

研究テーマ 「好気性光合成細菌が持つ光合成タンパク質超複合体の構造解析」

研究責任者 所属機関名 国立大学法人豊橋技術科学大学

官職又は役職 特任助教

氏名 河合 繁 メールアドレス kawai@chem.tut.ac.jp

共同研究者 所属機関名

官職又は役職

氏名

(令和6年度募集) 第37回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1,000字程度)

光合成細菌は、酸素を出さない光合成を行う細菌の総称である。光合成細菌と呼ばれるグループには、酸素がある条件（好気条件）で光合成する好気性光合成細菌（*Aerobic Anoxygenic Phototrophs*, 以降 AAP とする）と、酸素がない条件（嫌気条件）で育つ嫌気性光合成細菌の2種類が存在する。AAP は水圏環境に普遍的に存在する重要な細菌である。一方で、嫌気性光合成細菌を用いた研究はこれまで盛んに行われてきたが、AAP の研究はその光合成機構の詳細が十分に解明されていない。本研究では AAP が持つ光合成タンパク質超複合体の生化学・構造学的解析により、その光合成の仕組みを明らかにすることを目的とした。

本研究では、AAP の光合成タンパク質複合体の構造解明という研究目的を維持しつつ、研究開始直前に関連分野で類似成果が報告されたため、研究の新規性と独自性を確保する観点から、近年純粋培養株が報告された新規 AAP である *Vulcanimicrobium alpinus* を解析対象として選定し、以下の通り研究を実施した。

- ・ *V. alpinus* の大量培養系の検討
- ・ *V. alpinus* の細胞膜画分の調製方法の検討
- ・ *V. alpinus* の光合成タンパク質超複合体の可溶化条件の検討

光合成タンパク質複合体の解析には、細胞量の確保が必要である。一方で *V. alpinus* は細胞増殖が他の AAP に比べ遅く、最終到達濁度が低いことも大きな障壁となった。そこで、8Lスケールでの大量培養系を確立した。得られた培養細胞を用いて光合成タンパク質複合体が存在する細胞膜の調製条件の検討を行った。調製した細胞膜画分の吸収スペクトルの結果から、細胞膜画分には光合成タンパク質複合体に特異的な吸収ピークが確認できた。得られた画分について界面活性剤を用いて

光合成タンパク質複合体の可溶化・精製を試みたところ、可溶化を示す結果を得たが、細胞膜画分量の不足により高濃度の光合成タンパク質画分の精製には至らなかった。

以上に加え、*Vulcanimicrobiota* 門に分類される光合成細菌の環境中からの新規分離培養も同時並行で実施した。世界中の氷河環境には *Vulcanimicrobiota* 門細菌が分布していることが先行研究にて明らかになっていたため、氷河から採取されたサンプルを用いて分離培養を試みた。その結果、*V. alpinus* と類似した細胞の色を有する株の培養に成功した。現在はそれらの遺伝子解析を行い、*V. alpinus* との系統・比較解析を予定している。

本研究により、AAP 光合成タンパク質複合体の構造解析を進めるための培養・膜画分調製・可溶化条件に関する基盤的知見が得られ、今後、AAP に特有の光合成機構の解明が進むと期待される。また、新規分離株との比較により、*Vulcanimicrobiota* 門光合成細菌の進化的多様性の理解にもつながる。

2. 実施内容および成果の説明 (A 4で、5 ページ以内)

背景と目的

2022年に新しく分離培養された AAP である *Vulcanimicrobium alpinus* は、先行研究における光合成タンパク質の系統解析により始原的な系統に位置し、またそのアミノ酸配列は他の光合成細菌とは異なる特徴を有することが報告されている (Ward et al. 2019, Yabe et al. 2022). 本研究では、*V. alpinus* を用いて光合成タンパク質複合体の精製方法の検討およびその構造解析を目指した。さらに、より増殖速度が速い *V. alpinus* に近縁な AAP を見出すべく、氷河環境で優占する *Vulcanimicrobiota* 門の細菌の分離培養も実施した。

研究内容と成果

・ *V. alpinus* の大量培養系の検討

V. alpinus は細胞増殖速度が遅く、接種から増殖が確認されるまで2~3週間を要する上、最終到達濁度が0.01程度(モデル光合成細菌であれば3日程度で濁度1以上)と細胞量の確保が困難であった。そのため大型の培養装置を用いた大量培養が必須であるが、本菌は30mLスケールで継代培養されており、大量培養系が確立されていなかった。また、従来の培地調製方法が複雑であり、大量培養に不向きであったため、培地調製方法の簡略化を行った。簡略化した培養条件でも複数回継代できることを確認できたため、培地の量を30mLから500mLに増量し、*V. alpinus* を接種して30°Cで培養したところ、3週間程度で明瞭な増殖が確認された。培養できた細胞をさらに16本の培地入りメディウム瓶に接種し、同時に8L培養できる培養系を構築した。8L培養した培養液から遠心分離により細胞を回収し湿重量を測定したところ、20mg程度であった。得られた細胞を懸濁し、吸収スペクトルを測定したところ、光合成タンパク質複合体に特異的な800 nmおよび870 nm付近に吸収ピークが同定されたことから、大量培養システムで培養した細胞においても、光合成タンパク質複合体が合成されていることが確認できた。さらに大量培養を複数回実施し、最終的に100mg程度のペレットを次の細胞膜画分の調製に使用した。

・ *V. alpinus* の細胞膜画分の調製方法の検討

光合成タンパク質は細胞膜に局在するタンパク質超複合体である。そのため、効率的かつ純度の高い光合成タンパク質複合体の分離には、培養した *V. alpinus* 細胞

の細胞膜画分を調製する必要がある。膜画分の調製には従来フレンチプレスを用いた細胞破碎法が使用されるが、細胞試料のロスが多い点が問題である。そこで本研究では、低温条件下で超音波破碎による細胞膜の調製を試みた。しかしながら、破碎処理した細胞を顕微鏡で観察したところ、ほとんどの細胞が破碎されていないことが明らかになったため、ビーズビーティングによる破碎を追加で実施した。その結果、効率的に細胞が破碎されていることを確認できた。細胞膜と未破碎細胞・凝集物を分画するために、得られた細胞破碎液を 10%および 40% ショ糖を含む 2 層密度勾配遠心で分画した。その結果、10%と 40% ショ糖溶液の境界面にピンク～赤色のバンドが確認できた。これを注射器で丁寧に回収し、吸収スペクトルを測定したところ、光合成タンパク質複合体に特異的な 800 nm および 870 nm 付近に吸収ピークを確認できた。以上から、*V. alpinus* から光合成タンパク質複合体を含む細胞膜画分の調製に成功した。

・ *V. alpinus* の光合成タンパク質超複合体の可溶化条件の検討

調製した *V. alpinus* の細胞膜画分を用いて、界面活性剤による可溶化条件の検討を実施した。細胞膜画分を界面活性剤を含むバッファーに懸濁し、室温で 30 分間可溶化した。可溶化液を遠心分離し、可溶性画分と沈殿画分に分画した。可溶性画分の吸収スペクトルを測定したところ、特定の条件で光合成タンパク質複合体に特異的な 800 nm および 870 nm 付近に吸収ピークを確認できたことから、光合成タンパク質が可溶化されていると考えられた。

次に、界面活性剤で可溶化したサンプルを 10-30% ショ糖密度勾配遠心により分画し、光合成タンパク質複合体の精製を試みた。図 1 に矢印で示すように、遠心チューブの上層にピンク色の画分を得たため、吸収スペクトルを測定したが、光合成タンパク質複合体由来の吸収ピークは検出できなかった。そこで、ピンク色の画分より下層の溶液を 10 画分に分取し、吸収スペクトルを測定したところ、画分 3 と画分 4 に

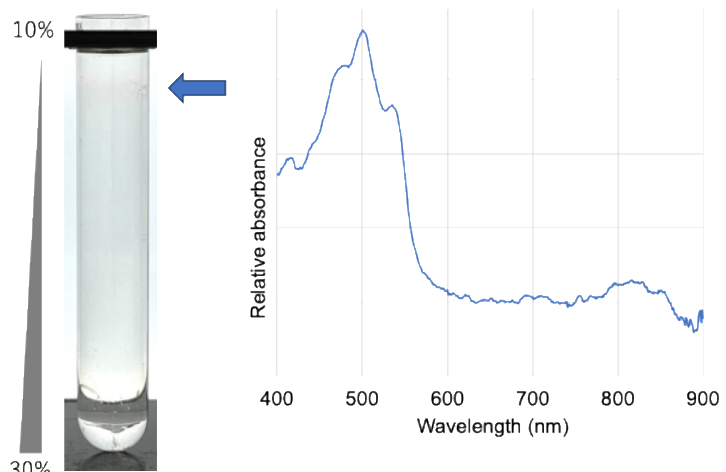


図 1. ピンク色画分下層の画分における吸収スペクトル

光合成タンパク質複合体由来に特異的な 800 nm および 870 nm 付近に吸収ピークを確認できた (図 2) . このことから、界面活性剤を用いることで、*V. alpinus* の光合成タンパク質複合体が可溶化・分離可能であると考えられる。一方で、

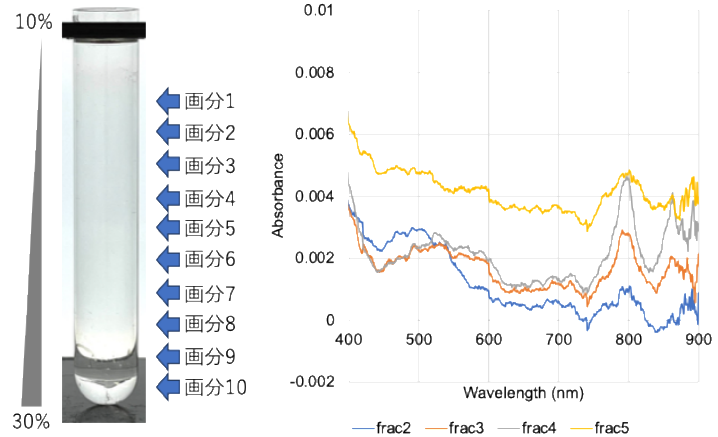


図 2. ピンク色画分下層の画分における吸収スペクトル

クライオ電子顕微鏡による構造解析に必要なタンパク質濃度の基準を大きく下回っていることから、現在では細胞の追加培養を行い、光合成タンパク質の収量向上を試験している。

・増殖速度が速い *Vulcanimicrobiota* 門に属する光合成細菌の分離培養

本研究を進める上で、*V. alpinus* の増殖速度の遅さ、および最終到達濁度の低さが課題となった。そこで、世界中の氷河環境には *Vulcanimicrobiota* 門細菌が分布していることが先行研究にて明らかになってきたため、氷河から採取されたサンプルを用いて分離培養を行い、増殖速度が速い *Vulcanimicrobiota* 門の光合成細菌の取得を目指した。1/10R2A 寒天平板培地に試料を塗布し、大気下および 10% CO₂ 下で 1 ヶ月間培養を行った。その結果、*V. alpinus* の細胞色と同様の色調を持つコロニーを複数得た。それらを継代培養し、純粋培養株の取得に成功した。現在は培養株の遺伝子解析および吸収スペクトルの測定を行い、微生物種の同定と光合成能の評価を実施している。

おわりに

上述にもあるが、本研究を進める上で *V. alpinus* の培養細胞の収量向上が大きな課題となった。大量培養系の確立には成功したが、それでもなお研究期間内に十分な細胞量を得ることができなかつたため、クライオ電子顕微鏡による構造解析にまで至らなかつた。しかしながら、本菌の細胞膜画分の調製方法および光合成タンパク質複合体の可溶化条件までは確立できたと考えており、細胞量が十分確保され次第、光合成タンパク質複合体を調製し、クライオ電子顕微鏡による解析を予定している。

参考文献

Yabe, S., Muto, K., Abe, K. et al. *Vulcanimicrobium alpinus* gen. nov. sp. nov., the first cultivated representative of the candidate phylum “Eremiobacterota”, is a metabolically versatile aerobic anoxygenic phototroph. *ISME Commun.* **2**:120 (2022).

Ward, L.M., Cardona, T., and Holland-Moritz, H. Evolutionary implications of anoxygenic phototrophy in the bacterial phylum *Candidatus* Eremiobacterota (WPS-2). *Front. Microbiol.* **10**:1658 (2019).