

助成番号 0828

表在性タンパク質の脂質修飾による光合成の安定化と耐塩性の改良

和田 元, 水澤 直樹

東京大学大学院総合文化研究科

概要 土壌中の塩濃度は、植物の光合成能力に影響を与え、植物の生産性を著しく低下させる。この光合成能力の低下は、植物が塩ストレス下で塩害を被る原因の一つであり、耐塩性植物を作出するためには、塩ストレス下でも高い光合成活性を維持する能力を植物に付与する必要がある。光合成の諸過程の中で最も塩ストレスに弱いのは、酸素発生反応である。この酸素発生は、光化学系II複合体(PSII)でおこり、塩ストレス下で酸素発生系が失活するのは、表在性タンパク質が塩ストレス下において解離し、それによって酸素発生を担っている Mn クラスターが不安定になることが原因であると考えられている。もし、そうだとすると、何らかの方法によって塩ストレス下でも表在性タンパク質が解離しないようにできれば、Mn クラスターが安定化され、耐塩性が向上するものと予想される。

高等植物には、PSII の表在性タンパク質として PsbO、PsbP、PsbQ が存在するが、植物の光合成研究のモデル系であるシアノバクテリアでは、三つのタンパク質に加えて、PsbU、PsbV、Psb27 も表在性タンパク質として存在する。興味深いことに、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の PsbQ と Psb27 は、脂質によって修飾されるリポタンパク質であり、脂質修飾の様式も異なることが、我々の最近の研究から明らかとなった。この脂質修飾のシステムを利用して、表在性タンパク質の脂質修飾を改変すれば、表在性タンパク質の PSII への結合能を変化させることができ、PSII の耐塩性を改良することができるのではないかと考えられる。

本研究では、*Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて、脂質修飾されない表在性タンパク質を脂質修飾されるように、あるいは逆に脂質修飾される表在性タンパク質を脂質修飾されないように、遺伝子操作による改変を行った。この表在性タンパク質の脂質修飾は、各タンパク質の N 末端領域にあるシグナル配列によって決まると考えられている。そこで、脂質修飾されるタンパク質として PsbQ と Psb27、脂質修飾されないタンパク質として PsbO を選び、それらのタンパク質のシグナル配列を相互に入れ替えたキメラタンパク質をコードした遺伝子を作製した。また、対象とするタンパク質の遺伝子を破壊した株も作製し、それらの株の中にキメラタンパク質遺伝子を導入して発現させた。その結果、シグナル配列を交換したタンパク質を *Synechocystis* sp. PCC 6803 において発現させることに成功した。それらの発現タンパク質の脂質修飾は変化しているものと予想され、それにとまって PSII の耐塩性も変化していることが期待される。

1. 研究目的

砂漠や海沿岸部の未利用の土地などで植物を栽培して穀物などの食糧を生産することは、人口増加にともなう食糧需要の増加や二酸化炭素削減の問題を解決する手段の一つとして極めて重要である。しかし、そのような土地では土壌中の塩濃度が高く、塩害のために植物を栽培することが困難であるため、塩濃度が高くても塩害を被らない耐塩性植物を作出することが必要である。土壌中の塩

濃度は、植物の光合成能力に影響を与え、塩濃度が高い塩ストレス下では光合成活性が低下し、植物の生産性が著しく低下することが知られている⁽¹⁻⁴⁾。この光合成能力の低下は、植物が塩ストレス下で塩害を被る原因の一つであり、耐塩性植物を作出するためには、塩ストレス下でも高い光合成活性を維持する能力を植物に付与する必要がある。光合成の諸過程の中で最も塩ストレスに弱いのは、光エネルギーによって水を酸化して酸素を発生する

酸素発生反応である。この酸素発生は、葉緑体にあるチラコイド膜に埋め込まれた光化学系 II 複合体 (PSII) でおこる^(5,6)。PSIIは20種類以上のタンパク質、クロロフィルなどの色素分子、金属原子、脂質、キノン等から構成される超分子複合体であり、反応中心は二つの相同なタンパク質 D1 と D2 により構成され、全ての素反応(電荷分離, 酸素発生, 電子伝達反応)は D1/D2 上でおこり、酸素発生は D1 上に結合するマンガン (Mn) クラスターにより触媒される^(7,8)。Mn クラスターは不安定であるため、PSII には Mn クラスターを覆うように複数の表在性タンパク質が結合している⁽⁹⁾。塩ストレス下で酸素発生系が失活するのは、表在性タンパク質が塩ストレス下において PSII から解離し、それによって Mn クラスターが不安定になることが原因であると考えられている。もし、そうだとすると、何らかの方法によって塩ストレス下でも表在性タンパク質が PSII から解離しないようにできれば、Mn クラスターが安定化され、耐塩性が向上するものと予想される。

植物には、PSII の表在性タンパク質として PsbO、PsbP、PsbQ が存在するが、植物と同じ酸素発生型の光合成を行い、植物の光合成研究のモデル系であるシアノバクテリアでは、PsbO、PsbQ、PsbU、PsbV、Psb27 が表在性タンパク質として存在し、Psb27 はアセンブリー中間体にも結合している (Fig. 1)⁽⁹⁾。最近、申請者らは、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の PsbQ と Psb27 が脂質によって修飾されており、脂質修飾の様式が違うという大変興味深い発見をした (Fig. 2)^(10,11)。シアノバクテリアのその他の表在性タンパク質や植物の表在性タンパク質は脂質修飾されないが、シアノバクテリアの PsbQ と Psb27 だけがなぜ脂質修飾されるのか、その生理機能はまだ不明であ

る。また、この脂質修飾のシステムを利用して他の表在性タンパク質も脂質修飾されるようにすることができれば、塩ストレス下でも表在性タンパク質が PSII から解離しなくなり、耐塩性が向上するのではないかと期待される。

本研究では、*Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて、脂質修飾されない表在性タンパク質を脂質修飾されるように、逆に脂質修飾される表在性タンパク質を脂質修飾されないように、あるいは脂質修飾の様式を変化させるように、遺伝子操作による改変を行った。この表在性タンパク質の脂質修飾は、各タンパク質の N 末端領域にあるシグナル配列によって決まると考えられている (Fig. 3)。そこで、脂質修飾されるタンパク質として PsbQ (ジアシルグリセロールとアシル基によって修飾される)、Psb27 (ジアシルグリセロールによって修飾される)、NrtA (細胞膜に存在するリポタンパク質、ジアシルグリセロールとアシル基によって修飾される)、脂質修飾されないタンパク質として PsbO を選び、それらのタンパク質のシグナル配列を相互に入れ替えたキメラタンパク質をコードした遺伝子を作製し、

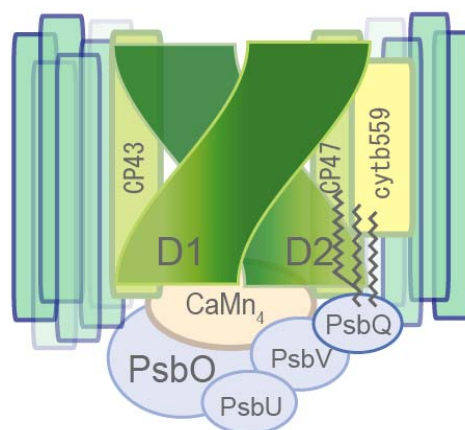


Fig. 1. Structure of PSII complex of cyanobacteria

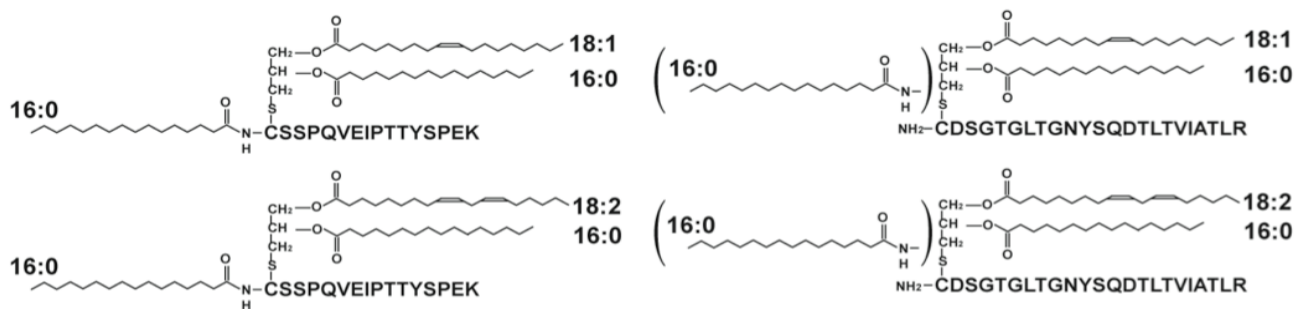


Fig. 2. Structure of lipid modification of cyanobacterial lipoproteins, PsbQ (left) and Psb27 (right)

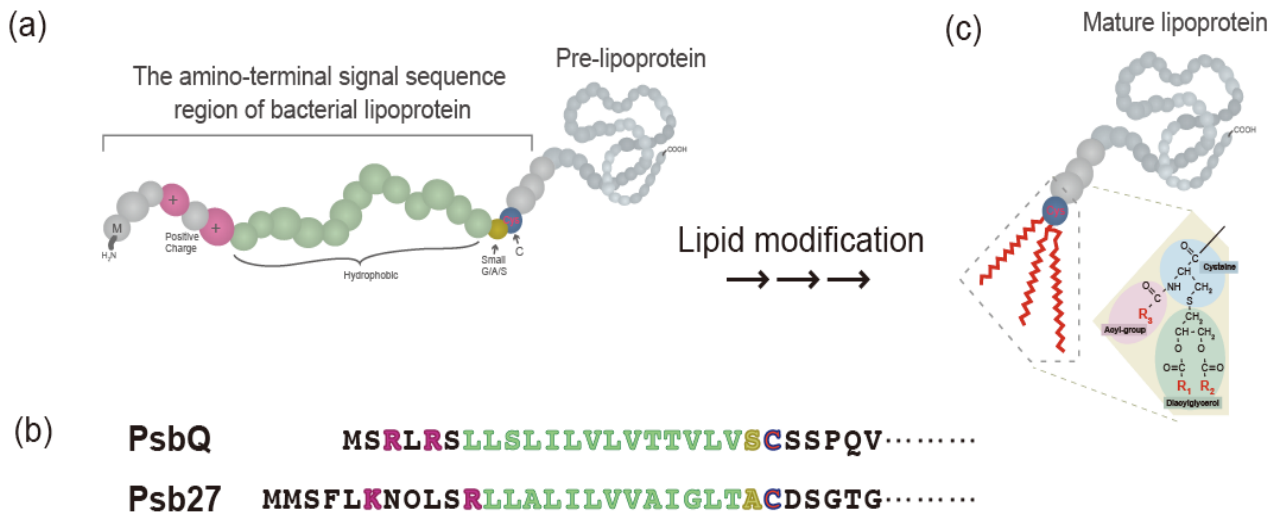


Fig. 3. Lipid modification of lipoproteins. (a) Structure of pre-lipoproteins. (b) N-terminal sequence of cyanobacterial lipoproteins, PsbQ and Psb27. (c) Structure of mature lipoproteins.

Synechocystis sp. PCC 6803 へ導入することでキメラタンパク質を発現させ、表在性タンパク質の脂質修飾の変化に応じて、PSII の耐塩性がどのように変化するかについて解析を進めている。

2. 研究方法

バクテリアのリポタンパク質の脂質修飾は、次のようなステップによっておこる (Fig. 4) (12, 13)。まず、脂質修飾を受けるタンパク質は、N 末端にシグナル配列をもつ前駆体として合成され、Sec と呼ばれる輸送系によって膜に輸送される。シアノバクテリアの PSII の表在性タンパク質は、チラコイド膜に輸送される。次に、シグナル配列の C 末端にあるシステイン残基 (このアミノ酸残基が成熟型タンパク質の N 末端となる) がジアシルグリセロールによって修飾される。その後、シグナル配列がシグナルペプチダーゼ II によって切断され、N 末端となったシステイン残基のアミノ基がさらにアシル基によって修飾される。つまり、N 末端のシステイン残基は、ジアシルグリセロールとアシル基による脂質修飾を受けることになる。脂質修飾を受けない PSII の表在性タンパク質も前駆体として合成され、シグナル配列によってチラコイド膜に輸送されるが、脂質修飾を受けずにシグナル配列が切断されて成熟型のタンパク質となる。したがって、表在性タンパク質が脂質修飾されるかどうかはシグナル配列によって決まり、シグナル配列を相互に交換することにより、脂質修飾を改変することができるものと

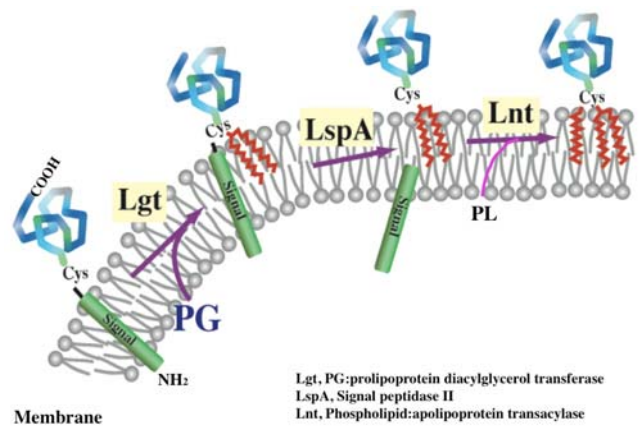


Fig. 4. Lipid modification of lipoproteins in cyanobacteria

考えられる。

2.1 遺伝子破壊株の作製

脂質修飾を受ける表在性タンパク質として PsbQ (ジアシルグリセロールとアシル基による修飾)、Psb27 (ジアシルグリセロールによる修飾)、NrtA (ジアシルグリセロールとアシル基による修飾)、脂質修飾を受けない表在性タンパク質として PsbO を選び、各タンパク質遺伝子の破壊株を作製した。これらの破壊株の作製には、PSII のタンパク質である CP47 C 末端に His タグを付加したタンパク質を発現している株 (CP47-His) を宿主株として使用した。この CP47-His 株では、CP47 に付加した His タグによって、PSII を容易に精製することができるという利点がある。この株を宿主として、各遺伝子の翻訳領域に抗生物質耐性遺伝

子を挿入することにより、各遺伝子の破壊株を作製した。

2. 2 脂質修飾を改変した株の作製

表在性タンパク質の N 末端シグナル配列をコードした領域を相互に交換したキメラタンパク質をコードするキメラ遺伝子を作製した。次に、それらの遺伝子を 2. 1 で作製した遺伝子破壊株に導入し、ゲノム中のニュートラルサイトに相同組換えによって組み込んだ (Table 1)。プロモーターは、それぞれのタンパク質のネイティブプロモーターを用いた。

2. 3 タンパク質の分析

作製した株におけるタンパク質の発現は、SDS-PAGEと Blue-Native PAGE、および各タンパク質に対する抗体を用いたウエスタンブロット解析によって調べた。また、タンパク質の脂質修飾は、PSII を SDS-PAGE にかけて各タンパク質のバンドを切り出し、各々のバンドから抽出したタンパク質を質量分析計によって分析することで確認した。

2. 4 PSII 活性の測定

PSII の活性は、光を照射したときに発生する酸素を酸素電極で測定することによって行った。電子受容体としては、フェリシアン化カリウムとジクロロフェニル-*p*-ベンゾキノンを使用した。

2. 5 耐塩性の評価

野生株および作製した株の耐塩性は、細胞を種々の塩濃度条件下において培養し、増殖速度および光合成活性(酸素発生能)を測定することにより評価する。

3. 研究結果

作製した12種類のキメラタンパク質を発現する株、及びそれぞれの親株である遺伝子破壊株からチラコイド膜を単離し、SDS-PAGEによりタンパク質を分離した。その後、ウエスタン分析を行い、タンパク質の発現を調べた (Fig. 5)。その結果、PsbQ の成熟タンパク質に NrtA、Psb27、PsbQ のシグナル配列を付加したものでは、タンパク質の発現が確認された。また、PsbO の成熟タンパク質に PsbO シグナル配列付加したものでも、PsbO タンパク質の発現が確認された。さらに、Psb27 の成熟タンパク質に NrtA、Psb27、PsbQ のシグナル配列を付加したものでもタンパク質の発現が確認された。これらの結果から、脂質修飾を受けるタンパク質は、シグナル配列を他の脂質修飾を受けるタンパク質のシグナル配列に改変しても、タンパク質が発

Table 1. List of chimera proteins encoded in the constructed chimera genes

Host strain	Signal	Mature protein	Chimera protein
<i>ΔpsbQ</i>	NrtA	PsbQ	N-PsbQ
<i>ΔpsbQ</i>	Psb27	PsbQ	27-PsbQ
<i>ΔpsbQ</i>	PsbQ	PsbQ	Q-PsbQ
<i>ΔpsbQ</i>	PsbO	PsbQ	O-PsbQ
<i>Δpsb27</i>	NrtA	Psb27	N-Psb27
<i>Δpsb27</i>	Psb27	Psb27	27-Psb27
<i>Δpsb27</i>	PsbQ	Psb27	Q-Psb27
<i>Δpsb27</i>	PsbO	Psb27	O-Psb27
<i>ΔpsbO</i>	NrtA	PsbO	N-PsbO
<i>ΔpsbO</i>	Psb27	PsbO	27-PsbO
<i>ΔpsbO</i>	PsbQ	PsbO	Q-PsbO
<i>ΔpsbO</i>	PsbO	PsbO	O-PsbO

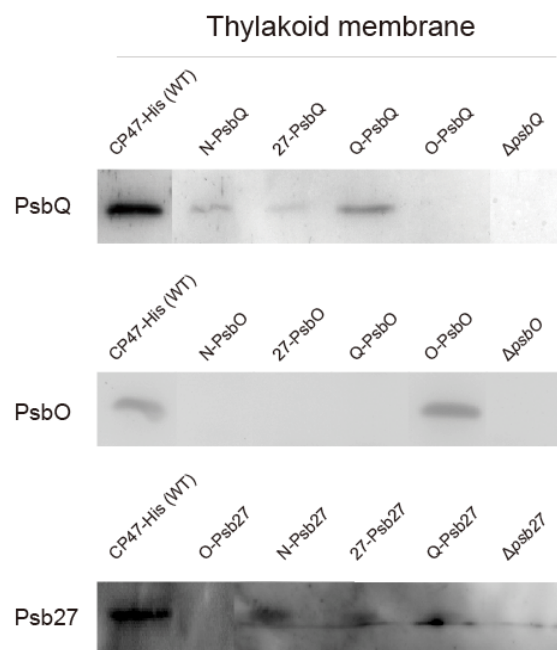


Fig. 5. Western blot analysis of PsbQ, PsbO, and Psb27 in thylakoid membranes

現するが、本来脂質修飾を受けない PsbO のシグナル配列を付加した場合には発現しないことがわかった。また、

脂質修飾を受けない *PsbO* については、脂質修飾を受けるタンパク質のシグナル配列を付加すると、タンパク質が発現しないことが明らかになった。

O-Psb27 と *O-PsbQ* について、タンパク質が発現しなかった理由を明らかにするために、mRNA の発現について調べた。その結果、mRNA は発現していることが明らかとなった (Fig. 6)。この結果から、転写は正常におこるものの、その後の過程で生じる何らかの原因によってタンパク質の合成が影響を受けているものと考えられる。

次に、チラコイド膜サンプルを用いて、*N-PsbQ* および *27-PsbQ* が PSII に結合しているかどうかについて調べた。まず、それぞれのチラコイド膜サンプルを、Blue Native PAGE を用いて複合体ごとに分離し、その後、SDS-PAGE によって、サブユニット組成を調べた。引き続き、D1 に対する抗体および *PsbQ* に対する抗体を用いてウエスタン分析を行った。その結果、D1 は、PSII の二量体及び単量体において検出された。*NrtA* および *Psb27* のシグナル配列を *PsbQ* の成熟タンパク質に付加した場合、*PsbQ* はおもに二量体に存在し、単量体にもわずかに存在していた (Fig. 7, Fig. 8)。このことから、*PsbQ* の成熟タンパク質に、*NrtA* や *Psb27* のシグナル配列を付加しても、*PsbQ* は正常に PSII へ結合できることが明らかとなった。

4. 考察および今後の展望

PSII 表在性タンパク質、*Psb27*、*PsbQ*、*PsbO* のシグナル配列を改変した株を作製し、各キメラタンパク質の発現を解析した。その結果、脂質修飾を受ける *Psb27* と *PsbQ* は、脂質修飾を受ける他のタンパク質の lipobox を含むシグナル配列と入れ替えた時のみ発現可能なこと、また、脂質修飾を受けないタンパク質は、lipobox を含むシグナル配列を付加すると発現しないことが明らかとなった。

リポタンパク質の脂質修飾は、これまでリポタンパク質の前駆体のアミノ末端にあるシグナル配列によって規定されていると考えられてきたが、本研究において脂質修飾を受けない *PsbO* に、脂質修飾を受ける前駆体タンパク質のシグナル配列を付加させると、*PsbO* の蓄積がおこらないことが明らかとなった。また、脂質修飾を受けるタンパク質 *PsbQ* と *Psb27* に、脂質修飾を受けない *PsbO* のシグナル配列を付加させると、*PsbQ* や *Psb27* の蓄積がおこらないことも明らかになった。遺伝子の転写レベルでは影響を受け

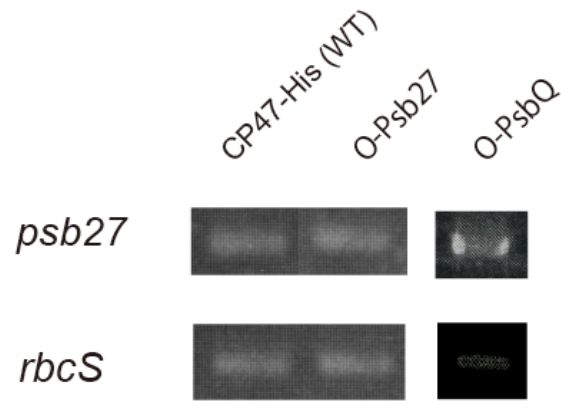


Fig. 6. RT-PCR analysis of expression of genes for *O-Psb27* and *O-PsbQ*

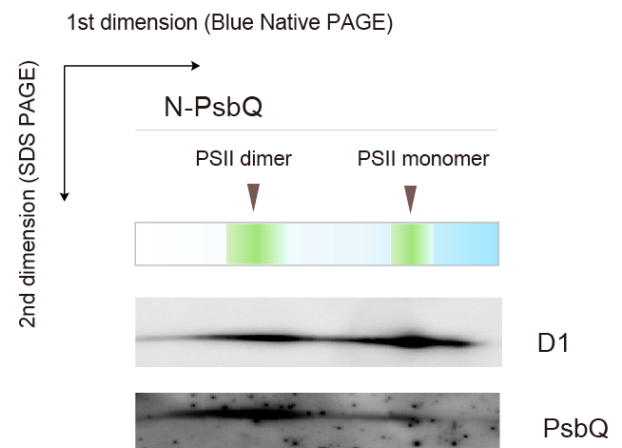


Fig. 7. Western blot analysis of D1 and *PsbQ* in PSII complexes, which were separated by Blue-Native PAGE, from the strain expressing *N-PsbQ*

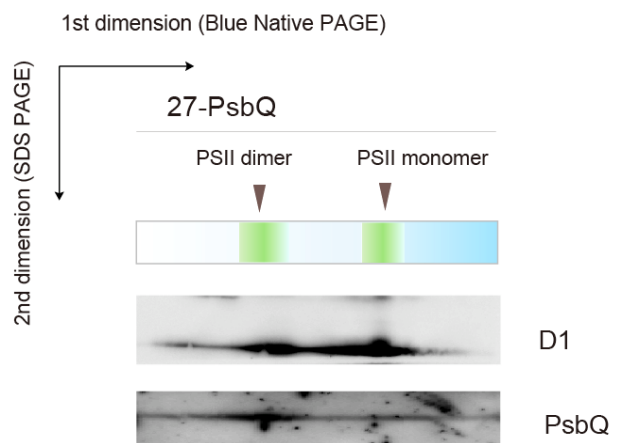


Fig. 8. Western blot analysis of D1 and *PsbQ* in PSII complexes, which were separated by Blue-Native PAGE, from the strain expressing *27-PsbQ*

ていないことから、タンパク質の蓄積がおこらない理由としては、翻訳されたタンパク質のチラコイド膜への輸送、膜透過、シグナル配列のプロセッシングなどがシグナル配列を変えたことによって影響を受け、タンパク質が不安定となり分解を受けるのではないかと推測される。つまり、シグナル配列だけでなく、成熟タンパク質も転写後のプロセスに影響を与えることを示唆している。今後は、シグナル配列だけでなく、成熟タンパク質についても部分的に入れ替える(特にアミノ末端付近のアミノ酸残基)などの工夫をすることにより、PsbOを脂質修飾することができないか、逆にPsbQやPsb27を脂質修飾されないようにすることができないかを検討しなければならない。一方、PsbQにPsb27とNtrAのシグナル配列を付加した場合や、Psb27にPsbQとNtrAのシグナル配列を付加した場合にはタンパク質を発現させることに成功した。これらのタンパク質では、脂質修飾の様式が変化していると考えられ、今後、脂質修飾の構造を質量分析計を用いて解析するとともに、増殖や光合成活性に対する塩ストレスの影響を調べ、脂質修飾が耐塩性に影響を与えるかどうかについても検討する予定である。

謝 辞

本研究にご援助頂きましたソルト・サイエンス研究財団に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Boyer, J. S. (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218:443-448.
- 2) Cheeseman, J. M. (1988) Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol.* 87:547-550.
- 3) Greenway, H. and Munns, R. (1980) Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31:149-190.
- 4) Brugnoli, E. and Lauteri, M. (1991) Effects of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity, and carbon isotope discrimination of salt-tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and salt-sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C₃ non-halophytes. *Plant Physiol.* 95:628-635.
- 5) Malkin, R. and Niyogi, K. (2000) Photosynthesis. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L., Eds.), pp. 568-628, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland.
- 6) Raval, M., Biswal, B. and Biswal, U. (2005) The mystery of oxygen evolution: analysis of structure and function of photosystem II, the water-plastoquinone oxido-reductase. *Photosynth. Res.* 85:267-93.
- 7) Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A. and Biesiadka, J. (2005) Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* 438:1040-1044.
- 8) Guskov, A. Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A. and Saenger, W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16:334-342.
- 9) Roose, J. L., Wegener, K. M., Pakrasi, H. B. (2007) The extrinsic proteins of photosystem II. *Photosynth Res.* 92:369-387.
- 10) Wada, H. and Murata, N. (2007) The essential role of phosphatidylglycerol in photosynthesis. *Photosynth. Res.* 92:205-215.
- 11) Ujihara, T., Sakurai, I., Mizusawa, N. and Wada, H. (2008) A method for analyzing lipid-modified proteins with mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 374:429-431.
- 12) Braun, V. and Wu, H. C. (1994) Lipoproteins, structure, function, biosynthesis and model for protein export. *New Compar. Biochem.* 27:319-341.
- 13) Sutcliffe, I. C. and Russell, R. R. (1995) Lipoproteins of gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 177:1123-1128.

No. 0828

Improvement of Stability and Salt Tolerance of Photosynthesis by Lipid Modification of Extrinsic Proteins

Hajime Wada and Naoki Mizusawa

Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

Summary

Post-translational modification of proteins with lipid is ubiquitously found in all organisms to facilitate the attachment of soluble proteins to biological membranes. Bacterial lipoproteins are modified with lipid at their N-terminal cysteine residues and play important roles at the membrane-aqueous interface. In cyanobacteria, which perform oxygenic photosynthesis, many genes for putative lipoproteins were found in genome databases by bioinformatic analysis. However, few studies have been performed on structure of lipid modification or physiological roles of lipid modification of lipoproteins.

In this study, we found that extrinsic proteins, PsbQ and Psb27, which are bound to photosystem II (PSII) complex of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, are modified with lipid, whereas other extrinsic proteins, PsbO, PsbU and PsbV, were not modified. In PsbQ, a sulfhydryl and an amino groups of the N-terminal cysteine residue were modified with a diacylglycerol and a palmitic acid moiety, respectively, whereas the corresponding sulfhydryl group of the N-terminal cysteine residue in Psb27 was modified with diacylglycerol but the amino group was only partially modified with a palmitic acid moiety. Since extrinsic proteins in PSII are required for stabilization of manganese cluster that is the most sensitive part of photosynthesis to stresses such as salt and heat stresses, these findings suggest that the lipid modification of PsbQ and Psb27 might play important roles in the stabilization of PSII complex. We also found that lipid modification of extrinsic proteins can be genetically changed by exchanging the coding region for signal sequences among extrinsic proteins. Such changes in lipid modification of extrinsic proteins may affect stability of PSII and lead us to make salt tolerant strains of cyanobacteria.