

珪藻 *Chaetoceros gracilis* の酸素発生光化学系II複合体の単離と解析[§]

¹東京大学大学院 総合文化研究科, ²東京理科大学 理学部
長尾 遼^{1,*}、輦 達也²、池内 昌彦¹、榎並 勲²

1. はじめに

光合成生物における光エネルギー変換系は葉緑体のチラコイド膜上に存在する。光照射に伴い水を分解し酸素を発生する光化学系II複合体 (PSII) は、CP47, CP43, D2, D1, Cytochrome *b559*αなどの膜タンパク質と数種の表在性タンパク質に加え、種々の光合成色素や酸化還元成分が結合した超分子複合体である。PSIIは、水を電子供与体としてプラストキノン (PQ) を還元するとともに、副産物として酸素を発生する点で、現在の地球上の生態系を保持するために最も重要な反応系の一つだといえる。しかし、その機構を明らかにする点でPSIIは不安定で、失活しやすく、また光合成生物により精製過程も異なるため、単離・精製は決して容易なことではない。これまでに全表在性タンパク質を結合した高い酸素発生活性をもつPSIIの調製に成功しているのは、高等植物^{1,2)}、シアノバクテリア^{3,4)}、紅藻^{5,6)}、緑藻⁷⁾、ユーグレナ⁸⁾からである。種々のPSIIを解析する過程で、表在性タンパク質の種類が光合成生物ごとに異なっていることが明らかとなり、高等植物・緑藻・ユーグレナでは P_{sb}O, P_{sb}P, P_{sb}Q の3種類、シアノバクテリアでは P_{sb}O, P_{sb}V, P_{sb}U の3種類、紅藻では P_{sb}O, P_{sb}Q', P_{sb}V, P_{sb}U の4種類の存在がそれぞれで確認されてきた¹⁻⁸⁾。さらに、その結合様式も光合成生物ごとに異なっていることが知られている^{9,10)}。このため、個々の表在性タンパク質の機能と構造および結合様式を明らかにすることは、酸素発生系における表在性タンパク質の役割と進化を解析する上で重要な課題である。

珪藻は、海洋、湖沼、河川などの水域に普遍的に生育し、水域圏生物の重要な食糧源となると共に、世界中の熱帯雨林が吸収する総量と同程度の CO₂ を吸収することから地球温暖化の防止にも大いに貢献して

いる藻類である^{11,12)}。従って、珪藻は水域圏の生態系で最も重要な植物プランクトンの一種であるといえる。なお、珪藻は紅藻の二次共生により誕生した藻類¹³⁾であり、珪藻PSIIにどのような表在性タンパク質が結合し、機能しているかを明らかにすることは、植物の進化の過程を明らかにする上でも極めて興味深い。これまでに、珪藻からチラコイド膜やPSIIを精製する試みが行われてきたが¹⁴⁾、高い酸素発生活性を保持した状態での精製には成功していない。その大きな原因の1つは、珪藻は珪酸質の固い殻をもつため細胞破壊が困難であると考えられてきたことにある。近年、筆者らは、海水産の中心目珪藻 *Chaetoceros gracilis* から高い酸素発生活性があり、全表在性タンパク質を結合したPSIIの単離に成功した¹⁵⁾。本稿では、珪藻 *C. gracilis* からのPSII単離法といくつかの解析結果を報告する。

2. 珪藻PSIIの単離

図1に珪藻 *C. gracilis* からのPSII単離法を示した。8Lの人工海水を用いて10日間培養した *C. gracilis* 細胞を buffer A (1 M betaine / 50 mM Mes (pH 6.5) / 5 mM MgCl₂) に懸濁し、DNA分解酵素である DNase I とプロテアーゼインヒビターである PMSF を終濃度 1 mM になるようにそれぞれ加え、遠心チューブの中で混合した。そのチューブを液体窒素に入れ凍結した後、手早く融解させ、30 min、氷上、暗所で処理することにより細胞を温和に破壊した¹⁶⁾。その後、遠心を行い未破碎細胞を除いた後、40,000 x g, 10 min で遠心した。この沈殿を buffer B (1 M betaine / 50 mM Mes (pH 6.5) / 1 mM EDTA) に懸濁し、チラコイド膜とした。

調製したチラコイド膜を終濃度 1.0 mg Chl/ml、1.0% Triton X-100で、5 min、氷上、暗所でスターラー攪拌

[§] 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: nagao@bio.c.u-tokyo.ac.jp

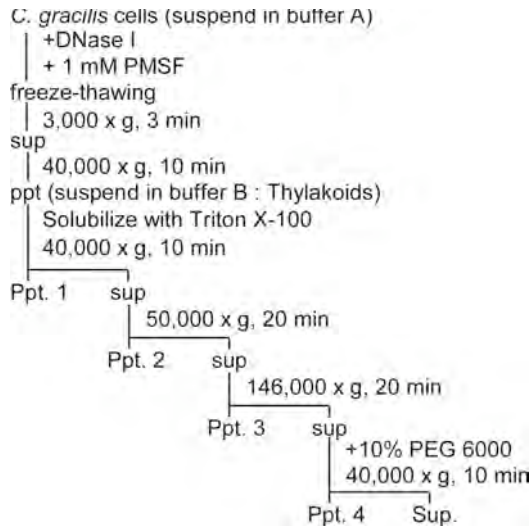


図1 珪藻 *C. gracilis* からのPSII単離法

しながら可溶化処理した。その後、40,000 × g で遠心し、未可溶のチラコイド膜を沈殿 (Ppt. 1) として除いた上清を、50,000 × g、146,000 × g で遠心し、得られた沈殿をそれぞれ Ppt. 2、Ppt. 3 とした。146,000 × g 後の遠心上清に、終濃度10% になるように PEG 6000 を加え、40,000 × g で遠心し、その沈殿を Ppt. 4 とし、遠心上清を Sup. とした。これら5つのフラクション (図1の Ppt. 1-4, Sup.) とチラコイド膜で、クロロフィル含量¹⁷⁾と酸素発生活性の測定、SDS-PAGEによるポリペプチド組成の分析を行った。

3. 各フラクションのポリペプチド組成、酸素発生活性と回収率

表1にTriton処理後の各フラクションのクロロフィルと酸素発生活性の分布を示し、さらに、図2にチラ

コイド膜とPSII精製過程における各フラクションのポリペプチド組成を示した。

Triton処理後の 40,000 × g の遠心で沈殿してくる未可溶チラコイド膜 (Ppt. 1) には、約14%のクロロフィルが分布した。従って、約86%のクロロフィルタンパク質複合体が、Triton処理により可溶化したことになる。可溶化したサンプルを 50,000 × g で遠心沈殿してくるフラクション (Ppt. 2) は、図2の lane 3 のようなポリペプチド組成となり、さらにWestern blottingの結果から、*印で示すPSIの大型サブユニット (PsaA/B) と●印で示す集光性色素タンパク質複合体fucoxanthin chlorophyll *a/c* binding proteins (FCP) のそれぞれが確認された。従って、このフラクションは主にPSIから構成されていると言える。このPSIには約12%のクロロフィルが分布し、酸素発生活性はほとんどなかった。さらに、146,000 × g の遠心で沈殿してくるフラクション (Ppt. 3) には、50,000 × g の遠心で沈殿しきらなかった PSI とわずかな PSII が存在し (図2の lane 4)、そのクロロフィル分布は約2%であった。この遠心操作を省略すると、PSII フラクションに PSI が混在することになる。また、50,000 × gの遠心を省略して、146,000 × g の遠心をする、その遠心沈殿に PSII が混在する結果となったので、この遠心分画過程は必要である。146,000 × g の遠心上清に終濃度 10% になるように PEG 6000 を加え、40,000 × g の遠心で沈殿してくるフラクション (Ppt. 4) は、約 850 μmol O₂ (mg chl)⁻¹ h⁻¹ の高い酸素発生活性を示し、主としてPSIIのポリペプチドから構成されるフラクションであった(後述)。このフラクションには、約18%のクロロフィルと約 62%の酸素発生活性がそれぞれ分布していた。一

表1 Triton処理後の各フラクションのクロロフィルと酸素発生活性の分布

	Total Chl		Chl <i>a/c</i> ratio	Oxygen evolution ^b	
	mg Chl	%		μmol O ₂ (mg chl) ⁻¹ h ⁻¹	%
Thylakoids	45.8 ± 5.0	100 ^a	2.6 ± 0.6	242 ± 11	100 ^c
Ppt. 1	6.6 ± 2.6	14	3.0 ± 0.6	191 ± 32	11
Ppt. 2	5.5 ± 0.7	12	7.4 ± 2.7	11 ± 5	0.5
Ppt. 3	0.7 ± 0.2	2	4.5 ± 1.9	130 ± 48	1
Ppt. 4	8.1 ± 0.5	18	2.5 ± 0.6	850 ± 98	62
Sup.	16.8 ± 2.0	39	2.0 ± 0.5	0	0

^a チラコイド膜を100%とした時のクロロフィル分布

^b 酸素発生活性の測定には、bufferに0.4 M sucrose / 40 mM Mes (pH 6.5)、アクセプターに*p*-benzoquinone を用いた。

^c チラコイド膜を100%とした時の酸素発生活性分布

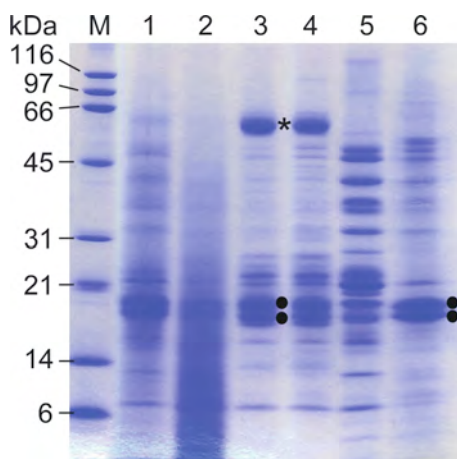


図2 各フラクションのポリペプチド組成

M : 分子量マーカー、lane 1 : チラコイド膜、lane 2 : Ppt. 1、lane 3 : Ppt. 2 (PSI)、lane 4 : Ppt. 3、lane 5 : Ppt. 4 (PSII)、lane 6 : Sup.

* : anti-PsaA/Bと反応したバンド、• : anti-FCPと反応したバンド

方、40,000 x g の遠心上清 (Sup.) には、表1に示すようにchl *a/c*比が2.0とchl *c*が多く、さらにWestern blottingの結果から、●印で示す FCP が確認されたため、このフラクションは主に FCP で構成されていることが示された (図2の lane 6)。

これらの結果は、チラコイド膜をTriton処理し遠心分画のみという単純かつ短時間の操作により、高い酸素発生活性をもつ PSII が高収率に得られたことを示している。

4. 珪藻PSIIのポリペプチド組成と表在性タンパク質

図3に Ppt. 4 のポリペプチドバンドを同定した結果を示す。図2 でみられる Ppt. 4 の各バンドを Western blottingやN末端アミノ酸シーケンスにより同定した結果、PSII膜タンパク質である CP47、CP43、D2、D1、Cytochrome *b559α* が確認されたので (図3の lane 1)、このフラクションは主に PSII で構成されていることが判明した。これらの膜タンパク質に加え、後述する PsbO、PsbQ', PsbV、PsbU、Psb31 の5種の表在性タンパク質と FCP、RuBisCO のサブユニットがこのフラクションに存在した。

このPSIIフラクションをアルカリTris処理し表在性タンパク質を遊離させた結果¹⁸⁾、5本のバンドが得られた (図3の lane 2)。Western blottingの結果、これらのうち4種は紅藻タイプの PsbO、PsbQ', PsbV、PsbU で

あったが、残りの一種は未知の新規タンパク質 (Psb31と命名) であることが判明した。この新規タンパク質 (Psb31) の遺伝子をクローニングした結果、Psb31 は核コードで、そのリーダー配列からチラコイド膜のルーメン側に存在することを明らかにした¹⁹⁾。さらに、Psb31 が PSII 膜タンパク質と直接静

電的結合していることが、架橋実験により明らかになった¹⁹⁾。このPsb31は、ゲノム解読されている珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* と *Thalassiosira pseudonana*^{20, 21)}にもコードされていることから、珪藻には5種類の表在性タンパク質が結合していることが示唆された。

5. おわりに

これまで困難だと考えられてきた珪藻から高い酸素発生活性を保持した状態でのPSIIの単離に初めて成功した。我々のグループは、過去に、ゲノムが解読されている *P. tricornutum* と *T. pseudonana* から PSII の単離を試みた。凍結融解法による細胞破碎ができなかったため、ガラスビーズ処理やフレンチプレス処理を用いて細胞を破碎したところ、酸素発生活性を失ったチラコイド膜しか得られなかった。従って、酸素発生活性を保持した状態でのチラコイド膜さらにはPSIIを容易に単離できるという点で、*C. gracilis* は使い勝手の良い材料であると言える。

図3に示すように、*C. gracilis* から得られた PSII には、RuBisCO や FCP が結合していた。すでに、これら成分をイオン交換クロマトグラフィーで除き、約 2,100 μmol O₂ (mg chl)⁻¹ h⁻¹の高い活性をもつ PSII の精製に成功している (B. B. A. in press)²²⁾。さらにこのPSIIには、紅藻タイプの4種の表在性タンパク質に加え、5番目の新規の表在性タンパク質 (Psb31) が結合していた。これら表在性タンパク質の再構成実験を行い、機能と結合様式を明らかにしたいと考えている。

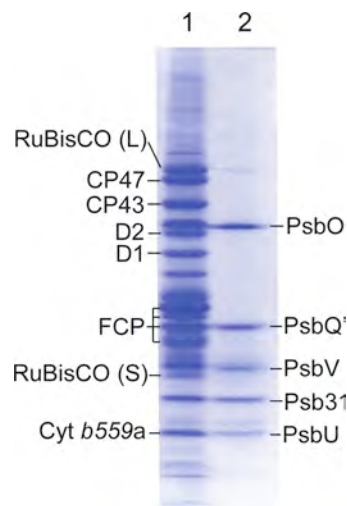


図3 PSIIサブユニットの同定

lane 1 : PSII、lane 2 : PSIIをアルカリTris処理して得た遠心上清

謝辞

本研究は、兵庫県立大学の菓子野 康浩先生、日本大学の奥村 彰規先生、理化学研究所の鈴木 健裕博士の指導・協力によるものであり、深く感謝し御礼申し上げます。また、本研究結果は日本学術振興会特別研究員の科学研究費補助金の援助によるものであり、謝意を表します。

Received November 7, 2009, Accepted November 20, 2009,

Published December 31, 2009

参考文献

- Berthold, D. A., Babcock, G. T., and Yocum, C. F. (1981) A highly resolved oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes, *FEBS Lett.* 134, 231-234.
- Enami, I., Kamino, K., Shen, J. -R., Satoh, K., and Katoh, S. (1989) Isolation and characterization of Photosystem II complexes which lack light-harvesting chlorophyll *a/b* proteins but retain three extrinsic proteins related to oxygen evolution from spinach, *Biochim. Biophys. Acta* 977, 33-39.
- Shen, J. -R., and Inoue, Y. (1993) Binding and functional properties of two new extrinsic components, cytochrome *c*-550 and a 12-kDa protein, in cyanobacterial photosystem II, *Biochemistry* 32, 1825-1832.
- Kashino, Y., Lauber, W. M., Carroll, J. A., Wang, Q., Whitmarsh, J., Satoh, K., and Pakrasi, H. B. (2002) Proteomic analysis of a highly active photosystem II preparation from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 reveals the presence of novel polypeptides, *Biochemistry* 41, 8004-8012.
- Enami, I., Murayama, H., Ohta, H., Kamo, M., Nakazato, K., and Shen, J. -R. (1995) Isolation and characterization of a Photosystem II complex from the red alga *Cyanidium caldarium*: association of cytochrome *c*-550 and a 12 kDa protein with the complex, *Biochim. Biophys. Acta* 1232, 208-216.
- 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.
- Suzuki, T., Minagawa, J., Tomo, T., Sonoike, K., Ohta, H., and Enami, I. (2003) Binding and functional properties of the extrinsic proteins in oxygen-evolving photosystem II particle from a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii* having his-tagged CP47, *Plant Cell Physiol.* 44, 76-84.
- Suzuki, T., Tada, O., Makimura, M., Tohri, A., Ohta, H., Yamamoto, Y., and Enami, I. (2004) Isolation and characterization of oxygen-evolving photosystem II complexes retaining the PsbO, P and Q proteins from *Euglena gracilis*, *Plant Cell Physiol.* 45, 1168-1175.
- Bricker, T. M., and Burnap, R. L. (2005) The Extrinsic Proteins of Photosystem II, in *Photosystem II: The water/plastoquinone oxido-reductase of photosynthesis* (Wydrzynski, T. and Satoh, K., Eds.) pp 95-120, Springer, Dordrecht.
- Enami, I., Okumura, A., Nagao, R., Suzuki, T., Iwai, M., and Shen, J.-R. (2008) Structures and functions of the extrinsic proteins of photosystem II from different species, *Photosynth. Res.* 98, 349-363.
- Nelson, D. M., Treguer, P., Brzezinski, M. A., Leynaert, A., and Queguiner, B. (1995) Production and dissolution of biogenic silica in ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation, *Global Biogeochem. Cycles* 9, 359-372.
- Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., and Falkowski, P. G. (1998) Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components, *Science* 281, 237-240.
- Falkowski, P. G., Katz, M. E., Knoll, A. H., Quigg, A., Raven, J. A., Schofield, O., and Taylor, F. J. (2004) The evolution of modern eukaryotic phytoplankton, *Science* 305, 354-360.
- Martinson, T. A., Ikeuchi, M., and Plumley, F. G. (1998) Oxygen-evolving diatom thylakoid membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1409, 72-86.
- Nagao, R., Ishii, A., Tada, O., Suzuki, T., Dohmae, N., Okumura, A., Iwai, M., Takahashi, T., Kashino, Y., and Enami, I. (2007) Isolation and characterization of oxygen-evolving thylakoid membranes and Photosystem II particles from a marine diatom, *Chaetoceros gracilis*, *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 1353-1362.
- Ikeda, Y., Satoh, K., and Kashino, Y. (2005) Characterization of photosystem I complexes purified from a diatom, *Chaetoceros gracilis*, in *Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives* (van der Est, A. and Bruce, D., Eds.) pp 38-40.
- Jeffrey, S. W., and Humphrey, G. F. (1975) New spectrophotometric equation for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural phytoplankton, *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167, 191-194.
- Yamamoto, Y., Doi, M., Tamura, N., and Nishimura, M. (1981) Release of polypeptides from highly active O₂-evolving photosystem-2 preparation by Tris treatment, *FEBS Lett.* 133, 265-268.
- Okumura, A., Nagao, R., Suzuki, T., Yamagoe, S., Iwai, M., Nakazato, K., and Enami, I. (2008) A novel protein in Photosystem II of a diatom *Chaetoceros gracilis* is

- one of the extrinsic proteins located on luminal side and directly associates with PSII core components, *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 1545-1551.
20. Armbrust, E. V., Berges, J. A., Bowler, C., Green, B. R., Martinez, D., Putnam, N. H., Zhou, S., Allen, A. E., Apt, K. E., Bechner, M., Brzezinski, M. A., Chaal, B. K., Chiovitti, A., Davis, A. K., Demarest, M. S., Detter, J. C., Glavina, T., Goodstein, D., Hadi, M. Z., Hellsten, U., Hildebrand, M., Jenkins, B. D., Jurka, J., Kapitonov, V. V., Kröger, N., Lau, W. W., Lane, T. W., Larimer, F. W., Lippmeier, J. C., Lucas, S., Medina, M., Montsant, A., Obornik, M., Parker, M. S., Palenik, B., Pazour, G. J., Richardson, P. M., Ryneerson, T. A., Saito, M. A., Schwartz, D. C., Thamtrakoln, K., Valentin, K., Vardi, A., Wilkerson, F. P., and Rokhsar, D. S. (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism, *Science* 306, 79–86.
21. Oudot-Le Secq, M. P., Grimwood, J., Shapiro, H., Armbrust, E. V., Bowler, C., and Green, B. R. (2007) Chloroplast genomes of the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*: comparison with other plastid genomes of the red lineage, *Mol. Genet. Genomics* 277, 427–439.
22. Nagao, R., Tomo, T., Noguchi, E., Nakajima, S., Suzuki, T., Okumura, A., Kashino, Y., Mimuro, M., Ikeuchi, M., and Enami, I. (2009) Purification and characterization of a stable oxygen-evolving Photosystem II complex from a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*, *Biochim. Biophys. Acta* (*in press*).

Isolation and Characterization of Oxygen-Evolving Photosystem II Particles from a Marine Centric Diatom, *Chaetoceros gracilis*

Ryo Nagao^{1, *}, Tatsuya Tomo², Masahiko Ikeuchi¹, Isao Enami²

¹Department of Life Sciences (Biology), Graduate School of Arts and Science, University of Tokyo

²Department of Biology, Faculty of Science, Tokyo University of Science