

氏 名 加藤 弘樹

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2204 号

学位授与の日付 2020 年 9 月 28 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 サンゴ共生褐虫藻における光合成及び光適応メカニズムの研究

論文審査委員 主 査 教授 川口 正代司

教授 皆川 純

教授 上田 貴志

教授 高橋 裕一郎

岡山大学 異分野基礎科学研究所

博士論文の要旨

氏 名 Kato, Hiroki

Title サンゴ共生褐虫藻における光合成及び光適応メカニズムの研究 (Studies on photosynthesis and photoadaptation mechanisms in coral symbiotic algae)

The growth of reef building corals strongly depend on photosynthetic products obtained from *Symbiodinium*, the microalgae which symbiosis within coral cells. Those coral habitats are distributed from the ocean surface to around 150 m depth, where light intensity widely changes with depth. These conditions force symbiotic *Symbiodinium* to maintain optimum photosynthesis under these various light environments to efficiently provide photosynthetic products to corals. Insufficient light intensity results in less photosynthesis, while excess light energy causes the damage of photosystems. To alleviate photoinhibition due to excess light, *Symbiodinium* has established a photoprotection mechanism called nonphotochemical quenching (NPQ), which is similar to the photoprotection mechanism in most other photosynthetic organisms.

To clarify the actual photoadaptation in corals, I collected several coral species from 2 m depth (shallow) and 43-45 m depth (deep) and analyzed their chlorophyll fluorescence behaviors. The results of photosynthetic activity, NPQ, and size of light-harvesting antenna suggested that symbiotic microalgae adapted to light conditions in coral habitats. In the collected corals, the symbiotic *Symbiodinium* types were varied. Some types of *Symbiodinium* were specifically associated with the corals collected at each depth, and the other types were associated with the corals collected at both depths. When I cultured several *Symbiodinium* strains under different light intensities, the light-harvesting antenna size and its regulation were diversified among those strains. From these results, it was presumable that corals have two light-adaptation strategies, "photoadaptation by symbiotic *Symbiodinium*" and "live together with *Symbiodinium*, which is already adapted to the light environment".

Although photoadaptation of corals in nature were observed, the molecular mechanisms of photoadaptation in *Symbiodinium* and molecular differences in photoadaptation capacity among *Symbiodinium* strains were poorly understood. Thus, I next focused on molecular mechanism of photoadaptation in *Symbiodinium*. In general, photosynthetic organisms have two photosystem cores (PSI and PSII) and their light-harvesting antennas (LHC). In *S. minutum*, the genome sequenced *Symbiodinium*, 145 LHC coding genes have been found. Those LHC genes are phylogenetically classified into a *Lhcf* type family, which is exclusively conserved in algae species that harbor secondary plastids of red algal origin, and a *Lhcr* type family,

of which members are known to be associated with PSI in red algal plastids and secondary plastids of red algal origin. However, it has not been fully investigated how these genes contribute to light harvesting in symbiotic algae because the biochemical methods to purify photosynthetic protein supercomplexes from *Symbiodinium* have not been established so far. To overcome this methodological limitation, I developed the isolation and purification methods for PSI and PSII supercomplexes, and tried to characterize these supercomplexes from *Symbiodinium minutum*.

A combination of sucrose density gradient (SDG) ultracentrifugation and ferredoxin-affinity purification enabled me to successfully purify the PSI-LHC supercomplexes from *S. minutum*. Purified PSI-LHC indicated highest oxygen absorption activity among photosynthetic organisms which have been reported so far. As a result of mass spectrometry, 25 LHCs, including both LHCF and LHCR families, were detected from the purified PSI-LHC supercomplex. Single-particle analysis electron microscopy revealed a supramolecular organization of PSI that was associated with the 8–18 LHCs. Pigment analysis and spectroscopic analysis indicated that the PSI-LHC contains peridinin and chlorophyll c2, which transfer excitation energy to the reaction center. These results suggest that PSI perform efficient light harvesting by using those pigments, which can efficiently compensate the absorption of chlorophyll *a* in ocean light (blue-green wavelength). Moreover, the PSI-LHC contained significant amounts of the xanthophyll pigment diadinoxanthin (Ddx). Ddx is known as a substrate for diatoxanthin (Dtx), which directly contributes to photoprotection in *Symbiodinium*. The Ddx was efficiently converted into Dtx in the PSI-LHC supercomplex under high light conditions. These data strongly suggest the presence of Dtx-dependent excitation energy quenching in the PSI-LHC supercomplex, which may contribute to photoprotection of the symbiotic alga in corals.

On the other hand, PSII supercomplex could not be isolated by the methods for PSI supercomplex purification in *Symbiodinium* and PSII supercomplex purification in other photosynthetic organisms. I assumed that PSII supercomplex in *Symbiodinium* is very unstable. To overcome this problem, I screened both detergents and conditions for thylakoid membrane solubilization. Finally, I succeeded in isolating PSII core complex and PSII-LHC supercomplexes which were expected to form various sizes. In my PhD course, I performed both spectroscopic measurement using corals and biochemical analysis using cultured *Symbiodinium* to investigate the molecular mechanisms of photosynthesis and photoadaptation of corals. In particular, I established the biochemical methods to purify PSI and PSII supercomplex in *Symbiodinium*, which have never been reported. I also suggest the presence of Dtx-dependent excitation energy quenching in the PSI-LHC supercomplex. I believe that these biochemical breakthroughs will contribute to further researches on both *Symbiodinium* photosynthesis and coral-algal symbiosis.

博士論文審査結果

Name in Full
氏 名

加藤 弘樹

Title
論文題目

サンゴ共生褐虫藻における光合成及び光適応メカニズムの研究

サンゴ礁を形成する造礁サンゴは褐虫藻と呼ばれる渦鞭毛藻を共生させ、その光合成産物を摂取することで生長する。褐虫藻はサンゴが繁栄する熱帯海洋生態系の主要な一次生産者であり、その光合成生理の理解は特に熱帯海洋生態系理解に不可欠である。サンゴが海面付近から水深 100m 以上まで広く分布できるのも褐虫藻がその幅広い光環境に適応できるためであるが、その光合成器官や光環境適応機構についてはこれまでほとんどわかっていなかった。

本博士論文では、まず自然界におけるサンゴ-褐虫藻間の光環境適応を明らかにすることを目的に、フィールドにおいて異なる深度からサンゴ片を採集し、そこに共生する褐虫藻の光合成機能解析を行った。その結果、深場と比較して浅場のサンゴの光化学系 II (PSII) 集光アンテナが小さいこと、NPQ 能力が高いこと等を明らかにし、浅場と深場でサンゴに共生する褐虫藻の光合成特性が異なること、浅場サンゴのそれは強光適応型になっていることを示した。次に、浅場より採集され、すでにゲノム構造が解明されている褐虫藻クレード b (Mf1.5b) 株の光合成装置について詳しい解析を行った。解析に先立ち大量培養系を確立し、ショ糖密度勾配超遠心法およびフェレドキシンカラムクロマトグラフィー法により PSI-LHC 超複合体を精製した。得られた PSI-LHC 超複合体の活性が文献値の中でも最高値を示していたことから、高品質標品の精製に成功したものと判断できる。この標品を用い、他生物種と比較して突出して PsaF および PsaL サブユニットが大きいこと、強光適応に用いられる可能性のあるキサントフィルサイクル色素ジアジノザンチンを多数結合していることなどを明らかにするとともに、アンテナサブユニット LHC が反応中心あたり 18 個結合する巨大超分子複合体構造を負染色電子顕微鏡単粒子解析により決定した。また、強光条件から調製した同複合体ではジアトザンチン含量の増加が見られ、光化学反応が抑制されていたことから、光化学系が光保護状態にあることが確認された。最終章では PSII 超複合体の精製を行った。今日では多くの植物や藻類から糖型界面活性剤にて PSII 超複合体を得る手法が確立されているが、この手法では褐虫藻の PSII は変性する。そこで多数の界面活性剤のスクリーニングを行った結果、一部の表在性サブユニットは欠落されるものの PSII 粒子が得られることを明らかにした。さらに界面活性剤置換効果により LHC の結合を安定化させることで PSII-LHC 超複合体が得られることも確認した。

以上を総合し、申請者は褐虫藻における PSII と PSI およびその集光装置について初めてとなる精製を行い、その詳細な解析から褐虫藻光化学系とその生理生態との関連を特徴づけた。本論文は、光合成分子生理研究において重要な貢献であり、学位授与にふさわしいものであると審査委員全員が一致して結論した。