

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23370024

研究課題名(和文) 光化学系複合体の段階的分子集合の解明

研究課題名(英文) Investigation of successive assembly mechanism of photosynthetic complexes

## 研究代表者

高橋 裕一郎 (Takahashi, Yuichiro)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：50183447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：光合成の電子伝達系で機能する2つの光化学系と集光機能をもつアンテナは、多数のサブユニットと光合成色素などのコファクターからなる複合体を形成する。本研究ではこれら複合体の生化学的構造を明らかにし、その生合成機構の解明を進めた。その結果、系1複合体に結合するアンテナ複合体(LHCII)の量と機能の解明、電子受容体として働くナフトキノンの同定を行った。また、複合体の段階的な生合成過程を分子レベルで解明した。また、アミノ酸を遺伝子工学的に置換した形質転換体を作成し、酸素発生系で生成するプロトン排出に関与すると考えられるアミノ酸の同定を進めた。

研究成果の概要(英文)：Photosynthetic reaction center and light-harvesting antenna form a complex consisting of a number of subunits and cofactors. In the present study, structure and successive assembly of these complexes has been analyzed using biochemical and molecular biological methods. The number and function of LHCII associated to PSI complex have been determined and the major naphthoquinone has been assigned as 5'-hydroxyphyloquinone. In addition, assembly mechanism of PSI complex has been analyzed using greening experiments and overexpressor of Ycf3 and Ycf4, which are required for PSI assembly. Site-directed mutagenesis that replaces amino acid residues involved in oxygen-evolution has been carried out to find that D1-N298 is an essential residue for the activity and protection against photodamage.

研究分野：光合成

キーワード：光合成 葉緑体 チラコイド膜 光化学系 アンテナ ステート遷移 酸素発生系 キノン

## 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系には光化学系1と2(以下系1および系2)が直列に機能し、明条件下で電子伝達反応を駆動する。系1は炭酸固定系に必要なNADPHを生成する強い還元力を形成し、生育条件によりヒドロゲナーゼに電子を供給し、チオレドキシン系に還元力を渡し代謝系の活性制御を行い、ATPを生成する循環型電子伝達反応を駆動する。したがって、系1は光合成反応の鍵となるいくつかの機能を果たす重要な成分である。系1複合体は多数のサブユニットから構成され、鉄硫黄中心、ナフトキノ、クロロフィル、カロテノイドを結合する。さらに、光エネルギーを効率的に捕集するアンテナ複合体(LHCI)を結合し、PSI-LHCIと呼ばれる分子質量700kDaの超分子複合体を形成する。一方、系2は水を分解し酸素を発生する強い酸化力を形成することを特徴とするが、系2複合体も多数のサブユニットから構成され、プラストキノ、クロロフィル、フェオフィチン、カロテノイド、ヘムおよび非ヘム鉄を結合する。

光損傷・修復の速い代謝回転を特徴とする系2に比べ、系1の構造と機能は静的である。また、短期的な光環境変化に応答した光エネルギー配分を最適化するステート遷移により、系2のアンテナ複合体(LHCII)が系1へ可逆的に結合する。さらに、長期的な光環境変化に応答して、主に系1の量が増減することにより2つの光化学系の量比が調節される。このように系1複合体の構造と機能は系2とは異なる機構によりダイナミックに制御される。

酸素発生型光合成生物が様々な光環境下で光合成的に効率よく生育するには、光化学系複合体の構造と機能のダイナミクスの分子基盤の解明は重要である。特に強い酸化力を形成する酸素発生系は光損傷を受けやすい部位の一つであると考えられている。酸素

発生系を結合する系2周辺の構造は明確になったが、反応と構造の関係は不明のままである。

## 2. 研究の目的

系1は多くのサブユニットとコファクターから構成される巨大で複雑な複合体で、直鎖型と循環型電子伝達を駆動する。系1はこの2つの電子伝達活性の制御を担うため、その構造と機能は光合成生物の生育環境に応答してダイナミックに制御される。様々な光環境下における酸素発生型光合成生物の効率よい生育の理解には、系1複合体の分子集合と構造と機能の制御機構を解明することが必須である。しかし、その解明は実験技術的に難しく、最近まで研究の進展は遅れていた。本研究の目的は、系1複合体の多様な変異株を活用し、系1複合体の段階的分子集合の全体像と構造と機能の制御機構の分子基盤を明らかにすることである。一方、系2複合体は水を分解する強い酸化力を形成するが、光損傷を強く受けることが知られている。特に、水の分解反応の結果生じるプロトンは速やかに排出しないと酸素発生系およびその周辺領域が強く酸性化され、失活の原因となると考えられる。従って、系2のプロトン排出経路の解明は重要であるため、遺伝子工学の手法を用いてプロトン排出に関与する系2反応中心のアミノ酸の同定を進める。

## 3. 研究の方法

光化学系複合体の段階的分子集合過程を解明するため、完成型及び分子集合中間体の系1複合体の単離・分析する。そのため、3つの異なるアプローチをとる。(1)光化学系複合体の精製法を改善し、得られた複合体標品のサブユニットおよびコファクター組成を詳細に解析する。(2)コファクターであるクロロフィルb合成欠損と暗所でクロロフィルを合成しないy-1変異株の明所での

緑化過程における光化学系複合体の合成過程を解析し、クロロフィル合成と分子集合過程の関連を明らかにする。(3)系1複合体の分子集合因子である葉緑体遺伝子にコードされた Ycf3 と Ycf4 を過剰発現させた形質転換株を作出し、系1複合体生合成への影響を解析する。(4)系2酸素発生系に関与すると構造から予測されるアミノ酸の置換を遺伝子工学的に行い、酸素発生系の活性および光阻害に対する影響を解析する。

#### 4. 研究成果

##### 1) 光化学系複合体の精製法の改善と解析

ステート遷移によりアンテナ複合体(LHCII)が系1と2の間を移動し励起エネルギーの制御に関わっていることが知られている。我々は既にステート2に誘導した細胞から単離した系1複合体に CP26、CP29、および LhcbM5 が結合することを報告した。しかし、チラコイド膜に存在する CP29 の一部、CP26 の大部分は分離した系1複合体には結合せず遊離していた。そこで、ステート遷移を完全に誘導する条件を検討し、さらにチラコイド膜を単離・精製する方法を改善したところ、これまでより多くのLHCIIを保持する系1複合体を単離することに成功した。この複合体のLHCIIの結合量をタンパク質の<sup>14</sup>C均一ラベルにより求めたところ、およそ5コピー結合することを明らかにした。また、結合したLHCIIは励起エネルギーを反応中心クロロフィル P700 へ移動し、アンテナとしての機能を果たしていることを明らかにした。

系1複合体の精製を迅速かつ効率的に行うためタグを融合し、アフィニティー精製する方法が報告されている。しかし、これまでに報告されたタグでは、アフィニティー担体との親和性が不十分で、収率や純度の改善が求められていた。そこで、系1反応中心の一つである PsaB の N 末端に n (n ≥ 7) 残基のヒスチジンからのある n-His タグを融合した

系1複合体を発現する葉緑体形質転換体を作成した。その結果、n ≥ 13 からタグとアフィニティー担体との親和性が十分に高くなったが、系1複合体の構造や機能への影響はほとんど見出されなかった。系1複合体の精製効率は n ≥ 13 のとき 90%以上で、精製製品のサブユニットは PsaN と PsaO 以外はすべて存在した。失われたサブユニットは系1複合体への結合が弱いことが分かっており、今後は精製条件を改善することが必要である。

系1の電子受容体として機能するナフトキノンは、生物種によりフィロキノン、ヒドロキシフィロキノン、メナキノンであることが知られているが、緑藻クラミドモナスは光合成のモデル生物でありながらその化学種は未同定のままであった。細胞、チラコイド膜および系1標品のキノンを分析した結果、主要な成分は 5'-hydroxyphyllquinone で phylloquinone も 10%程度存在することを明らかにした。系1欠損株のチラコイド膜にはナフトキノンは検出されないことから、すべてのナフトキノンは系1複合体に結合すると結論した。

系2複合体の精製には6-His タグと Strep タグを融合することにより行った。現在のところ、タグとアフィニティー担体との親和性が十分に高くなく、収率の改善が必要であると考えられる。

##### 2) クロロフィル合成変異株を用いた光化学系複合体の分子集合の解析

緑藻クラミドモナスは暗所で生育させてもクロロフィルを合成するため、クロロフィルタンパク質複合体を合成する。しかし、暗所でクロロフィルを合成しない y-1 変異株を用いて、明所での緑化過程において、安定同位元素でラベルし、高感度の質量分析器で解析することにより、新規に合成されるタンパク質を網羅的に解析する方法を確立した。データはまだ分析中であるが、系2複合体の生合成に関与する因子などが暗所でも存在

することが示された。本方法は強力な手法でチラコイド膜上のクロロフィルタンパク質の生合成の解析に有用であると言える。

緑化の過程における光合成色素の蓄積を逆層クロマトグラフィーで詳細に分析した。黄化細胞においてはカロテンが多量に蓄積しているが、緑化に伴いキサントフィルの蓄積量が増加することが分かった。カロテンはキサントフィルの前駆体であるので、緑化の過程でカロテンからキサントフィルが合成されたと考えられる。興味深いことに緑化の初期において最初に蓄積するクロロフィルはゲラニルゲラニルクロロフィル (GG-Chl) であった。緑化が進行するに伴い、GG-Chl はゲラニルゲラニルレダクターゼ (GGR) の作用により段階的に還元され、DHGG-Chl、THGG-Chl を経て最終的にクロロフィルが生成された。各緑化過程におけるクロロフィルタンパク質の蓄積を調べたところ、2つの光化学系とアンテナ複合体は同様の速度で蓄積することが示された。しかも、緑化途上の細胞から単離したクロロフィルタンパク質には前駆体である GG-Chl、DHGG-Chl、THGG-Chl が結合していた。従って、GG-Chl の GGR による還元反応は、クロロフィルタンパク質上で進行すると考えられる。しかし、どのような分子機構で還元反応が起こるのかについては興味深い問題であるがその詳細は不明である。

GGR 活性を欠損する変異株は GG-Chl しか蓄積しないので、緑化の過程で蓄積した GG-Chl を結合するクロロフィルタンパク質の性質を解析するためには有用である。UC Barkley の Niyogi 教授より譲渡された GGR 欠損株を用いてクロロフィルタンパク質の蓄積などを解析したところ、光合成的にはほとんど生育せず、従属栄養条件下で生育させた細胞は光感受性が極めて高いことが分かった。従属栄養条件下で生育させた細胞のクロロフィルタンパク質を分離すると、アンテナ

複合体の LHCII は正常に蓄積するが、2つの光化学系複合体の蓄積量は野生株の 20%程度に減少していた。また、比較的弱い光条件下においては光化学系複合体が更に不安定になることが分かった。通常は系 2 複合体が光に対して不安定であるが、GGR 変異株では系 1 複合体が著しく不安定であった。クロロフィルの構造の違いが光化学系複合体の安定性に大きく影響を与えることは、複合体の構造の維持にクロロフィルも大きく関与していることを示している。

### 3) 系 1 複合体の分子集合

系 1 複合体は複雑でサイズの大きな構造をもつため、その分子集合機構のほとんどは未知のまま残されている。我々は既に分子集合因子である葉緑体遺伝子にコードされた Ycf3 と Ycf4 がクラミドモナスの系 1 複合体の分子集合に必須であることを示している。本研究ではこれらの 2つの因子を過剰発現させた形質転換株を作出し、系 1 複合体生合成への影響を解析した。その結果、HA タグを Ycf4 に融合して過剰発現させることに成功した。系 1 複合体の蓄積量は特に変化は認められなかったが、光従属栄養条件下での生育は促進されることが示された。また、HA タグを利用して Ycf4 をアフィニティー精製したところ、新規合成されたと考えら得る系 1 複合体を結合した標品が精製できた。この手法により系 1 複合体の分子集合過程の解明を更に進めて行きたい。一方、Ycf3 を過剰発現させた株は光合成的生育がわずかであるが低下した。この表現型は予想外のことであり、その理由については今後の解析により明らかにしていきたい。

### 4) 系 2 酸素発生系の構造

結晶構造解析から酸素発生系のプロトン輸送に関与する推定されるアミノ酸の置換を遺伝子工学的に行い、酸素発生系の活性および光阻害に対する影響を解析した。反応中心サブユニットの D1 上の N-298 を他の 19 種

のアミノ酸に置換した形質転換体を作成したところ、すべての株において酸素発生活性が低下もしくは失われた。酸素発生を保持している株もその活性が極めて光に弱いことから N-298 は酸素発生系の活性や光阻害耐性にとって極めて重要であることが示された。

#### 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)

1. Kato, Y., Ozawa, S., Takahashi, Y. and Sakamoto, W. D1 fragmentation caused by photo-damage if a two-step model. *Photosynthesis Research*, 144 (2015) DOI 10.1007/s11120-015-0144-7
2. H. Kuroda, N. Kodama, X.-Y. Sun, S. Ozawa and Y. Takahashi, Requirement for Asn298 on D1 Protein for Oxygen Evolution: Analyses by Exhaustive Amino Acid Substitution in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 55(2014)1266-1275
3. H. Takahashi, A. Okamuro, J. Minagawa and Y. Takahashi, Biochemical characterization of photosystem I-associated light-Harvesting complexes I and II isolated from state 2 cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 55(2014)1437-1449
4. S. Ozawa, M. Kosugi, Y. Kashino, T. Sugiura, and Y. Takahashi, 5'-Monohydroxyphyllloquinone is the dominant naphthoquinone of PSI in the green alga *C. reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 53(2012)237-43.
5. N. Inoue-Kashino, Y. Kashino, and Y. Takahashi, Psb30 is a photosystem II reaction center subunit and is required for optimal growth in high light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 104 (2011) 220-228.

6. [学会発表](計51件)

1. 黒田洋詩, 兒玉なつ美, 上田和世, 孫小羽, 菓子野康浩, 高橋裕一郎 光化学系 II 反応中心 D1 タンパク質の Asn-298 変異株の酸素発生活性の解析 日本植物生理学会年会(東京農大) 2015年3月16-18日
2. S. Kodru, K. Niyogi, and Y. Takahashi, Chlorophyll Protein Complexes in Geranylgeranyl Reductase Mutant of the

green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. 日本植物生理学会年会(東京農大) 2015年3月16-18日

3. S. Nellaepalli, H. Kuroda, S. Ozawa, and Y. Takahashi, Isolation of Photosystem I Assembly Machinery Containing Ycf3 and Ycf4 by Affinity Chromatography from *Chlamydomonas reinhardtii*. 日本植物生理学会年会(東京農大) 2015年3月16-18日
4. 小澤真一郎, 大西岳人, 高橋拓子, 高橋裕一郎 緑藻クラミドモナスの光化学系 I 集光性複合体の構造 日本植物生理学会年会(東京農大) 2015年3月16-18日
5. 上田和世, 黒田洋詩, 兒玉なつ美, 菓子野康浩, 高橋裕一郎 光化学系 II 酸素発生系における D1 タンパク質上の Asp-61 の役割と解析 日本植物生理学会年会(東京農大) 2015年3月16-18日
6. H. Kuroda, N. Kodama, X.-Y. Sun, Y. Takahashi. Mutagenesis of D1-N298 impaired photosystem II activity in *C. reinhardtii*. 日本植物生理学会年会(富山大) 2014年3月18-20日
7. S. Kodru, K. Niyogi, Y. Takahashi Chlorophyll protein complexes in geranylgeranyl reductase mutant of the green alga *C. reinhardtii*. 日本植物生理学会年会(富山大) 2014年3月18-20日
8. S. Nellaepalli, H. Kuroda, Y. Takahashi, Overexpression of chloroplast ycf4 gene improves photoautotrophic growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. 日本植物生理学会年会(富山大) 2014年3月18-20日
9. 黒田洋詩, 兒玉なつ美, 孫小羽, 小澤真一郎, 高橋裕一郎 緑藻クラミドモナス光化学系 II サブユニット D1 の N298 への部位特異的変異導入 第71回中国四国植物学会(岡理大) 2014年5月10-11日
10. 黒田洋詩, 兒玉なつ美, 孫小羽, 小澤真一郎, 高橋裕一郎 緑藻クラミドモナスにおける D1 タンパク質のアミノ酸置換による PSII 活性への影響 第5回日本光合成学会年会および公開シンポジウム(近畿大) 2014年5月30-31日
11. 黒田洋詩, 兒玉なつ美, 孫小羽, 小澤真一郎, 高橋裕一郎 緑藻クラミドモナス D1 タンパク質の Asn298 のアミノ酸置換による酸素発生活性への影響 光合成セミナー(名工大) 2014年7月12-13日
12. 黒田洋詩, 孫小羽, 兒玉なつ美, 小澤真一郎, 高橋裕一郎 系 II 反応中心 D1 タンパク質の Asn298 のアミノ酸置換による酸素発生活性への影響 日本植物学会(明大) 2014年9月12-14日
13. 孫小羽, 黒田洋詩, 兒玉なつ美, 高橋裕一郎 Mn クラスタールーメンをつなぐ水素結合ネットワークに関するアミノ酸の置換 日本植物学会(明大) 2014年

- 9月12-14日
14. 小澤真一郎、大西岳人、高橋拓子、松村拓則、高橋裕一郎 緑藻クラミドモナスの光化学系Ⅰ集光性アンテナ複合体の構造 クラミドモナス研究会(高知市文化プラザ)2014年10月3-4日
  15. 松本洋平、S. Bujaldon、F.-A. Wollman、高橋裕一郎 緑藻クラミドモナス光感受性株の生化学的解析日本植物生理学会年会(岡大)2013年3月21-23日
  16. H. Kuroda、X.-Y. Sun、N. Kodama、Y. Takahashi, Engineering of a potential proton exit channel of photosystem II in *C. reinhardtii*. 日本植物生理学会年会(岡大)2013年3月21-23日
  17. 高橋裕一郎 光化学系Ⅰ複合体の構造と分子集合 日本植物学会(北大)2013年9月13-15日
  18. 松本洋平、S. Bujaldon、F.-A. Wollman、高橋裕一郎 緑藻クラミドモナス高光感受性株の生化学的解析 日本植物学会(北大)2013年9月13-15日
  19. 孫小羽、黒田洋詩、高橋裕一郎 タンパク質工学による酸素発生系プロトン排出経路の同定の試み 日本植物学会(北大)2013年9月13-15日
  20. 黒田洋詩、高橋裕一郎 酸素発生系プロトン排出経路の同定へ向けた光化学系Ⅱサブユニットのエンジニアリング 日本植物学会第77回大会(北大)2013年9月13-15日
  21. 兒玉なつ美、井坂敬文、S. Bujaldon、F.-A. Wollman、高橋裕一郎 緑藻クラミドモナスのクロロフィルb欠損株のクロロフィルタンパク質の生化学的解析 日本植物学会(北大)2013年9月13日-15日
  22. Y. Takahashi, Molecular mechanism for photosystem I complex assembly 国際シンポジウム(京大)2013年12月12日
  23. 高橋裕一郎、兒玉なつ美、杉本育代、久保諒太 緑藻クラミドモナスの光化学系Ⅰ複合体のアンテナサブユニットの生化学的解析 日本植物生理学会年会(京産大)2012年3月16-18日
  24. Y. Takahashi, Dynamics of structure and function of photosystem I complex. Japanese-Finnish Seminar 2012, Naantali Spa Hotel, Naantali, Finland, 2012年9月8-13日
  25. 高橋裕一郎、松崎英典 クラミドモナス *y-1* 変異株の緑化過程に伴うクロロフィルタンパク質の生合成 日本植物学会(兵庫県立大学)2012年9月15日-17日
  26. Y. Takahashi, Biogenesis of chlorophyll-protein complexes during greening of *Chlamydomonas y-1* cells. Okayama University International Symposium(岡大)2012年10月22-23日
  27. 高橋裕一郎 クロロフィルタンパク質複合体:膜タンパク質の精製法とタンパク

- 質・色素・キノンの分析法を中心に 光合成セミナー(大阪)2011年7月8-9日
28. 松崎英典、高橋裕一郎 クラミドモナス *y-1* 変異株の緑化に伴う光化学系Ⅰ複合体の分子集合過程の解析 日本植物学会(東大)2011年9月17-19日
  29. 浅田浩紀、兒玉なつ美、井上名津子、高橋裕一郎 緑藻クラミドモナスの光化学系超分子複合体のサブユニット構造の解析 日本植物学会(東大)2011年9月17-19日
  30. 高橋裕一郎、小澤真一郎、松崎英典 クラミドモナスのキノンとクロロフィルの分析 クラミドモナス・ワークショップ(岡崎)2011年11月25-26日

〔図書〕(計2件)

1. 高橋裕一郎 エネルギー代謝 (分担) 第2版 現代生物学入門(2011)186ページ 岡山大学出版会
2. 高橋裕一郎 光化学系Ⅰの分子構造と機能 (分担)(2015)光合成のエネルギー変換と物質変換 人工光合成をめざして 杉浦美羽・伊藤繁・南後守編 281ページ 化学同人

〔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

[http://www.biol.okayama-u.ac.jp/takahashi\\_y/index.htm](http://www.biol.okayama-u.ac.jp/takahashi_y/index.htm)

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋裕一郎(YUICHIRO TAKAHASHI)

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

該当なし

(3)連携研究者

該当なし