

光合成効率向上を目指した光合成装置光エネルギー分配機構の研究 Studies on the light energy distribution in photosynthesis for efficient photosynthetic production

大西紀和、岡山大学大学院自然科学研究科（理学系）、特任助教

Norikazu OHNISHI, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Assistant Professor

<研究要旨>

短時間で変動する光環境下では、陸生植物をはじめとする光合成生物はすでに合成してある光合成装置の構造や機能の一部を可逆的に再構築して、効率良く光合成を行っている。このような機構の一つであるステート遷移では、光合成明反応を駆動する2つの光化学系（光化学系 I、光化学系 II）に分配する光エネルギーを最適化して、最大の光合成効率を得ている。近年我々は、ステート遷移に関与する移動性の集光性クロフィルタンパク質を同定し、それらが光化学系 II 又は光化学系 I に結合して光エネルギーの分配に関与することを明らかにしてきた。本研究では、移動性クロフィルタンパク質の光化学系 I への結合に関与すると考えられているサブユニットである PsaH、PsaL、PsaO の機能解析を行う。これにより、ステート遷移による最大光合成効率の維持の基本原理を理解し、光合成の効率化により CO₂ を削減する技術開発の基盤を整備する。

<Abstract>

Photosynthetic organisms are frequently exposed to dramatic changes of light conditions in both quality and quantity in their natural habitat. To acclimate to such light conditions and keep efficient photosynthesis performance, a part of photosynthetic apparatus is reversibly remodeled in a short time. State-transitions is the light adaptation system, in which the light energy captured by light-harvesting antennae is re-distributed to photosystem I (PSI) and II (PSII) to optimize the rate of photosynthetic electron flow. Recently, we identified several monomeric light-harvesting chlorophyll (LHC) proteins that are involved in state transitions and demonstrated that these monomeric LHC proteins play an important role for the energy re-distribution by binding either PSI or PSII. PsaH/L/O subunits of PSI have been considered to be involved in state transitions. In the present study, we will analyze molecular mechanisms of the function of PsaH/L/O in order to determine how these subunits are involved in state transitions. This study would provide new perspectives for technical innovation of reduction of atmospheric CO₂ by enhancing photosynthesis performance, which could be employed to alleviate the global warming.

1. 研究目的

絶えず変動する光環境下、例えば一日のうちに日向と日陰を繰り返すなど短時間で光環境が変動する場合でも効率良く光合成反応を進行させるために、陸生植物をはじめとする光合成生物はすでに合成してある光合成装置の構造や機能の一部を可逆的に再構築することで光環境に適応し、

光合成効率を維持している。光合成明反応は2つの光化学系（光化学系 I、光化学系 II）によって駆動されており、光環境に応答してこれら2つに太陽光エネルギーをバランス良く分配し光合成効率を維持する機構が“ステート遷移”として知られている。近年我々は、光化学系に結合して光エネルギーを集める役割を果たす集光性ク

ロフィルタンパク質 (LHCI、LHCII) の内、特に単量体 LHCII に分類されるタンパク質 (CP26、CP29、LhcbM5) が光環境に応答して2つの光化学系のうち一方に結合することにより光エネルギーの分配に関与することを明らかにしてきた

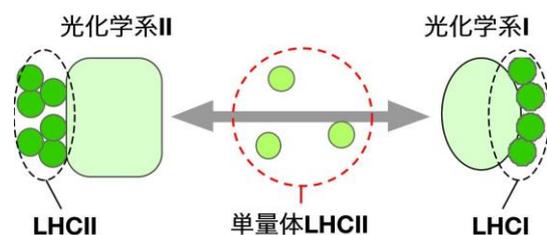


図 1. ステート遷移を示すモデル図

が (図 1)、この機構に関与する成分に関しては不明な点も多く残されている。ステート遷移は最大光合成効率の維持の鍵となっている光環境適応機構であるため、この理解が光合成効率の向上の技術開発には必須である。本研究では、単量体 LHCII の結合に必要な光化学系 I のサブユニットを同定し、ステート遷移の基本原理を理解することを目的とする。本研究により得られるステート遷移に関する多くの知見は、樹木を含めた高等植物の様々な光環境下における光合成の効率化と CO₂ の削減を図るための技術開発の基盤を作ると期待される。

2. 研究経過

○PsaH/L が減少したクラミドモナスではステート 2 の誘導効率が低下した

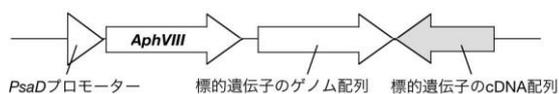


図 2. RNAi による遺伝子発現抑制のための形質転換ベクター。

ステート遷移に関与すると考えられる PSI のサブユニット PsaL の機能解析を行うために、PsaL 遺伝子の RNA 干渉法 (RNAi 法) による発現抑

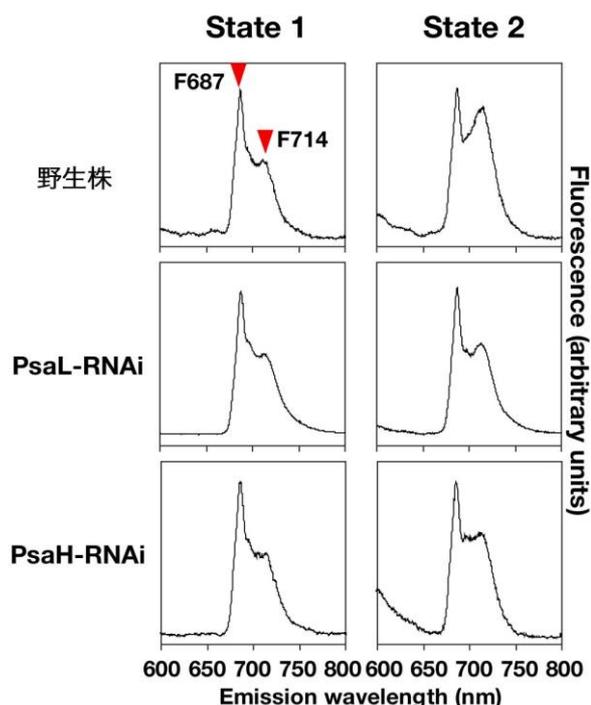


図 3. ステート 1、2 に誘導した野生株、および PsaL-RNAi 株、PsaH-RNAi 株の細胞の低温 (77K) 蛍光スペクトル。PSII および PSI に由来する蛍光の発光ピークが、それぞれ 687 nm (F687) と 714 nm (F714) に見られる。

制系を構築した。パロモイシン耐性を与える AphVIII 遺伝子の 3'UTR 内に PsaL 遺伝子のゲノム DNA 配列と、これと逆向きに cDNA 配列を連結した形質転換ベクターを作製し (図 2)、緑藻クラミドモナスの野生株 (cw-15 株) に導入した。230 株のパロモイシン耐性株を、PsaL タンパク質に対する抗体を用いたウェスタン解析により選抜した。その結果、PsaL タンパク質の蓄積量が野生株の 3% 未満まで減少した形質転換株

(PsaL-RNAi 株) を単離した。得られた株について PSI タンパク質の蓄積量をウェスタン解析により調べたところ、ほとんどのサブユニットは cw-15 と同様に蓄積していたが、PsaH のみが 10% 程度まで減少していた。PsaL-RNAi 株のステート遷移を評価するために、ステート 1 および 2 を誘導する条件で細胞を培養し、低温蛍光スペクトルの測定を行った (図 3)。低温蛍光スペクトルの測定では、PSII に由来する蛍光 (F687) と PSI に由来する蛍光 (F714) が得られるが、これら

は各光化学系に結合した光捕集クロロフィルの量を反映している。*cw-15* 株では、F687 あたりの F714 の収率が、ステート 1 に比べてステート 2 では大きく上昇する (図 3)。F714 の上昇は、ステート 2 の誘導に伴った PSI の光捕集クロロフィルの増加を反映している。これに対して *PsaL-RNAi* 株では、ステート 1 では *cw-15* 株と同様のスペクトルが得られたが、ステート 2 では F714 の上昇がほとんど見られなかった (図 3)。従って、*PsaL-RNAi* 株ではステート 2 の誘導効率が大きく低下していることが示された。

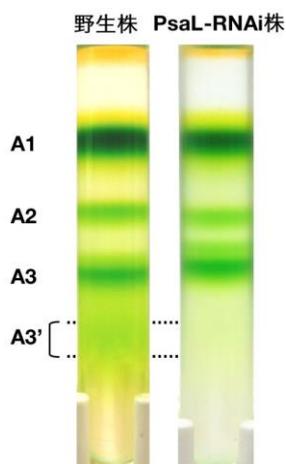


図 4 PSI-LHCI/II 超複合体の形成。
ステート 2 に誘導した細胞 (野生株、*PsaL-RNAi* 株) からチラコイド膜を単離し、ショ糖密度勾配超遠心によってクロロフィルタンパク質を分離した。

○*PsaH/L* の減少は *PSI-LHCI/II* 超複合体の形成を抑制した

ステート 2 の誘導に伴って形成される単量体 LHCII を結合した *PSI-LHCI* 複合体は、*PSI-LHCI/II* 超複合体と呼ばれる。*PsaL-RNAi* 株における *PSI-LHCI/II* 超複合体の形成について調べるために、ステート 2 に誘導した *cw-15* 株および *PsaL-RNAi* 株の細胞からチラコイド膜を単離して可溶化した後にショ糖密度勾配超遠心によってクロロフィルタンパク質複合体を分離した (図 4)。*cw-15* 株では三量体 LHCII を含む A1、PSII を含む A2、*PSI-LHCI* を含む A3、*PSI-LHCI/II* 超複合体を含む A3' が 4 本の緑色のバンドとして分離される。一方 *PsaL-RNAi* 株では、A1、A2、A3 は *cw-15* 株と同様に分離されたが、A3' の量が著しく減少していた (図 4)。各バンドに含まれる PSI のタンパク質 (*PsaA*、*PsaF*)、および 3 種類の単量体 LHCII (CP26、CP29、LhcbM5) の量をウェスタン解析で調べてみると、*cw-15* では単量体 LHCII はほとんど A3' に検出されたのに対し、*PsaL-RNAi* 株では一部が A1 画分に検出され

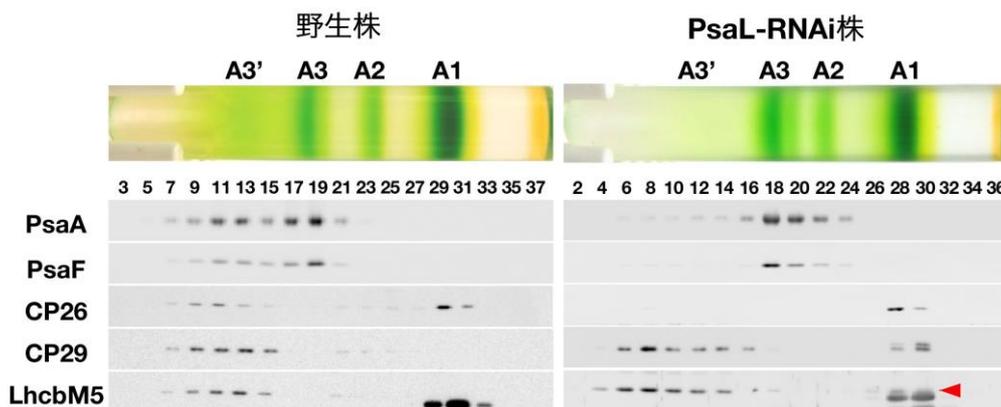


図 5. ステート 2 に誘導した野生株、および *PsaL-RNAi* 株における PSI (*PsaA*、*PsaF*) および単量体 LHCII (CP26、CP29、LhcbM5) タンパク質の分離。

た (図 5)。A1 画分には遊離した LHC が主に検出されるので、*PsaL-RNAi* 株において単量体 LHCII はステート 2 を誘導する条件においても、1) *PSI-LHCI* に結合できなかった。

2) 結合が不安定でサンプル調整の作業中に PSI-LHCI から遊離した。

3) PSII から移動していなかった。

のいずれかであったと考えられる。

○PsaH のみの発現を抑制してもステート2 の誘導効率が低下した

PsaL-RNAi 株では PsaH の蓄積量も大きく低下していたため、この株で見られた表現型が PsaL のみの欠損に起因するのか PsaH の減少との相乗効果によるものであるかが判別できない。この問題を解決するために、PsaH-RNAi 株の単離も試みた。560 株のパロモマイシン耐性株を選抜し、PsaH タンパク質の蓄積量が cw-15 株のおよそ 40% まで減少した株 (PsaH-RNAi 株) を単離した。得られた株についてステート遷移を蛍光スペクトルの測定によって評価すると、PsaL-RNAi 株に比べると緩やかではあるが、ステート2 の誘導効率の低下が見られた (図3)。また、PSI-LHCI/II 超複合体の形成についても解析を行った。ステート2 に誘導した細胞から単離したチラコイド膜を用いたショ糖密度勾配超遠心の結果、A3' の量が減少しており、更に単量体 LHCII の一部が A1 画分に検出された。従って、PsaH も PSI-LHCI/II 超複合体の形成に関与することが示された。

3. 研究成果

以上の結果より、PSI のサブユニットである

PsaH/L がステート2 において形成される

PSI-LHCI/II 超複合体の形成に関与することが示された。PsaH/L の機能が生化学的に示されたのは、本研究が初めてである。

4. 今後の課題と発展

本研究により、PsaH/L がステート遷移に関わるメカニズムの一端が明らかになった。しかしながらこれらのサブユニットが単量体 LHCII と PSI との結合に関与するのか、あるいは単量体 LHCII

の PSII-PSI 間の移動に関与するかは明確になっていない。また、ステート遷移には三量体 LHCII も関与していると考えられているが、三量体 LHCII は野生株でも単離操作中に遊離してしまうので、PsaH/L がこれと PSI との結合に関わっているかどうかは全く不明のままである。今後は LHCII が PSII あるいは PSI から単離作業中に解離しない精製条件を検討し、タンパク質の動態を解析する必要がある。また、PsaO に関しては 600 株以上の薬剤耐性株を選抜したが、PsaO タンパク質の蓄積量が低下した株は全く得られなかった。機能解析のためには、RNAi 法以外の遺伝子発現抑制法 (amiRNA 法など) を試みる必要がある。本研究で得られた知見と今後の結果を合わせることで、植物や藻類の光合成促進と CO₂ 削減のための技術開発の分子基盤を形成できると期待される。

5. 発表論文リスト

○学会発表

大西紀和、高橋裕一郎 緑藻クラミドモナスの光化学系 I サブユニット PsaH のステート遷移における機能解析

第9回日本光合成研究会公開シンポジウム 東京大学 駒場キャンパス 2009年5月29日

大西紀和、高橋裕一郎 緑藻クラミドモナスの光化学系 I サブユニット PsaL のステート遷移における機能解析

日本植物生理学会 2010年度大会 熊本大学黒髪北キャンパス 2010年3月19日