

リンカーが決める2つのフィコビリソーム[§]

東京大学 総合文化研究科 広域科学専攻/JST CREST

渡邊 麻衣* 池内 昌彦

フィコビリソームは、シアノバクテリアに広く存在するアンテナであり、主に光化学系IIへエネルギー伝達する。一般的なフィコビリソームは、ロッドとコアからなり、それぞれが特異的なリンカーにより結合している。一方近年、コアをもたないロッド状のフィコビリソームの存在が報告されている。このフィコビリソームは光化学系I特異的なアンテナとして機能すると考えられている。また形成には、新規のリンカーが関与していることも示唆されている。リンカーとフィコビリソームの構造について、最近の我々の知見と合わせて紹介する。

1. はじめに

フィコビリソーム (PBS) は、水溶性の巨大なタンパク質複合体である。シアノバクテリア、灰色藻、紅藻のアンテナとして広く存在し、主に光化学系 (PS) II へのエネルギー伝達を行う。PBSには多様な吸収波長のものが存在し、クロロフィルが吸収できない色の光を吸収することができる。生物種によって持っているPBSの種類が異なるため、水圏の多様な光環境に適応することができる。

一般的なPBSは、中心となるコアから何本かのロッドが放射状に伸びた構造をしている (図1A)。コアのフィコビリタンパク質はアロフィコシアニンであり、赤色 (650 nm) を吸収する。ロッドは主にフィコシアニンからなり、赤色 (620-630 nm) を吸収する。種によっては、フィコシアニンに加えてフィコエリスロシアニン (オレンジ色, 550-620 nm) や、フィコエリスリン (青色から黄色, 490-550 nm) をもち、さら

に短波長の光を吸収することを可能としている。

フィコビリタンパク質は3または6量体のディスクを形成し、それぞれ特異的なリンカータンパク質によって結合し、ロッドやコアを形成する¹⁾。ロッドとコアはさらに別のリンカーにより結合することで、PBSが形成される (図1A)。リンカータンパク質は、PBSのアセンブリーやエネルギー伝達に重要である²⁻⁵⁾。リンカータンパク質はその機能により、ロッドリンカー、ロッド-コアリンカー、コアリンカー、コア-メンブレンリンカーの4つに分類される (図1A)。ロッドリンカーはロッドのディスク同士を、ロッド-コアリンカーはロッドをコアへ、コア-メンブレンリンカーはPBSを膜へ結合する。ロッドリンカーの1つであるCpcDはロッドの先端に、コアリンカーのApcCはコアの両端に存在し、ロッドやコアのキャップとして機能している。ロッドリンカーは多様であり、ロッドを構成するフィコビリタンパク質の種類に応じて使い

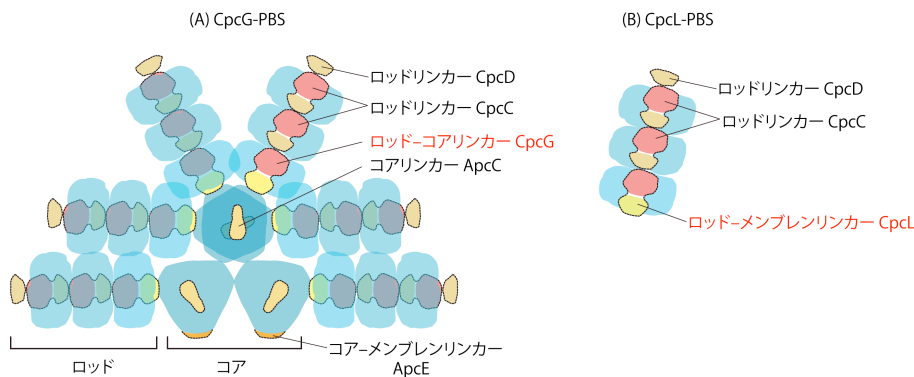


図1 CpcGとCpcLが形成するフィコビリソームの模式図

(A) 一般的なフィコビリソーム (CpcG-PBS) と (B) 光化学系I特異的なフィコビリソーム (CpcL-PBS) の構造を模式的に示す。模式図は結晶構造を基にし、「Interlocking model」を採用して描いた。わかりやすいように、リンカーの一部を強調している。詳細は、文献1を参照。

[§] 第3回日本光合成学会シンポジウム ポスター発表賞受賞論文

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

分けられている^{6,7)}。また、ロッドの構造にも関与している^{8,9)}。今回は、我々が近年発見した、新たな機能をもつリンカーについて紹介する。

2. ロッド-コアリンカー CpcGとロッド-メンブレリンリンカー CpcL

CpcLの発見

CpcLはロッド-コアリンカーCpcGとよく似た配列のタンパク質であり、ロッド-コアリンカーだと考えられてきた¹⁰⁾。しかし近年、これらがCpcGとは異なる機能を持つことが示唆されている^{1,4,11-13)}。我々は、これらのリンカーをCpcLと再命名した。CpcGとCpcLはどちらも、N末端側にPfamで検出されるリンカードメイン (Pfam00427、ここではlinker-PBSドメインと呼ぶ) をもち、それらは非常に似ている。一方、C末端の35~38残基はそれぞれに特徴的な配列をもっている¹⁾。我々は、C末端の特徴的な配列を抽出し、それぞれlinker-G、linker-Lドメインと名付けた。CpcLはlinker-Lの中に20残基以上の疎水性領域をもつ。

CpcG-PBSとCpcL-PBS

Synechocystis sp. PCC 6803における変異体の解析から、CpcGとCpcLが異なる2つのPBSの形成に関与することが示唆されている⁴⁾。ここではそれぞれを、CpcG-PBS、CpcL-PBSと呼ぶ。CpcG-PBSはこれまでに知られている一般的なPBSであり、ロッドとコアからなる。CpcGはロッド-コアリンカーとしてそれぞれを結合する。一方、CpcL-PBSは一般的なPBSとは異なり、コアをもたないロッド状の構造をとることが示唆された⁴⁾

(図1B)。*Synechocystis*のCpcL変異株の蛍光スペクトルの結果から、CpcL-PBSは主にPSIへのエネルギー伝達に関与していることが示唆されている¹²⁾。CpcLはCpcGと同様に、ロッドのCpcDとは逆の先端に結合していると考えられるが、生化学的な解析はされておらず、PSIとの結合は不明であった。

PBS-CpcL-PSI超複合体の発見

最近我々は、糸状性の窒素固定シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120を用いてCpcL-PBSとPSIとの超複合体の単離に初めて成功した¹³⁾。*Anabaena*のPSIは *Synechocystis*などと異なり、4量体を形成する¹⁴⁾。我々は、シヨ糖密度勾配遠心の方法を改善することで、PSI 4量体だけでなくさらに大きな超複合体の単離に成功した (図2A)。この超複合体にはPSIのサブユニットに加え、PBSのロッドのサブユニットが存在したがコアはなかった。一方で、CpcLが超複合体に特異的に存在していた (図2B)。このことから、CpcL-PBSとPSIとが超複合体を形成していると考えられた。低温での蛍光スペクトルの結果から、CpcL-PBSからPSIへのエネルギー伝達が確認できた (図2C)。これらのことから、CpcL-PBSはPSIに直接結合し、エネルギー伝達を行うPSI特異的アンテナであることが示唆された。これは、CpcLがPBSロッドをPSIへ直接結合するリンカーであることを強く示唆する初めての生化学的な証拠である。CpcLはC末端に疎水性残基を持っており、それによりPSIに直接結合していると考えられる。これはこれまでに知られているリンカータンパク

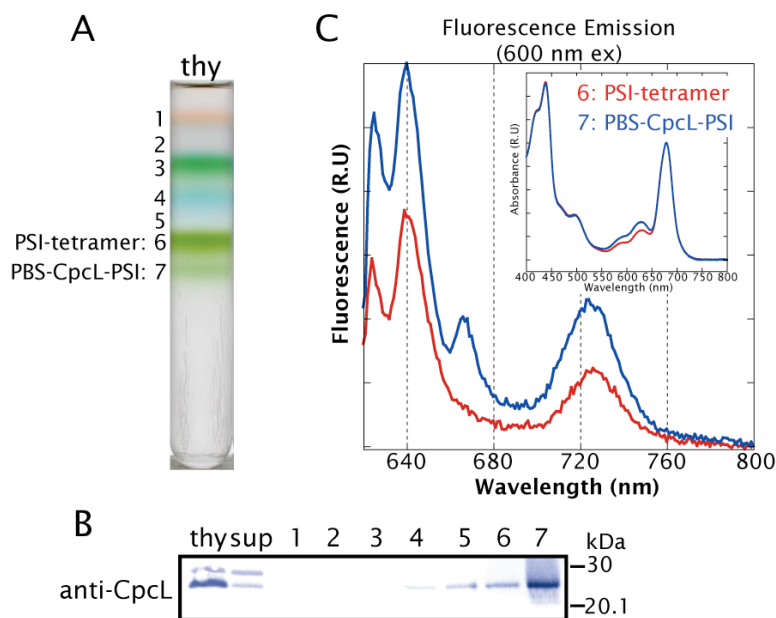


図2 PBS-CpcL-PSI超複合体の単離

(A) シヨ糖密度勾配遠心後のプロファイル。チラコイド膜を1%のドデシルマルトシドで可溶化後、シヨ糖密度勾配遠心した。(B) CpcLのウエスタンブロッティング。チラコイド膜(thy)と、細胞の可溶性画分(sup)、シヨ糖密度勾配遠心後の画分1~7をSDS-PAGE後、ブロッティングしCpcLに対する抗体で検出した。(C) PBS-CpcL-PSI超複合体とPSIの低温蛍光発光スペクトルと室温での吸収スペクトル (挿入図)。蛍光スペクトルは、PBSの吸収がある600 nmで励起し、クロロフィル濃度で規格化した。吸収スペクトルは、680 nmのクロロフィルの吸収で規格化した。文献13を改変。

質の機能とは全く異なる。したがって、CpcLを新たにロッド-メンブレンリンカーと分類した。

我々は、PBS-CpcL-PSI超複合体の構造を調べるため、オランダのBoekema教授との共同研究によって電子顕微鏡での構造解析を試みている。単粒子解析の結果から、CpcL-PBSはPSI 4量体の表面の単量体同士の境界に結合していることが示唆されている¹³⁾。また、4量体あたり1本だけでなく、2~3本結合したものが存在していた。

CpcL-PBSの機能

CpcL-PBSは、*Anabaena*においてPSIに結合し特異的にエネルギー伝達するアンテナであることが示された。*Anabaena*は窒素欠乏下で、窒素固定をするヘテロシストという細胞を分化させる。ヘテロシストでは、PSIIは働かず窒素固定に必要な還元力やATPの生産にはPSIの環状電子伝達が非常に重要である。我々は、ヘテロシストでのPSIの活性にはCpcL-PBSの存在が重要であると考えた。ヘテロシストにおけるCpcLの量をウェスタンブロットティングにより調べたところ、ヘテロシストではクロロフィルあたりのCpcLが栄養細胞の約4倍に増加していた¹³⁾。このことから、PBS-CpcL-PSI超複合体はヘテロシストにおける窒素固定活性に重要な機能をもつと考えられる。現在、窒素固定活性を測定している。

CpcL-PBSの普遍性

CpcGとCpcLのlinker-PBSドメインは非常に似ており、他のリンカーとは異なるグループに分類される(図3)。そのグループの中で、さらに3つのサブグループにわけることができる。サブグループIには、*Synechocystis*や*Nostoc*、および灰色藻・紅藻、サブグループIIには*Anabaena*や*Thermosynechococcus*、そしてサブグループIIIには海洋性のシアノバクテリアが分類される。これらのサブグループにはCpcGとCpcLがそれぞれ含まれている。このことは、CpcLとCpcGが進化の過程で独立に少なくとも3回分岐したことを示唆する。これは、それぞれのサブグループ間でlinker-Lドメインの配列の保存性が低いことと一致する。

サブグループIの*Synechocystis*、サブグループIIの*Anabaena*のCpcLがロッド状のPBSを形成し、PSIへのエネルギー伝達に関与していることは上で述べた。また、サブグループIの*Synechococcus* sp. PCC 7002のCpcL

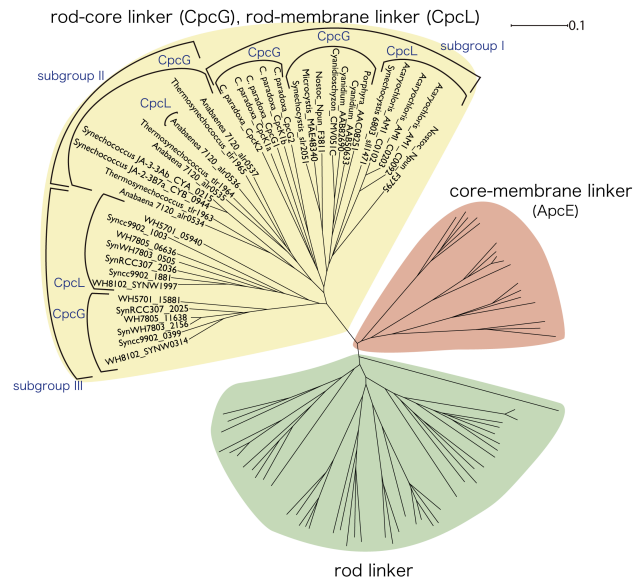


図3 リンカー-PBSドメインの系統樹

ロッドリンカー、ロッドコアリンカー、コア-メンブレンリンカー、ロッド-メンブレンリンカーのリンカー-PBSドメインを用いてクラスター解析を行った。クラスター解析には、近隣接合法を用いた。

がチラコイド膜画分に存在し、PSIへのエネルギー伝達に関与していることが示唆されている¹⁵⁾。我々は現在、サブグループIIIの海洋性シアノバクテリアについて、*Synechococcus* WH 8102のCpcLの解析を進めており、*Synechocystis*や*Anabaena*と同様にCpcLがチラコイド膜に多く存在するという結果を得ている(Watanabe et al. unpublished data)。これらのことから、CpcL-PBSはPSIへエネルギー伝達する、シアノバクテリアに広く保存されたPSIアンテナであると考えられる。

3. おわりに

フィコビリソームの構造解析は、電子顕微鏡や単粒子解析により数多く行われている。また、フィコビリタンパク質やサブコンプレックスの結晶構造もいくつか報告されている。しかしながら、リンカータンパク質ははっきりと見える構造はほとんどない。そのため、リンカーの結合様式や、エネルギー伝達を可能にする仕組みなど、フィコビリソームの構造には未だ謎が多く残っている。また、CpcL-PBSとPSIだけでなく、CpcG-PBSとPSIIの相互作用やエネルギー伝達機構についてもわかっていない。我々は、PBS-CpcL-PSI超複合体の単粒子解析を行っているが、電子顕微鏡では分解能が低く詳細な構造を見ることは難しい。リンカーの機能や光化学系との相互作用をより詳しく

知るためには、CpcG-PBS、CpcL-PBS、さらにはそれぞれのPBSと光化学系との超複合体の詳細な結晶構造解析が必要である。我々が単離したPBSとPSIの超複合体の結晶構造解析が、PBSと光化学系との結合様式やエネルギー伝達機構の解明につながるのではないかと期待している。

Received March 14, 2014, Accepted March 23, 2014,
Published April 30, 2014

参考文献

1. Watanabe, M. and Ikeuchi, M. (2013) Phycobilisome: architecture of a light-harvesting supercomplex. *Photosynth. Res.* 116, 265-276.
2. Bryant, D.A. (1991) Cyanobacterial phycobilisomes: progress toward complete structural and functional analysis via molecular genetics, in *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 7B (Bogorad, L., Eds.) pp 255-298, Academic Press, London.
3. de Lorimier, R., Guglielmi, G., Bryant, D.A. and Stevens, S.E., Jr. (1990) Structure and mutation of a gene encoding a Mr 33,000 phycocyanin-associated linker polypeptide. *Arch. Microbiol.* 153, 541-549.
4. Kondo, K., Geng, X.X., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2005) Distinct roles of CpcG1 and CpcG2 in phycobilisome assembly in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.* 84, 269-273.
5. Ughy, B. and Ajlani, G. (2004) Phycobilisome rod mutants in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Microbiology* 150, 4147-4156.
6. Six, C., Thomas, J.C., Thion, L., Lemoine, Y., Zal, F. and Partensky, F. (2005) Two novel phycoerythrin-associated linker proteins in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain WH8102. *J. Bacteriol.* 187, 1685-1694.
7. Six, C., Thomas, J.C., Garczarek, L., Ostrowski, M., Dufresne, A., Blot, N., Scanlan, D.J. and Partensky, F. (2007) Diversity and evolution of phycobilisomes in marine *Synechococcus* spp.: a comparative genomics study. *Genome Biol.* 8, R259.
8. Watanabe, M., Sato, M., Kondo, K., Narikawa, R. and Ikeuchi, M. (2012) Phycobilisome model with novel skeleton-like structures in a glaucocystophyte *Cyanophora paradoxa*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1817, 1428-1435.
9. Koyama, K., Tsuchiya, T., Akimoto, S., Yokono, M., Miyashita, H. and Mimuro, M. (2006) New linker proteins in phycobilisomes isolated from the cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. *FEBS. Lett.* 580, 3457-3461.
10. Bryant, D.A., Stirewalt, V. L., Glauser, M., Frank, G., Sidler, W. and Zuber, H. (1991) A small multigene family encodes the rod-core linker polypeptides of *Anabaena* sp. PCC7120 phycobilisomes. *Gene* 107, 91-99.
11. Kondo, K., Mullineaux, C.W. and Ikeuchi, M. (2009) Distinct roles of CpcG1-phycobilisome and CpcG2-phycobilisome in state transitions in a cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. *Photosynth. Res.* 99, 217-225.
12. Kondo, K., Ochiai, Y., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2007) The membrane-associated CpcG2-phycobilisome in *Synechocystis*: a new photosystem I antenna. *Plant. Physiol.* 144, 1200-1210.
13. Watanabe, M., Semchonok, D.A., Webber-Birungi, M. T., Ehira, S., Kondo, K., Narikawa, R., Ohmori, M., Boekema, E.J. and Ikeuchi, M. (2014) Attachment of phycobilisomes in an antenna-photosystem I supercomplex of cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111, 2512-2517.
14. Watanabe, M., Kubota, H., Wada, H., Narikawa, R. and Ikeuchi, M. (2011) Novel supercomplex organization of photosystem I in *Anabaena* and *Cyanophora paradoxa*. *Plant. Cell Physiol.* 52, 162-168.
15. Deng, G., Liu, F., Liu, X. and Zhao, J. (2012) Significant energy transfer from CpcG2-phycobilisomes to photosystem I in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 in the absence of ApcD-dependent state transitions. *FEBS. Lett.* 586, 2342-2345.

A Novel Rod-Membrane Linker Forming a Photosystem I-Specific Phycobilisome

Mai Watanabe*, Masahiko Ikeuchi

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