

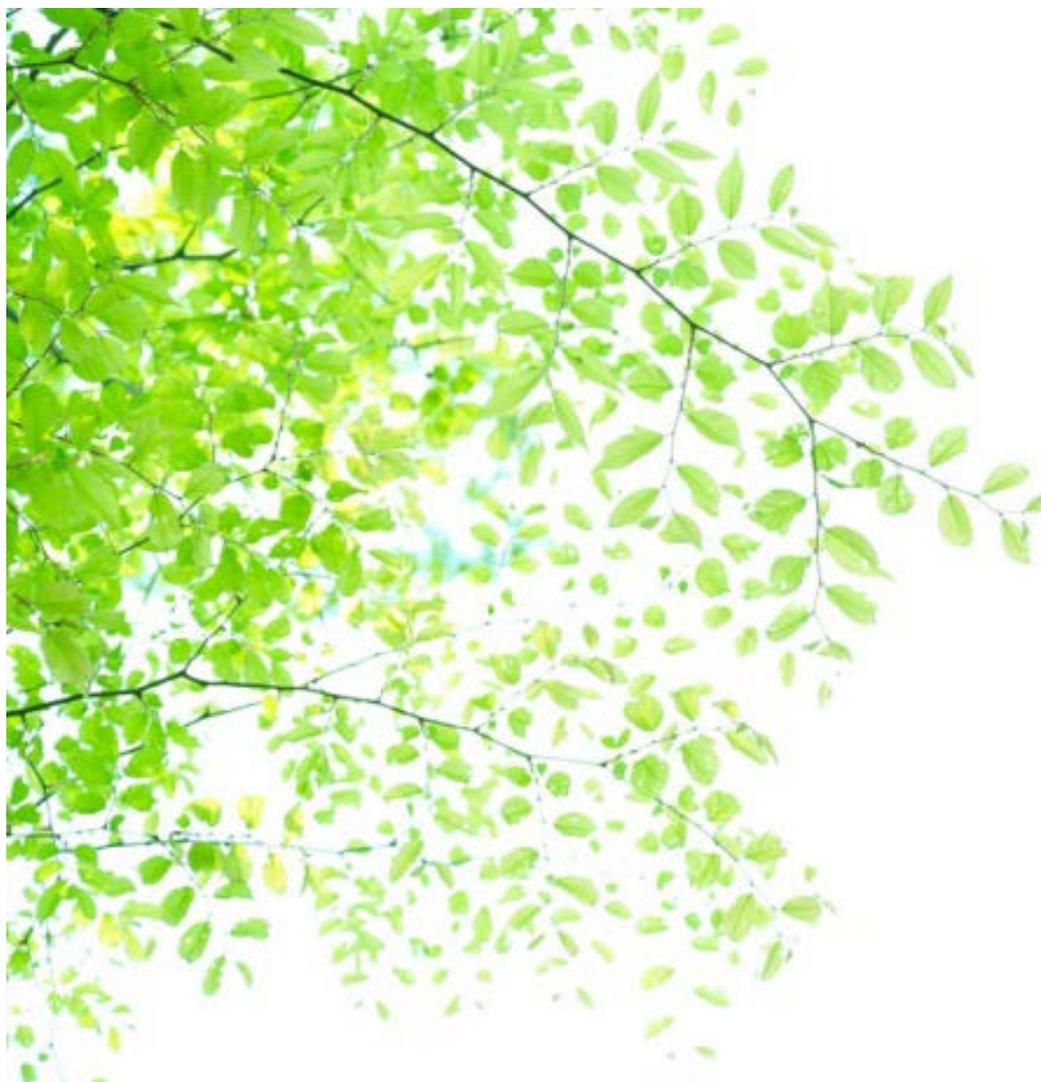


文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究（研究領域提案型）平成28年度～平成32年度

**新光合成**

光エネルギー変換システムの再最適化

# New Photosynthesis News Letter



No.6

July 2019

## 目次

巻頭言 清水 浩 .....	3
公募研究班(第二期: 令和1-2年) .....	4
公募研究班 新参画 研究紹介	
泉 正範 .....	5
河合(久保田)寿子 .....	5
高橋 拓子 .....	6
宮下 英明 .....	6
長尾 遼 .....	7
後藤 栄治 .....	7
森垣 憲一 .....	8
Journal Highlight .....	9
Reports	
産業界との接点や応用展開について模索するための勉強会.....	14
Find out the mechanism supporting C4 photosynthesis.....	16
WS「緑藻クラミドモナスの CRISPR-Cas9」(岡大).....	18
ようこそゲノム編集 シモンさんとはじめるクラミドモナスの CRISPR/Cas9 ワークショップ・イン京都.....	19
2019 年度春期領域会議.....	21
今後の予定 .....	23
お願い .....	24

## 巻頭言

元号が令和に改まりました。

特に、何が変わったわけでもありませんが、30年続いた平成が終わり、昭和をおよそ30年経験した人間としては、何か一区切りがあったような、人生の二区切り目があったような気にもなっています。第5回の領域会議は令和ではじめての会議として6月1-3日に北海道大学の学術交流会館で行われました。東工大の久堀さん、北大の田中さんの両研究室のお世話で大変充実した会議となりました。今回は3日間にわたり、計画班、新たに加わった方も含めて公募班の研究内容に関する口頭発表、ポスター発表がありました。公募班のポスター発表も充実し、全部で70件以上のポスター発表が行われました。発表の時間内では終わらない議論や、学生さん、若手研究者の熱い発表がポスター会場で続いていました。

皆川代表の挨拶にもあったように、昨年を振り返ると、今頃は中間評価に向けての取りまとめや領域としての方向性の議論などであわただしくしていたように思います。あれから1年経った今回の領域会議に参加しますと計画班や当初から参加されている公募班では、最初の3年間を経て、新光合成研究の流れが、各研究者の中で一旦取り込まれ、またそれを自分なりの方向性として展開され進められているように感じました。個人的にはこの3年間を経ても皆さんの研究発表の内容を何うほどに勉強することばかりですが、どれも大変楽しく光合成に関する興味が増します。研究者も構造、機能、遺伝学、生化学、電気生理、計測、個体、生態学、合成生物学、そして私たちのようなシステム解析など、非常に良いバランスの研究者で領域全体が構成されており、この分野の魅力と奥深さを実感しています。お互いの研究の立場を尊重しながら、幅広い視点からの充実した議論が行われていると思います。

総括班の運営に関する議論では、領域の研究が発展するのはもちろんのこと、若い研究者の育成に関する視点からの運営方針に関する議論が多くあります。領域会議を中心に若い研究者がこの分野の次世代を背負っていこうという情熱を持てるようなきっかけが、たくさん生まれる場であってほしいということから、国際支援、光合成道場、若手会などの方針が決まっています。若い研究者たちは大いにこれらの機会を利用され、世界トップの研究者と交流し、また、この分野で他の研究者にない独自の世界を構築していただきたいと思います。

来年度はまた、最終評価に向けて、ということが議論のひとつになるでしょう。3年間の経験を経てお互いを知り、そして、自由闊達に意見・情報を交換し研究を行えるのは今年だろうと思います。新たに参画された公募班の方はまだ始まったばかりとお感じのことと思いますが、この一年が計画班、公募班にとって充実した一年となるようにと祈念します。12月には岡山で本年度2回目の領域会議があります。

令和はどのような科学の時代になるのでしょうか。どのような光合成の新発見があるのでしょうか。光でさえ帰ってこれない事象の地平をブラックホールの影として目に見える形で提示される時代です。光合成の新しい顔が見ることのできる時代になるはずです。

清水 浩

## 公募研究班 新参画 研究紹介

泉 正範

プロトン駆動力の破綻シグナルと光合成調節におけるその役割の解明

丸山 真一郎

プロトン駆動力生成を支える集光アンテナ複合体の始原的機能とその多様化

河合 寿子 (久保田寿子)

プロトン勾配の消費と生成のバランスをとる光化学系 I - アンテナ複合体の構造基盤解明

川合 真紀

葉緑体 NADP 供給とプロトン駆動力のバランス制御機構の解明

高橋 拓子

プロトン駆動力制御機構の解明と光合成機能増加型植物の作出に向けて

寺島 一郎

光合成チラコイド膜反応における遠赤光の役割

増田 真二

酸素発生型光合成生物に保存された新規プロトン濃度最適化機構の解明

田中 寛

光合成明反応系を守るシアノバクテリア 2 成分制御系ネットワーク

加藤 祐樹

光化学系 I I におけるプロトン駆動力がもたらす電子伝達制御機構の解析

宮下 英明

微細藻類の遠赤色光順化におけるプロトン駆動力維持機構とその多様性に関する研究

大岡 宏造

タイプ 1 光合成生物のシトクロム複合体と反応中心の始原型共役反応機構

長尾 遼

赤色進化系統におけるプロトン駆動力により制御される光捕集適応機構の解明

山崎 朋人

光合成能力の最適化を制御する m i R N A の動態解明

後藤 栄治

光合成依存の葉緑体運動の分子機構解明

松下 智直

フィトクロムシグナルによる葉緑体タンパク質の細胞内局在変化を介した光合成制御

椎名 隆

葉緑体による新しい気孔制御メカニズム

野口 航

落葉樹林下の常緑草本のストレス環境下での光合成電子伝達系の維持システムの解析

桶川 友季

m 型チオレドキシニンによる光化学系 I サイクリック電子伝達の制御機構解明

浅井 智広

ホモダイマー光合成反応中心における pH 依存的な電子移動反応の同定

山本 大輔

プロトン駆動力制御に伴う光合成タンパク質構造動態変化の高速 A F M による解析

森垣 憲一

パターン化人工膜を用いた光合成分子機構の再構成と機能解析

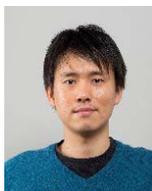
須藤 雄気

ロドプシンによる葉緑体プロトン勾配制御システムの確立と植物応答解析への展開

松村 浩由

C 4 光合成を調節する新規分子の動的構造機能解析

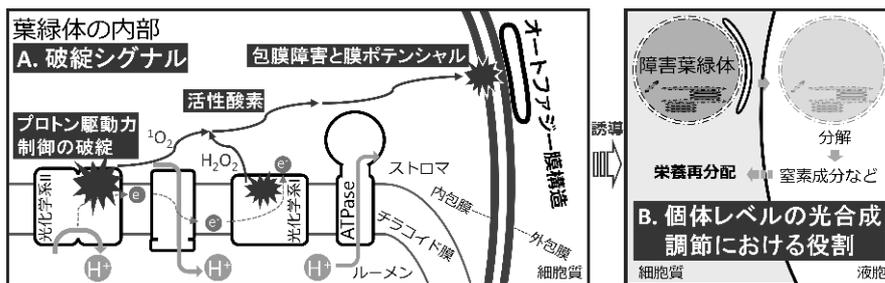
## 公募研究班（第二期：令和1-2年度）



### プロトン駆動力の破綻シグナルと光合成調節におけるその役割の解明

研究代表者：泉 正範（理化学研究所・環境資源科学研究センター）

< LAB HP: <http://molecular-bioregulation.riken.jp/index.html> >



葉緑体は、使う光と捨てる光の量を調節するプロトン駆動力制御により、過剰な光による強いダメージを防いでいます。

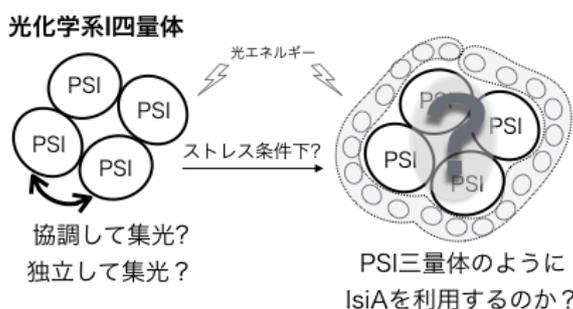
一方私たちは、強いダメージが起きてしまった葉緑体を、細胞内分解系オートファジーが除去する「クロロファジー」という現象を発見してきました。ゆえにそこには、プロトン駆動力制御で守り切れない葉緑体を選び取って除去するためのシグナル系（図A）があるはずであり、その解明を本研究では目指します。さらに「壊れた葉緑体を除去する」ことが、植物が成長するためにどのように重要なのか（図B）を検証します。



### プロトン勾配の消費と生成のバランスをとる光化学系 I-アンテナ複合体の構造基盤解明

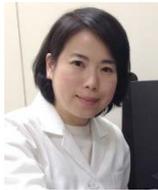
研究代表者：河合（久保田） 寿子（山形大学・理学部）

< LAB HP: <https://www.tamuralab.com/home-2> >



私はシアノバクテリアの一種、Anabaena が持つ光化学系 I 四量体に着目し、その構造解析を通して光化学系 I 四量体の集光メカニズムを明らかにすることを目指します。①光化学系 I 三量体は各プロトマーが協調して集光することが報告されています。本研究では光化学系 I 四量体の構造解析を通し、各プロトマーが協調して集光を行うか、独立して集光を行うかについて明らかにします。②光化学系 I 四量体と IsiA の相互作用を生化学的に検証し、複合体形成が示されれば、その構造解析を通して IsiA から光化学系 I 四量体への光エネルギー伝達経路を明らかにします。

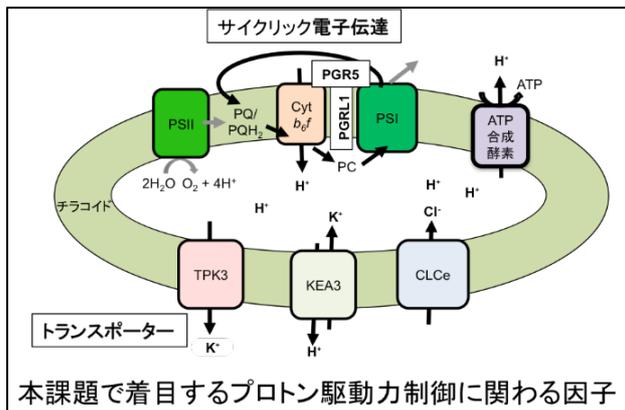
私はシアノバクテリアの一種、Anabaena が持つ光化学系 I 四量体に着目し、その構造解析を通して光化学系 I 四量体の集光メカニズムを明らかにすることを目指します。①光化学系 I 三量体は各プロトマーが協調して集光することが報告されています。本研究では光化学系 I 四量体の構造解析を通し、各プロトマーが協調して集光を行うか、独立して集光を行うかについて明らかにします。②光化学系 I 四量体と IsiA の相互作用を生化学的に検証し、複合体形成が示されれば、その構造解析を通して IsiA から光化学系 I 四量体への光エネルギー伝達経路を明らかにします。



## プロトン駆動力制御機構の解明と光合成機能増加型植物の作出に向けて

研究代表者：高橋 拓子（埼玉大学大学院・理工学研究科・分子生物）

<LAB HP: <http://park.saitama-u.ac.jp/~kankyo/nishiyama/takahasi.html>>



私たちは、プロトン駆動力制御機構の解明を目指して、シロイヌナズナにおけるプロトン駆動力形成に影響を与える変異の探索を行います。特に、①一過的発現解析を用いて、サイクリック電子伝達遺伝子の抑制型シス配列を同定し、内在性プロモーター改変による遺伝子発現の増加を目指します。（研究協力：池田美穂博士（埼玉大学））

②栗栖班と連携したタンパク質構造予測を元に、改変型チラコイド膜トランスポーターを無細胞翻訳系により作製し、魚住班と連携して輸送活性を評価します。（研究協力：戸澤譲博士（埼玉大学））③上記の解析によって明らかにしたプロトン駆動力形成に関わる変異を植物へ導入し、プロトン駆動力形成と光合成活性について解析を行います。将来的には、光合成活性の増加をもたらす変異をゲノム編集により植物へ導入し、光合成機能増加型植物の作出を目指します。



## 微細藻類の遠赤色光順化におけるプロトン駆動力維持機構とその多様性に関する研究

研究代表者：宮下 英明（京都大学・大学院人間・環境学研究科）

<LAB HP: [https://www.h.kyoto-u.ac.jp/academic\\_f/faculty\\_f/322\\_miyashita\\_h\\_0/](https://www.h.kyoto-u.ac.jp/academic_f/faculty_f/322_miyashita_h_0/)>



一部の微細藻類は、波長 700–750nm 付近の遠赤色光のみの光環境下においてもプロトン駆動力を維持し生育・生残できる。本研究では、それら藻類の遠赤色光順化における光エネルギー変換機能の最適化戦略とその多様性を明らかにすることを目指します。具体的には、計画研究班と連携し、遠赤色光順化前後の色素組成、酸素発生活性、アンテナ色素の光吸収波長とエネルギー移動経路、光化学系 I/II 量比、リニア

およびサイクリック電子伝達の寄与割合などの変化を解き明かし、遠赤色光下におけるプロトン駆動力の維持機構とその多様性を明らかにします。



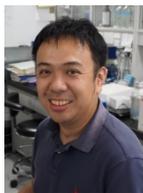
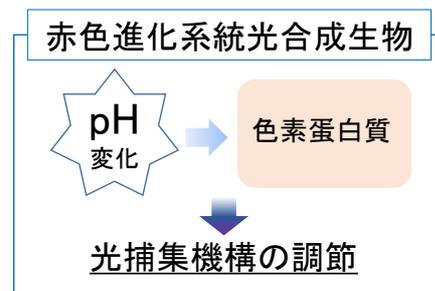
## 赤色進化系統におけるプロトン駆動力により制御される光捕集適応機構の解明

研究代表者：長尾 遼（岡山大学・異分野基礎科学研究所）

< LAB HP: <https://sites.google.com/site/ryonagaohome/> >

赤色進化系統光合成生物の代表といえる珪藻の光エネルギー捕集機構の解明を目指します。珪藻は植物や緑藻と異なる光捕集系を持つため、光捕集戦略の違いが予想されています。実際にこれまでの研究から、珪藻独自の光エネルギー伝達および消光機構が見えてきました。本研究は、プロトン濃度の変化が光エネルギー捕集機構にどのような影響を及ぼすか、

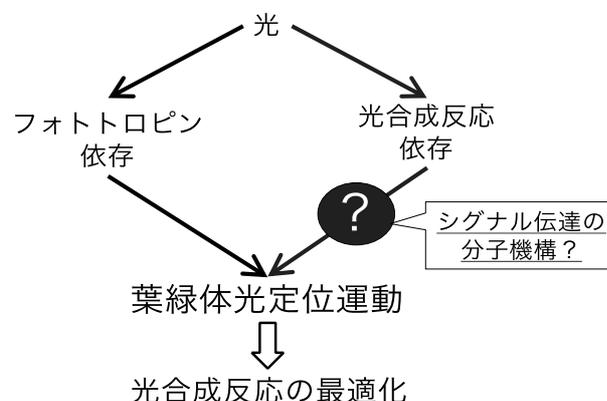
単離・精製された色素タンパク質を用いて解析します。赤色進化系統光合成生物が持つプロトン濃度変化に応じた光捕集系調節メカニズムを明らかにします。



## 光合成依存の葉緑体運動の分子機構解明

研究代表者：後藤 栄治（九州大学・大学院農学研究院）

光合成の場である葉緑体は、周囲の光環境に応じて細胞内の局在を変えます（葉緑体光定位運動）。葉緑体光定位運動は、青色光受容体であるフォトトロピン依存的に誘導されるだけでなく、フォトトロピン依存的な反応とは独立に、光合成反応依存的にも誘導されることを私たちは見出しました。そこで本研究では、生化学的手法および順遺伝学的手法を駆使して、光合成反応によるシグナル発信から葉緑体運動に至るまでのシグナル伝達に参与する因子を同定することで、光合成反応依存の葉緑体運動の分子機構解明を目指します。



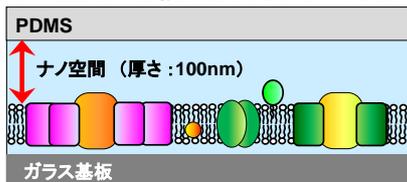


## パターン化人工膜を用いた光合成分子機構の再構成と機能解析

研究代表者：森垣 憲一（神戸大学・バイオシグナル総合研究センター）

<LAB HP: <http://www2.kobe-u.ac.jp/~morigaki/>>

### ナノ空間に再構成されたチラコイド膜



**光合成分子機構を分子レベル  
で定量的に評価できる手法論**

私たちは、チラコイド膜をガラス基板表面に再構成し、光合成関連タンパク質群の 2 次元分布が光合成電子伝達とプロトン濃度勾配形成に与える影響を解析する技術を開発します。再構成系において光合成関連分子の動的分布、機能を定量的に解析することで、これまでブラックボックスであった光合成分子機構を詳細に解析する手法論を実現し、チラコイド膜タンパク質群の分布がプロトン濃度勾配や光合成機能にどのような影響を与

えるか、空間情報とともに定量解析することを目指します。

連携研究者：高木 大輔（東北大学・東北大学大学院農学研究科）

連携研究者：秋本 誠志（神戸大学・分子フォトサイエンス研究センター）

## Journal Highlights

### **Amino acid excretion from *Euglena gracilis* cells in dark and anaerobic conditions**

Yuko Tomita, Masahiro Takeya, Kengo Suzuki, Nobuko Nitta, Chieko Higuchi, Yuka Marukawa-Hashimoto, Takashi Osanai  
*Algal Research* **37**, 169-177 (2019)

*Euglena gracilis* is a unicellular, eukaryotic alga, and is commercially used for production of food, medication, cosmetics, and dietary supplements. The algal cells are known to produce wax ester and succinate under dark and anaerobic conditions. In our study, we analysed a range of metabolites, and observed the excretion of various amino acids by *E. gracilis* cells. Arginine, alanine, leucine, lysine, and valine were excreted in amounts exceeding 30 mg/L into the culture medium upon anaerobic incubation for three days. Furthermore, an increase in the concentration of  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  affected the production of amino acids differently: those amino acids synthesized from glycolysis metabolites decreased, whereas those synthesized from tricarboxylic acid cycle metabolites increased with an increase in  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . Glutamate excretion was uniquely regulated by  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  concentration. Moreover, we found that the production of glutamate was regulated by the pH of the culture medium, but not by nitrogen, phosphate, and salt concentrations. These results demonstrate the ability of *E. gracilis* to synthesize various amino acids under dark and anaerobic conditions, and contribute valuable information for the commercial and scientific applications of fermentation of eukaryotic algae.

プレスリリース・要旨 (明治大学・2018年12月10日)

#### ユーグレナの光合成を活用したアミノ酸生産の可能性を示唆

##### 明治大学大学院農学研究科環境バイオテクノロジー研究室 およびユーグレナ社の研究成果

明治大学農学部・小山内崇准教授およびユーグレナ社からは発酵条件（暗・嫌気条件注1）で培養したユーグレナが、細胞外に様々なアミノ酸を放出することを発見しました。特にグルタミン酸に関しては、発酵条件の pH が生産量に大きく影響を与えることを明らかにしました。

アミノ酸はタンパク質を構成する代謝産物として知られており、他にも細胞内の代謝や環境応答に重要な役割を担います。工業的には、薬理機能を利用した薬品への利用をはじめ、呈味（ていみ）成分として食品添加物や、飼料の栄養補助などと幅広い分野で活用が期待されています。特にグルタミン酸は、最も市場規模の大きなアミノ酸の一つで、年間 330 万トンが発酵法によって生産されています。アミノ酸の主な工業生産方法は発酵法であり、主に使用される生産株は、コリネバクテリウムや、大腸菌、酵母などの生育に糖などの炭素源を必要とする従属栄養生物です。しかし、これらの生物による発酵法では、生産時に使う糖源のコストの割合が大きいため、糖の代替となる炭素源が望まれています。

本研究で使用したユーグレナは、植物と同じように光合成によって増殖します。また、増殖時には温室効果ガスの一つである  $\text{CO}_2$  を光合成によって吸収するため、ユーグレナをはじめとする微細藻類を使用した物質生産は環境負荷の低減につながると考えられています。

本研究グループでは、光合成によって増殖させたユーグレナを、発酵条件（暗・嫌気条件）下に移行した際に、細胞外にアミノ酸を放出することを発見しました。アミノ酸の生産量は、発酵時に培地の成分であるリン酸水素アンモニウムの濃度を変化させることで変化しました。アミノ酸のうち、グルタミン酸に関しては、発酵条件での pH によって生産量が制御されていることが分かりました。このように本研究では、ユーグレナの光合成を基盤としたアミノ酸の生産技術を開発しました。今後、光合成生物を利用した物質生産が発展することで、環境問題の一つである温室効果ガス削減に寄与できるなど、持続可能な循環型社会への推進が期待できます。

注1) 発酵条件 (暗・嫌気条件)

密閉により、酸素濃度をできるだけ低くした培養条件。ユーグレナなどの光合成を行う生物は、光が存在すると光合成により酸素を発生させてしまうため、暗条件下にすることで嫌気状態を保っている。

## Algal photoprotection is regulated by the E3 ligase CUL4–DDB1<sup>DET1</sup>

Yusuke Aihara, Konomi Fujimura-Kamada, Tomohito Yamasaki, and Jun Minagawa

*Nature Plants* 5, 34-40 (2019) doi: 10.1038/s41477-018-0332-5

Light is essential for photosynthesis, but the amounts of light that exceed an organism's assimilation capacity can cause serious damage. Photosynthetic organisms minimize such potential harm through protection mechanisms collectively referred to as non-photochemical quenching. One mechanism of non-photochemical quenching called energy-dependent quenching (qE quenching) is readily activated under high-light conditions and dissipates excess energy as heat. LIGHT-HARVESTING COMPLEX STRESS-RELATED PROTEINS 1 and 3 (LHCSR1 and LHCSR3) have been proposed to mediate qE quenching in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* when grown under high-light conditions. LHCSR3 induction requires a blue-light photoreceptor, PHOTOTROPIN (PHOT), although the signal transduction pathway between PHOT and LHCSR3 is not yet clear. Here, we identify two phot suppressor loci involved in qE quenching: de-etiolated 1 (det1) and damaged DNA-binding 1 (ddb1). Using a yeast two-hybrid analysis and an inhibitor assay, we determined that these two genetic elements are part of a protein complex containing CULLIN 4 (CUL4). These findings suggest a photoprotective role for the putative E3 ubiquitin ligase CUL4-DDB1<sup>DET1</sup> in unicellular photosynthetic organisms that may mediate blue-light signals to LHCSR1 and LHCSR3 gene expression.

プレスリリース・抜粋 (基礎生物学研究所・2019年1月1日)

### 藻類が強すぎる光から身を守るしくみをあきらかに

#### ～その根幹部分はヒトにもある?～

植物や藻類は、光のエネルギーを利用して二酸化炭素を固定し糖を合成します (光合成)。そのため、強い光のある環境の方が好ましい環境であると思われがちですが、多くの場合地表に届く光は光合成装置の限度を超えており、直射日光にさらされた植物は常に光合成装置破壊の危険と隣合わせです。この危険を避けるため、植物や藻類は強い光を浴びたときに、そのエネルギーから身を守るしくみである qE クエンチング (\*1) を発達させて安全に光合成を行っています。今回、研究グループが qE クエンチングを引き起こすシグナル経路を藻類を使って詳しく調べたところ、その根幹部分が CUL4-DDB1<sup>DET1</sup> と呼ばれる E3 ユビキチンリガーゼ (\*2) であることが明らかになりました。この E3 ユビキチンリガーゼは植物から動物まで広く存在していました。

\*1 qE クエンチング: クエンチング (q) とは一般に (火などが) “消える”、(乾きを) “癒やす” などの意味で使われるが、光合成反応においては、光エネルギーを吸収して興奮状態になったクロロフィルが鎮まることを意味する。その際の分子機構の違いにより、qE クエンチング、qT クエンチング、qM クエンチングなどが知られている。qE クエンチングは、光合成装置に電子が流れ葉緑体にエネルギー (E) が与えられたときに生じるフィードバック型のクエンチングのこと。NPQ (ノン・フォトケミカル・クエンチング; 光化学反応によらないエネルギー消去反応) とも呼ばれる。

\*2 E3 ユビキチンリガーゼ: ユビキチン転移酵素。ユビキチンとはあらゆる真核生物に存在する小さなタンパク質。E3 ユビキチンリガーゼはユビキチンを特定の標的タンパク質に付加する働きを持つ。数百種類あると言われ、それぞれ標的タンパク質が異なる。”ユビキチン化”を受けた標的タンパク質は、分解を受けたり活性変化したりしてその機能が制御される。

## Citrate synthase from *Synechocystis* is a distinct class of bacterial citrate synthase

Shoki Ito, Naoto Koyama, Takashi Osanai

*Scientific Reports* **9**, Article number: 6038 (2019) doi: 10.1038/s41598-019-42659-z

Citrate synthase (CS, EC 2.3.3.1) catalyses the initial reaction of the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Although CSs from heterotrophic bacteria have been extensively studied, cyanobacterial CSs are not well-understood. Cyanobacteria can produce various metabolites from carbon dioxide. *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis* 6803) is a cyanobacterium used to synthesize metabolites through metabolic engineering techniques. The production of acetyl-CoA-derived metabolites in *Synechocystis* 6803 has been widely examined. However, the biochemical mechanisms of reactions involving acetyl-CoA in *Synechocystis* 6803 are poorly understood. We characterised the CS from *Synechocystis* 6803 (SyCS) and compared its characteristics with other bacterial CSs. SyCS catalysed only the generation of citrate, and did not catalyse the cleavage of citrate. It is suggested that SyCS is not related to the reductive TCA cycle. The substrate affinity and turnover number of SyCS were lower than those of CSs from heterotrophic bacteria. SyCS was activated by MgCl<sub>2</sub> and CaCl<sub>2</sub>, which inhibit various bacterial CSs. SyCS was not inhibited by ATP and NADH; which are typical feedback inhibitors of other bacterial CSs. SyCS was inhibited by phosphoenolpyruvate and activated by ADP, which has not been reported for CSs from heterotrophic bacteria. Thus, SyCS showed unique characteristics, particularly its sensitivity to effectors.

プレスリリース・要旨 (明治大学・2019年4月15日)

～低炭素社会実現の“カギ”はラン藻に～

明治大学農学部環境バイオテクノロジー研究室がモデルラン藻が持つ  
酸素呼吸の鍵酵素が型破りな活性調節を受けることを明らかにしました

酸素発生型の光合成を行うラン藻という細菌は、固定した二酸化炭素から様々な有用物質を生産することができます。シネコシスティス<sup>注1)</sup>というラン藻は、遺伝子改変が容易で、凍結保存が可能であるなどの利点から、基礎・応用の両分野において、世界中で研究されています。特に、遺伝子研究や物質生産に関する研究は盛んに行われていますが、代謝のしくみに関する基礎研究は、まだまだ発展途上です。

クエン酸回路という代謝経路は、生育に必要な不可欠なエネルギーを生み出す酸素呼吸の主要な経路です。クエン酸回路は、いくつもの反応とそれを担う酵素で成り立っています。中でもボトルネックとなっている反応を担う酵素が、クエン酸シンターゼ (CS) です。CSの基質となる代謝産物は、様々な有用物質の元となる化合物です。今回、私たちは、シネコシスティスのCS (SyCS) を精製し、生化学的性質を調べました。

その結果、SyCSは、これまで報告されてきた細菌のCSとは異なるいくつかの性質を有することが分かりました。SyCSは、他の細菌よりも活性が著しく低いことが分かりました。SyCSは、一般的な細菌のCSの阻害剤である塩化マグネシウムと塩化カルシウムで活性化されました。また、SyCSは、他の細菌のCSとは異なり、代謝産物であるADPによって活性化され、ホスホエノールピルビン酸によって阻害されることが分かりました。このように、本研究では、酸素呼吸に重要なCSという酵素のこれまで報告されていないタイプを発見しました。

## Multicolor redox sensor proteins can visualize redox changes in various compartments of the living cell.

Kazunori Sugiura, Hideaki Tanaka, Genji Kurisu, Ken-ichi Wakabayashi, Toru Hisabori  
*Biochim Biophys Acta Gen Subj.* **1863**, 1098-1107(2019)

doi: 10.1016/j.bbagen.2019.01.016.

Change in the intracellular redox state is a consequence of various metabolic reactions, which simultaneously regulates various physiological phenomena in cells. Monitoring the redox state in living cells is thus very important for understanding cellular physiology. Various genetically encoded fluorescent redox sensors have therefore been developed. Recently, we developed oxidation-sensitive fluorescent proteins named Oba-Q (Sugiura, K., et al. (2015) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 457, 242-248), which exhibit dramatic quenching under oxidizing conditions. To extend the range of uses of redox sensor proteins, we refined these proteins based on the molecular architecture applied to Oba-Q, and successfully produced several redox sensor proteins based on CFP and YFP. Interestingly, some of these sensor proteins showed the reverse changes in emission compared with Oba-Q, implying remarkable fluorescence quenching under reducing conditions. We named this type of sensor protein Re-Q, reduction-sensed quenching protein. The cause of the redox-dependent fluorescence quenching could be clearly explained based on the crystal structure of Re-Q in the reduced and oxidized forms. In addition, by introducing suitable mutations into the sensors, we produced Oba-Q and Re-Q mutants exhibiting various midpoint redox potentials. This series of proteins can cover a wide range of redox potentials in the cell, so they should be applicable to various cells and even intracellular organelles. As an example, we successfully measured the redox responses in different cell compartments of cultured mammalian cells simultaneously against the anticancer reagents Kp372-1.

### 要約

細胞内における酸化還元状態の変化は酵素活性の制御や活性酸素種(ROS)の除去等、非常に重要なシグナルとなっていることが知られている。したがって細胞内の酸化還元状態の可視化は生命の恒常性維持機構を理解する上で極めて有用であると考えられており、蛍光タンパク質を基にした酸化還元応答タンパク質センサーの開発が行われてきた。しかし酸化還元反応は複数の細胞小器官にまたがって起こる場合が多く、酸化還元電位の異なる複数色のタンパク質センサーが必要となる為、新規の酸化還元応答蛍光タンパク質センサーの開発が継続されている。久堀グループではシアン蛍光タンパク質 CFP を基に、酸化されることで消光する新規蛍光タンパク質センサー Oba-Q を開発し報告してきた (Sugiura, K., et al. (2015) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 457, 242-248)。今回、様々な変異を導入し様々な酸化還元電位を持った改変体センサーの作成に成功するとともに、Oba-Q とは逆に還元されることで消光する新規蛍光タンパク質センサー Re-Q を開発することにも成功した。Re-Q の蛍光と消光のメカニズムについては、酸化型と還元模倣型の Re-Q の結晶構造解析を比較することで、Re-Q が酸化条件下で還元条件下よりも 10 倍強い蛍光強度で発光するメカニズムを明らかにした。更に、実際の動物細胞で酸化還元状態をモニターする実験も行い、抗癌剤 Kp372-1 に対する酸化還元応答を観測することにも成功した。

## Increased polyhydroxybutyrate levels by *ntcA* overexpression in *Synechocystis* sp. PCC 6803

Satomi Arisaka, Nodoka Terahara, Akira Oikawa, Takashi Osanai

*Algal Research* **41**, August 2019, 101565

*Synechocystis* sp. PCC 6803, a unicellular cyanobacterial species, changes intracellular nitrogen and carbon metabolism through the transcription factor NtcA in response to nitrogen deficiency. In this study, the change in metabolites in carbon storages and the related metabolites after nitrogen depletion was analysed using *ntcA*-overexpressing strain. Levels of polyhydroxybutyrate (PHB), a biodegradable polyester, increased in the *ntcA*-overexpressing strain after nitrogen depletion. Capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) analysis revealed that the levels of fumarate and malate increased and phosphoenolpyruvate, isocitrate, 2-oxoglutarate, succinate, phosphorylated monosaccharides and dihydroxyacetone phosphate decreased by *ntcA* overexpression. Respiratory activity decreased by *ntcA* overexpression, possibly resulted from the alteration of carbon metabolism and perturbation of redox balance. These results have revealed that NtcA is involved in the re-distribution of intracellular carbon sources to PHB and organic acids in the tricarboxylic acid cycle in this cyanobacterium.

プレスリリース・要旨 (明治大学・2019年6月6日)

～モデルラン藻のバイオプラスチック量を増やす遺伝子を発見～

明治大学農学部環境バイオテクノロジー研究室が

転写因子を利用してラン藻の炭素の流れを改変しました

ラン藻は、光合成をするバクテリアです。光合成をすることで光エネルギーを利用して二酸化炭素を取り込むことができます。ラン藻の光合成や代謝を研究することで、光合成生物の理解が進むだけでなく、二酸化炭素を利用したバイオテクノロジーの発展が期待できます。シネコスティス注1) というラン藻は、増殖が速く、遺伝子改変が可能なことから、基礎研究と応用研究の両方に使われています。

光合成で取り込まれた二酸化炭素は細胞内で様々な物質に変換されますが、シネコスティスは窒素が欠乏するとポリヒドロキシ酪酸 (PHB) という物質を細胞内に蓄積することが知られています。PHB は、生分解性のポリエステルであり、硬質系のプラスチックであることが知られています。

今回研究グループは、シネコスティスの PHB 量を増加させる新しい遺伝子を発見しました。この遺伝子は *ntcA* といい、転写因子というタンパク質をコードしています。この NtcA タンパク質を細胞内で増やしたところ、PHB 量が 2～3 倍に増加することが明らかになりました。

また、この遺伝子改変では、TCA 回路 (クエン酸回路) や光合成、呼吸の活性も変化することがわかりました。すなわち、今回の遺伝子改変では、PHB の量が増加するだけでなく、電子の流れも変化することもわかり、新しい形で炭素の流れを変化させることが明らかになりました。

注1) シネコスティス

世界的に研究されている単細胞性のラン藻で淡水性である。微細藻類の中で増殖が速く、海水でも培養が可能である。全生物の中で、3番目に全ゲノムが決定され、遺伝子改変が可能なことや、凍結保存が可能といった研究上の利点がある。

## Reports

### ・産業界との接点や応用展開について模索するための勉強会

報告者: 早稲田大学院先進理工学研究科 園池研究室 D3 三角将洋

会場: 東京工業大学 田町キャンパス

日時: 2019年3月4日(月) 13:20~16:20

東京工業大学の田町キャンパスにて、産業界との接点や応用展開について模索するための勉強会が開催されました。産業界からは、自社での応用、開発研究において現在抱えている問題を示すことで、新学術領域研究の光合成研究者と共に、研究の発展の糸口について模索していき、また大学の研究者からは、自身のアカデミックな研究において、応用の可能性があるのか、もしくはどのような研究が産業界からニーズがあるのかを模索していく勉強会でした。

産業界からの研究発表は、自社の研究の進捗を示すことになるなど、デメリットな部分も大きく、外部の人間が触れられる機会はなかなかありません。その中での DIC 株式会社の太郎田先生と明治大学の伊藤先生の発表は、学生研究者の私にとって、非常に勉強になるものでした。DIC 株式会社の太郎田先生の発表は微細藻類の大量培養に関するものでしたが、特に私自身が藻類を扱っているということもあって、実験室内での小さな試験管で無菌で育てる場合と、商業ベースでの大量培養の難易度の違いには考えさせられました。ある意味、屋外で大量培養する場合は、自然環境により近い環境であるため、学術的な観点からも屋外培養の研究は面白味がありそうだと思います。また明治大学の伊藤先生は果菜の多収量化についてでしたが、特に日本の農家は量より味を重視する傾向があり、面積当たりの収量では農業先進国のオランダに大きく差をつけられているという現状を初めて知りました。しかし、島国である日本と地続きでドイツ、フランスという巨大な消費地が存在するオランダとでは、求められている方向性に違いがあり、むしろ多くの農家が保存のしにくい果菜の多収量化に成功した場合、豊作貧乏となって共倒れする可能性があると考えられ、味より多収量化を目指していく姿勢についてはもう少し詳細を知りたいと思いました。

基本的に今までの産学連携は、大学の研究者が学会等で発表し、その内容に興味を持った企業が接触するという流れで始まる一方で、企業でどのような研究が進んでいるのかは把握しにくいいため、大学の研究者が企業での研究に大きく関係する、興

味深い現象を発見していたとしても、大学側からの接触は難しいという現状があります。確かに、企業による実際のデータも交えた研究発表の場は、特許などの関係上、実現しにくい部分もありますが、自分の研究や知識が、産業にどう活かせるのかを考えることができた刺激的な時間でしたので、今後このような機会が増えていければと思います。



### 勉強会のプログラム

13:20-13:30 皆川 先生(基生研) 領域代表挨拶

13:30-14:20 太郎田 博之 先生 (DIC 株式会社)「藻類産業利用の立場から、  
光合成に関して知りたいこと」

14:20-15:10 伊藤 善一 先生 (明治大学)「施設園芸と植物工場における野菜生産  
と栽培現場での収量向上のための光合成に対する取り組み」

15:10-15:20 休憩

15:20-16:20 総合討論(座長:大阪大学 清水先生)



太郎田 博之 先生によるご講演



伊藤 善一 先生によるご講演

## ・第 60 回日本植物生理学会年会シンポジウム

Find out the mechanism supporting C<sub>4</sub> photosynthesis

「C<sub>4</sub> 光合成を支える仕組みを解く」

報告者: 関西学院大学工学部 宗景 ゆり

会場: 名古屋大学 東山キャンパス

日時: 2019年3月14日(木)9:00~11:40

第 60 回日本植物生理学会年会において国際シンポジウムとして“Find out the mechanism supporting C<sub>4</sub> photosynthesis”を開催しました。本シンポジウムでは、C<sub>4</sub> 光合成を支えるシステムを多面的に議論するために、3名の研究者を海外から招聘しました。C<sub>4</sub> 光合成は熱帯や温帯の草原に生息する被子植物において複数の系統で独立に獲得された、いわゆる収斂進化の形質の一つであり、その生産性の高さからも応用研究が期待されています。葉肉細胞と維管束鞘細胞を分業化させた二細胞で C<sub>4</sub> 光合成を行う植物が大多数を占めますが、一細胞で C<sub>4</sub> 光合成を行う種も同定されています。このシンポジウムでは細胞分業による CO<sub>2</sub> 濃縮システムと、一細胞での葉緑体分業による CO<sub>2</sub> 濃縮システムの双方について興味深い話を聞くことができました。

C<sub>4</sub> 光合成を支えるシステムは、細胞内構造や葉緑体の配置、細胞特異的な遺伝子発現制御システム、葉緑体の電子伝達及び代謝制御システムなど、多岐にわたっています。このような様々な研究分野を通して C<sub>4</sub> の形質を議論する良い機会となりました。約 100 名程度の参加者がおり、会場から多くの質問があり活発な議論が交わられました。



プログラム  
シンポジウム07

Organizers: Yuri Munekage (Kwansei Gakuin Univ.)

Tsuyoshi Furumoto (Ryukoku Univ.)

- 9:00 Opening remarks Yuri Munekage
- 9:05 Evolutionary assembly of C<sub>4</sub> leaf structure  
Tammy Sage (Department of Ecology & Evolutionary Biology, University of Toronto)
- 9:30 Organelle positioning in C<sub>4</sub> photosynthetic cells  
Mitsutaka Taniguchi<sup>1</sup>, Takao Oi<sup>1</sup>, Koji Yamane<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Bioagricul. Sci., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Facul. Agricul., Kindai Univ.)
- 9:55 Electron transport and energy production in chloroplasts of NADP–ME type C<sub>4</sub> plants  
Yuri Munekage, Takako Ogawa, Yukimi Taniguchi (Sch Sci Tech, Kwansei Gakuin Univ.)
- 10:20 Optimum integration of C<sub>4</sub> cycle into Calvin–Benson cycle  
Tsuyoshi Furumoto (Faculty of Agriculture, Ryukoku University)
- 10:45 The molecular evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis  
Julian Hibberd (Department of Plant Sciences, University of Cambridge)
- 11:10 Mechanisms regulating differentiation and positioning of the two chloroplast types in single–cell C<sub>4</sub> species  
Sascha Offermann<sup>1</sup>, Philipp Bohnhorst<sup>1</sup>, Diana Wimmer<sup>1</sup>, Inhwan Hwang<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Leibniz University Hannover, Institute of Botany, <sup>2</sup>Pohang University of Science and Technology)
- 11:35 Closing remarks Tsuyoshi Furumoto

## ・ワークショップ「緑藻クラミドモナスの CRISPR-Cas9」(岡大)

報告者:岡山大学・異分野基礎研 小澤真一郎

会場:岡山大学

日時:2019年4月15日(月) ~16日(火)

国際支援班の取り組みの一つとして海外からの演者を招き技術交流を図った。緑藻クラミドモナスの核遺伝子を部位特異的に改変する技術はこれまで多くの研究グループによる試みがなされてきたが、いずれも一般的に応用できる技術ではなかった。そのなか 2017 年にドイツのベルリンフンボルト大学の Peter Hegemann グループが CRISPR-Cas9 による核遺伝子改変手法の確立を緑藻クラミドモナスで報告した。このグループは緑藻クラミドモナスの核遺伝子改変技術確立に挑戦し続けていた歴史があり多くのノウハウを蓄積している。そこで、Hegemann グループの Simon Kelterborn を講師としてお招きして緑藻クラミドモナスの核遺伝子を部位特異的に改変する CRISPR-Cas9 の技術についてワークショップを行った。ワークショップは岡山大学と京都大学の二会場で開催し、セミナー形式の技術説明を行ったが、ほとんどの時間を実習に充てるように計画した。岡山大学会場のワークショップでは若手や学生を中心に 10 人程度が参加する少数のグループだったため講師と参加者との距離が近く、実際に手を動かしながら細かい実験手技について深い議論と技術交流を行うことができた。関連する重要な実験項目を多く盛り込んだため時間内に計画を消化できるか多少の懸念があったが、入念な準備のおかげで効率的に日程を消化し濃密な時間を過ごすことができた。今後、本ワークショップ参加者から技術が全国へ広まり、緑藻クラミドモナスの核遺伝子を自在に改変し国内での光合成研究がさらに進展することを願います。

### プログラム

一日目	10:00-10:30	CRISPR-Cas9 についての簡単な説明
	10:30-18:00	実習。途中で昼食を挟む
	19:00-	懇親会
二日目	10:00-12:30	実習。昼食前に終了。



## ・ようこそゲノム編集 シモンさんとはじめるクラミドモナスの CRISPR/Cas9 ワークショップ・イン京都

報告者: 京都大学 大学院理学研究科 鹿内研究室 特定研究員 浜地 貴志  
会場: 京都大学 吉田キャンパス  
日時: 2019年4月19日(金)10:00 ~20日(土)14:00

「緑の酵母」クラミドモナスのゲノム編集の試みは長い歴史があった。「緑ではない」出芽酵母で日常的に行われてきた相同組換えを応用する試みに始まり、ジンクフィンガーヌクレアーゼや TALE ヌクレアーゼなど数多くの直接的遺伝子破壊操作が次々に考案され、期待され、試され、そしてそれらの効率のあまりの低さや煩雑さの前に、顧みられなくなったものもある。クラミドモナスの逆遺伝学の趨勢は、網羅的挿入変異体プロジェクト(CLiP)ライブラリーの登場で決定づけられたかに思われた。しかし、CLiP もまた開発の途上と言える。ここに登場したのが RNA 介在型ヌクレアーゼ CRISPR/Cas9 であった。

クラミドモナスの CRISPR 応用には、何報かの論文が公表された。しかし、クラミドモナス実験の「現場」の経験から最も実現性が高そうに思われたのが、2017 年に Plant Cell 誌に報告されたものであった。ドイツ・ベルリンのフンボルト大学にあるピーター・ヘーゲマン研究室で、アンドレ・グライナー博士とシモン・ケルターボーン氏らが開発したものである。今回、このチームからシモンさんをお迎えして、意見交換のうえ手技を直接披露していただける機会を得たことは、文字通りの僥倖であった。

桜の季節が過ぎて一週間、京都の街並みは緑に変わり、新たな光合成の季節を迎えていた。4月19・20日に京都大学生命科学研究科微生物細胞機構学分野の実験室をお借りして、クラミドモナスを実験材料とする3チーム・12人以上の研究者が、最先端の技術を習得しようと意気込んだ。今回のワークショップの資料として共有していただいたのは、2017年の論文からアップデートされたプロトコール(プレプリント。ブックチャプターとして近日出版予定)だった。

シモンさんの発表によれば、クラミドモナスでプロトコール通りにゲノム編集をすると、出てきたコロニーのだいたい10%でノックアウト株ができる。ただし、単に突然変異で遺伝子を破壊するだけでなく、遺伝子の狙った位置にペプチドタグなどの任意の配列を外来的に導入する「ノックイン」は未だ低頻度らしい。シモンさんもワークショップのあいだ、参加者の実験を見守り、作業の推移や数値をモレスキン手帳に記録して質問に答え、議論していた。

筆者(浜地)はワークショップ以前に自分でクラミドモナスのゲノム編集を試みてきたが、効率が極めて低かった。今回、ワークショップの中で「これがコツかな？」という箇所をいくつも見つけることができた。落とし穴に自分で勝手にはまりこんでいたのかもしれない。実際の手技を見ることと、フェイスツーフェイスで質問できたからこそその収穫だったといえるだろう。後日の PCR スクリーニングで、ワークショップの中で試みられた編集ターゲットの中には編集効率(野生株と明確に異なったシグナルを有する株の割合)が 60%を超えるものが存在したことには、シモンさんも驚きを隠せないようであった。クラミドモナスだけでなく CRISPR を利用したゲノム編集そのものがまだ揺籃期にあって日進月歩であり、ノックアウトの成功要因は未知だが、まずガイド RNA 配列の切断効率自体に影響されることが予想されるほか、10-30 塩基程度の相同配列(マイクロホモロジー)等の存在といった、切断サイト周辺の配列も影響する可能性がある。

実験台を離れても、1日目の懇親会や2日目の昼食会で、クラミドモナスだけでなく生物学を支える技術の未来や展望、社会的な影響にも話題がおよび、楽しい時間となった。

この機会が実現したのも新学術領域「新光合成」、オーガナイザーの高橋裕一郎先生と、京都ワークショップ担当の西村芳樹先生、場所を提供していただいた福澤秀哉先生のおかげです。ありがとうございます。今回のワークショップを通じて築いた技術的基盤によって皆様の研究のいっそうの進展に貢献していけることを願います。



## ・「新光合成」2019年度春期領域会議

報告者: 東北大学工学研究科 助教 解良 康太

会場: 北海道大学 学術交流会館

日時: 2019年6月1日(土)13:00 ~3日(月)14:30

新学術領域研究「新光合成」の新たな2年間の門出として、新学術領域研究5回目の会議が北海道大学の学術交流会館で開催されました。会期中は天候にも恵まれ、北海道大学の緑あふれるキャンパス内で非常に有意義な会議となりました。これまでの会議と同様に、各班が未発表のデータをもって参加し、クローズド形式で進行されました。計画班の発表に加え、公募班の方々、特に新たに加わった方々の発表もあり、今後の新たな展開、新しい共同研究についてなど、活発な議論が行われました。ポスターセッションは、偶数と奇数で1日目、2日目に分かれて開催されました。ポスターセッションに加え、休憩時間や朝の時間などを利用して、ポスター前で多くの方が積極的に議論、交流をされていました。新しく出たばかりのデータの解釈や仮説などについて忌憚なく議論が交わされていた様子はクローズド形式ならではのものです。私自身も様々なアドバイスをいただくことができ、非常に重要な経験となりました。懇親会会場では、昼間の会議中とは違った雰囲気の中、若手同士の交流が進み、領域全体として交友関係が深まっていたように感じました。社会・学術分野における光合成研究の貢献に向けて、更なる挑戦、研究の発展を決意する会議となりました。



### 2019年度春期領域会議のプログラム

6月1日(土): 代表挨拶 皆川先生、計画班2題、公募班8題、ポスターセッション

6月2日(日): 計画班4題、公募班10題、総括班会議、国際支援班説明、  
ポスターセッション

6月3日(月): 計画班2題、公募班4題、総括、代表挨拶 皆川先生

「新光合成」2019年度  
春期領域会議  
参加者の声♪

大阪大学蛋白質研究所 栗栖研究室 M1  
浜岡 紀之

今回の新学術領域会議に参加しポスター発表をいたしました。会場中はどこも光合成の話ばかりで、とても有意義で楽しい時間を過ごすことができました。私はタンパク質の構造解析に取り組んでいますが、同じタンパク質を別の手法で研究している方から話を聞くことができ、とてもよい経験になりました。また、先生方の発表には未発表のデータも多く、論文を読むだけでは分かりにくい実験に関する苦勞をうかがい知ることができました。最新の情報を得ることができただけでなく、様々な知見を持った方々から議論が生まれていく様子も勉強になりました。

## 今後の予定

2019年7月26日(金)

第4回「光合成道場」技術講習会  
「光合成タンパク質の翻訳後修飾:酸化還元制御の解析例」  
場所:東京工業大学すずかけ台キャンパス

2019年8月29日(木)～8月30日(金)

新光合成&光合成若手の会ジョイント若手ワークショップ  
場所:神戸市立神戸セミナーハウス

2019年9月18日(水)9:00～11:00

第92回 日本生化学会大会 シンポジウム (セッション No.:1S18m)  
タイトル:光合成と呼吸をプロトン駆動力の視点で理解する  
場所:パシフィコ横浜 第18会場(511+512)  
オーガナイザー:久堀 徹(東京工業大学)、魚住 信之(東北大学)

2019年10月1日(火)～10月3日(木)

日米二国間セミナー  
場所:京都・国際交流会館

2019年12月2日(月)～12月4日(水)

2019年度秋期領域会議  
場所:岡山国際交流センター(岡山駅前) <http://www.opief.or.jp/oicenter/>

## お願い

### ご投稿について

本ニュースレターは毎年2回発行予定です。掲載希望記事など、編集室の筒井 (m.tsutsui@protein.osaka-u.ac.jp) までメールをいただきたくお願いいたします。

第7号の原稿締め切りは、2019年12月10日とさせていただきます。

ご多用のところお手数をおかけしますが、ご投稿よろしくお願いいたします。

「新光合成：光エネルギー変換システムの再最適化」  
月刊ニュースレター



発行人 皆川 純  
編集人 栗栖源嗣

発行所 新学術領域「新光合成：光エネルギー変換  
システムの再最適化」領域事務局  
連絡先 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-2  
大阪大学蛋白質研究所蛋白質結晶学研究室  
TEL 06-6879-8605 FAX 06-6879-8606