

学 位 論 文 題 名

Functional analysis of light harvesting complexes in
photosynthetic algae

(光合成緑藻における集光色素アンテナタンパク質の機能的解析)

学位論文内容の要旨

All photosynthetic plants and algae with primary plastid can be coordinated in the Plantae kingdom, implying that they evolved from a common ancestor cyanobacteria. This evolution events has been predicted as occurred about more than 1.5 billion years ago. Following the events, photosynthesis spread among different eukaryotic kingdoms via secondary endosymbiosis, most commonly as a host involved a red or green alga. In photosynthesis, the initial conversion of solar energy to biochemical redox energy in photosynthetic eukaryotes is performed by the linked photosystems (PSI and PSII, respectively). These photosystems are large pigment-protein supercomplexes embedded in the thylakoid membrane. The PSII supercomplex splits water into four electrons, four protons and dioxygen, the primary electron acceptor for all aerobic organisms on this planet. PSII uses several light harvesting complex proteins (LHCII) to enhance the absorption of light energy and its subsequent transfer to the PSII reaction center. In nature, unexpected changes in light intensity and quality will easily lead to an overexciting of either photosystems, which results in accumulation of harmful reactive oxygen species through oxidative stress. However, unlike animals, most of plants and photosynthetic algae cannot move away from an endangering environment including light conditions. Therefore, plants and algae have developed the photo-protection mechanisms termed non-photochemical quenching (NPQ) that either dissipate or fine-tune an excess light energy to cope with the physical environment.

In chapter 1 and 2, I investigated about one of the NPQ called state transitions. State transitions are the remodeling of photosynthetic supercomplexes through lateral migration of LHCII. To keep optimal photosynthetic rate under variable light conditions, excitation levels of the two photosystems are balanced via redistribution of LHCII. It has been known that LHCII phosphorylation is required for a transition from State 1, where mobile LHCII are associated with PSII, to State 2, where they are associated with PSI. However, it still remains unclear which particular step in the LHCII migration requires the phosphorylation and how the formation of PSI-LHCI/II supercomplex is regulated. The biochemical analysis and spectroscopic measurements of several mutants in these chapters clarifies that phosphorylation of LHCII are only required for disassembly of PSII-LHCII supercomplexes but not for the formation of PSI-LHCI/II supercomplexes during state 2 transition. Indeed, the results of the minor LHCII RNAi mutants demonstrate that one of the minor LHCII CP29, not CP26, is crucial when mobile LHCII re-associate with PSI under State 2 conditions. Thus, I propose the hypothesis that state transitions are regulated through not only single but two different reactions in either photosystems.

In chapter 3, I have developed a method to purify PSII-LHCII supercomplexes from the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. PSII-LHCII supercomplexes were isolated using either of the two detergents *n*-dodecyl- α -D-maltoside (α -DM) or *n*-dodecyl- β -D-maltoside (β -DM). The biochemical analysis shows that the PSII-LHCII supercomplexes isolated with α -DM bind more LHCII proteins, and highly active and stable as compared to those isolated with β -DM, which is consistent with the molecular weight difference.

In chapter 4, I tried to investigate molecular mechanisms of qE quenching. The qE quenching is the most fastest and rapidly reversible component in NPQ, which dissipates excess absorbed light

energy as a harmless heat. Recently, LHCSR protein has been identified as a main component of qE in *C. reinhardtii*. Using the method established in chapter 3, the localization and molecular functions of LHCSR protein have been clarified. Wild-type strain exhibits the formation of PSII-LHCII-LHCSR supercomplex in thylakoid membranes. In contrast, the mutants with a defect in stable formation of PSII-LHCII-LHCSR supercomplexes show significant impairment of qE quenching activity. Hence, we concluded that a stable formation of the PSII-LHCII-LHCSR supercomplex may strongly participate in high energy quenching in the green alga.

Finally, I discuss and summarize the evolution and the current opinions regarding the role of LHCII in photo-protections in the photosynthetic green alga. The section will present the concluding remarks and possible future research directions in this field.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 歩

副 査 教 授 山 口 淳 二

副 査 教 授 皆 川 純 (総合研究大学院大学)

学 位 論 文 題 名

Functional analysis of light harvesting complexes in photosynthetic algae

(光合成緑藻における集光色素アンテナタンパク質の機能的解析)

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となっている。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調節を受けているか、いかに最適化されているか、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、その分子基盤については、未だに不明の点が多い。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、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「クラミドモナス LHCII リン酸化欠損変異株におけるステート遷移」では、*stt7* と呼ばれる LHCII リン酸化酵素が欠損した株における光化学系超複合体のステート遷移における動態を生化学的に解析したところ、リン酸化されなかった LHCII は光化学系2から脱離しなかったこと、しかし、光化学系1には非リン酸化 LHCII が結合していることが確認された。この結果により、ステート遷移における LHCII リン酸化は、光化学系2からの LHCII の脱離過程に重要であり、光化学系1への再結合過程には不要であることが明らかになった。これまで、不明であった LHCII リン酸化の役割を初めて分子レベルで明らかにしたものと評価できる。

第二部に記載された「クラミドモナスのマイナー単量体 LHCII のステート遷移における分子機能」では、ステート遷移時に光化学系1に結合することが確認されている2つの単量体 LHCII (CP29 および CP26) の機能を調べるために、個別に RNAi 技術を用いてノックダウンし、そのステート遷移へ与える影響を解析した。その結果、CP26 を欠損した株で通常のステート遷移が見られたのに対し、CP29 を欠損した株では、全ての遊動性 LHCII が光化学系1は再結合できないことがわかった。この結果は、遊動性

LHCII が光化学系 1 へ再結合する際に、CP29 がその結合サイトとして機能していることを示唆しており、ステート遷移の分子機構解明における重要な知見であるとして、生化学の一般誌に報告された(*J. Biol. Chem.* (2009) **284**:7777-7782).

これまで、PSII コア粒子や LHCII サブユニット単独での精製法は確立されていたものの、生体内では結合しているこの両者を無傷の結合状態で単離する方法は知られていなかった。第三部である「安定な巨大 PSII-LHCII 超複合体のクラミドモナスからの単離」では、ステート遷移の分子機構を解明する上で避けては通れないこの困難な課題に界面活性剤の適用条件を工夫することで挑み、見事に達成したものである。本研究により、緑藻にも高等植物に存在するものと同等の $C_2S_2M_2L_2$ タイプの PSII-LHCII 超複合体が存在することが示された。本技術は、今後のステート遷移研究ばかりか、膜タンパク質複合体の研究全体の発展に大きく寄与する重要な成果であると評価できる。

第四部に記載された「クラミドモナスにおける qE クエンチング発動中に形成される PSII-LHCII-LHCSR 超複合体」では、第三部で開発した技術を、強光条件で生育させたクラミドモナス細胞に応用し、この条件下の PSII-LHCII 超複合体には、さらに LHCSR も結合していることを明らかにした。LHCSR は、緑藻の強光耐性に必須であることが最近遺伝学的に示された重要なタンパク質であり、本研究により、植物の強光耐性メカニズムの理解は大きく進展したものと評価できる。

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における、「数メガダルトンにおよぶ超分子複合体が受ける動的リモデリングの詳細」が明らかになったことになる。本論文は光合成科学はもとより、基礎生物学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。