

TOPICS

集光性色素タンパク質 CP29 は光合成ステート遷移に必須である

北海道大学 低温科学研究所 生物適応機構学講座

得津隆太郎

1. はじめに

植物が光合成を行うにあたり、2つの光化学系 (PSI、PSII) 及び、その光化学系周辺集光アンテナ (LHC) は、光エネルギーを捕集し、化学エネルギーへの変換を行っている。最適な光合成効率を保つためには、生育する環境条件に応じて光化学系間の励起状態のバランスが維持される必要がある。どちらかの光化学系が優先的に励起される状態が長期間続いた場合、光化学系タンパク質の発現量比を調整することで光環境適応することが知られている。しかし、このようなタンパク質の発現制御が間に合わないような急激な光環境の変化が起きた場合、光化学系間の励起状態のバランスが崩れてしまう危険性がある。そこで、植物は、ステート遷移と呼ばれる光化学系超複合体の再構成機構により、短期間での光環境適応を行う。ステート遷移 (ステート1から2への遷移) では、次のような段階的な反応が起きることが知られている¹⁾。1) 光環境の変化などに伴い PSII が優先的 (または過剰) に励起されると、2) プラストキノールの酸化還元状態の変化をシグナルとして、LHCII リン酸化酵素が活性化される。3) この LHCII リン酸化酵素は、PSII に結合する集光性色素タンパク質である LHCII をリン酸化し、PSII から解離させる。4) PSII から解離した LHCII は、チラコイド膜中を移動し、PSI に再結合する。5) これにより、PSI の励起状態が上昇し、各光化学系間の励起割合のバランスが維持される。これまで、長い間、ステート2で形成される PSI-LHCI/II 超複合体の素性は明らかにされていなかった。しかし、最近、Kouřil ら²⁾はシングルパーティクル解析を行い、PSI に3量体 LHCII が結合している可能性を示唆した。また Takahashi ら³⁾が、この PSI-LHCI/II 超複合体にはモノマー LHCII である CP29 と CP26 が結合していることを示した。しかし、これらのモノマー LHCII がステート遷移により実際に

光化学系間を移動しているのか、また PSI-LHCI/II 超複合体の形成において、どのような役割を担っているのかは、明らかではない。そこで、本研究では、単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* において、モノマー LHCII である CP29 及び CP26 がステート遷移にどのような影響を及ぼすか検討した。

2. ステート遷移と集光性色素タンパク質

C. reinhardtii には、4種類の三量体 LHCII (Type I~IV)、2種類の単量体 LHCII (CP26, CP29) の6タイプの LHCII タンパク質が存在する。これら中での LHCII Type II、CP26 及び CP29 が、ステート2において PSI に結合することがわかっている³⁾。このうち、特に CP29 は、他の LHCII に比べてリン酸化部位が多いことや⁴⁾、シングルパーティクル解析でも PSI に結合することが示唆されているため⁵⁾、ステート遷移においてより中心的な役割をもつことが予想される。本研究では、ステート遷移における単量体 LHCII の役割を明らかにするため、RNAi を用いて CP29 及び CP26 それぞれの発現を抑制した変異株 (b4i, b5i) を作成した。

3. RNAi 変異株のステート遷移能力

得られた RNAi 株 (b4i, b5i) のチラコイド膜を単離してタンパク質組成を調べたところ、標的タンパク質以外の光化学系タンパク質に、影響は見られなかった。このことから、RNAi によるタンパク質の発現抑制が効率的かつ特異的に行われていることが確認できた。そこで、これら RNAi 株のステート遷移能力を以下の方法で解析した。

まず、ウェスタンブロッティング法により、ステート遷移に必須である LHCII のリン酸化状態の変化を調べた。各変異株では、野生株と同様に、ステート遷移

によるリン酸化の進行が観察された (data not shown)。したがって、2 つの RNAi 株では、LHCII リン酸化酵素による LHCII のリン酸化は起きており、プラストキノンプール還元のスIGNAL伝達は正常に行われていることがわかった。さらに、LHCII が PSII から解離しているか調べるために、蛍光クエンチング解析⁶⁾を行ったところ、ステート遷移に伴う PSII からの蛍光の減少 (qT クエンチング) が確認された (data not shown)。また、同時に FIRE 法を用いて PSII のアンテナの吸収断面積を測定した結果、ステート遷移に伴い PSII のアンテナサイズがいずれも小さくなっていることが明らかとなった (data not shown)。これらの結果は、各変異株において、ステート遷移での PSII 側での反応 (PSII-LHCII 超複合体からの LHCII の解離) は正常に機能していることを示している。

ステート遷移では、光化学系間で励起エネルギーの再分配が行われる。そこで、励起エネルギー分配の変化を観察するために、ステート 1 からステート 2 に誘導し蛍光発光スペクトルを測定した。この結果、野生株 (WT) では、PSII 由来の 690nm 付近の蛍光ピークの低下が観察された (図 1 (A))。これは PSII へのエネルギー分配の減少を反映しており、PSII から LHCII が

解離したことを示唆する。さらに、2 つの RNAi 株では、どちらにおいても LHCII が PSII から解離することがわかった (図 1 (A))。一方、WT において同時に観察される 720nm 付近の PSI 由来の蛍光ピーク上昇は、PSI への LHCII の再結合を示す。この蛍光ピークの上昇は WT と b5i 株において見られたが、b4i 株では見られなかった。このことから、b4i 株では、PSII から解離した LHCII が、PSI に再結合しない可能性が示唆された。この可能性をより直接的に明らかにするため、各ステートにおける蛍光励起スペクトルを測定し²⁾、その差スペクトルを求めることでステート 2 特異的に PSI へのエネルギー伝達を行っている成分を観察した。WT では、650nm 及び 675nm 付近での蛍光のピークが検出されたことから、LHCII が PSI へ再結合していることが示された (図 1 (B))。2 つの RNAi 株のうち、b5i 株においては、WT と同様の蛍光ピークが観察された。ところが、b4i 株ではステート遷移欠損コントロール株である *DLSA* 変異株⁷⁾と同様、蛍光の変化が観察されなかった。このことから、b4i 株では、ステート遷移に伴う LHCII-PSI 間のエネルギー伝達が起きておきていないことが明らかになった。

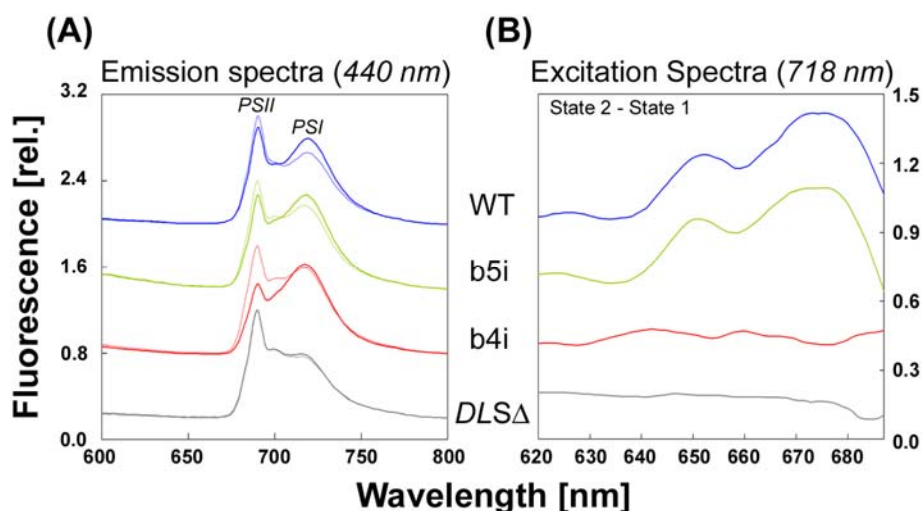


図 1 ステート遷移誘導による蛍光発光及び励起スペクトル変化

(A) 77 K における蛍光発光スペクトルの測定を行った。細線:ステート 1、太線:ステート 2。PSII の蛍光ピーク⁶⁾で規格化後、クエンチング解析から得られた PSII 蛍光値 (F_m') の減少率でスペクトル補正を行った。*DLSA*は、シトクロム *b₆f* の変異株で、ステート遷移欠損コントロールとして用いた⁷⁾。

(B) 77 K における蛍光励起スペクトルの測定を行った。ステート 1 及びステート 2 での蛍光励起スペクトル (718 nm 励起) を測定し、697 nm (PSI 吸収帯) で規格化を行った。図の線は、ステート 2 からステート 1 の測定値を差し引いた、差スペクトルを表している。

4. ステート遷移と PSI-LHCI/II 超複合体

前項までの光学的解析から、PSII から解離した LHCII が b4i 株では PSI に再結合していない可能性が明らかとなった。さらに、生化学的な解析を行い、ステート 2 の変異株において、PSI-LHCI/II 超複合体が形成されているか検証した。シヨ糖密度勾配超遠心法により、チラコイド膜中に存在するクロロフィルタンパク質の分離を行ったところ、b5i 株では WT と同様に PSI-LHCI/II 超複合体の存在を示す結果 (A3'バンドの検出) が得られた (図 2 (WT, b5i))。しかし、CP29 発現抑制株では A3'バンドは検出されず、PSI-LHCI/II 超複合体が形成されていないことがわかった (図 2 (b4i))。

本研究の結果は、ステート遷移は 2 つの反応；

- (1) LHCII がリン酸化を経て PSII から解離する。
- (2) 解離した LHCII が PSI へ再結合する。

を経て進行することを示している。b4i 株では、この反応のうち、PSII から LHCII が解離する部分に関しては正常に機能していた。しかし、PSI-LHCI/II 超複合体の形成されないことから、LHCII の中でも CP29 を欠損すると、解離 LHCII の全てが PSI に再結合できないことが明らかとなった (図 3)。このことから、CP29 は PSI と LHCII の間のリンカーとして機能していると考えられる。これまでの報告から、PSI のサブユニットである PSI-H を欠損した高等植物 *Arabidopsis thaliana* において、ステート遷移の欠損がわかってお

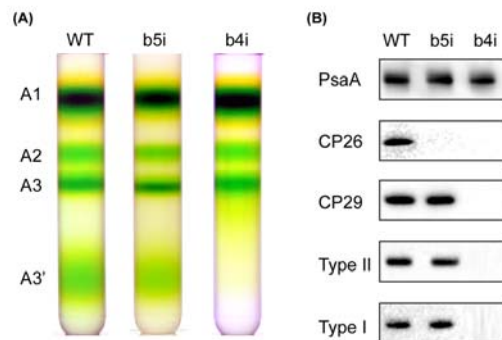


図 2 シヨ糖密度勾配超遠心によるクロロフィルタンパク質複合体の分離

- (A) ステート 2 に固定したチラコイド膜を可溶化し、シヨ糖密度勾配超遠心を行った。A1-A3'の 4 つのバンドは、それぞれ A1: Free LHCII、A2: PSII core、A3: PSI-LHCI supercomplex、A3': PSI-LHCI/II supercomplex を示す³⁾。
- (B) A3'画分に含まれる LHCII。PSI のサブユニットの一つである PsaA の量で規格化し、各抗 LHCII 抗体を用いて検出を行った。Type III 及び Type IV は検出されなかった (data not shown)。

り、PSI-H は、LHCII が PSI に再結合するためのドッキングサイトとして考えられている⁸⁾。今回の結果と併せ考えると、ステート遷移に伴う PSI と LHCII の結合には、CP29 および PSI-H が必須であり、それぞれ PSI-LHCI/II 超複合体の形成において、リンカーおよびドッキングサイトとして働いていると考えられる。

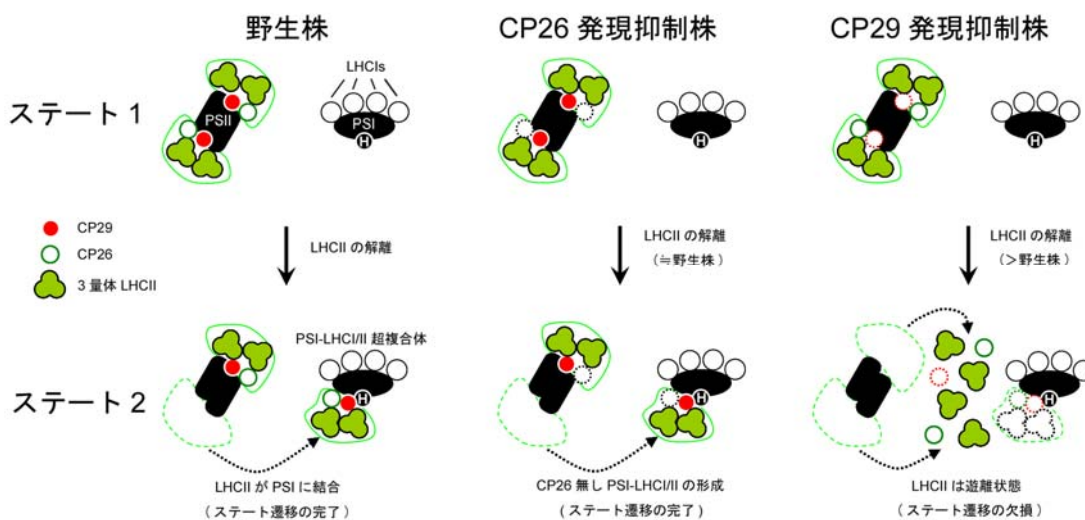


図 3 野生株と比較した各変異株におけるステート遷移モデル

PSI に含まれる『H』は、CP29 ドッキングサイトと考えられる PSI-H⁸⁾を示している。

5. まとめ

本研究により、単量体集光アンテナ分子である CP29 が *C. reinhardtii* のステート遷移に必要な不可欠であることが明らかとなった。CP29 は三量体 LHCII と PSI を繋ぐリンカーとして働いていると考えられる。今後は、今回報告した LHCII 以外に、4 種類の 3 量体 LHCII の変異体を作成し、全 6 種の LHCII がステート遷移において担う役割を明らかにしたい。

参考文献

1. Wollman, F. A. (2001) State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus, *EMBO J.* 20, 3623–3630.
2. Kouřil, R., Zygadlo, A., Arteni, A. A., Wit, C. D., Dekker, J. P., Jensen, P. E., Scheller, H. V., and Boekema, E. J. (2005) Structural characterization of a complex of photosystem I and light-harvesting complex II of *Arabidopsis thaliana*, *Biochemistry* 44, 10935–10940.
3. Takahashi, H., Iwai, M., Takahashi, Y., and Minagawa, J. (2006) Identification of the mobile light-harvesting complex II polypeptides for state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 477–482.
4. Turkina, M. V., Kargul, J., Rivero, A. B., Villarejo, A., Barber, J., and Vener, A. V. (2006) Environmentally modulated phosphoproteome of photosynthetic membranes in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Mol. Cell. Proteomics* 5, 1412–1425.
5. Kargul, J., Turkina, M. V., Nield, J., Benson, S., Vener, A. V., and Barber, J. (2005) Light-harvesting complex II protein CP29 binds to photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii* under State 2 conditions, *FEBS J.* 272, 4797–4806.
6. Iwai, M., Kato, N., and Minagawa, J. (2007) Distinct physiological responses to a high light and low CO₂ environment revealed by fluorescence quenching in photoautotrophically grown *Chlamydomonas reinhardtii*, *Photosynth. Res.* 94, 307–314.
7. Zito, F., Vinh, J., Popot, J. -L., and Finazzi, G. (2002) Chimeric fusions of subunit IV and PetL in the *b₆f* complex of *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biol. Chem.* 277, 12446–12455.
8. Lunde, C., Jensen, P. E., Haldrup, A., Knoetzel, J., and Scheller, H. K. (2000) The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis, *Nature* 408, 613–615.