

# 光合成研究

第 28 卷 第 2 号 (通巻 82 号) 2018 年 8 月  
NEWS LETTER Vol. 28 NO. 2 August 2018

THE JAPANESE SOCIETY OF PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

---

トピックス	光化学系 I 三量体-フェレドキシン複合体の X 線結晶構造	
	河合 (久保田) 寿子、栗栖 源嗣 (大阪大 他)	74
研究紹介	アンチマイシン A が引き起こす光化学系 II 内部のシトクロム $b_{559}$ への阻害効果	
	高木 大輔 (東北大)、伊福 健太郎 (京都大)	82
研究紹介	葉緑体チラコイド膜のルーメン pH 可視化を目指して	
	上妻 馨梨 (東北大)	94
解説特集	「チラコイド膜超複合体の構造とダイナミクス」	99
序文	高橋 裕一郎 (岡山大)、鹿内 利治 (京都大)	100
解説	NDH-PSI 超複合体の構造とその組み上げ機構	加藤 義宣 (京都大) 101
解説	クライオ電子顕微鏡単粒子解析による光合成超分子複合体の構造解析	
	宮崎 直幸 他 (大阪大 他)	112
表紙の紹介	エチオプラストの発達におけるガラクト脂質の役割	藤井 祥 他 (東京大) 119
特別企画	第四回「フライブルク滞在記」	門脇 太朗 (東北大) 120
報告記事	第 9 回 日本光合成学会 (年会・公開シンポジウム) 開催報告	
	牧野 周 (東北大)、宮尾 光恵 (東北大)	122
報告記事	第 15 回若手の会セミナー開催報告	清水 隆之 (東京大) 124
	光合成学会若手の会 第 15 回セミナーに参加して	高智 五輝 (愛媛大) 125
報告記事	First European Congress on Photosynthesis Research, ePS-1	
	嶋川 銀河 (CEA,Sacray)	126
報告記事	第 3 回光合成細菌ワークショップ開催記録	
	原田 二郎 他 (久留米大 他)	128
事務局からのお知らせ		130
日本光合成学会会員入会申込書		131
日本光合成学会会則		132
幹事会名簿		134
編集後記・記事募集		135
「光合成研究」編集委員・日本光合成学会 2018 年度役員		136
賛助法人会員広告		

---

## トピックス

## 光化学系 I 三量体-フェレドキシン複合体の X 線結晶構造

<sup>1</sup> 大阪大学蛋白質研究所<sup>2</sup> 基礎生物学研究所 (現所属)河合 (久保田) 寿子<sup>1,2,\*</sup>、栗栖源嗣<sup>1</sup>

植物やシアノバクテリアは、無機酸化物を還元して有機化合物を作り出している。この反応に使われる還元力は、光化学系 I (PSI) によって生み出され、PSI から電子を受け取り生体内の様々な還元同化酵素に分配する役目を担っているのがフェレドキシン (Fd) である。本研究において我々は、PSI と Fd の複合体結晶構造を 4.2 Å 分解能で明らかにし、PSI から Fd への電子伝達反応が高い効率で進行する構造基盤を明らかにした。さらに Fd 結合前後の PSI 構造を比較することで、Fd の結合が、効率よく酸化還元反応や集光反応を行うための構造変化を誘導している可能性を見いだした。

## 1. はじめに

生命体を構成する炭素、窒素および硫黄などの元素の大部分は、地球上に酸化状態で存在しており、生物が糖やアミノ酸などの有機物として利用するためには無機酸化物を還元同化する必要がある。この反応には多種類の同化酵素が関わっており、それらは還元力を必要としている。例えば、Fd-NADP<sup>+</sup>還元酵素 (FNR) によって NADP<sup>+</sup> が NADPH に還元される過程で 2 電子、亜硝酸還元酵素 (NiR) によって NO<sub>3</sub><sup>-</sup> が NH<sub>4</sub><sup>+</sup> に、亜硫酸還元酵素 (SiR) によって SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> が S<sup>2-</sup> に還元される過程でそれぞれ 6 電子が必要とされる。これら還元同化酵素はどうやって還元力を得ているのだろうか？植物やシアノバクテリアでは、FNR、NiR、SiR はチラコイド膜に埋め込まれた色素-蛋白質複合体、光化学系 I (photosystem I: PSI) が生み出す高い還元力を用いて反応を進めている。

PSI は光エネルギーを利用して電荷分離反応を引き起こし、非常に強い還元力を生み出すが、FNR や NiR、SiR などの還元酵素は、PSI から直接電子を受け取ることができない。PSI から電子

を受け取り、これらの酵素へ電子を分配しているのは、フェレドキシン (Fd) と呼ばれる小型の電子伝達蛋白質である。植物型 Fd の酸化還元電位は非常に低く、上記の酵素をはじめとする様々な還元同化酵素に電子を供給し、還元同化反応を進行させる (図 1)。

このように PSI を基点とした還元力の分配は Fd に依存しており、光合成生物は PSI から Fd への電子伝達効率を高める仕組みを作り上げてきたと考えられる。本研究では、PSI と Fd が作る複合体状態の結晶構造解析を通して、光合成生物が最適化した電子伝達の構造基盤を明らかにすることを目的として研究を開始した。

## 2. 電子伝達複合体結晶作製

光合成や呼吸のようなエネルギー変換系をはじめとする還元力を必要とする代謝反応では、蛋白質同士が複合体を形成して電子の受け渡しを行うケースが多い。この電子伝達の際に形成される複合体は解離会合を伴う過渡的なものであり、電子の授受が終わると直ちに複合体は解離する。例えば、光合成における電子分配において中心的役割を果たす Fd は、酸化状態と還元状態で構造

\*連絡先 E-mail: hkawai@nibb.ac.jp

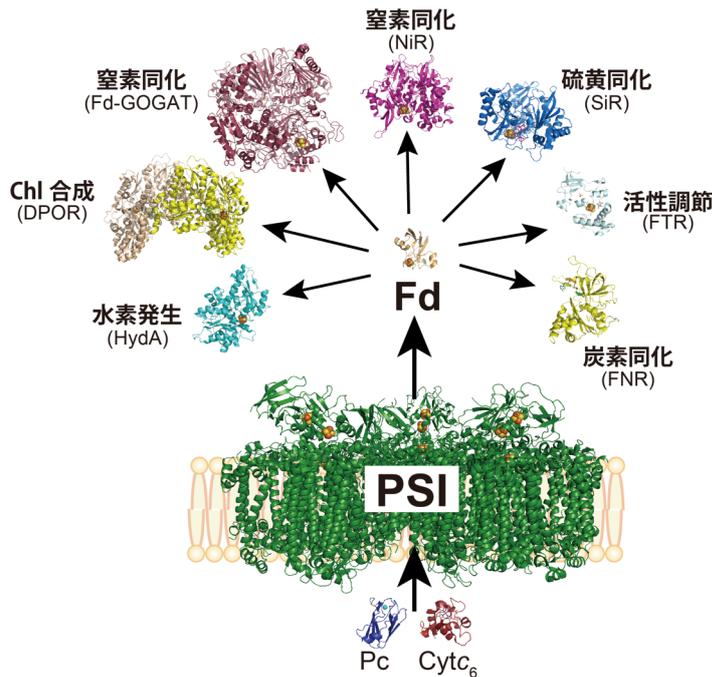


図 1. PSI を中心とした還元力の分配

PSI から生じた電子は Fd を介して生体内の様々な同化酵素に分配される。

が異なると報告されている。それによると、還元状態では酸化還元中心金属である[2Fe-2S]クラスターを取り巻くループ構造中の Ser45 のカルボニル酸素が約 180°反転していることが示されている<sup>1)</sup>。このように酸化・還元状態で構造が異なることが、電子伝達反応後の素早い複合体解離に寄与していると考えられる。本研究における PSI と Fd の電子伝達複合体も例外ではなく、電子伝達後に迅速に複合体が解離するという性質を持っており、構造解析可能な安定な複合体結晶を得る工夫が必要であった。

研究を開始した当初は、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* から精製した PSI 三量体と、*T. elongatus* の Fd を発現する大腸菌から精製した組換え体 Fd を利用して複合体結晶構造解析に取り組んでいた。結晶化スクリーニングで得られた様々な条件の結晶を溶かして SDS-PAGE にて分離したところ、1 条件のみで Fd が含まれていることが確認できた。その後、結晶化条件および結晶の抗凍結条件の最適化を行い、得られた良質の単結晶を用いて SPring-8 BL44XU にて X 線回折強度データの収集を行った。引き続き、*T. elongatus* の PSI 構造<sup>2)</sup> (PDB ID: 1JB0) をモデルとした分子置換法で初期位相を

決定し、4.3 Å 分解能で構造解析を行った。Fd がもつ[2Fe-2S]クラスターの位置は異常分散差フーリエマップから確認できたものの、Fd のタンパク質部分の電子密度はブロードで主鎖構造をトレースできないという問題が発生した。この理由は、X 線照射実験中に Fd が還元されて解離し複合体が不均化したためと予想できた。

この問題を解決するためには「酸化型 Fd と同等の立体構造を持ちながら、電子伝達活性を持たない Fd」を利用することが理想的である。そこで、このような性質をもった金属置換 Fd を用いた構造解析に取り組んだ。Fd が持つ[2Fe-2S]クラスターは金属イオンから再構成可能であることは以前から報告されており、再構成の過程で Fe<sup>3+</sup> の代わりにイオン半径が近い Ga<sup>3+</sup> を用いると、安定な Ga 置換 Fd (Fd[Ga]) を再構成可能であると報告されていた<sup>3,4)</sup>。再構成されたクラスターは、植物型 Fd とは異なりルブレドキシンの [1Ga-0S] クラスターであるという金属分析の報告もあった。そこで我々の研究室の村木、武藤等により、事前に Fd[Ga] の X 線結晶構造が[2Fe-2S] クラスターをもつ酸化型 Fd とほぼ同じであること (Ca 炭素の rmsd が 0.286 Å)、さらに NMR にて PSI との相互作用は野生型 Fd と同質であるこ

とが確認された<sup>5)</sup>。このような事前準備を行ったのちに、Fd[Ga]を用いて PSI との複合体結晶を作製した。野生型 Fd を利用した場合と全く同じ結晶化条件で複合体結晶が得られたことから、PSI との分子認識に違いが無いことを示唆している。この結晶を用いて X 線結晶構造解析に取り組み、4.2 Å での構造を決定した (PDB ID: 5ZF0)<sup>6)</sup>。そして、見込み通り複合体結晶構造中に Fd の蛋白質部分の電子密度を得ることに成功した。

PSI-Fd 複合体結晶の非対称単位中には二分子の PSI 三量体がルーメン側で向かい合うようにパッキングされており、全ての PSI プロトマーに Fd が結合していた。上下の PSI-Fd 構造は互いに殆ど変わらなかったため、以下は上側の PSI 三量体-Fd 構造について記述する。なお、上側の PSI 三量体に含まれる三分子の Fd を Fd1、Fd2、Fd3 とした (図 2)。

### 3. PSI 上の Fd の結合位置

PSI と Fd の個別の構造研究は古くから行われており、Fd の最初の高分解能構造は 1980 年に<sup>7)</sup>、PSI の高分解能構造は 2001 年に報告されている<sup>2)</sup>。これまで、これら単体の立体構造を基にして作製した部位特異的変異導入の実験や、架橋実験によって PSI と Fd の相互作用残基を明らかにするための研究が進められてきた。それらによると、Fd は PSI の細胞質側に存在する表在性タンパク質、PsaC、PsaD、PsaE と直接相互作用して複合体を形成すると提唱されている<sup>8-10)</sup>。そこで PSI-Fd 結晶構造中の相互作用残基を確認すると、実際に PsaC と PsaE に相互作用部位が存在し、反応中心蛋白質である PsaA とも相互作用して複合体を形成していることが明らかとなった。しかしながら、Fd と PsaD との直接的な相互作用は確認できなかった。これは、PsaD の酸性残基が Fd との相互作用に重要であるという報告<sup>10)</sup>とは相反する一方、PsaD の塩基性残基に変異を導入した際は Fd との相互作用への影響が小さい<sup>11,12)</sup>こととは矛盾しない結果であった。また最近になって、PSI の細胞質側には集光アンテナであるフィコビリソームが結合すると報告された<sup>13)</sup>。それによるとフィコビリソームは PsaA および PsaD と相

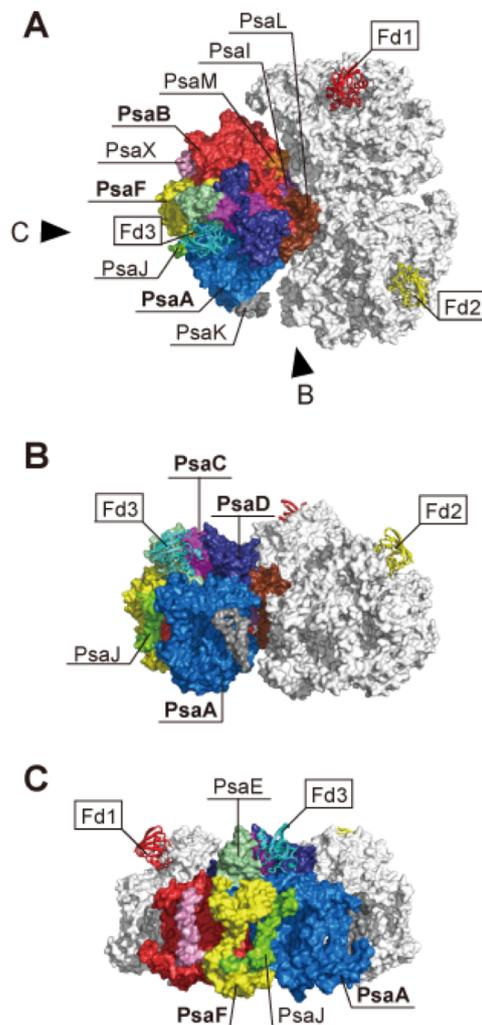


図 2. PSI-Fd 複合体の全体構造

A : PSI-Fd 複合体を細胞質側からみた図。PSI 三量体の各プロトマーに Fd が結合している。  
 B : A を 90°回転させ、PsaK 側からみた図。Fd は PsaA、PsaC、PsaE の形成するポケットに結合する。PsaD とは接点をもたない。  
 C : A を 90°回転させ、PsaF 側からみた図。

相互作用しており、Fd とフィコビリソームの結合は競合しない位置関係であった

### 4. 効率よく電子を伝達する仕組み

PSI から Fd への電子伝達は、それぞれの酸化還元中心である F<sub>B</sub> ([4Fe-4S]クラスター) から [2Fe-2S]クラスター間で起こる反応である。F<sub>B</sub> の酸化還元電位は-600 mV と極めて低く、約-400 mV の酸化還元電位をもつ[2Fe-2S]クラスターへ

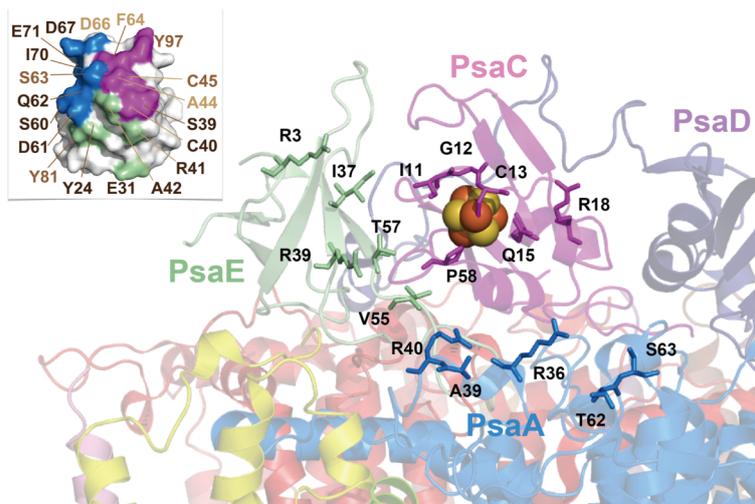


図3. PSI と Fd の相互作用残基

左上の Fd 分子表面には Fd1、Fd2、Fd3 の全ての相互作用残基を示した。黒色で示したアミノ酸は、Fd1~3 の全てに共通して相互作用に関わっている残基、茶色で示したアミノ酸は Fd1~3 のうちいずれか 2 分子の相互作用に関わっている残基、薄茶色で示したアミノ酸は Fd1~3 のうちいずれか 1 分子の相互作用に関わっている残基である。

右の PSI には Fd1、Fd2、Fd3 と相互作用する全ての残基をスティックモデルで示している。緑：PsaE、マゼンタ：PsaC、青：PsaA。

の電子伝達は迅速に進行すると予想される。電子伝達反応を駆動する主要な要因は「酸化還元電位差」であるが、その他にも「電子の移動距離や経路(酸化還元中心金属間の距離や配向)」と、「酸化還元中心金属周囲にアミノ酸残基がつくりだす環境」も重要である。

まず、酸化還元中心の相対配置について考察する。PSI-Fd 三量体中の  $F_B$  と [2Ga-2S]クラスター間の距離には 8.3 から 9.6 Å の開きがあるものの (Fd3 の [2Ga-2S]クラスターが  $F_B$  に最も近い)、どのプロトマーにおいても電子を直接伝達できる距離に位置していた。なお、Fd の [2Ga-2S]クラスターでは異常分散差フーリエマップにもピークの高さに違いが見られ、Fd3 の値が最も高かった。このことから、Fd3 は最も強く PSI に結合している一方、Fd1 と Fd2 は相対的に緩く PSI に結合していることが示唆された。

次に酸化還元中心を取り巻く環境について考察する。PSI と Fd の酸化還元中心近傍では PSI の PsaC と Fd の双方のアミノ酸が疎水的環境を作り出しており、電子の移動に適した分子環境と言えた。 $F_B$  を配位している PsaC と Fd の相互作用残基数は Fd1 と Fd2 では 3 残基であるのに対して Fd3 は 6 残基で相互作用していた。この酸化還元中心を取り巻く疎水領域の外側は、Fd と PsaA および PsaE との静電的相互作用と水素結合により取り囲まれていた。この極性残基による相

互作用は、Fd1、Fd2、Fd3 とそれぞれの PsaA、PsaE との相互作用残基数に大きな違いはなく、Fd の S60、D61、Q62、S63、D66、D67、I70、E71 が PsaA の R36、A39、R40、T62、S63 と、また、Fd の Y24、E31、R41、A42、Y81 は PsaE の R3、I37、R39、V55、T57 と相互作用し、複合体構造を安定化していた。このような階層的な相互作用様式で複合体を形成し安定化することで、PSI から Fd へ効率のよい電子伝達反応が達成されると考えられる (図 3)。

次に、これらの結晶構造で同定された相互作用残基が溶液中でも相互作用に参与しているかについて、横浜市立大学の池上教授の協力を得て NMR による転移交差飽和法にて検証した<sup>14)</sup>。この方法では、安定同位体ラベルしていない PSI に  $^2\text{H}$ -ラベルした Fd を加えた試料に対し、脂肪族水素の  $^1\text{H}$ -核スピンをラジオ波照射することで飽和させる (Fd は重水素化されているので脂肪族水素は PSI だけに存在する)。この飽和は PSI と相互作用している Fd にも転移し、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC シグナルの強度減少として観測されるため、シグナル強度が減少した残基は PSI との界面にあると言える。なお、酸化型 Fd では鉄の常磁性効果により [2Fe-2S]クラスター周辺のシグナルが検出できないため、Fd[Ga]を使用した。その結果、結晶中で PSI と相互作用すると同定された Fd のアミノ酸残基は溶液中でもほとんど同じであるこ

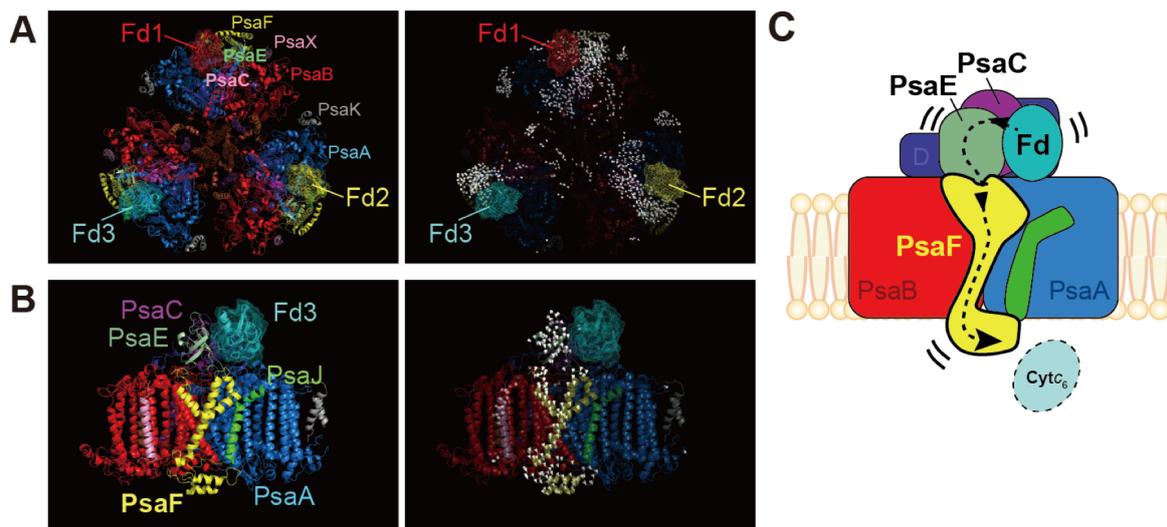


図4. Fdの結合に誘導されるPSI三量体の構造変化

Fd結合前後のPSIの構造を定量的に算出し、0.5 Å以上のずれを白いベクトルで表示した。A、B図共に、左図は、ベクトル表示前の構造、右図はベクトル表示後の構造（ヘリックスモデル半透明化）を表示している。

A：PSI-Fd複合体の三量体を細胞質側からみた図。表在性蛋白質がPSI三量体の外側に向かって動く。

B：Aの図を90°回転させた図（プロトマー3のみを表示）。PsaCとPsaEの動きは、PsaEと接している膜貫通蛋白質PsaFへと伝わる。

C：PsaFピストンモデルの模式図

とが示された。このように、X線結晶構造解析に加えて、溶液中での相互作用を検証できるNMRを相補的に利用することで、信頼性の高い情報が得られた。

### 5. Fdの結合に誘導されるPSIの構造変化からみえてきたこと

PSI-Fd複合体の構造とFdが結合していないPSIの構造を比較したところ、チラコイド膜を隔てた細胞質側とルーメン側を繋ぐ垂直方向の構造変化が確認された。この動きをベクトルにて定量的に示したのが図4-Bである。FdがPSIに結合すると、Fdと直接相互作用しているPsaC、PsaEがPSI三量体の外側に向かって移動する（図4-A）。その動きは、PsaEと接している膜貫通サブユニットPsaFにも連続しており、最終的にルーメン側に突出したPsaFのN末端まで伝わっていた（図4-B）。このPsaFのN末端近傍はPSIを還元する電子伝達蛋白質のCytochrome  $c_6$ が結合する位置として知られている。このことから、PSIは

PsaFを介してチラコイド膜内外の電子伝達蛋白質の結合情報を伝達することで、PSIの還元から酸化までの一連の電子の流れをスムーズに進行させるための微調整を行っていると考え、この仕組みをPsaFピストンモデルとして提唱した（図4-C）。

植物の場合、扇形のPSIの外側（PsaF側）にLight harvesting complex I（LHCI）という20~25 kDaの集光蛋白質が4分子（Lhca1-4）結合する。このLHCIからPSIコアへの主要な光エネルギー伝達は、ベルト状のLHCIの両端に位置するLhca1からPsaB、Lhca3からPsaAという経路を経ると算出されており<sup>15)</sup>、PsaFとLhca4の間には溝が存在している。この空間的余裕があるため、シアノバクテリアのみでなく植物においてもPsaFピストンモデルが機能している可能性があると考えている。

最後にPSI三量体を構成するプロトマー間の相対配置について見ていく。2014年にBakerらは、PSI三量体が各プロトマー間で光エネルギー

を共有することを報告している<sup>16)</sup>。そこで今回我々が解析した PSI-Fd 複合体構造に目を向けてみると、Fd が結合することで、PSI 三量体の各プロトマー間の距離が変化することが確認された。これは近接するプロトマーに光エネルギーを伝達するという Baker らの報告を裏付ける構造変化とも考えられる。

シアノバクテリアとは異なる光アンテナ系をもつ植物や緑藻の PSI は三量体ではなく単量体として存在するが、シアノバクテリアという三量体の境界面にあたる PsaK と PsaL の間には、光環境の変化に応じて PSII の集光アンテナである LHCII が結合すると言われている<sup>17,18)</sup>。紅藻においても PSI は単量体として存在しており、シアノバクテリアの三量体の境界面にあたる PsaM 側に LHCR が結合している<sup>19)</sup>。これらのことは、シアノバクテリア PSI の三量体境界面が、進化の過程で LHCII や LHCR からの光エネルギーを取り込む経路に進化したことを示唆しているのではないだろうか。

## 6. おわりに

我々は、4.2 Å で解析した PSI-Fd 複合体の結晶構造を基に、PSI 上の正確な Fd 結合部位を特定し、さらに双方の酸化還元中心間の距離や複合体界面でアミノ酸が作り上げる環境から PSI-Fd 間の電子伝達が効率よく進行する構造基盤を解明した。さらに Fd 結合前後の PSI 構造を比較することで、Fd は PSI から電子を受け取るだけでなく、PSI の構造変化を引き起こし、PSI の電子伝達反応や集光反応を効率よく行うための調整役となる可能性を提唱した。ここに示したように、蛋白質の電子伝達複合体形成は、固い構造どうしがぶつかり合う単純なものではなく、相互に構造変化を誘起する柔らかくダイナミックな相互作用であるといえるであろう。これまでに報告された Fd-FNR<sup>20)</sup>、Fd-NiR<sup>21)</sup>、Fd-SiR<sup>22)</sup>などの複合体構造解析では、複合体形成によって誘導される構造変化やドメイン間の相対配置の調整、配位様式の変化など、単体の構造からは計り知れない構造情報が得られてきた。本研究からは、PSI と Fd は複合体を形成することで、Fd が直接相互作用

している界面から遠く離れた場所の構造変化までも誘起し、高度な制御を行っている可能性が提唱された。今後、光合成研究をはじめ多くの生体反応について、蛋白質が実際に機能している複合体状態での構造解析が進むことで、高次の生命現象への理解が深まることを期待する。

## 謝辞

Fd[Ga]を精製する系の確立は村木則文博士(現、分子科学研究所助教)、Fd[Ga]の調製は大阪大学の新村研究員、NMR による PSI と Fd の相互作用解析は横浜市立大学池上貴久教授と武藤梨沙博士(現、福岡大学理学部助教)、最終の結晶構造解析は大阪大学の田中秀明准教授に担当していただきました。これらの方々、ならびに大型放射光施設 SPring-8 BL44XU のビームライン関係者の方々に感謝申し上げます。また、His-tag 付きの PSI を発現する株を提供して下さった、ルール大学ポーフムの Matthias Rögner 教授と Marc M. Nowaczyk 先生に御礼申し上げます。

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金(13J03550、16H06560)、JST-CREST 及び、大阪大学の国際共同研究促進プログラムの支援を受けたものです。

Received July 2, 2018; Accepted July 27, 2018; Published Aug 31, 2018.

## 参考文献

1. Morales, R., Charon, M.H., Hudry-Clergeon, G., Petillot, Y., Norager, S., Medina, M. and Frey, M. (1999) Refined X-ray structures of the oxidized, at 1.3 Å, and reduced, at 1.17 Å, [2Fe-2S] ferredoxin from the cyanobacterium *Anabaena* PCC7119 show redox-linked conformational changes. *Biochemistry* 38, 15764–15773.
2. 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.

3. Vo, E., Wang, H.C. and Germanas, J.P. (1997) Preparation and characterization of [2Ga-2S] *Anabaena* 7120 ferredoxin, the first gallium-sulfur cluster-containing protein. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 1934–1940.
4. Xu, X., Scanu, S., Chung, J.S., Hirasawa, M., Knaff, D.B. and Ubbink, M. (2010) Structural and functional characterization of the Ga-substituted ferredoxin from *Synechocystis* sp. PCC6803, a mimic of the native protein. *Biochemistry* 49, 7790–7797.
5. Mutoh, R., Muraki, N., Shinmura, K., Kubota-Kawai, H., Lee, Y.H., Nowaczyk, M.M., Rogner, M., Hase, T., Ikegami, T. and Kurisu, G. (2015) X-ray structure and nuclear magnetic resonance analysis of the interaction sites of the Ga-substituted cyanobacterial ferredoxin. *Biochemistry* 54, 6052–6061.
6. Kubota-Kawai, H., Mutoh, R., Shinmura, K., Setif, P., Nowaczyk, M.M., Rögner, M., Ikegami, T., Tanaka, H. and Kurisu, G. (2018) X-ray structure of an asymmetrical trimeric ferredoxin-photosystem I complex. *Nat. Plants* 4, 218–224.
7. Fukuyama, K., Hase, T., Matsumoto, S., Tsukihara, T., Katsube, Y., Tanaka, N., Kakudo, M., Wada, K. and Matsubara, H. (1980) Structure of *S. platensis* [2Fe-2S] ferredoxin and evolution of chloroplast-type ferredoxins. *Nature* 286, 522–524.
8. Fischer, N., Setif, P. and Rochaix, J.D. (1999) Site-directed mutagenesis of the PsaC subunit of photosystem I - F<sub>B</sub> is the cluster interacting with soluble ferredoxin. *J. Biol. Chem.* 274, 23333–23340.
9. Barth, P., Guillaouard, I., Setif, P. and Lagoutte, B. (2000) Essential role of a single arginine of photosystem I in stabilizing the electron transfer complex with ferredoxin. *J. Biol. Chem.* 275, 7030–7036.
10. Bottin, H., Hanley, J. and Lagoutte, B. (2001) Role of acidic amino acid residues of PsaD subunit on limiting the affinity of photosystem I for ferredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 833–836.
11. Chitnis, V.P., Jungs, Y.S., Albee, L., Golbeck, J.H. and Chitnis, P.R. (1996) Mutational analysis of photosystem I polypeptides. Role of PsaD and the lysyl 106 residue in the reductase activity of the photosystem I. *J. Biol. Chem.* 271, 11772–11780.
12. Hanley, J., Setif, P., Bottin, H. and Lagoutte, B. (1996) Mutagenesis of photosystem I in the region of the ferredoxin cross-linking site: modifications of positively charged amino acids. *Biochemistry* 35, 8563–8571.
13. Liu, H., Zhang, H., Niedzwiedzki, D.M., Prado, M., He, G., Gross, M.L. and Blankenship, R.E. (2013) Phycobilisomes supply excitations to both photosystems in a megacomplex in cyanobacteria. *Science* 342, 1104–1107.
14. Nakanishi, T., Miyazawa, M., Sakakura, M., Terasawa, H., Takahashi, H. and Shimada, I. (2002) Determination of the interface of a large protein complex by transferred cross-saturation measurements. *J. Mol. Biol.* 318, 245–249.
15. Mazor, Y., Borovikova, A., Caspy, I. and Nelson, N. (2017) Structure of the plant photosystem I supercomplex at 2.6 Å resolution. *Nat. Plants* 3.
16. Baker, D.R., Manocchi, A.K., Lamicq, M.L., Li, M., Nguyen, K., Sumner, J.J., Bruce, B.D. and Lundgren, C.A. (2014) Comparative photoactivity and stability of isolated cyanobacterial monomeric and trimeric photosystem I. *J. Phys. Chem. B* 118, 2703–2711.
17. Pan, X., Ma, J., Su, X., Cao, P., Chang, W., Liu, Z., Zhang, X. and Li, M. (2018) Structure of the maize photosystem I supercomplex with light-harvesting complexes I and II. *Science* 360, 1109–1113.
18. Drop, B., Yadav, K.N.S., Boekema, E.J. and Croce, R. (2014) Consequences of state transitions on the structural and functional organization of photosystem I in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant. J.* 78, 181–191.
19. Pi, X., Tian, L., Dai, H.E., Qin, X., Cheng, L., Kuang, T., Sui, S.F. and Shen, J.R. (2018) Unique organization of photosystem I-light-harvesting supercomplex revealed by cryo-EM from a red alga. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 4423–4428.
20. Kurisu, G., Kusunoki, M., Katoh, E., Yamazaki, T., Teshima, K., Onda, Y., Kimata-Arigo, Y. and Hase, T. (2001) Structure of the electron transfer complex between ferredoxin and ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase. *Nat. Struct. Biol.* 8, 117–121.
21. Sakakibara, Y., Kimura, H., Iwamura, A., Saitoh, T., Ikegami, T., Kurisu, G. and Hase, T. (2012) A new structural insight into differential interaction of cyanobacterial and plant ferredoxins with nitrite reductase as revealed by NMR and X-ray crystallographic studies. *J. Biochem.* 151, 483–492.
22. Kim, J.Y., Nakayama, M., Toyota, H., Kurisu, G. and Hase, T. (2016) Structural and mutational studies of an electron transfer complex of maize sulfite reductase and ferredoxin. *J. Biochem.* 160, 101–109.

X-ray crystal structure of trimeric photosystem I-ferredoxin complex

Hisako Kubota-Kawai<sup>1,2,\*</sup>、Genji Kurisu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for Protein Research, Osaka University, <sup>2</sup> National Institute for Basic Biology

## 研究紹介

アンチマイシン A が引き起こす  
光化学系 II 内部のシトクロム  $b_{559}$  への阻害効果<sup>§</sup><sup>1</sup>神戸大学大学院・農学研究科<sup>2</sup>京都大学大学院・生命科学研究科高木 大輔<sup>1,†,\*</sup>、伊福 健太郎<sup>2</sup>

アンチマイシン A は、光合成研究の分野においてフェレドキシンを介した光化学系 I 循環的電子伝達反応の阻害剤として頻繁に使用されてきた。しかしながら、アンチマイシン A のチラコイド膜における標的タンパク質や、その阻害機序に関しては未解明な点が多く残されている。本稿では、アンチマイシン A が光化学系 II 内部のシトクロム  $b_{559}$  に作用することを紹介する。単離チラコイド膜を用いた解析において、アンチマイシン A は通常使用される濃度でシトクロム  $b_{559}$  の酸化還元電位を変化させ、さらに比較的低濃度でも、光照射下におけるシトクロム  $b_{559}$  の酸化還元反応に影響を及ぼした。シトクロム  $b_{559}$  は、光化学系 II の循環的電子伝達反応に関わると考えられており、実際、アンチマイシン A の添加は光化学系 II の光傷害を促進した。これらのことから、アンチマイシン A は光化学系 II 循環的電子伝達反応の機能解析において有用と考えられた。一方で、従来の光化学系 I 循環的電子伝達反応の阻害剤としてのアンチマイシン A の使用には、結果の解釈に注意を要すると考えられる。

## 1. はじめに

光合成研究においては、光合成電子伝達反応から炭酸固定反応に至るまで、様々な阻害剤が反応機構を明らかにするために使われてきた<sup>1)</sup>。そうした阻害剤のうち、アンチマイシン A も光合成研究の発展に大きく貢献した阻害剤の一つである。アンチマイシン A は 1949 年に *Streptomyces* 属から単離された天然の殺菌抗生物質である<sup>2,3)</sup>。昆虫やラットの肝臓といった動物を実験対象とした作用機序の解析から、ミトコンドリア Complex III (Cyt  $bc_1$  複合体) を標的とすることが明らかとされた。Cyt  $bc_1$  複合体は、呼吸鎖電子伝達反応において、還元型ユビキノロン (ユビキノール) から電子を受け取り、シトクロム  $c$  を還元する。アンチマイシン A は、ジラクトン環とサリチル酸部位から構成されるが、特にサリチル

酸構造部位が水素結合により Cyt  $bc_1$  の  $Q_i$  サイトに結合し、High potential  $b$ -type heme からユビキノロンへの電子伝達反応を阻害することが明らかとされた<sup>4-8)</sup>。一方、光合成研究においてアンチマイシン A が初めて使用されたのは、動物を対象とした実験からやや遅れて 1959 年であると理解している<sup>9)</sup>。その後、1963 年に Tagawa らが、単離した broken chloroplasts (包膜が破れた状態の葉緑体) を用いたフェレドキシンを電子受容体とする循環的グリニ酸化反応 (cyclic photophosphorylation) の解析で、アンチマイシン A が ATP 合成を大きく阻害することを見出した<sup>10)</sup>。この循環的グリニ酸化反応は、後に言う光化学系 I (PSI) 循環的電子伝達反応 (Cyclic electron flow around photosystem I, CEF-PSI) に相当する。光合成電子伝達反応には、光化学系 II (PSII) の水の酸化で得た電子が、プラストキノロン (PQ)、シトクロム (Cyt)  $b_6/f$ 、プラストシアニン、PSI、フェレドキシン、フェレドキシン NAD (P) H オ

<sup>§</sup>第 9 回日本光合成学会年会 ポスター発表受賞論文<sup>†</sup>現所属 東北大学大学院・農学研究科

\*連絡先 E-mail: d.takagi@tohoku.ac.jp

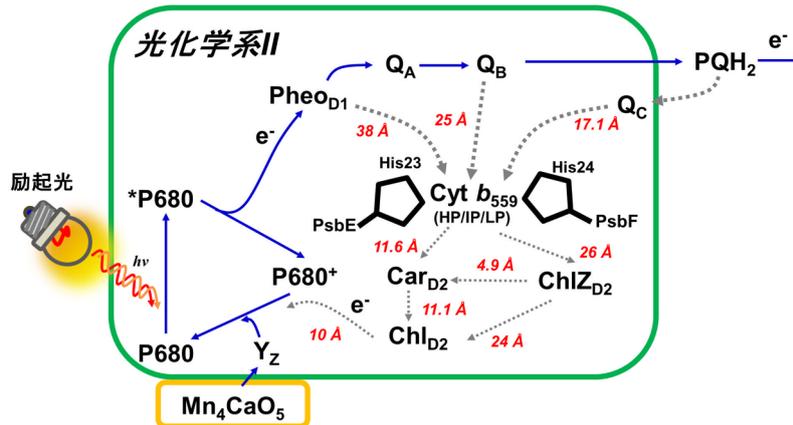


図1. PSII内部における Cyt  $b_{559}$  依存的な電子伝達反応の模式図

直線の電子伝達反応経路は青色の実線矢印で示し、PSII内部の Cyt  $b_{559}$  依存的な電子伝達反応経路は灰色の破線矢印で示した。赤色で示した数値は矢印でつながれた電子伝達コンポーネント間の PSII 構造内部における距離を示した<sup>25,26,41)</sup>。ただし、クロロフィル間の距離は中心金属原子間の距離、その他は分子間の最短距離である<sup>25)</sup>。図中の略語に関して Pheo<sub>D1</sub> は D1 タンパク質に存在するフェオフィチンを示した。Cyt  $b_{559}$  はシトクロム  $b_{559}$  を示し、PSII 内部では High potential (HP) form、Intermediate potential (IP) form、Low potential (LP) form の3つの酸化還元電位型を取りうる。Car<sub>D2</sub>、ChlZ<sub>D2</sub>、Chl<sub>D2</sub> はそれぞれ D2 タンパク質に結合しているカロテノイド、クロロフィルZ、アクセサリクロロフィルを示す。

キシドレダクターゼを介して NADP<sup>+</sup>へと伝達される Z-スキーム型の直線的電子伝達反応 (Linear electron flow) に加えて、PSI に到達した電子がもう一度光合成電子伝達鎖 (PQ と考えられている) に再導入されることによって、チラコイド膜を介したプロトン勾配形成と ATP 生産の促進を行う CEF-PSI と呼ばれる電子伝達経路が存在している<sup>11, 12)</sup>。Tagawa らの発見が、光合成研究においてアンチマイシン A とフェレドキシン依存型の CEF-PSI の関係を結び付ける大きな転機となり、以降、CEF-PSI の評価を行う際にアンチマイシン A が頻繁に用いられるようになった。

その後、解析対象は単離葉緑体を用いた解析から生葉を用いた *in vivo* での光合成解析へと推移し、解析手法も ATP 合成や CO<sub>2</sub> 固定評価から、クロロフィル蛍光測定や PSI 反応中心クロロフィル (P700) の吸収変化などの非破壊測定によって CEF-PSI 活性を評価する方法へと発展していった<sup>13-18)</sup>。その結果、現在ではシロイヌナズナにおける CEF-PSI 変異体が多数、単離されており、CEF-PSI に関わるコンポーネント [NAD(P)H dehydrogenase like complex (NDH)、Proton gradient regulation 5 (PGR5)、Proton gradient

regulation like protein 1 (PGRL1)] が同定され<sup>19-22)</sup>、それらの転写制御、複合体形成過程などの解析が盛んに行われている<sup>11, 12, 23, 24)</sup>。こうした多くの成果からも判断できるように、アンチマイシン A という阻害剤がいかに光合成の研究の発展に寄与してきたかは明らかである。

一方で、アンチマイシン A がフェレドキシン依存的な CEF-PSI をどのように阻害するか分子メカニズムについては、構造生物学の進展が著しい現在でも未だ解明されていない。また、アンチマイシン A には CEF-PSI の阻害剤という大きく注目集める効果以外に、これまで見過ごされてきた PSII への作用が存在する。本稿では、アンチマイシン A のもう一つのターゲットである PSII への効果について、近年、筆者らが報告した PSII 内部の Cyt  $b_{559}$  に及ぼす影響を紹介する。

## 2. PSII 内部の *b*-type heme、Cyt $b_{559}$ の分子機能

最初に、本稿で取り扱う Cyt  $b_{559}$  について紹介する。Cyt  $b_{559}$  は PSII 反応中心複合体の D2 サブユニット近傍に結合する *b*-type のヘムタンパク質であり<sup>25)</sup>、PSII サブユニットである PsbE と PsbF からなるヘテロダイマーである<sup>26)</sup>。その酸

化還元ヘムは、PSII 複合体の受容側(ストロマ側)近くに位置し、PsbE と PsbF が各々有する二つのヒスチジン側鎖に挟まれるように配位されている(図1)。この Cyt  $b_{559}$  の生理的役割は未だに未解明な点が多いが、シアノバクテリアから陸上植物に至るまで Cyt  $b_{559}$  が保存されていること、また PSII 複合体の分子集合過程のごく初期の複合体に Cyt  $b_{559}$  が含まれ、PSII の分子集合に必須であることから、PSII の機能にとって欠かすことができない重要なコンポーネントである<sup>27)</sup>。

Cyt  $b_{559}$  の特徴は、複合体内部において high potential (HP) form ( $\sim 400$  mV)、intermediate potential (IP) form ( $\sim 200$  mV)、low potential (LP) form ( $\sim 50$  mV) の3つの酸化還元電位を取ることであり<sup>28)</sup>。これら3つの電位状態は、複合体内部におけるヘム周辺の疎水の環境、ヘムを配位する His 残基の配位角度、プロトン付加、によって影響を受けて変化することが報告されている<sup>29-34)</sup>。興味深いことに、Cyt  $b_{559}$  の電位状態は、PSII 複合体において、膜の反対側に位置する Mn クラスターの状態に大きく影響されることが知られており、酸素発生活性が高い場合には HP form の割合が多く、PSII がダメージを受けると LP form の割合が多くなることが知られている<sup>35, 36)</sup>。しかしながら、その酸化還元電位の調節機構の詳細は明らかではない。最近では、PSII のチラコイド膜のルーメン側に結合し、Mn クラスターの活性化に重要な役割を持つ PsbP タンパク質の結合が Cyt  $b_{559}$  の電位状態に影響することが報告されている<sup>37)</sup>。

Cyt  $b_{559}$  は、光合成電子伝達反応において PSII 内部における循環的電子伝達反応(CEF-PSII)に関わると考えられている<sup>26)</sup>。その生理的役割は、何らかの原因で酸素発生活系から PSII の反応中心 P680<sup>+</sup>への電子供給が滞った場合に、PSII の還元側から電子を循環的に戻す役割があると考えられている<sup>26)</sup>。また、Cyt  $b_{559}$  の酸化に伴い、クロロフィル(Chl)やカロテノイド(Car)も酸化されることが知られており、Cyt  $b_{559}$  の還元には Pheo、Q<sub>B</sub>、PQ プールなどの関与が示唆されている<sup>26)</sup>。しかしながら、その電子伝達反応の経路の詳細は未だ明らかとなっていない。図1に現在、

想定されている CEF-PSII の電子伝達経路を示す。P680<sup>+</sup>への電子の供給は、D2 タンパク質に結合し P680 近傍に存在するクロロフィル(Chl<sub>D2</sub>)とカロテノイド(Car<sub>D2</sub>)を介して Cyt  $b_{559}$  から起こると考えられている。また、酸化された Car<sub>D2</sub>(Car<sub>D2</sub><sup>+</sup>)は、周辺の ChlZ<sub>D2</sub>などの Chl や Car も酸化すると考えられている。ただし、Kitajima と Noguchi は ChlZ<sub>D2</sub>の酸化は Car<sub>D2</sub>と独立して起こり得ることを報告している<sup>38)</sup>。一方、酸化された Cyt  $b_{559}$  の還元については、シアノバクテリアの PSII 立体構造的において、Cyt  $b_{559}$  への電子供与体と想定される Pheo と Q<sub>B</sub>は、いずれも構造内で Cyt  $b_{559}$  と距離が離れており、チラコイド膜上で分光学的に観測される Cyt  $b_{559}$  の還元速度( $t_{1/2} = 100$  ms)を説明できない<sup>26, 39, 40)</sup>。Guskov らは Cyt  $b_{559}$  と edge to edge で 15 Å の距離(Qc 結合時のプラスチックノールの head group との距離は 17.1 Å)に新規の PQ 結合部位である Qc site の存在を報告しており、そうした別の PQ 結合サイトの関与も示唆されている<sup>26, 39-42)</sup>。しかしながら、まだ定説となるには至っておらず、CEF-PSII の電子伝達経路にはまだまだ解明すべき点が多く残されている。

### 3. CEF-PSI 解析におけるアンチマイシン使用の問題点

前述のようにアンチマイシン A といえば CEF-PSI の阻害剤という印象が強いが、それだけでは説明できない現象も存在する。ここで、クロロフィル蛍光を用いたフェレドキシン依存的な CEF-PSI 評価法を例にとる。この方法では、単離した ruptured chloroplasts (葉緑体包膜を浸透圧によって破壊した葉緑体)にフェレドキシンと NADPH を加え、その時に観測されるクロロフィル蛍光の上昇により CEF-PSI 活性を評価する<sup>19-23)</sup>。このクロロフィル蛍光の増大は、NADPH により還元されたフェレドキシンが、チラコイド膜内の PQ プールを還元することが原因と考えられており、アンチマイシン A はそのクロロフィル蛍光の増大を抑制する。しかしながら、PSII 内部の Q<sub>A</sub>-Q<sub>B</sub> 間の電子伝達反応の阻害剤である DCMU は、フェレドキシン依存の CEF-PSI 活性

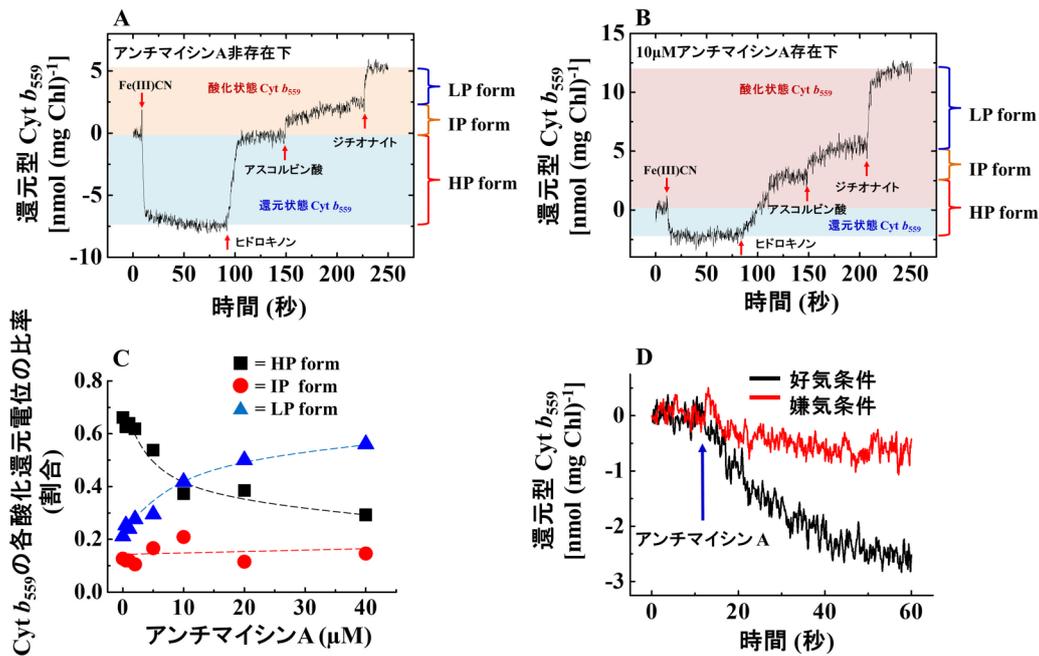


図2. アンチマイシン A が Cyt  $b_{559}$  の酸化還元電位に与える影響

ホウレンソウから単離したチラコイド膜において、暗所においてフェリシアン化カリウム [Fe (III) CN] で Cyt  $b_{559}$  を完全酸化し、HP form のみを還元するヒドロキノン、IP form を還元するアスコルビン酸、LP form を還元するジチオナイトを順に添加し、それらの添加に応じて還元される Cyt  $b_{559}$  の割合から HP、IP、LP form で存在する Cyt  $b_{559}$  の割合を算出した。A はアンチマイシン A 非存在下での結果を示し、B はアンチマイシン A 存在下での結果を示す。A、B の図内における青色で示した領域は滴定前において還元状態で存在している Cyt  $b_{559}$  の量を示し、赤色で示した領域は滴定前において酸化状態で存在している Cyt  $b_{559}$  の量を示す。赤矢印は各試薬を添加した時点を示す。C はアンチマイシン A の濃度変化に伴う Cyt  $b_{559}$  の HP、IP および LP form の割合の変化を示す。なお、アンチマイシン A の有無によって検出されるチラコイド膜における Cyt  $b_{559}$  の総量は変化しないことを確認している<sup>49)</sup>。D は暗所で単離チラコイド膜を含む反応液にアンチマイシン A を加えてからの Cyt  $b_{559}$  の酸化還元の変化を経時的にモニターした結果である。黒線は好気条件での結果を示し、赤線は嫌気条件での結果を示す。図は Takagi et al.<sup>49)</sup> から改変した。

と考えられているクロロフィル蛍光の上昇を阻害しない<sup>43)</sup>。即ち、フェレドキシンからの電子は PQ プールではなく PSII に作用しており、それを阻害するアンチマイシン A も PSII に作用している可能性がある。実際、アンチマイシン A の PSII への作用について、過去にいくつか報告があるが、深くは追求されてこなかった<sup>44-46)</sup>。このように、阻害剤は確固たる標的と作用機序の基には非常に有効であるが、作用点の曖昧さのもと使用する際には、結果の解釈を難しくする。とりわけクロロフィル蛍光解析においては PSII からの蛍光を見ているため、アンチマイシン A が PSII に作用した場合、正しく CEF-PSI を評価できているか不明瞭である。

#### 4. アンチマイシン A が PSII に与える影響 ～Cyt $b_{559}$ の酸化還元電位の変化～

そこで筆者らは、アンチマイシン A がチラコイド膜上の、どのコンポーネントを標的として光合成電子伝達反応に影響を与えているのかを Kinetic LED-array spectrophotometer (Waltz 社) を用いた多波長分光測定により解析した。Kinetic LED-array spectrophotometer は 508~580 nm の領域における波長吸収変化を同時かつ経時的に解析でき、多数の光合成電子伝達成分の酸化還元変化の同時解析を可能とする<sup>47,48)</sup>。その結果、単離チラコイド膜においてアンチマイシン A は PSII の Cyt  $b_{559}$  の酸化還元電位を変化させることを確認した(図2)<sup>49)</sup>。図2は Cyt  $b_{559}$  が取りうる3つの酸化還元電位型を、様々な還元剤を用いた滴定

により分別定量した結果である。解析は暗条件下においてチラコイド膜を含む反応液に [Fe (III) CN] を添加することで Cyt *b*<sub>559</sub> を完全酸化させた後、HP、IP、LP form を還元し得る還元剤を順に添加することで行った<sup>50,51)</sup>。図 2A に示すように、アンチマイシン A 非存在下で、暗順応させた単離ホウレンソウ葉緑体においては、6 割ほどの Cyt *b*<sub>559</sub> が HP form で存在していた。ここにアンチマイシン A を添加すると、濃度依存的に HP form が減少し、代わって LP form が増加した (図 2B、C)。また、最初に [Fe (III) CN] により酸化される Cyt *b*<sub>559</sub> の量は暗所で還元状態として存在している Cyt *b*<sub>559</sub> とみなすことができ、その量は HP form の割合とほぼ一致し、アンチマイシン A の添加では還元型 Cyt *b*<sub>559</sub> の割合が大きく低下することが確認された (図 2A、B)。そこで、チラコイド膜を含む溶液にアンチマイシン A を添加し、経時的に Cyt *b*<sub>559</sub> の酸化還元の変化をモニターしたところ、Cyt *b*<sub>559</sub> は好気条件で酸化されるが、嫌気条件においてはアンチマイシン A

に依存する酸化は確認されなかった (図 2D)。この結果から、還元状態であった Cyt *b*<sub>559</sub> がアンチマイシン A の作用によって HP form から LP form へと変化し、酸素依存的に酸化されると考えられた (図 2D)。

こうしたアンチマイシン A の Cyt *b*<sub>559</sub> の酸化還元電位に与える効果は、PSII が濃縮されたグラナ膜 (BBY 膜) を用いた実験においても確認された<sup>49)</sup>。一方、チラコイド膜および BBY 膜において、2,6-dimethylbenzoquinone (DMBQ) 依存的な酸素発生能力を評価したところ、アンチマイシン A の存在下および非存在下で PSII における酸素発生活性に差はなかった<sup>49)</sup>。また、PSII 複合体のサブユニット組成に関しても、PsbP の結合も含めて、アンチマイシン A 添加の影響は認められなかった<sup>49)</sup>。これらのことから、アンチマイシン A は PSII の Mn クラスターの酸素発生活性や PSII の複合体形成状況には影響せず、Cyt *b*<sub>559</sub> 近傍の構造に直接作用し、酸化還元電位の変化を誘導していることが考えられた。

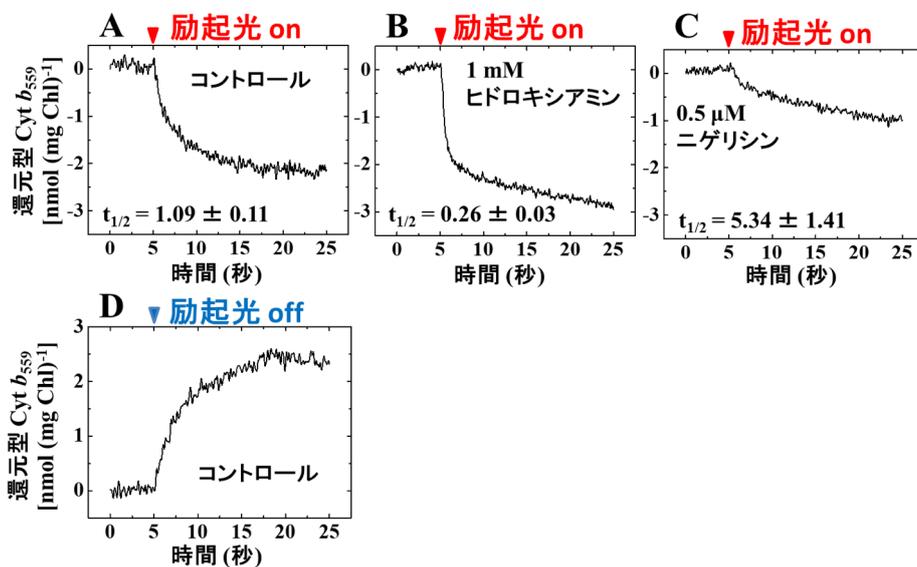


図 3. 単離チラコイド膜における Cyt *b*<sub>559</sub> の酸化反応解析

ホウレンソウから単離したチラコイド膜に励起光 ( $1,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) を照射した時の Cyt *b*<sub>559</sub> の酸化キネティクス (A-C) と AL 消灯時の Cyt *b*<sub>559</sub> の還元キネティクス (D) を示す。赤矢印は励起光の照射開始を意味し、青矢印は励起光の消灯を意味する。反応溶液中には光合成電子伝達反応駆動の為の電子のアクセプターとしてメチルピオロゲンと過酸化水素消去の為のカタラーゼを添加している。B では上記反応溶液に Mn クラスターの活性を阻害するためにヒドロキシアミン (1 mM) を、C では脱共役剤であるニゲリシン (0.5 μM) を、 $\Delta\text{pH}$  による水酸化活性の低下を緩和するために加えて解析を行った。A から C の図内には Cyt *b*<sub>559</sub> の酸化反応における  $t_{1/2}$  を示した (平均値 $\pm$ 標準誤差、 $n = 3-6$ )。図は Takagi et al.<sup>49)</sup> から改変した。

5. アンチマイシン A が PSII に与える影響 ～ Cyt *b*<sub>559</sub> を介した電子伝達反応の抑制～

続いて、光照射下において、アンチマイシン A が Cyt *b*<sub>559</sub> の関わる電子伝達反応に与える影響を、単離チラコイド膜を用いて解析した<sup>49)</sup>。本解析においては、単離チラコイド膜を含む溶液に電子のアクセプターとしてメチルビオロゲンを加え、光照射下において直線的電子伝達反応のみが駆動する環境を設定した。まず、アンチマイシン A の非存在下においては Cyt *b*<sub>559</sub> は光照射時に酸化され、光消灯時に還元されることを確認した (図 3A, D)。つまり、Cyt *b*<sub>559</sub> は単離チラコイド膜において直線的電子伝達反応だけが駆動する条件下でも、電子の授受を行っていることが確認された。また、Cyt *b*<sub>559</sub> の酸化反応は PSII の Mn クラスターを還元破壊するヒドロキシアミンの存在下においては促進され、水の酸化反応を低下させるルーメンの酸性化を脱共役剤であるニゲリシンで緩和すると抑制された (図 3B, C)<sup>49)</sup>。

これらのことから、光照射下で Mn クラスターを介した反応中心 P680<sup>+</sup>への電子供給が低下した場合に、Cyt *b*<sub>559</sub> を介した光合成電子伝達反応が促進されることが確認された。

次に Cyt *b*<sub>559</sub> の電子伝達反応におけるアンチマイシン A の濃度依存性を解析した。Cyt *b*<sub>559</sub> の酸化還元電位に影響を与えない低濃度の条件下 (～2 μM) において、単離チラコイド膜に光を照射すると、Cyt *b*<sub>559</sub> の酸化速度はアンチマイシン A 非存在下に比べて低下した (図 4A-D)。従って、アンチマイシン A は Cyt *b*<sub>559</sub> の酸化還元電位を変えることに加え、かなり低濃度でも光依存的な Cyt *b*<sub>559</sub> の酸化反応を阻害する効果があることが明らかとなった。一方、Cyt *b*<sub>559</sub> の酸化還元電位に影響を与える高濃度のアンチマイシン A 存在下では、Cyt *b*<sub>559</sub> は光照射時において逆に還元されるようになり、10 μM の条件では、還元後、ほとんど酸化されないことが明らかとなった (図 4E-G)。この比較的高濃度のアンチマイシン A

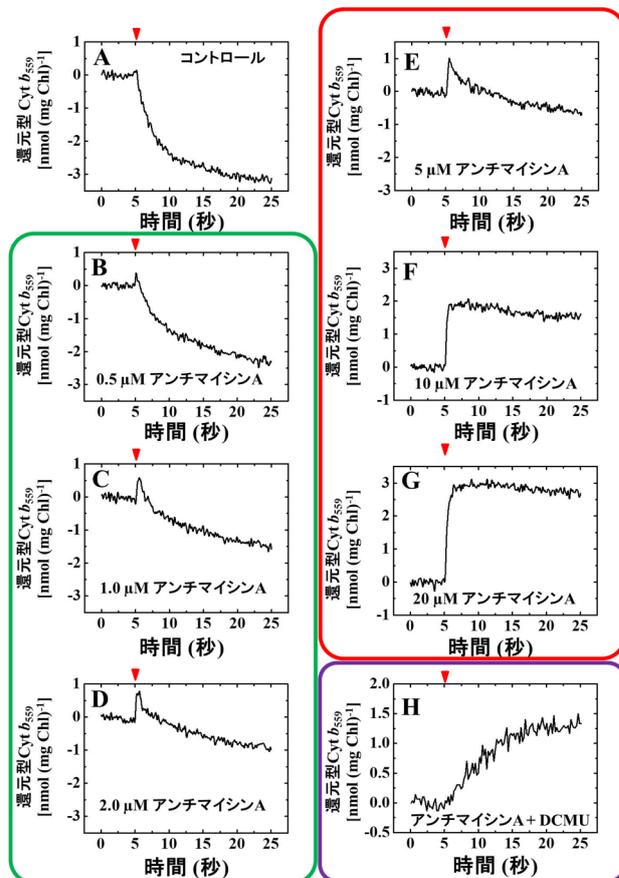


図 4. アンチマイシン A が光照射時の Cyt *b*<sub>559</sub> の酸化反応に与える影響の解析

ホウレンソウから単離したチラコイド膜に励起光 (1,000 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) を照射した時の Cyt *b*<sub>559</sub> の酸化還元キネティクスを示す。励起光は図内の赤矢印の時点で照射を開始した。反応溶液中には光合成電子伝達反応駆動の電子のアクセプターとしてメチルビオロゲンと過酸化水素消去のカタラーゼを添加した。図中左下には反応溶液に含まれるアンチマイシン A の濃度を示した。緑枠で囲まれている条件 (B-D) ではアンチマイシン A は Cyt *b*<sub>559</sub> の酸化還元電位には影響しない濃度での解析を示している。赤枠で囲まれた条件 (E-G) のアンチマイシン A の濃度は Cyt *b*<sub>559</sub> の酸化還元電位に影響を及ぼし、HP form 量を低下させ、LP form の量を増加させる濃度域である。紫枠で囲まれた条件 (H) は、単離チラコイド膜を含む溶液にアンチマイシン A (10 μM) と DCMU (5 μM) を加えた状態における Cyt *b*<sub>559</sub> の酸化反応の影響を調べた結果を示した。図は Takagi et al.<sup>49)</sup>から改変した。

存在下における早い還元反応は、LP form へと変化した酸化型 Cyt  $b_{559}$  に電子が流入する反応と考えられる。アンチマイシン A 存在下でさらに DCMU を加えると Cyt  $b_{559}$  の還元が抑制されたことから、Cyt  $b_{559}$  に電子を与えるのは  $Q_B$  以降の電子伝達成分であると考えられた (図 4H)。

さらに、アンチマイシン A は PSII の電子受容側の反応、 $Q_A \rightarrow Q_B$  キノン間の電子伝達反応にも影響を与えた。クロロフィル蛍光測定を用いて、パルス光照後の  $Q_A$  の再酸化キネティクスを解析した結果、アンチマイシン A 存在下で蛍光の減衰速度が低下し、 $Q_A \rightarrow Q_B$  間の電子伝達反応が抑制されることが示唆された<sup>49)</sup>。これに関連して Nakamura と Sugiura らは、*Thermosynechococcus elongatus* の Cyt  $b_{559}$  を保持する PsbE と PsbF にアミノ酸置換を行うことで、His 残基周囲の環境を変化させた際に、Cyt  $b_{559}$  の電位状態が HP form から LP form へと変化するとともに、 $Q_A \rightarrow Q_B$  間の電子伝達反応が低下することを報告している<sup>52, 53)</sup>。一方、DCMU 存在下ではアンチマイシン A は  $Q_A$  の再酸化キネティクスに影響しなかった。熱発光解析<sup>54)</sup>においても、アンチマイシン A は  $S_2Q_A^-$  の電化再結合温度には影響せず、 $S_2Q_B^-$  の電化再結合温度を低下させたことから、PSII の  $Q_B$

サイト周辺の構造に作用していることが推定された<sup>49)</sup>。

### 6. アンチマイシン A は Cyt $b_{559}$ 依存的な循環的電子伝達反応を阻害することによって、PSII の光傷害を誘導する

前述の実験によって、アンチマイシン A が PSII に作用し、Cyt  $b_{559}$  依存的な CEF-PSII を阻害することが明らかになった。Cyt  $b_{559}$  が担う PSII 内部の電子伝達反応は、高い酸化力を持つ  $P680^+$  ( $\sim 1.2V$ ) の蓄積を抑え、 $P680^+$  によって引き起こされる PSII のドナー側における光傷害を緩和する機能があると考えられている<sup>26)</sup>。そこでアンチマイシン A によって Cyt  $b_{559}$  依存的な電子伝達反応を阻害した場合に、PSII の光傷害が促進されるかどうかを解析した (図 5)。アンチマイシン A による PSII 光傷害への効果が CEF-PSI の阻害によって起こる可能性を排除するために、単離チラコイド膜において電子のアクセプターとしてメチルビオロゲンを用い、PSI から出た電子は酸素へと流れるよう実験条件を設定した。また、メチルビオロゲンを介して酸素へと電子が流れた結果生成する過酸化水素の消去の為にカタラーゼを反応溶液中に添加した。1,000  $\mu\text{mol photons m}^{-2}$

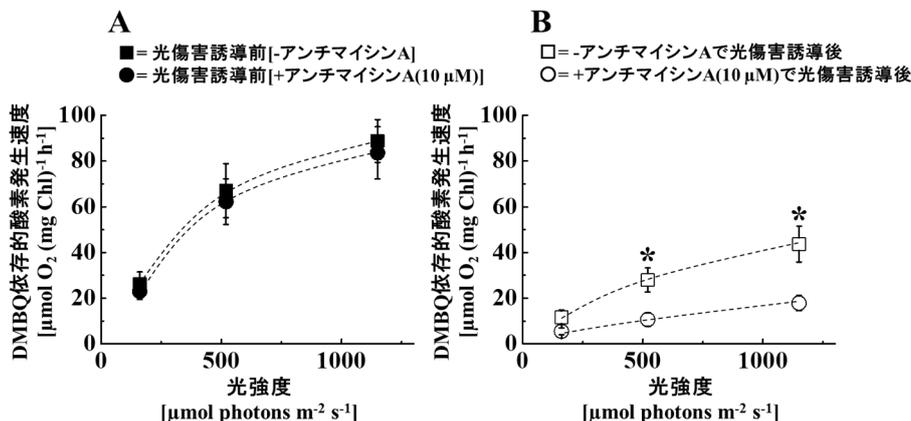


図 5. アンチマイシン A が PSII の光傷害に与える影響の解析

単離チラコイド膜においてアンチマイシン A の存在下、および非存在下での PSII における酸素発生活性を測定した。反応溶液中には光合成電子伝達反応駆動の為に電子のアクセプターとしてメチルビオロゲンと過酸化水素消去の為にカタラーゼを添加した。A は、チラコイド膜に光傷害誘導の為に強光照射を行う前に反応溶液中に DMBQ を添加し、DMBQ 依存的な酸素発生活性を解析した結果を示す。B は強光 (1,000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) の光を 30 分照射した後に DMBQ を反応溶液中に添加し、DMBQ 依存的な酸素発生活性を解析した結果を示す。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値  $\pm$  標準誤差を示し、図中にアスタリスクは有意差を示す (Student's t-test,  $p < 0.05$ )。図は Takagi et al.<sup>49)</sup> から改変した。

s<sup>1</sup>の光を上記のチラコイド膜反応溶液に30分間照射し、その後、DMBQを反応溶液に加えることによって、DMBQ依存的な酸素発生速度からPSIIの光傷害の程度を解析した。その結果、アンチマイシン非存在下では光照射の前後でPSIIにおける酸素発生活性が約50%低下した(図5B)。一方で、アンチマイシンA存在下でPSIIの光傷害を誘導すると、光照射の前後ではPSIIにおける酸素発生活性が約20%まで低下した(図5B)。なお、光傷害誘導前では、アンチマイシンAの有無ではPSIIにおける酸素発生活性に有意な差はみられていない(図5A)。これはBBY膜におけるDMBQ依存的な酸素発生にアンチマイシンAは影響しないという結果と一致する<sup>49)</sup>。今回の実験条件では、CEF-PSIは駆動しない条件に設定しており、アンチマイシンAがPSIにおける循環的電子伝達反応を阻害することによってPSIIの光傷害が促進した可能性は排除できる。すなわち、アンチマイシンAはPSIIのCyt b<sub>559</sub>に作用することによってPSII内部のCyt b<sub>559</sub>依存的CEF-PSIIを阻害し、PSII光傷害を亢進したと考えられる。

### 7. Cyt b<sub>559</sub>の関与する電子伝達反応制御の解明に向けて

今回の結果から、アンチマイシンAは、直線的電子伝達反応にも少し影響を与えるものの、その大きな阻害なしにCyt b<sub>559</sub>のHP formからLP formへのスイッチングを誘導できる阻害剤であることが明らかとなった。図1で示したように、Cyt b<sub>559</sub>がHP formで存在している場合にはP680<sup>+</sup>へと電子を供給することでPSIIの光傷害を緩和することに貢献すると考えられる。一方、LP formへと変換した場合は、PSIIのQ<sub>B</sub>やPQプールから効率よく電子を受け取り、LP form依存的な酸素還元反応により電子の受け皿を確保すると考えられる<sup>55,56)</sup>。後半の反応は循環的電子伝達ではないため、Cyt b<sub>559</sub>はCEFとオルタナティブな電子伝達(AEF)を、光合成電子伝達鎖の酸化還元状態に応じて切り替えていると考えられる。*T. elongatus*や*Chlamydomonas*において、ヘムを配位するPsbE、PsbFのHis残基を別のアミノ酸に

置換し、Cyt b<sub>559</sub>の酸化還元電位型を変化させた変異体を用いた解析から、Cyt b<sub>559</sub>のHP formがPSIIの光傷害から回復過程に必要であることが示されている<sup>53,58)</sup>。一方、LP formを誘導する必要性については未だ実証されておらず、今後実証すべき課題となっている。アンチマイシンAの作用機序の解明は、こうしたCyt b<sub>559</sub>の酸化還元電位のスイッチングメカニズムを明らかにできる可能性がある。近年、Kaminskayaらは、PSIIに存在する第三のキノン結合サイトQ<sub>C</sub> pocketへのプラストキノンの結合状態が、Cyt b<sub>559</sub>の酸化還元電位を変化させる可能性を報告した<sup>58-60)</sup>。もしかするとアンチマイシンAは、このQ<sub>C</sub> pocketをPQの代わりに占領することによってCyt b<sub>559</sub>の電子伝達反応および酸化還元電位に影響を及ぼしているのかもしれない。これはミトコンドリアにおけるCyt bc<sub>1</sub> complexへのアンチマイシンAの作用機序を考えると魅力ある仮説である。今後、葉緑体のPSIIにおいてもアンチマイシンAの相互作用様式が立体構造として解明され、光合成電子伝達経路の研究に再び大きな知見をもたらすことが期待される。

### 8. おわりに

今回の解析において、アンチマイシンAは単純なCEF-PSIの阻害剤ではなく、PSIIのCyt b<sub>559</sub>依存的な循環的電子伝達反応にも作用することを明らかとした。即ち、CEF-PSIの活性評価およびその生理学的役割を解析しようとする際に、アンチマイシンAの効果だけを持って、アンチマイシンAを添加時に現れる事象の原因をCEF-PSIに帰結することは非常に危険であろう。とりわけ、PSIIからのクロロフィル蛍光を用いた解析で得られるアンチマイシンAの効果は、過去にさかのぼって慎重に再考する必要があると考える。

アンチマイシンAがCyt b<sub>559</sub>に高い親和性をもって作用するという点は、未だ明確でないCyt b<sub>559</sub>依存的な電子伝達反応の生理的役割や制御機構を解明するために有効と考えている。一方、CEF-PSIにおけるアンチマイシンAの効果についても、PGR5のアミノ酸置換がアンチマイシン

A の感受性を左右するとの報告があり<sup>61)</sup>、全てを Cyt *b*<sub>559</sub> への効果だけで説明できる状態ではない。アンチマイシン A が光合成電子伝達鎖全体に及ぼす作用に関しては、現段階ではまだ様々な測定結果から現象を考察する必要があるだろう。Cyt *b*<sub>559</sub> を介する電子伝達反応の生理学的重要性に関する議論は非常に限られた状況である。今回、アンチマイシン A が Cyt *b*<sub>559</sub> 依存的な電子伝達反応をターゲットとすることが明らかとなったことで、今後、CEF-PSII や AEF-PSII の生理学的解析が発展することを期待する。

### 謝辞

本研究は、神戸大学の三宅親弘教授、京都大学の西村太志博士との共同研究で行われたものです。ご助言およびご指導をいただきましたこと、この場を借りて御礼申し上げます。

Received July 9, 2018; Accepted Aug 17, 2018; Published Aug 31, 2018

### 参考文献

1. Draber, W., Tietjen, K., Kluth, J.F. and Trebst, A. (1991) Herbicides in photosynthesis research. *Angew. Chem.* 30, 1621–1633.
2. Dunshee, B.R., Leben, C., Keitt, G.W. and Strong, F.M. (1949) The isolation and properties of antimycin A. *J. Am. Chem. Soc.* 71, 2436–2437.
3. Labs, M., Rühle, T. and Leister, D. (2016) The antimycin A-sensitive pathway of cyclic electron flow: from 1963 to 2015. *Photosynth. Res.* 129, 231–238.
4. Miyoshi, H., Tokutake, N., Imaeda, Y., Akagi, T. and Iwamura, H. (1995) A model of antimycin A binding based on structure-activity studies of synthetic antimycin A analogues. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1229, 149–154.
5. Xia, D., Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L. and Deisenhofer, J. (1997). Crystal structure of the cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex from bovine heart mitochondria. *Science* 277, 60–66.
6. Valkova-Valchanova, M., Darrouzet, E., Moomaw, C.R., Slaughter, C.A. and Daldal, F. (2000) Proteolytic cleavage of the Fe–S subunit hinge region of *Rhodobacter capsulatus bc*<sub>1</sub> complex: Effects of inhibitors and mutations. *Biochemistry* 39, 15484–15492.
7. Gao, X., Wen, X., Esser, L., Quinn, B., Yu, L., Yu, C.A. and Xia, D. (2003) Structural basis for the quinone reduction in the *bc*<sub>1</sub> complex: a comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome *bc*<sub>1</sub> with bound substrate and inhibitors at the Qi site. *Biochemistry* 42, 9067–9080.
8. Huang, L.S., Cobessi, D., Tung, E.Y. and Berry, E.A. (2005) Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial *bc*<sub>1</sub> complex: a new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern. *J. Mol. Biol.* 351, 573–597.
9. Whatley, F.R., Allen, M.B. and Arnon, D.I. (1959) Photosynthesis by isolated chloroplasts: VII. Vitamin K and riboflavin phosphate as cofactors of cyclic photophosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 32, 32–46.
10. Tagawa, K., Tsujimoto, H.Y. and Arnon, D.I. (1963) Role of chloroplast ferredoxin in the energy conversion process of photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 4, 567–572.
11. Shikanai, T. (2007) Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 199–217.
12. Yamori, W. and Shikanai, T. (2016) Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis and plant growth. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 81–106.
13. Mi, H., Endo, T., Schreiber, U. and Asada, K. (1992) Donation of electrons from cytosolic components to the intersystem chain in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 as determined by the reduction of P700<sup>+</sup>. *Plant Cell Physiol.* 33, 1099–1105.
14. Mi, H., Endo, T., Schreiber, U., Ogawa, T. and Asada, K. (1992) Electron donation from cyclic and respiratory flows to the photosynthetic intersystem chain is mediated by pyridine nucleotide dehydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 33, 1233–1237.
15. Mi, H., Endo, T., Schreiber, U., Ogawa, T. and Asada, K. (1994) NAD(P)H dehydrogenase-dependent cyclic electron flow around photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: a study of dark-starved cells and spheroplasts. *Plant Cell*

- Physiol.* 35, 163–173.
16. Mi, H., Endo, T., Ogawa, T. and Asada, K. (1995) Thylakoid membrane-bound, NADPH-specific pyridine nucleotide dehydrogenase complex mediates cyclic electron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 36, 661–668.
  17. Mano, J., Miyake, C., Schreiber, U. and Asada, K. (1995) Photoactivation of the electron flow from NADPH to plastoquinone in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 36, 1589–1598.
  18. Endo, T., Shikanai, T., Sato, F. and Asada, K. (1998) NAD(P)H dehydrogenase-dependent, antimycin A-sensitive electron donation to plastoquinone in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 39, 1226–1231.
  19. Ifuku, K., Endo, T., Shikanai, T., Aro, E. M. (2011) Structure of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex: nomenclature for nuclear-encoded subunits. *Plant Cell Physiol.* 52, 1560–1568.
  20. Munekage, Y., Hojo, M., Meurer, J., Endo, T., Tasaka, M. and Shikanai, T. (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell* 110, 361–371.
  21. DalCorso, G., Pesaresi, P., Masiero, S., Aseeva, E., Schünemann, D., Finazzi, G., Joliot, P., Barbato, R., Leister, D. (2008) A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*. *Cell*, 132, 273–285.
  22. Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K. I., Endo, T., Tasaka, M., and Shikanai, T. (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* 429, 579–582.
  23. Hashimoto, M., Endo, T., Peltier, G., Tasaka, M., and Shikanai, T. (2003). A nucleus-encoded factor, CRR2, is essential for the expression of chloroplast *ndhB* in *Arabidopsis*. *Plant J.* 36, 541–549.
  24. Kato, Y., Sugimoto, K., Shikanai, T. (2018) NDH-PSI supercomplex assembly precedes full assembly of the NDH Complex in Chloroplast. *Plant Physiol.* 176, 1728–1738.
  25. Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.R. and Kamiya, N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* 473, 55–60.
  26. Shinopoulos, K.E. and Brudvig, G.W. (2012) Cytochrome *b*<sub>559</sub> and cyclic electron transfer within photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1817, 66–75.
  27. Nickelsen J, Rengstl B (2013) Photosystem II assembly: from cyanobacteria to plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 609–635.
  28. Wada, K. and Arnon, D.I. (1971) Three forms of cytochrome *b*<sub>559</sub> and their relation to the photosynthetic activity of chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68, 3064–3068.
  29. Matsuda, H. and Butler, W.L. (1983) Restoration of high-potential cytochrome *b*-559 in Photosystem II particles in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 725, 320–324.
  30. Babcock, G.T., Widger, W.R., Cramer, W.A., Oertling, W.A. and Metz, J.G. (1985) Axial ligands of chloroplast cytochrome *b*-559: identification and requirement for a heme-crosslinked polypeptide structure. *Biochemistry* 24, 3638–3645.
  31. Ortega, J.M., Hervás, M. and Losada, M. (1988) Redox and acid-base characterization of cytochrome *b*-559 in photosystem II particles. *FEBS. J.* 171, 449–455.
  32. Krishtalik, L.I., Tae, G.S., Cherepanov, D.A. and Cramer, W.A. (1993) The redox properties of cytochromes *b* imposed by the membrane electrostatic environment. *Biophys. J.* 65, 184–195.
  33. Roncel, M., Ortega, J.M. and Losada, M. (2001) Factors determining the special redox properties of photosynthetic cytochrome *b*<sub>559</sub>. *FEBS. J.* 268, 4961–4968.
  34. Pospíšil, P. (2011) Enzymatic function of cytochrome *b*<sub>559</sub> in photosystem II. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 104, 341–347.
  35. Briantaisa, J.M., Vernttea, C., Miyao, M., Murata N. and Picauda M. (1985) Relationship between O<sub>2</sub> evolution capacity and cytochrome *b*-559 high-potential form in Photosystem II particles. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 808, 324–351.
  36. Ghanotakis, D., Yocum, C. and Babcock, G (1986) ESR spectroscopy demonstrates that cytochrome *b*<sub>559</sub> remains low potential in Ca<sup>2+</sup>-reactivated, salt-washed PSII particles, *Photosynth. Res.* 9, 125–134.
  37. Nishimura, T., Nagao, R., Noguchi, T., Nield, J., Sato, F. and Ifuku, K. (2016) The N-terminal sequence of the extrinsic PsbP protein modulates the redox potential of Cyt *b*<sub>559</sub> in photosystem II. *Sci. Rep.* 6: 21490.

38. Kitajima, Y. and Noguchi, T. (2006) Photooxidation pathway of chlorophyll Z in photosystem II as studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 45, 1938–1945.
39. 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.
40. 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.
41. Yadav, D.K., Prasad, A., Kruk, J. and Pospíšil, P. (2014) Evidence for the involvement of loosely bound plastoquinones in superoxide anion radical production in photosystem II. *PLoS ONE* 9, e115466.
42. 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.
43. Fisher, N. and Kramer, D.M. (2014) Non-photochemical reduction of thylakoid photosynthetic redox carriers in vitro: relevance to cyclic electron flow around photosystem I?. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1837, 1944–1954.
44. Mills, J.D., Slovacek, R.E. and Hind, G. (1978) Cyclic electron transport in isolated intact chloroplasts. Further studies with antimycin. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 504, 298–309.
45. Oxborough, K. and Horton, P. (1987) Characterisation of the effects of antimycin A upon high energy state quenching of chlorophyll fluorescence (qE) in spinach and pea chloroplasts. *Photosynth. Res.* 12, 119–127.
46. Ruban, A.V. and Horton, P. (1992) Mechanism of ΔpH-dependent dissipation of absorbed excitation energy by photosynthetic membranes. I. Spectroscopic analysis of isolated light-harvesting complexes. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1102, 30–38.
47. Klughammer, C., Kolbowski, J., & Schreiber, U. (1990). LED array spectrophotometer for measurement of time resolved difference spectra in the 530–600 nm wavelength region. *Photosynth. Res.* 25, 317–327.
48. Schöttler, M.A., Thiele, W., Belkuis, K., Bergner, S.V., Flügel, C., Wittenberg, G., Agrawal, S., Stegemann, S., Ruf, S. and Bock, R. (2017) The plastid-encoded Psal subunit stabilizes photosystem I during leaf senescence in tobacco. *J. Exp. Bot.* 68, 1137–1155.
49. Takagi, D., Ifuku, K., Nishimura, T. and Miyake, C. (2018) Antimycin A inhibits cytochrome *b*<sub>559</sub>-mediated cyclic electron flow within photosystem II. *Photosynth. Res.* DOI: 10.1007/s11120-018-0519-7.
50. Cramer, W.A., Fan, H.N. and Böhme, H. (1971) High and low potential states of the chloroplast cytochrome *b*-559 and thermodynamic control of non-cyclic electron transport. *J. Bioenerg.* 2, 289–303.
51. Cramer, W.A. and Böhme, H. (1972) High-potential cytochrome *b*-559 as a secondary quencher of chloroplast fluorescence in the presence of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 256, 358–369.
52. Nakamura, M., Boussac, A. and Sugiura, M. (2018) Consequences of structural modifications in cytochrome *b*<sub>559</sub> on the electron acceptor side of Photosystem II. *Photosynth. Res.* DOI: 10.1007/s11120-018-0521-0.
53. Sugiura, M., Nakamura, M., Koyama, K. and Boussac, A. (2015) Assembly of oxygen-evolving Photosystem II efficiently occurs with the apo-Cyt *b*<sub>559</sub> but the holo-Cyt *b*<sub>559</sub> accelerates the recovery of a functional enzyme upon photoinhibition. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1847, 276–285.
54. Rutherford, A.W. and Inoue, Y. (1984) Charge accumulation and photochemistry in leaves studied by thermoluminescence and delayed light emission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81, 1107–1111.
55. Barber, J. and De Las Rivas, J. (1993) A functional model for the role of cytochrome *b*<sub>559</sub> in the protection against donor and acceptor side photoinhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90, 10942–10946.
56. Bondarava, N., Gross, C.M., Mubarakshina, M., Golecki, J.R., Johnson, G.N. and Krieger-Liszskay, A. (2010) Putative function of cytochrome *b*<sub>559</sub> as a plastoquinol oxidase. *Physiol. Plant.* 138, 463–473.
57. Hamilton, M.L., Franco, E., Deák, Z., Schlodder, E., Vass, I., and Nixon, P.J. (2014) Investigating the photoprotective role of cytochrome *b*-559 in photosystem II in a mutant with altered ligation of the haem. *Plant Cell Physiol.* 55, 1276–1285.
58. Kaminskaya, O., Shuvalov, V.A. and Renger, G.

- (2007) Evidence for a novel quinone-binding site in the photosystem II (PS II) complex that regulates the redox potential of cytochrome *b*<sub>559</sub>. *Biochemistry* 46, 1091–1105.
59. Kaminskaya, O., Shuvalov, V.A. and Renger, G. (2007) Two reaction pathways for transformation of high potential cytochrome *b*<sub>559</sub> of PS II into the intermediate potential form. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1767, 550–558.
60. Kaminskaya, O.P. and Shuvalov, V.A. (2016) Towards an understanding of redox heterogeneity of the photosystem II cytochrome *b*<sub>559</sub> in the native membrane. *Eur. Biophys. J.* 45, 129–138.
61. Sugimoto, K., Okegawa, Y., Tohri, A., Long, T.A., Covert, S.F., Hisabori, T. and Shikanai, T. (2013) A single amino acid alteration in PGR5 confers resistance to antimycin A in cyclic electron transport around PSI. *Plant Cell Physiol.* 54, 1525–1534.

### Inhibitory effects of Antimycin A on cytochrome *b*<sub>559</sub> within photosystem II

Daisuke Takagi<sup>1,\*</sup>, Kentaro Ifuku<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, <sup>2</sup>Graduate School of Biostudies, Kyoto University

## 研究紹介

葉緑体チラコイド膜のルーメン pH 可視化を目指して<sup>§</sup>

東北大学 生命科学研究所

上妻 馨梨\*

葉緑体チラコイド膜を介して形成されるプロトン勾配はATP合成などの光合成反応に重要である一方、ルーメンの酸性化によるタンパク質の機能低下とも関連する。しかし、インタクトな植物における実際のルーメン pH の値を測定する技術は確立されておらず、ルーメンがどの程度酸性化されるのか不明である。本稿では、反射分光を用いてチラコイド膜ルーメンの pH 環境を可視化する新規測定法を提案する。光依存的に変化する反射分光指数 (PRI) はキサントフィル色素の組成変化を検出していることが生理学的な検証から明らかになった。キサントフィルサイクルはルーメン pH の低下によって誘導されるメカニズムであることから、PRI を用いることでインタクトな葉のチラコイドルーメン環境をモニターできると期待する。

## 1. はじめに

光合成の初期段階では電子伝達反応においてチラコイド膜を介したプロトン勾配が形成される。チラコイド膜ルーメンに蓄積されたプロトンは ATP を合成するための駆動力となるだけでなく、余剰な光エネルギーを熱へと変換する熱放散システムを誘導するためのトリガーにもなる<sup>1)</sup>。一方で、プロトン蓄積によるルーメン pH の低下はチラコイド膜タンパク質の活性低下を引き起こす<sup>2)</sup>。チラコイドルーメンの容量やグラナスタックの層構造、ストロマラメラの大きさは光環境などによって変化することが知られており、プロトン濃度もルーメンで一様でないと考えられている<sup>3)</sup>。しかしながら、インタクトな葉のルーメンにおいて膜タンパク質の機能低下をもたらすような pH の低下が起こっているのを測定する技術は確立しておらず、未だ、プロトン濃度変化が光合成機能にどのように影響を与えているのか不明な点が多い。筆者は、反射分光を用いてインタクトな植物葉のチラコイド膜ルーメン

環境変化を可視化することを目指して研究を行っている。

1990年に Gamon らは光によって変化する反射分光指数 Photochemical Reflectance Index (PRI) を提案した。PRI は、570nm をリファレンスとして 531nm の変化率を表したパラメータであり、

$$PRI = (R_{531} - R_{570}) / (R_{531} + R_{570})$$

で算出される<sup>4)</sup>。PRI は光強度依存的に変化することから、彼らは PRI が non-photochemical quenching (NPQ) を反映して変化するパラメータであると予想した。実際に、PRI は NPQ の大部分を占める熱散逸システムを誘導させるキサントフィルサイクルによる光合成色素の化学変換と強い相関が見出された<sup>5)</sup>。これらの背景より、PRI は光合成の NPQ を表すパラメータと認識されており、生態学の分野において、生態系の光合成である総一次生産 (Gross Primary Production : GPP) をリモートセンシングによって推定するために活用されている<sup>6)</sup>。しかし、光合成の余剰エネルギー散逸機構にはキサントフィルサイクルだけではなく、他にもいくつかのメカニズムが存在している。筆者は熱散逸システムに關与する

<sup>§</sup>第9回日本光合成学会年会 ポスター発表受賞論文

\*連絡先 E-mail: kohzuma@googlemail.com

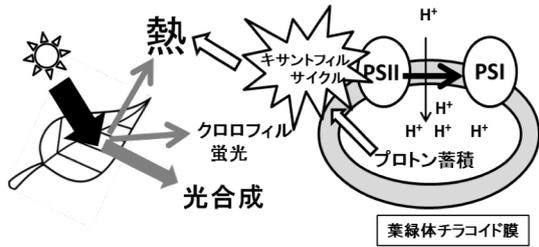


図1. 葉が吸収した光エネルギーは光合成に利用される経路と熱やクロロフィル蛍光で消費される経路に利用される。チラコイド膜ルーメンのpHの低下によって活性化するキサントフィルサイクルは熱散逸を誘導する。

シロイヌナズナの機能欠損変異体を用いて PRI パラメータが何を検出しているのか生理学的な検証を行った。これには2つのねらいがあった。1つは PRI を植物ストレスの指標として活用すること。もう1つは、ルーメン pH の測定に利用することである。光合成生物は常に光エネルギーを受け取るため、光合成反応の下流においてエネルギーがうまく消費できない場合（さまざまな環境ストレス、気孔調節の欠損、アクセプターの欠損など）、上流の ATP 合成が滞り、ルーメンに過剰なプロトンが蓄積する。プロトンの過剰蓄積は光エネルギーを光合成以外に流す熱放散システムを駆動させる。キサントフィルは、暗黒下ではバイオラキササンチン (Vio) が卓越するが、強光などのストレス下ではアンテラキササンチンやゼアキササンチン (Zea) に変換され、PSII が吸収した過剰エネルギーの放散に関わっていると考えられている (図 1)。この化学変化には pH 依存性の高い色素変換酵素 (VDE) が関与しており、ルーメンにおける過剰プロトン蓄積が VDE を活性化させ、キサントフィル色素の構成比を変化させる。このことから、PRI のシグナル変化は、光エネルギーをうまく消費できないストレス状態を表すこと、または、チラコイド膜ルーメンに蓄積されたプロトン量を表すこと、が期待される。PRI は反射分光であるため、カメラでの検出が可能である。筆者は、PRI を検出するためのイメージングシステムを構築し、植物ストレスとチラコイドルーメン pH の可視化を目指してい

る。そのためには、まず PRI が何を検出しているのかを確認する必要がある。

## 2. PRI パラメータの生理学的な検証

生態学の分野において PRI は NPQ に相当するパラメータであるとの認識が強い。しかしながら、NPQ の構成要素にはキサントフィルサイクルだけではなく、PsbS 依存のエネルギークエンチングや光阻害、ステート遷移などが知られている。特に、PsbS の活性化もまたルーメン pH 低下がトリガーとなっていることから、PRI パラメータとの関係性を検証する必要がある。シロイヌナズナの VDE の機能欠損変異体である *npq1* ではゼアキササンチンの蓄積量が低いが、PsbS の欠損変異体である *npq4* のゼアキササンチンへの色素変換能力は野生型と同等であることが知られている (図 2. A-B)。これらの変異体の PRI を野生型と比較した<sup>7)</sup>。PRI は光強度の増加に伴って低下することが知られている。野生型と *npq4* では光依存的に値が低下したのに対し、*npq1* ではその低下がわずかであった (図 2. C)。

NPQ には複数の分子機構が関与しているが、それぞれのコンポーネントは光照射下の定常状

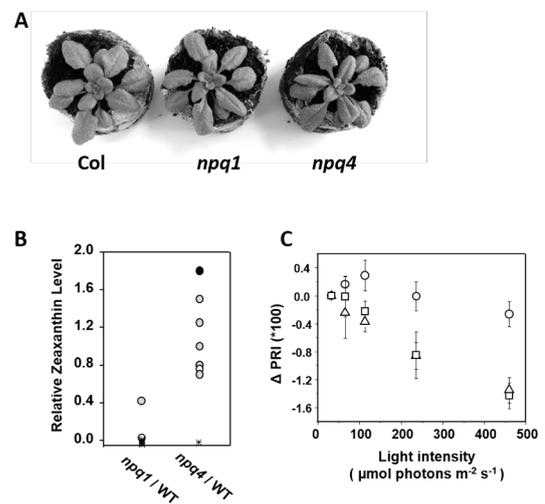


図2. (A) シロイヌナズナの野生型 (Col)、*npq1*、*npq4*。 (B) 過去の研究報告から算出した *npq1*、*npq4* におけるゼアキササンチンの蓄積量の野生型との比較 (Kohzuma and Hikosaka 2018 を改変)<sup>7)</sup>。●はダーク時、○は通常光、○は強光下。※は検出不可であった報告。 (C) 光依存的な PRI の変化。□は野生型 (Col)、○は *npq1*、△は *npq4*。n = 3, mean ± SD。

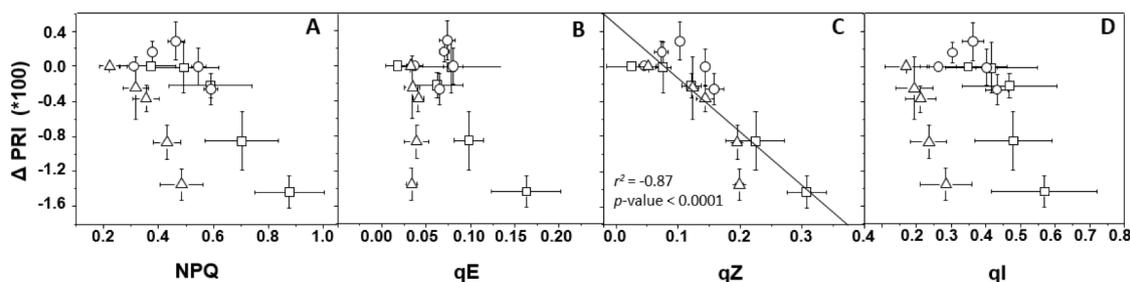


図3. PRI と NPQ コンポーネントの相関 (Kohzuma and Hikosaka 2018 を改変)<sup>7)</sup>。(A) はトータルの NPQ。(B) は暗条件にして 2 分後のクロロフィル蛍光から算出した熱散逸コンポーネント (qE)。(C) は暗条件にして 10 分後のクロロフィル蛍光から算出したキサントフィルサイクル依存の熱散逸コンポーネント (qZ)。(D) は PSII のダメージを反映する光障害コンポーネント (qI)。□は野生型 (Col)、○は *npq1*、△は *npq4*。n = 3, mean ± SD。

態から暗条件にした後のリカバリーの時間変化から分離することができ、クロロフィル蛍光から見積ることができる<sup>8)</sup>。PsbS 依存的なエネルギークエンチング機構 (qE) は数秒～数分以内に、キサントフィルのゼアキササンチンからビオラキササンチンへの変換 (qZ) は 10～15 分程度で暗条件の状態へ戻る。また、光障害 (qI) の修復には 1～2 時間かかることが知られている<sup>9)</sup>。筆者は野生型と 2 つの変異体の反射分光とクロロフィル蛍光を同時測定することで、クロロフィル蛍光解析から見積もる NPQ のそれぞれのコンポーネントと PRI の関係性を明らかにした。PRI とトータルの NPQ、qE、qZ、qI の関係性をプロットした結果、トータルの NPQ、qE、qI と比較して、qZ と PRI と間に極めて高い相関が確認された (図 3)。*npq1* における PRI の光依存性が低いこと、PRI と qZ のみに高い相関があったことから、PRI はキサントフィル色素の構成比を特異的に検出しているパラメータであることが明らかになった。

### 3. 環境ストレスモニタリングツールとしての拡張性

光合成反応過程において、CO<sub>2</sub> 代謝反応の容量を上回る光エネルギーを吸収した場合 (強光・低温・高温・乾燥など)、チラコイド膜ルーメンに高いプロトン勾配が形成される。ルーメン pH の低下がキサントフィルサイクルを誘導し余剰エネルギーの熱への変換が起こる (図 1)。つま

り、PRI を測定することで植物の余剰エネルギーストレス状態を検出できるのではないかと考えた。実際、光合成の電子伝達が滞るようなストレスを植物葉に与えてハイパースペクトルカメラで撮影し PRI を算出すると、ストレス強度に従って PRI *inv* (PRI の逆数) が上昇することが観察されている (図 4) (論文準備中)。PRI から植物の低温や乾燥といった影響をリモートセンシングできるという生態学的知見も報告されていることから<sup>10, 11)</sup>、PRI が植物の環境ストレスを検出するために有効であることが期待される。同時

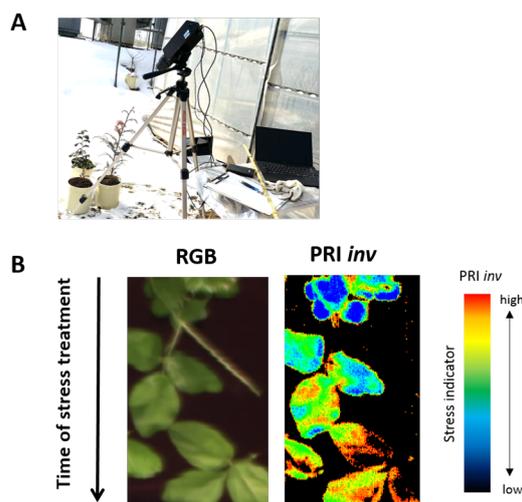


図4。(A) 野外における PRI 撮影の様子。(B) ストレスに曝された植物葉では高い PRI *inv* が観察されている。カラーバーはストレスの強度を表す。黒部分は測定可能領域外を表す。

に、カメラによる可視化が可能であることから農業分野などへの応用も見込まれる。

#### 4. チラコイド膜ルーメンのプロトン環境センシング

PRI はキサントフィル色素の化学変化を検出していることが明らかになったことから、VDE が感知するルーメンの pH 変化を間接的にモニターできるのではないかと考えた。VDE が活性化するような低 pH 環境を人為的に作り出すことでキサントフィル色素の変換を誘導させても PRI は変化するはずである。そこで筆者は pH を調整したバッファー数種類をリーフディスクに減圧処理し、細胞内の pH 環境を置換し PRI を測定した。その結果、低 pH バッファー処理したリーフディスクにおいて PRI の低下が観察された<sup>7)</sup>。このことから、PRI がルーメン pH 変化による VDE の活性化に起因したキサントフィル色素の変換を見ていることが明らかになり、PRI がルーメン pH の指標になる可能性が示唆された(図 5)。チラコイド膜ルーメンの実際の pH をモニターする手法には pH センサーとして蛍光タンパク質をルーメンで発現させるなどの方法が提案されているが<sup>12)</sup>、未だに確立されていない。PRI についてもルーメン pH 測定法として確立するためには更なる検証が必要である。実際、インタクトな葉への pH バッファー処理では細胞内の pH を完全に置換させるのは難しく、単離葉緑体やチラコイド膜などを用いた検証は必須である。ルーメン pH と PRI の関係性の検量線を確立できれば、将来的にインタクトな葉の PRI からルーメン pH の絶対値を予測することが可能になるかもしれない。そしてそれは可視情報として得ることも可能である。インタクト葉におけるルーメン pH が明らかになれば光合成の電子伝達制御、膜ポテンシャル制御など光合成調節の解明に繋がること期待される。

#### 5. おわりに

PRI は、1) 植物の環境ストレスを可視化する、2) ルーメン pH の変化を見る、など拡張性の高い有効なツールとして活用が期待できる。また、530nm 付近の反射光は NASA の人工衛星が搭載

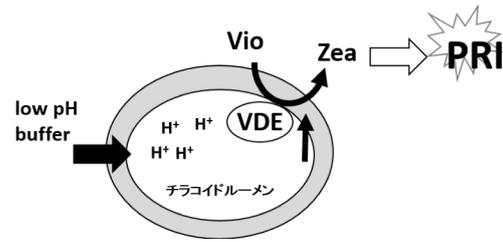


図 5. 低 pH バッファーを取り込ませたリーフディスクでは PRI の変化が見られる。チラコイド膜ルーメンの pH 低下による VDE の活性化に起因すると考えられる。

している光学センサー MODIS の測定可能領域であることから<sup>13)</sup>、農業地域など広大な土地や地球規模での植物ストレス状態をモニターできる可能性を秘めている。このように、PRI は分子レベルから地球レベルの光合成研究に貢献できる新しいツールになると期待する。

#### 謝辞

本稿で紹介した研究は東北大学・生命科学研究所の彦坂幸毅教授の研究室で行われた。測定にあたって協力していただいたソニー イメージングプロダクツ&ソリューションズ (株)の小川哲氏、変異体の種子を分与していただいた京都大学の鹿内利治博士、京都産業大学の桶川友季博士、また、反射分光研究に注目するきっかけを与えてくれた東北大学「生命の起源勉強会」のメンバーにこの場を借りて感謝申し上げたい。そして、執筆にあたりアドバイスして下さった彦坂教授にお礼申し上げる。本研究は日本学術振興会、内藤記念科学振興財団の支援を受けて行われた。

Received June 26, 2018; Accepted July 13, 2018; Published Aug 31, 2018

#### 参考文献

1. Ruban, A.V. (2017) Quantifying the efficiency of photoprotection. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 372, 20160393
2. Kramer, D.M., Sacksteder, C.A., and Cruz, J.A. (1999) How acidic is the lumen? *Photosynth. Res.* 60, 151–163.

3. Kirchhoff, H. (2018) Structure-function relationships in photosynthetic membranes: Challenges and emerging fields. *Plant Sci.* 266, 76–82.
4. Gamon, J.A., Field, C.B., Bilger, W., Bjorkman, O., Fredeen, A.L., and Penuelas, J. (1990) Remote sensing of the xanthophyll cycle and chlorophyll fluorescence in sunflower leaves and canopies. *Oecologia* 85, 1–7.
5. Gamon, J.A., Peñuelas, J., and Field, C.B. (1992) A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency. *Remote Sens. of Environ.* 41, 35–44.
6. Garbulsky, M.F., Peñuelas, J., Papale, D., and Filella, I. (2008) Remote estimation of carbon dioxide uptake of a Mediterranean forest. *Global Change Biology* 14, 2860–2867.
7. Kohzuma, K., and Hikosaka, K. (2018) Physiological validation of photochemical reflectance index (PRI) as a photosynthetic parameter using *Arabidopsis thaliana* mutants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 498, 52–57.
8. Muller, P., Li, X.P., and Niyogi, K.K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125, 1558–1566.
9. Nilkens, M., Kress, E., Lambrev, P., Miloslavina, Y., Müller, M., Holzwarth, A. R., and Jahns, P. (2010) Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in *Arabidopsis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 466–475.
10. Vicca, S., Balzarolo, M., Filella, I., Granier, A., Herbst, M., Knohl, A., Longdoz, B., Mund, M., Nagy, Z., Pintér, K., Rambal, S., Verbesselt, J., Verger, A., Zeileis, A., Zhang, C., and Peñuelas, J. (2016) Remotely-sensed detection of effects of extreme droughts on gross primary production. *Sci Rep.* 6, 28269.
11. Wong, C.Y., and Gamon, J.A. (2015) Three causes of variation in the photochemical reflectance index (PRI) in evergreen conifers. *New Phytol.* 206, 187–195.
12. Yang, H., Pu, X., Wang, L., Liu, L., and Theg, S. M. (2017) A new fluorescence-based method to monitor the pH in the thylakoid lumen using GFP variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 486, 1–5.
13. Middleton, E.M., Huemmrich, K.F., Landis, D.R., Black, T.A., Barr, A.G., and McCaughey, J.H. (2016) Photosynthetic efficiency of northern forest ecosystems using a MODIS-derived Photochemical Reflectance Index (PRI). *Remote Sens. of Environ.* 187, 345–366.

## An Attempt to Visualization of Thylakoid Lumen pH by Photochemical Reflectance Index (PRI)

Kaori Kohzuma \*

Graduate School of Life Science, Tohoku University

解説特集

チラコイド膜超複合体の構造とダイナミクス

Editor: 高橋 裕一郎 (岡山大学・異分野基礎研)  
鹿内 利治 (京都大学・理学研究科)

序文	高橋 裕一郎 (岡山大学・異分野基礎研) 鹿内 利治 (京都大学・理学研究科)	99
解説 NDH-PSI 超複合体の構造とその組み上げ機構	加藤 義宣 (京都大)	100
解説 クライオ電子顕微鏡単粒子解析による光合成超分子複合体の構造解析	宮崎 直幸 他 (大阪大 他)	112

## 解説特集

序文<sup>†</sup>

高橋 裕一郎 (岡山大学・異分野基礎研)

鹿内 利治 (京都大学・理学研究科)

光合成電子伝達を触媒する複合体の構造と機能は分子レベルで解明が進んでおり、光化学系Ⅱの水分解反応については、原子のレベルまで理解が及んでいる。しかしながら、これらの複合体は、一定の形でチラコイド膜内に整然と並んでいるのではなく、複合体間で超複合体を形成し、さらにその相互作用が光環境の変化に応じて変化することが明らかになっている。即ち、チラコイド膜におけるタンパク質複合体の動態は、我々が考えていたよりもダイナミックに変化するようである。また、このような複合体のアセンブリについても、突然変異体を用いた解析や、質量分析技術の向上により、近年、新しい知見が得られている。

こうした状況のもと、2018年5月27日に東北大学の青葉山新キャンパスにおいて開催された第9回日本光合成学会のシンポジウム2「チラコイド膜超複合体の構造とダイナミクス」が開催された。本シンポジウムでは、まず当該分野で活発に研究する3人の若手研究者に話題提供をお願いした。またクライオ電顕については、近年、技術革新によって超複合体の構造解析の分解能が飛躍的に向上しており、その概要を学ぶ機会を設けた。

まず、日本製粉の横野牧生博士から「チラコイド膜のダイナミクスの違いはPSI-PSII超複合体の構造に影響を与えうる」というタイトルで、PSIIの過剰な励起エネルギーをPSIに受け渡して処理する過程について講演をお願いした。続いて、京都大学の加藤義宣博士は、シロイヌナズナにおけるNDH-PSI超複合体の構造についてアセンブリの観点から研究を紹介した。岡山大学のSreedhar Nellaepalli博士は、クラミドモナスにおける、PSIのアセンブリに関して、Ycf3、Ycf4という2つのアセンブリ因子を中心に研究成果を紹介した。最後に、大阪大学の宮崎直幸博士から、光合成に関わる超複合体の構造解析での利用が相次いで報告されているクライオ電顕について、原理から実際の解析にいたるまで解説があり、活発な質疑応答が交わされた。本解説特集では、それらの中から、加藤博士と宮崎博士に解説記事をご寄稿いただいた。

光エネルギーは光合成必須であるが、過剰な光エネルギーの受容は、活性酸素の生成を介して光障害を引き起こす。植物は、この光の効果の二面性に対応するために、進化の過程で様々な戦略を獲得しており、その解明に光合成研究の一つの奥深さが潜んでいるであろう。精巧にできた光合成電子伝達装置が、静的な機械ではなく、ダイナミックに構造を変えたり、複合体間で相互作用をすることでこの困難な課題に対応していることが、本稿を読まれる読者の方々に実感していただければ幸甚である。

最後に、本特集の編集にあたっては、お忙しい中、執筆者、査読者の方々には大変お世話になり、この場を借りてお礼申し上げます。

<sup>‡</sup>解説特集「チラコイド膜超複合体の構造とダイナミクス」

<sup>†</sup>連絡先 E-mail: taka@cc.okayama-u.ac.jp; shikanai@pmg.bot.kyoto-u.ac.jp

## 解説

NDH-PSI 超複合体の構造とその組み上げ機構<sup>‡</sup>

京都大学大学院 理学研究科

加藤 義宣\*

光エネルギーを化学エネルギーに変換する光合成電子伝達反応では、複雑な構造を持つ電子伝達系複合体が中心的な役割を担っている。今世紀に入ってから、電子伝達系複合体がさらに別の複合体と結合して「超複合体」と呼ばれる構造をとるケースがいくつか報告された。超複合体形成は、効率的な電子伝達反応、複合体の安定化などに寄与している。本稿では、我々が解析を行っている NDH-PSI 超複合体に関して、2 種類の複合体を連結させるリンカータンパク質の位置の特定等から明らかになってきた超複合体の構造モデル、そしてチラコイド膜において NDH と PSI が連結する過程を含めたアセンブリモデルを紹介する。

## 1. はじめに

光合成電子伝達反応は、光合成色素が吸収した光エネルギーを用いてカルビン・ベンソン回路に必要な ATP・NADPH を生み出す。この一連の反応では、光化学系 I・II (PSI・PSII) に代表されるいくつかのサブユニットが複雑に組み上がった電子伝達系複合体が中心的な役割を担っている。長い歴史をもつ光合成研究のなかで、それら複合体の機能は事細かに明らかにされており、結晶構造の情報も蓄積している<sup>1-5)</sup>。この偉大な成果は、生化学的手法によって電子伝達系複合体を分離し、それに含まれるサブユニットを同定するという地道な解析の積み重ねから始まったものである<sup>6,7)</sup>。光合成電子伝達系は地球上の生命現象を理解する上でも重要な項目の一つであり、電子伝達系の模式図は多くの基礎的な生物学の教科書にも載せられている。そこでは、各複合体は水から NADP<sup>+</sup>への電子伝達を触媒する一連の単位として独立して描かれてきた。しかし 2000 年代に入ると、それらは必ずしもチラコイド膜において単独で存在しているわけではな

く、時には異なる複合体とさらに結合して「超複合体」構造を取ることが徐々に明らかにされた。以下にいくつかの例を挙げる。

## • PSI-PSII 超複合体

シアノバクテリアやシロイヌナズナにおいて、2つの光化学系が直接連結した PSI-PSII 超複合体が報告された<sup>8,9)</sup>。シアノバクテリアでは集光アンテナであるフィコビリソームも含まれている。これら超複合体では、吸収した光エネルギーの PSI、PSII 間での適切な分配や、過剰に励起された PSII から PSI へエネルギーを移動することで (スピルオーバー)、強光条件下で光化学系の励起バランスを調整する役割を果たすと考えられている<sup>10)</sup>。

• PSI-Cytb<sub>6</sub>f-PGRL1 超複合体

PSI サイクリック電子伝達系に関わる PGRL1 及び PSI とシトクロム (Cyt) b<sub>6</sub>f 複合体が連結した超複合体構造が緑藻クラミドモナスにおいて報告された<sup>11)</sup>。電子伝達系が還元状態になるとこの超複合体が形成され、同時に PSI サイクリック電子伝達を効率的に回すようになることが、無

<sup>‡</sup>解説特集「チラコイド膜超複合体の構造とダイナミクス」

\*連絡先 E-mail: ykato@pmg.bot.kyoto-u.ac.jp

酸素条件や変異体を用いた解析から示されている<sup>12)</sup>。

・葉緑体 NDH-PSI 超複合体

被子植物では、アンチマイシン非感受性 PSI サイクリック電子伝達系に関わる葉緑体 NDH 複合体<sup>13)</sup>と PSI-LHCI が結合した NDH-PSI 超複合体が存在する<sup>14)</sup>。PSI-LHCI との結合によって、強光条件での葉緑体 NDH 複合体の安定性を高める意義がある<sup>15)</sup>。

・呼吸鎖超複合体 (Respirasome 等)

ミトコンドリア電子伝達系でも超複合体形成がみられる。特に、Complex I・Complex III・Complex IV が連結した Respirasome と呼ばれる非常に巨大な超複合体構造が存在している<sup>16)</sup>。この超複合体の中で NADH から水までの一連の電子伝達反応 (NADH → Complex I → ユビキノン → Complex III → Cyt c → Complex IV → 水) を完結させることができると考えられている。そのため電子伝達体 (ユビキノンや Cyt c) を各複合体間で高速でやり取りし、電子伝達反応の効率化に寄与している (substrate channeling) と考えられている一方<sup>17)</sup>、この説に否定的なデータも報告されており<sup>18,19)</sup>、呼吸鎖超複合体形成の生理的な意義の詳細は議論が続いている。いずれにせよ、呼吸鎖超複合体を形成できない変異体ではミトコンドリアの機能が低下することから、超複合体形成はミトコンドリアにおいても重要な役割を果たしていることは間違いない<sup>20)</sup>。

以上のように、超複合体形成は光合成・呼吸のどちらの電子伝達系でもみられる普遍的な現象である。本稿では、これまで我々が解析を行ってきた葉緑体 NDH-PSI 超複合体において、独立な複合体を結合させるための構造、そしてそれがどのようにチラコイド膜において組み上げられるのかについて解説する。

2. 葉緑体 NDH 複合体の構造について

本題に入る前に、葉緑体 NDH 複合体、及び NDH-PSI 超複合体を構成するサブユニットやリ

ンカータンパク質について簡単に説明する。被子植物の NDH 複合体では、これまでに 29 のサブユニットが報告されている。それらサブユニット群は、遺伝学的・生化学的解析に基づき 5 つのサブ複合体にグループ分けされている<sup>21)</sup> (SubA、SubB、SubE、SubL、SubM : 図 1)。葉緑体 NDH 複合体は、呼吸鎖 NDH 複合体 (Complex I) と起源を共にする複合体であり、キノン還元部位やプロトンポンプなどの複合体のコアを成すサブユニットは保存されている<sup>22)</sup> (SubA 及び SubM)。しかし、呼吸鎖 NDH 複合体における電子供与体 NADH を酸化する部位に相当するサブユニット群 (N モジュール) を有しておらず、代わりにフェレドキシン結合部位を形成する NdhS (CRR31) を含む部位を獲得している<sup>23)</sup> (SubE)。アミノ酸配列は類似していないものの、NdhS の *in silico* における立体構造予測では、PSI のフェレドキシン結合サブユニットである PsaE とよく似た構造をとることが予測されている<sup>23,24)</sup>。この NdhS サブユニットが同定されたことで、葉緑体 NDH 複合体は NAD(P)H ではなくフェレドキシンから電子を受け取りプラストキノンへと受け渡すことで、PSI サイクリック電子伝達を触媒していることが明らかとなった。SubB、SubL は呼吸鎖 NDH 複合体には存在せず、葉緑体 NDH 複合体に特徴的なサブユニット群を含む<sup>21)</sup>。

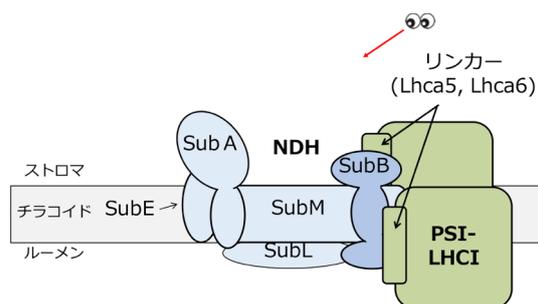


図 1. 被子植物の葉緑体 NDH 複合体は、5 つのサブ複合体 (SubA、SubB、SubE、SubL、SubM) から構成される。リンカータンパク質 Lhca5、Lhca6 を介して 2 コピーの PSI-LHCI が結合し、NDH-PSI 超複合体を形成する。赤矢印で示した目線は、図 2 で示した NDH-PSI 超複合体の pseudo atomic モデルのトレース図における視点を示している。

被子植物の NDH 複合体は、リンカータンパク質 Lhca5、Lhca6 を介してそれぞれ 1 コピーの PSI-LHCI と結合し、NDH-PSI 超複合体を形成する<sup>25)</sup>。「Lhca」という名前が示すとおり、リンカータンパク質は PSI アンテナタンパク質である LHCI ファミリーに属している。特に Lhca6 の分子進化については詳細なメカニズムが明らかにされた<sup>26)</sup>。Lhca6 は Lhca2 に由来し、ストロマ側に突出したループ領域 (ストロマループ、CA ループ) に起きた変異がリンカーとしての機能獲得に重要であると示されている。実際に Lhca2 のストロマループ領域のみを Lhca6 の配列に置換した改変型 Lhca2 は、リンカーとしての機能を果たすようになる。NDH 複合体は PSI-LHCI と超複合体構造を形成することによって、自身の安定性を高める<sup>15)</sup>。特に Lhca6 を介した PSI-LHCI との結合が NDH 複合体の安定性に寄与している。Lhca6 を欠損した変異体では、葉齢が古い葉において NDH 複合体蓄積量の低下が見られる<sup>25)</sup>。Lhca5、Lhca6 の両方を欠損した二重変異体では NDH 複合体は単独で存在するが、この状態ではさらに蓄積量が減少し、強光照射でも不安定化が起きてしまう<sup>15)</sup>。PSI-LHCI との超複合体形成は、充分な量の NDH 複合体を維持するために必須で

ある。シロイヌナズナでは、ほぼ全ての NDH 複合体が PSI-LHCI と超複合体を形成している。またチラコイド膜における NDH 複合体そのものの存在量は、PSI-LHCI の 1~5%程度である。

NDH 複合体もしくは NDH-PSI 超複合体の結晶構造は解かれていないものの、オオムギにおいて電子顕微鏡を使用した単粒子解析像が 2014 年に報告された<sup>27)</sup>。この像では、NDH 複合体を 2 コピーの PSI-LHCI が挟み込む形で超複合体を形成していることが明らかになった。また既に明らかにされている PSI-LHCI、バクテリア呼吸鎖 NDH 複合体の構造に基づいて、ある程度のサブユニットが単粒子解析像に当てはめられた。NDH 複合体は LHCI 複合体を介して PSI と結合しており、これはリンカータンパク質 (Lhca5、Lhca6) が LHCI ファミリーに属している事実とよく一致している。一方で、電子顕微鏡解析では、Lhca5、Lhca6 がそれぞれどちらの PSI-LHCI を NDH 複合体に結合させているのか、また Lhca5、Lhca6 が LHCI 複合体のどこに存在しているのかまでは明らかにされていなかった。また単粒子解析像には、由来が特定できない不明な電子密度が存在していた。我々はリンカータンパク質を欠損した変異体における生化学的解析を実行し、得られた結果と単粒子解析像を突き合わせ、リンカータンパク質の位置を特定することで、NDH-PSI 超複合体構造のより詳細なモデルを提唱した<sup>28)</sup>。本稿の前半ではその解析について述べる。後半では、NDH と PSI、異なる 2 つの複合体同士の結合がチラコイド膜においてどのように形成されるのか、そのアセンブリ過程の解析<sup>29)</sup>について報告する。

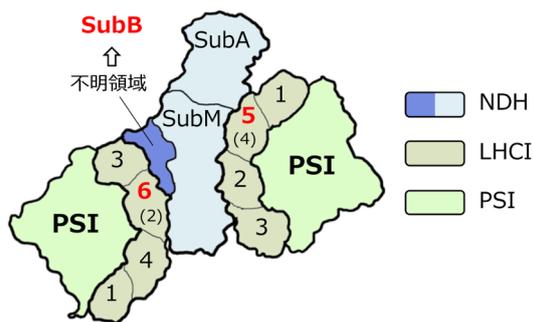


図 2. 文献 28 からトレースした。ストロマ側から NDH-PSI 超複合体を捉えた格好 (図 1、赤矢印) となっている。それぞれの複合体を色分けして示した。LHCI 複合体では、「Lhca」を省略しており番号のみを表記した。括弧内の数字は通常の PSI-LHCI において組み込まれる LHCI サブユニットを示している。我々の解析によって場所が特定された構成要素を赤字で示した。文献 26 より改変。

### 3. NDH-PSI 超複合体構造の生化学的解析

2017 年に再び NDH-PSI 超複合体構造の電子顕微鏡による単粒子解析の結果が報告された<sup>30)</sup>。この論文では、NDH 複合体の両側に PSI-LHCI が 1 コピーずつ結合した構造の他に、NDH 複合体の片側のみに複数の PSI-LHCI がさらに結合した構造が捉えられた。その結果、図 2 における NDH 複合体 (ストロマ側から見下ろし、SubA を上においた状態) の左側には最大 5 コピーの

PSI-LHCI が結合し得ることが示された。我々は、この特性を利用して左右の PSI-LHCI が Lhca5、Lhca6 のどちらの結合によるものか決定できるのではないかと考えた。

### 3.1. Lhca5、Lhca6 によって結合する PSI-LHCI の特定

まず初めに、NDH 複合体に複数の PSI-LHCI が結合した巨大な超複合体構造を生化学的に分離する条件の検討を行った。Blue Native-PAGE (BN-PAGE) は、光合成電子伝達系複合体の分離において汎用される手法の一つである。従来の BN ゲルを用いて電気泳動を行うと、NDH 複合体に 2 コピーの PSI-LHCI が結合した構造がゲルの最上部に分離されるが、それ以上の分子サイズを持つ複合体の分離するには限界があった。そこで、Järvi らによって報告された large pore BN-PAGE (lpBN-PAGE) <sup>31)</sup> を導入した。lpBN-PAGE では巨大複合体の分離を改善するために、分離に用いるアクリルアミドゲルの組成と濃度が工夫されている。lpBN-PAGE では、濃縮ゲルが 3%、分離ゲルが 3.5 - 12% の濃度勾配ゲルを使用し、高分子領域のアクリルアミド濃度が低く抑えられている。さらにとりわけ重要な変更点、濃縮ゲルの架橋剤 (N,N'-メチレンビスアク

リルアミド) の濃度である。普段の電気泳動 (SDS-PAGE、Tris-Tricine SDS-PAGE、BN-PAGE 等) では、トータルのアクリルアミド濃度 (アクリルアミドモノマー + N,N'-メチレンビスアクリルアミド) に対して 3~5% 前後の N,N'-メチレンビスアクリルアミドが混合されたゲルが用いられることが多いが、lpBN-PAGE の濃縮ゲルでは N,N'-メチレンビスアクリルアミドの濃度が 20% まで引き上げられている。このことによって、濃縮ゲルの網目構造が非常に大きく広がり <sup>32)</sup>、従来の BN-PAGE では濃縮ゲルでトラップされてしまっていた超複合体構造を、分離ゲルまで泳動することが可能になっている。実際に lpBN-PAGE の濃縮ゲルは、わらび餅程度のゲル強度しかなく、トロトロしたゲルからコームを抜く際は特に慎重に操作する必要がある。lpBN-PAGE はアクリルアミドゲルの濃度・組成のみが変更されており、可溶化、泳動などは従来の BN-PAGE の条件をそのまま適用できる。

この lpBN ゲルを用いて野生株のチラコイド膜サンプルを用いて電気泳動を行うと、高分子領域の分離が格段に改善される。さらに、これまで分離されていた NDH 複合体の両側にそれぞれ 1 コピーずつ結合した超複合体のバンド (図 3d) よりもさらに上部に複数のバンドが分離された (図

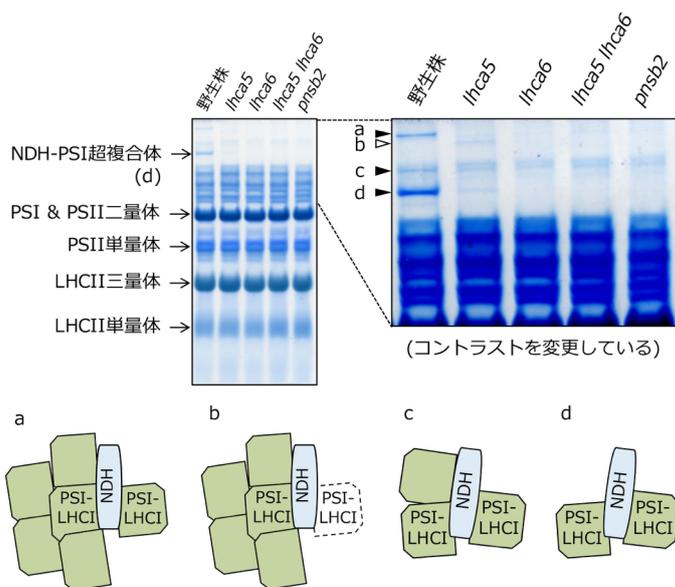


図 3. 野生株、*lhca5* 変異体、*lhca6* 変異体、*lhca5 lhca6* 二重変異体、*pnsb2* 変異体のチラコイド膜タンパク質を用いて、lpBN-PAGE により光合成電子伝達系複合体を分離した。左の写真は CBB 染色後の lpBN ゲルの全体像を示している。左側に電子伝達系複合体を表記した。右の写真ではゲル上部 (高分子領域) を拡大し、コントラストを上げている。黒い矢尻は野生株、白い矢尻は *lhca5* 変異体で分離された NDH 複合体由来のバンドをそれぞれ示しており、a-d の記号を各バンドに割り当てた。それらバンドに由来する超複合体のモデル図を泳動写真の下に示した。文献 26 より改変。

3a, c)。この分離されたバンドのなかに NDH 複合体由来のものがあるか確認するために、NDH 複合体のサブユニットを欠損する *pnsb2* 変異体から得たチラコイド膜サンプルと野生株サンプルの泳動パターンを比較すると、*pnsb2* において消失するバンドが確認された (図 3)。このことから、IpBN-PAGE によって分離される超複体のなかには、NDH 複合体を含むものが存在することが示唆された。

新たに分離された NDH 複合体を含む超複体構造を、リンカーを欠失した変異体 *lhca5* もしくは *lhca6* から得たチラコイド膜サンプルにおいて分離した (図 3)。*lhca6* 変異体では、従来のバンドを含む NDH 複合体由来のバンドが全て消失した。これに対して、*lhca5* 変異体では最上部の NDH 複合体由来のバンドが低分子側にシフトする現象が見られた (図 3b)。このことから、最上部のバンドは NDH 複合体の左側に PSI-LHCI が 5 コピー結合した構造を取っており、*lhca5* 変異体ではその反対側の PSI-LHCI が 1 コピーのみ外れるためバンドシフトが、*lhca6* 変異体では左側の PSI-LHCI が全て外れるためにバンドの消失が起きたものと考えられる。すなわち左側の PSI-LHCI の結合は *Lhca6* によって、右側の

PSI-LHCI の結合は *Lhca5* によって行われていると推察される。*lhca5* 変異体では二番目のバンド (図 3c) は消失したものの、NDH 複合体に PSI-LHCI が計 2 コピー結合した超複体が分離される領域に薄いバンドが認められた (図 3d)。この薄いバンドは野生株の図 3c の超複体から、PSI-LHCI が 1 コピー脱落し、下にシフトしたものと考えられる。なお、*Lhca6* 側の結合において PSI-LHCI が複数コピー結合する意義については不明であり、可溶化の際に凝集している可能性も否定できない。

### 3.2. LHCI 複合体における *Lhca5*、*Lhca6* の位置の特定

*Lhca5*、*Lhca6* が図 2 のどちらの PSI-LHCI を結合させているのか明らかになったが、*Lhca5*、*Lhca6* が NDH-PSI 超複体の中でどの位置にいるのかは定まっていなかった。そこで、二次元 IpBN/SDS-PAGE 及びウェスタンブロッティングによって NDH-PSI 超複体に含まれる LHCI 複合体の構成成分を野生株、変異体において調べた (図 4)。野生株では、図 3 で分離された 3 つの NDH-PSI 超複体のバンドと一致して、二次元展開では *NdhL* (NDH サブユニット) がスポット

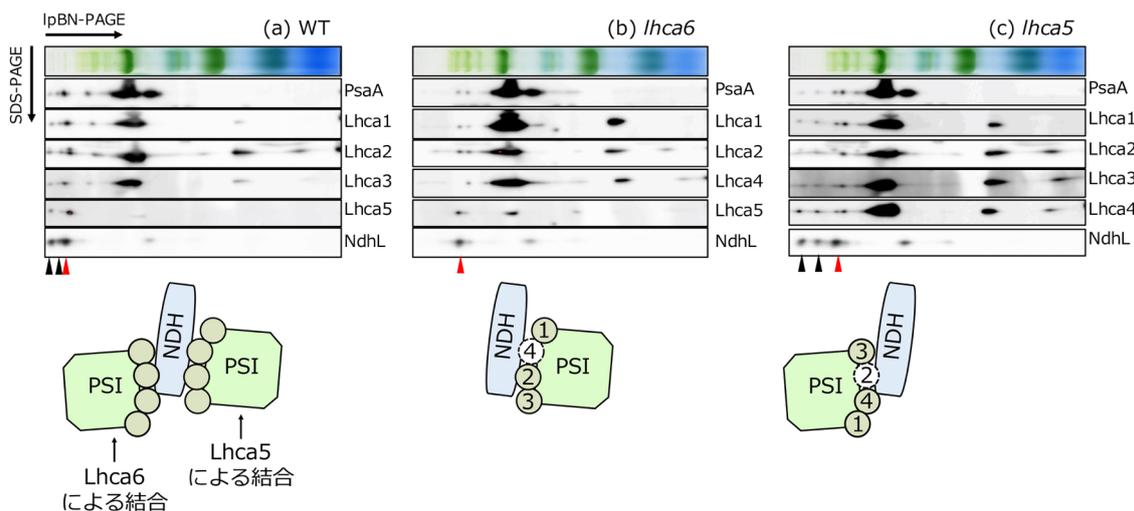


図 4. (a) 野生株、(b) *lhca5* 変異体、(c) *lhca6* 変異体のチラコイド膜タンパク質を用いて、二次元 IpBN/SDS-PAGE 及びウェスタンブロッティングを行った。検出したタンパク質を各レーンの右側に表記した。NDH-PSI 超複体由来のスポットを黒矢尻、赤矢尻で示した。それぞれの株において赤矢尻で示した NDH-PSI 超複体の模式図を下に描いた。緑色の丸は LHCI サブユニットを示しており、「Lhca」表記を省略し番号のみ示している。当該超複体から検出されなかった LHCI サブユニットを破線白抜き丸で示した。文献 26 より改変。

として検出された(図 4a、黒矢尻と赤矢尻)。Lhca6 変異体では、NDH 複合体と Lhca5 を介した PSI-LHCI の結合のみが起こる(図 4b、赤矢尻)。この超複合体からは NdhL、PsaA、Lhca1、Lhca2、Lhca5 のシグナルがスポットとして検出された。その一方で Lhca4 のシグナルはこの位置から検出されなかった。この結果は、Lhca5 は Lhca4 と入れ替わって LHCI 複合体の中に取り込まれていることを示唆する。

続いて、Lhca6 は LHCI 複合体においてどの位置に存在しているのだろうか。これに迫るために Lhca5 変異体における lpBN/SDS-PAGE・ウェスタンブロットティングによる解析を行った。Lhca5 変異体では、NDH 複合体と Lhca6 のみを介した PSI-LHCI の相互作用が起きている。上述のように、lpBN-PAGE では Lhca6 側において PSI-LHCI が複数コピー凝集した構造が検出されるが(図 4c、黒矢尻)、ここでは NDH 複合体と 1 コピーの PSI-LHCI が結合した構造のスポットについてのみ触れる(図 4c、赤矢尻)。この位置からは、NdhL、PsaA、Lhca1、Lhca3、Lhca4 のシグナルがスポットとして検出された。一方で、Lhca2 のシグナルはフリーの PSI-LHCI などでは検出されるのに対し、NDH 複合体と Lhca6 を介して 1 つの PSI-LHCI が結合した超複合体からは検出されなかった。この結果より、Lhca6 は Lhca2 と入れ替わって LHCI 複合体に取り込まれていると示唆された。このことは、Lhca6 が Lhca2 から派生してリンカーとしての機能を獲得した分子進化的な経緯と非常によく合致している。

以上で得られた知見を単粒子解析像から構築された pseudo atomic モデル<sup>30)</sup>に当てはめ、NDH-PSI 超複合体の構造モデルを提唱した(図 2)。

#### 4. NDH-PSI 超複合体のアセンブリ過程の解析

続いて、NDH と PSI、2 つの独立した複合体同士がどのような過程で組み上げられているのか、

超複合体アセンブリに関する解析を紹介したい。超複合体アセンブリを解析する上で手がかりとなったのは、CHLORORESPIRATORY REDUCTION 3 (CRR3) というタンパク質であった。CRR3 は NDH 活性を欠損した変異体スクリーニングにより同定された NDH 複合体関連の因子であるが<sup>33)</sup>、タンパク質としての機能は明らかにされていなかった。我々は当初、CRR3 の機能を明らかにする目的で研究を開始し、CRR3 は NDH 複合体の SubB アセンブリ因子であることを見出した。さらに CRR3 の解析を通じて、Lhca6 を介した超複合体形成が、SubB を組み上げる段階において既に開始されていることがみえてきた。

#### 4.1 CRR3 を含むタンパク質複合体の分離

当初、CRR3 が NDH 複合体のサブユニットである可能性を想定していたので、シヨ糖密度勾配超遠心法(SDG)によってシロイヌナズナ野生株のチラコイド膜タンパク質複合体を分離し検証した。超遠心後のシヨ糖溶液を分画して、それらを SDS-PAGE、ウェスタンブロットティングに供し、CRR3 を検出した(図 5a)。NDH-PSI 超複合体はシヨ糖濃度の高い領域に分離される。CRR3 は NDH-PSI 超複合体の画分からは検出されなかった。このことから、CRR3 は NDH 複合体を構成するサブユニットではないことが示唆された。また、CRR3 はシヨ糖密度勾配超遠心において 3 つのピークとして検出されており、CRR3 は NDH-PSI 超複合体よりも分子サイズの小さな何らかのタンパク質複合体を形成していた。二次元 BN/SDS-PAGE では CRR3 は複合体から解離してしまい、ほとんどが遊離タンパク質として検出された。電気泳動の際に負電荷を付加させるクマシーブリリアントブルー-G-250、もしくは電気泳動そのものの影響を受けて、タンパク質によっては複合体から外れてしまうケースがあり<sup>34)</sup>、CRR3 はそれに該当すると考えられる。

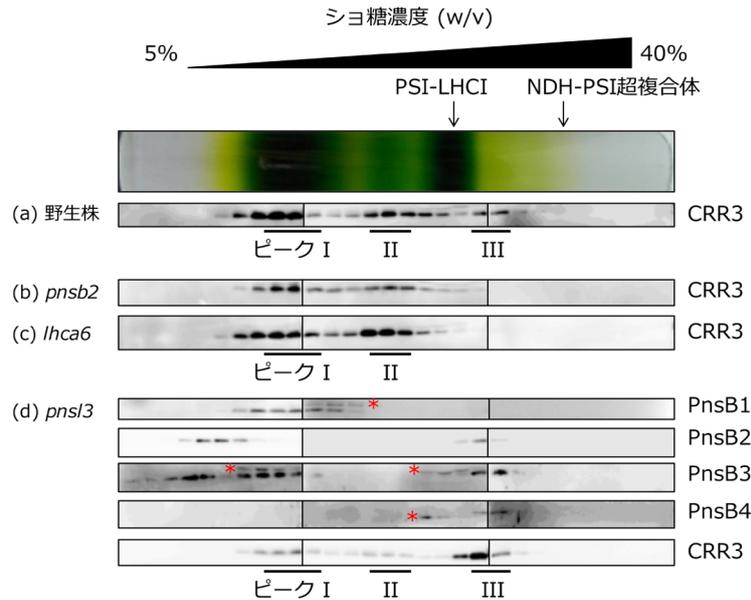


図 5. (a) 野生株、(b) *pnsb2* 変異体、(c) *lhca6* 変異体、(d) *pnsl3* 変異体のチラコイド膜タンパク質複合体をシヨ糖密度勾配超遠心法によって分離し、回収した画分を SDS-PAGE 及びウェスタンブロットティングによって解析した。検出したタンパク質を各レーンの右側に表記した。野生株サンプルの超遠心チューブの写真を上部に示した。黒矢印は NDH-PSI 超複合体、単独の PSI-LHCI をそれぞれ示す。アスタリスクは非特異的のシグナルを表している。文献 27 より改変。

この CRR3 複合体を構成する因子を絞り込むために、様々な NDH サブユニット欠損変異体背景において CRR3 複合体を分離、検出を行ったところ、SubB サブユニットを欠損した変異体 (*pnsb2*) において、ピーク III の消失がみられた (図 5b)。CRR3 は、ピーク III において SubB サブユニットと何らかの複合体を形成していると考えられた。そこで、全ての SubB サブユニット欠損変異体背景において CRR3 複合体を検出したところ、幾つかの変異体では *pnsb2* 変異体と同様にピーク III 複合体の消失が確認された。その一方で、PnsL3 サブユニットを欠損した変異体背景ではピーク III 複合体の消失は起こらず、ピーク III 複合体が多く蓄積するという逆の現象が起きていた (図 5d)。野生株では、CRR3 は主にピーク I、II に分布している。この *pnsl3* 変異体において、シヨ糖密度勾配における SubB サブユニットの分布を調べたところ、ピーク III の位置から PnsB2 – PnsB4 サブユニットのピークが検出された (図 5d)。これらの結果より、ピーク III 複合体には CRR3 と共に一部の SubB サブユ

ニットが含まれていることが示唆された (図 6 ii)。上述のように、ピーク III 複合体は NDH-PSI 超複合体よりも分子サイズが小さい。以上からピーク III 複合体は SubB が組み上がる途中のアセンブリ中間体であり、CRR3 は SubB アセンブリ因子であると結論した。

#### 4.2 ピーク III 複合体はリンカー Lhca6 を含む

ここでピーク III 複合体の分子サイズに注目したい。ピーク III 複合体は NDH-PSI 超複合体よりは小さいものの、単独の PSI-LHCI よりも重い画分に分離され、NDH アセンブリ中間体としてはかなりの分子サイズを有している。この点より、ピーク III 複合体に PSI-LHCI が含まれている可能性を考えた。この仮説を確かめるため、NDH と PSI をつなぐリンカータンパク質の欠損変異体背景において CRR3 複合体を分離・検出したところ、Lhca6 欠損変異体においてピーク III 複合体の消失が起きていた。よって、ピーク III 複合体 (SubB アセンブリ中間体) には既にリンカータンパク質 Lhca6 が結合していることが示唆さ

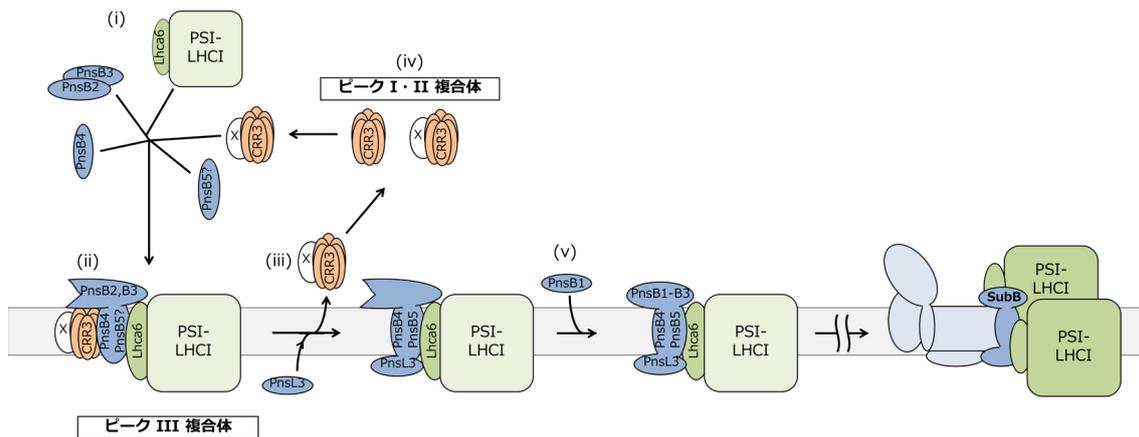


図 6. SubB アセンブリモデル

CRR3 が PnsB2 – PnsB5、Lhca6 とともにピーク III 複合体を形成する(i, ii)。ピーク III 複合体の分子サイズを考慮すると、Lhca6 と PSI-LHCI は結合していると予想される (ii)。CRR3 は PnsL3 が組み込まれるとアセンブリ中間体から解離する (iii)。CRR3 はホモオリゴマーとして働いており、ピーク I 複合体は CRR3 ホモオリゴマー、ピーク II 複合体は CRR3 ホモオリゴマーと未知の因子 (X) が結合したものと考えている (iv)。最後に PnsB1 の組み込みが行われ、SubB のアセンブリが完了する (v)。文献 27 より改変。

れた。NDH と PSI の結合、すなわち超複合体形成プロセスは NDH 複合体の完成を待たずして、SubB を組み上げる途中から既に開始されている。残念ながらピーク III 複合体に PSI が結合しているという直接的な実験的根拠は得られなかったものの、ピーク III 複合体の分子サイズは上述のように PSI-LHCI よりも大きく、フルサイズの PSI-LHCI がピーク III 複合体に含まれていると我々は考えている。

#### 4.3 SubB アセンブリモデル

以上の解析を通じて得られた結果をもとに、SubB アセンブリモデルを提唱した (図 6 i, ii)。CRR3 は PnsB2 – PnsB4 サブユニットとピーク III 複合体 (アセンブリ中間体) を形成する。非特異的なシグナルとの識別が困難であったため、SDG フラクシオンにおける PnsB5 サブユニットの分布を解析することができなかったが、PnsB5 も CRR3 とともにアセンブリ中間体を形成していると考えている。このアセンブリ中間体にはリンカータンパク質 Lhca6 も既に組み込まれており、少なくとも NDH 複合体が完成する前から Lhca6 を介した PSI-LHCI との超複合体形成プロセスが開始されている。

*pns13* 変異体の SDG フラクシオンでは PnsB2 – PnsB4 が同一のピークを示していることから、PnsL3 が不在の状態でもこれらのサブユニットの組み上げは可能である。また、CRR3 は PnsL3 が組み込まれた後、アセンブリ中間体から離れる因子であると考えている (図 6 iii)。PnsL3 が不在の状態では、CRR3 がアセンブリ中間体から離れるステップが起こらないために、CRR3 がピーク III 複合体として異常蓄積すると考えられる。ここではデータを示さないが、SubB アセンブリの過程で PnsB1 サブユニットが最後に組み込まれ、SubB が完成することを我々は見出している (図 6 v)。

CRR3 はピーク I、II 複合体も形成していた。これらの構成因子の特定には至っていないが、我々はピーク III 複合体において CRR3 がホモオリゴマーを形成している可能性を見出しており (図 6 ii)、ピーク I 複合体は CRR3 のホモオリゴマーではないかと考えている (図 6 iv)。また、ピーク II 複合体には CRR3 のホモオリゴマーの他、未知のアセンブリ因子が含まれている可能性がある (図 6 iv)。

NDH 複合体のアセンブリにおいて、SubB が先行して Lhca6 と結合するというアセンブリモデルは同時に、Lhca6 の結合部位が SubB であると

いうことを示唆する。この点から、図 2 の NDH-PSI 超複合体の単粒子解析像において不明領域となっていた場所に SubB を当てはめることができた。SubB に隣接する PSI-LHCI のサブユニット構造に着目すると、Lhca2 の代わりに Lhca6 が組み込まれている(図 2)。Lhca2 と Lhca3 はヘテロダイマーを形成することでお互いを安定化する<sup>35)</sup>。Lhca6 + Lhca3 という PSI 側にとってはイレギュラーである構造を、SubB を含めて先行して組み上げ安定化させることで、効率よく NDH-PSI 超複合体形成を行う意義があると我々は考えている。加えてコケ植物では Lhca6 は獲得されていないことから<sup>36)</sup>、Lhca6 周辺の構造は比較的新しいと言える。この新規構造から先に組み上げるといふ知見は、NDH 複合体の組み上げ過程も Lhca6 の獲得にあたり柔軟に変更されていることを示唆している。

## 5. おわりに

本稿では、NDH-PSI 超複合体の構造、そしてそのアセンブリ過程に関するモデルを紹介した。NDH-PSI 超複合体では、環境や条件による複合体の解離、結合などは報告されていないが、他の超複合体では生体内、外の条件によってダイナミックに複合体間の相互作用を変化させる例もある。そういった現象の仕組みを理解する上で、超複合体構造や複合体同士の連結過程に関する知見は必須である。また、NDH 複合体は他の電子伝達系複合体と比較して、チラコイド膜における存在量が少ない。超複合体形成や NDH 複合体そのもののアセンブリ過程の理解が進むことで、将来的に NDH 複合体やその他の光合成複合体の蓄積量の人為的な改変が可能になることを期待する。

## 謝辞

Lhca5、Lhca6 の結合部位の特定に関わる解析は、大谷卓人博士と共同で解析を行いました。鹿内利治教授には研究面、そして本稿作成において多くのご助言を頂きました。伊福健太郎博士(京都大学)、遠藤剛博士(京都大学)には、NDH

関連の変異体、抗体を数多く分与していただきました。この場をお借りして感謝申し上げます。本研究は、日本学術振興会、特別研究員奨励費(17J09745)によって行われました。

Received July 13, 2018; Accepted Aug 3, 2018; Published Aug 31, 2018.

## 参考文献

1. Kurisu, G., Zhang, H., Smith, J. L. & Cramer, W. A. (2003) Structure of the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex of oxygenic photosynthesis: Tuning the cavity. *Science* 302, 1009–1014.
2. Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J. & Picot, D. (2003) An atypical haem in the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex. *Nature* 426, 413–418.
3. Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J. R. & Kamiya, N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* 473, 55–60.
4. Qin, X., Suga, M., Kuang, T. & Shen, J.-R. (2015) Structural basis for energy transfer pathways in the plant PSI-LHCI supercomplex. *Science* 348, 989–995.
5. Mazor, Y., Borovikova, A., Caspy, I. & Nelson, N. (2017) Structure of the plant photosystem I supercomplex at 2.6 Å resolution. *Nat. Plants* 3, 17014.
6. Satoh, K. (1985) Protein-pigments and photosystem II reaction center. *Photochem. Photobiol.* 42, 845–853.
7. Ikeuchi, M., Hirano, A., Hiyama, T. & Inoue, Y. (1990) Polypeptide composition of higher plant photosystem-I complex - Identification of *psaI*, *psaJ* and *psaK* gene products. *FEBS Lett.* 263, 274–278.
8. Liu, H. *et al.* (2013) Phycobilisomes supply excitations to both photosystems in a megacomplex in cyanobacteria. *Science* 342, 1104–1108.
9. Yokono, M., Takabayashi, A., Akimoto, S. & Tanaka, A. (2015) A megacomplex composed of both photosystem reaction centres in higher plants. *Nat. Commun.* 6, 1–6.
10. Yokono, M. *et al.* (2018) 緑色植物の PSI-PSII 超複合体. 光合成研究 28, 15–19.

11. Iwai, M. *et al.* (2010) Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis. *Nature* 464, 1210–1213.
12. Takahashi, H., Clouez, S., Wollman, F. A., Vallon, O. & Rappaport, F. (2013) Cyclic electron flow is redox-controlled but independent of state transition. *Nat. Commun.* 4, 1954.
13. Munekage, Y. *et al.* (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* 429, 579–582.
14. Peng, L., Shimizu, H. & Shikanai, T. (2008) The chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex interacts with photosystem I in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 283, 34873–34879.
15. Peng, L. & Shikanai, T. (2011) Supercomplex formation with photosystem I is required for the stabilization of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 155, 1629–1639.
16. Dudkina, N. V., Kudryashev, M., Stahlberg, H. & Boekema, E. J. (2011) Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 15196–15200.
17. Lapuente-brun, E. *et al.* (2013) Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 340, 1567–1570.
18. Blaza, J. N., Serreli, R., Jones, A. J. Y., Mohammed, K. & Hirst, J. (2014) Kinetic evidence against partitioning of the ubiquinone pool and the catalytic relevance of respiratory-chain supercomplexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 15735–15740.
19. Fedor, J. G. & Hirst, J. (2018) Mitochondrial supercomplexes do not enhance catalysis by quinone channeling. *Cell Metab.* 28, 1–7.
20. Ikeda, K., Shiba, S., Horie-Inoue, K., Shimokata, K. & Inoue, S. (2013) A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nat. Commun.* 4, 2147.
21. Ifuku, K., Endo, T., Shikanai, T. & Aro, E.-M. (2011) Structure of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex: Nomenclature for nuclear-encoded subunits. *Plant Cell Physiol.* 52, 1560–1568.
22. Peltier, G., Aro, E.-M. & Shikanai, T. (2016) NDH-1 and NDH-2 plastoquinone reductases in oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 6.1–6.26.
23. Yamamoto, H., Peng, L., Fukao, Y. & Shikanai, T. (2011) An src homology 3 domain-like fold protein forms a ferredoxin binding site for the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 1480–1493.
24. Yamamoto, H. & Shikanai, T. (2013) In planta mutagenesis of src homology 3 domain-like fold of NdhS, a ferredoxin-binding subunit of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 288, 36328–36337.
25. Peng, L., Fukao, Y., Fujiwara, M., Takami, T. & Shikanai, T. (2009) Efficient operation of NAD(P)H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCI in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 3623–3640.
26. Otani, T., Yamamoto, H. & Shikanai, T. (2017) Stromal loop of Lhca6 is responsible for the linker function required for the NDH-PSI supercomplex formation. *Plant Cell Physiol.* 58, 851–861.
27. Kouřil, R. *et al.* (2014) Structural characterization of a plant photosystem I and NAD(P)H dehydrogenase supercomplex. *Plant J.* 77, 568–576.
28. Otani, T., Kato, Y. & Shikanai, T. (2018) Specific substitutions of light-harvesting complex I proteins associated with photosystem I are required for supercomplex formation with chloroplast NADH dehydrogenase-like complex. *Plant J.* 94, 122–130.
29. Kato, Y., Sugimoto, K. & Shikanai, T. (2018) NDH-PSI supercomplex assembly precedes full assembly of the NDH complex in chloroplast. *Plant Physiol.* 176, 1728–1738.
30. Yadav, K. N. S. *et al.* (2017) Supercomplexes of plant photosystem I with cytochrome b6f, light-harvesting complex II and NDH. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1858, 12–20.
31. Järvi, S., Suorsa, M., Paakkarinen, V. & Aro, E.-M. (2011) Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super- and mega-complexes. *Biochem. J.* 439, 207–214.
32. Strecker, V., Wumaier, Z., Wittig, I. & Schagger, H. (2010) Large pore gels to separate mega protein complexes larger than 10MDa by blue native electrophoresis: Isolation of putative respiratory strings or patches. *Proteomics* 10, 3379–3387.
33. Muraoka, R., Okuda, K., Kobayashi, Y. & Shikanai, T. (2006) A eukaryotic factor required for accumulation of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 142, 1683–1689.

34. Pfeiffer, K. *et al.* (2003) Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 278, 52873–52880.
35. Ganeteg, U., Strand, Å., Gustafsson, P. & Jansson, S. (2001) The properties of the chlorophyll a/b-binding proteins Lhca2 and Lhca3 studied in vivo using antisense inhibition. *Plant Physiol.* 127, 150–158.
36. Ueda, M. *et al.* (2012) Composition and physiological function of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Marchantia polymorpha*. *Plant J.* 72, 683–693.

## The structure of the NDH-PSI supercomplex and its assembly process

Yoshinobu Kato

Graduate School of Science, Kyoto University

## 解説

クライオ電子顕微鏡単粒子解析による光合成超分子複合体の構造解析<sup>‡</sup><sup>1</sup>大阪大学 蛋白質研究所<sup>2</sup>岡山大学 異分野基礎科学研究所<sup>3</sup>JST さきがけ宮崎 直幸<sup>1,\*</sup>、長尾 遼<sup>2</sup>、加藤 公兎<sup>2</sup>、沈 建仁<sup>2</sup>、秋田 総理<sup>2,3</sup>

クライオ電子顕微鏡（電顕）単粒子解析は近年急速に発展し、X線結晶構造解析やNMRと並んで原子モデルを構築できる構造解析手法となった。そして、結晶化が困難な膜タンパク質や超分子複合体の構造解析へ適用されている。我々も、このクライオ電顕単粒子解析を用いて、光合成関連の超分子複合体の構造解析に取り組んでいる。本稿では、我々が構造解析を進めている光化学系II (PSII) を例にとり、クライオ電顕単粒子解析法による近原子分解能構造解析を紹介する。

## 1. はじめに

生命活動はゲノムにコードされたタンパク質が主に担っており、生命機能を理解するには、それらタンパク質の機能を解明することが必須である。特に、タンパク質の原子構造情報は、タンパク質の機能を詳細に理解するうえで、非常に重要である。従来、タンパク質の原子構造を決定するには、X線結晶構造解析法あるいはNMR法が用いられてきた。NMR法では分子量が3万Daを超えるタンパク質の構造解析が困難なため、X線結晶構造解析法が構造生物学の中心的な役割を果たしてきた。X線結晶構造解析は、X線回折実験をおこなう放射光施設が現在では非常に整備され、良質な結晶さえ得られれば、迅速に構造を決定することができるようになっている。しかし、良質な結晶を得るには、多数の結晶化条件を探索しなければならず、数mgの高純度（一般的には純度95%以上）のタンパク質試料が必要となる。そのため、試料調製と結晶化に多大な時間と労力を要する。ところが、クライオ電子顕微鏡（電顕）単粒子解析が急速に発展し、状況が大きく変わってきた。このクライオ電顕単粒子解析の近年

の進歩は目覚ましく、2013年に膜タンパク質（TRPV1チャンネル）の構造が近原子分解能（3.4Å）で決定されて以降<sup>1)</sup>、分子量が100kDa以下の比較的小さなタンパク質も含めて<sup>2,3)</sup>さまざまなタンパク質の原子構造が決定されてきた。特に、少量の試料で構造を決定できることもあり、試料調製が難しい膜タンパク質や超分子複合体の構造解析に威力を発揮している。さらに、分解能もグルタミン酸脱水素酵素（GDH）の解析では、1.8Åまで到達している<sup>2)</sup>。分解能が2.5Åを超えたことで、タンパク質に水和した水分子や側鎖のコンフォメーション状態までも詳細に解析できるようになり、今後、タンパク質が担うさまざまな化学反応がクライオ電顕で解析できると期待されている。この近年の劇的な分解能向上は、電子直接検出カメラの実用化というハードウェアでの技術革新と、ベイズ統計を導入したRELION<sup>4)</sup>やFREALIGN<sup>5)</sup>等の解析ソフトウェアの発展によりもたらされた。

光合成反応を担っているタンパク質群に関しても、構造生物学的な手法による研究が盛んにおこなわれているが、結晶化が困難な不安定複合体に関してはこれまで研究が進んでこなかった。しかし、上記のようにクライオ電顕単粒子解析の手法が進展したこともあり、光合成に関わる巨大な

<sup>‡</sup>解説特集「チラコイド膜超複合体の構造とダイナミクス」

\*連絡先 E-mail: naomiyazaki@protein.osaka-u.ac.jp

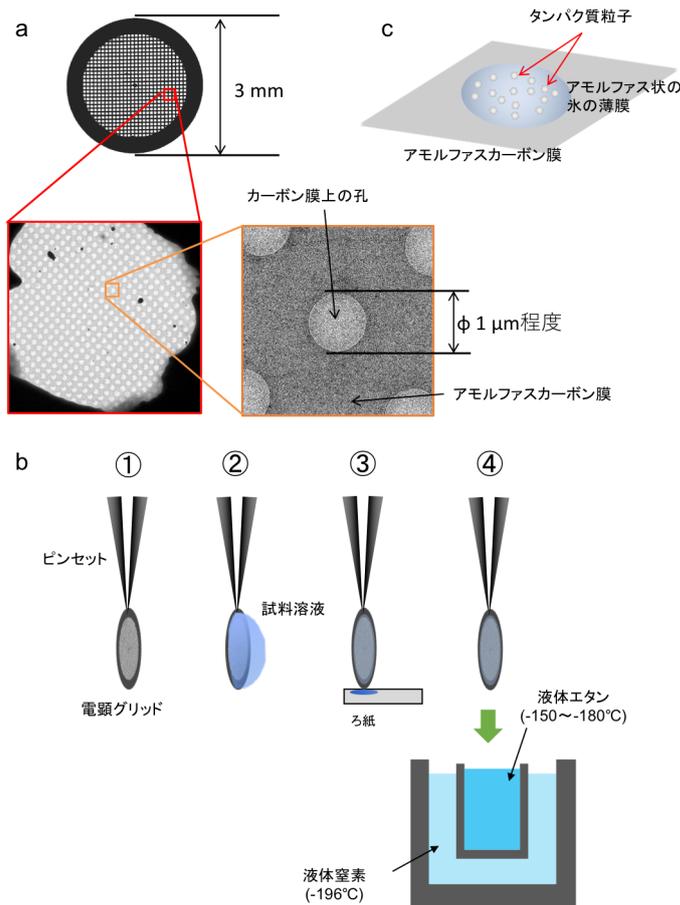


図 1. クライオ電顕試料作製法

(a) クライオ電顕で用いる電顕グリッド。直径約 3 mm の金属製のグリッドの上に、直径約 1 μm 程度の孔が規則的に空いたカーボン膜が張り付けてある。

(b) 試料の凍結方法。①ピンセットにクライオ電顕グリッドをセットする。②約 3 μl 程度の試料溶液をグリッドに載せる。③ろ紙で余分な溶液を吸い取り、カーボン膜に開いた孔に薄い水の膜が張った状態を作る。④液体窒素で冷却した液体エタンに電顕グリッドをすばやく浸漬し、急速凍結する。

(c) 電顕グリッドでアモルファス状の氷の薄膜に包埋されたタンパク質粒子の模式図。

複合体（超分子複合体）の構造が近年相次いで報告されている。例えば、サブユニットの数が 800 を超える巨大なアンテナタンパク質であるフィコビリソーム<sup>6)</sup>や、植物光化学系 II (PSII) とそのアンテナタンパク質 LHCII との複合体 (PSII-LHCII 複合体)<sup>7,8)</sup> などである。我々も、このクライオ電顕単粒子解析を用いて、光合成関連の超分子複合体の構造解析に取り組んでいる。本稿では、我々が構造解析を進めている好熱性シアノバクテリア (*Thermosynechococcus vulcanus*) PSII を例にとり、クライオ電顕単粒子解析法による構造解析を紹介したい。

## 2. クライオ電顕単粒子解析のための試料作製法

クライオ電顕単粒子構造解析では、X 線結晶構造解析の場合と同様に、高度に精製したタンパク質試料（純度 95%以上）を一般的に用いる。純度が低くても、混入したタンパク質粒子のサイズや

形状が解析対象と大きく異なり、電子顕微鏡写真上や解析の途中で解析対象と明瞭に区別できるものであれば、問題ないこともあるが、低純度試料では解析が困難になる場合が多い。X 線結晶構造解析では、多数の結晶化条件を探索するために、多量（数 mg）の高純度試料が必要となるが、クライオ電顕では、X 線結晶構造解析で要求される量と比べて 2 桁程度少ないタンパク質試料（数十 μg 程度）で解析をおこなうことができる。そのため、多量の試料を用意するのが難しい膜タンパク質や超分子複合体の解析に特に適している技術といえる。

クライオ電顕でタンパク質の粒子像を観察するには、直径 3 mm の金属製（銅あるいはモリブデン）のグリッドの上に、直径 1 μm 程度の孔が規則的に開けられている薄いアモルファスカーボン膜を張ったものを用いる（図 1 a）。そのクライオ電顕グリッドに、精製したタンパク質試料

溶液を 3  $\mu\text{l}$  程度載せる (図 1b)。そして、余分な溶液をろ紙で吸い取り、カーボン膜に開けられた孔に薄い水の膜が張った状態を作る。その結果、溶液に含まれるタンパク質分子 (一般に粒子と呼ぶ) は、その薄い水の膜に閉じ込められた状態になる。そして、そのグリッドを急速に液体エタンに浸漬することで、水分子がアモルファスの状態を保ったままタンパク質を凍結することができる (図 1c)。その凍結した試料は液体窒素に移され、液体窒素温度を保ったままクライオ電顕に挿入して、タンパク質の粒子像をクライオ電顕で取得する。後述のように、透過型クライオ電顕により得られるタンパク質の粒子像は、2 次元投影像である。それゆえ、タンパク質粒子の上下にあるアモルファス状の氷の像がタンパク質粒子にノイズとして重なってくる。したがって、なるべく薄い氷の膜にタンパク質を包埋することが、高分解能構造解析においては重要である。また、タンパク質粒子が単分散し互いに重ならず、なるべく多く一枚の写真に写るように、タンパク質濃度を適切に調節することも効率的なデータ取得において重要である。濃度が高すぎてタンパク質粒子像が重なってしまうと、個々の粒子の形状が分からなくなり解析できなくなる。一方で、濃度が低すぎてタンパク質粒子が少ないと、解析に必要な粒子数を得るのに多くの写真を撮影しなければ

ならなくなる。

### 3. クライオ電子顕微鏡でのタンパク質粒子像の撮影

アモルファス状の氷の薄膜に包埋された無染色のタンパク質粒子は、電子線照射に伴う損傷を受けやすい。そのため、電子線照射損傷低減システム (Minimum dose system あるいは Low dose system と呼ばれる) を用いて、実際に電子顕微鏡を用いて高倍率でのタンパク質粒子像を撮影するまで、試料に電子線が極力当たらないようにする<sup>9)</sup>。これは、撮影に適した場所を低倍率かつ非常に弱い電子線量で探し、フォーカスを写真撮影位置からわずかに (数  $\mu\text{m}$ ) 離れたところで合わせた後、最後に目的の場所を撮影するという方法である (図 2)。これにより、実際の撮影までに試料にあたる電子線量を最小にすることができる。また、一度撮影した場所は、電子線照射の損傷を受けているので、撮影する孔を変えながら撮影していく。このとき規則的に孔が並んでいることにより、撮影の自動化が容易になる。

高分解能構造解析のための電顕像の記録媒体としては、CMOS (相補性金属酸化薄膜半導体: Complementary metal oxide semiconductor) を用いた電子直接検出型カメラが現在主流である<sup>10)</sup>。従来は、CCD (Charge-coupled device) カメラを

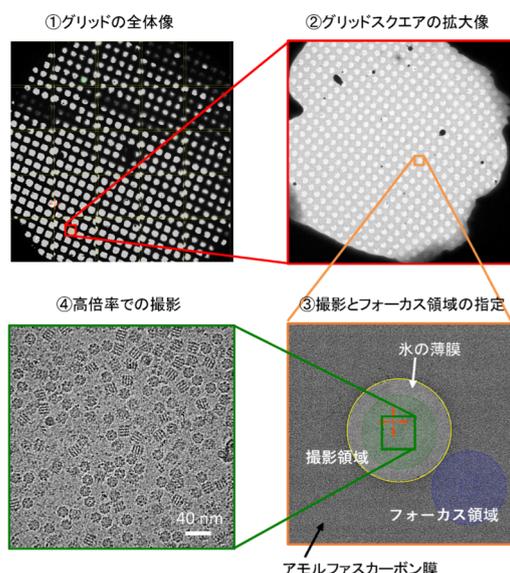


図 2. 電子線照射損傷低減システムによる撮影方法

①まず、クライオ電顕グリッドの全体像を低倍率かつ非常に弱い電子線で撮影する。②次に、全体像において、アモルファスカーボン膜の孔に薄く氷が張っているグリッドスクエアを探し、そのグリッドスクエアの拡大像を必要最低限の電子線量で撮影する。③そして、撮影する孔の場所をグリッドスクエア像で選択し、撮影領域、フォーカス領域を設定する。氷の薄膜が張った孔の領域を撮影し、その撮影前に撮影領域の近傍のアモルファスカーボン膜上でフォーカスを合わせる。④最後に、高倍率で氷の薄膜の場所を撮影し、タンパク質粒子の投影像を取得する。ここでは、タンパク質のフォールディングを助けるシャペロン GroEL の粒子像を示している。

用いていたが、CCD カメラは照射損傷を受けやすく、電子を CCD カメラの手前に置いたシンチレータで光子に変換し、光ファイバーやミラーを使って、CCD 素子へ転送していた。その結果、光-電子変換過程において、光子の点広がりが生じ、解像度が低下していた。さらに、データの読み出しを素子間の転送によっておこなうため、データの読み出しが遅いという欠点もあった。一方、CMOS イメージセンサーを用いた電子直接検出型カメラでは、電子を直接検出するので、CCD カメラの光-電子変換過程で生じていたボケがなく、高分解能情報が保持される。それに加え、CMOS 素子では、信号の高速読み出しも可能である。そのため、イメージを動画で撮影することが可能となった。高分解能構造解析のための電顕像の取得は高倍率でおこなうが、高倍率での撮影では撮影中の試料微動が大きな問題となってくる。その撮影中の試料微動を動画で撮影することによって、補正できるようになった。すなわち、撮影した動画のフレーム間での試料の動きを追跡し、その動きを補正した後に全てのフレームを重

ね合わせることによって、撮影中の試料微動に伴う像のボケを取り除くことができるようになった。

#### 4. タンパク質粒子の投影像からの3次元再構成

クライオ電顕像は、タンパク質粒子の2次元投影像である。そして、各タンパク質粒子は、一般に氷の薄膜中でランダムな配向をしている。したがって、電顕像からはタンパク質粒子のさまざまな方向への投影像が得られてくる。その結果、それら各タンパク質粒子の相対角度を決定することで、3次元構造を再構成することができる。その2次元投影像から3次元構造を再構成するには、①電顕像の動画補正、②コントラスト伝達関数(CTF)の見積もり、③粒子のピックアップ、④2次元クラス分類による粒子の選別、⑤初期3次元構造の作製、⑥3次元クラス分類による粒子の選別、⑦3次元構造の精密化、⑧分解能などの評価という流れで画像解析をおこなう。

それでは、我々のPSIIの解析を例にとり、解析の流れを紹介する。我々は、蛋白質研究所に導

表1 撮影および解析条件

Specimen	PSII dimer
<b>Data collection and processing</b>	
Microscope	FEI Titan Krios G2
Detector	Falcon 3EC in linear mode
Nominal magnification	59,000
Voltage (kV)	300
Nominal defocus range ( $\mu\text{m}$ )	-1.25 ~ -3.00
Pixel size ( $\text{\AA}$ )	1.12
Total electron dose ( $e^-/\text{\AA}^2$ )	60
Exposure time (s)	2.5
Number of frames per image	33
Number of micrographs	2,596
Number of micrographs used for analysis	2,405
Initial particle number	382,014
Number of particles used for 3D reconstruction	190,838
Map resolution ( $\text{\AA}$ )	3.3
Applied b-factor ( $\text{\AA}^2$ )	-194
<b>Model building and refinement</b>	
Refined resolution ( $\text{\AA}$ )	3.3
Map CC (around atoms)	0.838
Rmsd bond length	0.011
Rmsd bond angles	1.15
Ramachandran plot preferred (%)	96.61
Ramachandran plot allowed (%)	3.35
Ramachandran plot outlier (%)	0.04
Rotamer outlier (%)	0
Clashscore	2.93
MolProbity score	1.30

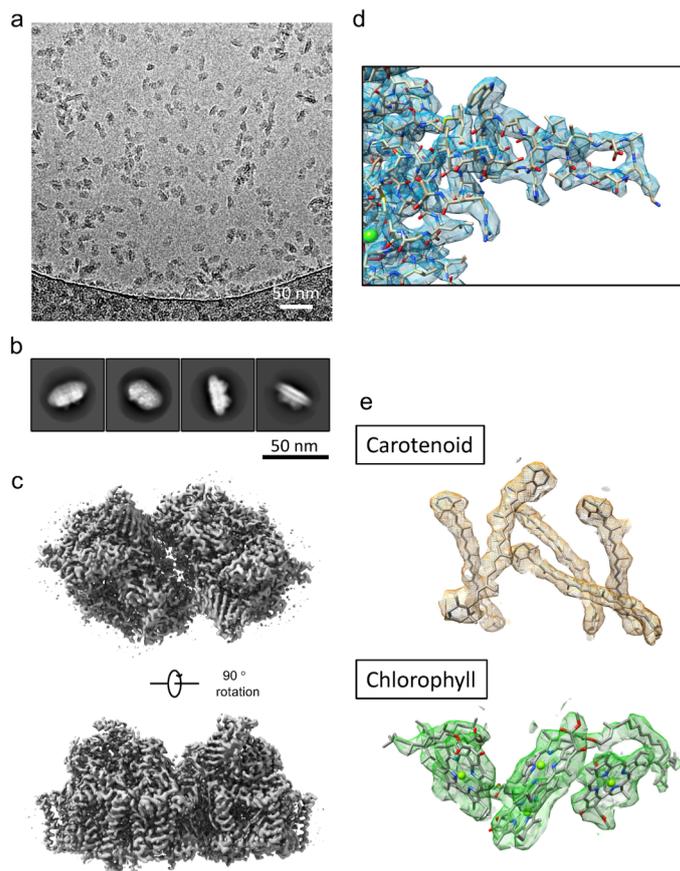


図3. 光化学系 II (PSII) のクライオ電顕単粒子解析

- (a) PSII のクライオ電顕写真
- (b) PSII の二次元クラス平均画像
- (c) PSII の 3.3 Å 分解能のクライオ電顕密度図
- (d) クライオ電顕密度図と原子モデル
- (e) PSII に存在する色素 (カロテノイドとクロロフィル) のクライオ電顕密度図と原子モデル

入されているサーモフィッシャーサイエンティフィック (旧 FEI) 製の最先端クライオ電子顕微鏡 (Titan Krios) を用いて、表 1 に示したような条件で 2,596 枚の PSII の電顕像 (図 3a) を自動撮影し、その電顕像に写っている多数のタンパク質粒子像を用いて 3 次元再構成をおこなった。まずは、撮影した 2,596 枚の動画を MotionCor2<sup>11)</sup> というソフトウェアを用いて、撮影中の試料微動を補正した。次に、各電顕像の CTF の見積もりをおこなった。クライオ電顕での粒子像のコントラストは、主に (約 90%) 位相差コントラストであるが、そのコントラストは、周波数依存的な変調を受けている。そのため、電顕像ごとにその変調関数である CTF を見積もり、電顕像の補正をする必要がある。今回は、CTFFIND<sup>12)</sup> というソフトウェアを用いて、CTF の見積もりをおこなった。そして、画質の悪いものを捨て、画質の良い 2,405 枚の電顕像から、382,014 の PSII の粒子像

をピックアップした。これらピックアップした PSII の粒子像には、サブユニットが欠落したものや、構造が壊れたものも含まれているので、それらを 3 次元再構成するまえに取り除く必要がある (当然、試料に混入した PSII 以外のタンパク質粒子も若干含まれているはずである)。例えば、近原子分解能で構造解析するには、その分解能で構造が揃ったものを選別し、構造が高度に均一な粒子像のみから 3 次元再構成をおこなう必要がある。そのような 3 次元再構成に適さない粒子を取り除くために、2 次元および 3 次元でのクラス分類と粒子の選択を RELION でおこなった (図 3b)。最終的に、190,838 粒子から、3.3 Å 分解能のクライオ電顕密度図を得ることができた (図 3c-d)。この構造解析のワークフローは、図 4 にまとめている。得られたクライオ電顕密度図では、タンパク質中の各サブユニットの原子モデルに加え、カロテノイドやクロロフィルなどの色素の

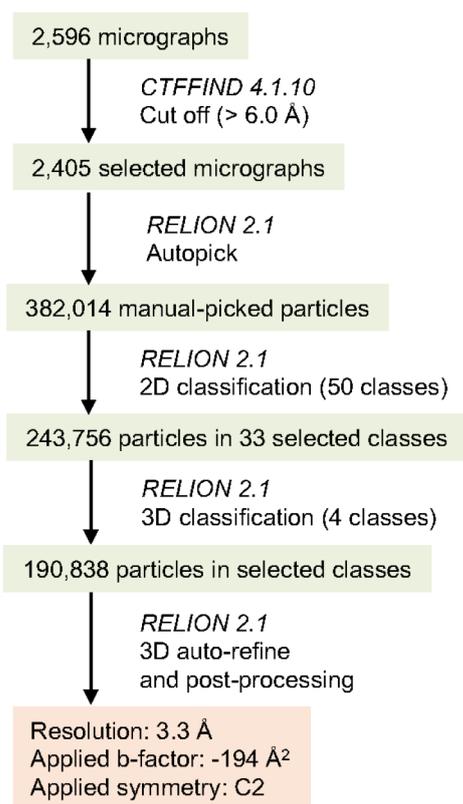


図 4. 光化学系 II のクライオ電顕ワークフロー

原子モデルも十分構築できるものであった(図 3 e)。このクライオ電顕で得られた密度図は、タンパク質のクーロンポテンシャル分布図である。そのため、X 線結晶構造解析で得られる電子密度図とは本質的に異なっているが、3 Å 程度の分解能では一見大きな違いは分からない(図 3c-e)。しかし、電荷をもつ電子線は、電荷を帯びた原子と帯びていない原子に対する原子散乱因子が大きく異なる。そのため、酸性および塩基性のアミノ酸残基では、荷電状態によって密度が変わってくる。それにより、アミノ酸側鎖の電荷情報が得られる可能性がある。一方、X 線結晶構造解析では、そのような電荷情報を得るのは難しいが、異常分散による元素分析をおこなうことができるという利点がある。

現在、我々は PSII の反応中間体の構造を詳細に調べるために、試料調製および撮影・解析条件

の検討をおこない、さらなる高分解能構造解析を目指している。

## 5. おわりに

本稿では、我々が進めているさまざまな光合成関連タンパク質複合体の 1 つ PSII の構造解析を例に、クライオ電顕単粒子解析を紹介した。現在では、PSII のようにタンパク質が構造的に安定で、氷の薄膜中できれいに単分散していれば、1 週間から 1 ヶ月程度で原子モデルの構築が可能となるレベル(4 Å 分解能以上)の近原子分解能構造解析ができるようになっている。今後、本解析技術は、X 線結晶構造解析では困難だった不安定な複合体の構造解析や過渡的複合体の構造解析などに応用されていくと予想される。さらに分解能が向上すれば、光合成反応中心にある金属クラスターの構造なども可視化できるようになり、反応中間体の構造解析などにも応用されていくことが期待されているが、まだ解決すべき問題点もある。例えば、反応中間体の詳細な構造解析では、タンパク質の電子線損傷が大きな問題となる。電子線は X 線よりも強く物質と相互作用するので、電子線によるタンパク質の損傷は無視できない。そのため、電子線照射に伴う構造の歪みを X 線自由電子レーザー(XFEL)により得られた無損傷構造と比較することで見積もり、(簡易的には既に行われているが)電子線照射に伴う損傷を考慮した解析法を構築する必要があるだろう。

## 謝辞

本成果は、国立研究開発法人医療研究開発機構創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業(創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム事業)の支援により得られました。

Received July 26, 2018; Accepted Aug 15, 2018; Published Aug 31, 2018.

参考文献

1. Liao, M., Cao, E., Julius, D. and Cheng, Y. (2013) Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504, 107–112.
2. Merk, A., Bartesaghi, A., Banerjee, S., Falconieri, V., Rao, P., Davis, M.I., Pragani, R., Boxer, M.B., Earl, L.A., Milne, J.L.S. and Subramaniam, S. (2013) Breaking cryo-EM resolution barriers to facilitate drug discovery. *Cell* 165, 1698–1707.
3. Khoshouei, M., Radjania, M., Baumeister, W. and Danev, R. (2017) Cryo-EM structure of haemoglobin at 3.2 Å determined with the volta phase plate. *Nat. Commun.* 8, 16099.
4. Scheres, S.H. (2012) RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J. Struct. Biol.* 180, 519–530.
5. Grigorieff, N. (2007) FREALIGN: high-resolution refinement of single particle structures. *J. Struct. Biol.* 157, 117–125.
6. Zhang, J., Ma, J., Liu, D., Qin, S., Sun, S., Zhao, J. and Sui S.-F. (2017) Structure of phycobilisome from the red alga *Griffithsia pacifica*. *Nature* 551, 57–63.
7. Wei, X., Su, X., Cao, P., Liu, X., Chang, W., Li, M., Zhang, X. and Liu, Z. (2016) Structure of spinach photosystem II-LHCII supercomplex at 3.2 Å resolution. *Nature* 534, 69–74.
8. Su, X., Ma, J., Wei, X., Cao, P., Zhu, D., Chang, W., Liu, Z., Zhang, X. and Li, M. (2017) Structure and assembly mechanism of plant C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub>-type PSII-LHCII supercomplex. *Science* 357, 815–820.
9. Crowther, R.A., Amos, L.A., Finch, J.T., De Rosier, D.J. and Klug, A. (1970) Three dimensional reconstructions of spherical viruses by Fourier synthesis from electron micrographs. *Nature* 226, 421–425.
10. 宮崎直幸, 村田和義. (2013) 電子直接検出カメラ (direct electron detector) の TEM への応用. *顕微鏡* 48, 57–60.
11. Zheng, S.Q., Palovcak, E., Armache, J.P., Verba, K.A., Cheng, Y. and Agard, D.A. (2017) MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nat. Methods* 14, 331–332.
12. Rohou, A. and Grigorieff, N. (2015) CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. *J. Struct. Biol.* 192, 216–221.

Cryo-electron single particle analysis of photosynthetic protein complexes

Naoyuki Miyazaki<sup>1,\*</sup>, Ryo Nagao<sup>2</sup>, Koji Kato<sup>2</sup>, Jian-Ren Shen<sup>2</sup>, Fusamichi Akita<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Institute for Protein Research, Osaka University, <sup>2</sup>Research Institute for Interdisciplinary Science, Okayama University, <sup>3</sup>JST-PRESTO

## 表紙の紹介

## エチオプラストの発達におけるガラクト脂質の役割

<sup>1</sup>東京大学 大学院総合文化研究科<sup>2</sup>大阪府立大学 高等教育推進機構(現所属)藤井 祥<sup>1</sup>、和田 元<sup>1</sup>、小林 康一<sup>1,2</sup>

暗所で発芽した被子植物は緑化せず、いわゆるモヤシ（黄化芽生え）の形態をとる。このとき、子葉細胞内では葉緑体の前駆体としてエチオプラストが発達する。エチオプラスト内には、プロチラコイド膜（PT）に加え、プロラメラボディ（PLB）とよばれる規則正しい格子状の膜構造が形成される。黄化芽生えが光を受けると、PLB が崩壊するとともにチラコイド膜が発達し、エチオプラストは急速に葉緑体へと分化する。

エチオプラストには、クロロフィルの前駆体であるプロトクロロフィリド（Pchl<sub>id</sub>e）と、それを光依存的にクロロフィリドへと変換する Pchl<sub>id</sub>e 還元酵素（LPOR）が蓄積する。Pchl<sub>id</sub>e の多くは LPOR と結合し、光により瞬時に変換される光活性型複合体を形成する。LPOR と Pchl<sub>id</sub>e の蓄積に関してはこれまでに数多くの研究がなされてきたが、それらの蓄積する場を作る膜脂質の役割はほとんど分かっていなかった。2017年に我々は、チラコイド膜や PLB の全脂質の約半分を占めるモノガラクトシルジアシルグリセロール（MGDG）の軽度の減少が、PLB の構造には大きな影響を与えないが、Pchl<sub>id</sub>e の合成や光活性型複合体の蓄積と多量体化、PT の伸長を強く阻害することを報告した<sup>1)</sup>。そこで、もう一つのガラクト脂質であるジガラクトシルジアシルグリセロール（DGDG）のエチオプラストにおける役割を明らかにするため、我々は主要 DGDG 合成酵素遺伝子 *DGD1* を欠損したシロイヌナズナ変異体 (*dgd1*) の解析を行った<sup>2)</sup>。

*dgd1* 変異体の黄化芽生えでは、DGDG の含量が野生株と比べ 80%減少していたが、MGDG の量はほとんど変わらなかった。変異体のエチオプラストでは、PT はほとんど発達せず、PLB の格子構造も大きく乱れていたが、PLB のサイズは野生株と同程度であった。また、DGDG の減少は MGDG の減少と同様に、膜における Pchl<sub>id</sub>e の合成プロセスや光活性型複合体の蓄積を阻害することが分かった。その他さまざまなデータの比較により、2種のガラクト脂質が共通で持つ役割と、それぞれが独自に果たす役割があることが示唆された。その詳細について、2018年12月号の解説記事にて報告する予定である。

kkobayashi@las.osakafu-u.ac.jp

## 参考文献

1. Fujii, S., Kobayashi, K., Nagata, N., Masuda, T. and Wada, H. (2017) Monogalactosyldiacylglycerol facilitates synthesis of photoactive protochlorophyllide in etioplasts. *Plant Physiol.* 174, 2183–2198.
2. Fujii, S., Kobayashi, K., Nagata, N., Masuda, T. and Wada, H. (2018) Digalactosyldiacylglycerol is essential for organization of the membrane structure in etioplasts. *Plant Physiol.* 177, 1487–1497.

## 特別企画：若手研究者の海外留学レポート！

### 第四回「フライブルク滞在記」

東北大学大学院 農学研究科

門脇 太郎

私は埼玉大学でポストドクをしていた時に、埼玉大学が取得した「頭脳循環を加速する戦略的国際研究ネットワーク推進プログラム」により、ドイツのフライブルク大学の Hess 教授のもとで、2017年1月から12月まで客員研究員として働いていました。Hess 教授のグループは、バイオインフォマティクスと実験の融合をモットーにしており、これまでに世界で最初にシアノバクテリアの転写開始点を網羅的に同定し、多数の新規 sRNA の発見やその機能解析を行っています。私は留学期間中にシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 を材料に sRNA の発現を制御する転写因子の研究や、シアノバクテリアの転写開始点と転写因子の結合モチーフ、トランスクリプトーム情報から転写因子の標的を同定する研究をしていました。

#### フライブルクについて

バーデン＝ヴュルテンベルク州の州都であり、南ドイツ、フランスとスイスの国境の近くにある人口約20万人の都市です。市の中心はシュヴァルツバルト(黒い森)のふもとにあり、美しいミュンスター大聖堂など歴史豊かな街並みです(写真1、写真2)。1457年創立の伝統あるフライブルク大学を中心とした大学都市であり住民の約15%が学生を占めます。また、昔から環境保護で先進的な取り組みを行ってきており、太陽光や風力を利用したエネルギー政策、公共交通の拡張や自転車通勤の推奨、ゴミ分別や緑化の推進などにより、環境都市フライブルクと呼ばれ、美しい街並みを保っています。

#### フライブルクでの生活

研究室は市の中心街から2から3キロはなれた場所にあり、私はそこからさらに路面電車で15分ほど離れた場所に住んでいました。フライブルクでまず大変なことは、住む家を探すことでした。特に安価な物件を見つけるのが、ドイツの中で非常に難しい都市だそうで、実際に現地の学生さんたちから家を探している、もしくはルームシェアをしたいから連絡してほしいという張紙がしょっちゅう掲示板や壁にあったりします。また研究室で、住む家が見つからないから良い物件を知らないか、というメールもありました。私自身も最初の三か月は月1000 euro 以上する物件に住んでいましたが、その後は現地の日本人の方の協力で月600 euro ほどの物件に運良く住むことができました。フライブルクに留学を考えている方は、家探しは早めに行き、現地にいる日本人の方にあらかじめ協力してもらうことを強くお勧めします。他の生活事情は、非常に良好で、特に食料品が安いので助かりました。ただ日曜日はフライブルク駅



写真1



写真 2

周辺の店以外は基本的に閉まっており、私は土曜日にまとめて買い物をしていました。また治安も良く、深夜に大学に行って実験しに行っても大丈夫なくらいでした（金曜と土曜以外の夜は酔っ払いが多いのでお勧めしませんが）。

### 研究室の様子

研究室はパーマネント研究者が3名、私を除くポスドクが1名、テクニシャンが4名、IT担当が2名、ドクターコースの学生が4名(外国籍2名)、マスターコースの学生が2名、学部生が2名という構成でした。研究室では9時ごろからだいたい18時くらいまで勤務する方が多く、土日は来ても朝に少し仕事をするか完全に休むという方がほとんどでした。

セミナーやお祝い事をする際には、発表者や祝ってもらう方が主催し、料理やお菓子を用意するという違いには驚きました。また私が留学している間も国外から2名の方が半年滞在し、研究室単位でも月1くらいで外部からの研究者の公演があるなど、国内外問わず、積極的に外部とのコミュニケーションを取っていました。実際に Hess 研の

論文はコラボレーションが多く、ポスドクの方と話す、いかにうまく協力して良いジャーナルにパブリッシュできるか、ということが研究者として非常にステータスになるそうです。論文が数本出ると大学内でバーベキューパーティーをしてお祝いします。そこでは研究の話もしますが、日常生活やスポーツ、政治など様々で、日本のことについても話題になりましたが、研究室の方の教養が高く、結構マニアックな話題になったりもしました。私はつつい研究の話ばかりしてしまいましたが、このような場で様々な種類の会話ができるようになることが、コラボレーションを行う一つのカギになるのではないかと感じました。

以上取り留めのない海外留学レポートでしたが、本稿がこれから海外で研究する方に少しでもお役に立てれば幸いです。最後に本稿を執筆する機会を与えていただいた光合成学会若手の会の会長の清水隆之氏に感謝いたします。

## 報告記事

## 第9回 日本光合成学会（年会・公開シンポジウム）開催報告

大会準備委員長：牧野 周（東北大）

大会企画委員長：宮尾光恵（東北大）

第9回日本光合成学会（年会・公開シンポジウム）が、2018年5月26～27日に東北大学青葉山新キャンパスの青葉山コモンズで行われました。青葉山新キャンパスは、県有地であった仙台カントリー倶楽部ゴルフ場跡地を2003年に東北大学が宮城県から購入、2006年より東北大学の新しいキャンパスとして整備をすすめてきた場所です。昨年農学部がこの新キャンパスに総合移転し、今回の年会は農学部の講義室・図書館が併設される真新しい青葉山コモンズで開催されました。2015年12月に仙台市営地下鉄東西線が開通し、東北大学のメインキャンパスである青葉山地区と川内地区の構内にそれぞれ地下鉄駅が建設され、市内中心部から非常に交通の便の良い立地での開催となりました。年会参加者は154名、ポスター発表は77題、企業展示は5件でした。参加者数、ポスター発表数ともにほぼ例年並みでした。青葉山コモンズ内の会場と、ポスターボードや視聴覚施設などの備品等は、農学部の好意によりすべて無料で借りることができました。シンポジウムは300人収容の大講義室（翠生ホール）で行い、ポスター会場は図書館に併設する大きなラーニングコモンズを使用しました。

一日目には、私、牧野と宮尾がオーガナイザーとなり、「光合成と窒素と作物生産」をテーマにシンポジウムを行ないました。今日までの作物増産は窒素の多量施肥に依存してきた背景を踏まえ、シンポジウムでは生物生産の窒素利用の最適化とさらなる作物増産の方向性について議論しました。話題提供者としては、安達俊輔さん（東京農工大）から「自然変異を利用した光合成速度・窒素利用効率向上の展望と課題」、泉正範さん（東北大）から「体内窒素利用と光合成活性のバランスは改変し得るか?」、そして、彦坂幸毅さん（東北大）から「植物葉群における葉間窒素分配の最適性」という演題で発表を頂き、有意義な討論をしました。

二日目のシンポジウムは高橋裕一郎さん（岡山大）と鹿内利治さん（京大）がオーガナイザーとなり、「チラコイド膜超複合体の構造とダイナミクス」と題して行われました。チラコイドタンパク質複合体はダイナミックに構造を変え、他の複合体と超複合体を形成することで、光合成活性を柔軟に調節するという新しいメカニズムの解明事例や、その解析方法としてのクライオ電顕の秘めた可能性の紹介がありました。話題提供者としては、横野牧生さん（日本製粉）から「チラコイド膜のダイナミクスの違いはPSI-PSII超複合体の構造に影響を与えうる」、加藤義宣さん（京大）から「NDH-PSI超複合体の構造とアセンブリ」、Sreedhar Nellaepalliさん（岡山大）から「PSI assembly apparatus in green alga *Chlamydomonas reinhardtii*」、そして、宮崎直幸さん（阪大）から「超分子複合体の構造のクライオ電顕による解析について」という演題で発表を頂き、活発な討論をしました。

今回の企画では、ポスター発表をすべて初日に行い、二日目はお昼で終了と言う形にさせていただきました。ポスター発表の1分間紹介も希望者による事前登録制としました。土日開催であったことや遠方から参加される人の便宜を考慮しました。ポスター会場内には休憩コーナーも設け、

また企業展示とも隣接させ、多少時間的にタイトなところはあったかもしれませんが、各所で熱い討論が行われました。ポスター賞は、従前の方法にしたがった投票の結果、高木大輔さん、上妻馨梨さん、米田卓郎さん、丸山萌さん、亀岡峰志さんが受賞し、高木大輔さんが最優秀ポスター賞に選出されました。

来年の年会は、2019年5月25日（土）～26日（日）の日程で、京都産業大学のむすびわざ館にて開催の予定です。来年も土日の開催になるのでご注意ください。



図1. 年会会場となった青葉山新キャンパス



図2. シンポジウム会場（青葉山コモンズ大講義室）



図3. 総会で挨拶する高橋裕一郎会長



図4. ポスター賞受賞者

## 報告記事

### 第 15 回若手の会セミナー開催報告

東京大学 大学院総合文化研究科

清水 隆之

今回は、5月27日の光合成学会本会終了後に東北大学の講義室をお借りして行いました。開催に際して、東北大学の牧野周先生と菅波真央さんには、会場準備・設営において多大なご協力を頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。セミナーの様子については、愛媛大の高智五輝さんに報告記事としてまとめて頂いたもので、詳しくはそちらをご覧ください。

セミナーには総勢41名の参加があり、今回も和やかなムードの中、活発な議論が行われました。理由は良くわかりませんが（わかれば今後の運営に生かせるのですが）、初参加の学生が多く見受けられました。なにやら新しい風が吹き始めている予感がしています。

また、8月19～22日に北京で開催された第1回アジア・オセアニア国際光合成学会において、セッションの1つとして若手セミナーを開催いたしました。その報告は12月号に掲載予定です。今年度はあと1つのセミナーを企画しております。とても刺激的な会になると確信していますので、皆様のご参加を心よりお待ち申し上げます。さらに、来年度は光合成学会若手の会設立10周年となるので、何か特別なことができると考えております。

【今後のセミナー開催予定】詳細は光合成学会若手の会 HP をご覧ください。

10月5-7日 第1回生命科学系フロンティアミーティング 2018@遺伝研

(生命情報科学若手の会・ゲノム微生物若手の会との合同シンポジウム)

2019年5月26日光合成学会年会終了後 光合成学会若手の会 10th Anniversary セミナー (仮)

【学生のみなさんへ】

若手の会ってどんなイメージですか？近い研究をしている他大学の学生が交流する会？はたまた、若手研究者が集まってエネルギーに議論する会？私は、特に決まっているわけじゃなく、色んなことを試しにやってみる会だと思っています。でも、学生が求めるものって、学生じゃなくなると見えにくくなっちゃうんですね（苦笑）なので、誰々の話を聞きたいとか、セミナーに限らずこんなことしたいとか、若手の会でやってみたい・やって欲しいことがあれば、遠慮なく清水 (ctshimizu@g.ecc.u-tokyo.ac.jp) までご連絡ください。まあ、まずは参加してみてください。思ったより楽しいから！



## 光合成学会若手の会 第 15 回セミナーに参加して

愛媛大学大学院 理工学研究科  
博士前期課程 2 年

高智 五輝

2018 年 5 月 26 から 27 日にかけて第 9 回日本光合成学会年会およびシンポジウムが東北大学青葉山新キャンパスで開催されました。年会終了後に光合成学会若手の会第 15 回セミナーが行われました。私にとって若手の会への参加は今回が初めてでした。セミナーの内容は、二人の学生による講演と柴田穰先生 (東北大学大学院理学研究科化学専攻) による特別講演、各参加者による自己紹介でした。セミナー終了後は居酒屋へ移動し、先生方を交え若手ならではの陽気な懇親会 (研究に関する熱い議論も聞こえてきました) が開催され終始笑顔溢れる会となりました。

学生招待講演の一つ目は菅波真央さん (東北大学) による「Rubisco 量増強によるイネの光合成機能と生産性の強化」でした。人工増加や地球環境変化に伴う食糧不足に対して、主要穀物の生産性を向上させることが重要となってきます。内容は、圃場を使用した自然環境下における Rubisco 量増強イネの栽培試験についてでした。分子レベルから始まり圃場での作物収量までに至るお話を聞かせていただきました。

二つ目は三角将洋さん (早稲田大学) による「シアノバクテリアと灰色藻における呼吸が光合成に与える影響」でした。内容は、光合成生物における呼吸/葉緑体呼吸が光合成にとってネガティブなものか、生理学的意義が存在するのかについてでした。6 種のシアノバクテリアと灰色藻を使用し、クロロフィル蛍光測定を用いて比較することで呼吸が光合成に与える影響は種によって異なることが明らかにされました。

特別企画として柴田穰先生による「レーザー分光法で見る光合成—単一分子から細胞まで—」という演題で、研究内容から現在に至るまでのご自身の経歴について講演して頂きました。内容は、極低温でも作動する蛍光顕微鏡を開発し、光合成タンパク質に適応できる単一分子計測についてでした。この技術を使用すれば、ステート遷移でアンテナタンパク質が光化学系間を移動する現象を捉える事に繋がります。また、講演の中で経歴について「自分は運が良かった」と仰っていましたが、それは先生の研究に対する熱意や努力があったからこそその結果だと講演を聞いて強く感じました。

参加者約 30 名の自己紹介では、それぞれがユーモア満載のスライドを作成し、研究内容・経歴・趣味・近況などについて語って頂きました。

私は若手の会に参加して、もっと早くからこのセミナーに参加しておけばというのが正直な感想です。光合成という枠組みの中で、様々な研究分野に出会う事は自身の視野を広げる機会です。また、光合成を研究する同年代の学生との交流によって良い刺激を受けることができました。若手の会を終え、新たな気持ちで自身の研究活動に日々精進しています。

最後になりましたが、セミナーの主催及び本稿を執筆する機会を与えて頂きました清水隆之先生を初め、有意義な時間を共有することのできたセミナー参加者の皆様にこの場をお借りして感謝申し上げます。

## 報告記事

## First European Congress on Photosynthesis Research, ePS-1

CEA Saclay  
嶋川 銀河

## 学会の概要

2018年6月25~28日にスウェーデンのウプサラ(写真, 図1)で開かれましたFirst European Congress on Photosynthesis Research (ePS-1) および若手研究者を対象としたサテライト会議 (ePS-1-Young) に参加してきました。本会議は、言うなれば国際光合成会議のヨーロッパ支部会のようなもので、8月にはアジア・オセアニア支部会が北京で開かれるものと存じます。ヨーロッパ支部会ですのでもちろん日本人研究者の比率は非常に少なかったですが、会議の規模は思いのほか大きく ePS-1 の参加者が400名超であり、さらにそのうち約150名は ePS-1-Young から続けて参加していた状況でした。実際、ePS-1-Young のオーガナイザーの方は、想定以上に参加者が増えてしまい会議の準備・運営等が大変だったとおっしゃっておりました。ヨーロッパにおける光合成研究の確かな地位、そして今後ますます発展していくことへの期待が強く伺えるものでした。



図1. ウプサラ大聖堂. 初日の会場外から撮影

## 発表“Changing frequency of fluctuating light reveals the molecular mechanism for P700 oxidation in plant leaves”に対する反応

私は、ePS-1 および ePS-1-Young においてポスターで「変動光の周波数の変化が光合成電子伝達制御に与える効果」について発表しました。この研究では、正弦関数を模した滑らかな変動光(通称、海坊主“Umibozu”)を用いる事により、光の変動の速さを変えて経時的にP700酸化レベルなどの様々な光合成パラメータを評価しました(図2)。詳細な内容については、近々オンライン公表されます論文(Shimakawa and Miyake, 2018 *Plant Direct* in press)を参照していただければ幸いです。発表の中ではP700酸化とクロロフィルパラメータ  $q_L$  の相関から、プロトン勾配に依存しないシトクロム  $b_6/f$  電子伝達制御の可能性(Shaku et al., 2016 *Plant and Cell Physiology* 57, 1443-1453; 釋と三宅, 2016 *光合成研究* 26, 10-22; 嶋川と三宅, 2017 *光合成研究* 27, 4-15; Shimakawa et al., 2018 *Frontiers in Microbiology* 9, 886) や NADPH dehydrogenase が変動光下でP700酸化に担う役割(Kono and Terashima, 2016 *Plant and Cell Physiology* 57, 1405-1414; Yamori et al., 2016 *Scientific Reports* 6, 20147)などを議論し、変動光に興味のある方だけではなく、光合成の電子伝達制御や光傷害といった分野で働かれている方から、とても良い反応をいただきました。

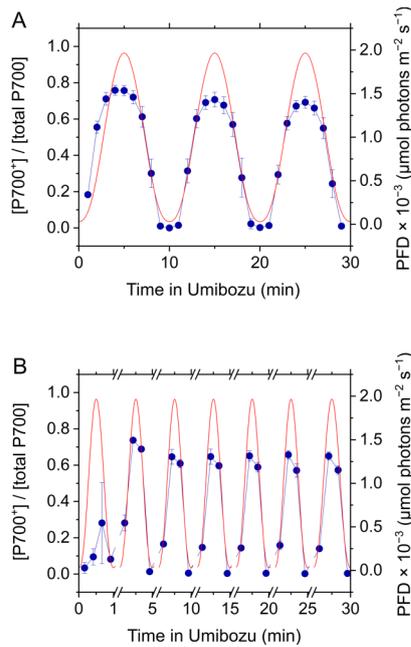


図 2. Umbiobozu 測定における光強度 (PFD, 赤線) と P700 酸化 (紺丸) の変動。遅い変動光 (A) と速い変動光 (B) に対するシロイヌナズナ野生株の P700 酸化を Dual-NIR-KLAS (WALZ, Germany) を用いて大気条件下で測定した。図は Shimakawa and Miyake *Plant Direct* in press より改訂。

生測定とクロロフィル蛍光の同時測定から「FLV2/4 も FLV1/3 と同様の機能を有しており、低 CO<sub>2</sub> 環境でのみ極めて特異的に働く」との結論に至っておりました (Hayashi et al., 2014 *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 78, 384-393; Shimakawa et al., 2015 *Plant Physiology* 167, 472-480)。詳細な内容は 2015 年の光合成研究記事 (嶋川, 2015 *光合成研究* 25, 16-21) をご参照ください。論文を通してから実に 3~4 年もの間、自身の研究成果がいまいち浸透しない事にやりきれない思いをする事も多々ありましたが、ついに今回の ePS-1 でフィンランドの当グループを含めた多くの研究者の方々から意見の一致と高い評価をいただき、長かった苦労も少しは実を結んだかと感じる次第でした。光合成生物における FLV の反応メカニズムに関してはまだまだ多くの謎が残されていますが、その活性制御メカニズムや生物種における多様性の面白みなど Yagut Allahverdiyeva 氏とはようやく同じ方向性で活発な議論を交わす事ができました。

### おわりに

海外での研究活動を始めてからも感じていたことですが、今回の ePS-1 を通して、自身の研究発信力の弱さを改めて痛感しました。こちらではしばしば、論文を公表すること以上に直接的なディスカッションで相手を説得させる事が極めて重要であり、自身の未熟な言語面と論理力ではまだまだ困難な状況が多いのが実情です。私は今春より海外学振のプロジェクトで 2 年間のフランス滞在をスタートさせましたが、日々、自身に足りないものを思い知らされ、苦労の多い (有意義な) 研究生活を送っております。今回紹介しましたヨーロッパ支部会について第 2 回の詳細はまだ存じませんが、ご興味のある方は是非とも参加してみたいかがでしょうか。

### 情報収集内容

参加者が多い事もあり ePS-1、ePS-1-Young 両方で多岐にわたった光合成研究の発表を聴くことができました。少し特徴的であったのは、開催国のスウェーデンで人気の高いと思われる人工光合成に関する話題が多かったことです。私の発表分野であった光合成電子伝達のセッションもなかなかの盛況であり、口頭発表の部屋には立ち見の方が溢れるほどでした。当分野の中では光化学系 I の反応評価法について新規のアプローチを提案する発表が複数あり、中でもフランスの Benjamin Bailleul 氏の手法は非常にシンプルで興味をそそられました。

学会全体を通じた発表のうち、個人的に最も特筆すべき発表はフィンランドの Yagut Allahverdiyeva 氏による「光合成生物における Flavodiiron protein (FLV) の生理機能の再考」であり、その内容は、<sup>18</sup>O<sub>2</sub> 質量分析測定を用いた FLV2/4 による O<sub>2</sub> 光還元の見証結果でした。Synechocystis sp. PCC 6803 を含む一部のシアノバクテリアは FLV というフラビンタンパク質を 4 つ所有しており、それぞれ FLV1/3 および FLV2/4 の組み合わせでヘテロダイマーを形成していると考えられていますが、FLV1/3 が電子伝達系の過剰電子を O<sub>2</sub> へと安全に散逸していると強く支持される一方で、FLV2/4 については O<sub>2</sub> の光還元は触媒しないという事が定説でした。そんな中、私は神戸大学における博士課程の研究において O<sub>2</sub> 発

## 報告記事

## 第3回光合成細菌ワークショップ開催記録

原田 二郎(久留米大・医)  
浅井 智広(立命館大・生命科学)  
塚谷 裕介(JAMSTEC)

今年3月に札幌で開催された第59回日本植物生理学会年会の関連集会として、第3回光合成細菌ワークショップを開催した。今回のプログラムでは微生物生態と微生物応用と大きく内容を分け、例年通り本会では聞けない発表を演者の方々にして頂いた。トップ演者の花田 智先生(首都大学東京)には、長年の温泉マットの研究から、古代地球環境で推測される光合成細菌の役割と進化について発表して頂いた。次演者の吉澤 晋先生(東京大学)には、細菌がもつプロテオロドプシンの多様性について話して頂いた。海洋表面において太陽光をエネルギー源とするのは光合成生物だけでなく、むしろプロテオロドプシンをもつ生物の方が主流であるという内容は印象的であった。微生物生態系での最終演者の福井 学先生(北海道大学)には、硫黄循環システムを担う微生物群集についてお話いただいた。生命誕生から初期において、エネルギー獲得として主流であったと示唆される還元的環境下での硫黄循環システムは、光合成細菌およびシアノバクテリアの出現により酸化的環境へと移行した際に、変化することを余儀なくされ、それに関わる微生物群集とどのように共進化したかという、興味深い内容であった。

後半トップは、学生の伏見ころろさん(大阪大学)にヘリオバクテリア由来のタイプ I 反応中心の立体構造について発表していただいた。現存の光合成生物の中で構造が未解明であった酸素非発生型タイプ I 反応中心は、唯一ホモダイマー構造をとっており、進化的にも重要な位置づけにある。昨年、米国のグループからその結晶構造の報告があり、発表内容も話題性の高いものであった。続いて樋口美栄子先生(理化学研究所)には、生物が貧栄養時の炭素及びエネルギー所蔵物質として用いるポリヒドロキシアルカン酸(バイオポリエステル的一种)の光合成細菌での生産についてお話いただいた。ポリヒドロキシアルカン酸は石油由来のプラスチックの代替材料として注目されている。光合成細菌におけるその生合成は既知のものとは異なり、応用発展に期待されることを説明していただいた。そしてワークショップ最後には、民秋 均先生(立命館大学)に長年研究されている光合成細菌の特殊なアンテナ系であるクロロソームについてご講演いただいた。クロロソームの光捕集部は色素だけの自己会合体で形成されているが、有機合成のアプローチから生体外で機能性アンテナとして働くようにプログラムすることで、人工光合成系へ発展していく過程をご説明いただき、勉強となった。

オーガナイザーとしての所感を今回も少し記述したいと思う。今回で本ワークショップを3回目と数えられるまで続けることができ、また開催の度に少しずつ参加人数が増えているのは嬉しい限りである。そうなるように、世話人同士で毎回プログラム内容の検討に苦勞しているといった話は昨年の本誌4月号に書かせていただいた。それに加えて、プログラム編成では若い方に発表していただくことを心掛けている。特に学生枠を設けており、毎回学生1人には話していただいている。これは光合成細菌研究が次の世代に繋がるようにというのが大きな理由である。研究者人口が多くないので、若い方の発表者探しには骨を折るが、過去の学生・若手発表者がまた参加してくれているのを見かけると嬉しく感じる。さらに、これは我々自身も分野外の研究に目を向ける良い機会となっている。実際この過程において、光合成細菌研究の土台を作るとともに、広い分野の研究者と関係することがなされている。

ワークショップがこの様に集まった方々の、分野や世代を超えた交流の場になれば幸いである。講演会後の交流会では、若い方を含めた多くの方にご参加いただき、活発な議論や会話が盛り上がっていた様子がうかがえたので、今回も開催してよかったと感じている。今年 8 月にカナダ・バンクーバーで開催された ISPP(国際原核光合成生物シンポジウム)に参加した際には、学生を含めた日本人研究者の参加が目立った。この様な国際会議での日本人の活躍に、本ワークショップが少しでも貢献できればと思い、次回以降もプログラムの検討に腐心したいと思う。

## 事務局からのお知らせ

### ★入会案内

本会へ入会を希望される方は、会費（個人会員年会費：¥1,500、賛助法人会員年会費：¥50,000）を郵便振替（加入者名：日本光合成学会、口座番号：00140-3-730290）あるいは銀行振込（ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキュウと入力)、当座、0730290 名前：ニホンコウゴウセイガクカイ）にて送金の上、次ページの申し込み用紙、または電子メールにて、氏名、所属、住所、電話番号、ファックス番号、電子メールアドレス、入会希望年を事務局までお知らせください。

### ★会費納入のお願い

学会の運営は、皆様に納めていただいております年会費によりまかなわれております。当該年度の会費が未納の場合、光合成研究が送られてくる封筒に、会費未納が印字されています。ご都合のつくときに、会費を納入ください。1年間会費を滞納された場合、次年度よりお名前が会員名簿から削除され、光合成研究は届かなくなります。再入会される場合は、未納の分もあわせてお支払いいただきます。会費納入状況などにつきましては、ご遠慮なく事務局（sonoike@waseda.jp）までお問い合わせください。会員の皆様のご理解とご協力をお願い申し上げます。

## 日本光合成学会会員入会申込書

平成 年 月 日

日本光合成学会御中

私は日本光合成学会の趣旨に賛同し、平成 年より会員として入会を申し込みます。

[ ]内に会員名簿上での公開承諾項目に○印をつけてください

[ ] 氏名 (漢字) (必須)

氏名 (ひらがな)

氏名 (ローマ字)

[ ] 所属

[ ] 住所 1

〒

[ ] 住所 2 (自宅の方または会誌送付先が所属と異なる場合にのみ記入)

〒

[ ] TEL1

[ ] TEL2 (必要な方のみ記入)

[ ] FAX

[ ] E-mail

個人会員年会費 1,500 円 (会誌、研究会、ワークショップなどの案内を含む)

賛助法人会員年会費 50,000 円 (上記と会誌への広告料を含む)

(振込予定日: 平成 年 月 日) (会員資格は1月1日~12月31日を単位とします)

\* 複数年分の会費を先払いで振り込むことも可能です。その場合、通信欄に (何年度~何年度分) とお書き下さい。

### 連絡先

〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

岡山大学 異分野基礎科学研究所

高橋裕一郎 研究室内

日本光合成学会

TEL : 086-251-7861

FAX : 086-251-7876

ホームページ: <http://photosyn.jp/>

郵便振替口座 加入者名: 日本光合成学会 口座番号: 00140-3-730290

銀行振込の場合 ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキョウと入力)、当座、0730290

名前: ニホンコウゴウセイガッカイ

## 日本光合成学会会則

### 第1条 名称

本会は日本光合成学会（The Japanese Society of Photosynthesis Research）と称する。

### 第2条 目的

本会は光合成の基礎および応用分野の研究発展を促進し、研究者相互の交流を深めることを目的とする。

### 第3条 事業

本会は前条の目的を達成するために、シンポジウム開催などの事業を行う。

### 第4条 会員

#### 1. 定義

本会の目的に賛同する個人は、登録手続を経て会員になることができる。また、団体、機関は、賛助会員になることができる。

#### 2. 権利

会員および賛助会員は、本会の通信および刊行物の配布を受けること、本会の主催する行事に参加することができる。会員は、会長を選挙すること、役員に選出されることことができる。

#### 3. 会費

会員および賛助会員は本会の定めた年会費を納めなければならない。

### 第5条 組織および運営

#### 1. 役員

本会の運営のため、役員として会長1名、事務局長1名、会計監査1名、常任幹事若干名をおく。役員の任期は2年とする。会長、常任幹事は連続して二期を越えて再任されない。事務局長は五期を越えて再任されない。会計監査は再任されない。

#### 2. 幹事

幹事数名をおく。幹事の任期は4年とする。幹事の再任は妨げない。

#### 3. 常任幹事会

常任幹事会は会長と常任幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。常任幹事会は本会の運営に係わる事項を審議し、これを幹事会に提案する。事務局長と会計監査は、オブザーバーとして常任幹事会に出席することができる。

#### 4. 幹事会

幹事会は役員と幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。幹事会は、常任幹事会が提案した本会の運営に係わる事項等を審議し、これを決定する。

#### 5. 事務局

事務局をおき、事務局長がこれを運営する。事務局は、本会の会計事務および名簿管理を行う。

#### 6. 役員および幹事の選出

会長は会員の直接選挙により会員から選出される。事務局長、会計監査、常任幹事は会長が幹事の中から指名し、委嘱する。幹事は常任幹事会によって推薦され、幹事会で決定される。会員は幹事を常任幹事会に推薦することができる。

### 第6条 総会

1. 総会は会長が招集し、出席会員をもって構成する。議長は出席会員から選出される。

2. 幹事会は総会において次の事項を報告する。

1) 前回の総会以後に幹事会で議決した事項

2) 前年度の事業経過

3) 当年度および来年度の事業計画

3. 幹事会は総会において次の事項を報告あるいは提案し、承認を受ける。

- 1) 会計に係わる事項
- 2) 会則の変更
- 3) その他の重要事項

#### 第7条 会計

本会の会計年度は1月1日から12月31日までとする。当該年度の経理状況は、総会に報告され、その承認を受ける。経理は、会計監査によって監査される。本会の経費は、会費および寄付金による。

#### 付則

第1 年会費は個人会員1,500円、賛助会員一口50,000円とする。

第2 本会則は、平成14年6月1日から施行する。

第3 本会則施行後第一期の会長、事務局長、常任幹事にはそれぞれ、第5条に定める規定にかかわらず、平成14年5月31日現在の会長、事務局担当幹事、幹事が再任する。本会則施行後第一期の役員および幹事の任期は、平成14年12月31日までとする。

第4 本会則の改正を平成21年6月1日から施行する。

### 日本光合成学会の役員選出に関する申し合わせ

平成27年5月27日 幹事会

#### 1. 選挙管理委員会

本会の選挙を公正に実施するため、選挙管理委員会を置く。選挙管理委員2名は常任幹事会が幹事会に推薦し、決定する。選挙管理委員の互選により委員長を選出する。

#### 2. 会長〔会則第5条第6項〕

##### 1) 幹事および常任幹事による若干名の候補者の推薦方法

幹事は、会長選挙に推薦する候補者としてふさわしい会員を3名連記で投票する。投票結果が上位の会員について、常任幹事会は、本人の意向を確認した上で、若干名を推薦候補者として決定する。選挙事務は事務局長が執り行う。

##### 2) 会長選挙

会長選挙の実施に当たっては、会員に推薦候補者を提示し、全会員による単記無記名投票を実施する。最高得票者を、次期会長とする。得票数が同数の場合は、抽選により決定する。選挙事務は選挙管理委員会が執り行う。

### 日本光合成学会の運営に関する申し合わせ

#### 1. 幹事会

幹事は光合成及びその関連分野の研究を行うグループの主催者である等、日本の光合成研究の発展に顕著な貢献をしている研究者とする。任期は4年とするが、原則として再任されるものとする。

#### 2. 事務局

事務局長の任期は2年とするが、本会の運営を円滑に行うため、約5期(10年)を目途に再任されることが望ましい。

#### 3. 次期会長

会長の引き継ぎを円滑に行うため、次期会長の選挙は任期の1年前に行う。

#### 4. 常任幹事会

常任幹事会の運営を円滑におこなうため、次期会長は常任幹事となる。

## 幹事会名簿

秋本誠志	神戸大学大学院理学研究科	高市真一	東京農業大学生命科学部
栗井光一郎	静岡大学大学院理学領域	高橋裕一郎	岡山大学異分野基礎科学研究所
池内昌彦	東京大学大学院総合文化研究科	田中 歩	北海道大学低温科学研究所
石北 央	東京大学大学院工学研究科	田中 寛	東京工業大学資源化学研究所
泉井 桂	近畿大学生物理工学部生物工学科	田中亮一	北海道大学低温科学研究所
伊藤 繁	名古屋大学	民秋 均	立命館大学総合理工学院
井上和仁	神奈川大学理学部	都筑幹夫	東京薬科大学生命科学部
伊福健太郎	京都大学大学院生命科学研究所	出羽毅久	名古屋工業大学大学院工学研究科
榎並 勲	東京理科大学	寺島一郎	東京大学大学院理学系研究科
得平茂樹	首都大学東京大学院理工学研究科	輛 達也	東京理科大学理学部
遠藤 剛	京都大学大学院生命科学研究所	仲本 準	埼玉大学大学院理工学研究科
大岡宏造	大阪大学大学院理学研究科	永島賢治	神奈川大学
太田啓之	東京工業大学	成川 礼	静岡大学大学院理学研究科
	バイオ研究基盤支援総合センター	南後 守	大阪市立大学大学院理学研究科
大友征宇	茨城大学理学部	西田生郎	埼玉大学大学院理工学研究科
大政謙次	東京大学大学院農学生命科学研究科	西山佳孝	埼玉大学大学院理工学研究科
小川健一	岡山県農林水産総合センター	野口 航	東京薬科大学生命科学部
	生物科学研究所	野口 巧	名古屋大学理学研究科
小俣達男	名古屋大学大学院生命農学研究科	長谷俊治	大阪大学蛋白質研究所
垣谷俊昭	名古屋大学	林 秀則	愛媛大学プロテオサイエンスセンター
菓子野康浩	兵庫県立大学理工学部	原登志彦	北海道大学低温科学研究所
柏山祐一郎	福井工業大学環境情報学部	彦坂幸毅	東北大学大学院生命科学研究所
金井龍二	埼玉大学	久堀 徹	東京工業大学大学院化学生命科学研究科
神谷信夫	大阪市立大学複合先端研究機構	日原由香子	埼玉大学大学院理工学研究科
熊崎茂一	京都大学大学院理学研究科	福澤秀哉	京都大学大学院生命科学研究所
栗栖源嗣	大阪大学蛋白質研究所	藤田祐一	名古屋大学大学院生命農学研究科
小池裕幸	中央大学理工学部	古本 強	龍谷大学農学部
小林正美	筑波大学大学院数理工学研究所	前 忠彦	東北大学
坂本 亘	岡山大学資源生物科学研究所	牧野 周	東北大学大学院農学研究科
佐賀佳央	近畿大学理工学理学部	増田真二	東京工業大学
櫻井英博	早稲田大学		バイオ研究基盤支援総合センター
佐藤公行	岡山大学	増田 建	東京大学大学院総合文化研究科
佐藤直樹	東京大学大学院総合文化研究科	松浦克美	首都大学東京都市教養学部
鹿内利治	京都大学大学院理学研究科	松田祐介	関西学院大学理工学部
重岡 成	近畿大学農学部	真野純一	山口大学農学部
篠崎一雄	理化学研究所植物科学研究センター	皆川 純	基礎生物学的研究所
嶋田敬三	首都大学東京	宮尾光恵	東北大学大学院農学研究科
白岩義博	筑波大学生物科学系	宮下英明	京都大学大学院地球環境学堂
沈 建仁	岡山大学異分野基礎科学研究所	宗景 (中島) ゆり	関西学院大学理工学部
杉浦昌弘	名古屋市立大学	村田紀夫	基礎生物学的研究所
	大学院システム自然科学研究科	本橋 健	京都産業大学総合生命科学部
杉浦美羽	愛媛大学プロテオサイエンスセンター	矢守 航	東京大学大学院理学系研究科
杉田 護	名古屋大学遺伝子実験施設	横田明穂	奈良先端科学技術大学院大学
杉山達夫	名古屋大学		バイオサイエンス研究科
鈴木祥弘	神奈川大学理学部	和田 元	東京大学大学院総合文化研究科
園池公毅	早稲田大学教育学部		

## 編集後記

高温、地震、大雨、台風など、日本各地で未曾有の異常気象が続いています。皆様におかれましても、被害等が出ていないことを切に願います。今号では、2018年5月27日に東北大学青葉山新キャンパスで開催された第9回日本光合成学会・公開シンポジウム「チラコイド膜超複合体の構造とダイナミクス」でご講演していただいた方から、お二人の方に特集記事をお願いしました。また、その年会でポスター発表賞を受賞されたお二人にも、早速、研究紹介記事を頂きました。少し執筆期間が短い中、記事をご投稿いただき、感謝申し上げます。また、編集の都合で雑誌の発行が例年より遅れましたことをお詫びいたします。

今号に関するご意見や本誌に対するご要望がございましたら、伊福までご連絡ください。また、研究紹介や解説、トピックスなどの記事を随時受け付けております。表紙にふさわしい写真、図等も募集しており、採用された場合は紹介記事の掲載なども可能です。どうぞよろしく願いいたします。

編集長・伊福 健太郎 (京都大学)

## 記事募集

日本光合成学会では、会誌に掲載する記事を会員の皆様より募集しています。募集する記事の項目は以下の通りです。

- トピックス：光合成及び関連分野での纏まりのよいトピックス的な記事。
- 解説：光合成に関連するテーマでの解説記事。
- 研究紹介：最近の研究結果の紹介。特に、若手、博士研究員の方からの投稿を期待しています。
- 集会案内：研究会、セミナー等の案内。
- 求人：博士研究員、専門技術員等の募集記事。
- 新刊図書：光合成関係、または会員が執筆・編集した新刊図書の紹介。書評も歓迎します。

記事の掲載を希望される方は、編集長の伊福 (ifuku@kais.kyoto-u.ac.jp) までご連絡ください。

「光合成研究」編集委員会

編集長 伊福 健太郎 (京都大学)  
編集委員 粟井 光一郎 (静岡大学)  
編集委員 成川 礼 (静岡大学)  
編集委員 矢守 航 (東京大学)

---

日本光合成学会 2018年度役員

会長 高橋 裕一郎 (岡山大学)  
事務局長 園池 公毅 (早稲田大学)

常任幹事 田中 歩 (北海道大学) 前会長  
常任幹事 鹿内 利治 (京都大学) 前事務局長  
常任幹事 松田 祐介 (関西学院大学) 年会 2015年  
常任幹事 柏山 祐一郎 (福井工業大学) 年会 2016年  
常任幹事 杉浦 美羽 (愛媛大学) 年会 2017年  
常任幹事 古本 強 (龍谷大学) 年会 2017年  
常任幹事 牧野 周 (東北大学) 年会 2018年  
常任幹事 宮尾 光恵 (東北大学) 年会 2018年  
常任幹事 輦 達也 (東京理科大学) 光生物学協会  
常任幹事 石北 央 (東京大学)  
常任幹事 伊福 健太郎 (京都大学) 編集長

会計監査 藤田 祐一 (名古屋大学)  
ホームページ 加藤 裕介 (岡山大学)

---

光合成研究 第28巻 第2号 (通巻82号) 2018年8月31日発行

日本光合成学会

〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

岡山大学 異分野基礎科学研究所

高橋 裕一郎 研究室内

TEL : 086-251-7861

FAX : 086-251-7876

e-mail : jspr@photosyn.jp

ホームページ : <http://photosyn.jp/>

郵便振替口座 加入者名 : 日本光合成学会 口座番号 : 00140-3-730290

銀行振込の場合 ゆうちょ銀行、019店 (ゼロイチキュウと入力)、当座、0730290

名前 : ニホンコウゴウセイガツカイ

---