

## 論文内容の要旨

### 論文題目

Functional analysis of two types of phycobilisome in *Synechocystis* sp. PCC 6803

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における  
二種類の集光超分子複合体フィコビリソームの機能解析

近藤久益子

### <序>

光合成生物は光合成を効率よく行うために様々な機構を備えている。集光装置はその代表的な例で、ラン藻（シアノバクテリア）や一部の真核藻類のフィコビリタンパク質（フィコビリソーム）、緑色植物や真核藻類のクロロフィル結合型集光装置（LHCI, LHCII）、紅色光合成細菌のバクテリオクロロフィル結合型集光装置（LH1, LH2）があげられる。集光装置は光エネルギーを光化学系反応中心へ伝えるという点で、光エネルギー利用効率の向上において最も重要な要素の一つであり、さらに近年、二つの光化学系のエネルギーバランスを保つ短時間の光環境応答（ステート遷移）においても重要な役割を果たしていることが分かってきた。

フィコビリソーム（PBS）はフィコビリタンパク質の集光超分子複合体で、紅藻、灰色植物、シアノバクテリアに存在している。PBSは5-10 MDaと巨大な複合体を形成しているため、完全な会合状態での解析は困難であり、特に光化学系反応中心複合体との相互作用についてはほとんど分かっていない。また、PBSは主には光化学系 II（PSII）へ光エネルギーを伝えるといわれている一方で、光化学系 I（PSI）へのエネルギー伝達も物理化学的な解析から示唆されているが生化学的な機構は未知のままである。

PBSの構造はフィコビリタンパク質フィコシアニンから構成されるロッドとアロフィコシアニンから構成されるコアに分けられ、ロッドとコアはCpcGタンパク質によって連結されているといわ

れている (Fig. 1A)。私は修士課程において、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 のゲノム中に 2 コピー存在する CpcG1 と CpcG2 が 2 種類の異なる PBS を形成することを見いだした。CpcG1 が形成する PBS (CpcG1-PBS) はほぼ全ての構成タンパク質を含むが、CpcG2 が形成する PBS (CpcG2-PBS) はコアを含まない (Fig. 1B)。本研究では PBS の不均一性に着目し、二種類の PBS の細胞内での機能を明らかにすることを目指した。

## <結果と考察>

### 1. エネルギー伝達における機能

野生株および各 *cpcG* 遺伝子破壊株のクロロフィル励起時の低温蛍光スペクトルから、*cpcG2* 破壊株では野生株と比べ、PSI/PSII 比が上昇し、*cpcG1* 破壊株では減少していることが分かった (Fig. 2B)。さらに、PBS から PSI へのエネルギー伝達効率を、フィコシアニン励起時 (Fig. 2A) の PSI 蛍光の PSII 蛍光に対する比として算出し (Table 1, A)、PSI/PSII 量比 (Table 1, B) で標準化したところ (Table 1, C)、CpcG2-PBS から PSI へのエネルギー伝達効率は CpcG1-PBS と比べ、 $(0.630 \div 0.202 =)$  約 3 倍高いことが分かった。これらの結果から、CpcG1-PBS が比較的 PSII の集光装置として機能する一方、CpcG2-PBS は PSI の集光装置として機能していることが示唆された。さらに、細胞の粗抽出液を遠心によって分画し、CpcG1 および CpcG2 の局在を免疫ブロット法で調べた (Fig. 3B)。すると CpcG2 は一部のフィコシアニンとともに 20k x g 沈殿の粗チラコイド膜画分 (P1) に多く存在しているのに対し、CpcG1 は 100k x g 沈殿の遊離 PBS を含む高分子タンパク質画分 (P2) と粗チラコイド膜画分 (P1) にほぼ等量回収された。従って、CpcG2-PBS は CpcG1-PBS と比べ、チラコイド膜に強く相互作用していることが示唆された。CpcG1 と CpcG2 は共に N 末端に保存性の高いリンカードメイン領域を有するが、CpcG2 のみ C 末端に疎水性領域を持ち、この領域が CpcG2 の特異な機能を決定していると考えられる (Fig. 4)。また他の多くのシアノバクテリアにおいても CpcG2 と同様の疎水性領域を持つ CpcG が広く存在していることが分かった (Fig. 5)。

### 2. 光化学系複合体との同時精製

CpcG2 タンパク質と PSI との直接的な相互作用を示すために、界面活性剤で可溶化したチラコイド膜タンパク質を密度勾配遠心によって分画した。ところが以前に報告のあった PBS の結合した PSII を精製する方法では、フィコビリソームは超複合体を維持していないことが分かった。また、PBS が安定であるとされる高濃度のリン酸緩衝液を用いると PSII や PSI の多量体構造が不安定になった。そこでグリシンペタインを加えた低塩溶液中で細胞を破碎しチラコイド膜タンパク質を  $\beta$ -ドデシルマルトシドで可溶化した。これをコール酸を添加したグリセロール密度勾配で遠心したところ、一部の CpcG2 タンパク質が PSI 三量体と同じ画分に回収された。一方、CpcG1 タンパク質はこの画分には全く回収されなかった (Fig. 6, lane 10)。このような条件では PBS は超複合体を維持していないが、CpcG2 がアロフィコシアニンコアを介さずに PSI と相互作用することから、CpcG2-PBS から PSI へのエネルギー伝達が示唆された。

### 3. ステート遷移における機能

ステート遷移とは PSII と PSI の励起状態のバランスを短時間で調節する現象で、二つの光化学系複合体を持つ酸素発生型光合成生物にとって重要な光環境応答である。PSII を過剰に励起する光条件では集光装置から PSI へのエネルギー伝達が上昇し（ステート 2）、PSI を過剰に励起する光条件では逆の現象が起こる（ステート 1）（Fig. 7）。シアノバクテリアでは PBS から PSII および PSI へのエネルギー伝達効率に変化し、これには PBS の動きが必要であることが分かっているが、その生化学的な機構は全く不明である。そこで、CpcG2-PBS のステート遷移への関与を CpcG1-PBS と比較した。ステート 2（暗順応）とステート 1（DCMU+光）処理細胞の低温蛍光スペクトルを測定したところ、*cpcG1* 破壊株、*cpcG2* 破壊株は共にクロロフィルから PSI/PSII へのエネルギー分配の変化は野生株と同様だったが、*cpcG1* 破壊株では PBS から PSI/PSII へのエネルギー分配の変化が野生株や *cpcG2* 破壊株よりも小さかった（Fig. 8）。さらに室温のクロロフィル蛍光を測定しステート遷移の経時変化を測定した。PSII 光（PSII を主に励起）でステート 2 を誘導後、PSI 光（PSI を主に励起）を照射してステート 1 への遷移を調べたところ、*cpcG1* 破壊株では野生株や *cpcG2* 破壊株で見られるような蛍光の経時変化がほとんど見られなかった（Fig. 9）。これらの結果から、CpcG2-PBS はステート遷移を起こさない PBS であることが示唆された。また、CpcG1-PBS と CpcG2-PBS の動きを比較するために、共焦点顕微鏡を用いて Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) 解析を行った。FRAP 解析では細胞の約半分の蛍光を退色させその後の回復の時間変化でチラコイド膜上の色素タンパク質の拡散を比較することができ、フィコビリソームの動きを見るのに有効な方法である（Fig. 10）。その結果、*cpcG1* 破壊株および *cpcG2* 破壊株でも野生株と同様に蛍光退色の回復が見られた（Fig. 11）。一方、PBS の動きを止めるような条件下ではいずれの株においても蛍光退色の回復はほとんど見られなかった。従って、ステート遷移に必要なフィコビリソームの動きに関しては CpcG2-PBS は CpcG1-PBS と違いがないと示唆された。

#### <結論と今後の展望>

ステート 1 では、PSII の集光装置として主に CpcG1-PBS が、PSI の集光装置としてコア構造を欠く CpcG2-PBS が機能していると考えられる。またチラコイド膜上の動きには互いに違いは見られなかったが、ステート遷移を担っているのは CpcG1-PBS であり CpcG2-PBS は関与しないことから、ステート 2 では一部の CpcG1-PBS が PSI へ移動すると考えられる。今後は野生株において CpcG1-PBS と CpcG2-PBS の機能分化の分子機構を明らかにする必要がある。電子顕微鏡等で構造や局在の違いを明らかにするとともに、CpcG2-PBS と PSI および CpcG1-PBS と PSII との超複合体精製を目指す。このような PBS の一細胞内での不均一性はこれまでほとんど議論されたことがないが、他の集光装置でも生育環境に応じた様々な機能分化が存在すると推定される。本研究で見いだされた PBS の機能の多様性は、その概念を他の集光装置にまで広げることによって、光合成生物の集光システムにおける普遍原理の解明への突破口となると期待される。

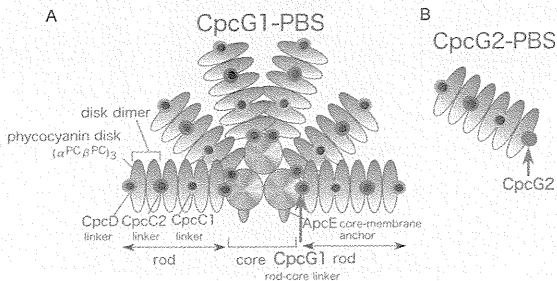


Fig. 1 CpcG1-フィコビリソーム (PBS)(A)とCpcG2-PBS(B)の模式図

Table 1. 細胞におけるフィコシアニンからPSI/PSIIへのエネルギー伝達効率。600 nm励起 (Fig. 2A)の蛍光発光強度比を  $F_{PSI}/F_{PSII}$  として算出し、435 nm励起 (Fig. 2B)の蛍光発光強度比 (量比を反映) で標準化した。CpcG2-PBSはCpcG1-PBSにくらべ (0.630+0.202)約3倍PSIへのエネルギー伝達効率が高いことが示唆された。

	Wild Type	$\Delta cpcG2$	$\Delta cpcG1$	$\Delta cpcG2/\Delta cpcG1$
(A) $F_{PSI}/F_{PSII}$ excitation at 600 nm	0.72 ± 0.041	0.92 ± 0.063	0.86 ± 0.16	0.81 ± 0.072
(B) $F_{PSI}/F_{PSII}$ excitation at 435 nm	3.00 ± 0.37	4.54 ± 0.40	1.40 ± 0.45	2.49 ± 0.30
(C) = A/B	0.243 ± 0.023	0.202 ± 0.012*	0.630 ± 0.069*	0.325 ± 0.018

\*The difference is significant (t test,  $P = 0.0009$ ).

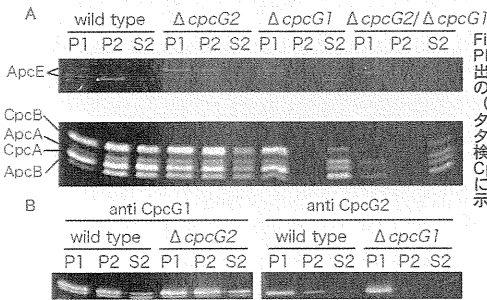


Fig. 3 細胞内におけるCpcG1-PBSとCpcG2-PBSの局在。粗抽出液を低速の沈殿 (P1)、高速の沈殿 (P2) およびその上清 (S1) に分離した。フィコビリタンパク質を蛍光で (A)、CpcGタンパク質を抗体で検出した (B)。CpcG2-PBSはCpcG1-PBSに比べてフィコビリタンパク質に強く相互作用していることが示唆された。

Fig. 5 NJ法によるCpcGアミノ酸配列の無根系統樹。SynechocystisのCpcG2と同様にC末に疎水性領域が多量のシアノバクテリアに存在していた (赤点線)。

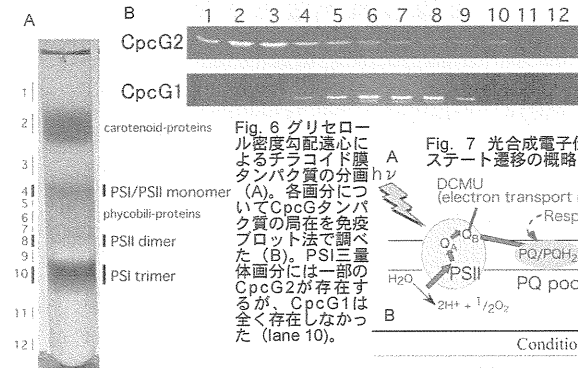
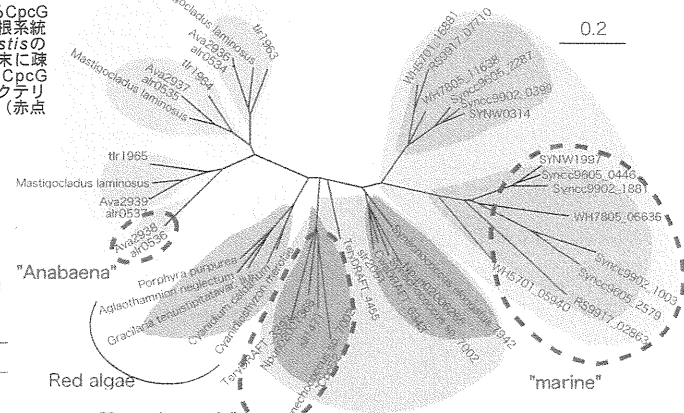
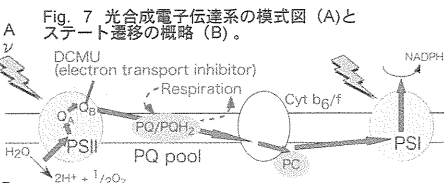


Fig. 6 グリセロール密度勾配泳動に膜タンパク質の分離 (A)、各画分についてCpcGタンパク質の存在を免疫プロット法で調べた (B)。PSI二量体画分には一部のCpcG2が存在するが、CpcG1は全く存在しなかった (lane 10)。



	Condition		Acclimation
	Light	PQ pool	Energy distribution
State 2	PSII light or Dark	Reduced	PBS → PSII ▼ PSI ▲
State 1	PSI light or DCMU + Light	Oxidized	PBS → PSI ▲ PSII ▼

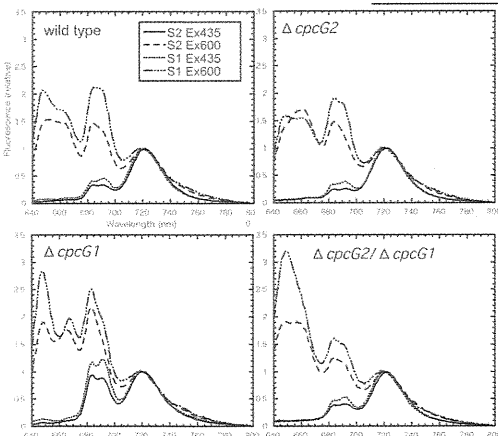


Fig. 8 ステート遷移処理時の細胞の低温蛍光スペクトル。暗順応でステート2 (S2) を20  $\mu$ M DCMU添加後3分間の白色光照射でステート1 (S1) を導いた。720 nmのPSIIピークで標準化して示した。692 nmのPSIIピークの変化がステート遷移の度合いを表す。cpcG1破壊株およびcpcG2/cpcG1二重破壊株では600 nm励起時の変化が減少していた。

Fig. 11 蛍光回復の株間の比較。退色領域の周辺の蛍光強度の変化をピクセル数として数値化しプロットした。cpcG2破壊株およびcpcG1破壊株でも野生株と同様、退色の回復が観察された。

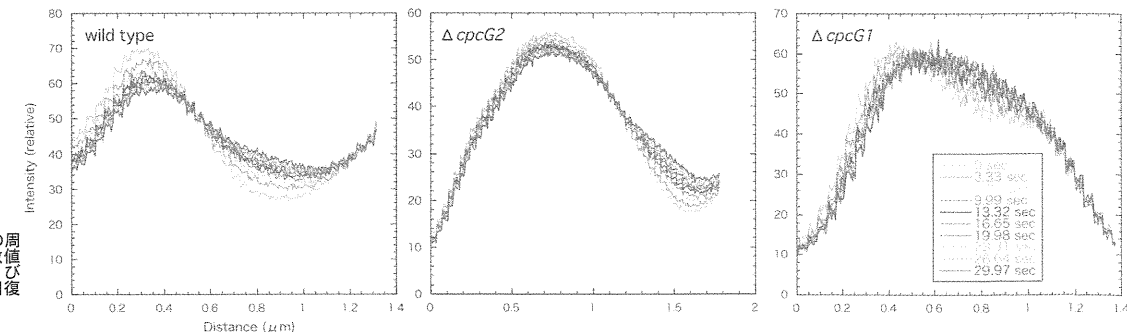


Fig. 2 77 Kにおける細胞の低温蛍光スペクトル。励起波長はそれぞれ600 nm (フィコシアニン) (A) および435 nm (クロロフィル) (B)。ピークは650-660 nmがフィコビリソーム、680-690 nmが光化学系II (PSII)、720 nmが光化学系I (PSI) に由来する。

Fig. 4 CpcG1とCpcG2のアミノ酸配列の比較。CpcG2のC末にのみ疎水性領域が存在する (灰色で示した)。黒線は抗体ペプチド抗体の作製に用いた部位。

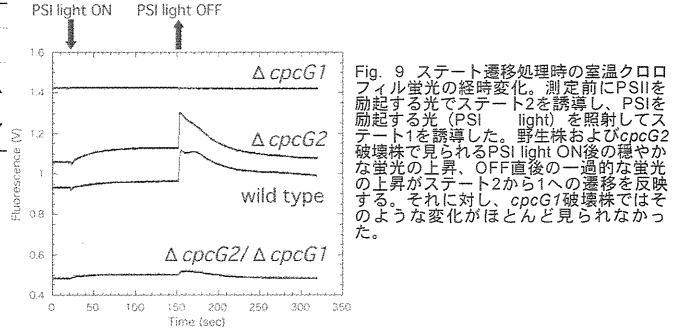


Fig. 9 ステート遷移処理時の室温クロロフィル蛍光の経時変化。測定前にPSIIを励起する光でステート2を誘導し、PSIIを励起する光 (PSII light) を照射してステート1を誘導した。野生株およびcpcG2破壊株で見られるPSII light ON後の遅やかな蛍光の上昇、OFF後の一過的な蛍光の昇がステート2から1への遷移を反映する。それに対し、cpcG1破壊株ではそのような変化がほとんど見られなかった。

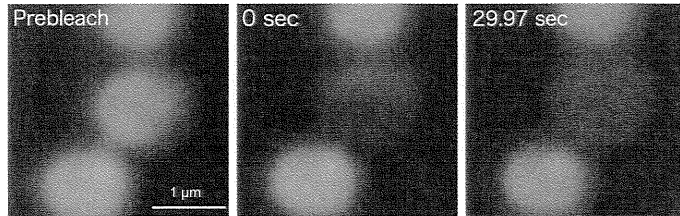


Fig. 10 野生株のFRAP測定例。フィコシアニンを励起し (633 nm)、主にフィコビリソームの蛍光を検出することで、フィコビリソームの動きを調べた。