

機関番号：15301  
研究種目：学術創成研究費  
研究期間：2006～2010  
課題番号：18GS0318  
研究課題名（和文）光合成・光エネルギー変換装置のダイナミクスとその分子基盤の解明  
研究課題名（英文）Photosynthesis: dynamics and molecular mechanism of light energy conversion apparatus  
研究代表者  
高橋 裕一郎 (TAKAHASHI YUICHIRO)  
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授  
研究者番号：50183447

## 研究成果の概要（和文）：

酸素発生型光合成電子伝達系で機能する光エネルギー変換装置を高度に精製し、そのサブユニットとコファクター組成の詳細を明らかにし、結晶化を進めた。その結果、構成サブユニットの役割を明らかにし、立体構造解析を進展させた。また、複雑な構造をもつ光エネルギー変換装置生合成の分子機構を明らかにし、分子集合モデルを提出した。さらに、異なる光環境下で光エネルギー変換装置の構造と機能の再構築の分子機構を解明した。

## 研究成果の概要（英文）：

We purified the reaction center complexes involved in oxygenic photosynthesis and determined their subunits and cofactors, and crystalized them to determine the three-dimensional structures. We also examined the molecular mechanism by which the reaction center complexes are assembled from the constituent subunits and cofactors and proposed a working model for the assembly. Furthermore, we revealed the molecular mechanism by which the structure and function of the reaction center complexes are remodeled under varying light environments.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	71,100,000	23,330,000	94,430,000
2007年度	50,200,000	15,060,000	65,260,000
2008年度	43,100,000	12,930,000	56,030,000
2009年度	48,600,000	14,580,000	63,180,000
2010年度	42,200,000	12,660,000	54,860,000
総計	255,200,000	78,560,000	333,760,000

研究分野：植物生理学・光合成

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理学

キーワード：光合成, 光化学系, アンテナ, ダイナミクス, タンパク質分析

## 1. 研究開始当初の背景

植物、藻類、シアノバクテリアおよび光合成

細菌の光合成反応は地球上のほとんどすべての生物の生存に必須で、光合成の基盤的研究は農業生産の増大や大気中二酸化炭素の増加などの地球規模の問題の根本的解決に必須である。光合成は太陽からの無限の光を利用するため、光エネルギー変換装置（光化学系）は光合成研究の中心課題の一つである。植物、藻類およびシアノバクテリアが行う酸素発生型光合成の電子伝達系には、光を捕集するアンテナ複合体と光化学反応を引き起こす反応中心複合体から構成される2種類の光化学系（系1と系2）が機能する。その構造と機能は重要で、多くの研究者が長年にわたり物理化学、生化学、分子生物学、分子遺伝学などの学際的な手法を用いてその詳細を研究し、一定の光条件下で効率よく光エネルギーを変換する分子機構が明らかにされてきた。

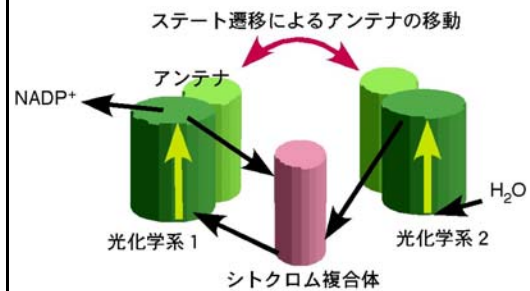
光強度が大きく変動する自然条件下で効率的に光合成反応を行うために光化学系の構造と機能をダイナミックに変化させることの重要性が注目されるようになってきた。それは弱光下では効率的に光を利用する必要があるが、強光下では光損傷を受けないように応答する必要があることが明らかにされてきたためである。このダイナミックな光エネルギー変換装置の機能の変化は、光化学系コア複合体とアンテナ複合体の構造と機能の変化を引き起こすと考えられるが、タンパク質レベルでの解析は遅れている。私たちはこれまでに光エネルギー変換装置のダイナミクスに着目し

(Protist 2002, Photosynthesis Res. 2004), 2つの光化学系間でのアンテナ複合体が可逆的に移動する現象（状態遷移）を生化学的に証明し、光エネルギーの再分配の新しいモデルを提唱し、この分野の研究の突破口を開いた (PNAS 2006)。今後の研究では、光合成反応における光と酸化還元エネルギーの分配と調節の分子レベルでの解明が強く求めら

れていた。

## 2. 研究の目的

光合成反応で最も重要な機能を果たす光エネ



光合成電子伝達系における光エネルギーと電子の再分配

ルギー変換装置である光化学系の構造と機能を分子レベルで解明する。さらに、光化学系の分子集合、光損傷と修復、そして構造と機能の再構築の分子機構を解明する。光化学系の詳細な構造を解析し、光合成反応で光エネルギーが高效率で利用される分子機構を理解する。さらに、光化学系の構造と機能のダイナミクスを解明し、大きく変化する自然環境下で光合成生物が効率的な光合成反応を進める仕組みを明らかにする。

まず、光化学系1は大きなアンテナ複合体を安定に結合するが、その構造を生化学的に解析し、結晶構造解析を進める。そして、弱い光エネルギーを効率的に捕集する分子機構を解き明かす。光化学系2の結晶構造解析も進め、光合成反応で最も重要な酸素発生系に関与するマンガンクラスターの構造を明らかにする。光化学系は多数のサブユニットとコファクターをもつ超分子複合体である。このような多数の成分をもつ複合体がどのように合成されるかという分子集合の過程を解明する。

複雑な構造をもつ光化学系は、光環境が大きく変動する自然条件下で効率的に光合成反応を行うため、その構造と機能をダイナミックに変化させる。しかし、その調節機構の分子レベルでの解析は遅れている。そこで、光環境が変化したとき2つの光化学系の活性の

バランスを調節するステート遷移の過程で、アンテナ複合体が移動する機構を分子レベルで解明する。さらに、ステート遷移に伴ない直鎖型と循環型電子伝達系の活性が調節される。この調節機構の解明を進める。特に循環型電子伝達系に関与する成分や調節の分子機構を明らかにする。

これまでに、静的な構造体として捉えられていたエネルギー変換装置の合成・再構築・分解修復の分子機構を解明し、自然環境下での光合成反応の効率化に必要な光エネルギー変換装置のダイナミクスという新しい概念を確立する。

### 3. 研究の方法

光化学系1と2複合体をそれぞれ緑藻クラミドモナスもしくは好熱性シアノバクテリアから高度に精製し、結晶化し、X線構造解析を行う。光化学系1では9種のアンテナ複合体の配置構造に着目し、光化学系2では酸素発生系のマンガクラスターの構造を中心に解析を進める。

光化学系複合体の分子集合過程を明らかにするため、分子集合に必須なYcf4タンパク質を含む複合体の生化学的解析を進める。特に、Ycf4複合体を高度に精製し、そこに含まれるサブユニットの組成を明らかにする。また、分子集合途中の光化学系1サブユニットの存在を調べる。ラジオアイソトープによるタンパク質のパルスラベル法により光化学系複合体のサブユニットの分子集合の過程を解析し、暗所で黄化させた細胞を緑化させる過程を追跡し、サブユニットとコファクターの分子集合過程を解析する。

生育の光条件が変化したときに、光化学系複合体のサブユニットやアンテナ複合体の組成が変化する過程を生化学的に分析する。また、光合成電子伝達活性が調節される現象も知られているが、その調節過程にどのような

成分が関与するかを明らかにする。特に、光化学系1の還元側の電子伝達成分とシトクロム $b_6f$ 複合体の関連に着目して解析を進める。

### 4. 研究成果

高等植物より大きなアンテナ複合体を結合する光化学系1複合体を緑藻クラミドモナスから迅速かつ高度に精製する方法を確立し、結晶化条件を改善した。構造解析を進めるにはさらにより結晶を作成する必要があるが、X線回折像の解像度は8 Åまで改善した。また、化学架橋法により構造が明らかにされていない一部の光化学系1サブユニットやアンテナ複合体のトポロジーを明らかにした。特にPsa0とPsaNの光化学系1複合体における存在部位が分かった。さらに、9種のアンテナ複合体の化学量論を決定し、多くのアンテナのおおよそのトポロジーを明らかにした。また、好熱性シアノバクテリアから精製した光化学系2複合体の構造解析の解像度が世界最高レベルにまで改善された。光合成反応で最も重要である酸素発生系のマンガクラスターの機能的構造が明らかにされつつある。

光化学系1複合体の分子集合に必須なYcf4複合体の精製に成功した。アフィニティタグを融合したYcf4をクラミドモナスに発現させ、Ycf4を含む大きな構造体(Ycf4複合体)を高度に精製した。その構成サブユニットを質量分析、ウェスタン分析、N末シーケンスにより同定した。そこには、分子集合途中の新規に合成された光化学系1タンパク質が存在することが分かった。さらに、機能は不明であるがレチナルを結合するモチーフをもつCop2タンパク質や核酸を結合する可能性のある塩基性タンパク質Ycf2も存在することを明らかにした。前者は光化学系1の分子集合が光により制御される可能性を示唆し、後者は光化学系1の葉緑体にコードされるPsaAやPsaBなどのサブユニット(反応中心サブユニ

ット)のmRNAと結合する可能性が示唆される。したがって、分子集合の初期の過程は「足場」の機能を果たすYcf4複合体上で進行すると考えられる。少なくとも葉緑体遺伝子にコードされる主要サブユニットがここで分子集合すると言える。この分子集合の初期過程の後、周辺部のサブユニットが順次結合し、安定で機能的な複合体が分子集合する新しいモデルを提出した。

光化学系1複合体の分子集合モデルを検証するため、新規に合成されたサブユニットの分子集合過程を解析した。その結果、コア複合体の中心部分が分子集合した後、すでにオリゴマー状態に分子集合したアンテナ複合体がコア複合体に結合することが分かった。その後、アンテナ複合体のコア複合体への結合を安定化するため、PsaGとPsaKが最も遅く分子集合することを明らかにした。この分子集合過程をさらに確かめるため、暗所で生育させるとクロロフィル合成できず黄化するy-1変異株を用いた緑化実験を行った。その結果、コア複合体の分子集合過程は提案したモデルから予想される結果と一致した。また、アンテナ複合体の9種のサブユニットの分子集合の速度が3つにグループ分けできることが明らかになった。さらに、クロロフィル前駆体であるゲラニルゲラニルクロロフィル (GG-Ch1)、デヒドロゲラニルゲラニルクロロフィル (DHGG-Ch1)、テトラヒドロゲラニルゲラニルクロロフィル (THGG-Ch1) が一過性的に蓄積することを見いだした。これらクロロフィル中間体はクロロフィルaとbの両方で見いだされ、クロロフィルタンパク質に結合した状態で反応が進行することも分かった。今後のクロロフィルタンパク質複合体の生合成の解析において興味深い結果であると言える。

光環境が変化すると、光合成電子伝達活性

を駆動する2つの光化学系の活性が異なってしまう。しかし、2つの光化学系の活性を最適化するため、一部のアンテナ複合体が2つの光化学系の間を移動するステート遷移が起こる。本研究では、従来の研究を発展させ、ステート遷移に伴い光化学系2と光化学系1の間でアンテナ複合体が可逆的に移動する現象を生化学的に詳細に示すことができた。また、移動するアンテナ複合体をラジオアイソトープで均一にラベルすることにより定量し、ステート2状態では少なくとも5コピーの移動性アンテナ複合体が安定に結合することが分かった。一方、ステート遷移に反応して電子伝達反応も直鎖型と循環型の活性が変化することが知られている。しかし、循環型電子伝達反応に関与する成分はあまり明らかにされていなかったが、ステート2の状態でも光化学系1とシトクロム $b_6/f$ が安定な複合体を形成することを生化学的に証明した。さらに、この複合体にフェレドキシンとプラストシアニンを添加すると、循環的電子伝達反応活性を示すことに成功した。

#### 5. 主な発表論文等 (すべて査読あり)

1. Ozawa, S., Kosugi, M., Kashino, Y., Sugimura, T., and Takahashi, Y., 5'-Monohydroxyphyllanthrone is the dominant naphthoquinone of PSI in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 53: 237-243 (2012)
2. Inoue-Kashino, N., Kashino, Y. and Takahashi, Y. Psb30 is a photosystem II reaction center subunit and is required for optimal growth in high light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Photochem. Photobiol.* 104: 220-228 (2011)
3. Iwai, M., Takizawa, K., Tokutsu, R., Okamuro, A., Takahashi, Y., Minagawa, J. Isolation of the elusive supercomplex driving cyclic electron transfer in photosynthesis. *Nature* 464 (2010) 1210-1213.
4. Hohmann-Marriott, M. F., Takizawa, K., Eaton-Rye, J., Mets, L., and Minagawa,

- J. The reduction state of plastoquinone is a major modulator of in vivo chlorophyll fluorescence in *Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Lett., 584 (2010) 1021-1026.
5. Iwai, M., Yokono, M., Inada, N., Minagawa, J. Live cell imaging of photosystem II antenna dissociation during state transitions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107 (2010) 2337-2342
  6. Takasaka K., Iwai M., Umena Y., Kawakami K., Ohmori Y., Ikeuchi M., Takahashi Y., Kamiya N., Shen J.-R. Structural and functional studies on Ycf12 (Psb30) and PsbZ deletion mutants from a thermophilic cyanobacterium. Biochim. Biophys. Acta, 1797 (2010) 278-284
  7. T. Takahashi, N. Inoue-Kashino, S. Ozawa, Y. Takahashi, Y. Kashino, and K. Satoh, Photosystem II complex in vivo is a monomer. J. Biol. Chem. 284 (2009) 15598-15606.
  8. Biochemical and structural studies of the large Ycf4-Photosystem I assembly complex of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. S. Ozawa, J. Nield, A. Terao, E. J. Stauber, M. Hippler, H. Koike, J.-D. Rochaix and Y. Takahashi, The Plant Cell 21 (2009) 2424-2442
  9. Effects of Site-directed Mutations in the Chloroplast-encoded *ycf4* Gene on Photosystem I Complex Assembly in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. T. Onishi and Y. Takahashi, Plant and Cell Physiology 50 (2009) 1750-1760
  10. Adachi H., Umena Y., Enami I., Henmi, T. Kamiya N., Shen J.-R. (2009) Towards structural elucidation of eukaryotic photosystem II: Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of photosystem II from a red alga. Biochim. Biophys. Acta, 1787, 121-128
  11. Ren Y.-N., Zhang C.-X., Bao H., Shen J.-R., Zhao J.-Q. (2009) Probing tyrosine Z oxidation in photosystem II core complex isolated from spinach by EPR at liquid helium temperatures. Photosynthesis Research, 99, 127-138
  12. Kawakami K., Umena Y., Kamiya N., Shen J.-R. (2009) Location of chloride and its possible functions in oxygen-evolving photosystem II revealed by X-ray crystallography. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 8567-8572
  13. Kato, Y., Miura, E., Ido, K., Ifuku K., and Sakamoto W. The variegated mutants lacking chloroplastic FtsHs are defective in D1 degradation and accumulate reactive oxygen species. Plant Physiol., 151 (2009) 1790-1801
  14. Sakamoto, W., Uno, Y., Zhang, Q., Miura, E., Kato, Y., and Sodmergen Arrested differentiation of proplastids into chloroplasts in variegated leaves characterized by plastid ultrastructure and nucleoid morphologies. Plant Cell Physiol., 50 (2009) 2069-2083
  15. Gibala, M., Kicia, M., Sakamoto, W., Gola, E., Kubrakiewicz, J., Smakowska, E., and Janska, H. The lack of mitochondrial AtFtsH4 protease alters Arabidopsis leaf morphology at the late stage of rosette development under short day photoperiod. Plant J., 59 (2009) 685-699
  16. Zhang, L., Wei, Q., Wu, W., Cheng, Y., Hu, G., Sun, Y., Zhu, Y., Sakamoto, W., and Huang, J. Activation of the heterotrimeric G protein  $\alpha$ -subunit GPA1 suppresses the ftsh-mediated inhibition of chloroplast development in Arabidopsis. Plant J., 58 (2009) 1041-1053
  17. Tang, L. Y., Nagata, N., Matsushima, R., Chen, Y., Yoshioka, Y., and Sakamoto, W. Visualization of plastids in pollen grains: involvement of FtsZ1 in pollen plastid division. Plant Cell Physiol. 50 (2009) 904-908
  18. Kato, Y. and Sakamoto, W. Protein quality control in chloroplasts: a current model of D1 protein degradation in the Photosystem II repair cycle. J. Biochem., 146 (2009) 463-469
  19. Evidence for a stable association of Psb30 (Ycf12) with photosystem II core complex in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. N. Inoue-Kashino, T. Takahashi, A. Ban, M. Sugiura, Y. Takahashi, K. Satoh and Y. Kashino, Photosynthesis Res. 98 (2008) 323-335
  20. Chloroplast biogenesis during rehydration of the resurrection plant *Xerophyta humilis*: Parallels to the etioplast-chloroplast transition. R. A. Ingle, H. Collett, K. Cooper, Y. Takahashi, J. M. Farrant and N. Illing, Plant, Cell and Environment, 38 (2008) 1813-1824
  21. Molecular Remodeling of Photosystem

- II during State Transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*. M. Iwai, Y. Takahashi and J. Minagawa, *The Plant Cell* 20 (2008) 2177-2189
22. Chloroplast-encoded polypeptide PsbT is involved in the repair of primary electron acceptor QA of photosystem II. N. Ohnishi, Y. Kashino, K. Satoh S. Ozawa and Y. Takahashi, *Journal of Biological Chemistry* 282 (2007) 7107-7115
23. Chloroplast-encoded PsbT is required for efficient biogenesis of photosystem II complex in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. N. Ohnishi and Y. Takahashi, *Photosynthesis Res.* 95 (2008) 315-322.
24. Distinct physiological responses to a high light and low CO<sub>2</sub> environment revealed by fluorescence quenching in photoautotrophically grown *Chlamydomonas reinhardtii*. Iwai, M., Kato, N., Minagawa, J. *Photosynth. Res.* 94 (2007) 307-314.
25. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. Merchant, S., Grossman, A., et al. *Science* 318 (2007) 245-250.
26. Aromatic structure of Tyrosine-92 in the extrinsic PsbU protein of red algal Photosystem II is important for its functioning. Okumura A., Sano M., Suzuki T., Tanaka H., Nagao R., Nakazato K., Iwai M., Adachi H., Shen J.-R. and Enami I. *FEBS Lett.* 581 (2007) 5225-5258
27. Real-Time monitoring of chloroplast gene expression by a luciferase reporter: Evidence for nuclear regulation of chloroplast. T. Matsuo, K. Onai, K. Okamoto, J. Minagawa, M. Ishiura, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 863-870
28. Chemically induced expression of rice OSB2 under the control of the OsPR1.1 promoter confers increased anthocyanin accumulation in transgenic rice. Kawahigashi, H., Hirose, S., Iwai, T., Ohashi Y., Sakamoto, W., Maekawa, M., and Ohkawa, Y. (2007)
29. Differences in DNA amount in each mitochondrion in tobacco cultured cell and rice root. Takanashi, H., Arimura, S., Sakamoto, W., and Tsutsumi, N. *Genes Genet. Syst.* (2006) 599-621
30. g-Anisotropy of the S<sub>2</sub>-state manganese cluster in single crystals of cyanobacterial photosystem II studied by W-band electron paramagnetic resonance spectroscopy. Matsuoka H., Furukawa K., Kato T., Mino H., Shen J.-R., and Kawamori A. *J Phys Chem B*, 100 (2006) 599-621.
31. Quality control of Photosystem II: cleavage of reaction center D1 protein in spinach thylakoids by FtsH protease under moderate heat stress. M. Yoshioka, S. Uchida, H. Mori, K. Komayama, S. Ohira, N. Morita, T. Nakanishi and Y. Yamamoto, *J Biol. Chem.* 281 (2006) 21660-21669
32. Differences in DNA amount in each mitochondrion in tobacco cultured cell and rice root. Takanashi, H., Arimura, S., Sakamoto, W., and Tsutsumi, N. *Genes Genet. Syst.* 81 (2006) 215-218. [雑誌論文] (計 3 4 件)
- [学会発表] (計 1 3 0 件)
- [図書] (計 4 件)
1. Minagawa, J. Light-harvesting proteins. *Chlamydomonas* sourcebook ed. By David B. Stern, Academic Press (2008)
- [産業財産権]  
該当なし  
[その他]  
該当なし
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
高橋 裕一郎 (TAKAHASHI YUICHIRO)  
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授  
研究者番号：50183447
- (2) 研究分担者  
沈 建仁 (SHIN KENJIN)  
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授  
研究者番号：60261161  
皆川 純 (MINAGAWA JYUN)  
北海道大学・低温科学研究所・准教授  
研究者番号：80280725  
坂本 亘 (SAKAMOTO WATARU)  
岡山大学・資源植物科学研究所・教授  
研究者番号：20222002  
菓子野 康浩 (KASHINO YASUHIRO)  
兵庫県立大学・生命理学研究科・准教授  
研究者番号：20221872
- (3) 連携研究者  
該当なし