

氏 名 渡邊 顕正

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2249 号

学位授与の日付 2021年3月 24日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 新規精製法を用いた、光化学系 II 超複合体における集光機  
構の研究

論文審査委員 主 査 上田 貴志  
基礎生物学専攻 教授  
皆川 純  
基礎生物学専攻 教授  
長谷部 光泰  
基礎生物学専攻 教授  
栗栖 源嗣  
大阪大学 蛋白質研究所 教授

(様式3)

## 博士論文の要旨

氏名 Watanabe, Akimasa

論文題目

新規精製法を用いた、光化学系 II 超複合体における集光機構の研究

(Study of light-harvesting mechanism in photosystem II supercomplexes using a novel purification method)

Photosynthesis is a reaction that converts light energy into chemical energy. One of the most important protein is photosystem II (PSII), a protein complex in the thylakoid membrane of chloroplasts that splits water into protons, oxygens and electrons. Photosynthetic organisms use electrons and protons to fix carbon dioxide and synthesize carbohydrates.

In green plants, PSII is surrounded by the light-harvesting protein complexes II (LHCII) and forms the PSII-LHCII supercomplex (PSII-LHCII). LHCIIs are classified into three types, S, M and L-LHCII, according to their binding strength to PSII. S, M and L-LHCII represent strongly, moderately and loosely bound LHCII trimers, respectively. In land plants, the structure of C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub>-type of PSII-LHCII in spinach, which has two copies of each PSII (Core) complex, S-LHCII and M-LHCII, was reported by negatively staining electron microscope (EM) using a mild detergent, n-dodecyl- $\alpha$ -D-maltoside ( $\alpha$ -DDM). In the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, a C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-type was thought to be the largest structure as it lacks CP24, a minor monomeric LHCII protein specific to land plants acting as a linker between the PSII core and the M-LHCII. However, when  $\alpha$ -DDM was used to solubilize their thylakoid membranes, a C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub>L<sub>2</sub>-type of PSII-LHCII was identified. In this structure, L-LHCII binds to PSII core in the place of CP24. Although the structure of the C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub>L<sub>2</sub>-type was revealed by negative staining EM, no atomic level structural analysis has been reported so far. One of the reasons for this was the instability of PSII-LHCII in *C.*

*reinhardtii*. Specifically, the LHCIIs tend to dissociate from PSII–LHCII during and after the purification process.

In this thesis, I developed a novel purification method to overcome the instability of PSII–LHCII using amphipol, an organic polymer that stabilizes membrane protein (Chapter 1). Using this method, the stability of the PSII–LHCII of *C. reinhardtii* was much improved, which would be especially useful for cryo-EM. In Chapter 2, I focused on the protein composition of LHCIIs of *C. reinhardtii*. In our collaborator's sample, a C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-type was analyzed at a resolution of 2.7 Å. According to the structure, the S-LHCII trimer consists of three species: LHCBM1, LHCBM2 and LHCBM3. The strain lacking *LhcbM1* is known to have a low quenching capacity, the ability to convert excess light energy into heat. However, the detailed mechanism of this quenching ability has been still unclear. I therefore purified the PSII–LHCII from a LHCBM1 deficient mutant (*lhcbm1*) and compared the structure with the that of the wild-type strain. Although a previous study showed that *lhcbm1* has a reduced size of PSII–LHCII, my result showed that the same size of C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub>L<sub>2</sub>-type was formed. I found that the lack of LHCBM1 was complemented structurally and functionally by another LHCBM(s) in the presence of amphipol, which suggests a critical role of a galactolipid bound to LHCBM1 in energy quenching. In Chapter 3, I focused on the structural changes in PSII in the thylakoid membranes in land plants. In the previous study, PSII–LHCII of land plants forms oligomers only under low-light conditions but the significance of this phenomena has not been clear. Using the purification method described above, I purified oligomeric PSII–LHCII and attempted to understand the significance of this phenomena. As a result, although the protein compositions are almost identical, biochemical and spectroscopic data indicate that the monomeric and the oligomeric PSII–LHCII are suitable for high-light and low-light conditions, respectively. In Chapter 4, I focused on whether the structural change in Chapter 3 also occurs in *C. reinhardtii*. Under low-light conditions, PSII–LHCII megacomplexes, which were composed of two PSII–LHCII

supercomplexes, were found, but the amounts of them were smaller than those of land plants. Although the importance of the light-acclimation mechanism found in Chapter 3 is different compared to land plants, this result suggests *C. reinhardtii* has the same mechanism that forms oligomer under low-light conditions. In addition, I found the angle of the LHCII in the PSII–LHCII megacomplex is different from that of the PSII–LHCII supercomplex, which is possibly important for changing energy transfer efficiencies.

In summary, my studies focused on PSII–LHCII and challenged to understand its light-harvesting mechanism using biochemically isolated samples via a novel purification method. I investigated not only the detailed structure of PSII–LHCII itself, but also how it behaves in the thylakoid membranes. Specifically, I revealed PSII–LHCII forms oligomers that could collect light more efficiently than as monomers.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏 名 渡邊 顕正

Title  
論文題目 新規精製法を用いた、光化学系 II 超複合体における集光機構の研究

光合成は光エネルギーを集め、電子伝達を起こし究極的には二酸化炭素を同化する。一連の反応で最初に光を集め、そのエネルギーを電気化学エネルギーに変換し（電荷分離反応）、電子伝達を始動させるのは色素タンパク質複合体である「光化学系 II 超複合体」である。光化学系 II 超複合体は光を集める「集光アンテナ」部分と電荷分離を行う「反応中心」部分に区分することができるが、前者と後者の結合が光化学系 II 超複合体を葉緑体チラコイド膜から可溶化する際に従来型の界面活性剤によって不安定となる技術的な課題があった。このため、両者は結合して初めて超複合体として機能するにもかかわらず、その構造全体の研究の難しさが、長い間光合成の機能、種多様性、環境適応などの深い理解の妨げとなってきた。

本博士論文は全 4 章で構成されている。出願者は、まず第 1 章において、光化学系 II 超複合体を一旦糖型界面活性剤にて可溶化した後に両親媒性ポリマーであるアンフィポールに置換するという手法を開発し、超複合体としての安定性を改良した新規精製方法を確立した。この精製方法により緑藻クラミドモナスから調製された標品は、従来法と比較して活性が高いばかりでなく、常温 4 日経過後も 3 種類の集光アンテナである S(Stringently binding)、M(Moderately binding)、L(Loosely binding) 三量体 LHCII がほとんど脱離せず、無傷複合体の収率が大幅に向上するなど機能構造解析に適う高い品質のものであることが示された。第 2 章では、第 1 章で確立された手法を用い、クラミドモナスの S 三量体 LHCII サブユニットの一つである LHCBM1 欠損株より光化学系 II 超複合体を精製し、電子顕微鏡負染色単粒子解析による構造解析を行った。その結果、同変異株においても野生株と同様に S 三量体 LHCII の結合した光化学系 II 超複合体が形成されることが明らかとなった。このことから、同変異株が持つ過剰光熱放散能欠損表現型は LHCBM1 ポリペプチドの欠失ではなく、LHCBM1 が特異的に結合するガラクト脂質の欠失によるものであることを示唆した。第 3 章では、同じ手法を陸上植物であるホウレンソウに展開した。その結果、弱光環境下のホウレンソウ葉からは光化学系 II 超複合体の単量体と「光化学系 II 超複合体 array」（光化学系 II 超複合体のマルチマー）が調製されるが、強光照射により単量体のみになること、そして単量体では検出される過剰光熱放散能が光化学系 II 超複合体 array では検出されないことを発見した。光化学系 II 超複合体 array は、弱光環境特異的に電子顕微鏡で観察されてきた結晶様構造体である semi-crystalline array の一部であると考えられることと総合し、これまでその役割が明らかでなかった semi-crystalline array は、光化学系 II 超複合体をマルチマー化して過剰光熱放散能を抑え、逆に集光機能を強化するためのものであると結論した。最終第 4 章では、弱光培養したクラミドモナスにおいても光化学系 II 超複合体の二量体が見られることを示し、ホウレンソウほど規則的

な構造ではないものの、クラミドモナスにもハウレンソウと類似の array 構造形成による光適応機構がある可能性を示唆した。

以上の博士論文研究により、出願者の開発した新規精製法を基盤として、光化学系 II 超複合体機能におけるガラクト脂質の重要性、超複合体の array 構造形成による光環境適応という新しい概念が示されたことは、光合成科学分野の研究に新しい方向性を示したものと評価することができる。よって、本論文は同分野における重要な貢献であり、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。