

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23687008

研究課題名(和文) ストレス環境耐性を持つコケ植物特有の光エネルギー制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of light energy redistribution mechanisms under stress environments in the moss *Physcomitrella patens*

研究代表者

岩井 優和 (Iwai, Masakazu)

独立行政法人理化学研究所・光量子工学研究領域・客員研究員

研究者番号：80553768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,600,000円、(間接経費) 5,580,000円

研究成果の概要(和文)：植物は効率の良い光合成反応を維持するため、葉緑体チラコイド膜で吸収した光エネルギーを光化学系1(PSI)と光化学系2に必要量に調節し伝達する。本研究では、コケ植物(*P. patens*)で新しく発見されたLhcb9の光エネルギー制御機構を解明することを目的とする。生化学的・分光学的解析結果、Lhcb9は2種類の分子量を持つPSI超複合体の形成に重要であることが分かった。光環境変化にตอบสนองして、2種類のPSI超複合体の量比が変化することも分かった。系統樹解析によると、Lhcb9は緑藻から水平移動によって獲得したことが分かり、*P. patens*の進化の過程で重要な働きがあったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To maintain the efficient photochemistry under fluctuating light environments, absorbed light energy has to be redistributed between photosystem I and II (PSI and PSII) in chloroplast thylakoid membranes. In this study, we investigated the energy redistribution mechanism of a recently discovered light-harvesting complex (LHC) protein, Lhcb9, in the moss *Physcomitrella patens*. Our results indicated that two different types of PSI supercomplex exist in *P. patens* thylakoid membranes, and Lhcb9 is essential for the formation of the larger PSI supercomplex. Moreover, we demonstrated that Lhcb9 is involved in the adjustment of the functional antenna size of PSI supercomplex under high light conditions. Our results implied that Lhcb9 is important for the adjustable PSI light-harvesting system for conquering dynamic environmental interface between aquatic and terrestrial conditions during the evolution.

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子生物・生理学

キーワード：光環境適応機構 ヒメツリガネゴケ 集光アンテナタンパク質

1. 研究開始当初の背景

光合成生物は、葉緑体チラコイド膜に存在する光化学系タンパク質複合体 (PSI と PSII) と集光アンテナタンパク質との相互作用様式を改変し再編成することで光環境の変化に順応していると考えられている。特に、PSII に属する集光アンテナタンパク質 (LHCII) が、各光化学系へ伝達される光エネルギー量の調節する役割を担っていると考えられている。

これまでに、シアノバクテリア、緑藻、そして陸上植物に関する光エネルギー伝達機構について多く研究がされてきたが、コケ植物についてはまだほとんど明らかとなっていない。コケ植物ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) の全ゲノムが2007年に解読され、Lhcb9 と呼ばれるコケ特有の新規 LHCII が発見された。これまでに研究されてきた LHCII と大きく異なる点として、通常 PSI に属する集光アンテナタンパク質 (LHCI) が持つエネルギー準位の低いクロロフィルを Lhcb9 が持っていることが挙げられる。その理由や、Lhcb9 がエネルギー伝達機構においてどのような働きをするかなど、その詳細についてはまだ分かっていない。これまで研究されている LHCII の特徴とは異なる新規 LHCII がコケ植物に存在していることは非常に興味深く、コケ植物特有のエネルギー制御機構に Lhcb9 が重要な役割を担っていることが期待できる。従って、コケ植物特有の光環境適応機構を紐解くために、Lhcb9 の機能を理解することは必須であると考えられる。

2. 研究の目的

コケ植物は、植物が陸上に進出するきっかけとなる生物種と考えられている。また様々なストレス環境に対して耐性を持つことが知られていることから、コケ植物の光エネルギー伝達機構について研究することは有意義であると考えられる。コケ特有の LHCII である Lhcb9 を解析する上で、本研究で重視することは、生化学的解析を主軸に研究を推進することである。また、*P. patens* は、核遺伝子の相同組換えによる形質転換が可能な唯一の植物であるため、欠損株やタグ付与変異株を作成することで、生化学的解析の水準を最大限に引き上げることができる。本研究では、まず、*P. patens* チラコイド膜に存在する光化学系タンパク質複合体の分離精製、光化学系と集光アンテナタンパク質の相互作用の変化、また系統樹解析による Lhcb9 が持つ進化的な特徴について明らかにする。本研究によって、*P. patens* が持つ Lhcb9 の機能的な働きが明らかとなり、コケ植物の生息環境における光環境適応機構の意義について明らかとなる。

3. 研究の方法

【*P. patens* 形質転換体の作成】

P. patens は、相同組換えにより核遺伝子の改変ができる唯一の植物種である。植物が持つ集光アンテナタンパク質の全てが核遺伝子であるため、その遺伝子改変が自由に行える点は研究を進める上で有益である。

①Lhcb9 欠損株の作成

P. patens には、Lhcb9 をコードする遺伝子が二つあるため、次の三種類の欠損株の作成を行った。

- ΔLhcb9. 1
- ΔLhcb9. 2
- ΔLhcb9. 1/9. 2

②Lhcb9-His 変異株の作成

集光アンテナタンパク質の N 末端にはシグナル配列があるため、C 末端に His タグを付与した変異株の作成を行った。Lhcb9 をコードする遺伝子が二つあるため、次の2種類の変異株を作成した。

- Lhcb9. 1-His
- Lhcb9. 2-His

③変異株の単離

PEG 法によるプロトプラストの形質転換を行い、適宜薬剤耐性を保持する変異株を単離する。また、形質転換の確認は、DNA 解析と RT-PCR 解析によって行う。

【*P. patens* チラコイド膜の生化学的解析】

P. patens 野生株からチラコイド膜を精製する。その後、界面活性剤を用いて、光化学系タンパク質と集光アンテナタンパク質を可溶化し、ショ糖密度勾配超遠心法によって分離精製する。各画分に存在するタンパク質を SDS-PAGE 並びにウェスタン解析によって明らかにする。野生株と同様に、Lhcb9 欠損株から精製したチラコイド膜を用いて解析を行い、野生株との違いを見出す。

【光化学系タンパク質複合体と Lhcb9 の相互作用解析】

精製された光化学系タンパク質を時間分解蛍光寿命解析を行い、Lhcb9 が含まれるタンパク質複体内でのエネルギー伝達効率について解析する。時間分解蛍光寿命解析は、秋本誠志准教授 (神戸大学) と横野牧生博士 (北海道大学) と共同で行う。

Lhcb9-His 変異株から精製したチラコイド膜を界面活性剤で可溶化し、ニッケル吸着アフィニティー精製を行う。この時、Lhcb9 に結合する光化学系タンパク質複合体を SDS-PAGE 並びにウェスタン解析によって明らかにする。Lhcb9. 1-His と Lhcb9. 2-His における違いも確認する。

また、Lhcb9-His と相互作用する光化学系タンパク質複合体の変化の有無を調べるため、ゲルろ過を用いて解析を行う。

【Lhcb9 の系統樹解析】

コケ植物が持つ多様な集光アンテナタンパク質のアミノ酸配列を用いて、他の植物が持つ集光アンテナタンパク質との類似性を

BLAST 解析によって行う。得られた結果を基に、系統樹解析を行い Lhcb9 の進化的な背景を明らかにし、他の植物が持つ集光アンテナタンパク質との関連を見出す。系統樹解析は、横野牧生博士（北海道大学）と共同で行う。

4. 研究成果

①形質転換体の作成について

上述した形質転換体 (Δ Lhcb9. 1、 Δ Lhcb9. 2、 Δ Lhcb9. 1/9. 2、Lhcb9. 1-His、Lhcb9. 2-His) の作成は全て成功した。特に、内在する核遺伝子にコードされる LHCI に His タグが付与した例は本研究が初めてであり、*P. patens* の特徴である相同性組換えの有用性が示された。

欠損株の確認は、PCR 解析と RT-PCR 解析によって行い、His タグ変異株の確認は、PCR 解析、シーケンス解析、そしてニッケル吸着アフィニティー精製によって行った。いずれも予想通りの結果を得ることができた。

②*P. patens* 野生型チラコイド膜に存在する 2 種類の PSI-LHCI 超複合体について

ショ糖密度勾配超遠心によって、*P. patens* 野生型のチラコイド膜には、少なくとも 5 つの光合成に関連するタンパク質複合体 (B1~B5) が存在することが分かった (図 1 A)。B3 は PSI-LHCI 超複合体、B5 は PSII-LHCII 超複合体であることが分かった。Lhcb9. 1 は B4 に含まれており、更に PSI-LHCI も含まれていることが分かった。Lhcb9. 1 欠損株では、B4 が形成されなかったことから、Lhcb9. 1 は B4 で形成されるタンパク質超複体に重要であることが示唆された (図 1 C)。一方、

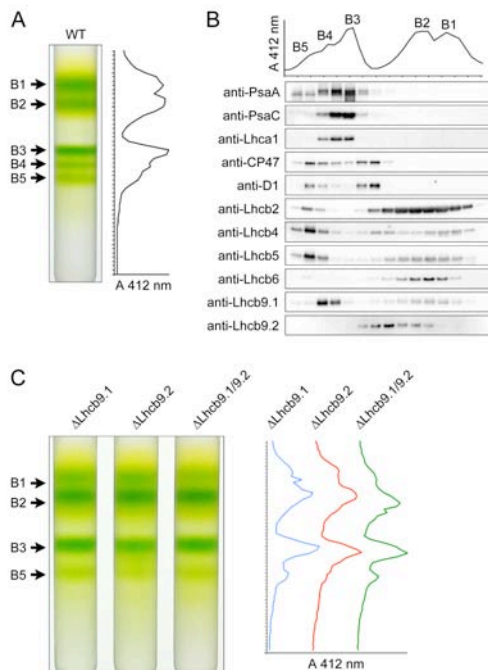


図 1. ショ糖密度勾配超遠心による光化学系タンパク質などの単離精製

Lhcb9. 2 は B4 には存在しておらず、オリゴマーを形成する Lhcb4 と相互作用していることが分かった。しかし、Lhcb9. 1 と Lhcb9. 2 の存在量は前者の方が圧倒的に多いことが分かった。 Δ Lhcb9. 2 では、B4 の形成が不安定化しているため、Lhcb9. 2 は複合体形成の安定に関わっていることが示唆された。

次に、B3、B4、B5 を別々に精製し、時間分間蛍光寿命解析を行った (秋本誠志准教授と横野牧生博士との共同研究)。その結果、B3 と B5 の結果と比較すると、B4 には主に PSI-LHCI が含まれており、Lhcb9 によって PSI に属する集光アンテナタンパク質 LHCI のサイズが大きくなっていることが明らかとなった。これらのことから、Lhcb9 は機能的に PSI-LHCI に結合していることが強く示唆され、2 種類の異なるサイズを持つことで、コケ特有の光環境適応の仕組みを持っていることが考えられる。

③Lhcb9 を含む光化学系タンパク質複体の相互作用の変化

Lhcb9-His をニッケル吸着アフィニティー精製すると、PSI-LHCI 超複体が含まれていたため、Lhcb9 との強い相互作用を裏付けることができた。強光ストレスを 1 時間与えると、Lhcb9 を含む分子量の大きい PSI-LHCI 超複体の量比が減少した。一方、分子量の小さい PSI-LHCI 超複体の量比が増加した。このことから、*P. patens* は、光環境の変化において、PSI-LHCI 超複体の集光アンテナサイズを変換していることが分かり、その際 Lhcb9 との結合が重要であることが示唆される。

④緑藻との共通祖先から水平移動による Lhcb9 の獲得

系統樹解析によると、Lhcb9 以外の集光アンテナタンパク質は高等植物のそれと相同性が高いことが分かった。しかし、Lhcb9 についてのみ、緑藻クラミドモナスの Lhcbm5 と相同性が高いことが分かった。Lhcbm5 も PSI-LHCI と結合することが分かっており、双方の機能的な関連があることが考えられる。また、Lhcb9 だけは、緑藻の祖先からの水平移動によって獲得されたことが強く示唆された (図 2)。これまでにも、*P. patens* に存在する複数の遺伝子が水平移動によって獲得されていることが報告されていたが、今回初めて集光アンテナタンパク質の水平移動による獲得が明らかとなった (横野牧生博士との共同研究)。この Lhcb9 の水平移動による獲得についての詳細は全く不明であるが、水平移動によって獲得されたと考えられるその他の遺伝子の多くがハウスキーピング遺伝子と考えられていることから、コケ植物が進化の過程で陸上へ進出する際に重要な働きをしていたとする一つの仮説を提唱できる。また、緑藻の Lhcbm5 とコケ植物の Lhcb9 共に、PSI 超複体の集光アンテナサイズを

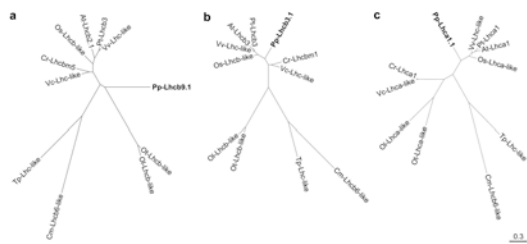


図 2. Lhcb9 の系統樹解析

決定するのに重要であることが考えられることから、高等植物においても同様に機能することが示唆される。

⑤Lhcb9 のタンパク質構造予測

Lhcb9.1 と Lhcb9.2 はそれぞれ緑藻の Lhcbm5 と相同性が高いことが系統樹解析によって分かった。しかし、野生型、 Δ Lhcb9.1 と Δ Lhcb9.2 の解析から、Lhcb9.1 と Lhcb9.2 は異なる働きをすることが示唆される。Lhcb9.1 は主に PSI-LHCI 超複合体との結合に重要であることが分かったが、Lhcb9.2 に関しては、Lhcb4 との親和性が高いことが分かった。この親和性の違いがタンパク質構造との違いと相関があるか調べるために、タンパク質の構造予測解析を行った（横野牧生博士との共同研究）。その結果、Lhcb9.1 には無いリン酸化修飾部位が Lhcb9.2 に存在することが明らかとなった（図 3 g, h の矢印で示した緑色の部分）。このリン酸化修飾部位は、高等植物の LHCII でも保存されており（図 3 j）、結合様式の相違になんらかの影響を与えていることが示唆された。同様の部位は緑藻の Lhcbm5 にも保存されていることが分かった（図 3 i）。これらのことから、Lhcb9.1 と Lhcb9.2 のタンパク質複合体形成の親和性の違いは、リン酸化部位の違いに基づくものと考えられた。

これらのリン酸化部位は光環境変化に重要な機能を持つステート遷移と呼ばれる機構に重要であることが分かっており、Lhcb9.1 に関しては PSI との親和性が常にあるが、Lhcb9.2 に関しては、ある特定の環境ストレス下において何らかの働きがあることも考えられる。これらの解析についても、コケ植物の相同組換えによる変異体解析をすることで可能であり、リン酸化修飾を担うキナーゼの欠損株などを作成し、解析することで、更に Lhcb9.1 と Lhcb9.2 の機能について解析することができる。

⑥まとめ

P. patens のチラコイド膜には、2種類の PSI-LHCI 超複合体が存在しており、分子量の大きい方には Lhcb9 が含まれていることが分かった。Lhcb9 を基点にし、PSI-LHCI のアンテナサイズを変換させ、光環境の変化に対応していることも分かった。Lhcb9.1 と Lhcb9.2 の機能的な相違からタンパク質部位（特にリン酸化修飾部位）が光化学系タンパク質超複

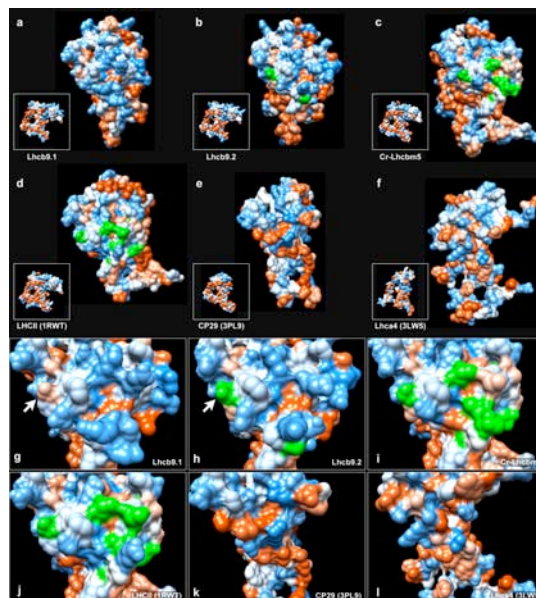


図 3. Lhcb9 のタンパク質構造解析

合体の相互作用様式に関わっていることも示唆された。進化的な観点から、Lhcb9 は緑藻との共通祖先から水平移動によって獲得されたことが考えられ、コケ植物が陸上に進出する際に重要な働きをしていたことが示唆された。

本研究によって、*P. patens* の相同組換えによる核遺伝子コードの光合成関連タンパク質の解析が可能であることが示された。今後、*P. patens* を用いた同様のアプローチによって、より複雑な制御機構の解明へと繋がることが期待できる。

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 3 件）

- ① Masakazu Iwai, Makio Yokono, Akihiko Nakano, Visualizing structural dynamics of thylakoid membranes. *Scientific Reports* 4, 3768; DOI:10.1038/srep03768 (2014).
- ② 岩井優和, クロロフィル蛍光解析における時空間軸のギャップ, 光合成研究 23: 118-124 (2013).
- ③ Masakazu Iwai, Chan-Gi Pack, Yoshiko Takenaka, Yasushi Sako, Akihiko Nakano, Photosystem II antenna phosphorylation-dependent protein diffusion determined by fluorescence correlation spectroscopy, *Scientific Reports* 3, 2833; DOI:10.1038/srep02833 (2013).

〔学会発表〕（計 10 件）

- ① 岩井優和, クロロフィル蛍光解析における時空間軸のギャップ 第 4 回日本光合成学会年会, 名古屋大学, 2013 年 5 月 31 日.

② 岩井優和, 白燦基, 佐甲靖志, 中野明彦, 葉緑体チラコイド膜タンパク質の拡散速度と光環境適応 第54回日本植物生理学会年会, 岡山, 2013年3月21日.

③ 岩井優和, 光合成から「イメージ」する宇宙環境と地球の未来, 理研シンポジウム「きぼう」に夢を乗せて(2), 和光, 2013年3月7日.

④ 岩井優和, Live Cell Imaging of Chloroplast Internal Structure Dynamics, Okayama University International Symposium “Structure and Dynamics of Photosynthetic Systems”, 岡山, 2012年10月22日.

⑤ 岩井優和, Visualizing chloroplast internal activities by using live cell imaging techniques, Japanese-Finland International Seminar 2012, Naantali, 2012年9月10日.

⑥ 岩井優和, Visualizing thylakoid membrane structure dynamics, Gordon Research Conference 2012 Photosynthesis, Davidson, 2012年7月8日.

⑦ 岩井優和, Enlarging the moss chloroplasts to see what happens inside, MOSS2012, Bronx, 2012年6月16日.

⑧ 岩井優和, 中野明彦, 葉緑体チラコイド膜構造のライブセルイメージング, 第53回日本植物生理学会年会, 京都, 2012年3月16日.

⑨ 岩井優和, 白燦基, 武仲能子, 佐甲靖志, 中野明彦, 集光アンテナタンパク質のリン酸化によって、チラコイド膜タンパク質の移動度が増加する, クラミドモナスワークショップ2011, 岡崎, 2011年11月25日.

⑩ 岩井優和, 白燦基, 武仲能子, 中野明彦, 葉緑体集光アンテナタンパク質のリン酸化修飾による チラコイド膜タンパク質の移動度の変化, 植物脂質シンポジウム, 東京, 2011年9月20日.

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩井優和 (IWAI Masakazu)
理化学研究所 光量子工学研究領域 ラ
イブセル分子イメージング研究チーム
研究者番号: 80553768

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: