

研究紹介

緑藻クラミドモナスの光化学系 I 複合体の

PsaH, I, L, O サブユニットの解析

岡山大学大学院自然科学研究科

大西岳人

はじめに

酸素発生型光合成の電子伝達系には2つの光化学系（光化学系1および2）が機能している。高等植物および藻類の光化学系I (PSI)は、14 - 15のサブユニットから構成されるコア複合体に、4-9種の集光性アンテナタンパク (LHCI) が結合し、PSI-LHCI 超分子複合体を形成している。これまでにシアノバクテリアのPSI複合体とエンドウのPSI-LHCI複合体の結晶構造が解析された^{1, 2)}。図1に示したのは、PSI-LHCIのサブユニット構造である。PSIの反応中心の電子伝達成分P700、A₀、A₁、F_XはPsaAとPsaBから構成されるヘテロ二量体に結合し、最終電子受容体のF_AとF_BはPsaCに結合する。その他に、高等植物には11の小型サブユニットPsaD、E、F、G、H、I、J、K、L、Nが、シアノバクテリアには9の小型サブユニットPsaD、E、F、I、J、K、L、M、Xが存在する。PsaC、D、Eはコア複合体のストロマ側に配置し、フェレドキシンとの結合部位を形成している。PsaFはプラストシアニンとの

結合部位の形成しており、PsaJはPsaFに隣接している。PsaNはコア複合体のルーメン側にPsaFに近接した位置に存在する。PsaGとPsaKはPSIコアに結合するLHCI4量体の両端にそれぞれ存在し、LHCIのコア複合体への結合を安定化している³⁾。コア複合体のLHCI結合部位の反対側に位置するPsaH、I、Lの機能は、PSIのダイナミックな構造と機能調節に関与しているという興味深い結果が最近の研究から明らかにされつつある。PsaH、PsaL、PsaIはそれぞれ1、3、1本の膜貫通ヘリックスをもち、隣り合って存在する。シアノバクテリアでは、PsaHを欠くこの領域がPSIコア複合体の3量体形成に関与していると考えられている⁴⁾。高等植物では、PsaHとPsaLがステート遷移に伴うLHCIIの結合に関与するらしい⁵⁾。さらにシロイヌナズナのPSI標品で発見された約10kDaのPsaOはPsaLと化学架橋し、ステート遷移に伴うLHCIIの結合に関与することも示唆された^{6, 7)}。

我々はゲノム解析が進展し、分子遺伝学や生化学的

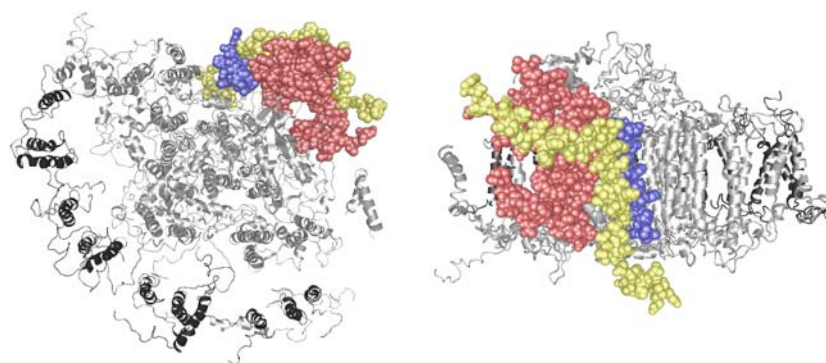


図1 エンドウ (*Pisum sativum*) のPSIの結晶構造²⁾

PsaA-G, J, K, Nは明るい灰色で、LHCIは濃い灰色で、PsaHは黄で、PsaIは青で、PsaLは赤で表している。左はストロマの上側から見た構造で、右はPsaH, I, Lの横側から見た構造。PsaL (赤)とPsaI (青)がコアに隣接し、PsaH (黄)はその外側に存在する。

な解析が容易なモデル生物である緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) を用いて、PSI コア複合体の構造と機能の解析を進めてきた⁸⁾。その過程で、ほとんどすべての PSI と LHCI サブユニットに対する抗体を作製した。今回は、PSI 複合体の構造と機能のダイナミクスを解析するため、PsaH, I, L, O に着目して解析を進めたので報告する。

PsaO の生化学的解析

PsaO の SDS-PAGE における泳動度が PsaN とほぼ同じであるため、PSI 標品に PsaO が存在することは見逃されてきた。ところが、シロイヌナズナの PsaN 欠損株から単離した PSI 標品のサブユニット組成の解析で PsaO の存在が初めて見出された⁶⁾。2本の膜貫通ヘリックスをもつと考えられ、シロイヌナズナの PsaL および PsaH 欠損株の解析と化学架橋の実験から、PsaO は PsaL と近接すると考えられている⁷⁾。しかし、エンドウの PSI-LHCI の結晶構造には PsaO の存在部位が明らかにされていない²⁾。PSI 複合体の周辺部に存在するため、構造解析ができなかったのかもしれない。もしくは、比較的遊離しやすいサブユニットなので、精製の過程で失われたのかもしれない。

クラミドモナスのゲノムのデータベースには *psaO* 遺伝子と相同な遺伝子が存在する⁹⁾。そこで、PsaO に対する抗体を用いて、チラコイド膜タンパク質のウェスタン分析を行った。その結果、PsaO はチラコイド膜に存在することが分かった (図2)。更に、PSI 欠損株

(Δ -PsaA/B) のチラコイド膜における PsaO の蓄積量を調べた。欠損株には PsaH, I, L は検出されなかった (5-10%以下) が、PsaO は野生株の 30%まで減少したが蓄積していた(図2)。一般的に、反応中心が欠損すると周辺に結合する他の PSI サブユニットは安定に蓄積しないことが知られている¹⁰⁾。したがって、クラミドモナスにおいても PsaO は PSI の構成サブユニットであり、反応中心が欠損したことにより不安定になり蓄積量が大きく減少したと考えられる。しかし、野生株のチラコイド膜をドデシルマルトシドで可溶化し、ショ糖密度勾配超遠心でクロロフィルタンパク質を分離すると、PsaO は PSI 複合体が分離される A-3 には検出されず、遊離したタンパク質が分離されるショ糖密度勾配の上部に検出された (図3)。この結果は、PsaO が PSI サブユニットであるとしても、PSI コアとの結合は弱く、界面活性剤による可溶化の過程で容易に遊離することを示している。

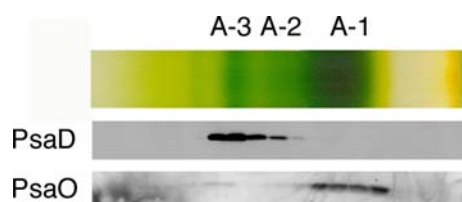


図3 ショ糖密度勾配超遠心で分離した PSI 標品の分析
チラコイド膜を1%のドデシルマルトシドで可溶化後、0.4-1.3M のショ糖密度勾配超遠心でタンパク複合体を分離した。各画分のポリペプチドは SDS-PAGE で分離して、ウェスタン分析を行った。PSI は A-3 の緑のバンドに、PsaO は A-1 の緑のバンド付近の画分に分離する。

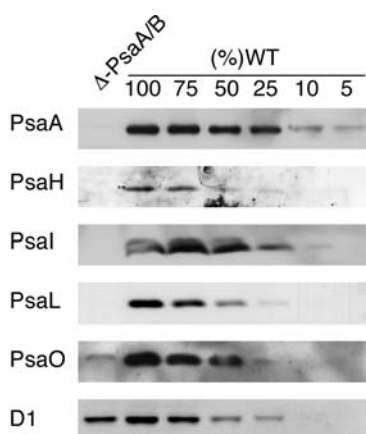


図2 PsaA/B 欠損株のチラコイドに存在するポリペプチドの分析
SDS-PAGE でチラコイド膜のペプチドを分離して PSI の5種と PSII の D1 に対する抗体を用いてウェスタン分析を行った。右は野生株のチラコイドの 100%、75%、50%、25%、10%、5%の希釈系である。

そこで PsaO の結合強度を調べるために、チラコイド膜をカオトロピック試薬で処理し、サブユニットの遊離を調べた。野生株のチラコイド膜を 2M KSCN で 30分処理してから、遠心でチラコイド膜を回収し、ウェスタン分析で各 PSI サブユニットの蓄積量を調べた (図4)。PSI 反応中心サブユニットの PsaA は 11本の膜貫通ヘリックスを持ち、膜に強固に結合しているので遊離しなかった。PsaI と PsaL は反応中心に安定に結合しているためか、ほとんど遊離しなかった。これに反して、PsaH は KSCN 処理では完全に遊離した。PsaH の疎水領域は PsaI と PsaL と隣接しているが、KSCN はその結合を容易に切断すると考えられる。PsaO は約 50%が遊離し、チラコイド膜への結合はやや弱いことが分かった。

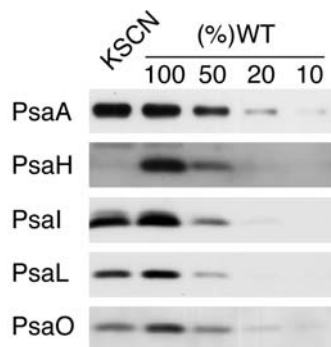


図4 カオトロピック試薬 KSCN による PSI サブユニットの遊離

野生株のチラコイド膜を 2M KSCN で 30 分処理、遠心でチラコイド膜画分を回収し、SDS-PAGE でペプチドを分離してウェスタン分析を行った。右は野生株のチラコイドの 100%、50%、20%、10% の希釈系である。

以上の結果は、クラミドモナスの PsaO が PSI サブユニットであることを示すには不十分である。そこで、PsaO と PSI サブユニットとの化学架橋を試みた。チラコイド膜を 0.1mg/ml Disuccinimidyl suberate (DSS) および 1mg/ml Dimethyl suberimidate-2HCl (DMS) で処理した後、ポリペプチドを可溶化し、SDS-PAGE で分離し、架橋産物をウェスタン分析で同定した(図 5)。両者とも架橋距離は約 11 Å でタンパクのアミノ基同士を架橋する。DSS を用いると PsaO と PsaL が架橋した産物が検出された。さらに DMS を用いると PsaO と PsaH の架橋産物が検出された。したがって、PsaO は PSI サブユニットである PsaL と PsaH に隣接することが分かった。カオトロピック試薬で処理したときに、PsaH が完全に遊離しても PsaO が残っていたので、PsaO は PsaH が遊離しても PSI と結合できる位置に存在すると考えられる。シアノバクテリアの PSI 複合体には PsaI の近傍に PsaM が存在する。更に、一部の藻類は PsaO と PsaM をもつことが知られている。したがって、PsaI の近傍に PsaO が存在するとは考えにくい。したがって、PsaO の 2 本の膜貫通ヘリックスと PsaH の膜貫通ヘリックスの間に PsaL の膜貫通ヘリックスが存在するのではないかと考えられる。PsaH の膜貫通ヘリックスは、PsaI と PsaL のヘリックスの間に位置し、N 末端側の親水領域は、PsaL の膜貫通領域のストロマ側の縁を回り込むように伸び、PsaD の N 末端近傍にまで達している (図 1 右)。したがって、PsaO は PsaH の N 末端と隣接することになるので、化学架橋されたのであろう。

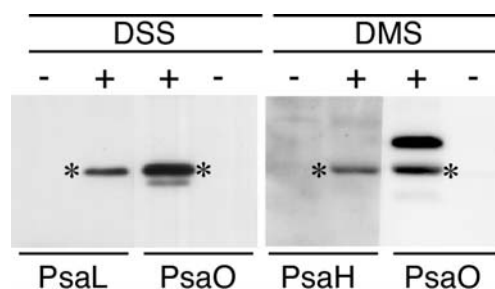


図5 化学架橋による PsaO の存在部位の同定

野生株のチラコイド膜に DSS および DMS で、架橋処理した後、SDS-PAGE で分離して、ウェスタン分析を行った。-は架橋処理をしていないチラコイド、+は架橋処理したチラコイドを示す。*は目的の架橋産物。

クラミドモナスには構造と機能の異なる 2 種類の PSI が存在する

ステート遷移は、PSI と PSII の間に励起エネルギーを再分配する機構で、2つの光化学系の活性のバランスを補正し、電子伝達活性を効率化する機構である。アンテナ複合体 (LHCII) が PSI と PSII の間を移動し、2つの光化学系のアンテナサイズを変化させると考えられている¹¹⁻¹³。ステート遷移の活性が高いクラミドモナスは、ステート遷移の分子機構を解析する上ですぐれたモデル生物である¹⁴。

クラミドモナスにおいてステート遷移に関与する PSI サブユニットを解析するため、ステート 1 および 2 に固定した細胞から単離したチラコイド膜を可溶化し、シヨ糖密度勾配超遠心法分離し、PSI 複合体および PsaD と PsaH の分布をウェスタン分析で調べた(図 6)。ステート 1 のチラコイド膜からは、3本のクロロフィルタンパク質のバンド (A-1、A-2、A-3) が分離された。A-1 は LHCII、A-2 は PSII コア複合体、A-3 は PSI-LHCI をそれぞれ含む。一方、ステート 2 のチラコイド膜からは上記の 3本に加えて、PSI-LHCI/II を含む A-3' が A-3 よりシヨ糖密度が高い画分に分離された¹⁵。確かに、ステート 1 では PsaD は A-3 にだけ分離するが、ステート 2 では A-3 に加えて A-3' にも分離する。

ステート 1 のチラコイド膜における PsaH の分布を解析すると、チラコイド膜の可溶化と精製の過程で遊離することなく A-3 に分離される PSI 複合体と結合していた。しかし、ステート 2 では PsaH は予想外の分布を示すことが分かった。つまり、A-3 には存在せず

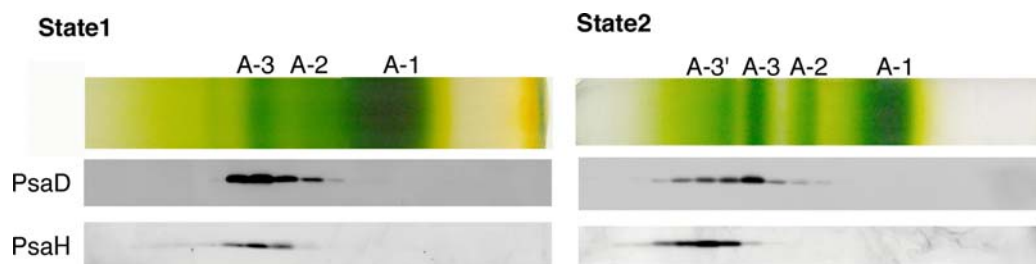


図6 ステート遷移によるタンパクの大きさの変化
ステート1と2に固定した細胞から単離したチラコイド膜を1%のドデシルマルトシドで可溶化後、0.4-1.3Mのショ糖密度勾配超遠心でタンパク複合体を分離した。各画分のポリペプチドはSDS-PAGEで分離して、ウェスタン分析を行った。

A-3'にのみ存在した。この結果は、クラミドモナスのチラコイド膜には少なくとも2種類のPSI複合体が存在することを示している。そして、PsaHを保持するPSI複合体のみが、ステート2のときにLHCII (CP26、CP29、Lhcbm5)を結合すると考えられる¹⁵⁾。しかし、ステート1の時は、すべてのPSI複合体はLHCIIを結合せずA-3画分に分離されるので、PsaHを保持したPSI複合体とPsaHを保持しないPSI複合体が混在していると考えられる。この結果は、ステート2のときにPsaHとLHCIIが化学架橋するという報告と一致する¹⁶⁾。

クラミドモナスにおいて一部のPSI複合体にPsaHが存在しないのは、PsaHの合成がPSI複合体の合成に比べて遅いからであると考えられることができる。もしそうであるなら、PSI複合体の活発な合成が終了した培養の定常期の細胞では、PsaHの蓄積量が追いつくはずである。しかし、対数増殖期と定常期の細胞のPsaHをウェスタン分析により解析したところ、蓄積量に差は認められなかった (data not shown)。したがって、PsaHの蓄積量を少なく調節する分子機構がクラミドモナスには備わっているのかもしれない。このような調節機構の存在を調べることは今後の興味深い課題である。

まとめ

強光下では代謝回転の速いPSII複合体に比べ、PSI複合体の構造は安定で変化しないと考えられてきた。しかし、PSIはステート遷移に伴い、LHCIIを可逆的に結合したり、直線的電子伝達系と循環的電子伝達系の切り替え機能を果たしたりするため、その構造と機能がダイナミックに変化することが分かってきた。特

に、PsaH, PsaI, PsaLおよびPsaOが形成するクラスターは、PSIの構造と機能の制御に大きく関わっていると考えられる。このような観点から、この部分の構造と機能の解析は、重要となると考えられる。

参考文献

1. Jordan, P. et al. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature* 411, 909-917.
2. Amunts, A., Drory, O., and Nelson, N. (2007) The structure of a photosystem I supercomplex at 3.4Å resolution, *Nature* 447, 58-63.
3. Moseley, J. L., Allinger, T., Herzog, S., Merchant, S., and Hippler, M. (2002) Adaptation to Fe-deficiency requires remodeling of the photosynthetic apparatus, *EMBO J.* 21, 6709-6720.
4. Chitnis, V. P., and Chitnis, P. R. (1993) PsaL subunit is required for the formation of photosystem I trimers in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *FEBS Lett* 336, 330-334.
5. Lunde, C., Jensen, P. E., Haldrup, A., Knoetzel, J., and Scheller, H. V. (2000) The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis, *Nature* 408, 613-615.
6. Knoetzel, J., Mant, A., Haldrup, A., Jensen, P. E., and Scheller, H. V. (2002) PSI-O, a new 10-kDa subunit of eukaryotic photosystem I, *FEBS Lett.* 510, 145-148.
7. Jensen, P. E., Haldrup, A., Zhang, S., and Scheller, H. V. (2004) The PSI-O subunit of plant photosystem I is involved in balancing the excitation pressure between the two photosystems, *J. Biol. Chem.* 279,

- 24212-24217.
8. 高橋 裕, 福澤 秀 (2000) モデル生物として注目される緑藻クラミドモナス, *蛋白質 核酸 酵素* 45, 1937-1945.
 9. Merchant, S. S. et al. (2007) The Chlamydomonas Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions, *Science* 318, 245-251.
 10. Girard-Bascou, J., Choquet, Y., Schneider, M., Delosme, M., and Dron, M. (1987) Characterization of a chloroplast mutation in the *psaA2* gene of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Curr. Genet.* 12, 489-495.
 11. Finazzi, G. (2005) The central role of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in revealing the mechanism of state transitions, *J. Exp. Bot.* 56, 383-388.
 12. Rochaix, J. D. (2002) *Chlamydomonas*, a model system for studying the assembly and dynamics of photosynthetic complexes, *FEBS Lett.* 529, 34-38.
 13. Rochaix, J. D. (2007) Role of thylakoid protein kinases in photosynthetic acclimation, *FEBS Lett.* 581, 2768-2775.
 14. Delepelaire, P., and Wollman, F. A. (1985) Correlations between Fluorescence and Phosphorylation Changes in Thylakoid Membranes of *Chlamydomonas-Reinhardtii* In vivo - a Kinetic-Analysis, *Biochimica Et Biophysica Acta* 809, 277-283.
 15. 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.
 16. Zhang, S., and Scheller, H. V. (2004) Light-harvesting complex II binds to several small subunits of photosystem I, *J. Biol. Chem.* 279, 3180-3187.