

## 光化学系II複合体は界面活性剤により二量体化する！？§

東京大学・大学院総合文化研究科  
渡邊麻衣

### 1. はじめに

光化学系II複合体（系II複合体）は、チラコイド膜に存在する超分子複合体であり、少なくとも20のサブユニットと多数の色素や脂質分子からなり、シアノバクテリアから高等植物までよく保存されている。これまでに、さまざまな生物から単離されており、単量体と二量体の2つの状態が報告されている<sup>1-4)</sup>。好熱性シアノバクテリアでは、二量体を用いた結晶構造解析が行われており、3.8~2.9 Åの分解能の結晶構造が報告されている<sup>5-9)</sup>。高等植物では、単粒子解析や集光性アンテナタンパク質複合体である、LHCII (light-harvesting chlorophyll complex) と系IIの超分子複合体が精製されているが、これらも系II複合体は二量体である<sup>10-12)</sup>。また、酸素発生活性やタンパク質、色素結合量は単量体よりも二量体の方が高いことが報告されてきた。これらのことから、系II複合体は生体内で二量体として機能しており、単量体はアセンブリーや修復過程の中間体であると考えられてきた<sup>3, 13)</sup>。しかし近年、二量体と同等の酸素発生活性やタンパク質、色素組成を示す単量体の存在も報告されている<sup>14)</sup>。このように、系II複合体は二量体と単量体の間で変換することが知られているが<sup>15, 16)</sup>、二量体形成の生理的意義やその分子機構には不明な点が多い。

シアノバクテリアや緑藻において、系II複合体の二量体化に関与するサブユニットがいくつか報告されている<sup>17-22)</sup>。我々のグループも、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (*T. elongatus*) の変異体解析により、PsbMやPsbTcといった二量体の安定化に関与するサブユニットを報告している<sup>19, 20)</sup>。また、phosphatidylglycerolなどの脂質が二量体化に関与していることも知られている<sup>23)</sup>。

本研究では、系IIサブユニットの遺伝子破壊が系IIの二量体形成へ及ぼす影響を再評価する目的で、blue-native PAGE (BN-PAGE) による解析を行った。BN-PAGEはnativeなタンパク質複合体を簡便に分離する方法として広く用いられており、系II複合体の解析にも使われている<sup>16, 24)</sup>。しかし、実験法が簡便な割には詳しい条件や標品の検討はあまりされていない。今回我々は、チラコイド膜を可溶化する際の界面活性剤濃度に着目し、検討した。可溶化は、膜タンパク質複合体の精製の第一段階であり、濃度を検討することは、系II複合体の安定性を調べる上で重要である。膜タンパク質複合体は、高濃度の界面活性剤処理により、複合体が解離することが知られている。しかし我々は、可溶化濃度の検討により、以下に述べる予想外の結果を得た。

### 2. 結果

#### 2-1. 系II複合体の安定性

マイルドな条件で単離した *T. elongatus* のチラコイド膜を0.5%から5.0%までのさまざまな濃度の *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DM) で可溶化し、DMを含まないゲルを用いたBN-PAGEによって分離した (図1A)。それぞれのバンドは、分子量と二次元SDS-PAGEの解析から、系I三量体、フィコビリソームコア、系II二量体、単量体、フィコシアニンであった。

系IIの単量体と二量体の比は、可溶化時のDM濃度に依存して、変化していた。しかし驚いたことに、低濃度DMでは単量体が多く、高濃度DMでは二量体が増加するという、これまでの常識に反する結果であった。単量体の減少が高濃度DMにより引き起こされたサブユニットの解離ではないことを確かめるため、ゲルをスキャンし、それぞれのバンドのクロロフィル量

§ 第9回日本光合成研究会シンポジウム ポスター賞受賞論文

\* 連絡先 E-mail: MAIMAI@bio.c.u-tokyo.ac.jp

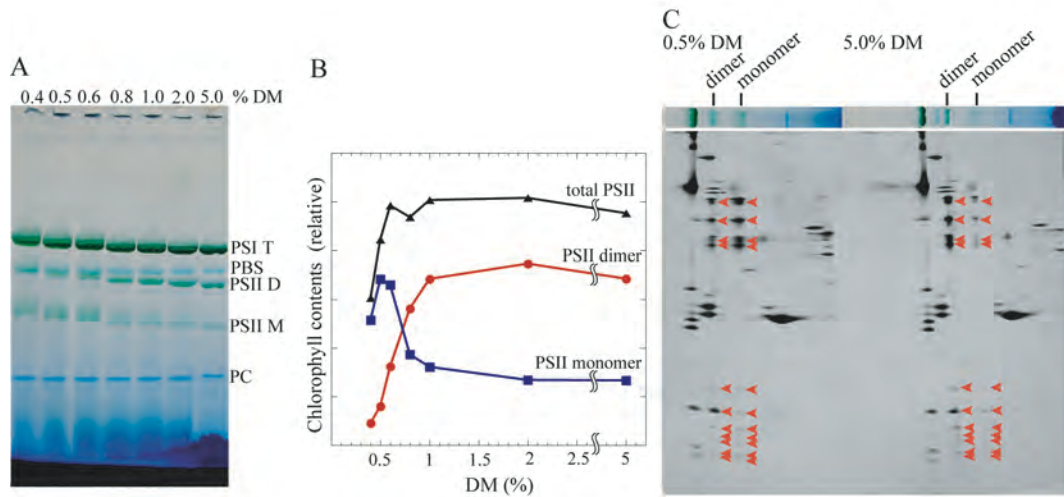


図1 WTのBN-PAGE

A、BN-PAGE; チラコイド膜を0.4から5.0%の各濃度のDMで可溶化し、遠心後の上清を泳動した。それぞれのバンドは、系II三量体 (PSI T)、フィコピリソームコア (PBS)、系II二量体 (PSII D)、系II単量体 (PSII M)、フィコシアニン (PC)。B、系II複合体のクロロフィル含量; BN-PAGEのゲルをスキャンしたときの670 nmの吸収面積。C、二次元SDS-PAGE; 一次元目のBN-PAGEの0.5%または5% DMのレーンを変性し、二次元SDS-PAGEを行った。赤矢尻は、系II複合体のサブユニットを示す。ゲルは銀染色した。

を求めた (図1B)。その結果、単量体の減少に対応して二量体が増加していた。二次元SDS-PAGEの結果から、タンパク質としても単量体の減少と二量体の増加が確認できた。また、CP43-less単量体などのこわれた系II複合体は見つからなかった (図1C)。これらの結果は、可溶化時のDM濃度により、系II複合体の単量体と二量体の回収比が変化することを明確に示している。

2-2. 段階的DM処理

可溶化時のDM濃度に依存した系II複合体の変化が、単量体から二量体への変換であるのかを調べるため、段階的なDM処理を行った。

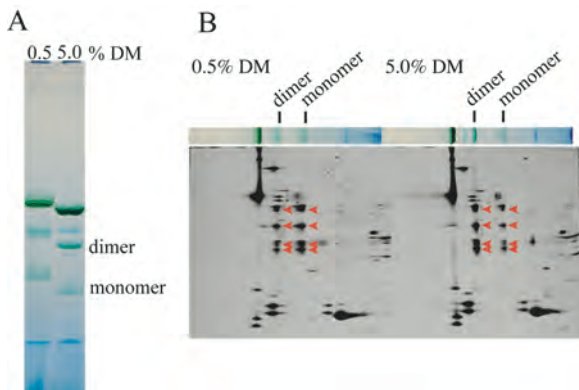


図2 段階的DM処理

A、BN-PAGE; 0.5% DMでチラコイド膜を可溶化後、遠心した上清 (レーン1) に、さらにDMを加えて処理したもの (レーン2, 終濃度5.0%)。B、二次元SDS-PAGE; 赤矢尻は系II複合体のサブユニットを示す。

0.5% DMでチラコイド膜を可溶化後、遠心により不溶性画分を除き、その上清に終濃度が5.0%になるようにさらにDMを加えて処理した後でBN-PAGEで分離した。このDMの追加によって明らかに単量体の減少と二量体の増加が見られた (図2)。このことは、高濃度のDM処理による系II複合体の単量体から二量体への変換を示している。

2-3. PsbTc, PsbM破壊株

結晶構造においてこれらのサブユニットは二量体を形成する境界面に存在し、さらに、その近くには4分子のDMも存在していた<sup>9)</sup>。また、PsbM同士でロインジッパー様の相互作用がみられ、二量体を安定化することが提案されている<sup>9)</sup>。一方、我々は遺伝子を破壊した変異株の系II複合体のクロマトグラフィーにおける挙動からPsbTc、PsbMが系II複合体の二量体化に関与することを報告している<sup>19, 20)</sup>。今回は、さらにマイルドな手法であるBN-PAGEによって、これらのサブユニットと二量体化の関係を再検討した。

*psbTc*欠損株では、低濃度のDMで可溶化すると、ほとんどが単量体であった (図3A)。また、1.0% DMで可溶化しても二量体の増加は見られなかった。しかし、2.0%以上のDMで可溶化すると、単量体の減少と二量体の増加が見られた。一方、*psbM*欠損株では、すべての濃度で単量体のわずかな増加が見られたが、野生株と同様にDM濃度に依存した単量体の減少と二

量体の増加が起こった (図3B)。このことは、PsbMの二量体化への寄与はほとんどないことを示している。結晶構造から、PsbMはロイシンジッパー様の相互作用により二量体を安定化していることが示唆されているが、生体内ではこれによる二量体の安定はごく僅かであると考えられる。

### 3. おわりに

これまでの結果から、系II複合体の二量体化には、(1) PsbTcに依存した二量体化、(2) DMにより引き起こされる二量体化、の少なくとも2つのプロセスがあると考えている。結晶構造において、PsbTcは二量体の境界面に存在し、他方の単量体のCP47の膜貫通部と接しており、この相互作用が二量体の安定化に関与していると考えられる。また、この境界面のルーメン側にはDM分子が挿入されている。疎水性の短鎖脂肪酸を1本だけもつDM分子は、長い脂肪酸を2本もつ本来の脂質に比べ小さい。つまり、境界面に脂質分子を含む二量体においてその脂質がDM分子に置き換わることで、単量体間の距離が縮み、より強固な二量体が形成されることが考えられる。本来のチラコイド膜内では系II複合体は複数の脂質分子を含んだ緩やかな二量体構造をとっていると考えている。この緩やかな二量体構造は、系IIのダイナミックなふるまいなどに関わっているかもしれない。今後は、D1タンパク質の素早いターンオーバーなどとの関連を検証する予定である。

Received July 22, 2009, Accepted July 23, 2009, Published August 31, 2009

### 参考文献

- Rogner, M., Dekker, J. P., Boekema, E. J. and Witt, H. T. (1987) Size, shape and mass of the oxygen-evolving photosystem II complex from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp, *FEBS Lett.* 219, 207-211.
- Bald, D., Kruij, J. and Rogner, M. (1996) Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes: How is the phycobilisome connected with the photosystems?, *Photosynth. Res.* 49, 103-118.
- Hankamer, B., Nield, J., Zheleva, D., Boekema, E., Jansson, S. and Barber, J. (1997) Isolation and biochemical characterisation of monomeric and dimeric photosystem II complexes from spinach and their relevance to the organisation of photosystem II *in vivo*, *Eur. J. Biochem.* 243, 422-429.
- Adachi, H., Umena, Y., Enami, I., Henmi, T., Kamiya, N. and Shen, J. R. (2009) Towards structural elucidation of eukaryotic photosystem II: Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of photosystem II from a red alga, *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 121-128.
- Zouni, A., Witt, H. T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W. and Orth, P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution, *Nature* 409, 739-743.
- Kamiya, N. and Shen, J. R. (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 98-103.
- Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J. and Iwata, S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Science* 303, 1831-1838.
- Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A. and Biesiadka, J. (2005) Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II, *Nature* 438, 1040-1044.
- Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A. and Saenger, W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 334-342.
- Hankamer, B., Morris, E. P. and Barber, J. (1999) Revealing the structure of the oxygen-evolving core dimer of photosystem II by cryoelectron crystallography, *Nat. Struct. Biol.* 6, 560-564.
- Dekker, J. P. and Boekema, E. J. (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants, *Biochim. Biophys. Acta* 1706, 12-39.
- Nield, J. and Barber, J. (2006) Refinement of the structural model for the Photosystem II supercomplex of higher plants, *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 353-361.
- Barbato, R., Friso, G., Rigoni, F., Dalla Vecchia, F. and Giacometti, G. M. (1992) Structural changes and lateral redistribution of photosystem II during donor side photoinhibition of thylakoids, *J. Cell. Biol.* 119, 325-335.
- Kern, J., Loll, B., Luneberg, C., DiFiore, D., Biesiadka, J., Irrgang, K. D. and Zouni, A. (2005) Purification, characterisation and crystallisation of photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* cultivated in a new type of photobioreactor, *Biochim. Biophys. Acta* 1706, 147-157.
- Meunier, P. C., Colon-Lopez, M. S. and Sherman, L. A. (1997) Temporal changes in state transitions and photosystem organization in the unicellular, diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142, *Plant Physiol.* 115, 991-1000.

16. Aro, E. M., Suorsa, M., Rokka, A., Allahverdiyeva, Y., Paakkarinen, V., Saleem, A., Battchikova, N. and Rintamaki, E. (2005) Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes, *J. Exp. Bot.* *56*, 347-356.
17. Iwai, M., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2006) Absence of the *psbH* gene product destabilizes the Photosystem II complex and prevents association of the Photosystem II-X protein in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Photosynth. Res.* *87*, 313-322.
18. Katoh, H. and Ikeuchi, M. (2001) Characterization of PSII-I or PSII-K protein-depleted photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* strain BP-1. PSII-I protein plays an essential role in dimerization of photosystem II, *In PS2001 Proceedings: 12th International Congress on Photosynthesis*. pp. S5-50. CSIRO PUBLISHING, Collingwood.
19. Aoyama, C. (2003) Studies on PsbM of photosystem II in a thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Master thesis*.
20. Iwai, M., Katoh, H., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2004) PSII-Tc protein plays an important role in dimerization of photosystem II, *Plant Cell Physiol.* *45*, 1809-1816.
21. Iwai, M., Suzuki, T., Dohmae, N., Inoue, Y. and Ikeuchi, M. (2007) Absence of the PsbZ subunit prevents association of PsbK and Ycf12 with the PSII complex in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Plant Cell Physiol.* *48*, 1758-1763.
22. Bentley, F. K., Luo, H., Dilbeck, P., Burnap, R. L. and Eaton-Rye, J. J. (2008) Effects of inactivating *psbM* and *psbT* on photodamage and assembly of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Biochemistry* *47*, 11637-11646.
23. Kruse, O., Hankamer, B., Konczak, C., Gerle, C., Morris, E., Radunz, A., Schmid, G. H. and Barber, J. (2000) Phosphatidylglycerol is involved in the dimerization of photosystem II, *J. Biol. Chem.* *275*, 6509-6514.
24. Herranen, M., Battchikova, N., Zhang, P., Graf, A., Sirpio, S., Paakkarinen, V. and Aro, E. M. (2004) Towards functional proteomics of membrane protein complexes in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant Physiol.* *134*, 470-481.

## High Concentrations of Detergent Induce a Dimerization of Photosystem II!?

Mai Watanabe\*

Department of Life Sciences (Biology),  
Graduate School of Arts and Science, University of Tokyo