

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660087

研究課題名(和文)1分子観測による光合成タンパク質超複合体の可視化

研究課題名(英文)Visualization of photosynthetic protein supercomplexes by single molecule analysis

研究代表者

伊福 健太郎 (IFUKU, KENTARO)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：50359783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体チラコイド膜においては、光合成の電子伝達鎖を形成する膜タンパク質複合体が膜上で集合し、準安定または過渡的な超複合体を形成して機能することが知られている。本研究では、電子顕微鏡を用いた1分子解析によって、それらを可視化する技術開発を行った。第一に、モデル系として、好熱性シアノバクテリアの光化学系II複合体に対して、位相板を用いたクライオ電子顕微鏡観察を行い、3次元立体構造を構築し、X線結晶構造解析とは異なる複合体同士の相互作用を認めた。加えて、緑藻クラミドモナスのチラコイド膜から光化学系II-集光タンパク質複合体を温和な処理で抽出、精製する方法を開発し、電子顕微鏡による1分子観察を行った。

研究成果の概要(英文)：In the thylakoid membrane of chloroplasts, protein complexes involved in the photosynthetic electron transport form metastable or transient supercomplexes to function efficiently. To visualize such supercomplexes in the thylakoid membrane, a single molecule analysis using electron microscope has been performed. As a model system, the photosystem II complex from thermophilic cyanobacteria was analyzed by a cryo-electron microscopy equipped with a phase plate to build the quaternary structure. In addition, we isolated and analyzed the photosystem II - light harvesting antenna protein (PSII-LHCII) supercomplexes from the thylakoid membrane of a unicellular algae, *Chlamydomonas reinhardtii*.

研究分野：植物分子生物学・生化学

キーワード：植物 葉緑体 光合成 電子顕微鏡解析 光化学系

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の立体構造の視点に基づく構造生物学研究は、生物学研究の基盤技術として生命現象の理解に大きく貢献している。葉緑体チラコイド膜上で光合成の電子伝達鎖を形成するタンパク質複合体についても、単独での X 線結晶構造が解明され、各々の分子機能の研究が大きく進展した。さらに最近の研究からそれら複合体が超複合体を形成して機能することが報告されてきている。しかしながら、準安定、もしくは過渡的に形成される超複合体の 3 次元立体構造の可視化は難しかった。

2. 研究の目的

よりインタクトに近い状態で葉緑体チラコイド膜からタンパク質超複合体を抽出できる条件を検討し、電子顕微鏡を用いた 1 分子観測によって、光合成膜タンパク質超複合体の実像を可視化する技術を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

解析対象には、すでにある程度立体構造が判明している光化学系 II (PSII) と光化学系 II—集光タンパク質複合体 (PSII-LHCII)、および、その立体構造が未解明な葉緑体 NDH-like 複合体の二つを選択した。第一に、葉緑体チラコイド膜からタンパク質超複合体を抽出、分離する条件を検討した。次に、電子顕微鏡解析によるデータ取得とその解析を行った。

4. 研究成果

(1) 葉緑体チラコイド膜から PSII-LHCII 超複合体を抽出、分離する条件の検討

PsbP タンパク質は、緑色植物に特有な PSII の膜表在性サブユニットであり、比較的容易に複合体から解離する。従って、インタクトな PSII-LHCII 複合体を観察するためには、PsbP を結合した複合体を得ることが重要である。そこで、PsbP タンパク質にアフィニティ精製のタグを付加することで、複合体の精製を試みた。まず、クラミモナス PsbP 欠損株を取得し、ゲノム配列中の遺伝子変異を同定した。次に、その欠損株に新たに *PsbP* 遺伝子を導入することで、光合成機能の相補（酸素発生能の回復）が可能であることを確認した。さらに導入する *PsbP* 遺伝子に、His タグをコードする配列を付加しても、タンパク質の機能に問題が生じないことを確認した。

そこで PsbP-His 発現株から葉緑体チラコイド膜を抽出し、界面活性剤で可溶化後、コバルトカラムを用いてアフィニティ精製を行った。その結果、PSII-LHCII 複合体が特異的に濃縮されて精製できることを明らかにした。SDS-PAGE、および、電

子顕微鏡解析の結果、さらなる純度の向上が必要とされるものの、目的の PSII-LHCII 複合体が得られていることが確認できた。

葉緑体 NDH-like 複合体についても、シロイヌナズナを材料に同様の手法で複合体の単離を試みたが、こちらはまだタグを付加するサブユニットの検討が必要と考えられた。

(2) 電子顕微鏡解析によるデータ取得とその解析

初年度は、すでに X 線結晶構造が判明している、好熱性シアノバクテリア由来の PSII 複合体を、大阪市立大学の川上恵典博士から分与いただき、モデル実験を行った。まず、PSII 複合体をアクリルアミド、もしくはアガロースゲルに包埋し、脱水、固定後、樹脂包埋した。その連続薄層切片を作成し、電子顕微鏡解析を行った。しかしながら、複合体が凝集した像しか得られなかった。複合体濃度、希釈するバッファー、ゲルの種類などを検討したが、解決しなかったため、この方法で単 1 分子像を得るのは困難であると判断した。

そこで次年度から戦略を変え、多数の細孔が空いたカーボングリッド上に複合体溶液を塗布し、急速凍結させる方式に切り替えた。その後、日本電子(株)の協力を得て、位相板を用いたクライオ位相差電子顕微鏡解析を行った。得られた像は、主に PSII 二量体の 2 つが、ストロマ側の表面で接着した四量体であった。位相板を用いた電子顕微鏡像は、非常に鮮明であり、複合体から突き出した膜表在性タンパク質の突起もはっきりと目視できるものであった。(図 1 上図)

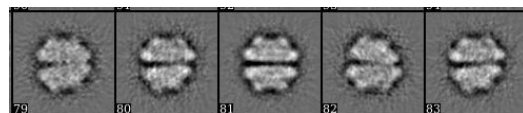
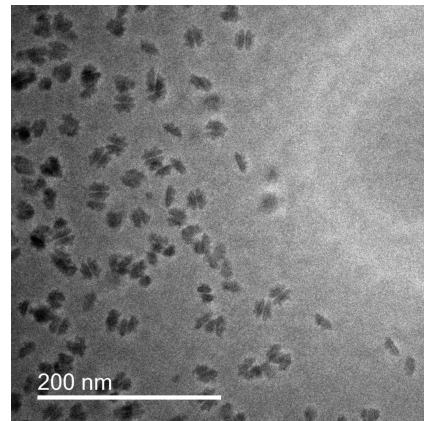


図 1 : 好熱性シアノバクテリア PSII 複合体の位相差クライオ電子顕微鏡像(上)及び、そこから抽出した PSII 四量体(2 つの二量体が背中合わせに相互作用したもの)の粒子像(下)

そこで得られた像を用いて、ロンドン大学クイーンメアリー校の Jon Nield 博士と協力して、3次元立体構造の構築を試みた。しかしながら、得られた構造モデルは、フィッティングの結果、X線結晶構造解析のものよりもかなり大きく、多くのノイズを含んでいると考えられた。その原因として、ダイマー同士が相互作用する角度が、粒子間で微妙に異なっており(図1下図)、それらを一気にマージしてしまうことで、ノイズが大きい構造モデルが生じてしまうと考えられた。

今回の結果から、電子顕微鏡を用いた複合体解析に位相板を使うメリットとして、クライオ電子顕微鏡像における粒子の目視が比較的容易なため、立体構築に用いる粒子の選抜が可能であることが考えられた。正しく粒子を選抜できれば、複合体が形成し得る多様な相互作用様式を一度に解明できる可能性がある。しかしながら、目視による粒子の選抜は、どうしても主観が入るため、専門化したソフトウェアの開発が望まれた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Nishimura, T., Nagao, R., Noguchi, T., Nield, J., Sato, F., *Ifuku, K. (2016) "The N-terminal sequence of the extrinsic PsbP protein modulates the redox potential of Cyt *b*₅₅₉ in photosystem II", *Scientific Reports* 6, 21490.
doi: 10.1038/srep21490.

*Ifuku, K., Noguchi T. (2016) "Structural Coupling of Extrinsic Proteins with the Oxygen-Evolving Center in Photosystem II", *Frontiers in Plant Science* 7: 84.
doi: 10.3389/fpls.2016.00084.

Fujii, R., Yamano, N., Hashimoto, H., Misawa, N., *Ifuku, K. (2015) "Photoprotection vs Photoinhibition of Photosystem II in Transplastomic Lettuce (*Lactuca sativa*) Dominantly Accumulating Astaxanthin", *Plant & Cell Physiology*, in press. pii: pcv187.

*Ifuku, K. (2015) "Localization and functional characterization of the extrinsic subunits of photosystem II: an update", *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* 79(8):1223-1231.
doi: 10.1080/09168451.2015.1031078.

Ido, K., Nield, J., Fukao, Y., Nishimura, T., Sato, F., *Ifuku, K. (2014) "Cross-Linking Evidence for Multiple Interactions of the PsbP and PsbQ Proteins in a Higher Plant Photosystem II Supercomplex", *Journal of Biological Chemistry* 289: 20150-20157.
doi: 10.1074/jbc.M114.574822.

[学会発表](計12件)

草間翔子、松井信太郎、Marjaana Suorsa、Eva-Mari Aro、佐藤文彦、伊福健太郎、「PsbP-Like protein 1 (PPL1) は PSII-LHCII 超複合体の安定性と光環境適応に必須である」第56回 日本植物生理学会年会, 2015.03.16.

西村太志、長尾遼、富田めぐみ、野口巧、佐藤文彦、伊福健太郎、「PsbP の N 末端ペプチド断片が光化学系 II の水分解酸素発生反応に及ぼす影響」第56回 日本植物生理学会年会, 2015.03.16.

伊福健太郎、井戸邦夫、深尾陽一朗、Jon Nield、西村太志、佐藤文彦、「化学架橋と質量分析を用いた高等植物光化学系 II における膜表面タンパク質の結合様式の解析」第56回 日本植物生理学会年会, 2015.03.18.

西村太志、長尾遼、野口巧、佐藤文彦、伊福健太郎、「PsbP の N 末端ペプチド断片が光化学系 II の水分解酸素発生反応に及ぼす影響」第6回 日本光合成学会年会, 2015/05.

横江友貴、仲村渉、藪田真也、佐藤文彦、伊福健太郎、「葉緑体 NAD(P)H dehydrogenase 様複合体の蓄積に関わる PsbQ-Like(PQL)3 タンパク質の機能解析」第56回 日本植物生理学会年会, 2015.03.18.

浅田瑞枝、西村太志、佐藤文彦、伊福健太郎、三野広幸、「光化学系 II 表面性サブユニット PsbP 結合位置の解析」第54回電子スピンスイェンス学会年会 (SEST2015), 2015/11

山野奈美、伊福健太郎、橋本秀樹、三沢典彦、藤井律子、「カルボニルカロテノイドが結合した LHCII の構造と機能」第57回日本植物生理学会年会(盛岡) 2016/03

藤井律子、山野奈美、橋本秀樹、三沢典彦、伊福健太郎、「アスタキサンチン生産レタスにおける光化学系 II の光阻害と光保護」第57回日本植物生理学会年会(盛岡) 2016/03

浅田瑞枝、西村大志、佐藤文彦、伊福健太郎、三野広幸、「PELDOR 法を用いた光化学系 II 表在性サブユニット PsbP の結合位置の解析」第 57 回日本植物生理学会年会（盛岡）2016/03

西村太志、佐藤文彦、伊福健太郎、「緑藻クラミドモナスにおける His タグ付加 PsbP タンパク質を用いた光化学系 II の機能相補と精製」第 57 回日本植物生理学会年会（盛岡）2016/03

横江友貴、仲村渉、藪田真也、佐藤文彦、伊福健太郎、「葉緑体 NAD(P)H dehydrogenase 様複合体における PsbQ-Like(PQL)3 タンパク質の局在と分子機能」第 57 回日本植物生理学会年会（盛岡）2016/03

安原咲希、佐藤文彦、伊福健太郎、「シロイヌナズナ変異体 *psbO1* における光阻害防御機構の解析」第 57 回日本植物生理学会年会（盛岡）2016/03

〔図書〕(計 1 件)

Ifuku K, Shikanai T (2015) “Regulation of photosynthetic electron transport via supercomplex formation in the thylakoid membrane”, In: “Redox Proteins in Supercomplexes and Signalosomes” (R. Louro and I. Diaz-Moreno, Eds.), CPC press, Boca Raton, FL, pp. 167-186. ISBN 9781482251104.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊福 健太郎 (IFUKU, Kentaro)
京都大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：50359783

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし