

学 位 論 文 題 名

Molecular Mechanisms of Photosynthetic State Transitions

(光合成ステート遷移の分子機構)

学位論文内容の要旨

Photosystem protein complexes (PSI and PSII) in chloroplasts have to work in concert to perform efficient photosynthesis. Light-harvesting antenna proteins of PSII (LHCII) collect solar energy, which is used to split water into molecular oxygen and protons. When PSII receives more light energy than its need, LHCII is suggested to redirect the excess energy to PSI, thereby maintaining the energy balance between PSII and PSI. This balancing mechanism is called state transition, and its precise mechanism has been unclear. In the series of biochemical studies carried out during my graduate course, I investigated how photosystem protein complexes and their light-harvesting antenna proteins maintain the energy balance in state transitions. Using a unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, I first manipulated the growth conditions so that the cells were in two different physiological conditions, so-called State 1 (PSI is more excited) and State 2 (PSII is more excited). Then I carried out sucrose density gradient centrifugation, nickel affinity chromatography, and gel filtration to isolate both the intact PSI complexes and intact PSII complexes. The protein identification by immunoblotting and mass spectrometry of the isolated PSII complexes showed that more and less LHCII proteins were connected to PSII complexes in State 1 and State 2, respectively. On the other hand, the isolated PSI complexes contained less and more LHCII proteins in State 1 and State 2, respectively. I also found that the sequential phosphorylation of several LHCII proteins and PSII proteins occurred during the transition from State 1 to State 2. These results have indicated that the molecular remodeling of photosystem protein complexes by the interactions of LHCII occurs during state transitions. Furthermore, I carried out the live-cell imaging of state transitions using fluorescence lifetime imaging microscopy. The results have provided not only further evidence for that the molecular remodeling occurs during state transitions *in vivo* but also its significant role in the energy dissipation. The results of my studies during the graduate course have elucidated that the mechanism of state transitions is regulated by dynamic processes involved in the protein-protein interactions, molecular remodeling of protein

complexes, and the energy dissipation for plant survival under different light environment.

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 皆 川 純

副 査 教 授 田 中 歩

副 査 教 授 山 本 興太郎

学 位 論 文 題 名

Molecular Mechanisms of Photosynthetic State Transitions

(光合成ステート遷移の分子機構)

光合成は全ての生命を持続させるエネルギーの源であり、その原理の追究は生命科学全体において常に最重要課題の一つであった。主要な電子伝達反応やプロトン輸送反応の詳細が明らかにされ、さらにそれら反応場であるタンパク質複合体のほとんどにおいて立体構造が決定された現在、待たれているのは、光合成反応がいかに動的に調節されているか、その仕組みの解明である。光合成は、直列に並ぶ2つの光化学系で太陽光を集め化学エネルギーへと変換する反応であるが、この反応を効率よく行うため、光化学系1と光化学系2の間で集光アンテナと呼ばれる一群のタンパク質をやりとりし、励起のバランスを取る仕組みが発達した。ステート遷移と呼ばれるこの機構は、代表的な光合成反応調節機構として知られてきたが、その分子基盤はこれまでほとんど明らかにされて来なかった。本論文に記載された一連の研究は、こうした国内外の状況を鑑み、とりわけステート遷移能が高い緑藻として知られるクラミドモナスを用い生化学的な解析を行うことで、ステート遷移中に光化学系1および光化学系2に何が起こるのか、その分子基盤を明らかにすることを目的として行われた。

第一部に記載された「蛍光クエンチング解析から明らかになった、光独立栄養条件下で生育したクラミドモナスにおける強光および低二酸化炭素濃度環境に対する異なった生理応答」では、強光ストレス条件下、また低二酸化炭素濃度条件下に置いたクラミドモナス細胞の光合成機能解析から、明所から暗所へ移す際、最初にプロトン濃度勾配の解消に伴う過剰エネルギー消去系の消失が起こり、続いて2つの光化学系間に還元力が蓄積されステート2が誘導されることを明らかにした。この結果は光合成科学における重要な知見として専門誌に報告された (*Photosynth. Res.* 94:307-314, 2007)。

第二部に記載された「クラミドモナスにおけるステート遷移中の光化学系 II の再編成」では、それまで状況証拠しか示されていなかったステ

ート遷移時の光化学系 II からの集光アンテナ LHCI の脱離について、脱離前後のタンパク質超複合体を単離精製することから決定的な証拠を得た。また、各タンパク質の遷移の各段階でのリン酸化の解析から、二段階のリン酸化によって光化学系 II 超複合体が再編成される、とするステート遷移の分子モデルを提唱した。この結果は、光合成にかかわる超分子複合体が、環境によってはサブユニットを組み替え再編成されることを示した初めての例として、光合成科学ばかりでなく広く植物科学全体に貢献するものとして、植物科学の一般誌に報告された (*Plant Cell* 20:2177-2189, 2008)

第三部に記載された「ステート遷移時の移動性集光アンテナタンパク質 LHCI の同定」では、ステート遷移時に、光化学系 II から脱離し続いて光化学系 I へ再結合する集光アンテナタンパク質として、CP26, CP29, LhcbM5 の 3 つを同定した。この移動性集光アンテナタンパク質の素性はそれまで全くわかっていなかったものである。この同定は、2 つの光化学系間を実際にタンパク質が移動していることを初めて証明した重要な結果であると評価され、その公表は生命科学ばかりでなく広く科学界全体に資するものとして、米科学アカデミー紀要にて行われた (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:477-482, 2006)。

第四部に記載された「ステート遷移時に見られる脱離する集光アンテナタンパク質 LHCI のクロロフィル蛍光寿命イメージング」では、上記第一部～第三部の結果を踏まえ、さらに、ステート遷移において 2 つの光化学系間を集光アンテナタンパク質が移動する様をリアルタイム可視化しようという極めて挑戦的な試みで、タンパク質が実際に移動する様子を、FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy) の原理を応用しレーザー共焦点顕微鏡で観察した。こうして得られたのは、ステート遷移の進行に伴って光化学系 II の蛍光寿命が長くなるという画期的な成果であり、光化学系 II から集光アンテナタンパク質が脱離する様の初めての可視化がなされた。

これら著者の一連の研究結果を要するに、光合成ステート遷移の分子機構の理解が大きく進み、その実態が「数メガ Da におよぶ超分子複合体が受ける動的なリモデリング」であることが明らかになったことになる。3 報の報文が、専門誌から一般誌まで広く受理されていることからわかるように、本論文は光合成科学、植物科学はもとより科学界全体に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。