白い事にこれら電子伝達系下流の酸化が、 ΔpH に寄与すると考えられる O_2 依存的代替的電子伝達の欠損株においてむしろ顕著に見られた。想定される RISE の分子メカニズムとして、酸化型プラストキノンの不足による Q-サイクルの抑制が提唱されており³⁰⁾、今後は陸上植物など真核光合成生物も含めた詳細な研究が期待される。

クロロフィル蛍光測定によって定義される PSII の光エネルギーの熱放散 (Non-photochemical quenching, NPQ) もまた P700 酸化に寄与する事が期待される。緑藻クラミドモナスでは ΔpH 依存的な NPQ (qE) に関与する light-harvesting complex stress-related protein 3 の欠損によって PSI 光傷害が深刻化する事が見出されており、NPQ による P700 酸化の可能性が示唆されている⁴⁰⁾。また広義の NPQ として PSII/PSI 間の光エネルギー分配変化 (ステート遷移, qT) や PSII 光傷害 (qI) なども挙げられるが、それぞれ同様に P700 酸化への寄与が示唆されている⁴⁰⁻⁴²⁾。これらの結果は「PSII からの電子伝達」が P700 の酸化還元レベルに大きな影響をもつことを裏付けている。

一方で PSI のアクセプター側においては、過剰な電子の散逸を行う代替的電子伝達が P700 酸化に貢献する。多くの代替的電子伝達反応において最終的な電子のアクセプターは O_2 であり、この事は光合成生物が O_2 を邪悪な老廃物として恐れるだけでなく有益な「電子の受け口 (エレクトロンシンク)」として賢く利用している事を意味する。例えば C_3 植物は、光呼吸代謝の中で O_2 を利用する事で過剰な光エネルギーを上手く消費すると同時にリブローズ 1,5-ビスリン酸の再生成を行っている⁴³⁾。 C_3 植物の光呼吸活性は非常に高く、そのエレクトロンシンク能によって CO_2 補償点においても光合成に匹敵する程の電子伝達活性が観察される⁴⁴⁾。光呼吸による代替的なエ

レクトロンシンクは C_3 植物の P700 酸化に大きく貢献しており、特に光合成が抑制される低 CO_2 環境およびそれをもたらす強光、乾燥ストレス下などでは、一定の光呼吸活性がなければ植物は P700 を酸化する事ができない⁴⁵⁾。

光呼吸の他に大きなエレクトロンシンク能をもつ代替的電子伝達として Flavodiiron タンパク質 (FLV または FDP) による O_2 還元反応が挙げられる⁴⁶⁾。FLV はフラビンモノヌクレオチド結合サイトと 2 鉄センターを有したフラビントタンパク質であり、光合成生物の中ではシアノバクテリア、緑藻、コケ、シダ、裸子植物にホモログが見出されている⁴⁷⁾。FLV は PSI のアクセプター側において電子を受け取って O_2 を H_2O に 4 電子還元すると考えられるが^{14,46,48,49)}、その反応の生理活性は非常に高くシアノバクテリアでは光合成活性に匹敵するほどの電子伝達活性が確認される^{46,50)}。シアノバクテリアの FLV 欠損株は、変動光⁵¹⁾や低 CO_2 ¹⁴⁾といった過剰光環境において P700 を酸化できず、PSI 光傷害を被ってしまう。また近年では陸上にて光合成を始めたコケ植物のゼニゴケ²⁹⁾やヒメツリガネゴケ⁵²⁾においても FLV が P700 酸化システムの一員として PSI 防御に貢献する事が明らかになっている。特に嶋川ら²⁹⁾は、水際環境での生存がいかに危険なものをゼニゴケを用いて初めて示した。FLV を欠損したゼニゴケは水没すると速やかに光傷害の危険にさらされる²⁹⁾。この事は陸上植物で働く光呼吸が水中では機能しない事を示しており、また陸に上がったばかりのゼニゴケにとって FLV の存在が不可欠だった事を示している。FLV が P700 酸化システムとして働いていたからこそ、植物の陸上進出が起こりえたのだろう。

5. P700 酸化システムの多様性と進化的変遷

前項では様々な P700 酸化システムを紹介したが、それぞれ光合成生物によってどのシステムを利用するのかが好き嫌いがある。シアノバクテリアはおよそ 30 億年前に現れた最古の酸素発生型光合成生物であるが、彼らの中において既に P700 酸化戦略の種多様性がみられる。最も多く研究材料として扱われる *Synechocystis* sp. PCC

6803 (*S. 6803*) や *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (*S. 7942*)、海洋性の *Synechococcus* sp. PCC 7002 (*S. 7002*) はそれぞれ複数の FLV アイソザイムを持ち、それに依存した代替的電子伝達性を示すが、各々の種における FLV の P700 酸化に対する寄与度は全く異なる (図 4)¹⁴。*S. 6803* は 2 セットの FLV ヘテロダイマー (FLV1/3 および FLV2/4) を有し、低 CO₂ 環境において FLV2/4 を高発現する事で代替的電子伝達を駆動する^{49,50,53,54}。一方で *S. 7942* は FLV2/4 を持たず、低 CO₂ 環境では光合成とともに電子伝達反応を抑制する⁵⁰。しかしながら面白い事に、これら 2 種のシアノバクテリアは FLV およびその代替的電子伝達活性に関係なく低 CO₂ 環境で P700 を酸化する事ができる^{14,30}。これはドナー側において RISE など別の P700 酸化システムが機能するためだと考えられ、結果的にこれら 2 種の野生株および FLV 欠損株は低 CO₂ 環境にさらされても PSI 光傷害を被らない¹⁴。一方で *S. 7002* は低 CO₂ 環境において FLV1/3 に依存した非常に大きな代替的

電子伝達性を示し⁵⁵、その欠損株では低 CO₂ 環境で P700 酸化がみられない¹⁴。結果として *S. 7002* における FLV 欠損株は、低 CO₂ 環境における 2 時間の短い光照射 (290 μmol photons m⁻² s⁻¹) によって PSI 光傷害による光合成活性の完全な失活を示した¹⁴。つまり *S. 7002* は他の 2 種とは異なり PSI 防御をほとんど FLV のみに依存している。これら嶋川、釋らの研究結果により、酸素発生型光合成のルーツを担うシアノバクテリアにおいて「光」が本質的にもつ危険性および P700 酸化の必要性が既に確立していた事が世界で初めて示されたと同時に、PSI における活性酸素生成抑制メカニズムの正体が P700 酸化であるとした瀬島らの仮説²⁾が実証された。

光合成生物は、その進化の歴史の中でそれぞれの生存環境に合わせて P700 酸化システムを変化させてきた。アクセプター側の P700 酸化システムである光呼吸と FLV を例に挙げたい (図 5)。光呼吸は C₃ 植物において非常に大きな代替的電子伝達性を担うが⁴⁴、シアノバクテリアや緑藻

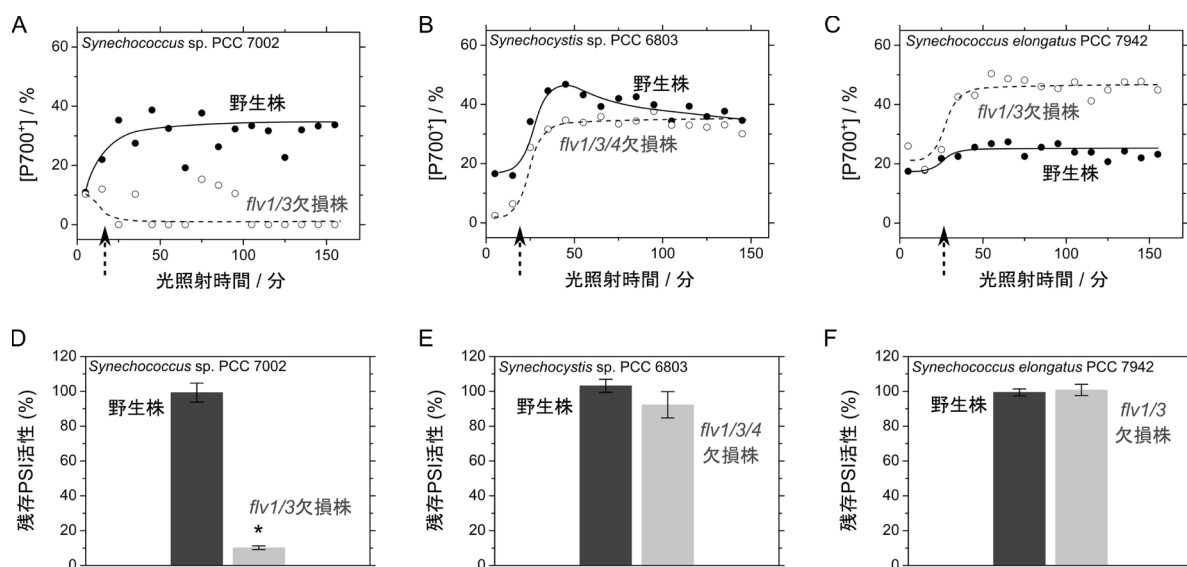


図 4. 異なる 3 種のシアノバクテリアにおける低 CO₂ 環境下での P700 酸化と PSI 光傷害

(A-C) 光合成 CO₂ 濃度律速期への移行における P700 酸化の応答. シアノバクテリア生細胞を含む反応溶液 (HCO₃⁻を添加しない) に光を照射すると、じきに溶液環境中の CO₂ が光合成によって食い尽くされてしまい、光合成が抑制される。この状態を私たちは光合成の CO₂ 濃度律速期と定義しており^{49,50}、このとき光合成は大気中から溶液中への CO₂ 拡散によって律速されている。図 4A-C では、CO₂ 濃度律速期への移行が生じている時間を点線矢印で示す。光強度 180 μmol photons m⁻² s⁻¹ の励起光を用いた。黒丸が野生株、白丸が FLV 変異体を示す。(D-F) 低 CO₂ 環境下で生じる PSI 光傷害. 光強度 290 μmol photons m⁻² s⁻¹ の励起光を用いて CO₂ 濃度律速期で 2 時間の光照射を行い、その後 1 時間の暗順化を挟んで残存 PSI 活性を測定した。図中の残存 PSI 活性は光酸化可能な P700 の全量 (P_m) を意味する。データは全て Shimakawa et al. (2016)¹⁴から引用した。

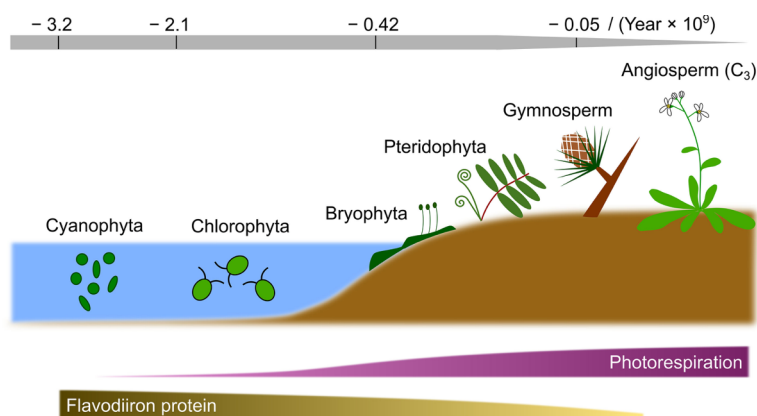


図 5. P700 酸化システムである光呼吸およびFLVの進化的変遷
Cyanophyta, シアノバクテリア;
Chlorophyta, 緑藻; Bryophyta,
コケ植物; Pteridophyta, シダ植
物; Gymnosperm, 裸子植物,
Angiosperm (C₃), C₃植物。

クラミドモナスにおいてはその活性は小さく、P700 酸化に寄与しているとは考えづらい^{49,50,55}。代わりに、これらシアノバクテリアや緑藻ではFLVが主要なエレクトロンシンクとしてP700酸化に貢献していると考えられる^{14,46,51,55}。網羅的な光呼吸活性の評価から、裸子植物やシダ植物、そしてコケ植物においては光呼吸が十分なエレクトロンシンク能を有している事が明らかになっている⁵⁶。一方で陸上植物とは別の系統で進化してきた珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* では光呼吸がエレクトロンシンクとして働いていなかった⁵⁷。水中ではO₂の拡散速度が大気中と比べて約10,000分の1にまで低下する⁵⁸。大気平衡時における水中のO₂濃度が約250 μMである事を考慮すると、光呼吸の初発反応であるルビスコのオキシゲナーゼ反応が示すO₂へのK_m値は250~450 μMとあまりにも高い⁵⁹。これらを考慮すると光合成生物は、大気中の豊富なO₂に触れて初めて光呼吸をエレクトロンシンクとして利用し始め、陸上進出が進むにつれて本格的に光呼吸をP700酸化システムとして駆動するようになり、結果としてFLVが不必要になってしまったと推察する事も可能である。FLVによるO₂還元反応でのK_m値はおおよそ1 μMであるため^{48,49}、シアノバクテリアや緑藻、そして水際に生息するゼニゴケなどにとっては都合が良かったのかもしれない²⁹。実際、ゼニゴケFLV欠損株は水没するとPSII電子伝達活性の顕著な低下を示す²⁹。これは光呼吸の初発反応であるルビスコのオキシゲナーゼ反応が水中で十分に駆動していない、

つまり水中環境では光呼吸がエレクトロンシンクとして機能できない事を示している。ただし、光呼吸代謝そのものはシアノバクテリアの時点で既に獲得されており、多くの藻類で生育に不可欠な代謝系として機能している事に注意しなければならない^{60,61}。シアノバクテリアや緑藻、珪藻において光呼吸はP700酸化システムではなく、別の生理的役割を担っているのだろう。面白いことに、同じ陸上植物でもC₄植物はほとんど光呼吸活性を示さない事からC₃植物とは異なるP700酸化システムを発達させていると考えられる^{44,56}。また藻類の中でもユーグレナ藻 *Euglena gracilis* においては光呼吸による代替的電子伝達活性の存在が示唆された⁵⁷。自然界には私たちの知らないP700酸化システムの多様性がまだまだ眠っていそうである。

PSIドナー側のP700酸化システムに関しても、シアノバクテリアで見出されたRISEが植物への進化を経た後も残されたのかは分かっていない。緑藻や陸上植物においてΔpHの制御に貢献しているPGR5はシアノバクテリアでは同様の機能を持たない⁵¹。これらドナー側のP700酸化システムが光合成生物の歴史の中でどのような進化的変遷を辿ってきたのか興味深い。

6. P700 酸化システムは、人工的変動光環境でもたらされる光傷害を理解するための分子基盤である

瀬島ら²⁾が確立した「活性酸素によるPSI光傷害の誘導法」では、飽和パルス光(10~1,000 ms)

照射により、一瞬にして光合成電子伝達系を電子で満たすことができる。これは、植物が環境ストレスにさらされた際の過剰光環境を模倣する簡便な方法である。この方法では、光合成の駆動に伴って P700 酸化システムが機能し、P700 が酸化状態にあると、パルス光照射による PSI 光傷害が観測されない。この理由は、前述のとおりである。一方、光合成が駆動していない時にパルス光を照射すると PSI 光傷害が観測される。ここで注目すべき事は、P700 が酸化されていない状態で、光合成に使われる以上の光エネルギーにより P700 が励起されると活性酸素生成に至ってしまうことである。このことが、人工的変動光環境実験で PSI 光傷害が生じてしまう理由である。

高木ら³¹⁾は、P700 酸化システムが飽和光強度のパルス光照射に対しても機能することができれば PSI 光傷害が生じないことを見出した。コケ、シダ、裸子植物は、パルス光照射の短い間 (< 1,000 ms) でも P700 を速やかに酸化し、PSI 光傷害を抑制する事ができる (図 6)³¹⁾。この P700 酸化は FLV によるものであり、O₂ を必要とする (図 6)^{29,31)}。FLV による P700 酸化は、光合成生物の進化過程においてシアノバクテリアの時に既に確立されているが^{14,46)}、高木らが示した陸上植物における P700 酸化の多様性は、陸上に進出し O₂ の危険にさらされる事になったコケ、シダ、裸子植物が FLV を P700 酸化システムとして利用しつづけていた事を示している。ゼニゴケ FLV 欠損変異株においてパルス光照射の間に P700 酸化が観測されないことから (図 6)、いかに FLV が優れた P700 酸化能力、つまり活性酸素生成抑制効果をもっているかがえる^{29,31)}。

一方で被子植物は、FLV を用いた P700 酸化システムをもたず (図 6)、それゆえパルス光照射による PSI 光傷害を瀬島ら²⁾は見出すことができた。フィンランドの Aro グループが世界で最初に示した人工的変動光環境実験では、シロイヌナズナ野生株と PGR5 変異体の人工的変動光への暴露が検討された¹³⁾。ここで重要なのは、野生株が人工的変動光環境で PSI 光傷害を被らなかった事である。その理由として、第 1 に、人工的変動光環境実験で用いる光強度が約 2,000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$

(太陽光強度の約 8 割程度) と瀬島ら²⁾の方法 (20,000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) に比べて小さい事が挙げられる。瀬島らが用いた光強度では、約 1 時間の短い間で PSI 光傷害が生じる。一方で瀬島らは、太陽光強度の約 8 割 (2,000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) においても PSI 光傷害が生じることを見出しているが、その場合には明確に PSI の失活がみられるまで数時間を要する²⁾。この事が、Aro グループの研究で野生株の PSI 光傷害がみられなかった理由である。第 2 に、人工的変動光環境実験では矩形の光強度変化が適用されるが、その光照射時間がパルス光と比べて非常に長く (数十分オーダー)、その間に P700 酸化システムが駆動してしまう事が挙げられる。つまり人工的変動光環境実験では、生葉への突然の過剰光照射によって活性酸素生成の危険が生じるものの、それと同時に P700 酸化による活性酸素生成の抑制が起こっているため、非常に複雑な生理現象が同時に生じている。Aro グループの報告

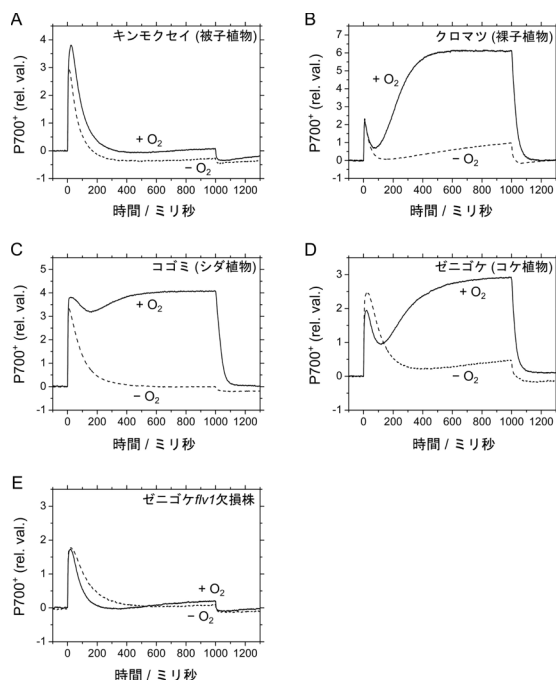


図 6. パルス光照射中の P700 酸化と O₂ の効果

キンモクセイ、クロマツ、コゴミ、ゼニゴケ野生株および *flv1* 欠損株に対して 1 秒間のパルス光 (5,000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を照射した。図中には大気 O₂ 濃度条件 (+ O₂, 21 kPa O₂) および嫌気条件 (- O₂, 0 kPa O₂) での実験結果をそれぞれ実線と破線で示す。データは全て Takagi et al. (2017)³¹⁾から引用した。

¹³⁾における PGR5 変異体の PSI 光傷害は、矩形の光強度変動の間に PGR5 変異体において P700 酸化が生じない事による非常に興味深い事例である。

このように人工的変動光環境実験で観測される PSI 光傷害は、P700 酸化システムの観点から理解できる。FLV をもたない被子植物が地球環境で大繁栄しているという事実を直視すれば、人工的変動光が植物に与える事例は無視できることかもしれない。しかしながら、PGR5 の役割を世界で最初に示した Aro グループの功績は、人工的変動光環境が P700 酸化システムの能力評価に貢献することを示唆している。実際に瀬島ら ²⁾ のパルス光照射実験では、野生株においても PGR5 変異体同様に PSI 光傷害が生じてしまうため、両者の間に差を見出すことができない。人工的変動光環境実験はその光照射の間に P700 酸化を誘導するからこそ、P700 酸化システム変異体の性質解明に有効である。

7. おわりに：P700 酸化と光合成

なぜ P700 は酸化される必要があるのか、それは光合成生物が「安心して」光合成を行うためであると私たちは考える。P700 酸化は光合成に直接影響しない。光合成活性（あるいは電子伝達活性）と P700 酸化の間には明確な相関はなく ³¹⁾、その証拠にシアノバクテリアでは、低 CO₂ 環境にさらされて同じように電子伝達活性が低下していく中でも P700 を酸化する細胞と酸化しない細胞が作出される ¹⁴⁾。もちろん P700 酸化システムを欠損しても光合成活性そのものが低下する事はない ¹⁴⁾。私たちの研究グループは P700 酸化と PSI 防御の間に明確な相関を見出し、世界で初めて P700 酸化の生理的な意義づけを行った ²⁾。その後この仮説は、多様なシアノバクテリアを用いた解析により実証され ¹⁴⁾、また光合成生物に普遍的にあてはまる事が示された ³¹⁾。P700 酸化は PSI 内部における活性酸素生成を未然に防ぐために存在し ^{2,19)}、P700 酸化システムは PSI を酸化傷害から護るために働いている (図 3) ^{14,29,31)}。つまり光合成生物は、P700 が酸化できなければ例え光合成を行えたとしても常に「光」と「O₂」に怯え

て暮らさなければならない。酸素発生型の光合成生物が誕生する以前から地球上には極低濃度の O₂ が存在し、生物は酸化傷害の危険にさらされていた ⁶²⁾。光合成生物のご先祖さまであるシアノバクテリアにおいて P700 酸化システムは既に多様化していた ¹⁴⁾。つまり P700 酸化システム無くして光合成の誕生は有り得なかったに違いない。そして、それら「O₂」毒性にさらされていながら逆に「O₂」を利用する事で P700 を酸化する戦略を見出した ^{38,53,63,64)}、そんな彼らの貪欲かつ賢明な生き様に改めて感服する。

謝辞

執筆の場を与えて下さった伊福健太郎先生(京都大学)、および査読していただいた先生方に対して心からお礼申し上げます。

Received March 01, 2017; Accepted March 14, 2017; Published April 30, 2017

参考文献

1. Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141, 391–396.
2. Sejima, T., Takagi, D., Fukayama, H., Makino, A. and Miyake, C. (2014) Repetitive short-pulse light mainly inactivates photosystem I in sunflower leaves. *Plant Cell Physiol.* 55, 1184–1193.
3. Bowler, C., Van Montagu, M. and Inzé, D. (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83–116.
4. Kok, B. (1956) On the inhibition of photosynthesis by intense light. *Biochim. Biophys. Acta* 21, 234–244.
5. Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y. and Allakhverdiev, S.I. (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1767, 414–421.
6. Sundby, C., Chow, W.S. and Anderson, J.M. (1993) Effects on photosystem II function, photoinhibition, and plant performance of the spontaneous mutation of serine-264 in the photosystem II reaction center D1 protein in triazine-resistant *Brassica napus* L. *Plant Physiol.* 103, 105–113.
7. Neidhardt, J., Benemann, J.R., Zhang, L. and Melis, A. (1998) Photosystem-II repair and chloroplast recovery from irradiance stress: relationship between chronic photoinhibition, light-harvesting chlorophyll antenna

- size and photosynthetic productivity in *Dunaliella salina* (green algae). *Photosynth. Res.* 56, 175–184.
8. Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., Yamamoto, H., Hayashi, H. and Murata, N. (2004) Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 43, 11321–11330.
 9. Tyystjärvi, E. (2008) Photoinhibition of photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. *Coord. Chem. Rev.* 252, 361–376.
 10. Krause, G.H., Köster, S. and Wong, S.C. (1985) Photoinhibition of photosynthesis under anaerobic conditions studied with leaves and chloroplasts of *Spinacia oleracea* L. *Planta* 165, 430–438.
 11. Terashima, I., Funayama, S. and Sonoike, K. (1994) The site of photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L. at low temperatures is photosystem I, not photosystem II. *Planta* 193, 300–306.
 12. 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.
 13. Suorsa, M., Jarvi, S., Grieco, M., Nurmi, M., Pietrzykowska, M., Rantala, M., Kangasjarvi, S., Paakkari, V., Tikkanen, M., Jansson, S. and Aro, E.M. (2012) PROTON GRADIENT REGULATION5 is essential for proper acclimation of Arabidopsis photosystem I to naturally and artificially fluctuating light conditions. *Plant Cell* 24, 2934–2948.
 14. Shimakawa, G., Shaku, K. and Miyake, C. (2016) Oxidation of P700 in photosystem I is essential for the growth of cyanobacteria. *Plant Physiol.* 172, 1443–1450.
 15. Kudoh, H. and Sonoike, K. (2002) Irreversible damage to photosystem I by chilling in the light: cause of the degradation of chlorophyll after returning to normal growth temperature. *Planta* 215, 541–548.
 16. Zivcak, M., Brestic, M., Kunderlikova, K., Sytar, O. and Allakhverdiev, S.I. (2015) Repetitive light pulse-induced photoinhibition of photosystem I severely affects CO₂ assimilation and photoprotection in wheat leaves. *Photosynth. Res.* 126, 449–463.
 17. Satoh, K. (1970) Mechanism of photoinactivation in photosynthetic systems II. The occurrence and properties of two different types of photoinactivation. *Plant Cell Physiol.* 11, 29–38.
 18. Sonoike, K. (1996) Degradation of *psaB* gene product, the reaction center subunit of photosystem I, is caused during photoinhibition of photosystem I: possible involvement of active oxygen species. *Plant Sci.* 115, 157–164.
 19. Takagi, D., Takumi, S., Hashiguchi, M., Sejima, T. and Miyake, C. (2016) Superoxide and singlet oxygen produced within the thylakoid membranes both cause photosystem I photoinhibition. *Plant Physiol.* 171, 1626–1634.
 20. Mehler, A.H. (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 33, 65–77.
 21. Youngman, R.J. and Elstner, E.F. (1981) Oxygen species in paraquat toxicity: the crypto-OH radical. *FEBS Lett.* 129, 265–268.
 22. Polm, M. and Brettel, K. (1998) Secondary pair charge recombination in photosystem I under strongly reducing conditions: temperature dependence and suggested mechanism. *Biophys. J.* 74, 3173–3181.
 23. Cazzaniga, S., Li, Z., Niyogi, K.K., Bassi, R. and Dall'Osto, L. (2012) The Arabidopsis *szl1* mutant reveals a critical role of β -carotene in photosystem I photoprotection. *Plant Physiol.* 159, 1745–1758.
 24. Sonoike, K., Terashima, I., Iwaki, M. and Itoh, S. (1995) Destruction of photosystem I iron-sulfur centers in leaves of *Cucumis sativus* L. by weak illumination at chilling temperatures. *FEBS Lett.* 362, 235–238.
 25. Zhang, S. and Scheller, H.V. (2004) Photoinhibition of photosystem I at chilling temperature and subsequent recovery in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45, 1595–1602.
 26. Klughammer, C. and Schreiber, U. (1994) An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700⁺-absorbance changes at 830 nm. *Planta* 192, 261–268.
 27. Laisk, A. and Oja, V. (1994) Range of photosynthetic control of postillumination P700⁺ reduction rate in sunflower leaves. *Photosynth. Res.* 39, 39–50.
 28. Miyake, C., Miyata, M., Shinzaki, Y. and Tomizawa, K. (2005) CO₂ response of cyclic electron flow around PSI (CEF-PSI) in tobacco leaves—relative electron fluxes through PSI and PSII determine the magnitude of non-photochemical quenching (NPQ) of Chl fluorescence. *Plant Cell Physiol.* 46, 629–637.
 29. Shimakawa, G., Ishizaki, K., Tsukamoto, S., Tanaka, M., Sejima, T. and Miyake, C. (2017) The liverwort, *Marchantia*, drives alternative electron flow using a flavodiiron protein to protect PSI. *Plant Physiol.* doi: 10.1104/pp.16.01038.
 30. Shaku, K., Shimakawa, G., Hashiguchi, M. and Miyake, C. (2016) Reduction-induced suppression of electron flow (RISE) in the photosynthetic electron transport system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* 57, 1443–1453.
 31. Takagi, D., Ishizaki, K., Hanawa, H., Mabuchi, T., Shimakawa, G., Yamamoto, H. and Miyake, C. (2017) Diversity of strategies for escaping reactive oxygen

- species production within photosystem I among land plants. *Physiol. Plant.* In press.
32. Nishio, J.N. and Whitmarsh, J. (1993) Dissipation of the proton electrochemical potential in intact chloroplasts (II. The pH gradient monitored by cytochrome f reduction kinetics). *Plant Physiol.* 101, 89–96.
 33. Avenson, T.J., Cruz, J.A., Kanazawa, A. and Kramer, D.M. (2005) Regulating the proton budget of higher plant photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9709–9713.
 34. Livingston, A.K., Cruz, J.A., Kohzuma, K., Dhingra, A. and Kramer, D.M. (2010) An Arabidopsis mutant with high cyclic electron flow around photosystem I (*hcef*) involving the NADPH dehydrogenase complex. *Plant Cell* 22, 221–233.
 35. Schreiber, U. and Neubauer, C. (1990) O₂-dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.* 25, 279–293.
 36. Takizawa, K., Kanazawa, A. and Kramer, D.M. (2008) Depletion of stromal Pi induces high ‘energy-dependent’ antenna exciton quenching (qE) by decreasing proton conductivity at CF₀-CF₁ ATP synthase. *Plant Cell Environ.* 31, 235–243.
 37. Armbruster, U., Carrillo, L.R., Venema, K., Pavlovic, L., Schmidtman, E., Kornfeld, A., Jahns, P., Berry, J.A., Kramer, D.M. and Jonikas, M.C. (2014) Ion antiport accelerates photosynthetic acclimation in fluctuating light environments. *Nat. Commun.* 5, 5439.
 38. Johnson, X., Steinbeck, J., Dent, R.M., Takahashi, H., Richaud, P., Ozawa, S.-I., Houille-Vernes, L., Petroustos, D., Rappaport, F., Grossman, A.R., Niyogi, K.K., Hippler, M. and Alric, J. (2014) Proton gradient regulation 5-mediated cyclic electron flow under ATP- or redox-limited conditions: A study of Δ ATPase *pgr5* and Δ rbcL *pgr5* mutants in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 165, 438–452.
 39. Shaku, K. and Miyake, C. (2016) 光合成と O₂ の研究から見えてきた、新たな電子伝達制御メカニズムの存在. *光合成研究* 26, 10–22.
 40. Bergner, S.V., Scholz, M., Trompelt, K., Barth, J., Gäbelein, P., Steinbeck, J., Xue, H., Clowez, S., Fucile, G., Goldschmidt-Clermont, M., Fufezan, C. and Hippler, M. (2015) STATE TRANSITION7-dependent phosphorylation is modulated by changing environmental conditions, and its absence triggers remodeling of photosynthetic protein complexes. *Plant Physiol.* 168, 615–634.
 41. Grieco, M., Tikkanen, M., Paakkanen, V., Kangasjarvi, S. and Aro, E.M. (2012) Steady-state phosphorylation of light-harvesting complex II proteins preserves photosystem I under fluctuating white light. *Plant Physiol.* 160, 1896–1910.
 42. Huang, W., Yang, Y.-J., Hu, H. and Zhang, S.-B. (2016) Moderate photoinhibition of photosystem II protects photosystem I from photodamage at chilling stress in tobacco leaves. *Front. Plant. Sci.* 7, 182.
 43. Ruuska, S., Andrews, T.J., Badger, M.R., Hudson, G.S., Laisk, A., Price, G.D. and von Caemmerer, S. (1999) The interplay between limiting processes in C₃ photosynthesis studied by rapid-response gas exchange using transgenic tobacco impaired in photosynthesis. *Funct. Plant Biol.* 25, 859–870.
 44. Sejima, T., Hanawa, H., Shimakawa, G., Takagi, D., Suzuki, Y., Fukayama, H., Makino, A. and Miyake, C. (2016) Post-illumination transient O₂-uptake is driven by photorespiration in tobacco leaves. *Physiol. Plant.* 156, 227–238.
 45. Takagi, D., Hashiguchi, M., Sejima, T., Makino, A. and Miyake, C. (2016) Photorespiration provides the chance of cyclic electron flow to operate for the redox-regulation of P700 in photosynthetic electron transport system of sunflower leaves. *Photosynth. Res.* 129, 279–290.
 46. Helman, Y., Tchernov, D., Reinhold, L., Shibata, M., Ogawa, T., Schwarz, R., Ohad, I. and Kaplan, A. (2003) Genes encoding A-type flavoproteins are essential for photoreduction of O₂ in cyanobacteria. *Curr. Biol.* 13, 230–235.
 47. Yamamoto, H., Takahashi, S., Badger, M.R. and Shikanai, T. (2016) Artificial remodelling of alternative electron flow by flavodiiron proteins in Arabidopsis. *Nat. Plants* 2, 16012.
 48. Vicente, J.B., Gomes, C.M., Wasserfallen, A. and Teixeira, M. (2002) Module fusion in an A-type flavoprotein from the cyanobacterium *Synechocystis* condenses a multiple-component pathway in a single polypeptide chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 82–87.
 49. Shimakawa, G., Shaku, K., Nishi, A., Hayashi, R., Yamamoto, H., Sakamoto, K., Makino, A. and Miyake, C. (2015) FLAVODIIRON2 and FLAVODIIRON4 proteins mediate an oxygen-dependent alternative electron flow in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under CO₂-limited conditions. *Plant Physiol.* 167, 472–480.
 50. Hayashi, R., Shimakawa, G., Shaku, K., Shimizu, S., Akimoto, S., Yamamoto, H., Amako, K., Sugimoto, T., Tamoi, M., Makino, A. and Miyake, C. (2014) O₂-dependent large electron flow functioned as an electron sink, replacing the steady-state electron flux in photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp.

- PCC 6803, but not in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 384–393.
51. Allahverdiyeva, Y., Mustila, H., Ermakova, M., Bersanini, L., Richaud, P., Ajlani, G., Battchikova, N., Cournac, L. and Aro, E.M. (2013) Flavodiiron proteins Flv1 and Flv3 enable cyanobacterial growth and photosynthesis under fluctuating light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 4111–4116.
52. Gerotto, C., Alboresi, A., Meneghesso, A., Jokel, M., Suorsa, M., Aro, E.-M. and Morosinotto, T. (2016) Flavodiiron proteins act as safety valve for electrons in *Physcomitrella patens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 12322–12327.
53. Zhang, P., Allahverdiyeva, Y., Eisenhut, M. and Aro, E.M. (2009) Flavodiiron proteins in oxygenic photosynthetic organisms: photoprotection of photosystem II by Flv2 and Flv4 in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One* 4, e5331.
54. Shimakawa, G. (2015) シアノバクテリアの光合成における酸素利用. *光合成研究* 25, 16–21.
55. Shimakawa, G., Akimoto, S., Ueno, Y., Wada, A., Shaku, K., Takahashi, Y. and Miyake, C. (2016) Diversity in photosynthetic electron transport under [CO₂]-limitation: the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 and green alga *Chlamydomonas reinhardtii* drive an O₂-dependent alternative electron flow and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence during CO₂-limited photosynthesis. *Photosynth. Res.* 130, 293–305.
56. Hanawa, H., Takagi, D., Shimakawa, G., Nohira, K., Sejima, T., Shaku, K., Makino, A. and Miyake, C. (2017) Land plants drive photorespiration as higher electron-sink: Comparative study of post-illumination transient O₂-uptake rates from liverworts to angiosperms through ferns and gymnosperms. *Physiol. Plant.* In press.
57. Shimakawa, G., Matsuda, Y., Nakajima, K., Tamoi, M., Shigeoka, S. and Miyake, C. (2017) Diverse strategies of O₂ usage for preventing photo-oxidative damage under CO₂ limitation during algal photosynthesis. *Sci. Rep.* 7, 41022.
58. Raven, J.A., Osborne, B.A. and Johnston, A.M. (1985) Uptake of CO₂ by aquatic vegetation. *Plant Cell Environ.* 8, 417–425.
59. Jordan, D.B. and Ogren, W.L. (1981) Species variation in the specificity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. *Nature* 291, 513–515.
60. Eisenhut, M., Ruth, W., Haimovich, M., Bauwe, H., Kaplan, A. and Hagemann, M. (2008) The photorespiratory glycolate metabolism is essential for cyanobacteria and might have been conveyed endosymbiontically to plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 17199–17204.
61. Rademacher, N., Kern, R., Fujiwara, T., Mettler-Altmann, T., Miyagishima, S., Hagemann, M., Eisenhut, M. and Weber, A.P.M. (2016) Photorespiratory glycolate oxidase is essential for the survival of the red alga *Cyanidioschyzon merolae* under ambient CO₂ conditions. *J. Exp. Bot.* 67, 3165–3175.
62. Asada, K. (2009) シアノバクテリアの酸素適応と活性酸素適応. *光合成研究* 19, 75–80.
63. Miyake, C. and Makino, A. (2003) Water-Water 回路の進化と光合成スターターとしての酸素利用. *化学と生物* 41, 478–487.
64. Takagi, D. and Miyake, C. (2014) これまで欠けていた、速度論的評価に基づく、オルタナティブ・エレクトロン・フロー活性の比較と光合成におけるO₂の役割: 生理的な意味が見える、本丸へ挑む. *光合成研究* 24, 97–110.

P700 oxidation system protects PSI against photo-oxidative damage: Why are plants safe in the light?

Ginga Shimakawa and Chikahiro Miyake*

Graduate School of Agricultural Science, Kobe University

研究紹介

硫化水素を電子供与体とする電子伝達系遺伝子の発現誘導： 転写制御タンパク質 SqrR の同定とその硫化水素応答機構[§]

東京工業大学 大学院生命理工学研究科

清水 隆之*

誕生初期の光合成では硫化水素を電子供与体としていた可能性が高い。現存する酸素非発生型光合成細菌でも硫化水素などのイオウ化合物を電子供与体として光合成を行うものが多く存在する。私は硫化水素に応答したシグナル制御機構を解明するために、紅色光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* から硫化水素応答性の転写因子 SqrR を同定し、その分子機構を解析した。その結果、SqrR は、硫化水素由来の活性イオウ分子種によって2つの Cys 残基の間で分子内テトラスルフィド結合が形成されることで、オペレーター領域への DNA 結合能が弱まることがわかった。これより、硫化水素依存的な光合成の転写制御の分子機構が明らかとなった。

1. はじめに

光合成が地球上に誕生した初期の段階では、水よりも酸化が容易な硫化水素などのイオウ化合物を電子供与体として光合成が行われていたと考えられている。実際、硫化水素を電子供与体として光合成を行う細菌種が現在も多数同定されている。光合成電子伝達系で硫化水素の酸化に関わる酵素は、Sulfide:quinone oxidoreductase (SQR)¹⁾、Flavocytochrome *c* sulfide dehydrogenase (FccAB)²⁾、Sox 酵素群³⁾が知られており、特に SQR が主要な役割を担っていると考えられている⁴⁾。これら酵素の研究から、硫化水素依存的な光合成電子伝達系はかなり明らかになってきた。硫化水素の酸化に関わる酵素の発現は、硫化水素濃度に応じて制御されていると考えられる。実際、紅色光合成細菌 *R. capsulatus* において、SQR の発現が硫化水素処理で誘導されることが報告されている⁵⁾。しかし、硫化水素応答性の制御因子が同定されておらず、詳しい制御機構は未だ明らかでない。急激な生物進化には、遺伝子構造の変化よりも遺伝子制御系の変化の方が重要だと考え

られている。そのため、硫化水素の応答機構は、初期の光合成の進化にとって重要だったと考えられる。

私は、硫化水素の応答機構を分子レベルで解明するために、*R. capsulatus* を用いて、硫化水素応答性の転写因子 SqrR を同定した。本稿では、SqrR の DNA 結合能と転写制御活性が Cys 残基のテトラスルフィド結合形成によって変化することを示す⁶⁾。

2. 硫化水素応答性転写因子 SqrR の同定

硫化水素応答性の制御因子の同定を、遺伝子操作が容易な *R. capsulatus* を用いた順遺伝学的手法によって行った⁷⁾。硫化水素で発現誘導を受ける *sqr* 遺伝子の発現変化を指標にすることで、硫化水素非感受性の変異株の単離を試みた。変異株の選抜のために、*sqr* プロモーターの下流に *lacZ* 遺伝子を融合したプラスミド (*sqr::lacZ*-fusion) を作成した。*sqr* プロモーターが硫化水素イオン (HS⁻) 特異的に応答することを確認するために、*sqr::lacZ*-fusion を保有する *R. capsulatus* を、好気または嫌気培養条件で硫化ナトリウム (Na₂S) 処理し、各細胞の β ガラクトシダーゼ活性を指標に、*sqr* プロモーター活性の時間変化を測定した。そ

[§]第7回日本光合成学会シンポジウム ポスター発表賞受賞論文

*連絡先 E-mail: shimizu.t.au@m.titech.ac.jp

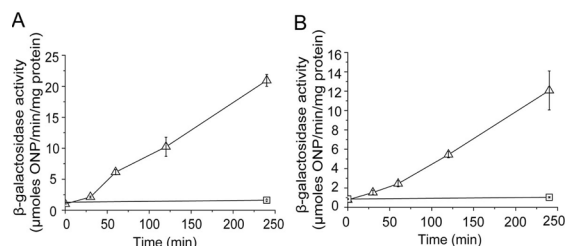


図 1. *sqr-lacZ* fusionによる β ガラクトシダーゼ活性
好気培養 (A) もしくは光嫌気培養 (B) で log 期中
中期まで生育させ、何も添加しない (白四角) もしくは
終濃度 0.6 mM Na₂S (白三角) を添加したときを 0
分として、さらに 0.5、1、2、4 時間培養したときの
 β ガラクトシダーゼ活性を測定した。

の結果、*sqr* 遺伝子は硫化水素イオン (Na₂S は水溶液中では主として硫化水素イオンとして存在する) に応答して転写が誘導されることがわかった (図 1)。

R. capsulatus 野生株 (WT) は β -ガラクトシダーゼ (*lacZ* 遺伝子産物) をもたないためラクトースを唯一の炭素源とした培地では生育することができない。一方、*sqr* プロモーター制御下に *lacZ* を連結した *sqr::lacZ*-fusion 保有株は、硫化水素存在下で *lacZ* の発現が誘導されるためラクトースを炭素源として生育が可能となる。*R. capsulatus* の *sqr::lacZ*-fusion 保有株を EMS で処理することで突然変異を誘発した後、硫化水素非存在下でラクトースを唯一の炭素源とした培地を用いて好気培養した。この条件では硫化水素非存在下でも *lacZ* が発現するようになった細胞 (硫化物非感受性株) のみ生育が可能である。このスクリーニングにより、突然変異を誘発した 10⁸ 個の細胞から約 30 株の硫化水素非感受性変異株が単離できた。得られた変異株のうち 3 株について、*sqr::lacZ*-fusion の *sqr* プロモーター領域に変異がないことを確認した後、ゲノム DNA のリシーケンスによって変異箇所の同定を行った。その結果、複数の候補遺伝子が同定された。候補遺伝子をそれぞれ欠損させた結果、欠損によって硫化水素非存在下での *sqr* の発現が高くなる遺伝子が 1 つ同定された (図 2)。欠損によって抑制能が失われることから、この遺伝子は *sqr* 遺伝子のリプレッサーであると考えられ、*sqrR* (*sqr* repressor) と命名した。

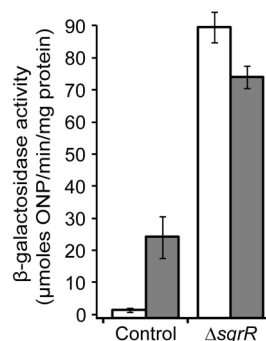


図 2. 同定した硫化水素応答性の制御因子 SqrR の
欠損株における *sqr* プロモーター活性
Control は *sqr::lacZ*-fusion を保有する野生株。誘導
をかけていない細胞 (白色) と終濃度 0.6 mM Na₂S
による誘導を 4 時間かけた細胞 (灰色) での測定
結果を示す。

最近、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* において、硫化水素応答性の転写因子 CstR が同定された⁸⁾。CstR は CsoR/RcnR ファミリーに属し、今回同定した SqrR は ArsR/SmtB ファミリーに属するため、CstR と SqrR は全く異なるタンパク質である。*R. capsulatus* も *cstR* ホモログを 2 つ持つが、それぞれ formaldehyde 感受性リプレッサー FrmR とニッケル感受性リプレッサー RcnR に近縁であることが系統解析よりわかった^{9,10)}。実際に、2 つの *cstR* ホモログの単一欠損および二重欠損株は、完全な硫化水素応答能を保持していた。これより、*R. capsulatus* において、SqrR が主要な硫化水素センサーであると考えられた。

3. SqrR の硫化水素検知機構の解析

SqrR が硫化水素に応答する分子機構を解明するために、大腸菌で大量発現させた *R. capsulatus* SqrR のリコンビナントタンパク質を精製し、その生化学的性質を解析した。DNase I フットプリントアッセイによって *sqr* プロモーター領域における SqrR の結合領域を決定したところ、-10 と転写開始点を含む領域に結合することがわかり、SqrR がリプレッサーであることが明白となった。SqrR は硫化水素に応じてオペレーターへの DNA 結合親和性を変化させると考えられたため、決定したオペレーター領域に対する DNA 結合親和性をゲルシフトアッセイによって測定した。S.

aureus CstR は硫化水素イオンには応答せず、活性イオウ分子種 (RSS; Reactive sulfur species) に応答すると報告されている⁸⁾。RSS は、酸化された非常に反応性の高いイオウ含有分子種で、生体内では硫化水素自身もしくは硫化水素と別の分子との反応によって産生される^{11,12)}。本研究では、グルタチオンと硫化水素の反応によって産生される RSS であるグルタチオンパースルフィド (GSSH) を *in vitro* 実験に用いた。嫌気条件下で、還元型 SqrR と GSSH 処理 SqrR の *sqr* オペレーターへの DNA 結合親和性を測定したところ、GSSH 処理によって結合親和性が有意に低下した (図 3A)。このことはパースルフィド存在下で SqrR がオペレーターから解離しやすくなることを示唆している。

RSS によるシグナル伝達には Cys 残基の SH 基の修飾が関与していると考えられる。*R. capsulatus* SqrR は3つの Cys 残基 (Cys9, Cys41,

Cys107) を持ち、そのうちの2つ (Cys41 と Cys107) は異なる細菌種の SqrR ホモログ間に保存されていた。これら Cys 残基が RSS 応答に関わるか検証するために、各 Cys 残基を Ser 残基に置換した点変異 SqrR を用いて同様の解析を行った。その結果、C9S SqrR は DNA との結合親和性は全体として大きく低下したが、RSS に対する応答は保持していた (図 3B)。一方、C41S SqrR と C107S SqrR は RSS 処理を受けても DNA 結合親和性は高いままだった (図 3C, D)。この結果は、*sqrR* 点変異株を用いた *in vivo* 解析結果とも一致した (図 4)。C9S は WT 同様に硫化水素イオンに反応して抑制が解除されたが、C41S と C107S は硫化水素イオン存在下でも抑制状態が維持されていた。これより、SqrR の硫化水素応答には、RSS による Cys 残基の修飾が重要であることがわかった。

GSSH による SqrR の Cys 残基の化学修飾を同定するために、LC-ESI-MS によって GSSH 処理

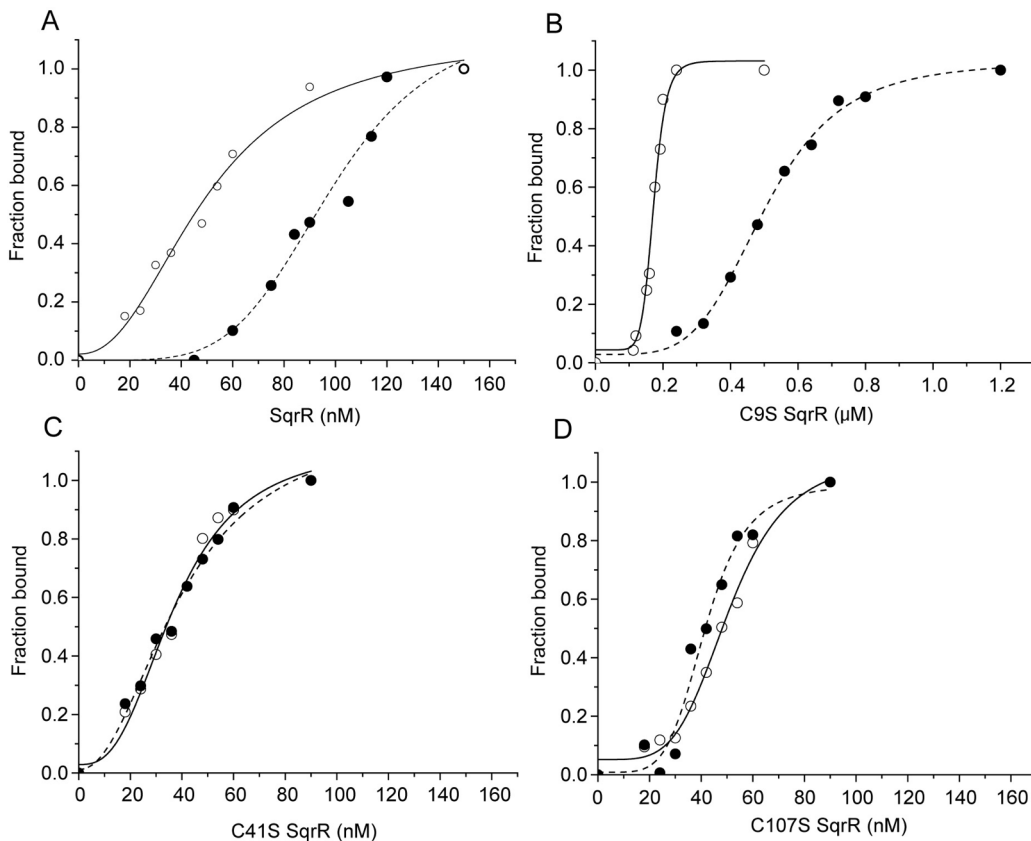


図 3. ゲルシフトアッセイによるSqrRの*sqr*プロモーターへのDNA結合親和性

嫌気条件下での還元型 SqrR (白丸) と GSSH 処理 SqrR (黒丸) の結合曲線。A-D はそれぞれ、WT SqrR, C9S SqrR, C41S SqrR, C107S SqrR の結合曲線を示す。

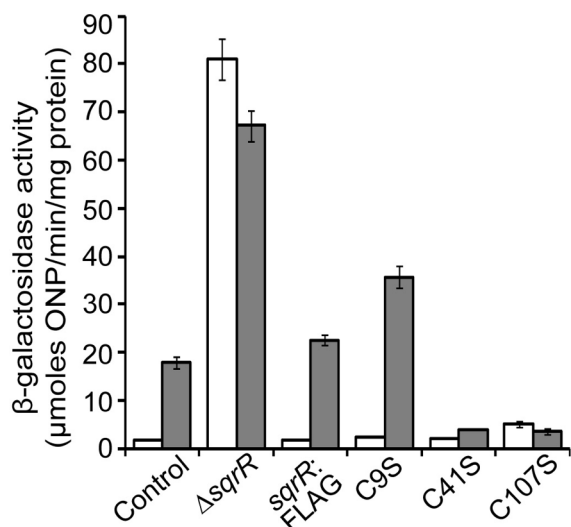


図 4. *sqrR*各点変異株における*sqr*プロモーター活性
*R. capsulatus*のゲノム上の*sqrR*遺伝子の3'末端にFLAGをコードする配列を付加した。各点変異株は*sqrR*:FLAG変異株をもとに作成した。図2と同様の手順で測定した。

したときの C9S SqrR の分子量変化を測定した (図 5)。この測定では、還元型と GSSH 処理のほかに、還元型グルタチオン (GSH)、酸化型グルタチオン (GSSG)、 Na_2S で処理した C9S SqrR の解析も行った。C9S SqrR は細胞内で硫化水素応答活性を WT 同様に持つ (図 4)。そこで本解析では、SqrR の酸化的二次化学反応の影響を最小限に抑えるために、C9S SqrR を本解析に用い

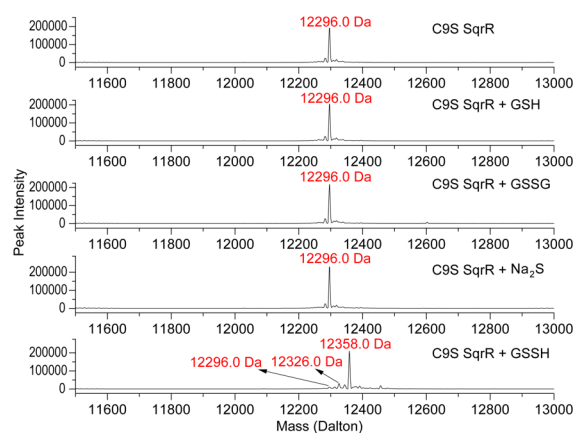


図 5. C9S SqrRのLC-ESI-MS解析

単量体 C9S SqrR (12,196 Da)が GSSH 処理以外で観察された。GSSH 処理では主にテトラスルフィド結合形成 C9S SqrR (12,358 Da)が観察された。少量 ($\leq 5\%$) のトリサルファイド結合形成 C9S SqrR も観察された。

た。還元型 C9S SqrR では、推定分子量 12,296 Da と完全に一致するシグナルが得られたことから、修飾を受けておらず、Cys 残基は完全に還元されていることが裏付けられた。さらに、GSH、GSSG、 Na_2S で処理した場合も変化がなかった。一方、GSSH で処理した場合には、+62 Da (M_r 12,358 Da) の分子量シフトが観察された。この変化 (+62) は、硫黄原子 2 個の付加 (+64) と水素原子 2 個の消失 (-2) で算定される値とよく一致するため、Cys41 と Cys107 の間で分子内テトラスルフィド結合を形成していることを示唆する。加えて、+30 Da (M_r 12,326 Da)の小さな変化も観察され、分子内トリスルフィド結合も示唆された。ESI-MS/MS でトリプシン処理した GSSH 処理 C9S SqrR を分析したところ、同一分子内の Cys41 と Cys107 の間でトリスルフィドとテトラスルフィド結合を形成していることが示された。同様の結果は WT SqrR でも得られた。

Cys41 と Cys107 が硫化水素処理によって修飾を受けることを *in vivo* で確かめるために、チオール基修飾試薬の AMS で処理した総タンパク抽出液を用いてウェスタンブロッティングを行った。テトラスルフィド結合を形成している Cys 残基は AMS では修飾されないため、AMS 修飾による電気泳動での移動度の変化は、フリーのチオール基の数にのみ依存する。対照の SqrR:FLAG に対する Na_2S 無処理サンプルの分子量増加 (2.4 kDa) は処理サンプルの分子量増加 (0.8 kDa) のおよそ 3 倍であることが観察された (図 6)。これより、硫化水素イオン処理によってフリーのチオール基が 3 つから 1 つになると考えられた。こ

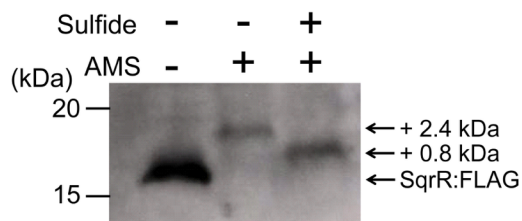


図 6. *in vivo*でのSqrRのCys残基の修飾の検出

Cys 残基の SH 基が AMS 修飾をうけることで生じる電気泳動度シフトから、SqrR の Cys 残基のフリーの SH 基数を定量した。細胞を硫化水素で処理することで、2.4 kDa 分のシフトが 0.8 kDa 分のシフトに減少した。

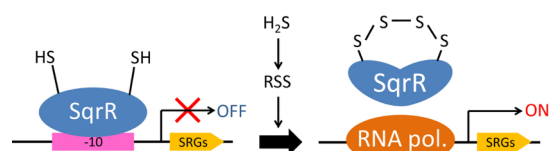


図 7. SqrRによる硫化水素応答性遺伝子群 (Sulfide-responsive genes; SRGs) の転写制御機構のモデル

の実験からは、Cys41 と Cys107 の架橋は同定できないが、*in vitro* の実験からこれら 2 つのシステイン残基の間で GSSH による架橋が形成されることが示されているため、*in vivo* でも内在性の硫化水素によって生成された RSS によって SqrR は 2 つのシステイン残基の間で架橋反応を起こすと考えられた。

硫化水素応答性転写因子 SqrR は、硫化水素非存在下では、還元型としてオペレーター領域に結合して転写を抑制する。硫化水素存在下では、それに由来する RSS によって保存された Cys 残基 (Cys41 と Cys107) の間で分子内テトラスルフィド結合が形成され、オペレーター領域との結合親和性が低下し、重複するプロモーター領域への RNA ポリメラーゼ結合が可能となり転写が活性化される。このような分子機構で、硫化水素にตอบสนองした転写制御を行っていることが明らかとなった (図 7)。

4. おわりに

本研究では、硫化水素依存的な光合成の制御に関わる因子の同定とその分子機構の解析を行った。その結果、硫化水素応答性の転写因子 SqrR を同定し、RSS によって形成される分子内テトラスルフィド結合が転写調節に重要であることを明らかにした。しかし、SqrR による制御機構が、環境中での硫化水素濃度変動に対応するためにどのくらい重要であるかはわからない。近年、環境中の微生物群集におけるメタ解析が急速に進んでいる。これらの技術と本研究の生理学的な成果を合わせることで、環境変化に合わせた光合成の進化の解明につながると期待している。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、東京工業大学の増田真二准教授には手厚いご指導を賜りました。深く感謝いたします。また、本研究は、インディアナ大学の David P. Giedroc 教授、Carl E. Bauer 教授、Jiangchuan Shen 博士との共同研究によって行いました。感謝いたします。

Received February 14, 2017; Accepted February 24, 2017;

Published April 30, 2017

参考文献

1. Schutz, M., Shahak, Y., Padan, E. and Hauska, G. (1997) Sulfide-quinone reductase from *Rhodobacter capsulatus*. *J. Biol. Chem.* 272, 9890–9894.
2. Chen, Z., Koh, M., Driessche, G.V., Beeumen, J.J.V., Bartsch, R.G., Meyer, T.E., Cusanovich, M.A. and Mathews, F.S. (1994) The structure of flavocytochrome *c* sulfide dehydrogenase from a purple phototrophic bacterium. *Science* 266, 430–432.
3. Ogawa, T., Furusawa, T., Shiga, M., Seo, D. and Inoue, K. (2010) Biochemical studies of a soxF-encoded monomeric flavoprotein purified from the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum* that stimulates *in vitro* thiosulfate oxidation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 771–780.
4. Sander, J. and Dahl, C. (2009) Metabolism of inorganic sulfur compounds in purple bacteria, in *The purple phototrophic bacteria* (Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnaier, M.C. and Beatty, J.Y., Eds.) pp 595–622, Springer, Dordrecht, the Netherlands.
5. Griesbeck, C., Schutz, M., Schodl, T., Bathe, S., Nausch, L., Mederer, N., Vielreicher, M. and Hauska, G. (2002) Mechanism of sulfide-quinone reductase investigated using site-directed mutagenesis and sulfur analysis. *Biochemistry* 41, 11552–11565.
6. Shimizu, T., Shen, J., Fang, M., Zhang, Y., Hori, K., Trinidad, J. C., Bauer C. E., Giedroc, D. P. and Masuda, S. (2017) The sulfide-responsive transcriptional repressor SqrR functions as a master regulator of sulfide-dependent photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* in press (doi: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1614133114)
7. Sganga, M.W. and Bauer, C.E. (1992) Regulatory factors controlling photosynthetic reaction center and

- light-harvesting gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Cell* 68, 945–954.
8. Luebke, J.L., Shen, J., Bruce, K.E., Kehl-Fie, T.E., Peng, H., Skaar, E.P. and Giedroc, D.P. (2014) The CsoR-like sulfurtransferase repressor (CstR) is a persulfide sensor in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 94, 1343–1360.
 9. Osman, D., Piergentili, C., Chen, J., Sayer, L., Uson, I., Huggins, T., Robinson, N. and Pohl, E. (2016) The effectors and sensory sites of formaldehyde-responsive regulator FrmR and metal-sensing variant. *J. Biol. Chem.* 291, 19502–19516.
 10. Higgins, K.A. and Giedroc, D.P. (2014) Insights into protein allostery in the CsoR/RcnR family of transcriptional repressors. *Chem. Lett.* 43, 20–25.
 11. Ida, T., Sawa, T., Ihara, H., Tsuchiya, Y., Watanabe, Y., Kumagai, Y., Suematsu, M., Motohashi, H., Fujii, S., Matsunaga, T., Yamamoto, M., Ono, K., Devarie-Baez, N.O., Xian, M., Fukuto, J.M. and Akaike, T. (2014) Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 7606–7611
 12. Nishida, M., Sawa, T., Kitajima, N., Ono, K., Inoue, H., Ihara, H., Motohashi, H., Yamamoto, M., Suematsu, M., Kurose, H., van der Vliet, A., Freeman, B.A., Shibata, T., Uchida, K., Kumagai, Y. and Akaike, T. (2012) Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration,” *Nat. Chem. Biol.* 8, 714–724.

The induction of an electron transport chain involved in sulfide oxidation: The identification and sulfide-responsive mechanism of transcriptional factor SqrR

Takayuki Shimizu*

Graduate School of Bioscience & Biotechnology, Tokyo Institute of Technology

研究紹介

光応答素子のための光化学系 I とカーボンナノチューブの複合体形成[§]

¹東京理科大学大学院 理学研究科, ²東京大学大学院 理学系研究科,
³東京理科大学 工学部, ⁴東京理科大学 理学部
 二井 大輔^{1,*}, 宮地 麻里子² 嶋田 友一郎³, 野沢 陽佑⁴, 伊藤 雅浩¹, 本間 芳和¹,
 池平 秀², 山野井 慶徳², 西原 寛², 鞆 達也¹

近年、光化学系 I (PS I) の光合成反応を活用したデバイス作製が盛んに行われている。これは光合成反応の初期過程において、PS I 電子伝達反応の量子収率が 100%に近いことを利用するものである。本研究では、導電性に優れた単層カーボンナノチューブ (SWNT) と PS I の複合体を作製し、PS I を励起することによって生じた電子を SWNT に伝達し、光エネルギーを電流に変換する素子を作製することを目的とした。本研究で用いた PS I は、還元側に遺伝子組換えにより炭素材料に特異的に結合する配列を挿入し、配向性をもたせることにより、効率よく電子を取り出すことを可能にしている。野生株の PS I との比較により、遺伝子改変した PS I は SWNT と複合体を形成し、光応答素子として機能することを紹介する。

1. はじめに

炭素材料は、次世代素子の構成要素として有用な可能性を秘めている。炭素材料としては、グラファイト、フラーレン、ダイヤモンド、カーボンナノチューブ (CNT) そしてグラフェン等が存在するが、本研究では単層カーボンナノチューブ (Single-Walled Carbon Nano Tube: SWNT) を用いた。SWNT の構造は、一枚のグラフェンを丸めた構造をしており、その構造はカイラル指数により決定され、金属性と半導体性のどちらかの性質を持つ。SWNT の特徴として、フレキシブルで強靱であり、また導電材料として一般的に使われている銅と比較して、約 1000 倍の高い電流密度耐性 (高導電性) を有しているため、センサーや電子素子等への応用が考えられている。しかしながら、炭素材料は不溶性であり、この点が応用の際の問題点であった。その中で、近年生体分子を SWNT の分散剤として用いることで可溶化する多くの研究報告がある^{1,2)}。また SWNT は DNA

やタンパク質のような生体分子と複合体を形成できることが知られている³⁻⁸⁾。SWNT 表面とタンパク質間の結合メカニズムについてはいくつか報告がある。まず化学的な結合の例としてはタンパク質側鎖と表面を修飾した SWNT 間の相互作用によるものがある^{9,10)}。また他の例として、SWNT 表面とタンパク質の疎水性アミノ酸側鎖間の疎水性相互作用によるものがある^{11,12)}。しかしながら、疎水性相互作用を活用する方法は、SWNT 表面とタンパク質の吸着方向をコントロールすることが出来ない問題点がある。複合体化の別のアプローチとして、SWNT 表面にて生体分子間の強い相互作用を利用する方法がある。この方法の一つとして、biotin-streptavidin の分子認識能による化学的な反応を活用した例がある¹³⁾。

光化学系 (PS) I はシアノバクテリア、藻類、高等植物中に存在する膜タンパク質複合体であり、光駆動による電子伝達を行う。そして plastocyanin、もしくは cytochrome *c*₆ から電子を受け取り ferredoxin へ効率よく伝達する機構をもつ。これらの特性から、ナノサイズの光電変換素

[§]第7回日本光合成学会シンポジウム ポスター発表受賞論文

*連絡先 E-mail: iidabashi2011@yahoo.co.jp

子の構成要素としての適合性が見出されている¹⁴⁻¹⁷⁾。

PS I 複合体はシアノバクテリアから三量体として単離されるのに対して、高等植物からは単量体として単離される。好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* そして高等植物の *Pea sativum* から単離された PS I の結晶構造は、高分解能で報告されていることから、分子レベルの反応理解および操作が可能である¹⁸⁻²⁰⁾。近年の遺伝子工学およびナノテクノロジーの発展により、PS I は白金、金粒子あるいはオンチップといった他のナノ材料と複合体化させることにより素子として活用されており^{15,21,22)}、例えば、電子伝達素子あるいは水素生成への応用が期待されている¹⁴⁻¹⁷⁾。

本研究で用いた、PS I と SWNT の複合体化は、Phage display 法により同定した CNT に対して特異的に結合する配列を介して形成される (CNTBP: CNT Binding Peptide)。本研究では、この配列を PS I の還元側に挿入した。この PS I に挿入した配列は、CNT に対して高い親和性を持っているため、SWNT 表面に配向性を有して結合すると期待される。本研究では、実験材料としてシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 を使用し、CNTBP は PsaE 中央付近のループ部位に挿入した。この選定理由は、PsaE 近傍にフェレドキシンが結合し電子授与に関わっていることが結晶構造から示唆されているためである。従って、SWNT は光照射により PsaE に隣接した PsaC に結合している Fe-S クラスタから電子を直接受け取ることが期待できる。

電極上に固定化された PS I からの光電流測定は、様々な光合成生物や材料において多くの研究がなされてきた²³⁻²⁵⁾。本研究では配向性を持たせた PS I を SWNT 電極に結合させ、光照射により電子の流れを検出することに成功した²⁶⁾。

2. カーボンナノチューブ結合配列の発現と PS I への挿入

論文共著者の嶋田らは、phage display 法を用いて 10^9 個の phage から CNT に対して高い結合性を示した His-Met-Gly-Leu-Thr-Lys-Ile-His-Tyr-

Ser-Ala-Leu からなる 12 アミノ酸配列を同定した。この CNTBP 配列を *Synechocystis* sp. PCC 6803 の PsaE ループ部位 Gly55-Val56 の間に挿入した変異体を相同組み換えにより得た²⁷⁾ (図 1a)。DNA のセグリゲーションは、PsaE の両側のプライマーを含んだ PCR 法より確認した (data not shown)。

コントロール及び遺伝子改変した *Synechocystis* sp. PCC 6803 株は 8 L ボトルにて BG11 で培養を行った。培養環境は $20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の蛍光灯下にて室温で行い、空気をフィルター (Millex filter, Millipore, USA) を通して供給した。それぞれの株からの PS I 複合体の単離精製は、チラコイド膜を可溶化後、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて行った²⁸⁾。まず、細胞を 10 mM MgCl_2 , 5 mM CaCl_2 として 25% (w/v) glycerol を含む 50 mM 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid (MES)-NaOH buffer (pH 6.0) 中にて懸濁し、その後ガラスビーズを用いて破碎した。チラコイド膜は遠心分離により回収し、その後、2% *n*-dodecyl- β -D-maltoside (DM) を用いて、277 K で 10 分間可溶化を行った。遠心分離後、その溶液の上清を 50 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.04% DM, 30 mM NaCl にて平衡化した陰イオン交換カラムに供した (DEAE Toyopearl, TOSOH, Japan)。単離 PS I は、NaCl (30-400 mM) 濃度勾配によりカラムから溶出した。

図 1b は精製された PS I の SDS-PAGE を示している。図中の Lane 1 はコントロール PS I、Lane 2 は CNTBP を PsaE に挿入した PS I (以後 PS I-CNTBP と呼ぶ) をそれぞれ示す。その結果、PS I-CNTBP において PsaE のバンドがコントロール PS I と比べアップシフトをしており、PsaE に特異的な結合配列が挿入されていることが SDS-PAGE から確認できた。

3. 吸収スペクトル測定による SWNT と PSI の複合体化の確認

PS I と SWNT の複合体化の確認は、吸収スペクトルの測定、透過型電子顕微鏡観察 (TEM)、SWNT のフォトルミネッセンスにより評価した。吸収スペクトルによる測定は、PS I と SWNT の

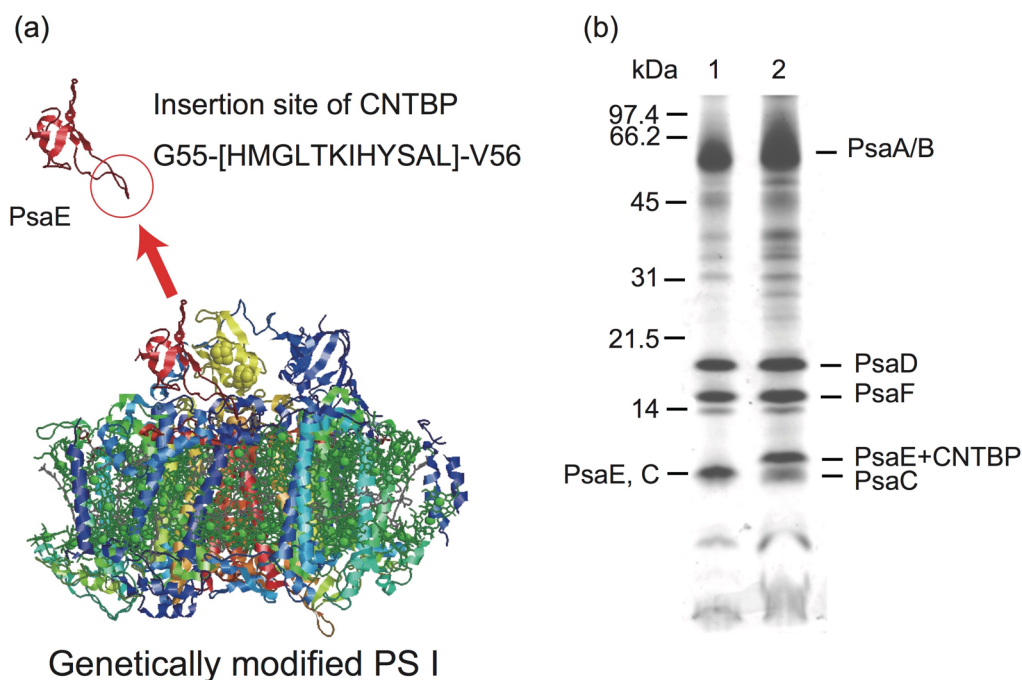


図1. PS Iへのカーボンナノチューブ結合配列 (CNTBP) の挿入部位 (a) と SDS-PAGE による精製した PS I の組成の確認 (b) Lane 1: コントロール PS I、Lane 2: PS I-CNTBP

混合溶液を密度勾配遠心分離により、PS I と SWNT が複合体形成しているものと複合体形成していない PS I を分離することで評価した。

本研究で用いた SWNT は、HiPco 法 (高圧一酸化炭素法) で作製されたものであり、OPTO SCIENCE, INC. (Tokyo, Japan) から購入した。この SWNT の直径は、Raman 分光測定から直径が約 0.8–1.2 nm であることを確認している。SWNT 懸濁液作製方法は以下の通りである。1.0 mg の HiPco SWNT を 2% (w/v) Triton X-100 溶液 1 mL と混合し、氷水中で 90 分間超音波処理 (on 1 s, off 1 s) を行った。その後超音波処理した溶液を 1 時間遠心分離 (18,000 × g) し、沈殿を除いた上清を分取した。この SWNT 懸濁液を全ての実験で用いた。

PS I と SWNT の結合は、PS I と SWNT 懸濁液を phosphate buffer [10 mM phosphate (pH 7.4), 0.04% DM]、もしくは MES buffer [10 mM MES (pH 6.0), 0.04% DM] 中にて混合し作製した。本実験で用いたサンプルの混合後の PS I 最終濃度は 0, 10, 20, 30, 50, 70, 100 μg Chl mL⁻¹ であり、SWNT の最終濃度は 0, 50, 100 μg mL⁻¹ とした。混

合後、PS I と SWNT の溶液を暗所で 277 K にて 1 時間インキュベートをすることにより、複合体形成を行った。

密度勾配遠心分離は、非イオン性の密度勾配溶液 (OptiPrep: iodixanol 水溶液, Sigma-Aldrich)²⁹⁾ を使用し、勾配は遠心分離チューブ内にてステップグラジエント法にて作製した。まず、200 μL の 60 % (w/v) iodixanol を遠心チューブの底に加え、その上に 20 % (w/v) iodixanol を 1.8 mL を加えた。その後、作製した勾配溶液の上層に 100 μL の PS I もしくは PS I と SWNT の混合溶液 (iodixanol 無し) を加えた。

吸収スペクトル測定用のサンプル作製手順は以下の通りである。コントロールとしての PS I のみの溶液と、コントロール PS I もしくは PS I-CNTBP との SWNT 混合溶液を 30 分間 80,000 × g にて遠心分離 (Himac CS100GX II, Hitachi Koki, Tokyo, Japan) した。遠心分離後、上層部の PS I バンドを分取し、室温にて分光光度計 (JASCO V-660, Tokyo, Japan) を用いて吸収スペクトルを測定した。

PS I の SWNT への吸着評価として、PS I と SWNT 混合液を用いたときの PSI バンドの濃度 (C_m) とコントロール PS I のみの場合の濃度 (C_p) を、それぞれのサンプルの吸光度から決定した。PS I と SWNT との平衡溶液における遊離 PS I の濃度 (E_c) と PS I 吸着量 (A) は式 (1), (2) にて算出した。

$$E_c = I_c \times C_m / C_p \quad (1)$$

$$A = (I_c - E_c) \times V / A_s \quad (2)$$

I_c は PS I の初期濃度、 V はサンプルの体積、そして A_s は SWNT の添加量である。

図 2 は、MES buffer (pH 6.0) 中にてコントロール PS I もしくは PS I-CNTBP ($50, 70, 100 \mu\text{gChl mL}^{-1}$) と SWNT ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) を混合したときの遠心分離後の写真である。上述した遠心分離条件では、遠心分離後に SWNT は沈殿する。従って、もし PS I と SWNT が複合体化しているならば、PS I は沈殿することが期待される。図 2c の PS I-CNTBP と SWNT の混合溶液の場合、吸着して

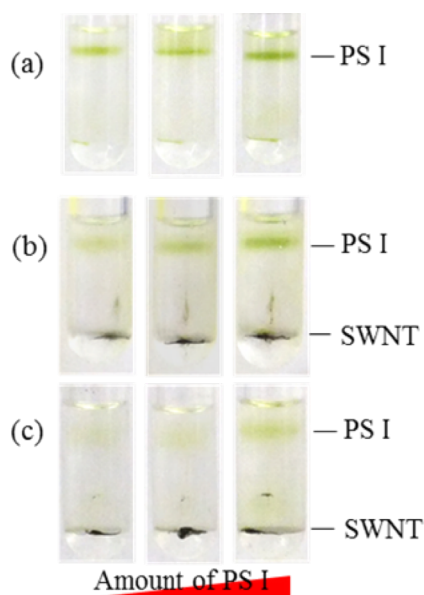


図 2. 密度勾配遠心分離による SWNT に吸着していない PS I の分離
a: PS I, b: SWNT + コントロール PS I, c: SWNT + PS I-CNTBP. 各レーンの PS I の濃度は、左から $50, 70, 100 \mu\text{gChl mL}^{-1}$ である。

いない PS I を示す上層部のバンドが他の溶液の場合と比べ薄まっており、SWNT 表面に PS I が吸着し多くが沈殿していることが示唆される。

図 3 は、分取した上層部の PS I バンドの吸光度測定から算出したコントロール PS I と PS I-CNTBP の SWNT 表面への吸着特性である。Phosphate buffer (pH 7.4) の場合 (図 3a)、配列が無い場合でもわずかな吸着は見られるが、PS I-CNTBP の濃度依存の吸着が示された。従って、PS I に挿入した CNTBP が有効に機能していることが示唆される。一方で、MES buffer (pH 6.0) の場合では、Phosphate buffer (pH 7.4) の場合と同様に PS I の濃度依存の吸着が得られ、また吸着量が増加した (図 3b)。しかしながら、コントロール PS I の場合も吸着量が増加し、また吸着量に大きければつきが得られたため、pH 変化にともない表面電荷が変化することで非特異的な吸着が生じたことが示唆された。この非特異的な吸着の増加は、素子として応用する際に問題となることが考えられる。

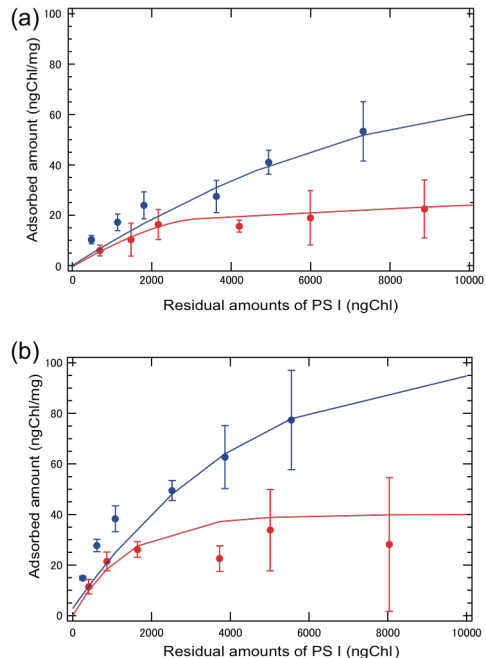


図 3. PS I の SWNT への (a) Phosphate (pH 7.4) 及び (b) MES buffer (pH 6.0) 中での吸着特性
赤色: コントロール PS I、青色: PS I-CNTBP

4. 透過型電子顕微鏡観察による SWNT 表面への PS I の吸着評価

TEM 観察は、Hitachi HF-2000 を用いて行った。使用したグリッドは、サンプル滴下前に親水化処理を行ったものを用いた。サンプルは buffer にて 100 倍希釈した後にグリッドに滴下し、その後 1 時間真空引きを行った。画像は加速電圧 75 kV にて得た。

図 4 は、溶液を Phosphate buffer (pH 7.4) とした場合の SWNT (a) と PS I-CNTBP と SWNT の複合体 (b) の TEM 画像である。画像として SWNT は棒状のものとして確認できた。また PS I のサイズ (20 nm) は、PS I の結晶構造から明らかとなっている¹⁸⁾。PS I-CNTBP と SWNT の混合溶液の場合では、SWNT 表面のまわりに 20 nm サイズの粒子が確認できることから (図 4b)、PS I が SWNT に吸着していることを確認した。

5. SWNT のフォトルミネッセンスの変化による PS I の吸着評価

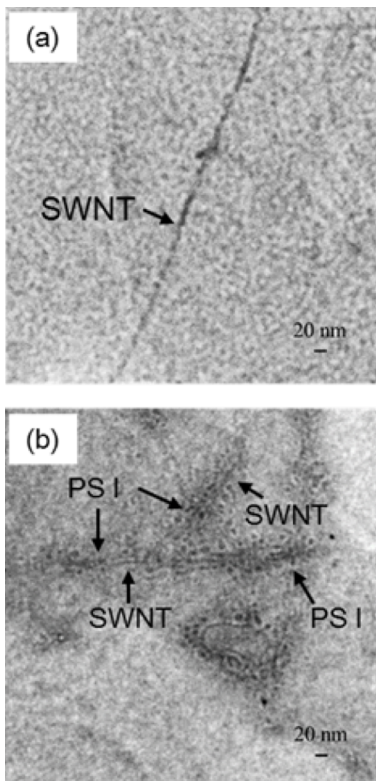


図 4. SWNT のみ (a) 及び PS I-CNTBP と SWNT の複合体 (b) の TEM 画像

フォトルミネッセンス測定は、NIR photoluminescence spectrometer (Shimadzu NIR-PL system) を用いて行った。励起波長は 400–500 nm とし、1000–1600 nm の領域のフォトルミネッセンスを測定した。フォトルミネッセンスは SWNT のユニークな特徴の一つであり、孤立分散された SWNT は、近赤外領域にて発光を示す。

図 5 は、溶液を MES buffer (pH 6.0) とし、SWNT 懸濁液 (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) とその溶液にコントロール PS I もしくは PS I-CNTBP (100 $\mu\text{gChl mL}^{-1}$) を混合した場合における励起波長を変えながら観測したフォトルミネッセンス強度マップである。SWNT は、直径や SWNT 表面の環境により励起・発光波長が異なるが³⁰⁻³²⁾、本実験で用いた SWNT

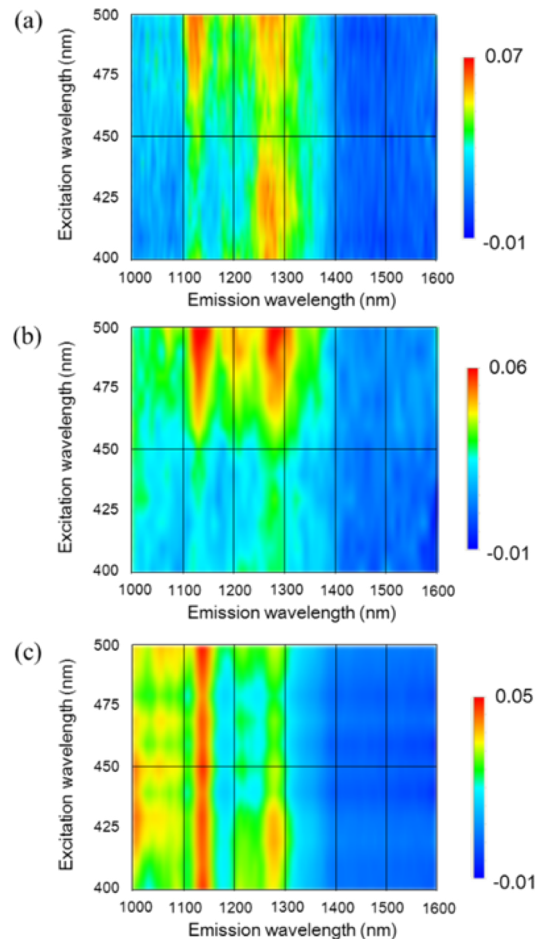


図 5. SWNT の励起波長 400–500 nm におけるフォトルミネッセンス強度マップ

a: SWNT, b: SWNT + コントロール PS I, c: SWNT + PS I-CNTBP. 各サンプルの SWNT の濃度は 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 、PS I の濃度は 100 $\mu\text{gChl mL}^{-1}$ である。

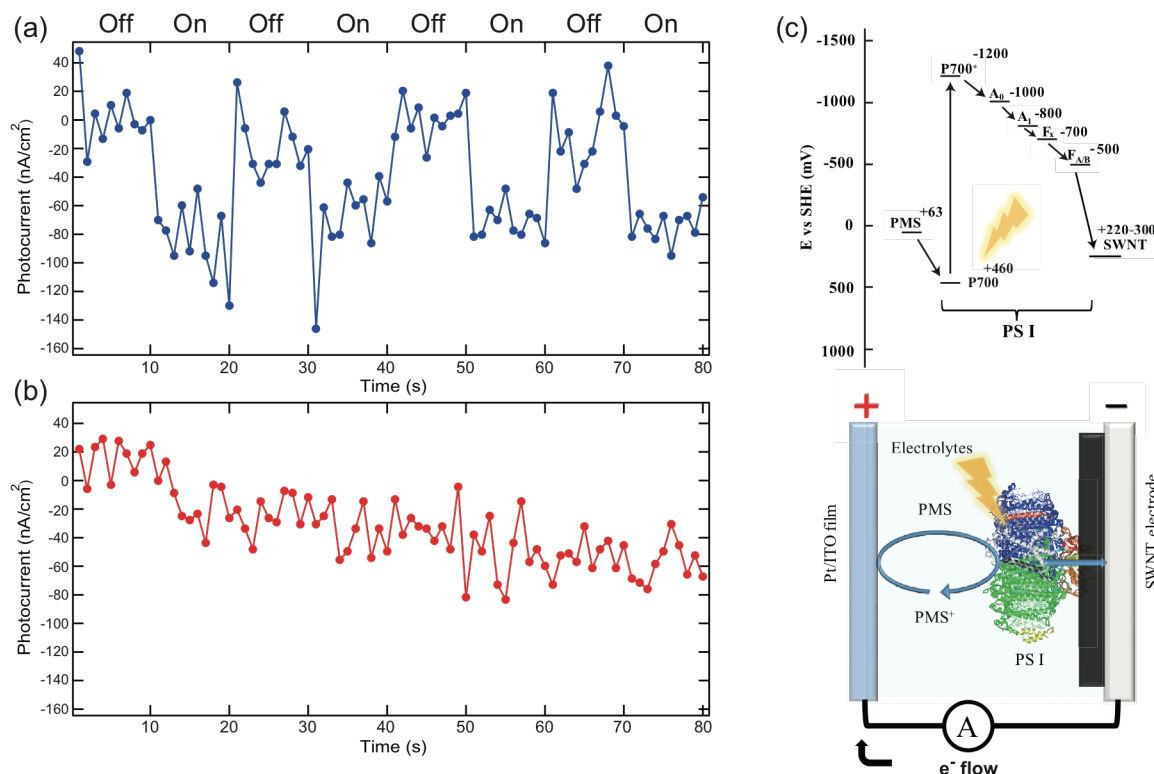


図 6. SWNT 電極に吸着させた (a) PS I-CNTBP 及び (b) PS I (50 µgChl) からの光応答(露光時間:10 sec on/off cycles) (c) 光電流測定中の電子伝達経路(数字はそれぞれの還元電位)及び PS I からの電流生成のメカニズム SWNT 電極 (50 µg) への PS I 添加量は 50 µgChl である。

は、600–850 nm の励起光で、1000–1400 nm の発光が得られる。しかし、我々は PS I の SWNT への吸着状態を確認するため、クロロフィル *a* のソーレー帯の吸収ピークに相当する領域での光応答に注目した。SWNT 懸濁液の場合では、400–500 nm の励起領域では 1100 nm と 1280 nm で SWNT の発光が得られた (図 5a)。従って、もし PS I が SWNT 表面と強い相互作用を持っているならば、この励起光領域の光は、PS I により SWNT の発光に影響を及ぼすことが考えられる。

図 5b は、SWNT とコントロール PS I の混合溶液の場合の測定結果である。この場合も同様に 1100 nm と 1280 nm で SWNT の発光が得られたが、ソーレー帯の吸収に相当する 400–425 nm の領域では発光が消光していることが分かる。これは PS I により励起光のエネルギーが吸収されているためと考えられる。一方で、SWNT と PS I-CNTBP の混合溶液の場合では、コントロール PS I と比べ 1000–1300 nm に新たな幅の広い発光を観測した (図 5c)。このことは、PS I から SWNT

に電子あるいはエネルギーの伝達があることを示唆している。

6. PS I と SWNT で構成された素子の光応答による PS I の配向性の評価

上述した結果から、PS I-CNTBP においては、挿入した CNTBP を介した SWNT への吸着が確認できた。最後にその PS I の SWNT 表面への配向性を確認するため、SWNT を電極とした光応答素子を作製し、光照射により生じる PS I からの光電流により、PS I の SWNT 表面への配向性の評価をした。

全ての測定は室温にて行った。励起光はハロゲンランプ (150 W) からガラスファイバーを介して供給し、光照射時に生じる光電流はデジタルマルチメータ (34401A, Keysight Technologies, Santa Rosa, CA) を用いて測定した。素子の構成は、FTO 導電性ガラス (11 Ω cm⁻², Peccell Technologies, Inc., Kanagawa, Japan) を作用電極とし、Pt /Indium Tin Oxide (ITO) film (15 Ω cm⁻² Peccell Technologies, Inc., Kanagawa, Japan) を対

極として用いた。作用電極は、SWNT 懸濁液を FTO 導電性ガラスに 50 μL (0.5 mg mL⁻¹) 滴下し (液滴面積 1.2 × 1.2 cm)、473 K で 20 分間焼結させる工程を 2 回行い作製した。その後、100 μL の PS I 溶液 (50 μgChl) を SWNT 電極に滴下し、暗所で 277 K にて 12–16 時間インキュベートした。光電流測定前に、電解液を構成する phosphate buffer (pH 7.4) を電極に滴下し、吸着していない過剰な PS I を除いた。二つの電極間に電解液を満たすため両面テープ (厚さ 0.1 mm) を用いて空間を作り接着を行った。電極間に注入する電解液は、phosphate buffer (pH 7.4) 中に電子供与体として Phenazine methosulfate (PMS) を含んだ溶液とした。その後、二つの電極は、両面テープに加えて瞬間接着材エポキシを用いて両者を接着させた。

作製した素子に対し、光を照射することで電流応答を測定した。この時、PS I-CNTBP (図 6a) とコントロール PS I (図 6b) において発生する光電流に明らかな相異が確認できた。PS I-CNTBP の場合では、10 秒間隔で明と暗を移行させる非連続な光照射により、それぞれの明暗移行後に、素早い逆電流が生じた (図 6a)。一方、コントロール PS I の場合では、電流値の変化がそれぞれの明暗移行の後に確認できなかった (図 6b)。以上の結果から、PS I-CNTBP の場合、CNTBP が挿入されている PS I の還元側が電極に吸着し、コントロール PS I は、SWNT 電極上に吸着していない、もしくは配向していないことが示唆される。

図 6c は、作製した素子に含まれる PS I 電子伝達成分、および還元メディエーターとしての PMS の還元電位と素子内部の電子伝達経路を示す。SWNT 電極の酸化還元電位の値は参考文献を参照した³³⁻³⁵。PMS からの電子は、PS I の反応中心から A₀, A₁, F_x, F_A/F_B を経由して Fe-S cluster に伝達される。その後、PS I の還元された Fe-S cluster 側が SWNT 電極と吸着していることから、SWNT 電極に直接電子が伝達される。SWNT 電極に到達した電子は Pt/ITO 電極伝達され、そして Pt/ITO 電極の電子により PS I に電子を供与し

た PMS⁺が還元される。これにより、暗状態に移行するまで逆電流が生成される。

7. おわりに

私達は、CNT に対して高い親和性を持つ CNTBP を PS I の PsaE サブユニットに挿入し、PS I-SWNT 複合体を作製した。我々の得た結果は、明らかに CNTBP を介した PS I と SWNT の複合体が作製されていることを示した。そして、その PS I は SWNT 表面と意図した向きで吸着していることを実証した。PS I と SWNT の複合体においては、高効率な電子伝達システムの構築が期待できる。また、今後この遺伝子改変による複合体化の手法は、他の種を含めた PS I あるいは PS II とナノ材料を組み合わせる方法として有効であると考えられる。

謝辞

本研究の一部は、文部科学省科研費 (26220801) の補助を受けて行われました。今回本稿執筆の機会を与えてくださいました日本光合成学会ならびに編集委員会の方々に御礼申し上げます。

Received February 25, 2017; Accepted March 11, 2017;
Published April 30, 2017

参考文献

1. Zheng, M., Jagota, A., Semke, E.D., Diner, B.A., McLean, R.S., Lustig, S.R., Richardson, R.E. and Tassi, N.G. (2003) DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes. *Nat. Mater.* 2, 338–342.
2. Nakashima, N., Okuzono, S., Murakami, H., Nakai, T. and Yoshikawa, K. (2003) DNA dissolves single-walled carbon nanotubes in water. *Chem. Lett.* 32, 456–457.
3. Saifuddin, N., Raziah, A.Z. and Junizah, A.R. (2012) Carbon nanotubes: a review on structure and their interaction with proteins. *J. Chem.* 2013.
4. Ito, M., Yajima, H. and Homma, Y. (2016) Strain effect of cellulose-wrapped single-walled carbon nanotubes measured by photoluminescence and Raman scattering spectroscopy. *Jpn. J. Appl. Phys.* 55, 075101.

5. Kam, N.W.S. and Dai, H. (2005) Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 6021–6026.
6. Yang, W., Thordarson, P., Gooding, J.J., Ringer, S.P. and Braet, F. (2007) Carbon nanotubes for biological and biomedical applications, *Nanotechnology* 18, 412001.
7. Nii, D., Hayashida, T., Yamaguchi, Y., Ikawa, S., Shibata, T. and Umemura K. (2014) Selective binding of single-stranded DNA-binding proteins onto DNA molecules adsorbed on single-walled carbon nanotubes. *Colloids Surf. B*, 121, 325–330.
8. Umemura, K. (2015) Hybrids of nucleic acids and carbon nanotubes for nanobiotechnology. *Nanomaterials* 5, 321–350.
9. Tasis, D., Tagmatarchis, N., Bianco, A. and Prato, M. (2006) Chemistry of carbon nanotubes. *Chem. Rev.* 106, 1105–1136.
10. Qi, H., Ling, C., Huang, R., Qiu, X., Shangguan, L., Gao, Q. and Zhang, C. (2012) Functionalization of single-walled carbon nanotubes with protein by click chemistry as sensing platform for sensitized electrochemical immunoassay. *Electrochim. Acta.* 63, 76–82.
11. Chen, R.J., Zhang, Y., Wang, D. and Dai, H. (2001) Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 3838–3839.
12. Matsuura, K., Saito, T., Okazaki, T., Ohshima, S., Yumura, M. and Iijima, S. (2006) Selectivity of water-soluble proteins in single-walled carbon nanotube dispersions. *Chem. Phys. Lett.* 429, 497–502.
13. Liu, Z., Galli, F., Janssen, K.G., Jiang, L., van der Linden, H.J., de Geus, D.C., Voskamp, P., Kuil, M.E., Olsthoorn, R.C., Oosterkamp, T.H., Hankemeier, T. and Abrahams, J.P. (2010) Stable single-walled carbon nanotube–streptavidin complex for biorecognition. *J Phys Chem C*. 114, 4345–4352.
14. Ciesielski, P.N., Scott, A.M., Faulkner, C.J., Berron, B.J., Cliffel, D.E. and Jennings, G.K. (2008) Functionalized nanoporous gold leaf electrode films for the immobilization of photosystem I. *ACS Nano* 2, 2465–2472.
15. Terasaki, N., Yamamoto, N., Hiraga, T., Yamanoi, Y., Yonezawa, T., Nishihara, H., Ohmori, T., Sakai, M., Fujii, M., Tohri, A., Iwai, M., Inoue, Y., Yoneyama, S., Minakata, M. and Enami, I. (2009) Plugging a molecular wire into photosystem I: reconstitution of the photoelectric conversion system on a gold electrode. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 1585–1587.
16. Iwuchukwu, I.J., Vaughn, M., Myers, N., O'Neill, H., Frymier, P. and Bruce, B.D. (2010) Self-organized photosynthetic nanoparticle for cell-free hydrogen production. *Nat. Nanotechnol.* 5, 73–79.
17. Mershin, A., Matsumoto, K., Kaiser, L., Yu, D., Vaughn, M., Nazeeruddin, M.K., Bruce, B.D., Graetzel, M. and Zhang, S. (2012) Self-assembled photosystem-I biophotovoltaics on nanostructured TiO₂ and ZnO. *Sci. Rep.* 2, 234.
18. 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.
19. Mazor, Y., Borovikova, A. and Nelson, N. (2015) The structure of plant photosystem I super-complex at 2.8 Å resolution. *eLife* 4, e07433.
20. Qin, X., Suga, M., Kuang, T. and Shen, J.R. (2015) Structural basis for energy transfer pathways in the plant PSI–LHCI supercomplex. *Science* 348, 989–995.
21. Kaniber, S.M., Brandstetter, M., Simmel, F.C., Carmeli, I. and Holleitner, A.W. (2010) On-chip functionalization of carbon nanotubes with photosystem I. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 2872–2873.
22. Miyachi, M., Yamanoi, Y., Shibata, Y., Matsumoto, H., Nakazato, K., Konno, M., Ito, K., Inoue, Y. and Nishihara, H. (2010) A photosensing system composed of photosystem I, molecular wire, gold nanoparticle, and double surfactants in water. *Chem. Commun.* 46, 2557–2559.
23. Nguyen, K. and Bruce, B.D. (2014) Growing green electricity: progress and strategies for use of photosystem I for sustainable photovoltaic energy conversion. *Biochim. Biophys. Acta.* 1837, 1553–1566.
24. Ravi, S.K. and Tan, S.C. (2015) Progress and perspectives in exploiting photosynthetic biomolecules for solar energy harnessing. *Energy Environ. Sci.* 8, 2551–2573.
25. Miyachi, M., Yamanoi, Y., Tomo, T. and Nishihara, H. (2016) Cross-sectional TEM analysis of an ITO coated with photosystem I and molecular wires. *J. Inorg. Organomet. Polym.* 26, 1309–1312.
26. Nii, D., Miyachi, M., Shimada, Y., Nozawa, Y., Ito, M., Homma, Y., Ikehira, S., Yamanoi, Y., Nishihara, H. and Tomo, T. (2017) Conjugates between

- photosystem I and a carbon nanotube for a photo response device. *Photosynth. Res.* (doi 10.1007/s11120-016-0324-0).
27. Vermaas, W. (1996) Molecular genetics of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: principles and possible biotechnology applications. *J. Appl. Phycol.* 8, 263–273.
 28. Tomo, T., Akimoto, S., Tsuchiya, T., Fukuya, M., Tanaka, K. and Mimuro, M. (2008) Isolation and spectral characterization of photosystem II reaction center from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.* 98, 293–302.
 29. Arnold, M.S., Green, A.A., Hulvat, J.F., Stupp, S.I. and Hersam, M.C. (2006) Sorting carbon nanotubes by electronic structure using density differentiation. *Nat. Nanotechnol.* 1, 60–65.
 30. Miyauchi, Y., Saito, R., Sato, K., Ohno, Y., Iwasaki, S., Mizutani, T., Jiang, J. and Maruyama, S. (2007) Dependence of exciton transition energy of single-walled carbon nanotubes on surrounding dielectric materials. *Chem. Phys. Lett.* 442, 394–399.
 31. Ohno, Y., Iwasaki, S., Murakami, Y., Kishimoto, S., Maruyama, S. and Mizutani, T. (2007) Excitonic transition energies in single-walled carbon nanotubes: Dependence on environmental dielectric constant. *Phys. Stat. Sol. b* 244, 4002–4005.
 32. Chiashi, S., Watanabe, S., Hanashima, T. and Homma, Y. (2008) Influence of Gas Adsorption on Optical Transition Energies of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Nano Lett.* 8, 3097–3101.
 33. Tanaka, Y., Hirana, Y., Niidome, Y., Kato, K., Saito, S. and Nakashima, N. (2009) Experimentally Determined Redox Potentials of Individual (n, m) Single-Walled Carbon Nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 7655–7659.
 34. Paolucci, D., Franco, M.M., Iurlo, M., Marcaccio, M., Prato, M., Zerbetto, F., Pénicaud A. and Paolucci, F. (2008) Singling out the Electrochemistry of Individual Single-Walled Carbon Nanotubes in Solution. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 7393–7399.
 35. Kim, K.K., Yoon, S.-M., Park, H.K., Shin, H.-J., Kim, S.M., Bae, J.J., Cui, Y., Kim, J.M., Choi, J.-Y. and Lee, Y.H. Doping Strategy of Carbon Nanotubes with Redox Chemistry. *New J. Chem.* 2010, 34, 2183–2183.

Complex formation between photosystem I and a carbon nanotube for a photo-conversion device

Daisuke Nii^{1*}, Mariko Miyachi², Yuichiro Shimada³, Yosuke Nozawa⁴, Masahiro Ito¹, Yoshikazu Homma¹, Shu Ikehira², Yoshinori Yamanoi², Hiroshi Nishihara², Tatsuya Tomo¹

¹Department of Physics, Graduate School of Science, Tokyo University of Science, ²Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo, ³Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Tokyo University of Science, ⁴Department of Physics, Faculty of Science, Tokyo University of Science

解説特集
**光化学系の構造・モデル計算から見えてきた
光合成反応の妙**

Editors: 得津 隆太郎 (基礎生物学研究所 環境光生物学研究部門)
柏山 祐一郎 (福井工業大学 環境情報学部)

| | | |
|----|--|----|
| 序文 | 得津 隆太郎 (基生研) 柏山 祐一郎 (福井工業大) | 32 |
| 解説 | X線自由電子レーザーを利用したタンパク質高分解能無損傷構造解析 平田 邦生 (理研・放射光科学, JST/CREST) | 33 |
| 解説 | Photosystem II における水素結合ネットワークを介したプロトン移動 斉藤 圭亮 (東京大) | 39 |
| 解説 | 植物の光化学系 I-集光性アンテナ複合体 I 超複合体の結晶構造とエネルギー伝達の構造基盤 菅 倫寛 (岡山大) | 48 |

解説特集

序文[‡]

基礎生物学研究所 環境光生物学研究部門

得津 隆太郎¹

福井工業大学 環境情報学部

柏山 祐一郎²

地球上に生きる多くの生物は、その活動のためのエネルギーを太陽光エネルギーに依存しています。特に、酸素発生型光合成は、水分子を電子供与体とすることで地球内部からの還元力に依存する必要のないエネルギー変換の仕組みであって、地球生命圏のエネルギーフローのあり方を決定づけてきたといえるでしょう。すなわち、酸素発生型光合成によって地球上に豊富な酸素と有機物が蓄えられ、多くの生物はこれら光合成産物の化学ポテンシャルをエネルギー源として活動しています。このような観点からも、酸素発生型光合成は、その誕生から 28 億年にわたり、地球環境の形成に最も大きな影響を与えた生化学プロセスであると言えます。

ところで、光合成の根幹の一つをなす光化学反応は、酸素発生型光合成においては光化学系Ⅱおよび光化学系Ⅰと呼ばれる 2 つの光化学系を中心として駆動されています。これら光化学系の研究の歴史は古く、先人たちの研究の積み重ねにより、その構造・機能が次第に明らかになってきました。特に、近年の目覚ましい X 線結晶構造解析技術の向上に伴い原子分解能に近い光化学系の超分子構造が明らかとなり、光合成研究分野のみならず他分野・社会的にもインパクトの大きい研究成果が続々と発表されています。その一方で、構造生物学分野以外の光合成研究者にとっては、構造解析の手法や構造情報に基づく化学反応に関する議論などを完全に理解することは困難になりつつあると思います。このような背景を受けて、2016 年 5 月に東京理科大学にて開催された第 7 回日本光合成学会・公開シンポジウム 1 『光化学系の構造・モデル計算から見えてきた光合成反応の妙』では、大型放射光施設 SPring-8 を利用した結晶構造解析の技法、それにより明らかになった光化学系Ⅱおよび光化学系Ⅰの分子構造、さらにはそれらの構造情報をふんだんに利用した構造・理論解析の手法について、4 名の研究者に講演をしていただきました。いずれの講演も、構造生物学分野外のシニア研究者はもちろん、多くの若手研究者にとって分かりやすい内容であったのではないかと思います。

本特集では、シンポジウムの限られた時間では伝わりきらなかった部分も含めた研究内容について、3 名の講演者に改めて解説をお願いしました。本特集が、一人でも多くの光合成研究者にとって、新たな興味・発想を生み出すきっかけとなれば幸いです。

最後に、本特集の編纂に当たってご尽力いただいた本紙編集長の伊福 健太郎先生にこの場を借りてお礼を申し上げます。

[‡]解説特集「光化学系の構造・モデル計算から見えてきた光合成反応の妙」

¹連絡先 E-mail: tokutsu@nibb.ac.jp

²連絡先 E-mail: ykas8787@gst.ritsumeit.ac.jp

解説

X線自由電子レーザーを利用したタンパク質高分解能無損傷構造解析[†]

理化学研究所・放射光科学総合研究センター、JST/CREST

平田 邦生*

ここ数年でX線を用いたタンパク質の結晶構造解析は著しい変化を迎えたといえる。それはX線自由電子レーザー（以下XFEL）の利用開始による種々の技術革新によるものと言って良いだろう。XFELという新しいX線プローブがタンパク質結晶構造解析に新しい価値を与え始めている。我々もSPRING-8に併設されたXFEL施設であるSACLA(SPRING-8 Angstrom Compact Free Electron Laser)を用い、金属含有タンパク質であるウシ心筋シトクロム酸化酵素の「あるがままの構造をより詳細に」捉えることに成功した。従来のタンパク質結晶構造研究と、XFEL施設を用いたその違いを比較しながら、タンパク質結晶構造解析にXFELを用いる利点について紹介する。

1. はじめに：研究の背景

生命活動はタンパク質が関わる化学反応によって担われており個々のタンパク質の機能やその発現のメカニズム解明は古くから重要な研究対象である。タンパク質の機能をより深く理解するために立体構造情報は必要不可欠な情報であり、数ある構造解析手法の中でもタンパク質X線結晶構造解析は高分解能立体構造を取得するための強力な手法の一つであると言って良い。タンパク質結晶構造解析は結晶中に規則的に並んだ原子によって回折されたX線回折強度から電子密度図を得ることにより結晶単位胞内の原子配列（結晶構造）を決定する手法である。回折像はブラッグの条件を満たす回折点によって構成され、結晶方位を変化させれば条件を満たす回折斑点が変化する。立体構造を決定するためには連続的に結晶を動かしその回折像を三次的に記録する必要がある。現在タンパク質分子の結晶解析においては、ほとんどの場合、振動写真法(rotation method)が用いられる。つまり、結晶を回転軸の周りに微小角で振動させながら、その回折像を二次元検出器で連続的に収集する。回折能

の低いタンパク質結晶からの高精度回折強度測定には放射光の高輝度X線利用が有効であるが、一方で放射線による試料の損傷が深刻化した。このいわゆる放射線損傷を抑えるためにサンプル結晶の冷却が有効であることが見出され、結晶中の水にグリセロールやトレハロースなどの抗凍結剤を加え、100K以下の低温で瞬間的に凍結させて、低温窒素ガス気流下での回折強度測定を行うことが現在一般的な測定方法となった。ただし冷却による放射線損傷低減にも限界がある。

タンパク質X線結晶構造解析における放射線損傷には大きく分けて二つあることが知られている。グローバルな損傷とローカルな損傷である。X線の照射によって結晶格子の長さが変化したり、結晶のモザイク度が変化したり、結果として回折強度がデータ収集中に目に見えて弱くなるなどのデータ劣化を総じてグローバルな放射線損傷と呼ぶ。一方でグローバルな放射線損傷が無いと考えられる場合にも電子密度上でタンパク質分子の形が変化するなど、精密構造決定に障害となる放射線損傷をローカルな放射線損傷と呼び、グローバルな放射線損傷と分けて議論される場合がある。当然ローカルな放射線損傷はグローバルなものよりもX線照射量が少ない実験条件で起こる。ローカルな損傷はその空間の放射線損

[†]解説特集「光化学系の構造・モデル計算から見えてきた光合成反応の妙」

*連絡先 E-mail: hirata@spring8.or.jp

傷“感受性”によって起きやすさ（観測されやすさ）が異なり、それは電子密度の高低でほぼ規定される。例えば金属原子など原子番号が多い原子の周辺ほど観測されやすく、金属原子周辺に不可解な電子密度が生じる、ジスルフィド結合の乖離、アミノ酸側鎖の酸素原子の乖離など見え方も種々報告されている。いずれにせよタンパク質結晶の放射線損傷は結晶に X 線を照射した場合に必ず起こる現象であり、それが問題になるかどうかは結晶構造解析の目的に応じて判断すべきである。特に原子番号の大きい金属イオンを含み、それがタンパク質の機能に重要な役割を持つ場合には注意深く解析を進めるべきであろう。

放射線損傷は吸収線量（結晶が X 線照射によって単位重量あたりの吸収するエネルギー量 $\text{J/kg} = \text{Gy}$ ）によって定量化され、さらに凍結したタンパク質結晶試料の回折能は吸収線量 20 MGy でおおよそ半分になるということが広く知られている（Henderson limit）。回折強度の減衰（グローバルな放射線損傷）に関するこの知見に基づき通常は、結晶に含まれる分子などの情報から利用する X 線のエネルギーにおける吸収係数を概算し、データ収集時の露光条件を決定するなど対策が講じられてきた。一方のローカルな放射線損傷が問題になる場合には結晶構造解析ではない方法（分光学など）で吸収線量とタンパク質の状態変化の関係を調査し損傷が重篤でないレベルの吸収線量で結晶構造解析を行う、あるいは、系統的に損傷量を変化させた構造決定を行って電子密度変化から損傷の無い構造を予測するなどの方法が用いられている。問題は損傷量をより低減するためには分解能がトレードオフとなることであり、これを解決することが従来のシンクロトン放射光では困難であった。以下にシトクロム酸化酵素（以下 CcO）の結晶構造解析を例にこれについて記述する。

2. 高分解能結晶構造解析と放射線損傷の問題

ミトコンドリア内膜に存在する CcO は分子状酸素を水にまで還元する反応と共役して膜を介したプロトン能動輸送を行う細胞呼吸末端酸化酵素の一つである。CcO が形成する膜内外のプロ

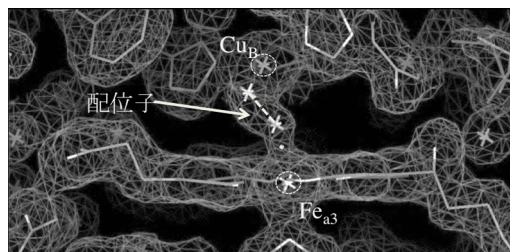


図 1. シトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) の酸素還元中心の電子密度
 $\text{Fe}_{a3}\text{Cu}_B$ の間に配位子が存在している。

トン濃度差は細胞のエネルギー源である ATP の合成に利用されるため、この酵素は細胞のエネルギー変換過程で最も重要な酵素の一つであると言える。ウシ心筋由来酸化型休止型（以下単に酸化型と呼ぶ）CcO の構造は 1995 年に決定され¹⁾、その後、その分子機構のさらなる理解のため主に高分解能 X 線結晶構造解析を継続して行っていた^{2), 3)}。特に酸化型の酸素還元中心の配位分子種の特定は反応サイクル中の電子の授受とプロトンポンプ機構のカップリングを理解する上で重要な研究対象であった。CcO の酸素還元中心はヘム鉄およびその近傍に存在する Cu_B で構成されており、分子状酸素の還元反応が起こる。この活性中心（図 1）には配位子の電子密度が認められていた。この配位子同定のための高分解能酸化型 CcO 構造解析において放射線損傷の問題に直面した。反応中間体結晶構造解析を行うために、ビームラインに設置したオンライン結晶分光装置により、図らずも結晶への X 線の照射が酸化型結晶の吸収スペクトルに変化を与えることが判明した。このことは、酸素還元中心の電子状態が変化していることを示唆していたため⁴⁾、我々は回折データ取得の際の X 線総露光量を系統的に変化させた酸化型 CcO の高分解能構造決定を行いそれらの比較を行った。その結果、露光量増加に伴って酸素還元中心の配位子の結合長が伸長することが明らかとなった。配位子の損傷に伴う化学変化や、金属イオンの酸化状態の変化により配位構造が変化することも可能性として考えられた。

配位子の同定のためには高分解能構造が必要である。そのため放射光施設の高強度 X 線照射を行っていたが、それにより同定したい配位子の形を歪めてしまうというジレンマであった。これは先の述べたところのローカルな放射線損傷に相当する。とりわけ金属で構成された酸素還元中心は放射線損傷感受性が高く、そこに配位する分子種の特定には深刻な問題であった。

この問題を解決するため、合計 400 個あまりの CcO 結晶の各結晶から 1 枚だけ (通常はフルデータ 450 枚収集) 回折像を取得し、それらをマージして利用する手法を開発し酸化型 CcO の構造解析を行った⁵⁾。このように収集したデータに基づいて決定した構造中の配位子 O-O 結合長を 1.7 Å と推定し、溶液状態の共鳴ラマン法の結果を合わせて配位子を過酸化イオンであると推定した [4]。しかしこの構造解析で得た O-O 結合長 1.7 Å も、共鳴ラマン分光法により決定されていた 1.5 Å よりも 0.2 Å 長いものであった。シンクロトロンでできる最少の放射線損傷量の測定でも「あるがままの」配位子の構造を取得することは実現不可能であったといえる。

3. XFEL に期待されたタンパク質の高分解能無損傷構造解析

タンパク質結晶の放射線損傷は結晶に入射した X 線により引き起こされる光電効果で生じた

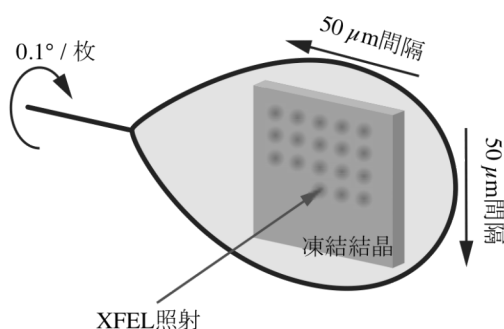


図 2. SF-ROX (Serial Femtosecond Rotation Crystallography)^{8),9)}におけるデータ収集の模式図

凍結した数百 μm 大の結晶を利用して XFEL を照射して回折像を取得し、露光点と結晶方位を変えて測定を繰り返す。50 μm 間隔で XFEL 照射位置を変更する。

電子 (光電子) が主な原因であるといわれている⁶⁾。結晶内で生じた光電子は結晶中に多く含まれる水分子やタンパク質分子と相互作用を起し反応性の活性分子種を多く生成し、それらが結晶内の分子と相互作用することによりあらゆる放射線損傷に関する化学反応を引き起こす。結晶内で起きるこの反応の時間スケールは速いものでおおよそピコ秒オーダーであるとされている。

大型放射光施設である SPring-8 に併設された X 線自由電子レーザー (XFEL) 施設 SACLA で利用できる X 線のパルス長はおおよそ 10 フェムト秒である。このごく短い露光時間で利用可能な XFEL を利用すればタンパク質結晶の放射線損傷の化学反応を引き起こされる「前」の結晶構造を反映した回折像を取得することができ、無損傷構造解析が実現できる (Diffraction before destruction) と考えられている⁷⁾。この場合、1 パルスに含まれる X 線光子数が増えれば増えるほど回折分解能が高くなり、無損傷高分解能構造解析が実現可能となる。

そこで我々は XFEL を用いた CcO 無損傷高分解能構造解析による配位子同定を計画した。凍結 CcO 結晶に対して XFEL を 1 パルス (含まれる光子数 $10^{10} \sim 10^{11}$ 個) 照射し 1 枚の回折イメージを取得し、それまで XFEL 照射で損傷を受けていない結晶体積に次の XFEL を照射して回折イメージを 1 枚取得する。結晶は撮像の都度、微量回転させ、これを結晶の交換を含めて繰り返すことでデータ収集を完成させる方法を考案した。

この方法を用いるために凍結 CcO 結晶に XFEL を 1 パルス照射した場合、結晶上どの程度の距離まで放射線損傷が広がるかを明確に知る必要があった。我々は解析の対象となる酸化型 CcO 結晶を用いて X 線照射による損傷の伝播距離を実験的に決定した。回折強度の減衰を指標にした場合、XFEL の照射位置からおおよそ 11 μm 程度の位置までが放射線損傷により影響を受けていた。この結果にセーフティマージンを付加し、各照射点間の距離を 50 μm として実験を行った。この方法は SFX (Serial Femto-second Crystallography) と区別化するために「Serial Femtosecond Rotation Crystallography (以下

SF-ROX)」と命名された (図 2)⁸⁾。SFX では大量の微小結晶 (数 μm 程度) を用いたデータ収集を行っていたが、SF-ROX では数百 μm 大の結晶を利用するという点が 2 つの手法の最大の違いである。通常、得られる回折強度は回折に寄与する結晶格子の数に比例するため、高品質な大型結晶を用いることで微小結晶よりも構造解析の分解能を高めることができると考えてこの手法を開発した。50 μm という照射点距離については (後述する光化学系 II 複合体の解析を含め) 種々の SF-ROX 構造解析の結果から一般的に適用が可能であると考えている (光子密度が $10^{10}\sim 10^{11}$ 光子/ μm^2 の 50~100 倍になったときには挙動が変わる可能性は否定しない)。

4. 実験結果

実際に行った測定の手順を簡単に記述する。凍結 CcO 結晶をゴニオメータ (結晶を並進・回転可能にする装置) にマウントし、露光点間の距離 50 μm 、静止写真のステップ角度 0.1° で測定を行った。CcO 結晶は平均的な結晶サイズは $500\times 500\times 100\sim 200$ μm 程度であったため、多いものだと 1 結晶から 100 枚程度 (約 10° 分) の角度が連続する回折イメージが取得可能であった。最終的に 76 個の凍結結晶を用いて構造解析に必要な構造因子を分解能 1.9 Å で得ることに成功した。

これにより得られたデータを用いて CcO の構造解析を行った。目的であった配位子の構造についてはまず酸素還元中心の電子密度図を $2F_o-F_c$ マップにより確認した。配位子はこれまでの CcO 酸化型構造と同様、 $\text{Fe}_{a3}\text{-Cu}_b$ の間に存在しており特に大きな構造変化は認められなかった。定量的に配位子の結合長を検討するために我々はここに酸素原子が 2 個存在することを前提とし、その結合長に通常精密化時に利用する束縛条件を適用しないで (un-restrained) 原子座標の精密化を行った (注: 通常タンパク質の構造解析では観測される構造因子の数が、決定すべき全ての原子位置や熱的ゆらぎパラメータの数よりも少ないため、電子密度図を解釈する際にアミノ酸や化合物ごとに既知の結合長や結合角などの構造情報ライブラリを利用している。ライブラリ中の理想

的な結合長や結合角度が乱されないように束縛条件をかけながら観測データとモデルを最小二乗法で合致させる。ここでいう un-restrained 精密化は酸素原子間距離にこのような前提を与えずに原子位置を決定したという意味)。un-restrained 精密化後の酸素原子間距離は 1.7 Å となった。過去に行っていた 400 個以上の結晶を用いた放射光施設における最少損傷量であるデータにも同様の精密化を適用すると 1.9 Å であり⁴⁾、その数値よりも 0.2 Å 短いものとなった。さらに電子密度図に基づき酸素化合物の結合距離を決定するために、今度は配位子の酸素間の結合距離に 0.1 Å ずつ 1.2 Å (分子状酸素) ~1.8 Å という束縛条件を与えて構造精密化を行い、得られた構造因子を用いて F_o-F_c マップ (注: 観測データとモデルの構造因子の差の電子密度図) を比較した。この結果、酸素結合距離が 1.5 Å と 1.6 Å の結合長の時に電子密度の残差が最も小さいことが分かったため、酸化型 CcO 中の配位子結合距離が 1.55 Å であるとして精密化を行い最終構造とし、配位子の化学種が過酸化イオンであるという過去の推定が正しいと結論づけた。配位子以外の部分でも SF-ROX で得られた CcO 構造が無損傷である確証を得ることが出来た⁹⁾。

5. SF-ROX の応用展開: 光化学系 II 複合体

CcO で確立した SF-ROX を光化学系 II 複合体の無損傷高分解能構造解析にも適用した。光化学系 II 複合体は光エネルギーを利用して水分子から酸素分子を発生させることのできる唯一の天然触媒である。光化学系 II 複合体の結晶構造は過去にはシンクロトロン放射光を利用して解析されていたが、反応を触媒する部分 (マンガングラスタ) が放射線損傷の影響 (ローカルな損傷) で天然状態と異なった構造になっていることが示唆されていた。そこで岡山大学の沈先生・菅先生らと協力して SF-ROX により光化学系 II 複合体の構造を 1.95 Å 分解能で決定した。得られた酸素発生中心の構造は X 線吸収微細構造の測定および理論計算により提唱されていた Mn-Mn の距離とその長さが一致し、放射線による損傷のまったくない構造であることが示唆された。水分

解反応の開始状態 (S_1 状態) では酸素発生中心を構成する Mn の価数は Mn1D が+3、Mn2C が+4、Mn3B が+4、Mn4A が+3 であること、水分解反応における基質分子 O₅ の化学種は OH⁻ であること、および、その反応機構が菅先生らによって提唱された¹⁰⁾。これ以降の議論については、本解説特集の斎藤 圭亮氏の記事を参照いただきたい。

6. おわりに

新しい光源 XFEL を用いて、従来のタンパク質の X 線結晶構造解析における大きなジレンマを解決することができた。分子量 40 万超のタンパク質複合体であるシトクロム酸化酵素・光化学系 II 複合体の高分解能かつ無損傷構造を決定したことで、機能を理解するために重要な構造情報を得ることができた。XFEL の利用はタンパク質の結晶構造解析に新たな可能性を与え、我々はその特徴の一つを活用し構造生物学の大きな一歩を踏み出した。

謝辞

本構造解析は JST/X 線自由電子レーザー施設重点戦略課題推進事業「無損傷・動的結晶構造解析による生体エネルギー変換過程の可視化」および JST/CREST 「ミトコンドリア呼吸鎖の構造生命科学—構造がもたらす正確さ」の支援を受け実施しました。本研究をともに行った理研・放射光科学総合研究センターの同僚および兵庫県立大の諸先生方・学生の皆様、また技術支援を頂いた JASRI、RSC エンジニアリングチームの皆様を始めとする関係各位に深く感謝申し上げます。また本稿に関する実験は SACLA 利用実験課題 (課題番号: 2012A8011、2012B8040、2013A8047 and 2013B8052) でデータ収集を行った成果です。

また今回、光合成学会に招待して下さったオーガナイザーの先生方に深く感謝いたします。光合成学会誌ということで PSII に関する原稿を準備するべきかとも思ったのですが、私自身は X 線結晶構造解析の手法開発を担当しましたので、XFEL という新光源をどう考えてどう利用したかに焦点を当てて原稿を書かせて頂きました。今回の発表に関連するアイデアやご意見などご

連絡頂けましたら大変嬉しいです。

Received March 27, 2017; Accepted April 5, 2017;
Published April 30, 2017

参考文献

1. Tukahara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizuka, T., Yamaguchi, H., Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science* 269, 1069–1074.
2. Muramoto, K., Hirata, K., Shinzawa-Itoh, K., Yoko-o, S., Yamashita, E., Aoyama, H., Tsukahara, T. and Yoshikawa S. (2007) A histidine residue acting as a controlling site for dioxygen reduction and proton pumping by cytochrome *c* oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 7881–7886.
3. Muramoto, K., Ohta, K., Shinzawa-Itoh, K., Kanda, K., Taniguchi, M., Nabekura H, Yamashita, E., Tsukahara, T. and Yoshikawa, S. (2010) Bovine cytochrome *c* oxidase structures enable O₂ reduction with minimization of reactive oxygens and provide a proton-pumping gate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 7740–7745.
4. Aoyama, H., Muramoto, K., Shinzawa-Itoh, K., Hirata, K., Yamashita, E., Tsukahara, T., Ogura, T. and Yoshikawa, S. (2009) A peroxide bridge between Fe and Cu ions in the O₂ reduction site of fully oxidized cytochrome *c* oxidase could suppress the proton pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 2165–2169.
5. Hirata, K., Yamashita, E., Aoyama, H., Muramoto, K., Yoshikawa, S. and Tsukahara, T. (2004) Scaling of one-shot oscillation images with a reference data set.,” *J. Synchrotron Rad.* 11, 60–63.
6. O'Neill, P., Stevens, D.L. and Garman, E.F. (2002) Physical and chemical considerations of damage induced in protein crystals by synchrotron radiation: a radiation chemical perspective. *J. Synchrotron Rad.* 9, 329–332.
7. Neutze, R., Wouts, R., van der Spoel, D., Weckert, E. and Hajdu, J. (2000) Potential for biomolecular imaging with femtosecond X-ray pulses. *Nature* 406, 752–757.
8. Schlichting, I. (2015) Structural biology: Photosynthetic complex in close-up. *Nature* 517, 26–27.
9. Hirata, K., Shinzawa-Itoh, K., Yano, N., Takemura,

- S., Kato, K., Hatanaka, M., Muramoto, K., Kawahara, T., Tsukihara, T., Yamashita, E., Tono, K., Ueno, G., Hikima, T., Murakami, H., Inubushi, Y., Yabashi, M., Ishikawa, T., Yamamoto, M., Ogura, T., Sugimoto, H., Shen, J.R., Yoshikawa, S. and Ago, H. (2014) Determination of damage-free crystal structure of an X-ray-sensitive protein using an XFEL. *Nat. Meth.* 11, 734–736.
10. Suga, M., Akita, F., Hirata, K., Ueno, G., Murakami, H., Nakajima, Y., Shimizu, T., Yamashita, K., Yamamoto, M., Ago, H. and Shen, J.R. (2015) Native structure of photosystem II at 1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses. *Nature* 517, 99–103.

High resolution damage-free structure analyses of supra-molecular complexes with SF-ROX

Kunio Hirata*

RIKEN SPring-8 Center, JST/CREST

解説

Photosystem II における水素結合ネットワークを介したプロトン移動[†]

東京大学 先端科学技術研究センター

齊藤 圭亮*

蛋白質中のプロトン移動は水分子が作る水素結合ネットワーク上で起こる。Photosystem II (PSII) の結晶構造では、蛋白質中の水分子が見えているので、その構造情報を利用することで、PSII 内で起こるプロトン移動のしくみを理論的に調べることができる。本稿では、蛋白質がいかにか水素結合ネットワークをうまく利用してプロトン移動を行っているのかを、(1) PSII の水分解における第一段階のプロトン排出と、(2) 水分解反応に直接関わらないが酸化還元活性をもつ TyrD からのプロトン排出という2つの具体例を通じて紹介する。

1. はじめに：プロトン移動と水素結合

プロトン (H^+) 移動現象は生物におけるエネルギー代謝において非常に重要な役割を果たしており、光合成においてもいたる所で利用されている。プロトン移動の特徴として、溶液中においてその移動度が他のイオンの移動に比べて一桁大きいことが挙げられる¹⁾。この理由はプロトン移動の機構にある。溶液中では通常、プロトンはヒドロニウムイオン (H_3O^+) の形で存在し、周囲の水分子と水素結合を形成している。 H_3O^+ が移動する場合、その H_3O^+ そのものが実際に移動する必要はない。水分子間の水素結合内のプロトンを玉突きのようにほんの少しずつ動かすだけで、見かけ上 H_3O^+ を遠くに移動させることができる (図1)。このようなリレー式プロトン移動の機構は Grotthuss 機構と呼ばれている²⁾。これに対し他のイオンではそれ自身が実際に動く必要がある。この違いがプロトンだけが特異的に大きな移動度をもつ原因であると考えられている¹⁾。

蛋白質の中でも、溶液中と同様に、プロトン移動は水分子が作る水素結合の上で起こる³⁾。したがって、蛋白質中のプロトン移動を調べるための第一歩は、その蛋白質の中で、水分子とその周り

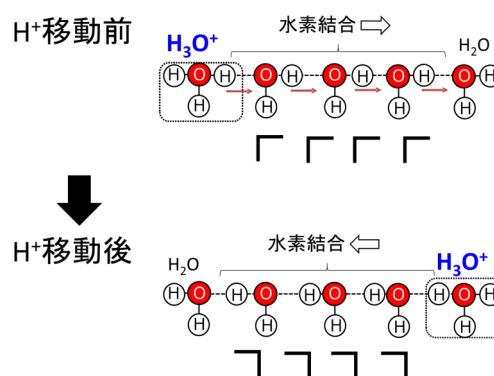


図1. Grotthuss のプロトン移動機構

水素結合の向きだけを入れ替えることで、見かけ上、遠くへ H_3O^+ を移動させることができる。

のアミノ酸残基がどのように配置され、どのように水素結合ネットワークを形成しているかを知ることである。近年、X線による結晶構造解析の研究が進み、光合成蛋白質のような大きくて複雑な蛋白質でも、その中の水分子がはっきり見えるくらいに高解像度の構造が数多く解かれている^{4),5)}。それらの構造を利用することで、実際に実験することなしに、理論的にプロトン移動を調べることが可能である。本稿では photosystem II (PSII) に関して筆者らが行ったそのような試みを紹介したい。

[†]解説特集「光化学系の構造・モデル計算から見えてきた光合成反応の妙」

*連絡先 E-mail: ksaito@appchem.t.u-tokyo.ac.jp

2. 蛋白質構造に基づいたプロトン移動の理論解析: QM/MM 法

Grotthuss のプロトン移動機構では、 H_3O^+ の酸素原子と水素原子との間の共有結合を切って、代わりに隣の水分子の酸素原子へと結合を作り直す、という過程が繰り返されてプロトンを輸送していく (図 1)²⁾。一般に、化学結合の切断・生成には分子内の電子の動きが関わっている。そのためプロトン移動を理論計算で調べるためには、量子化学的手法 (電子の運動を記述する基礎方程式であるシュレーディンガー方程式に立脚している) を用いる必要がある。

ところが量子化学計算には、あまり大きな分子を扱えないという欠点がある。通常、扱う分子の大きさ N が大きくなればなるほど、 N^3 に比例して計算時間がかかるからである。例えば、 N を原子数と見なすと、水分子 1 個 ($N=3$) の計算が 1 秒で終わるとき、PSII ($N \sim 90000$) では $(90000/3)^3$ 秒 ~ 85 万年 (!) かかる計算になり、そのままでは到底不可能である。これを可能にするために工夫を施したのが、2013 年のノーベル化学賞の対象となった quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) 法という手法である^{6,7)}。大きな蛋白質でも、反応に重要な活性部位 (今回の例ではプロトン移動が起こる部位) はその中のごく一部だけである。QM/MM 法ではその活性部位だけを量子化学 (QM) 的に扱い、残りの大部分は古典力学に基づいた分子力学 (MM) で取り

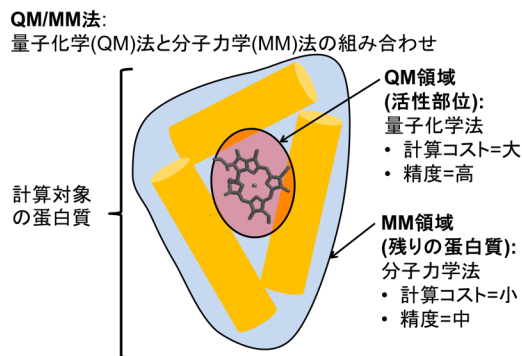


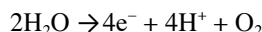
図 2. QM/MM 法の概念図

計算に時間がかかる QM 計算を適用する領域を活性部位に限ることで、計算を速く行う工夫をしている。

扱う (図 2)。MM 計算は QM 計算にくらべて非常に速く、蛋白質全原子を対象にしても瞬時に計算が終わる。MM 計算では電子の運動を記述することができないが、反応に関係する電子は QM で取り扱う活性部位だけに局在しているので、問題は無い。このようなわけで、QM/MM 法を利用することによって、蛋白質全体を十分に実用的な時間で十分に正確に計算できる。

3. 水分解反応に伴うプロトン移動

PSII 蛋白質複合体は太陽光エネルギーを駆動力として、水分子から電子を引き抜き、酸素とプロトン(H^+) に分解している⁸⁾ :



この反応は 4 段階の光酸化過程からなる (図 3)⁹⁾。1 段階ごとに触媒部位 MnCa 錯体から電子が 1 つずつ引き抜かれ、 S_0 だった錯体の電子状態が $\text{S}_1 \rightarrow \text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3 \rightarrow \text{S}_4$ と変化する (Mn の価数または錯体の持つ電荷が次々に上がる)。そして、 S_4 状態が作られた後、はじめて酸素 1 分子が発生する。このときプロトンの放出機会は一定ではなく、1~4 回目の反応段階でそれぞれ 1, 0, 1, 2 個のプロト

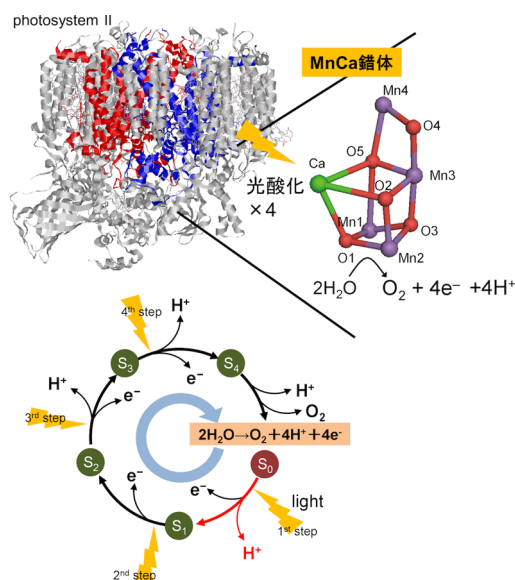


図 3. PSII の水分解反応の触媒部位 MnCa 錯体の構造⁴⁾ (上) と 4 段階からなる反応スキーム (下)

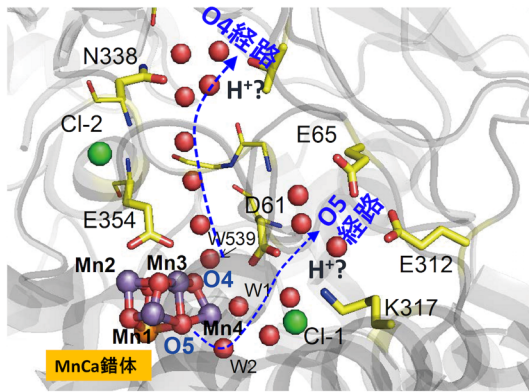


図4. MnCa 錯体の周りの水素結合ネットワーク⁴⁾。赤玉は水分子の酸素原子を表す。

ンが蛋白質外へと放出される (図 1)^{9, 10)}。私たちはまず、反応の第一段階 ($S_0 \rightarrow S_1$) で起こるプロトン放出に着目した。

3.1. 水分解第一段階におけるプロトン放出サイトの候補 : O4 と O5

この過程において、プロトンは MnCa 錯体のどこから放出されるのだろうか。結晶構造⁴⁾では、錯体を構成する酸素原子の中でもとりわけ“O5”は Mn や Ca との結合距離が長く (図 3)、プロトン化されて OH⁻となっている可能性がある。そ

のため当初は O5 がプロトン放出サイトの有力候補だと考えられた¹¹⁻¹³⁾。しかし、ENDOR-EPR 実験によると OH⁻となる酸素原子は Mn3 と Mn4 の間にあることが示されており^{14, 15)}、実は O5 だけでなく、“O4” (図 3) もそれに該当する。以上のことから O4 と O5 をプロトン放出サイトの候補と考えた。

錯体周辺の構造⁴⁾を見てみると、O4 や O5 の周りには多数の水分子が存在し、水素結合ネットワークを形成している (図 4)。先に述べたように、プロトンは水素結合ネットワークを介して移動するので、もし O4 や O5 からプロトンが放出されるのなら、蛋白質外へのプロトン排出にこのネットワークが利用されるに違いない。

梅名らによる PSII 結晶構造⁴⁾に QM/MM 法を適用し、O4 と O5 それぞれについて、周囲の水素結合ネットワークを通じたプロトン排出の起こりやすさを調べた¹⁶⁾。計算では MnCa 錯体を含む一連の水素結合ネットワークを QM 領域とした。なお、梅名らの構造⁴⁾では 25% の Mn が二価に還元されていると指摘されているが⁵⁾、本研究では、それぞれの S 状態に対して正しい価数を仮定した量子化学計算によって最適化された構造を利用しているため、その影響は排除されていると考えている。

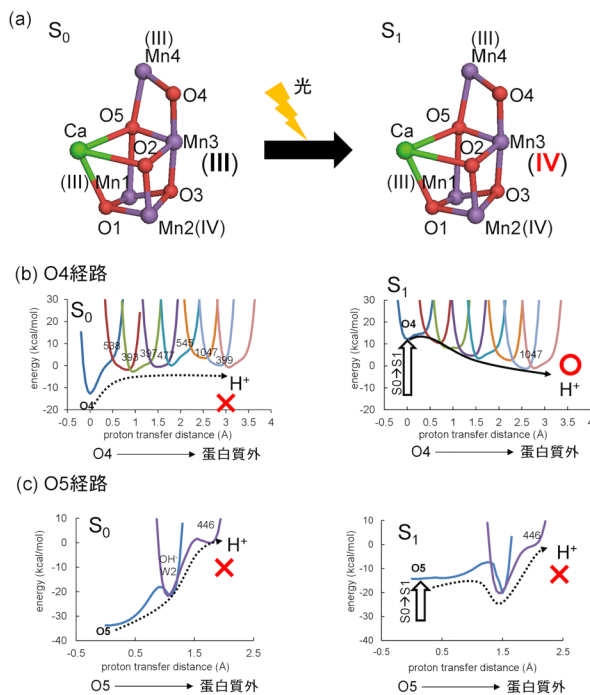


図5. (a) $S_0 \rightarrow S_1$ 遷移における Mn 原子の価数変化 (b) O4 経路と (c) O5 経路の S_0 と S_1 状態におけるプロトン移動ポテンシャル¹⁶⁾

数字は結晶構造の水番号を表し、1つのカーブが2水分子間の水素結合内プロトン移動に対応する。プロトン放出後をエネルギーの基準にとった。

3.2 プロトン移動が起こるのは O4 から

まず、1つ目の候補 O4 についての結果¹⁶⁾を示す。光を受ける前の S_0 状態では、O4 のプロトンは飛び出すことができない (図 5b 左)。ところが、第一の光酸化によって MnCa 錯体が S_1 状態に移ると、状況は一変する。 S_0 状態では III 価だった“Mn3”が IV 価に上がったことで (図 5a)、その隣の O4 のプロトンのエネルギーが高くなり、プロトンはポテンシャルの坂を転がるようにして、蛋白質外部の方向へと移動することが分かった (図 5b 右)¹⁶⁾。

一方、2つ目の候補 O5 では、たとえ S_1 状態になったとしてもポテンシャルは上り坂のままであり、プロトンは移動し得ない (図 5c)。以上の結果から、水分解の第一段階 ($S_0 \rightarrow S_1$) で起こるプロトン放出は O5 ではなく O4 から起こることが結論づけられた¹⁶⁾。

3.3 プロトン移動経路の水素結合ネットワークは理想的なかたちをしている

なぜ O5 経路ではなく O4 経路でプロトン移動が起こるのだろうか。図 6a は計算で得られたプ

ロトン移動前の水分子の構造を示している (プロトンは O4 上に存在している)。これがプロトン移動後には図 6b に変化する (プロトンは MnCa 錯体から離れた所にある水分子上に存在している)。この2つの構造を見比べると、プロトン移動前後で水分子の位置は変化せずに水素結合の向きだけが入れ替わっているだけである。まさに、Grotthuss 機構 (図 1) によってプロトン移動が起こることを示している¹⁶⁾。

図 6c は a と b を重ね合わせた図である。面白いことに、水分子が三つ叉状の構造に見える。このことはプロトン移動前後で水分子の O 原子の位置と水素結合の角度が変化しないことを反映している。一方、プロトン移動が起こらない O5 経路ではどうだろうか。計算で作ったプロトン移動前後の構造を重ね合わせてみたところ、O4 とは異なり、三つ叉状の構造に見えない (図 6e-g)。O5 の経路ではプロトン移動前後で水分子が動いてしまうことを反映している。水分子が動いてしまうと、Grotthuss 機構による効率的なプロトン輸送は実現し得ないのである。

このことから、プロトン移動経路となるかどうか

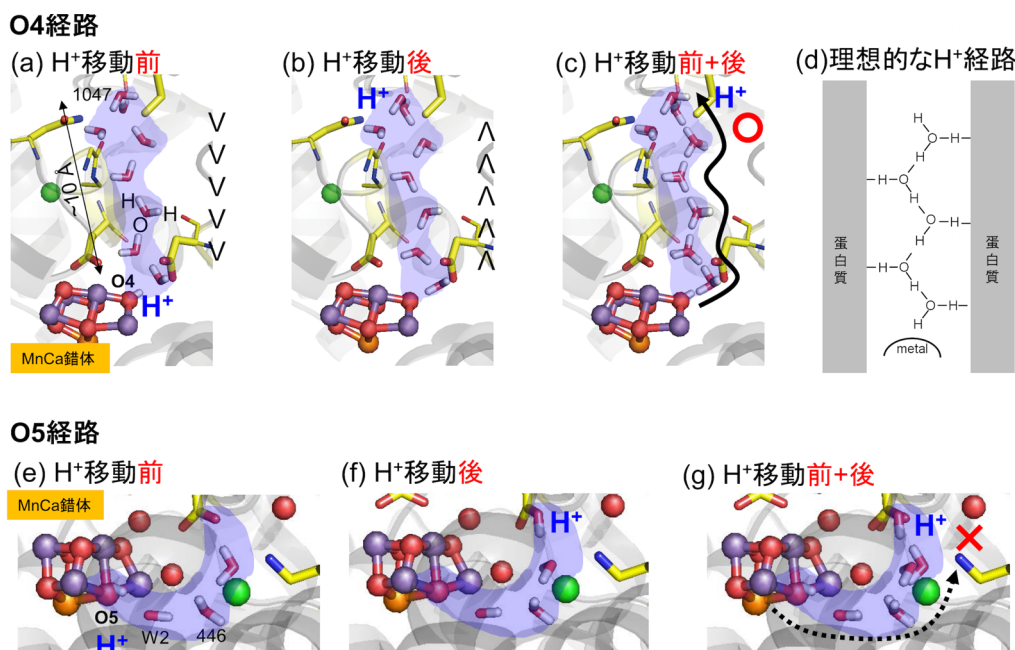


図 6. O4 経路における (a) プロトン移動前と (b) 後の構造 (c) その重ね合わせ¹⁶⁾ (d) 理想的なプロトン移動経路. O5 経路における (e) プロトン移動前と (f) 後の構造と (g) その重ね合わせ¹⁶⁾

かの鍵は、蛋白質中において水分子が形成する水素結合ネットワークにあることが明らかになった。プロトン移動経路となる水素結合ネットワークは、プロトン移動するのに理想的な形をしており、かつ水分子が周囲の蛋白質と強固に結びつき、その形を崩さないようにできている必要がある (図 6d)。このような理想的なプロトン経路の存在下で、光酸化によって MnCa 錯体の酸化状態が S_0 から S_1 になれば、そのエネルギーを受けたプロトンは必然的に効率よく排出される。

3.4. さらにその先のプロトン排出

O4 から放出されたプロトンは MnCa 錯体から 10 Å 程度離れた水分子 (1047) の位置 (図 6a) までは速やかに移動する。しかし、この水分子は、まだ PSII 蛋白質複合体の内部であり (図 7a)、その後さらにプロトンは蛋白質表面へと移動しなければならない。そのような経路は存在するだろうか。

私たちは、蛋白質構造に基づく空洞探索プログ

ラム¹⁷⁾を用いて、その先の経路の有無を解析した¹⁸⁾。その結果、1047 水分子の先の PsbU サブユニット (シアノバクテリア固有の表在性蛋白質) に、外へと続く空洞が存在し、そこは多数の水分子によって満たされていることがわかった (図 7b)¹⁸⁾。したがって、O4 から放出されたプロトンは最終的にはこれらの水分子が作る水素結合ネットワークを経由して、蛋白質外部へと放出されると考えられる。なお、植物の場合には、PsbU の代わりに別の表在性蛋白質 PsbP が存在しているが^{19,20)}、そこでも、シアノバクテリアと同様に空洞があり、その中は複数の水分子で満たされている可能性が高いことが、電子顕微鏡による構造²¹⁾に基づく私たちの理論解析によって示されている²²⁾。

4. Photosystem II の TyrD からのプロトン移動

私たちは、PSII 蛋白質複合体に含む別のプロトン移動経路として、TyrD からのプロトン排出経路も突き止めている。次にその研究を紹介する。

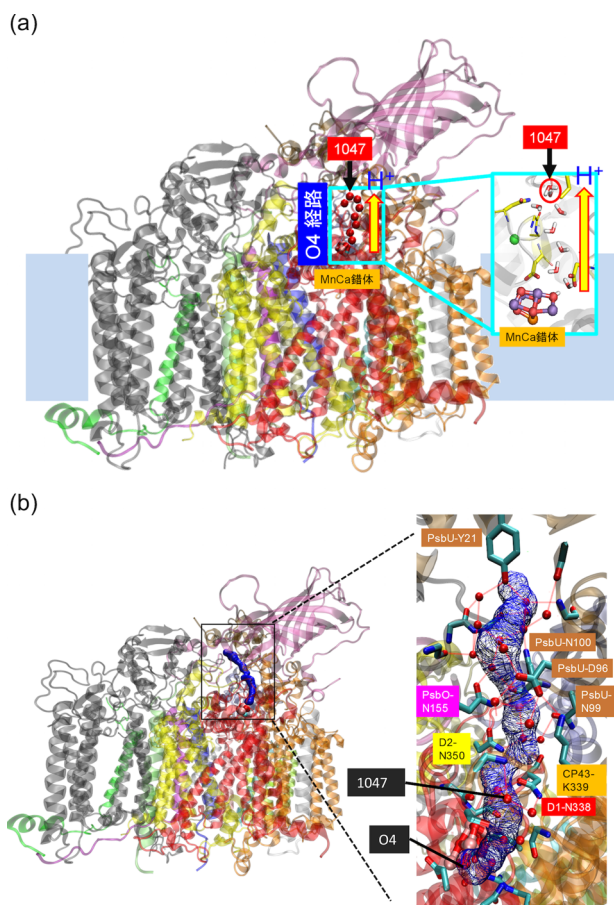


図 7. (a) PSII 蛋白質複合体全体における O4 経路の位置 (b) O4 経路とそれに続く PsbU サブユニットの空洞 (青色) とその中の水分子 (赤玉) の水素結合ネットワーク¹⁸⁾

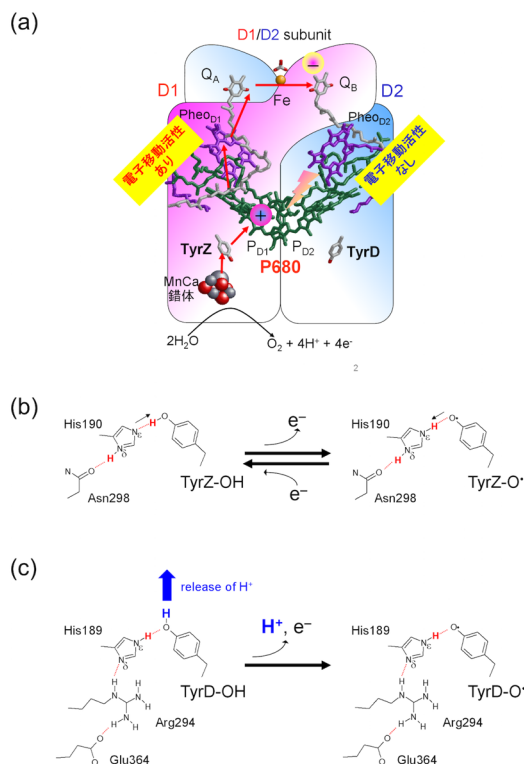


図 8. (a) PSII の反応中心を構成する D1/D2 サブユニットとその中の補因子. 赤矢印は電子移動経路を表す (b) TyrZ の電子の授受に伴う proton rocking 機構 (c) TyrD の酸化に伴うプロトン放出

4.1. TyrZ と TyrD におけるプロトン共役電子移動の違い

PSII の反応中心は D1 と D2 のサブユニットから成るヘテロダイマーである (図 8a)。D1 と D2 サブユニットは相同性が高く、立体構造は互いによく似ている。しかし、D1 は MnCa 錯体を持ち電子移動活性があるが、D2 は MnCa 錯体を持たないため電子移動活性がないという大きな違いがある (図 8a) ⁸⁾。

D1 において、MnCa 錯体からクロロフィル二量体 P680 (初期電荷分離反応によりここに正電荷が生じる) への電子移動の仲介を行っているのがアミノ酸残基 D1-Tyr161 (通称 TyrZ) である (図 8a)。TyrZ の OH 基はすぐ隣にある D1-His190 と水素結合をしており、TyrZ が P680⁺ によって酸化されると、OH 基のプロトンは His190 に移動し、ラジカル状態 (TyrZ-O[•]) が作られる (図 8b) ²³⁾。

その後すぐに TyrZ-O[•] は MnCa 錯体から電子を奪うと同時に His190 に移しておいたプロトンを戻し、もとの TyrZ-OH に戻る (図 8b)。酸化還元に応じて TyrZ のプロトンが行ったり来たりするこの機構は proton rocking 機構と呼ばれている ²³⁻²⁵⁾。

D2 側においても、TyrZ に対応する位置に D2-Tyr160 (通称 TyrD) が存在している (図 8a)。TyrD は電子移動の起こらない D2 側に存在しているにも拘わらず、酸化還元活性を持ち、電子の授受を行っている。特筆すべき特徴として、一度 TyrD が酸化されてラジカル状態 (TyrD-O[•]) が作られると、数時間にも及ぶ長い間、その状態を維持することが観測されている ²⁶⁻²⁸⁾。TyrD が酸化される時、TyrZ と同様に、OH 基のプロトンはどこかに移動するはずである。TyrD の隣にも、D2-His189 が存在し、水素結合を形成しているので (図 8c)、ここでも proton rocking 機構が実現していると思われるかもしれないが、実はそうではない: TyrZ においては D1-His190 の Nδ の隣には D1-Asn298 の酸素原子があり、Nδ から水素結合を受ける入る形になっている (図 8b)。このため、His190 の Nδ には常にプロトンが存在しなければならない。Nδ のプロトンの存在のため、TyrZ 側にあるもうひとつの Nε にはプロトンがついていてもいいし、無くてもかまわない。この事実が TyrZ の proton rocking 機構の前提になる。一方、TyrD では D2-His189 の Nδ の隣には D1-Arg294 の NH 基が存在しており、His189 へ水素結合を与えている (図 8c)。このため、D2-His189 の Nδ にはプロトンは存在し得ない。この結果、TyrD 側にあるもうひとつの Nε には必ずプロトンがついていなければならない、とれてはならない。言い換えると、TyrD と D2-His189 との間では proton rocking 機構は実現し得ないのである ²⁹⁾。

4.2. TyrD から放出されるプロトンの移動経路

では、TyrD が酸化される時、放出されたプロトンはどこへ行くのだろうか。上に述べた理由により TyrD の OH 基は D2-His189 とは方向に水素原子を向けていると考えられる。構造を見ると、その方向には複数の水分子が存在し、水

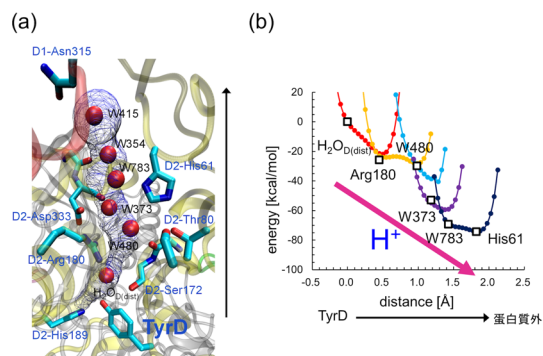


図9. (a) TyrDからのプロトン移動経路と(b)その経路においてTyrD近傍の水分子からD2-His61へ至るプロトン移動ポテンシャル²⁹⁾

素結合ネットワークを形成している。空洞探索プログラム¹⁷⁾による解析の結果、これらの水分子が存在している空洞は蛋白質外部へとつながっていることが分かった(図9a)²⁹⁾。そこで、この水素結合ネットワークを通じたプロトン移動のポテンシャルを計算したところ、プロトンがTyrD付近の水分子からD2-His61へ至るにつれ、ポテンシャルは下り坂になることが示された(図9b)^{29, 30)}。このことから私たちは、TyrDから放出されたプロトンはこの経路を通して排出されると結論づけた^{29, 30)}。その後、このことはFTIRの実験で実証された²⁵⁾。さらに、計算で得られた下り坂のポテンシャルが示すことは、「TyrD-OHからTyrD-O[•]が作られるときに放出されたプロトンが速やかに蛋白質外部へと移動する」ことだけでなく、「一度外部へと放出してしまったプロトンが再び元に戻ってTyrD-OHを形成することは非常に起こりにくい」ことも意味する³⁰⁾。この点においても、TyrD-O[•]が長時間維持する観測事実をよく説明する。

このプロトン移動経路は、水分子だけでなく、途中にD2-Arg180の側鎖を経由する点が興味深い。また、経路となる水分子周囲の蛋白質環境の特徴を調べてみたところ、TyrD付近では疎水的環境であるが、蛋白質外部へ進むにつれ親水的環境へと変化することが分かった²⁹⁾。この環境の差がプロトン放出の駆動力になっていると考えられる。

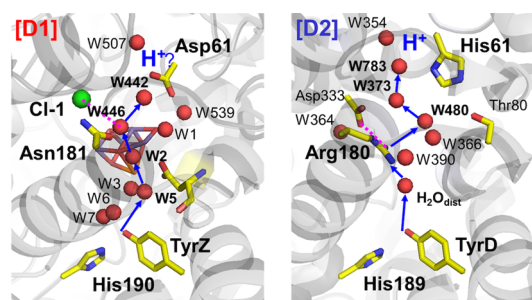


図10. D2側のTyrDからのプロトン移動経路(右)に対応して、D1側にも似たような水素結合ネットワークが存在する(左)³⁰⁾

5. おわりに：PSIIの他のプロトン移動経路

蛋白質においてプロトンは水分子の作る水素結合ネットワークを通じて移動する。したがって、高解像度の結晶構造があれば、QM/MM手法によりプロトン移動経路を特定できる。このことを、PSIIにおける2つの具体例を通じて紹介した。水分解反応におけるS₀→S₁遷移では、プロトンは理想的なかたちで水素結合した水分子の鎖を通して排出される。一方で、TyrDからのプロトン放出経路は、水分子だけでなくArg残基からも成っているため、理想的な水素結合のかたちからはやや崩れているように見える。いずれにしても、蛋白質はそこに置かれた水素結合ネットワークの状況をうまく利用して、プロトン移動経路を構築していることが見てとれる。

PSIIの水分解反応ではS₃への遷移以降の段階で残り3つのプロトンが放出される。その時に使われるプロトン排出経路は今回紹介したO4経路と同じであるとは限らない。今後、その経路がどれなのかを調べていきたい。そのヒントとなり得る興味深い事実を最後に紹介したい：先に述べたTyrDのプロトン移動経路は電子移動の起こらないD2側に位置しているが、D1側の対応する場所はどうなっているだろうか。調べてみると、面白いことに、その位置にはTyrZだけでなく、水分子が作る水素結合ネットワークも存在している(図10)³⁰⁾。もしかしたら、水分解で放出される残りのプロトンのうちいくつかは、この水素結

合ネットワークを通して排出されるかもしれない。

謝辞

本研究は東京大学・石北央教授のもと、同研究室の修士課程の坂下尚紀氏とともに行った研究である。ここに謝意を表します。また、適切なご指摘を迅速にくださった査読者の方にも感謝申し上げます。

Received March 28, 2017; Accepted March 31, 2017;
Published April 30, 2017

参考文献

- Voet, D. and Voet, J.G. (2011) *Biochemistry*, 4th Edition. John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ.
- Agmon, N. (1995) The Grotthuss mechanism. *Chem. Phys. Lett.* 244, 456–462.
- Pomes, R. and Roux, B. (1996) Structure and dynamics of a proton wire: A theoretical study of H⁺ translocation along the single-file water chain in the gramicidin a channel. *Biophys. J.* 71, 19–39.
- 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.
- Suga, M., Akita, F., Hirata, K., Ueno, G., Murakami, H., Nakajima, Y., Shimizu, T., Yamashita, K., Yamamoto, M., Ago, H. and Shen, J.R. (2015) Native structure of photosystem II at 1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses. *Nature* 517, 99–103.
- Warshel, A. and Karplus, M. (1972) Calculation of ground and excited-state potential surfaces of conjugated molecules. 1. Formulation and parametrization. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 5612–5625.
- Warshel, A. and Levitt, M. (1976) Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *J. Mol. Biol.* 103, 227–249.
- Renger, G. (2001) Photosynthetic water oxidation to molecular oxygen: apparatus and mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1503, 210–228.
- Suzuki, H., Sugiura, M. and Noguchi, T. (2005) pH dependence of the flash-induced S-state transitions in the oxygen-evolving center of photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* as revealed by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 44, 1708–1718.
- Haumann, M. and Junge, W. (1999) Photosynthetic water oxidation: a simplex-scheme of its partial reactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 86–91.
- McConnell, I.L., Grigoryants, V. M., Scholes, C.P., Myers, W. K., Chen, P. Y., Whittaker, J. W. and Brudvig, G.W. (2012) EPR-ENDOR characterization of (¹⁷O, ¹H, ²H) water in manganese catalase and its relevance to the oxygen-evolving complex of photosystem II. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 1504–1512.
- Pal, R., Negre, C.F., Vogt, L., Pokhrel, R., Ertem, M. Z., Brudvig, G.W. and Batista, V.S. (2013) S-state model of the oxygen-evolving complex of photosystem II. *Biochemistry* 52, 7703–7706.
- Siegbahn, P. E. (2013) Water oxidation mechanism in photosystem II, including oxidations, proton release pathways, O-O bond formation and O₂ release. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 1003–1019.
- Kulik, L. V., Epel, B., Lubitz, W. and Messinger, J. (2007) Electronic structure of the Mn₄O_xCa cluster in the S₀ and S₂ states of the oxygen-evolving complex of photosystem II based on pulse ⁵⁵Mn-ENDOR and EPR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 13421–13435.
- Cox, N., Pantazis, D.A., Neese, F. and Lubitz, W. (2013) Biological water oxidation. *Acc. Chem. Res.* 46, 1588–1596.
- Saito, K., Rutherford, A. W. and Ishikita, H. (2015) Energetics of proton release on the first oxidation step in the water-oxidizing enzyme. *Nat. Commun.* 6, 8488.
- Petrek, M., Otyepka, M., Banas, P., Kosinova, P., Koca, J. and Damborsky, J. (2006) CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *BMC Bioinformatics* 7, 316.
- Takaoka, T., Sakashita, N., Saito, K. and Ishikita, H. (2016) pKa of a proton-conducting water chain in photosystem II. *J. Phys. Chem. Lett.* 7, 1925–1932.
- Bricker, T. M., Roose, J. L., Fagerlund, R. D., Frankel, L. K., and Eaton-Rye, J. J. (2012) The extrinsic proteins of Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 121–142.
- Ifuku, K. and Noguchi, T. (2016) Structural coupling of extrinsic proteins with the oxygen-evolving center in photosystem II. *Front. Plant. Sci.* 7, 84.
- Wei, X. P., Su, X. D., Cao, P., Liu, X. Y., Chang, W. R., Li, M., Zhang, X.Z. and Liu, Z.F. (2016) Structure of spinach photosystem II-LHCII supercomplex at

- 3.2 Å resolution. *Nature* 534, 69–74.
22. Sakashita, N., Watanabe, H.C., Ikeda, T. and Ishikita, H. (2017) Structurally conserved channels in cyanobacterial and plant photosystem II. *Photosynth. Res.*, 1–11.
 23. Saito, K., Shen, J.R., Ishida, T. and Ishikita, H. (2011) Short hydrogen-bond between redox-active tyrosine Y_Z and D1-His190 in the photosystem II crystal structure. *Biochemistry* 50, 9836–9844.
 24. Ahlbrink, R., Haumann, M., Cherepanov, D., Bogershausen, O., Mulikidjanian, A. and Junge, W. (1998) Function of tyrosine Z in water oxidation by photosystem II: electrostatical promotor instead of hydrogen abstractor. *Biochemistry* 37, 1131–1142.
 25. Nakamura, S. and Noguchi, T. (2015) Infrared detection of a proton released from tyrosine Y_D to the bulk upon its photo-oxidation in photosystem II. *Biochemistry* 54, 5045–5053.
 26. Rutherford, A.W., Boussac, A. and Faller, P. (2004) The stable tyrosyl radical in photosystem II: why D? *Biochim. Biophys. Acta* 1655, 222–230.
 27. Babcock, G.T., Barry, B.A., Debus, R.J., Hoganson, C. W., Atamian, M., McIntosh, L., Sithole, I. and Yocum, C. F. (1989) Water oxidation in photosystem II: from radical chemistry to multielectron chemistry. *Biochemistry* 28, 9557–9565.
 28. Diner, B.A. and Babcock, G.T. (1996). in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Ort, D. R., and Yocum, C. F., Eds.), pp 213–247, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
 29. Saito, K., Sakashita, N. and Ishikita, H. (2016) Energetics of the proton transfer pathway for tyrosine D in photosystem II. *Aust. J. Chem.* 69, 991–998.
 30. Saito, K., Rutherford, A.W. and Ishikita, H. (2013) Mechanism of tyrosine D oxidation in Photosystem II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 7690–7695.

Proton Transfer via Hydrogen Bond Networks in Photosystem II

Keisuke Saito *

Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo

解説

植物の光化学系 I—集光性アンテナ複合体 I 超複合体の結晶構造とエネルギー伝達の構造基盤[†]

岡山大学異分野基礎科学研究所

菅 倫寛*

光化学系 I 複合体は光駆動による電子移動と酸化還元反応を行い、糖の合成に必要な還元力を供給している。植物の光化学系 I 複合体は反応中心コアと光捕集アンテナ I 複合体が光化学系 I-光捕集アンテナ I 超複合体を形成し、光エネルギーをほぼ 100%の効率で伝達および変換している。光合成における高い効率での光エネルギー利用の基本原則を理解することを目的とし、筆者らは高等植物マメ由来の光化学系 I-光捕集アンテナ I 超複合体の結晶構造を分解能 2.8 Å で決定した。これにより、分子量が 60 万に及ぶ超複合体の詳細な構造、とりわけ、光捕集アンテナ I を構成する 4 つの Lhca サブユニットにおいて秩序正しく配置されたクロロフィル、カロテノイド、脂質分子、水分子などによる構造基盤を明らかにし、光エネルギーの捕集と伝達の経路、および、光阻害に対する防御機構を提唱した。

1. はじめに

植物や各種の藻類が行う酸素発生型光合成は、太陽光を利用して水を分解して酸素分子を放出するとともに、二酸化炭素から有機物をつくり出す反応である。約 30 億年まえに酸素発生型の光合成能を持つシアノバクテリアが出現し、大気中の酸素濃度を急激的に上昇させ、好気生物の進化・繁栄を牽引した。そして今日に至るまで地球上に絶え間なく降り注いでいる太陽の光エネルギーは糖の形として化学エネルギーへと変換され、ほぼすべての生物の生存維持に必要なエネルギー供給源となっている。光化学系 I (PSI) は光エネルギーを利用してプラストシアニンからフェレドキシンへの電子伝達を仲介し、糖合成に必要な還元力である NADPH の供給を担っている。

シアノバクテリアの出現から高等植物の繁栄に至るまで、生物は酸素発生型の光合成の効率と性能を巧みに進化させた。天候の変化により太陽光の照射量は大きく変動するが、植物には雨の日

でも光合成ができる光エネルギー利用の効率の良さだけでなく、真夏の太陽光でもタンパク質を損傷させないために光エネルギーを積極的に捨てることも必要になる。(なお、光化学系 II の強光順化メカニズムに関しては本誌に掲載された得津隆太郎会員の解説記事¹⁾を参照されたい。) 光化学系は電荷分離反応を行う反応中心コア部分を厳密に保存しつつ、前述したような高度に制御された光エネルギーの利用を実現するためにアンテナ系タンパク質複合体を獲得した。シアノバクテリアの PSI は三量体として存在するのに対し²⁾、植物の PSI は単量体として存在して光捕集アンテナ I 複合体 (LHCI) と分子量 60 万におよぶ PSI-LHCI 超複合体を形成する³⁾。

これまでの分光学的および生化学的な研究から、植物の LHCI は 4 つの膜タンパク質サブユニット Lhca1~Lhca4 から構成される複合体であり、Chla、Chlb、複数種のカロテノイドを適切に配置してエネルギーを高い効率で伝達するだけでなく、蓄積されたエネルギーを熱として散逸させるしくみも備えもつことが明らかにされている。筆者らはこのエネルギー伝達の構造基盤を明らかにすることを目的とし、エンドウマメ *P.*

[†]解説特集「光化学系の構造・モデル計算から見えてきた光合成反応の妙」

*連絡先 E-mail: msuga@okayama-u.ac.jp

sativum var. Alaska の葉から単離した PSI-LHCI 超複合体を結晶化し、大型放射光施設 SPring-8 の高輝度 X 線により 2.8 Å 分解能で構造解析した^{4,5)}

2. 植物 PSI-LHCI 超複合体の全体構造

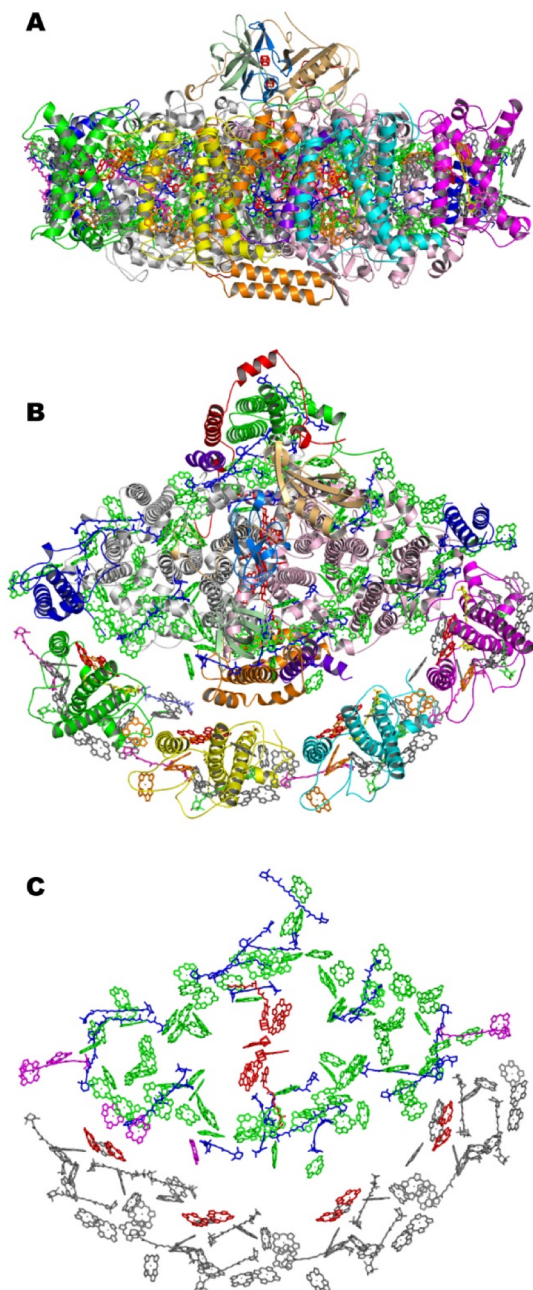


図 1. 植物 PSI-LHCI 超複合体の結晶構造

(A) 膜面に平行な方向および (B) 垂直な方向から見たもの。(C) タンパク質複合体中の補因子のみを (B) と同じ方向であらわしたもの。反応中心およびエネルギー伝達に関わる各 Lhca サブユニットにおける Chl 二量体 (*a603* と *a609*) を赤色であらわす。文献⁹⁾より引用。

PSI-LHCI 超複合体は Lhca1~Lhca4 の 4 つの LHCI サブユニットに加え、反応中心コア部分を構成する 9 つの膜貫通サブユニット (PsaA, PsaB, PsaF~PsaL) および 3 つの表在性サブユニット (PsaC~PsaE) からなる計 16 個のサブユニットから構成され、長さ 140 Å の親骨をもつ扇子のような構造をしている (図 1)。この構造解析により、PSI-LHCI 超複合体に含まれる、143 個の Chl*a*、12 個の Chl*b*、35 個のカロテノイド (26 個の β カロテン、5 個のルテイン、4 個のビオラキサンチン)、10 個の脂質分子 (6 個のホスファチジルグリセロール、3 個のモノガラクトシルジアシルグリセロール、1 個のジガラクトシルジアシルグリセロール)、3 個の Fe₄S₄ クラスター、2 個のフィロキノンの正確な位置と配向が明らかになった。これらの Chl およびカロテノイドの数は、結晶化された標品を用いた HPLC 分析やこれまでの生化学的な実験の報告とも一致したことから、超複体内のほぼすべての集光性色素を同定することに成功したと考えられる。これまでの構造解析^{3,6,7)}とは異なり、筆者らの構造では分解能が改善されて Chl*a* と Chl*b* の区別ができたことにより LHCI から反応中心コア部分へのエネルギー伝達の経路を特定し、カロテノイドの種類を特定したことでキサントフィル回路に参与するビオラキサンチンの結合箇所を明らかにして機能の理解に大きく貢献した。

3. LHCI を構成する Lhca サブユニットの構造

全ての Lhca サブユニットは 3 本の膜貫通ヘリックス A、B、C とルーメン側に存在する両親媒性ヘリックス D から構成され、同じ LHC ファミリーである LHCII^{8,9)} や CP29¹⁰⁾ と共通のフォールディングをしている (図 2)。しかしアミノ酸の保存性の低い領域である、AC ループ (膜貫通ヘリックス A と C を繋ぐループ構造) および BC ループ (膜貫通ヘリックス B と C を繋ぐループ構造)、そして N 末端部分では各 Lhca サブユニット間で構造は異なる。反応中心コア部分はこれらの Lhca サブユニットの構造的な特徴をうまく判別して超複合体を形成する。このとき反応中心コア部分が各 Lhca サブユニットと相互作用

用する面積は Lhca1~Lhca4 において 357、131、638、340 (Å²) であり、Lhca1 と Lhca3 (Lhca1/3) とは強く、Lhca2 と Lhca4 (Lhca2/4) とは弱く相互作用している。AC ループは Lhca1 では他の Lhca2/3/4 と比べてずっと短く、むしろ LHCII や CP29 に近い。同様に BC ループも Lhca1 にのみ LHCII や CP29 と共通した両新媒性ヘリックス E を持つが、Lhca2/3/4 にはない。Lhca1 の AC ループおよび BC ループにおけるこれらの特徴的な領域は反応中心コア部分のサブユニットである PsaG と相互作用しており、Lhca1 以外の Lhca サブユニットを Lhca1 のところに仮に配置すると立体的な衝突が起こり超複合体を形成できない。また N 末端領域では Lhca1/2/4 は良く似た構造をしていたが Lhca3 には短いヘリックス F が新しく見つかった。この Lhca3 の特有の N 末端領域は反応中心コア部分のサブユニットである、PsaA および PsaK と相互作用しており、さらに Lhca3 の膜貫通ヘリックス B の N 末端側はひと巻き分

が短くなってループ構造となり PsaA との相互作用を強めている。この膜貫通ヘリックス B の N 末端側と反応中心コア部分とのストロマ側での相互作用はいずれの Lhca サブユニットにおいても共通して見られ、Lhca1 は PsaB を、Lhca2 は PsaJ を、Lhca3 は PsaA を、Lhca4 は PsaF をうまく認識することで超複合体を形成する。

PSI-LHCI 超複合体におけるエネルギーの伝達の効率はほぼ 100%といわれている¹⁾。すなわち、弱光条件で LHCI が吸収した全ての光エネルギーは励起エネルギーとして反応中心コア部分に導かれ電荷分離反応が起こることになる。この励起エネルギー伝達のための経路についてはさまざまな議論がなされているが、今回決定した PSI-LHCI 超複合体の結晶構造は反応中心コア部分と LHCI とのあいだに存在している集光性色素の正確な位置を明らかにしたことで、これまで蓄積されてきた分光の実験結果を説明しうる分子基盤を提供した。さらに集光性色素の配置に基づきこれまでは不確定であったエネルギー伝達の経路を特定した。ここでエネルギー伝達の経路を議論するにあたり、最も低いエネルギー準位を持つ、すなわち、エネルギーを効率的に捕捉することのできる Red Chl に注目する。真核生物の PSI-LHCI 超複合体では Red Chl のほとんどが各 Lhca サブユニットに存在している Chl a603 と a609 の Chl 二量体であるとされている。確かに Lhca1~4 におけるいずれの Chl a603-609 においても Chl のテトラピロール環の C 環と E 環が平行に並び重なり、周囲に集光性色素を配置して効率よく LHCI 内の光エネルギーを集めることのできる構造をしている。さらにこれら二量体 Chl は LHCI の内側部分に結合し、Chl のフィトール鎖を反応中心コア部分に向かって大きく突き出すようにして固定され、励起エネルギーを伝達するのに合理的な構造をとっていると考えられる。ただし、それぞれの Lhca サブユニットは共通するフォールディングと集光性色素の配置を持つものの、前項で述べたように反応中心コア部分との相互作用の強さには差異があり、それゆえ、それぞれの Lhca サブユニットから反応中心コア部分へのエネルギー伝達の効率は異なる。筆者らは

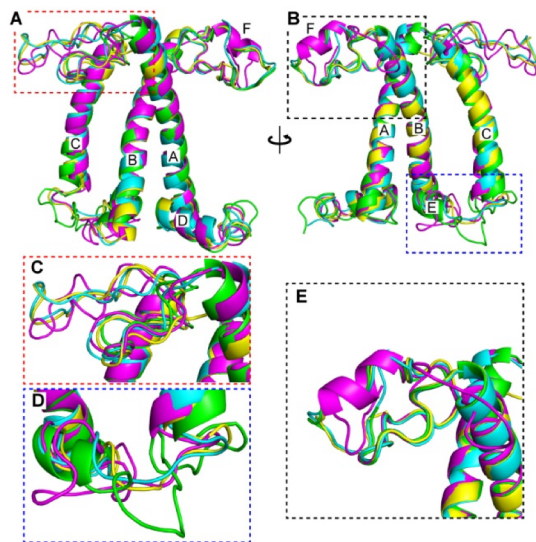


図 2. Lhca サブユニットの構造

4 つの Lhca サブユニットを重ね合わせた。Lhca1 を緑、Lhca2 をシアン、Lhca3 を紫、Lhca4 を黄で表し(A) LHCI の外側の方向および (B) 反応中心コア部分の方向からみたもの。(C) は AC ループ部分、(D) は BC ループ部分、(E) は N 末端の部分を拡大したもの。文献⁴⁾のものを改変して引用。

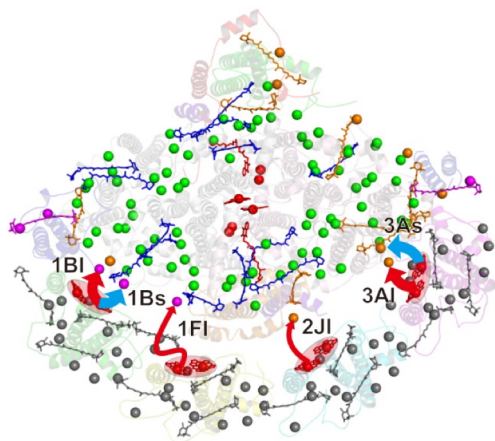


図3. 励起エネルギーを伝達する経路

ストロマ側の経路を水色、ルーメン側の経路を赤色の矢印で示す。矢印の太さは伝達の効率を表す。文献⁹⁾のものを改変して引用。

これらの相互作用の強さに基づき、励起エネルギーはおもに Lhca1 と Lhca3 サブユニットから、それぞれ PsaB と PsaA サブユニットへと膜の両面において伝達されていることを提唱した (図3)。これらのうち、前述の二量体 Chl はストロマ側の 1Bs パスおよび 3As パスにおいて機能しており、ルーメン側は二量体 Chl を必要としない 1B1 パスおよび 3A1 パスが存在している。(なお、これらパスの命名方法は Lhca サブユニット名ーPsa サブユニット名ーストロマ側かルーメン側かに従っている。) これらパスにおける LHCI と反応中心コア部分との Chl 同士の最短の距離は 1B1 パスが 5.5 Å、1Bs パスが 7.5 Å、3A1 パスが 5.8 Å、3As パスが 10.2 Å である。

1B1 パスは Lhca1 の Chl b607 から PsaB の 3つの Chl (a1231、a1232、a1233) へと繋がるルーメン側の経路で、最短の Chl 間の距離は 5.5 Å である。興味深い事に、これら 3つの Chl (a1231、a1232、a1233) はシアノバクテリア PSI では Red Chl であると提案されており²⁾、このうち a1233 は植物の反応中心コア部分ではシアノバクテリアと比べてその位置と配向を大きく変化させ、Lhca1 の b607 からのエネルギー伝達を行うのに理想的な場所に存在している。ただし通常は Chla から Chlb へのエネルギー伝達はそれほど効率的ではないため、この b607 はエネルギー伝達を制

限しているか、あるいは状況に応じて、この部位に結合する Chl は Chla と Chlb の両方が使い分けられている可能性が考えられる。

1Bs パスは Lhca1 の二量体 Chl に集められたエネルギーを PsaB の 3つの Chl (a1218、a1219、a1802) へと伝達するストロマ側の経路で、最短の Chl 間の距離は 7.5 Å である。このうち、Chl a1802 はシアノバクテリアの PSI には見られず、植物反応中心コア部分で新規に獲得された Chl である。周辺の PsaB の膜貫通ヘリックス d と e をつなぐループ領域 (Ala307~Gly318) も大きく構造が変化しており、シアノバクテリアと比べて PsaB 側に約 60 度、10 Å 近く PsaB 側にフリップしている。さらにシアノバクテリア *Synechocystis* PSI コア単量体の結晶構造解析から a1802 の結合サイト近くでは Chl a40 が見つかっており¹²⁾、Chl a40 を含む Chl の 3 量体 (a1218、a1219、a40) が Red Chl として機能する可能性も提案されている。以上をふまえると 1Bs パスは特に効率の良い経路であると考えられる。

Lhca3 から PsaA の Chl 間の距離は、ルーメン側では 5.8 Å、ストロマ側では 10.2 Å となっており、それぞれ 3A1 パス・3As パスを形成している。3A1 パスは二量体 Chl を必要としない、他の Chl からエネルギーを PsaA 側に伝達する経路であり、Lhca2 で吸収された励起エネルギーもこの経路を通る可能性が考えられる。一方で 3As パスはエネルギーの殆どが二量体 Chl を経由すると考えられ、特に効率よく機能していると考えられる。

以上のように我々は構造に基づきエネルギーの伝達経路を提唱したが、これまでの低分解能の結晶構造^{3, 6, 7)}と筆者らの結晶構造の決定的な違いは LHCI と反応中心コア部分の間である、“ギャップ部分”に存在するギャップ Chl の数ははるかに少ないことである。筆者らの構造とほぼ同じ時期に発表された 2.8 Å 分解能の結晶構造¹³⁾でもギャップ Chl の数は同様に少ないため、筆者らの結晶構造でギャップ Chl の数が少ないことは決して精製方法や結晶化方法の違いではなく本来の構造を反映していると考えられる。これまでのキネティクスの解析や理論計算はギャップ Chl を余分に多く含んでいる結晶構造に基づいて

いるため、これらの実験結果は再度検証する必要があるかもしれない。

4. LHCI におけるカロテノイドの配置とその機能

Lhca1~Lhca4 サブユニットはそれぞれが 3~4 個のカロテノイドを結合しており、LHCI には全部で 13 個のカロテノイドが結合している (図 4)。高分解能で構造解析されている同じ LHC ファミリーの LHCII では 4 つのカロテノイドの結合部位が同定され、膜貫通ヘリックス A および膜貫通ヘリックス B が形成する溝にルテインを結合する L1 部位および L2 部位、膜貫通ヘリックス C の近傍にネオキササンチンを結合する N1 部位、隣接する LHCII との境界にビオラキサンチンを結合する V1 部位が存在する。LHCI においては、いずれの Lhca サブユニットにおいても L1 部位にルテイン、L2 部位にビオラキサンチン、N1 部位に BCR が結合していたが、V1 部位にはカロテノイドは何もみつからず、Lhca1 のみ新規の L4 部位にルテインが結合していた (図 4)。

本研究により特定されたカロテノイドうち、本稿ではキサントフィル回路に関与するビオラキサンチンについて紹介する。ビオラキサンチンは強光条件においてビオラキサンチンデエポキシダーゼ (VDE) により脱エポキシ化されてゼアキササンチンとなり、Chl の励起エネルギーを奪い熱として捨てる。これは過剰な光によってタンパク質が損傷されるのを防ぐため、過度に光化学反応が進行して蓄積したルーメン側のプロトンとビオラキサンチンデエポキシダーゼが感知して負のフィードバックをかける仕組みであり、キサントフィル回路とよばれる¹⁴⁾。このような防御機構は LHCII については古くから知られていたが、つい最近の報告¹⁵⁾まで、多くの研究者は LHCI ではキサントフィル回路は機能しないと考えていた。しかし、筆者らの PSI-LHCI 超複合体の結晶構造では L2 部位にビオラキサンチンが結合しており、これは LHCI においてもキサントフィル回路が機能している直接的な証拠となる。さらに立体構造に基づき Lhca1~Lhca4 サブユニット間

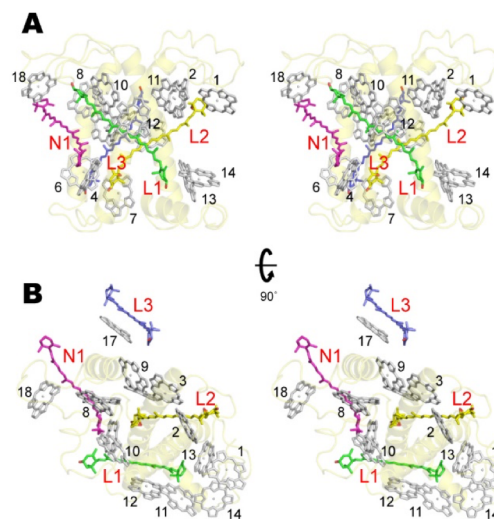


図 4. Chl およびカロテノイドの結合サイト
膜に平行 (A) および垂直 (B) な方向から Lhca サブユニットについてステレオ表示であらわした。数字は Chl の結合サイトをあらわしている。文献⁴⁾のものを改変して引用。

でのキサントフィル回路の効率の違いについても考察する。

L2 部位は膜貫通ヘリックス A と B が形成する溝のうち LHCI の内側、すなわち反応中心コア部分の側にある。サブユニット同士が接触する面積から判断される反応中心コア部分と LHCI との相互作用は Lhca1/3 では強く、Lhca2/4 では弱いため、反応中心コア部分と LHCI との間のルーメン側には深い間隙がある。この間隙の存在から、VDE の L2 部位へのアクセスは LHCI の中央のサブユニットである Lhca2/4 の方が LHCI の側面にある Lhca1/3 よりも容易であることが示唆される。また、ビオラキサンチンのルーメン側は 3 個の Chl (*a*604, *a*/*b*606, *a*/*b*607) によって囲まれており、これらは BC ループによって塞がれている。そのため VDE が L2 部位のビオラキサンチンを脱エポキシ化するには BC ループが開く必要があると考えられる。Lhca2/4 の BC ループは 21 アミノ酸で構成され、Chl *b*607 への結合は水分子を介している。これに対し Lhca1/3 の BC ループは PSI コアと相互作用するため Lhca2/4 と比べて 10 アミノ酸余分に長くなっており、Chl *a*/*b*607 を直接結合している。さらに Lhca2/4 の BC ループの

方が 10 アミノ酸分短いにも関わらず、ルーメン側に晒されている酸性アミノ酸の数が多い。これらの構造的差異から Lhca2/4 の BC ループの方が構造変化し易く、またルーメン側の酸性化を感知し易いことが示唆されるので Lhca2/4 では Lhca1/3 と比べてキサントフィル回路は活発であると推察される。さらに、Lhca2/4 と Lhca1/3 ではピオラキサニンとの水素結合の様式にも違いが見られる。ピオラキサニンのルーメン側の端部は Lhca2/4 では Trp 127 (Lhca2)、Trp 126 (Lhca4) と水素結合しているのに対し、Lhca1/3 では Trp 101 (Lhca1) と Trp 130 (Lhca3) に加え、Gln 105 (Lhca1) もしくは Thr 133 (Lhca3) とそれぞれ水素結合を形成している。これは Lhca2/4 の L2 部位の方がピオラキサニンとの親和性が低いことが推察され、このことから LHCI の中央のサブユニットにおいてキサントフィル回路が活発であることが示唆される⁹⁾。

6. おわりに

本研究により、高等植物の PSI-LHCI 超複合体の詳細な構造が明らかになった。立体構造にもとづき、どのようにして巨大な超複合体が形成されるか、そして励起されたエネルギーはどの経路を通過して反応中心コア部分へと導かれるか、など超複合体に関する長年の疑問に答えただけでなく、L2 部位に結合するピオラキサニンがキサントフィル回路により非光化学的消光の役割を担っているという新たな提案も行った。これらの構造基盤は、光エネルギーをより効率良く利用することのできる新規のエネルギー変換材料のモデルテンプレートともなることが期待される。

謝辞

本研究は岡山大学異分野基礎科学研究所の沈建仁、中国科学院植物研究所の Xiaochun Qin、Tingyun Kuang 諸氏との共同研究である。X 線結晶構造解析データは SPring-8 の BL41XU および BL44XU にて測定した。この場を借りてお礼申し上げる。また本研究は科学研究費補助金等の助成を受けて行った。

Received March 3, 2017; Accepted March 29, 2017;
Published April 30, 2017

参考文献

1. 得津 隆太郎 (2016) 光合成における強光順化メカニズム研究の新展開 光合成研究 26, 36–42.
2. Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W., and Kraus, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* 411, 909–917.
3. Ben-Shem, A., Frolov, F. and Nelson, N. (2003) Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* 426, 630–635.
4. Qin, X., Suga, M., Kuang, T. and Shen, J.R. (2015) Structural basis for energy transfer pathways in the plant PSI-LHCI supercomplex *Science* 348, 989–995.
5. Suga, M., Qin, X., Kuang, T. and Shen J.R. (2016) Structure and energy transfer pathways of the plant photosystem I-LHCI supercomplex. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 39, 46–53.
6. Amunts, A., Drory, O. and Nelson, N. (2007) The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution. *Nature* 447, 58–63.
7. Amunts, A., Toporik, H., Borovikova, A. and Nelson, N. (2010) Structure determination and improved model of plant photosystem I. *J. Biol. Chem.* 285, 3478–3486.
8. Kuhlbrandt, W., Wang, D.N. and Fujiyoshi, Y. (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367, 614–621.
9. Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X. and Chang W. (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* 428, 287–292.
10. Pan, X., Li, M., Wan, T., Wang, L., Jia, C., Hou, Z., Zhao, X., Zhang, J. and Chang, W. (2011) Structural insights into energy regulation of light-harvesting complex CP29 from spinach. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 309–315.
11. Nelson, N. (2009) Plant Photosystem I – The Most Efficient Nano-Photochemical Machine. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9, 1709–1713.
12. Mazor, Y., Nataf, D., Toporik, H. and Nelson, N. (2014) Crystal structure of virus-like photosystem I complexes from the mesophilic cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *eLife* 3, e01496.

13. Mazor, Y., Borovikova, A. and Nelson, N. (2015) The structure of plant photosystem I super-complex at 2.8 Å resolution. *eLife* 4, e07433.
14. Niyogi, K.K., Grossman, A.R. and Bjorkman, O. (1998) Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* 10, 1121–1134.
15. Ballottari, M., Alcocer, M.J., D'Andrea, C., Viola, D., Ahn, T.K., Petrosza, A., Polli, D., Fleming G.R., Cerullo, G. and Bassi, R. (2014) Regulation of photosystem I light harvesting by zeaxanthin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E2431–2438.

Crystal structure and energy transfer pathways of the plant photosystem I-light harvesting complex I supercomplex

Michihiro Suga*

Research Institute for Interdisciplinary Science, Okayama University

報告記事

第2回光合成細菌ワークショップ開催報告

久留米大学医学部

原田 二郎

「様々な分野で活躍する光合成細菌の研究者が集まる場が無いので、それを作りたい」という思いがあり、昨年(2016年)の植物生理学会年会の関連集会で第1回光合成細菌ワークショップを企画しました。世話人は浅井智広さん(立命館大)、塚谷祐介さん(東工大)と私が務めました。普段年会に参加されない演者も含めて様々な内容の発表となり、終わった後には多くの方から反響がありました。そのため今年の年会でも、同世話人によって第2回目を企画し、5名の方に講演を依頼して開催しました。参加者は32名でした。

前半の最初は、東工大の増田真二先生に、光合成細菌のレドックスセンサーを利用した硫化水素・活性硫黄分子種インジケータおよびシアノバクテリアの光受容体を応用した遺伝子発現光制御技術の開発について話していただきました。次の明治大の鬼沢あゆみ先生には、ご自身のシアノバクテリアの脂肪酸代謝の研究内容を発表していただき、そこから光合成細菌の脂肪酸代謝との関連について考察していただきました。立命館大の学生の寺村美里さんには、これまで行ってきた緑色硫黄細菌のアンテナ色素の生合成系の研究について発表していただきました。後半は、新潟大の三好智博先生に、哺乳類で研究が進んでいるRNA干渉の中心タンパク質であるArgonauteが、光合成細菌にも保存されており、その分子機構がユニークであることから多様性を含めて議論していただきました。最後は首都大の福島俊一先生に、糸状性好熱性光合成細菌の滑走運動中の移動方向転換について発表していただきました。この様に普段は互いに聴けない多種多様な発表があったためか、会場の議論は盛り上がりました。引き続いて始まった親睦会も、発表内容や参加者自身の研究などの熱心な会話が何処からも聞こえており、楽しい時間を過ごすことができました。

この様な場で開催報告を世話人が書かせていただいているので、今回のプログラム編成で意識したことや感じたことを少し述べたいと思います。

光合成細菌の専門家と非専門家の両方に興味を持ってもらえるように、プログラムは世話人同士で何度も議論しながら組みました。昨年は「光合成とそれ以外」という認識で組みましたが、今年は応用、脂肪酸合成、色素合成、哺乳類、運動と、それぞれに関連性があまり無い演題を選びました。正直、そうなってしまった部分もありますが、関連性が無くても違和感なく発表を聴くことができました。これは、光合成細菌を題材としているという一貫性があったからだと考えています。一見すると関連がないような演題を組むというのは、異なる分野や非専門家の参加者を募るのに有効だと感じました。また、いつもは年会に参加されない方に講演を依頼したことにより、質疑応答や懇親会などで、積極的な異分野交流が生まれているように見えました。この辺りは昨年度もそうして多くの方が面白いと感じた部分でしたので、今年も意識しました。今後、参加者同士で共同研究などの発展に繋がれば、企画した方も嬉しく思いますし、その様な研究者同士の出会いの場の提供は、本ワークショップ開催の趣旨の1つでもあります。あともう一つ考慮したのは、学生や若手研究者に講演依頼したことです。光合成細菌研究の将来を盛り上げていってくれることに期待しています。

光合成細菌の研究の発展のため、今後もしばらく同様にワークショップを企画していきたいと考えています。来年の札幌での年会でも試行錯誤しながら、第3回目のプログラムを作って行きたいと思います。そのためには、最新の研究に触れ、常にアンテナを張りながら、日々の研究活動に専念することが重要だと感じています。

集会案内

第73回 藤原セミナー

The 4th International Conference “Molecular Life of Diatoms” 開催のお知らせ

日時：2017年7月9日（日）15:00 ～ 7月13日（木）15:00

場所：生田神社社会館 〒650-0011 兵庫県神戸市中央区下山手通1丁目2-1

詳細・参加申し込み：<http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~matsuda/MLD4/>

主催：The International Conference, “Molecular Life of Diatoms” (MLD) 準備委員会

問い合わせ先：関西学院大学 松田 祐介 (yusuke@kwansei.ac.jp)

珪藻の分子研究は現在、海洋学、生態学、および植物生理学にまたがる境界領域を形成しつつありますが、その中心課題として海洋光合成の謎に迫る研究も急速に展開しています。また、ケイ酸材料源や油脂化合物源としても注目を浴びている極めてユニークで重要な研究対象です。

本会議は2011年アトランタ開催を嚆矢に、パリ（2013年）、シアトル（2015年）とつづき、今回初めて欧米以外での開催となります。非常に幅広いトピックを幅広い分野の研究者が、珪藻+分子というキーワードで貫通する学術集会ですが、光合成研究者も様々な発見がある大変面白い会議です。

詳細は標記ウェブサイトをご覧ください。

松田 祐介（関西学院大学）

The 73rd Fujihara Seminar

The IVth International Conference
“Molecular Life of Diatoms”
 July 9, Sun - 13, Thu, 2017,
 Ikuta Shrine Hall, Kobe, Japan



Keynote Speakers
 Jonathan ZEHM, Department of Ocean Sciences, University of California Santa Cruz, USA
 Jun MINAGAWA, Division of Environmental Photobiology, National Inst. for Basic Biology, Japan
 Debashish BHATTACHARYA, Dept. Ecology, Evolution, & Natural Resources, Rutgers Univ., USA
 José YOUNG, School of Oceanography University of Washington, USA
 Marina MONTRESOR, Section EM, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Italy
 Thomas MÖCK, School of Environmental Sciences, University of East Anglia, UK
 Shigeki MATSUMA, Department of Biology, Tokyo-Gaijigo University, Japan
 Benjamin BAILLEUL, Institut de Biologie Physico-Chimique, France
 Peter KRÖTY, Plant Ecophysiology, Biology, University of Konstanz, Germany
 Harriet ALEXANDER, Department of Biology, University of California Davis, USA
 Nils KRÖGER, I CBCE Center, Dept. Chemistry & Food Chemistry, TU Dresden, Germany
 Tomoko YOSHINO, Biotechnical Science, Tokyo University of Agriculture & Technology, Japan
 Chris BOWLER, Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure, France
 Hiroyuki OGATA, Dept. Biophysics, Division of Biological Sciences, Kyoto University, Japan
 Virginia ARMBRUST, The School of Oceanography, University of Washington, USA

International Steering Committee
 Virginia ARMBRUST (Univ. Washington, USA)
 Ailsa BONIS (Norwegian Univ. Science & Technology, Norway)
 Mariella FERRANTE (Stazione Zoologica Anton Dohrn, Italy)
 Yusuke MATSUDA (Kwansei Gakuin Univ., Japan)
 Tsuyoshi TANAKA (Tokyo Univ. Agriculture & Technology, Japan)
 Kimberlee THAMMATHAKOLN (Rutgers Univ., USA)
 Assaf YARDI (Weizmann Institute, Israel)

Local Organizers: Yusuke MATSUDA, Tsuyoshi TANAKA, Ailsa BONIS (Florence Res. Agency), Masao AICASHI (Osaka Univ.), Harriet ALEXANDER, Shigeki MATSUMA, Harriet ALEXANDER (Florence Res. Agency), YIP TUNG (Kowloon Univ. Technology), YIP TUNG (Kowloon Univ. Technology), YIP TUNG (Kowloon Univ. Technology)

MLD Kobe 2017



集会案内

8th International Conference “Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability -2017”の開催案内

期日：2017年10月30-11月4日

場所：インド、ハイデラバード大学

昨年、ロシア・モスクワ郊外の Pushchino で開催された会議に引き続き、本年10月30-11月4日にインドのハイデラバード大学にて上記会議が催されます。本国際会議は今回が8回目の開催になり、2013年からは毎年開催しています。ハイデラバードはインド中南部の都市で日本からの渡航は少なくとも1回の乗り継ぎが必要です。本会議の第1回目は2004年にカナダ、ケベック州 Trois-Rivières で“In honor of Norio Murata (村田先生の名誉を讃える記念)”として行われたのを原点としていることから毎回多数の日本からの参加者があり、近年は毎回 Young Talent 賞・Poster 賞を日本人参加者が受賞しています。今回は Prof. Govindjee (イリノイ大学)、Prof. W. A. Cramer (パデュー大学)、Prof. A. S. Raghavendra (ハイデラバード大学)の業績に敬意を表して開催されます。なお、インドへの渡航は Visa が必要になるので御留意ください。昨年より、Visa on Arrival 制度も適用されています。

今回も多くの方々に参加、御発表（口頭及びポスター発表）頂き、活発なディスカッションができますようお願い申し上げます。学生・ポスドクの参加者も大歓迎しています。Visa 申請（公的）の締切りは9月10日、参加登録・要旨の締切りは9月20日です（2017年3月1日時点）。例年国際ジャーナルに特集号が掲載されており、今回も同様の予定です。

討論のセクションは大きく二つに分かれており

1. 光合成（基礎から応用まで人工光合成を含む光合成科学全ての領域）
2. 水素エネルギー（ヒドロゲナーゼ等による水素生産やバイオフェュエル等）

となっています。詳しくは下記ウェブサイトをご覧ください。

<https://prs.science/>

御不明な点がございましたら、御遠慮なくお問い合わせください。

東京理科大学 榎 達也
(本会議の事務局を担当)

集会案内

第 25 回「光合成セミナー2017：反応中心と色素系の多様性」の開催案内

期日：2017年（平成29年）7月15日（土）午後2時から16日（日）午後4時まで

場所：神戸大学百年記念会館（<http://www.kobe-u.ac.jp/guid/access/rokko/rokkodai-dai2.html>）

（交通）阪急電車「六甲」駅、JR西日本「六甲道」駅、または、阪神電車「御影」駅から市バス36系統「鶴甲団地」行に乗車「神大文理農学部前」下車。

開催の目的：光合成に関して、物理学、化学、生物学を融合した討論を行う。光合成の進化、物質変換、人工光合成などについても討論する。第一線の研究者に専門分野の解説をしていただくとともに、参加者の口頭・ポスター発表を行う。

協賛：日本光合成学会

内容：

1. 25周年記念講演会
 - 大岡 宏造（大阪大学）「光合成細菌タイプ1反応中心の研究の現状」
 - 高市 真一（東京農業大学）「カロテノイド研究30余年」
 - 田中 歩（北海道大学）「クロロフィル代謝の機能と進化」
2. 口頭発表（討論を含めて、一人10分から15分を予定）
3. ポスター発表（3分程度のポスタープレビューも併せて行う）

申込：発表申し込み締め切り 2017年（平成29年）6月30日（金）

参加申し込み締め切り 2017年（平成29年）6月30日（金）

参加費：（7月15日の懇親会費、7月16日の昼食代を含む）

一般 5,000円（予定）

学生 3,000円（予定）

世話人：秋本 誠志（神戸大学）、大岡 宏造（大阪大学）、大友 征宇（茨城大学）、
出羽 毅久（名古屋工業大学）、永島 賢治（神奈川大学）、宮武 智弘（龍谷大学）

申し込み・問い合わせ先：神戸大学大学院 理学研究科 秋本 誠志

(E-mail: photosynthesis@boar.kobe-u.ac.jp, Tel: 078-803-5705)

プログラムおよび今後の案内は下記ホームページにて、更新情報を随時、掲載いたします。

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/~ohoka/photosyn_seminar_2017/top.html

宿泊：セミナー期間中は連休となりますので、早めにホテルを予約してください。

その他：光合成生物の進化も含めた光反応・色素系の基礎から応用までを幅広く議論し、異分野の学生・研究者が楽しく交流できる場を提供していきたいと考えています。また新しい研究テーマや方向性のヒントが得られることも期待しています。今後の運営・内容等に関してご意見等がありましたら、遠慮無くメール（上記メールアドレス宛）をいただければ幸いです。

報告記事

若手の会の幹事の交代のご報告

立命館大学 生命科学部 生命情報学科
浅井 智広

若手の会は、日本光合成学会に所属する若手研究者の有志によって発足し、2009年10月から活動を始めました。2013年6月から私が会長として活動してきました。これまでの幹事は主に発足時の有志であり、積極的に運営に関わってきました。当時はほぼ全員がポストドクレベルの初々しい若手研究者という立場でしたが、時が経つにつれてPIとなってラボを運営する者も増え、その立場は熟練の中堅研究者のようなイメージに自然と変わってきました。前号の会報でもお知らせしていた通り、若手の会の“若手研究者の集まり”というフレッシュなイメージを維持していくため、この4月号の会報での活動報告をもって、若手の会はその運営体制を一新します。現幹事および前回の研究セミナーの参加者からは既に快い賛同が得られています。母体である日本光合成学会の会員の皆様にも、本会の次年度年会の総会の折にご報告させていただきたいと思えます。具体的な新幹事は以下の方々（敬称略）にお願いしました。

| | |
|----------|------------------------|
| 会長：榎本 元 | (東京大学・助教) |
| 幹事：斉藤 圭亮 | (東京大学・講師) |
| 嶋川 銀河 | (神戸大学) |
| 清水 隆之 | (東京工業大学) |
| 神保 晴彦 | (埼玉大学) |
| 高橋 拓子 | (埼玉大学・助教) |
| 溝上 祐介 | (CNRS) |
| 森田 隆太郎 | (神戸大学) |
| 横山 諒 | (岡山大学、ウィスコンシン大学マディソン校) |
| 渡辺 麻衣 | (東京大学) |

実年齢が若い学生を中心に、幅広い研究分野の方々に幹事をお願いしました。今後の若手の会の活動は、これまでの7年間の活動内容に縛られず、一新した幹事による“新会の会”のフレッシュな方針に委ねたいと思えます。既に新幹事によって新しい活動の提案が複数挙げられ、その溢れるパワーに驚いています。これまでの会報で私が書き続けたことですが、現場の研究を推進している研究者が積極的に交流することが学際性の強い光合成研究では絶対不可欠です。この記事を読んで興味を持たれた方は、是非、新幹事の若手の会の活動にご参加下さい。この点はこれまでの若手の会と変わらず、新幹事による若手の会も、実年齢や身分、所属を問わず、多くの方々の参画を歓迎してくれるはずです。

若手の会新会長からのごあいさつ

東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻
榎本 元

はじめまして、東京大学大学院・総合文化研究科・池内研究室・助教の榎本元と申します。光合成学会若手の会の二代目会長である浅井さんより引き継ぎ、三代目の会長を務めることになりました。よろしくお願いいたします。

私は学部時代、当時の会長（初代）だった成川さんのお手伝いをするかたちで、初めて光合成学会若手の会に参加しました。研究者として右も左もわからなかった昔の自分にとって、初めて研究者というものを間近に感じることでできる機会だったように思います。あれから5年ほどたち、まさか自分がその会長になる日がくるとは思ってもいませんでした。巡り合わせの妙を感じます。

私はシアノバクテリアを研究対象に、主として光受容体に着目することで、光応答機構を分子レベルで理解することに興味を持ち、研究しております。いわゆる「光合成の研究者」ではありません。ですが、光合成学会若手の会はそんな私にも会長を務める機会をいただける、ふとこの深いコミュニティであると感じております。実際、光合成学会若手の会には様々なバックグラウンドをもった研究者が参加しています。自分とは異なる、様々な視点をもった研究者と交流することで、新たな発見がある楽しい会です。新メンバーに運営が移っても、その良い雰囲気は継続していければと思っています。

今回の幹事交代では全てのメンバーが一新され、一気に平均年齢が下がりました。具体的に光合成学会若手の会がどうなっていくのか、具体的な見通しは全く立っていません。新幹事の間で密に連携を取りながら、ときに旧幹事に応援を求めつつ、新たな光合成学会若手の会として活発に活動していけたらと思います。幹事は世代交代を行いました。参加に年齢制限などありません。私達より上の世代の方々にも、これまで以上に積極的に若手の会へ参加していただければ幸いです。本会にも劣らない活発な研究交流を行い、若い世代から光合成研究を盛り上げていきたいと思っています。

最後に、若輩者で色々と至らないところもあるかとは思いますが、精一杯がんばります。みなさまには、温かい目で見守りつつ、アドバイスいただければ幸いです。今後ともよろしくお願いいたします。

(若手の会からのお知らせ)

第8回日本光合成学会年会2日目の後には、16時より同キャンパス9号館大会議室にて若手の会セミナーを開催致します。演者等の詳細は、追ってメーリングリストなどでご周知します。若手の会では本年度より幹事を一新し、新体制での最初のセミナーになります。これまで若手の会に参加したことがなかった学生や若手の研究者の方々も、ぜひこの機会にご参加いただければ幸いです。また、この記事を読んでいただいた先生方には、ご自身の参加の検討だけでなく、ご指導中の学生やポスドクの方に若手の会への参加を是非お勧めいただきたいと思います。

事務局からのお知らせ

★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(ゼロイチキュウと入力)、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。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、会費を納入ください。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。会費納入状況などにつきましては、ご遠慮なく事務局（sonoike@waseda.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

〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

岡山大学 異分野基礎科学研究所

高橋裕一郎 研究室内

日本光合成学会

TEL : 086-251-7861

FAX : 086-251-7876

ホームページ: <http://photosyn.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(ゼロイチキユウと入力)、当座、0730290

名前：ニホンコウゴウセイガッカイ

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。役員の任期は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。幹事の任期は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。

日本光合成学会の役員選出に関する申し合わせ

平成27年5月27日 幹事会

1. 選挙管理委員会

本会の選挙を公正に実施するため、選挙管理委員会を置く。選挙管理委員2名は常任幹事会が幹事会に推薦し、決定する。選挙管理委員の互選により委員長を選出する。

2. 会長〔会則第5条第6項〕

1) 幹事および常任幹事による若干名の候補者の推薦方法

幹事は、会長選挙に推薦する候補者としてふさわしい会員を3名連記で投票する。投票結果が上位の会員について、常任幹事会は、本人の意向を確認した上で、若干名を推薦候補者として決定する。選挙事務は事務局長が執り行う。

2) 会長選挙

会長選挙の実施に当たっては、会員に推薦候補者を提示し、全会員による単記無記名投票を実施する。最高得票者を、次期会長とする。得票数が同数の場合は、抽選により決定する。選挙事務は選挙管理委員会が執り行う。

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 | 鈴木祥弘 | 神奈川大学理学部 |
| 栗井光一郎 | 静岡大学大学院理学領域 | 園池公毅 | 早稲田大学教育学部 |
| 池内昌彦 | 東京大学大学院総合文化研究科 | 高市真一 | 日本医科大学生物学教室 |
| 石北 央 | 東京大学大学院工学研究科 | 高橋裕一郎 | 岡山大学異分野基礎科学研究所 |
| 泉井 桂 | 近畿大学生物理工学部生物工学科 | 田中 歩 | 北海道大学低温科学研究所 |
| 伊藤 繁 | 名古屋大学 | 田中 寛 | 東京工業大学資源化学研究所 |
| 井上和仁 | 神奈川大学理学部 | 田中亮一 | 北海道大学低温科学研究所 |
| 伊福健太郎 | 京都大学大学院生命科学研究所 | 民秋 均 | 立命館大学総合理工学院 |
| 白田秀明 | 帝京大学医学部 | 都筑幹夫 | 東京薬科大学生命科学部 |
| 榎並 勲 | 東京理科大学 | 出羽毅久 | 名古屋工業大学大学院工学研究科 |
| 得平茂樹 | 首都大学東京大学院理工学研究科 | 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所 | 輛 達也 | 東京理科大学理学部 |
| 大岡宏造 | 大阪大学大学院理学研究科 | 仲本 準 | 埼玉大学大学院理工学研究科 |
| 大杉 立 | 東京大学大学院農学生命科学研究科 | 永島賢治 | 神奈川大学 |
| 太田啓之 | 東京工業大学 | 成川 礼 | 静岡大学大学院理学研究科 |
| | バイオ研究基盤支援総合センター | 南後 守 | 大阪市立大学大学院理学研究科 |
| 大友征宇 | 茨城大学理学部 | 西田生郎 | 埼玉大学大学院理工学研究科 |
| 大政謙次 | 東京大学大学院農学生命科学研究科 | 西山佳孝 | 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 | 野口 航 | 東京薬科大学生命科学部 |
| | 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 |
| 小保方潤一 | 京都府立大学・生命環境科学研究科 | 林 秀則 | 愛媛大学プロテオサイエンスセンター |
| 小保達男 | 名古屋大学大学院生命農学研究科 | 原登志彦 | 北海道大学低温科学研究所 |
| 垣谷俊昭 | 名古屋大学 | 彦坂幸毅 | 東北大学大学院生命科学研究所 |
| 菓子野康浩 | 兵庫県立大学理工学部 | 久堀 徹 | 東京工業大学研究院化学生命科学研究所 |
| 柏山祐一郎 | 福井工業大学環境情報学部 | 日原由香子 | 埼玉大学大学院理工学研究科 |
| 金井龍二 | 埼玉大学 | 檜山哲夫 | 埼玉大学 |
| 神谷信夫 | 大阪市立大学大学院理学研究科 | 福澤秀哉 | 京都大学大学院生命科学研究所 |
| 熊崎茂一 | 京都大学大学院理学研究科 | 藤田祐一 | 名古屋大学大学院生命農学研究科 |
| 栗栖源嗣 | 大阪大学蛋白質研究所 | 古本 強 | 龍谷大学農学部 |
| 小池裕幸 | 中央大学理工学部 | 前 忠彦 | 東北大学 |
| 小林正美 | 筑波大学大学院数理物質科学研究科 | 牧野 周 | 東北大学大学院農学研究科 |
| 坂本 亘 | 岡山大学資源生物科学研究所 | 増田真二 | 東京工業大学 |
| 佐賀佳央 | 近畿大学理工学理学科 | | バイオ研究基盤支援総合センター |
| 櫻井英博 | 早稲田大学 | 増田 建 | 東京大学大学院総合文化研究科 |
| 佐藤公行 | 岡山大学 | 松浦克美 | 首都大学東京都市教養学部 |
| 佐藤直樹 | 東京大学大学院総合文化研究科 | 松田祐介 | 関西学院大学理工学部 |
| 佐藤文彦 | 京都大学大学院生命科学研究所 | 真野純一 | 山口大学農学部 |
| 鹿内利治 | 京都大学大学院理学研究科 | 皆川 純 | 基礎生物学研究所 |
| 重岡 成 | 近畿大学農学部 | 宮尾光恵 | 東北大学大学院農学研究科 |
| 篠崎一雄 | 理化学研究所植物科学研究センター | 宮下英明 | 京都大学大学院地球環境学堂 |
| 島崎研一郎 | 九州大学大学院理学研究院 | 宮地重遠 | 海洋バイオテクノロジー研究所 |
| 嶋田敬三 | 首都大学東京 | 宗景(中島)ゆり | 関西学院大学理工学部 |
| 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 | 本橋 健 | 京都産業大学総合生命科学部 |
| 杉浦昌弘 | 名古屋市立大学 | 横田明徳 | 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 |
| 杉浦美羽 | 愛媛大学プロテオサイエンスセンター | 和田 元 | 東京大学大学院総合文化研究科 |
| 杉田 護 | 名古屋大学遺伝子実験施設 | | |
| 杉山達夫 | 名古屋大学 | | |

編集後記

前任者の西山 佳孝さんから引き継ぎ、今号から編集長を務めることになりました。また編集委員には、前期から引き続き粟井 光一郎さん（静岡大学）、そして新しく成川 礼さん（静岡大学）、矢守 航さん（東京大学）に加わって頂きました。二年間、どうぞよろしくお願い申し上げます。私自身、見よう見まねで光合成研究を始めた学生の頃から、「光合成研究」を楽しみに拝読してきました。これまでの関係者の御尽力で非常に充実した誌面となっており、日本語のわかりやすい解説や研究紹介は、光合成研究者だけではなく、異分野の研究者にとっても非常に価値のあるものだと思います。この雑誌をさらに素晴らしいものとし、研究分野の発展に貢献するため、鋭意努力する所存であります。

さて、今号は、2016年5月27日～28日に東京理科大学葛飾キャンパスで開催された第7回日本光合成学会・公開シンポジウム「光化学系の構造・モデル計算から見えてきた光合成反応の妙」でご講演していただいた方々とポスター発表賞を受賞された方々に加え、トピックス記事を神戸大学の嶋川さんと三宅さんに執筆していただきました。限られた執筆期間だったにも関わらず、ご自身の研究に対する著者の思い入れが伝わってくる力作ぞろいだったと思います。今号に関するご意見や本誌に対するご要望がございましたら、ぜひ私までご連絡ください。

また、研究紹介や解説などの記事を随時受け付けておりますので、奮ってご投稿ください。

編集長・伊福 健太郎（京都大学）

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。書評も歓迎します。

記事の掲載を希望される方は、編集長の伊福（ifuku@kais.kyoto-u.ac.jp）までご連絡ください。

「光合成研究」編集委員会

編集長 伊福 健太郎 (京都大学)
編集委員 栗井 光一郎 (静岡大学)
編集委員 成川 礼 (静岡大学)
編集委員 矢守 航 (東京大学)

日本光合成学会 2017年度役員

会長 高橋 裕一郎 (岡山大学)
事務局長 園池 公毅 (早稲田大学)

常任幹事 田中 歩 (北海道大学) 前会長
常任幹事 鹿内 利治 (京都大学) 前事務局長
常任幹事 松田 祐介 (関西学院大学) 年会2015年
常任幹事 柏山 祐一郎 (福井工業大学) 年会2016年
常任幹事 杉浦 美羽 (愛媛大学) 年会2017年
常任幹事 古本 強 (龍谷大学) 年会2017年
常任幹事 榎 達也 (東京理科大学) 光生物学協会
常任幹事 石北 央 (東京大学)
常任幹事 伊福 健太郎 (京都大学) 編集長

会計監査 藤田 祐一 (名古屋大学)
ホームページ 加藤 裕介 (岡山大学)

光合成研究 第27巻 第1号 (通巻78号) 2017年4月30日発行

日本光合成学会

〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

岡山大学 異分野基礎科学研究所

高橋 裕一郎 研究室内

TEL : 086-251-7861

FAX : 086-251-7876

e-mail : jspr@photosyn.jp

ホームページ : <http://photosyn.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 (ゼロイチキュウと入力)、当座、0730290

名前 : ニホンコウゴウセイガッカイ
