

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02510

研究課題名（和文）光合成・環境変動に应答した光化学系 複合体の構造と機能のダイナミクス

研究課題名（英文）Dynamics of the structure and function of photosystem I complex in response to environmental changes

研究代表者

高橋 裕一郎（Takahashi, Yuichiro）

岡山大学・異分野基礎科学研究所・特任教授

研究者番号：50183447

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：光化学系（PSI）複合体の4つの分子集合因子Ycf3, Y3IP1, Ycf4, CGL71とLHCの分子集合に必須な因子cpSRP43とAlb3.1の機能を明らかにした。ヘテロ二量体を形成するYcf3とY3IP1は、PSI反応中心（RC）の分子集合の初期に必須で、オリゴマーを形成するYcf4は、その後の分子集合過程に必須である。CGL71は、好気条件下での分子集合に重要である。cpSRP43とAlb3.1は複合体を形成し、LHCIの分子集合に必須で、PSI-LHCI超複合体の形成に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光化学系（PSI）複合体の構成成分であるタンパク質サブユニットの合成とコファクターの生合成は解析が進んでいる。また、PSI複合体の構造は構造生物学的手法で詳細に解析され、各成分が秩序正しく配置されていることが明らかにされた。さらに、物理化学的解析により、PSI複合体の機能もかなり解明されてきた。しかし、これらの成分がどのように機能的な複合体に分子集合する機構はほとんど明らかにされていなかった。本研究により、PSI-LHCI超複合体の分子集合機構に重要な役割を果たす分子集合因子の機能が明らかにされた。今後、過酷な環境に耐性を示す光合成生物を作出する上で重要な基盤的成果となると言える。

研究成果の概要（英文）：The functions of four photosystem I (PSI) complex assembly factors Ycf3, Y3IP1, Ycf4, CGL71, and those of cpSRP43 and Alb3.1, which are essential for the LHCS, are studied. Ycf3 and Y3IP1, which form heterodimers, are essential for the initial assembly of PSI reaction centers (RC), Ycf4, which forms oligomers, is essential for the subsequent molecular assembly process. CGL71 is important for the PSI complex assembly under aerobic conditions. cpSRP43 and Alb3.1 form a complex and are essential for LHCI complex assembly and are involved in the formation of the PSI-LHCI supercomplex.

研究分野：光合成、植物生理学、植物分子生物学

キーワード：光合成 環境変動 ダイナミクス 分子集合因子 光化学系 複合体 アンテナ複合体 プルダウン実験 緑藻クラミドモナス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

光合成は光エネルギーを利用して水と二酸化炭素から炭水化物を合成する複雑な反応系である。光を吸収し、酸化還元エネルギーへ変換する反応は、光合成の最も初期の過程である。太陽からの光エネルギー密度は低く、光は極めて不安定なエネルギー源である。このような性質をもつ光エネルギーを高い効率で捕集し、酸化還元エネルギーへ変換するアンテナと光化学系複合体は、多数のサブユニットタンパク質と光合成色素などの多数のコファクターが秩序正しく配置された複合体を形成している。その構造は X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡による単粒子解析により、原子レベルで解明され、光エネルギーが効率的に捕集され、その励起エネルギーが高い量子収率で酸化還元エネルギーへ変換される分子機構はかなり詳細に解明されてきた(図1)。しかし、このような秩序正しく構成成分が配置されたアンテナおよび光化学系複合体はどのように分子集合(アセンブリー)されるのかについての情報は極めて乏しい。分子集合の研究が遅れている理由の一つは、分子集合は速く進行するため、その過程を追跡することが難しいためである。これまでに我々は2つの葉緑体ゲノムにコードされた2つの因子が PSI 複合体の分子集合に必須であることを報告した。その結果、PSI コア複合体のサブユニットは段階的に分子集合するモデルを提出した(図2)。



図1 PSI-LHCI の構造

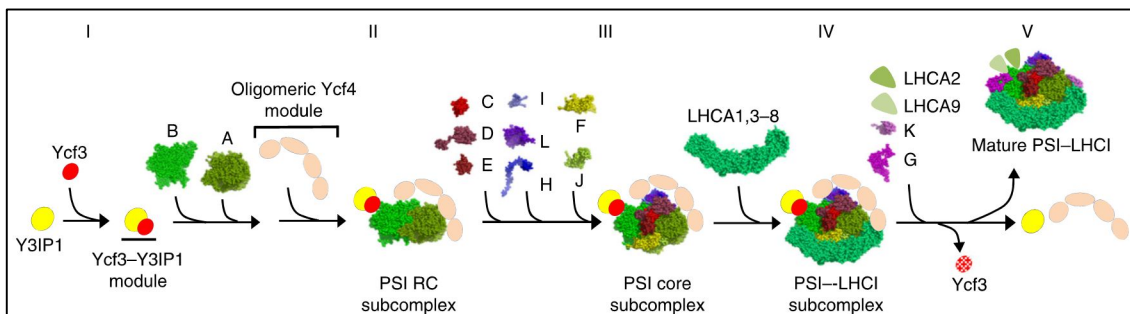


図2 PSI 複合体のサブユニットの段階的分子集合モデル

光合成生物は変動する環境下で光合成反応を最適化しながら生育している。環境要因の中でも光環境の変動は極めて大きく、過酷な光環境下では光合成装置が著しく損傷を受ける光阻害が生じることが知られている。アンテナと光化学系複合体は、光阻害の主要なターゲットであり、損傷と修復が常に行われている。したがって、過酷な光環境に高い耐性を示す光合成生物を作出するには、このアンテナと光化学系複合体の分子集合の分子機構(ダイナミクス)を解明する必要がある。

### 2. 研究の目的

一定の光環境下で生育した光合成生物の光化学系 I (PSI) 複合体の構造と機能は詳しく解明されてきた。一方、大きく変動する光環境下において、PSI 複合体の構造と機能が変化することが知られている。しかし、光環境の変化に誘導された構造変化や機能調節の詳細は不明な点が多く残されている。本研究では、複雑な構造をもつ PSI 複合体の分子集合(アセンブリー)機構、およびアンテナ複合体(LHCI と LHCII)の PSI 複合体への結合調節機構と励起エネルギー移動機構を解析する。そして PSI が制御の中心となる直鎖型と循環型電子伝達反応の調節機構を解析する。いずれの電子伝達反応にも関与し、PSI へ電子を供給するシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体の活性調節機能を構造と機能の面から解明する。主に分子生物学・生化学・生物物理学の手法を融合させた研究手法を積極的に活用し、複合体の構造解析はクライオ電顕を用いて行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) PSI 複合体分子集合因子の精製

通常の下で必要な分子集合因子である Ycf3、Y3IP1、Ycf4、CGL71 と好気条件下で PSI 複合体の分子集合に必須な役割を果たす CGL71/PYG7/Ycf3 の機能解析を進める。既に作出した HA タグを融合した因子を発現する緑藻クラミドモナス形質転換体から PSI の分子集合中間体を単離しその性質を生化学的に解析する。

#### (2) PSI 超分子複合体の構造と機能の解析

PSI 複合体は細胞の生育環境の変化に伴いアンテナ複合体や Cyt-*b<sub>6</sub>f* 複合体を結合して超分子複合体を可逆的に形成する。20 残基のヒスチジンから構成されるヒスチジントグ(His-tag)を PSI 反応中心の PsaB サブユニットの N 末端付近に融合した形質転換体をすでに作出した。アフィニティークロマトグラフィーにより、His-tag を融合した PSI 複合体は高収率で高度の純化することができる。このシステムを活用して、嫌気、最適明条件、強光条件、などの光条件下で細胞を生育させ、チラコイド膜を単離し、温和に可溶化し、PSI 超分子複合体をアフィニティー精

製する。得られた標品のサブユニット組成、光捕集効率、電子伝達活性を生化学および物理化学的手法により解析する。さらに、クライオ電子顕微鏡によりその構造を解析する。

### (3) アンテナ複合体の分子集合因子の精製

アンテナ複合体のアポタンパク質 (LHCP) が細胞質で合成された後、包膜を輸送され葉緑体内へ取り込まれ、最終的にはチラコイド膜へ輸送される過程で、シグナル認識粒子 (cpSRP) とインセルターゼ (Alb) が必須の因子として関与する。それぞれの因子を欠損する変異株に cpSRP43-HA もしくは Alb3.1-HA を発現する相補株を作出し、それぞれの因子をアフィニティー精製することにより、LHCP がチラコイド膜で LHC 複合体へ分子集合する過程を解析する。

## 4. 研究成果

### (1) PSI 分子集合因子の解析

葉緑体遺伝子にコードされた Ycf3 は、PSI 反応中心 (PsaA と PsaB) の分子集合に関与することから、PSI 反応中心の初期の分子集合に必須の成分であることをすでに報告した。エピトープタグである HA を融合した Ycf3-HA のアフィニティー精製により核遺伝子にコードされた Y3IP1 が Ycf3 とヘテロ二量体を形成することも明らかにした。本研究では、Y3IP1 を欠損した変異株 cg159 の PSI 複合体を解析した。cg159 株には野生型のおよそ 5% 程度の PSI が蓄積するが、光合成的には生育できない。わずかに蓄積した PSI 複合体は安定であり、P700 光酸化活性は保持していた。おそらく、Y3IP1 は PSI 複合体の分子集合の効率化に関与するが、PSI 複合体の分子集合には必須ではないと考えられる。Y3IP1 は Ycf3 の安定性や機能に重要な役割を果たしていると考えられる。

核遺伝子にコードされる CGL71 は、好気条件下での PSI 複合体の生合成に必須で、嫌気条件下での生合成には必要でないことが報告されていた。PSI 複合体の分子集合で酸素に感受性があると考えられる段階は、FeS クラスターの分子集合過程である。先行研究では PsaC に結合する 2 つの FeS クラスター  $F_A$  と  $F_B$  の分子集合過程に関与すると予想された。そこで、CGL71 を欠損した cg171 変異株を CGL71-HA を発現するベクターで相補し、CGL71-HA をアフィニティー精製した。その結果、一過性的に結合するのは PSI 反応中心タンパクである PsaA と PsaB であることが分かった。この結果は、PsaA と PsaB が形成する PSI 反応中心の FeS センター ( $F_X$ ) の分子集合過程に必須であり、PsaC の FeS センターの形成には関与しないことを示す。

本研究成果に基づき、PSI 複合体の新しい分子集合過程のモデルが提案できた (図 3)。PSI 複合体の最初期の分子集合過程では、反応中心サブユニット PsaA と PsaB がヘテロ二量体を形成するが、この過程を Ycf3-Y3IP1 因子が介添える。PsaA と PsaB のそれぞれのストロマ側に保存された 4 つの Cys 残基に  $F_X$  が配意されるが、この過程は酸素感受性が高いので CGL71 がこの周囲の嫌気的条件を維持すると考えられる。オリゴマーを形成する葉緑体遺伝子にコードされる Ycf4 は、PSI 複合体の分子集合の初期から最終期まで関与するので、おそらく不安定であると考えられる分子集合中間体を分解から守る役割を果たしているのであろう。

これまでに精製された Ycf4-Y3IP1 と Ycf4 oligomer の構造を解析するため、現在クライオ電子顕微鏡で単量子解析が進行中である。構造が明らかにされると、これらの因子が PSI 複合体の分子集合をどのように介添えるか明らかになると期待される。

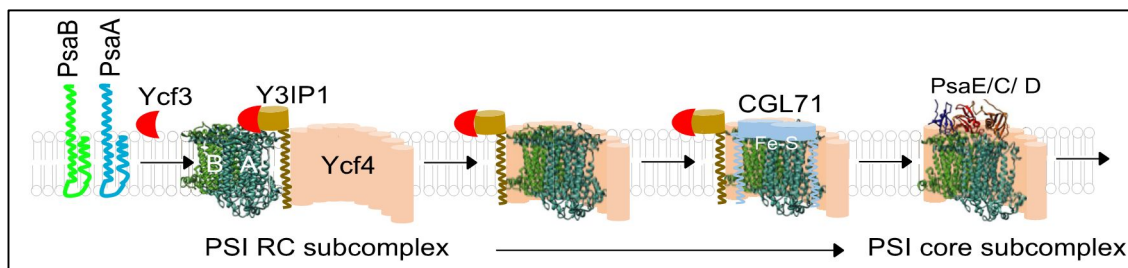


図 3 CGL71 は好気条件下での反応中心の分子集合に必須

### (2) LHCAI 分子集合因子の解析

細胞質で合成され葉緑体に取り込まれた前駆体 pLHCP は N 末のシグナルペプチドを取り切れ成熟型 LHCP となる。その後、cpSRP と結合してストロマをチラコイド膜のシグナル認識粒子 FtsY まで輸送され、インセルターゼ Alb3.1 の作用によりチラコイド膜内に挿入される。この過程とおそらく共役してコファクターを結合して LHC 複合体が形成される。この過程で重要な役割を果たす cpSRP は cpSRP43 と cpSRP54 のヘテロ二量体であり、ストロマに局在すると考えられていた。

本研究では、Alb3.1 の欠損株 BF4 に HA タグを融合した Alb3.1 を発現させ、Alb3.1-HA アフィニティー精製した。その結果、Alb3.1-HA には化学量論的にほぼ等しい cpSRP43 と cpSRP54 が結合していた。その他にも一過性的に LHCI と LHCI I が検出された。しかし、シグナル認識粒子である FtsY は検出されなかった。それは結合が弱くて可溶化・精製の過程で脱離して失われたからかもしれない。これらの結果は、一過性的にしか結合しないと考えられていた cpSRP が安定

に Alb3.1 に結合していることを示す。したがって、これまでの定説とは異なり、cpSRP は必ずしもストロマに局在する因子ではないことが示唆された (図4)。

次に cpSRP43 欠損株に cpSRP43-HA を発現させ相補した株から cpSRP43-HA をアフィニティー精製した。得られた標品には cpSRP54 と Alb3.1 が化学量論的にほぼ等量検出された。また、LHCI と LHCII も微量ながら検出された。しかし、ここでも FtsY は検出されなかった。この結果は、cpSRP と Alb3.1 が複合体を形成している結論を支持している。また、cpSRP43-HA の細胞内での

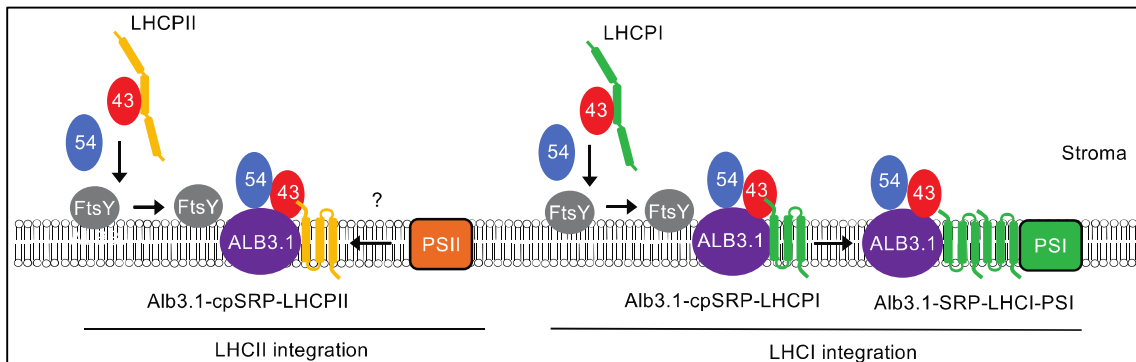


図4 LHCP のチラコイド膜への分子集合モデル

分布を調べたところ、可溶性画分にはわずかにしか検出されず、ほとんどが膜画分に存在していた。Alb3.1 は膜貫通ヘリックスをもつ膜タンパクであるが、cpSRP と複合体を形成していることが確認できた。

以上の実験事実から、従来の LHC 複合体の分子集合の分子機構モデルは大幅に改訂する必要が生じたと言える。少なくとも pLHCP が包膜を輸送される位置とチラコイド膜上の cpSRP-Alb3.1 複合体は近接しており、LHCP はストロマ中を長距離輸送されることはないと考えられる。多分、包膜とチラコイド膜が近接もしくは結合している部位で LHC 複合体の分子集合が行われる可能性がある。本研究で精製された cpSRP-Alb3.1 標品の構造解析するため、クライオ電子顕微鏡で単量子解析が進行中である。

### (3) シトクロム $b_6f$ 複合体の構造と機能調節の解明

変動する光環境にตอบสนองして 2 つの光化学系への光エネルギー分配し光合成反応を効率化と、過剰な光エネルギーによる光化学系の光損傷を抑制において、シトクロム  $b_6f$  ( $bf$ ) 複合体は大きな役割を果たしている。強光下において電子伝達反応を抑制し、PSI の光阻害を防ぐ「光合成コントロール」は重要な調節機構の一つである。これは強光下ではチラコイド膜のルーメンの酸性化が大きくなることにより  $bf$  複合体の電子伝達が抑制される現象である。本研究では、強光での生育が低下する表現型をもつ *pgr1* 変異株は、ルーメンの酸性化がわずかに起こったときに電子伝達の活性抑制が起こることを示した。その結果、*pgr1* 変異株ではルーメン酸性化が不十分となり NPQ が誘導されず、強光下での生育が抑制された。

次に「光合成コントロール」の分子機構を詳細に調べるため、 $bf$  複合体の構造を決定した。 $bf$  複合体の PetA に His-tag を融合した株から、 $bf$  複合体をアフィニティー精製し、その構造をクライオ電子顕微鏡の単粒子解析で決定した。その結果、X 線結晶解析では分からなかった FeS クラスタをもつ Rieske サブユニットに動的構造があることが示された。PQH<sub>2</sub> が電子を Cyt- $b_6$  と FeS へそれぞれ渡した後、Rieske サブユニットは構造を変化させ、FeS センターを PQH<sub>2</sub> 結合部位から Cyt-f へ近づける動きをしていると考えられる。このような Rieske サブユニットの動きは「光合成コントロール」の分子機構と関連がある可能性がある。現在、*pgr1* 変異株からも His-tag を融合した  $bf$  複合体を精製し、その構造解析が進行中である。Rieske サブユニットの動的構造に変化が生じているかどうかを注目している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akiyama Kentaro, Ozawa Shin-Ichiro, Takahashi Yuichiro, Yoshida Keisuke, Suzuki Toshiharu, Kondo Kumiko, Wakabayashi Ken-ichi, Hisabori Toru	4. 巻 120
2. 論文標題 Two specific domains of the subunit of chloroplast F <sub>1</sub> provide redox regulation of the ATP synthesis through conformational changes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2218187120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2218187120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato Yusuke, Kuroda Hiroshi, Ozawa Shin-Ichiro, Saito Keisuke, Dogra Vivek, Scholz Martin, Zhang Guoxian, de Vitry Catherine, Ishikita Hiroshi, Kim Chanhong, Hippler Michael, Takahashi Yuichiro, Sakamoto Wataru	4. 巻 12
2. 論文標題 Characterization of tryptophan oxidation affecting D1 degradation by FtsH in the photosystem II quality control of chloroplasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.88822.3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ozawa Shin-Ichiro, Buchert Felix, Reuys Ruby, Hippler Michael, Takahashi Yuichiro	4. 巻 191
2. 論文標題 Algal PETC-Pro171-Leu suppresses electron transfer in cytochrome <i>b<sub>6</sub>f</i> under acidic lumenal conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1803 ~ 1817
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiac575	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Naschberger Andreas, Mosebach Laura, Tobiasson Victor, Kuhlger Sebastian, Scholz Martin, Perez-Boerema Annemarie, Ho Thi Thu Hoai, Vidal-Meireres Andr?, Takahashi Yuichiro, Hippler Michael, Amunts Alexey	4. 巻 8
2. 論文標題 Algal photosystem I dimer and high-resolution model of PSI-plastocyanin complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 1191 ~ 1201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41477-022-01253-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kuroda Hiroshi, Kawashima Keisuke, Ueda Kazuyo, Ikeda Takuya, Saito Keisuke, Ninomiya Ryo, Hida Chisato, Takahashi Yuichiro, Ishikita Hiroshi	4. 巻 1862
2. 論文標題 Proton transfer pathway from the oxygen-evolving complex in photosystem II substantiated by extensive mutagenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 148329 ~ 148329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2020.148329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hippler Michael, Minagawa Jun, Takahashi Yuichiro	4. 巻 62
2. 論文標題 Photosynthesis and Chloroplast Regulation?Balancing Photosynthesis and Photoprotection under Changing Environments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1059 ~ 1062
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcab139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Rathod Mithun Kumar, Nellaepalli Sreedhar, Ozawa Shin-Ichiro, Kuroda Hiroshi, Kodama Natsumi, Bujaldon Sandrine, Wollman Francis-Andr?, Takahashi Yuichiro	4. 巻 63
2. 論文標題 Assembly Apparatus of Light-Harvesting Complexes: Identification of Alb3.1?cpSRP?LHCP Complexes in the Green Alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 70 ~ 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcab146	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yuichiro Takahashi
2. 発表標題 Structure and dynamics of photosystem I supercomplex in the green alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
3. 学会等名 ICFAST-2022 (University of Hyderabad, India) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒田洋詩、小澤真一郎、濱尾志乃、高橋裕一郎
2. 発表標題 集光性クロロフィルタンパク質の輸送に関する cpSRP43 タンパク質のアフィニティ精製
3. 学会等名 日本植物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuichiro Takahashi
2. 発表標題 How to assemble proteins into a functional multiprotein complex; Factors assisting the assembly of photosystem I supercomplex in the green alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
3. 学会等名 CTFPB-2023 (University of Hyderabad, India) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuichiro Takahashi
2. 発表標題 Structure and biogenesis of photosystem I supercomplex in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Regulation, Kobe (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒田洋詩、小澤真一郎、高橋裕一郎
2. 発表標題 緑藻クラミドモナス集光性クロロフィルタンパク質の輸送に関するcpSRPのアフィニティ精製
3. 学会等名 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shin-ichiro Ozawa, Felix Buchert, Ruby Reuys, Michel Hippler, Yuichiro Takahashi
2. 発表標題 The amino acid substitution, PETC-Pro171Leu, slowdown electron transfer in the cytochrome b6f complex under anoxic conditions in the green alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
3. 学会等名 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田穰、金田直也、ネレパリ スリーダー、高橋裕一郎
2. 発表標題 光化学系 組み立て中間体の光捕集とスペクトルの不均一性
3. 学会等名 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黒田洋詩、小澤真一郎、濱尾志乃、高橋裕一郎
2. 発表標題 緑藻クラミドモナスcpSRPはcpSRP43とcpSRP54から構成されるAlb3.1を介してチラコイド膜に結合する
3. 学会等名 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小澤真一郎、ブッハート フェリックス、ルイス ルビー、ミハヤエル ヒップラー、高橋裕一郎
2. 発表標題 緑藻クラミドモナスのシトクロムb6fのPETC-171-ProをLeuに置換した変異株はルーメン酸性下条件で電子伝達速度を強く抑制する
3. 学会等名 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 柴田穰、金田直也、ネレパリ スリーダー、高橋裕一郎
2. 発表標題 光化学系 組み立て中間体の光捕集とスペクトルの不均一性
3. 学会等名 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Roberta Croce and Yuichiro Takahashi	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 16
3. 書名 The Chlamydomonas Sourcebook	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関