

## 過去30年間の光化学系1複合体の研究から30年後の研究展開を読む<sup>‡</sup>

岡山大学 大学院自然科学研究科  
高橋 裕一郎\*

光化学系1は光捕集、光化学反応、電子伝達反応に関与するコファクターが一体となった複合体を形成するため、多くの光合成研究者の興味を引きつけてきた。生化学と物理化学の分野の研究者が研究を牽引してきたが、最近では分子生物学の手法も多用されるようになり、研究手法が広がりつつある。長年にわたる研究の結果、光化学系1の静的な構造と機能の研究は大きく進展した。そして、光合成生物が変動する自然環境に応答して、光化学系1複合体の構造と機能をフレキシブルに変化させる分子機構を解明する研究はこれから大きく展開していくだろう。本稿では光化学系1研究の過去と現在を振り返りながら、今後の研究の方向を議論したい。

### 1. はじめに

光化学系は、光捕集、光化学反応、電荷分離の安定化を担う。酸素発生型光合成電子伝達系には2つの光化学系が直列に機能し、光エネルギーを利用してH<sub>2</sub>OからNADP<sup>+</sup>への電子伝達反応を駆動する。光化学系2はH<sub>2</sub>Oから電子を引き抜く高い酸化力を生成し、プラストキノンおよびシトクロム $b_6f$ を経てプラストシアニンもしくはシトクロム $c$ を還元する。一方、光化学系1はプラストシアニンもしくはシトクロム $c$ を酸化し、フェレドキシンを還元する反応を触媒し、NADP<sup>+</sup>を還元する強い還元力を生成する。光化学系2やシトクロム $b_6f$ と同様に、光化学系1は多数のコファクターとサブユニットから構成される大きな複合体を形成し、チラコイド膜に埋め込まれて存在する。光化学系1は、分子量が大きく、構造が複雑な膜タンパク質複合体であるため、解析が容易でなかった。しかし、新しい界面活性剤の導入、タンパク質精製法および微量タンパク質解析法の発展、構成サブユニットの遺伝子の解析および改変法の開発、コファクターの分析法や活性の分光学的解析法の高度化、結晶構造解析の成功などにより、光化学系1複合体の構造と機能の解明は大きく進展した。

光化学系1の還元側では、電子の行き先が多岐に分かれるため、光合成研究者にとって魅力的な研究対象の一つである。ここでは光化学系1複合体の生化学的解析の経緯と今後の展開の大きな流れについて、

著者の主観を交えて概観し、それを基にして今後の研究の展開を考えてみたい。

### 2. 光化学系1の研究の流れを振り返る：サブユニット組成を中心に

光化学系1複合体を単離する研究は50年ほど前から本格的に行われるようになった。1960年代に、2つの光化学系を物理的に分離することに成功した<sup>1)</sup>。植物のチラコイド膜を温和な界面活性剤であるジギトニンで処理した後、分画遠心法によりチラコイド膜断片を分画したところ、重い膜画分はクロロフィル $b$ が多く光化学系2活性が高いこと、軽い膜画分はクロロフィル $a$ が多く光化学系1活性が高いことが示された。植物ではチラコイド膜のグラナ構造が発達しており、グラナチラコイドには光化学系2が、ストロマチラコイドには光化学系1がそれぞれ局在していることが現在では明らかにされている。ジギトニンによりグラナチラコイドとストロマチラコイドの接続部分が切断された結果、グラナチラコイドが重い画分に分画され、ストロマチラコイドが軽い画分に分画されたのである。当時は既に酸素発生型光合成電子伝達系には2つの光化学系が直列に機能することが提唱されていたが、2つの光化学系を分離できることを示した実験は、その後の光化学系複合体の精製につながる重要な成果である。

一方、チラコイド膜を強い界面活性剤であるSDSで

<sup>‡</sup> 解説特集「30年後の光合成研究」

\* 連絡先 E-mail: taka@cc.okayama-u.ac.jp

可溶化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけると、緑のバンドが3本分離された。先端に泳動されたバンドは遊離色素であったが、泳動度の小さい2本のバンドは泳動度の低い順番に、クロロフィルaを主に含むCPIとクロロフィルbを多く含むCPIIと名前がつけられ、クロロフィルa/b比から前者が光化学系1、後者が光化学系2であると結論された<sup>2)</sup>。その後、クロロフィルb欠損株には光化学系2の活性があるにもかかわらずCPIIが分離されなかったことから、CPIIはアンテナ複合体 (LHCII) であることが示された<sup>3)</sup>。SDSを用いた電気泳動の研究により、光化学系1とLHCIIがクロロフィルを結合するタンパク質 (クロロフィルタンパク質複合体) として生化学的に分離できることが証明された。

呼吸鎖やATP合成酵素の研究の分野でも大きな構造をもつ複合体が重要な機能を果たすことが注目されるようになってきた。そして、1970年代には光化学系1複合体の生化学的研究も新しい段階に発展し、複合体を構成する成分に着目した研究が報告されるようになった。光化学系1は膜タンパク質であるため活性を保持したまま可溶化するためには適切な界面活性剤を使用しなければならないこと、そしてサイズが非常に大きいことなどから精製法を工夫する必要があった。そして、1975年にはポリペプチド組成を議論できるレベルまで純化された標品が報告された<sup>4)</sup>。温和な界面活性剤で可溶化して、光化学系1複合体を単離・精製し、それを今度はSDSで解離しポリペプチド組成をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で調べた。すると、80kDa程度の大きなサブユニットと、20kDa以下の多数の小さなサブユニットが光化学系1複合体に存在することが示された。複合体に含まれる多数のサブユニットの機能の解析も進められ、80kDaの大きなサブユニットに光化学反応の成分とアンテナクロロフィルが存在することが明らかにされた。さらに、小型のサブユニットの機能解析も進められ、電子受容体の鉄硫黄中心の結合とプラスチシアニンの酸化の効率化に関与するサブユニットの同定に成功した。より強い条件での可溶化と精製法を用いて、光化学系1の機能をもつ最小単位の構造を明らかにすることが、当時の研究の主要な目標の一つであった (図1)。

光化学系1複合体の無傷な構造を明らかにするという逆の方向性の研究も進められた (図1)。この場合、より温和な界面活性剤を用いてチラコイド膜を可

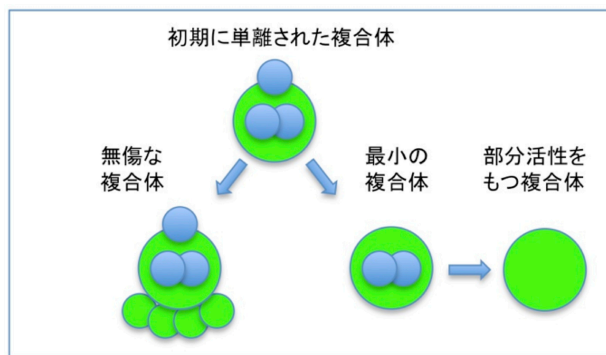


図1 光化学系1複合体の生化学的解析の展開

緑の丸は反応中心を示し、いわゆるコア複合体である。ここにはコアアンテナ色素 (クロロフィルaとβ-カロテン) と主要な電子伝達成分 (P700、A<sub>0</sub>、A<sub>1</sub>、F<sub>X</sub>) が結合する。小さな青の丸はその他の小型サブユニットを示し、電子受容体F<sub>A</sub>とF<sub>B</sub>を結合するPsaCはそのうちのひとつである。4つ連なった小さな緑の丸はアンテナ複合体 (LHCI) を示す。研究の流れとして、光化学系1活性を保持する最小単位の解明する方向 (右矢印) と無傷な複合体を解明する方向 (左矢印) があった。

溶化するのである。その結果、植物の光化学系1複合体には、シアノバクテリアの光化学系1複合体と共通する構造をもつコア複合体 (PSI core) にアンテナ複合体 (LHCI) が結合していることが分かった<sup>5)</sup>。現在ではこの標品はPSI-LHCI超複合体と呼ばれている。また、葉緑体ゲノムの全塩基配列が決定され、N末端のアミノ酸配列の決定法が大きく進歩し、これまでに知られていなかった10kDa以下の膜を一回貫通するヘリックスをもつ疎水性サブユニットが存在することが見いだされた<sup>6)</sup>。このような疎水性小型サブユニットはシアノバクテリアから植物の光化学系2およびシトクロムb<sub>6/f</sub>複合体にも存在する。葉緑体ゲノムの全塩基配列の情報、小型のサブユニットの発見に重要な貢献をした<sup>7,8)</sup>。興味深いことに、疎水性小型サブユニットは光合成細菌の反応中心標品や呼吸鎖のシトクロムb<sub>c<sub>1</sub></sub>複合体には見いだされない。したがって、光化学系1複合体のサブユニット構造は当初考えられていたよりもかなり複雑であることが分かった。

分子生物学の進展に伴い、1980年代にはシアノバクテリアの光合成遺伝子の形質転換が可能になった。1990年代には緑藻クラミドモナスを中心に葉緑体形質転換系が開発され、光合成の葉緑体遺伝子の特異的形質転換が可能となった。その結果、小型サブユニットの機能の一部が明らかにされた。また、いくつかのサブユニットは、欠損させると複合体の安定性が損なわれる多面効果があることも示された。これまでの生化学的解析と新たな分子生物学的解析により光化学系1

表 植物の光化学系1複合体のサブユニット

サブユニット	遺伝子	機能
PsaA	C	反応中心
PsaB	C	反応中心
PsaC	C	Fe-S中心、F <sub>A</sub> とF <sub>B</sub>
PsaD	N	フェレドキシン結合
PsaE	N	フェレドキシン結合
PsaF	N	プラストシアニン結合
PsaG	N	アンテナ複合体と相互作用
PsaH	N	ステート遷移
PsaI	C/N	
PsaJ	C	
PsaK	N	アンテナ複合体と相互作用
PsaL	N	ステート遷移
PsaN	N	アンテナ複合体と相互作用
PsaO	N	ステート遷移
PsaP	N	リン酸化タンパク

Cは葉緑体コード、Nは核コードの遺伝子を示す。

複合体のサブユニット組成の全貌が明らかにされた(表)。また、シアノバクテリアそしてそれに続く植物の光化学系1複合体の結晶構造解析により、各サブユニットの複体内での配置が明確になり、サブユニットの構造と機能の解明も大きく進展することとなった。

### 3. 光化学系1の研究の流れを振り返る：コファクター組成を中心に

光化学系1複合体のサブユニット構造は当初考えられていた以上に複雑であることが明らかになってきたが、コファクター組成の解明も大きく進展した。シアノバクテリアと植物に共通する構造であるコア複合体にはおよそ100分子のクロロフィル $a$ が結合し、その一部は初期電子供与体(P700)と初期電子受容体(A<sub>0</sub>)として機能する。また、主要なカロテノイドは $\beta$ カロテンで、クロロフィル $b$ やキサントフィルは存在しない。また、鉄硫黄中心が3種存在し、中間電子受容体の4Fe-4SであるF<sub>X</sub>が2つの相同な反応中心サブユニット(PsaAとPsaB)間に結合し、最終電子受容体のF<sub>A</sub>とF<sub>B</sub>がストロマ側に結合するPsaCサブユニットに結合する。PsaCは4Fe-4Sクラスターを2つ結合し、バクテリア型フェレドキシンの構造とよく似ている。A<sub>0</sub>とF<sub>X</sub>の間に機能する電子受容体A<sub>1</sub>の化学種はナフトキノンは植物とシアノバクテリアで光化学系1複合体

に2分子のフィロキノン(ビタミンK<sub>1</sub>)が存在することが生化学的に明らかにされ<sup>9)</sup>、結晶構造解析が行われたた標品もフィロキノンをもっていたため、光化学系1のナフトキノンはフィロキノンのみであると考えがちである。しかし、様々なシアノバクテリアや藻類のナフトキノンを分析すると、フィロキノン、メナキノン、ヒドロキシフィロキノンの3種類のナフトキノンが存在することが明らかになった。光合成のモデル生物として多用される緑藻クラミドモナスも最近までナフトキノンの組成が明確でなかったが、2種のフィロキノンが存在し、ヒドロキシフィロキノンが90%でフィロキノンが10%存在することが分かった<sup>10)</sup>。光化学系1のコア複合体の構造と機能はシアノバクテリアから植物までよく保存されているが、重要な電子伝達成分であるナフトキノンの化学種が異なることは意外な結果である。種により3種のナフトキノンがどのように使い分けられているのかは分かっていない。

光化学系1と光化学系2では、反応中心サブユニットのアミノ酸配列が大きく異なるため、両者はそれぞれタイプIおよびタイプIIの先祖型反応中心から進化してきたと考えられている。しかし、結晶構造解析により明らかにされた膜貫通ヘリックスの配置が光化学系1と2でよく保存されていることから、両者は共通の先祖型反応中心から進化したとみなされている。また、光化学系1と光化学系2には1対の電子伝達体(光化学系1ではクロロフィル $a$ 二量体の電子供与体P700、クロロフィル $a$ の電子受容体A<sub>0</sub>、ナフトキノンの電子受容体A<sub>1</sub>、光化学系2ではクロロフィル $a$ 二量体の電子供与体P680、クロロフィル $a$ の電子受容体A<sub>0</sub>、フェオフィチン電子受容体、プラストキノン電子受容体Q<sub>A</sub>、Q<sub>B</sub>)が複体内で対称的に配置されている。電子伝達成分の酸化還元反応のキネティクス解析によると、光化学系2では一方の電子伝達鎖しか機能してないが、光化学系1では両方の電子伝達鎖が機能している。ここでは、光化学系1複合体の構造の解明というブレークスルーが想定していなかった新しい研究課題を生み出すことを示すよい例である。タンパク質の構造解析や生化学、機能上重要なアミノ酸を改変するタンパク質工学、電子伝達系の活性を測定する分光学的な測定法、などの異分野の知識・技術を駆使して研究を進めるといふ光合成研究の特徴である学際性が光化学系1複合体の解析に大きな力を発揮している。

#### 4. 光化学系1の構造と機能のダイナミクス：最近の研究の進展と今後の展開

これまでの研究では、光化学系1はその構造や機能が不変で安定した複合体として解析されてきた。シアノバクテリアの光化学系1の3量体<sup>11)</sup>と植物のPSI-LHCI超複合体<sup>12)</sup>の結晶構造解析によりサブユニット構造とコファクターの配置の解明も大きく進展した。その結果、筆者が大学院生として光化学系1の研究を始めた30年程前からすると構造と機能に関する基本的な謎は解けてしまったと思われる。しかし、残された未解明の重要な課題に注目すべき時期がきている。最近の研究手法の進展によりこの未解明な課題を本格的に取り組める段階にようやく達したと言えるのである。

今後解決すべき課題の一つは、複雑で巧みな構造をもつ光化学系1複合体がどのように合成されるかである(図2)。コア複合体のサブユニット数は14前後で、その多くは膜貫通ヘリックスをもつ疎水性タンパク質である。さらにコファクターとしてクロロフィル、カロテノイド、ナフトキノン、Fe-Sクラスターをもち、それらの総数は百数十分子にも達する。真核生物の場合、サブユニットの一部は葉緑体にコードされ、残りは核にコードされている。また、クロロフィルは合成されたとほぼ同時に光化学系複合体のクロロフィル結合サブユニットに結合されないと光照射下では有害な活性酸素を発生して葉緑体や細胞に有害である。つまり、光化学系複合体の合成には異なる部位で合成されたサブユニットとコファクターが効率的に分子集合されなければならないのである。その仕組みはどのようなものなのだろうか。これまでに分子集合に必要なタンパク質因子がいくつか報告されているが、それらの因子がどのような分子機構で光化学系成分の分子集合を介添えているのかはほとんど明らかにされていない。

もう一つの興味深い課題は、光化学系1複合体の構造と機能が生育環境変化にตอบสนองして部分的に変化する動的な性質を解明することである(図2)。光化学系1複合体の構造と機能のダイナミクスの分子機構の解明は今後大きく進展することが期待される。例えば、光環境変化にตอบสนองした2つの光化学系間の光エネルギーの分配機構として知られるステート遷移がある。光化学系2が光化学系1よりもより励起される条件下では、2つの光化学系の間にあるシトクロム $b_{6f}$ が還元型になる。その状態を感知すると光化学系2に結合するアンテナ複合体(LHCII)がリン酸化され、

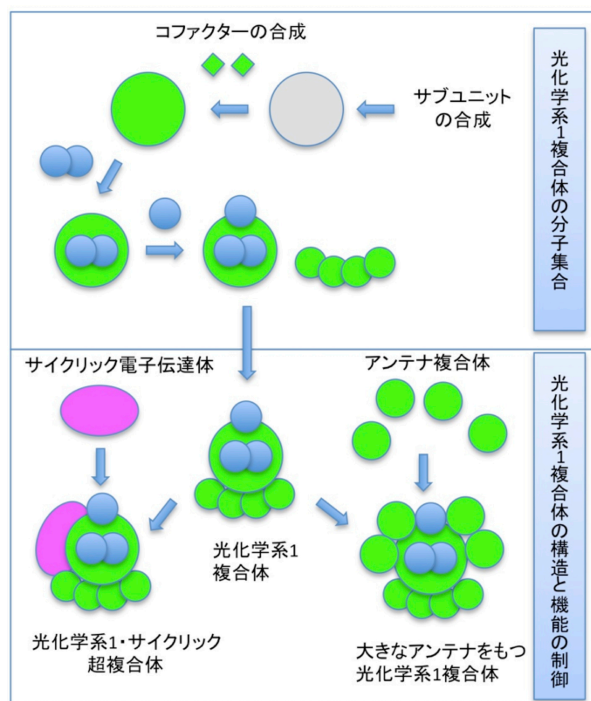


図2 光化学系1複合体の動的構造の解明

光化学系1複合体の分子集合(上)と完成された光化学系1複合体が生育条件にตอบสนองしてその機能を変化させる様子(下)を模式的に示した。複合体の分子集合は段階的に行われると考えられている。サブユニットの翻訳とコファクターの生合成は協調的に行われているはずである。周辺部のサブユニットは順番に付加されていくと考えられる。分子集合が完了しても複合体の構造は静的ではなく生育環境にตอบสนองして、アンテナ複合体が付加されたり、循環型電子伝達体と結合したりすると考えられている。

その一部が光化学系2から光化学系1複合体へ移動し、光化学系1のアンテナサイズを大きくする<sup>13)</sup>。植物の光化学系1コア複合体の一方側(PsaFとPsaJが存在する側)にLHCIが4つ結合し(クラミドモナスでは9つ結合する)、その反対側(PsaH, PsaI, PsaL, PsaOが存在する側)にLHCIIが結合すると考えられている。しかし、正確な結合部位は不明で、どのくらいLHCIIが結合するかも明らかにしなければならない。もう一つの具体例は、直鎖型と循環型電子伝達系の制御機構である。酸素発生型光合成電子伝達系には、2つの光化学系が直列に機能する直鎖型電子伝達系が存在することはよく知られており、この反応とATP合成が共役し、さらにNADPHが生成される。また、光化学系1だけが関与する循環型電子伝達系も機能し、フェレドキシンからシトクロム $b_{6f}$ へ電子が還流し、電子は再び光化学系1へ戻ってくる。この反応はATP合成と共役し、NADPHは生成されない。光化学系1の還元側が直鎖型と循環型電子伝達への電子の



分岐点となるが、電子の分配の制御機構を明らかにすることは重要である。

## 5. まとめ

光化学系1複合体は巨大な構造をもち、光捕集・光化学反応・電子伝達反応という複雑な機能を効率的に果たしている。微細な構造が明らかにされてきたが、分子集合や機能調節といったダイナミクスは今後の魅力的な研究対象である。この課題が解明されるには30年かかるのかどうかは議論が分かれるところであろう。しかし、解決したと思った研究課題から、新しい研究手法が導入されると再び脚光を浴びるような新しい研究成果が生まれてくることはよくあることである。新しい研究対象に取り組むだけでなく、新しい視点でこれまでの研究対象を見直すことも大切ではないだろうか。

Received December 5, 2013, Accepted December 7, 2013,  
Published December 31, 2013

## 参考文献

- Boardman, J.K. and Anderson, J.M. (1964) Isolation from spinach chloroplasts of particles containing different proportions of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* and their possible role in the light reactions of photosynthesis. *Nature* 203, 166-167.
- Ogawa, T., Obata, F. and Shibata, K. (1966) Two pigment proteins in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 112, 223-234.
- Thornber, J.P. and Highkin, H.R. (1974) Composition of the photosynthetic apparatus of normal barley leaves and a mutant lacking chlorophyll *b*. *Eur. J. Biochem.* 41, 109-116.
- Bengis, C. and Nelson, N. (1975) Purification and properties of the photosystem I reaction center from chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 250, 2783-2788.
- Mullet, J.E., Burke, J.J. and Arntzen, C.J. (1980) Chlorophyll proteins of photosystem I. *Plant Physiol.* 65, 814-822.
- Ikeuchi, M. and Inoue, Y. (1988) A new 4.8-kDa polypeptide intrinsic to the PSII reaction center, as revealed by modified SDS-PAGE with improved resolution of low-molecular-weight proteins. *Plant Cell Physiol.* 29, 1233-1239.
- Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H. and Ozeki, H. (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322, 572-574.
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B. Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H. and Sugiura, M. (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* 5, 2043-2049.
- Takahashi, Y., Hirota, K. and Katoh, S. (1985) Multiple forms of P700-chlorophyll *a*-protein complexes from *Synechococcus* sp.: The iron, quinone and carotenoid contents. *Photosyn. Res.* 6, 183-192.
- Ozawa, S., Kosugi, M., Kashino, Y., Sugimura, T. and Takahashi, Y. (2012) 5'-monohydroxyphyloquinone is the dominant naphthoquinone of PSI in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 53, 237-243.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W. and Krauss, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* 411, 909-917.
- Amunts, A., Toporik, H., Borovikova, A. and Nelson, N. (2010) Structure determination and improved model of plant photosystem I. *J. Biol. Chem.* 285, 3478-3486.
- Rochaix, J.D. (2011) Regulation of photosynthetic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 375-383.

## Perspective Research on Photosystem 1 Based on the Past and Present Achievements

Yuichiro Takahashi\*

Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University