

緑藻クラミドモナスにおける LHCSR1 の局在
と機能の解析

小菅 晃太郎

博士（理学）

総合研究大学院大学
生命科学研究科
基礎生物学専攻

平成30（2018）年度

緑藻クラミドモナスにおける LHCSR1 の局在と機能の解析

総合研究大学院大学
生命科学研究科 基礎生物学専攻

小菅 晃太郎

目次

要旨	3-5
Abbreviations	5
序章	6-9
目的	10
第1章 LHCSR3 の局在の解明および <i>npq4/lhcsr1</i> 変異体の解析	
序論	11
結果と考察	12-20
実験材料・方法	21-23
第2章 LHCSR1 の局在の解明	
序論	24
結果と考察	25-37
実験材料・方法	38-39
第3章 LHCSR1 の発現条件の検討	
序論	40
結果と考察	41-53
実験材料・方法	54
第4章 新光源(メタルハライドランプ+UV 管)を用いた LHCSR1 の局在と機能の解明	
序論	55
結果と考察	56-65
実験材料・方法	66-67

第5章	<i>LHCSR</i> 変異体の遺伝的バックグラウンドの調整	
序論	68-69
結果と考察	70-85
実験材料・方法	86
第6章	新光源(UV管)を用いた <i>LHCSR1</i> の局在と機能の解明	
序論	87
結果と考察	88-111
実験材料・方法	112-114
議論	115-127
結論と提言	128-129
謝辞	130-131
参考文献	132-145

「要旨」

光合成生物にとって、光は生長に必須のものである。しかし、それらの光合成能力を上回る光にさらされた際、過剰となった光は有害な活性酸素(ROS)の発生の原因となり、光化学系 II (PSII)の破壊につながる。PSII の破壊は光阻害と呼ばれており、生長の抑制や細胞の死を引き起こす。そのような不利な環境に対して、光合成生物は NPQ(non-photochemical quenching)という過剰な光エネルギーを熱エネルギーに変換する機能を発達させている。これまでに、3種類の主要な NPQ が知られている。集光アンテナ(LHCII)を PSII から光化学系 I (PSI)に移動させる事によって、過剰エネルギーを両光化学系に分配させるための qT クエンチング、PSII の中心タンパク質である PSbA(D1)を崩壊させる事によって過剰な光エネルギーをこれ以上獲得する事を防ぐ qI クエンチング、ルーメン側のプロトン勾配形成によって誘導されるクロロフィル蛍光寿命の減少を引き起こす qE クエンチングである。暗黒から強光に移した際、もっとも早い時間軸で引き起こされる NPQ は、qE クエンチングである。緑藻クラミドモナスでは、集光アンテナタンパク質 (LHC, Light harvesting complex)に属する、LHCSR1 および LHCSR3 タンパク質がこの機能に関与する。これまでの報告によると、LHCSR3 は強光条件下で発現誘導され、PSII に局在し、LHCII と PSII-LHCII-LHCSR3 超複合体を形成する。また、過剰光下ではチラコイド膜内側のルーメン側のプロトン濃度が上昇し、LHCSR3 が qE クエンチングに寄与する。LHCSR3 を欠損した変異体 *npq4* は強光条件下では生存することができない。それゆえに、このタンパク質はクラミドモナスで qE を誘導するための主要の要素であると認識されてきた。

一方で、LHCSR1 もまた強光条件下で発現誘導され、LHCII で低 pH 依存の蛍光の消去を行うことが知られている。主要の qE クエンチングの要素である LHCSR3 については精力的に研究が進められていたが、LHCSR1 についてはわずかにしか明らかにされていなかった。qE クエンチングのさらなる理解のため、生化学および分光学的な解析を行い、LHCSR1 の局在と、機能を解析した。LHCSR1 は LHCSR3 と比べ、タンパク質で 87%の配列の同一性がある。その事実から、この研究は、LHCSR1 は LHCSR3 のように PSII-LHCII-LHCSR1 超複合体を形成し、qE クエンチングに寄与するという仮定のもとで行われた。LHCSR1 の誘導のため細胞は強光条件下で培養され、チラコイド膜が単離された。チラ

コイド膜は界面活性剤 α -DM で可溶化され、タンパク質複合体はショ糖密度勾配遠心分離法により分離された。LHCSR1 の局在を調べるため、遠心分離された各分画を用いてウェスタン解析を行った。しかし、PSII-LHCII-LHCSR1 超複合体を確認することはできなかった。強光条件下では、LHCSR3 に比べ、LHCSR1 はより少ない量しか発現しない。それゆえに、正確な LHCSR1 の局在を明らかにするためには、より多くの LHCSR1 を蓄積させるための、他の適切な培養条件を見いだす必要があった。

我々の研究室は LHCSR1 が UV 条件下で特異的に発現誘導されるという事を明らかにした。そこで、十分な LHCSR1 を蓄積させるため、サンプルを UV 下で培養するための独自の光源が開発された。この新しい装置を用いて培養されたサンプルを用いてショ糖密度勾配遠心分離を行い、遠心分離された各分画を用いてウェスタン解析を行った。しかし、正確な LHCSR1 の局在をまたしても明らかにする事ができなかった。LHCSR1 の局在を詳細に明らかにする事はできなかったが、もし LHCSR1 が PSII-LHCII-LHCSR1 超複合体をわずかでも形成している場合、PSII 分画はエネルギー消去能力をもっているはずである。この仮説に基づき、PSII 分画を用いて蛍光寿命測定を行った。しかし、PSII 分画はエネルギー消去能力をもっていなかった。この結果から、LHCSR1 の機能はチラコイド膜の可溶化の過程で失われたのかもしれないと考えた。

この問題を解決するため、可溶化されていないチラコイド膜を用いて蛍光寿命測定を行った。その結果、LHCSR1 は酸性条件下で、チラコイド膜上においてエネルギー消光能力をもっている事が明らかとなった。さらなる LHCSR1 の解析のため、チラコイド膜上のエネルギー移動を明らかにすることを目的に Fluorescence Decay Associated Spectrum (FDAS)測定を行った。その結果、LHCSR1 は酸性条件下において LHCII から PSI への励起エネルギーの移動を誘引していることが明らかになった。加えて、3種の光化学系欠損株を用いて蛍光寿命測定を行ったところ、PSI が LHCSR1 依存のエネルギー消去に寄与していることを明らかにした。これらの結果から、LHCSR1 は励起エネルギーを LHCII から PSI に移動させることを仲介し、PSI をエネルギートラップとして利用していると結論づける。この機能は、LHCII から PSII へのエネルギーの流れを減少させ、PSII の崩壊を防いでいるのかもしれない。本研究においては LHCSR1 の局在を明らかにする事ができなかった。しかしこの結果は、LHCSR1 が励起エネルギー移動のためにチラコイド膜上で光合成タンパク質の間に存在し、光化学系に

は強くは結合していないということを示しているのかもしれない。しかし、LHCSR3 に比べ LHCSR1 はタンパク質により緩く結合しており、それゆえにチラコイド膜の可溶化の過程で LHCSR1 が失われた、という他の可能性が存在する事も考えられる。正確な LHCSR1 の局在を明らかにするためには、さらなる解析が必要である。

「Abbreviations」

NPQ: Non photochemical quenching, LHC: Light harvesting complex, HL: High light, LL: Low light, LHCSR: Light harvesting complex stress related protein, LHCSR3-P: Light harvesting complex stress related protein 3 phosphorylated, LHCSR1-H: Light harvesting complex stress related protein 1 high, LHCSR1-L: Light harvesting complex stress related protein 1 low, Chl: Chlorophyll, ROS: Reactive oxygen species, PS: Photosystem, PSBS: PhotosystemII subunit S, PSBA(D1): PhotosystemII subunit A, CP47: Chlorophyll protein 47, Cyt: Cytochrome, PQ: Plastoquinone, PC: Plastocyanin, P700: Pigment-700, WT: Wild type, *lhcsr1*: LHCSR1 knock out mutant, *npq4*: LHCSR3 knock out mutant, *npq4/lhcsr1*: LHCSR1/3 knock out mutant, PAR: Photosynthetically active radiation, SDG: Sucrose density gradient centrifugation, α -DM: α -Dodecyl maltoside, GBLP: G protein subunit-like polypeptide, FDAS: Photon decay associated spectrum, ΔPSI : Photosystem I mutant, $\Delta PSII$: Photosystem II mutant, $\Delta PSI/II$: Photosystem I/II mutant

「序章」

「強光によるダメージ」

光合成とは、光エネルギーから得た還元力により二酸化炭素から有機物を生み出す反応である。光合成生物は光化学系 I および II の周囲に、集光アンテナタンパク質である LHC を持ち (Allen and Staehelin, 1994; Elrad et al, 2004)、そこに結合したクロロフィル Chl を中心とした光合成色素により光吸収に関わっている (Green and Kuhlbrandt, 1995)。主に光合成に用いる事のできる光 400-700nm の波長帯の光、これを PAR (Photosynthetically active radiation, 光合成有効放射量) という。光の強さは $\mu E (\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1})$ で表され、真夏の直射日光は 2000 μE 程にまで達する。光合成生物は強い光にさらされた際、光合成色素から吸収した光エネルギーを全て光合成に用いる事はできない。光合成において吸収される光エネルギーが飽和に達すると、過剰な光が発生する。光エネルギーの吸収が起こると、一重項クロロフィル($^1\text{Chl}^*$)が発生し、強い光のもとでその状態が続くと、励起されたクロロフィルが三重項状態を形成しうる。この発生した三重項クロロフィルは、比較的寿命が長く、そのエネルギーは O_2 に受け渡され、反応性の高い活性酸素 (ROS) の発生につながる (Krieger-Liszkay, 2005)。ROS は具体的にはスーパーオキシド (O_2^-)、ヒドロキシルラジカル (OH^\cdot)、ヒドロゲンペロキシサイド (H_2O_2)、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) に分類される。これらは光化学系 II (PSII) 中心タンパク質の一つの D1 を標的として破壊を招き、一般的に、最大量子集率の低下、および光合成の効率の低下を招く、光阻害と呼ばれている (Long et al, 1994; Muller et al, 2001)。

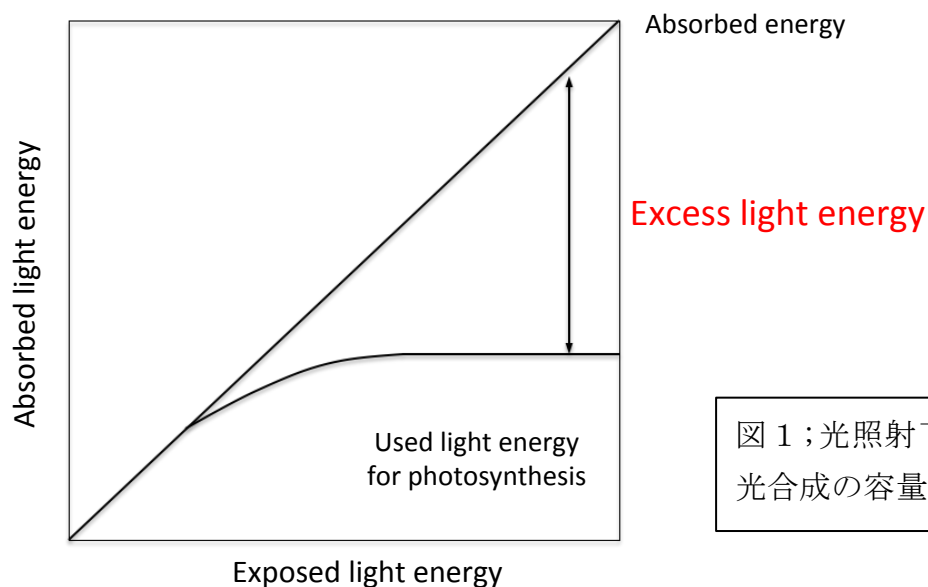


図 1 ; 光照射下における
光合成の容量

「強光から光合成器官を守る NPQ」

光合成生物は、自然界で降り注ぐ強い環境の中でも適応できるよう、過剰に獲得された光エネルギーを安全な熱エネルギーに変換して消去する、NPQ (Non-Photochemical-Quenching) と呼ばれる共通したシステムを発達させている (Muller et al, 2001)。これは、光照射時に光化学系 II より発される蛍光を指標として用いることによって算出される、経験的に用いられてきた強光適応能力の一種の指標である。常温時、光化学系 II は光化学系を取り囲む集光アンテナタンパク質(LHC)から獲得された光エネルギーは、一部蛍光として発せられる。一方光化学系 I は受け取った光エネルギーをその先のカルビンベンソン回路に流しやすく、常温時エネルギーが飽和になりにくいいため、光照射時に蛍光はほとんど発生しないと言われている。これらの反応は光照射後に反応として起こるものであり、様々な時間軸で引き起こされ、主に3通りの成分で表される。

「NPQ の成分(qE)(qT)(qI)」

もっとも早い時間軸(数秒)で引き起こされる反応は qE クエンチングと呼ばれる。反応は可逆的であり、チラコイド膜内のプロトン濃度勾配の活性化によって誘引される(Briantais et al, 1979)。つまり、光照射時にエネルギーが光化学系より吸収されると、光化学系 II の酸素発生部位より、またはシトクロム b₆f の働きにより葉緑体チラコイド膜にプロトンの濃度勾配が形成される。しかし、プロトン濃度勾配を用いた ATP の合成が追いつかないため、これが引き金となり qE クエンチングが駆動し、逆に膜濃度勾配が緩和されると機能がオフになる。後に詳述する、qE 関連タンパク質のプロトン認識部位によって機能の駆動が制御されている。この機能は(¹Chl*)の平均蛍光寿命を減少させ、危険な(O₂)の発生を抑制し(Aro et al.,1993)、プラストキノンプールの急激な減少を防ぎ、またチラコイド膜内の急激なプロトン濃度勾配形成を防いでいると考えられている(Kramer et al.,1999)。

qT クエンチングは十分以内程度の時間軸で引き起こされ、PQ プールの減少により活性化され、アンテナタンパク質(LHCII)が光化学系 II から光化学系 I へ移動することによって引き起こされる。そして、励起エネルギーが PSI で消去される一連のシステムのことを指す。一般にステートトランジションと呼ばれ、両光合成器官の励起エネルギーバランスを保っている(Allen, 1992)。この

反応は、光照射によってプラストキノールが減少し、プラストキノールがシトクロム *b₆f* 複合体の *Q_o* サイトに結合し(Zito et al., 1999)し、そしてそれにより活性化された STT7 による LHCII の可逆的なリン酸化によって制御されている(Depège et al., 2003; Lemeille et al., 2010)。

qI クエンチングは数時間程度の時間軸で引き起こされ、強光条件下で発生した ROS による D1 のリアクションセンターの破壊に関連して引き起こされる。強光での PSII の破壊と同時に D1 タンパク質の選択的分解と修復が同時に起きているものの(Aro et al.,1993)、修復の速さが遅れた際に光阻害が引き起こされる(Takahashi and Murata, 2005)。FtsH プロテアーゼは光損傷を受けた D1 の分解に関わっているとされる(Malnoe et al.,2014)。この *qI* クエンチングによって PSII の破壊を招く事により PSI に過剰なエネルギーを受け渡すことを抑制している。光化学系 I は修復(ターンオーバー)が遅いと言われているため、*qI* も光適応の一種であるとみなすことができる(Tikkanen et al., 2014)。

「クラミドモナスの *qE* クエンチングに関わる因子」

もっとも早い時間軸で引き起こされるクラミドモナスの *qE* クエンチングに関して、長年因子が探索されてきた。Li818 は強光や CO₂ 欠乏によって誘導される LHC タンパク質の一種ではあるが、長年その役割については謎であった(Miura et al., 2004; Yamano et al.,2008)。近年、強光条件下で NPQ の誘導が起きにくい変異体 *npq4* が単離された。この変異体は LHCSR3(Li818-3)が欠損しており、強光条件下において NPQ の能力が WT に比して著しく低下し、また強光条件下では死滅することが示された(Peers et al., 2009)。これにより、Li818-3 タンパク質が緑藻クラミドモナスの *qE* クエンチングに必須の因子であることが明らかとなった。LHCSR3 はほとんど同一のプロモーターで支配された LHCSR3.1 と LHCSR3.2 の遺伝子に支配される。いずれの遺伝子からも合成されるタンパク質は等しい配列をもつ(Erickson et al., 2015)。このタンパク質は pH センシングで機能し、その特異的な部位も明らかになっている(Liguori et al., 2013; Ballottari et al., 2016)。生化学的な実験により、強光で誘導された LHCSR3 は光化学系 II の超複合体に局在し、PSII-LHCII-LHCSR3 supercomplex を形成することによってエネルギー消去に寄与する事が明らかとなっている(Tokutsu and Minagawa., 2013)。

一方クラミドモナスは LHCSR3 の他に、遺伝子が似た配列を持つ LHCSR1

タンパク質を持つ。このタンパク質は LHCSR3 と 87%の相同性を持ち(Bonente et al., 2011)、LHCSR3 と同一の染色体上に存在している。LHCSR1 欠損株および LHCSR1/3 二重変異体を用いた In vivo の実験では、LHCSR1 が NPQ に寄与することが明らかとなっている(Berteotti et al., 2016)。また LHCSR1 は LHCSR3 と同じように低 pH 下において機能し、LHCII において蛍光の消去に寄与する事が明らかとなっている(Dinc et al., 2016)。このように LHCSR1 は NPQ への寄与が明らかになっているにもかかわらず、解析が LHCSR3 に比べ遅れており、知見の蓄積が少なかった。LHCSR1 の NPQ への寄与が明らかとなっている事から、クラミドモナスの qE クエンチングの詳細を解明するためには、LHCSR1 のさらなる解析が必要とされている。

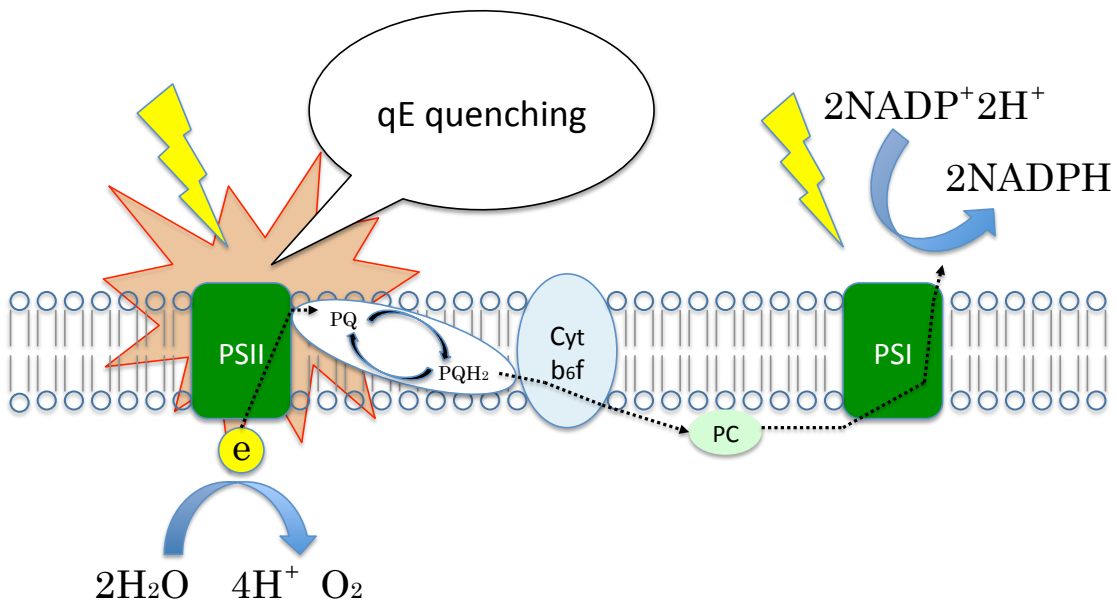


図 2 ; 光照射下における qE クエンチング。
光化学系 II のエネルギー過剰を解消し、破壊から守っている。

「この博士論文の研究の目的」

本研究では緑藻クラミドモナスを用い、その NPQ の qE クエンチングのメカニズム、とりわけ LHCSR1 タンパク質に焦点を当てる。このタンパク質の発現、チラコイド膜上での局在、過剰光エネルギー消去に関わる機能を明らかにすることを目的に、生理学・生化学・分子生物学・分光学的手法を用いて解析を行った。

第1章 LHCSR3 の局在の解明および *npq4/lhcsr1* 変異体の解析

—序論—

過去これまでの報告によると、生化学的な解析によって、強光によって発現誘導された LHCSR3 は PSII に局在し、PSII-LHCII-LHCSR3 超複合体を形成する事によって過剰光エネルギー消去に寄与する事が明らかとなっている (Tokutsu and Minagawa, 2013)。そこで本章では、LHCSR3 と似た配列を持つ LHCSR1 も同様に、強光(HL, High Light)によって発現誘導されて PSII に局在し、PSII-LHCII-LHCSR1 超複合体を形成する事によってエネルギー消去に寄与するという仮説をたて、研究を進める事とした。

研究開始当初、本研究室では野生株 (WT, Wild Type) カリフォルニア大 Niyogi 博士より提供を受けた LHCSR3 欠損株 *npq4* と LHCSR1/3 二重変異体 *npq4/lhcsr1* の3種のみを保有し、LHCSR1 欠損株を保有していなかった。また、本研究室では LHCSR1 の抗体を作成および保持していなかった。そこで、*npq4/lhcsr1* において LHCSR1 が欠損する事による影響を調べる事とした。後に行う LHCSR1 の生化学的な解析には高度な技術が要求されるため、LHCSR1 の解析に先立ち、過去の論文を参照にして (Tokutsu and Minagawa, 2013) PSII-LHCII-LHCSR3 を単離するための再現実験をすることにより生化学実験の技術取得を行った。

「結果・考察」

WT、*npq4* (Δ LHCSR3)、および *npq4/lhcsr1* (Δ LHCSR1/3)を用いて、独立栄養培地(HSM)下で、それぞれの細胞に対して HL(約 400uE)を 4 時間照射した。培養後のサンプルを用いて蛍光イメージング装置 (Fluoro Cam ,Photon System Instruments, Brno, Czech)を用いて NPQ の駆動を、及びウェスタン解析により LHCSR3 の蓄積の確認を行った。その結果、NPQ は WT で一番高く誘導され、*npq4/lhcsr1* で最も低かった(図 3)。また、LHCSR3 は WT のみで HL 照射の時間に伴って加算的に蓄積が確認された(図 4)。

WT、*npq4* (Δ LHCSR3)、および *npq4/lhcsr1* (Δ LHCSR1/3)を用いて、独立栄養培地(HSM)下で、それぞれの細胞に対して HL(約 400uE)を 1 時間照射してサンプルを回収した。得られたサンプルを用いて、RT-PCR を行い、LHCSR3.1, LHCSR3.2, および LHCSR1 の mRNA 発現パターンを確認したところ、*npq4* および *npq4/lhcsr1* において LHCSR3.1 および LHCSR3.2 の欠損が確認された。また、すべての株で、LHCSR1 のバンドが確認された。LHCSR1 の欠損はポイントミューテーションにより引き起こされていることが明らかとなっており、*npq4/lhcsr1* は正常ではない mRNA を合成するが、1, タンパク質に翻訳されるものの機能的ではない、2, RNA は合成されるがタンパク質は翻訳されない、のいずれかの可能性が考えられた(図 5)。先の NPQ の測定結果からも、HL 照射によって正常な LHCSR1 が発現していると考えられる *npq4* に比べ、*npq4/lhcsr1* は低い値を示したことから、この結果は上記の仮説を支持している。以上の結果をふまえると、LHCSR1 は HL 条件下で誘導され蓄積し、NPQ の駆動に寄与する事が示唆された。GBLP(G protein subunit-like polypeptide)は光誘導性タンパク質ではないため、コントロールとして使用した。

この結果をもとに、生化学的な解析のため、WT、*npq4*、および *npq4/lhcsr1* を独立栄養培地(HSM)用いて HL 条件下で 15 時間培養を行った。培養後のサンプルを用いてそれぞれの株からチラコイド膜を単離し、ショ糖密度勾配遠心分離法(SDG, Sucrose-Density-Gradient centrifugation)によって各光合成タンパク質複合体の分離を行った。その結果、過去に報告のあった WT、*npq4*、に加え、*npq4/lhcsr1* においても正常に各バンドが形成されている事が明らかとなった(図 6)。これは LHCSR1 の欠損は PSII-LHCII 超複合体および PSI-LHCI 超複合体各光合成タンパク質複合体の形成に影響を与えないことを示している。つまり、LHCSR1 が光合成タンパク質複合体に局在していると仮定した場合、そ

の内部ではなく、外郭に存在している可能性が高い事を示唆している。

SDG によって分離した各分画のサンプルを用いて、ウェスタン解析を行った結果、3種の株すべてにおいて、主要光合成タンパク質の分布に大きな差は確認されなかった(図7)。これは、LHCSR1の欠損は、各光合成タンパク質の発現には影響を与えない事を示唆している。しかし、WTにおいて、過去に報告されている LHCSR3の光化学系II超複合体への局在の確認、つまり PSII-LHCII-LHCSR3超複合体を単離する事は難しかった。

LHCSR3のPSII超複合体への局在が見られなかった原因の一つとして、チラコイド膜に界面活性剤を加えて転倒混和する際の混和時間が過剰であったことと考えられた。従来、転倒混和は15分を行い光合成タンパク質を可溶化していた。そこで、チラコイド膜タンパク質の可溶化のための時間を1分、5分、15分とし、それぞれのサンプルを用いてSDGを行った。その結果、すべてのサンプルにおいて正常に各バンドが形成された(図8)。これらのサンプルを分画し、PSII超複合体のピーク分画のサンプルを用いてウェスタン解析を行った結果、LHCSR3の局在を確認することはできなかった(図9)。この事から、LHCSR3のPSII超複合体への局在が確認されない原因は他に存在する事が示唆された。

以上の結果から、LHCSR3のPSII超複合体への局在が確認されなかった理由は手技的な問題があった事が予想され、この先のLHCSR1の局在を確認する生化学的実験を行うためには、更なる生化学実験の技術の取得が求められた。

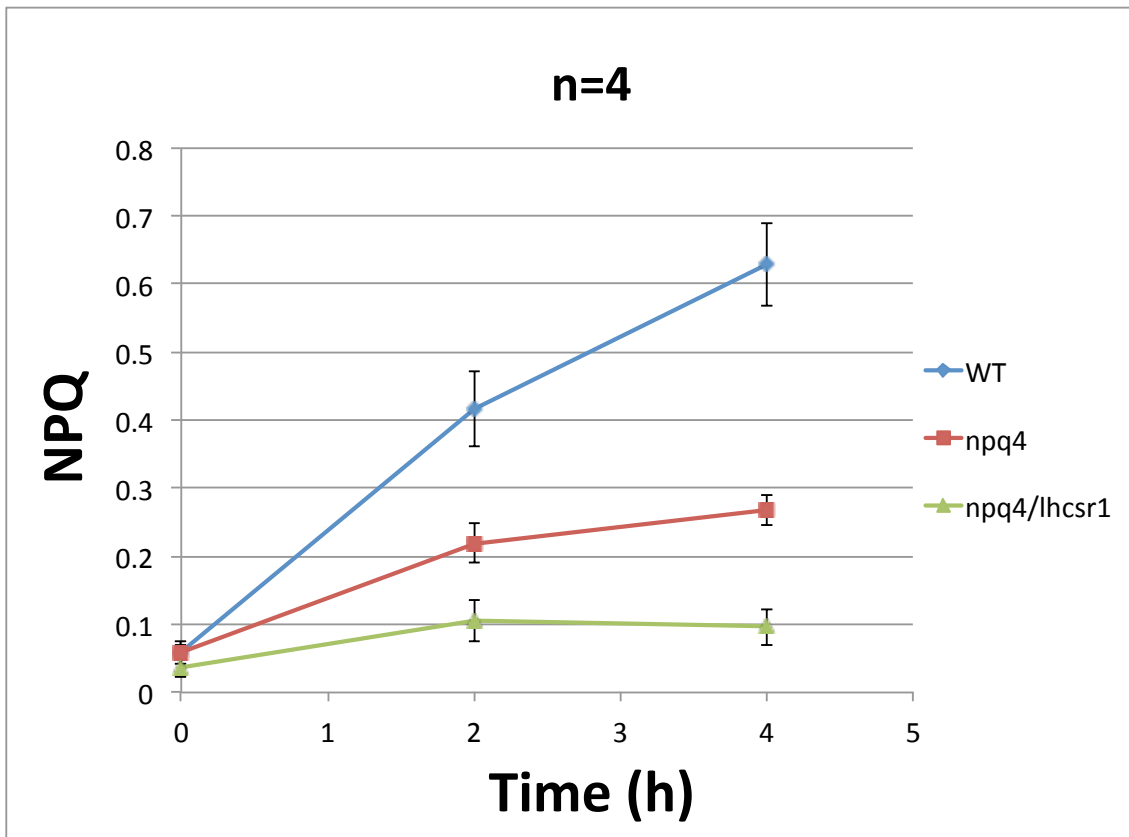


図3; 光照射下における NPQ の駆動。LHCSR3 が欠損した *npq4* では WT に比べ NPQ の値が低く、LHCSR1/3 を欠損した *npq4/lhcsr1* では NPQ がほとんど誘導されていない。

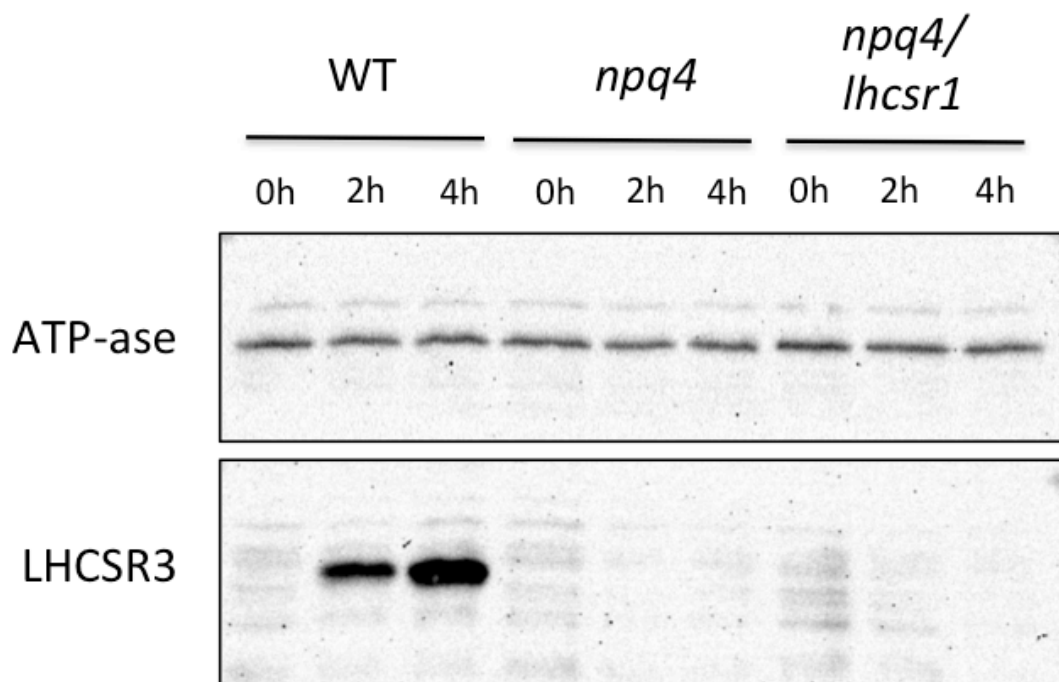


図 4 ; 強光条件下における LHCSR3 の発現。少なくとも LHCSR3 の発現が WT における NPQ の高い誘導に寄与している。

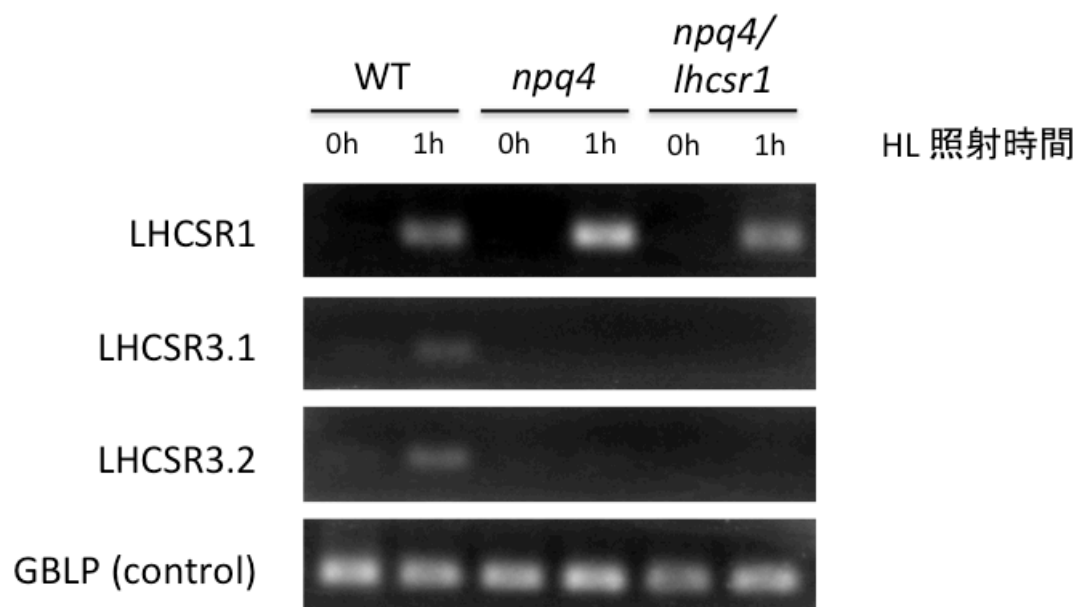


図 5 ;RT-PCR における強光条件下における各遺伝子の発現。*npq4* における LHCSR1 の発現が、その NPQ の誘導に関わっている可能性がある。

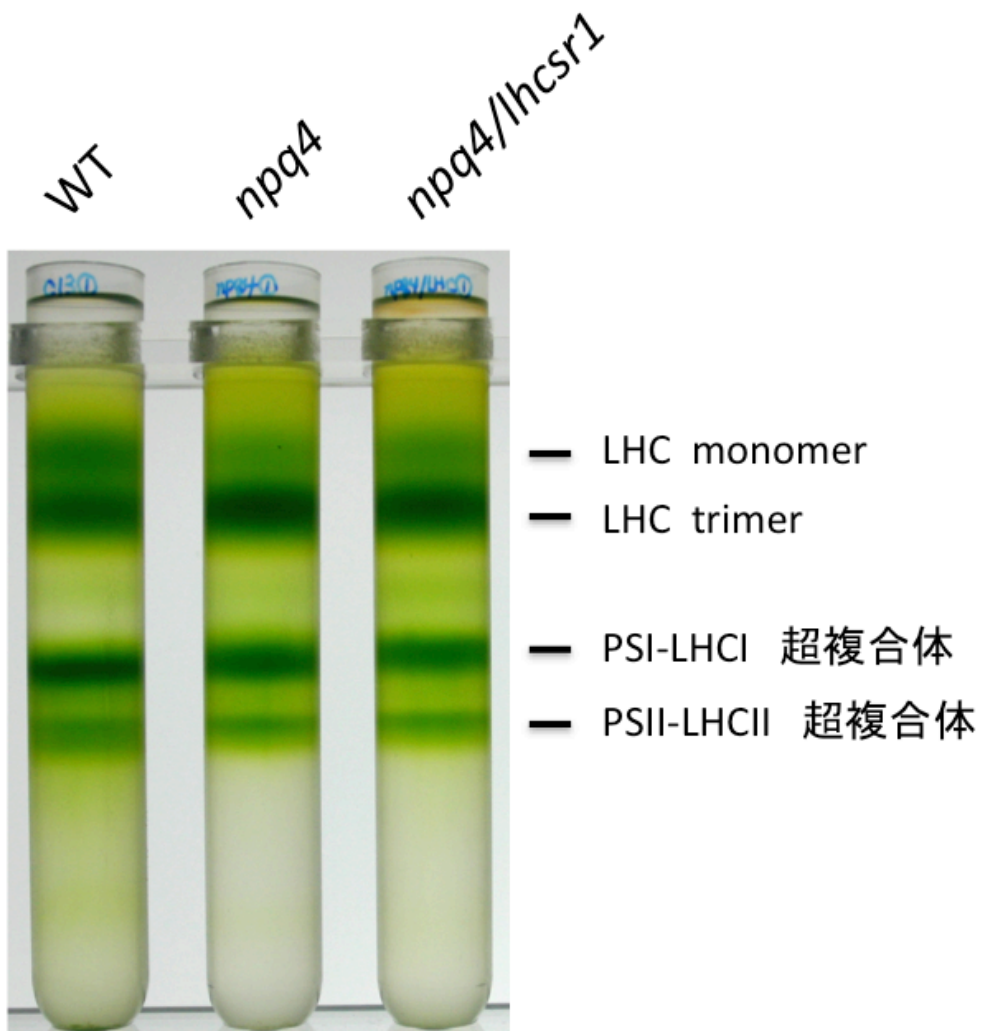
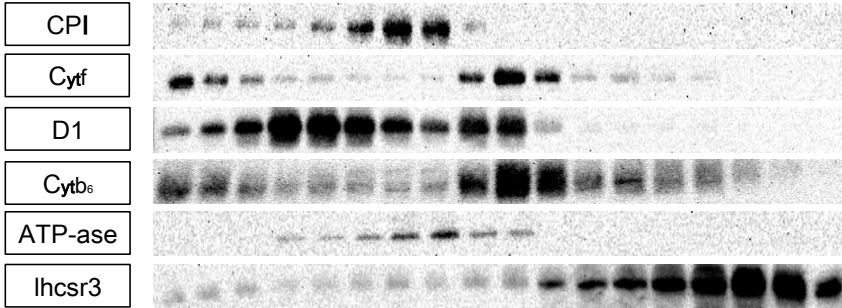


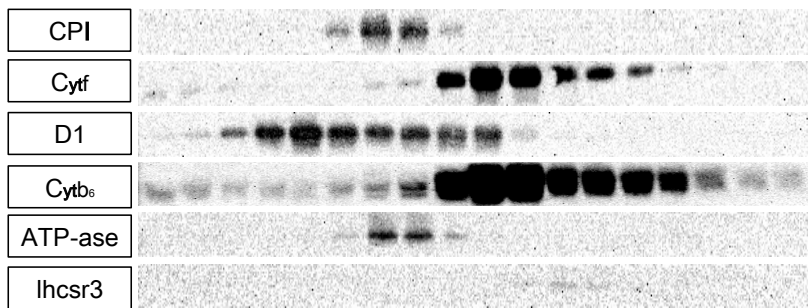
図6 ; ショ糖密度勾配遠心分離法により分画された各光合成タンパク質。 *npq4/lhcsr1* においても他株と比較して正常にバンドが形成されていることから、 **LHSCR1** の欠損はタンパク質複合体の構成に影響を与えない。



(a)



(b)



(c)

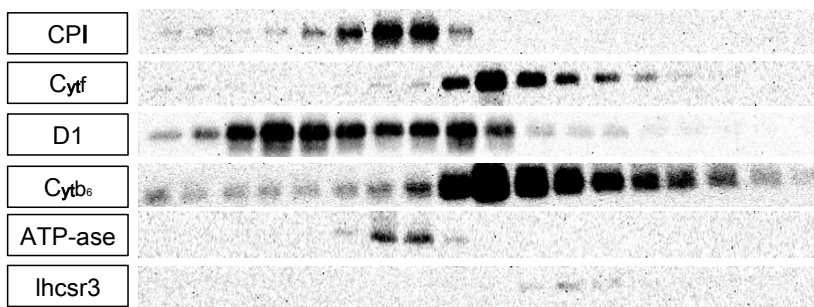


図 7 ; 各分画を用いた光合成タンパク質の分布 (a)WT (b)*npq4* (c)*npq4/lhcsr1*。LHCSR1 が欠損した *npq4/lhcsr1* においても、各タンパク質の構成は WT と比べて大きな変化がない。つまり LHCSR1 の欠損はタンパク質の構成に影響を与えない。

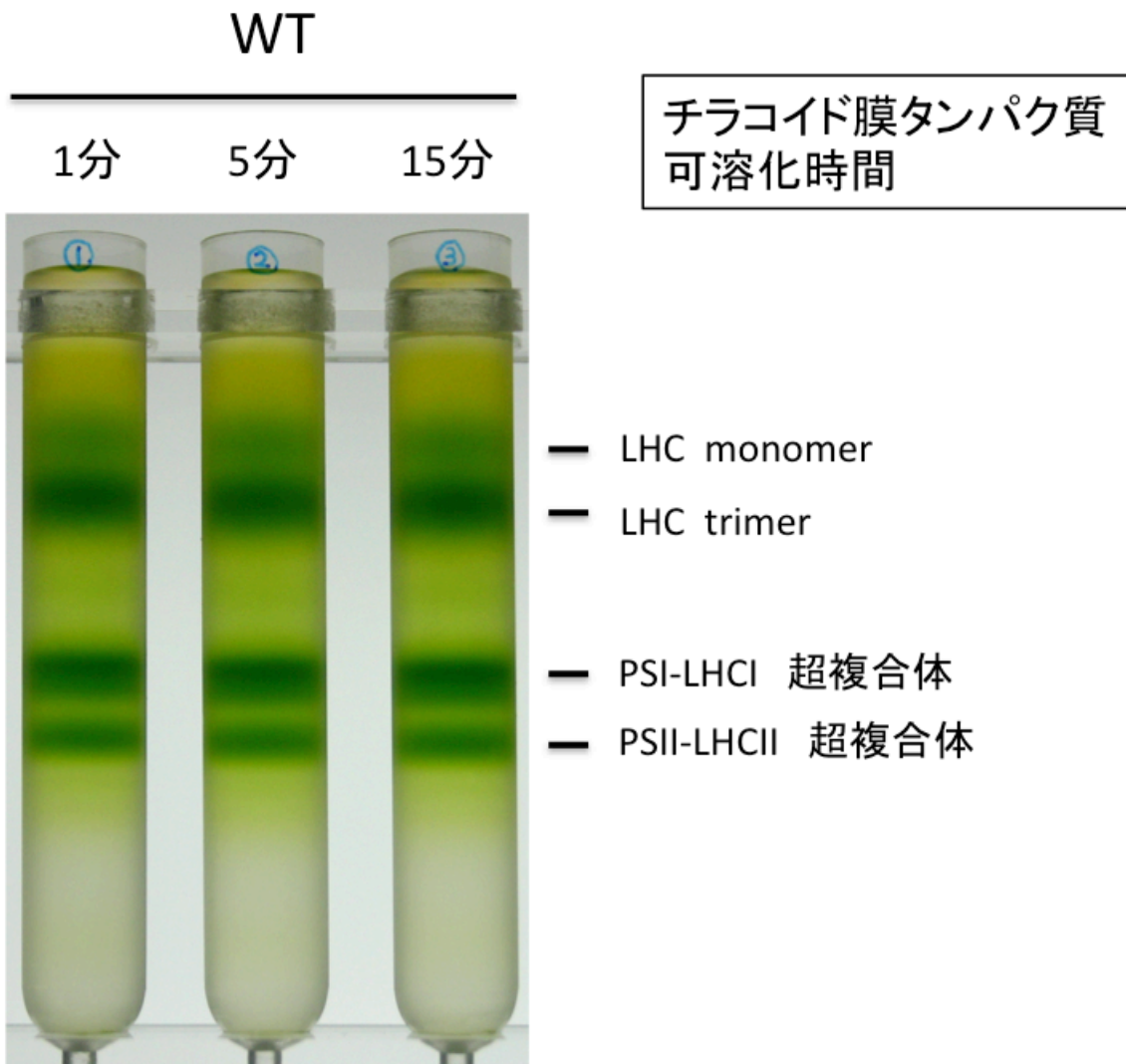


図 8 ; ショ糖密度勾配遠心分離法により分画された各光合成タンパク質。チラコイド膜を可溶化処理する時間の違いは、バンド形成に影響を与えない。

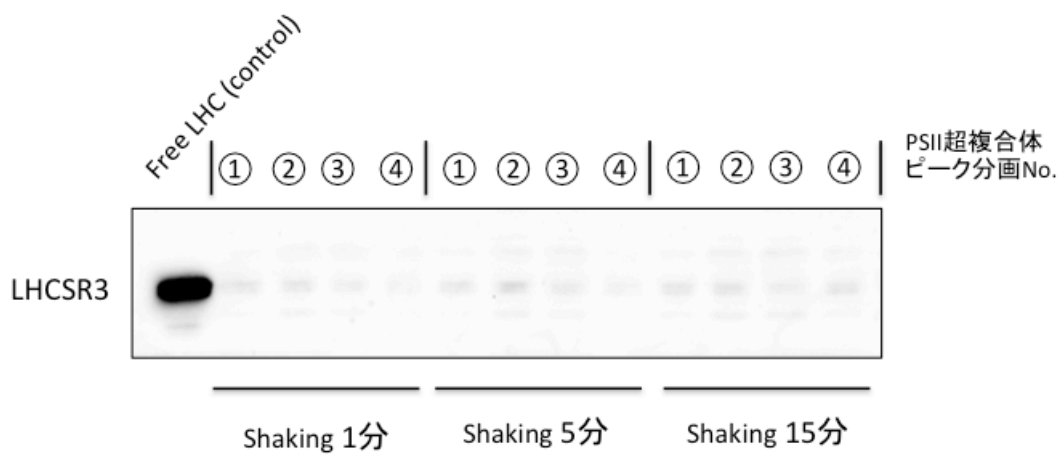


図9; ショ糖密度勾配遠心分離法によって分画されたPSII-LHCII超複合体分画を用いたLHCSR3の局在。チラコイド膜を可溶化処理する時間の違いは、PSII-LHCII-LHCSR3超複合体を安定的に単離精製することにはつながらなかった。

「実験材料・方法」

「株および培養条件」

本研究では、*Chlamydomonas reinhardtii* の野生株として 137C+(Chlamydomonas Resource Center <https://www.chlamycollection.org/>) が用いられた。また、LHCSR1/3 における NPQ の機能を明らかにするため、変異体 *npq4*(Peers et al., 2009), *npq4/lhcsr1*(Silvia et al., 2016)が用いられた(カリフォルニア大バークレー校 Niyogi 博士より提供)。

LHCSR3 の発現確認のため、各株は従属栄養培地(TAP)(Gorman et al,1965)を用いて対数増殖期(約 $2.0\sim 5.0\times 10^6$ Cells/ml)に達した細胞を、独立栄養培地(HSM)(Sueoka, 1960)に置換後、クロロフィル含有量を測定し、サンプルを 2ugChl/ml の濃度に調整した。サンプルは LED 下(約 400uE)で 4 時間培養された。

RT-PCR のため、細胞は上記と同条件で前培養され、サンプルは LED 下(約 400uE)で 1 時間培養された。

HL 照射下のタイムコース取得のため、細胞は同条件で前培養され、23°C、500uE の条件下で、空気通気を伴って培養された。サンプルは、0,2,4,6,8,12,15 時間においてサンプリングされた。

生化学実験のため、TAP 寒天培地上で保管されている細胞は液体独立栄養培地 HSM を用いて 100~150uE 下で対数増殖期まで育てられた。その後、1L スケールのボトルに移され 23°C、100~120uE で、CO₂ を通気して対数増殖期まで育て、その後細胞内に蓄積した CO₂ の濃度を下げるため、空気通気を伴い 12 時間培養された。前培養されたサンプルは、500uE の光条件下に移され、上記と同様の 23°C の条件下において 15 時間培養された。

「RT-PCR」

細胞は、ガラスビーズで破碎され、TrIzol(Life Technologies Japan, Tokyo, Japan)で処理され、クロロフォルムで抽出したあと、トータル RNA は RNeasy Mini kit(Qiagen, Valencia, USA)によって抽出された。抽出されたトータル RNA は逆転写され、核酸濃度を測定し、PCR に用いられた。各プライマーは(Maruyama et al., 2014)で使用されたものと同様の配列のものを用いた。

「NPQ 測定」

クラミドモナスにおけるクロロフィル蛍光測定は、Fluoro Cam(Photon System Instrument)を用いて行われた。Actinic light は 500 μ E、Saturating pulses は 900 μ E にてすべての測定は行われた。培養後のサンプルは 48 穴プレートに 1mL ずつ入れられ、測定前に弱遠赤色光下で 30 分静置された。PSII の量子収率は、 $(F_m - F_0) / F_m$ によって求められた。F_m は暗黒条件下におかれた細胞に光照射した場合に発される、最大量子収率を、F₀ はその際の最小量子収率を示す。NPQ は $(F_m - F'_m) / F'_m$ によって算出された(Bode et al., 2009)。Actinic light 照射後、約 10 秒後に照射された Saturating pulses によって得られた F'_m の値が NPQ の算出に用いられた。F'_m は Actinic light を照射して、細胞が光適応条件下にある状態で得られた最大量子収率の事をさす。

「ウェスタン解析」

培養後の細胞は遠心によって回収された。サンプルはあらかじめ成形された 16-22% SDS-tris glycine-Urea(7.5M)ゲルを用いて泳動された。メンブレンは 1 時間ブロッキングされ、各抗体で処理された。抗体は LHCSR3 ATP-B, 1:10000 を用いた。メンブレンは抗体で処理されたあと、2-2-5-5-5-分で計 5 回洗われた。1 μ g Chl が各レーンにロードされた。WSE-7120L EzWestLumi plus(ATTO, Tokyo, Japan)を用いた増強化学発光(ECL)によるシグナルは ChemiDoc(BIO-RAD, California, USA)によって検出された。

「チラコイド膜の単離」

チラコイド膜の単離は、Tokutsu et al, 2012 に従って行われた。大量培養した細胞は、遠心によって回収し、60ml のバッファーによって懸濁した。細胞を懸濁する際に、25mM MES, 0.33M スクロース, 5mM MgCl₂, 1.5mM NaCl, /NaOH, (pH6.5)で調整したバッファーを使用した。BioNeb (Glascot, Terre Haute, IN) を用いて、約 7.5 kg/cm² の圧力において、2 回細胞を破碎した。破碎した懸濁液は、100,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 25min の条件下で Two Step SDG を行う事により、チラコイド膜が分離された。チラコイド膜の分画は回収され、60ml 0.33MS バッファーで 2 回洗われた。チラコイド膜は 500ul のバッファーを加え、絵筆を用いて再懸濁され、液体窒素下(-196 $^{\circ}$ C)に保存された。

「シヨ糖密度勾配遠心分離(SDG)」

シヨ糖密度勾配遠心分離は、Tokutsu,2012 に従って行われた。液体窒素下で保存されていたチラコイド膜は、解凍され 25 mM MES, pH 6.5 バッファーで 1 回洗われ、500ul の同バッファーで絵筆を用いて再懸濁した。チラコイド膜溶液は 0.4mgChl に調整され、1.0%の α -DM を加えて、暗黒下、氷上で 15 分可溶化した。可溶化後、10000g \times ,4 $^{\circ}$ C で遠心して不純物を分離し、上澄みを 500ul(200ug Chl)とり、SDG チューブ(0.1/0.4/0.7/1.0/1.3 M sucrose ,25mMES, 0.02% α -DM, pH6.5)の上にロードした。SDG チューブは 4 $^{\circ}$ C, 90,000 \times g on a P40ST rotor (Hitachi-koki, Japan)で 24h 超遠心を行った。

第2章 LHCSR1の局在の解明

—序論—

本研究室は、カリフォルニア大 Krishna. K. Niyogi 博士より提供を受けた LHCSR3 欠損株 *npq4* と LHCSR1/3 二重変異体 *npq4/lhcsr1* の二種に加え、後に LHCSR1 欠損株 *lhcsr1* を同博士より得た。また、本研究室では LHCSR1 を特異的に認識する抗体を独自に作成した。そこで、前章に引き続き、本章においても LHCSR3 と同様に、LHCSR1 は HL によって発現誘導されて PSII に局在し、PSII-LHCII-LHCSR1 超複合体を形成する事によってエネルギー消去に寄与するという仮説をもとにして、研究を進める事とした。そこで初めに、PSII-LHCII-LHCSR1 超複合体を生化学的に単離し、ウェスタン解析によって LHCSR1 が PSII 超複合体に局在しているかを確認する事を目的とした。

「結果・考察」

WT、LHCSR1 欠損株 *lhcsr1*、LHCSR3 欠損株 *npq4* および LHCSR1/3 二重変異体 *npq4/lhcsr1* の 4 種の株を独立栄養培養(HSM)下にて HL(400uE)を 4 時間照射した。NPQ を測定した結果、WT, *lhcsr1*, *npq4* の順に NPQ の蓄積が確認された(図 1 0)。これは、HL 照射下において、LHCSR1 に比べて LHCSR3 のほうが NPQ の駆動への寄与が大きい事を示している。一方、二重変異体 *npq4/lhcsr1* においてはほとんど NPQ の駆動は見られなかった。WT に比べ、LHCSR1 欠損株である *lhcsr1* では NPQ の低下が確認された。また、LHCSR3 欠損株 *npq4* に比べて LHCSR1/3 二重変異体の *npq4/lhcsr1* で NPQ の低下が確認された。この結果から、第一章の結果同様に、HL 照射下において LHCSR1 は NPQ の駆動に寄与している事を示唆している。

培養後のサンプルを用いてウェスタン解析を行った結果、WT および *npq4* において LHCSR1 の蓄積が確認された(図 1 1)。WT と *lhcsr1* においては LHCSR3-P および LHCSR3 の発現が確認された。LHCSR3-P は、過去の報告の通り LHCSR3 がリン酸化されたものである(Bonente et al, 2010)。以上のことから、LHCSR1 は HL 条件下で発現し、NPQ の駆動に寄与することが示唆された。

LHCSR1 および LHCSR3 はタンパク質で 87%の相同性を持ち(Bonente et al, 2010)、差異が小さいため、LHCSR1 をウェスタンブロットティングにおいて検出する際にバンドが重なりうる。つまり、実際に本研究室の標準プロトコールである 16%-22% (Separation gel)混合ゲルを用いて LHCSR1/3 を検出した場合、LHCSR1, LHCSR3-P および LHCSR3 を明確に分離・識別することが難しい場合がある(図 1 2)。LHCSR1 を HL で発現させる際に、同時に LHCSR3-P, LHCSR3 も誘導されるため、正確な LHCSR1 の発現の確認・定量を行うためには各タンパク質をバンドとして明瞭に識別する必要がある。そこで、LHCSR1/3 (20~30kD) のバンドを比較的明瞭に分離できるゲル濃度を探索した結果、11%(アクリルアミド)の濃度が最適であることが明らかとなり、LHCSR1, LHCSR3-P 及び LHCSR3 の分離に成功した(図 1 3)。アクリルアミド濃度を高くした(18%)ところ、平行に下方向へ流れていたサンプルが泳動途中で歪曲し、さらに濃度を高くすると(22%)、セパレートゲルの上方で泳動が停止し、それからはほとんど下方向へのバンドの移動が見られなかった。また、ゲルの濃度を低くしすぎた場合、ゲルの耐久性が低下するため、SDS-PAGE から

ブロットニングに移る際に作業上の困難を極める。アクリルアミド濃度調整に関しては、①濃度統一(11%)のみならず、2種の濃度のゲルを同時に用いて②混合ゲル(16.5%及び6.75%。平均約11%)で勾配を形成しゲルを作成することができる(図14)。両者の結果を比較したところ、前者のほうがウェスタン検出によるLHCSR1及びLHCSR3のバンドの分離能力に優れていたため、本研究では、①アクリルアミド濃度統一(11%)の条件を採用した。

チラコイド膜上におけるLHCSR1の局在を明らかにするため、生化学的な解析を行った。WT, *lhcsr1*, *npq4*, および *npq4/lhcsr1* の細胞を大量培養用のボトル(1Lスケール)を用いて培養し、HL(蛍光灯、500uE)を15時間照射した。遠心で培養後の細胞を回収した後、Bio-Neb(Glascol, Terre Haute, IN)を用いて破碎を行った。後に2-STEP SDGによって、チラコイド膜が単離生成された。

単離したチラコイド膜状に、正常にLHCSR1/3が存在しているかをウェスタン解析によって調べたところ、採取したサンプルによって存在量に差がある事が明らかとなった(図15)。後の解析において、LHCSR1/3の局在をより明確に明らかにするためにタンパクの存在量が多いチラコイド膜を選別した。チラコイド膜上のLHCSR1/3の存在量に差が生じている事は、培養条件によりその発現蓄積がばらつきやすい、あるいはチラコイド膜単離時に脱落しやすいという事が考えられた。

単離したチラコイド膜を、界面活性剤である α -DMを加えて可溶化し、SDGによって分画することにより、各光合成タンパク質複合体の精製・分離を行った。その結果、新たに加わった*lhcsr1*においても過去の報告と同様(Tokutsu et al., 2012)のタンパク質複合体と考えられるバンドが確認された(図16)。第1章における*npq4/lhcsr1*同様、*lhcsr1*においてもバンドが正常に確認された事から、あらためてLHCSR1の欠損は各タンパク質超複合体の形成に影響を与えないことが確認された。

破碎を行う際は0.33MS bufferを用いて適宜チラコイド膜の含有量を調整し、適切な濃度で破碎することが重要である。チラコイドは膜でつまれた円盤状の構造をしており、その膜上に各光合成タンパク質が存在する。もし細胞濃度が高い状態で破碎すると、破碎時の物理的なエネルギーが各細胞・細胞内部のチラコイドに加えられず、完全には円盤状が破碎されていない状態でチラコイド膜が単離される。仮にこの完全に破碎されていないチラコイドを界面活性剤で処理した場合、SDGによってPSI-LHCI超複合体に比べ、構造的に不安定な

PSII-LHCII 超複合体を単離することはできない(図 1 7)。これは、完全に破砕されていないチラコイド膜を用いた場合、界面活性剤がストロマ側(チラコイド膜構造の外側)からのみしか作用することができないことによる。一方、チラコイド膜を完全に破砕している場合は界面活性剤がストロマ側及びルーメン側(チラコイド膜構造の内側)両方から作用することができるため、不安定な PSII-LHCII 超複合体であっても比較的安定に単離することが可能であったと考えられる。つまり、膜上のタンパク質複合体を安定的に単離する場合、できる限り短時間の、界面活性剤によるタンパク質超複合体への作用、及び単離が必要であると考えられる。PSI-LHCI 超複合体は、PSII-LHCII 超複合体に比べ構造が安定なため、チラコイド膜が完全に破壊されていない状態で界面活性剤を処理したとしても、SDG にて超複合体の分離精製が可能であったと考えられる。

LHCSR1 の局在を確認するため、WT の SDG によって分画されたフラクションから採取したサンプルをウェスタン解析した結果、LHCSR3 は Free LHC 画分及び PSII-LHCII 超複合体に局在していることが確認され(図 1 8 (a))、過去の報告と同様の結果となった(Tokutsu and Minagawa, 2013)。LHCSR1 の局在は、(a)において Free LHC 画分には局在が確認されたものの、(a)および(b)を比較したところ PSII-LHCII 超複合体分画には明確に局在を確認することができなかった(図 1 8 (a)(b))。抗体は、LHCSR3 および LHCSR1 両方を認識する抗体を用いた。

この結果は、①LHCSR1 が PSII 超複合体にそもそも局在していない、② LHCSR1 が PSII 超複合体に局在しているが、HL(蛍光灯)下では LHCSR1 の発現量が少ないために確認が難しい、③LHCSR1 抗体の LHCSR1 認識能力が低いことによって LHCSR1 の PSII-LHCII 超複合体への局在が確認されなかった、という可能性が考えられた。

また、PSII-LHCII 超複合体に局在すると報告されている LHCSR3 についても、生化学的に PSII-LHCII-LHCSR3 超複合体を安定的に単離することは技術的に困難である。つまり、LHCSR3 は PSII-LHCII 超複合体に緩く結合しており、物理的に不安定であることが考えられる。従って、もし LHCSR1 が PSII-LHCII 超複合体に局在していると仮定した場合、LHCSR3 と同様物理的な不安定に結合していることが考えられ、生化学実験の技術向上、もしくは事前培養条件のさらなる最適化が必要である。

チラコイド膜単離に際して、事前に細胞を大量培養する必要があるが、その際は独立栄養培地(HSM)を用いて増殖させたものを HL 処理し、チラコイド膜の単離を行った。しかし、従属栄養培地(TAP)に比べ、独立栄養培地(HSM)を用いた場合は細胞の増殖スピードが遅く、大量培養には適していない。そこで、あらかじめ TAP で大量培養した野生株細胞を、HSM に適切な細胞濃度で置換して、その後 1L スケールで約 15 時間通気培養し、その後強光照射し、チラコイド膜の単離、SDG およびウェスタン解析により LHCSR1/3 の局在を確認することを試みた。その結果、細胞内に LHCSR3 が蓄積し、NPQ を駆動するものの、PSII-LHCII 超複合体には LHCSR3 の局在は、HSM を用いて長時間事前培養した際に比べ、比較的確認されづらかった。

つまりこのような事前培養の方法の違いによってもたらされた結果の違いに関して、LHCSR3 が PSII-LHCII 超複合体に局在し、機能するためには HSM での長時間の事前培養が必要不可欠であり、また TAP で育てた細胞の生理状態を、独立栄養培地培養時の状態に適応させるためには比較的長時間の培養が必要であると考えられた。その結果から、LHCSR1/3 の局在を確認するための事前培養においては、独立栄養培地 HSM を用いて培養することが適切であると結論付けられた。

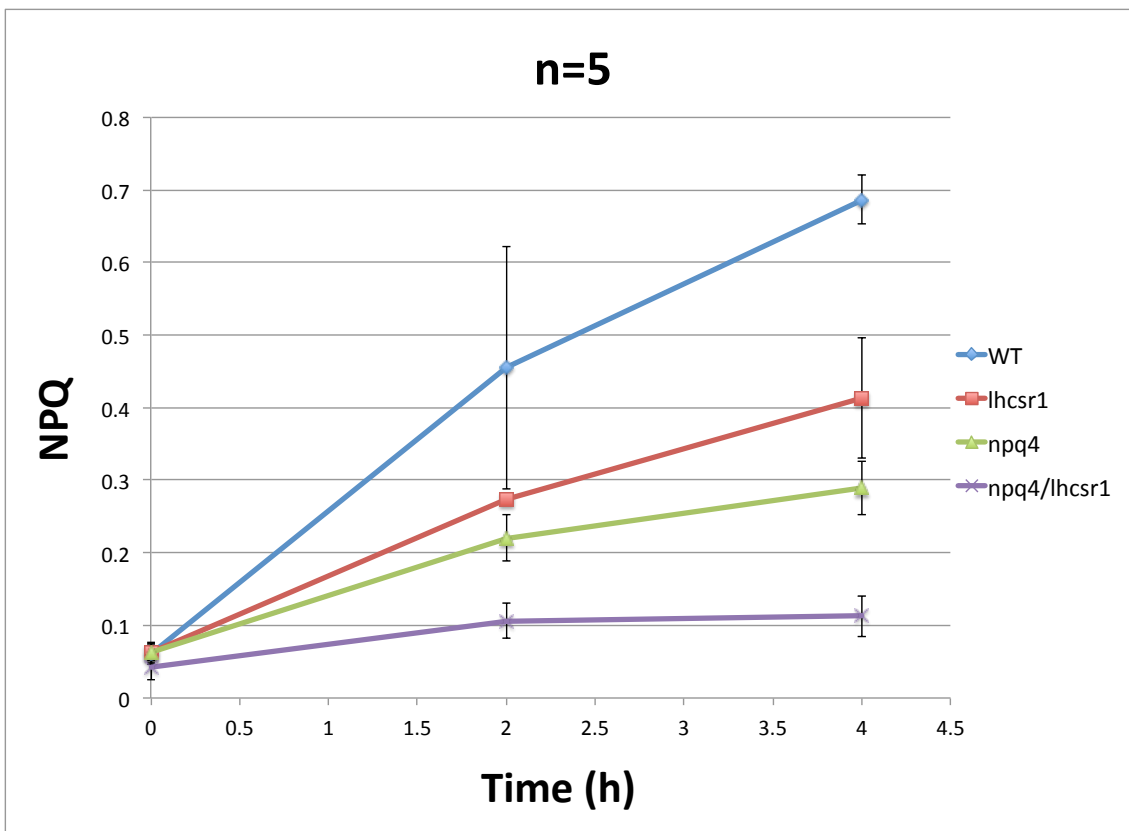


図 1 0 ; 光照射下における NPQ の駆動。変異体 *lhcsr1* においても比較的高い NPQ が誘導されている。LHCSR1 を欠損しているため、WT よりも NPQ の誘導が低いと考えられる。

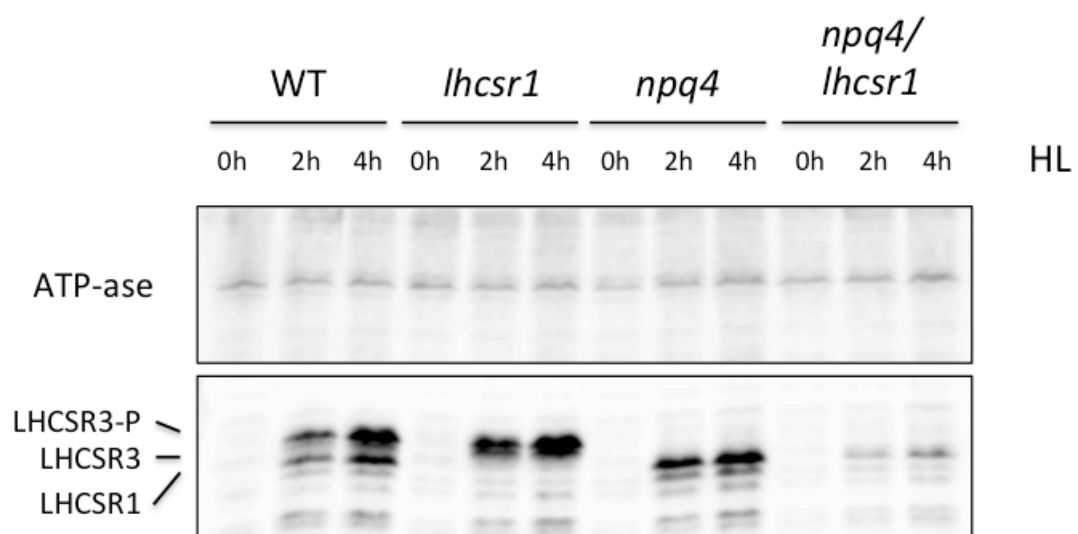


図 1 1 ; 光照射下における LHCSR3, LHCSR3-P および LHCSR1 の発現。WT と *npq4* において LHCSR1 の発現が確認された。図 1 0 と合わせて考えれば、LHCSR1 の蓄積による NPQ の誘導が確認された。

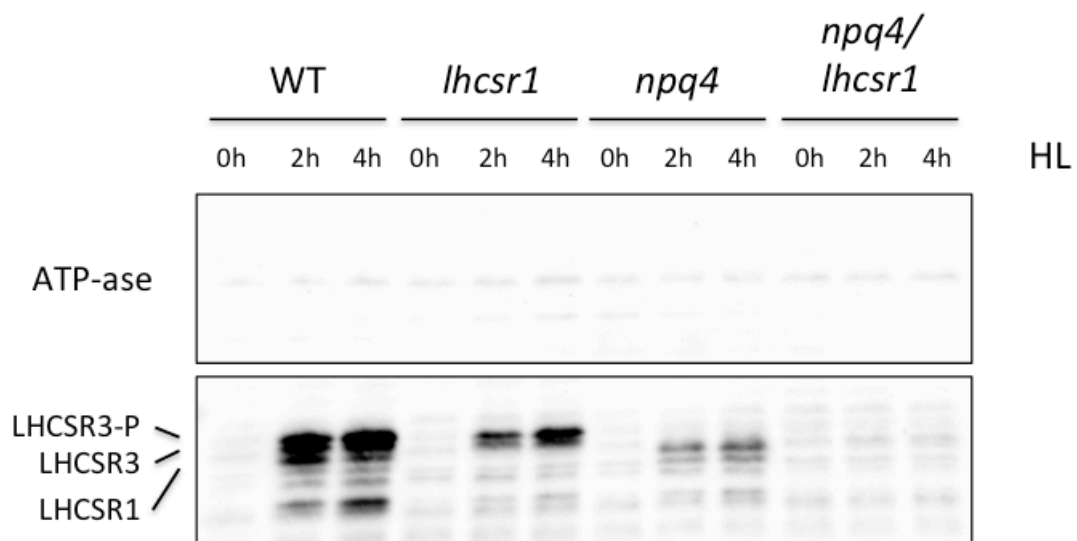


図 1 2 ; 光照射下における LHCSR3, LHCSR3-P および LHCSR1 の発現。WT および *lhcsr1* においてバンドが重なっており、それぞれの発現量を明確に確認する事は難しい。

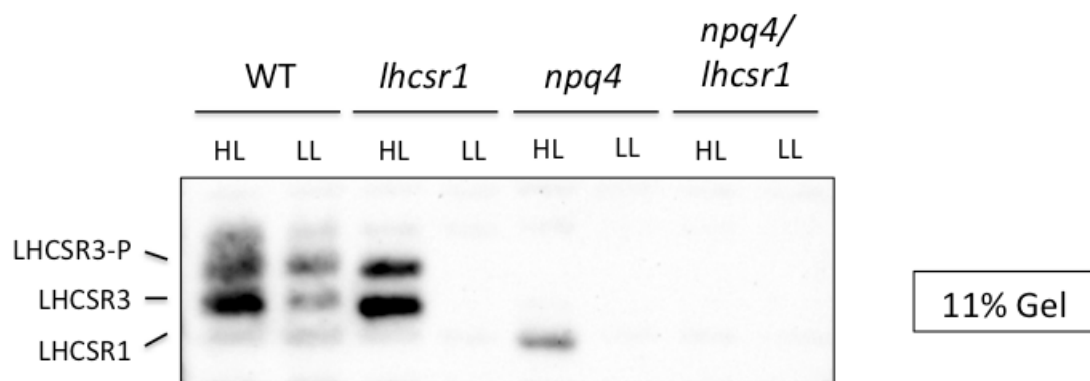


図 1 3 ; 光照射下における LHCSR3, LHCSR3-P および LHCSR1 の発現。11% ゲルを用いた場合、従来のゲルを用いた場合に比べ LHCSR1/3 のバンドを明瞭に分離する事ができる。

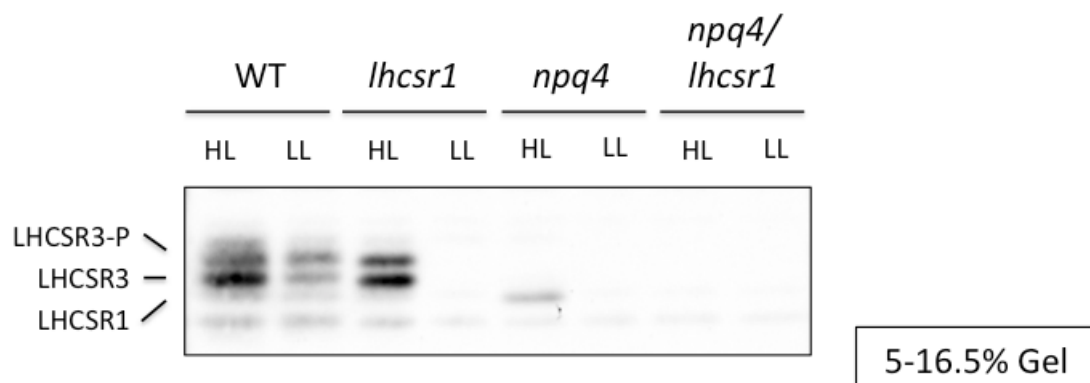


図 1 4 ; 光照射下における LHCSR3, LHCSR3-P および LHCSR1 の発現。図 1 3 の 11%ゲルと組成の似たゲルを用いたが、11%ゲルに比べると LHCSR1/3 の分離能が高くはなかった。

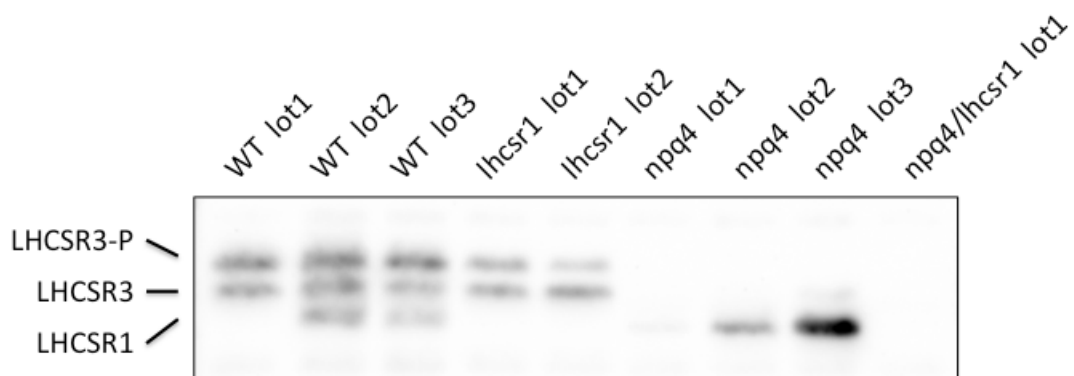


図15;チラコイド膜上における LHCSR3, LHCSR3-P および LHCSR1 の蓄積。Lot によってチラコイド膜上における LHCSR1/3 の蓄積量にバラツキがあるので、蓄積量の比較的多いものを選別することが必要であると考えられる。

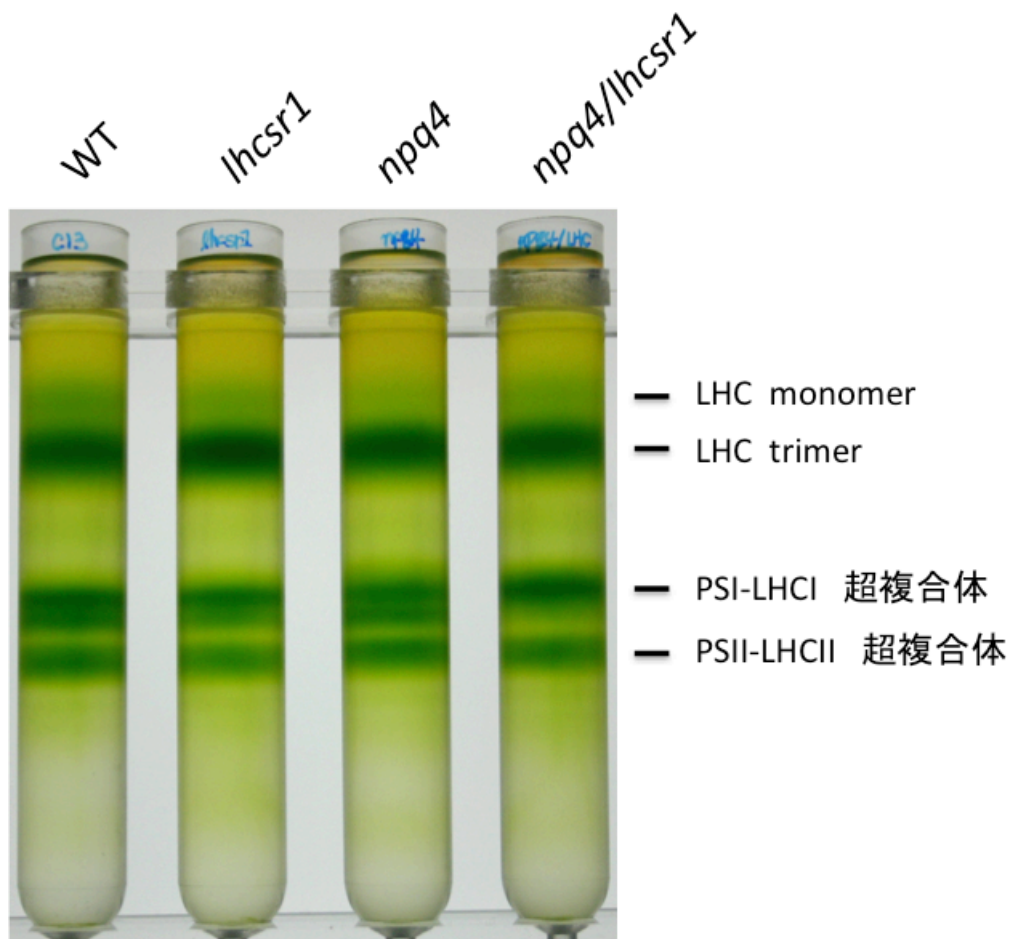


図 1 6 ; ショ糖密度勾配遠心分離法により分画された各光合成タンパク質。 *lhcsr1* でも正常にバンドが形成されている事から、LHCSR1 を欠損した場合でもタンパク質超複体の構成に影響を与えなかった事が考えられる。

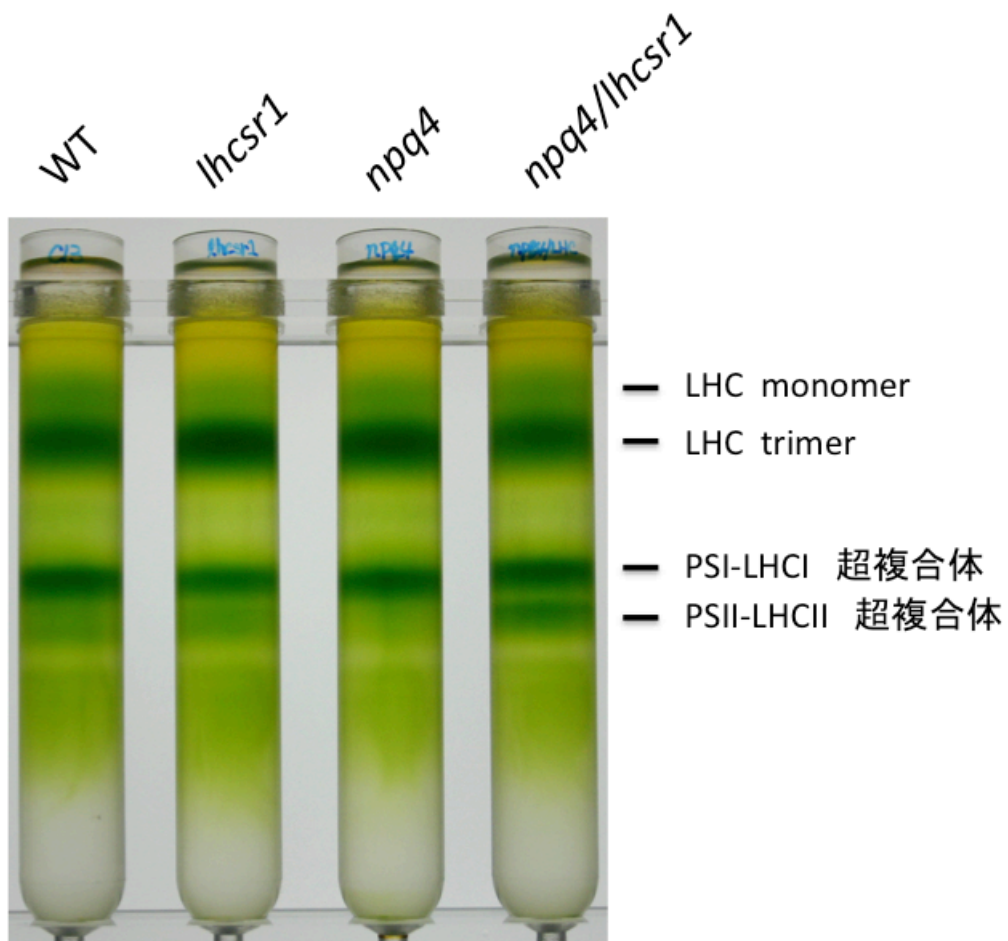


図 1 7 ; ショ糖密度勾配遠心分離法により分画された各光合成タンパク質。細胞を濃度が高い状態で破碎して単離したチラコイド膜を用いたSDG。PSII-LHCII 超複合体が一部破壊されている事が確認できる。

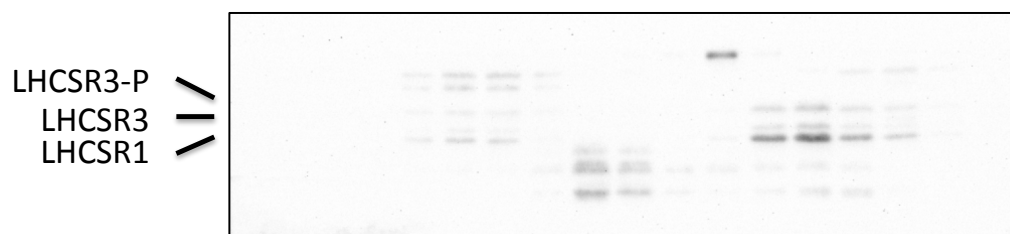


図 1 8 ;各分画を用いた LHCSR3-P, LHCSR3, および LHCSR1 の局在 (a)WT (b)*npq4/lhcr1*。PSII-LHCII 超複合体に LHCSR3-P が局在している事が確認できるものの、LHCSR1 については明らかにする事はできなかった。

「実験材料・方法」

「株および培養条件」

本章では、野生株 137C+、変異体 *npq4*(Peers et al., 2009), *npq4/lhcsr1*(Silvia et al., 2016)に加え、新たに LHCSR1 変異体 *lhcsr1* が用いられた(カリフォルニア大バークレー校 Niyogi 博士より提供)。

LHCSR1/3 の発現確認のため、各株は従属栄養培地(TAP)(Gorman et al,1965)を用いて対数増殖期(約 $2.0\sim 5.0\times 10^6$ Cells/ml)に達した細胞を、独立栄養培地(HSM)(Sueoka, 1960)に置換後、クロロフィル含有量を測定し、サンプルを 2ugChl/ml の濃度に調整した。サンプルは LED 下(約 400uE)で 4 時間培養された。

生化学実験のため、TAP 寒天培地上で保管されている細胞は液体独立栄養培地を用いて 100~150uE 下で対数増殖期まで育てられた。その後、1L スケールのボトルに移され 23°C、100~120uE で、CO₂ を通気して対数増殖期まで育て、その後細胞内に蓄積した CO₂ の濃度を下げるため、空気通気を伴い 12 時間培養された。前培養されたサンプルは、500uE の光条件下に移され、上記と同様の 23°C の条件下において 15 時間培養された。

「ウェスタン解析」

培養後の細胞は遠心によって回収された。サンプルはあらかじめ成形された 11% SDS-tris glycine-Urea(7.5M)ゲルを用いて泳動された。メンブレンは 1 時間ブロッキングされ、各抗体で処理された。抗体は LHCSR3 ATP-B, 1:10000 を用いた。メンブレンは抗体で処理されたあと、2-2-5-5-5-分で計 5 回洗われた。1ug Chl が各レーンにロードされた。WSE-7120L EzWestLumi plus(ATTO, Tokyo, Japan)を用いた増強化学発光(ECL)によるシグナルは ChemiDoc(BIO-RAD, California, USA)によって検出された。

「チラコイド膜の単離」

Tokutsu et al, 2012 に従って行われた。大量培養した細胞は、遠心によって回収し、60ml のバッファーによって懸濁した。細胞を懸濁する際に、25mM MES, 0.33M スクロース, 5mM MgCl₂, 1.5mM NaCl, /NaOH, (pH6.5)で調整したバッファーを使用した。BioNeb (Glascot, Terre Haute, IN) を用いて、約 7.5

kg/cm² の圧力において、2回細胞を破碎した。破碎した懸濁液は、100,000 ×g, 4°C, 25min の条件下で Two Step SDG を行う事により、チラコイド膜が分離された。チラコイド膜の分画は回収され、60ml 0.33MS バッファーで2回洗われた。チラコイド膜は 500ul のバッファーを加え、絵筆を用いて再懸濁され、液体窒素下(-196°C)に保存された。

「シヨ糖密度勾配遠心(SDG)」

Tokutsu et al, 2012 を一部改変して行われた。液体窒素下で保存されていたチラコイド膜は、解凍され 25 mM MES, pH 6.5 バッファーで1回洗われ、500ul の同バッファーで絵筆を用いて再懸濁した。チラコイド膜溶液は 0.4mgChl に調整され、1.0%の α -DM を加えて、暗黒下、氷上で15分可溶化した。可溶化後、10000g×, 4°Cで遠心して不純物を分離し、上澄みを 500ul(200ug Chl)とり、SDG チューブ(0.1/0.4/0.7/1.0/1.3 M sucrose ,25mMES, 0.02% α -DM, pH6.5)の上にロードした。SDG チューブは 4°C, 90,000 ×g on a P40ST rotor (Hitachi-koki, Japan)で20h 超遠心を行った。

第3章 LHCSR1 の発現条件の検討

—序論—

LHCSR1 のチラコイド膜上での局在を明らかにするためには、LHCSR1 の発現量が多いほうが都合が良い可能性がある。プレ実験において LHCSR1 を HL 照射して発現誘導実験を行った結果、安定的にその再現を取る事は難しかった (図 1 9)。そこで LHCSR3 の発現誘導解析で得られている過去知見を用いて、それを応用する形で LHCSR1 の発現量を増加させることを目的に実験を行った。

「結果・考察」

HL(500uE、蛍光灯)照射下におけるタイムコースをとることにより、LHCSR1/3 を十分に発現させるための最適な培養時間を調べた。その結果、LHCSR3 はおよそ 15 時間で発現量が極大に達した(図 2 0)。一方 LHCSR1 は若干早く、12 時間ほどで発現の極大に達した(図 2 0)。これは、LHCSR1 が LHCSR3 よりも早く誘導されやすいタンパク質であるか、もしくは LHCSR1 がもともと HL 下では LHCSR3 よりも発現の最大量が少ないため、早く発現量の上限に到達したという事が考えられた。しかし、従来と培養時間を変える事により LHCSR1/3 の蓄積量を増加させる事は難しいようである。

次に、蛍光灯は使用年数の増加による劣化のため、光照射量 PAR(光合成に用いることのできる 400-700nm の光)の合計量は等しくても、含有波長帯が異なる可能性もある。実際に旧新蛍光灯を同様のソケットに装着し、基礎生物学研究所光学解析室の協力を得て分光放射計ひだまり Mini(相馬光学、日本)を用いて含有波長帯の各波長の相対値を確認したところ、複数現れるピークに差異が確認された。そこで、蛍光灯を新しいものに交換し、改めて上記の条件下(500uE、蛍光灯)で培養したところ、蛍光灯を変える前の実験と比較して LHCSR1/3 の発現量に明瞭な差は見られなかった。また、光源を蛍光灯とは異なった波長帯の光を出すメタルハライドランプに変え強光条件下(500uE)で培養を試みたが、明瞭な LHCSR1 の発現量の変化は確認されなかった(図 2 1)。

過去の報告によると、LHCSR3 は光条件下のみならず、様々な栄養欠乏下においても発現誘導が促進されることが明らかとなっている。そこで、LHCSR1 も同様に栄養欠乏条件下において培養する事により、発現量が増加するかどうかを確認した。従属栄養培地(TAP)したで前培養した細胞を、窒素源(NH_4^+)および鉄(Fe^{2+})を欠乏した独立栄養培地(HSM)を用いてそれぞれ細胞を置換し、HL(500uE、蛍光灯)を 4 時間照射した。その結果、HSM を用いた場合に比べ窒素源(NH_4^+)および鉄(Fe^{2+})を欠乏培地で培養した細胞はわずかに LHCSR1 の発現量が上昇したものの、大きな発現量の差を確認することはできなかった(図 2 2)。

当研究室の得津博士により、基礎生物学研究所大型スペクトログラフを用いた実験において、各波長帯の光照射下における LHCSR1 及び LHCSR3 の発現が調べられた。結果、LHCSR1 は主に紫外線領域(300-350nm)で、LHCSR3 は主に青色光領域(400-450nm)で発現し、発現誘導における波長特異性があること

が明らかとなった。後に、投稿論文として受理され、LHCSR1は紫外線(UV-B)受容体のUVR8を介した発現機構を持つこと(Allorent et al., 2016)、LHCSR3は青色光受容体であるフォトロピンを介した発現機構を持つ(Petroutsos et al., 2016)ことが明らかとなった。この結果より、LHCSR1を細胞内で十分に蓄積させるためにはUV照射が適切であることが明らかとなった。従来用いていた光源は(蛍光灯、LED、メタルハライドランプ)は、含有光にほとんど紫外線を含まないため、LHCSR1を十分に発現させることが困難であったと考えられる。

波長依存的な発現機構をもつLHCSR1/3であるが、このほかにも特徴的な発現パターンが存在することが明らかになった。LHCSR3を発現させるため、異なる強さの青色光(450nm)を照射したところ、LHCSR3の発現量は、照射した青色光の量におおよそ比例して細胞内に蓄積した(図23)。一方、LHCSR1を発現させるため、異なる強さの紫外線を照射したところ、LHCSR1の発現量はそれぞれおおよそ等しく蓄積した(図24)。つまり、青色光依存的なLHCSR3の蓄積量は、青色光のそれに比例しており、一方紫外線依存的なLHCSR1の蓄積は、一定量以上の紫外線が存在すればおおよそ等しいレベルで引き起こされることが明らかとなった。

LHCSR1を十分に発現させるため、メタルハライドランプにUV蛍光管を取り付けた独自の光源を開発した(図25)。この光源はPARに加え紫外線も含有しており太陽光の含有スペクトルにできるだけ近い条件を再現した。UV蛍光管はLHCSR1を発現誘導するための紫外線領域(300-350nm)の光を比較的多く含んでいる(図26)。このUV蛍光管を単独で用いて株を培養し、そのサンプルを用いてウェスタン解析を行った結果、LHCSR1の十分な蓄積(図27)とNPQの駆動(図28)が確認された。

本研究室の方法によると、チラコイド膜を単離するために細胞を大量培養する際、1Lスケールのボトルにサンプルを加え、外部から光照射する。この際、照射光はボトルのガラスを透過してサンプルに到達するが、光がガラスを透過する過程で特定の波長域の光が吸収・拡散されないかを調べた。基礎生物学研究所光学解析室の協力を得て、分光放射計ひだまりMini(相馬光学、日本)を用いて、波長帯ごとの光のガラス透過率を測定したところ、わずか厚さ数ミリのガラス及びプラスチックであっても紫外線は散乱・吸収されほとんど透過しなかった。この結果から、紫外線を細胞に照射してLHCSR1を十分に発現させるためには、紫外線が直接的にサンプルに照射されるようにする必要がある。

この結果から、紫外線が直接的にサンプルに照射されるように、独自の培養装置を作成した際は、サンプルを入れるケースにフタのない仕様とした。ファンを用いる事により、培養中のサンプル温度を室温の 25℃で一定に保つ事ができる事も確認した。

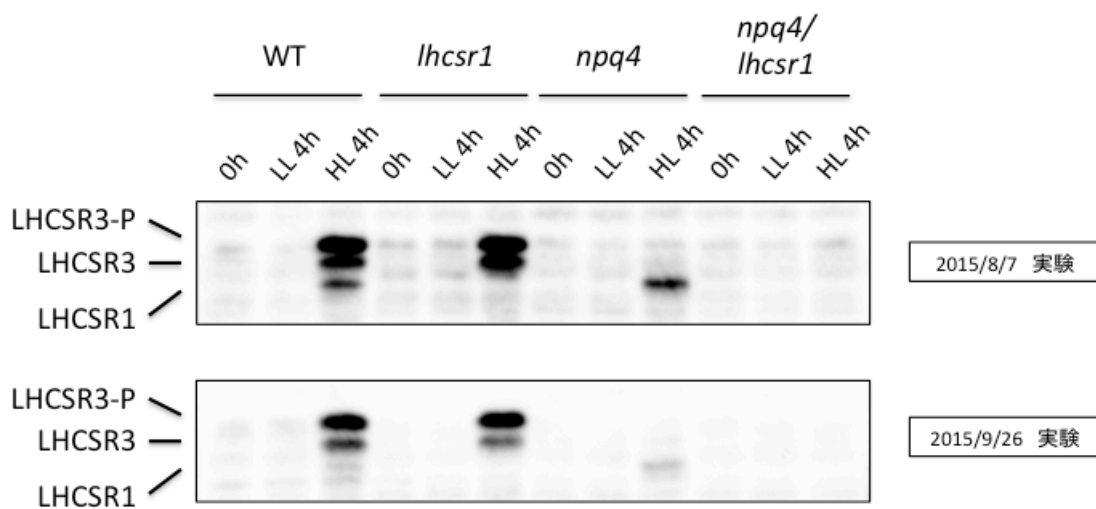


図 19 ; 光照射下における LHCSR3, LHCSR3-P および LHCSR1 の発現。LHCSR1 の発現量に差異が生じている。LHCSR1 を安定的に発現させる事は難しい。

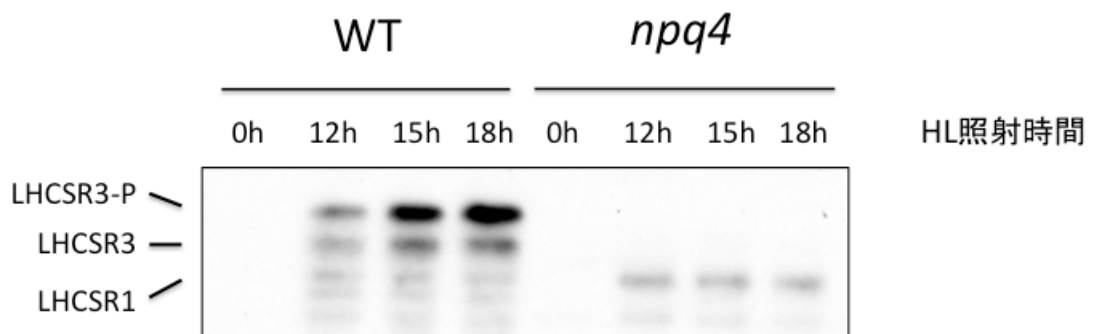


図 20 ; 光照射下における LHCSR3, LHCSR3-P および LHCSR1 の発現。培養時間を従来の 15 時間から伸ばしたとしても、LHCSR1/3 の蓄積量の増加は期待できない事が明らかとなった。

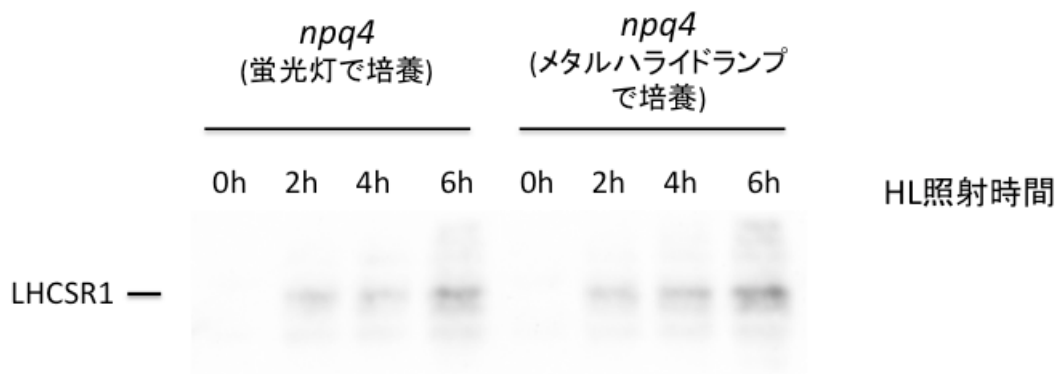


図 2 1 ; 光照射下における LHCSR1 の発現。
光照射の際の光源を変更しても、LHCSR1
の蓄積量の増加は望めない。

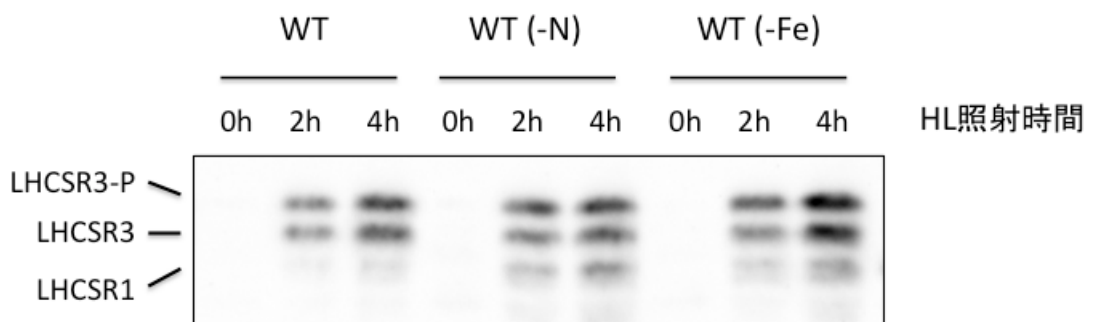


図 2 2 ; 光照射下における LHCSR3, LHCSR3-P および LHCSR1 の発現。特定の栄養欠乏条件下で培養したとしても、LHCSR1 の蓄積量の大幅な増加は望めなかった。

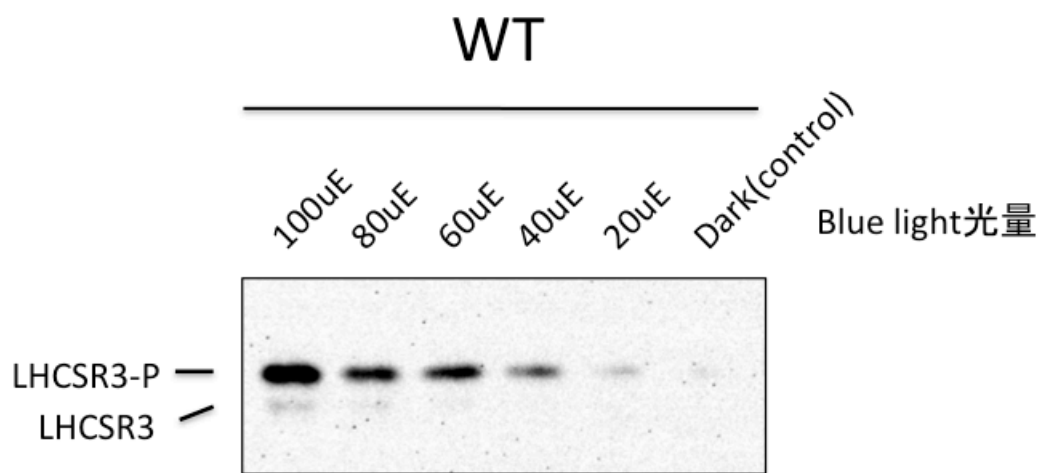


図 2 3 ; 青色光照射下における LHCSR3-P および LHCSR3 の発現。 LHCSR3 は青色光の照射量に比例して発現・蓄積する。

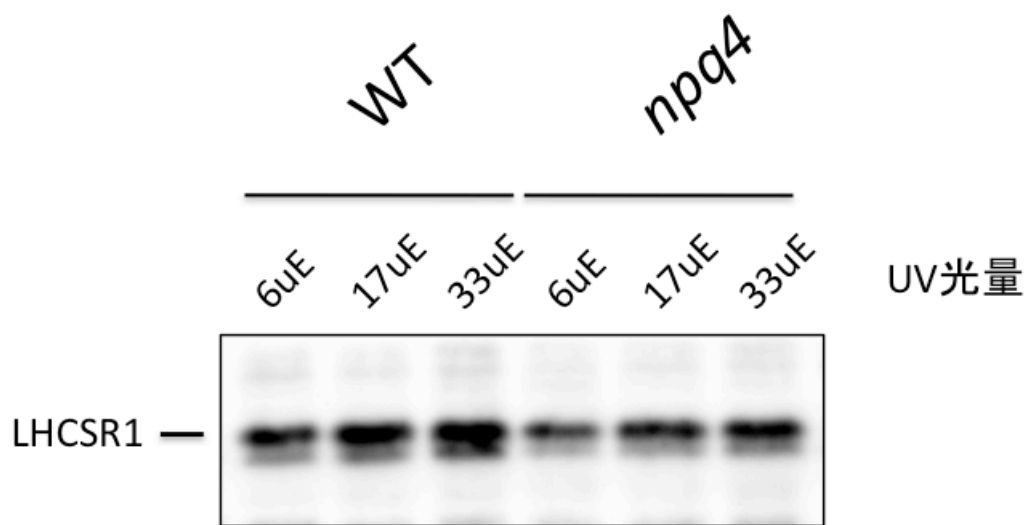


図 2 4 ; UV 光照射下における LHCSR1 の発現。
LHCSR1 は LHCSR3 と違い、一定量以上の UV が
照射されれば、およそ一定量の発現・蓄積をする。

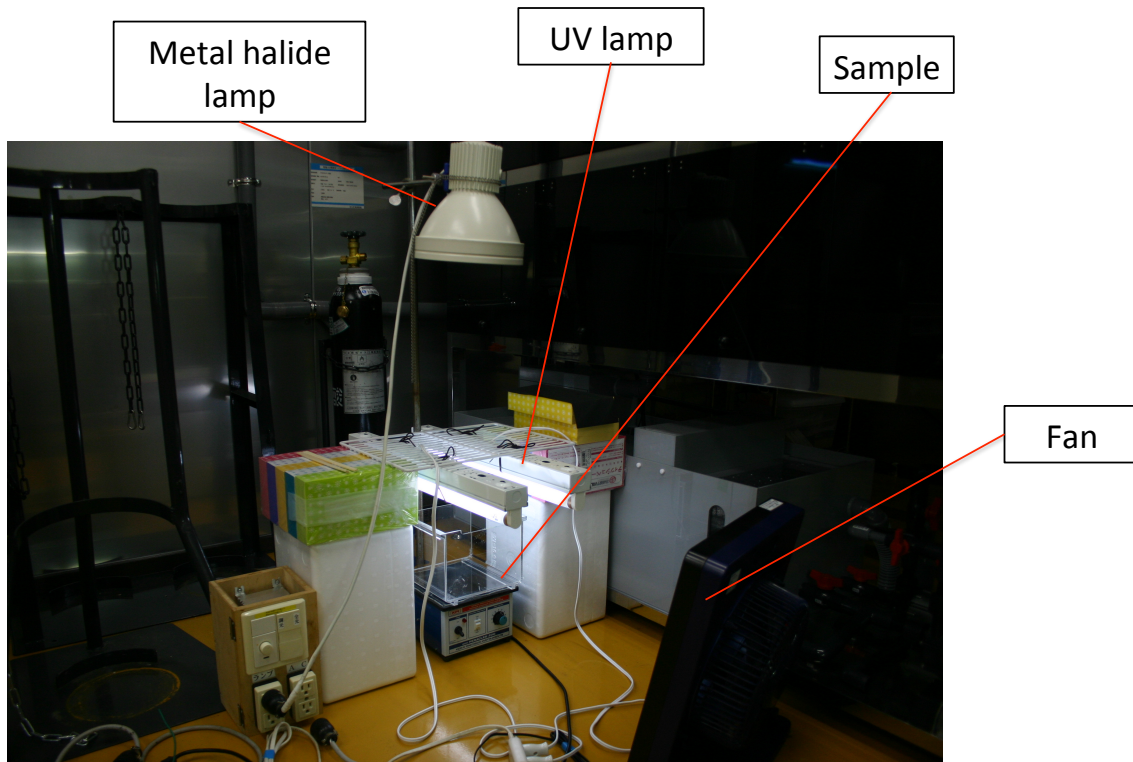


図 2 5 ; UV 管とメタルハライドランプを用いた独自の光源。培養ケースのフタがなく、UV 光が吸収される事なく直接サンプルに十分照射されるようになっている。培養中に Fan を使用する事により、サンプル温度を室温の 25°C に保つ事ができる。

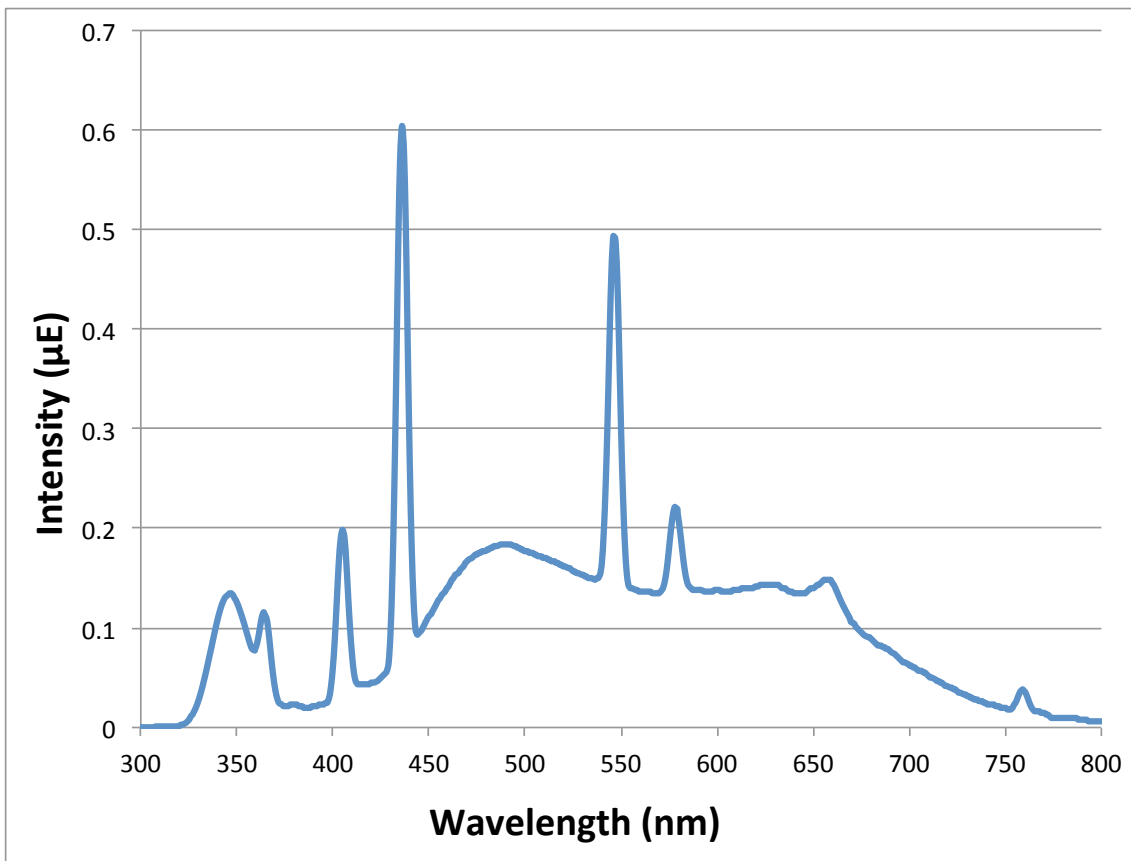


図 2 6 ; UV 管 (2 本) の光の含有波長域。蛍光管等と比べ、 LHCSR1 の発現誘導するための 300-350nm の波長帯の光が含まれていることが分かる。

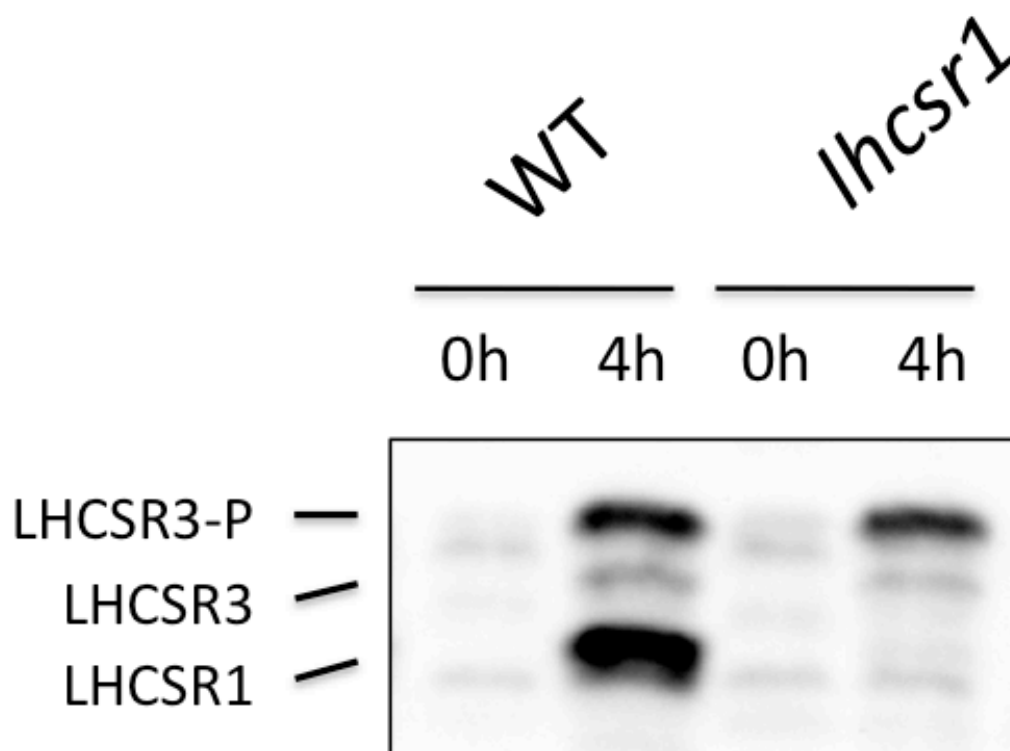


図 2 7 ;UV 光照射下における LHCSR3, LHCSR3-P および LHCSR1 の発現。UV 管を用いる事により、十分な LHCSR1 を発現させる事ができる。

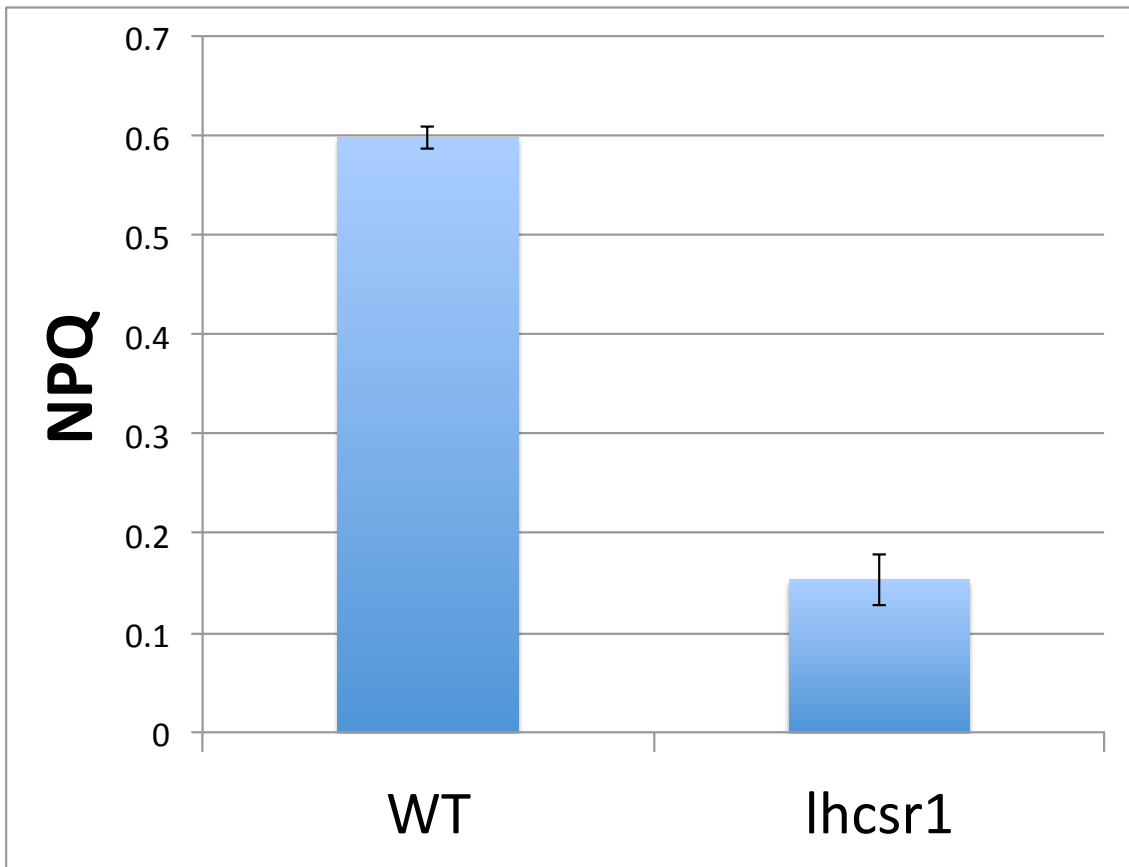


図 2 8 ;UV 光照射下における NPQ の駆動。
UV によって発現した LHCSR1 が NPQ の
駆動に関わっている事が明らかとなった。

「実験材料・方法」

「株および培養条件」

本章では、野生株として 137C+、変異体 *npq4*(Peers et al., 2009)および *lhcsr1* が用いられた(カリフォルニア大バークレー校 Niyogi 博士より提供)。

窒素および鉄欠乏下における LHCSR1/3 の発現を確認するため、各株は従属栄養培地(TAP)(Gorman et al,1965)を用いて対数増殖期(約 $2.0\sim 5.0\times 10^6$ Cells/ml)に達した細胞を、窒素(NH_4^+)および鉄(Fe^{2+})を含有していない独立栄養培地(HSM)(Sueoka, 1960)に置換後クロロフィル含有量を測定し、サンプルを 2ugChl/ml の濃度に調整した。サンプルは蛍光灯下(約 500uE)で空気通気を伴って培養され、2,4 時間でサンプリングが行われた。

LHCSR1/3 発現のタイムコースを取得するため、各株は従属栄養培地(TAP)(Gorman et al,1965)を用いて対数増殖期(約 $2.0\sim 5.0\times 10^6$ Cells/ml)に達した細胞を、独立栄養培地(HSM)(Sueoka, 1960)に置換後、クロロフィル含有量を測定し、サンプルを 2ugChl/ml の濃度に調整した。サンプルは蛍光灯下(約 500uE)で空気通気を伴って培養され、12,15,18 時間でサンプリングが行われた。

他のすべての光照射実験においては上記同様に前培養が行われた。

生化学実験のため、TAP 寒天培地上で保管されている細胞は液体独立栄養培地を用いて 100~150uE 下で対数増殖期まで育てられた。その後、1L スケールのボトルに移され 23°C、100~120uE で、CO₂ を通気して対数増殖期まで育て、その後細胞内に蓄積した CO₂ の濃度を下げるため、空気通気を伴い 12 時間培養された。前培養されたサンプルは、プラスチック製の培養ケースに移され、25°C の条件下において 15 時間培養された。

「ウェスタン解析」

培養後の細胞は遠心によって回収された。サンプルはあらかじめ成形された 11% SDS-tris glycine-Urea(7.5M)ゲルを用いて泳動された。メンブレンは 1 時間ブロッキングされ、各抗体で処理された。メンブレンは抗体で処理されたあと、2-2-5-5-5 分で計 5 回洗われた。1ug Chl が各レーンにロードされた。WSE-7120L EzWestLumi plus(ATTO, Tokyo, Japan)を用いた増強化学発光(ECL)によるシグナルは ChemiDoc(BIO-RAD, California, USA)によって検出された。

第4章 新光源(メタルハライドランプ+UV管)を用いた LHCSR1 の局在と機能の解明

—序論—

本章においては、第3章において作成した独自の新光源を用いて LHCSR1 を十分に発現させた上で、LHCSR1 の局在及び機能を生化学的に解析する事を目的とした。

「結果・考察」

この環境下において LHCSR1 を発現させるための最適な培養時間を調べるため、WT および *npq4* を用いてタイムコースを取得した。また、得られたサンプルを用いてウェスタン解析を行うことによって、LHCSR1 の発現・蓄積を確認した。WT および *npq4* 細胞を独立栄養培地(HSM)を用いて培養した結果、LHCSR1 は光照射とともに約 10-12 時間で発現量および NPQ の蓄積がピークに達した(図 2 9)。そこで、今後の実験ではこの光源を用いて 13 時間光照射を行うこととした。LHCSR1 の局在を確認するため、作成した独自の培養装置を用いて予備実験として WT と *npq4* を培養し、生化学的にチラコイド膜を単離した。単離したチラコイド膜を用いてウェスタン解析を行った結果、いずれの株のチラコイド膜においても LHCSR1 の十分な蓄積が見られたため、作成した光源の有効性が確認された(図 3 0)。単離した WT および *npq4* のチラコイド膜を用いて SDG を行い、分画したサンプルを用いてウェスタン解析を行った結果、LHCSR1/3 が Free LHC の分画に存在していることが明らかとなった(図 3 1)。一方、PSII-LHCII 超複合体分画には、従来の報告の通り LHCSR3 の局在が確認されたものの、LHCSR1 の局在を明確に結論付けることはできなかった(図 3 1)。そこで、PSII-LHCII 超複合体分画を濃縮したサンプルを用い(約 4 ~ 6 倍、Chl 量換算)、ウェスタン解析を行った結果、LHCSR1 のバンドが確認された(図 3 2)。これは LHCSR1 が PSII-LHCII 超複合体に局在していることを示唆している。

過去の報告では強光条件下で LHCSR3 が発現し、PSII-LHCII-LHCSR3 超複合体を形成することによってエネルギー消去に寄与することが明らかとなっている。そこで、先の実験で LHCSR1 が PSII-LHCII-LHCSR1 超複合体を形成しているということを仮定し、生化学的に単離した 4 種の株(WT, *lhcsr1*, *npq4*, *npq4/lhcsr1*)の PSII-LHCII 超複合体を用いて、蛍光寿命測定を行った。つまり、PSII-LHCII 超複合体において LHCSR1 がどの程度 NPQ におけるエネルギー消去に関与しているのかを調べた。その結果、酸性条件下(pH5.5)においてすべての株が蛍光の減衰が確認され、つまりエネルギー消去が確認された(図 3 3)。しかし、その蛍光減衰の程度はすべての株においてほぼ等しかった。WT と *lhcsr1*、また *npq4* と *npq4/lhcsr1* の蛍光減衰に差が生じなかったことから、PSII-LHCII 超複合体における LHCSR1 の機能を明らかにすることはできなかった。この結果から、LHCSR1 が PSII-LHCII-LHCSR1 超複合体を形成してい

るということを仮定した場合、1, チラコイド膜から光合成タンパク質複合体を生化学的に単離する過程で、LHCSR1 の活性が失われた。2, LHCSR1 は PSII-LHCII 超複合体依存ではない独自の過剰光エネルギー消去機能を持っている、と考えられた。

過去の文献を参照し(Liguori et al., 2013)、一般的に用いられている酸性条件 pH 5.5 の条件と比べさらに強い酸性条件下(pH4.0)にて、より LHCSR1 の機能を発揮させた状態で蛍光寿命測定を行った。その結果、pH 5.5 の条件下で得られる結果と同様の結果が得られ、LHCSR1 の機能を明らかにすることができなかった(図 3 4)。また、PSII-LHCII 超複合体の含有色素を調べた結果、Chla/b 比が、チラコイド膜、及び細胞に比べ大きかった。PSII-LHCII 超複合体に含まれる中心部、PSII CORE は、Chl a のみを含み、一方 PSII CORE の外郭に結合している集光アンテナタンパク質 LHCII は Chla 及び Chlb を含む。つまり、PSII-LHCII 超複合体の外郭に集光アンテナが安定に結合・保存されている場合は Chla/b 比が比較的低くなり、物理的に破壊されている場合は Chla/b 比は高くなる。今回の PSII-LHCII 超複合体を用いた Chla/b 比の結果から、PSII-LHCII 超複合体の構造が物理的に壊れていることが示唆され、先の定常蛍光測定の結果とは異なった。最終的に、蛍光寿命測定ですべての株で蛍光の減衰の程度がほぼ等しくなる理由については完全には明らかにすることができなかった。

また、Tokutsu and Minagawa,2013 では、強光で誘導された LHCSR3 の影響により、WT のほうが *npq4* よりも PSII-LHCII 超複合体における過剰エネルギー消去が大きいことが明らかとなっている。しかし、今回の結果を見ると、WT と *npq4* の傾向の減衰は同程度であり再現をとることができなかった。これは、今回強光を再現する際に UV を含んだ独自の光源を用いたために起こったのではないかと考えられた。

細胞を用いた *in vivo* の実験によって、LHCSR1 は、酸性条件下において Free LHCII 依存のクエンチングを引き起こすことが明らかとなっている(Dinc et al., 2016)。SDG を用いて光化学系タンパク質を生化学的に分離精製すると、チューブ上部の Free LHCII 分画には LHCSR1 が存在していることが明らかとなっている(図 3 1)。そこで、Free LHCII 分画において LHCSR1 依存のクエンチングが起こっており、*in vivo* において駆動された NPQ の実態であると仮定し、SDG で分離精製した Free LHCII 分画を用いて、蛍光寿命測定を行った。

LHCSR3 の発現の影響を避け、LHCSR1 の機能をより明らかにするため、*npq4* 及び *npq4/lhcs1* を用いた。Free LHCII を界面活性剤 α -DM を 0.02% 含んだバッファーを用いて蛍光寿命を測定したところ、*npq4* 及び *npq4/lhcs1* のいずれの株においてもクエンチングを確認することができなかった(図 3 5)。次に、界面活性剤 α -DM をさらに低濃度の 0.002% 含んだバッファーを用いて蛍光寿命を測定したところ、*npq4* 及び *npq4/lhcs1* のいずれの株においてもクエンチングが確認された。界面活性剤を比較的低い濃度(0.002%)で用いた場合でのみ各アンテナタンパク質および LHCSR1 が凝集する事ができ、この凝集がクエンチングには必須の条件であることからこのような結果が得られたと考えられる。しかし、0.002% 含んだバッファーを用いて蛍光寿命を測定したところ酸性条件下において二種の株の蛍光の減衰に差が見られなかったことから(図 3 5)、Free LHCII 分画における LHCSR1 の機能を明らかにすることはできなかった。

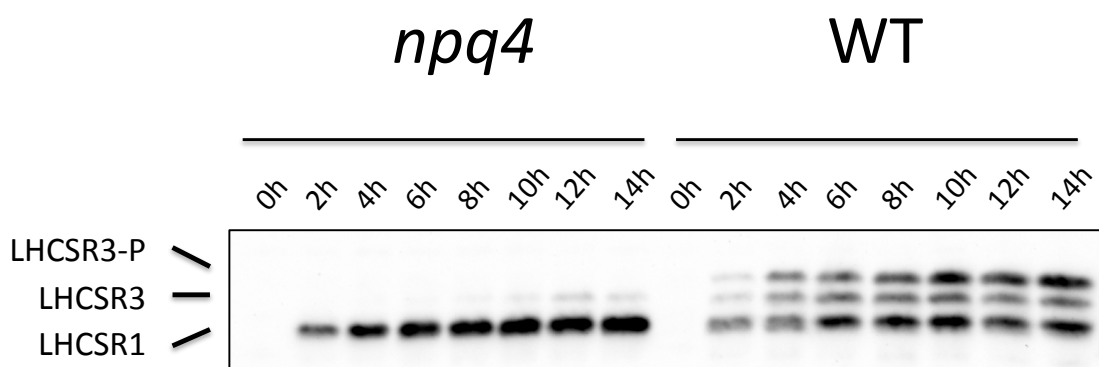


図 2 9 ; 光照射下における LHCSR3-P, LHCSR3 および LHCSR1 の発現。UV 下における LHCSR1 の発現・蓄積はおよそ 10-12 時間でピークになる事が明らかとなった。

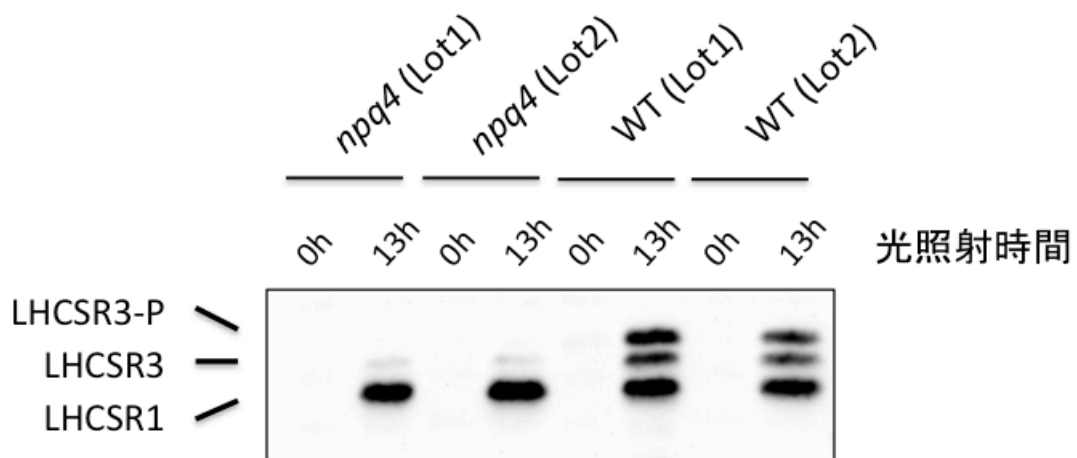
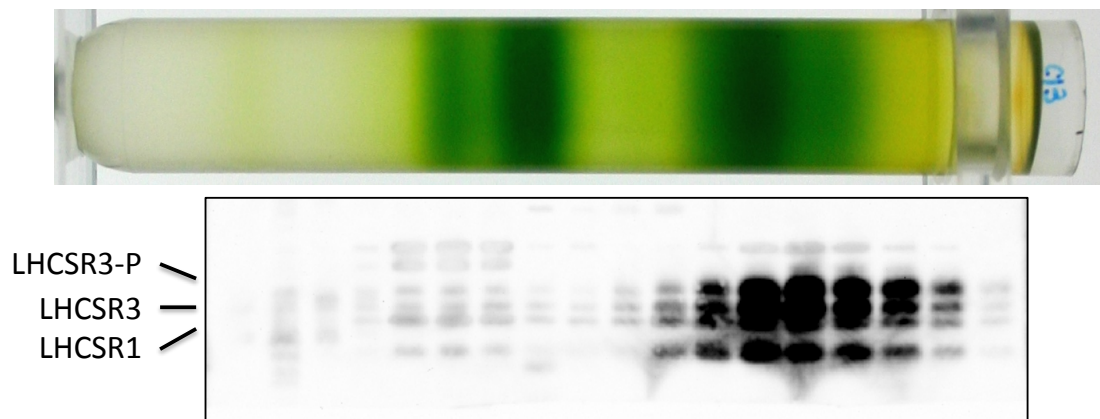


図 3 0 ;チラコイド膜上における LHCSR3-P, LHCSR3 および LHCSR1 の蓄積。UV 管を含んだ新光源を用いた場合、従来に比べ十分な LHCSR1 がチラコイド膜上に蓄積していることが分かる。

(a)



(b)

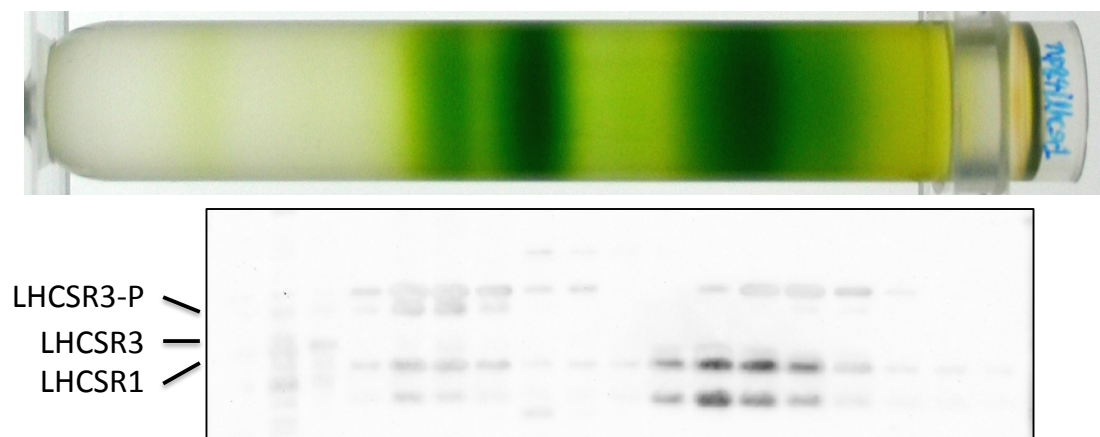


図 3 1 ;各分画を用いた LHCSR3-P, LHCSR3, および LHCSR1 の局在 (a)WT (b)*npq4/lhcsr1*。LHCSR3-P および LHCSR3 の PSII-LHCII 超複合体への局在は確認できたものの、LHCSR1 の局在は確認する事ができなかった。

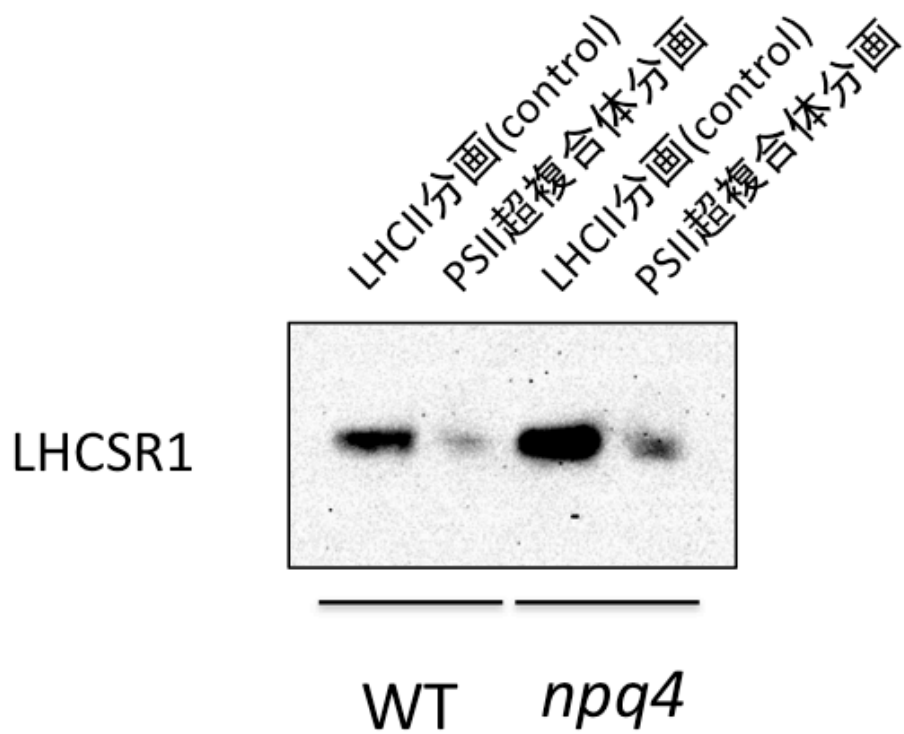


図 3 2 ;濃縮サンプルを用いた LHCSR1 の局在。この結果から、PSII-LHCII 超複合体に LHCSR1 が局在している可能性がある。

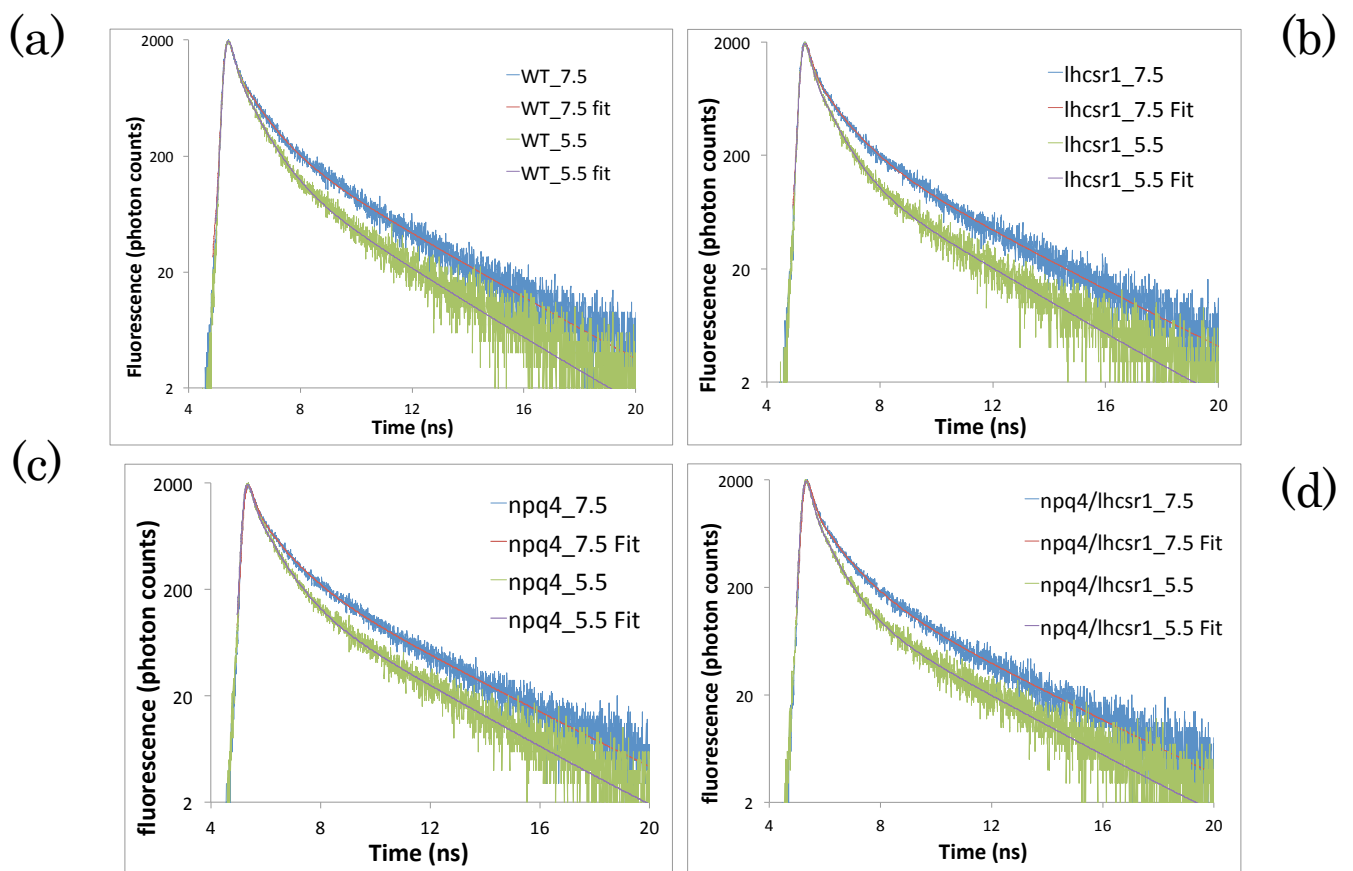


図 3 3 ;PSII-LHCII 超複合体を用いた蛍光寿命測定 (a) *WT* (b) *lhcsr1* (c) *npq4* (d) *npq4/lhcsr1*。4 種の株間に差が見られなかったことから、LHCSR1 の PSII-LHCII 超複合体における機能を明らかにする事ができなかった。

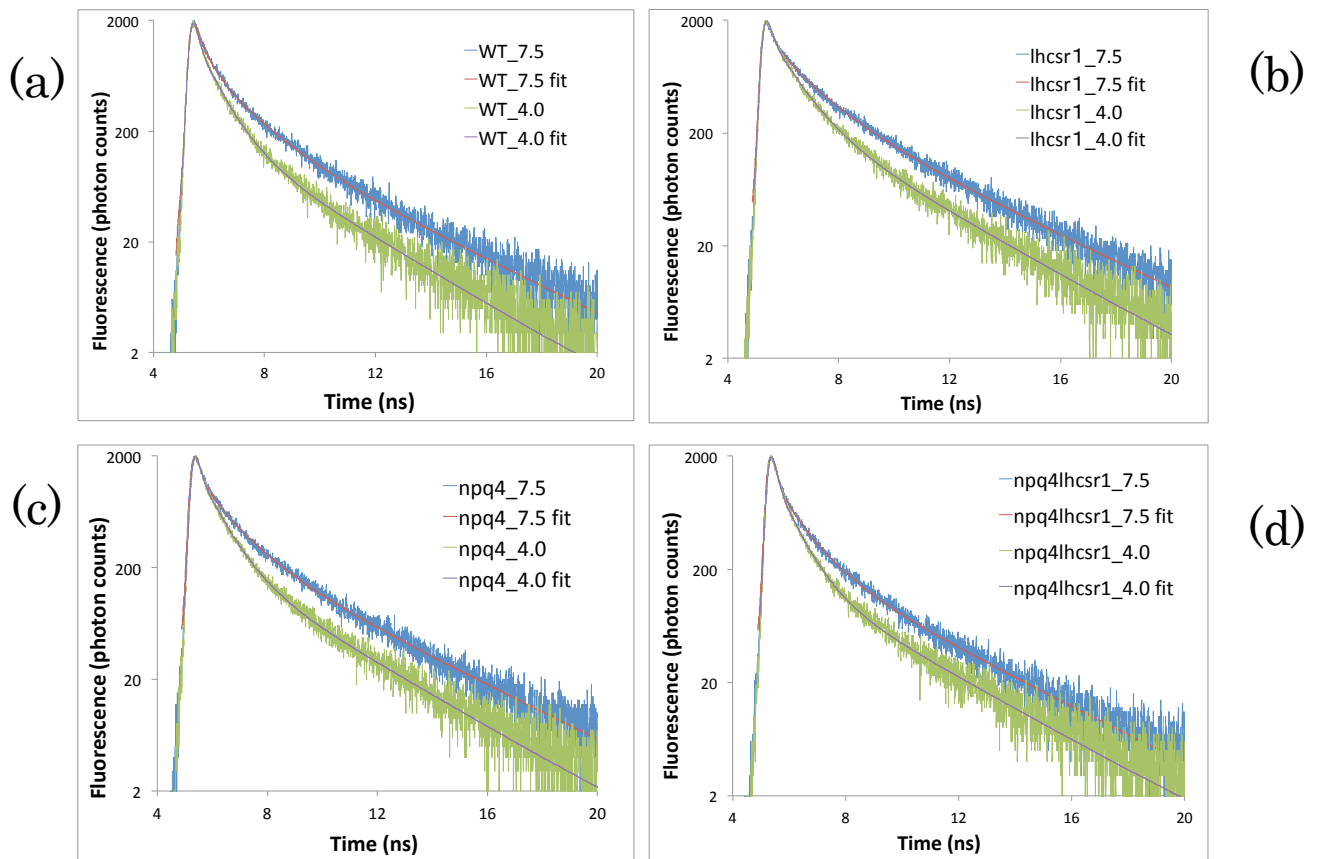
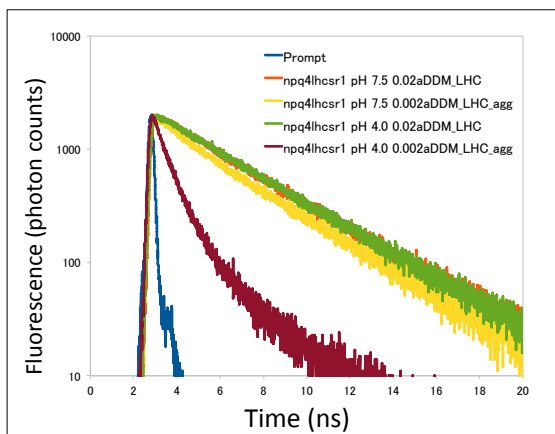


図 3 4 ;PSII-LHCII 超複合体を用いた蛍光寿命測定
 (a) *WT* (b) *lhcsr1* (c) *npq4* (d) *npq4/lhcsr1*。LHCSR1 の機能
 を活性化するため、チラコイド膜を従来よりも強い酸性条件
 下(pH4.0)においた。しかし、4 種の株間で差が見られなかつた
 ことから、LHCSR1 の機能を明らかにする事はできなかつた。

(a)



(b)

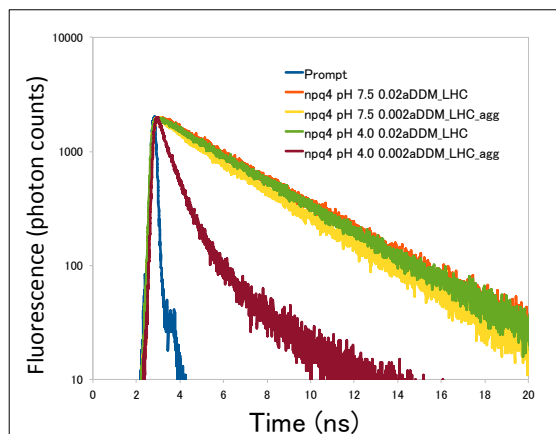


図 3 5 ;LHCII 分画を用いた蛍光寿命測定
(a)*npq4* (b)*npq4/lhcsr1*。二種の株で、蛍光の減衰に差が確認されなかった事から、LHCSR1 の Free LHCII 分画における機能を過去の報告(Dinc et al., 2016)のように確認する事はできなかった。

「実験材料・方法」

「株および培養条件」

本章では、野生株として 137C+、変異体 *npq4*(Peers et al., 2009), *npq4/lhcsr1*(Silvia et al., 2016)および *lhcsr1* が用いられた(カリフォルニア大バークレー校 Niyogi 博士より提供)。

各株のタイムコースを取得するため、各株は従属栄養培地(TAP)(Gorman et al,1965)を用いて対数増殖期(約 $2.0\sim 5.0\times 10^6$ Cells/ml)に達した細胞を、独立栄養培地(HSM)(Sueoka, 1960)に置換後、クロロフィル含有量を測定し、サンプルを 2ugChl/ml の濃度に調整した。サンプルは新光源(メタルハライドランプ+UV 管)(約 400uE)で空気通気を伴って培養され、2,4,6,8,10,12,14 時間でサンプリングが行われた。

生化学実験のため、TAP 寒天培地上で保管されている細胞は液体独立栄養培地を用いて 100~150uE 下で対数増殖期まで育てられた。その後、1L スケールのボトルに移され 23°C、100~120uE で、CO₂を通気して対数増殖期まで育て、その後細胞内に蓄積した CO₂の濃度を下げるため、空気通気を伴い 12 時間培養された。前培養されたサンプルは、プラスチック製の培養ケースに移され、25°C の条件下において 13 時間培養された。

「蛍光寿命測定」

PSII-LHCII 超複合体をもちいた蛍光は FluoroCube (HORIBA Jobin-Yvon)を用いて常温(23°C)で測定された。Pico second パルスレーザー(DD-470L; HORIBA Jobin-Yvon)の 463nm のレーザー光を用いて 10 MHz の繰り返し数でクロロフィルが励起され、蛍光は monochromatic detector において 682nm で検知された(帯域幅 = 8nm)。蛍光の減衰は、DAS6 software (HORIBA Jobin-Yvon)を用いて解析された。

「チラコイド膜の単離」

Tokutsu et al, 2012 に従って行われた。大量培養した細胞は、遠心によって回収し、60ml のバッファーによって懸濁した。細胞を懸濁する際に、25mM MES, 0.33M スクロース, 5mM MgCl₂, 1.5mM NaCl, /NaOH, (pH6.5)で調整したバッファーを使用した。BioNeb (Glascot, Terre Haute, IN) を用いて、約 7.5

kg/cm² の圧力において、2回細胞を破砕した。破砕した懸濁液は、100,000 ×g, 4°C, 25min の条件下で Two Step SDG を行う事により、チラコイド膜が分離された。チラコイド膜の分画は回収され、60ml 0.33MS バッファーで2回洗われた。チラコイド膜は 500ul のバッファーを加え、絵筆を用いて再懸濁され、液体窒素下(-196°C)に保存された。

「シヨ糖密度勾配遠心分離(SDG)」

Tokutsu et al, 2012 を一部改変して行われた。液体窒素下で保存されていたチラコイド膜は、解凍され 25 mM MES, pH 6.5 バッファーで1回洗われ、500ul の同バッファーで絵筆を用いて再懸濁した。チラコイド膜溶液は 0.4mgChl に調整され、1.0%の α -DM を加えて、暗黒下、氷上で15分可溶化した。可溶化後、10000g×, 4°Cで遠心して不純物を分離し、上澄みを 500ul(200ug Chl)とり、SDG チューブ(0.1/0.4/0.7/1.0/1.3 M sucrose ,25mMES, 0.02% α -DM, pH6.5)の上にロードした。SDG チューブは 4°C, 90,000 ×g on a P40ST rotor (Hitachi-koki, Japan)で20h 超遠心を行った。

第5章 *LHCSR* 変異体の遺伝的バックグラウンドの調整

—序論—

現在緑藻クラミドモナスの一種である *Chlamydomonas reinhardtii* は世界中でモデル生物として様々な研究に用いられている。それらの株は、ジャガイモ畑で発見された一対のペア(mt+, mt-)に由来している(Harris, 2001)。現在様々なタイプの野生株が存在するが、長期間保管されることにより独自の進化をとげ、少なからず遺伝的な変異が生じていることが網羅的ゲノムシーケンス解析により明らかになってきた(Gallaher et al., 2015; Flowers et al., 2015)。本研究室に保管されている複数の野生株を用いて LHCSR1/3 の発現レベルを確認したところ、3種で明瞭な差が確認された(図3 6)。

一般的にクラミドモナスは、従属栄養培地である TAP 用いて作成した寒天培地上に弱光下で長期保管する。自身の変異体を保管していたところ、突然 *npq4* 変異体における LHCSR1 発現量が低下した(図3 7)。当初は実験過程における測定ミスではないかと考えたが、LHCSR1 の発現量が極端に低下しているだけで完全には欠損していない事から、最終的に何らかの遺伝的変異あるいは後天的制御が LHCSR1 発現経路を支配する遺伝子に起こったと考えられた。当研究室で別のシャーレ上に保管してあった *npq4* 変異体を用いて LHCSR1 の発現量を比較したところ、この事実が判明した。このように、弱光の蛍光灯下に保管した場合においても変異が突然引き起こされうる。クラミドモナスは世代交代の時間が短く増殖スピードが速いため(25°C、200-400 μE の場合 6-8 時間で分裂; Harris, 2001)、変異が生じた細胞がシャーレ内に蓄積・保存され受け継がれてしまう可能性が高いと考えられる。

また、過去の論文を参照し、WT、*npq4* および *npq4/lhcsr1* を用いてシャーレ状にサンプル溶液を同細胞数ずつ滴下し、培養したところ、株のバックグラウンドによって生存率に大きな差が生じた(図3 8)。このことから種の遺伝的背景の表現型への影響が顕著であるといえる。

先述した通り、本研究で用いている3種の LHCSR1/3 変異体は、カリフォルニア大バークレー校の Krishna. K. Niyogi 博士のご好意により提供していただいたものである。これらの変異体はその研究室で用いられている WT である 4A+ を遺伝的背景として持っている。一方、本研究室で用いられている野生株は 137C+ として扱われている野生株である。本研究室で用いられている 137C+ を

野生株として用い、提供された3種の変異体の解析を行うためには、137C+を用いて、変異体を戻し交雑し、遺伝的背景を統一する必要がある。

「結果・考察」

クラミドモナスは、17本の染色体をもち、単数体で生活している。しかし、窒素欠乏条件下では配偶子が誘導されるため、その性質を用いて戻し交雑を行うことが可能である(Harris, 2001)。*npq4* (mt-)及び*lhcsr1* (mt+)を用いて戻し交雑を4回行った。*npq4* (mt-)は直接137C+と、*lhcsr1* (mt+)は別の種類の野生株137C-を用いて戻し交雑を一回行い、*lhcsr1* (mt-)を作成した後に137C+と戻し交雑を行った。また、二重変異体は、4回戻し交雑を行った *npq4*(mt+)及び *lhcsr1*(mt-)を交配させることにより作成した。(以降、戻し交雑を行った後の株を *npq4-k*, *lhcsr1-k*, *npq4/lhcsr1-k* と呼ぶこととする。)

先にも述べたように、*Lhcsr1*, *Lhcsr 3.1* および *Lhcsr 3.2* は同染色体上に存在するため、*npq4/lhcsr1-k* 作成のためには、変異体 *npq4-k* および *lhcsr1-k* を交配した際に染色体の組み換えが起こる必要がある。BLAST 検索の結果、これらの遺伝子の距離はおよそ240kbpほどであった。実際交配により、500コロニーの *npq4/lhcsr1* を得たところ、*Lhcsr1*, -3.1, -3.2 すべての遺伝子の欠損が両方受け継がれた株は4コロニーであったことから、*Lhcsr1*, -3 遺伝子の組み換え価は約1.6%と算出された。

次に、作成した変異体の遺伝子欠損の確認を行った。*npq4-k* における *LHCSR3* の欠損は、増殖させたコロニーを独立栄養培地を用いてHL下で4時間培養し、得られたサンプルをウェスタン解析する事で確認した(図39)。また、*npq4-k* における *LHCSR3* の欠損は、*LHCSR3.1* および *LHCSR3.2* の遺伝子領域のPCRを行い、その領域が増幅できないことでも確認することができる(Peers et al., 2009)。4回戻し交雑を行った *npq4-k* における *LHCSR3* の欠損は独自に遺伝子領域を増幅するプライマーを作成し、PCRによって確認された(図40)。

lhcsr1-k における *LHCSR1* の欠損は、コード領域にポイントミューテーションが存在することにより引き起こされる(Truong., 2011)。*lhcsr1-k* における *LHCSR1* の欠損は、増殖させたコロニーを独立栄養培地を用いてUV下で4時間培養し、得られたサンプルをウェスタン解析する事で確認した(図41)。4回戻し交雑を行った *lhcsr1-k* における *LHCSR1* の欠損はコード領域のゲノムシーケンスを行うことにより確認した。その結果、*lhcsr-k* は、WTと比較してコード領域のうちの2塩基に変異が入ったポイントミューテーションが存在し、過去の報告と一致した(Truong., 2011)。また、この変異は、戻し交雑を行う前

の *lhcsr1* 変異体のものと同一であることも確認された。

*npq4/lhcsr1-k*における LHCSR3 の欠損は、独自に遺伝子領域を増幅するプライマーを作成し、PCR によって確認された(図 4 2)。同株は、他の二種に比べ、作成・確認するコロニー数が多いため、96 穴プレートを用いて PCR で確認を行い LHCSR3 が欠損していると考えられる株の選抜を行った。LHCSR1 の欠損は、先の実験と同様に、増殖させたコロニーを独立栄養培地を用いて UV 下で 4 時間培養し、得られたサンプルをウェスタン解析する事で確認した。4 回戻し交雑を行った *npq4/lhcsr1-k*における LHCSR1 の欠損はコード領域のゲノムシーケンスを行うことにより確認した。

戻し交雑を行った変異体における LHCSR1/3 発現量を確認するため、ウェスタン解析を行った。LHCSR3 の欠損と LHCSR1 の蓄積を確認するため、WT と *npq4-k* を HL(LED)および UV 下で培養し、そのサンプルを用いてウェスタン解析を行った。その結果、*npq4-k*において LHCSR3 の蓄積が確認されなかったとともに、WT よりも多い LHCSR1 が発現することが確認された(図 4 3)。これは、LHCSR3 が欠損したことによる相補的機能により、LHCSR1 の発現量がわずかに上昇したためであると考えられる。クロロフィル蛍光測定により NPQ を測定したところ、LHCSR1 の蓄積に伴って NPQ の駆動も確認され、WT と同等であった(図 4 4)。LHCSR1 の発現量が *npq4-k*に比べ WT で少ないにもかかわらず、二種で同程度の NPQ が駆動することは、WT においては、LHCSR1 に加え LHCSR3 もわずかに発現していたため、これも NPQ の駆動に寄与したからであると考えられる。

LHCSR1 の欠損と、LHCSR3 の蓄積を確認するため、WT と *lhcsr1-k* を HL(LED)および UV 下で培養し、そのサンプルを用いてウェスタン解析を行った。その結果、*lhcsr1-k*において LHCSR1 の蓄積が確認されなかったとともに、WT と同程度の LHCSR3 が発現することが確認された(図 4 5)。クロロフィル蛍光測定により NPQ を測定したところ、LHCSR3 の蓄積に伴い、NPQ の駆動も確認された(図 4 6)。

LHCSR1/3 の欠損を確認するため、戻し交雑後の *npq4-k* および *lhcsr1-k* を用いて作成した *npq4/lhcsr1-k* 株を用いて、HL(LED)および UV 下で培養し、そのサンプルを用いてウェスタン解析を行った。その結果、LED 下では *npq4/lhcsr1-k* で LHCSR3 の欠損が確認された。しかし、UV 下では WT に比べて少ないが LHCSR1 のようなバンドが確認された(図 4 7)。NPQ の駆動を

確認したところ、WT に比べ *npq4/lhcsr1-k* では LED および UV 下いずれにおいても、NPQ の駆動が確認されなかった(図 4 8)。この結果から、UV 下で *npq4/lhcsr1-k* で確認された LHCSR1 のようなバンドは、ポイントミューテーションで変異が入っている LHCSR1 タンパク質が一部発現誘導されたが、ほとんど機能的ではなかった事を示唆している。今後 LHCSR1 欠損変異体にて UV 下で誘導される同様のタンパク質は Nonfunctional-LHCSR1 タンパク質と呼ぶ事とする。

これらの戻し交雑にて作成した株は、それぞれメタノール等で処理した後、長期保存を目的として液体窒素下に保存された。

※以降の章においては、特に断りがない限り戻し交雑後の *lhcsr1-k* は *lhcsr1*、戻し交雑後の *npq4-k* は *npq4*、戻し交雑後の *npq4/lhcsr1-k* は *npq4/lhcsr1* と表記する事とする。

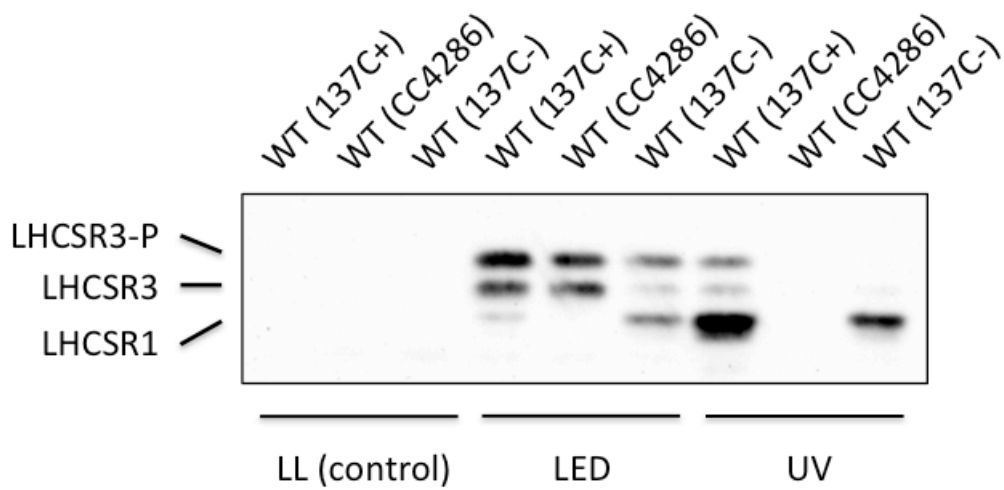


図 3 6 ; UV 光照射下における LHCSR3-P, LHCSR3 および LHCSR1 の発現。各種の WT 間で、LHCSR1/3 の発現量に大きな差があることが明らかとなった。

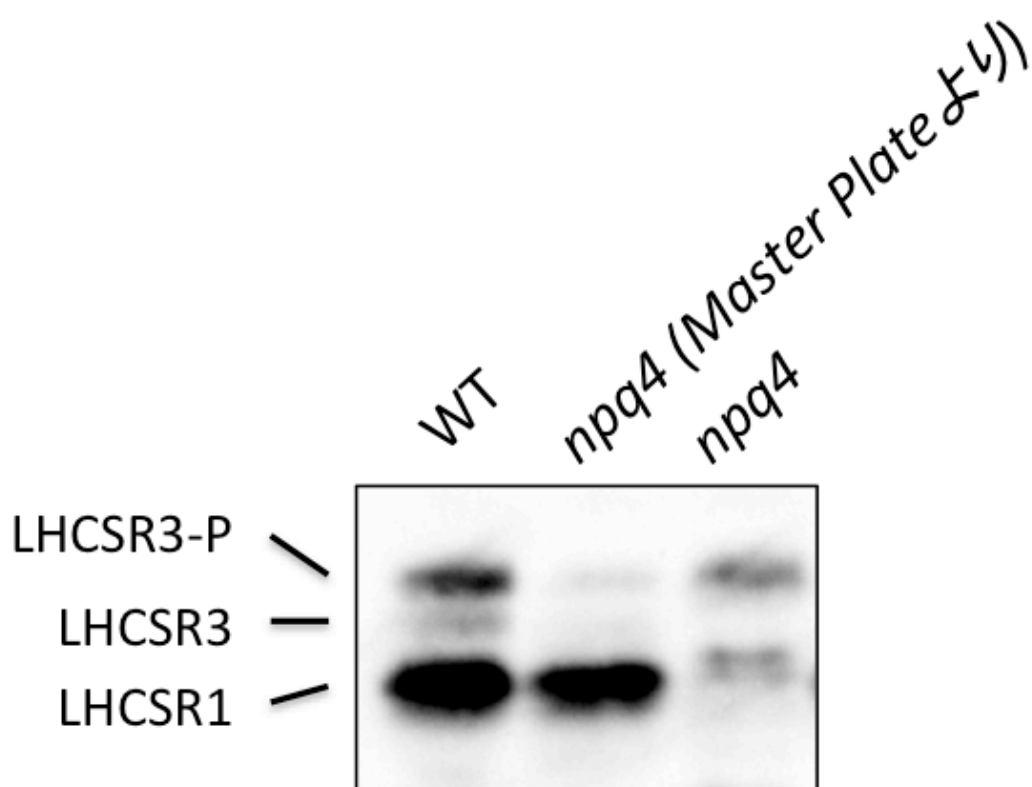


図 3 7 ; UV 光照射下における LHCSR3-P, LHCSR3 および LHCSR1 の発現。 *npq4* における LHCSR1/3 発現量が低下している。通常保管していた株にも、突然遺伝的変異が生じうる事を示唆している。

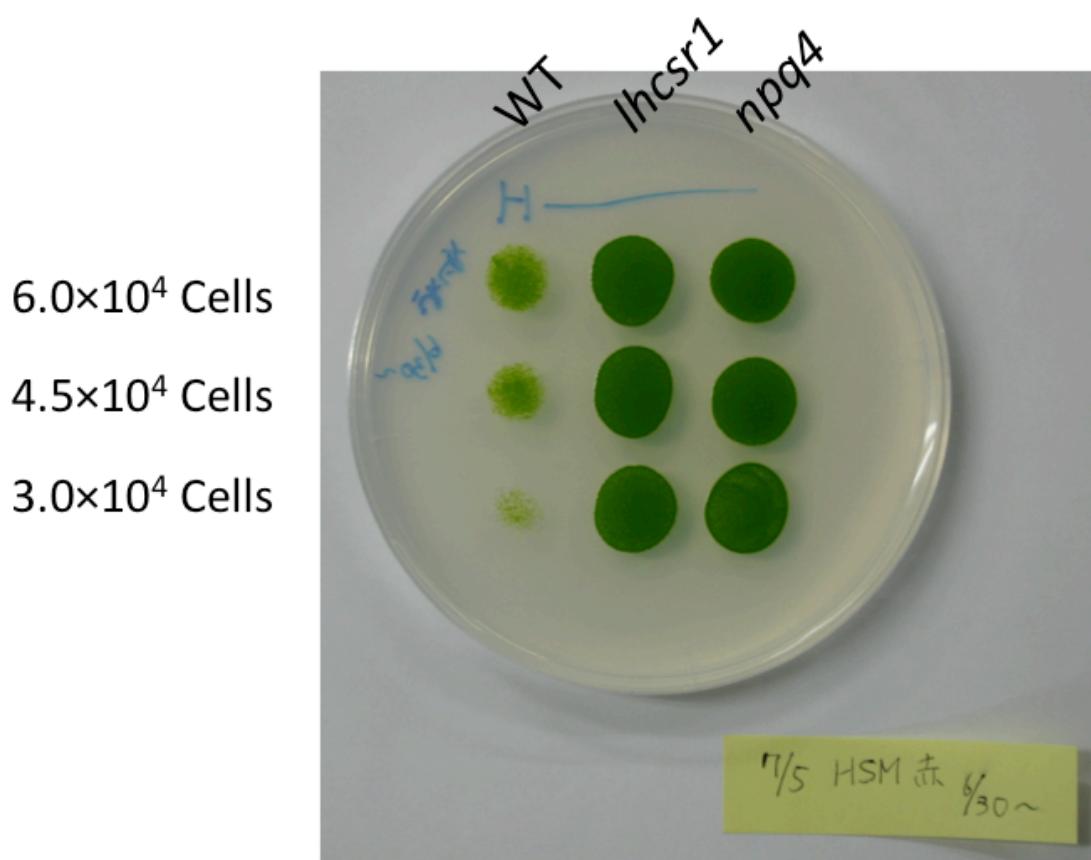


図 3 8 ; 独立栄養培地の寒天培地を用いたサンプル滴下実験。WT のみ遺伝的背景が異なっているため、シャーレ上での生存率が低下している。

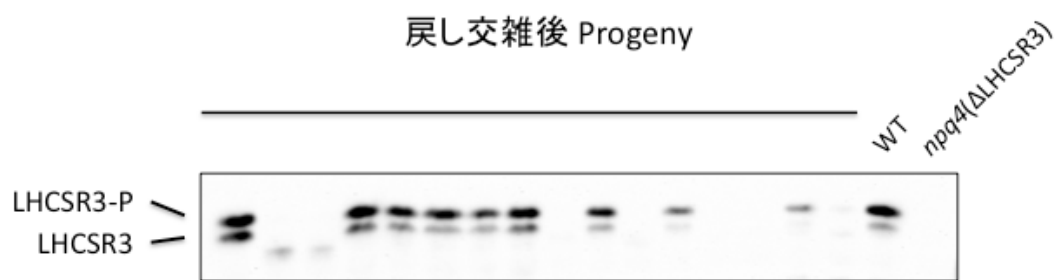


図 3 9 ; 光照射下における LHCSR3-P および LHCSR3 の発現。LHCSR3 欠損株を選抜する。



図 4 0 ;PCR における LHCSR3.1 の検出。LHCSR3 欠損株を選抜する。

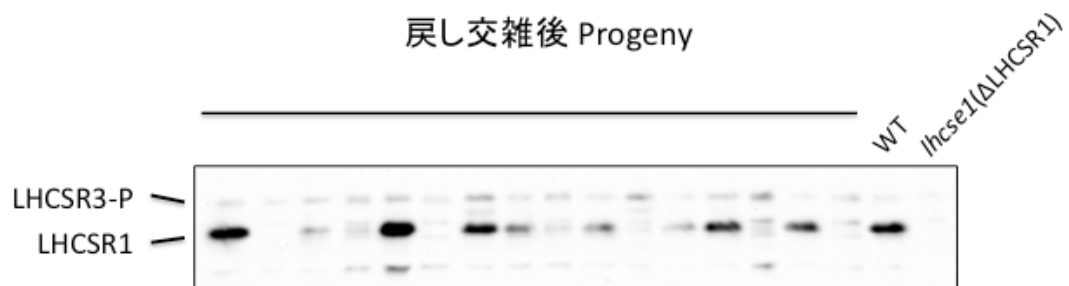


図 4 1 ; UV 光照射下における LHCSR1 の発現。
LHCSR1 欠損株を選抜する。

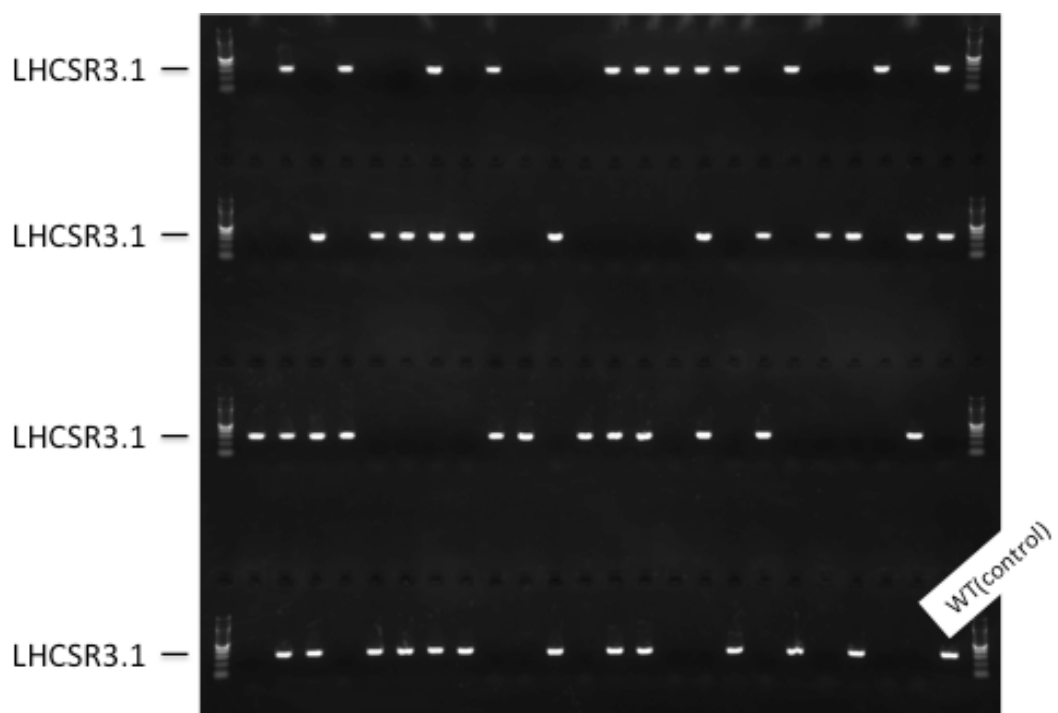


図 4 2 ;PCR における LHCSR3.1 の検出。LHCSR3 欠損株を選抜する。

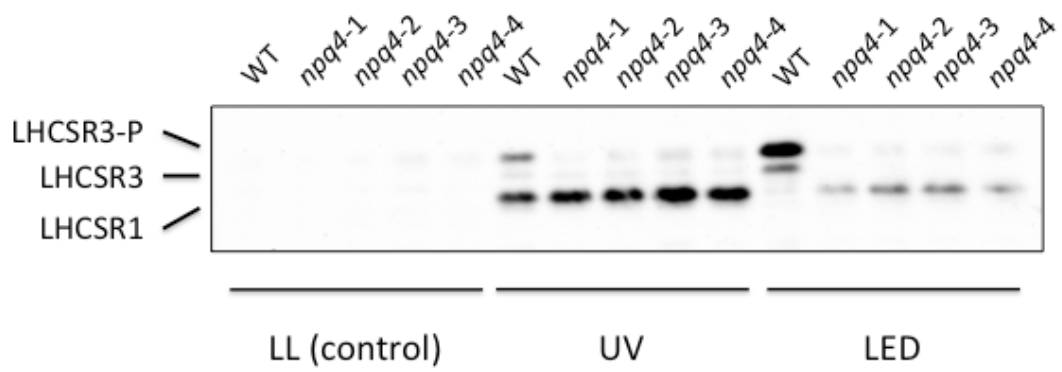


図 4 3 ; 光照射下における LHCSR3-P, LHCSR3 および LHCSR1 の発現。戻し交雑後の *npq4* において LHCSR3 が欠損している事を確認。

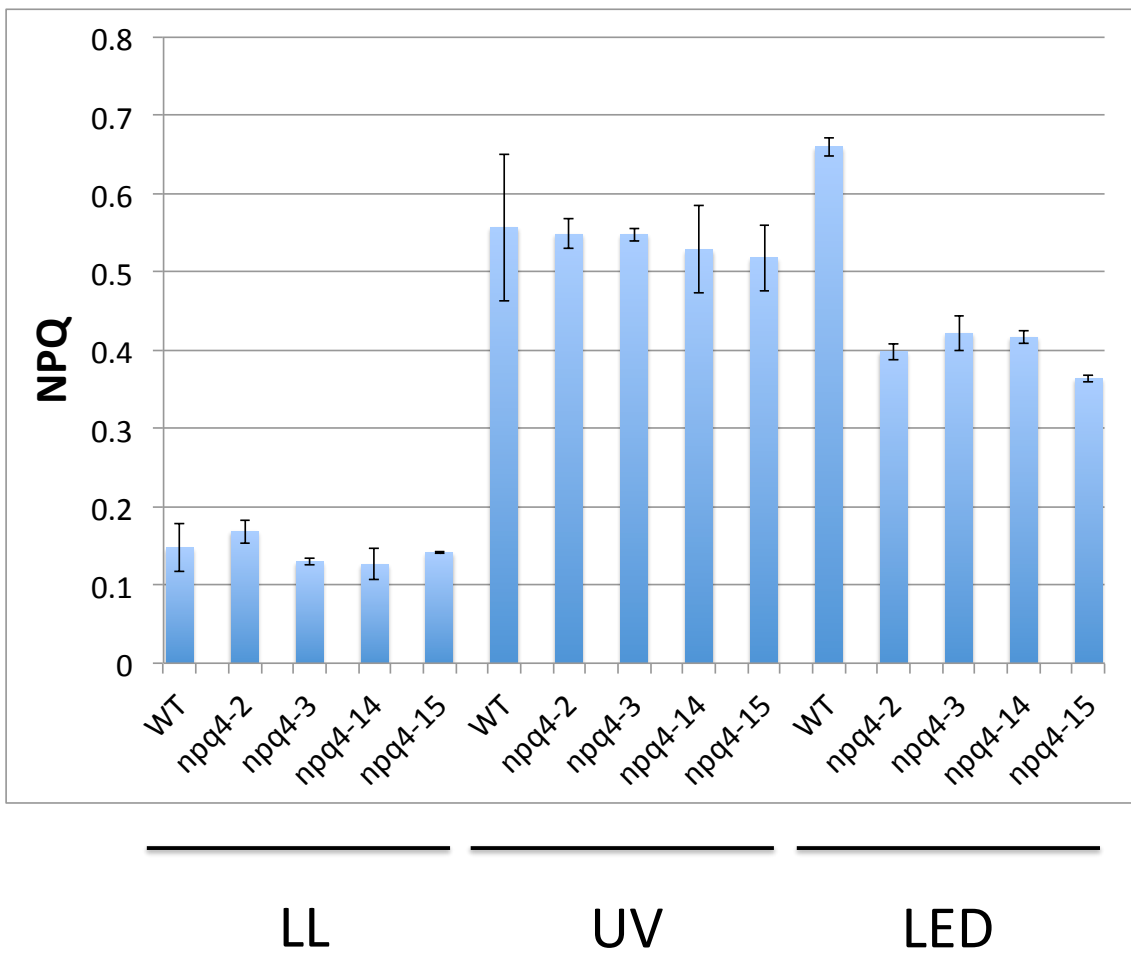


図 4 4 ; 光照射下における NPQ の駆動

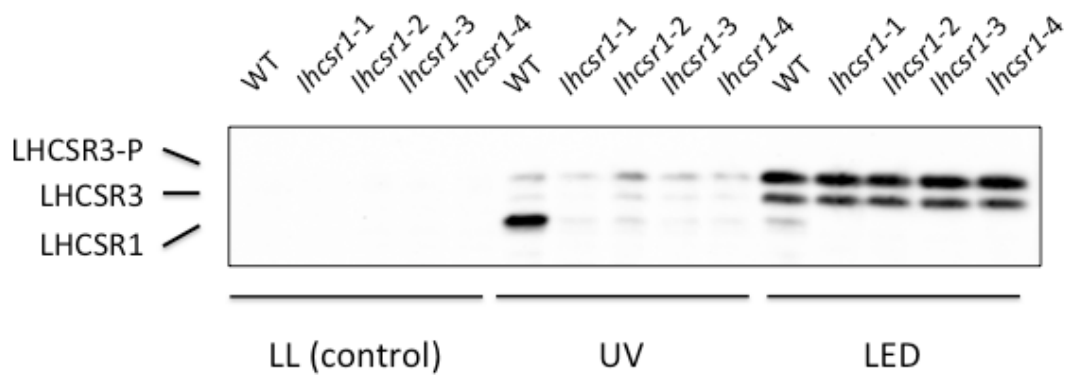


図 4 5 ; 光照射下における LHCSR3-P, LHCSR3 および LHCSR1 の発現。戻し交雑後の *lhcsr1* において LHCSR1 が欠損している事を確認。

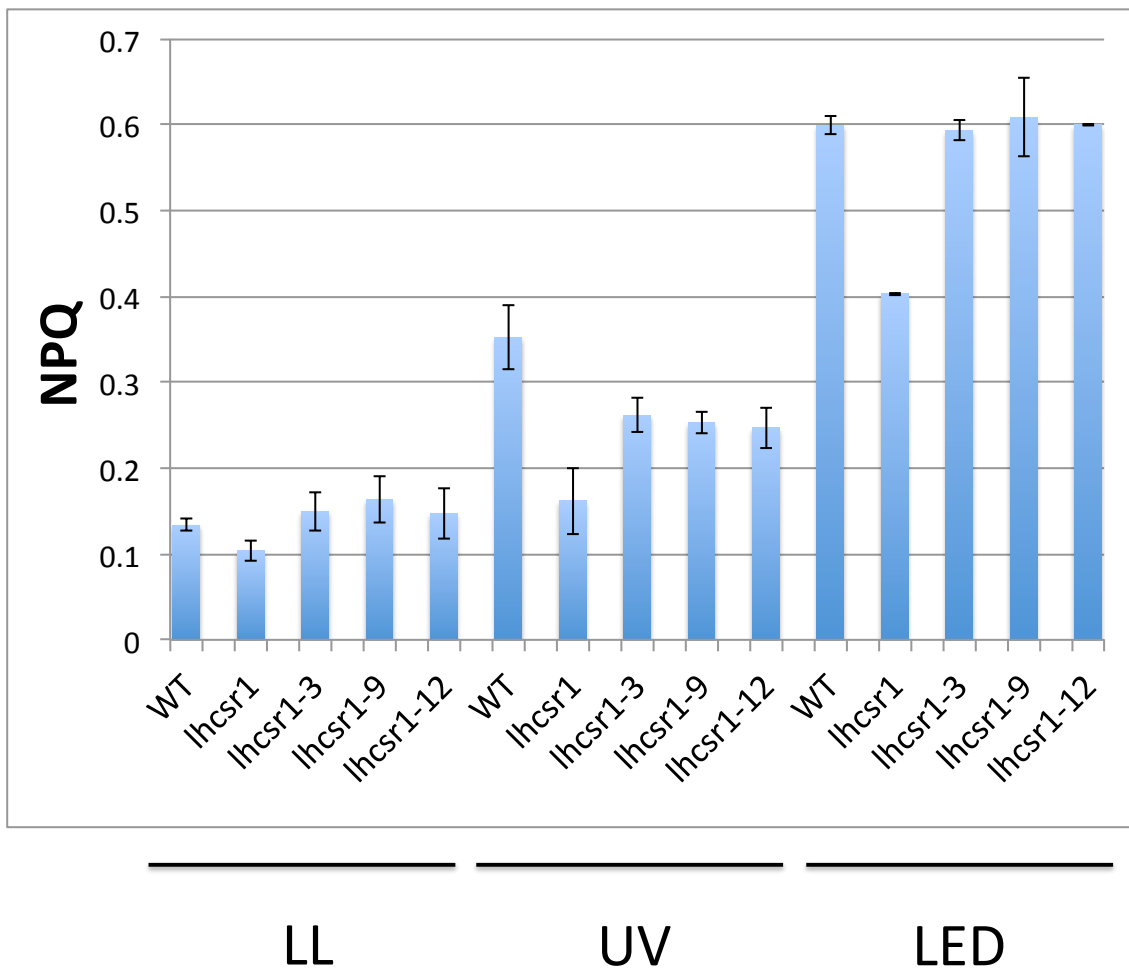


図 4 6 ; 光照射下における NPQ の駆動

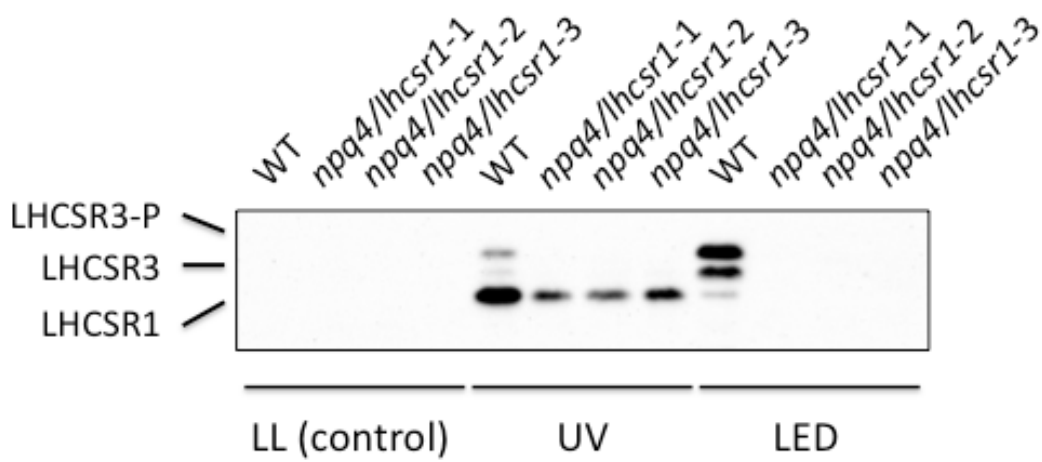


図 4 7 ; 光照射下における LHCSR3-P, LHCSR3 および LHCSR1 の発現。戻し交雑後の *npq4/lhcsr1* において LHCSR1/3 が欠損している事を確認。しかし、UV 下では *npq4/lhcsr1* において Nonfunctional -LHCSR1 が発現している。

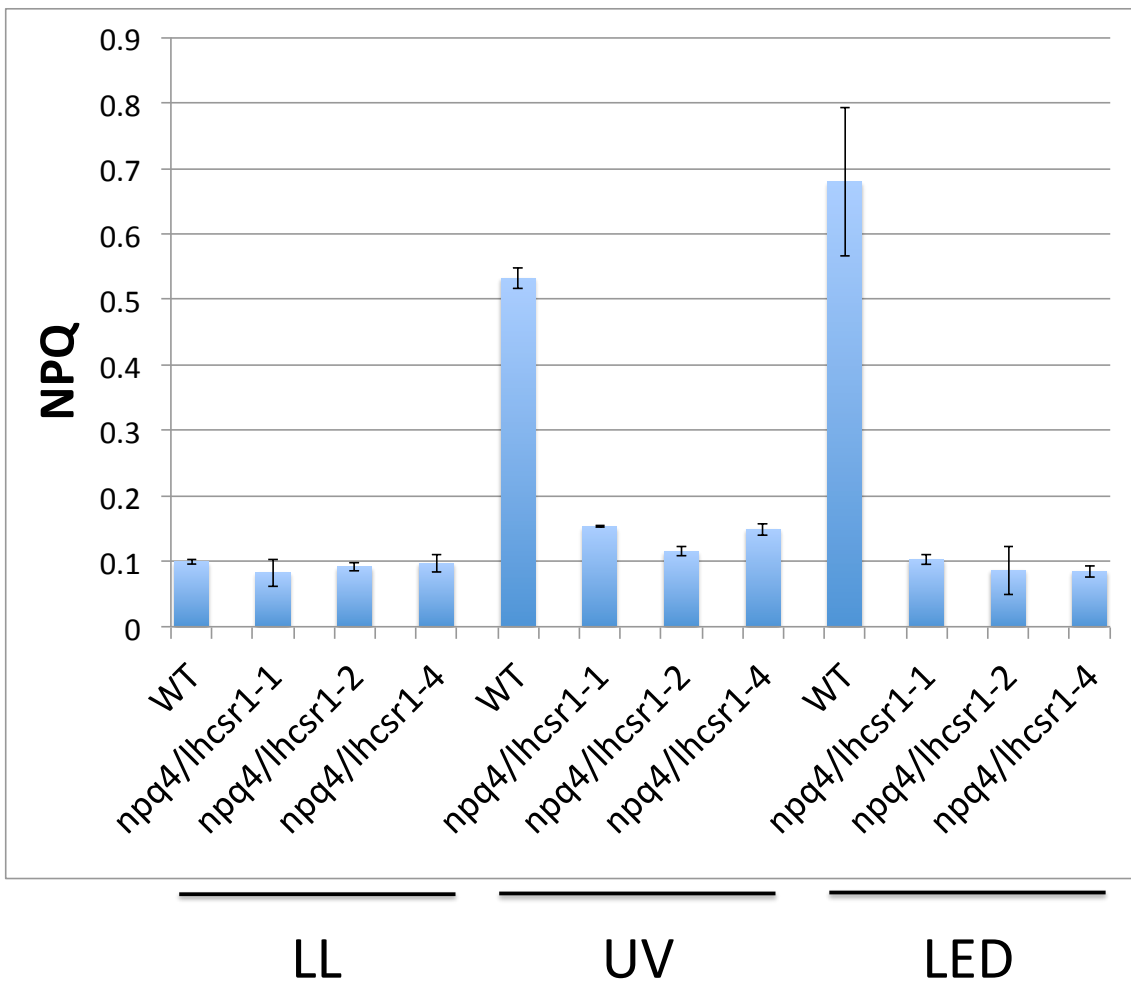


図 4 8 ; 光照射下における NPQ の駆動

「実験材料・方法」

「戻し交雑」

クラミドモナスは窒素欠乏条件下で配偶子形成を行うことが知られている。この知見を用いて配偶子を人工的に誘導し戻し交雑を行った。先述した、Niyogi 博士から提供された LHCSR3 変異体は *npq4(mt-)*、LHCSR1 変異体は *lhcsr1(mt+)* である。本研究室で用いている野生株 137C+ の Mating type は mt+ であるため、*npq4(mt-)* とは直接 4 回戻し交雑を行う事によって *npq4-k(mt+)* を作成した。変異体 *lhcsr1* の Mating type は mt+ であるため、クラミドモナス リソースセンター (Chlamydomonas Resource Center <https://www.chlamycollection.org/>) より取り寄せた野生株 137C- (*mt-*) を用いて 1 回戻し交雑を行う事によって変異体 *lhcsr1(mt-)* を作成し、これを用いて野生株 137C+ (*mt+*) と 4 回戻し交雑を行って *lhcsr1-k(mt+)* を作成した。LHCSR1/3 二重変異体 *npq4/lhcsr1-k* は、4 回戻し交雑を行う事によって作成した *npq4-k(mt+)* および *lhcsr1-k(mt-)* を交雑する事によって作成した。

「PCR」

戻し交雑によって得られた *npq4-k* および交雑によって得られた *npq4/lhcsr1-k* の LHCSR3.1 コード領域を PCR にて増幅した。プライマー配列は LHCSR3.1_F GCCAGGCCACAATTCGCAG LHCSR3.1_R TTTAATC GATGGCCAGGCTCTTGAGGTTGTCG である。

「シーケンス」

得られたコロニーを用いて、LHCSR1 コード領域周辺を PCR にて増幅し、断片を精製した。プライマーは LHCSR1_F GAGTCTGAGATCACCCACGG LHCSR1_R CAACCGTGCCAGCCAAGCAAG を用いた。精製した断片を鋳型とし、BigDye(Applied Biosystems, USA)を用いて PCR が行われた。プライマーは LHCSR1_F CCCCACCCAACAGACTTCGAC を用いた。

「株の液体窒素保存」

従属栄養培地(TAP)で培養された株にメタノールを添加し、クライオボックスに入れ液体窒素下で保存された。

第6章 新光源(UV管)を用いた LHCSR1 の局在と機能の解明

—序論—

先に行った実験結果から、独自に作製した光源(メタルハライドランプ+UVランプ)を用いて培養した細胞にて LHCSR1 の局在と機能を確認することができなかった。そこで、LHCSR1 の局在と機能を確認するため、さらに新たな光源装置(先に作製した光源装置より多い、5本の UV 管を用いた)を作製し、LHCSR1 をより発現・蓄積させることのできる条件下で実験を行なった。

「結果・考察」

新たに作成した光源装置を用いて LHCSR1 の局在と機能を明らかにするため、実験に用いる株の選定を行った。この培養装置を用いて、WT、*lhcsr1*、*npq4* 及び *npq4/lhcsr1* を従属栄養培地(HSM)下で培養を行った。培養を行った細胞を用いてウェスタン解析を行った結果、WT 及び *npq4* で LHCSR1 の発現が確認された(図 4 9)。しかし、WT 及び、*lhcsr1* は LHCSR3 が少なからず発現し NPQ の駆動に寄与していることが考えられる。そこで、LHCSR1 の機能を明瞭に確認するため、LHCSR3 が欠損し LHCSR1 のみが発現する *npq4* 及び LHCSR1/3 が欠損した *npq4/lhcsr1* の二種の株を用いて解析を行い、表現型を比較することが適切であると判断し、この二種の株を用いて今後の実験を行うこととした。

次に、生化学的な手法による LHCSR1 の局在の確認のため、二種の培地を用いて大量培養した細胞を用いてそれぞれのチラコイド膜を単離した。この単離したチラコイド膜を用いてウェスタン解析を行い、LHCSR1 の存在量を確認したところ、いずれの培養条件下においても LHCSR1 の存在が確認された(図 5 0)。しかし、従属栄養培地で育てたチラコイド膜では、LHCSR1 に加え、Nonfunctional-LHCSR1 が比較的多く存在していた(図 5 0)。LHCSR1 の遺伝子欠損はもともとポイントミューテーションによって引き起こされたものであるため、LHCSR1 と構造のよく似た、Nonfunctional-LHCSR1 タンパク質が発現しうるものと考えられる。仮に、Nonfunctional-LHCSR1 がわずかにでもエネルギー消去機能を持ち合わせていると仮定すると、従属栄養培地条件(TAP)はこの先の実験に用いることは適切ではないと判断される。そこで、この先の実験では、独立栄養培地(HSM)で培養された株を用いて実験を行うこととした。

独立栄養培地(HSM)下で、*npq4* と *npq4/lhcsr1* を用いて 12 時間の UV 照射下で大量培養し、培養後の細胞を用いて NPQ 測定を行い、またチラコイド膜を単離した。NPQ 測定の結果、*npq4* のみで高い NPQ の蓄積が確認された(図 5 1)。単離したチラコイド膜を用いてウェスタン解析を行った結果、*npq4* においてのみ、LHCSR1 の発現が確認された(図 5 2)。また、LHCSR1 同様に紫外線照射下で発言することが明らかとなっている PSBS の蓄積量は二種の株で差は確認されなかった。また、CBB 染色によってチラコイド膜上に存在する集光アンテナタンパク質 LHC の存在量を確認したところ、二種の株で差は確認されなかった。これらの結果から、*npq4* にて蓄積した LHCSR1 の影響により NPQ

が誘導された事が確認された。そこで、単離した *npq4* のチラコイド膜を用いて SDG を行い、単離精製された分画を用いてウェスタン解析を行い、LHCSR1 の局在を確認した。その結果、Free LHCI 各分には LHCSR1 のピークが確認されたものの、PSI-LHCI 超複合体及び PSII-LHCII 超複合体分画にはウェスタン解析における LHCSR1 のピークが一致しなかった(図 5 3)。つまり、この実験からは LHCSR1 が PSI-LHCI 超複合体及び PSII-LHCII 超複合体分画に存在することを明確に決定づけることはできなかった。SDG における PSI-LHCI 超複合体および PSII-LHCII 超複体のバンド位置に LHCSR1 がわずかに確認されたことは、LHCSR1 は PSI-LHCI 超複合体および PSII-LHCII 超複体にわずかに局在しているか、もしくはコンタミネーションによるものであることが考えられた。

上記の実験結果から、LHCSR1 が PSII-LHCII 超複合体および Free LHCI 分画に局在していると仮定した場合、LHCSR1 がその各分画でクエンチングに関わっているかどうかを明らかにするため、常温下において蛍光寿命測定を行った。過去の報告から LHCSR3 は PSII-LHCII-LHCSR3 を形成し、過剰エネルギー消去に寄与する(Tokutsu and Minagawal, 2013)。もし、LHCSR1 が PSII-LHCII-LHCSR1 超複合体を形成していると仮定すると、SDG によって分画した PSII 超複合体分画はエネルギー消去能力を持っているかもしれない。また、過去の報告から LHCSR1 は Free LHCI において過剰エネルギー消去に寄与する(Dinc et al., 2016)。もし、LHCSR1 が Free LHC 分画に局在していると仮定すると、SDG によって分画した Free LHC 分画はエネルギー消去能力を持っているかもしれない。

そこで、PSII-LHCII 超複合体分画を用いて蛍光寿命測定を行ったところ、*npq4* 及び *npq4/lhcsr1* にて酸性条件下でクエンチングが確認されたものの、二種に差は確認されなかった(図 5 4)。このことから、LHCSR1 は PSII-LHCII 超複合体に局在しているものの、①実験途中で機能が失われたか②PSII-LHCII 超複合体単独では機能しないか、もしくは③そもそも PSII-LHCII 超複合体に局在しておらず、コンタミネーションであった事が考えられた。よって、PSII-LHCII 超複合体における LHCSR1 の機能を明らかにすることができなかった。

次に、Free LHCI 分画を用いて、蛍光寿命測定を行ったところ、*npq4* 及び *npq4/lhcsr1* にて酸性条件下でクエンチングが確認されたものの、二種に差は確

認められなかった(図5 5)。おそらく、生化学的に界面活性剤で処理した際に、LHCSR1のクエンチングの機能が失われた可能性が考えられた。過去のDinc et al., 2016の研究においては細胞を用いた実験であったのでLHCSR1のLHCIIにおける機能が保存されていたと考えられた。この結果より、Free LHC分画におけるLHCSR1の機能を明らかにすることができなかった。これらの結果から、PSII-LHCII超複合体及びFree LHCII画分で確認されたクエンチングは、LHCSR1非依存的なものであると結論付けられた。通常、常温下では光化学系Iからは、蛍光が発せられないことが知られているため、PSI-LHCI超複合体分画は測定に用いなかった。

上記のように、チラコイド膜上のタンパク質を界面活性剤で可溶化し、SDGにて分画した場合、LHCSR1の機能を確認することができなかった。これは、チラコイド膜から各タンパク質複合体を可溶化する過程でLHCSR1の活性が失われてしまった可能性も考えられる。そこで、*npq4*及び*npq4/lhcsr1*から単離されたチラコイド膜を用いて蛍光寿命測定を行うことによってLHCSR1の機能を確認した。その結果、酸性条件下において*npq4/lhcsr1*に比べ、*npq4*ではより大きな蛍光の減衰を確認した(図5 6 (a))。蛍光寿命の成分分析を行った結果、*npq4* pH5.5においては特に早い成分の τ_1 の割合が急激に上昇していた(図5 6 (b))。以上のことから、酸性条件下における*npq4*のチラコイド膜において、クエンチングが確認されたことにより、チラコイド膜上においてはLHCSR1が機能的であることが明らかとなった。

LHCSR1を介した全体のエネルギー制御と収支を確認するため、*npq4*及び*npq4/lhcsr1*から単離したチラコイド膜を用いて、低温絶対蛍光(77K)を測定した。低温(77K)下では光化学系II(PSII)および光化学系I(PSI)から発せられる蛍光をいずれも測定することができる。また、測定装置には積分球を取り付けてあるため、蛍光の絶対量を測定する事ができる。測定の結果、*npq4* pH5.5の条件下においてPSII(685nm)及びPSI(715nm)における蛍光の減少が確認された(図5 7)。つまり、LHCSR1の機能によって、PSII及びPSIから発せられるはずであった蛍光エネルギーが減少していることが確認された。つまり、LHCSR1の影響により、PSII及びPSIにおける過剰エネルギーが消去されている可能性を示している。

酸性条件下のチラコイド膜上において、LHCSR1がどのように機能しているかさらに詳細に調べるため、*npq4*及び*npq4/lhcsr1*から単離したチラコイド膜

を用いて、FDAS (Fluorescence Decay Associated Spectrum)測定を行った。680nm の波長帯は、LHCII から吸収されたエネルギーによる蛍光の減衰を、685nm 付近の波長帯は PSII から発される蛍光の立ち上がりを、710nm 付近の波長帯は PSI から発される蛍光の立ち上がりを表している。~30ps の最も早い蛍光の立ち上がりを見てみると、*npq4* pH5.5 の条件は他の条件に比べ、PSI の蛍光の立ち上がりが大き(図 5 8)。これは、*npq4* pH5.5 の条件において LHCII から吸収されたエネルギーがより PSI へと移動していることを表している。つまり、LHCSR1 は LHCII から吸収されたエネルギーの PSI 側への移動を促進していることが示唆された。また、*npq4* pH5.5 の条件では、他条件に比べ~85ps において PSII および PSI でエネルギーのトラッピングが起きている一方、~500ps において PSII の蛍光が減っていることは、PSII の周りにおけるエネルギー消去が起きていることを示している。また、蛍光寿命の成分を各株で比較してみると、ほぼ差がなかった(図 5 8 (b))。~85ps および~500ps の時間軸は光化学系 I における電化分離の時間軸とも一致する(Van et al.,2000, Savikhin., 2006)。これらのことから、LHCSR1 を介して LHCII から PSI に流されたエネルギーは、光化学系 I において電化分離によって蛍光の消去が引き起こされていることが考えられる。

上記の実験から、LHCSR1 は酸性条件下において PSI に依存したエネルギー制御を行っている可能性があることが明らかとなった。そこで、プレ実験として、PSI 欠損株 Δ PSI 細胞を用いて、UV を 6 時間照射した後、蛍光寿命測定を行った。LHCSR1 が光化学系 I 依存的な蛍光の消去を示すなら、UV 照射した Δ PSI 株ではクエンチングが確認できないはずである。コントロールとして、LL(Low light)下で培養した同株を用いた。本来は先に行った *npq4* および *npq4/lhcsr1* と同様、細胞を大量培養してチラコイド膜を単離して実験に用いるべきである。しかし、過去の報告から、細胞の培養液に酸やアルカリを加えるのみで、特別な膜透過物質等を用いなくても、細胞内およびチラコイド膜内の pH を変化させ、LHCSR1 の機能を制御できることが明らかとなっている(Dinc et al, 2016)。そこで、今回はプレ実験として蛍光寿命測定において以下の *in vivo* における方法を試みた。

UV 照射にて培養した細胞に直接酸及びアルカリを加えて測定する。pH5.5 の条件再現のために AcOH を、pH7.5 の条件再現のために NaOH を加えた。事前に培養液を各 10ml とり、酸およびアルカリを適量加えながら pH を測定し、

蛍光寿命測定時に添加するべき酸とアルカリの量を決定した。

実験の結果、UV 照射を行った ΔPSI 株は比較的大きなクエンチングを示した (図 5 9)。また、ウェスタン解析によって LHCSR1 の蓄積を確認したところ、UV 照射による LHCSR1 の蓄積が確認された (図 6 0)。この結果から、PSI に依存した LHCSR1 の機能を明らかにする事はできなかった。

上記の結果をふまえて、PSI 依存の LHCSR1 のクエンチングが存在するかをさらに詳細に確認するため、光化学系 I 欠損変異体 ΔPSI 株に加え、光化学系 II 欠損変異体 $\Delta PSII$ 及び二重変異体 $\Delta PSI/II$ の 3 種を用いて、UV を 12 時間照射し、チラコイド膜を単離し蛍光寿命測定を行った。その結果、いずれの株もクエンチングが起きていたが、各株ではっきりとした差は確認されなかった (図 6 1)。ウェスタン解析をおこない、LHCSR1 の細胞内の蓄積を確認した。各レーンに 1 μ g Chl ずつロードした結果、LHCSR1 の量が同一ではなかった (図 6 2)。このサンプルはチラコイド膜を用いているため、単離過程で LHCSR1 が剥がれ落ちた可能性が考えられる。光化学系を欠損した変異体は、チラコイド膜の高次構造の安定性に何かしらの影響を与えており、従来のチラコイド膜単離のプロトコールでは LHCSR1 を安定的に保ったままで単離することが難しかった可能性が考えられた。

次に、光化学系 I 欠損変異体 ΔPSI 株に加え、光化学系 II 欠損変異体 $\Delta PSII$ 及び二重変異体 $\Delta PSI/II$ の 3 種を用いて、UV を 12 時間照射して培養し、その細胞に直接酸とアルカリを加える事によって蛍光寿命測定を行った。この実験においては、pH 7.5 の再現のために NaOH を、pH 5.5 の再現のために AcOH を用いた。先の実験の結果、AcOH を用いた方が HCl を用いた場合に比べより大きなクエンチングが見られたため、pH 5.5 の酸性条件を作り出すために、今後 AcOH を用いて実験を行うこととした。

蛍光寿命測定を行った結果、 ΔPSI および $\Delta PSI/II$ において同等のクエンチングが、 $\Delta PSII$ においてはより大きなクエンチングが確認された (図 6 3 (a))。 $\Delta PSII$ 変異体のみ PSI を有しておりそれに依存した蛍光減衰が強調されていることになる。このことから LHCSR1 の存在によって、LHCII から励起エネルギーが PSI に流され、さらに PSI における蛍光の消去が起こっていることを示唆している。コントロールとして、LL の条件で培養した株を用いて同様の実験を行った結果、いずれの株においてもほとんど蛍光は確認されなかった (図 6 4)。また、サンプルを用いてウェスタン解析を行ったところ、LL 下において

は各株において LHCSR1 の蓄積は確認されなかった(図 6 5)。

以上の蛍光の減衰を踏まえて、簡易的に NPQ を測定することができる。一般的に $NPQ = (F_m - F'_m) / F'_m$ で求めることができるが(Bode et al., 2009)、 $F_m =$ 「pH7.5 における平均蛍光寿命」、また $F'_m =$ 「pH5.5 における平均蛍光寿命」とすると各光化学欠損株の NPQ を算出することができる。上記の式を踏まえると、各株の NPQ は、 ΔPSI 0.76, $\Delta PSII$ 3.00, $\Delta PSIII$ 0.93 と算出された(図 6 3 (b))。 ΔPSI および $\Delta PSIII$ では同等の NPQ の駆動が確認されたことから、PSII に依存した LHCSR1 のクエンチングが存在しない事も示唆された。

上記の測定における細胞を用いてウェスタン解析を行った結果、LHCSR1 は三種でほぼ同一であることが確認された(図 6 6)。つまり、蛍光寿命測定における結果は、LHCSR1 の発現量の差に夜影響を与えなかった。 ΔPSI では CP47、 $\Delta PSII$ では PSbA(D1)、 $\Delta PSIII$ ではいずれのタンパクも欠損していることも確認された。ATP-ase は UV 誘導性ではないので、これをローディングコントロールとして用いた。

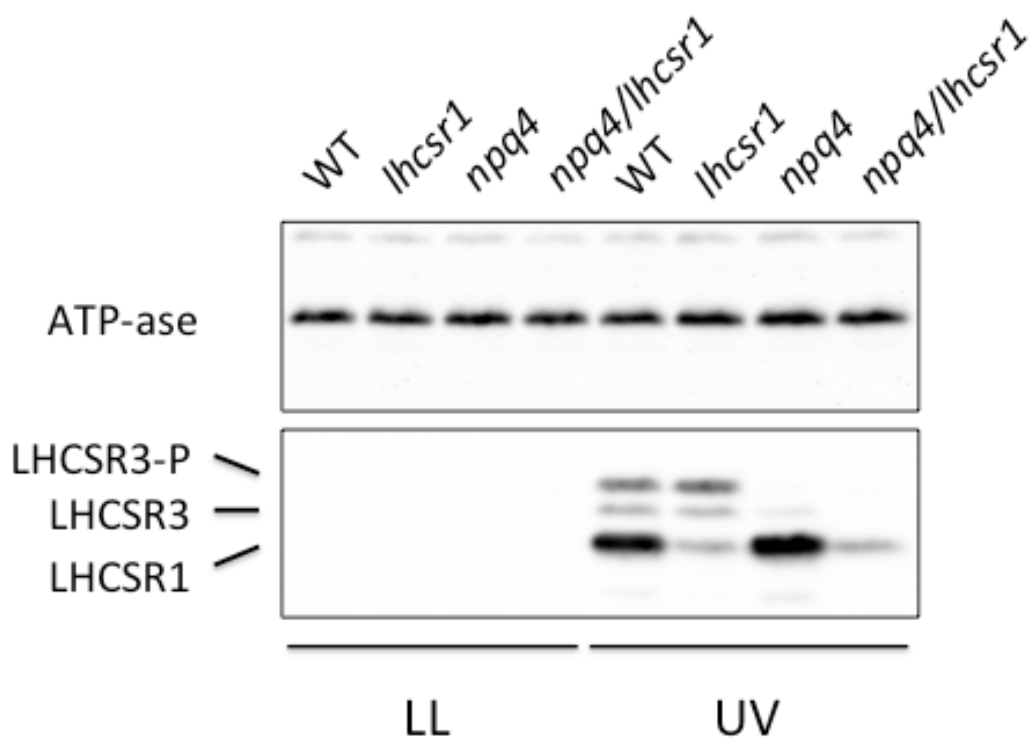


図 4 9 ; 光照射下における LHCSR3-P, LHCSR3 および LHCSR1 の発現。WT および、*npq4* では LHCSR1 が蓄積している。しかし、WT と *lhcsr1* では LHCSR3 が蓄積している。そこで、LHCSR1 の機能をより明瞭に見るため、以後の実験では *npq4* および *npq4/lhcsr1* を用いる事にした。

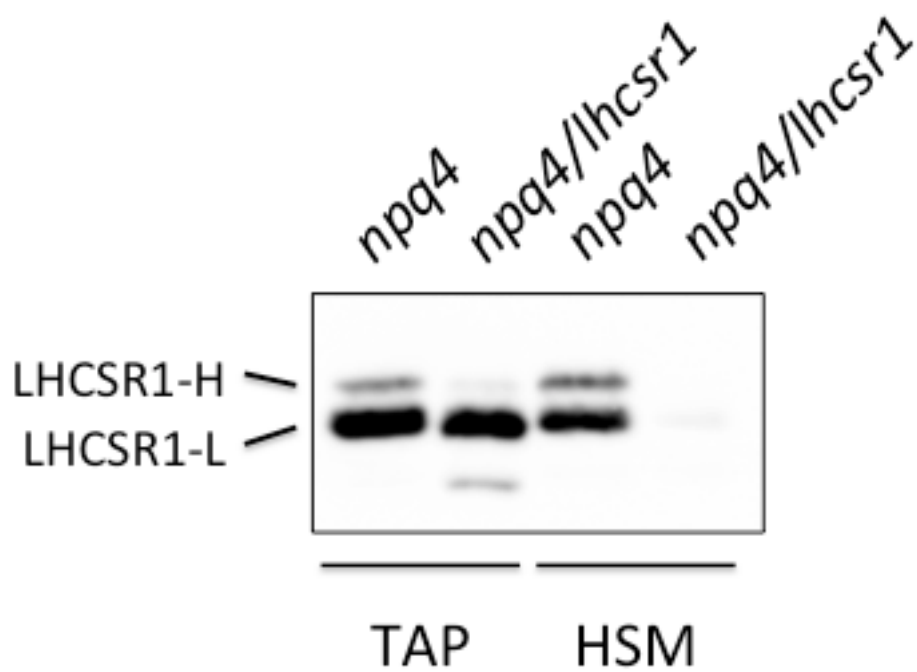


図50;光照射下における LHCSR1-H および LHCSR1-L の発現。従属栄養培地 TAP を用いた場合、*npq4/lhcsr1* では Nonfunctional-LHCSR1 が発現しているため、以後は独立栄養培地 HSM を用いる事とした。

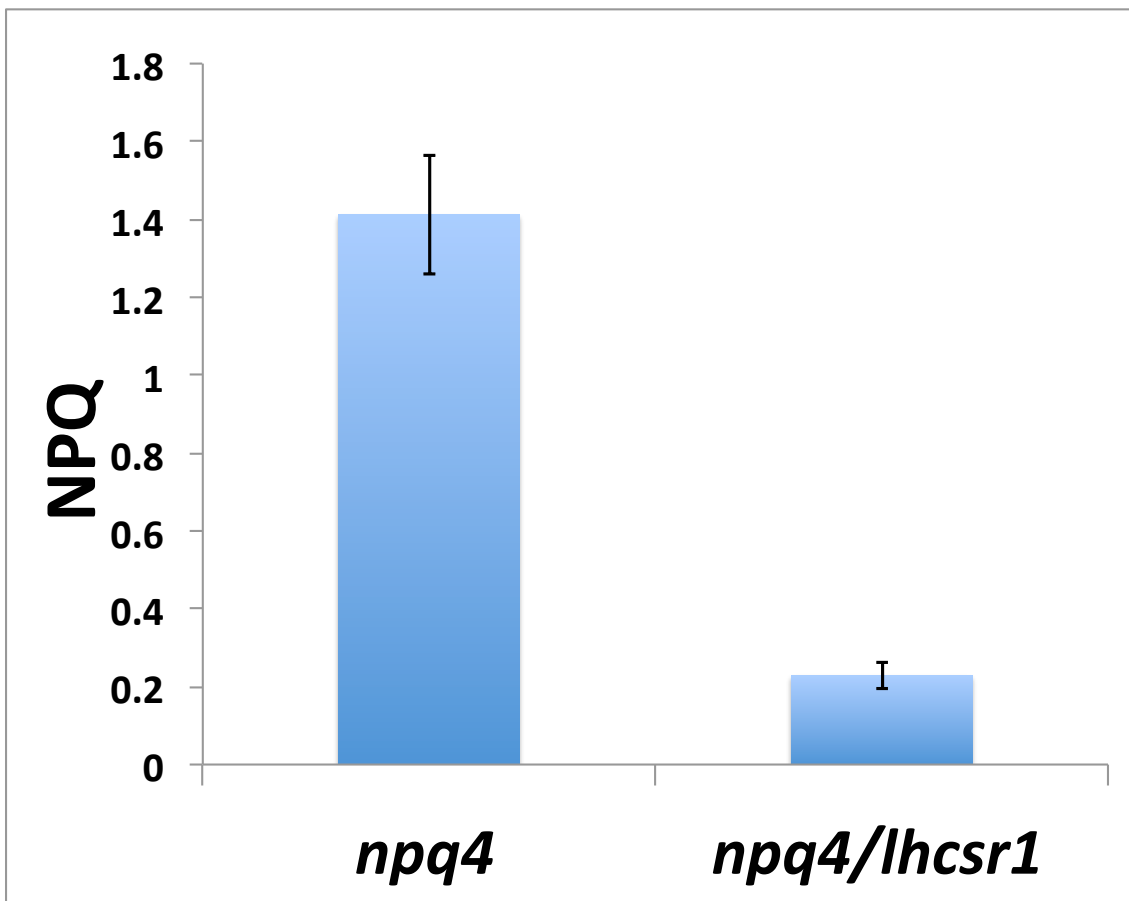


図 5 1 ; 光照射下における NPQ の駆動。LHCSR1 をもつ *npq4* では、独立栄養培地 HSM を用いて UV 下で培養した際、NPQ の駆動が確認された。

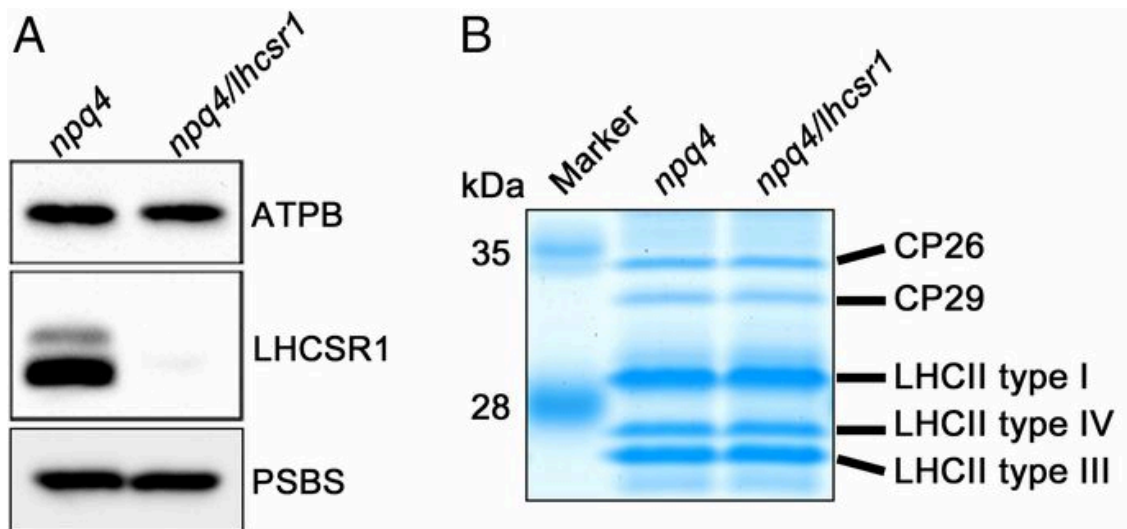


図 5.2 ;(A)光照射下における LHCSR1 および PSBS の発現。 *npq4* のチラコイド膜において、LHCSR1 の蓄積が確認された。また、(B)CBB 染色における集光アンテナタンパク質の存在量の比較。図 5.3 の測定に用いられた UV 下で培養された細胞を用いてチラコイド膜を単離し、そのチラコイド膜を各レーン $2 \mu\text{gChl}$ ずつロードした。

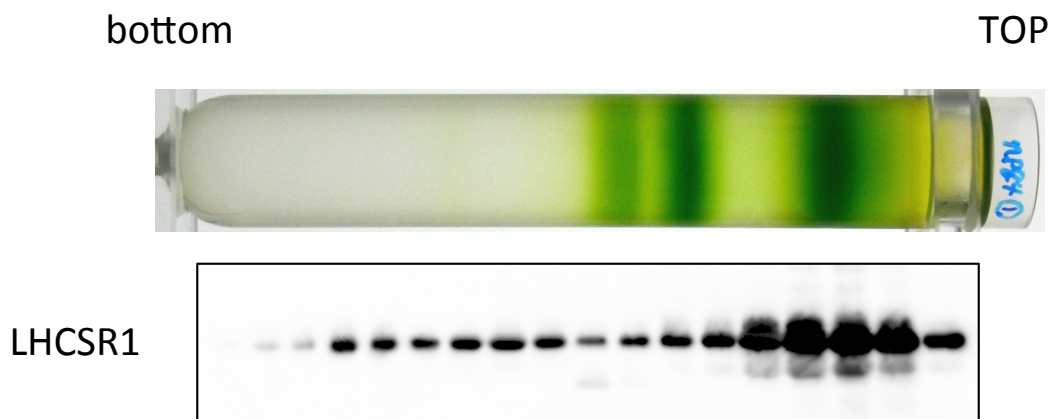


図 5 3 ; ショ糖密度勾配遠心後の各分画を用いた LHCSR1 の局在。SDG 後のチューブの PSII 超複合体のバンドと、ウェスタンにおける LHCSR1 のピークが一致していないことから、LHCSR1 の PSII 超複合体への局在を明確に結論づける事はできなかった。

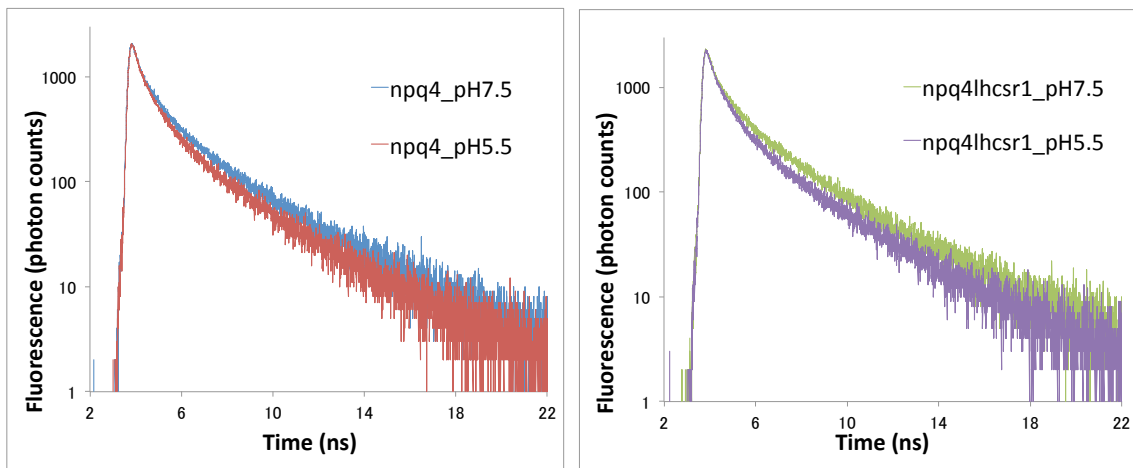


図 5 4 ; ショ糖密度勾配遠心後の PSII-LHCII 超複合体画分を用いた蛍光寿命測定。両株間の蛍光減衰の程度に差が見られなかった事から、PSII 超複合体における LHCSR1 の機能を明らかにする事はできなかった。

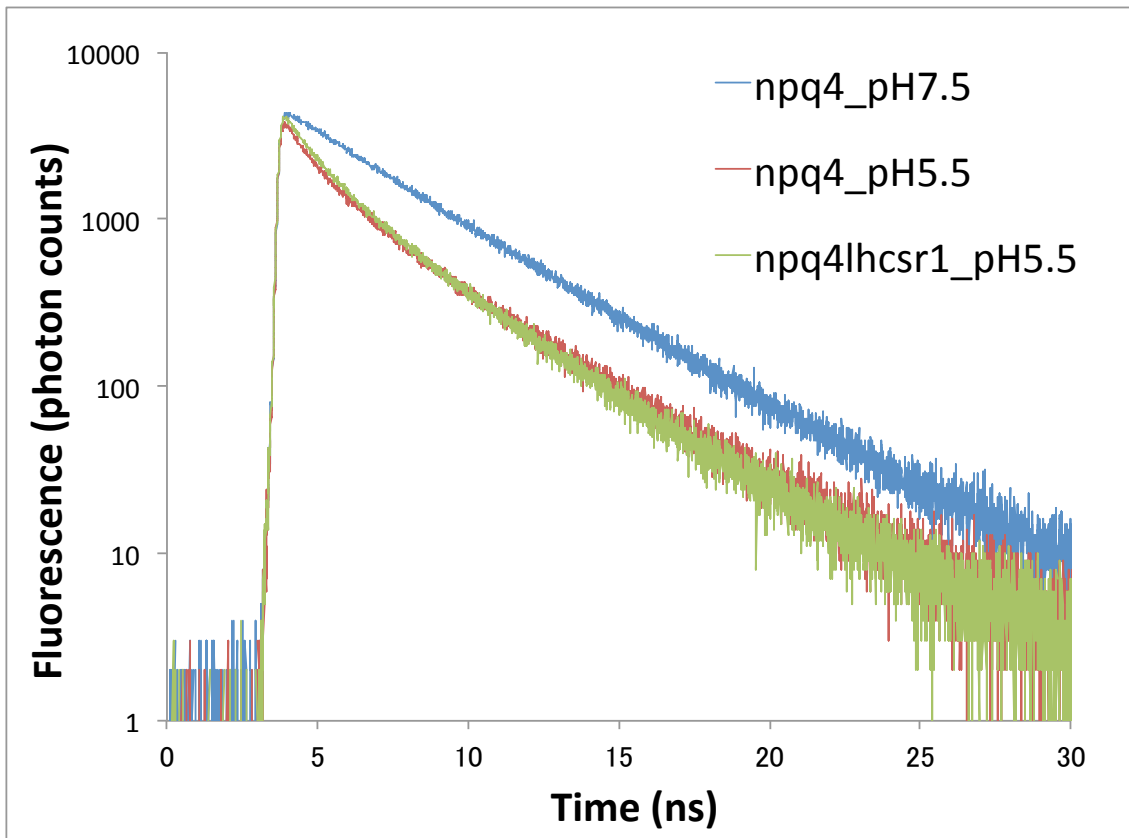


図 5 5 ; ショ糖密度勾配遠心後の LHCII 画分を用いた蛍光寿命測定。酸性条件下 (pH5.5) における蛍光の減衰に差が見られなかったことから、LHCSR1 の Free LHCII における機能を明らかにする事ができなかった。

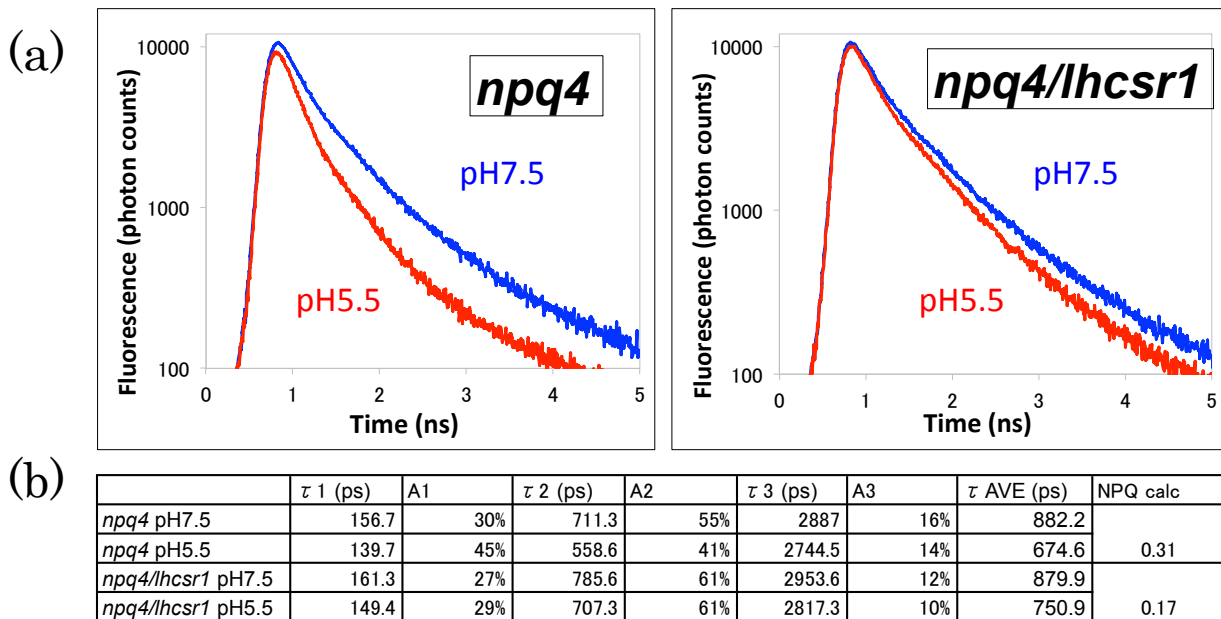


図 5 6 ;チラコイド膜を用いた蛍光寿命測定。
 LHCSR1 の発現している *npq4* では LHCSR1
 の欠損した *npq4/lhcsr1* に比べ酸性条件下に
 おいてより大きな蛍光の減衰が見られた。この
 結果から、LHCSR1 はチラコイド膜上におい
 ては機能的である事が確認された。

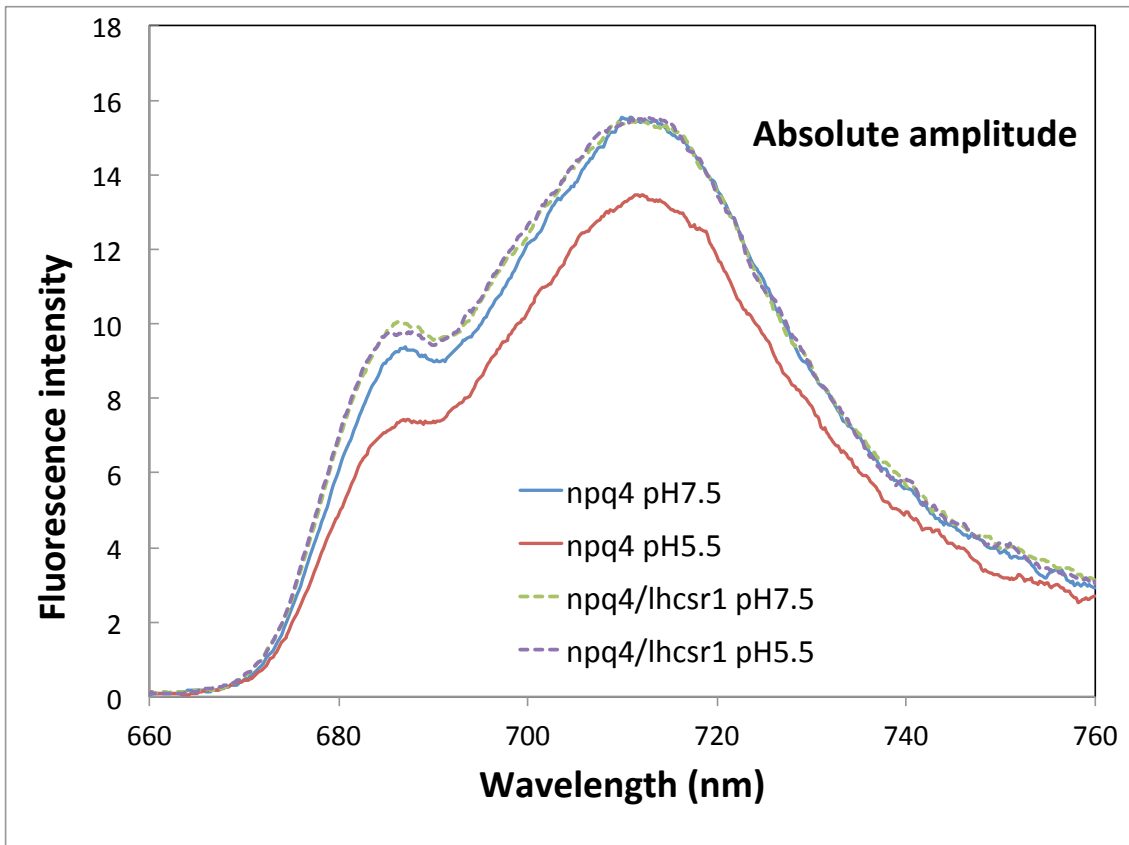


図 5 7 ; チラコイド膜を用いた低温絶対蛍光測定 (77K)。LHCSR1 が機能的である *npq4* pH5.5 においてのみ、PSII(685nm)および PSI(715nm)から発される蛍光が減少している。LHCSR1 の機能により PSI 及び PSII のエネルギー収支に何らかの影響を与えている事が示唆された。

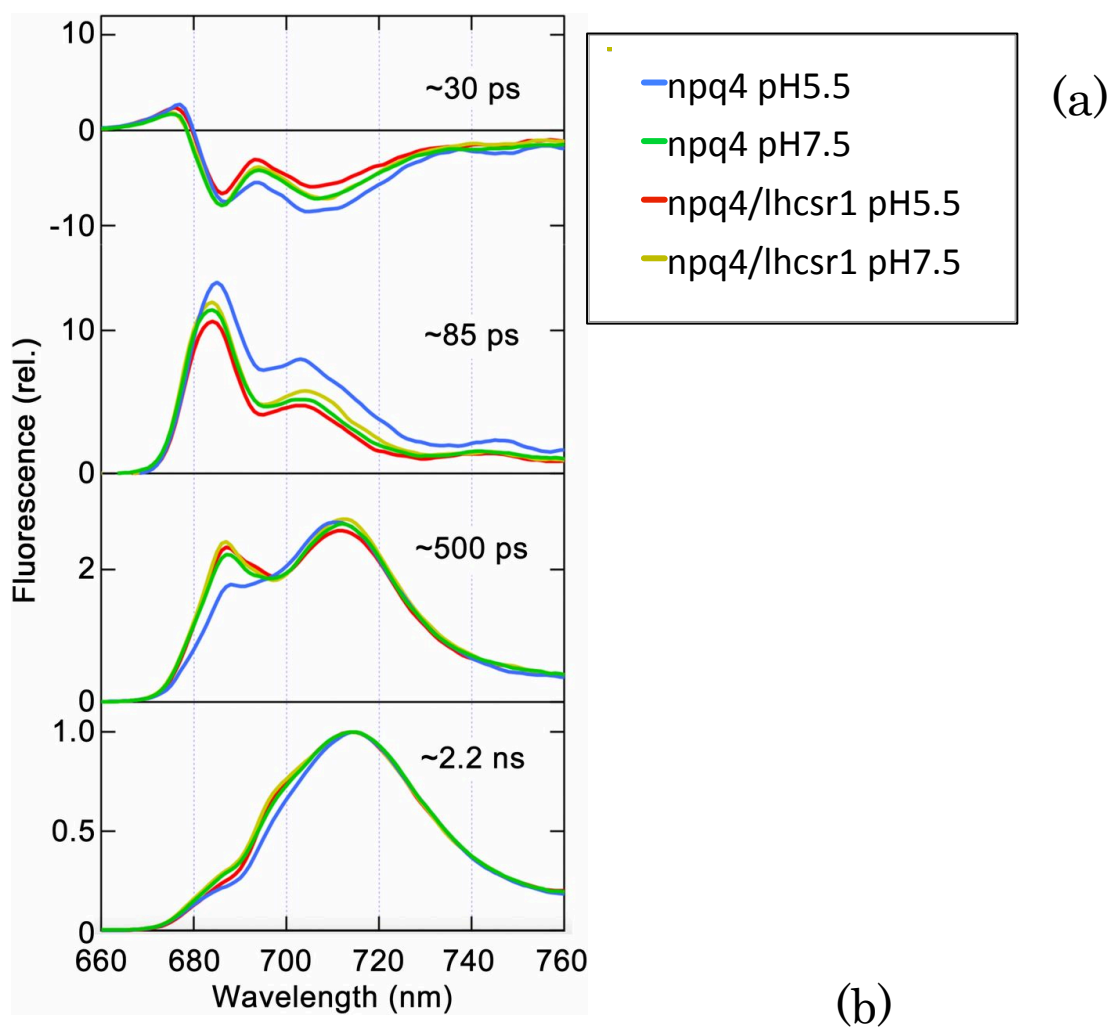
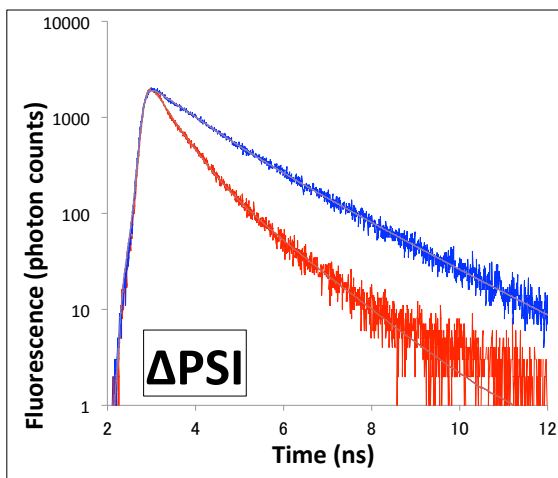
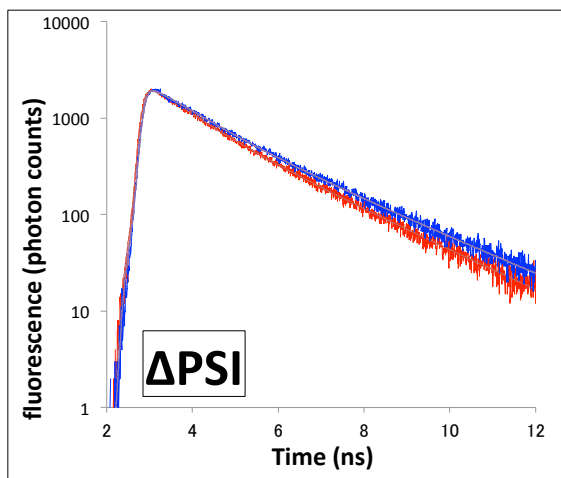


図 5.8 ; (a) チラコイド膜を用いた FDAS (Fluorescence Decay Associated Spectrum)測定および(b)蛍光寿命の各構成成分。npq4 pH5.5では、~30psの時間軸において LHCII(680nm)から吸収されたエネルギーがより PSI(715nm)に移動している。つまり、LHCSR1が LHCII から吸収されたエネルギーを PSI に移動させている。



UV 下



Dark 下

図 5 9 ; ΔPSI 株を用いた蛍光寿命測定。UV 下で培養した場合は Dark と同様に蛍光の減衰が見られないと仮定していたが、それに反して減衰が確認された。

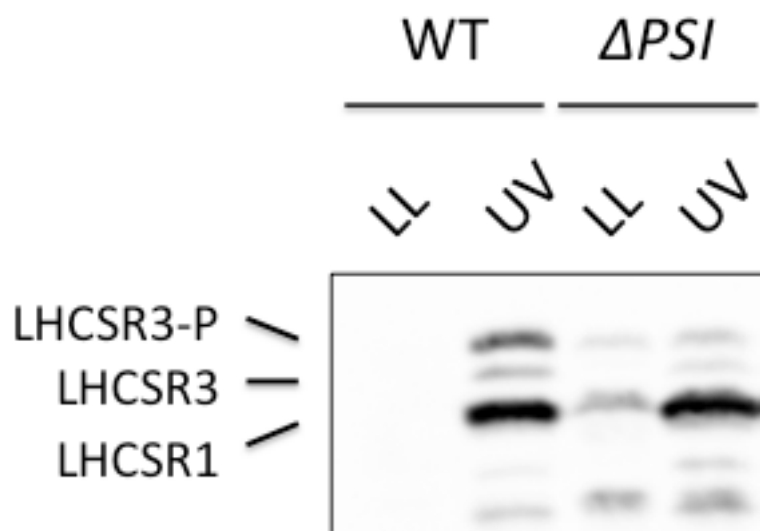


図 6 0 ; 光照射下における LHCSR3-P, LHCSR3 および LHCSR1 の発現。UV 下で培養した ΔPSI において、コントロールである WT 同様に LHCSR1 の発現が確認された。

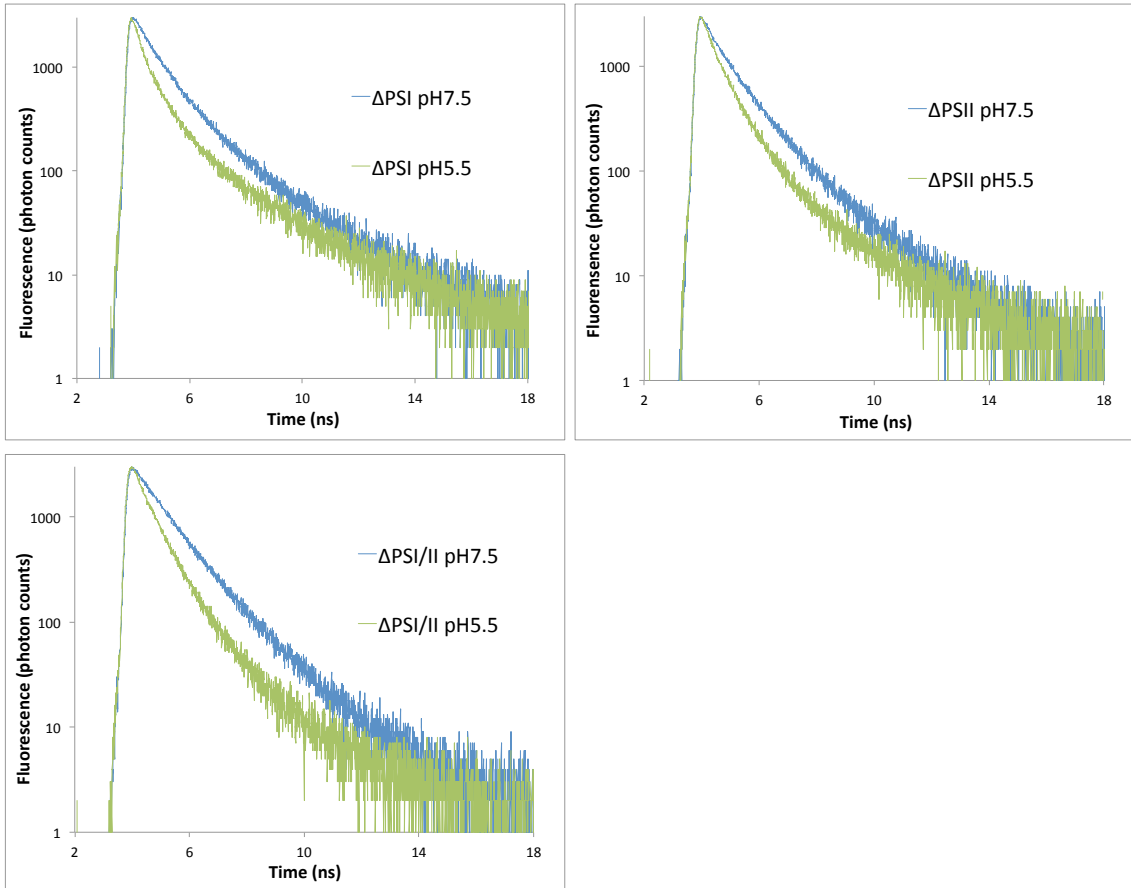


図 6 1 ; 3 種 の 光 化 学 系 欠 損 株 の チ ラ コ イ ド 膜 を 用 い た 蛍 光 寿 命 測 定 。 チ ラ コ イ ド 膜 が 安 定 的 に 単 離 でき て い な い た め か 、 蛍 光 の 減 衰 に 目 立 っ た 差 は 確 認 さ れ な か っ た 。

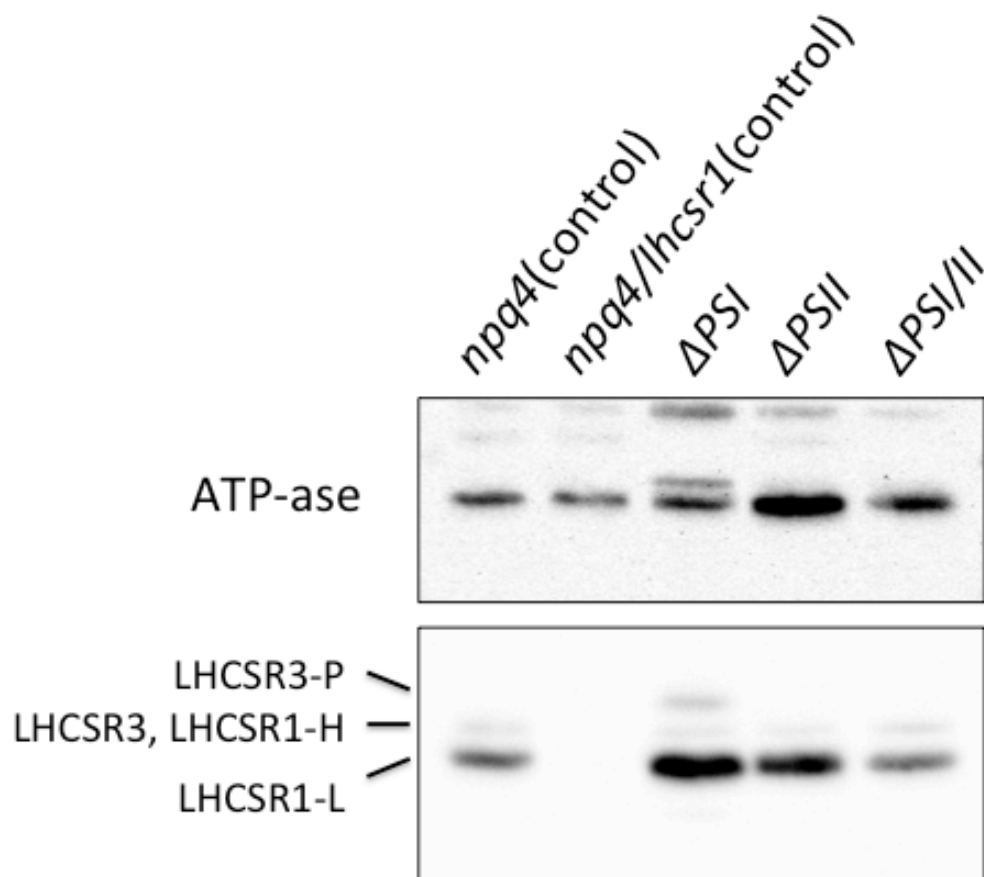
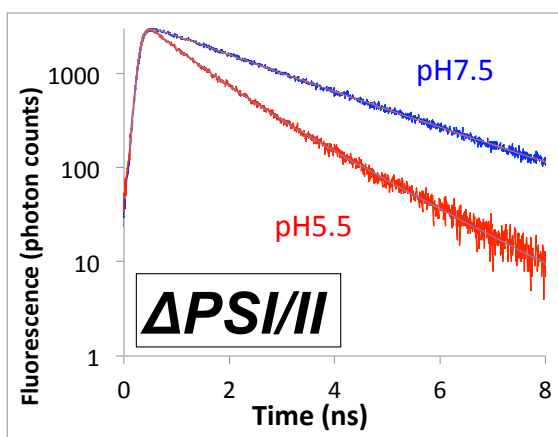
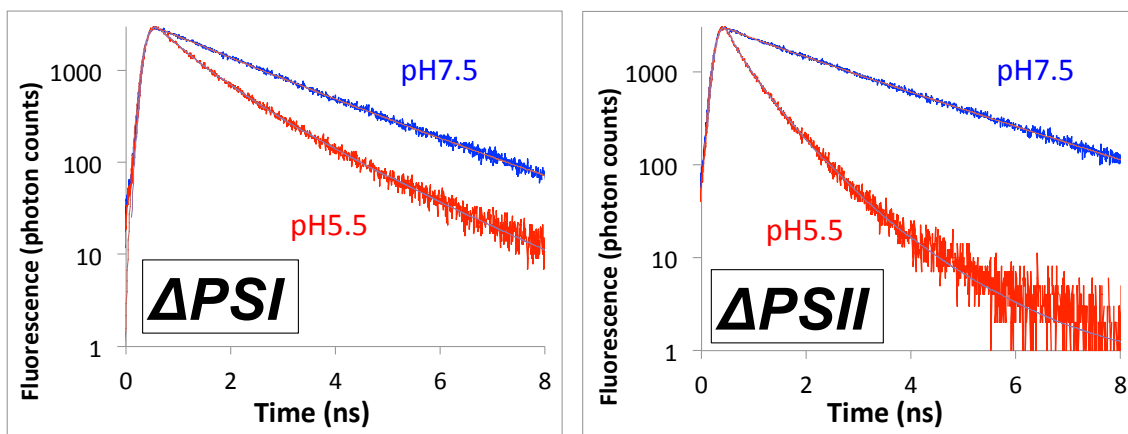


図 6 2 ; 3 種の光化学系欠損株を用いた LHCSR3-P, LHCSR3 および LHCSR1 の発現。チラコイド膜が安定的に単離できていないためか、LHCSR1 の蓄積量が各株で一定ではなかった。

(a)



(b)

	Ave Fluorescence lifetime (τ AVE)		pH-inducible fluorescence quenching (%)	NPQ calc
	pH 7.5	pH 5.5		
ΔPSI	2.06	1.17	43.5	0.76
$\Delta PSII$	2.32	0.58	75.0	3.00
$\Delta PSI/II$	2.30	1.19	48.2	0.93

図 6 3 ; UV 下で培養した 3 種の光化学系欠損株を用いた蛍光寿命測定 (a) 蛍光減衰曲線グラフ (b) 解析および NPQ の算出。光化学系 II を欠損した $\Delta PSII$ では、他の二株に比べ酸性条件下においてより大きな蛍光の減衰が見られた。 $\Delta PSII$ のみが PSI を有している事から、LHCSR1 依存のクエンチングと PSI には何かしらの関連性がある事が示唆された。

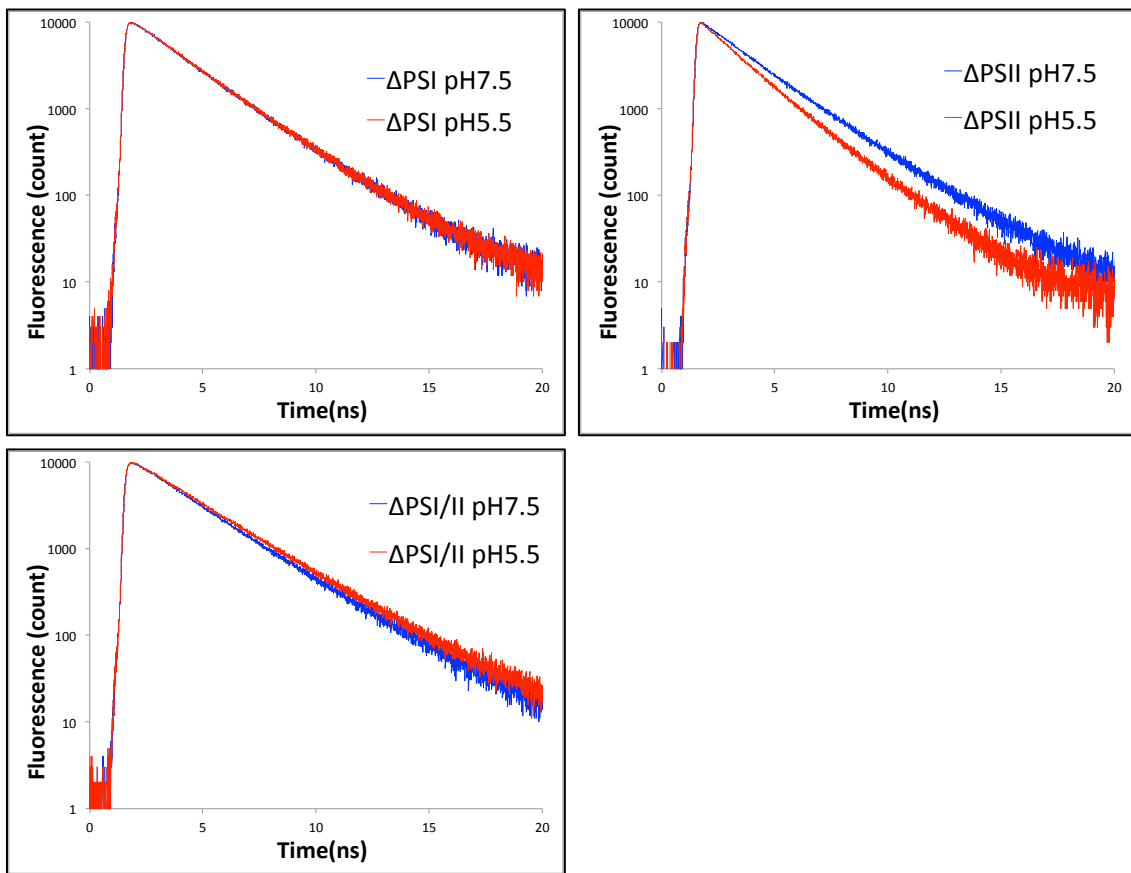


図 6 4 ;LL 下で培養した 3 種の光化学系欠損株を用いた蛍光寿命測定。コントロールとして 3 種の光化学系欠損株 LL 下で培養した場合、図 6 3 で示したような蛍光の減衰は確認されなかった。よって、図 6 3 で示した蛍光の減衰は、UV の照射によって誘導された LHCSR1 の蓄積により引き起こされたと考えられる。

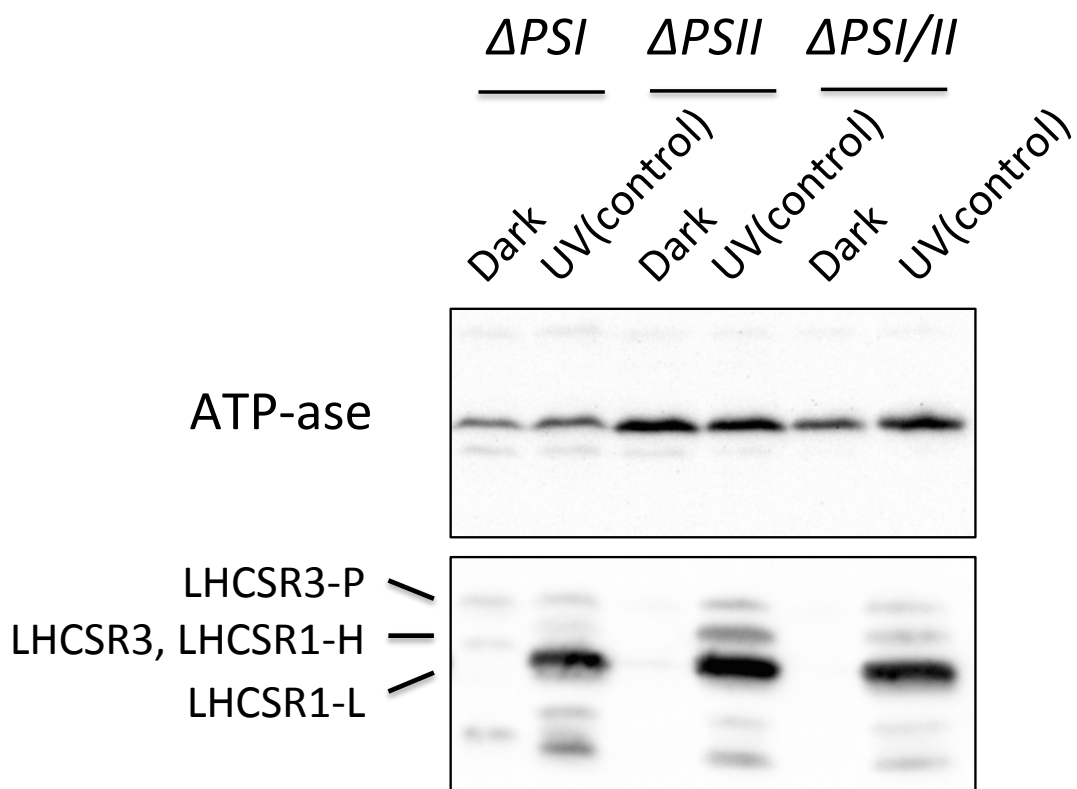


図65; LLおよびUV光下で培養した3種の光化学系欠損株を用いた LHCSR3-P, LHCSR3, LHCSR1-H, および LHCSR1-L の発現。Dark 条件においては LHCSR1 が発現していないため、図64における蛍光寿命測定において蛍光の減衰がみられなかったことがわかる。

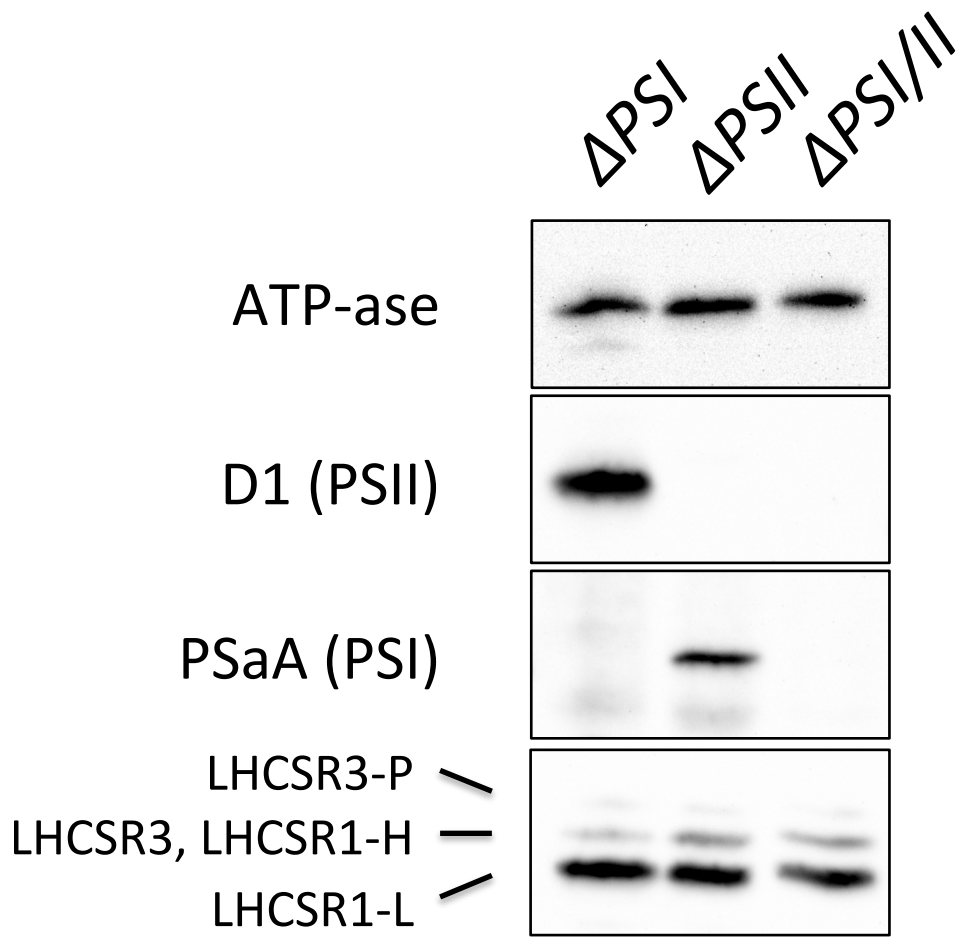


図 6 6 ; UV 光下で培養した 3 種の光化学系欠損株を用いた各光合成タンパク質の発現。
 LHCSR1-H,-L の発現にほぼ差がなかったことから、この差が図 6 3 における蛍光寿命測定の結果に影響を与えた可能性は低い。

「実験材料・方法」

「株および培養条件」

本章では、野生株として 137C+, 変異体 *npq4-k*, *lhcsr1-k* および *npq4/lhcsr1-k* が用いられた。

新光源下での LHCSR1/3 発現の発現量を確認するため、各株は従属栄養培地 (TAP)(Gorman et al, 1965) を用いて対数増殖期(約 $2.0 \sim 5.0 \times 10^6$ Cells/ml) に達した細胞を、独立栄養培地(HSM)(Sueoka, 1960)に置換後、クロロフィル含有量を測定し、サンプルを 2ugChl/ml の濃度に調整した。サンプルは新光源下に静置され、4 時間培養された。

生化学実験のため、TAP 寒天培地上で保管されている細胞は液体独立栄養培地を用いて 100~150uE 下で対数増殖期まで育てられた。その後、1L スケールのボトルに移され 23°C、100~120uE で、5% CO₂ を通気して対数増殖期まで育て、その後細胞内に蓄積した CO₂ の濃度を下げるため、空気通気を伴い 12 時間培養された。前培養されたサンプルは、プラスチック製の培養ケースに移され、新光源下、25°C の条件において 12 時間培養された。

「Chlorophyll 濃度測定」

クロロフィル濃度及びクロロフィル a/b 比は(Porra, 1989; Porra, 2002) に従い行われた。細胞は 100% のメタノールに溶解され、18,000g で 3 分の遠心の後、上澄みを用いて NanoDrop(Thermo Fisher Scientific, Japan) にて測定が行われた。

「チラコイド膜の単離」

Tokutsu et al, 2012 を一部改変して行われた。大量培養した細胞は、遠心によって回収し、60ml のバッファーによって懸濁した。細胞を懸濁する際に、25mM MES, 0.33M スクロース, 5mM MgCl₂, 1.5mM NaCl, 1.0M Betain, /NaOH, (pH6.5) で調整したバッファーを使用した。BioNeb (Glascol, Terre Haute, IN) を用いて、約 7.5 kg/cm² の圧力において、2 回細胞を破碎した。破碎した懸濁液は、100,000×g, 4°C, 25min の条件下で Two Step SDG を行う事により、チラコイド膜が分離された。チラコイド膜の分画は回収され、60ml 0.33MS バッファーで 2 回洗われた。チラコイド膜は 500ul のバッファーを加え、絵筆を用いて再懸濁され、液体窒素下(-196°C) に保存された。

「シヨ糖密度勾配遠心分離(SDG)」

Tokutsu et al, 2012 を一部改変して行われた。液体窒素下で保存されていたチラコイド膜は解凍され、25 mM MES, 1.0M Betain, /NaOH, (pH6.5)バッファで1回洗われ、500ul の同バッファで絵筆を用いて再懸濁した。チラコイド膜溶液は 0.4mgChl に調整され、1.0%の α -DM を加えて、暗黒下、氷上で15分可溶化した。可溶化後、10000g \times , 4 $^{\circ}$ Cで遠心して不純物を分離し、上澄みを500ul(200ug Chl)とり、SDG チューブ(0.1/0.4/0.7/1.0/1.3 M sucrose ,25mMES, 1.0M Betain, /NaOH, (pH6.5),0.02% α -DM)の上にロードした。SDG チューブは 4 $^{\circ}$ C, 90,000 \times g, P40ST rotor (Hitachi-koki, Japan)で 20h 超遠心された。

「ウェスタン解析」

培養後の細胞は遠心によって回収された。サンプルはあらかじめ成形された11% SDS-tris glycine-Urea(7.5M)ゲルを用いて泳動された。メンブレンは1時間ブロッキングされ、各抗体で処理された。メンブレンは抗体で処理されたあと、2-2-5-5-5-分で計5回洗われた。1ug Chl が各レーンにロードされた。WSE-7120L EzWestLumi plus(ATTO, Tokyo, Japan)を用いた増強化学発光(ECL)によるシグナルは ChemiDoc(BIO-RAD, California, USA)によって検出された。

「蛍光寿命測定チラコイド膜」

チラコイド膜をもちいた蛍光は FluoroCube (HORIBA Jobin-Yvon)を用いて常温(23 $^{\circ}$ C)で測定された。Pico second パルスレーザー(DD-470L; HORIBA Jobin-Yvon)の 463nm のレーザー光を用いて 10 MHz の繰り返し数でクロロフィルが励起され、蛍光は monochromatic detector において 682nm で検知された(帯域幅 = 8nm)。蛍光の減衰は、DAS6 software (HORIBA Jobin-Yvon)を用いて解析された。

「低温絶対定常蛍光測定(77K)」

低温絶対蛍光測定は、先に報告されている積分球を備えた蛍光光度計を用いて行われた(FP-6600/ILFC-543L;JASCO)(Ueno et al.,2015)。

「FDAS 測定」

低温条件下(77K)における時間分解蛍光減衰は、時間分解単粒子蛍光解析装置 SPC-630 (Becker and Hickl, GmbH)を用いて測定された。Pico second パルスレーザー(PiL047X; Advanced Laser Diode Systems)を用いて 459nm で 3 MHz の繰り返し数でクロロフィルを励起し、放出された蛍光は、660-760nm の波長帯において 1nm 波長間隔で検出された。(帯域幅 = 2.5nm)。蛍光減衰の曲線は、過去の報告と共通の時間軸を用いて解析された(Akimoto et al, 2012)。

「蛍光寿命測定 Δ PS 株」

3種の Δ PS 株をもちいた蛍光は FluoroCube (HORIBA Jobin-Yvon)を用いて常温(23°C)で測定された。サンプルは 2ug Chl/ml の濃度に調整された。Pico second パルスレーザー(DD-470L; HORIBA Jobin-Yvon)の 463nm のレーザー光を用いて 10 MHz の繰り返し数でクロロフィルが励起され、蛍光は monochromatic detector において 682nm で検知された(帯域幅 = 8nm)。蛍光の減衰は、DAS6 software (HORIBA Jobin-Yvon)を用いて解析された。

「議論」

ここまで、過剰光エネルギー散逸機構 NPQ の qE クエンチングに関わる、クラミドモナスの LHCSR1 タンパク質の局在と機能について生理学・分子生物学・生化学・分光学的手法を用いて解析を行ってきた。qE はフィードバック制御によって過剰光エネルギーを熱に変換する機構である(Kulheim et al., 2002)。また qE クエンチングは、チラコイドルーメン側のプロトン濃度勾配の形成によって引き起こされる、NPQ の中でも最も早い時間軸で引き起こされる反応である。これまでの報告では、LHCSR3 は青色光で波長特異的に発現誘導され、PSII-LHCII 超複合体に局在し、直接的に過剰エネルギーを消去することによって qE クエンチングに寄与することが明らかとなっている(Petroutsos et al., 2016; Tokutsu and Minagawa., 2013; Kim et al., 2017)。一方 LHCSR1 は、UV で波長特異的に発現誘導され qE クエンチングに寄与する(Allorent et al., 2016)。本研究においてその局在を明らかにすることができなかったものの、LHCII から吸収された過剰光エネルギーを PSI に受け流し、また PSI における蛍光消去を引き起こすことが分かった。驚くべきことに、LHCSR1 はタンパク質配列で 87%の相同性を持つ(Bonente et al., 2010)LHCSR3 とは異なった、全く新しい形の qE クエンチングにおける機能を持つことが明らかとなった。

「発現機構」

LHCSR1/3 は、Peers et al., 2009 によって報告されるまでは、Li818-1 および Li818-3 と認識されていた。光誘導性の集光アンテナタンパク質の遺伝子群に属するタンパク質であり、その機能等の詳細は明らかにされないものの、その発現機構が調べられてきた。高等植物や緑藻のクロロフィル a/b 結合タンパク質と関連していると考えられている Li818 のタンパクが光誘導性である事が明らかになっており、クラミドモナス属の中で保存されている(Richard et al., 2000)。他の光合成タンパク質とは違い光で誘導されることから、何か他の機能があるのではないかと考えられていた(Richard et al., 2000)。遺伝子的に LHC に関連したものであると言われているが、他の光化学系 I/II の LHC とは非常に異なった発現を示す事が明らかとなっている(Savard, 1996)。他の藻類では Chla/c をもつ Li818 も確認されており、起源が古い事も示唆されている。

RT-PCR によって、HL 下で Li818-1/3 の mRNA が誘導されること(Richard et

al., 2000)、高 CO₂ 条件下で Li818-3 が、Low CO₂ 条件下で Li818-1 の mRNA が誘導される事が明らかになっている(Yamano et al., 2008)。また、様々なトランスクリプトーム解析においても、Li818(LHCSR)の mRNA が Fe, S, Cu, 欠乏条件下でも、蓄積量が増加する事が明らかとなっている(Naumann et al., 2007; Zhang et al.; Strenkert et al., 2016)。本研究においても、LHCSR3 は独立栄養培地 HSM で発現・誘導される一方、LHCSR1 は独立栄養培地 HSM に比べ、従属栄養培地 TAP でより早く・多く発現・誘導される事を明らかにした(図 6 7)。このように、Li818(LHCSR)は、光のシグナルのみならず、外部の様々な環境条件に応じて発現が調節されている。LHCSR1/3 はタンパク質配列で 87%の相同性を持つ(Bonente et al., 2010)ものの、本研究により発現機構が少なからず異なり厳密に調整されている事が明らかとなってきた。

本研究において特に着目した発現機構は、LHCSR3 が青色光下で、LHCSR1 が紫外線下において発現誘導される事である。気候条件における波長の含有量を調べたところ、およそ 12 時頃に紫外線量は最大化する(気象庁 HP UV インデックスより、http://www.data.jma.go.jp/gmd/env/uvhp/info_uv.html)。この時間は、紫外線だけでなく太陽の日光照射量も最大化する地点である。よって、様々な強光適応機構では補いきれない程の強光によるダメージが生じた場合、紫外線によって LHCSR1 が発現誘導される事によって強光防除機構を強化している可能性も考えられる。

「局在」

LHCSR1 はチラコイド膜上でどこに存在するのであろうか？本研究では、生化学的な解析を用いて LHCSR1 の局在を解明する事を目指してきた。LHCSR1 は核にコードされた遺伝子が強光(強光照射による電子伝達系の電子の詰まり)及び UV 下(波長特異的)に発現し、葉緑体のチラコイド膜上に輸送される事を明らかにした。そのチラコイド膜を用いて行った生化学的な解析(SDG)により LHCSR1 が Free LHC 画分に存在する事が示唆された。しかし、PSI-LHCI 超複合体および PSII-LHCII 超複合体に局在しているかは明確にする事ができなかった。

過去の報告によると、LHCSR1 は Free LHCII において酸性条件下でクエンチングを行う事が示唆されている(Dinc et al, 2016)。この事実を肯定するように、生化学的な解析によって本研究でも、SDG チューブの Free LHC 分画に

LHCSR1 が局在している事が確認された。しかし、本研究では、Free LHC 分画に局在する LHCSR1 の機能を明らかにする事はできなかった。過去の報告では(Dinc et al, 2016)、従属栄養培地を用いて株を培養し、細胞を用いて蛍光測定を行う事によって LHCSR1 の機能を明らかにした。一方本研究では、単離したチラコイド膜を可溶化し、SDG によって分画した後の Free LHC および LHCSR1 を用いて蛍光測定を行った。そのため、生化学的実験の途中で LHCSR1 の機能が失われてしまった可能性が考えられる。細胞内では、Free LHC と LHCSR1 が物理的により強固に相互作用していたのかもしれない。

LHCSR3 は PSII-LHCII 超複合体に局在し、PSII-LHCII-LHCSR3 超複合体を形成することによってクエンチングに寄与する(Tokutsu and Minagawa, 2013)。それに加えて、LHCSR3 自身がエネルギートラップになっていることが示唆されている(Kim et al., 2017)。LHCSR1 も同様に、PSII 超複合体に結合していると仮定して生化学的解析を行ってきたが、LHCSR1 の PSII-LHCII 超複合体への結合を明確に確認する事ができなかった(図 5 3)。この結果から、①LHCSR1 は PSII 超複合体に局在していない、あるいは②LHCSR1 は LHCSR3 に比べ PSII 超複合体にかなり弱く結合している。つまり、本実験ではその結合の弱さゆえ、チラコイド膜から PSII-LHCII 複合体を可溶化する過程で LHCSR1 が剥がれ落ちてしまった可能性が考えられる。これらの仮説を検証するため、LHCSR1 の局在を、機能の面から考察していく。3種の光化学系欠損株を用いた実験では、 $\Delta PSI/II$ 株(NPQ=0.93)に比べ、PSII 超複合体を含む ΔPSI 株(NPQ=0.76)においてエネルギー消去の大きさに変化はなかった(図 6 3)。その事からも、LHCSR1 依存の PSII 超複合体依存のエネルギー消去はほとんど起きていないと考えられる。また、LHCSR1 は Free LHCII において酸性条件下でクエンチングを行う事が示唆されている(Dinc et al, 2016)。この事実から、in vivo の蛍光測定において確認された LHCSR1 依存の NPQ(図 5 1) は、LHCSR1 が PSII-LHCII 超複合体に結合して引き起こされたものでなく、Free LHCII と相互作用をする事により起こったものであると推測される。つまり、以上の事実からすると、①LHCSR1 は PSII 超複合体に局在していない、という仮説が妥当のように考えられる。

一方、本研究において LHCSR1 は酸性条件下において LHCII から獲得されたエネルギーを PSI に移動させる働きも持つ事が明らかとなっている(図 5 8)。また、低温絶対定常蛍光(77K)において、酸性条件下における LHCSR1 の機能

の影響により、PSII から発される蛍光が減少する事が明らかとなっている(図 5 7)。この事実から、LHCSR1 は酸性条件下において LHCI Ⅱ から獲得されたエネルギーのうち、本来 PSII に受け渡されるべきであったエネルギーを PSI に流している。ここで着目したいのは、この LHCI Ⅱ は、Free で存在しているものの他に、PSII 超複合体の外郭に結合したのも含まれている可能性があることである。この PSII-LHCI Ⅱ 超複合体に含まれた LHCI Ⅱ から、PSI へのエネルギー移動を促進しているという可能性を考慮すると、LHCSR1 が PSII-LHCI Ⅱ 超複合体に結合していると言う、②LHCSR1 は LHCSR3 に比べ PSII 超複合体にかなり弱く結合している、の仮説であることも考えられる。

上記に加えて、本研究では、LHCSR1 の PSI-LHCI 超複合体への結合を明確に確認する事ができなかった。しかし、コケの一種である *Physcomitrella patens* は、LHCSR が両光化学系に局在し機能している事が明らかとなっている(Pinnora et al., 2015)。この事から、LHCSR1 の PSI-LHCI 超複合体への局在は、進化的に保存されている可能性も考えられなくはない。もっとも、クラミドモナスの LHCSR1 は LHCI Ⅱ から PSI へのエネルギー移動を促進しているという可能性を考慮すると、この機能を支えるために LHCSR1 が PSI-LHCI 超複合体に局在していると考えても不思議ではない。

仮に LHCSR1 が PSI-LHCI 超複合体および PSII-LHCI Ⅱ 超複合体が局在していなかった場合を考えてみる。この場合、LHCSR1 は各タンパク質複合体および Free LHC の間に浮遊しているという事になる。この場合、LHCSR1 は浮遊して各複合体には結合・局在していないものの、LHCI Ⅱ にて励起されたエネルギーはタンパク質を飛び越えて移動する事もできるので(図 6 8 (a))、LHCSR1 が LHCI Ⅱ から PSI へのエネルギー移動を仲介するという事実には矛盾しない。また、Dinc et al., 2016 では、本研究の UV とは異なる HL 条件下で LHCSR1 が誘導されたものの、LHCSR1 は主要集光アンテナタンパク質である LHCBM1 の 5%ほどししか存在しないと報告されている。このような LHCSR1 の発現量の少なさから考慮すると、LHCSR1 は各光合成タンパク質に局在するというよりは、各光合成タンパク質の間で共有されていると考えた方が妥当かもしれない。つまり、本研究の実験結果と照らし合わせて考えると、LHCSR1 は Free LHCI Ⅱ と PSI-LHCI 超複合体の間、および PSII-LHCI Ⅱ 超複合体と PSI-LHCI 超複合体の間に遊離して存在し、エネルギー移動を仲介しているとも考えられる。

クラミドモナスの LHCSR3 は、PSII-LHCII 超複合体内における結合部位についても調べられている(Xue et al, 2015a ; Xue et al, 2015b)。仮に、LHCSR1 がタンパク質複合体に局在していると仮定した場合、このような解析のためにはさらなる生化学実験技術の向上により、より安定にタンパク質複合体を精製する必要がある。

「機能におけるエネルギー移動」

本研究においては、LHCSR1 は LHCII で獲得されたエネルギーを PSI に受け流す機能がある事を明らかにした。この機能はどのように起こっているのだろうか？一つは LHCSR1 が色素を含有し、エネルギーLHCII と PSI のエネルギーの橋渡しをしているという事である(図 6 8 (a))。過去の報告によると、LHCSR3 はクロロフィル a/b とカロテノイドを含有する事が報告されている(Bonente et al., 2010)。仮に、LHCSR1 も色素を含有していると仮定すると、この説が妥当な説の一つである。もう一つは LHCSR1 がタンパク質複合体等の光合成タンパク質の構造変化を引き起こし、LHCII から PSI へのエネルギー移動を補助しているという事である(図 6 8 (b))。過去の報告によると、qE クエンチングの因子として光化学系サブユニットの一つである PSBS が関わる事が知られており、これまで主に *Arabidopsis thaliana* において研究されてきた(Li et al., 2000)。*Arabidopsis thaliana* の PSBS タンパク質は色素を結合せず(Funk et al., 1995; Crouchman et al., 2006; Bonente et al., 2008a)、酸性条件で励起され(Li et al, 2004)、タンパク質複合体の構成を変化させる事でエネルギー消去を誘引する事が知られている(Betterle et al., 2009 ; Johnson et al., 2011)。一方、*Physcomitrella patens* やクラミドモナスでも、このタンパク質が保存されており、機能的である事が報告されている(Alboresi et al., 2010; Gerotto et al., 2012; Correa-Galvis et al., 2016 ; Tibiletti et al., 2016)。クラミドモナスの PSBS は、恒常的に発現している *Arabidopsis thaliana* や *Physcomitrella patens* に比べて、解析が遅れている。クラミドモナスは PSBS の遺伝子配列を持つが、タンパク質の蓄積は長い間確認されておらず(Bonente et al., 2008b)、窒素欠乏条件下で mRNA が発現する事のみが分かっていた(Miller et al., 2010)。そのため、クラミドモナスの PSBS は Pseudo gene ではないかと考えられていた。そして近年、強光条件下において PSBS の蓄積、及び PSII への局在が確認された(Correa-Galvis et al., 2016 ; Tibiletti et al., 2016)。長い間確認されな

った理由として、PSBS の発現量が非常に少なく、また認識能力の高い抗体が存在しない事が考えられる。クラミドモナスにおいて、光化学系 II のサブユニットの一つである LHCBM1 があるが、これを欠損した変異体は qE クエンチング能力が大きく低下する(Elrad et al., 2002)。この報告からも、タンパク質複合体の構造変化における qE クエンチングの機能への影響の可能性を示している。つまり、今回のケースでは LHCSR1 の働きによって PSI-LHCI 超複合体と LHCII の相互作用、および PSI-LHCI 超複合体と PSII-LHCII 超複合体の相互作用を誘引するような構造変化を引き起こす事が考えられる。

本研究では LHCII から PSI にエネルギーが移動する事を明らかにしてきた。実際チラコイド膜上には、Free LHCII および PSII-LHCII 超複合体に結合している LHCII の二種類が存在する。FDAS のデータを見てみると、もっとも早い時間軸(~30ps)において LHCII から PSI へのエネルギー移動が見られるが(図 5 8)、これは PSII-LHCII 超複合体に含まれている LHCII からのエネルギー移動を指している。~30ps 程の早い時間軸においては、エネルギー移動の起こりやすい複合体レベルでないと観測されないからである。一方、Free LHCII から PSI へのエネルギー移動は起こっているのだろうか？ 3 種の光化学系欠損株を用いた蛍光寿命測定の結果によると、変異体 $\Delta PSII$ で他種に比べて大きなエネルギー消去が起こっている。この株は、PSII-LHCII 超複合体が存在しないため、そこに結合した LHCII から PSI へのエネルギー移動は起こらない。それにもかかわらず、大きな蛍光の減衰が見られたという事は、LHCSR1 の機能によって Free LHCII から PSI へのエネルギー移動が起こっている事を示唆している。また、平均蛍光寿命 τ_{AVE} から算出した NPQ は、変異体 ΔPSI のものに比べ (NPQ=0.76)、変異体 $\Delta PSIII$ のほうが若干大きくなっている(NPQ=0.93)。これは、 $\Delta PSIII$ では PSII-LHCII 超複合体の構造が崩れ、PSII-LHCII 超複合体に結合していた LHCII が Free LHCII になったからであると考えられる。過去の報告で、LHCSR1 は Free LHCII でエネルギー消去をする事が明らかとなっているが(Dinc et al., 2016)、チラコイド膜上において Free LHCII の総量が増え、それに伴って LHCSR1 によって消去されるエネルギーの総量も増えた事により、NPQ の上昇が観察されたのではないかと考えられる。

ステート遷移は LHCII が PSII から PSI に移動して、PSII でのエネルギー過剰を防いで両光化学系の励起バランスを調節するものである(Allen, 1992; P7 序章参照)。今回見られた現象も、本来 LHCII から PSII に受け渡されるべきで

あった励起エネルギーが PSI に移動するというものであるが、これだけを見るとステート遷移と同様の現象がみられたことになる。しかし、今回は LHCSR1 の働きによって PSI におけるエネルギー消去が引き起こされたという点では新しい。また、この現象はステート遷移とは異なり pH センシングでのみ引き起こされることも着目すべき点である。

光合成において、励起エネルギーが光化学系器官を飛び移るスピルオーバーと言う現象が明らかとなっている(Yokono et al., 2011; Ueno et al., 2016)。本来光合成では、PSII から吸収された光エネルギーによって生じた電子は Cytb₆f および PC 等を経て PSI に一方方向的に伝達されるが、両光化学系のエネルギーの励起バランスを取るための一つの手段なのであろう。一見今回発見された LHCSR1 依存のエネルギー移動のように見えるが、本研究における現象は別の時間軸で、いわゆるかなり早い時間軸(~30ps)で引き起こされている事(スピルオーバーはより長い時間軸で観測される)、また、LHCSR1 が存在し pH が低い条件下でのみこの現象が確認されたので否定される。本研究に用いたクラミドモナスのチラコイド膜を用いてスピルオーバーを測定したところ、過去に報告のあった紅藻やシアノバクテリアでのスピルオーバーに比べ、クラミドモナスでは大きくは確認されなかった。

「LHCSR1 は直接的エネルギー消去をするか、もしくはタンパク質複合体間の構造を変えるか？」

本研究では、LHCSR1 が機能的な状況下では、PSI におけるエネルギー消去が誘引される事が明らかとなった。また、過去の報告において LHCSR1 は Free LHCI においてエネルギー消去を引き起こすとされている(Dinc et al., 2016)。このエネルギー消去は LHCSR1 によって直接的、あるいは間接的かどのように引き起こされているのであろうか。

クラミドモナスにおける LHCSR3 は、Chla/b およびカロテノイドを含んでいる(Bonente et al., 2011)。カロテノイドの一種であるキサントフィルは、エネルギー消去に寄与すると言われている。通常条件ではビオラキサニンで存在するが、光照射下においてはエネルギー消去能力を持つアンスラキサニン、ビオラキサニンと形態を変えこれはキサントフィルサイクルと呼ばれている(Niyogi et al., 1995)。LHCSR1 が実際に色素を結合しているかは明らかとなっていないが、仮に色素を結合している場合は直接的なエネルギー消去に寄与し

ている可能性がある。実際に、*Physcomitrella patens* で保存されている LHCSR もキサントフィルを結合している事が報告されている(Pinnola et al., 2013; Pinnola et al., 2017)。また、LHCSR3 は強光条件下において発現誘導され、PSII-LHCII-LHCSR3 超複合体を形成するとともに(Tokutsu and Minagawa, 2013)、LHCSR3 はエネルギーとラップになっている事が示唆されている(Kim et al, 2017)。チラコイド膜を用いた蛍光寿命測定の結果から考えると、酸性条件下(pH5.5)における LHCSR1 のクエンチングによって τ_1 のもっとも早い時間軸の割合が増加している(図5 6)(LHCSR1 をもつ *npq4* における τ_1 成分 30.0%→44.7%; LHCSR1 をもたない *npq4/lhcsr1* における τ_1 成分 26.7%→29.0%)。これは FDAS で LHCII から PSI へのエネルギー移動がかなり早い時間軸において促進されている事実と一致する(図5 8)。Kim et al., 2017 によると、LHCSR3 による機能は同様に早い時間軸 (~40ps) で観察されることが明らかとなっている。これらを踏まえると、エネルギー消去が起こる時間軸的には LHCSR1/3 で共通している部分があるのかもしれない。一方で、図5 8 (b)を参照すると、LHCSR1 が機能的であっても、そうでないときに比べ蛍光寿命の構成成分に大差はない。このことから、LHCSR1 が LHCSR3 と同様に PSII-LHCII-LHCSR1 超複合体を形成し、直接的なエネルギートラップとして働いている可能性は否定される。以上のことを踏まえて、LHCSR1 はチラコイド膜上で遊離しており、Free LHCII と相互作用する事によって直接的なエネルギートラップになっていると考えれば、Dinc et al., 2017 の報告に矛盾しない。

LHCSR1 が間接的なエネルギー消去に寄与している可能性はあるだろうか？議論で先にも述べた通り、クラミドモナスは、qE クエンチングに寄与すると考えられる PSII のサブユニット PSBS を持つ(Tibiletti et al., 2016; Correa-Galvis et al., 2016)。このタンパク質は *Arabidopsis thaliana* でよく研究されており、色素を持たず(Funk et al., 1995; Crouchman et al., 2006; Bonente et al., 2008a)、PSII のタンパク質複合体の構成を変える事によりエネルギー消去に寄与すると言われている(Betterle et al., 2009 ; Johnson et al., 2011)。これらの報告を踏まえると、もしかしたら、LHCSR1 も PSBS と同様にタンパク質複合体の構成を変える事によってエネルギー消去に寄与しているかもしれない。これが事実とすれば、LHCSR1 はチラコイド膜上の光合成タンパク質の構成変化を引き起こすことによって、LHCII からのエネルギーを何ら

かの形で PSI に受け渡し、また、PSI における電化分離によって蛍光のを消去を誘引しているのかもしれない。図 5 8 (b)を参照し、LHCSR1 が機能的であっても、そうでないときに比べ蛍光寿命の構成成分に大差はないことを踏まえると妥当である。また、Free LHCI 2 は、それぞれが凝集する事によってエネルギー消去をすると報告されている (Ruben et al, 1997; Tokutsu et al., 2009)。そのため、LHCSR1 はそれら Free LHCI 2 が凝集し、効率的にエネルギー消去をする事を補助しているのかもしれない。これが事実とすると、過去の Dinc et al., 2016 の報告に矛盾しない。

「なぜこの機能を得たのか。生物学的な合理性」

なぜ、クラミドモナスは LHCSR1 に特徴的な qE クエンチングの機能を獲得したのであろうか？本研究では、UV 下で発現誘導された LHCSR1 が、酸性条件下において LHCI 2 から獲得されたエネルギーを PSI に受け渡し、さらに PSI における蛍光消去を引き起こしていることを明らかにした。この機能によって LHCI 2 から PSI 側に受け渡されるエネルギーは、本来 PSII 超複合体に流されるはずであったものである。つまり、本来の光合成の電子伝達反応は、LHCI 2-PSII-Cytb6f-PSI のように電子伝達が起こる。しかし、LHCSR1 が酸性条件下で機能的な場合は、LHCI 2-PSI というバイパスを形成する事により、PSII のエネルギー過剰を防いでいる。PSII の光阻害は PSII のエネルギー過剰から引き起こされるものであるため、LHCSR1 の機能は PSII をエネルギー過剰から保護し、PSII の光阻害を防いでいる可能性を示している。本研究では、UV 照射後の *npq4* および *npq4/lhcsr1* において Fv/Fm のパラメーターを用いて光化学系 II の破壊の程度を測定したところ、種間での変化は見られなかった。しかし、過去の報告によると、UV 照射した後に HL を照射すると、二種の Fv/Fm に変化が見られたことから、クラミドモナスは UV 照射後に現れる強光に備えて、LHCSR1 を発現させていると結論付けている (Allorent et al., 2016)。つまり、これを参考とすると、本研究において明らかにされた LHCSR1 の機能は合理的であると言える。また、光化学系 II の破壊のメカニズムの研究も進められてきた。説の一つに、Two-Step モデルが存在する。Two-Step モデルは、二段階の光波長の照射によって引き起こされる破壊であるとされる。1 段階目は、UV あるいは青色光照射によって光化学系 II の酸素発生部位が破壊される。2 段階目は、青色光および赤色光の照射によって光化学系 II のクロロフィルが励起され

ることにより、光化学系 II の反応中心が破壊されるというものである(Ohnishi et al., 2005)。このモデルを考慮すると、1 段階目の酸素発生部位の破壊に関わる光波長帯、UV および、青色光は、LHCSR1 および LHCSR3 を誘導させるための波長帯と一致する。つまり、UV および青色光によって一段階目の酸素発生部位の破壊が起こることと同時に LHCSR1/3 を発現させ、引き続き起こる二段階目の反応中心の破壊から光化学系 II を保護していると考えられる。

従来の LHCSR3 に見られるような PSII 依存のクエンチングとは異なり、なぜクラミドモナスの LHCSR1 は PSI における蛍光消去を引き起こすという(図 5 7, 図 6 3) PSI 依存のクエンチングを行うのであろうか? PSI は、PSII に比べてエネルギー過剰になりやすく、PSI の反応中心の反応中心クロロフィル P700 および P700+は共に優れたクエンチャーであると言われている(Savikhin, 2006)。また、光化学系 I は量子収率がほぼ 100%であり(Nelson, 2009)吸収した光エネルギーをほぼすべて電荷分離に用いる事ができるため、もっとも効率的な自然のエネルギーとラップと言われている(Mazor et al., 2015)。PSI 中心タンパク質は、シアノバクテリアと高等植物でアミノ酸配列に類似性が高く(Cantrel and Bryant, 1987)、光合成生物の中でもよく保存されている可能性が高いと考えられる。これは、光合成生物に共通した最も原始的なエネルギー消去システムの一つなのかもしれない。本研究ではクラミドモナスの LHCSR1 は LHCSR2 から吸収されたエネルギーを PSI に受け渡し、さらに PSI をエネルギートラップとして用いて消去している事を示した。クラミドモナスの持つ LHCSR1 であるが、*Physcomitrella patens* においても配列が完全に一致しないものの関連するオルソログである LHCSR1 が保存されており(Alboresi et al., 2008)、高等植物では消失している(Niyogi and Truong., 2013)。一方で、*Arabidopsis thaliana* の qE クエンチングでは、PSII のサブユニットの一つである PSBS が主要なクエンチャーとして働いており、PSII の構造変化を引き起こすことによってエネルギー消去を引き起こす(Betterle et al., 2009; Johnson et al., 2011)。もしかしたら、進化的に陸上化初期までは PSI におけるエネルギートラップをよく用い、それ以降は PSI に依存しないエネルギー消去に移行していったのではないだろうか。

PSI の反応中心の反応中心クロロフィル P700+は PSII で過剰になった励起エネルギーが光化学系器官間を飛び移って PSI に移動する、いわゆるスピルオーバーにおいてクエンチャーになっていると言われている(Slavov et al., 2016)。

この事から考えても、PSI が複数経路からの過剰エネルギーのトラップとして利用されている事が伺える。NPQ の成分の一つに PSII-LHCII 超複合体に結合した LHCII が、PSI に移動し、両光化学系における励起エネルギーのバランスを取る状態遷移(Allen, 1992; P7 序章参照)があるが、クラミドモナスでは最大 80% の LHCII が状態遷移により PSI に移動する(Vallon et al., 1986; Delosme et al., 1996)。一方、高等植物の *Arabidopsis thaliana* では 15-20% の LHCII しか PSI に移動していないとされる(Allen, 1992; Finazzi, 2005)。つまり、高等植物に比べ、クラミドモナスの方がより PSI 側にエネルギーを流し、そこをエネルギートラップとして用いる事で過剰エネルギーを消去しているのかもしれない。

しかし、緑藻クラミドモナスにおいては、どのようにして LHCSR1 が機能的な条件のみで LHCII から PSI にエネルギーが流されるのかという詳細な機能の解明には、さらなる解析が必要である。

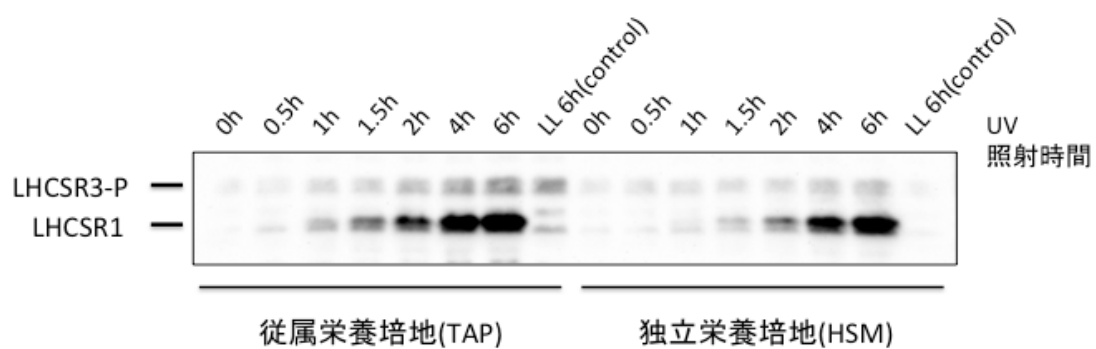


図 6 7 ; UV 光下で培養した WT サンプルを用いた LHCSR3-P および LHCSR1 の発現。従属栄養培地 TAP においては独立栄養培地 HSM に比べ LHCSR1 がより早く、多く蓄積している。

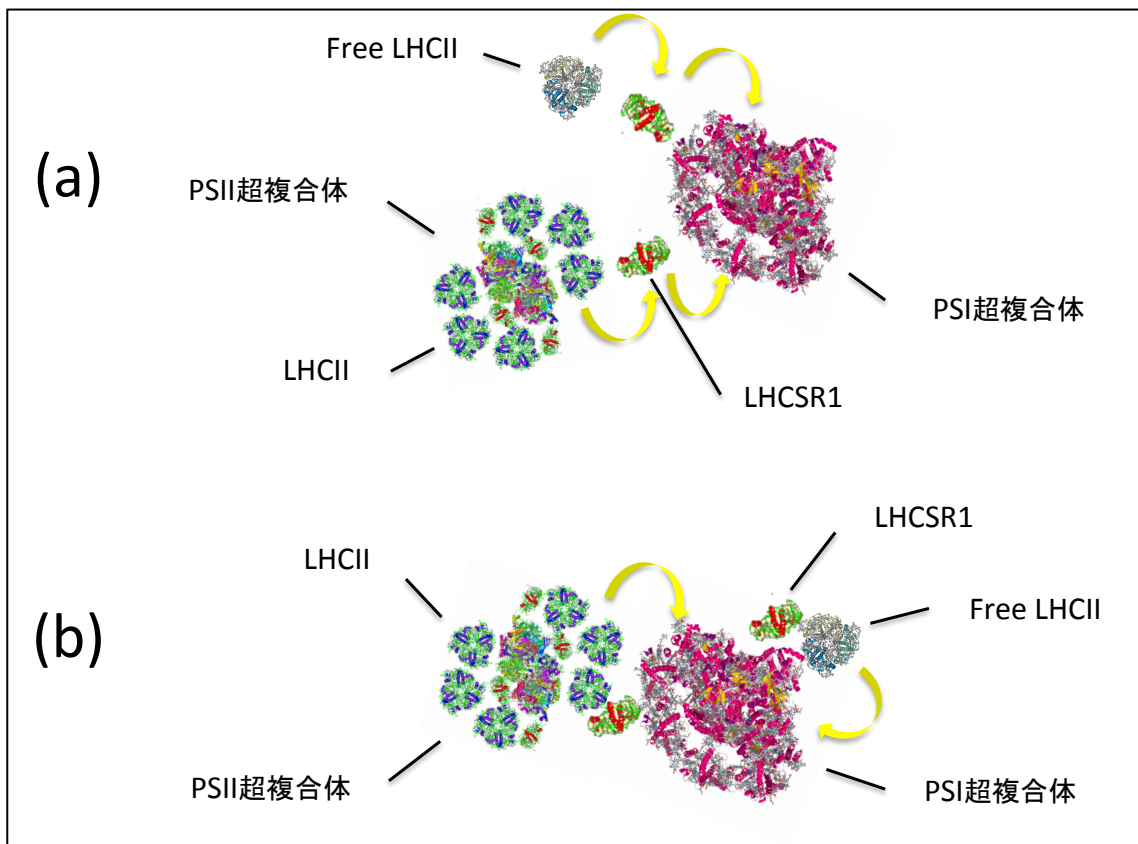


図 6 8 ; LHCSR1 のエネルギー移動(黄色矢印)
 (a)LHCSR1 におけるエネルギーの直接的な橋渡し。
 Free LHCII→LHCSR1→PSI および PSII 超複合体
 に結合した LHCII→LHCSR1→PSI のエネルギーの
 流れ (b)LHCSR1 によるタンパク質複合体の構造変
 化と LHCII→PSI へのエネルギーの流れ

「結論と提言」

クラミドモナスは強光条件下において、プロトン濃度勾配形成に伴って LHCSR1 が活性化されると LHCI から吸収されたエネルギーを PSI に流すことにより、PSI での電化分離を引き起こし蛍光の消去を誘引する。つまり、通常の光合成のエネルギー伝達経路とは別の経路を形成する事によって LHCI から PSII に直接的にエネルギーが流れる事を抑制し、PSII でのエネルギー過剰による光阻害を防ぐとともに、安定的に光合成を行う事を可能にしている(図 6 9)。この qE クエンチングのシステムはクラミドモナスだけでなく他の光合成生物でも今まで報告のない全く新しい形のものである。

本研究から明らかになったクラミドモナスの LHCSR1 の機能より、クラミドモナスの qE クエンチングのシステムは、LHCSR3 に見られるようにタンパク質が直接的にエネルギーを消去するものだけではなく、実際はもっと複雑な機構である可能性が出てきた。これら機構は、今まで見つかっている他のエネルギー消去機能ともなんらかの関わりを持ち、複雑に制御されている可能性も考えられる。それらとの変異体を作成して関連性を調べる事により、NPQ というシステムの包括的な理解を目指す事が今後の重要な課題の一つと言えるであろう。

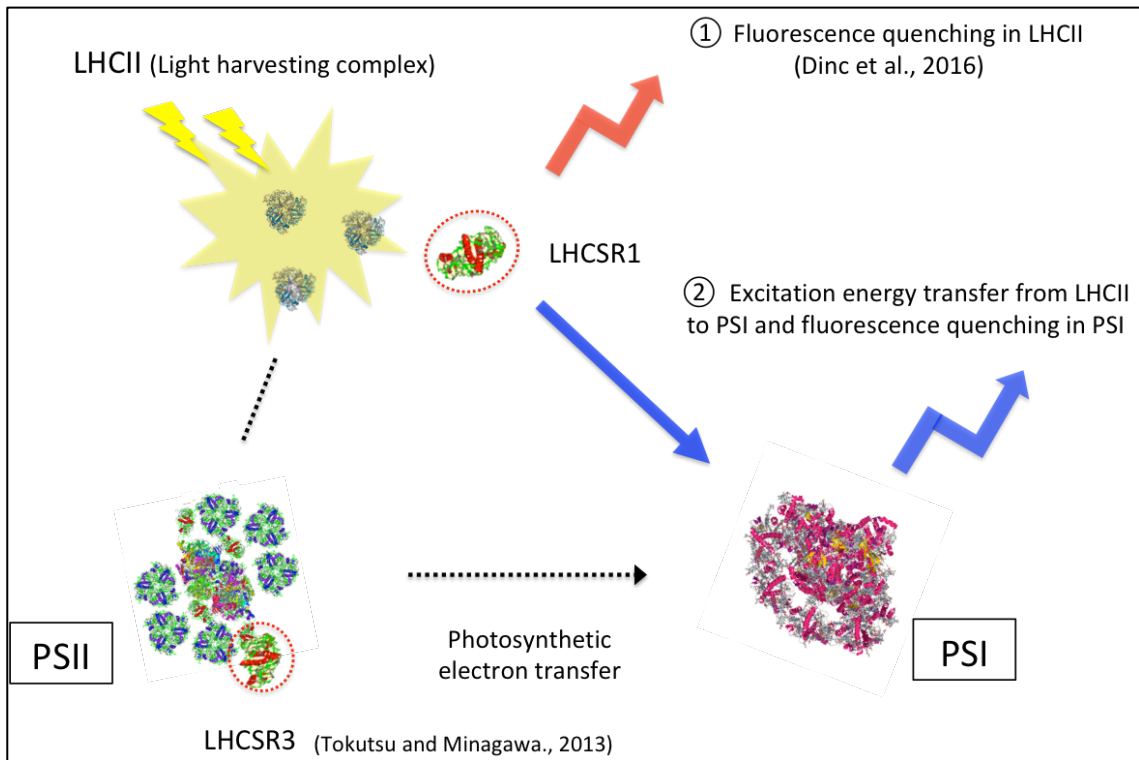


図 6 9； クラミドモナスにおける LHCSR1 を介した新たな qE クエンチングのモデル。①過去に報告のあった LHCII における蛍光消去(赤矢印) ②本研究で明らかにした、LHCII から PSI へのエネルギー移動および PSI における蛍光消去(青矢印)

「謝辞」

博士課程在学中研究生活全般のサポートをしてくださった、得津隆太郎博士および皆川純博士に感謝しております。

生活習慣の乱れを改善させ、研究者としての基本的姿勢を身につけさせてくださったことは得津隆太郎博士のおかげです。

本研究で用いた変異体は、カリフォルニア大学バークレー校の **Krishna. K. Niyogi** 博士および **Thuy B. Truong** 博士のご厚意によって提供していただき感謝しております。

クラミドモナスの戻し交雑は、鎌田このみ博士および門脇たまか氏にお世話になりました。

分光学的な測定では、**Kim Eunchul** 博士、神戸大学秋本誠志博士、同植野嘉文氏にお世話になりました。分光学的な解析では、北海道大学横野牧生博士にお世話になりました。

投稿論文執筆に関しては、貴重な議論をしてくださった得津隆太郎博士、**Krishna.K.Niyogi** 博士、および秋本誠志博士には感謝申し上げます。

総合研究大学院大学生命科学研究科の授業科目である生命科学プロセスにて、研究に対しての多くの助言をいただきました事については、長谷部光泰博士、松林嘉克博士(現名古屋大学教授)、玉田洋介博士、武田直也博士(現関西学院大学准教授)、金澤建彦博士に感謝しております。

学術振興会特別研究員に応募する際、研究費獲得の為の書類作成の方法を身に付けさせてくださったのは、高橋俊一博士および得津隆太郎博士のおかげであり感謝しております。

入学当初、**SDS-PAGE**、ウェスタン解析等基本実験をご指導くださり、研究生生活の礎を築かせてくれたのは元技術支援員の星理絵氏のおかげであり、感謝しております。

2010 年度基礎生物学研究所の体験入学にて研究室に受け入れてくださり、後に総合研究大学院大学に入学して基礎生物学研究所にて研究をするきっかけを作ってくくださった西村幹夫博士(現総合研究大学院大学名誉教授)に感謝しています。

経済的に決して恵まれている家庭ではないものの、自身の博士課程進学を許可し、成長の機会を与えてくださった両親に感謝しております。

研究結果が出ずにくじけそうだった際も励ましてくれた母や多くの友人達に感謝しております。

改めて、この研究をサポートして下さった上記の方々に大変感謝しております。

「参考文献」

Akimoto, S., Yokono, M., Hamada, F., Teshigahara, A., Aikawa, S., & Kondo, A. (2012). Adaptation of light-harvesting systems of *Arthrospira platensis* to light conditions, probed by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(8), 1483–1489.

Alboresi, A., Gerotto, C., Giacometti, G. M., Bassi, R., & Morosinotto, T. (2010). *Physcomitrella patens* mutants affected on heat dissipation clarify the evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(24), 11128–11133.

Alboresi, A., Caffarri, S., Nogue, F., Bassi, R., & Morosinotto, T. (2008). In silico and biochemical analysis of *Physcomitrella patens* photosynthetic antenna: Identification of subunits which evolved upon land adaptation. *PLoS ONE*, 3(4).

Allen, J.F. (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1098, 275–335.

Allorent, G., Tokutsu, R., Roach, T., Peers, G., Cardol, P., Girard-Bascou, J., ... Finazzi, G. (2013). A Dual Strategy to Cope with High Light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 25(2), 545–557.

Allorent, G., Lefebvre-Legendre, L., Chappuis, R., Kuntz, M., Truong, T. B., Niyogi, K. K., ... Goldschmidt-Clermont, M. (2016). UV-B photoreceptor-mediated protection of the photosynthetic machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(51), 14864–14869.

Allorent, G., & Petroutsos, D. (2017). Photoreceptor-dependent regulation of photoprotection. *Current Opinion in Plant Biology*, 37, 102–108.

Aro Eva-Mari, Virgin Ivar, Andersson Bertil. (1993). Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1143(2), 113–134.

Ballottari, M., Alcocer, M. J. P., D'Andrea, C., Viola, D., Ahn, T. K., Petrozza, A., ... Bassi, R. (2014). Regulation of photosystem I light harvesting by zeaxanthin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(23), E2431–E2438.

Ballottari, M., Truong, T. B., Re De, E., Erickson, E., Stella, G. R., Fleming, G. R., ... Niyogi, K. K. (2016). Identification of ph-sensing sites in the light harvesting complex stress-related 3 protein essential for triggering non-photochemical quenching in chlamydomonas reinhardtii. *Journal of Biological Chemistry*, 291(14), 7334–7346.

Bergner, S. V., Scholz, M., Trompelt, K., Barth, J., Gäbelein, P., Steinbeck, J., ... Hippler, M. (2015). STATE TRANSITION7-Dependent Phosphorylation Is Modulated by Changing Environmental Conditions, and Its Absence Triggers Remodeling of Photosynthetic Protein Complexes. *Plant Physiology*, 168(2), 615–634.

Berteotti, S., Ballottari, M., & Bassi, R. (2016). Increased biomass productivity in green algae by tuning non-photochemical quenching. *Scientific Reports*, 6.

Betterle, N., Ballottari, M., Zorzan, S., de Bianchi, S., Cazzaniga, S., Dall'Osto, L., ... Bassi, R. (2009). Light-induced dissociation of an antenna hetero-oligomer is needed for non-photochemical quenching induction. *Journal of Biological Chemistry*, 284(22), 15255–15266.

Bode, S., Quentmeier, C. C., Liao, P.-N., Hafi, N., Barros, T., Wilk, L., ... Walla, P. J. (2009). On the regulation of photosynthesis by excitonic interactions between carotenoids and chlorophylls. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences, 106(30), 12311–12316.

Bonente, G., Ballottari, M., Truong, T. B., Morosinotto, T., Ahn, T. K., Fleming, G. R., ... Bassi, R. (2011). Analysis of LHCSR3, a protein essential for feedback de-excitation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS Biology*, 9(1).

Bonente, G., Howes, B. D., Caffarri, S., Smulevich, G., & Bassi, R. (2008a). Interactions between the photosystem II subunit PsbS and xanthophylls studied in vivo and in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 283(13), 8434–8445.

Bonente, G., Passarini, F., Cazzaniga, S., Mancone, C., Buia, M. C., Tripodi, M., ... Caffarri, S. (2008b). The occurrence of the psbs gene product in *chlamydomonas reinhardtii* and in other photosynthetic organisms and its correlation with energy quenching. *Photochemistry and Photobiology*, 84(6), 1359–1370.

Cantrel, A., Bryant, D. a. (1987). psaA psaB genes. *Plant Molecular Biology*, 468(1987), 453–468.

Correa-Galvis, V., Redekop, P., Guan, K., Griess, A., Truong, T. B., Wakao, S., ... Jahns, P. (2016). Photosystem II Subunit PsbS Is involved in the induction of LHCSR Protein-dependent energy dissipation in *chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, 291(33), 17478–17487.

Croce, R., & Van Amerongen, H. (2013). Light-harvesting in photosystem i. *Photosynthesis Research*, 116(2–3), 153–166.

Crouchman, S., Ruban, A., & Horton, P. (2006). PsbS enhances nonphotochemical fluorescence quenching in the absence of zeaxanthin. *FEBS Letters*, 580(8), 2053–2058.

Delosme, R., Olive, J., & Wollman, F. A. (1996). Changes in light energy distribution upon state transitions: An in vivo photoacoustic study of the wild type and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1273*(2), 150–158.

Depège, N., & Rochaix, J. D. (2003). Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHCII phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science*, *299*(March), 1572–1575.

Derks, A., Schaven, K., & Bruce, D. (2015). Diverse mechanisms for photoprotection in photosynthesis. Dynamic regulation of photosystem II excitation in response to rapid environmental change. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1847*(4–5), 468–485.

Dinc, E., Tian, L., Roy, L. M., Roth, R., Goodenough, U., & Croce, R. (2016). LHCSR1 induces a fast and reversible pH-dependent fluorescence quenching in LHCII in *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(27), 7673–7678.

Drop, B., Webber-Birungi, M., Yadav, S. K. N., Filipowicz-Szymanska, A., Fusetti, F., Boekema, E. J., & Croce, R. (2014). Light-harvesting complex II (LHCII) and its supramolecular organization in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1837*(1), 63–72.

Elrad, D., & Grossman, A. R. (2004). A genome's eye view of the light-harvesting polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Genetics*, *45*(2), 61–75.

Elrad, D., Niyogi, K. K., & Grossman, A. R. (2002). A major light-harvesting polypeptide of photosystem II functions in thermal dissipation. *The Plant Cell*, *14*(8), 1801–1816.

Erickson, E., Wakao, S., & Niyogi, K. K. (2015). Light stress and photoprotection in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal*, *82*(3), 449–465.

Finazzi, G. (2005). The central role of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in revealing the mechanism of state transitions. *Journal of Experimental Botany*, *56*(411), 383–388.

Flowers, J. M., Hazzouri, K. M., Pham, G. M., Rosas, U., Bahmani, T., Khraiwesh, B., ... Purugganan, M. D. (2015). Whole-Genome Resequencing Reveals Extensive Natural Variation in the Model Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, *27*(9), 2353–2369.

Funk, C., Adamska, I., Green, B. R., Andersson, B., & Renger, G. (1995). The nuclear encoded chlorophyll-binding PSII-S protein is stable in absence of pigments. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(50), 30141–30147.

Gallaher, S. D., Fitz-Gibbon, S. T., Glaesener, A. G., Pellegrini, M., & Merchant, S. S. (2015). *Chlamydomonas* Genome Resource for Laboratory Strains Reveals a Mosaic of Sequence Variation, Identifies True Strain Histories, and Enables Strain-Specific Studies. *The Plant Cell*, *27*(9), 2335–2352.

Gerotto, C., Alboresi, A., Giacometti, G. M., Bassi, R., & Morosinotto, T. (2012). Coexistence of plant and algal energy dissipation mechanisms in the moss *Physcomitrella patens*. *New Phytologist*, *196*(3), 763–773.

Gobets, B., & Van Grondelle, R. (2001). Energy transfer and trapping in photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1507*(1–3), 80–99.

Gorman, D. S., & Levine, R. P. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas*

reinhardi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 54(6), 1665–1669.

Harris, E. H. (2001). As a model organism. *Molecular Biology*, 52(1), 363–406.

Horton, P., Ruban, A. V., & Walters, R. G. (1996). Regulation of Light Harvesting in Green Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), 655–684.

Horton, P., & Ruban, A. (2005). Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: Photosynthesis and photoprotection. *Journal of Experimental Botany*, 56(411), 365–373.

Iwai, M., Yokono, M., Inada, N., & Minagawa, J. (2010). Live-cell imaging of photosystem II antenna dissociation during state transitions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), 2337–2342.

Johnson, M. P., Goral, T. K., Duffy, C. D. P., Brain, A. P. R., Mullineaux, C. W., & Ruban, A. V. (2011). Photoprotective Energy Dissipation Involves the Reorganization of Photosystem II Light-Harvesting Complexes in the Grana Membranes of Spinach Chloroplasts. *The Plant Cell*, 23(4), 1468–1479.

Kim, E., Akimoto, S., Tokutsu, R., Yokono, M., & Minagawa, J. (2017). Fluorescence lifetime analyses reveal how the high light-responsive protein LHCSR3 transforms PSII light-harvesting complexes into an energy-dissipative state. *Journal of Biological Chemistry*, 292, jbc.M117.805192.

Kondo, T., Pinnola, A., Chen, W. J., Dall'Osto, L., Bassi, R., & Schlau-Cohen, G. S. (2017). Single-molecule spectroscopy of LHCSR1 protein dynamics identifies two distinct states responsible for multi-timescale photosynthetic photoprotection. *Nature Chemistry*, 9(8), 772–778.

Kramer, D. M., Sacksteder, C. A., & Cruz, J. A. (1999). How acidic is the lumen? *Photosynthesis Research*, *60*(2–3), 151–163.

Krieger-Liszkay, A. (2005). Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, *56*(411), 337–346.

Lemeille, S., Turkina, M. V, Vener, A. V, & Rochaix, J.-D. (2010). Stt7-dependent Phosphorylation during State Transitions in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular & Cellular Proteomics*, *9*(6), 1281–1295.

Li, X. P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A. R., Rosenquist, M., Jansson, S., & Niyogi, K. K. (2000). A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature*, *403*(6768), 391–5.

Li, X. P., Gilmore, A. M., Caffarri, S., Bassi, R., Golan, T., Kramer, D., & Niyogi, K. K. (2004). Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(22), 22866–22874.

Liguori, N., Roy, L. M., Opacic, M., Durand, G., & Croce, R. (2013). Regulation of light harvesting in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The c-terminus of lhcsr is the knob of a dimmer switch. *Journal of the American Chemical Society*, *135*(49), 18339–18342.

Malnoe, A., Wang, F., Girard-Bascou, J., Wollman, F.-A., & de Vitry, C. (2014). Thylakoid FtsH Protease Contributes to Photosystem II and Cytochrome b6/f Remodeling in *Chlamydomonas reinhardtii* under Stress Conditions. *The Plant Cell*, *26*(1), 373–390.

Maruyama, S., Tokutsu, R., & Minagawa, J. (2014). Transcriptional regulation of the stress-responsive light harvesting complex genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology*, *55*(7), 1304–1310.

- Mazor, Y., Borovikova, A., & Nelson, N. (2015). The structure of plant photosystem i super-complex at 2.8 Å resolution. *eLife*, 4(JUNE2015), 1–18.
- Miller, R., Wu, G., Deshpande, R. R., Vieler, A., Gartner, K., Li, X., ... Benning, C. (2010). Changes in Transcript Abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following Nitrogen Deprivation Predict Diversion of Metabolism. *Plant Physiology*, 154(4), 1737–1752.
- Minagawa, J., & Tokutsu, R. (2015). Dynamic regulation of photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal*, 82(3), 413–428.
- Miura, K., Yamano, T., Yoshioka, S., Kohinata, T., Inoue, Y., Taniguchi, F., ... Fukuzawa, H. (2004). Expression profiling-based identification of CO₂-responsive genes regulated by CCM1 controlling a carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 135(3), 1595–607.
- Mu, P. (2001). Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology*, 125(4), 1558–1566.
- Naumann, B., Busch, A., Allmer, J., Ostendorf, E., Zeller, M., Kirchhoff, H., & Hippler, M. (2007). Comparative quantitative proteomics to investigate the remodeling of bioenergetic pathways under iron deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proteomics*, 7(21), 3964–3979.
- Nelson, N. (2009). Plant Photosystem I – The Most Efficient Nano-Photochemical Machine. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9, 1709–1713.
- Niyogi, K. K. (1997). *Chlamydomonas* Xanthophyll Cycle Mutants Identified by Video Imaging of Chlorophyll Fluorescence Quenching. *The Plant Cell Online*, 9(8), 1369–1380.

Niyogi, K. K., Bjorkman, O., & Grossman, A. R. (1997). The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(25), 14162–14167.

Niyogi, K. K. (1999). PHOTOPROTECTION REVISITED: *Genetic and Molecular Approaches*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *50*(1), 333–359.

Niyogi, K. K., & Truong, T. B. (2013). Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, *16*(3), 307–314.

Ohnishi, N., Allakhverdiev, S. I., Takahashi, S., Higashi, S., Watanabe, M., Nishiyama, Y., & Murata, N. (2005). Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: Step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. *Biochemistry*, *44*(23), 8494–8499.

Peers, G., Truong, T. B., Ostendorf, E., Busch, A., Elrad, D., Grossman, A. R., ... Niyogi, K. K. (2009). An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis. *Nature*, *462*(7272), 518–521.

Petroutsos, D., Busch, A., Janßen, I., Trompelt, K., Bergner, S. V., Weinl, S., ... Hippler, M. (2011). The Chloroplast Calcium Sensor CAS Is Required for Photoacclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, *23*(8), 2950–2963.

Petroutsos, D., Tokutsu, R., Maruyama, S., Flori, S., Greiner, A., Magneschi, L., ... Minagawa, J. (2016). A blue-light photoreceptor mediates the feedback regulation of photosynthesis. *Nature*, *537*(7621), 563–566.

Pinnola, A., Dall'Osto, L., Gerotto, C., Morosinotto, T., Bassi, R., & Alboresi, A. (2013). Zeaxanthin Binds to Light-Harvesting Complex Stress-Related

Protein to Enhance Nonphotochemical Quenching in *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell*, 25(9), 3519–3534.

Pinnola, A., Cazzaniga, S., Alboresi, A., Nevo, R., Levin-Zaidman, S., Reich, Z., & Bassi, R. (2015). Light-Harvesting Complex Stress-Related Proteins Catalyze Excess Energy Dissipation in Both Photosystems of *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell*, 27(11), 3213–3227.

Porra, R. J., Thompson, W. A., & Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *BBA - Bioenergetics*, 975(3), 384–394.

Porra, R. (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. *Photosynthesis Research*, 73(1), 149–156.

Qin, X., Suga, M., Kuang, T., & Shen, J.-R. (2015). Structural basis for energy transfer pathways in the plant PSI-LHCI supercomplex. *Science*, 348(6238), 989–995.

Truong, Thuy B. (2011) Investigating the Role(s) of LHCSRs in *Chlamydomonas reinhardtii*. *UC Berkeley : Plant Biology*. Retrieved from <https://escholarship.org/uc/item/2154v8x8>.

Richard, C., Ouellet, H., & Guertin, M. (2000). Characterization of the LI818 polypeptide from the green unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Molecular Biology*, 42(2), 303–316.

Savard, F., Richard, C., & Guertin, M. (1996). The *Chlamydomonas reinhardtii* LI818 gene represents a distant relative of the *cabI/II* genes that is regulated during the cell cycle and in response to illumination. *Plant*

Molecular Biology, 32(3), 461–73.

Savikhin A (2006) Ultrafast optical spectroscopy of photosystem I. *Photosystem I: The Light-Driven Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase* 24:155-175.

Slavov, C., Schrameyer, V., Reus, M., Ralph, P. J., Hill, R., Büchel, C., ... Holzwarth, A. R. (2016). “Super-quenching” state protects Symbiodinium from thermal stress - Implications for coral bleaching. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857(6), 840–847.

S.P. Long and S. Humphries. (1994) PHOTOINHIBITION OF PHOTOSYNTHESIS IN NATUR. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:633-62.

Strenkert, D., Limso, C. A., Fatihi, A., Schmollinger, S., Basset, G. J., & Merchant, S. S. (2016). Genetically programmed changes in photosynthetic cofactor metabolism in copper-deficient chlamydomonas. *Journal of Biological Chemistry*, 291(36), 19118–19131.

Sueoka, N. (1960). Mitotic Replication of Deoxyribonucleic Acid in Chlamydomonas Reinhardi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 46(1), 83–91.

Tian, L., Xu, P., Chukhutsina, V. U., Holzwarth, A. R., & Croce, R. (2017). Zeaxanthin-dependent nonphotochemical quenching does not occur in photosystem I in the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(18), 4828–4832.

Tibiletti, T., Auroy, P., Peltier, G., & Caffarri, S. (2016). Chlamydomonas reinhardtii PsbS protein is functional and accumulates rapidly and transiently under high light. *Plant Physiology*, pp.00572.2016.

Tikkanen, M., Mekala, N. R., & Aro, E. M. (2014). Photosystem II photoinhibition-repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1837*(1), 210–215.

Tilbrook, K., Dubois, M., Crocco, C. D., Yin, R., Chappuis, R., Alloreant, G., ... Ulm, R. (2016). UV-B perception and acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, *28*(April), tpc.00287.2015.

Tokutsu, R., & Minagawa, J. (2013). Energy-dissipative supercomplex of photosystem II associated with LHCSR3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(24), 10016–10021.

Tokutsu, R., Iwai, M., & Minagawa, J. (2009). CP29, a monomeric light-harvesting complex II protein, is essential for state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(12), 7777–7782.

Tokutsu, R., Kato, N., Bui, K. H., Ishikawa, T., & Minagawa, J. (2012). Revisiting the supramolecular organization of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(37), 31574–31581.

Ueno, Y., Aikawa, S., Kondo, A., & Akimoto, S. (2015). Light adaptation of the unicellular red alga, *Cyanidioschyzon merolae*, probed by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Photosynthesis Research*, *125*(1–2), 211–218.

Ueno, Y., Aikawa, S., Kondo, A., & Akimoto, S. (2016). Energy Transfer in Cyanobacteria and Red Algae: Confirmation of Spillover in Intact Megacomplexes of Phycobilisome and Both Photosystems. *Journal of Physical Chemistry Letters*, *7*(18), 3567–3571.

Vallon, O., Wollman, F.-A. and Olive, J. (1986). Lateral distribution of the main protein complexes of the photosynthetic apparatus in *Chlamydomonas*

reinhardtii and in spinach: an immunocytochemical study using intact thylakoid membranes and a PS II enriched membrane preparation. *Photobiochem. Photobiophys.* 12, 203-220.

Van Amerongen H, van Grondelle R, & Valkunas L (2000) Excitation energy transfer and trapping: Experiments. *Photosynthetic Excitons*, WORLD SCIENTIFIC, pp 449-478.

Xue, H., Bergner, S. V., Scholz, M., & Hippler, M. (2015). Novel insights into the function of LHCSR3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Signaling & Behavior*, 10(12), e1058462.

Xue, H., Tokutsu, R., Bergner, S. V., Scholz, M., Minagawa, J., & Hippler, M. (2015). PHOTOSYSTEM II SUBUNIT R IS REQUIRED FOR EFFICIENT BINDING OF LIGHT-HARVESTING COMPLEX STRESS-RELATED PROTEIN3 TO PHOTOSYSTEM II-LIGHT-HARVESTING SUPERCOMPLEXES IN *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 167(4), 1566–78.

Yamano, T., Miura, K., & Fukuzawa, H. (2008). Expression Analysis of Genes Associated with the Induction of the Carbon-Concentrating Mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 147(1), 340–354.

Yokono, M., Murakami, A., & Akimoto, S. (2011). Excitation energy transfer between photosystem II and photosystem I in red algae: Larger amounts of phycobilisome enhance spillover. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807(7), 847–853.

Zito, F., Finazzi, G., Delosme, R., Nitschke, W., Picot, D., & Wollman, F. A. (1999). The Q_o site of cytochrome b₆f complexes controls the activation of the LHCII kinase. *EMBO Journal*, 18(11), 2961–2969.

PDB(Protein Data Bank). PEA LIGHT-HARVESTING COMPLEX II AT 2.5

ANGSTROM RESOLUTION. <http://www.rcsb.org/structure/2BHW>

PDB(Protein Data Bank). The Structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Angstrom resolution. <http://www.rcsb.org/structure/2O01>