

氏 名 小菅 晃太郎

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2045 号

学位授与の日付 平成 30 年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 緑藻クラミドモナスにおける LHCSR1 の局在と機能の解析

論文審査委員 主 査 教授 長谷部 光泰  
教授 皆川 純  
教授 青木 一洋  
教授 石崎 章仁  
物理科学研究科 構造分子科学専攻

(様式3)

## 博士論文の要旨

氏名 小菅 晃太郎

論文題目 緑藻クラミドモナスにおける LHCSR1 の局在と機能の解析 Analysis of LHCSR1 localization and function in *Chlamydomonas reinhardtii*

For photosynthetic organisms, light is essential for growth. However, when they are exposed to light that surpasses their photosynthetic capability, the excess energy causes harmful reactive oxygen species (ROS) production followed by Photosystem II (PSII) destruction. This damage is referred to as photoinhibition, which ultimately leads to growth suppression and cell death. Thus, to cope with such adverse environments, photosynthetic organisms have developed a mechanism, termed non-photochemical quenching (NPQ) that dissipates excess light energy as heat. There are three major components of NPQ; qT quenching, in which light harvesting antenna (LHCII) migrate from PSII to Photosystem I (PSI) and help to distribute excess energy to both photosystems; qI quenching which prevents PSII from absorbing excess light energy by disrupting the PSII core protein PsbA and finally, qE quenching, induced by luminal proton gradient formation leading to Chlorophyll fluorescence lifetime reduction. The earliest response of NPQ is qE quenching caused by the shift from dark to high light (HL). In the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, LHCSR1 and LHCSR3 proteins, which belong to the light-harvesting antenna proteins, are involved in this function. According to previous reports, LHCSR3 is expressed under HL, forming a PSII-LHCII-LHCSR3 supercomplex. Under excess light conditions, a proton gradient on the luminal side of the thylakoid membrane is upregulated and LHCSR3 contributes to qE quenching. The LHCSR3 deficient mutant, *npq4*, cannot survive under HL. Therefore, this protein has been recognized as a main factor of qE induction in *C. reinhardtii*. LHCSR1 is also expressed under HL and induces low pH dependent fluorescence quenching in LHCII. LHCSR3 has been well studied as a main qE

quenching factor, however, little knowledge about LHCSR1 has been accumulated. For further understanding of qE quenching, I performed biochemical and spectroscopic analyses and investigated localization and function. LHCSR1 has 87% primary sequence identity to LHCSR3, therefore this study was conducted on a hypothesis that LHCSR1 forms a PSII-LHCII-LHCSR1 supercomplex and contributes to qE quenching in a similar manner to LHCSR3. *C. reinhardtii* cells were incubated under HL and the thylakoid membrane were purified. The thylakoid membranes were solubilized by detergent  $\alpha$ -dodecyl maltoside and protein complexes were separated by sucrose density gradient (SDG) centrifugation. To investigate LHCSR1 localization, the separated fractions were used for immunoblot analysis, however, PSII-LHCII-LHCSR1 supercomplex was not detected. Under HL, only a small amount of LHCSR1 was expressed as compared with LHCSR3. Thus, to determine LHCSR1 localization, conditions to accumulate more LHCSR1 needed to be discovered. Our laboratory had demonstrated that LHCSR1 was specifically expressed under UV illumination. Therefore, a house built light source was constructed to illuminate samples under UV for accumulate LHCSR1. Cells exposed to using this new light source were subjected to SDG and immunoblot analysis. However, exact LHCSR1 localization was still not clarified. Although I could not determine the LHCSR1 localization, the PSII fraction would have energy quenching ability if LHCSR1 formed PSII-LHCII-LHCSR1 supercomplex. I therefore performed fluorescence lifetime measurement, but the PSII fraction did not exhibit fluorescence quenching. From this result, LHCSR1 function might have been lost upon thylakoid solubilization. To test this hypothesis, non-solubilized thylakoid membrane was used for further analysis and the result indicated that LHCSR1 has fluorescence quenching ability on the thylakoid membrane under acidic conditions. For further LHCSR1 analysis, fluorescence decay associated spectrum (FDAS) measurement was performed to clarify excitation energy transfer on the thylakoid membrane. This result showed that LHCSR1 triggers excitation energy

transfer from LHCII to PSI under acidic conditions. Additionally, fluorescence lifetime measurement using three photosystem mutants revealed that PSI contributes to LHCSR1-dependent fluorescence quenching. From these results, I conclude that LHCSR1 mediates excitation energy transfer from LHCII to PSI and utilizes PSI as an energy trap. This function may contribute to reduce energy flow from LHCII to PSII and prevent PSII destruction. I was not able to clarify LHCSR1 localization, but this result may indicate that LHCSR1 exists between photosynthetic proteins on the thylakoid membrane for excitation energy transfer, and is not tightly bound to the photosystems. However, another possibility may be that LHCSR1 is more loosely bound to the proteins in contrast to LHCSR3, leading to a loss during thylakoid solubilization. Further investigation is needed for elucidating a precise localization study of LHCSR1.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏名 小菅 晃太郎

Title  
論文題目 緑藻クラミドモナスにおける LHCSR1 の局在と機能の解析

光合成反応には光エネルギーが必須である。しかし、陸上植物や緑藻類は光合成能力を上回る光エネルギーを受けると、過剰となった光エネルギーが有害な活性酸素を発生させ、光阻害と呼ばれる光化学系 II の損傷を引き起こし、やがては細胞死等の重大な影響をもたらす。光阻害はしばしばおこるため、その対策は陸上植物や緑藻類の生存に必須である。

過剰光エネルギーを安全に消去する過程の研究は今世紀に入り急速に進んだ。その過程は、励起されたクロロフィルの寿命を減衰させる過程であり、主に3種あることが知られている。もっとも主要な qE クエンチングは、光合成電子伝達に伴いチラコイド膜ルーメン側に形成されたプロトン勾配によって誘導されるもので、緑藻クラミドモナスでは、集光アンテナタンパク質 (LHC) 遺伝子群に属する互いに配列の似た LHCSR1 と LHCSR3 タンパク質がこの機能に関与するとされる。これまでの報告によると、強光条件下では、LHCSR3 が発現誘導され PSII に結合して PSII-LHCII-LHCSR3 超複合体を形成する。この時、チラコイド膜内側のルーメン側のプロトン濃度が上昇することで、PSII-LHCII-LHCSR3 超複体内クロロフィルの励起状態寿命は減衰する。すなわち、PSII に集光された過剰分のエネルギーは LHCSR3 により熱過程として散逸されていることがわかっている。一方で、LHCSR1 もまた強光条件下で発現誘導されるとの報告はあるが、その詳細はわかっていなかった。

本博士論文では、緑藻クラミドモナスの qE クエンチング過程における LHCSR1 の機能の詳細を研究した。LHCSR1 は LHCSR3 と同様、PSII と超複合体を形成し、qE クエンチングに寄与すると予想されたが、PSII-LHCII-LHCSR1 超複合体は確認されなかった。そこで出願者はチラコイド膜そのものを解析対象とし、Fluorescence-Decay-Associated-Spectra (FDAS) 測定により膜上でおこるエネルギー移動の解析を行った。その結果、LHCSR1 は、LHCSR3 とは異なり、エネルギーを受けとった LHCII から光化学系 I (PSI) への励起エネルギーの移動を仲介していることが明らかとなった。この LHCII から PSI へのエネルギー移動は、さらに低温絶対蛍光スペクトル測定や PSI 欠損株を用いた実験等によって確認された。以上を総合し、出願者は、LHCSR1 は PSI へと過剰光エネルギーを逸らし光阻害を受けやすい PSII を守る機能を担うものと結論づけた。本分子モデルは強光下における新規な光化学系保護モデルである。PSII と比べ、PSI は元来光エネルギー利用効率の高い光化学系であることが知られていたが、本論文は「過剰エネルギーを、よりエネルギー利用効率の高い光化学系で処理する」という新しい光化学系保護機構の発見であり、光合成研究全般において重要な貢献となった。よって、出願者の論文は、学位授与にふさわしいものであると審査委員全員が一致して結論した。