

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06217

研究課題名(和文) 光合成における電子伝達と光捕集システムの相互制御の検証

研究課題名(英文) Verification of mutual regulation hypothesis for electron flow and light harvesting system in photosynthesis

研究代表者

小澤 真一郎 (Ozawa, Shin-Ichiro)

岡山大学・資源植物科学研究所・特任助教

研究者番号：80717538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：光合成の光化学系はNPQやサイクリック電子伝達、Photosynthetic control (PCON) で保護される一方で、集光性アンテナ複合体(LHC)が光合成に利用する光エネルギーを最適化する。本研究では、これらを包括的に理解することを目指して、PCON変異株の作出ならびにその表現型の解析とLHC欠損株の解析を主に進めた。その結果、PCONはチラコイド膜ルーメンの酸性化で駆動され、強い光のもとでの光合成的生育に必要であることを発見した。また、化学架橋剤と質量分析を用いたインタラクトーム解析を駆使することによって、NPQが誘導される条件でouter LHCIが果たす構造的な役割を提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Photosynthetic controlはチラコイド膜ルーメンの酸性化に応答したb6fの電子伝達速度調整であり光合成的細胞成長にも影響が大きいことを見いだした。この機能を発揮するb6fの構造的な基盤が明らかになればさらなる機能解明が期待される。また、強光下でLHCが果たす構造的な役割も一端が見え始めてきた。解析対象を広げることで、LHCの機能をより動的に捉えることができると期待される。

研究成果の概要(英文)：The photosynthetic electron transfer system is protected by NPQ, cyclic electron transfer, and photosynthetic control (PCON), while the light-harvesting antenna complex (LHC) optimizes light energy. This study generated and characterized the PCON mutant. The data showed that PCON is driven by acidification of the thylakoid lumen and is important for photosynthetic growth under high light. In addition, mass spectrometry-based interactome analysis proposed a structural role for outer LHCI under high light where NPQ is inducible, supported by biochemical experiments using an outer LHCI subunit-deficient mutant.

研究分野：植物生理学

キーワード：Photosynthesis Plant physiology biochemistry Photosynthetic control cytochrome b6f

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酸素発生型光合成の直鎖型電子伝達 (LEF) では、葉緑体チラコイド膜内在性の光化学系 II (PSII) と光化学系 I (PSI) が直列に機能し照射下で電子伝達反応を駆動する。PSII はチラコイド膜のプラストキノン (PQ) をプラストキノール (PQH₂) に還元する。シトクロム *b₆f* (*b₆f*) は Q サイクルによって電子伝達と共役したストロマからルーメンへのプロトン移動を行ないプラストシアニン (Pc) を還元する。Pc から PSI へと電子が伝達し PSI はフェレドキシン (Fd) を還元し FNR が NADP⁺ を NADPH に還元する。一連の電子伝達反応でチラコイド膜内外のプロトン濃度勾配 (Δ pH) が形成され葉緑体 ATP 合成酵素が ADP から ATP を合成する。

光合成反応が過剰になると、NADP⁺ が不足し全体の電子伝達反応が滞り光化学系が過剰な励起状態となって損傷するリスクが出てくる。そこで、Fd の電子が PQ を還元し PSI へ電子を戻すサイクリック電子伝達経路 (CEF) が駆動され Δ pH が高まり光防御反応に必要な非光化学的消光 (NPQ) が誘導され ATP が合成される。さらに、チラコイド膜ルーメンの過剰な酸性化に応答し *b₆f* の電子伝達速度が低下する Photosynthetic control (PCON) が誘導される。PSI は CEF によって電子の詰まりが解消され、PCON によって電子伝達速度が低下することで、過剰な励起状態が回避され損傷を免れる。一方 PSII は NPQ による余剰エネルギーの散逸と複合体の品質管理で損傷を免れる。PSII の品質管理では、傷害 D1 タンパク質が葉緑体プロテアーゼ FtsH によって効率的に分解され PSII が素早く修復されることで電子伝達機能が維持される。

そして、PSI と PSII には、数多くのホモログタンパク質から構成される集光性タンパク質複合体 (LHC) が結合し光の利用効率を上げる。LHC は余剰エネルギーを散逸させる機能も持つ。維管束植物では PSI コアに 4 つの LHCI サブユニットが結合し PSI-LHCI を形成する。緑藻クラミドモナスでは PSI コアに結合する 4 つの LHCI サブユニット (inner LHCI) の外側に 4 つの LHCI サブユニットが結合し (outer LHCI) 二層構造を形成しさらに PSAG と PSAH の間で 2 つの LHCI サブユニットが PSI コアに結合する。構造解析によって、outer LHCI は余剰エネルギーを散逸させる機能を持つことが提案されている。そして、LHCI サブユニットは PSI コアと同じ化学量論で存在し結合することから PSI の光利用に特化する。また、NPQ が誘導される条件では LHCSR3 タンパク質の蓄積量が増加し余剰エネルギー散逸に寄与するとされているが LHCSR3 タンパク質が結合する場所は議論が続いている。

そして、CEF と PCON による光化学系の保護と、LHC による各光化学系における光エネルギー利用効率制御と、それぞれお互いの関連には不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、光化学系の保護機能と LHC による光エネルギー利用効率制御との相関を探ることにある。PSII は NPQ と優れた品質管理システムで保護されるが、PSI は CEF と PCON ならびに専用の LHCI 自身の機能で保護される。しかし PCON の *in vivo* での駆動や *b₆f* 自身の機能ならびに光強度に対する機能制御、そして数多くの LHCI ホモログの機能には不明な点が残されている。そこで、エネルギー散逸に特化した構造をもつことが提案された outer LHCI と高い光環境適応能力の両方を併せ持つ緑藻クラミドモナスを材料とし構造情報に基づいて PSI の保護機構を調べることで両者の相関を探る。

3. 研究の方法

本研究課題の期間では、PSI の保護機構に着目し、緑藻クラミドモナスを材料として以下の方法によって研究を進めた。

- (1) 緑藻クラミドモナスの PCON 変異株を作出し、緑藻クラミドモナスにおいて *in vivo* での PCON の駆動を観測する系を確立する。
- (2) PCON 変異株を利用して光強度に応答した PCON の代謝反応・生長への影響を解析する
- (3) CEF 変異株とプロテアーゼ変異株を利用してより広い範囲から PSI 保護機能を俯瞰する
- (4) NPQ が駆動される条件でおきるアンテナ構造の再編を化学架橋剤で処理したチラコイド膜をプロテオーム解析するインタラクトーム解析により明らかにし、LHCI サブユニット欠損株を用いて検証する。

4. 研究成果

(1) 緑藻クラミドモナスの PCON 変異株作出ならびに *in vivo* での PCON の観測手法の確立
PCON 変異は順遺伝学的に単離されたシロイヌナズナの *pgr1* が存在し、*b₆f* の PETC サブユニットの P194L 変異が記載される。*pgr1* では野生株よりも高い pH で PCON が誘導され電子伝達速度が低下し Δ pH も比較的低下するため NPQ が駆動されづらくなる。PETC 遺伝子破壊株に PETC 遺伝子を相補する逆遺伝学的手法でクラミドモナスにおける *pgr1* に相当する P171L 変異株を作出するため準備を進めた。ところが、先行論文で単離されたクラミドモナスの PETC 遺伝子破壊株は PSI の蓄積量が低下するもう一つの表現型を示すことを発見し、PETC を相補しても PSI の蓄積量は完全に回復しなかった。そこで、標準株の cc-125 と戻し交雑を行ない純化して PSI を正常に蓄積する PETC 遺伝子破壊株を単離し形質転換体を得た。ここで、PETC 遺伝子に逆遺伝学的手法で自在に変異を導入する手法を確立した。今後、*b₆f* の構造情報から予測した PCON 変異を導入し機能解析を行なうために準備を進めており、一部はすでに形質転換体を得て新たな PCON 変異株として解析し 2023 年の日本光合成学会で報告した。

PCON がかったときの b_6f の電子伝達速度を *in vivo* で測定するため、チラコイド膜ルーメンを特異的に酸化させ b_6f 自身の電子伝達速度を測定する必要がある。ドイツ・ミュンスター大学の Michael Hippler 教授のグループと共同で手法の開発を行なった。チラコイド膜ルーメンを特異的に酸化させるため、暗所かつ無酸素条件下に細胞を置き葉緑体呼吸を利用し PQH_2 をチラコイド膜に蓄積させ、光を当てることによって、ルーメンが酸性化しやすい条件を作った。 b_6f の電子伝達速度を測定するため、色素レーザーを用いた光化学系の 2 電子励起とそれに続く電子伝達を見積もるため 520 nm での吸光度の時間変化をポンピングプローブ法で測定した。これらの手法を組み合わせることで、チラコイド膜ルーメンが酸性化しやすい状態で P171L の b_6f は電子伝達速度が低下することを見いだした。そして、プロトンの脱共役剤であるナイジェリシンを入れると観察されなかった。以上より、プロトン濃度勾配に依存した PCON による b_6f の速度制御を *in vivo* で直接に測定する系を確立した。

(2) PCON が代謝反応・生長におよぼす影響と光強度との相関

細胞の増殖曲線より、P171L 株は増殖段階初期において光合成的生育速度が 1.5 倍低下したが、増殖段階後期では差が見られなかった。細胞が光を吸収するため、高細胞濃度では細胞に照射される光強度が比較的低下したためと考察し、PCON の影響はより高い照度で顕著に観測されると結論づけた。また、シロイヌナズナの *pgr1* 変異株と同様に、P171L では b_6f の電子伝達速度が遅いため ΔpH 形成が不十分となり NPQ の誘導も抑制されていた。これはバイオリアクターを利用した数日間にわたる経時的な光合成活性の測定でも確認できた。以上のことより、PCON が細胞の光合成的生育に直接影響を与えることを発見し、高い照度で影響が見られることを確認した。以上、(1) と (2) の P171L 株の解析結果は *Plant Physiol* 191(3) (2023) 1803-1817. に発表した。しかしながら、光強度に対する PCON の代謝ならびに細胞成長への定量的な解析は今後の課題となった。

(3) 葉緑体プロテアーゼ機能欠損株は CEF 機能欠損の影響を緩和する

葉緑体プロテアーゼ FtsH は光阻害により損傷した PSII の反応中心タンパク質 D1 を効率的に分解し PSII の品質を維持する。PSII の修復中は PSII の機能が低下するため PQ の還元が滞る。PSII の一時的な機能低下は光合成電子伝達全体の安全弁として機能しており、結果として高い修復機能を持たない PSI の機能維持に貢献していると考えられる。一方、CEF は PQ を還元するため b_6f の上流、PSII の下流に電子を供給しているとも考えられるので、CEF と PSII の修復による安全弁はどの程度で機能的にバランスが取られているかは光化学系と電子伝達システムの相関を探るために必要と考えられる。そこで、CEF 機能を欠損した *pgr5* 変異株と *ftsh* 変異株との二重変異株を緑藻クラミドモナスで作出し PSI の光阻害を強調させて PSI の活性を測定した。間欠光を使うことなく PSII と PSI の両方を阻害する条件を探索した結果、620nm に発光ピークをもつ LED 照射によって *pgr5* 変異株において一過性的に PSI 光阻害が起きる培養条件を確立した。そして、*pgr5ftsh* 二重変異株では PSI 光阻害が *pgr5* よりも緩和されることを見いだした。以上のことから PSI 保護機能と光質についての関連を解明する緒を得た。ただし、光阻害の緩和は一過性的であり、長期的な光合成的細胞成長への影響は緩和しないため PSII の修復による安全弁は一時的であると考えられる。以上の成果は *Plants (Basel)* 13(5) (2024) 606. に発表した。また、OHP タンパク質の解析にも共著で参加し PSII 分子集合の理解を深めた。

(4) NPQ が誘導される条件における LHCI の付加的な構造再編をインタラクトーム解析で推定

CEF と PCON が駆動される条件では NPQ も誘導され光化学系を保護する。NPQ が駆動される条件でおきる LHCI の付加的な構造再編を明らかにする目的で、NPQ が駆動される条件のクラミドモナス細胞から単離したチラコイド膜を化学架橋剤で処理し質量分析で網羅的に分析するインタラクトーム解析を行なった。その結果、NPQ が誘導される条件で特異的に蓄積量が増加し光防御に関わるとされる LHCSR3 と outer LHCI の LHCA5 と inner LHCI の LHCA3 との架橋産物を検出した。AlphaFold2 で予測した LHCSR3 の構造と既知の PSI-LHCI 構造との docking simulation を行い、構造的に可能なコンフォメーションである事を確認した。また、LHCA5 欠損株 (*lhca5*) とその相補株からチラコイド膜を単離し界面活性剤で可溶化しショ糖密度勾配超遠心で光化学系タンパク質を分離した。LHCSR3 タンパク質の分離パターンが *lhca5* では PSI-LHCI の分離パターンから外れており、架橋産物のデータを支持した。また、outer LHCI と inner LHCI 両方に存在する LHCI サブユニットである LHCA1 と LHCI との架橋産物も得られ、docking simulation で構造的な妥当性を確認した。以上の研究はドイツ・ミュンスター大学の Michael Hippler 教授のグループと共同で行い、得られた成果を原著論文にまとめ Preprints.org に公表し 2024 年 6 月 5 日に *Plants (Basel)* での掲載が決定した。

(5) 細胞内レドックスに応答した ATP 合成酵素の構造基盤

葉緑体 ATP 合成酵素は ΔpH 解消に大きく寄与し、細胞内のレドックス環境に応じて機能調整されることが知られている。東京工業大学との共同研究で、葉緑体 ATP 合成酵素の γ サブユニット特異的に見いだされるドメインが重要である事を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

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 b6f under acidic lumenal conditions	5. 発行年 2023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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Mosebach Laura, Ozawa Shin-Ichiro, Younas Muhammad, Xue Huidan, Scholz Martin, Takahashi Yuichiro, Hippler Michael	4. 巻 -
2. 論文標題 Chemical Protein Crosslinking-Coupled Mass Spectrometry Reveals Interaction of LHCl with LHClI and LHCSR3 in <i>C. reinhardtii</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 -	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20944/preprints202404.1057.v1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ozawa Shin-Ichiro, Zhang Guoxian, Sakamoto Wataru	4. 巻 13
2. 論文標題 Dysfunction of Chloroplast Protease Activity Mitigates pgr5 Phenotype in the Green Algae <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 606 ~ 606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants13050606	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Maeda Hanaki, Takahashi Koharu, Ueno Yoshifumi, Sakata Kei, Yokoyama Akari, Yarimizu Kozue, Myouga Fumiyoshi, Shinozaki Kazuo, Ozawa Shin-Ichiro, Takahashi Yuichiro, Tanaka Ayumi, Ito Hisashi, Akimoto Seiji, Takabayashi Atsushi, Tanaka Ryouichi	4. 巻 135
2. 論文標題 Characterization of photosystem II assembly complexes containing ONE-HELIX PROTEIN1 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 361 ~ 376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-022-01376-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

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 FoF1 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 -
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 小澤真一郎, Felix Buchert, Ruby Reuys, Michael Hippler, 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-Pro171-Leu変異株解析
3. 学会等名 第12回日本光合成学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shin-Ichiro Ozawa, Felix Buchert, Ruby Reuys, Michael Hippler, and 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 Chlamydomonas reinhardtii
3. 学会等名 第64回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, 高木 理世, 高橋 裕一郎
2. 発表標題 LHCA3またはLHCA7欠損株におけるPSI-LHCIの生化学的解析
3. 学会等名 第15回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2022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, ヒップラー ミハエル, 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 第63回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, Yuval Milrad, Frauke Baymann, Michael Hippler, and Yuichiro Takahashi
2. 発表標題 The mutant analysis of amino acid substitution at PETC subunit in the cytochrome b6f complex in the green alga Chlamydomonas reinhardtii
3. 学会等名 第13回日本光合成学会年会およびシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Guoxian Zhang, 坂本巨, Michael Hippler, 小澤真一郎
2. 発表標題 環状電子伝達変異と葉緑体プロテアーゼ変異との二重変異株の解析
3. 学会等名 第11回日本光合成学会年会・公開シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小澤 真一郎
2. 発表標題 光捕集タンパク質複合体構成サブユニットの安定性
3. 学会等名 第16回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小澤真一郎
2. 発表標題 緑藻クラミドモナスにおける、光捕集タンパク質複合体構成サブユニット欠損株の解析
3. 学会等名 第17回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shin-ichiro Ozawa, Felix Buchert, Ruby Reuys, Michael Hippler, and Yuichiro Takahashi
2. 発表標題 The algal PETC-Pro171-Leu suppresses electron transfer in the cytochrome b6f complex under acidic lumenal condition
3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Regulation (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shin-ichiro Ozawa, Michiyo Takagi, Andre Vidal-Meireles, Felix Buchert, Michael Hippler, Yuichiro Takahashi
2. 発表標題 Effects of the LHCA3 or LHCA7 subunit deletion on the structure and function of the Photosystem I Light-Harvesting Complex I in the green alga Chlamydomonas reinhardtii
3. 学会等名 International Congress on Photosynthesis Research 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

RECTOR Program http://www.rib.okayama-u.ac.jp/RECTOR/ 文献リスト https://www.rib.okayama-u.ac.jp/RECTOR/index.php/publications/

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
---------	---------