

【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】

総合研究大学院大学

生命科学研究科 基礎生物学専攻

加藤 弘樹

## 内容

略語表 .....	3
共通序論 .....	4
第一章 異なる深度に生息するサンゴの光環境適応.....	6
序論.....	6
実験材料および生育条件.....	8
結果.....	10
考察.....	12
第二章 褐虫藻光化学系 I の機能構造解析 .....	15
序論.....	15
材料及び方法.....	19
結果.....	25
考察.....	30
第三章 褐虫藻光化学系 II の単離精製 .....	35
序論.....	35
材料及び方法.....	37
結果.....	39
考察.....	42
共通考察 .....	46
参考文献 .....	48
謝辞.....	54
図・表 .....	55

## 略語表

PSI	: photosystem I
PSII	: photosystem II
LHC	: light-harvesting complex
PCP	peridinin-chlorophyll <i>a</i> -protein
acpPC	chlorophyll <i>a</i> -chlorophyll <i>c</i> <sub>2</sub> -peridinin-protein
NPQ	: non-photochemical quenching
Chl	: chlorophyll
GL	: growth light
HL	: high light
Ddx	: diadinoxanthin
Dtx	: diatoxanthin
Per	: peridinin
$\alpha$ -DDM	: <i>n</i> -dodecyl- $\alpha$ -D-maltoside
$\beta$ -DDM	: <i>n</i> -dodecyl- $\beta$ -D-maltoside
DMNG	: Decyl maltose neopentyl glycol
SM	: sucrose monolaurate
SDG	: sucrose density gradient

## 共通序論

### 褐虫藻における光適応の重要性

サンゴ礁が占める面積は海洋面積の 1%にも満たないが、海洋における全生物種のうち 4 分の 1 もの種が生息していると言われており、生物多様性において重要な役割を担っている (Spalding et al. 2002)。サンゴ礁を形成する造礁サンゴは、細胞内に褐虫藻とよばれる渦鞭毛藻を共生させることで、生育に必要なエネルギーのうちの大部分を光合成産物から得て生長する。サンゴはサンゴ礁における主要な生産者であることから、共生褐虫藻による光合成産物はサンゴ礁に生息する生物全体にとって重要なエネルギー源となる。共生藻を持つサンゴは海面付近から水深 150 m 付近まで幅広く分布しているため、その光環境は大きく異なる (Lesser et al., 2010)。したがって、サンゴ及び共生する褐虫藻は幅広い光環境に適応することが求められる。

### 光合成生物の強光防御

光合成反応は、チラコイド膜上に存在する反応中心である光化学系 II 及び光化学系 I における光吸収により駆動する。光合成生物にとって光は必須であるが、過剰な光照射は光阻害とよばれる光化学系の損傷、失活を招く。PSII は光照射により、酸素発生系及び反応中心サブユニットである D1 タンパク質の失活が起こる。通常光照射下では、失活した酸素発生系及び D1 タンパク質は速やかに修復される。強光下では、D1 タンパク質の修復が抑制される (Takahashi and Murata, 2008)。反応中心サブユニットである D1 タンパク質の失活—修復バランスの崩壊により、結果として PSII の光阻害が生じる。一方で PSI の光阻害は、低温下のような限られた状況下で見られることが知られている (Sonoike 2013)。強光による光化学系の損傷を防ぐため、光合成生物は non-photochemical quenching (NPQ) とよばれる強光防御システムを有している (Müller et al., 2001)。

### 褐虫藻の光合成

褐虫藻は紅藻由来の葉緑体を所持する、渦鞭毛藻類に分類される二次共生藻である。

集光アンテナとして PCP (peridinin-chlorophyll *a*-protein) と acpPC (chlorophyll *a*-chlorophyll *c*<sub>2</sub>-peridinin-protein) と呼ばれる 2 種類の集光アンテナタンパク質を持つことが知られている。PCP は紅藻系統の葉緑体を持つ渦鞭毛藻に特有である水溶性の集光アンテナタンパク質であり、PSII のルーメン側に結合して機能するとされている (Schulte et al. 2010)。強光下において、PCP が PSII から解離することで集光能力を下げるという強光防御モデルが報告されているが (Reynolds et al. 2008)、その一方で強光下では PCP の解離は起こらないという主張もある (Kanazawa et al., 2014)。PCP にはモノマー型 (15 kDa) とダイマー型 (30–35 kDa) の 2 種が存在することが知られており、褐虫藻種の中でもどちらか片方、もしくは両方の型を所持する褐虫藻の存在が報告されている (Govind et al., 1990)。これらの PCP の生理学的な違いは明らかとなっていないが、両タイプの PCP を所持する *Symbiodinium microadriaticum* では、弱光下でモノマー型 PCP が増加することが報告されており、2 種の PCP が褐虫藻の光適応に寄与すると考えられている (Iglesias-Prieto and Trench, 1997)。

acpPC は多くの真核光合成生物の LHC と同様に膜内在性の集光アンテナであり、褐虫藻が持つ色素の主要な結合部位 (タンパク質) として考えられている (Hiller et al., 1993)。acpPC (以下 LHC) は緑藻や陸上植物の主要な LHCII と同様に、トライマー構造を形成することが報告されている (Jiang et al., 2014)。

## 第一章 異なる深度に生息するサンゴの光環境適応

### 序論

#### 褐虫藻で知られている光適応

浅場に生息するサンゴは、慢性的な光阻害が生じるほどの強光に晒されている (Winters et al., 2003)。水深 60 m 付近までのサンゴは褐虫藻の提供する光合成産物への強く依存しているが、光強度の極端に低い深場では、光合成産物だけでは生育に必要なエネルギーを賄うことができない為、捕食に頼る割合が高くなっていく (Mass et al., 2007)。褐虫藻が共生するサンゴは様々な深度に生息するため、それぞれの光環境下で効率的な光合成を維持する必要がある。褐虫藻の強光防御としては先に述べたとおり、NPQ やスピルオーバー、メーラー反応、PCP のサイズ比率の変化が報告されている。一方で、弱光適応としては、不足する光エネルギーを補うため、光化学系の数を増やすことや (Iglesias-prieto and Trench, 1994)、光化学系—集光アンテナ複合体のサイズを大きくすることが報告されている (Dustan, 1982)。

#### 野生のサンゴに共生する褐虫藻種

近年まで褐虫藻は rDNA の ITS-2 領域をもとに 9 つのクレード (A-I) に分類され、さらに複数のサブクレードに分類されていた (Pochon et al., 2006; Pochon and Gates, 2010)。近年、褐虫藻の分類が大きく見直され、これまでの *Symbiodinium* 属が *Symbiodiniaceae* 科として、またこれまでのクレードが属として再分類された (LaJeunesse et al. 2018)。再分類されたそれぞれの属の中に、幾つかの種 (タイプ) が存在する。これらの属間、もしくは同じ属内の種間において、光感受性、高温耐性、細胞サイズ等の生理学的な特性に違いがあることが知られている (Takahashi et al. 2009; Karim et al. 2015; LaJeunesse et al. 2018)。自然界のサンゴには、単一の褐虫藻種のみを共生させているコロニー (サンゴ群体) と、複数の褐虫藻種を共生させているコロニーが見つまっている (Rowan & Knowlton 1995; Ulstrup & Van Oppen 2003)。また、サンゴを異なる環境に移動させると、共生する褐虫藻種が変化することが知られている (Baker 2001)。

本研究では、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とした。異なる深度からサンゴ片を採集し、共生する褐虫藻のクロロフィル蛍光、集光アンテナサイズの測定及び褐虫藻タイプの同定を行うことで、サンゴの光適応戦略の実態に迫った。

## 実験材料および生育条件

### 使用したサンゴ

瀬底島周辺海域の水深 2 m 及び 20 m からコユビミドリイシ、1—2 m 及び 43—45 m から複数種のサンゴからサンゴ片を、シュノーケリング及び SCUBA (self-contained underwater breathing apparatus) により採集した (図 1 及び表 1)。採集したサンゴ片は屋外水槽で 1 晩飼育した後、測定を行った。

### クロロフィル測定

クロロフィル蛍光には monitoring PAM (Waltz, Germany) を用いた。サンゴ片を暗条件に 10 分間適応させた後、褐虫藻密度が高い部位に検出器を設置した。青色照射光強度を段階的に上昇させながら、それぞれの光照射下における測定を行った。光強度は (0, 60, 100, 150, 210, 300, 440, 650, 950, 1400, 2000, 2600, 3800  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) の 13 ステップで、それぞれのステップで 2 分間照射した。測定はそれぞれのサンゴ片の異なる部位を用いて 3 回測定し、その平均値を結果に示した。光防御の指標である NPQ は、 $\text{NPQ} = F_m/F_m' - 1$  の式を用いて算出した。

### PSII の実効集光アンテナサイズ測定

サンゴ片にジェット水流を当てることで、サンゴの共肉組織を剥離させた。剥離した組織から 40  $\mu\text{m}$  セルストレーナー (BD Falcon, Japan) を使用し、褐虫藻を単離した。褐虫藻密度を  $1.0 \times 10^5 \text{ cells/mL}$  に調整し、Fluorescence Induction and Relaxation (FiRe) system (satlantic, Canada) を用いて青色光 (435 nm) 照射条件における実効集光アンテナサイズ ( $\sigma_{\text{PSII}}$ ) を測定した。測定結果は Fireworx を用いて解析した。

### 褐虫藻タイプの同定

サンゴ片の一部を 95 %エタノールで固定、保存した。サンゴ片を乾燥させた後、(Sinniger et al., 2009) に従って DNA を抽出した。ITS2 領域を ITSint-for2/ITS2CLAMP プライマーを用いて増幅し、(Sinniger et al., 2017) に従って DGG 法及びシーケンスから



褐虫藻タイプを同定した。

#### 異なる光条件下における褐虫藻培養

褐虫藻株 Mfl.05b (クレード B1) 、CCMP2458 (A1) 、CCMP2459 (B2) 、CCMP2462 (B3) 、CCMP2465、CCMP2466 (C1) 、CCMP2467 (A1) 、CCMP2476 を、ダイゴ IMK 培地を含む人工海水培地で静置培養した。それぞれの褐虫藻株を  $2.0 \times 10^5$  cells/mL に調整し、角形プラスチックフラスコに 30 mL ずつ分注した。25 °C、白色蛍光灯下 (20, 100, 400  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期： L/D : 12 h/ 12 h) に静置し、毎日 1 回ずつ攪拌を行いながら 16 日間培養した。

## 結果

### 浅場 (2 m) と深場 (43—45 m) に生息する不特定多数のサンゴの比較

瀬底島周辺海域の浅場と深場から不特定多種のサンゴ片を採集し、PAM を用いたクロロフィル蛍光測定を行った。段階的に上昇させた光強度下における PSII の量子収率 Y(II) を比較したところ、弱光下では深場のサンゴの方が高い値を示し、強光下では浅場のサンゴの方が高い値を示していた (図 2A~C)。NPQ を比較した結果、特に浅場のサンゴでは個体差が大きかったが、深場サンゴの方が弱光下における NPQ が高く、弱い光強度で定常状態に達し最大値が小さかった。一方で強光下における NPQ の最大値は浅場サンゴの方が大きかった (図 2D~F)。共生する褐虫藻の持つ PSII の集光アンテナサイズを比較したところ、個体差は見られたが、浅場サンゴの方が有意に小さかった (t 検定、 $p < 0.05$ ) (図 3C)。共生していた褐虫藻タイプは、両深度に共通して見られた褐虫藻タイプ (C1, C3, C15) と、それぞれの深度特異的に見られた褐虫藻タイプ (1—2 m : C21, D1, 43—45 m : C27/C30, C59) が存在していた (図 4)。C27 と C30 は常に同時に検出された。

### 浅場 (2 m) とやや深場 (20 m) に生息する *Polites cylindrica* の比較

同一サンゴ種における光環境の違いを調べるため、浅場 (2 m) およびやや深場 (20 m) から採集したユビエダハマサンゴ (*Polites cylindrica*) を用いて測定を行った。PAM を用いた測定では、Y(II)、NPQ のいずれのパラメーターも深度による明確な違いは見られなかった (図 5A, B)。PSII の集光アンテナサイズからは、両深度間における有意差は見られなかった (図 5C)。共生していた褐虫藻種は浅場の 1 個体を除き C15 タイプであった (図 5D)。

### 培養褐虫藻における光適応

異なる光照射下で 1 週間培養した後のアンテナサイズを比較した (図 6A)。CCMP2459 株はいずれの光強度においても一貫してアンテナサイズが大きく、Mf 1.05b

及び CCMP2476 株は小さいアンテナを所持していた。CCMP2458 及び 2462 株は光強度に応じてアンテナサイズを大きく変化させていた。CCMP2465、CCMP2466、CCMP2467 株は、中程度のアンテナサイズの調節能力を保持していた。光合成活性および光阻害の指標となる  $F_v/F_m$  を比較すると、どの褐虫藻株においても強光下で  $F_v/F_m$  の減少が見られたが、その減少量は褐虫藻株ごとに異なっていた、

## 考察

### サンゴの強光適応

浅場から採集したサンゴは深場のサンゴと比較し、共生褐虫藻の PSII 集光アンテナが小さく、強光下で顕著に高い NPQ を示した。NPQ に関与するアンテナタンパク質として、陸上植物の PsbS、緑藻の LHCSR、珪藻における LHCX が知られている。褐虫藻ではこれらに相同な LHC は見つかっていない (Niyogi & Truong 2013)。しかし、顕著な NPQ が測定されることから、何らかの因子が同様の働きを示すものと考えられる。浅場のサンゴは強光下で生育することにより強光防御に関わるタンパク質の発現が誘導されているため、NPQ の最大値が高くなったと考えられる。それ故に浅場のサンゴは強光下でも高い Y (II) を維持しており、日中の強光照射に適応しているものと推測される。

また、浅場のサンゴでは同一深度から採集したにもかかわらず、アンテナサイズや NPQ に大きな個体差が見られた (図 3A)。サンゴの細胞内に共生する褐虫藻へ照射される実質的な光強度は、サンゴ種や共生部位、形状の違いにより大きく異なることが推測される。また、特に浅場の海では、天候や時間、海水の状態等によって、光環境は大きく変化する。そのため、同じ浅場で生育しているサンゴであっても、単に強光下の光合成に特化した褐虫藻株だけでなく、それぞれ適した褐虫藻株を共生させることで効率的な光合成を行っていると考えられる。

### サンゴの弱光適応

一方で弱光下では、生育に必要な光エネルギー量の確保が必要となるため、効率良く集光することが求められる。実際に、深場のサンゴは一様に PSII の集光アンテナサイズが大きい褐虫藻を所持していた (図 3B, C)。本研究の測定からはこのアンテナサイズの違いが PCP と LHC のどちらに由来するのかを区別することはできないが、深場のサンゴは比較的高い集光能力を持つといえる。実際に PAM による測定結果において、弱光照射下における Y (II) は浅場のサンゴと比較し深場のサンゴの方が高い値を示し

た (図 2C) 。これは集光能力の高さゆえに弱光下における集光効率が高いことを示す。深場のサンゴの NPQ は弱光下で誘導されたものの、強光下における最大値が低かった (図 2F) 。浅場のサンゴと比較し、より弱光下で NPQ に必要なプロトン濃度勾配が形成され、NPQ が誘導されたためであると考えられる。また、深場のサンゴは生育環境では強光に晒されることが無いため、NPQ 関連タンパク質が発現していない、もしくは NPQ の能力が低い株が共生していることにより、強光下でも NPQ の最大値が低いものだと考えられる。浅場のサンゴと異なり集光アンテナサイズや蛍光における個体差が少なかったのは、弱光下であることによりサンゴ種や形状の違いに伴う共生褐虫藻に照射される光強度に個体差が少なかったためであると考えられる。

#### 同一サンゴ種の比較

*P. cylindrica* は浅場とやや深場では共生する褐虫藻タイプは概ね同一の C15 であり、各測定結果も両深度間で違いは見られなかった (図 5) 。C15 は不特定多種のサンゴにおいて、浅場と深場の両深度に共通してみられた褐虫藻タイプであり (図 4) 、比較的広い光環境に適応できると考えられる。同一のサンゴ種における比較を行うために 2 m と 20 m の比較となったが、この深度間は共生褐虫藻にとって、大きな変化を伴わずに順化可能な光強度幅であったと推測される。

#### 褐虫藻種のバリエーション

褐虫藻は株ごとに所持する集光アンテナサイズ及びその調節能力に差があり、光強度に関わらず一貫してアンテナサイズが大きい株、小さい株、また光強度に応じてアンテナサイズを大きく変化させる株が見られた (図 6) 。したがって、褐虫藻自身が順化可能な光環境の範囲も種によって大きく異なると推測される。実際に、異なる深度から採集したサンゴに共生している褐虫藻タイプを調べたところ、両深度に共通して共生している褐虫藻タイプと、それぞれの深度に特異的に共生している褐虫藻タイプがあった (図 4) 。Y (II) 及び NPQ の結果から、サンゴに共生する褐虫藻は、それぞれのサンゴが

生育している光環境へ明らかに適応していることが示された。両深度に共通して見られた褐虫藻種は光環境適応幅が広い褐虫藻株であると考えられ、アンテナサイズや NPQ の調節能力が高い株であることが示唆された。

また、同一の深度内でも共生する褐虫藻タイプには大きく違いが見られた。サンゴ—褐虫藻の共生には種間の特異性があり、それは褐虫藻のセルサイズに依存することが報告されている (Biquand et al. 2017) 。したがって、光適応能力だけでなく、褐虫藻のセルサイズによる褐虫藻—サンゴ間の特異性が褐虫藻タイプの分布に関与していると考えられる。さらに、共生可能な褐虫藻の光適応範囲が、サンゴ種の深度分布を決定づけている可能性も否定できない。

本研究により、サンゴに共生する褐虫藻はその光環境に適応していること、また、光環境に応じた集光アンテナサイズを所持していることが示された。また、集光アンテナサイズおよび調節能力には褐虫藻株ごとに明確な違いがあり、共生する褐虫藻タイプにも深度依存的な傾向が見られた。以上の結果から、サンゴが広い光環境に適応する上で、光環境に適した共生褐虫藻株の変化と、共生褐虫藻自身の光環境適応が共に関与していることが示唆された。

## 第二章 褐虫藻光化学系 I の機能構造解析

### 序論

第一章で示した通り、採取したサンゴおよび単離培養した褐虫藻を用いた分光学的解析により、サンゴ-褐虫藻の共生関係における光環境適応戦略が示唆された。浅場のサンゴに共生する褐虫藻は高い NPQ を示し、褐虫藻種間における集光アンテナサイズの違いや、その調節能力の違いがサンゴの生息する幅広い光環境に適応する上で貢献していることが示された。そこで、集光アンテナが関与する光適応の分子メカニズムを明らかにするために、私は光合成の反応中心である光化学系に着目し、その機能・構造解析を試みた。本章では光合成における 2 つの光化学系のうち、光化学系 I (PSI) に関する研究について記述する。

### 褐虫藻の LHC

褐虫藻において、LHC の詳細に関する研究は長い間進められてこなかった。しかし、ゲノム解読された褐虫藻株 *Breviolum minutum* (*Symbiodinium minutum*) において、LHC は 145 個の遺伝子によってコードされることが明らかとなった (Shoguchi et al. 2013)。また、これらの LHC 遺伝子群は系統学的に 10 のグループに分類できると報告された (Maruyama et al. 2015)。このうち 5 グループは、紅藻起源の色素体を有する二次共生藻においてのみ保存されている LHCF 型であり、珪藻では FCP として広く知られる LHC に相同である。残りの 5 グループは、紅藻の色素体および紅藻由来の色素体を持つ二次共生藻の PSI に結合すると考えられている LHCR 型に分類される (Maruyama et al. 2015)。

以上のように、*B. minutum* は他の光合成生物と比較して多くの LHC をコードする遺伝子を持つが、どの LHC が褐虫藻における集光にどのように寄与しているかについては全く明らかにされていない。さらに、緑藻における LHCSR や珪藻における LHCX、陸上植物における PsbS といった、光防御に寄与するとされている LHC 様タンパク質に相同なものは見つかっていない (Niyogi and Truong, 2013)。しかしながら、多くの褐虫

藻は高い NPQ を示すことから (第一章) 、145 の LHC の内のいずれかがクエンチングに寄与している可能性は十分に考えられる。

### 光合成生物の PSI 複合体

PSI 複合体の構造は、光合成生物の種間で多様化している。光合成シアノバクテリア *Synechococcus elongates* では、結晶構造解析により 3 つの PSI コア複合体から成るトライマー構造を形成していることが示された (図 7A) (Jordan et al. 2001) 。別のシアノバクテリア *Chroococcidiopsis* sp TS-821 や灰色藻では、ネガティブ染色電子顕微鏡により PSI コア複合体のテトラマー構造が明らかにされた (図 7B) (Li et al. 2014; Watanabe et al. 2011) 。一方で、多くの真核光合成生物ではモノマーPSI コア複合体に複数の LHC を結合させた PSI-LHC 超複合体構造が報告されている。陸上植物では *Lhca1-4* 遺伝子によってコードされる 4 つの LHCI (図 7C) 、緑藻では *Lhca1-9* 遺伝子によってコードされる 8-10 の LHCI (図 7D) がモノマーPSI コア複合体に結合することが報告されている (Drop et al., 2011; Kubota-Kawai et al., 2019; Su et al., 2019; Suga et al., 2019) 。また、ヒメツリガネゴケでは、電子顕微鏡単粒子解析によりモノマーPSI コア複合体に 9 個のモノマーLHC に加えて 1 つのトライマーLHCII を結合させた巨大な PSI-LHC 超複合体構造が示された (図 7E) (Iwai et al. 2018; Pinnola et al. 2018) 。褐虫藻の葉緑体の祖先とも考えられている紅藻についてもいくつかの PSI 構造が報告されており、モデル紅藻 *Cyanidiocyzon merolae* は 3 つの *Lhcr* 遺伝子 (*Lhcr1-3*) を持っていることが知られており (Matsuzaki et al. 2004; Busch et al. 2010) 、PSI コア複合体の *PsaF* 側に 3 個、*PsaB* 側に 2 個の LHCR を結合させたクライオ電子顕微鏡構造が報告されている (図 7F) (Pi et al. 2018) 。また、興味深いことに紅藻は培養光条件に応じて 3~8 個の LHC を結合させた PSI-LHC 超複合体を形成すると報告されている (Antoshvili et al. 2018; Haniewicz et al. 2017) 。褐虫藻と同様に紅藻由来の色素体を持つ他の二次共生藻においても、いくつか PSI-LHC 複合体の構造が報告されている。*Nannochloropsis gaditana* ではネガティブ染色電子顕微鏡により、PSI コア複合体に 5~11 個の LHC を結合させた構造が観察されてお



り (図 7G) (Alboresi et al. 2016; Bina et al. 2016) 、珪藻 *Chaetoceros gracilis* では複合体の分子量及びネガティブ染色電子顕微鏡観察像をもとに、PSI コア複合体に 18 個の LHC (FCPI) が結合していると推測されている (Ikeda et al. 2013) 。以上のように、X 線結晶構造解析や電子顕微鏡観察を中心として、多くの光合成生物の PSI-LHC 超複合体の構造が明らかにされつつある。

### PSI における光防御

これまでに、光合成生物を用いた光防御の研究では、光防御反応に直接的に寄与すると考えられているキサントフィル色素の局在について議論されてきた。陸上植物を用いた研究では、キサントフィル色素 (ビオラザンチンおよびゼアザンチン) は PSII に結合する集光アンテナ (LHCII) に結合し、PSII における光防御を担っていると考えられてきた (Müller et al., 2001) 。最近になり、陸上植物、紅藻および珪藻において、ビオラザンチンが PSI-LHC 複合体に結合すると報告された (Haniewicz et al. 2017; Suga et al. 2016; Ikeda et al. 2013) 。これに関連して、陸上植物では PSI におけるゼアザンチン依存的なエネルギークエンチングの存在が報告されたが (Ballottari et al. 2014) 、その存在を否定する研究報告もあり (Tian et al. 2017) 、PSI におけるキサントフィル色素の機能についての議論は未だ結論に至っていない。

このような研究情勢の中、褐虫藻の PSI および周辺における光防御反応に着目すると、PSI から酸素分子へ電子を受け渡すメーラー反応が PSI の過剰な還元を解消することで、強光下における光防御に寄与するという報告がある (Roberty et al. 2014) 。また、褐虫藻は高温下において過剰な励起エネルギーを PSII から PSI に直接伝達するスピルオーバー反応を活性化し、最終的に PSI による直接的なエネルギークエンチングを行うと報告された (Slavov et al. 2016) 。このように、分子メカニズムの詳細は解明されていないものの、褐虫藻では PSI を利用したエネルギークエンチングが過剰光下における光防御に貢献することが示唆されている。

本研究では、褐虫藻における PSI 依存的な光防御の分子メカニズムを明らかにするため、ゲノム解読済みのモデル共生藻である *B. minutum* から PSI-LHC 超複合体の単離精製を試みた。単離生成した PSI-LHC 複合体の生化学的解析を行うことで、褐虫藻 PSI-LHC のタンパク質組成、吸収・蛍光スペクトル、超複合体構造、構成色素といった観点から、これまで未解明であった褐虫藻のもつ特殊な PSI-LHC 超複合体の実体を明らかにした。これらのデータをもとに、褐虫藻の PSI におけるエネルギークエンチングの可能性について議論する。

## 材料及び方法

### 実験材料および生育条件

本研究では、Mary Alice Coffroth 博士 (State University of New York at Buffalo) から供与して頂いた *B. minutum* Mf 1.05b 株を使用した。通常の培養にはダイゴ IMK 培地を含む人工海水培地を使用し、500 mL 三角フラスコに 200 mL ずつ分注・植菌し、白色蛍光灯下 ( $50 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ )、明暗周期 (12h light/ 12h dark)、25°C で静置培養した (Aihara et al., 2016)。大量培養系では f/2 微量金属・栄養塩を含む人工海水培地を使用した。培養には 2 gal ポリカーボネートボトル (Nalgen, NY, USA) を使用し、培養インキュベーター [BioTRON (NK system, Japan)] 内で白色蛍光灯を  $150 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、明暗周期 (12h 明期/ 12h 暗期) で照射し (GL)、円形攪拌子で攪拌しつつ、エアレーションを行いながら、25°C で培養した。*C. reinhardtii* の生育には、TAP 培地 (Gorman and Levine, 1965) を用い、弱光光 ( $10\text{--}30 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) でエアレーションを行った。

### チラコイド膜の単離

PSI の単離には、明暗周期をつけて大量培養した対数増殖期の *B. minutum* 株を明期 6 時間時に遠心回収 [R9A ローター (Hitachi Koki, Japan) を接続した Himac CR20GIII (Hitachi Koki, Japan) で (6,000 rpm、3 min)] し、HSB バッファー (0.33 M sucrose, 25 mM HEPES, 1.0 M betaine, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.5 mM NaCl, pH 7.5) に懸濁した。細胞破碎には 0.1 mm と 0.5 mm を等量混合したガラスビーズを使用し、Bead-Beater (WAKENBTECH, Japan) を用いて氷上で 10 秒間破碎、170 秒間インターバルを 1 サイクルとし、計 20 サイクル行った。破碎した細胞溶液は 1.3 M 又は 1.8 M sucrose を含む HSB バッファーを積層した SDG チューブ上に重層し、P28ST ローター (Hitachi Koki, Japan) を接続した himac CP80WX (Hitachi Koki, Japan) を用いて超遠心 (28,000 rpm, 25 min, 4°C) を行った。主にチラコイド膜が含まれる 1.3 M sucrose 画分を回収し、HB バッファー (25 mM HEPES, 1.0 M betaine, pH 7.5) に懸濁後、遠心操作 [R9A ローター (Hitachi Koki, Japan) を接続した Himac CR20GIII (Hitachi Koki, Japan) で (18,000 rpm、10 min)] により、チラ

コイド膜を沈殿化した。さらに HB バッファーを用いて 2 回の洗浄・遠心沈殿を繰り返して、最終的に得られた沈殿を精製チラコイド膜標品とした。一連の操作は低温暗室内にて行った。*C. reinhardtii* からのチラコイド膜の単離は先行研究に従って行った (Iwai et al., 2008)。

#### ショ糖密度勾配超遠心 (SDG) を用いた光合成タンパク質複合体の単離

チラコイド膜標品のクロロフィル量は先行研究に従い、Chl<sub>a</sub> と Chl<sub>c</sub><sub>2</sub> の合計値から算出した (Jeffrey and Humphrey, 1975; Takahashi et al., 2008)。チラコイド膜標品に HB バッファーを加え、0.5 mg total Chl/mL に調整し、最終濃度 1.0% となるように *n*-dodecyl- $\alpha$ -D-maltopyranoside ( $\alpha$ -DDM) を加えた後、氷上で 15 分間振とうすることでチラコイド膜を可溶化した。可溶化されていないチラコイド膜を遠心 [MX-205 (TOMY, Japan) で (15,000 rpm, 5 min)] によって取り除いた後、500  $\mu$ L (0.25 mg Chl 相当) をショ糖密度勾配チューブ (0.1/0.4/0.7/1.0/1.3 M sucrose, 25 mM HEPES, 1.0 M betaine, 0.05%  $\alpha$ -DDM, pH 7.5) に重層し、P40ST rotor (日立工機, Japan) を用いて超遠心分画 (90,000 x g, 20 h, 4°C) を行った。一連の操作は低温暗室内にて行った。

#### PSI アフィニティ精製

PSI のアフィニティ精製は先行研究の手法 (Kubota-Kawai et al., 2018) を改変して行った。SDG によって分画した PSI-LHC 画分を回収し、Amicon Ultra-4 MWCO 100 kDa (Merck Millipore, MA, USA) を用いた限外濾過により、クロマトバッファー (25 mM HEPES, 0.05%  $\alpha$ -DDM, pH 7.5) に置換した。*Chlamydomonas reinhardtii* 由来のフェレドキシン (Fd1) タンパク質を結合させた樹脂 (Sephacrose 4B (GE Healthcare, US-IL)) を 20 mL エコノパック® カラム (BIO-RAD, CA, USA) に充填し、クロマトバッファーに置換した PSI-LHC を結合させた。Fd1 樹脂に非特異的に結合したタンパク質などを除去するため、樹脂担体の 10 倍量のクロマトバッファーで洗浄し、特異的に結合した PSI 複合体の溶出には樹脂担体の 2 倍量の溶出クロマトバッファー (クロマトバッファー/500 mM NaCl) を用いた。溶出した PSI-LHC は限外濾過によりクロマトバッファ

一に置換、Amicon Ultra-4 MWCO 100 kDa (Merck Millipore, MA, USA) を用いた限外濾過により濃縮した。一連の操作は低温暗室内にて行った。

### 光合成活性の測定

アフィニティ精製した PSI-LHC の光合成活性は、先行研究の手法 (Kubota et al., 2010) を改変した酸素吸収活性により評価した。PSI-LHC 超複合体を 1.0 M sucrose, 1.0 M betaine, 1 mM diaminodurene, 1.5 mM methylviologen, 1 mM ascorbate, and 2 mM NaN<sub>3</sub> を含む 25 mM HEPES buffer に懸濁し、2.5 µg Chl/mL に調整した。酸素吸収活性は Witrox 4 oxygen meter (Loligo Systems, Tjele, Denmark) を使用し、25°C、10,000 µmol photons/m<sup>2</sup>/s の白色メタルハライドランプ (NPI, Japan) 照射下で測定した。酸素吸収活性は光照射 30 秒間の測定値の平均により算出した。

### 質量分析

精製した PSI-LHC 超複合体を 7 M 尿素を含む 16—22% ポリアクリルアミド濃度勾配ゲルを用いて SDS-PAGE を行い (Iwai et al., 2008) 、構成するタンパク質サブユニットを分離した。SDS-PAGE 後のゲルを銀染色 MS キット (Wako, Japan) で染色した後、それぞれのタンパク質バンドを切り出し、ゲル内トリプシン消化を行った (Shevchenko et al., 1996)。この作業により得られたペプチドサンプルについて、UPLC system (EASY-nLC 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を接続した Orbitrap Elite mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて質量分析を行った。質量分析により検出されたペプチド断片を解析・同定するためのタンパク質データベースは、OIST ゲノムデータベースから取得したポリペプチド配列をもとに構築した。参照データベース : *S. minutum* strain Mf1.05b.01 (Clade B1) (<http://marinegenomics.oist.jp/gallery/>) 。

### 分光学的解析

室温条件下の吸収スペクトルは V-650 (JASCO, Japan) に積分球ユニットを接続し

て測定した。吸収スペクトルは 350 nm から 800 nm の範囲で 0.5 nm ごとに測定し、得られたスペクトルは 680 nm 付近のピークで規格化した。低温 (77 K) の蛍光発光スペクトルは FluoroMax-4 spectrofluorometer (HORIBA, Japan) を用いて測定した。測定は 440 nm 及び 460 nm (スリット幅 5 nm) で励起し、650 nm から 800 nm の範囲で行い、最大ピークで規格化した。77 K 蛍光励起スペクトルは 705 nm (スリット幅:2 nm) で検出し、400 nm から 650 nm の範囲で 1 nm ごとに測定した。

P700 の酸化速度は Dual/KLAS-NIR 分光光度計 (Heinz Walz GmbH) を用いて 820 nm と 870 nm 間のパルス信号の差を測定することで解析した (Klughammer and Schreiber, 2016)。GL 及び HL 処理した *B. minutum* 株を  $1.0 \times 10^6$  cells/mL に調整し、暗所に 2 分間静置し P700 を完全に還元した。暗条件—光照射による P700 の酸化速度は  $10 \mu\text{M}$  3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) 存在下で、赤色 LED (33  $\mu\text{E}$ , 635 nm) 光照射に伴い 1 ms ごとに測定した。測定は 3 度行い、その平均値を結果として使用した。

#### 電子顕微鏡観察及び単粒子解析

精製した PSI-LHC をクロマトバッファーで 3.0  $\mu\text{g}$  total Chl/mL に希釈し、glow-discharged carbon-coated copper grids に 30 秒間吸着させた後、2%酢酸ウラニルによるネガティブ染色を 30 秒、3 回行った。電子顕微鏡観察は JEOL JEM-1010 電子顕微鏡 (日本電子, Japan) を用いて行い、オリンパス Veleta CCD camera (2k x 2k pixels) を用いてピクセルサイズ 5 Å, 80 kV, 150,000 倍の倍率で撮影した。分解能の推定には CTFFIND4 (Rohou and Grigorieff, 2015) を用いた。単粒子解析には RELION 2.1 を用いた (Kimanius et al., 2016)。ネガティブ染色されたタンパク質粒子から 19,922 個の粒子を選別し、2次元クラス分けを行った。タンパク質凝集体や不純物、小さすぎる構造体や数の少ない構造体を取り除き、結果として、4,614 の粒子が直上、斜め、横からの視点を含む”大型粒子構造”として 10 のクラスに分類され、5,507 の粒子が”小型粒子構造”として 10 のクラスに分類された。大型粒子構造のクラスをもとに、初期モデル生成を行った。初期モデルの分解能限界は、RELION 3 の初期モデルアルゴリズム (Zivanov et al., 2018) により、

25 Å と推定された。この初期モデルは、3 次元クラス分けを行う際に精度を上げるための基準として使用した。最終的に再構築した大型粒子構造には 4,036 個の粒子が含まれた。モデルのフィッティングの例は図 8,9 に示した。同様に、小型粒子構造からも初期モデルを構築し、最終的に 2,490 個の粒子が再構築モデルに使用された。得られた大型粒子構造及び小型粒子構造の再構築モデルに、*C. merolae* 由来の PSI コア及び LHCR の Cryo-EM 構造の PDB モデル構造 (Pi et al., 2018) を重ね合わせた。

### 色素分析

PSI-LHC 及びチラコイド膜に含まれる色素は 50%メタノール/50%アセトンで抽出し、遠心操作 (20,000 g, 5 min) により不純物を除去した。遠心後の上清について、先行研究 (Tokutsu and Minagawa, 2013)と同様に Waters H-class system equipped with a 2.1 mm × 150 mm ACQUITY UPLC HSS C18 column (Waters, MA, USA) をセットした UPLC を用いて液体クロマトグラフィー分析を行った。得られたクロマトグラフは Empower 3 software (Waters, MA, USA) を用いて解析を行い、各標準色素 [Chl *a*, Chl *c*<sub>2</sub>, peridinin (Per), diadinoxanthin (Ddx), diatoxanthin (Dtx)] で作成した検量線を用いて色素の定量化を行った。

### 強光処理チラコイド膜の単離

GL で大量培養した細胞 1.5 L を角形プラスチックケースに移し、白色 LED (600 μmol photons/m<sup>2</sup>/s) を 3 時間照射した (HL)。強光照射した細胞を遠心回収し、1,000 μmol photons/m<sup>2</sup>/s の白色 LED 光照射下で bead-beater による細胞破碎処理を行った。細胞破碎後のチラコイド膜精製は通常サンプルと同様に行った。

### 光合成パラメーター (Fv/Fm 及び NPQ) の測定

光合成パラメーターを算出するためにクロロフィル蛍光測定には PAM-2500 (Waltz, Germany) を用いた。各条件で培養した褐虫藻を 15 分間暗順応させた後、最大クロロ

フィル蛍光 ( $F_m$ ) および定常クロロフィル蛍光 ( $F_o$ ) を測定し、PSII 最大量子収率 ( $F_v/F_m$ ,  $F_v=F_m-F_o$ ) を算出した。その後、段階的な強度変化をつけた赤色光照射下 (0, 12, 36, 74, 111, 151, 208, 281, 373, 484, 629, および 795  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ) における最大クロロフィル蛍光 ( $F_m'$ ) を測定した。各光強度における光照射は 20 秒間行った。光防御の指標である NPQ は、 $\text{NPQ} = F_m/F_m' - 1$  の式を用いて算出した。



## 結果

### 褐虫藻の大量培養

まず初めに生化学実験に必要なとなる褐虫藻の大量培養法の検討を行った (実験材料および生育条件参照)。従来の静置培養と比較し、大量培養系では顕著に細胞増殖が速く、高密度に生育した (図 10A)。光合成活性の指標となる Fv/Fm を比較した結果、大量培養系ではサンゴに共生している褐虫藻と同程度の値を示した (図 10B)。本培養法では均一な光条件で培養された褐虫藻細胞を大量に得ることができ、また自然 (サンゴ共生) 条件に近い光合成活性を示したことから、生化学実験に必要な大量培養系が確立できたと結論した。本章の生化学実験には、本大量培養法で生育した褐虫藻 *B. minutum* を用いた。

### PSI-LHC の精製

大量培養した *B. minutum* から単離したチラコイド膜を  $\alpha$ -DDM で可溶化し、光合成タンパク質複合体のショ糖密度勾配超遠心分画 (SDG) を試みた。*B. minutum* から精製した緑色の PSI-LHC 超複合体画分は、緑藻 *C. reinhardtii* の PSI-LHCI 超複合体と比較し高いショ糖密度に位置していた (図 11A)。このことから、褐虫藻の PSI-LHC 超複合体は、緑藻 *C. reinhardtii* の PSI-LHCI 超複合体よりも分子量が大きい複合体を形成していることが示唆された。

SDG で得られた PSI-LHC 画分から検出された、PSI-LHC に由来しないタンパク質 (PSII 複合体や由来のタンパク質や光合成に関与していないタンパク質)) を取り除くため、フェレドキシン (Fd) カラムを用いたアフィニティ精製を試みた。Fd は、PSI から電子を受容する電子伝達タンパク質として機能することが知られており、PSI コアサブユニットである PsaA、PsaC 及び PsaE と相互作用する (Kubota-Kawai et al. 2018; Fischer et al. 1998)。したがって Fd アフィニティカラムを用いた精製を行うことで、PSI コア複合体および結合タンパク質の特異的な精製が期待できる。実際に、SDG 分画した PSI-LHC を Fd アフィニティカラムに吸着させたところ、十分な洗浄プロセスを経た後にも

カラムは緑色を維持しており、*C. reinhardtii* 由来の Fd 1 タンパク質が *B. minutum* の PsaA, PsaC 及び PsaE と相互作用することが強く示唆された。SDS-PAGE 分析の結果、Fd アフィニティ精製後のサンプル中には PSII および ATPase 由来のタンパク質が明らかに減少していたことから (図 11B)、PSI-LHC の精製に成功したと判断し、この精製 PSI-LHC を用いて以降の実験を行った。

アフィニティ精製した PSI-LHC の光合成活性を評価するため、酸素吸収活性を測定した。その結果、 $2,017.5 \pm 343.1 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (表 2) を示し、過去に報告されたシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 から単離されたモノマーおよびトライマー PSI (Kubota et al., 2010)、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongates* のトライマー PSI およびモデル紅藻 *C. merolae* の PSI-LHCR 超複合体の活性 (Haniewicz et al., 2017) よりも高かった。この結果は、本精製手法により高活性を維持した褐虫藻の PSI-LHC 超複合体の精製に成功したことを示すものである。

### タンパク質組成

*B. minutum* の PSI-LHC 超複合体の構成サブユニットを明らかにするために、質量分析によるタンパク質組成の同定を試みた。精製した PSI-LHC 超複合体に含まれるタンパク質ポリペプチドを SDS-PAGE で分離、銀染色し、トリプシンによるゲル内消化した後、材料及び方法に記述したように質量分析 (LC-MS/MS) を用いた分析を行った。同定された PSI サブユニットを図に示した (図 11C)。モデル緑藻 *C. reinhardtii* と比較して、*B. minutum* の PsaA、PsaB コアサブユニットの分子量は小さいことが示された。一方で、その他の PSI サブユニットは *C. reinhardtii* のサブユニットと比較して大きく、特に PsaF および PsaL の分子量は2倍程度の大きさを持つことが分かった (図 11C,12,13)。このような PSI サブユニットタンパク質の独自性および、SDG における PSI-LHC 画分の密度位置の違いを考慮すると、*B. minutum* は *C. reinhardtii* と同じ藻類と言えどもユニークな PSI 超複合体構造を保持していること予想された。

SDS-PAGE の結果から、PSI-LHC 超複合体は複数のバンドから成る多くの LHC を結

合していることが判明した。これらの LHC の種類を明らかにするため、精製した PSI-LHC 超複合体、チラコイド膜及び SDG の遊離アンテナ画分 (free LHC 画分) に含まれる LHC を LC-MS/MS を用いて検出、同定、分類した。その結果、褐虫藻で見つかっている 145 個の LHC 遺伝子のうち、79 個がチラコイド膜で検出され、25 個が PSI-LHC から検出された (表 3)。PSI-LHC から検出された LHC には LHCR グループだけでなく LHCF グループの一部も含まれていた (表 3,4)。また、遊離アンテナ画分から検出されずに PSI-LHCI から検出された LHC は、可溶化-SDG-アフィニティ精製の精製プロセスを経ても PSI に強固に結合していると考えられる。

#### 分光学的解析

PSI-LHC の吸収スペクトルを測定したところ、Chl *a* に由来する 440 nm のピーク及び、Chl *c*<sub>2</sub> 及び Per に由来する 460 nm 付近のショルダーピークを示した (図 14A) (Mantoura and Llewellyn, 1983)。チラコイド膜との差スペクトルは、PSI には結合していない多くの LHC に含まれていると考えられる Chl *c*<sub>2</sub> 及び Per に由来する 461 nm の明確なピークを示した (図 14B)。 *B. minutum* の PSI-LHC から検出された LHC が、PSI コア複合体へのエネルギー伝達を行っているのか明らかにするため、77 K 下における PSI-LHC の蛍光スペクトルの測定を行った。Chl *a* を励起する 440 nm、Chl *c*<sub>2</sub> 及び Per を励起する 460 nm で励起した際 (Reynolds et al., 2008a)、どちらの励起光においても LHC に由来する 687 nm のピーク及び、PSI PSI コア由来の蛍光である 705 nm のショルダーピークを示した (図 14C)。この結果は、Chl *a* だけでなく LHC に含まれる Chl *c*<sub>2</sub> 及び Per から PSI コアへの励起エネルギーの伝達が行われていることを示す。蛍光励起スペクトルを 705 nm で検出した結果、Chl *c*<sub>2</sub> 及び Per に由来する 464 nm, 492 nm のピークを Chl *a* に由来する 440 nm のピークと比較した場合、吸収スペクトルの結果 (図 14A) と比較して明確に大きかった (図 14D)。したがって、PSI-LHC における Chl *c*<sub>2</sub> 及び Per から PSI コアへの電子伝達は、Chl *a* と比較して効率的に行われていると言える。

## 単粒子解析

*B. minutum* が持つ PSI-LHC 超複合体の構造を明らかにするため、精製した PSI-LHC 超複合体をネガティブ染色－電子顕微鏡観察および単粒子解析を行った。得られた顕微鏡写真から PSI-LHC 粒子を選別し、得られた平均画像をもとに 3 次元構成を行ったものを 2 次元投影した結果 (図 7,8)、2 種類の超複合体構造が得られた。図 15A は PSI-LHC 画分の中で優占していた大型の構造であり、長さ約 250 Å、幅約 200 Å であった。図 15B は 2 番目に多く観察された小型の構造であり、長さ約 210 Å、幅約 160 Å であった。さらに小さな粒子も少量 (2.2%) 観察されたが (図 16)、LHC を結合していない PSI コア複合体構造に由来するものであると考えられる。超複合体に結合している LHC の数を推測するため、*C. merolae* 由来の PSI コア及び LHCR の Cryo-EM 構造の PDB モデル構造を平均粒子像上に配置した。その結果、最終的に大型超複合体構造には PSI コア複合体を取り囲むように 18 個の LHC を配置することができた (図 15C)。小型の超複合体は、大型の超複合体から PsaO 側の LHC を半円状に一層欠いた構造をしていた (図 15D)。結果として、褐虫藻 PSI-LHC は 8－18 個の LHC を結合させた、少なくとも 2 種の超複合体構造を形成していることが示唆された。

## 色素分析

液体クロマトグラフィーを用いてチラコイド及び PSI-LHC の色素組成を分析した結果、4 種の色素 (Chl *a*, Chl *c*<sub>2</sub>, Per, Ddx) が検出された。これらの色素量を Chl *a* で規格化した結果、PSI-LHC に含まれる Chl *c*<sub>2</sub> 及び Per 量は、チラコイドと比較して少なかった (図 17)。また、興味深いことに、PSI-LHC には Chl *a* に次いでキサントフィル色素である Ddx が多く含まれていることが判明した。Ddx は強光適応時に Dtx に変換されることが知られている (Brown et al., 1999)。そこで、PSI-LHC に含まれる Ddx が実際に強光適応に応じて Dtx へと変換されているのかを評価するために、強光照射によるキサントフィルサイクルの有無を調べた。まず始めに、大量培養した *B. minutum* (GL) をプラスチックコンテナに移し、3 時間の強光処理を行った (HL)。光防御活性 (NPQ) を

測定した結果、HL 処理した細胞は GL の細胞と比較して顕著に高い NPQ を示した (図 18)。さらに、色素分析を行った結果、HL 処理を施した細胞からは GL 細胞では検出されなかった Dtx の蓄積が確認された (図 19A)。この蓄積した Dtx は暗条件下で速やかに減少する (Ddx への変換される) ため (図 19B)、従来のチラコイド膜単離及び PSI-LHC 精製手法では PSI-LHC において再現良く Dtx を検出することが困難であった。このような状況を打破するため、強光照射下で細胞破碎を行うことで、Dtx 減少の抑制を試みた。その結果、Dtx の一部を保持した状態でのチラコイド膜を単離することに成功した。得られたチラコイド膜から PSI-LHC を精製したところ、高度に精製した PSI-LHC においても Dtx が検出された (図 20A)。興味深いことに、PSI-LHC に含まれる Dtx 量はチラコイドと比較し有意に多かった (図 20B)。このことから *B. minutum* ではチラコイド膜の中でも PSI-LHC 超複合体内における局所的な Ddx 脱エポキシ化が起きる可能性が示唆された。

## 考察

### 褐虫藻大量培養系

従来の褐虫藻の培養には、静置培養が行われてきた。その理由として褐虫藻培養に攪拌やエアレーションを用いた場合、細胞同士が凝集し、細胞増殖が抑制されてしまうことが挙げられる（資料未掲載）。本研究で確立した大量培養法では、大きな容量での緩やかな攪拌、最適なエアレーションを行うことで、細胞同士の凝集を緩和しつつ、それぞれの褐虫藻細胞に照射される光条件を均一化することを実現している。その結果として、高い細胞増殖速度、密度を示し、サンゴに共生している褐虫藻と遜色無い光合成活性 ( $F_v/F_m$  値) を示した。したがって、本培養法では褐虫藻本来の光合成特性を正当に評価できるとともに、光合成生化学実験を進める上で重要である“均一な光条件下で生育した多量の細胞の回収”を可能にしたと言える。

一方、本培養法はゲノム株 *B. minutum* を含めた複数の褐虫藻株の培養において高い細胞増殖効果を示したものの、一部の褐虫藻株では沈殿、凝集の問題を解決できず、均一な光条件下で生育した細胞を得ることはできなかった（培養可能株：Mf 1.05b, cs-73, CCMP2457, S38C. 培養不可株：OTCH-1）。この違いは褐虫藻株ごとの細胞サイズや遊泳能力によるものであると推測される。また、200 mL から 1.5 L スケールの培養でエアレーションやスターラーを用いた攪拌を行った場合は細胞増殖が抑制されてしまうことから、2 L 以上のスケールで培養することが求められた。小スケールでの褐虫藻培養法の確立は今後の課題である。

### PSI-LHC の精製

$\alpha$ -DDM を用いた可溶化及び SDG により、PSI-LHC 画分を得ることに成功した。 $\alpha$ -DDM を用いて可溶化した際、PSI-LHC 画分の下に新たな緑色画分 (PSI-L 画分) が形成されることがあり (図 21A)、さらに巨大な複合体の存在が期待された。PSI-L 画分は、同一の条件においても再現よく形成されるものではなかったが、破碎時のバッファーにプロテアーゼ阻害剤を加えた際に形成されることが多かった。PSI-L 画分について多角

的な検証を行ったが、単粒子解析では図 15A で示した巨大 PSI-LHC 構造を超える大きさの構造は観察されなかった。また、質量分析を行ったところ、PSI-L 画分と PSI-LHC 画分との間に LHC の組成に明確な違いは見られなかった。さらに、回収した PSI-LHC 画分を限外濾過により 25 mM HB バッファーに置換した後、再度 SDG を行ったところ、PSI-L 画分が形成された (図 21B) 。以上のことから、PSI-L 画分は、可溶化条件によって生じる PSI-LHC 超複合体の人工的な凝集体であると判断した。

精製した PSI-LHC の酸素吸収活性は  $2,017.5 \pm 343.1 \text{ } \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  であり、過去に報告された全ての光合成生物の PSI 複合体の中で最も高い値を示した。精製手法が異なるため一概に比較評価することは難しいが、褐虫藻 PSI-LHC 超複合体は高い活性安定性、もしくは元来高い活性を保持していると考えられた。この PSI-LHC の堅牢性こそが、褐虫藻の強光適応能力に寄与している可能性が考えられる。

#### 褐虫藻の持つ LHC

褐虫藻は非常に多くの LHC 遺伝子を所持している一方で、これらの LHC は、長い間 *acpPC* として一括して扱われてきた。最近になり、ゲノム情報に基づく遺伝子系統解析による LHC の分類が行われたことで、LHCF 及び LHCR として区別されるようになった (Shoguchi et al., 2013; Maruyama et al., 2015) 。このような先行研究と、本研究で確立した PSI-LHC の精製手法により、褐虫藻の持つ多くの LHC の特徴について掘り下げることが可能となった。

褐虫藻の LHCR は、祖先的な藻類として考えられている紅藻の PSI 超複合体に含まれる *Lhcr* と比較的高い類似性を持つ。そのため、褐虫藻において LHCR は主に PSI に結合し、LHCF は PSII に結合していると推測されていた (Maruyama et al., 2015) 。本研究において、褐虫藻から精製した PSI-LHC について SDS-PAGE および質量分析を行った結果、PSI は主に LHCR を結合していた。しかしながら、チラコイド膜で検出された LHCR のうち、一部は PSI-LHC からは検出されなかった。これらの LHCR は PSI に弱く結合しているために精製過程で解離したか、もしくは元々 PSI には結合していない

LHC であることが示唆された。一方で、チラコイド膜で検出された LHCF のうち大部分は SDG の遊離アンテナ画分から検出されたが、一部は PSI-LHC にも含まれていた。

PSI-LHC は Chl *a* を主要な集光色素として所持していた。紅藻の LHCR は集光アンテナ色素として主に Chl *a* を所持しており、Chl *c*<sub>2</sub> を持たない。褐虫藻の PSI-LHC を構成する主要な LHC が LHCR であったことを考えると、褐虫藻の LHCR は紅藻と同様に Chl *a* を主要な集光色素として所持しており、Chl *c*<sub>2</sub> や Per は LHCF に由来するものであると推測される。精製した PSI-LHCI において、Chl *c*<sub>2</sub>/Per から PSI コアへのエネルギー伝達を確認されたことから (図 14)、紅藻の PSI とは異なり、Chl *c*<sub>2</sub> 及び Per も集光に寄与していることが示された。この結果は、PSI における集光に LHCR だけではなく、LHCF が寄与することを強く示唆している。

Chl *a* の吸収スペクトルのピークが 440 nm 付近に現れるのに対し、Chl *c*<sub>2</sub> 及び Per のピークはより長波長側 (460 nm 付近) に現れる。PSI が LHCR (Chl *a*) のみならず LHCF (Chl *c*<sub>2</sub> 及び Per) を集光に利用することは、深度の変化に伴い光波長が限定される海洋における褐虫藻の幅広い光環境適応能力に寄与しているものと考えられる。

### 褐虫藻 PSI-LHC の構造

SDG の結果において PSI-LHC 画分が *C. reinhardtii* の PSI-LHCI 画分よりも下に位置に形成されたことから、褐虫藻 PSI 超複合体は、10 個の LHCI を結合した *C. reinhardtii* の PSI-LHCI (長さ約 200Å、幅約 170Å) と比較して大きな複合体を形成していることが推測された。実際に、ネガティブ染色—電子顕微鏡観察と単粒子解析により、褐虫藻独自の巨大な超複合体構造が明らかとなった。小型複合体に結合していた 8 個の LHC は、陸上植物で報告されているような PsaF/J 側に結合した LHCI のベルトに加え (Nelson and Junge, 2015)、近年報告されたヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens* における二量体 LHCI にみられるように、LHCI ベルトの PsaK 側の外側に部分的な 2 層目の LHC を結合していた。本研究で作成した大型超複合体のモデルでは、計 18 個の LHC を結合した構造を形成していた。この構造モデルについて、*P. patens* の PSI 超複合体構造と比較



した (図 22) (Iwai et al., 2018)。2 種の生物間の PSI-LHC 超複合体構造はよく似ており、PsaB/PsaK 側に多くの LHC を結合していることは共通しているが、*B. minutum* では PsaL から PsaA 側まで回り込むように LHC が PSI コア複合体を取り囲んでいた。この違いは、PsaH 及び PsaL に依存している可能性が考えられる。PsaH サブユニットは PSI コア複合体のトライマー化の阻害及び、LHCII の結合部位として機能すると考えられている (Zhang & Scheller 2004)。PsaH サブユニットは、ヒメツリガネゴケには保存されている一方で、褐虫藻には保存されていない。代わりに、褐虫藻の PsaL サブユニットは他の光合成生物と比較して N 末端側が明らかに大きい (図 13)。この N 末端のアミノ酸配列は他の生物のものと相同性が見られないため、その生物学的意義は明らかとなっていない。考えられる仮説として、*B. minutum* の PsaL サブユニットは緑藻や陸上植物における PsaH サブユニットと同様にコア複合体のトライマー化を阻害すること、あるいは LHC の結合部位として機能しており、褐虫藻独自の巨大複合体構造の形成に貢献している可能性が挙げられる。

また、我々は全ての LHC をモノマーとして構造モデル上に配置したが、先行研究では、褐虫藻株 CS-156 から単離された acpPC の一部がトライマーを形成していたという報告がある (Jiang et al. 2014)。この報告で扱われていた acpPC は、界面活性剤による単離が容易かつ量の多い、遊離 LHC 画分を構成する LHCF と同一のものであると推測される。質量分析の結果、*B. minutum* の PSI-LHC 複合体には LHCR だけでなく LHCF の一部が結合していることが示された。したがって、*B. minutum* では LHCF がトライマーとして PSI に結合している可能性も十分に考えられる。

#### PSI におけるエネルギークエンチング

キサントフィルサイクルは PSII における主要な光防御機構の一部である (Goss & Jakob 2010)。一方で、PSI 超複合体におけるキサントフィル色素の存在が紅藻、珪藻および陸上植物で報告されている (Haniewicz et al. 2017; Suga et al. 2016; Ikeda et al. 2013)。私は、高度に精製した褐虫藻 PSI-LHC にキサントフィル色素 Ddx が多量に含まれるこ

とを見出した。キサントフィルサイクルは PSII におけるクエンチングとして広く知られていることから、Ddx は主に PSII に結合する LHC に含まれていると考えられていた。本研究の結果において、Chl  $c_2$  や Per と比較して明らかに多量の Ddx が PSI-LHC から検出されたことから、従来の報告とは異なり、Ddx は PSI に結合する少量の LHCF だけでなく、LHCR もしくは PSI コア複合体に含まれていることが強く示唆された。

培養した褐虫藻に HL 処理を行うことで、GL 条件と比較して顕著な光防御活性 (NPQ) の増加が見られた (図 18)。この HL 処理した褐虫藻は、GL 条件では検出されなかった Dtx を多量に保持しており、この細胞から精製した PSI-LHC にも保持されていた。PSI-LHC に含まれる Dtx 量はチラコイド膜と比較しても顕著に多かったことから (図 20B)、HL 下では Ddx が PSI-LHC 局所的に Dtx に変換されていることが示唆された。つまり、褐虫藻はチラコイド膜の中でも PSI-LHC 複体内において強光依存的なキサントフィルサイクルを活性化させることで光防御を駆動している、と予想できる。

PSI-LHC に含まれる Dtx が光防御に寄与しているのか調べるため、PSII からの電子伝達阻害剤である DCMU 存在下における PSI の反応中心である P700 の酸化速度を測定した。その結果、HL 処理した褐虫藻は GL と比較し、光照射時における P700 の酸化速度が遅かった (図 23)。この結果について、以下の可能性が考えられる。①LHC におけるキサントフィルサイクル依存的なエネルギー消去が行われ、集光効率が低下した (Ballottari et al., 2014)。②PSI コアにおいて P700<sup>+</sup>依存的なエネルギー消去が行われた (Slavov et al., 2016)。③サイクリック電子伝達が活性化され、P700<sup>+</sup>の再還元が生じた (Aihara et al., 2016)。PSI-LHC に蓄積された Dtx が、これらの 3 つのメカニズムのどれに直接的、ないし間接的に寄与しているのかは、今後の研究で明らかにする必要がある。いずれにせよ、本研究では強光下における NPQ の増加と関連した PSI-LHC への明確な Dtx の蓄積が観察された。このことから、褐虫藻の PSI-LHC は海洋表層付近における強光に適応する上で必要な強光防御に関与していると考えられる。

### 第三章 褐虫藻光化学系 II の単離精製

#### 序論

第 2 章で PSI の単離精製に成功し、機能構造解析を行うことで褐虫藻のもつ強光防御メカニズムの 1 つを示すことができた。本章では、光合成の起点であり酸素発生部位を持つ、光化学系 II (PSII) に着目した。第 2 章で述べたとおり、PSI と同様の  $\alpha$ -DDM や  $\beta$ -DDM を用いたチラコイド膜の可溶化では、ショ糖密度勾配超遠心による特定の均一な画分として PSII 複合体を単離することはできなかった。PSI-LHC や他の生物における PSII 複合体と比較し、褐虫藻の PSII 複合体は生化学実験の操作で分解されやすいものであると考えられる。本章では、PSII 超複合体を単離可能な条件の探索を行った。

#### 光合成生物の PSII 複合体

一般的な光合成反応における酸素発生を担う PSII の反応中心複合体において、膜貫通タンパク質の構造はシアノバクテリアから陸上植物まで高く保存されていることが知られている (Pagliano et al. 2013)。一方で、酸素発生部位である親水性タンパク質部位は、光合成生物間で構成サブユニットが異なる。緑藻や陸上植物は PsbO, PsbP, PsbQ を持つ。シアノバクテリアは PsbP, PsbQ を持たず、PsbO に加えて PsbU, PsbV を所持しており、紅藻ではそれに加えて PsbQ' とよばれるサブユニットを所持している (Enami et al. 2008)。珪藻では紅藻と同様の PsbO, PsbU, PsbV, PsbQ' に加え、PsbQ' と相同なサブユニットである Psb31 を持つことが報告されている (Ifuku and Noguchi, 2016)。褐虫藻 *B. minutum* のゲノム情報からは、紅藻と同様に PsbO, PsbU, PsbV, PsbQ' を所持していることが明らかになっているが、PsbQ' と相同とされる Psb31 は見つかっていない (Mungpakdee et al., 2014)。

#### PSII の集光アンテナ

シアノバクテリアおよび紅藻の PSII では、膜外タンパク質であるフィコビリソームが PSII のストロマ側に結合することで集光アンテナの役割を果たしている (Pagliano et

al. 2013)。一方で、多くの光合成生物において、膜内在性の LHC を結合させた PSII 超複合体が報告されている。陸上植物では、3 対のモノマー LHC (CP24, CP26, CP29) に加え 2 対 (合計 4 個) の LHCII トライマーを結合させた  $C_2S_2M_2$  構造が広く知られている (Su et al. 2017)。緑藻クラミドモナスでは、3 対 (合計 6 個) の LHCII トライマーを結合させた  $C_2S_2M_2L_2$  構造が報告された (Tokutsu et al. 2012)。褐虫藻を含む紅藻系統の葉緑体を持つ渦鞭毛藻は、PSII のルーメン側に、水溶性のアンテナである PCP を結合させていることが知られている (Schulte et al. 2010)。加えて、先に述べた通り、褐虫藻 *B. minutum* では 145 もの LHC をコードする遺伝子が見つかった。本研究の培養条件では、そのうち 79 種類の LHC の発現がチラコイド膜において確認され、うち 25 種類が PSI に結合していることが示されが、その他の多くの LHC が機能している場所については明らかとなっていない。したがって、褐虫藻 PSII は PCP と LHC の両方からなる多くの集光アンテナを結合し、ユニークな超複合体を形成していることが期待される。

以上のように、ユニークな超複合体構造が予想される褐虫藻の PSII 複合体構造の解析を行うためには、まず PSII 複合体の精製が必要不可欠である。しかしながら、褐虫藻の PSII 複合体を生化学的解析が可能な純度で精製した報告は無い。本研究では褐虫藻 PSI-LHC 超複合体の単離精製で得られた知見をもとに、単離したチラコイド膜を様々な条件で可溶化することで、褐虫藻 PSII 複合体を単離する手法の開発を試みた。

## 材料及び方法

### チラコイド膜の精製

PSI と同様の条件で培養した *B. minutum* を遠心回収し後、MS バッファー (0.33 M sucrose, 25 mM MES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM NaCl, pH 6.5.) に懸濁した。細胞破碎は N<sub>2</sub> ガスを接続した BioNeb® (Glas-col, Terre Haut, IN) を使用し、7.5 kgf/cm<sup>2</sup> の圧力で 3 回処理した。未破碎の細胞を除くため遠心操作[R9A ローター (Hitachi Koki, Japan) を接続した Himac CR20GIII (Hitachi Koki, Japan) を用いて (1,000 x rpm, 1 min) ]を行った後、上製を 1.3 M 及び 1.8 M sucrose を含む MS バッファー (25 mM MES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM NaCl, pH 6.5.) を積層した SDG チューブ上にロードし、P28ST ローター (Hitachi Koki, Japan) を接続した himac CP80WX (Hitachi Koki, Japan) を用いて超遠心 (90,000 x g, 25 min, 4°C) を行った。チラコイド膜画分である 1.3 M sucrose 画分を回収した後、25 mM MES (pH 6.5) に懸濁し、18,000 rpm、10 min の遠心を 3 回行うことにより、得られた沈殿をチラコイド膜標品とした。一連の操作は暗室にて行った。

### ショ糖密度勾配超遠心 (SDG) を用いた光合成タンパク質複合体の単離

チラコイド膜標品に 25 mM MES (pH 6.5) を加え、0.6 mg Chl/mL に調整した。それぞれの界面活性剤を加えた後、用いて氷上で 15 分間浸透し、チラコイド膜を可溶化させた。可溶化されていないチラコイド膜を遠心 (20,000 x g , 5 min) によって取り除いた後、500 µL を各層に界面活性剤を加えたショ糖密度勾配チューブ (0.1/0.4/0.7/1.0/1.3 M sucrose, 25 mM HEPES , 1.0 M betaine, pH 7.5) 上に載せ、P40ST rotor (Hitachi-koki, Japan) を用いて超遠心 (90,000 x g, 20 h, 4°C) を行った。A<sub>8</sub>-35 を用いた精製には、ショ糖密度勾配チューブの各層に界面活性剤の代わりに 0.01% A<sub>8</sub>-35 (Anatrace, OH, USA) を加えたものを使用し、同様の超遠心 (90,000 x g, 20 h, 4°C) を行った。可溶化に用いた界面活性剤は、β-DDM (Sigma-Aldrich, MO, USA) 、 Sucrose monolaurate (Dojindo, Japan) を除き、Anatrace 社 (OH, USA) の製品を使用した。

#### 酸素発生活性測定

チラコイド及び PSII の光合成活性は  $O_2$  発生から評価した。40  $\mu\text{g Chl/ mL}$  に調整したサンプルに電子受容体として 0.4 mM 2,6-dichlorobenzoquinone (DCBQ) を加え、25°C、メタルハライドランプ (10,000  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ) 照射下における酸素濃度をクラークタイプ酸素電極 (Hansatech Ltd., UK) により測定した (Tokutsu et al. 2012)。

## 結果

### 界面活性剤のスクリーニング

光化学系 II 複合体の構造を保ったまま可溶化可能な界面活性剤及び条件の検討を行った。チラコイド膜を可溶化後、酸素発生活性の有無、可溶化状態及び SDG 画分の形成の観点から評価し、光化学系 II 複合体を単離可能な条件を検討した。

まず初めに、可溶化処理を行った後の酸素発生活性及び可溶化状態から界面活性剤を評価した。多くの界面活性剤では、可溶化可能な濃度を加えると酸素発生活性は失われてしまった。Sucrose monolaurate (SM) 及び *n*-nonyl- $\beta$ -D-maltoside (N330) は、酸素発生を維持した状態でチラコイド膜の可溶化が可能であることが判明し、有力な候補とした (表 5)。

次に、様々な界面活性剤でチラコイド膜を可溶化し、SDG を行うことで光化学系複合体の単離を試みた。試薬コスト及び実験操作の都合上、SDG チューブには他の多くの光合成生物の PSII 複合体の単離に使用されている 0.05%  $\beta$ -DDM または 0.03—0.05%  $\alpha$ -DDM を使用した。使用した界面活性剤、濃度及び可溶化後の SDG 結果を図に示した (図 24)。大半の界面活性剤による可溶化では、光化学系画分を得ることはできなかった。酸素発生活性から候補としていた N330 では、チラコイド膜を不均一に可溶化してしまうため、特定の画分を得ることはできなかった。一方で、SM を用いた場合、第二章で示した  $\alpha$ -DDM、 $\beta$ -DDM と同様に PSI-LHC 画分を得ることができた。その中で  $\alpha$ -DDM 及び SM を使用した際、PSI-LHC 画分付近に少量の PSII 由来のタンパク質が含まれることが確認されたが、少量かつ不均一であることから、単離することはできなかった。

可溶化及び SDG チューブの両方に DMNG を用いた条件下でのみ、PSI-LHC 画分 (A4)、遊離アンテナ各分 (A1) に加えて褐色画分 (A2) 及び緑色画分 (A3) を得ることができた (図 25A)。褐色画分 A2 は主に LHC 由来のタンパク質を含んでおり (図 25B)、PSI もしくは PSII から遊離した LHC のオリゴマー画分であると推測された。A3 画分は、SDS-PAGE 及びイムノブロット解析の結果、PSII に由来する画分であると同定され

た (図 25B,C)。

#### PSII のタンパク質組成

PSII 画分に含まれるタンパク質を LC-MS/MS 解析により同定した。その結果、反応中心を構成する D1, D2, CP43, CP47 に加え、PsbH 及び、酸素発生部位である PsbO サブユニットが検出された (図 25D)。酸素発生活性の測定をおこなったが、チラコイド膜サンプルでは明らかな酸素発生活性を保持していたのに対し、PSII 画分は酸素発生を示さなかった (資料未掲載)。可溶性集光アンテナタンパク質である PCP は、大部分がチラコイド膜精製の工程で失われており、残りの PCP も PSII 画分からは得られなかった。

#### CCMP2457 株を用いた光化学系の単離

Mf1.05b 株からは、LHC の解離無しに PSII を単離することはできなかった。しかしながら、褐虫藻は種ごとに集光アンテナサイズの調節能力に大きな違いが観察されたことから (図 6)、褐虫藻種によってはアンテナを結合させた PSII-LHC が単離できる可能性が考えられた。そこで、Mf 1.05b 株と同様に大量培養可能な褐虫藻株である CCMP2457 株からのチラコイド膜及び PSII 複合体の単離を試みた。その結果、PSI-LHC 画分に重なるように PSII 由来の画分が検出された [図 26A (2), B]。SDG チューブの DMNG 濃度を上げることで、褐色の PSII 由来画分は低ショ糖密度側に遷移した [図 26A (3), C]。

#### A<sub>8</sub>-35 を用いた安定化及び光化学系複合体

DMNG を用いた可溶化からの SDG を行うことで、PSII コア複合体の単離には成功したが、PSII-LHC 超複合体を単離することはできなかった。超遠心の工程で可溶化された PSII-LHC 超複合体が過剰に分解されてしまっている可能性が考えられた。そこで、当研究室で開発された手法をもとに (Watanabe et al., 2019)、アンフィポール A<sub>8</sub>-35 を用いたタンパク質の安定化を試みた。両親媒性ポリマーであるアンフィポールは、タン



パク質を界面活性剤により可溶化した後に界面活性剤と置換することで、タンパク質の疎水性部位に結合し、界面活性剤を除去した後も可溶化状態を維持する。A<sub>8</sub>-35 を加えたショ糖密度勾配チューブを用いた SDG を行うことで、超遠心中に可溶化した界面活性剤を A<sub>8</sub>-35 に置換し、PSII-LHC 超複合体の安定化を試みた。

通常の DMNG を用いた可溶化及び SDG 条件では、4 つの有色画分が得られたのに対し (図 25A)、SDG チューブに A<sub>8</sub>-35 を加えた SDG 条件では 9 つの細い有色画分が得られた (図 27B)。SDS-PAGE によりこれらの画分に含まれるタンパク質を展開したところ、B3 から B9 の領域において、PSI、PSII 由来のタンパク質及び LHC が検出された。これらのうち 3 つが緑色画分 (B4, B6, B8)、4 本が褐色の画分であった (B3, B5, B7, B9)。DMNG を加えた SDG チューブを用いた SDG で得られた PSII コア画分 (図 27A, A3) は、A<sub>8</sub>-35 を用いた SDG では形成されなかった。

同様に  $\alpha$ -DDM (図 27C) 及び SM (図 27D) で可溶化したチラコイド膜についても A<sub>8</sub>-35 を使用したチューブで SDG を行った。その結果、PSI-LHC 画分は緑褐色を示し (図 17C2, D3)、DMNG で得られた PSI-LHC 画分 (図 27A, A3) よりもわずかに下側 (高ショ糖密度側) に位置していた。また、PSI-LHC 画分の下部に新たな画分が形成されていた (図 27 C3, C4 及び D4, D5)。SM の場合は LHC 由来の褐色画分が 2 つに分離しており、D2 画分は DMNG で得られた LHC のオリゴマー画分 (A1) と同様のものであると考えられる。しかしながら、いずれの界面活性剤においても PSII 由来のタンパク質は大部分が遊離アンテナ画分から検出されており、PSII 複合体画分を得ることはできなかった (図 28)。

## 考察

### PSII コア複合体の単離

これまでに褐虫藻の光化学系複合体を、生化学実験が可能な純度で精製した報告はなかった。第二章の研究で、PSI-LHC を高い活性を保った状態で高度に精製することに成功した。この PSI-LHC 画分は、Sucrose monolaurate、Decyl-maltose-neopenthyol glycol といった、異なる界面活性剤を用いた可溶化後の SDG でも得ることができた (図 24)。したがって PSI-LHC は界面活性剤によるチラコイド膜可溶化時に解離しにくい、比較的安定した構造であると考えられる。

一方で PSII 複合体は、PSI-LHC を単離可能な条件 (第二章参照) においても得ることができなかったことから、比較的分解されやすい複合体であると考えられる。そのため、私は PSII 複合体を安定的に可溶化できる条件を見つけるため、界面活性剤及び可溶化条件のスクリーニングを行った。多くの界面活性剤では、チラコイド膜を過剰に、もしくは不均一に可溶化してしまうため、その結果として SDG における光化学系画分は得られなかった。 $\alpha$ -DDM 及び SM を用いた可溶化を行うことで、一部 PSII 由来のタンパク質が集中している画分が得られたものの、少量かつ PSI と混在していることから、均一な PSII を単離、精製することはできなかった。

DMNG を用いた可溶化を行うことで、PSI-LHC 画分と同時に PSII 由来の緑色画分を単離することに成功した (図 25A3)。得られた PSII 画分は PSII 反応中心サブユニット及び PsbO を含んでいたため (図 25D)、PSII コア複合体から酸素発生部位が乖離することなく単離できたことが期待された。しかしながら、PsbU, PsbV, PsbQ' といった褐虫藻の酸素発生部位複合体を構成する PsbO 以外のサブユニットは失われており、光照射化における酸素発生は示さなかった。得られた PSII 画分は PSI-LHC 画分よりも低ショ糖密度に位置していたことから、緑藻クラミドモナスの PSII-LHCII 超複合体と比較して分子量が小さいことは明らかである。したがって、A3 画分は LHC や周辺サブユニットが解離した、主に PSII コアサブユニット複合体に由来する画分であると考えられる。PSII 画分に隣接する褐色の画分 A2 は、主に LHC が含まれていたことから (図 25B)、

LHC オリゴマーに由来する画分であると推測される。

PSII 画分から検出された LHC は、A2 画分に含まれる LHC オリゴマーが同時に検出されたものであり、コア複合体には結合していないと考えられる。最終的に、DMNG を用いた可溶化—SDG では、濃度を変更しても LHC を結合した状態の PSII-LHC を単離することはできなかった。

#### 褐虫藻種による PSII 画分形成の違い

本研究では生化学的解析を行うため、主に全ゲノムが解読された Mf1.05b 株を使用した。本種は培養されている褐虫藻の中でも最もゲノムサイズが小さな株であり (Shoguchi et al. 2013)、また褐虫藻種ごとにゲノムサイズには大きな差があることが示されている (LaJeunesse 2005)。そのため、褐虫藻種ごとに光化学系複合体に結合する LHC の種類や数が異なる可能性が挙げられた。CCMP2467 株を用いて Mf1.05b における PSII コア複合体単離と同様の SDG を行った結果、PSI-LHC 画分に重なるように PSII 由来のタンパク質を含む褐色の画分が形成された [図 26A(2)]。本画分は LHC を多く結合した PSII-LHC 超複合体画分であると推測される。SDG チューブ内の DMNG 濃度を上昇させることで、低密度位置に PSII-LHC が遷移した [図 26A(3)]。これは高濃度の DMNG により、PSII に結合している LHC の一部が解離したためであると考えられる。以上のように、*B. minutum* では得られなかった PSII-LHC 超複合体画分が CCMP2467 株からは単離できた。このことは、褐虫藻種間で PSII-LHC における安定性や超複合体の大きさ、量などに大きな差があることを示す。PSII に結合している集光アンテナサイズ及びその調節能力には、褐虫藻株ごとに顕著な差が観察されている (図 6A)。これらの違いは、PSII-LHC 超複合体の構造や安定性に起因する可能性が示唆された。

#### **A<sub>8</sub>-35 で安定化させた光化学系複合体の単離**

*B. minutum* では DMNG を用いた可溶化—SDG により PSII コア複合体画分が得られた

が、PSII-LHC 超複合体画分は形成されなかった。DMNG を用いた可溶化後、超遠心の工程で界面活性剤を A8-35 に置換することで、9 本の有色画分を得ることに成功した (図 27B)。第二章で、PSI-LHC を構成する主要な LHC は LHCR であることが示された。また褐虫藻の LHCR は主に Chl a を所持しており、LHCF は Chl a に加え Chl c2 や Per を多く含んでいることが強く示唆された。以上のことから、LHCR を多く含む PSI-LHC 画分は緑色を示し、LHCF を多く含む画分は褐色を示すと考えられる。SDS-PAGE の結果と合わせて考えると、3 本の緑色画分 (B4, B6, B8) は PSI-LHC 由来であり、LHC 画分を除く褐色の画分 (B3, B5, B7, B9) は LHCF を多く結合した PSII 画分であると推測される。DMNG を加えた SDG チューブを用いた条件で得られた PSII コア複合体画分 (A3) は A8-35 を用いた条件では得られなかった。チラコイド膜を可溶化後に界面活性剤を A8-35 に置換することで PSII-LHC 超複体の分解が抑制され、結果として多くの LHC との結合を維持した状態で複数の PSII-LHC 超複体画分が単離されたと考えられる。LHC オリゴマー画分と推測された A2 画分は、A8-35 を用いた条件では薄くなっていた (図 27B, B2)。A8-35 による PSII-LHC 超複体の安定化により、PSII からの LHC オリゴマーの解離が抑制された結果によるものと考えられる。褐色の PSII-LHC 超複体画分は異なる密度位置に 4 本得られたこれらの画分は異なる数の LHC を結合させた PSII-LHC 超複体から形成された可能性もあるが、PSI-LHC 画分と同時に検出された PSI-L 画分と同様に (図 21)、PSII-LHC 超複体が凝集することで形成されている可能性も否定できない。これらの疑問点を明らかにするための LHC 組成や超複体構造といった、詳細な解析は今後の課題である。

PSI-LHC 画分の単離を可能にした  $\alpha$ -DDM 及び SM についても、A8-35 への置換を利用した光化学系複体の単離を試みた。PSII 由来のタンパク質は A8-35 を使用しない場合と同様に大半が解離してしまい、複合体として SDG の画分を得ることはできなかった。褐虫藻の PSII コア複合体は、これらの界面活性剤による可溶化工程で容易に解離されてしまうものと考えられる。一方で、PSI-LHC 画分は緑褐色を示し (図 27 C2, D3)、DMNG で可溶化したものと比較すると高密度側に位置していた (図 27A)。これらの画

分は Chl  $c_2$ /Per を含んでいると考えられ、したがって LHCF を多く含んでいると推測される。第 2 章で、少量の LHCF を含む 18 個の LHC を結合した PSI-LHC 超複合体構造を明らかにした。本章で A8-35 を用いることで得られた画分から、褐虫藻の PSI-LHC は 18 個を超える数の LHC を結合した超複合体構造を形成している可能性が示唆された。さらに、これらの条件では PSI 由来画分がそれぞれ 3 本ずつ得られた (図 27、C2—C4, D3—D5)。高密度側に新たに得られた画分 (C3,C4 及び D4,D5) は、第二章の PSI-L 画分と同様、PSI-LHC 画分の凝集体である可能性も挙げられるが (図 21)、より多くの LHC を結合した PSI 画分を含む、複数の超複合体構造であることも期待される。

## 共通考察

本研究の生化学実験では主にゲノム解読された褐虫藻株 **Mf 1.05b** を使用した。この褐虫藻株はフロリダの水深 20m 付近に生息するサンゴから単離したものである (Voolstra et al., 2009)。他の褐虫藻株と比較し、**Mf 1.05b** の PSII に結合している集光アンテナサイズは小さいものであり、光強度に応じたアンテナサイズの調節能力も低かった (図 6A)。強光条件下の培養後にも比較的高い活性を維持しており (図 6B)、強光条件に適応した株であると言える。PSI-LHC 超複合体の構造解析の結果、18 個もの LHC を結合した巨大な超複合体構造が明らかとなった。また、強光下ではキサントフィルサイクルが PSI-LHC において駆動し、強光防御に寄与していることを見出した。PSII 超複合体の構造は明らかとなっていないが、チラコイド膜では 79 種類の LHC の発現が確認されていることから、多様な LHC を結合させた超複合体構造を形成していることが推測される。

一方で、褐虫藻種ごとに光合成特性や生息深度が異なることが明らかとなっている (第一章)。CCMP2457 株から光化学系の単離を試みた結果、**Mf 1.05b** と同様の条件で可溶化-ショ糖密度勾配超遠心を行ったにもかかわらず、得られた画分は大きく異なっていた (図 26A)。これにより、褐虫藻種により光化学系に結合する集光アンテナの種類や数、結合強度に大きな違いがあることが示唆された。褐虫藻種ごとの光適応能力の差は、こうした光化学系超複合体の特性に起因するものである可能性が挙げられた。したがって、サンゴ-褐虫藻共生系が非常に幅広い光環境への適応を可能としている要因として、他の光合成生物には見られない巨大な光化学系複合体とその多様性の存在が考えられる。今後は、褐虫藻種間における生理的特性と、光化学系超複合体の関連について調べていく必要がある。

本研究では、サンゴを用いた分光測定及び、培養褐虫藻を用いた生化学的解析の両面から、サンゴ-褐虫藻共生系の光合成及び光適応に迫った。特に、これまで生化学的解析の報告が無かった褐虫藻の光化学系に関して、PSI 及び PSII 超複合体の精製手法を確立した。また、精製した PSI-LHC 超複合体の解析を行い、そのユニークな特性を明らか

にし、PSI-LHC におけるキサントフィル依存的な強光防御の存在を提唱した。これらの成果は、褐虫藻の光合成研究において必須とも言える生化学的技術革新を伴っており、今後のサンゴ-褐虫藻共生系の研究に貢献するものであると考える。

## 参考文献

- Aihara Y, Takahashi S, Minagawa J** (2016) Heat induction of cyclic electron flow around photosystem I in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium*. *Plant Physiol* **171**: pp.01886.2015
- Alboresi A, Le Quiniou C, Yadav SKN, Scholz M, Meneghesso A, Gerotto C, Simionato D, Hippler M, Boekema EJ, Croce R, et al** (2017) Conservation of core complex subunits shaped the structure and function of photosystem I in the secondary endosymbiont alga *Nannochloropsis gaditana*. *New Phytol* **213**: 714–726
- Antoshvili M, Caspy I, Hippler M, Nelson N** (2018) Structure and function of photosystem I in *Cyanidioschyzon merolae*. *Photosynth Res* **57**: 521–565
- Baker AC** (2001) Ecosystems: Reef corals bleach to survive change. *Nature* **411**: 765–766
- Ballottari M, Alcocer MJP, D’Andrea C, Viola D, Ahn TK, Petrozza A, Polli D, Fleming GR, Cerullo G, Bassi R** (2014) Regulation of photosystem I light harvesting by zeaxanthin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: E2431–E2438
- Bína D, Gardian Z, Herbstová M, Litvín R** (2016) Modular antenna of photosystem I in secondary plastids of red algal origin: a *Nannochloropsis oceanica* case study. *Photosynth Res* **131**: 255–266
- Brown BE, Ambarsari I, Warner ME, Fitt WK, Dunne RP, Gibb SW, Cummings DG** (1999) Diurnal changes in photochemical efficiency and xanthophyll concentrations in shallow water reef corals: Evidence for photoinhibition and photoprotection. *Coral Reefs* **18**: 99–105
- Busch A, Nield J, Hippler M** (2010) The composition and structure of photosystem I-associated antenna from *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant J* **62**: 886–897
- Drop B, Webber-Birungi M, Fusetti F, Kourřil R, Redding KE, Boekema EJ, Croce R** (2011) Photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii* contains nine light-harvesting complexes (Lhca) located on one side of the core. *J Biol Chem* **286**: 44878–44887
- Dustan P** (1982) Depth-dependent photoadaptation by zooxanthellae of the reef coral *Montastrea annularis*. *Mar Biol* **68**: 253–264
- Enami I, Okumura A, Nagao R, Suzuki T, Iwai M, Shen JR** (2008) Structures and functions of the extrinsic proteins of photosystem II from different species. *Photosynth Res* **98**: 349–363
- Fischer N, Hippler M, Sétif P, Jacquot JP, Rochaix JD** (1998) The PsaC subunit of photosystem I provides an essential lysine residue for fast electron transfer to ferredoxin. *EMBO J* **17**: 849–858
- Gorman DS, Levine RP** (1965) Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**: 1665–1669
- Goss R, Jakob T** (2010) Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. *Photosynth Res* **106**: 103–122



- Govind NS, Roman SJ, Iglesias-Prieto R, Trench RK, Triplett EL, Prezelin BB** (1990) An Analysis of the Light-Harvesting Peridinin-Chlorophyll a-Proteins from Dinoflagellates by Immunoblotting Techniques. *Proc R Soc B Biol Sci* **240**: 187–195
- Haniewicz P, Abram M, Nosek L, Kirkpatrick J, El-Mohsnawy E, Janna Olmos JD, Kouril R, Kargul JM** (2017) Molecular mechanisms of photoadaptation of photosystem I supercomplex of in an evolutionary cyanobacterial/algal intermediate. *Plant Physiol* **176**: 1433–1451
- Hiller RG, Wrench PM, Gooley AP, Shoebridge G, Breton J** (1993) The major intrinsic light-harvesting protein of *Amphidinium*: characterization and relation to other light-harvesting proteins. *Photochem Photobiol* **57**: 125–131
- Ifuku K, Noguchi T** (2016) Structural coupling of extrinsic proteins with the oxygen-evolving center in photosystem II. *Front Plant Sci* **7**: 1–11
- Iglesias-prieto R, Trench RK** (1994) Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates . I . Responses of the photosynthetic unit to changes in photon flux density Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates . I . Responses photon flux density. *Mar Ecol Prog Ser* **113**: 163–175
- Iglesias-Prieto R, Trench RK** (1997) Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. II. Response of chlorophyll-protein complexes to different photon-flux densities. *Mar Biol* **130**: 23–33
- Ikeda Y, Yamagishi A, Komura M, Suzuki T, Dohmae N, Shibata Y, Itoh S, Koike H, Satoh K** (2013) Two types of fucoxanthin-chlorophyll-binding proteins i tightly bound to the photosystem i core complex in marine centric diatoms. *Biochim Biophys Acta* **1827**: 529–539
- Iwai M, Grob P, Iavarone AT, Nogales E, Niyogi KK** (2018) A unique supramolecular organization of photosystem I in the moss *Physcomitrella patens*. *Nat Plants* **4**: 904–909
- Iwai M, Takahashi Y, Minagawa J** (2008) Molecular remodeling of photosystem II during state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **20**: 2177–2189
- Jeffrey SW, Humphrey GF** (1975) copy New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemical Physiology Pflanz* **167**: 191–194. *Biochem Physiol Pflanz* 191–194
- Jiang J, Zhang H, Orf GS, Lu Y, Xu W, Harrington LB, Liu H, Lo CS, Blankenship RE** (2014) nce of functional trimeric chlorophyll a / c 2 -peridinin proteins in the dino fl agellate Symbiodinium. *BBA - Bioenerg* **1837**: 1904–1912
- Jordan P, Fromme P, Witt HT, Klukas O, Saenger W, Krauss N** (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* **411**: 909–917
- Kanazawa A, Blanchard GJ, Szabó M, Ralph PJ, Kramer DM** (2014) The site of regulation of light capture in Symbiodinium: Does the peridinin-chlorophyll a-protein detach to regulate light capture? *Biochim Biophys Acta* **1837**: 1227–1234
- Karim W, Seidi A, Hill R, Chow WS, Minagawa J, Hidaka M, Takahashi S** (2015) Novel characteristics of photodamage to photosystem II in a high-light-sensitive Symbiodinium

- phylotype. *Plant Cell Physiol* **56**: pcv040-
- Kimanius D, Forsberg BO, Scheres SHW, Lindahl E** (2016) Accelerated cryo-EM structure determination with parallelisation using GPUs in RELION-2. *Elife* **5**: 1–21
- Klughammer C, Schreiber U** (2016) Deconvolution of ferredoxin, plastocyanin, and P700 transmittance changes in intact leaves with a new type of kinetic LED array spectrophotometer. *Photosynth Res* **128**: 195–214
- Kubota-Kawai H, Burton-Smith RN, Tokutsu R, Song C, Akimoto S, Yokono M, Ueno Y, Kim E, Watanabe A, Murata K, et al** (2019) Ten antenna proteins are associated with the core in the supramolecular organization of the photosystem I supercomplex in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **294**: 4304–4314
- Kubota-Kawai H, Mutoh R, Shinmura K, Sétif P, Nowaczyk MM, Rögner M, Ikegami T, Tanaka H, Kurisu G** (2018) X-ray structure of an asymmetrical trimeric ferredoxin-photosystem I complex. *Nat Plants* **4**: 218–224
- Kubota H, Sakurai I, Katayama K, Mizusawa N, Ohashi S, Kobayashi M, Zhang P, Aro EM, Wada H** (2010) Purification and characterization of photosystem I complex from *Synechocystis* sp. PCC 6803 by expressing histidine-tagged subunits. *Biochim Biophys Acta* **1797**: 98–105
- LaJeunesse TC** (2005) “Species” radiations of symbiotic dinoflagellates in the Atlantic and Indo-Pacific since the Miocene-Pliocene transition. *Mol Biol Evol* **22**: 570–581
- LaJeunesse TC, Parkinson JE, Gabrielson PW, Jeong HJ, Reimer JD, Voolstra CR, Santos SR** (2018) Systematic revision of Symbiodiniaceae highlights the antiquity and diversity of coral endosymbionts. *Curr Biol* **28**: 2570-2580.e6
- Lesser MP, Marc S, Michael S, Michiko O, Gates RD, Andrea G** (2010) Photoacclimatization by the coral *Montastraea cavernosa* in the mesophotic zone: Light, food, and genetics. *Ecology* **91**: 990–1003
- Li M, Semchonok DA, Boekema EJ, Bruce BD** (2014) Characterization and Evolution of Tetrameric Photosystem I from the Thermophilic Cyanobacterium *Chroococcidiopsis* sp. TS-821. *Plant Cell* **26**: 1230–1245
- Mantoura RFC, Llewellyn CA** (1983) The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse phase HPLC. *Anal Chem Acta* **151**: 297–314
- Maruyama S, Shoguchi E, Satoh N, Minagawa J** (2015) Diversification of the light-harvesting complex gene family via intra- and intergenic duplications in the coral symbiotic alga *Symbiodinium*. *PLoS One* **10**: e0119406
- Mass T, Einbinder S, Brokovich E, Shashar N, Vago R, Erez J, Dubinsky Z** (2007) Photoacclimation of *Stylophora pistillata* to light extremes: metabolism and calcification. *Mar Ecol Prog Ser* **334**: 93–102
- Matsuzaki M, Misumi O, Shin-I T, Maruyama S, Takahara M, Miyagishima SY, Mori T, Nishida K, Yagisawa F, Nishida K, et al** (2004) Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* **428**: 653–657

- Müller P, Li XP, Niyogi KK** (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* **125**: 1558–1566
- Mungpakdee S, Shinzato C, Takeuchi T, Kawashima T, Koyanagi R, Hisata K, Tanaka M, Goto H, Fujie M, Lin S, et al** (2014) Massive Gene Transfer and Extensive RNA Editing of a Symbiotic Dinoflagellate Plastid Genome. *Genome Biol Evol* **6**: 1408–1422
- Nelson N, Junge W** (2015) Structure and Energy Transfer in Photosystems of Oxygenic Photosynthesis. *Annu Rev Biochem* **84**: 659–683
- Niyogi KK, Truong TB** (2013) Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* **16**: 307–314
- Pagliano C, Saracco G, Barber J** (2013) Structural, functional and auxiliary proteins of photosystem II. *Photosynth Res* **116**: 167–188
- Pi X, Tian L, Dai H, Qin X, Cheng L, Kuang T, Sui S, Shen J-R** (2018) Unique organization of photosystem I – light-harvesting supercomplex revealed by cryo-EM from a red alga. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: 4423–4428
- Pinnola A, Alboresi A, Nosek L, Semchonok D, Rameez A, Trotta A, Barozzi F, Kouřil R, Dall'Osto L, Aro EM, et al** (2018) A LHCB9-dependent photosystem I megacomplex induced under low light in *Physcomitrella patens*. *Nat Plants* **4**: 910–919
- Pochon X, Gates RD** (2010) A new Symbiodinium clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawai'i. *Mol Phylogenet Evol* **56**: 492–497
- Pochon X, Montoya-Burgos JI, Stadelmann B, Pawlowski J** (2006) Molecular phylogeny, evolutionary rates, and divergence timing of the symbiotic dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *Mol Phylogenet Evol* **38**: 20–30
- Reynolds JM, Bruns BU, Fitt WK, Schmidt GW** (2008a) Enhanced photoprotection pathways in symbiotic dinoflagellates of shallow-water corals and other cnidarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 13674–13678
- Reynolds JM, Bruns BU, Fitt WK, Schmidt GW** (2008b) Enhanced photoprotection pathways in symbiotic dinoflagellates of shallow-water corals and other cnidarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 13674–13678
- Roberty S, Bailleul B, Berne N, Franck F, Cardol P** (2014) PSI Mehler reaction is the main alternative photosynthetic electron pathway in *Symbiodinium* sp., symbiotic dinoflagellates of cnidarians. *New Phytol* **204**: 81–91
- Rohou A, Grigorieff N** (2015) CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. *J Struct Biol* **192**: 216–221
- Rowan R, Knowlton N** (1995) Intraspecific diversity and ecological zonation in coral-algal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 2850–2853
- Schulte T, Johanning S, Hofmann E** (2010) Structure and function of native and refolded peridinin-chlorophyll-proteins from dinoflagellates. *Eur J Cell Biol* **89**: 990–997
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M** (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**: 850–858

- Shoguchi E, Shinzato C, Kawashima T, Gyoja F, Mungpakdee S, Koyanagi R, Takeuchi T, Hisata K, Tanaka M, Fujiwara M, et al** (2013) Draft assembly of the *Symbiodinium minutum* nuclear genome reveals dinoflagellate gene structure. *Curr Biol* **23**: 1399–1408
- Sinniger F, Prasertia R, Yorifuji M, Bongaerts P, Harii S** (2017) Seriatopora diversity preserved in upper mesophotic coral ecosystems in Southern Japan. *Front Mar Sci* **4**: 1–9
- Sinniger F, Reimer JD, Pawlowski J** (2009) The Parazoanthidae ( Hexacorallia : Zoantharia ) DNA taxonomy : Description of The Parazoanthidae ( Hexacorallia : Zoantharia ) DNA taxonomy : description of two new genera. doi: 10.1007/s12526-009-0034-3
- Slavov C, Schrameyer V, Reus M, Ralph PJ, Hill R, Büchel C, Larkum AWD, Holzwarth AR** (2016) “Super-quenching” state protects *Symbiodinium* from thermal stress - Implications for coral bleaching. *Biochim Biophys Acta* **1857**: 840–847
- Sonoike K** (2013) Photoinhibition of Photosystem I. *Int Rev Cell Mol Biol* **300**: 243–303
- Spalding MD, Ravilious C, Green EP** (2002) World Atlas of Coral Reefs. *Mar Pollut Bull.* doi: 10.1016/S0025-326X(01)00310-1
- Su X, Ma J, Pan X, Zhao X, Chang W, Liu Z, Zhang X, Li M** (2019) Antenna arrangement and energy transfer pathways of a green algal photosystem-I-LHCI supercomplex. *Nat Plants* **5**: 273–281
- Su X, Wei X, Zhu D, Chang W, Liu Z, Zhang X, Li M** (2017) Structure and assembly mechanism of plant C2S2M2-type PSII-LHCII supercomplex. *Science* (80- ) **820**: 815–820
- Suga M, Ozawa SI, Yoshida-Motomura K, Akita F, Miyazaki N, Takahashi Y** (2019) Structure of the green algal photosystem I supercomplex with a decameric light-harvesting complex I. *Nat Plants* **5**: 626–636
- Suga M, Qin X, Kuang T, Shen JR** (2016) Structure and energy transfer pathways of the plant photosystem I-LHCI supercomplex. *Curr Opin Struct Biol* **39**: 46–53
- Takahashi S, Murata N** (2008) How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci* **13**: 178–182
- Takahashi S, Whitney SM, Badger MR** (2009) Different thermal sensitivity of the repair of photodamaged photosynthetic machinery in cultured *Symbiodinium* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 3237–3242
- Takahashi S, Whitney SM, Itoh S, Maruyama T, Badger MR** (2008) Heat stress causes inhibition of the de novo synthesis of antenna proteins and photobleaching in cultured *Symbiodinium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 4203–4208
- Tian L, Xu P, Chukhutsina VU, Holzwarth AR, Croce R** (2017) Zeaxanthin-dependent nonphotochemical quenching does not occur in photosystem I in the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci* **114**: 4828–4832
- Tokutsu R, Kato N, Bui KH, Ishikawa T, Minagawa J** (2012) Revisiting the supramolecular organization of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **287**: 31574–31581
- Tokutsu R, Minagawa J** (2013) Energy-dissipative supercomplex of photosystem II associated

- with LHCSR3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 10016–10021
- Ulstrup KE, Van Oppen MJH** (2003) Geographic and habitat partitioning of genetically distinct zooxanthellae (*Symbiodinium*) in *Acropora* corals on the Great Barrier Reef. *Mol Ecol* **12**: 3477–3484
- Voolstra CR, Schwarz JA, Schnetzer J, Sunagawa S, Desalvo MK, Szmant AM, Coffroth MA, Medina M** (2009) The host transcriptome remains unaltered during the establishment of coral-algal symbioses: FAST TRACK. *Mol Ecol* **18**: 1823–1833
- Watanabe M, Kubota H, Wada H, Narikawa R, Ikeuchi M** (2011) Novel supercomplex organization of photosystem i in *Anabaena* and *Cyanophora paradoxa*. *Plant Cell Physiol* **52**: 162–168
- Winters G, Loya Y, Röttgers R, Beer S** (2003) Photoinhibition in shallow-water colonies of the coral *Stylophora pistillata* as measured in situ. *Limnol Oceanogr* **48**: 1388–1393
- Zhang S, Scheller HV** (2004) Light-harvesting Complex II Binds to Several Small Subunits of Photosystem I. *J Biol Chem* **279**: 3180–3187
- Zivanov J, Nakane T, Forsberg BO, Kimanius D, Hagen WJH, Lindahl E, Scheres SHW** (2018) New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. *Elife* **7**: 1–22

## 謝辞

本研究を行うにあたり、懇切丁寧なご指導を賜り、また多大な便宜を図っていただきました指導教官の皆川純教授に心より感謝を申し上げます。

高橋俊一准教授には、研究において多くのご助言と指導を賜りました。深く感謝いたします。得津隆太郎助教には、生化学実験の基礎から研究に関するあらゆることに関して、懇切丁寧な指導をいただきました。深く感謝いたします。

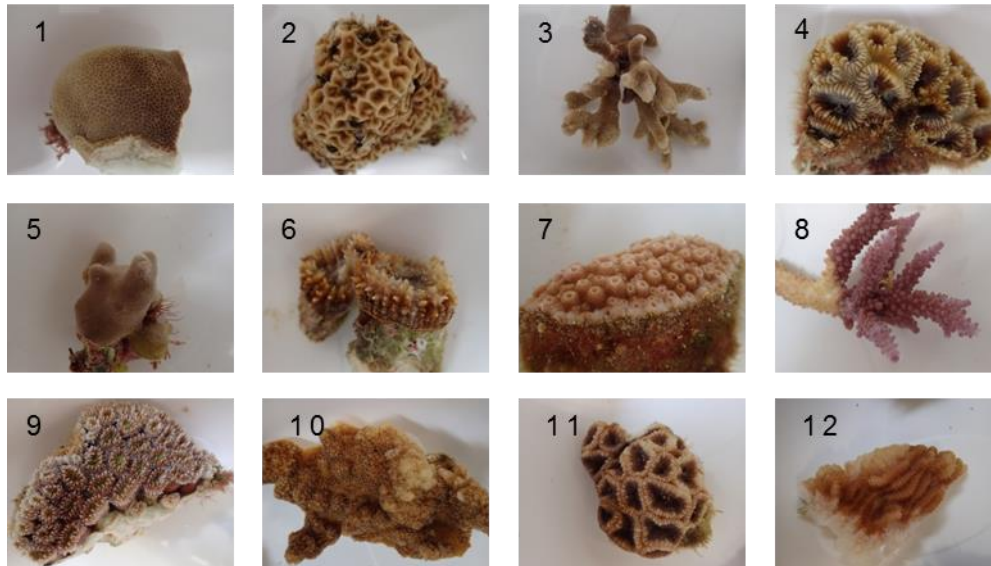
大変ご多忙の中、審査を引き受けていただき、多くの時間を割いてくださった川口正代司教授、上田貴志教授、岡山大学の高橋裕一郎教授に心より感謝申し上げます。

琉球大学熱帯生物圏研究センターの酒井一彦教授、波利井佐紀准教授、Frederic Sinniger 博士およびスタッフの皆様には、実験に使用するサンゴの採集に協力していただきました。深く感謝申し上げます。

最後に、日々私を助けてくださり、叱咤激励してくださった環境光生物学研究部門の皆様、に、厚く感謝申し上げます。

図・表

1—2 m



43—45 m

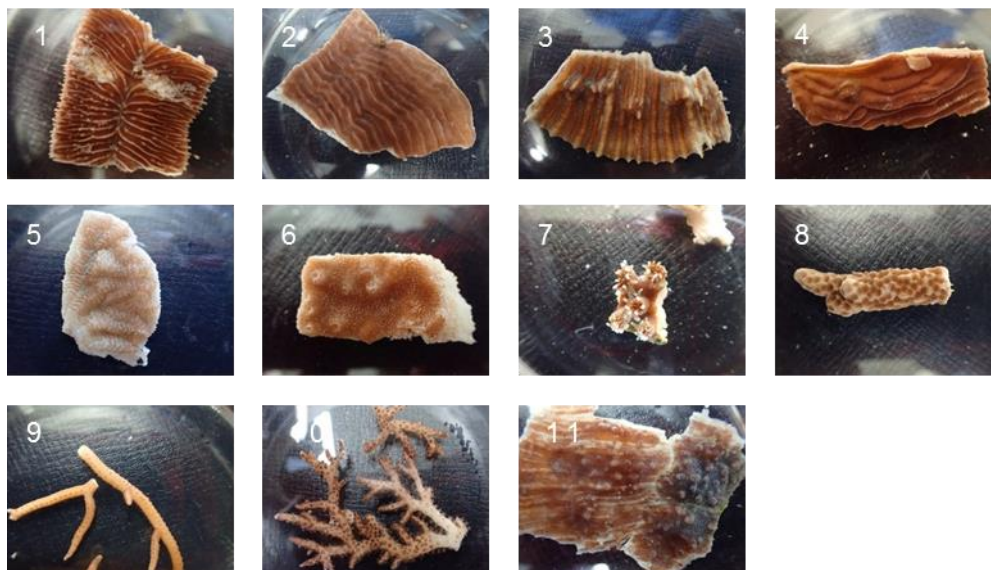


図 1 浅場及び深場から採集したサンゴ片

沖縄県瀬底島周辺海域の 1—2 m 及び 43—45 m の深度から採集したサンゴ片。サンゴ種の詳細は表 1 に示した。

	サンプル番号	サンゴ種	褐虫藻タイプ
2ー3 m	1	<i>Porites</i>	C15
	2	<i>Psammocora</i>	C15
	3	<i>Porites</i>	C15
	4	<i>Dipsastrea</i>	C3
	5	<i>Porites cylindrica</i>	C15
	6	<i>Lobophyllia</i>	C
	7	<i>Astreopora myriophthalma</i>	C15
	8	<i>Acropora</i>	C3
	9	<i>Galaxea</i>	C15
	10	<i>Montipora</i>	C21
	11	<i>Favites</i>	C21
	12	<i>Merulina</i>	C
	13	<i>Pachhryseris</i>	D1
43ー45 m	1	<i>Herpolitha</i>	C27/ C30
	2	<i>Pachryseris</i>	C27/ C30
	3	<i>Echinophyllia</i>	C27/ C30
	4	<i>Pacheyseris</i>	C27/ C30
	5	<i>Merulina</i>	C3
	6	-	C1
	7	<i>Galaxea</i>	-
	8	<i>Porites</i>	C15
	9	<i>Seriatopora hystrix</i>	C59
	10	<i>Pocillipora</i>	-
	11	<i>Echinophyllia</i>	-

表 1 実験に使用したサンゴ種及び共生していた褐虫藻タイプ

種及び褐虫藻タイプは同定できた範囲で示しており、同定できなかったものは - と示す。  
C27 及び C30 は常に同時に共生していた。



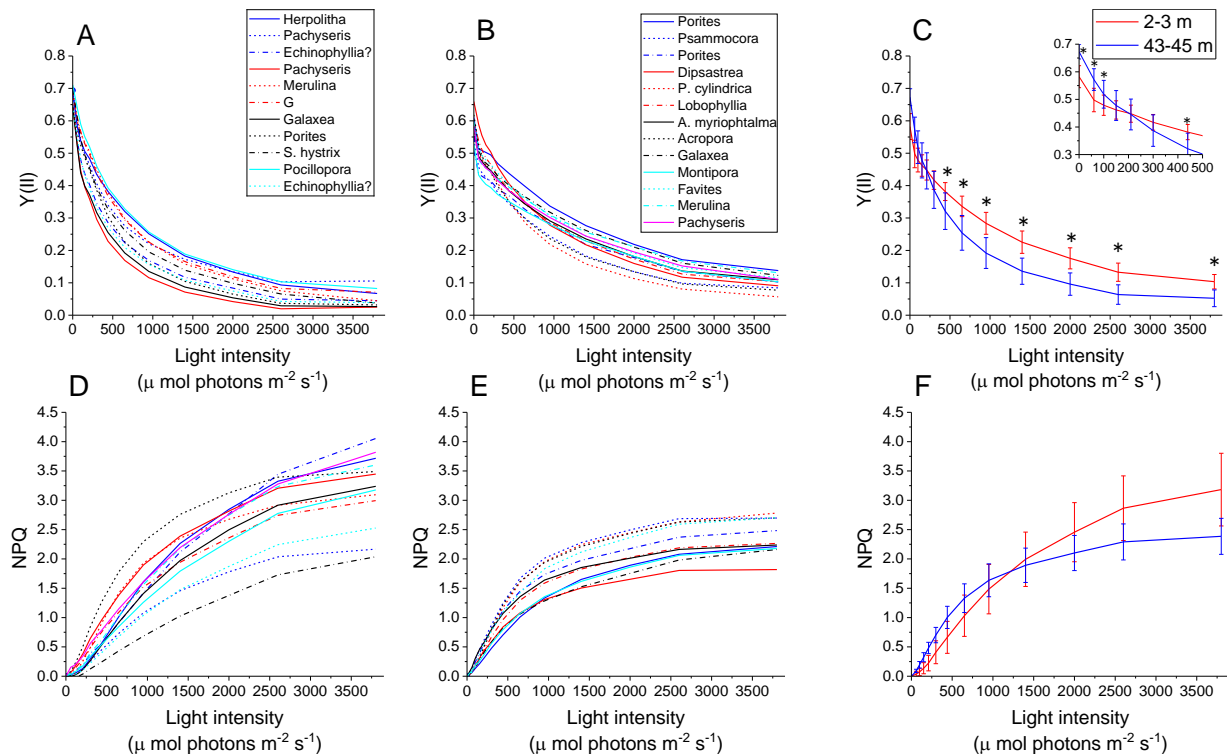


図 2 異なる深度から採集したサンゴにおける Y (II) 及び NPQ の比較

サンゴ片は沖縄県瀬底島周辺海域の浅場 (2—3 m) 及び深場 (43—45 m) から採集した。Y (II) 及び NPQ は  $3800 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  までの異なる強度の光照射下で monitoring PAM を用いて測定し、各光強度は 2 分間の光照射を行った。それぞれの結果は異なる部位における 3 回の測定の平均値を用いた。A, D は浅場、B, E は深場から採集したサンプルの測定結果、C 及び F はそれぞれ Y (II) 及び NPQ の各深度の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

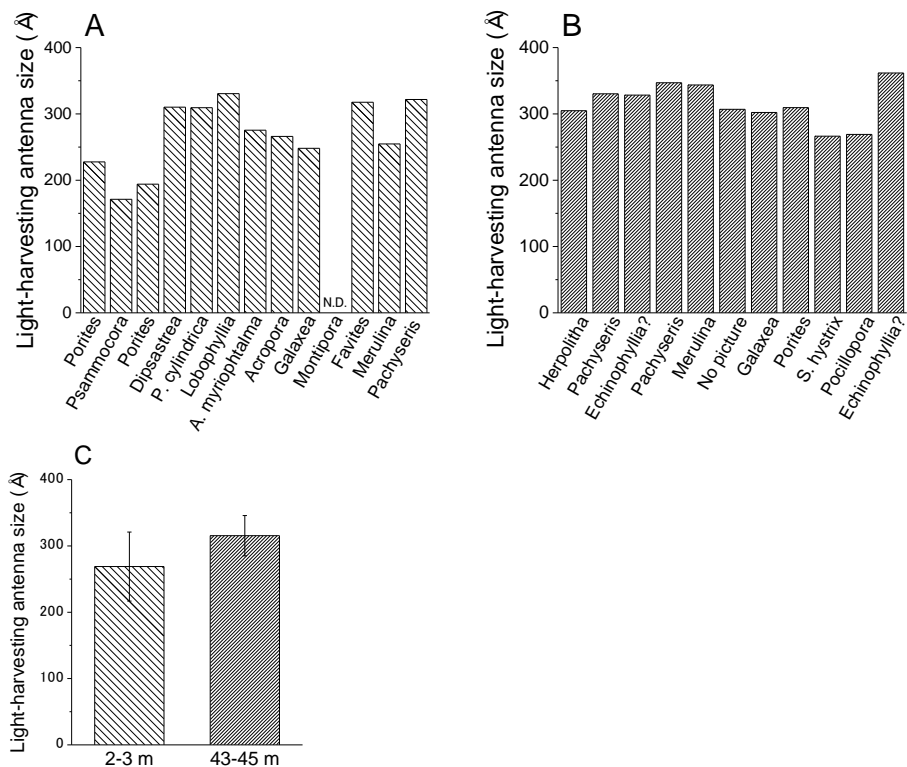


図 3 異なる深度から採集したサンゴに共生する褐虫藻の集光アンテナサイズ

A,B,浅場 (2—3 m) (A) 及び深場 (43—45 m) (B) から採集したサンゴ片から単離した褐虫藻の集光アンテナサイズを Fluorescence Induction and Relaxation (FIRE) system を用いて測定した。C, それぞれの深度の平均値。エラーバーは標準偏差を表す。

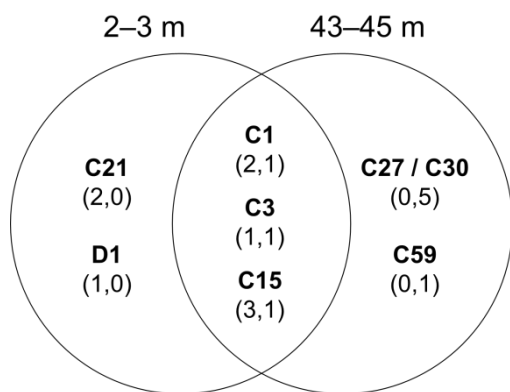


図 4 異なる深度から採集したサンゴに共生する褐虫藻タイプ

括弧内の数字はそれぞれの深度でその褐虫藻タイプを共生していたサンゴ数を表す (浅場, 深場)。C27 および C30 は常に同時に検出された。

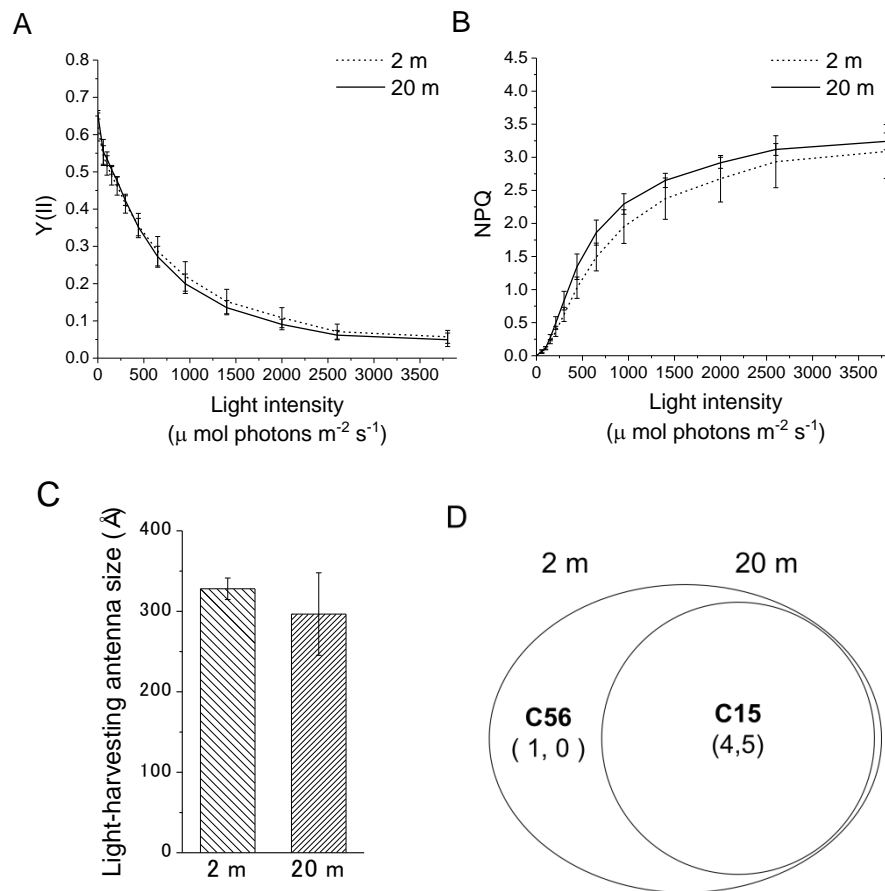


図 5 異なる深度から採集した *Porites cylindrica* の光合成特性比較

2 m 及び 20 m の深度から *Porites cylindrica* のサンゴ片を採集した。

A,B. Y (II) 及び NPQ は  $3800 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  までの異なる強度の光照射下で monitoring PAM を用いて測定し、各光強度は 2 分間の光照射を行った。C. 共生していた褐虫藻の保持する集光アンテナサイズ比較 D. 異なる深度から採集した *Porites cylindrica* に共生する褐虫藻タイプ。括弧内の数字はそれぞれの深度でその褐虫藻タイプを共生していたサンゴ数を表す (2m,20 m)。

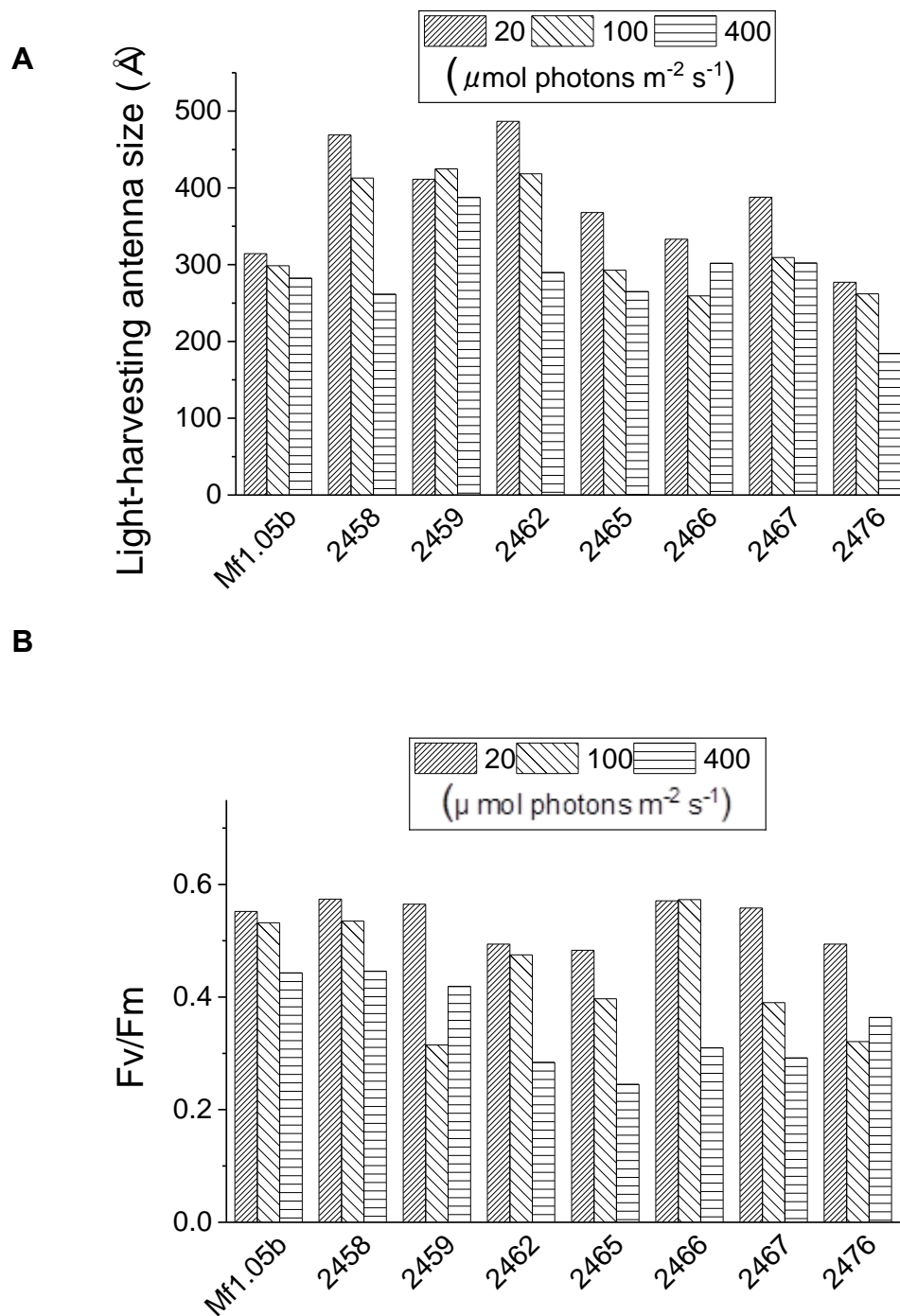


図 6

異なる光条件下で培養した 8 種の褐虫藻株の光環境適応

異なる光条件下で培養した褐虫藻株における集光アンテナサイズ (A) 及び Fv/Fm (B) の比較。それぞれの褐虫藻株を 20, 100 and 400  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期 Light/Dark : 12 h/12 h の光条件下で 16 日間静置培養した。集光アンテナサイズは FiRe system を用いて測定した。

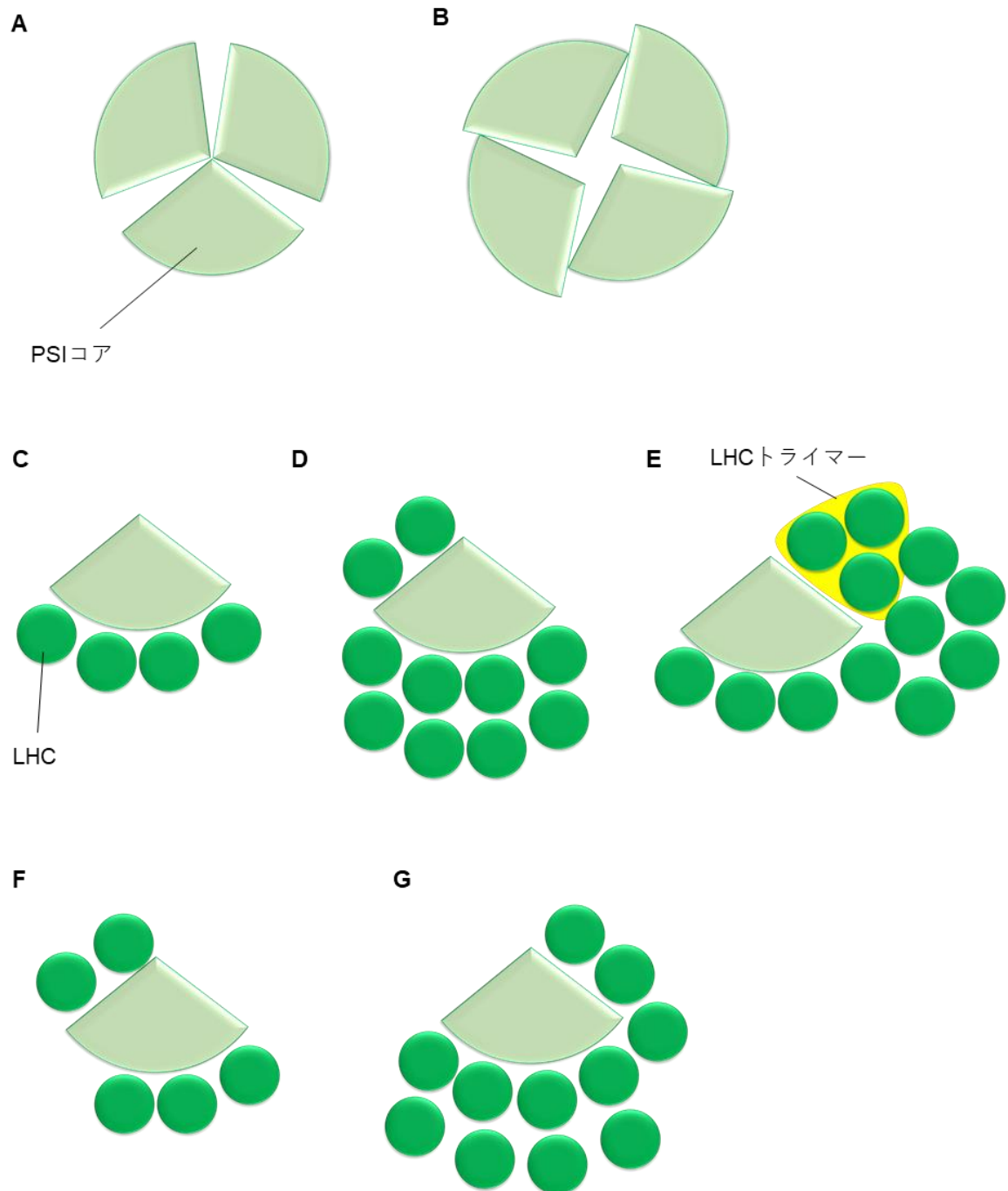


図 7 光合成生物の PSI 超複合体構造モデル

光合成生物で報告されている PSI 及び LHC 超複合体の構造モデル。シアノバクテリア *Synechococcus elongates* (A) シアノバクテリア *Chroococcidiopsis* sp TS-821 (B) 陸上植物 (C) 緑藻 (D) ヒメツリガネゴケ (E) 紅藻 *Cyanidiocyzon merolae* (F) *Nannochloropsis gaditana* (G)

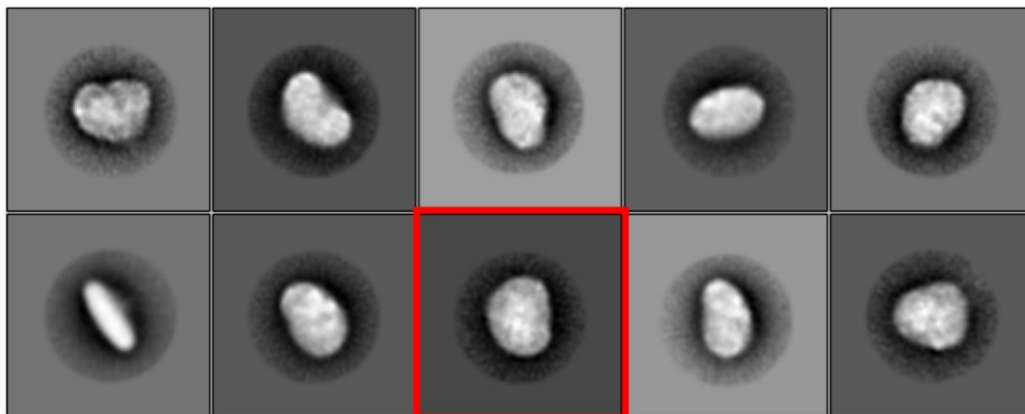


図 8 10 クラスに分類された *B. minutum* の大型 PSI-LHC 超複合体構造

赤枠で囲んだ粒子は 3D 再構成モデルと比較し、直上から捉えた図であると判断した。

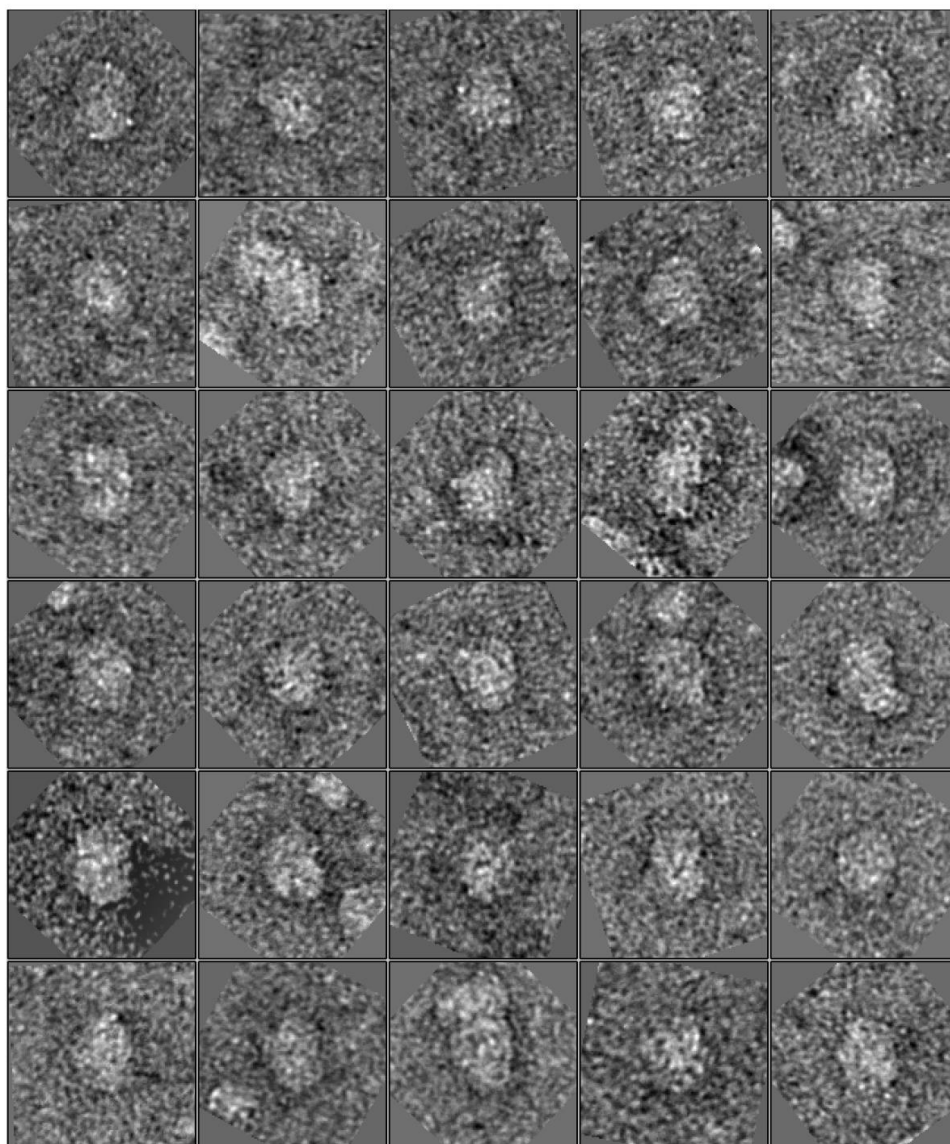
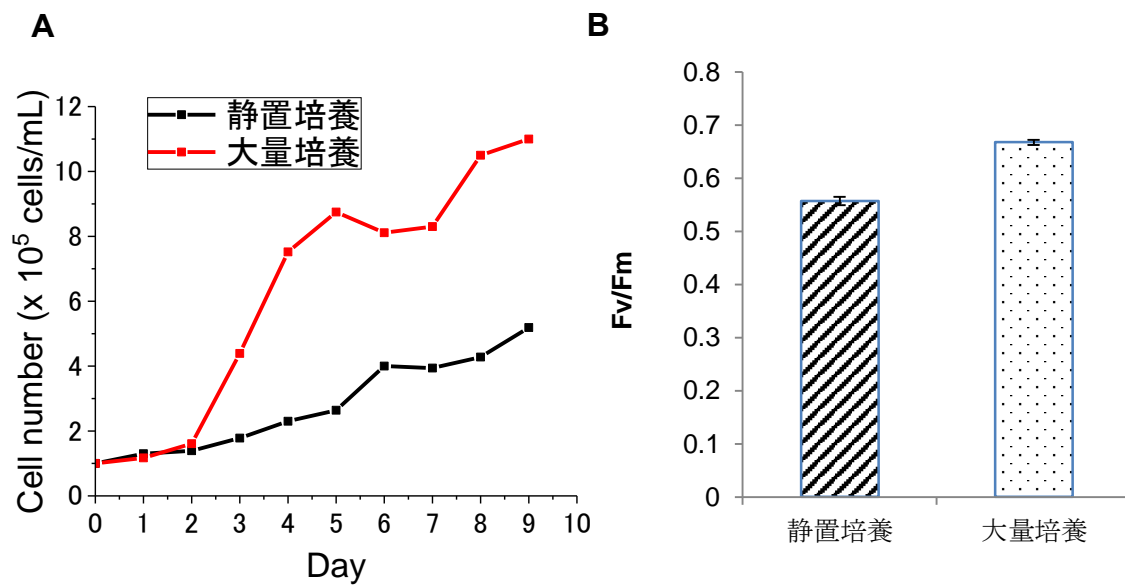


図9 図8の赤枠で囲んだモデルに含まれる粒子の例

ネガティブ染色—電子顕微鏡観察で得られた図から30枚をピックアップした。





**図 10 静置培養と大量培養の比較**

従来の静置培養と本研究で使用した大量培養法における *B. minutum* 株の細胞増殖比較 (A) 静置培養と大量培養で培養した *B. minutum* の Fv/Fm を比較した結果 (B) エラーバーは標準偏差を示す。(n=3)

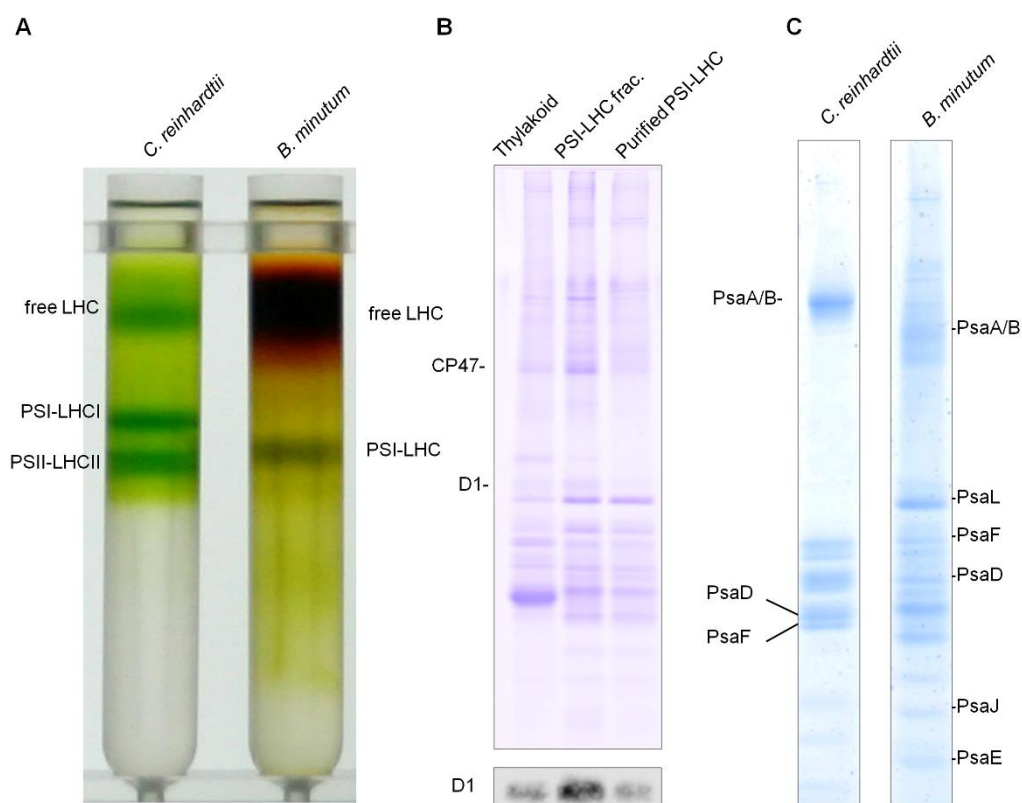


図 11 *B. minutum* における PSI-LHC 超複合体の精製

**A.** *C. reinhardtii* 及び *B. minutum* における 1.0%  $\alpha$ -DDM で可溶化したチラコイド膜の SDS 結果比較。**B.** *B. minutum* のチラコイド、SDG で得られた PSI-LHC 画分及び Fd アフィニティ精製した PSI-LHC の SDS-PAGE。それぞれ 1  $\mu$ g chlorophyll 量のサンプルをロードし、電気泳動後、CBB 染色を行った。泳動後にイムノブロット解析も行い、抗 D1 (PsbA) 抗体で検出した。**C.** *C. reinhardtii* 及び *B. minutum* 由来の PSI-LHC に含まれるタンパク質組成。それぞれ 1  $\mu$ g chlorophyll 量のサンプルをロードし、電気泳動後、CBB 染色を行った。それぞれのタンパク質バンドは LC-MS/MS を用いて同定した。

```

>chlamydomonas -----
>Arabidopsis -----
>Cyanidioschyzon -----
>Synechocystis -----
>Breviolum.v1.2.025464 MIIVCVIARPNGLPLDVERELNKFRPGSPELAQFRPSINGSAIETELPVACLRTWTHGGI

>chlamydomonas -----MALTMRNPAVKASSRVAP
>Arabidopsis -----MSLTIPANLVLNPRSNKSLTQSV
>Cyanidioschyzon -----
>Synechocystis -----
>Breviolum.v1.2.025464 HSEMVFVTGGRADGRSIFDLVHDLCLGRSDVSEIPPLKIVMEGNVFFSLNNRRLAAAFKMFQ

>chlamydomonas SSRRALRVACQAQKNETASKVGTALAASALAAVSLSAPSAMADIAG-----
>Arabidopsis PKSSARFVCSDDKSSSTPQSMKAFSAVALSSILLSAPMPAVADISG-----
>Cyanidioschyzon -----MFKRSLIFIAAVMSVCQISAIQISAVSADV-----
>Synechocystis -----MKHLLALLAFTLWFNFAPSASADDFAN-----
>Breviolum.v1.2.025464 ALQQHRVVKIQHLIGDSVAAMSRSGSLLCVAAVSFVAASLAFVGTTPAGSHASSESRVEL
                                :      *

>chlamydomonas -----
>Arabidopsis -----
>Cyanidioschyzon -----
>Synechocystis -----
>Breviolum.v1.2.025464 ASRALPNGIMESSMSDEAASEQSTAGSFMKWTAGLLAGLVMAVSSSAPVSAKPLDMFGG

>chlamydomonas -----LTPCESKAYAKLEKKELKTLKRLKQYEADSAPAVALKAT
>Arabidopsis -----LTPCKDSKQFAKREKQIKKLESSLKYAPESAPALALNAQ
>Cyanidioschyzon -----LTPCQQSEAFHKREINEVRTLENRQANYEANSPSYLALQSQ
>Synechocystis -----LTPCSENPAYLAKSKN-----FLNTT
>Breviolum.v1.2.025464 VDIDLENTPEHWTIKASPVLEPCKNKYHKKFKDEMYKTTKQQARYAKGSADVYARFNKK
                                * *.:. : . ::

>chlamydomonas MERTKARFANYAKAGLLCGN-DGLPHLIADPGLALKYGHAGEVFIPTFGLYVAGYIGYV
>Arabidopsis IEKTKRRFDNYGYGLCGS-DGLPHLIVNG---DQRHWGEFITPGILFLYIAGWIGWV
>Cyanidioschyzon IDQVHKRFDKYG--TLICGQ-DGLPHLITDG---DWRHAREFTIPALLFLYITGWIGWV
>Synechocystis NDPNSGKIRAERYASALCGP-EGYPHLIVDG---RFTHAGDFLIPSILFLYIAGWIGWV
>Breviolum.v1.2.025464 VAMIKAREEAYG--DRLCGLKDGPNRVVATG---EWNVRASVMWPFATIFLYIAGWIGWA
                                :      *** : * : : . . . * ****: : * : :

>chlamydomonas GRQYLIADVGEAKPTDKEIIIDVPLATKLAWQAGWPLAAVQELQRTLLEKEENITVSP
>Arabidopsis GRSYLIAISGEKKPAMKEIIIDVPLASRIIFRGFIWVPAAYREFLNGDLIAKDV-----
>Cyanidioschyzon GRSYLKYTKETKNPTEQEIIIDVPMALKYMLSGFLWPLSAWQEYRSGQLLAKEDEITVSP
>Synechocystis GRSYLIEIRESKNPEMQEVVINVPLAIKKMLGGFLWPLAAVGEYTSGLVMKDSEIPTSP
>Breviolum.v1.2.025464 GRSYLIRTN---DETKELNIDVPLALTCMASGFSWVPAWQEIIVNGEMAVPDDQIHPGG
**.*. : : : : * * * : :

>chlamydomonas R----
>Arabidopsis -----
>Cyanidioschyzon R----
>Synechocystis R----
>Breviolum.v1.2.025464 PFTQS

```

## 図 12 光合成生物間における Psf サブユニットのアミノ酸配列比較

代表的な光合成生物と *B. minutum* の Psf サブユニットのアミノ酸配列を比較した。  
*Chlamydomonas reinhardtii* (UniProtKB:Q08363.2), *Arabidopsis thaliana* (NP\_051075.1),  
*Synechocystis* sp pcc 6803 (WP\_010872251.1), *Cyanidioschyzon merolae* (NP\_849130.1),  
*Breviolum minutum* (Breviolum.v1.2.025464)。

```

>chlamydomonas      -----
>Arabidopsis        -----
>Synechocystis      -----
>Cyanidioschyzon   -----
>Breviolum.v1.2.027137 MYKCAAGLREREGTRGFSSRAENYNVNVVTCLOQKAKESRNDRLPWLGGVAAMKDFL
>Breviolum.v1.2.037928 -----

>chlamydomonas      -----
>Arabidopsis        -----
>Synechocystis      -----
>Cyanidioschyzon   -----
>Breviolum.v1.2.027137 NLSTCLVLAVLGALTLGDVAFTVASHGPSHLTSPSHVSAQRPSFASAQEVMGAKGMVCFG
>Breviolum.v1.2.037928 -----MGAKGVVCFG

>chlamydomonas      -----
>Arabidopsis        -----
>Synechocystis      -----
>Cyanidioschyzon   -----
>Breviolum.v1.2.027137 MGFGLLMAINQGLSRNVSCASFQQPGTIIVKEQD-TDISKIAYLQDVPRTIMEADTLE
>Breviolum.v1.2.037928 MGFGIIMALSRLTQSRVSCASFQQPGTIIVKEKDDTDISKIAYLQDVPRTIMEADTLE

>chlamydomonas      -----MAVAMRSSTGLRATAARRQMP
>Arabidopsis        -----MAASAPMASQLRSSFSASLSQRLAVP
>Synechocystis      -----
>Cyanidioschyzon   -----
>Breviolum.v1.2.027137 KLLKVTFRDQWEDPPEDTYLYTLKTFAEVYGP GKATKMGWWDYRLLKWDLPDTKELQDEE
>Breviolum.v1.2.037928 KLLKVTFRDQWEDPPEDTYLYTLKTFAEVYGP GKATKMGWWDYRLLKWDLPDTKELQDEE

>chlamydomonas      LGLG-----RVSTVRVCAADTKKAQVISPVNGDPFVG-MLETPTVSAPIVATY
>Arabidopsis        KGISGAPFGVSPTKRVSSFTVRAVKSDKTTFQVVQPI NGDPFTIG-SLETPTVSSPLIAWY
>Synechocystis      -----MAESNQVVQAYNGDPFVG-HLSTPISDSAFTRTF
>Cyanidioschyzon   -----MTDYIKPYNNDPFVG-HLATPINSSSLTRAY
>Breviolum.v1.2.027137 DAEYVSEYFRLMMEGKVPFAVPGPAGYWYTGAIIQWKGEQFAGDQVQTLLENGRWSKQF
>Breviolum.v1.2.037928 DAEYVSEYFRLMMEGKVPFAVPGPAGYWYTGAIIQWKGEQFAGDQVQTLLENGRWSKQF
                          :. . : * * : * : .. :
                          :

>chlamydomonas      LSNLPAYRTGVAPVLRGVEIGLAHGFLLAGPFIKLGPLRNPETAEIAGSLSAAGLVLIL
>Arabidopsis        LSNLPGYRTAVNPLLRGVEVGLAHGFFLVGPFVKAGPLRNT-AYAGSAGSLAAAGLVVIL
>Synechocystis      IGNLPAYRKGLSPILRGLEVGMAGHYFLIGPWTLLGPLRDS-EYQYIGGLIGALALILVA
>Cyanidioschyzon   LSQLPYRRGVSPFLRGLEIGMAHG YFLIGPFVQLGPLRNT-DIKYLAGLLSAIGLIVIL
>Breviolum.v1.2.027137 LSNLAFYREGLKPWQRGLEIGMAHG YFLIGPFTSLGPLRNT-PEAATVGLLCGCAVVGIV
>Breviolum.v1.2.037928 LSNLAFYREGLKPWQRGLEIGMAHG YFLIGPFTSLGPLRNT-PEAATVGLLCGCAVVGIV
                          :.:*. ** .: * **.:*:***:~* **~* : * : . .: :

>chlamydomonas      ALCLSIYGSAQFQS-TPSIG-VKTLSGRSVARDPLFSADGWSEFAAGFLVGGEGAVAWAY
>Arabidopsis        SMCLTIYGISSFKEGEPSIAPSLTLTGRKKQPDQLQTADGWAKFTGGFFFGGISGVTWAY
>Synechocystis      TAALSSYGLVTFQG-----EQSGSDTLQTADGWSQFAAGFFVGMGGAFVAY
>Cyanidioschyzon   TLGMLLYGAVSFTN-----DSQDLESVDGWRQLASGFLLGAVGGAGFAY
>Breviolum.v1.2.027137 SIGGLIFGSTIKPT-----RFDKPD DKPAAGFIEMINWHAIGGLGGAGFAH
>Breviolum.v1.2.037928 SIGGLIFGSTIKPT-----RFDKEGDKPAAGFIEMINWHAIGGLGGAGFAH
                          : :~* .. * : : . *. *. * :

>chlamydomonas      VCTQILPYYS-----
>Arabidopsis        FLLYVLDLVPYFVK-----
>Synechocystis      FLLNLSVVDGIFRGLFN-----
>Cyanidioschyzon   LLLTLFS-----
>Breviolum.v1.2.027137 ALITIFGS-----
>Breviolum.v1.2.037928 ALITIFGSQCMGMRATATRAAARHVLINKNLISASSSDGILHLCRTSIFEFDVAV
                          :

```

図 13 光合成生物間における Psal サブユニットのアミノ酸配列比較

代表的な光合成生物と *B. minutum* の Psal サブユニットのアミノ酸配列を比較した。

*Chlamydomonas reinhardtii* (UniProtKB:P32974.2), *Arabidopsis thaliana* (NP\_051074.1), *Synechocystis* sp pcc 6803 (NP\_440414.1), *Cyanidioschyzon merolae* (NP\_849129.1) 及び *B. minutum* 由来の 2 種の Psal サブユニット (Breviolum.v1.2.027137, Breviolum.v1.2.037928)。

values are means  $\pm$  S.D. (n = 3)

		Oxygen absorption rate per Chl
Preparation		
		$\mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$
<i>B. minutum</i>	PSI-LHC	2,017.5 $\pm$ 343.1
Synechocystis	PSI monomer	730 $\pm$ 30
	PSI trimer	1240 $\pm$ 20

**表 2 精製した *B. minutum* PSI-LHC の光合成活性**

精製した *B. minutum* 由来の PSI-LHC、*Synechocystis sp.* PCC 6803 由来の PSI コアモノマー及びトライマー (Kubota et al., 2010) の酸素吸収速度比較。結果は異なるチラコイド膜から精製した 3 サンプルの平均値であり、 $\pm$ は標準偏差を表す。

LHC group	Thylakoid	PSI-LHC	Free LHC frac.
F1	51	7	45
F2	2	2	1
F3	3	1	0
F4	6	2	3
F5	0	0	0
R1	3	3	0
R2	1	0	1
R3	7	6	2
R4	3	2	0
R5	3	2	0
other	0	0	0
total	79	25	52

**表 3 チラコイド、PSI-LHC 及び SDG の LHC 画分で検出された LHC 数**

それぞれのサンプルで検出された LHC について、LHC のグループごとに計数した。検出された LHC の詳細は表 4 に示した。

Group	LHC number	Thylakoid	PSI-LHCI	Free antenna
F1	006213.6 6	+	-	+
	005231.6 9	+	-	+
	003715.4 6	+	-	+
	005231.4 9	+	-	+
	000704.3 6	-	-	-
	000704.2 6	+	-	+
	000704.6 6	-	-	+
	000704.5 6	-	-	-
	028303.2 2	-	-	-
	006875.2 5	+	-	+
	038157.5 6	-	-	-
	037222.2 2	-	-	-
	037219.1 1	-	-	-
	041291.5 5	-	-	-
	038157.2 6	-	-	-
	016171.4 4	-	-	-
	016171.3 4	-	-	-
	041291.2 5	-	-	-
	006875.1 5	+	-	+
	034225.1 2	-	-	-
	028303.1 2	-	-	-
	005126.1 1	-	-	-
	038157.4 6	+	-	+
	006873.4 5	+	-	+
	042413.1 1	-	-	-
	041290.1 1	-	-	-
	039010.2 2	-	-	+
	039010.1 2	-	-	-
	006873.5 5	+	-	-
	016171.2 4	+	-	+
	003714.1 1	+	-	+
	003715.2 6	+	-	+
	006213.1 6	-	-	-
	003713.1 1	+	-	+
	006213.5 6	-	-	-
	006212.2 8	+	-	+
	005231.8 9	+	-	+
	024892.2 4	+	-	-
	007477.2 4	+	+	-
	033169.1 1	+	-	-
	005231.9 9	+	-	+
	006212.8 8	+	-	+
	024681.2 2	-	-	-
	024680.2 2	-	-	+
	024681.1 2	+	-	-
	024680.1 2	+	+	-
	006875.5 5	+	+	-
	007477.3 4	+	+	+
	024892.3 4	+	-	-
	004087.2 3	-	-	+
	006212.7 8	+	-	+
	006875.4 5	+	+	+
	041094.1 3	-	-	-
	030607.1 2	+	-	+
	038157.3 6	-	-	-
	041094.3 3	-	-	-
	030609.2 3	+	-	+
	033532.4 5	-	-	-
	033532.3 5	-	-	-
	020974.1 2	-	-	+
	037220.2 3	+	-	+
	030608.1 1	+	-	+
	011071.3 3	-	-	-
	011071.2 3	+	-	+
	005231.3 9	+	-	-
	005231.1 9	+	-	+
	005231.2 9	+	-	+
	003715.3 6	+	-	+
	016257.1 1	-	-	-
	016255.1 1	+	+	+
	007477.1 4	+	-	+
	004087.1 3	+	-	+
	000704.1 6	+	-	+
	005231.5 9	+	-	-
	005231.7 9	-	-	-
	006213.2 6	+	-	+
	003715.5 6	+	-	+
	017478.1 2	+	-	+
	026613.1 2	+	-	+
	017480.1 2	+	-	-
	005437.1 2	+	+	+
	019686.1 2	-	-	+
	026613.2 2	+	-	+
	017480.2 2	+	-	+
	005437.2 2	+	-	-

F2	012424.1 2	+	+	-
	000416.1 2	+	+	+
F3	004087.3 3	+	-	-
	007477.4 4	+	+	-
F4	024892.4 4	+	-	-
	011361.1 1	-	-	-
	011302.1 1	+	-	-
	023630.1 1	+	-	-
	029304.1 2	+	+	-
	029305.1 2	-	-	-
	002584.1 1	-	-	-
	037730.2 2	-	-	-
	022533.2 2	-	-	-
	038122.1 1	-	-	-
	037313.1 1	-	-	-
	008549.2 2	-	-	-
	030607.2 2	+	-	+
	030609.3 3	-	-	-
	033532.5 5	-	-	-
	004366.1 1	-	-	+
	028203.2 2	-	-	-
	016027.1 1	-	-	-
	007877.1 1	-	-	+
	012918.1 1	-	-	-
	016373.1 1	-	-	-
	019932.3 3	-	-	-
	019932.2 3	-	-	-
	019932.1 3	-	-	-
	038694.1 1	-	-	-
	030315.2 2	+	+	-
	011270.1 1	-	-	-
	029304.2 2	+	-	-
	030436.1 1	-	-	-
	010109.3 3	+	+	-
	038449.3 3	-	-	-
	033058.3 3	+	+	-
	010108.3 3	+	+	-
	019686.2 2	+	-	+
	024854.2 2	-	-	-
	006473.1 1	-	-	-
	006472.1 1	+	+	-
	018027.1 1	-	-	-
	010521.4 4	+	+	-
	010521.3 4	-	-	-
	010521.1 4	+	-	-
	010522.1 1	-	-	-
	010521.2 4	-	-	-
	038449.1 3	+	+	-
	010109.1 3	+	+	-
	033058.1 3	+	+	+
	010108.1 3	+	+	+
	010109.2 3	-	-	-
	038449.2 3	+	-	-
	033058.2 3	+	+	-
	010108.2 3	+	+	-
	000417.1 1	+	+	-
	000416.2 2	+	-	-
	012424.2 2	+	+	-
other	028830.2 2	-	-	-
	028830.1 2	-	-	-

表 4 チラコイド膜、精製した PSI-LHC、遊離アンテナ各分に含まれていた LHC それぞれのサンプルで検出された LHC を+(黄色) と示した。それぞれのグループで発現していた LHC を計数した結果を表 3 に示した。

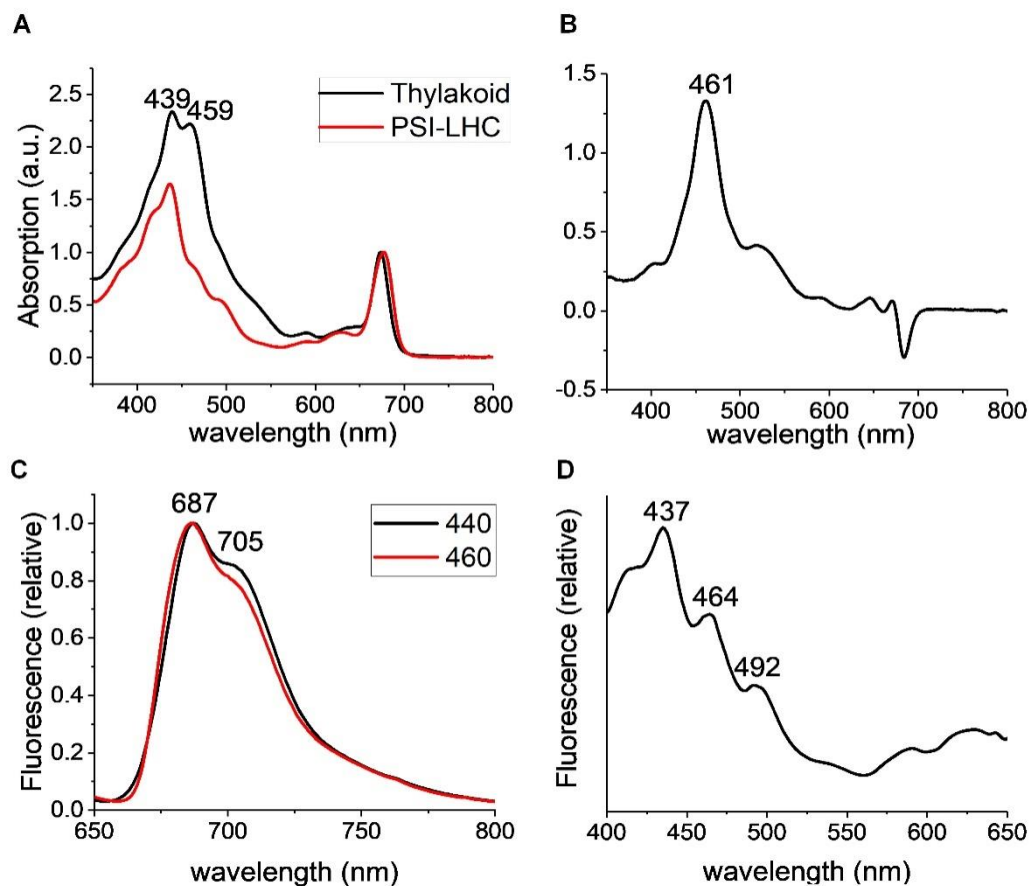


図 14 *B. minutum* PSI-LHC の分光学的解析

**A.** チラコイド膜及び PSI-LHC の吸収スペクトル。スペクトルは 680 nm 付近のピークで標準化した。**B.** チラコイド膜及び PSI-LHC の吸収差スペクトル。**C.** 440 nm および 460 nm で励起した際の PSI-LHC の蛍光放出スペクトル。蛍光強度は 680 nm 付近のピークで標準化した。**D.** 705 nm で検出した PSI-LHC の蛍光励起スペクトル。



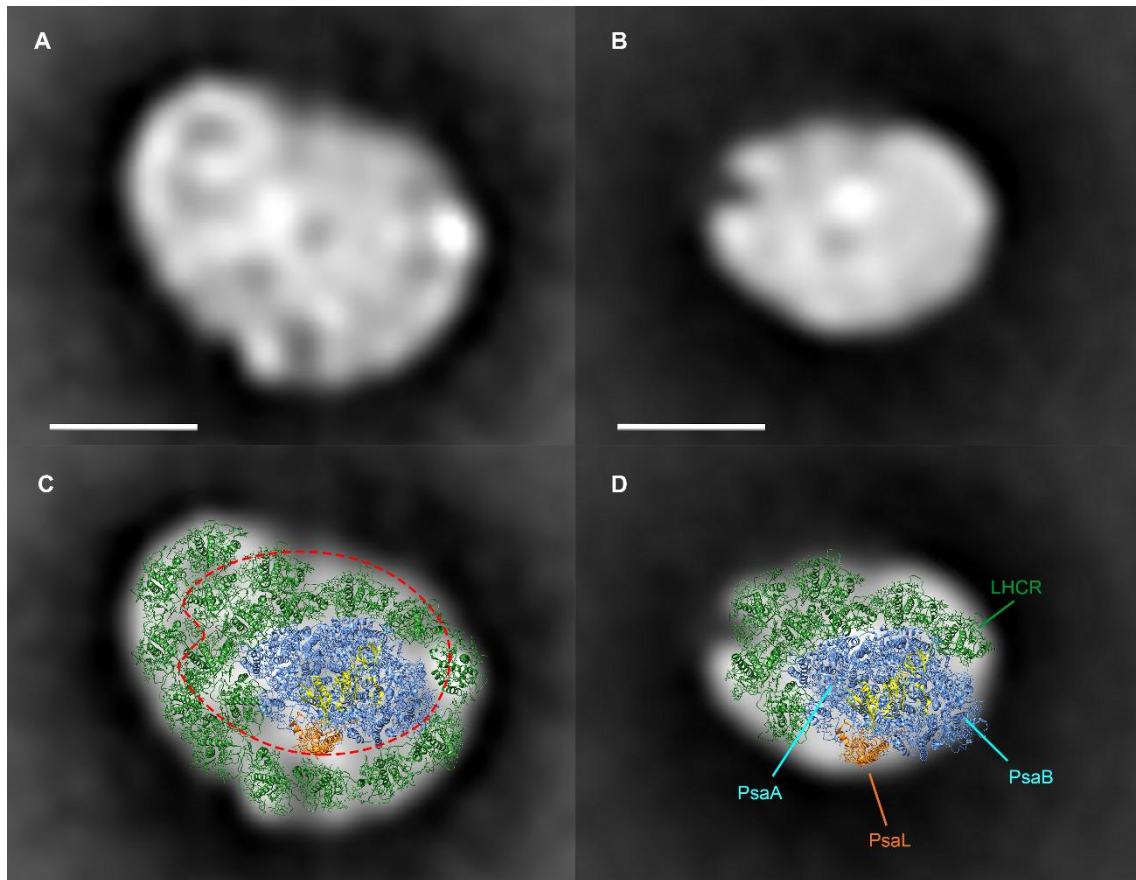


図 15 *B. minutum* における PSI-LHC の構造モデル

A. ネガティブ染色ー電子顕微鏡単粒子電子顕微鏡解析で得られた *B. minutum* の大型 PSI-LHC 超複合体。B. 及び小型 PSI-LHC 超複合体。C,D. *C. merolae* の PSI コア複合体及び LHC を配置した構造モデル。C の赤い点線は D の構造が該当する位置を示す。PsaA, B, F, J, K, O : 青、PsaC, D, E : 黄、PsaL : オレンジ、LHC : 緑、スケールバーは 10 nm を示す。

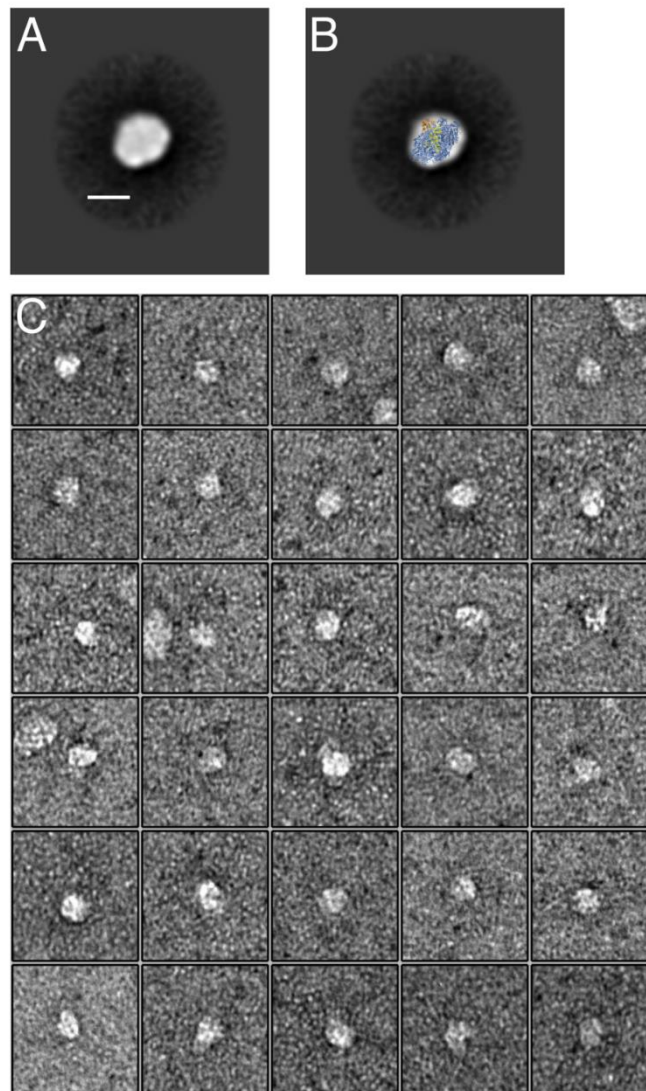


図 16 *B. minutum* の PSI-LHC 超複合体の中でネガティブ染色により得られた小型構造。

A. ネガティブ染色－電子顕微鏡観察から単粒子解析を行った結果、2次元クラス分けにより得られた最も小さな *B. minutum* の PSI-LHC 超複合体。スケールバーは 10 nm を示す。B. *C. merolae* の PSI コア複合体及び LHC を配置した。PsaA, B, F, J, K, O : 青、PsaC, D, E : 黄、PsaL : オレンジ、LHC : 緑。C. 平均化に使用した粒子の例。各画像は A の 50% のスケールで示した。

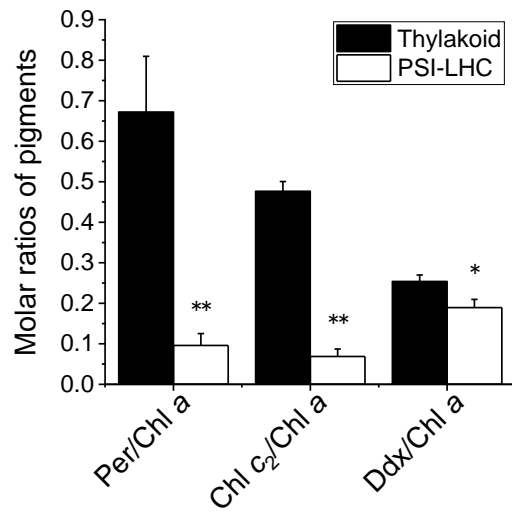


図 17 チラコイド膜および PSI-LHC の色素分析

チラコイド膜及び PSI-LHC に含まれる色素 (Per, Chl  $c_2$ , Ddx) 量。クロロフィル  $a$  のモル量で規格化した。(n = 3 biological replicates; mean  $\pm$  SD) . \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, Student's t-test.

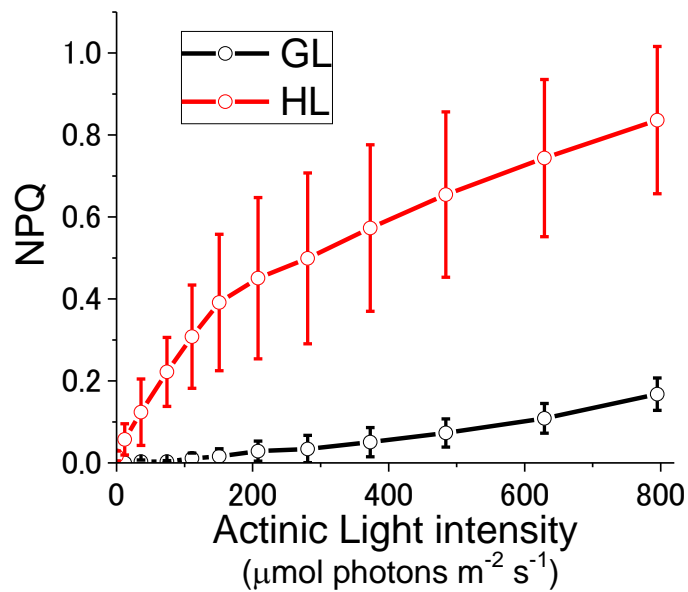


図 18 GL 及び HL 処理した *B. minutum* における蛍光クエンチングの比較

通常の培養条件 (GL) 及び、強光処理 (HL) した *B. minutum* の NPQ-光強度曲線を示した。それぞれの *B. minutum* 細胞は暗条件で 15 分間慣らした後、段階的にアクティニック光強度を上昇させた条件下におけるクロロフィル傾向を測定した。それぞれの NPQ の値は 3 度の異なるロットの培養細胞を用いた測定結果の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

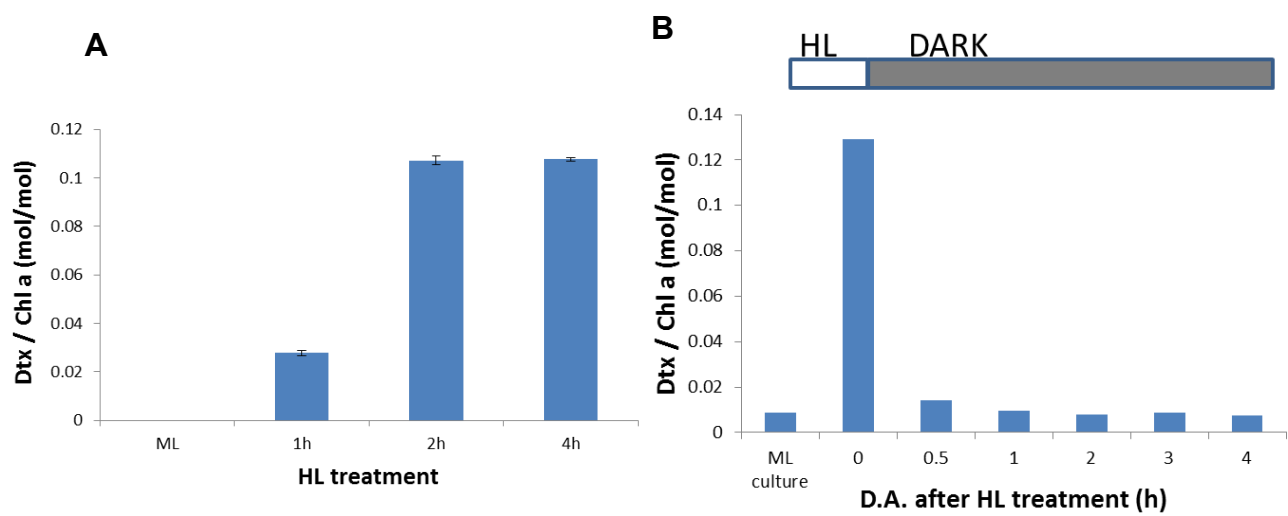
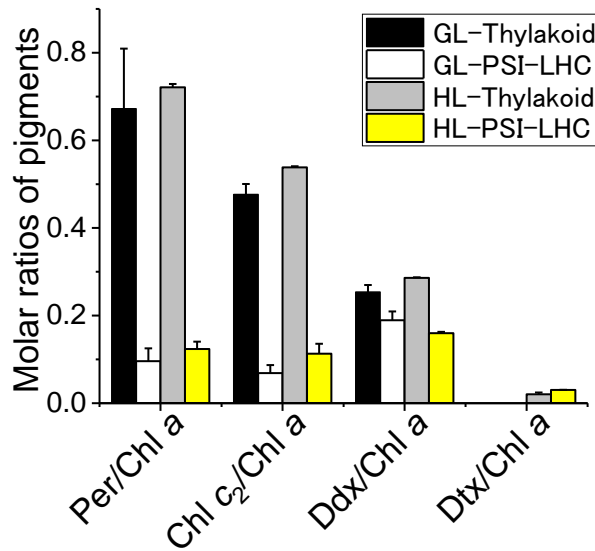
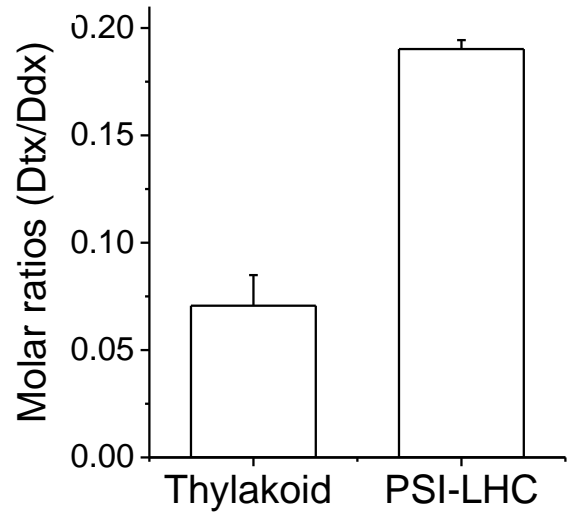


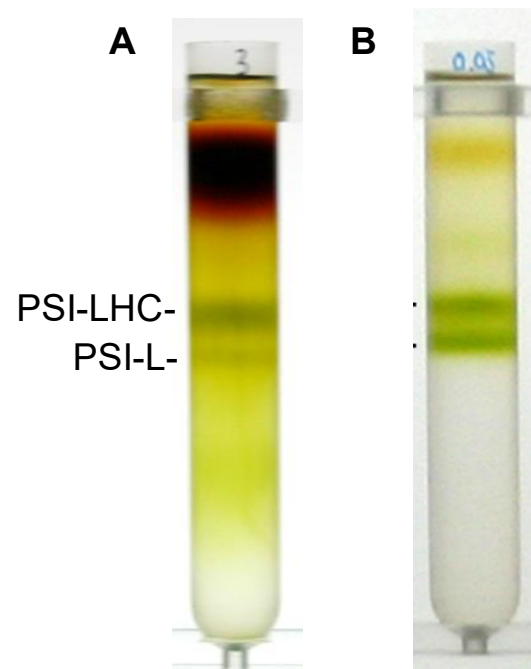
図 19 強光処理に伴う Dtx の蓄積及び分解

A. 大量培養系 (ML) 及び強光処理 1h, 2h, 4h 後の *B. minutum* 細胞の Dtx 量。B. 3h の強光処理後に暗条件に静置した条件における Dtx 量の推移。Dtx 量は Chl *a* で規格化した。

**A****B**

**図 20** PSI-LHC 及びチラコイドにおける強光処理によるキサントフィル色素の変化

**A.** GL 及び HL 処理した Mf 1.05b 株からチラコイド及び PSI-LHC を単離精製し、含まれている色素量を測定した。各色素量は Chl *a* のモル量で規格化した。**B.** 強光処理したチラコイド及び PSI-LHC に含まれる Dtx/Ddx のモル比。結果は異なるサンプルを用いた 3 回の測定の平均を示し、エラーバーは標準偏差を示す。



**図 21 PSI-L 画分の形成**

**A.** 2%  $\alpha$ -DDM で可溶化したチラコイド膜の SDG 結果。**B.** 回収した PSI-LHC 画分を限外濾過にて濃縮した後、再度 SDG を行った結果。

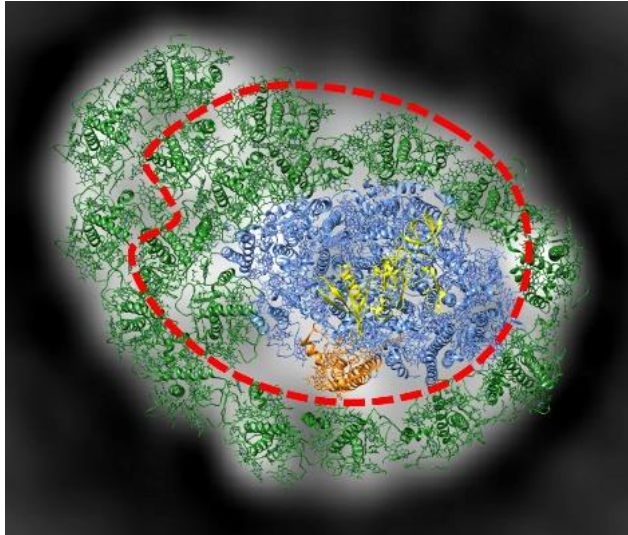
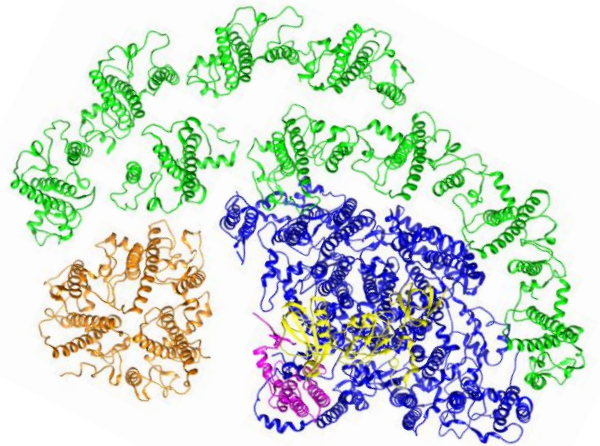
**A****B**

図 22 *B. minutum* と *P. patens* の PSI-LHC 超複合体構造の比較

**A.** *B. minutum* の大型超複合体構造モデル (図 10C)。**B.** ヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens* の PSI-LHCI 超複合体構造モデル (EMDB ID: 9107)。黄 : PsaC, D, E, ピンク : PsaL, 青 : PsaC, D, E, L を除く PSI コアサブユニット, 緑: LHCI, オレンジ : LHCII。



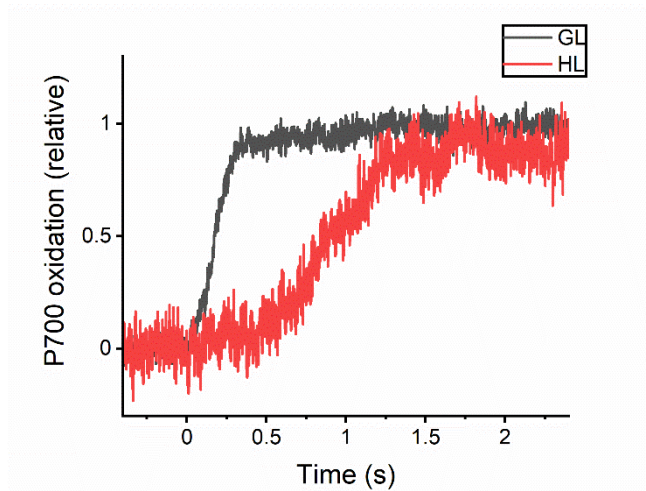


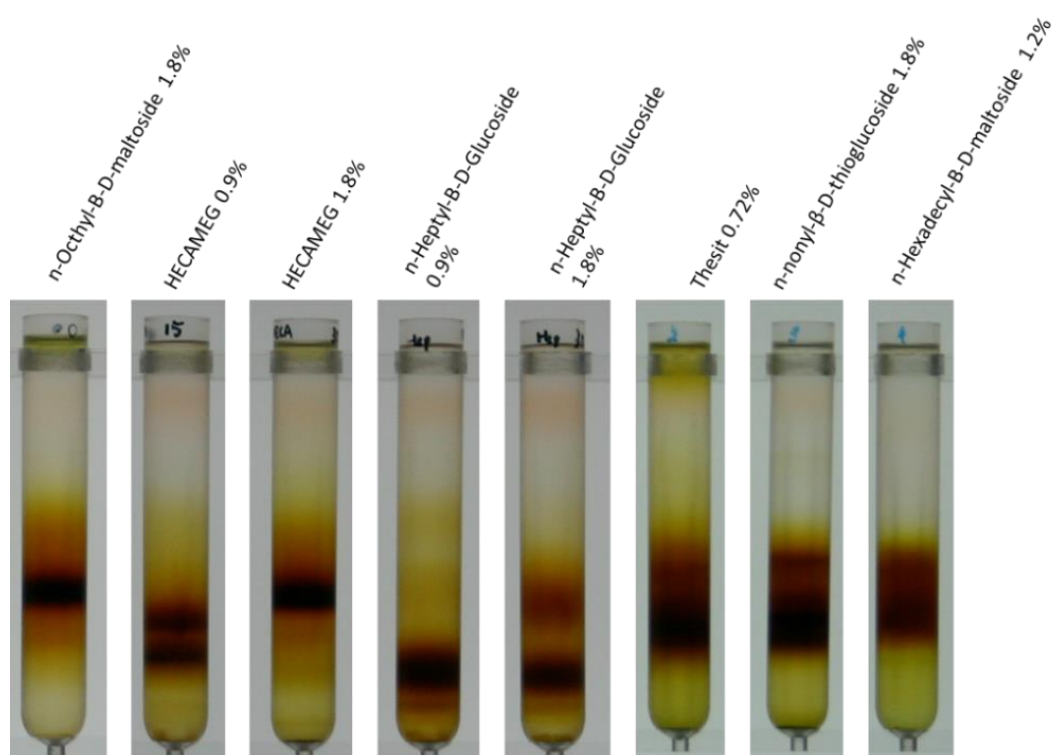
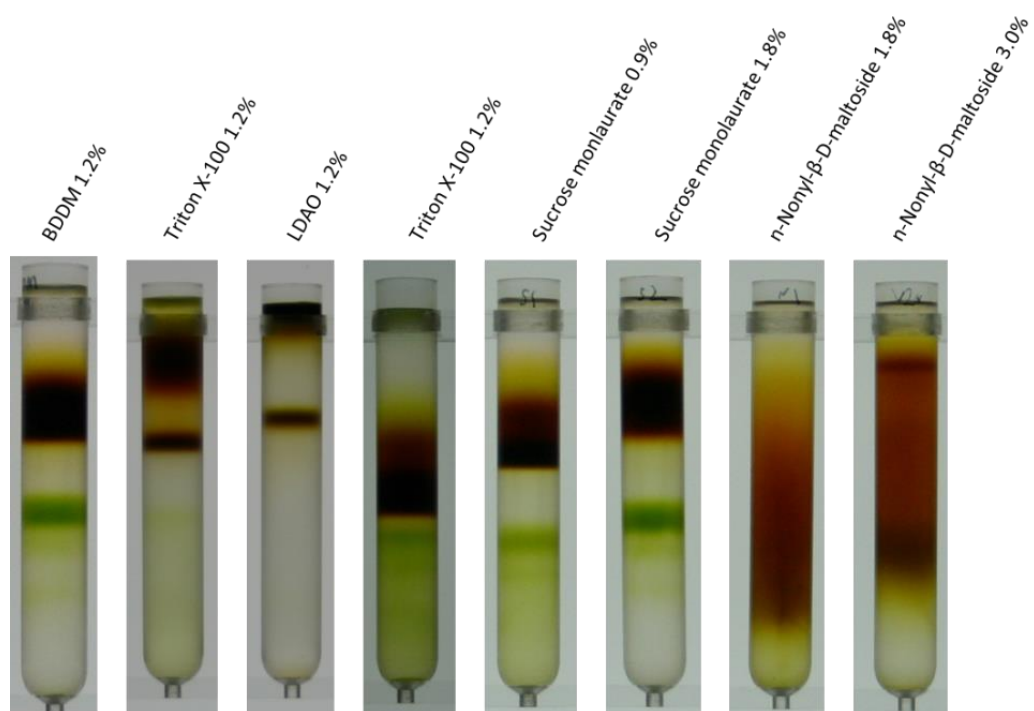
図 23 GL 及び HL 処理した *B. minutum* における光照射による P700 の酸化速度

GL 及び HL 処理した *B. minutum* 株について、DCMU 存在下における、暗条件—光照射 (33 $\mu$ E, 635 nm) に伴う P700 還元速度を測定した。測定は 3 度行い、その平均値を結果として使用した。

界面活性剤名	濃度 (%)	酸素発生	可溶化
sucrose monolaurate	0.6	++	-
	0.9	++	+
	1.2	+	+
<i>n</i> -undecyl- $\beta$ -D-thiomaltoside	1.2	++	-
<i>n</i> -undecyl- $\beta$ -D-maltoside	1.2	-	+
<i>n</i> -tridecyl- $\beta$ -D-maltoside	1.2	-	+
<i>n</i> -octyl- $\beta$ -D-maltoside	1.2	-	-
<i>n</i> -nonyl- $\beta$ -D-maltoside (N330)	1.2	++	-
	1.8	++	+
	2.4	+	+
<i>n</i> -nonyl- $\beta$ -D-glucoside (N324)	0.6	++	-
	1.2	-	+
<i>n</i> -hexyl- $\beta$ -D-glucoside	1.2	++	-
<i>n</i> -dodecyl- $\beta$ -D-glucoside	1.2	-	+
HEGA-9	1.2	++	-
HEGA-8	1.2	++	-
1-S-nonyl- $\beta$ -D-thiomaltoside	1.2	-	+

**表 5 酸素発生活性及び可溶化から評価した界面活性剤のスクリーニング**

単離したチラコイド膜について界面活性剤を用いて 15 分間可溶化した後、酸素発生活性を測定した。++ は明らかな酸素発生が観られた、+ はわずかに酸素発生が観られたものを示し、- は酸素発生が観られなかったものを示す。測定後、15,000 rpm, 5min で遠心し、上清が有色であったものを可溶化されたもの (+)、上清が無色であったものを可溶化されなかったもの (-) と判断した。チラコイド膜は終濃度 600  $\mu\text{g Chl/mL}$  に調整した。



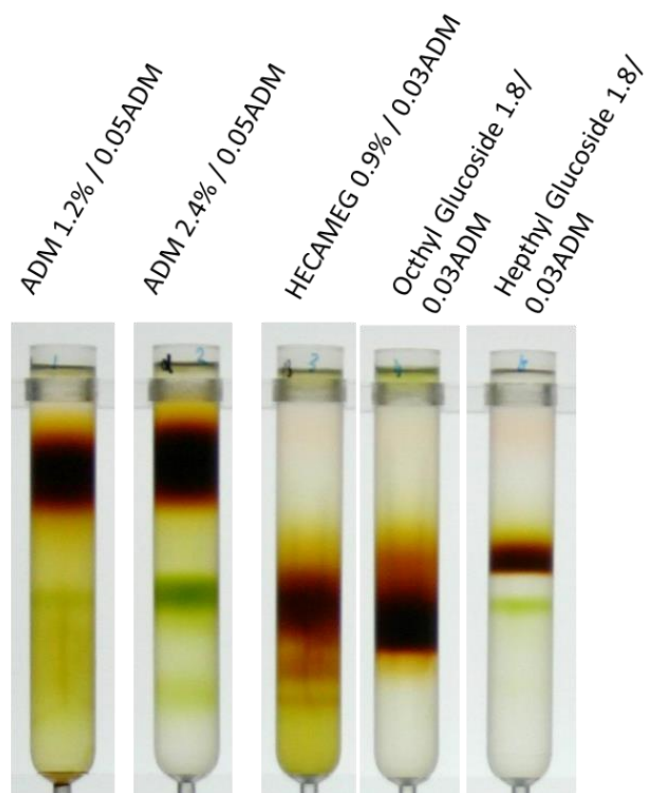
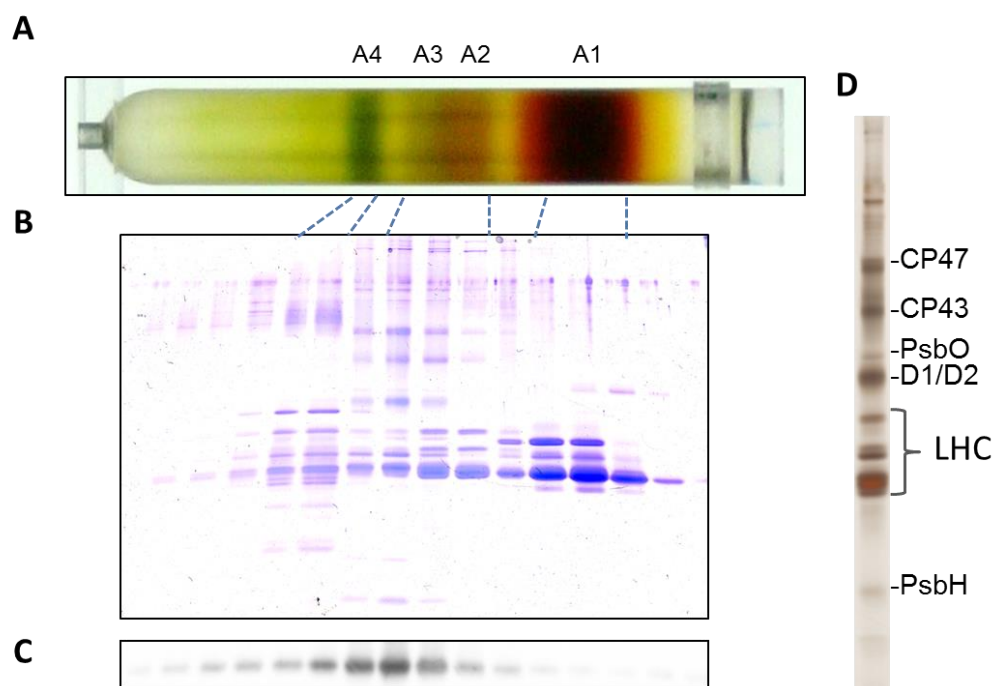


図 24 様々な界面活性剤で可溶化したチラコイド膜の SDG 結果

チラコイド膜は  $0.6 \mu\text{g Chl/mL}$  に調整し、それぞれの界面活性剤を加えて氷上で 15min 浸透しながら可溶化した後、500  $\mu\text{L}$  を SDG チューブ上に載せ、28,000 rpm, 24 h の超遠心を行った。SDG チューブには共通して 0.05 %  $\beta$ -DDM を含む Sucrose バッファー勾配を使用した。



**図 25 SDG 画分の SDS-PAGE 及びウエスタンブロッティング解析**

**A.** 2% DMNG で可溶化したチラコイド膜の SDG 結果。250  $\mu\text{g}$  Chl 分のチラコイドを使用した。SDG チューブには 0.1%DMNG を含む 0.1—1.3M sucrose を積層した密度勾配チューブを使用した。**B.** SDG の全画分における SDS-PAGE 及び CBB 染色結果。**C.** 抗 D1 (PsbA) 抗体を用いたイムノブロット解析。**D.** PSII 画分の銀染色結果及び LC-MS/MS により同定されたタンパク質。

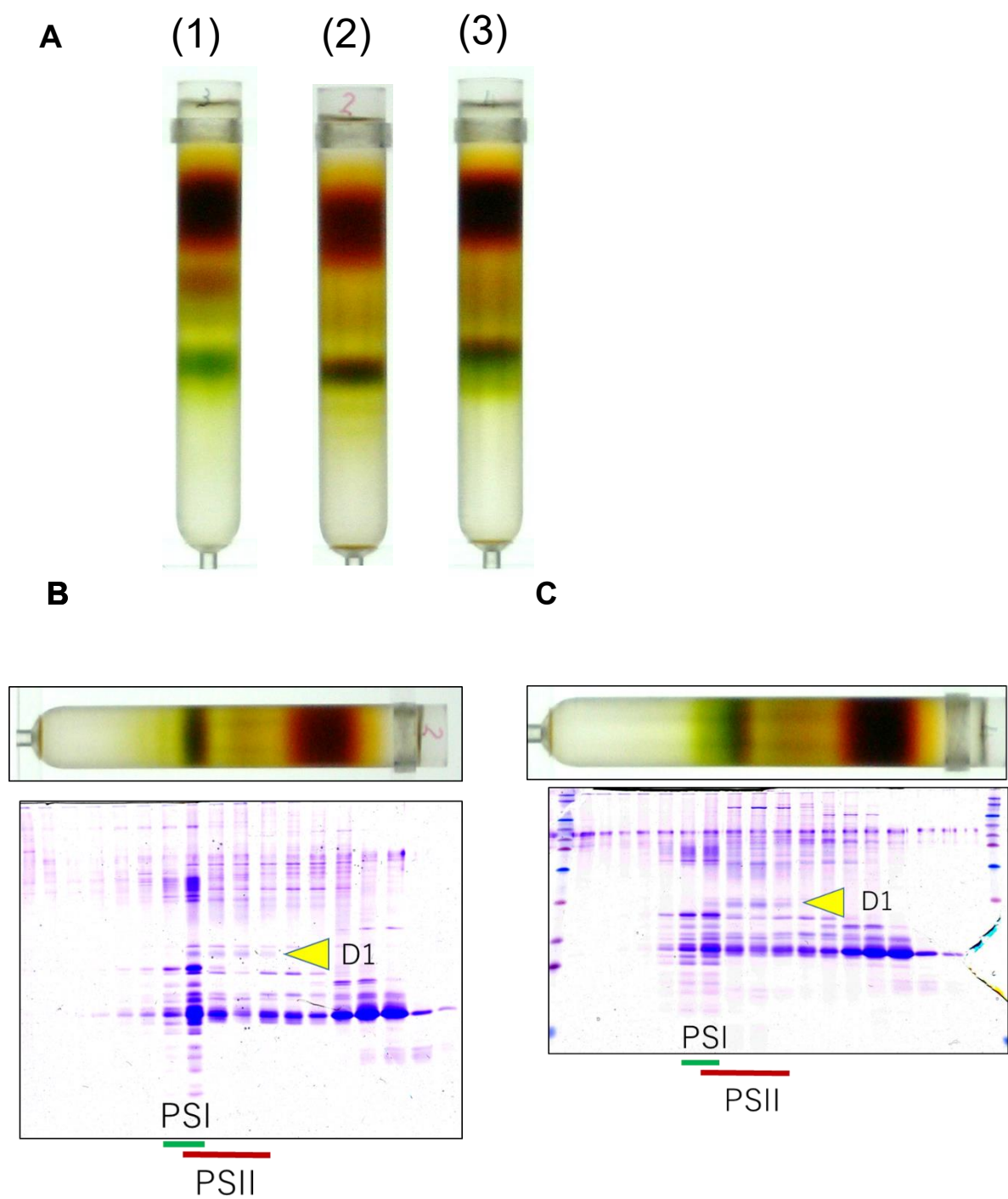


図 26 CCMP2457 株からの光化学系複合体単離

A. Mf 1.05b (1) 及び CCMP2457 (2,3) 株由来のチラコイド膜を DMNG で可溶化した際の SDG 結果。B.C. CCMP2457 株を用いた SDG 結果の全画分のタンパク質組成。A(2)(B), (3)(C) の全画分を回収し、SDS-PAGE により展開した後、CBB 染色を行った。下部の PSI 及び PSII の表記は、それぞれに由来するタンパク質が含まれていたレーンを示す。

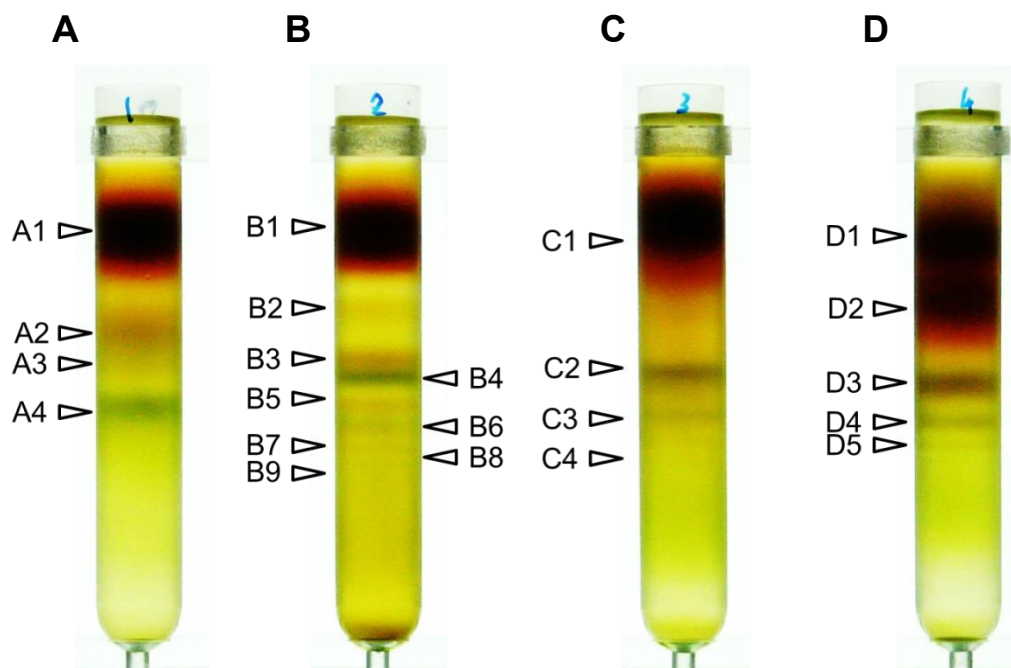


図 27 A<sub>8</sub>-35 を用いた安定的な光化学系複合体の精製

DMNG (A,B) 、 $\alpha$ -DDM (C) 、SM (D) で可溶化した後、0.05% DMNG (A) または A<sub>8</sub>-35 (B—D) を含む SDG チューブを用いた SDG を行った結果。有色画分を矢印で示した。A3, A4 及び B4, B6, B8 は緑色、C2-4, D3-5 は緑褐色、残りの画分は褐色を示した。



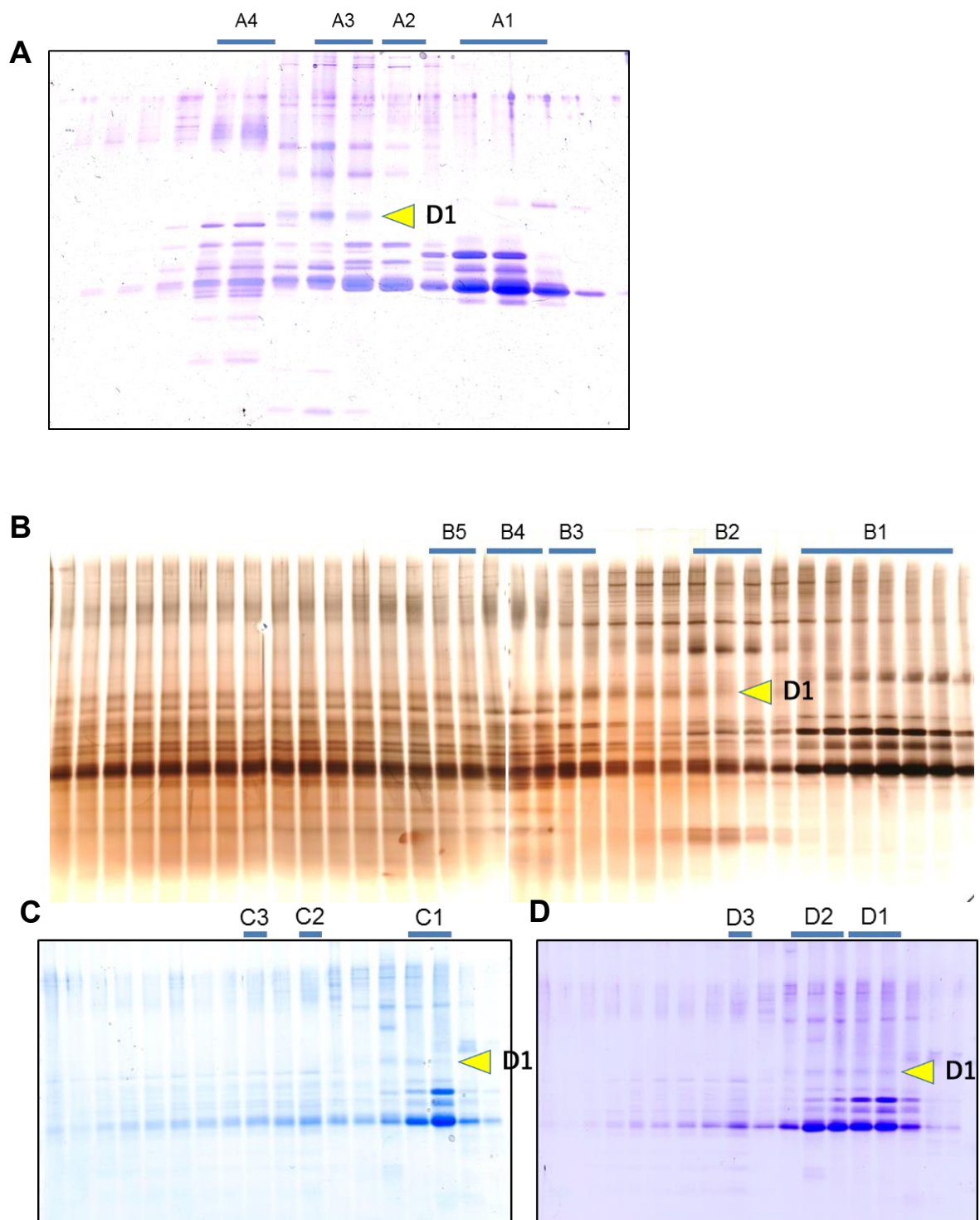


図 28 A<sub>8</sub>-35 を使用した SDG 結果の全画分におけるタンパク質組成

図 17 の A-D それぞれの SDG 結果の全層を回収し、SDS-PAGE で展開した後、CBB 染色 (A, C, D) 及び銀染色 (B) を行った結果。左から右に向かって、SDG 結果の高シヨ糖密度 (底側) から低シヨ糖密度 (上層側) の画分を配置した。