

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

総合研究大学院大学
生命科学研究科 基礎生物学専攻

渡邊 顕正

目次

序論 (3-4p)

第1章 Amphipol を用いた PSII-LHCII 超複合体の精製法の確立 (5-12p)

第2章 クラミドモナスの PSII-LHCII 超複合体の組成に関する研究 (13-17p)

第3章 陸上植物における PSII 複合体の構造変化を介した光環境適応 (18-30p)

第4章 弱光下におけるクラミドモナスの PSII 複合体の構造 (31-37p)

総括 (38-39p)

引用文献 (40-46p)

謝辞 (47p)

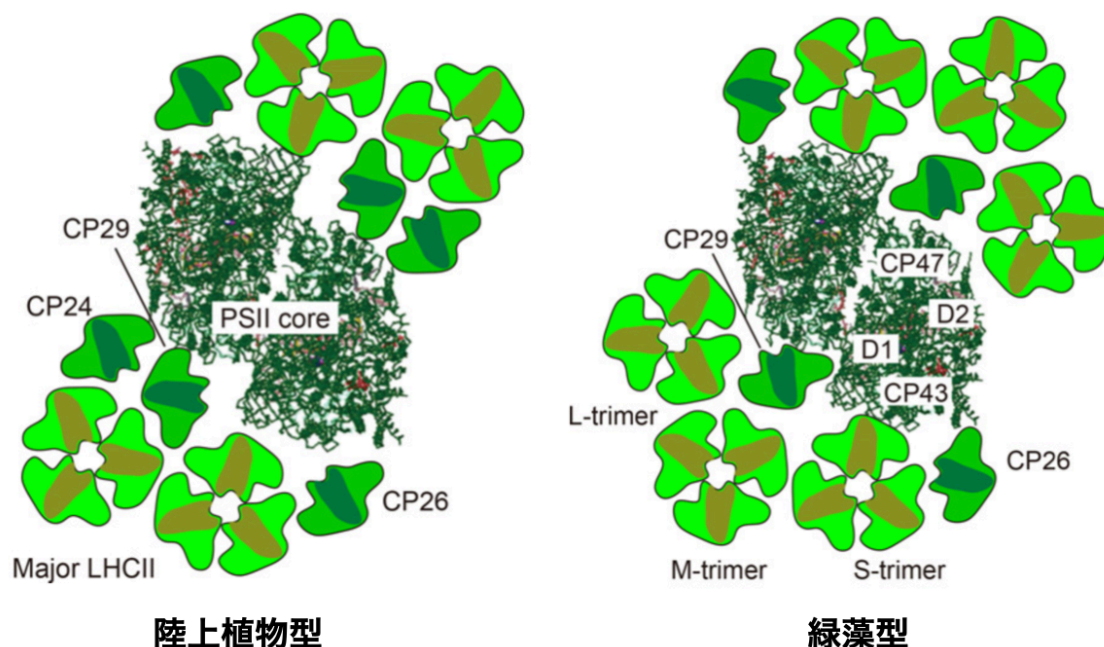
序論

地球上の多くの生物にとって、光合成生物は欠かす事の出来ない存在である。その生物が行う光合成とは、光エネルギーを化学エネルギーへと変換する反応を指す。中でも大きな役割を担うのが、葉緑体のチラコイド膜上に存在するタンパク質複合体、光化学系 II (PSII) である。PSII は水をプロトン、酸素、電子に分解する。光合成生物は電子とプロトンを用いて NADPH と ATP を産生し、それらを用いる事で二酸化炭素を固定して有機化合物を合成する (Minagawa and Takahashi 2004)。この有機化合物や、反応の副産物である酸素を多くの生物は利用している。

陸上植物や緑藻では light-harvesting complex (LHC) と呼ばれる集光タンパク質の存在が知られ、PSII と結合した PSII-LHCII 超複合体 (以下 PSII-LHCII) の形でチラコイド膜上に存在する。陸上植物では、ホウレンソウ由来の PSII-LHCII をネガティブ染色法で観察する事で、PSII に LHCII が結合した構造が 1995 年に初めて報告された (Boekema et al. 1995)。この構造は C_2S_2 型の PSII-LHCII と呼ばれている。なお、C は PSII の反応中心の core に、S は strongly bound LHCII trimers にそれぞれ由来する。その後、ホウレンソウにおいては、よりマイルドな界面活性剤である n-dodecyl- α -D-maltoside (α -DDM) を用いてチラコイド膜を部分的に可溶化する事により、 C_2S_2 型より大きな PSII-LHCII が発見された。この構造では C_2S_2 型の PSII-LHCII にクロロフィル結合タンパク質である CP24 と、新規に発見された LHCII である moderately bound LHCII trimers が結合しており、 $C_2S_2M_2$ 型と名付けられた (Boekema et al. 1998) (下図参照)。なお、この構造はゼニゴケでも報告されている (Roswitha 2003)。近年のクライオ電子顕微鏡を用いた解析により、ホウレンソウ由来の C_2S_2 型の PSII-LHCII が 3.2 Å で (Wei et al. 2016)、エンドウ由来の $C_2S_2M_2$ 型の PSII-LHCII が 2.7/3.2 Å の分解能で報告されている (Su et al. 2017)。

緑藻クラミドモナスでは、PSII の反応中心と M トライマーを結合する CP24 が欠損している事から、PSII-LHCII は C_2S_2 型が最大であると長らく考えられてきた (Kovács et al. 2006, de Bianchi et al. 2008, Iwai et al. 2008)。しかし、チラコイド膜の可溶化に α -DDM を用いた結果、陸上植物よりも LHCII が多く結合した $C_2S_2M_2L_2$ 型の構造が報告された (Tokutsu et al. 2012) (下図参照)。なお、この L は loosely bound LHCII trimers に由来する。ネガティブ染色法による解析で $C_2S_2M_2L_2$ 型の構造は明らかになったものの、その後クライオ電子顕微鏡や X 線結晶を用いた構造解析は報告されていない。その原因の 1 つとして、クラミドモナスの PSII-LHCII の不安定性が挙げられる。具体的には、精製過程や精製後に、LHCII トライマーが容易に PSII-LHCII から解離してしま

う (Kim et al. 2018)。先行研究でも $C_2S_2M_2L_2$ 型の構造は高々10%程度であり、LHCII トライマーが解離したと考えられる C_2S_2ML 型や C_2S_2 型の PSII-LHCII が多く見られた (Tokutsu et al. 2012)。



陸上植物と緑藻における PSII-LHCII のモデル図を引用した(Minagawa and Tokutsu 2015)。

本論文では、PSII-LHCII の不安定性を克服するために、膜タンパク質安定化作用を持つ試薬 Amphipol を用いて新規精製法を開発した (第1章)。第2章では LHCII タンパク質の欠損株を用いる事で、クラミドモナスの PSII-LHCII についてより詳細な理解を試みた。第3章では、開発した新規精製法を陸上植物であるホウレンソウに用いる事で、集光状態における光化学系複合体の精製を試みた。得られた構造を詳細に解析した結果、チラコイド膜上における PSII のダイナミクスが明らかとなった。第4章では、第1から3章で得られた知見を活かし、クラミドモナスの集光状態における PSII-LHCII の構造をより詳細に明らかにした。これらの研究内容から、新規精製法を用いて光合成生物の PSII-LHCII そのものを詳細に研究するだけでなく、チラコイド膜上で PSII 複合体がどのように変化するかというダイナミクスも明らかにした。

第1章 Amphipol を用いた PSII-LHCII 超複合体の精製法の確立

■緒言

序章で述べた様に、PSII-LHCII の不安定性を克服するためには既存の界面活性剤のみを用いた精製法では限界がある。近年、膜タンパク質の精製において MNG 系の界面活性剤 (Chae et al. 2010)、ナノディスク (Bayburt et al. 2002)、Amphipol (Tribet et al. 1996)などが使用されるようになってきた。Amphipol は 1996 年に報告されたポリマーであり、従来型の界面活性剤の代わりに膜タンパク質の疎水性部位と結合し、全体として水溶性に保つ事で安定化を実現する。その Amphipol の中でも一番使用されている物が A8-35 である。Amphipol は 2 種類の側鎖がランダムにグラフトされたポリアクリレート骨格を持ち、全体として両親媒性のポリマー構造となっている。A8-35 に関しては、ユニットの約 25%がオクチルアミド側鎖、約 40%がイソプロピルアミド側鎖、そして約 35%がカルボキシ基で構成される (Tribet et al. 1996)。この A8-35 はバクテリオロドプシン (Gohon et al. 2008)やシトクロム *b₆f* 複合体 (Tribet et al. 1996)、ミトコンドリア呼吸鎖 (Shinzawa-Itoh et al. 2016)など、100 種を超える膜タンパク質に用いられている (Popot 2018)。

Amphipol を光合成関連のタンパク質に用いた例では、シアノバクテリアの PSI (Kievit and Brudvig 2001)と PSII (Nowaczyk et al. 2004)の例や、陸上植物やクラミドモナスの LHCII に対して用いた例がある (Bazzacco et al. 2012, Liguori et al. 2013, Opacic et al. 2014)。加えて、私が共同研究に参画したクラミドモナス由来の PSI-LHCI 超複合体 (以下 PSI-LHCI) (Kubota-Kawai et al. 2019)の精製例も挙げられる。しかしながら、PSI-LHCI に関しては新規構造の精製に成功したが、不安定性ゆえに精製が難しい PSII-LHCII に関しては適用例が無かった。そこで、A8-35 を用いた精製を行う事で、クラミドモナスの PSII-LHCII の不安定性を克服する事が出来ると考えた。ただ、Amphipol の一般的な使用方法である「タンパク質精製後に界面活性剤と置換する事で安定化させる」という手法は困難が予想された。その理由として、PSII-LHCII の不安定さが挙げられる。具体的には、目的の構造である $C_2S_2M_2L_2$ 型の PSII-LHCII は、界面活性剤中においては時間経過とともに容易に LHCII が解離すると報告されている (Kim et al. 2018)。そこで本研究では、チラコイド膜可溶化の直後に A8-35 を加え、その後に精製を行う事で安定性を向上させて $C_2S_2M_2L_2$ 型の PSII-LHCII が増加する事を期待した。

■実験手法

株および培養条件

本研究では、緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) の野生株と

して 137c 株を用いた。培地には従属栄養培地である TAP (Tris-acetate-phosphate) 培地を用いた (Gorman and Levine 1965)。培養下では 23°Cにおいて空気通過を行い、光条件は $20 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ とした。

チラコイド膜の精製

クラミドモナスからのチラコイド膜の精製は先行研究を参考に行った (Takahashi et al. 2006)。簡潔に記すと、Glas-Col 社の BioNeb を用いて圧力 8 kgf/cm² で細胞を破碎し、ショ糖密度勾配法を用いてチラコイド膜と未破碎細胞等を分画した。

PSII-LHCII の精製

精製したチラコイド膜を用いてショ糖密度勾配超遠心 (SDG) 法を行う事で、PSII-LHCII を精製した。手法としては先行研究を参考にし、適宜改良を行った (Tokutsu et al. 2012)。まずはチラコイド膜を終濃度 1.4% α -DDM (Anatrace 社) を用いて 10 分間かけ可溶化し、可溶化できなかった物は 25,000 g, 1 分間の遠心で取り除いた。その後、可溶化した膜タンパク質を界面活性剤から A8-35 (Anatrace 社) へと置換するために、遠心後の上清に終濃度 1.0% となるように A8-35 を加えて 10 分間転倒混和した。NAPol (Anatrace 社) に関しては A8-35 と同様に扱ったが、濃度のスクリーニングを行った結果、終濃度に関しては 2.0% となる様に加えた。その後、SDG 法のチューブにのせ遠心した (Tokutsu et al. 2012)。なお、全ての作業は光合成タンパク質に影響を及ぼさない緑色 LED 下、低温条件下で行った。また A8-35 を用いないサンプルでは 0.02% の α -DDM を、ベタイン入りの実験条件では 1 M のベタインをそれぞれチューブ内の溶液に入れた。全ての条件においてバッファは 25 mM MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) を用い、pH は水酸化ナトリウムを用いて 6.5 に調整した。

SDS/PAGE 及び D1 タンパク質の定量

SDS/PAGE とウェスタンブロッティングに関しては、先行研究を参考に行った (Iwai et al. 2008)。D1 タンパク質に対する抗体は Agrisera 社の AS05-084 を用い、Bio-Rad 社の IMAGE LAB を用いて定量を行った。

PSII-LHCII の安定性の測定

先行研究に従い、精製した PSII-LHCII の 77 K における低温蛍光スペクトルを、HORIBA 社の FluoroMax4 を用いて測定した (Kim et al. 2018)。クロロフィルの励起は波長 480 nm で行い、640 nm から 800 nm までの蛍光を観察した。測定までの間、精製サンプルは室温・暗黒下で保存した。

酸素発生活性の測定

酸素発生活性の測定には Loligo Systems 社の Witrox4 を用い、25°C 下で測定した。精製した PSII-LHCII を終濃度 $10 \mu\text{g Chl} \cdot \text{mL}^{-1}$ となるよう測定バッフ

アーに懸濁した。測定バッファーは、25 mM MES、5 mM 塩化カルシウム、1 mM フェリシアンカリウム、0.25 mM 2,6-ジクロロベンゾキノンで構成され、pH は 6.5 に調整した物を用いた。測定光には NPI 社のメタルハライドランプを用い、光量は $5,000 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ で測定した。

電子顕微鏡による観察と単粒子解析

精製した PSII-LHCII を 25 mM MES バッファーを用いて $3 \mu\text{g Chl} \cdot \text{mL}^{-1}$ となるよう希釈し、親水化した銅グリッドに 2% 酢酸ウラニルを用いて固定した。その際にタンパク質をグリッドに静置するが、A8-35 を用いたサンプルでは従来の条件では質の良いグリッドが作成出来なかった。そこで条件を検討し、界面活性剤を用いたサンプルは吸着時間を 30 秒、A8-35 を用いたサンプルは 60 秒とした。固定時間は全てのサンプルで 30 秒を 3 回とした。日本電子社の JEM 1010 を用いて、加速電圧 80 kV、倍率 75,000 倍で観察を行った。写真の記録にはオリンパス社の Veleta CCD カメラ (2048×2048 ピクセル) を用いた。単粒子解析には Relion 2.1 パッケージを用いた (Kimanius et al. 2016)。

■実験結果および考察

チラコイド膜を α -DDM で可溶化し、十分量の A8-35 を加える事で置換を行なった。置換したサンプル全量を SDG 用のチューブに乗せ遠心する事で、余分な A8-35 と α -DDM を取り除いた。通常、膜タンパク質を可溶化状態に保つためには限界ミセル濃度以上の界面活性剤が溶液中に必要である。しかし、今回の A8-35 を用いた精製法では、SDG のチューブ内には A8-35 と α -DDM のどちらも加えていない。それにも関わらず、膜タンパク質はアグリゲーションを起こして沈殿する事もなく、明瞭なバンドを形成した (図 1 A)。 α -DDM のみで精製したバンドパターンとの比較から、LHCII モノマー、LHCII トライマー、PSI-LHCI、PSII-LHCII の精製に成功した。

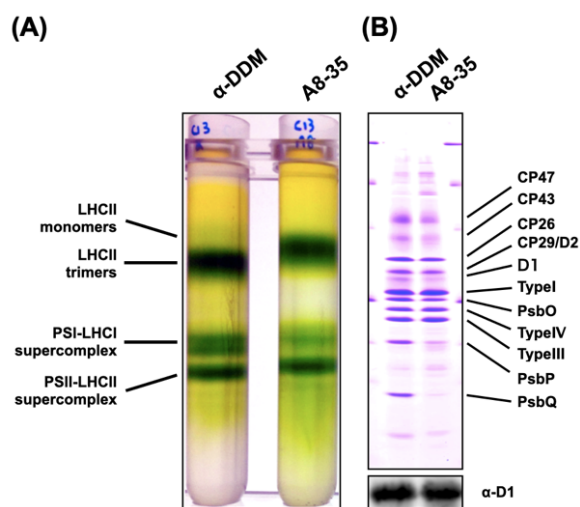


図1 SDG法によるPSII-LHCIIの精製。(A) クラミドモナスのチラコイド膜を α -DDM で可溶化した。A8-35 に置換したサンプルについては、チューブ内に界面活性剤等が入っていない。(B) 精製したPSII-LHCIIのタンパク質組成をSDS/PAGEを用いて確認した。アプライ量は、反応中心であるD1タンパク質で揃えた。

次に、2つの手法で得られた PSII-LHCII のタンパク質組成を比較するため、タンパク質を SDS/PAGE で分離し、CBB 染色を行なった (図 1 B)。A8-35 を用いて精製した PSII-LHCII を α -DDM のみを用いて精製した物と比較すると、PsbP と PsbQ という2つのタンパク質について顕著な差が見られた。ここで、PsbO, P, Q という3つのタンパク質はチラコイド膜の内腔側に存在する表在性のタンパク質であり、水分解の機能を持つマンガクラーを保護する役割を持つ (Minagawa and Takahashi 2014)。ただ、PsbP と PsbQ に関しては PSII との結合が弱い事が知られている (Miyao and Murata 1983, Ono and Inoue 1984)。Amphipol が膜タンパク質を標的とした試薬である事を踏まえると、精製過程でこれらのタンパク質が解離してしまったと考えられる。ここで、 α -DDM は電荷を持たない界面活性剤であり、A8-35 は負電荷を持つ構造である事に注目した。即ち、電荷を持たない Amphipol を使用すれば表在性のタンパク質の保持が可能だと考えた。そこで、電荷を持たない Amphipol である NAPol を用いて PSII-LHCII の精製を行い、表在性タンパク質の有無を確認した (図 2) (Bazzacco et al. 2009, Bazzacco et al. 2012)。

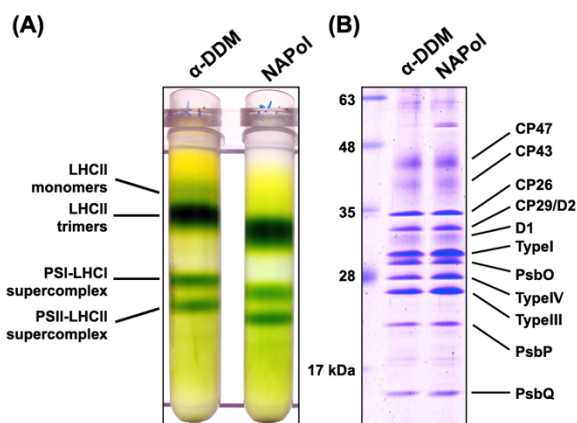


図 2 NAPol を用いた、SDG 法による PSII-LHCII の精製。

(A) クラミドモナスのチラコイド膜を α -DDM で可溶化し、NAPol に置換した。
(B) 精製した PSII-LHCII のタンパク質組成を SDS/PAGE を用いて確認した。

結果として、NAPol に置換した PSII-LHCII は PsbP や PsbQ といった表在性タンパク質も保持していた (図 2 B)。以上から、NAPol を用いた精製法がこの先の構造解析などを考えると最適な方法かと思われた。しかし、本研究を始めた時点では NAPol は市販されておらず、使用量などを考慮すると A8-35 の約 20 倍の費用がかかる事がわかった。そこで、A8-35 を用い、なおかつ表在性タンパク質を保持する事が可能な条件を探した。そこで注目したのがベタインという試薬である。ベタインは正電荷と負電荷を同一分子内に持ち、なおかつ先行研究において PSII の安定化に寄与する事が知られている (Papageorgiou and Murata 1995)。先に記した精製法を全ての溶液に 1 M のベタインを加えた状態で行う事で、表在性タンパク質を保持した PSII-LHCII の精製に成功した (図 3)。

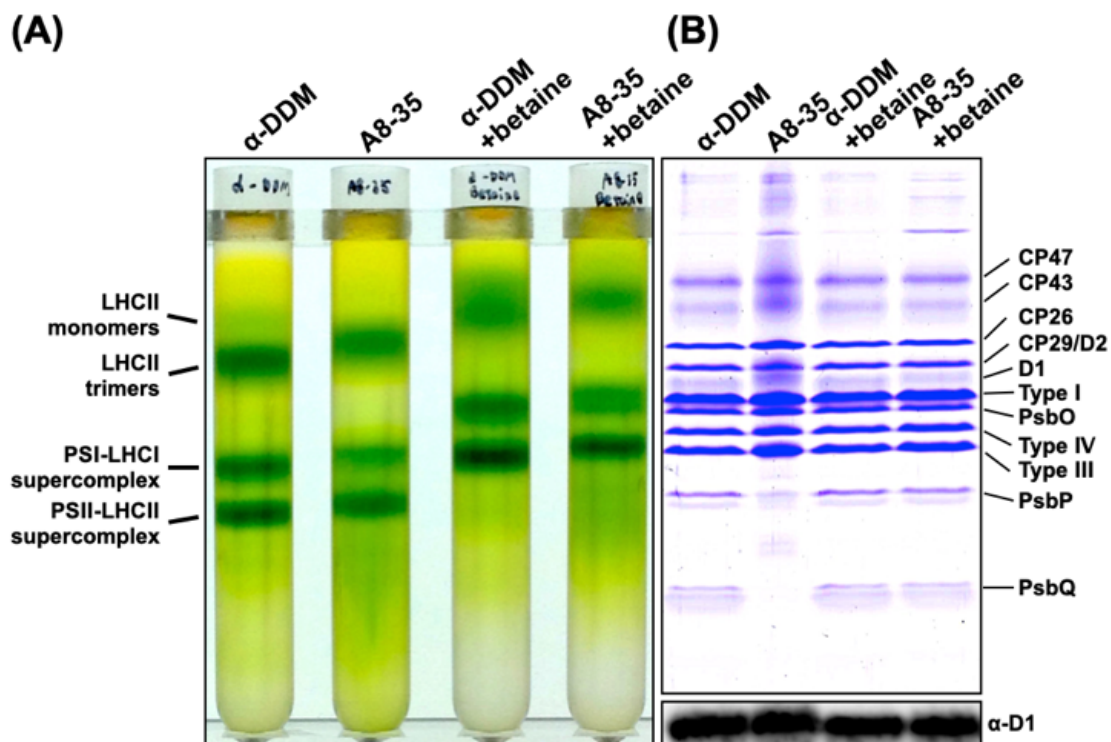


図3 様々な条件下における PSII-LHCII の精製。

(A) クラミドモナスのチラコイド膜を α -DDM で可溶化し、A8-35 に置換した。
+ betaine はベタインを加えた事を意味する。

(B) 精製した PSII-LHCII のタンパク質組成を SDS/PAGE を用いて確認した。

次に、精製した PSII-LHCII の安定性を測定した (図4)。単離 PSII の低温蛍光スペクトル測定において、684 nm 由来の蛍光 (F684) は PSII のコアサブユニットである CP43 タンパク質に、678 nm 由来の蛍光 (F678) はフリーの LHCII タンパク質に由来する (Groot et al. 1999, Andrizhiyevskaya et al. 2005)。測定原理としてはまず LHCII を励起し、PSII-LHCII の形を保っていればエネルギー移動により F684 が、LHCII が解離していれば自家蛍光である F678 が増加する。そこで、F678/F684 の値を時間経過とともに測定した (図4)。 α -DDM を用いて精製したサンプルでは、先行研究にもある通り、時間経過とともに F678/F684 の値が上昇した (図4、青丸) (Kim et al. 2018)。この上昇は、時間経過とともに LHCII が PSII から解離していく様子を反映している。一方で、A8-35 を用いて精製したサンプルでは、96 時間後でも F678/F684 の値に変化は見られなかった (図4、緑四角)。これらの結果から、A8-35 は α -DDM と置換し、その結果として PSII-LHCII の安定性を大幅に向上させる事がわかった。

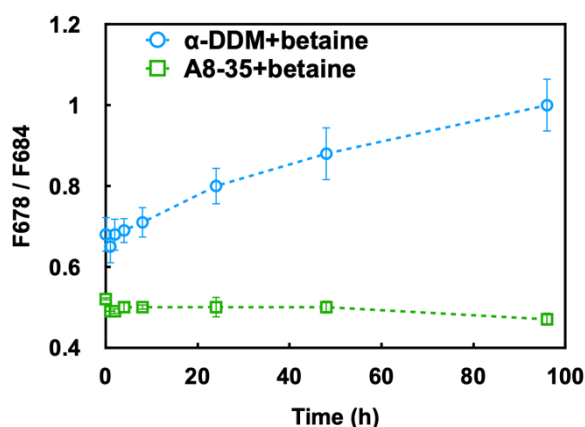


図4 PSII-LHCIIの安定性の測定。
α-DDM + betaine と A8-35 + betaine の条件でそれぞれ精製した PSII-LHCII について、F678/F684 を算出した。測定は 0, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 時間ごとに行なった。値は平均±標準誤差 ($n = 3$)。

A8-35 を用いて精製した PSII-LHCII の安定性と表在性タンパク質の保持が確認出来たので、次に酸素発生活性を測定した。両者の活性を比較すると、A8-35 を用いて精製した PSII-LHCII の方が低い活性を示した (表 1)。

表 1 PSII-LHCII の酸素活性測定。値は平均±標準誤差 ($n = 3$)。

Preparation	酸素発生活性
	$\mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg Chl})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
α-DDM + betaine	272 ± 35
A8-35 + betaine	208 ± 12

しかし、酸素活性測定はクロロフィル量で除した値のため、単純な比較は出来ない。その理由として、A8-35 を用いて精製した PSII-LHCII は α-DDM を用いた物に比べるとより多くの LHCII を保持しており、その結果として見かけ上酸素活性が低くなっている可能性が考えられるからである。そこで、両者の酸素活性を PSII の反応中心である D1 タンパク質あたりで比較するために、ウェスタンブロットを用いて“D1 相関係数”を算出した (図 5)。算出方法としては、クロロフィル量を合わせた PSII-LHCII からそれぞれ D1 タンパク質を定量した。その結果、D1 相関係数は 0.74 ± 0.03 となった (= “A8-35 + betaine”/“α-DDM + betaine”、値は平均±標準誤差、 $n = 3$)。この値で A8-35 を用いて精製した PSII-LHCII の活性を算出し直すと $282 \mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg Chl})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($= 208/0.74$) となり、α-DDM のそれである $272 \pm 35 \mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg Chl})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ とほぼ同等の値となった (表 1)。このことから、A8-35 を用いて精製した PSII-LHCII は安定性に加え、酸素活性も維持している事が示された。



図5 精製した1 μ g Chl の PSII-LHCII に対して、D1 タンパク質のウェスタンブロットを行なった。

最後に、構造的な均一性を評価するため、精製した PSII-LHCII をネガティブ染色法で観察した (図6)。クラミドモナスにおいては、 α -DDM を用いた精製法で $C_2S_2M_2L_2$ 型の PSII-LHCII が報告されている (Tokutsu et al. 2012)。しかし、精製中や精製後に LHCII が徐々に解離し、 $C_2S_2M_2L_2$ 型の割合は高々10%程度であった。一方、今回の A8-35 を用いた精製法では多くの $C_2S_2M_2L_2$ 型の PSII-LHCII が観察された (図6 A)。そこで、 α -DDM と A8-35 のそれぞれの精製法で得られた PSII-LHCII について単粒子解析を行い、粒子数を算出した (図6、表2)。

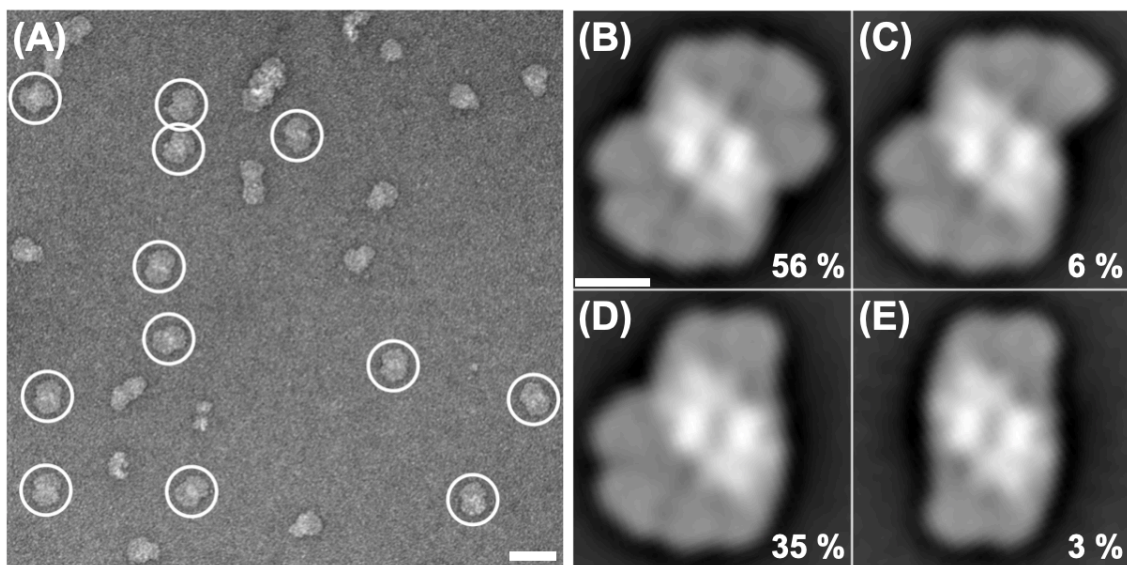


図6 A8-35 を用いて精製した PSII-LHCII を電子顕微鏡で観察した。

(A) 精製した PSII-LHCII をネガティブ染色法で観察した。白丸は $C_2S_2M_2L_2$ 型の PSII-LHCII を表す。スケールバーは 50 nm。

(B-E) 精製した PSII-LHCII の単粒子解析。画像はそれぞれ $C_2S_2M_2L_2$ 型(B)、 $C_2S_2M_2L$ 型(C)、 C_2S_2ML 型(D)、 C_2S_2 型(E)を表す。全体における割合を右下に数字で示した。スケールバーは 10 nm。

表2 本研究と先行研究 (Tokutsu et al. 2012)における PSII-LHCII の粒子数の比較(%)。

	A8-35 + betaine	先行研究
C ₂ S ₂ M ₂ L ₂	8772 (56%)	414 (11%)
C ₂ S ₂ M ₂ L	883 (6%)	267 (7%)
C ₂ S ₂ ML	5536 (35%)	1454 (40%)
C ₂ S ₂ M	N.D.	479 (13%)
C ₂ S ₂	432 (3%)	1066 (29%)
総粒子数	15623	3680

解析の結果から全体の 56%が C₂S₂M₂L₂ 型の PSII-LHCII であり、A8-35 を用いたとはいえ少量の LHCII が解離した C₂S₂M₂L 型、C₂S₂ML 型がそれぞれ 6%と 35%ずつ観察された。以上の結果から、20 μmol photons · m⁻² · s⁻¹ という弱光条件下では、クラミドモナスにおいては C₂S₂M₂L₂ 型の PSII-LHCII が主たる構造であると結論付けた。興味深い事に、陸上植物で主たる構造である C₂S₂M₂ 型の PSII-LHCII は観察されなかった (Caffarri et al. 2009)。クラミドモナスには M トライマーを保持する役割を持つとされる CP24 タンパク質が存在しない事を踏まえると (Minagawa and Takahashi 2014)、L トライマーの解離後すぐに M トライマーも解離し、その結果として A8-35 を使用してもなお C₂S₂M₂L 型や C₂S₂M 型が少ないと考えられる (表2)。PSII と L トライマーの結合様式などは、今後の構造解析によって明らかになると期待される。

■まとめ

本章では、Amphipol を適用したクラミドモナスの PSII-LHCII の精製法について報告した。A8-35 とベタインを併用した精製法は PSII-LHCII の安定性を大幅に向上させ、酸素発生活性も維持していた。目的の構造であった C₂S₂M₂L₂ 型の PSII-LHCII についても 56%と過半数を超えていたため、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析にも有望な精製法であると言える。加えて、室温での安定性にも優れていたため、分光学における解析などにも有用な精製法だと考えられる。精製手法が簡便な事を踏まえると、本精製法は光合成タンパク質のみならず、多くの生物における膜タンパク質精製への利用が期待される。

第2章 クラミドモナスの PSII-LHCII 超複合体の組成に関する研究

■緒言

第1章では、A8-35 と NAPol を用いた PSII-LHCII の精製法について述べた (Watanabe et al. 2019)。その後、NAPol を用いて精製した PSII-LHCII についてクライオ電子顕微鏡を用いて解析し、分解能 5.8 Å の構造を共同研究として報告した (Burton-Smith et al. 2019)。得られた構造からは新たな膜貫通タンパク質の存在が示されたが、LHCII トライマーの組成についての情報は得られなかった。そこで、A8-35 とベタインを併用したサンプルで濃度条件などを再検討して得られる粒子数を増やし、加えて最新の観察機器を用いる事で分解能を 3.4 Å まで向上させることに成功した (Sheng et al. 2019)。しかし、この構造においても LHCII トライマーの組成を決める事は出来なかった。一方で、共同研究者のサンプルにおいて、C₂S₂型の PSII-LHCII は分解能 2.7 Å での解析に成功しており、S トライマーに関しては組成も決定する事が出来た (Sheng et al. 2019)。その構造によれば、S トライマーは LHCBM1 (LHCII TypeIV)、LHCBM2 (LHCII TypeIII)、LHCBM3 (LHCII Type I) の3種で構成されている。ここで、*LhcbM1* の欠損株は *npq5* と呼ばれ、過剰な光を熱エネルギーに変える能力であるクエンチング能力が低い事が知られている (Elrad et al. 2002)。しかし、その詳細な機構は明らかとなっていない。本研究では、*npq5* の PSII-LHCII を精製し野生株の構造と比較する事で、なぜクエンチング能力が低いのかなど、クラミドモナスにおける各種 LHCBM の役割を明らかに出来ると考えた。

■実験手法

株および培養条件

野生株は第1章と同様 137c 株を用いた。変異株は *LhcbM1* 欠損株 (*npq5*) を鎌田このみ博士から分与していただいた。全ての株において、培養条件は第1章に記した物と同様の手法で行った。

チラコイド膜及び PSII-LHCII の精製

全ての株において、第1章に記した A8-35 と betaine を併用した手法で行った (Watanabe et al. 2019)。

SDS/PAGE 及びウェスタンブロット法

精製したタンパク質は 7.5 M の Urea を含む 14% アクリルアミドゲルを用いて解析した。染色には CBB-R250 を用いた。

電子顕微鏡による観察と単粒子解析

第1章に記した物と同様の手法を用いてグリッドを作成した。観察には日本電子社の JEM 1010 を用い、条件は加速電圧 80 kV、倍率 100,000 倍とした。写真の記録にはオリンパス社の Veleta CCD カメラ (2048×2048 ピクセル) を用

いた。単粒子解析には Relion 3.0 パッケージを用いた (Zivanov et al. 2018)

■実験結果および考察

まず初めに、*npq5*株における LHCBM1 の発現確認を行なった (図 1)。TAP 培地で培養した野生株 (WT) と *npq5*株の細胞をそれぞれ回収し、SDS/PAGE を用いて解析した。CBB 染色の結果から、*npq5*株における LHCBM1 の欠損が確認された。

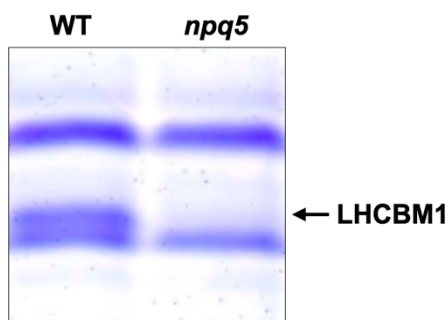


図 1 培養した野生株 (WT) と *npq5*株の細胞をそれぞれ回収し、SDS/PAGE を用いて解析した。

次に、LHCBM1 を欠損した事による PSII-LHCII への影響を確かめるため、精製したチラコイド膜を用いて SDG 法を行なった (図 2 A)。予想に反し、PSII-LHCII のバンドは野生株と遜色なく形成された。当初の予想では、LHCBM1 の欠損によって PSII-LHCII のサイズが小さくなり、複合体が通常バンドよりも上層に形成する事が考えられた。しかし、SDS/PAGE を用いた解析からは、バンドの上層のエリアにおいても小さな PSII-LHCII などは観察されなかった (図 2 B)。以前の共同研究において、PSII-LHCII の S トライマーは LHCBM1, 2, 3 の 3 種類のタンパク質で構成されると報告した (Sheng et al. 2019)。この研究結果と今回の結果を踏まえると、PSII-LHCII のバンドが観察される理由として以下の 2 つの仮説が浮かび上がる。1 つ目は、LHCBM1 が欠損しても、それを LHCII の Type I や III が補完するという仮説である。もう 1 つは、PSII-LHCII がヘテロであり、LHCBM1 が欠損した物に関してもサイズは小さくなるがバンドとしては同じ位置に出るという仮説である。この仮説を確かめるため、電子顕微鏡を用いた解析を行なった。

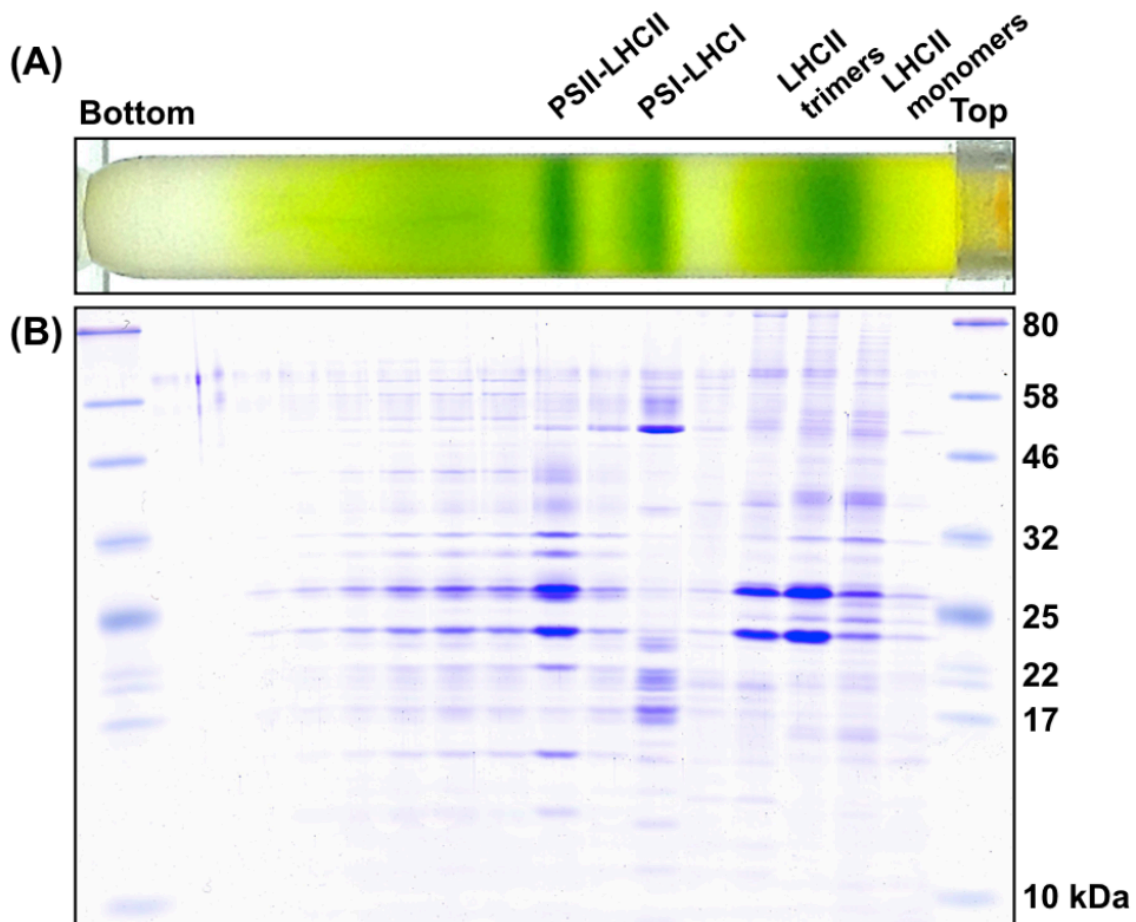


図2 *npq5*から精製したチラコイド膜を用いて、SDG法を行なった。
 (A) 明確なバンドは4本形成され、そのパターンは野生株を用いた先行研究と変わらない見た目を示した (Watanabe et al. 2019)。
 (B) 精製した複合体をSDS/PAGEを用いて解析した。チューブより分離したサンプルから16フラクションを選択し、タンパク質組成の解析を行なった。

単粒子解析を行うため、*npq5*株から精製したPSII-LHCIIをネガティブ染色法で観察した(図3A)。その結果、多くの $C_2S_2M_2L_2$ 型のPSII-LHCIIが観察された。これらの画像に対して単粒子解析を行い、粒子数を算出した(図3B-E、表1)。まず $C_2S_2M_2L_2$ 型のPSII-LHCIIにおける形状であるが、2次元構造のため分解能に限界はあるものの、野生型と比較して顕著な差は見られなかった(図3B) (Watanabe et al. 2019)。次にPSII-LHCIIにおける各型の構成割合であるが、これも野生株と大差は見られなかった(表1)。このことから、先の「LHCBM1が欠損した物に関してサイズは小さくなるが、バンドとしては同じ位置に出る」という仮説は否定された。即ち、クラミドモナスのPSII-LHCIIに関しては、LHCBM1が欠損してもそれをLHCIIのType IやIIIが補完していると予想され

る。一方で、PSIの集光タンパク質であるLHCIは欠損しても補完が見られない事から、発現制御機構などの更なる研究が期待される (Kubota-Kawai et al. 2019)。

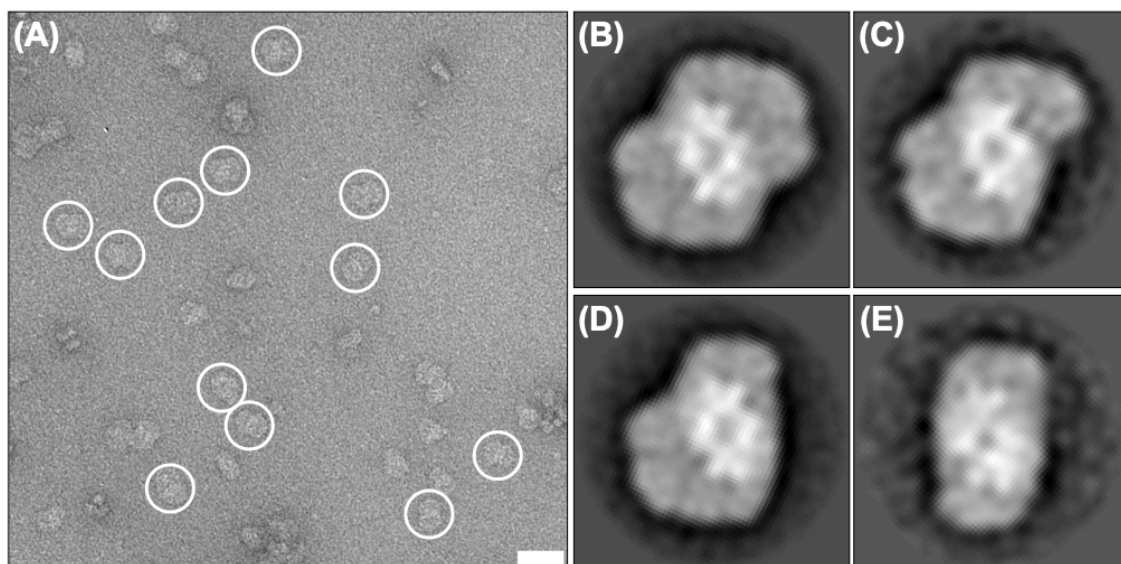


図3 *npq5*から精製したPSII-LHCIIを電子顕微鏡で観察した。

(A) 精製したPSII-LHCIIをネガティブ染色法で観察した。白丸は $C_2S_2M_2L_2$ 型のPSII-LHCIIを表す。スケールバーは50 nm。

(B-E) 精製したPSII-LHCIIの単粒子解析。画像はそれぞれ $C_2S_2M_2L_2$ 型(B)、 $C_2S_2M_2L$ 型(C)、 C_2S_2ML 型(D)、 C_2S_2 型(E)を表す。スケールバーは10 nm。

表1 *npq5*と野生株 (WT) (Watanabe et al. 2019)におけるPSII-LHCIIの粒子数の比較 (%)。値は平均±標準誤差 ($n=3$)。

	<i>npq5</i>	WT (先行研究)
$C_2S_2M_2L_2$	59.7 ± 3.9%	56%
$C_2S_2M_2L$	4.0 ± 2.8%	6%
C_2S_2ML	32.7 ± 6.3%	35%
C_2S_2	3.0 ± 0.0%	3%

ただ、野生株と *npq5* 株において見た目は $C_2S_2M_2L_2$ 型で同じであるが、PSII-LHCIIの安定性においては違いがあると推測される。Ferranteらの報告によれば、*npq5*株のチラコイド膜を非変性ゲルで分離したところ、野生株と比較してPSII-LHCIIのバンドは薄くなり、フリーのLHCのバンドが濃くなっていた (Ferrante et al. 2012)。この事は、*npq5*株では野生株と比べて $C_2S_2M_2L_2$ 型の

割合が減っている事を意味する。一方で、Amphipol を用いて精製を行なった本研究では、野生株との間に顕著な差は見られなかった（表1）。この事から、LHCBM1 が LHCII の Type I や III に置き換わる事で PSII-LHCII の安定性は低下するが、その寄与は Amphipol を用いる事により消失したと考えられる。この原因の1つとして考えられるのが、S トライマーと PSII の間に存在する脂質の影響である。以前の共同研究において、LHCBM1 に特異的な配列である Phe40 と Trp41 がジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG) の安定化に寄与していると報告した（図4）(Sheng et al. 2019)。この安定化作用は LHCII の Type I や III に置き換わる事で低下すると考えられ、ひいては先行研究にあるような PSII-LHCII のサイズが小さくなる事につながると考えられる (Ferrante et al. 2012)。残念ながら満足な分解能を得る事が出来なかったために、M、L トライマーのタンパク質の帰属は出来ていない。今後、より良い分解能での構造を明らかにする事で、クラミドモナスの PSII-LHCII におけるそれぞれの LHCBM タンパク質の役割を明らかに出来ると期待される。

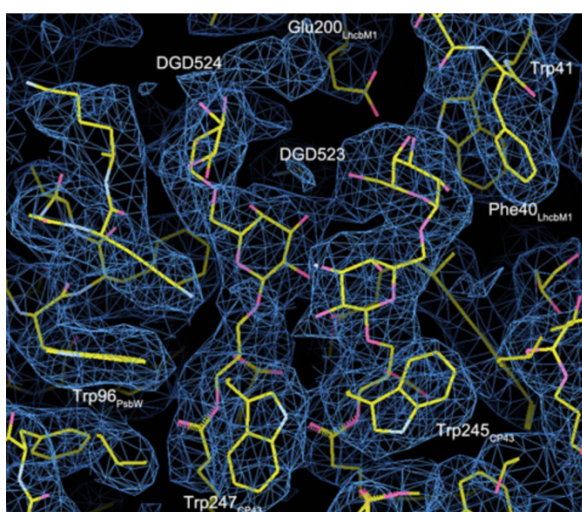


図4 LHCBM1 とガラクト脂質の相互作用。

2つの DGDG 分子 (DGD523 と DGD524) が LHCBM1 と CP43、PsbW に挟まれている様子を図示した。図は Sheng et al. 2019 より引用した。

■まとめ

本章では、*LhcbM1* 欠損株を用いて PSII-LHCII のより詳細な解析を試みた。先行研究と違い、LHCBM1 が欠損しても野生株と同量の $C_2S_2M_2L_2$ 型の PSII-LHCII が形成された。残念ながら、今回の研究からは *npq5* のクエンチング能力の低さの原因は明らかにする事が出来なかった。今後の議論には *npq5* 由来の PSII-LHCII に関してもより高分解能の構造が必須である。また、各種 LHCBM の欠損株から精製した PSII-LHCII の構造解析も合わせて行う事で、クラミドモナスにおけるそれぞれの LHCBM タンパク質の役割を明らかに出来ると期待される。

第3章 陸上植物における PSII 複合体の構造変化を介した光環境適応

■緒言

植物にとって光は重要なエネルギー源であるが、自然環境下においてその量と質は刻一刻と変動する (Külheim et al. 2002)。そのため、陸上植物は光合成タンパク質を制御する事で様々な光条件に対処している (Demmig-Adams and Adams 1992)。光合成の主要なプロセスである集光反応は、降り注ぐ光の強度に応じて集光タンパク質の数を調整する事で最適化されている (Wada et al. 2003, Walters 2005)。陸上植物では、弱光条件下において PSII-LHCII が連なった semi-crystalline array と呼ばれる構造が形成される事が知られている (Simpson 1978)。その一方で、強光条件下においてはこの構造は形成されず、PSII-LHCII の単量体が主たる構造となっている (Kirchhoff et al. 2007)。この構成変化については、チラコイド膜における拡散を克服するためや (Tietz et al. 2015)、光防御のためであるとして長らく議論されてきた (Kereiche et al. 2010)。しかし、技術的な困難もあり、semi-crystalline array の特性や役割は明らかにはなっていなかった。

NPQ は過剰に吸収された光エネルギーを安全に散逸させるために必要な光防御機構である。そのうちの1つである qE は、水の分解によって生じたプロトンの影響でチラコイド膜の内腔が酸性化する事によって引き起こされる (Li et al. 2009, Ruban et al. 2012)。陸上植物では、キサントフィルサイクル色素と PsbS が qE の重要な因子となっている (Li et al. 2009)。これまでに、マイナー LHCII におけるクロロフィル (Chl) 二量体とゼアキササンチン (Zea) やルテイン (Lut) 内の電荷移動や (Ahn et al. 2008, Avenson et al. 2009)、LHCII における Chl クラスターから Lut への励起移動が qE に寄与すると提唱されてきた (Ruban et al. 2007)。一方で、これらカロテノイドを介さないモデルも存在し、その中では LHCII の Chl 二量体内で電荷移動が起こるとされている (Müller et al. 2010)。強光条件下では、チラコイド膜の内腔が酸性化する事により PsbS とビオラキササンチンデエポキシダーゼが活性化され、ビオラキササンチン (Vio) が Zea に変換される (Li et al. 2009, Ruban et al. 2012)。PsbS と Zea は PSII-LHCII の再編成と LHCII の凝集を促進し (Kiss et al. 2008, Betterle et al. 2009, Ruban et al. 2012)、その結果、semi-crystalline array の構成が変化する事で NPQ が調節されると示唆されている (Ruban et al. 2012)。

これらの複雑な機構の一端を明らかにするために、まずは semi-crystalline array の特性を明らかにする事を考えた。そこで本研究では、第1章で報告した精製法を用いる事でホウレンソウから semi-crystalline array 様の PSII-LHCII を精製し (Watanabe et al. 2019)、単量体構造との比較を行う事でその特性の

解明を試みた。

■実験手法

チラコイド膜の精製

ホウレンソウはスーパーマーケットで購入し、光の当たらない室温条件下で2日程保管して用いた。保管後に光を照射した葉については、照射後に液体窒素を用いて瞬時に凍結し、市販のブレンダーを用いて破碎した。破碎以後のチラコイド膜精製に関しては、第1章に記したクラミドモナスと同様の手法で行った。シロイヌナズナについては、野生株と *PsbS* 欠損株 (*npq4*) をそれぞれ高橋俊一博士から分与していただいた。強光処理に関しては、光量は $1,000 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ とした。

PSII の精製

陸上植物由来のチラコイド膜はクラミドモナスのそれと同様に扱う事ができるため、第1章に記した A8-35 と betaine を併用した精製手法を用いた (Watanabe et al. 2019)。

SDS/PAGE 及びウェスタンブロット法

SDS/PAGE とウェスタンブロッティングに関しては、第1章に記した様に先行研究を参考に行った (Iwai et al. 2008)。CBB 染色に関しては、精製したタンパク質をそれぞれ $1.0 \mu\text{g Chl}$ ずつ SDS/PAGE にアプライした。ウェスタンブロッティングに用いるサンプルに関しては、精製したタンパク質をそれぞれ $0.3 \mu\text{g Chl}$ ずつ SDS/PAGE にアプライした。D1 タンパク質と *PsbS* タンパク質に対する抗体は Agrisera 社から購入した (D1 : AS05-084、*PsbS* : AS09-533)。PsaA タンパク質に対する抗体は先行研究で用いられている物を使用した (Iwai et al. 2008)。タンパク質の定量には Bio-Rad 社の IMAGE LAB を用いた。

電子顕微鏡による観察と単粒子解析

第1章に記した物とほぼ同様の手法を用いてグリッドを作成した。その際、精製した各種 PSII を 25 mM MES バッファーを用いてそれぞれ $2 \mu\text{g Chl} \cdot \text{mL}^{-1}$ となるよう希釈した。観察には日本電子社の JEM 1010 を用い、条件は加速電圧 80 kV 、倍率 $150,000$ 倍とした。写真の記録にはオリンパス社の Veleta CCD カメラ (2048×2048 ピクセル) を用いた。PSII-LHCII supercomplex に関しては 100 枚、PSII-LHCII megacomplex に関しては 400 枚、PSII-LHCII arraycomplex に関しては 600 枚の画像を取得し、Relion 2.1 パッケージを用いて単粒子解析を行った (Kimanius et al. 2016)

色素組成分析

精製した各種 PSII からの色素抽出には 80% アセトンを用い、Waters 社の UPLC を用いて分析した。詳細な条件は先行研究に従った (Tokutsu et al. 2013)。

蛍光寿命測定

時間相関単一光子計数法による蛍光寿命の測定には HORIBA 社の FluoroCube を用いた。測定は常温で行った。クロロフィルの励起には 441 nm の波長を用い、発光スペクトルは 685 nm で観察した。

■実験結果および考察

陸上植物の中で最適な試料を検討するため、光合成研究においてよく用いられるホウレンソウとシロイヌナズナを用いた。バンドパターンのコントロールにはクラミドモナスを用い、それぞれチラコイド膜を精製して A8-35 を用いた SDG 法によって複合体の精製を行なった (図 1) (Watanabe et al. 2019)。ここで、クラモドモナスにおいては PSII ダイマーに対して LHC モノマー相当のタンパク質が $C_2S_2M_2L_2$ 型の場合には 22 個結合する (Tokutsu et al. 2012, Sheng et al. 2019)。一方で、陸上植物では PSII ダイマーに対して LHC モノマー相当のタンパク質が $C_2S_2M_2$ 型の場合には 18 個結合する (Caffarri et al. 2009, Su et al. 2017)。図 1 を見ると、LHCII トライマーはほぼ同じ高さにバンドが現れているが、ホウレンソウとシロイヌナズナの PSII-LHCII のバンドはクラミドモナスの物と比べるとやや上に生じている。この事は、先に記した PSII に結合する LHC タンパク質の個数と一致する。ここで、ホウレンソウとシロイヌナズナを比較すると、ホウレンソウでは PSII-LHCII と予想されるバンドの下にさらにバンドが 2 本以上生じている。一方で、シロイヌナズナにおいては新たなバンドは 1 本しか生じていない様に見受けられる。新たな複合体を精製するという観点から、本研究ではホウレンソウを用いる事とした。

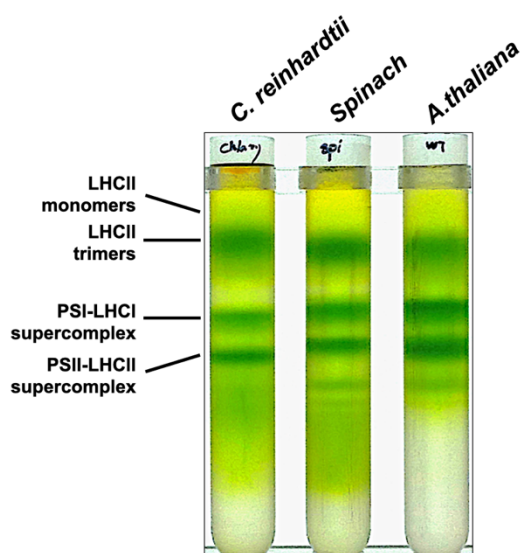


図 1 A8-35 を用いた、SDG 法による PSII-LHCII の精製。

クラミドモナス (*C. reinhardtii*)、ホウレンソウ (*Spinach*)、シロイヌナズナ (*A. thaliana*) 由来のチラコイド膜を α -DDM で可溶化し、A8-35 に置換する事で複合体を精製した。

ホウレンソウの SDG 法による精製では、A1 から A5 に示す 5 本のバンドが観察された (図 2 A)。これらのバンドのタンパク質組成を SDS/PAGE を用いて

解析したところ、A1, A2, A3 バンドはそれぞれ LHCII、PSI-LHCI、PSII-LHCII であると予測された (Caffarri et al. 2009)。一方、クラミドモナスでは観察されない A4, A5 バンドに関しては、タンパク質組成を見ると PSII-LHCII である A3 バンドとほぼ同一であった (図 2 B)。このことから、A4 に関してはすでに報告のある PSII-LHCII megacomplex であり (Nosek et al. 2017)、A5 に関してはさらに大きな PSII-LHCII の複合体ではないかと考えた。興味深い事に、A4, A5 バンドはホウレンソウに強光照射をしたサンプルでは消失した (図 2 A)。この事は、PSII-LHCII megacomplex やそれより大きな複合体は弱光条件下においてのみ安定的に存在する事を意味する。以上の結果を踏まえると、第 1 章に記した A8-35 を用いた安定的な精製法を用いる事で、semi-crystalline array に由来するであろう PSII-LHCII の複合体を精製出来たと結論付けた。

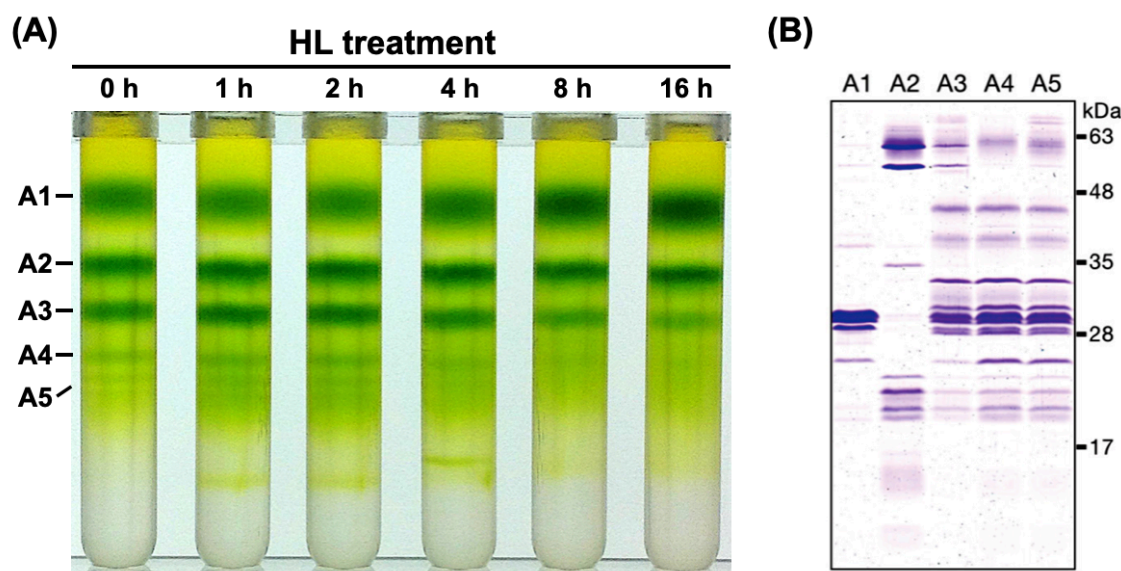


図 2 ホウレンソウから精製したチラコイド膜を用いて、SDG 法を行なった。
 (A) 弱光におけるサンプル (0 h) と、強光処理を行なったサンプルを比較した。処理はそれぞれ 1, 2, 4, 8, 16 時間行なった。
 (B) 精製した複合体をそれぞれ 1 μ g Chl 取り、SDS/PAGE を用いて解析した。

次に、上記の予想を確かめるために、A3-5 バンドをネガティブ染色法で観察した (図 3)。タンパク質組成から予測された通り、A3 バンドは PSII-LHCII であった (図 3 A) (Caffarri et al. 2009)。また、A4 バンドに関してもすでに報告のある PSII-LHCII megacomplex と思われる構造が観察された (図 3 B) (Nosek et al. 2017)。一方で、A5 バンドにおいては PSII-LHCII が 3 つ連なった構造が観察された (図 3 C)。

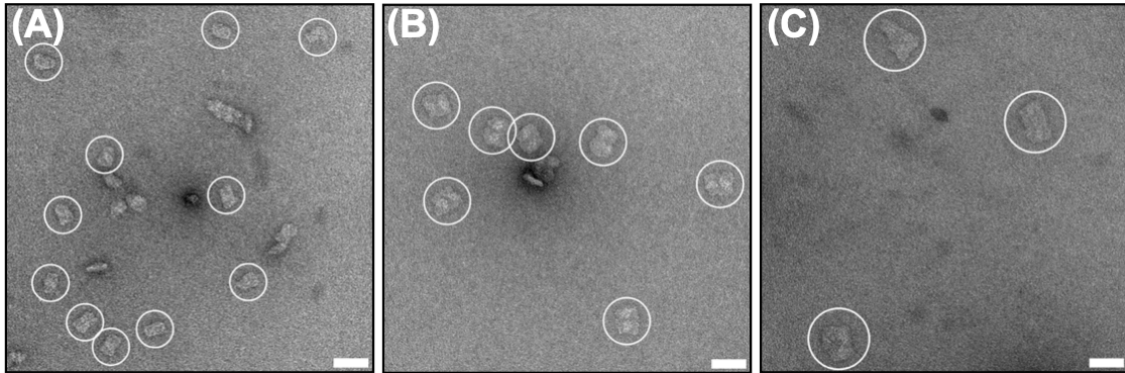


図3 精製したPSIIをネガティブ染色法で観察した。
(A-C)はそれぞれA3-5バンドに対応する。白丸はPSIIを示す。スケールバーは50 nm。

これらの構造をより詳細に解析するために、得られた画像について単粒子解析を行い、既存のPDBモデルを重ね合わせた(図4-10)(PDB:5XNM, Su et al. 2017)。まず、PSII-LHCIIにおいては4種のクラスが観察された(図4)。PDBモデルを当てはめるとC₂S₂M型の構造が最も多く(図4、5)、これは先行研究の結果とも一致する(Boekema et al. 2000)。以後、この構造をPSII-LHCII supercomplexと呼ぶ。

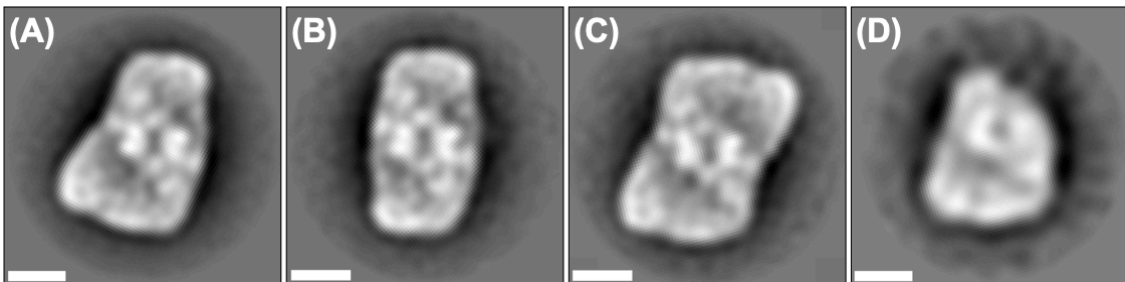


図4 A3バンドの単粒子解析結果。
それぞれの割合は以下の様であった。(A) 50.2%, (B) 29.4%, (C) 16.1%, (D) 4.2%。スケールバーは10 nm。

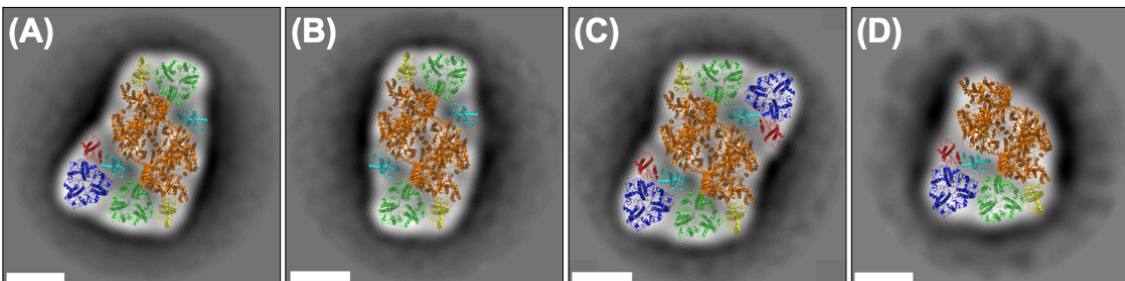


図5 A3バンドの単粒子解析結果にタンパク質をアサインした(PDB:5XNM)。
橙色はPSII反応中心、黄色はCP26、水色はCP29、赤色はCP24、緑色はLHCII-S トライマー、青色はLHCII-M トライマーを表す。スケールバーは10 nm。

次に、PSII-LHCII megacomplex と予想される構造について解析した。単粒子解析によるクラス分けでは、10種のクラスに分類された(図6、7)。得られた構造は、先行研究で報告された物とほぼ同じ構造をしていた(Nosek et al. 2017)。以後、この構造をPSII-LHCII megacomplex と呼ぶ。ここで、陸上植物におけるPSII-LHCII megacomplex には2種類ある事が知られている。1つは、本研究に記す様なチラコイド膜上で複合体が形成される構造である。もう1つは、チラコイド膜間で複合体を形成するPSII-LHCII megacomplex である(Albanese et al. 2016, Albanese et al. 2020)。この構造は“サンドイッチ構造”と呼ばれ、クラミドモナスにおいても α -DDM を用いた精製法では確認出来た(Burton-Smith et al. 2019)。一方、Amphipol を用いた精製法ではこの“サンドイッチ構造”は確認出来ていない(Burton-Smith et al. 2019, Sheng et al. 2019)。この理由については現時点ではわからないが、今回の精製においても“サンドイッチ構造”は確認出来なかった。

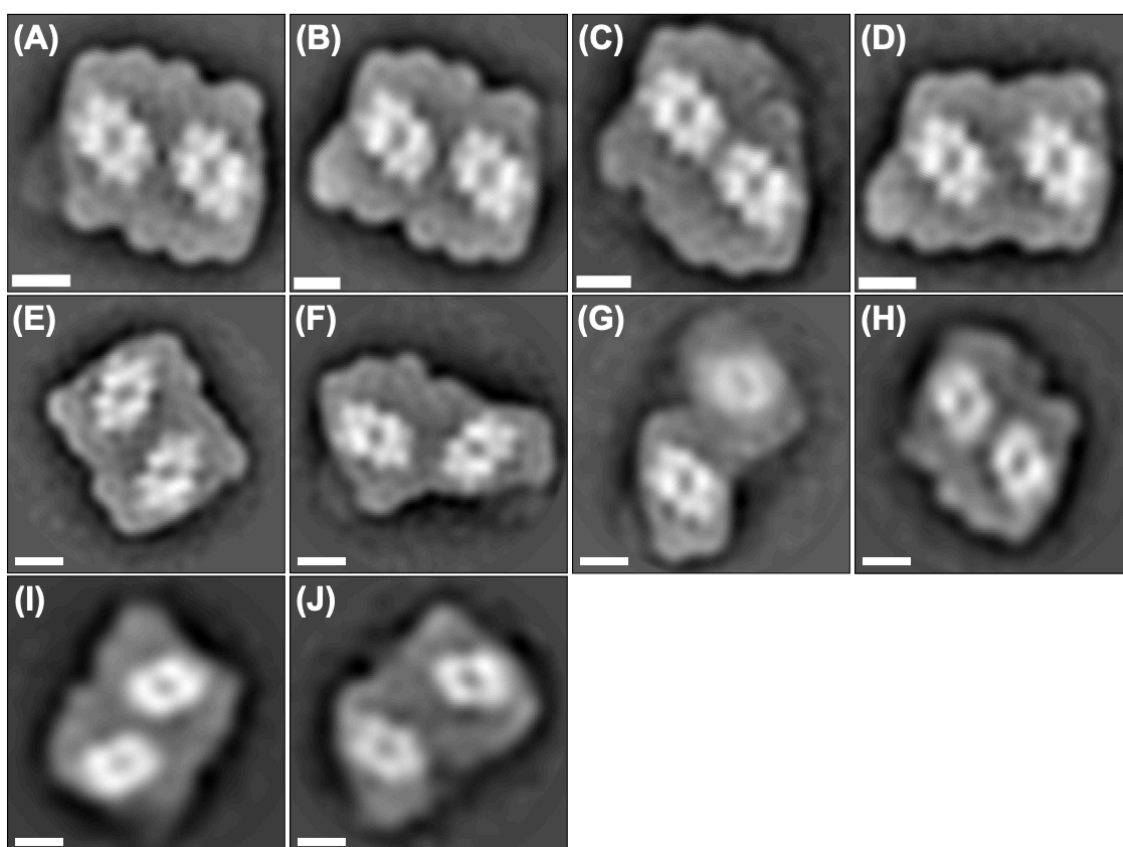


図6 A4バンドの単粒子解析結果。

それぞれの割合は以下の様であった。(A) 23.6%, (B) 19.8%, (C) 10.3%, (D) 10.0%, (E) 9.1%, (F) 8.4%, (G) 6.0%, (H) 5.8%, (I) 4.0%, (J) 2.9%。スケールバーは10 nm。

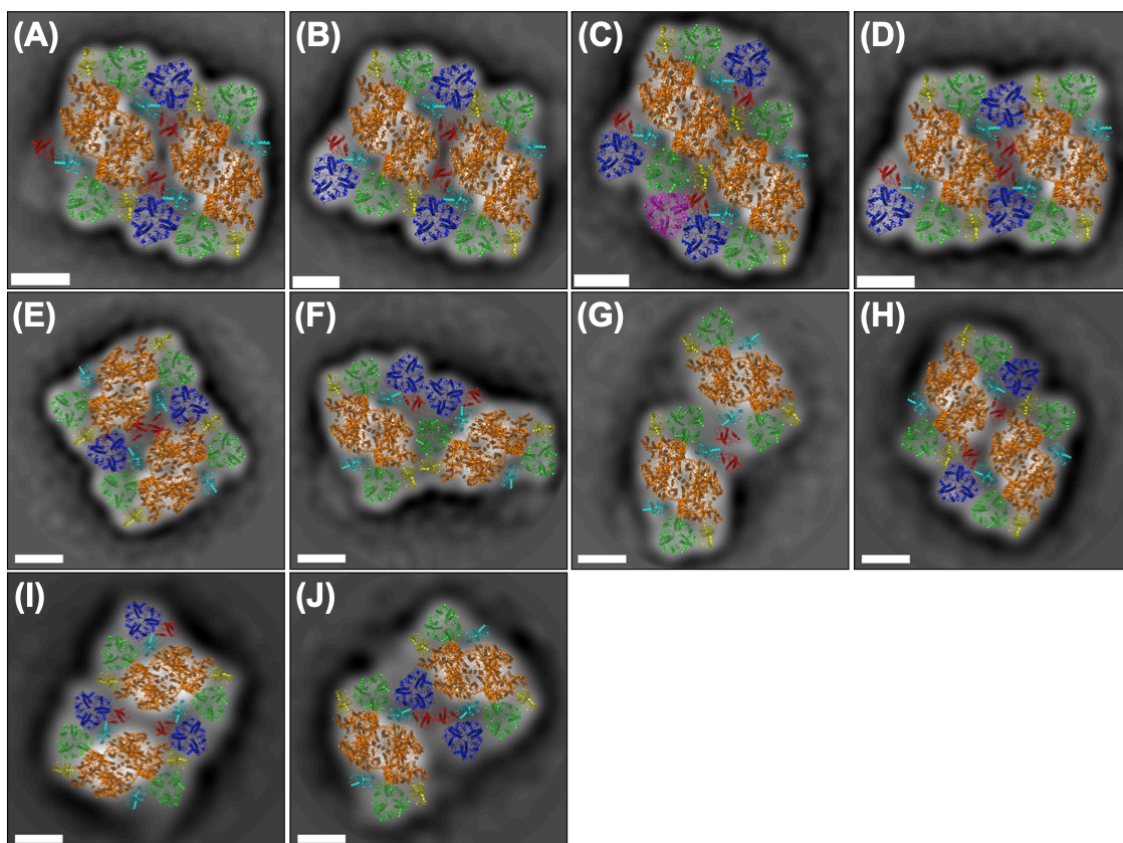


図7 A4バンドの単粒子解析結果にタンパク質をアサインした(PDB:5XNM)。橙色は PSII 反応中心、黄色は CP26、水色は CP29、赤色は CP24、緑色は LHCII-S トライマー、青色は LHCII-M トライマー、紫色は新規の LHCII トライマーを表す。スケールバーは 10 nm。

最後に、これまでに報告の無いより大きな PSII-LHCII の複合体について解析を行なった。単粒子解析によるクラス分けでは、12 種のクラスに分類された (図 8)。得られた解析画像にタンパク質をアサインした結果、全ての構造において PSII-LHCII supercomplex を 3 つ置くことが出来た (図 9)。様々な結合角度を持つこの構造は、先に記したように弱光でのみ安定的に存在する (図 2A)。この事から、A8-35 による安定効果で semi-crystalline array の一部を精製する事が出来たと考え、PSII-LHCII arraycomplex と名付けた。この PSII-LHCII arraycomplex の特徴としては、新規の LHCII トライマーを多く含む事が挙げられる (図 9 E, F, J, K)。

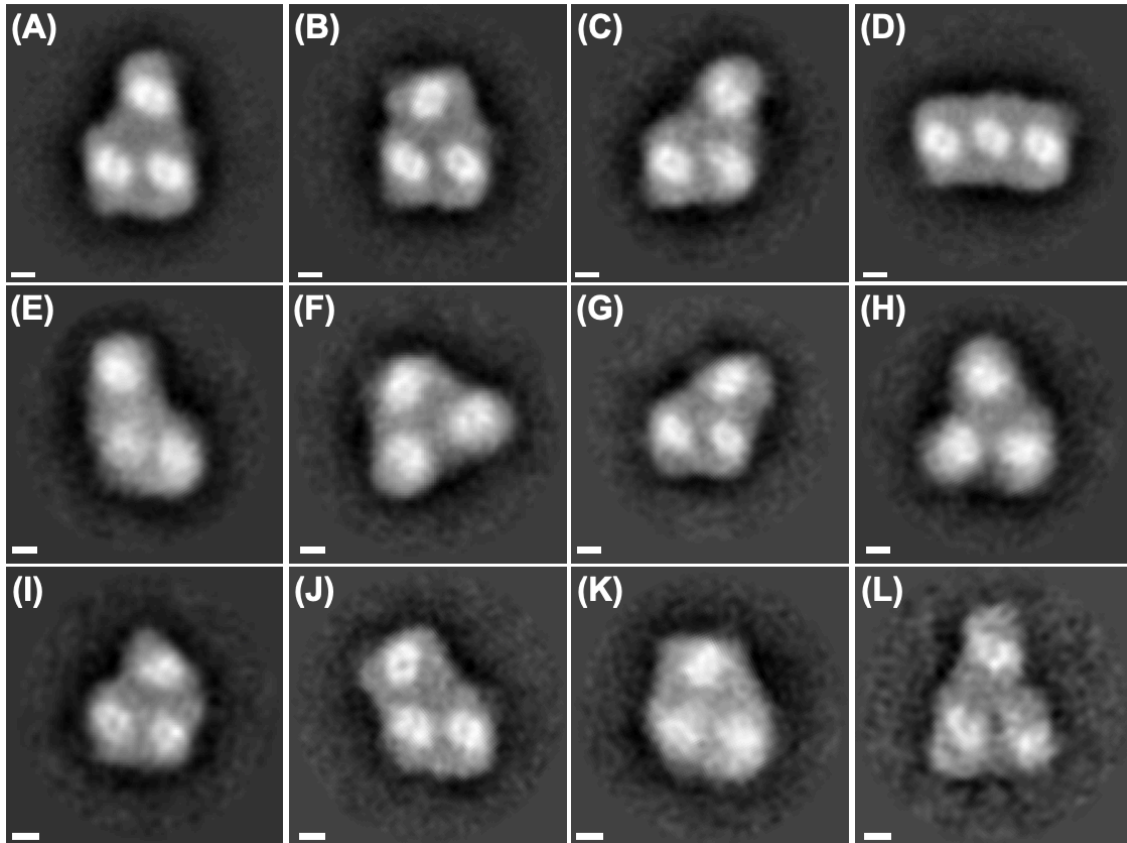


図8 A5バンドの単粒子解析結果。

それぞれの割合は以下の様であった。(A) 21.0%, (B) 17.1%, (C) 12.7%, (D) 8.0%, (E) 7.9%, (F) 7.2%, (G) 5.7%, (H) 5.4%, (I) 5.0%, (J) 5.0%, (K) 3.4%, (L) 1.6%。スケールバーは 10 nm。

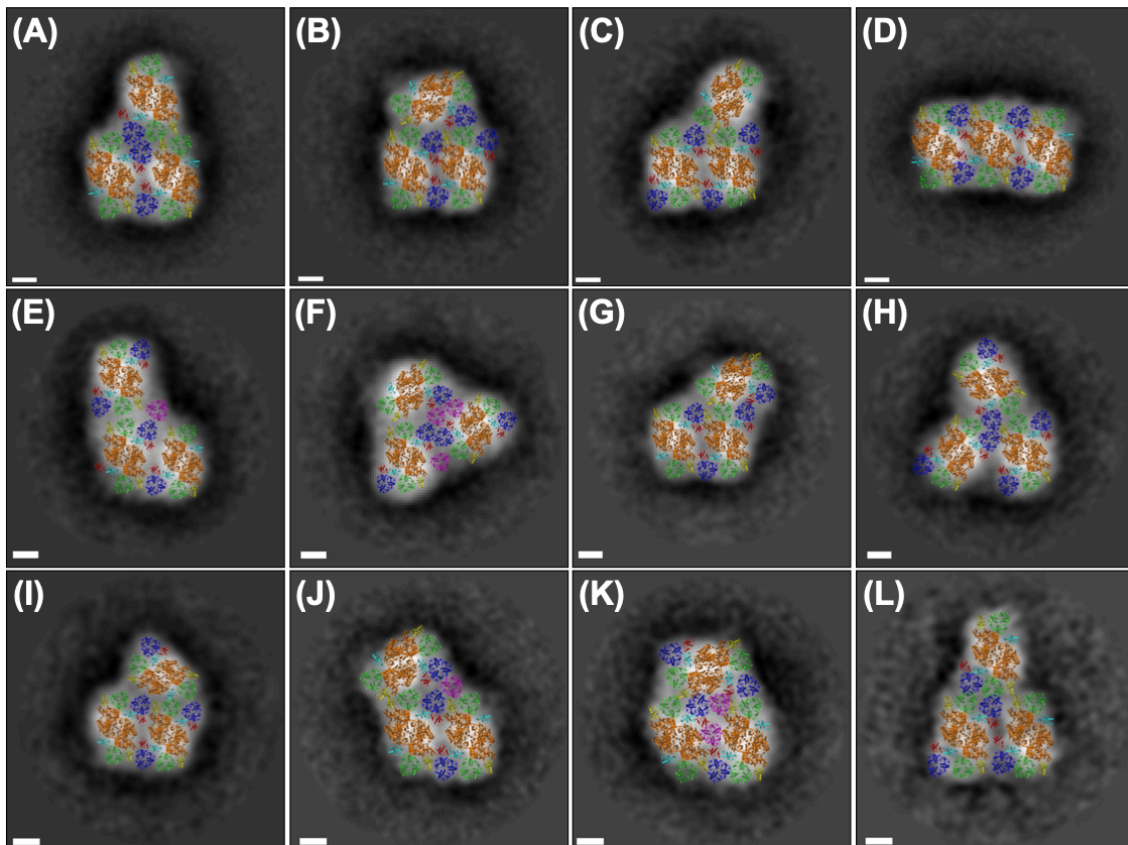


図9 A5バンドの単粒子解析結果にタンパク質をアサインした(PDB:5XNM)。橙色は PSII 反応中心、黄色は CP26、水色は CP29、赤色は CP24、緑色は LHCII-S トライマー、青色は LHCII-M トライマー、紫色は新規の LHCII トライマーを表す。スケールバーは 10 nm。

3種の PSII は、光の強さでどれが主たる構造か変化する (図 2 A)。特に強光条件では、PSII-LHCII megacomplex と arraycomplex は減少する一方で PSII-LHCII supercomplex は増加している。このことから、3種の PSII のクエンチング能力、すなわち過剰な光を熱エネルギーに変える能力に差があるのではないかと考えた。そこで、3種の PSII の蛍光寿命を測定する事でクエンチング能力を算出した (図 10、表 1)。クエンチング能力を算出するために、まず中性条件 (pH 7.5) と酸性条件 (pH 5.5) における蛍光寿命を測定した (図 10)。すると、PSII-LHCII supercomplex (A3) の酸性条件において顕著に短い蛍光寿命が観察された。これらの値を用いて、 NPQ_{calc} を算出した (表 1) (Kosuge et al. 2018)。 NPQ_{calc} の値は PSII-LHCII supercomplex が 0.79 であるのに対し、PSII-LHCII megacomplex (A4) と arraycomplex (A5) はそれぞれ 0.22, 0.27 と supercomplex のそれよりも低い値であった (表 1)。この事は、PSII-LHCII supercomplex は他の 2 種よりも pH 5.5 において光を捨てる能力が高い事を意

味し、実際に強光条件下で PSII-LHCII supercomplex が増加している事実と一致する (図 2)。

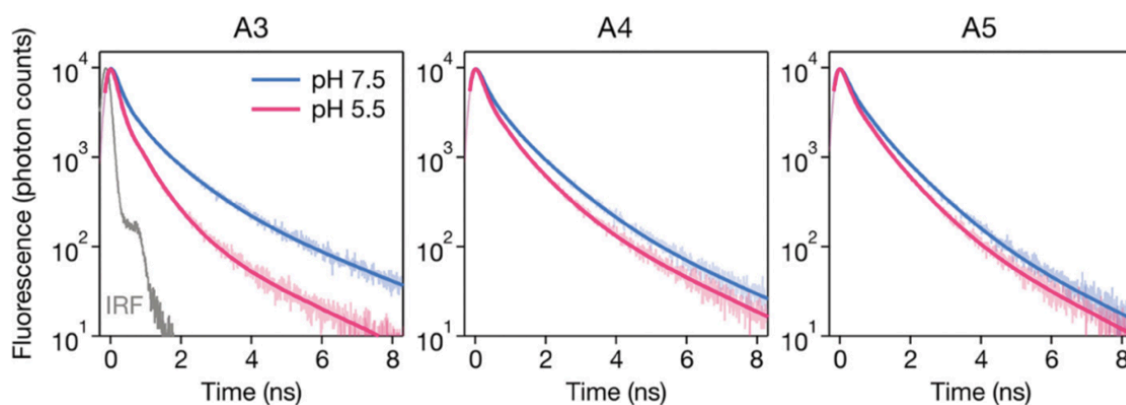


図 10 各種 PSII における蛍光寿命の測定。

441 nm の波長で励起したサンプルの蛍光減衰を 685 nm の波長で測定した。青線は pH 7.5 を、赤線は pH 5.5 をそれぞれ表す。

表 1 各種 PSII における蛍光寿命と pH 依存のクエンチング。値は平均±標準誤差 ($n = 4$)。

	pH	τ_1	a_1	τ_2	a_2	τ_3	a_3	$\tau_{ave.int}$	NPQ _{calc}
A3	7.5	0.20	0.80	0.82	0.18	2.59	0.02	0.87 (\pm 0.07)	0.79 (\pm 0.22)
	5.5	0.15	0.86	0.59	0.13	2.15	0.01	0.49 (\pm 0.02)	
A4	7.5	0.23	0.71	0.90	0.26	2.57	0.03	0.95 (\pm 0.02)	0.22 (\pm 0.06)
	5.5	0.20	0.77	0.79	0.21	2.41	0.02	0.77 (\pm 0.02)	
A5	7.5	0.27	0.64	0.98	0.33	2.56	0.02	0.92 (\pm 0.01)	0.27 (\pm 0.05)
	5.5	0.23	0.74	0.84	0.24	2.34	0.02	0.73 (\pm 0.02)	

次に、PSII-LHCII supercomplex におけるクエンチング能力の高さが何に由来するのかを考察した。その中で、1) PsbS と Zea の量が異なる 2) PSII-LHCII supercomplex ではよりクエンチングサイトが露出しているという 2つの可能性を考えた。1つ目に関しては、PsbS は PSII-LHCII supercomplex に結合し、Zea と協同して pH 依存の NPQ に寄与する事が知られている (Correa-Galvis et al. 2016, Wei et al. 2016)。そこで、各種 PSII について反応中心である D1 タンパク質あたりの PsbS の量を測定した。それに先立ち、購入した PsbS に対する抗体の特異性を、シロイヌナズナの *PsbS* 欠損株 (*npq4* 株) を用いて確認した (図 1 1 A)。PSII-LHCII megacomplex と arraycomplex における PsbS の量は、supercomplex に対してそれぞれ $104 \pm 9\%$ と $91 \pm 10\%$ であり、顕著な差は観察されなかった (図 1 1 B)。なお誤差は標準誤差であり、 $n = 3$ で算

出した。また、本研究で用いたサンプルは弱光条件における物のため、Zea は検出されなかった (表 2)。

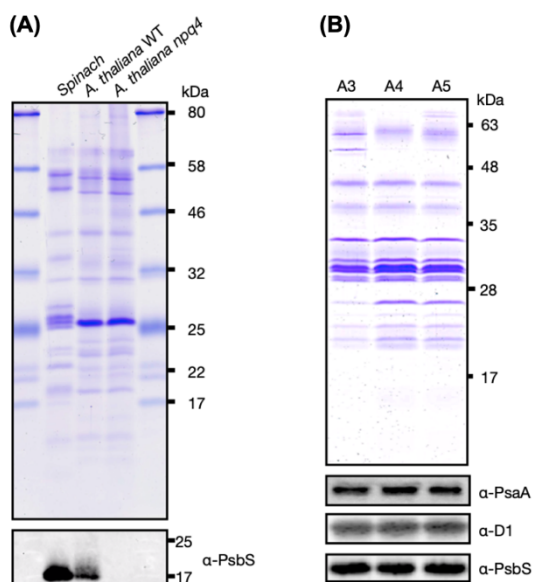


図 1.1 PsbS の定量

(A) 抗体の特異性をホウレンソウ (*Spinach*)、シロイヌナズナの野生株 (*A. thaliana* WT)、*PsbS* 欠損株 (*A. thaliana npq4*) 由来のチラコイド膜を用いて確認した。

(B) 各種 PSII をそれぞれ 1.0 μ g Chl 取り、SDS/PAGE を用いて解析した。D1 と PsbS に対してウェスタンブロットを行い、量を比較した。

表 2 各種 PSII における色素組成 (mmol/mol Chl *a*)。値は平均 \pm 標準誤差 ($n = 3$)。

	Chl <i>b</i>	Chl <i>a/b</i>	Lut	Vio	Zea	Neo	β -caro
A3	321 \pm 0	3.11 \pm 0.00	129 \pm 6	45 \pm 11	N.D.	45 \pm 4	77 \pm 13
A4	327 \pm 2	3.06 \pm 0.02	136 \pm 4	51 \pm 16	N.D.	45 \pm 3	67 \pm 3
A5	345 \pm 3	2.90 \pm 0.02	150 \pm 4	56 \pm 16	N.D.	51 \pm 3	61 \pm 10

2つ目の可能性に関して、先行研究では CP29 がクエンチングサイトとして働く事が提唱されている (Betterle et al. 2009)。単粒子解析における構造を用いて、クエンチングサイトとして働く事が出来そうな、外部に露出している CP29 の量を計算した。その結果、PSII ダイマーあたりそれぞれ 1.09 個 (supercomplex)、0.78 個 (megacomplex)、0.72 個 (arraycomplex) と差が見られた (図 5、7、9)。この結果から、組成は同じ PSII-LHCII であっても、タンパク質相互作用などによりクエンチングに関する能力を変化させていると結論付けた。

最後に、これらの各種 PSII の集光能力を共同研究で明らかにした。詳細は省略するが、PSII-LHCII megacomplex と arraycomplex における集光能力は supercomplex に対して、pH7.5 ではそれぞれ 1%と 21%、pH5.5 ではそれぞれ 41%と 59%高かった (Kim et al. 2020a)。この結果から、PSII-LHCII は多量体を形成する事でその集光能力を上げている事が明らかとなった。

以上の結果を踏まえ、陸上植物の光適応における構造変化のモデルを提唱した (図 1 2)。弱光条件では PSII は semi-crystalline array を形成しており、この構造は集光に適している。ここに強い光が当たると PSII-LHCII supercomplex へと解離していき、クエンチングに適した構造を取る。その際、一部の LHCII は PSII-LHCII から解離すると考えられる (図 2 A)。この解離現象は先行研究でも報告されており (Betterle et al. 2009, Ruban et al. 2012)、これらの LHCII が凝集したオリゴマーも pH 依存のクエンチングを引き起こすとされている (Kiss et al. 2008, Ruban et al. 2012)。以上のようなチラコイド膜上での構造変化を活かし、陸上植物は強光状態への応答をしていると考えられる。

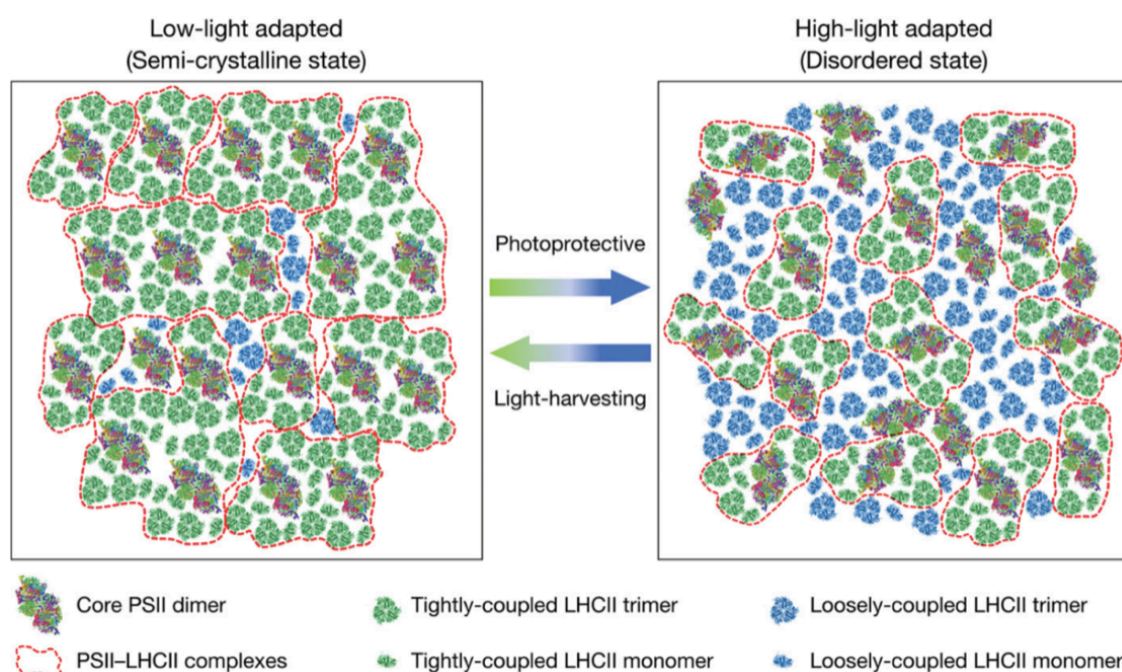


図 1 2 PSII の構造変化を介した光適応モデル。

チラコイド膜上における、弱光下 (Low-light) と強光下 (High-light) での PSII の構造変化を示した。赤点線で囲った複合体は、A8-35 を用いた手法で精製した構造を表す。

■まとめ

本章では、光条件によるチラコイド膜上における PSII の構造変化を報告した。タンパク質組成としてはほぼ同一の各種 PSII であるが、単一の PSII-LHCII supercomplex は強光状態に、オリゴマーの PSII-LHCII arraycomplex は弱光状態に適した構造である事が示された。これまで semi-crystalline array の存在自体は知られていたがその意義はわかっておらず、本研究によって初めて明ら

かとなった。残念ながら構造変化の原因の同定までは出来ていないが、タンパク質のリン酸化などの要因が考えられる。今後はクライオ電子顕微鏡を用いた PSII-LHCII megacomplex の解析や、原子間力顕微鏡を用いたチラコイド膜自体の観察などのより詳細な研究が期待される。

第4章 弱光下におけるクラミドモナスの PSII 複合体の構造

■緒言

陸上植物や緑藻における PSII-LHCII の研究の歴史については序論で述べた通りである。その後、クラミドモナスの $C_2S_2M_2L_2$ 型 PSII-LHCII の高分解能構造がクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析で、 3.37\AA と 3.4\AA の分解能で決定された (Shen et al. 2019, Sheng et al. 2019)。Sheng らによって解かれた $C_2S_2M_2L_2$ 構造では、M と L トライマーは CP29 を介して PSII に結合している事が示された (Sheng et al. 2019)。近年、オウシュウトウヒから $C_2S_2M_2N_2$ 型の PSII-LHCII がネガティブ染色法で報告された (Kouřil et al. 2020)。ここで、N という記号は 2014 年に名付けられた命名であり、彼らの論文ではクラミドモナスの LHCII トライマーの結合は loosely ではなく naked だと主張されている (Drop et al. 2014)。最新の研究から CP29 を介した LHCII の結合様式が明らかとなったため、今後は $C_2S_2M_2L_2$ という名称に統一すべきと考える。さて、オウシュウトウヒは *lhcb6* (CP24) を欠くが、M トライマーはクラミドモナスで観察された物と同じ結合角度を示す (Kouřil et al. 2016)。Kouřil らはさらに精製法などを改良する事により、陸上植物であるオウシュウトウヒはクラミドモナスとほぼ同等の $C_2S_2M_2N_2$ 型 PSII-LHCII を形成する事を明らかにした (Kouřil et al. 2020)。クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析などの研究により、CP29 を介した結合様式の違いなどの更なる研究の発展が期待される。

PSII-LHCII megacomplex に関しては、単粒子解析によりホウレンソウ由来の構造が最初に報告された (Boekema et al. 1999)。第3章で述べた様に、植物においては弱光条件下で semi-crystalline array が PSII-LHCII から形成されている (Simpson 1978, Kirchhoff et al. 2007)。陸上植物由来の PSII-LHCII megacomplex の単粒子画像は、他のいくつかの研究でも示されてきた (Kouřil et al. 2016, Kim et al. 2020a, Kouřil et al. 2020)。緑藻クラミドモナスに関しては $(C_2S_2)_2$ 型の PSII-LHCII megacomplex が提唱されているものの、これらの構造は単粒子解析などの 2次元構造レベルではまだ明確では無い (Dekker and Boekema 2005, Iwai et al. 2008)。また、 $C_2S_2M_2L_2$ 型の PSII-LHCII は 2012 年に初めて発見されたため (Tokutsu et al. 2012)、先に提唱された構造がよりネイティブな構造かは不明である。加えて、明確な semi-crystalline array がクラミドモナスに存在しない理由などもわかっていない。

本研究では、第1章で報告した精製法を用いてクラミドモナスの PSII-LHCII megacomplex の単離を試みた (Watanabe et al. 2019)。得られた構造は、これまでの報告の中で最大であった。また、PSII-LHCII megacomplex の中には新規の LHCII トライマーが結合した物も存在した。特に重要な発見として、PSII-

LHCII megacomplex と supercomplex では結合している LHCII トライマーの角度が違う事が示唆された。

■実験手法

株および培養条件

株に関しては野生株である 137c 株を用いた。培地には従属栄養培地である TAP を用い (Gorman and Levine 1965)、23°Cにおいて空気通過を行う所までは第 1 章と同様である。変更した箇所としては、光条件を $10 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ と以前よりもより弱くした。

チラコイド膜の精製

第 1 章に記したものと同様の手法で行った。

PSII-LHCII megacomplex の精製

SDG 法までは第 1 章に記した A8-35 とベタインを併用した手法で行った (Watanabe et al. 2019)。ホウレンソウのサンプルについては、第 3 章に記した物と同じチラコイド膜を用いた。サンプル分取の際は、チューブの下に小さな穴を開けてフラクションを分画した。

SDS/PAGE

精製した $1.0 \mu\text{g Chl}$ のタンパク質を、7 M の Urea を含む 14% アクリルアミドゲルを用いて解析した。染色には CBB-R250 を用いた。

電子顕微鏡による観察と単粒子解析

第 1 章に記した物と同様の手法を用いてグリッドを作成した。観察には日本電子社の JEM 1010 を用い、条件は加速電圧 80 kV、倍率 100,000 倍とした。写真の記録にはオリンパス社の Veleta CCD カメラ (2048×2048 ピクセル) を用いた。合計で 1500 枚の画像を取得し、Relion 3.0 パッケージを用いて単粒子解析を行った (Zivanov et al. 2018)

■実験結果および考察

第 3 章で得られた知見から、クラミドモナスを第 1 章の条件よりもさらに弱光条件下で培養し、チラコイド膜を単離した (Kim et al. 2020a)。バンドパターンのコントロールにはホウレンソウを用い、SDG 法によって複合体の精製を行なった (図 1 A) (Watanabe et al. 2019)。両者のチューブを比較すると、クラミドモナスのチューブにおいて、ホウレンソウの PSII-LHCII megacomplex (m) と arraycomplex (a) の間に相当する箇所にバンドが観察された (A4)。このバンドを含めた A1-A4 バンドに関して、タンパク質組成を SDS/PAGE を用いて解析した。A1-3 バンドに関しては、先行研究と同様にフリーの LHCII タンパク質、PSI-LHCI、PSII-LHCII であった (Watanabe et al. 2019)。一方、A4 バンドに関しては、タンパク質組成を見ると PSII-LHCII である A3 バンドとほぼ同一であった (図 1 B)。この事から、ホウレンソウの場合と同様に A4 に関しては

PSII-LHCII megacomplex ではないかと考えた。そこで、A4 バンドをネガティブ染色法で観察した (図 1 C)。その結果、白丸で囲った様な PSII-LHCII megacomplex が観察された。なお、粒子数が少なかったため本章では解析していないが、ホウレンソウで見られた PSII-LHCII arraycomplex の様な構造も観察された (図 1 C)。ここで、クラミドモナスの PSII-LHCII supercomplex に対する megacomplex の量比をホウレンソウの場合と比較すると、その量は少ない (図 1 A)。その原因の 1 つとして考えられるのが、第 3 章でも言及した semi-crystalline array の存在である。陸上植物は弱光環境下で semi-crystalline array を形成するが (Simpson et al. 1978, Kirchhoff et al. 2007)、緑藻クラミドモナスにおいては、チラコイド膜のクライオトモグラフィーを用いた解析でも明確な semi-crystalline array は観察されていない (Wietrzynski et al. 2020)。ただ、その中で観察された PSII の反応中心の近さから、PSII-LHCII megacomplex のモデルが提唱されていた。本研究では、彼らの培養条件である $90 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ よりもさらに弱光条件で培養した事で、量は少ないながらも PSII-LHCII megacomplex を精製する事に成功した。

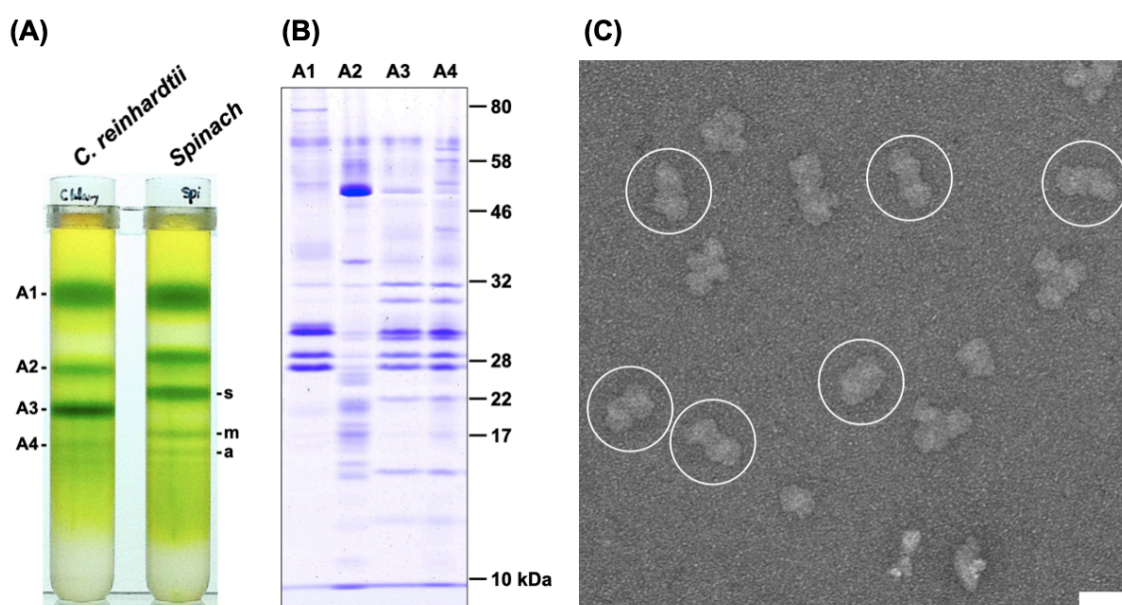


図 1 クラミドモナスから新たに単離した複合体の評価。

- (A) クラミドモナスとホウレンソウから光化学系複合体を精製し比較した。クラミドモナスでは A1-4 に示すような明確なバンドが 4 本観察された。ホウレンソウのチューブにおける s, m, a は、それぞれ PSII-LHCII super-, mega-, arraycomplex を表す。
- (B) クラミドモナスから精製した A1-4 に示す複合体をそれぞれ $1.0 \mu\text{g Chl}$ 取り、SDS/PAGE を用いて解析した。
- (C) 精製した A4 バンドをネガティブ染色法で観察した。白丸は PSII-LHCII megacomplex を示す。スケールバーは 50 nm。

次に、クラミドモナスにおける PSII-LHCII megacomplex のより詳細な構造を明らかにするため、取得した画像の単粒子解析を行なった (図 2)。単粒子解析によるクラス分けでは 13 種に分類された。第 3 章でも“サンドイッチ構造”について述べたが、今回のサンプルからもその様な構造は確認されなかった (Albanese et al. 2016, Albanese et al. 2020)。ここで、平面で形成される PSII-LHCII megacomplex については、先行研究で 2 つのタイプへの分類が提唱されている。それは“parallel”タイプと“non-parallel”タイプと呼ばれる構造への分類である (Kouřil et al. 2016, Kouřil et al. 2020)。“parallel”タイプでは 2 つの PSII-LHCII supercomplex が平行に結合しており、陸上植物の PSII-LHCII megacomplex における主たる結合様式である (Kouřil et al. 2016, Kim et al. 2020a, Kouřil et al. 2020)。一方の“non-parallel”タイプでは、PSII-LHCII supercomplex の結合に統一性は観察されない。今回の解析では、3 種の“parallel”タイプ (図 2 A, B, F) と 10 種の“non-parallel”タイプ (図 2 C-E, G-M) が観察され、前者が 47%、後者が 53% を占めた (図 2)。この事は、クラミドモナスの PSII-LHCII megacomplex は陸上植物のそれとは結合様式が違う事を示唆し、その原因として上で述べた semi-crystalline array の存在が考えられる。

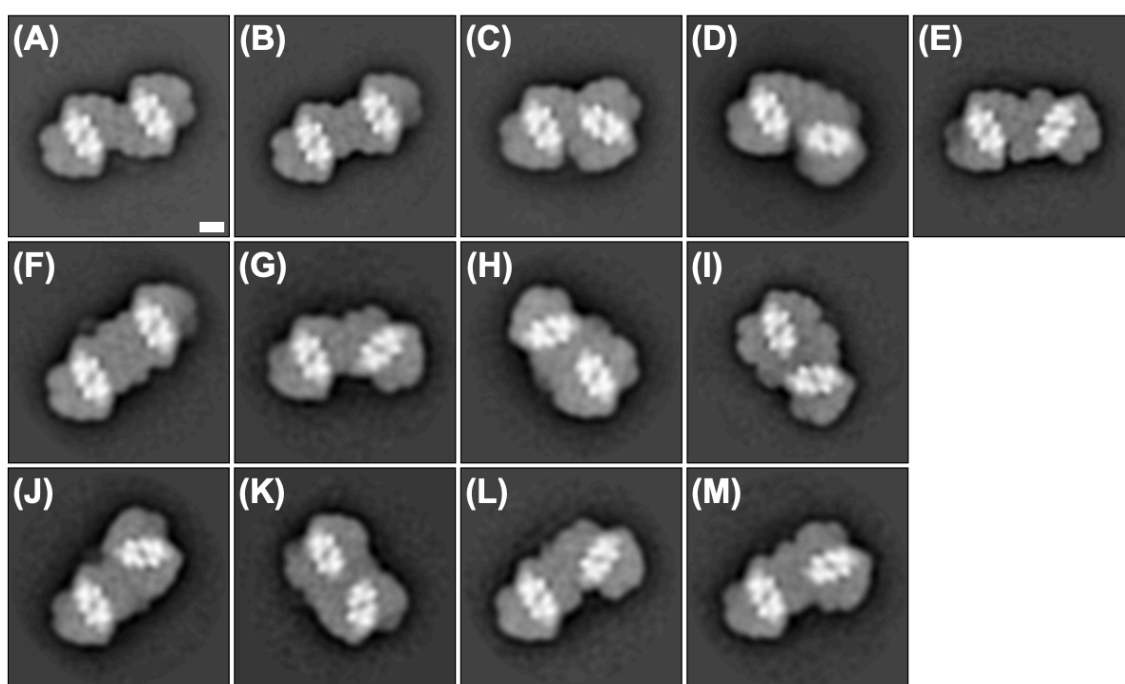


図 2 A4 バンドの単粒子解析。

それぞれの割合は以下のものであった。(A) 19.7%, (B) 18.4%, (C) 11.4%, (D) 10.6%, (E) 9.7%, (F) 8.5%, (G) 4.8%, (H) 4.7%, (I) 3.5%, (J) 3.1%, (K) 2.1%, (L) 1.8%, (M) 1.6%。スケールバーは 10 nm。

PSII-LHCII megacomplex におけるより詳細な結合様式を明らかにするため、単粒子解析で得られた画像に $C_2S_2M_2L_2$ 型の PSII-LHCII タンパク質モデルをアサインした (図 3 A, B) (Sheng et al. 2019)。大まかな構造については PDB モデルと一致したが、複合体同士の結合箇所において M と L トライマーの重なりが見られた (図 3 B、白矢印)。この重なりを解消するためにトライマーの角度を調整した所、単粒子解析の画像と一致する構造を取った (図 3 C)。ここで、L トライマーの角度についての先行研究を記す。先行研究において、我々は L トライマーから反応中心タンパク質 D2 への直接的なエネルギー伝達経路を提唱した (Sheng et al. 2019)。このエネルギー伝達は L トライマーのモノマー 1 の Chl *a* 614 から ChlZ_{D2} への経路で行われる。クラミドモナスでは、ChlZ_{D2} の欠損株を用いた解析から、このクロロフィルが集光に重要な役割を果たす事がわかっている (Ruffle et al. 2001)。伝達経路における *K*-factor (双極子配向定数) はエネルギー移動に無理のない値であったものの、クロロフィルの Mg 間の距離は 28.3 Å とやや長い値であった (Sheng et al. 2019)。今回得られたトライマーの角度を調整した PSII-LHCII megacomplex では、L トライマーと D2 タンパク質の距離は、通常の PSII-LHCII supercomplex における距離よりも短くなっている (図 3 C)。2次元構造にモデルをアサインしているために厳密なクロロフィル間の角度や距離は算出出来ないが、上記の距離の変化から PSII-LHCII megacomplex はより集光能力が高い構造であると示唆される。また、この結果は PSII-LHCII megacomplex が弱光環境下で出現する事と矛盾しない (図 1 A)。

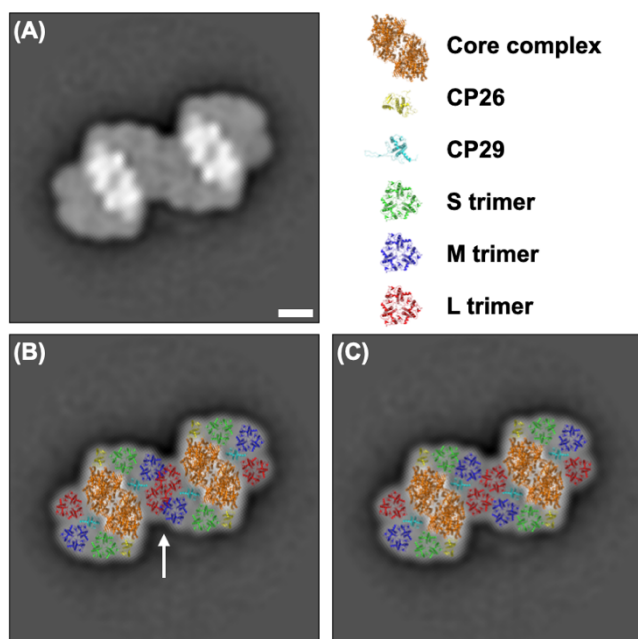


図 3 PSII-LHCII megacomplex の構造モデル。

(A) 図 2A に記した単粒子解析画像。

(B) PSII-LHCII megacomplex に $C_2S_2M_2L_2$ 型の PDB モデルを当てはめた (PDB : 6KAD)。白矢印は LHCII トライマーの重なりを示す。
(C) トライマーの角度を調整し、重なりを解消した PSII-LHCII megacomplex。個々の色分けの詳細は図の右上に記した。

上記の角度を調整した構造を基準にして、図2に示した構造についてそれぞれ PDB モデルをアサインした (図4)。興味深い事に、新規の PSII 構造に加えて新たな LHCII トライマーも見つかった (図4D, E, F, H, I, K, M、Additional trimer)。このタイプのトライマーは陸上植物では報告があるものの、クラミドモナスにおいては初めて観察された (Kouřil et al. 2016, Kim et al. 2020a, Kouřil et al. 2020)。ここで、クラミドモナスの LHCII トライマーはその構成によって4種類に分類される (Kawakami et al. 2019, Kim et al. 2020b)。その内の1つは LHCII のタイプ II と呼ばれるタンパク質を含み、ステート遷移に重要であるとされている (Takahashi et al. 2006)。分解能が十分でなかった事もあり、先行研究では PSII-LHCII supercomplex にこの LHCII タイプ II が含まれるかは分かっていないが、SDS/PAGE を用いた解析からは LHCII タイプ II は検出されていない (Shen et al. 2019, Sheng et al. 2019)。別の先行研究では、モデル構造は異なるものの、PSII-LHCII megacomplex はステート遷移状況下では解離すると報告されている (Iwai et al. 2008)。以上を踏まえると、今回見つかった Additional trimer は LHCII タイプ II を含む可能性が考えられる。即ち、弱光条件下では PSII のアンテナとして働き、PSII-LHCII megacomplex が解離するステート遷移状況下では PSII のアンテナとしての役割ではなく、PSI のアンテナとして働く可能性が示唆される。

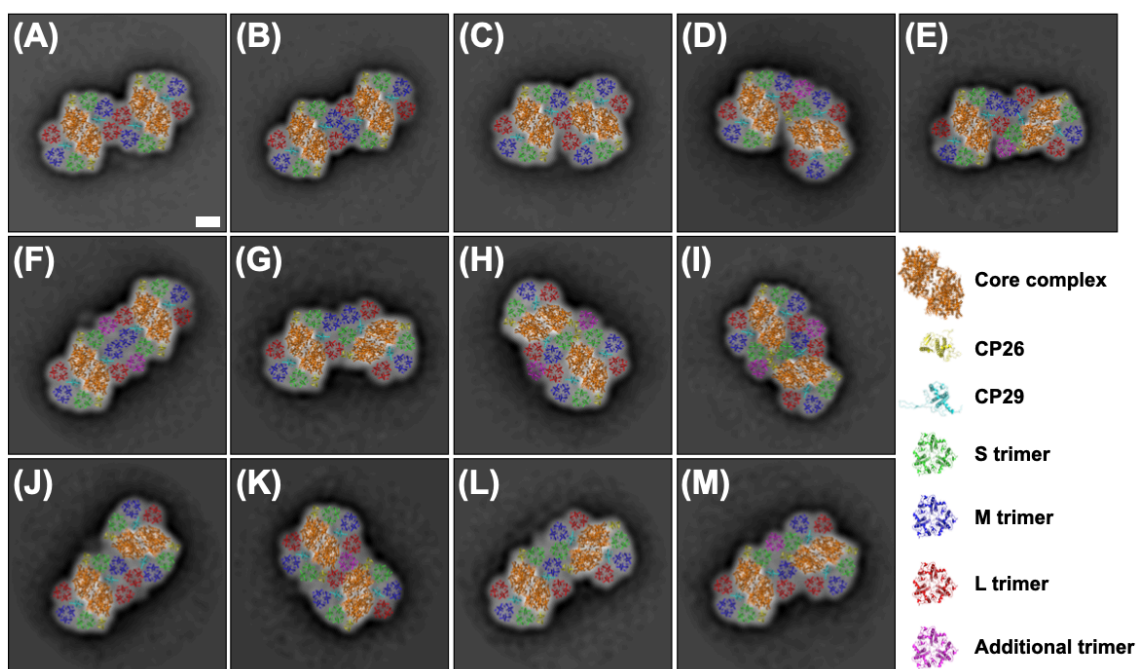


図4 図2に記した PSII-LHCII megacomplex の構造モデル。それぞれの構造において、LHCII の角度は単粒子解析画像と一致するよう調整した。個々の色分けの詳細は図の右下に記した。スケールバーは 10 nm。

■まとめ

本章ではクラミドモナスの PSII-LHCII megacomplex について議論した。得られた構造は、他の光合成生物と比較して最大であった (Kouřil et al. 2016, Kim et al. 2020a, Kouřil et al. 2020)。また、いくつかの構造では、これまで”フリー”と呼ばれていたであろう LHCII トライマーが PSII に結合している状態も観察された。これら新規構造の発見に加え、PSII-LHCII megacomplex における LHCII の角度が supercomplex の物とは違う事も報告した。どちらの構造がよりネイティブかという事を議論するのは困難であるが、近年報告のある高分解能 AFM などを用いたチラコイド膜の観察が助けになるのではと考えられる (Zhao et al. 2020)。本研究で記した様な光合成タンパク質が結合した megacomplex の解析と、チラコイド膜自体を観察する様な研究が補い合って進む事で、光合成生物の集光状態における理解が大きく進むと期待される。

総括

本研究では光合成に関するタンパク質の内、PSII に焦点を当てる事で集光機構の解明に取り組んだ。その中で、光合成生物から PSII を精製し、構造や分光の観点から各種測定を行う事で理解に努めた。

第1章では、膜タンパク質を安定化する機能を持つポリマーである Amphipol を用いる事で新たな精製法の開発に成功した。この手法を用いて精製した PSII-LHCII の安定性を確認した所、従来法と比べて大幅な向上が見られた。また、酸素発生活性についても従来法と同様に高い値が観察された。この手法を用いて第3章や第4章に示す様な研究を展開したが、本論文で述べた他にも LHCII の結合エネルギーの測定やクロレラからの光化学系の単離などにも用いた (Kim et al. 2019, Watanabe and Minagawa 2020)。この事からもわかるように、非常に簡便かつ有用な精製法であるため、今後の研究においてもより一層の使用が期待される。また第2章では、LHCII の一部欠損株を解析する事でクラミドモナスの PSII-LHCII をより詳細に理解しようと努めた。従来の報告に反して、ある LHCII の遺伝子が欠損しても他の遺伝子が補完する事で野生型と見かけ上の構造は同等であった。これまでは多くの光合成生物で野生株由来の PSII-LHCII の構造解析に力が注がれてきたが、今後はそれらの分解能をさらに向上させるとともに、各種変異体を用いた解析も期待される。

第3章では、ハウレンソウを用いた研究から、PSII は光条件によってチラコイド膜上における構造が変化する事を報告した。PSII 複合体は構造が変化してもタンパク質組成としてはほぼ同一であったが、強光状態と弱光状態にそれぞれ適した構造がある事を示した。その結果、これまで存在は知られていたがその意義がわかっていなかった semi-crystalline array について、集光に重要な構造であるという知見を得た。加えて、モデル図で示した LHCII のオリゴマーについても、共同研究において類似構造の精製に成功している (Shukla et al. 2020)。今後は、これらタンパク質のチラコイド膜上における動的な様子の観察が期待される。

第4章では、緑藻クラミドモナスについても陸上植物と同様の機構を持つのかを検証した。その結果、量が少ない事を考えると陸上植物ほど重要ではないかもしれないが、やはり構造変化機構を持つ事が示唆された。緑藻クラミドモナスと陸上植物では PSII に結合している集光タンパク質の量が違う事は言及されてきたが、この構造まで含めるとどちらの集光能力がより優れているかはわからない。将来的な人工光合成などの応用研究を見据えると、PSII に集光タンパク質がどの様な形で結合する状態が良いのか、その立体構造はどの様な物が良いのかを研究する事は有意義であると言える。また、光合成生物の進化の観点から

見ても、今後はコケや車軸藻類など他の生物の解析も期待される。これらの発見に加え、PSII 複合体では PSII-LHCII の結合角度について新たな知見を得た。エネルギー移動は距離や角度が非常に重要なため、今後はさらなる技術の進歩などによる集光状態の完全解明が期待される。

以上、本論文では PSII に焦点を当てる事で集光状態に関する知見を得た。研究開始時は PSII-LHCII の構造を解明すれば集光機構がわかると思われたが、実はそれは終わりではなく新たな研究のスタート地点であった。精製技術を高めていった結果として、精製タンパク質とチラコイド膜上での構造には差があり、膜の直接観察の重要性が明らかになったというのは皮肉な事であるが、これは本研究のような徹底的な技術改良を続けたからこそわかった点である。同時に、高分解能での観察を望むとなれば、現時点ではやはり精製タンパク質の解析に分があると言える。今後は両輪での研究を行う事で、光合成生物の理解がより一層深まると期待される。

引用文献

- Ahn TK, Avenson TJ, Ballottari M, Cheng YC, Niyogi KK, Bassi R et al. (2008) Architecture of a charge-transfer state regulating light harvesting in a plant antenna protein. *Science* 320: 794–797
- Albanese P, Nield J, Tabares JAM, Chiodoni A, Manfredi M, Gosetti F et al. (2016) Isolation of novel PSII-LHCII megacomplexes from pea plants characterized by a combination of proteomics and electron microscopy. *Photosynth Res* 130: 19–31
- Albanese P, Tamara S, Saracco G, Scheltema RA, Pagliano C (2020) How paired PSII-LHCII supercomplexes mediate the stacking of plant thylakoid membranes unveiled by structural mass-spectrometry. *Nat Commun* 11: 1361
- Andrizhiyevskaya EG, Chojnicka A, Bautista JA, Diner BA, van Grondelle R, Dekker JP (2005) Origin of the F685 and F695 fluorescence in photosystem II. *Photosynth Res* 84: 173–180
- Avenson TJ, Ahn TK, Niyogi KK, Ballottari M, Bassi R, Fleming GR (2009) Lutein can act as a switchable charge transfer quencher in the CP26 light-harvesting complex. *J Biol Chem* 284: 2830–2835
- Bayburt TH, Grinkova YV, Sligar SG (2002) Self-assembly of discoidal phospholipid bilayer nanoparticles with membrane scaffold proteins. *Nano Lett* 2: 853–856
- Bazzacco P, Sharma KS, Durand G, Giusti F, Ebel C, Popot JL et al. (2009) Trapping and stabilization of integral membrane proteins by hydrophobically grafted glucose-based telomers. *Biomacromolecules* 10: 3317–3326
- Bazzacco P, Billon-Denis E, Sharma KS, Catoire LJ, Mary S, Le Bon C et al. (2012) Nonionic homopolymeric amphipols: application to membrane protein folding, cell-free synthesis, and solution nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 51: 1416–1430
- Betterle N, Ballottari M, Zorzan S, de Bianchi S, Cazzaniga S, Dall'Osto L et al. (2009) Light-induced dissociation of an antenna hetero-oligomer is needed for non-photochemical quenching induction. *J Biol Chem* 284: 15255–15266
- de Bianchi S, Dall'Osto L, Tognon G, Morosinotto T, Bassi R (2008) Minor antenna proteins CP24 and CP26 affect the interactions between

photosystem II subunits and the electron transport rate in grana membranes of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 1012–1028

Boekema EJ, Hankamer B, Bald D, Kruijff J, Nield J, Boonstra AF et al. (1995) Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 175–179

Boekema EJ, van Roon H, Dekker JP (1998) Specific association of photosystem II and light-harvesting complex II in partially solubilized photosystem II membranes. *FEBS Lett* 424: 95–99

Boekema EJ, van Roon H, Calkoen F, Bassi R, Dekker JP (1999) Multiple types of association of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Biochemistry* 38: 2233–2239

Boekema EJ, van Breemen JFL, van Roon H, Dekker JP (2000) Arrangement of photosystem II supercomplexes in crystalline macrodomains within the thylakoid membrane of green plant chloroplasts. *J Mol Biol* 301: 1123–1133

Burton-Smith RN, Watanabe A, Tokutsu R, Song C, Murata K, Minagawa J (2019) Structural determination of the large photosystem II–light-harvesting complex II supercomplex of *Chlamydomonas reinhardtii* using nonionic amphipol. *J Biol Chem* 294: 15003–15013

Caffarri S, Kouřil R, Kerešič S, Boekema EJ, Croce R (2009) Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *EMBO J* 28: 3052–3063

Chae PS, Rasmussen SG, Rana RR, Gotfryd K, Chandra R, Goren MA et al. (2010) Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat Methods* 7: 1003–1008

Correa-Galvis V, Poschmann G, Melzer M, Stühler K, Jahns P (2016) PsbS interactions involved in the activation of energy dissipation in *Arabidopsis*. *Nat Plants* 2: 15225

Dekker JP, Boekema EJ (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta* 1706: 12–39

Demmig-Adams B, Adams WW (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 599–626

Drop B, Webber-Birungi M, Yadav SKN, Filipowicz-Szymanska A, Fusetti F, Boekema EJ et al. (2014) Light-harvesting complex II (LHCII) and its

supramolecular organization in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 1837: 63–72

Elrad D, Niyogi KK, Grossman AR (2002) A major light-harvesting polypeptide of Photosystem II functions in thermal dissipation. *Plant Cell* 14: 1801–1816

Ferrante P, Ballottari M, Bonente G, Giuliano G, Bassi R (2012) LHCBM1 and LHCBM2/7 Polypeptides, components of major LHCII complex, have distinct functional roles in photosynthetic antenna system of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* 287: 16276–16288

Gohon Y, Dahmane T, Ruigrok RW, Schuck P, Charvolin D, Rappaport F et al. (2008) Bacteriorhodopsin/amphipol complexes: structural and functional properties. *Biophys J* 94: 3523–3537

Gorman DS, Levine RP (1965) Cytochrome *f* and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 54: 1665–1669

Groot ML, Frese RN, de Weerd FL, Bromek K, Pettersson A, Peterman EJJ et al. (1999) Spectroscopic properties of the CP43 core antenna protein of photosystem II. *Biophys J* 77: 3328–3340

Iwai M, Takahashi Y, Minagawa J (2008) Molecular remodeling of photosystem II during state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 20: 2177–2189

Kawakami K, Tokutsu R, Kim E, Minagawa J (2019) Four distinct trimeric forms of light-harvesting complex II isolated from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth Res* 142: 195–201

Kereïche S, Kiss AZ, Kouřil R, Boekema EJ, Horton P (2010) The PsbS protein controls the macro-organisation of photosystem II complexes in the grana membranes of higher plant chloroplasts. *FEBS Lett* 584: 759–764

Kievit O, Brudvig GW (2001) Direct electrochemistry of photosystem I. *J Electroanal Chem* 497: 139–149

Kim E, Tokutsu R, Minagawa J (2018) Investigation on the thermodynamic dissociation kinetics of photosystem II supercomplexes to determine the binding strengths of light-harvesting complexes. *J Phys Chem B* 122: 1627–1630

Kim E, Watanabe A, Sato R, Okajima K, Minagawa J (2019) pH-responsive binding properties of light-harvesting complexes in a photosystem II supercomplex investigated by thermodynamic dissociation kinetics analysis.

J Phys Chem Lett 10: 3615–3620

Kim E, Watanabe A, Duffy CDP, Ruban AV, Minagawa J (2020a) Multimeric and monomeric photosystem II supercomplexes represent structural adaptations to low- and high-light conditions. J Biol Chem 295: 14537–14545

Kim E, Kawakami K, Sato R, Ishii A, Minagawa J (2020b) Photoprotective capabilities of light-harvesting complex II trimers in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. J Phys Chem Lett 11: 7755–7761

Kimanius D, Forsberg BO, Scheres SHW, Lindahl E (2016) Accelerated cryo-EM structure determination with parallelisation using GPUs in RELION-2. eLife 5: e18722

Kirchhoff H, Haase W, Wegner S, Danielsson R, Ackermann R, Albertsson PA (2007) Low-light-induced formation of semicrystalline photosystem II arrays in higher plant chloroplast. Biochemistry 46: 11169–11176

Kiss AZ, Ruban AV, Horton P (2008) The PsbS protein controls the organization of the photosystem II antenna in higher plant thylakoid membranes. J Biol Chem 283: 3972–3978

Kosuge K, Tokutsu R, Kim E, Akimoto S, Yokono M, Ueno Y et al. (2018) LHCSR1-dependent fluorescence quenching is mediated by excitation energy transfer from LHCI to photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci USA 115: 3722–3727

Kouřil R, Nosek L, Bartoš J, Boekema EJ, Ilík P (2016) Evolutionary loss of light-harvesting proteins Lhcb6 and Lhcb3 in major land plant groups – break-up of current dogma. New Phytol 210: 808–814

Kouřil R, Nosek L, Opatíková M, Arshad R, Semchonok DA, Chamrád I et al. (2020) Unique organization of photosystem II supercomplexes and megacomplexes in Norway spruce. Plant J 104: 215–225

Kovács L, Damkjær J, Kereiche S, Iliaia C, Ruban AV, Boekema EJ et al. (2006) Lack of the light-harvesting complex CP24 affects the structure and function of the grana membranes of higher plant chloroplasts. Plant Cell 18: 3106–3120

Kubota-Kawai H, Burton-Smith RN, Tokutsu R, Song C, Akimoto S, Yokono M 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

Külheim C, Agren J, Jansson S (2002) Rapid regulation of light harvesting

and plant fitness in the field. *Science* 297: 91–93

Li Z, Wakao S, Fischer BB, Niyogi KK (2009) Sensing and responding to excess light. *Annu Rev Plant Biol* 60: 239–260

Liguori N, Roy LM, Opacic M, Durand G, Croce R (2013) Regulation of light harvesting in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The C-terminus of LHCSR is the knob of a dimmer switch. *J Am Chem Soc* 135: 18339–18342

Minagawa J, Takahashi Y (2004) Structure, function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins. *Photosynth Res* 82: 241–263

Minagawa J, Tokutsu R (2015) Dynamic regulation of photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 82: 413–428

Miyao M, Murata N (1983) Partial disintegration and reconstitution of the photosynthetic oxygen evolution system. Binding of 24 kilodalton and 18 kilodalton polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 725: 87–93

Müller MG, Lambrev P, Reus M, Wientjes E, Croce R, Holzwarth AR (2010) Singlet energy dissipation in the photosystem II light-harvesting complex does not involve energy transfer to carotenoids. *Chem Phys Chem* 11: 1289–1296

Nosek L, Semchonok D, Boekema EJ, Ilík P, Kouřil R (2017) Structural variability of plant photosystem II megacomplexes in thylakoid membranes. *Plant J* 89: 104–111

Nowaczyk M, Oworah-Nkruma R, Zoonens M, Rögner M, Popot JL (2004) Amphipols: strategies for an improved PS2 environment in detergent-free aqueous solution. In *Biohydrogen III* (Miyake J, ed), pp. 151–159. Elsevier, Dordrecht.

Ono T, Inoue Y (1984) Ca²⁺-dependent restoration of O₂-evolving activity in CaCl₂-washed PS II particles depleted of 33, 24 and 16 kDa proteins. *FEBS Lett* 168: 281–286

Opacic M, Durand G, Bosco M, Polidori A, Popot JL (2014) Amphipols and photosynthetic light-harvesting pigment-protein complexes. *J Membr Biol* 247: 1031–1041

Papageorgiou GC, Murata N (1995) The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving Photosystem II complex. *Photosynth Res* 44: 243–252

Popot JL (2018) Membrane proteins in aqueous solutions: From detergent

to Amphipols. Springer, Cham, Switzerland.

Roswitha H (2013) Associations between light-harvesting complexes and Photosystem II from *Marchantia polymorpha* L. determined by two- and three-dimensional electron microscopy. *Photosynth Res* 75: 249–258

Ruban AV, Berera R, Iliaia C, van Stokkum IH, Kennis JT, Pascal AA et al. (2007) Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature* 450: 575–578

Ruban AV, Johnson MP, Duffy CDP (2012) The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochim Biophys Acta* 1817: 167–181

Ruffle SV, Wang J, Johnston HG, Gustafson TL, Hutchison RS, Minagawa J et al. (2001) Photosystem II peripheral accessory chlorophyll mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochemical characterization and sensitivity to photo-inhibition. *Plant Physiol* 127: 633–644

Scheres SHW (2012) RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J Struct Biol* 180: 519–530

Shen L, Huang Z, Chang S, Wang W, Wang J, Kuang T et al. (2019) Structure of a C₂S₂M₂N₂-type PSII-LHCII supercomplex from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 116: 21246–21255

Sheng X, Watanabe A, Li A, Kim E, Song C, Murata K et al. (2019) Structural insight into light harvesting for photosystem II in green algae. *Nat Plants* 5: 1320–1330

Shinzawa-Itoh K, Shimomura H, Yanagisawa S, Shimada S, Takahashi R, Oosaki M et al. (2016) Purification of active respiratory supercomplex from bovine heart mitochondria enables functional studies. *J Biol Chem* 291: 4178–4184

Shukla MK, Watanabe A, Wilson S, Giovagnetti V, Moustafa EI, Minagawa J et al. (2020) A novel method produces native light-harvesting complex II aggregates from the photosynthetic membrane revealing their role in nonphotochemical quenching. *J Biol Chem* 295: 17816–17826

Simpson DJ (1978) Freeze-fracture studies on barley plastid membranes. II. Wild-type chloroplast. *Carlsberg Res Commun* 43: 365–389

Su X, Ma J, Wei X, Cao P, Zhu D, Chang W et al. (2017) Structure and assembly mechanism of plant C₂S₂M₂-type PSII-LHCII supercomplex. *Science* 357: 815–820

Takahashi H, Iwai M, Takahashi Y, Minagawa J (2006) Identification of the mobile light-harvesting complex II polypeptides for state transitions in

Chlamydomonas reinhardtii. Proc Natl Acad Sci USA 103: 477–482

Tietz S, Puthiyaveetil S, Enlow HM, Yarbrough R, Wood M, Semchonok DA et al (2015) Functional implications of photosystem II crystal formation in photosynthetic membranes. J Biol Chem 290: 14091–14106

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 USA 110: 10016–10021

Tribet C, Audebert R, Popot JL (1996) Amphipols: Polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. Proc Natl Acad Sci USA 93: 15047–15050

Wada M, Kagawa T, Sato Y (2003) Chloroplast movement. Annu Rev Plant Biol 54: 1455–468

Walters RG (2005) Towards an understanding of photosynthetic acclimation. J Exp Bot 56: 435–447

Watanabe A, Kim E, Burton-Smith RN, Tokutsu R, Minagawa J (2019) Amphipol-assisted purification method for the highly active and stable photosystem II supercomplex of *Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Lett 593: 1072–1079

Watanabe A, Minagawa J (2020) Structural characterization of the photosystems in the green alga *Chlorella sorokiniana*. Planta 252: 79

Wei X, Su X, Cao P, Liu X, Chang W, Li M et al. (2016) Structure of spinach photosystem II–LHCII supercomplex at 3.2 Å resolution. Nature 534: 69–74

Wietrzynski W, Schaffer M, Tegenov D, Albert S, Kanazawa A, Plitzko JM et al. (2020) Charting the native architecture of *Chlamydomonas* thylakoid membranes with single-molecule precision. eLife 9: e53740

Zhao LS, Huokko T, Wilson S, Simpson DM, Wang Q, Ruban AV et al. (2020) Structural variability, coordination and adaptation of a native photosynthetic machinery. Nat Plants 6: 869–882

Zivanov J, Nakane T, Forsberg B, Kimanius D, Hagen WJH, Lindahl E et al. (2018) RELION-3: new tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination. eLife 7: e42166

謝辞

本研究を進めるにあたり、異動された方も含め、基礎生物学研究所環境光生物学研究部門の皆様には大変お世話になりました。特に、終始並々ならぬ御指導ならびに御助言を賜りました皆川純先生と得津隆太郎先生に深く感謝申し上げます。研究に対する姿勢などは勿論の事、今後の人生を生きていく上で重要な様々な事を学ばせて頂きました。また、生命科学プロGRESSでは竹花佑介先生、中山潤一先生、村田隆先生、森田美代先生に御指導いただきました。半年に一度お話しさせていただく事で、自分の研究の生物学における位置付けなどを考えるきっかけとなりました。

研究面では、共同研究者としてロンドン大学の Alexander Ruban 先生、中国科学院の柳振峰先生、生理学研究所の村田和義先生およびその研究室の皆様には大変お世話になりました。また、様々な学会や新学術領域「新光合成」の会議などで御助言等をいただきました研究者、学生の皆様にも感謝申し上げます。本研究が光合成分野ならびに植物学分野での一助となる事を切に願います。

学生生活全般を通しては、名古屋工業大学の田中俊樹先生、高木繁先生、増田理子先生、そして京都府立大学の織田昌幸先生には大変お世話になりました。大学を卒業後も進路や研究に対する考え方を聞いて頂くなど、皆様との食事が大変日々の励みになりました。特に、基礎生物学研究所での研究のきっかけをくださった増田理子先生にはただただ感謝の気持ちで一杯です。同じく名古屋工業大学や総合研究大学院大学の先輩、同期、後輩の皆様にも御礼申し上げます。同世代との飲み会は常に刺激を与えてくれ、研究生活を豊かにしてくれました。加えて、SNS で知り合った研究者の皆様にも感謝申し上げます。皆様の素早い情報発信は大変ありがたいものでした。また、研究以外の賑やかな掛け合いは実験の合間の癒しでした。

学生生活を振り返ると、人や機会に大変恵まれて辛い時期はほとんど無かったように感じます。そのような環境を作り、長きに渡る学生生活を暖かな目で見守ってくださった家族、親族に心から感謝いたします。