HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | ヒメツリガネゴケの光化学系I-II超複合体の解析 |
| Author(s) | 古川, 亮 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(生命科学) |
| Dissertation Number | 甲第13955号 |
| Issue Date | 2020-03-25 |
| DOI | https://doi.org/10.14943/doctoral.k13955 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/80071 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Ryo_FURUKAWA.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士学位論文

# ヒメツリガネゴケの光化学系 I-II 超複合体の解析

北海道大学大学院生命科学院

古川　亮

2020 年 3 月

【目次】


目次 P1

要旨 P2-4

序論 P5-19

材料と方法 P20-23

結果 P24-50

考察 P51-60

謝辞 P61

参考文献 P62-74

## [要旨]

地球上には多様な環境が存在し、しかもその環境は変動し続けている。そのため、生物にとって環境に適応し続けることは非常に重要である。生命誕生以来、地球上で様々な生命が誕生と絶滅を繰り返しながら、しかも多種多様な生命体が現存している、その大きな要因は、地球規模の環境変動に適応し続ける必要がありながら、しかも少なくとも一部の生命がその時代その時代でそれに成功してきたからであると思われる。

地球の生命史の中でも最大級のイベントの一つが光合成生物の誕生である。光合成は地球環境を大きく変え続け、生物進化にも大きな影響を与え続けている。そして光合成生物自身もまた、環境に適応し、進化してきた。光合成生物にとって最も重要な環境の一つは光環境である。光合成は光エネルギー（励起エネルギー）を利用した反応であるため光は不可欠であるが、同時に光は活性酸素を発生させる可能性のある危険なものである。そのため光合成生物は光エネルギーの利用を適切に制御する必要がある。特に強光時には、過剰な励起エネルギーが活性酸素障害を誘発するため、励起エネルギーを安全に熱として放散する機構は非常に重要である。

多くの先行研究から、光合成生物が pH 依存的に励起エネルギーを熱放散する機構を持つことはよく知られている。この反応は数分以内で十分に誘導することができるため、時々刻々とその強度が変化する太陽光下での光合成の制御に重要な役割を担っている。そして、藻類では LHCSR タンパク質、維管束植物では PsbS タンパク質が主にその役割を担うことが明らかになっている。興味深いことに、陸上化を果たした最初期の植物として知られるコケ植物のモデル材料である *Physcomitrella* は LHCSR と PsbS の両方を有している。そして *Physcomitrella* はこの両方の機構を利用できるため、熱放散能が強いことが知られており、この強力な熱放散能は植物の陸上化において重要な役割を果たしたと考えられている。

さらに、緑色植物において熱放散以外に新たな強光適応機構が発見された。それは、2 つ

の光化学系間で励起エネルギーを共有する、スピルオーバーと呼ばれる機構である。とりわけ陸上植物においては光化学系 I（PSI）と光化学系 II（PSII）が空間的に分かれて存在すると考えられており、その両者の間では励起エネルギーの移動は起こらないと考えられてきた。すなわち、PSI と PSII は電子伝達を介して協調的に働いているのであり、光エネルギーは伝達されないと考えられてきたのである。しかし、近年、モデル植物の *Arabidopsis* において PSI と PSII を含む巨大なタンパク質複合体 PSI-PSII megacomplex が発見され、さらにその megacomplex 内では PSI と PSII 間で光エネルギーが伝達可能であることが明らかになった。現時点ではこの生理的意義は十分には解明されていないが、PSI と PSII 間で励起エネルギーを適切に分配するための機構であり、光合成に伴う光酸化的障害に対する防御機構であると考えられている。

この PSI-PSII megacomplex に関しては未解明な点が多く残されている。その 1 つは PSI-PSII megacomplex が緑色植物内でどの程度保存されているか、というものである。これまでに、スピルオーバー活性を有する PSI-PSII megacomplex に関する報告は *Arabidopsis* 以外にはなく、その一般性に関しては全く解明されていない。同時に、PSI-PSII megacomplex にどの程度の多様性があるのかという点に関しても、未解明である。

*Arabidopsis* 以外の PSI-PSII megacomplex を調べるため、本研究では、研究材料として *Physcomitrella* に着目した。*Physcomitrella* は上述したようにコケ植物のモデル材料であり、進化系統的に *Arabidopsis* と遠く離れている。また、*Physcomitrella* の熱放散機構は LHCSR と PsbS の両方を有するものであり、緑藻と維管束植物の中間的な形質を有するユニークなものであると言える。さらに、PSI-LHCI の構造も LHCI の数と配置に関しても、*Arabidopsis* とは異なることが知られている。このように、*Physcomitrella* は PSI-PSII megacomplex の一般性と多様性を調べる上で適した材料であると考えられる。

そこで、本研究では *Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex を精製し、そのタンパク質組成や光合成特性を調べ、*Arabidopsis* の PSI-PSII megacomple と比較した。

まず、large-pore clear-native PAGE (lpCN-PAGE)の結果から、*Physcomitrella* は *Arabidopsis* と同様に PSI-PSII megacomplex を形成することが明らかになった。そして、移動度がほとんど変わらなかったことから、分子量はよく似ていると考えられた。

次に、*Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex のタンパク質組成を 2D-SDS-PAGE で調べた結果、*Arabidopsis* と同様に PSI,PSII、および LHC アンテナが結合していることが明らかになった。PsbS タンパク質も native 電気泳動で PSI-PSII megacomplex と同じ移動度を示したことから、*Arabidopsis* と同様に PSI-PSII megacomplex に結合していることが強く示唆された。さらに、*Arabidopsis* には存在しない LHCSR も PsbS と同様に PSI-PSII megacomplex に結合していることが強く示唆された。なお、この LHCSR は PSII-LHCII supercomplex にも結合していると考えられた。

さらに、*Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex について、クロロフィル蛍光の時間分解解析を行ったところ、その超複合体内で励起エネルギーの移動が行われていること、すなわちスピルオーバー活性を有することが明らかになった。さらに、強光照射後の PSI-PSII megacomplex は低 pH で、LHCSR もしくは PsbS による熱放散が誘導されていることが強く示唆された。これは、強光照射時に、PSI-PSII megacomplex の形成が光酸化的な障害からの回避に寄与することを示唆する結果である。

これらの結果から、陸上植物は PSI-PSII megacomplex に依存するスピルオーバーを幅広く有する可能性が示唆された。また、*Physcomitrella* では LHCSR と PsbS タンパク質に依存する励起エネルギーの熱放散が PSI-PSII megacomplex 内で行われており、それは *Physcomitrella* の強力な熱放散能に貢献しているはずである。そして、本研究で見出した、*Physcomitrella* の LHCSR と PsbS を有するユニークな PSI-PSII megacomplex の発見は、スピルオーバーが陸上植物の進化初期の陸上環境への適応にあたって、貢献した可能性を示唆している。

## [序論]

### 生物進化と光合成

現在、地球上には多種多様な生物が存在するが、その全てが共通の祖先種に由来すると考えられている。その根拠はタンパク質を構成するアミノ酸が約 20 種類に限られることや、エネルギー通貨として ATP を用いていることなど、生命現象の基本的な原理が共通することなどである。では、最初の生命からどのようにして多種多様な生物が誕生したのであろうか。その現象こそが「進化」であり、現在では生物はゲノムの突然変異と自然淘汰を駆動力とする様々な試行錯誤が多種多様な生物の誕生につながったと考えられている。このように進化とは生物が長きにわたりそれぞれの環境に適応し続けた歴史といえる。そしてこの長い生物進化のイベントの中でも最大のイベントの 1 つと考えられているのが、シアノバクテリアによる酸素発生型光合成の出現である（Hohmann-Marriott and Blankenship, 2011)。シアノバクテリアの光合成に伴う酸素の発生は地球の大気組成を変える大きな要因となった（Fig. 1)。それをきっかけとして、酸素呼吸を行う生物が主流になり、さらには真核生物が出現した。真核生物の一部はシアノバクテリアと細胞内共生し、葉緑体を有することで、真核光合成生物が生まれた。これによってさらに酸素濃度が上昇し、オゾン層を形成して紫外線が地表に届かなくなると生物が地上に進出し始めた。このように、酸素発生型光合成生物の誕生と進化は地球の大気環境や生物進化に大きく影響を与えてきた。

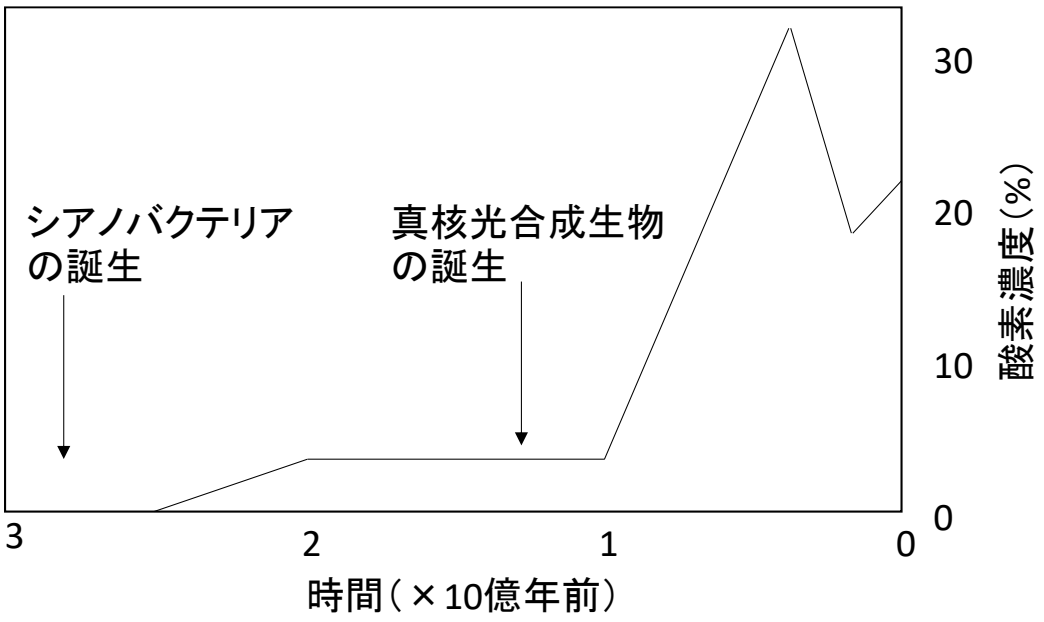


**Fig.1　生物進化と酸素濃度の関係図　（Hohmann-Marriott and Blankenship 2011)**

約30億年くらい前に、シアノバクテリアが誕生し、光合成によって酸素を生成し始めたと考えられている。その光合成によって放出された酸素は、まず海水中の鉄イオンを酸化し、しだいに大気中に酸素が放出されるようになった。そして、約15億年前に、シアノバクテリアの細胞内共生によって真核藻類が誕生すると、さらに酸素濃度が上昇することになった。この光合成活動に伴う酸素濃度の変動は、生物進化にも大きく影響したと考えられている。

## 光合成反応とそのリスク

酸素発生型光合成の反応は水と二酸化炭素から光エネルギーを用いて糖と酸素を合成する反応として非常によく知られている。しかしその機構は非常に複雑であり、未解明な点も多く残されている。ここでは、その光合成の反応についてみていきたい（Fig. 2)。まず光合成は光合成色素（クロロフィルやカロテノイドなど）が光エネルギーを補足して、分子が励起されることで開始される。次に、その励起エネルギーは、2 つの光化学系、すなわち光化学系 I（PSI）および光化学系 II（PSII)、の反応中心クロロフィル二量体まで伝達され、そのエネルギーを利用して 2 つの光化学系の反応中心クロロフィルがそれぞれ電子を放出する。なお、それぞれの吸収波長から、PSI の反応中心クロロフィル二量体は P700、PSII の反応中心クロロフィル二量体は P680 と呼ばれる。そして、PSI から放出された電子はフェレドキシンを還元し、さらに NADPH を合成するために利用される。一方、PSII の反応中心から放出された電子は PSI の反応中心に伝達され、電子を失った PSI の反応中心クロロフィル二量体（$P700^{+}$）を還元する。やはり電子を失った PSII の反応中心クロロフィル二量体（$P680^{+}$）は水から電子を受け取り、$H^{+}$と酸素が生成される。また、PSII から PSI への電子の伝達に伴っても $H^{+}$の濃度差が生じる。こうしてできた $H^{+}$濃度の差を用いて ATP 合成酵素は ATP を合成することができる。つまり、光合成ではまず ATP と NADPH が生産され、さらにその化学エネルギーが代謝の駆動力になる。その 1 つは、二酸化炭素を固定還元して糖が合成される反応であるが、それ以外にも窒素代謝や硫黄代謝などの様々な代謝の駆動力になっている。以上が光合成の概要であるが、ここでいくつか注目したい点がある。まず酸素発生型光合成では PSI と PSII の 2 つの光化学系が協調的に機能しているため、それら 2 つの活性のバランスを保つことが重要である。次に光合成は多くの反応が関係しあって多段階的に反応が進むため、光合成を制御するためには、様々な制御機構が必要である。そして何よりも、励起状態のクロロフィルは酸素分子と反応し活性酸素を生成してしまうことが知られており、光合成では副産物としての酸素分子の生成は不可避であるた

め、光合成は常に活性酸素種種を生成し続けてしまう反応でもある。この観点から考えると光合成は光合成生物にとって危険な反応であり、常に適切に制御される必要がある。

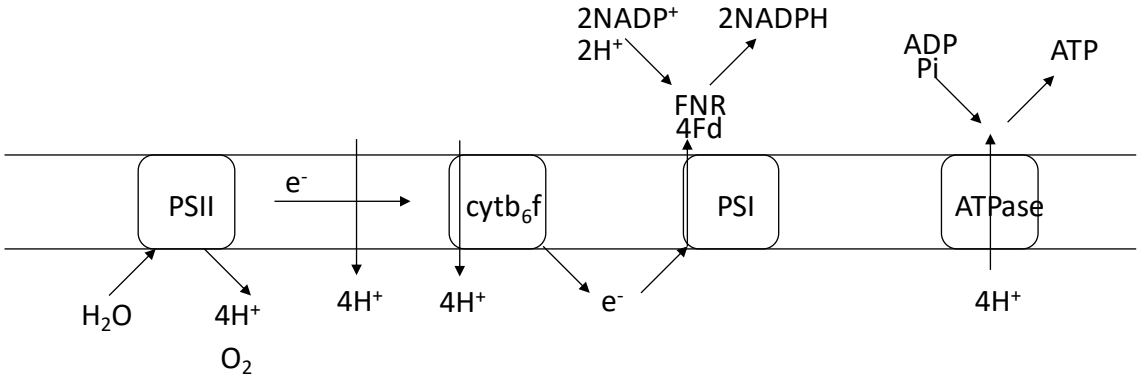


**Fig.2　光合成電子伝達反応 のスキーム**

光化学系II（PSII）は光エネルギーを利用して、水を分解して酸素を発生する。PSIIから放出された電子はチトクローム$b_6$/f（Cyt $b_6$/f）を経由してPSIに届けられ、還元型のフェレドキシン（Fd) やNADPHの合成に利用される。同時に、チラコイド膜内外の電子伝達によって生じた$H^+$の濃度差を利用してATPaseが駆動しATPを合成する。合成された還元力（Fdの還元型とNADPH)とATPは糖などの代謝の駆動力となる。

## 光合成生物の光環境適応機構

光合成は光エネルギーを補足して電子の流れを作ることから始まるため光合成に光は不可欠であるが、光環境はその生物の生息する環境によって大きく異なる。生物にとって環境に適応することは非常に重要であるが、光合成生物にとって光環境は最も重要な環境の一つである。実際に様々な場所に光合成生物は存在するがそれらは見事に生息域の光環境に適した色素組成を持つことで適応している。異なる光環境の代表的な例としては水中と陸上の違いが考えられる。ここでは極端な例として深海と陸上の違いについて考えてみたい。まず深海の光環境は非常に暗く、光の強度としては数 μmol photons/m²/s 程度である。さらにその波長は水中では水分子によって長波長が、水中の有機物によって低波長が吸収され深海に届く波長は青色の領域に偏っている（Stomp et al. 2007）。この弱くて限られた波長域の光のみを効率的に集めるため、深海に生息する *Palmophyllum crassum* などはクロロフィル *b* を極端に多く持っている（Kunugi et al. 2016）。一方、地上では光は非常に強く光強度は 1,000 μmol photons/m²/s を超える。さらに雲などの陰になることで非常に短い時間でその強度は劇的に変化する。この非常に強く短時間で大きく変化する光環境に適応するために陸上に生息する光合成生物は補足した光エネルギーを熱として安全に放散するための機構を備えていることが知られている。これは光合成が危険な反応であることと多段階的に成り立っていることと関係している。まず光合成は複数の反応が互いに関係しあって初めて達成されるため光合成全体の反応速度はそれぞれの反応の中で最も遅い反応によって決まる。通常律速となるのは二酸化炭素の固定や PSII から PSI への電子の伝達である。これらの反応はクロロフィルが光エネルギーを補足することで開始されるが、クロロフィルが光を補足する反応、それ自体を制御することは難しい。そして励起したクロロフィルは酸素分子と反応して活性酸素を発生し得る。すなわち、クロロフィルの励起状態は非常に危険であるため、光合成速度の律速過程を超えるような過剰な光エネルギーを吸収した際には、励起したクロロフィルからエネルギーを熱として放散する手段が必要になるのであ

る。

**緑色植物の陸上環境への進出と光合成の進化**

光合成生物が陸上に生息するためには強くて短時間で大きく変化する光環境への適応が不可欠である。そのため過剰な光エネルギーを熱として放散する機構や 2 つの光化学系のバランスを保つ機構などが必要である。ここで光合成の防御機構についてこれまでに明らかにされている機構をいくつか紹介する（Fig. 3 および Fig. 4）。まず過剰な光エネルギーを熱として放散する熱放散機構が挙げられる（Niyogi and Truong 2013; Goss and Lepetit 2015; Minagawa and Tokutsu 2015; Ruban 2015; Xu et al. 2015; Ruban 2016; Wobbe et al. 2016）。この機構は「flexible NPQ」や「qE クエンチング」とも呼ばれる。この熱放散はチラコイド膜内外の pH の差によって誘導されることが知られており、強光照射後、数秒から数分で誘導される。維管束植物ではこの熱放散機構は PsbS タンパク質により活性化されることが明らかになっているが、藻類では LHCSR タンパク質がその役割を担っていることが明らかになっている。また、熱放散には PsbS や LHCSR だけでなく、光合成色素である zeaxanthin も必要である。Zeaxanthin 合成はキサントフィルサイクルと呼ばれる機構で制御されており、やはり強光照射によって誘導される。次に、2 つの光化学系のバランスを保つための機構として state transition（ステート遷移）が挙げられる。ステート遷移は緑色植物の周辺アンテナである light-harvesting complex II (LHCII) が 2 つの光化学系を可逆的に移動することで、励起エネルギーの分配を制御する機構である（Minagawa and Tokutsu 2015; Xu et al.2015; Wobbe et al.2016）。この LHCII の移動は redox-active kinases によって LHCII がリン酸化されることで制御されている（Bellafiore et al.2005; Pesaresi et al.2009）。ステート遷移の誘導、解消も数分で起こることが知られており、熱放散と同様に、時々刻々と変化する光環境への迅速な適応機構として重要な役割を担っている。最後にスピルオーバー（spillover）も励起エネルギーの分配制御に関係していると考

えられている（Fig. 5）。スピルオーバーは励起エネルギーを 2 つの光化学系の間で共有する現象である。具体的には、PSII が吸収した励起エネルギーを PSI に伝達する反応、および、その逆に PSI が吸収した励起エネルギーを PSII に伝達する反応を指す（Yokono et al. 2015; Yokono et al. 2019）。しかし、これまでの緑色植物におけるスピルオーバーに関する研究は非常に限られている。

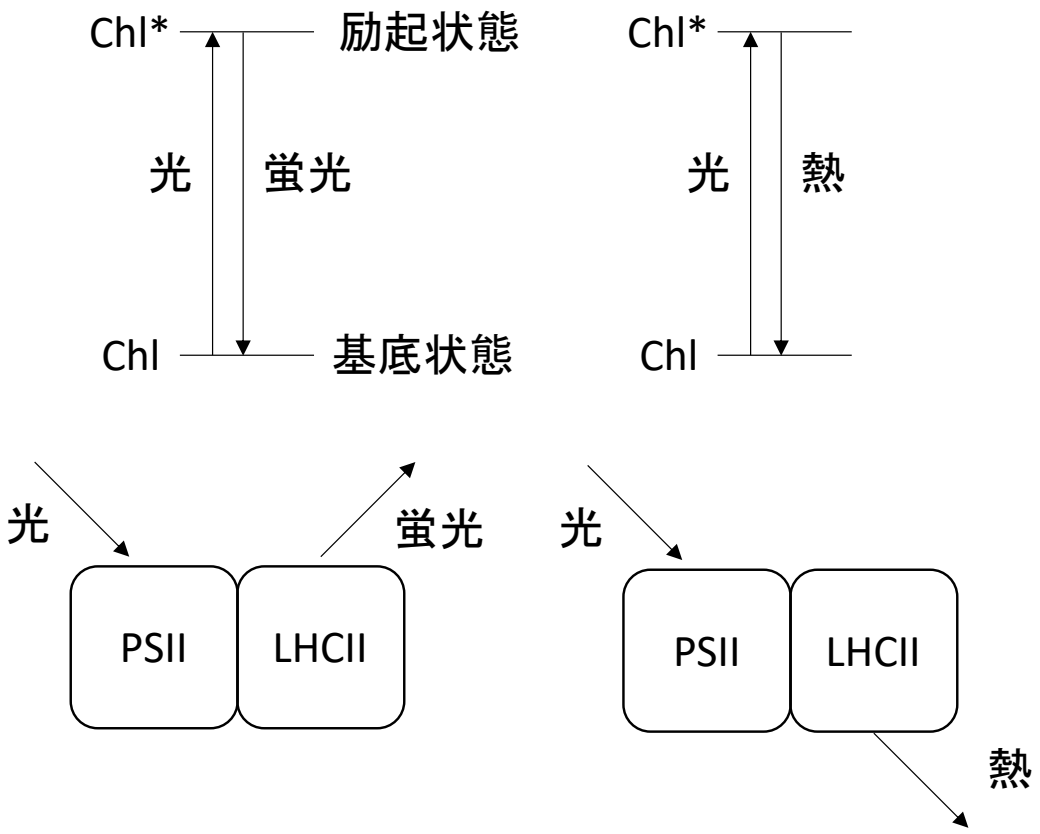


**Fig.3　熱放散**

クロロフィル（Chl）は光を吸収して励起状態（Chl*）となる。その後、反応中心クロロフィルに励起エネルギーを伝達し光合成を行う一方で、その一部は蛍光や熱などによりエネルギーを放出して基底状態に戻る。なお、Chlの励起状態が長く続くと酸素と反応し活性酸素の生成が誘発されるため、強光下などでは、PsbSやLHCSRタンパク質の関与により、励起エネルギーの熱放散能が上昇する。

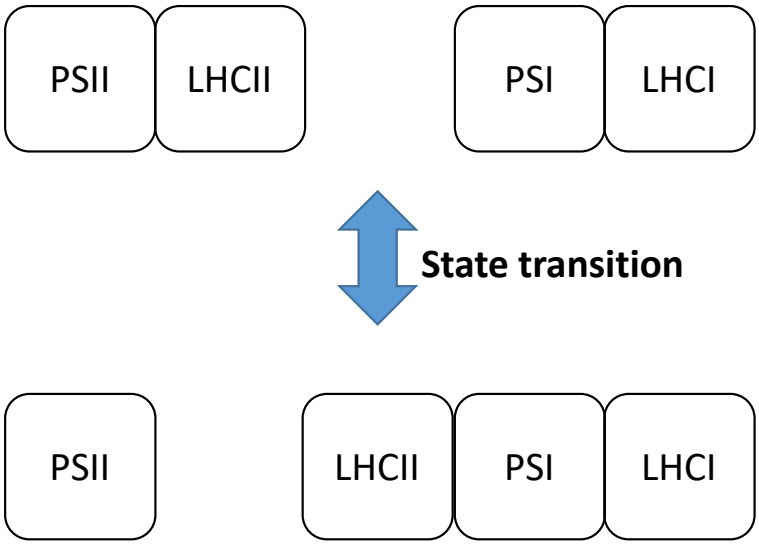


**Fig.4　State transition（ステート遷移）の概念図**

LHCII アンテナを光環境に応答して光化学系I（PSI）と PSII の間で移動させることで、PSI と PSII のアンテナサイズを調節し、それにより、PSI と PSII の働きを調節する反応をステート遷移と呼ぶ。

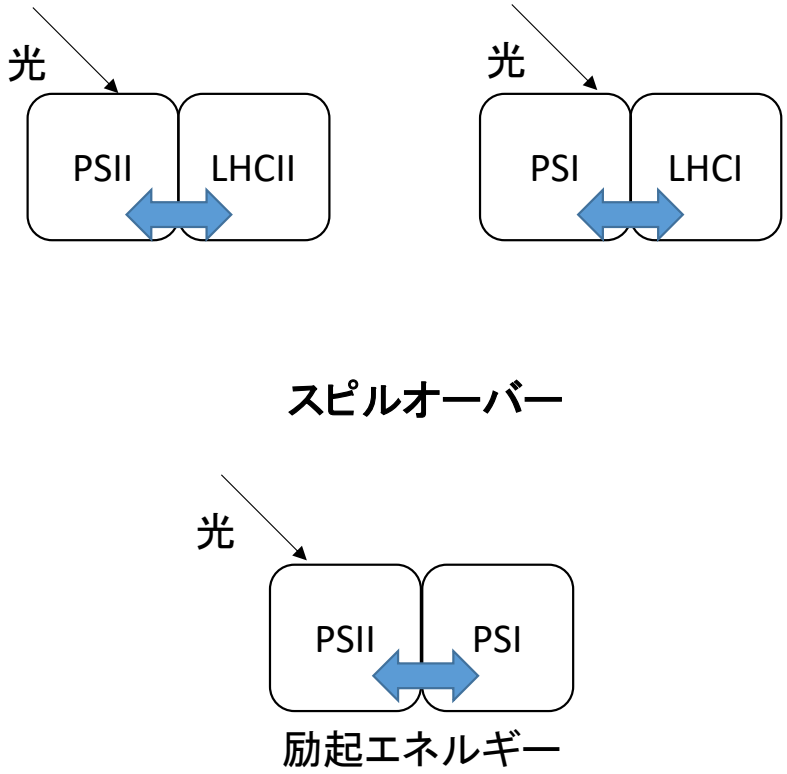


**Fig.5 スピルオーバー**

LHC アンテナのクロロフィルが補足したエネルギーは、結合している PSI または PSII に伝達される。このLHCアンテナの機能により、PSI や PSII はアンテナサイズを増やすことができる。この現象はよく知られている。一方、スピルオーバーは PSI と PSII の間で励起エネルギーが共有される現象で、2つの光化学系間のエネルギー分配などに有効であると考えられている。この現象に関しては未解明な点が多く残されている。

### 光化学系 I-II 超複合体（PSI-PSII megacomplex）の発見

上述のとおり、光合成の光環境適応機構は盛んに研究が行われており、熱放散やステート遷移、スピルオーバー（spillover）などが知られている。しかし緑色植物におけるスピルオーバーに関する研究は非常に限られてきた。その理由はスピルオーバーの活性を測定することが難しいこと、そしてスピルオーバーの機構が不明であったことである。また、陸上植物では PSII と PSI が空間的に異なる局在を示すと考えられてきたこともその一因であると考えられる。具体的には、チラコイド膜の中で、PSII は grana core (grana stacking) に局在し、PSI は stroma lamellae に局在すると考えられており、PSI と PSII はチラコイド膜で共局在しないと考えられてきたのである。しかし、Jarvi らはモデル光合成植物である *Arabidopsis thaliana*（以下 *Arabidopsis*）において PSI と PSII の両方を含む巨大なタンパク質複合体（PSI-PSII megacomplex）が存在することを初めて報告した（Jarvi et al. 2011）。この巨大な複合体は grana core と stroma lamellae のマージナルな領域である grana margin に局在すると考えられた。さらに、Yokono らは、*Arabidopsis* の葉、および、電気泳動で分離した PSI-PSII megacomplex 内の 2 つの光化学系でスピルオーバーが見られることの分光化学的な証拠を示した（Yokono et al. 2015）。これにより PSI と PSII が複合体を形成し、その内部で励起エネルギーを共有できることが明らかになった。この発見は空間的に分かれて存在していると信じられてきた PSI と PSII が直接相互作用して巨大な複合体を形成し、その複合体内部で励起エネルギーを共有することで、2 つの光化学系間の励起エネルギーバランスを制御し得ることを示唆している。

では、スピルオーバーはどのような生理的意義を持つのであろうか？現時点では 2 つの機構が考えられている。1 つ目は、2 つの光化学系の励起エネルギーの分配制御である。例えば、PSII が吸収した光エネルギーを PSI に伝達したとすれば、PSII のアンテナサイズが小さくなり、PSI のアンテナサイズが大きくなったことになる。言い方を変えれば、PSII が PSI のアンテナとして機能したことになる。このような機構で 2 つの光化学系間の励起エ

ネルギーの分配バランスを調節することが可能である。2 つ目は、熱放散機能である。実は電子を失った PSI の反応中心（$P700^+$）は強力な熱放散能を有することが知られている。そのため、PSII から PSI へと移動した励起エネルギーを PSI の $P700^+$が効率よく熱放散することが可能である。この場合、PSI は PSII のクエンチャーとして機能することになる。このような 2 つの機構により、スピルオーバーは光化学系の防御機構として機能していると考えられる。そしてこれらの機能は、光強度が時々刻々と大きく変化し続ける陸上の光環境への適応には特に有効であったと考えられる。しかしながら、スピルオーバーの生理的な意義に関しては、*Arabidopsis* においてもその変異株が現時点では報告されていないことなどから、不明な点が多く、今後のさらなる研究が必要である。

### *Physcomitrella patens*（ヒメツリガネゴケ）の進化的な位置とそのユニークな光化学系

緑色植物は陸上化に成功した唯一の光合成生物であるといえるがその起源は水中であると考えられている。水中から陸上へ進出する際には様々な環境の変化があり、それらに適応することで陸上化が可能となったはずである。陸上化に関する研究は乾燥耐性や形態など様々な方向から研究が行われているが、光合成の観点からの研究は多くない。しかし光合成において陸上化は光環境の大きな変化であり、非常に重要な環境の変化である。そこで陸上化初期の緑色植物である *Physcomitrella patens*（以下 *Physcomitrella*）に着目した。

*Physcomitrella* はコケ植物のモデル植物であり、緑藻から陸上植物への光化学系の進化を理解するために適した研究材料である。コケ植物は、陸上植物の進化の初期に分岐した植物であり、緑藻と維管束植物の光合成システムの中間的な形質を示すことが知られている（Niyogi and Truong 2013）。実際、*Physcomitrella* は熱放散に関して、陸上植物に特有の PsbS に依存した熱放散機構と藻類に特有の LHCSR に依存した熱放散機構の両方を兼ね備えている（Peers et al. 2009; Niyogi and Truong 2013; Iwai and Yokono 2017）。

なお、維管束植物は進化の過程で LHCSR を失っているため、PsbS に依存する熱放散機構のみを有していることが明らかになっている（Niyogi and Truong 2013）。そして、緑藻は PsbS と LHCSR の両方を有しているが、熱放散機構は主に LHCSR に依存している。最近の研究（Correa-Galvis et al.2016）では *Chlamydomonas* の PsbS が LHCSR 依存的な熱放散機構の活性化に必要であることが報告され、緑藻では PsbS は LHCSR 依存的な熱放散機構の制御因子であることが示唆された。

対照的に、*Physcomitrella* では PsbS と LHCSR は独立に、相加的に、機能していると考えられている。まず、チラコイド膜における PsbS の局在は LHCSR とは異なることが報告されている（Pinnola et al. 2015）。さらに、PsbS と LHCSR の片方だけの欠損株はいずれも熱放散能の減少を引き起こし、両方を同時に欠損させることで初めて熱放散能がほぼ 0 にまで減少することが明らかとなっている（Alboresi et al. 2010; Gerotto et al. 2011）。さらにそれらの生理的な意義に関しては、PsbS と LHCSR の両方が欠損した変異体では片方だけを欠損した変異体よりも、強光でより深刻な表現型を示すことが報告されており（Alboresi et al. 2010）、両経路が強光ストレスへの防御機構として重要な役割を担うことが明らかになっている。さらに *Physcomitrella* は PsbS と LHCSR に依存する熱放散機構を相加的に引き起こすことができるため、維管束植物よりも高い熱放散能を有する（Alboresi et al.2010）。これらの知見はコケ植物が熱放散に関して、緑藻と維管束植物の中間的な形質を有すること、そしてそれゆえに強力な熱放散能を有することを示しており、これらのユニークな熱放散機構が陸上の強くて変化の激しい光環境への初期の適応として寄与していることを示唆している（Alboresi et al. 2010）。

### 本研究目的　－Physcomitrella の PSI-PSII megacomplex の解析

これまで述べてきたように、*Arabidopsis* は PSI-PSII megacomplex を形成し、その超複合体はスピルオーバー活性を有することが明らかになった（Jarvi et al. 2011; Yokono et

al. 2015)。また、PSI-PSII megacomplex は PsbS を結合していることが明らかになっており、その PsbS はその分子機能から光防御に寄与すると考えられる。これらのことから、PSI-PSII megacomplex の形成は陸上の光環境適応に貢献していると考えられる。一方で、Arabidopsis 以外の緑色植物においてスピルオーバー活性を有する PSI-PSII megacomplex の報告はなく、他の植物を用いたさらなる解析が必要である。

なかでも、*Physcomitrella* は藻類型の LHCSR と陸上植物型の PsbS を両方持ち、それらを独立に相加的に引き起こすことができるため、高い熱放散機能を有する。そのため、*Physcomitrella* は PSI-PSII megacomplex を形成し、PsbS だけでなく LHCSR も含む可能性がある。そして、もしスピルオーバー活性を有していれば、LHCSR の強力なクエンチング能も含めて、PSI-PSII megacomplex は光防御機構に重要である可能性が考えられる。

そこで本研究では *Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex の解析を行った。具体的には、*Physcomitrella* が PSI-PSII megacomplex を形成していることを明らかにし、さらに LHCSR や PsbS と結合していることを明らかにした。さらに、分光学的な解析から、PSI-PSII megacomplex はスピルオーバー活性を有すること、そしておそらくは LHCSR や PsbS の関与により、PSI-PSII megacomplex 内部で pH 依存的なクエンチングが生じることも明らかにした。これらの結果から、*Physcomitrella* は LHCSR、PsbS が結合したユニークな PSI-PSII megacomplex を形成すること、そしてその複合体形成により光強度が強く激しく変動し続ける陸上の光環境への適応に寄与し得ることが明らかになった。

## [材料と方法]

### 植物の育成

*Physcomitrella patens* の原糸体を BCDAT 培地（(Nishiyama et al. 2000）の BCD 培地に 1 mM $CaCl_2$ と 5 mM di-ammonium [+]-tartrate を加えて 0.8%(w/v)の agar で固めたもの）の上にセロハンを敷いてその上で 25℃、continuous light（40 $\mu$ mol photon $m^{-2}$ $s^{-1}$）の下で培養した。培養 4 日目の原糸体を弱光サンプルとした。同じく培養 4 日目の原糸体に cold spot fiber potics（PCS-UMX250, NPI, Tokyo, Japan）を用いて、強光（500 $\mu$ mol photon $m^{-2}$ $s^{-1}$）を 1 時間照射したものを強光サンプルとした。

### Thylakoid membrane の単離

Thylakoid membrane の単離は基本的に Jarvi et al.(2011)の方法に従った。実験は 4℃または氷上で行った。原糸体を grinding buffer [50 mM Hepes/KOH (pH 7.5), 330 mM sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM ascorbate, 0.05% BSA, 10 mM sodium fluoride, 0.25 mg $mL^{-1}$ Pefabloc (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)]中で懸濁した。約 1 mL の懸濁液を 1 g の glass beads (0.5 mm diameter)の入った 2 mL vial に移し、Mini-Bead Beater (Waken B Tech Co., Ltd, Kyoto, Japan)を用いて 10 秒間の破砕処理を 3 回行うことで原糸体を破砕した。次に、破砕液を 4℃、5,000 x g で 4 分間遠心分離した。続いてペレットを shock buffer（50 mM Hepes/KOH (pH 7.5), 5 mM sorbitol, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM sodium fluoride）を用いて懸濁し、再度 4℃、5,000 x g で 4 分間遠心分離した。最後に、沈殿を storage buffer (50 mM Hepes/KOH (pH 7.5), 100 mM sorbitol, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM sodium fluoride)で 1.5 mg $mL^{-1}$ chlorophyll 濃度に再懸濁し、液体窒素で凍結後、-80℃のフリーザーで保存した。

### Clear-native (CN)-PAGE

CN-PAGE は基本的に Umetani et al.(2018)の方法に従った。まず、単離した thylakoid membrane を solubilization buffer (50 mM imidazole/HCl (pH7.0), 20% glycerol, 5 mM 6-aminocaproic acid, 1 mM EDTA)で再懸濁した。次に、等量の 2%α-dodecyl maltoside (α-DM)と終濃度 1 %の protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を加えて thylakoid membrane 溶液を懸濁し、氷上で 1 分間静置することで、タンパク質複合体を可溶化した。可溶化できなかったものは 4℃、21,000 x g で 1 分間遠心分離してサンプルから除いた。

遠心の上清に 20 mg $mL^{-1}$ Amphipol A8-35(Anatrace, OH, USA)を上清の半分量加えたものを CN-PAGE のサンプルとし、4-13% polyacrylamide gradient gel にロードし、4℃で分離した。泳動の buffer には Anode buffer [50 mM imidazole/HCl (pH 7.0 at 4℃)]と cathode buffer [50 mM Tricine 15 mM imidazole/HCl (pH7.0 at 4℃)]を用いた。

### Large-pore (lp)CN-PAGE

lpCN-PAGE は基本的には Jarvi et al. (2011)の方法に従った。25BTH20G buffer (25 mM BisTris/HCl (pH 7.0), 20% (w/v) glycerol, 0.25 mg $mL^{-1}$ Pefabloc)を加えて thylakoid membrane の上清を 1 mg $mL^{-1}$ chlorophyll 濃度に調製した。チラコイドタンパク質複合体を digitonin で可溶化するため、等量の 2% digitonin の入った 25BTH20G buffer を上清に加え、暗所で 20℃、5 分間撹拌した。可溶化できなかったものを除くために遠心分離をした後、上清の 1/6 量の 20 mg $mL^{-1}$ amphipol A8-35 (Anatrace, OH,USA)を上清に加えたものを泳動サンプルとした。lpCN-PAGE の分離ゲルは 5-13% (w/v) polyacrylamide でありその acrylamide と bisacrylamide の比率は 29:1 とした。サンプルゲルの polyacrylamide 濃度は 3%とし、その acrylamide, bisacrylamide 比は 4:1 とした。電気泳動用の buffer として、anode buffer [50 mM BisTris/HCl (pH7.0 at 4℃)]と cathode buffer (50 mM Tricine,

15 mM BisTris/HCl (pH7.0 at 4℃), 0.01% amphipol A8-35)を用いた。

### 2 次元(2D)-lp（large-pore）CN/SDS-PAGE

（2D）-lpCN/SDS-PAGE に関しては Umetani et al.(2018)の手法に従った。lpCN-PAGE ゲル中を solubiliziation buffer (1% SDS, 1% 2-mercaptoethanol) に 30℃で 60 分間浸し、タンパク質を変性させた。続いて 4 M urea の入った 14% acrylamide gel で分離した。2 次元 SDS-PAGE による分離には Laemmli system を用いた。銀染色には Pierce Silver Stain kit (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA)を用い、メーカーの説明書に従って実験を行った。

### Immunoblot 解析

電気泳動で分離したタンパク質は polyvinylidene fluoride membrane (PolyScreen PVDF transfer membrane, PerkinElmer Life Science, MA, USA)に転写し、特異的な抗体と Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer Life Science, MA, USA)を用いて検出した。本実験で用いたすべての抗体は Agrisera (Vannas, Sweden)から購入した。Anti-PsbB (AS04 038), anti-PsbC antibodies (AS11 1787) は PSII core サブユニットの検出に用いた。Anti-PsaD antibodies (AS09 461) は PSI core サブユニットの検出に用いた。Anti-Lhcb2 (AS01 003), Lhcb3 (AS01 002) antibodies は major LHCII タンパク質の検出に用いた。Anti-LHCSR1 antibodies (AS15 3081)は LHCSR タンパク質の検出に用いた。

### 分光解析

1 時間の強光照射前後のサンプルから lpCN-PAGE で分離した PSI－PSII megacomplex を 4℃で 5 分間、pH 7 、もしくは、pH4.5 の buffer（50 mM BisTris/HCl (pH 7 or pH 4.5), 0.5 M 6-aminocaproic acid）に浸し、それら 4 種類のサンプルの時間分解蛍光解析を行っ

た。励起波長は 408 nm で repetition rate は 2 MHz で 100ns（24.4 ps per channel * 4,096 channels）まで測定に影響はなかった。時間分解能を改善するため時間分解蛍光も 10 ns（2.4 ps per channel * 4,096 channels）まで測定した。蛍光動向のグローバル解析の後 fluorescence decay-associated spectra（FDAS）解析を行った。Steady-state fluorescence spectra は F-2500 spectrophotometer (HITACHI)を用いて測定した。スリット幅は励起波長と蛍光でそれぞれ 10 nm と 2.5 nm とした。Steady-state absorption spectra は室温（20-25℃）で Umetani et al.(2018)の手法に従って測定した。

**色素解析**

光合成色素を抽出するため、*Physcomitrella* の原糸体細胞を acetone 中で stainless beads (5 mm in diameter, TCS0-0100, Bio medical science, Tokyo)を用いて 1 分間破砕した。破砕には、ShakeMaster bead shaker (BioMedical Science Co. Ltd, Tokyo, Japan)を用いた。その破砕液を 21,600 x g で分間遠心分離して上清を C18 column (YMC AL303 250*4.6 mm, 5 μm, YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan)にロードした。サンプルは solvent A (100% methanol)を用いて 17 min 分離した後、さらに 5 分間かけて solvent A から solvent B (60% methanol, 20% ethanol, 20% hexane)に変えながら分離した。流速は 0.8 mL/min とした。色素の吸収スペクトルは L-2450 photodiode array detector (HITACHI High Technologies Science Corporation, Tokyo, Japan)を用いて 450 nm でモニターした。クロロフィルおよびカロテノイド色素の同定と定量は吸収スペクトルを標品と比較することで行った。

## [結果]

### lpCN-PAGE を用いた Physcomitrella の PSI-PSII megacomplex の分離

*Arabidopsis* で報告されている PSI-PSII megacomplex は現在植物で知られている中で最も大きな複合体の一つであり、そのサイズは 3000kDa を超えると考えられる（Yokono et al. 2019 の *Arabidopsis* PSI-PSII megacomplex 構造モデルをもとに計算）。タンパク質複合体を分離する技術の中でも、このサイズの複合体を分離できる方法はサイズクロマトグラフィーやショ糖密度勾配など非常に限られており、しかも、これまで PSI-PSII megacomplex の分離に成功した例は native PAGE system 以外には確認されていない（Järvi et al. 2011; Yokono et al. 2015; Ferroni et al. 2016; Giovanardi et al. 2017）。さらに、PSI-PSII megacomplex は通常の blue-native (BN) や clear-native(CN)-PAGE system では分離することはできない。その理由は PSI-PSII megacomplex が非常に大きな複合体であるため、分離ゲルに入る前のサンプルゲルを通過できないからである（Järvi et al. 2011）。

そこで本研究では、PSI-PSII megacomplex の分離のため、CN-PAGE から派生した large-pore CN-PAGE (lpCN-PAGE) を用いた。lpCN-PAGE は通常の CN-PAGE では分離できないような大きさの複合体を分離するための手法であり、アクリルアミドに対するビスアクリルアミドの比率を 20-25 %にまで増やすことで PSI-PSII megacomplex が通過できるポアサイズを持つアクリルアミドゲルを作成することが可能である（Järvi et al. 2011）。

本研究では PSI-PSII megacomplex の強光適応能を調べるため、強光処理をした細胞と未処理の細胞のそれぞれからチラコイド膜を単離し、光化学系を穏和な界面活性剤である digitonin で可溶化した。一般的な lpCN-PAGE では、穏和な界面活性剤である DOC を添加し、その負電荷がタンパク質の表面に結合することで中性域でのタンパク質の電気泳動を可能にしている。しかし本実験では DOC の代わりに Amphipol A8-35 を用いた。

Amphipol は新しいタイプの両親媒性ポリマーで界面活性剤ミセル中のタンパク質複合

体に作用し、Amphipol がタンパク質表面に結合する。そしてその結合により、タンパク質複合体を界面活性剤ミセルから解離させることで、タンパク質複合体の安定性を高める作用がある。なかでも AmphipolA8-35 は膜タンパク質の安定化に広く利用されており、とりわけ膜タンパク質の結晶化においてよく用いられている（Popot et al. 2011; Watanabe et al. 2019）。そして、Amphipol A8-35 は中性域の pH で負電荷を有するため、DOC の代わりにタンパク質表面への負電荷の付与が可能になるのではないかと考えた。DOC もタンパク質複合体への解離・変成作用が小さいことが知られているが、A8-35 ほどの安定化作用は報告されていない。そのため、DOC の代わりに A8-35 が利用できれば、泳動中のタンパク質複合体の安定性の向上が見込めるのではないかと期待した。実際に、Amphipol A8-35 を用いて泳動を行った結果、主に 3 本の光化学系タンパク質複合体バンドを分離することができた（Fig. 6）。これは Amphipol を用いた最初の Native-PAGE 系の報告である。

それぞれの複合体の構成成分を調べるため、2D-lpCN/SDS-PAGE の後、immunoblotting 解析（Fig. 7）、および、 銀染色（Fig. 8）を行った。その結果、それぞれのバンドが PSI-PSII megacomplex, PSI-LHCI および PSII dimer, LHCII trimer であることが明らかになった。まず、PSI-PSII megacomplex のバンドが lpCN-PAGE のサンプルゲルを通過したことから、このバンドは可溶化できなかった膜画分ではなく、タンパク質複合体であるといえる。また、*Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex は主に PSI, PSII, LHCII で構成されており（Fig. 7）、これは *Arabidopsis* の megacomplex の結果とよく似たものであった（Yokono et al. 2015）。なお、PSI-LHCI と PSII dimer は分子量がよく似ているため、よく似た泳動度をもつことが知られている（Fig. 6）。また、本実験では、PSII-LHCII がほとんど検出されなかったが、これは digitonin が grana core をあまり可溶化しないためである（PSII-LHCII は主に grana core に局在する）（Järvi et al. 2011）。なお、*Arabidopsis* での分光学的な解析から、PSI-PSII megacomplex 以外にも分子量が比較的小さな PSI-PSII の存在も報告されている（Yokono et al. 2015）が、おそらくはその量の少なさ

からバンドとしては検出できないため、本研究では解析対象としなかった。

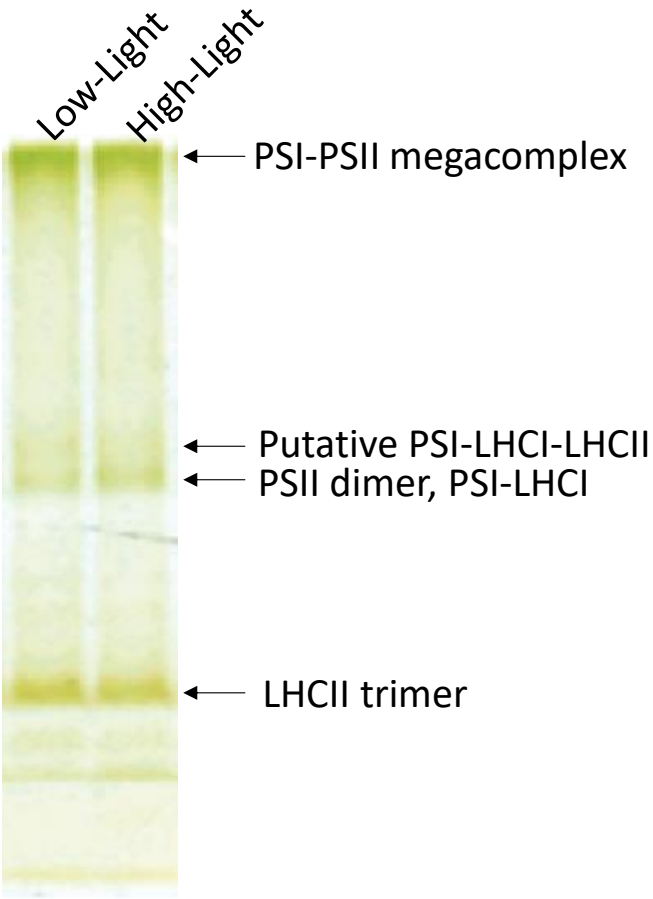


**Fig.6　Amphipol A8-35を用いた lpCN-PAGE による *Physcomitrella* の光化学系 の分離**

Low-light（40 µmol photons $m^{-2}s^{-1}$）で培養した原糸体と、その原糸体に1時間の強光処理（500 µmol photons $m^{-2}s^{-1}$）を行った High-Light サンプルからチラコイド膜を単離し、1% の digitonin でチラコイド膜タンパク質複合体を可溶化した後、3.5%-13% の polyacrylamide ゲルを用いた large-pore clear-native PAGE (lpCN-PAGE) で分離した。

その結果、PSI-PSII megacomplex、putative PSI-LHCI-LHCII、PSII dimerおよびPSI-LHCI、LHCII trimer の各バンドが認められた。

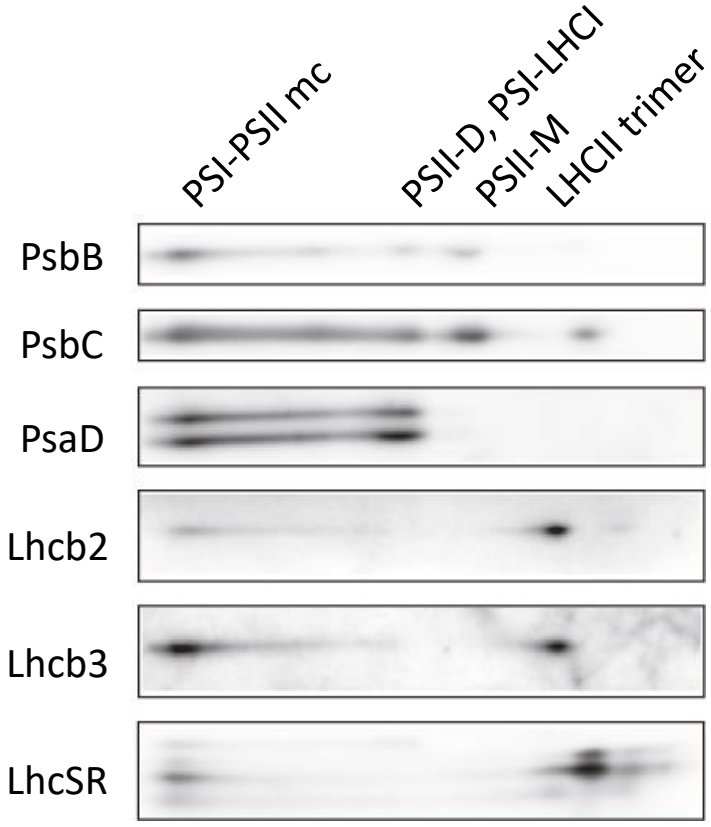


**Fig.7　low-light で培養した *Physcomitrella* 原糸体の光化学系タンパク質の 2D-lpCN/SDS-PAGE 後のImmunoblot解析**

PsbB（PSII）,PsbC（PSII）,PsaB（PSI）,Lhcb2（LHCII）,Lhcb3（LHCII）,LHCSRタンパク質について、それらの特異的抗体を用いてImmunoblot解析を行った。その結果、lpCN-PAGE で分離できた光化学系のバンドが、高分子側から、それぞれ PSI-PSII megacomplex (PSI-PSII mc)、PSII dimer (PSII-D)、PSI-LHCI、PSII monomer (PSII-M)、LHCII trimerであることが明らかになった。なお、PsaDのバンドが2本見られるのは、ヒメツリガネゴケにはPsaDをコードする遺伝子が2つあるためであると考えられた。

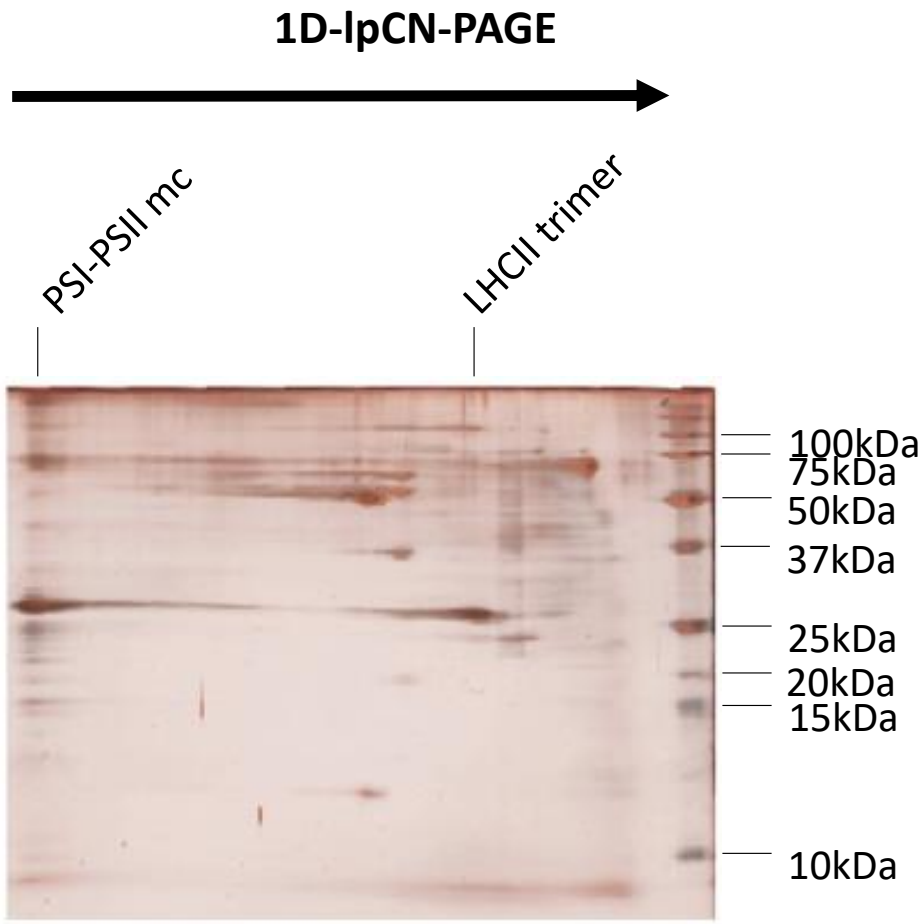


**Fig. 8 *Physcomitrella* のチラコイド膜タンパク質複合体の 2D-lpCN(3.5%-13%) /SDS-PAGE による分離パターン**

*Physcomitrella* から単離したチラコイド膜タンパク質複合体を 1% digitonin で可溶化した後lpCN-PAGE-gel (3.5-13%) で分離した( Fig. 6) ゲルの2D-SDS-PAGE。分離後のタンパク質は銀染色で可視化した。分子量マーカーは右側に示した。

### *Arabidopsis* の PSI-PSII megacomplex との泳動度の比較

*Arabidopsis* の PSI-PSII megacomplex の構造に関しては、最近、ネガティブ染色を行った PSI-PSII megacomplex を電子顕微鏡で観察した像に基づく構造モデルが報告された（Yokono et al. 2019）。このモデルでは 1 つの PSII dimer が 2 つの PSI-LHCI に挟まれた 2 回転対称になっており、その周りを LHCII trimer が取り囲むような構造になっている。もし *Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex がこのモデルと似た構造をしているならば、分子量も *Arabidopsis* の megacomplex と似ているはずである。その 2 種類の植物の PSI-PSII megacomplex の分子量サイズを比較するため、*Arabidopsis* と *Physcomitrella* のチラコイド膜タンパク質複合体を digitonin で可溶化し、lpCN-PAGE で分離した。その際に、分子量による泳動度の変化をより明らかにするため、acryl amide 濃度を変えた 3 種類のアクリルアミドゲルを用いて、泳動度の変化を比較した（3%-13%, 3.25%-13%）（Fig. 9）。

その結果、*Physcomitrella* と *Arabidopsis* の PSI-PSII megacomplex はいずれの濃度のゲルを用いた場合でも、同程度の泳動度を示した。このことから *Physcomitrell*a と *Arabidopsis* の PSI-PSII megacomplex の分子量は同程度であると考えられる（Fig. 9）。また、2 つの異なる濃度のアクリルアミドゲル（3.5%-13%（Fig. 6）, 3.25%-13%（Fig. 9））を用いた 2D-lpCN/SDS-PAGE で分離したタンパク質について、銀染色を行った。その結果、*Physcomitrella* と *Arabidopsis* の PSI-PSII megacomplex のバンドパターンはよく類似していた（Fig. 8 および Fig. 10）。またアクリルアミドの濃度を変化させても PSI-PSII megacomplex の周辺に他の緑色のバンドは認められなかったことから（Fig.6 および Fig. 9）、PSII-LHCII megacomplex などの他の複合体の混入は無視できるといえる。これは PSII-LHCII megacomplex が grana core に局在しているため、digitonin で可溶化できなかったためであろう。一方で PSI-PSII megacomplex のバンドはテーリングしていた（Fig.6 および Fig. 9）。これは PSI-PSII megacomplex に結合する LHCII の量に多様性があるためであろうと考えられた（Yokono et al. (2019)）。これらのことから、

*Physcomitrella* と *Arabidopsis* の PSI-PSII megacomplex の構造は類似していると予想された。

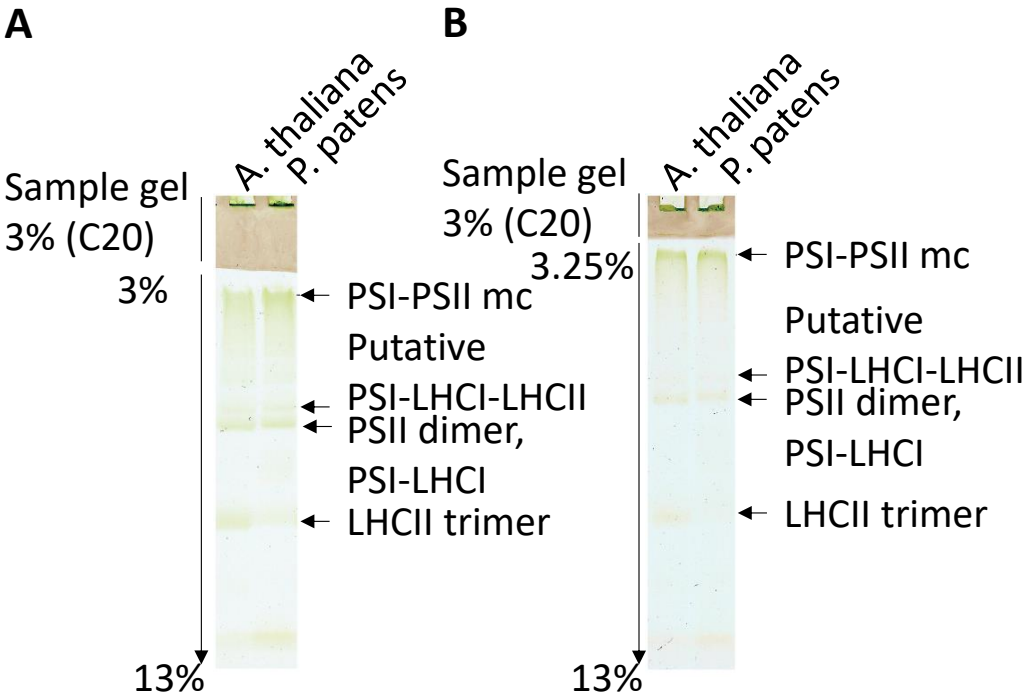


**Fig. 9　Acrylamide の濃度（A:3%-13%; B:3.25%-13%）が異なる2種類の分離ゲルを用いた lpCN-PAGE による、*Physcomitrella* と *Arabidopsis* の光化学系の分離パターンの比較**

*Physcomitrella* (*P. patens*) と *Arabidopsis* (*A. thaliana*) のチラコイド膜を単離し、1% digitonin を用いて、光化学系タンパク質複合体を可溶化した。Large-pore sample gel (C20) の作成には、3%Tと20%C（Strecker et al.2010）の acrylamide 溶液を用いた。グラジエントゲル濃度の低下（3.25% →3%）に伴い、PSI-PSII megacomplex (PSI-PSII mc）の移動度が上昇したが、いずれの条件においても、*Physcomitrella* と *Arabidopsis* のPSI-PSII megacomplex の移動度はほぼ同一であった。そのため、その2つの megacomplex の分子量は類似していると考えられる。

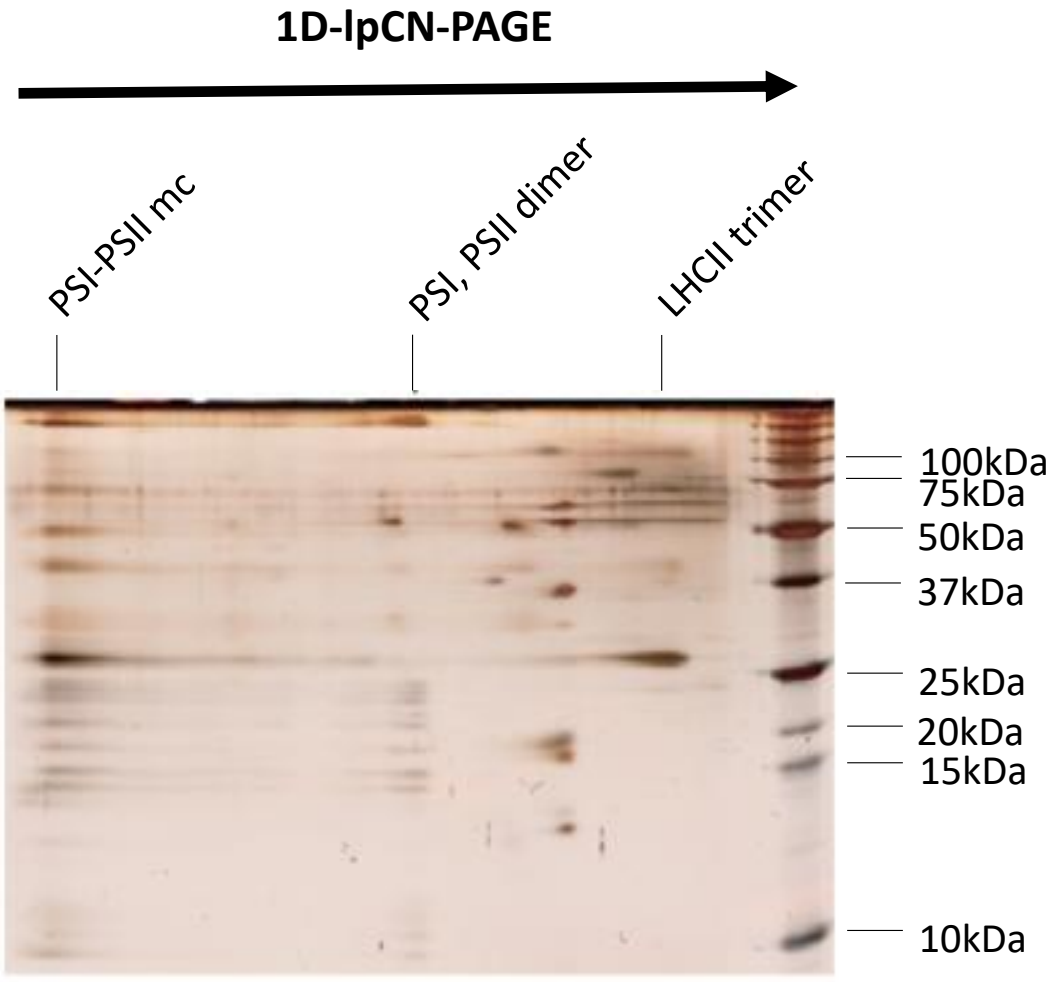


**Fig. 10 *Physcomitrella* のチラコイド膜タンパク質複合体の 2D-lpCN(3.25%-13%) /SDS-PAGE による分離パターン**

*Physcomitrella* から単離したチラコイド膜タンパク質複合体を 1% digitonin で可溶化した後lpCN-PAGE-gel (3.25-13%) で分離した( Fig. 9B) ゲルの2D-SDS-PAGE。分離後のタンパク質は銀染色で可視化した。分子量マーカーは右側に示した。

### *Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex は LHCSR と PsbS を有している

前述のように、*Arabidopsis* の PSI-PSII megacomplex が PsbS と結合することがすでに報告されている（Suorsa et al. 2015）。そこで *Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex に PsbS が結合しているか確かめるため抗 PsbS 抗体を用いて immunoblot 解析を行った。その結果、lpCN-PAGE において *Physcomitrella* においても PsbS は PSI-PSII megacomplex と同じ泳動度を持つ（co-migration）ことが明らかになった（Fig. 11）。この結果は、*Physcomitrela* でも PSI-PSII megacomplex に PsbS が結合していることを強く示唆している。

さらに、*Physcomitrella* は *Arabidopsis* には存在しない LHCSR を有している。先行研究から、*Physcomitrella* の LHCSR は PSI と PSII の両方の NPQ 形成に関わっているが、その局在は stroma lamellae や grana margin であろうと議論されている（Pinnola et al. 2015）。そこで、LHCSR は PSI-PSII megacomplex に結合しており、その熱放散に寄与しているのではないかと考えた。この仮説を検証するために抗 LHCSR 抗体を用いて immunoblotting 解析を行った（Fig. 7）。その結果、2D-lpCN-PAGE/SDS-PAGE において、LHCSR monomer の他に、PSI-PSII megacomplex と同じ移動度を持つ（co-migration）LHCSR のバンドが検出された。これは *Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex が LHCSR を結合していることを強く示唆している。LHCSR は植物の進化の過程で維管束植物では失われているため、LHCSR の有無は *Arabidopsis* と *Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex の大きな違いであるといえる。LHCSR と PsbS の両方のタンパク質が PSI-PSII megacomplex に結合していることから、これらのタンパク質は megacomplex 内で過剰なエネルギーを熱として放散することに寄与していると考えられる。

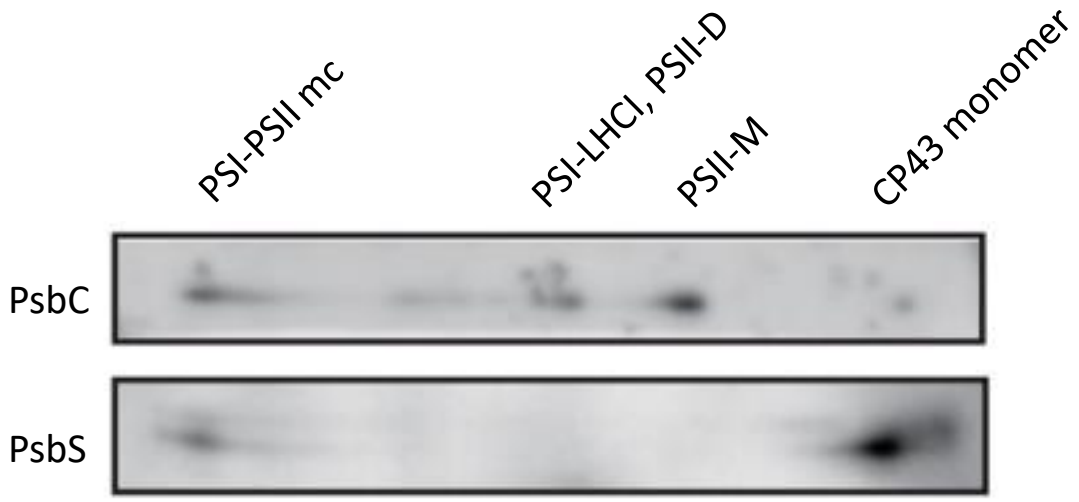


**Fig.11 2D-lpCN/SDS-PAGE 後の PsbC（PSII）と PsbS の immunoblot 解析**

Low-lightで培養した *Physcomitrella* のチラコイドタンパク質複合体を1%digitoninで可溶化し、Amphipol A8-35 を用いて lpCN-PAGE（3.25-13%）によって分離した。その後、さらに2D-SDS-PAGEで分離した後PsbC、PsbSの特異的抗体を用いて immunoblot　解析を行った。その結果、PSI-PSII megacomplex (PSI-PSII mc) と PsbS のco-migration が確認できた。

**77K における PSI-PSII megacomplex の定常状態蛍光スペクトル**

lpCN-PAGE で分離した PSI-PSII megacomplex（Fig. 6）の光合成特性を調べるため、77K の定常状態蛍光スペクトルを測定した（Fig. 12）。その解析には PSI-LHCI, PSII-LHCII, LHCII trimer の単独での蛍光スペクトルが必要となるため、チラコイド膜タンパク質複合体をα-DM（dodecyl maltoside）で可溶化し、(large-pore ではない) CN-PAGE（Fig. 13）で分離した。界面活性剤としてα-DM を用いたのは、α-DM がチラコイド膜の全ての subfraction を可溶化できるからであり、PSII-LHCII の多くが蓄積する場である grana core も可溶化される。実際、digitonin を用いた lpCN-PAGE（Fig. 6 および Fig. 9）では明確には見られなかった PSII-LHCII のバンドが本実験系では明瞭に確認された（Fig13）。興味深いことに、この CN-PAGE において、LHCSR は PSI-PSII megacomplex だけでなく、PSII-LHCII とも co-migration を示した（Fig. 14）。このことは *Physcomitrella* において LHCSR は PSII-LHCII とも結合していることを示唆している（Fig14）。対照的に LHCSR と PSI-LHCI との co-migration は認められなかった。ただし、これは、LHCSR と PSI-LHCI が解離してしまった可能性を排除するものではない。なお、α-DM は PSI-PSII megacomplex 内で PSII から PSI へのエネルギー移動を阻害することが知られている（Yokono et al. 2015）。そのため、PSI-PSII megacomplex の分光学的な解析のためには、digitonin を用いた可溶化が適している。

次に、分離した PSI-LHCI, PSII-LHCII, LHCII trimer の 77K 蛍光スペクトルを測定した（Fig. 15）。分離したバンドの同定には銀染色（Fig. 16）と PSI, PSII, LHCII, および LHCSR、それぞれの特異的抗体を用いた immunoblot 解析を行った（Fig. 14）。そしてこれらと共に lpCN-PAGE で分離した PSI-PSII megacomplex の 77K の定常状態蛍光スペクトルを見てみると、*Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex のスペクトル（Fig. 12）は *Arabidopsis* の PSI-PSII megacomplex スペクトル（Yokono et al. 2015）と非常によく似ていることが明らかになった。まず、725nm 付近にピークを持つ強い蛍光は、PSI-LHCI の

low-energy chlorophyll (red form) に対応している蛍光であると考えられた（Fig. 12）。一方で 690nm 付近にピークを持つ、弱くブロードなスペクトルは PSII-LHCII から放出された蛍光であると考えられた（Fig. 12）。その理由は、α-DM で可溶化され、CN-PAGE により分離された PSII-LHCII と LHCII trimer は約 693nm と 678nm に蛍光ピークを示した（Fig. 15）からである。約 690nm にピークを持つ PSII-LHCII に由来する蛍光のシグナル（Fig. 12）が、約 725nm にピークを持つ PSI-LHCI に由来する蛍光のシグナル（Fig. 12）よりも顕著に弱いことは、*Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex は *Arabidopsis*（Yokono et al. 2015）と同様に PSII から PSI への効率的なエネルギー移動が起こっていることを示唆する結果である。これは、77K ではエネルギーの低い（長波長）クロロフィルからエネルギーの高い（短波長）クロロフィルへの励起エネルギー移動（uphill エネルギー移動）は起こりにくく、PSI と PSII の間で励起エネルギー移動が生じる場合は最もエネルギーの低い PSI の red form にエネルギーがトラップされる確率が非常に高いと考えられるためである。また、1h の強光処理の前後で差スペクトルを取ると、*Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex の蛍光スペクトルに小さな違いが生じていることが明らかになった（Fig. 12）。とりわけ、約 725nm にピークを持つ蛍光スペクトルのシグナルが強光処理により増えていることは、*Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex が強光下では、より多くの励起エネルギーを PSI-LHCI の low-energy chlorophyll (red form) に伝達するように変化したことを示唆している。そして、その変化は *Physcomitrella* の強光環境への適応に貢献しうると考えられた（Yokono et al. 2019）。

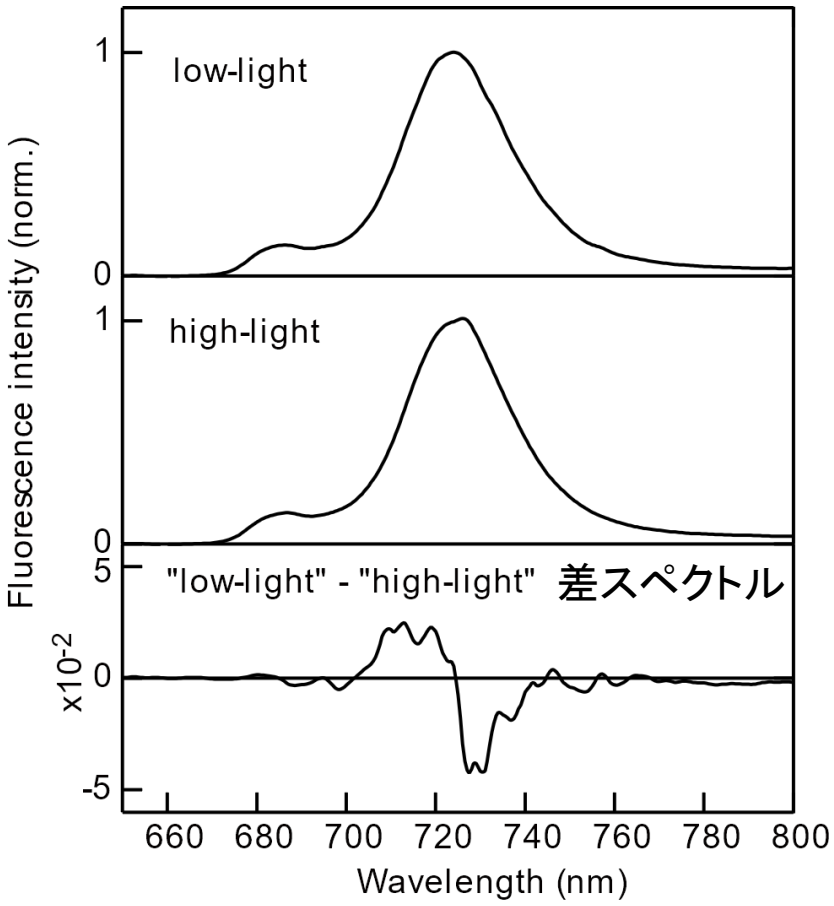


**Fig.12　PSI-PSII megacomplex（Fig6）の定常状態蛍光スペクトル**

lpCN-PAGEで分離したPSI-PSII megacomplex の定常状態の蛍光スペクトルを77Kで測定した。上のスペクトルは low-light で培養した細胞から分離したPSI-PSII megacomplex のスペクトル。真ん中は強光処理したサンプルから分離したPSI-PSII megacomplex のスペクトル。下は強光処理の有無で変化したPSI-PSII megacomplex の差スペクトルを示している。

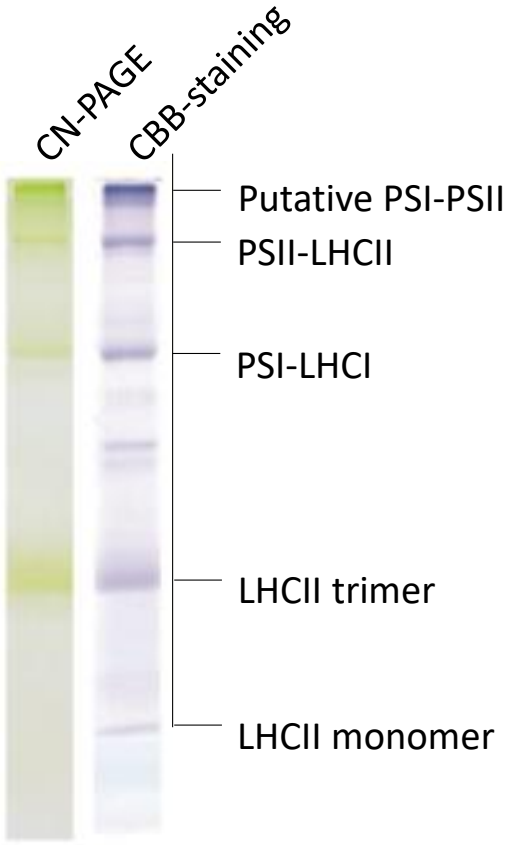


**Fig. 13 Amphipol A8-35 を用いた CN-PAGE による *Physcomitrella* の光化学系タンパク質複合体の分離**

*Physcomitrella* から単離したチラコイド膜タンパクを 1%　α-dodecyl maltoside（α-DM) で可溶化し、AmphipolA8-35 を用いた CN-PAGE（4-13%）で分離した。右のゲルはそのCN-PAGE のゲルをCBB染色したもの。

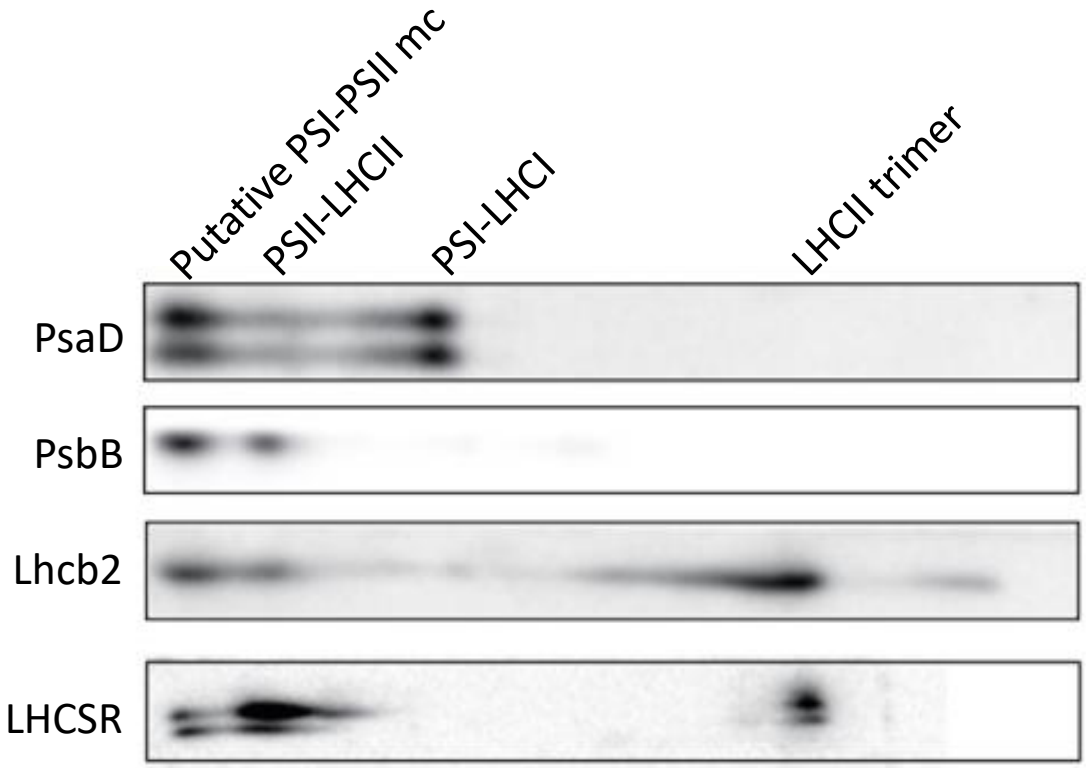


**Fig.14　2D-CN/SDS-PAGE 後の PsaD（PSI）、PsbB（PSII）、Lhcb2（LHCII）、LHCSR タンパク質の Immunoblot 解析**

*Physcomitrella* のチラコイドタンパク質複合体を 1% α-dodecyl maltoside で可溶化しAmphipol A8-35 を用いた CN-PAGE で分離したゲル（Fig13）を、さらに、2D-SDS-PAGE で分離した。その後、各光化学系の特異的な抗体を用いて Immunoblot 解析を行った。なお、PsaDとLHCSRのシグナルが2つみられるのは、ヒメツリガネゴケではPsaDおよびLHCSRが複数の遺伝子にコードされているためであると考えられる。

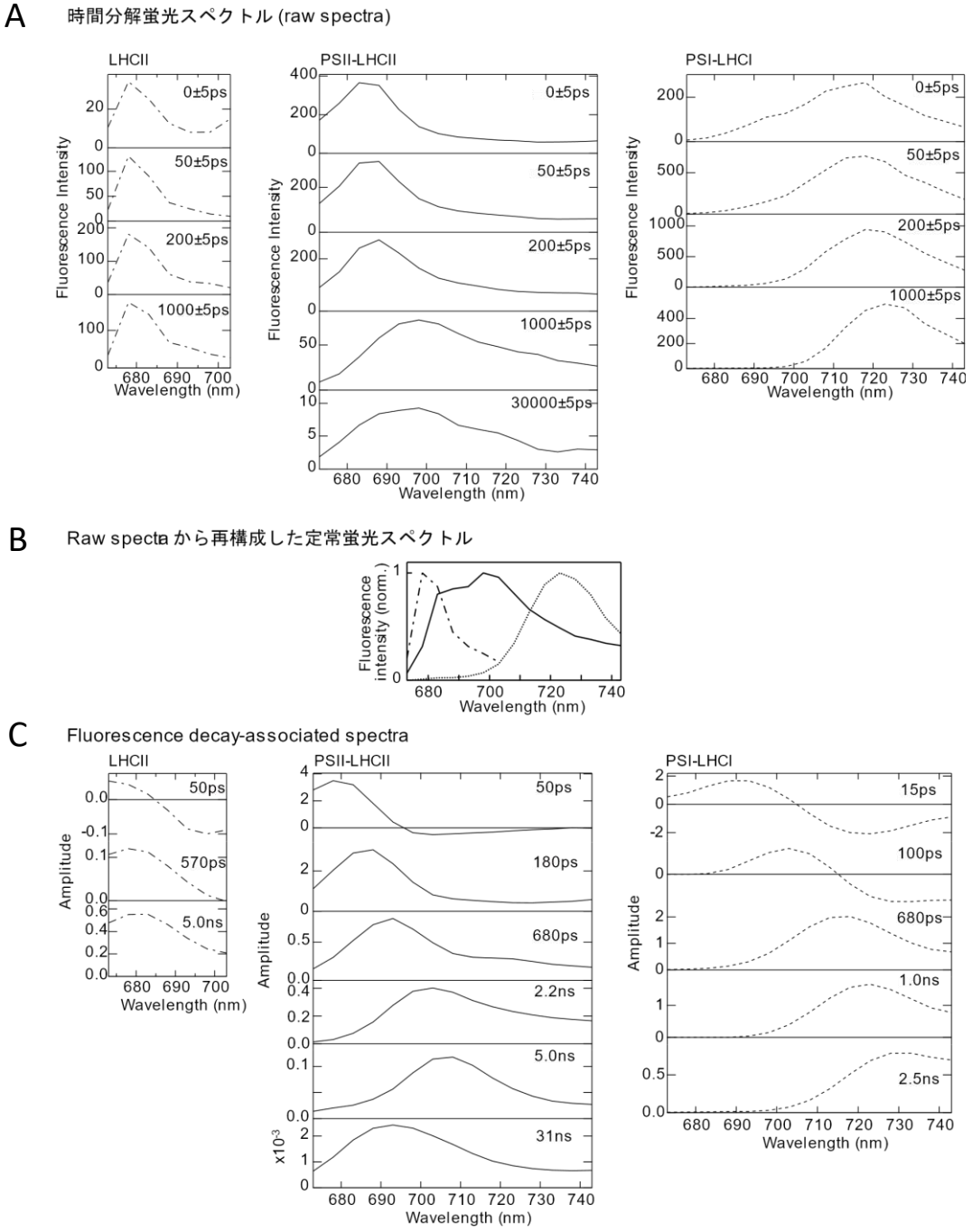


**Fig.15 Low-light で培養したPhyscomitrellaから単離したチラコイド膜タンパク質複合体を1%α-dodecyl maltosideで可溶化し、CN-PAGEで分離したPSI-LHCI、PSII-LHCII、LHCII trimerの77Kにおける蛍光スペクトル**

(A) 時間分解蛍光スペクトルの生データ。(B) 生データから再構築した定常蛍光スペクトル。(C) 蛍光減衰スペクトル。

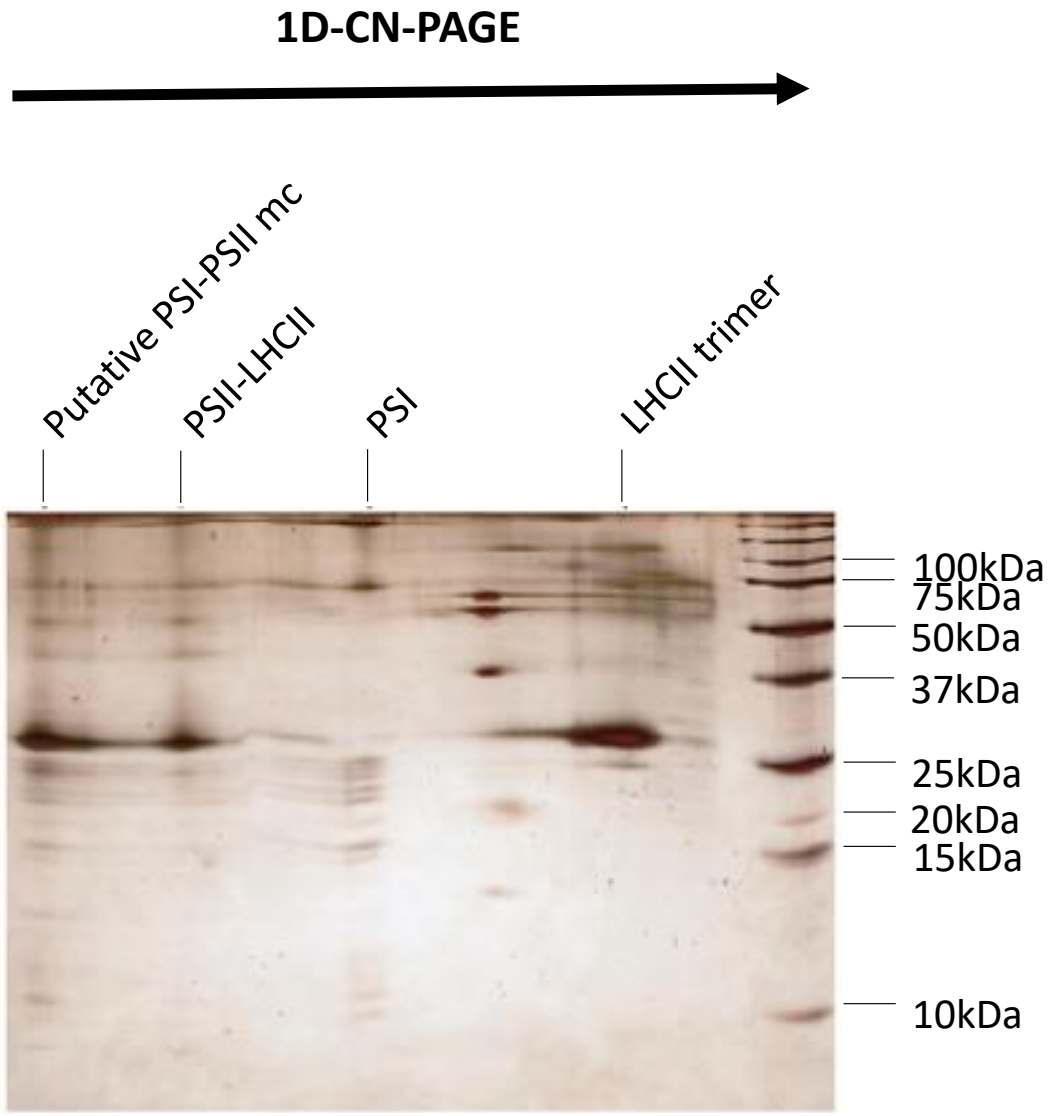


**Fig.16 Low-light で培養した *Physcomitrella* チラコイド膜タンパク質複合体の 2D-CN/SDS-PAGE による分離後の銀染色**

*Physcomitrella* のチラコイドタンパク質複合体を 1% α-dodecyl maltoside で可溶化しAmphipol A8-35 を用いた CN-PAGE で分離したゲル（Fig13）を、さらに、2D-SDS-PAGE で分離した。タンパク質のスポットは銀染色で可視化した。分子量マーカーは右側に示した。CN-PAGE における光化学系のバンドの位置はゲルの上側に示した。

**PSI-PSII megacomplex の時間分解蛍光解析**

ここでは PSI-PSII megacomplex 内部での励起エネルギーの挙動を解明するために PSI-PSII megacomplex の蛍光の時間分解解析を行った（Fig. 17）。本研究では強光処理の有無でサンプルを分けて比較解析を行ったが、まず、その強光処理による変化について記載したい。強光処理により、LHCSR と PsbS のタンパク質の蓄積量が増加し（Fig. 18）、さらに violaxanthin から zeaxanthin の転換が強く誘導された（Table 1）ことが明らかになった。なお、zeaxanthin は強光に応答して短時間で violaxanthin から転換され得ることが知られており、この機構はキサントフィルサイクルと呼ばれている。そして、この zeaxanthin は *Physcomitrella* において LHCSR と PsbS の両方の NPQ に必要である（Pinnola et al.2013）。そのため、この zeaxanthin の増加（Table 1）を LHCSR および PsbS の発現誘導（Fig. 18）と合わせて考えると、強光処理により PSI-PSII megacomplex の過剰な光エネルギーを熱放散する能力が上昇しているのではないかと予想された。なお、1h という短時間の強光処理で LHCSR と PsbS のタンパク質の蓄積量が増加したことから（Fig. 18）、LHCSR および PsbS は分解制御を受けており、強光処理によりその分解が抑制された可能性が示唆された。このような強光に応答した LHCSR や PsbS の速い量的制御機構に関しては、将来的な課題である。

*Physcomitrella* や *Chlamydomonas reinhardtii*（以下 *Chlamydomonas*）の PSII-LHCII supercomplex は LHCSR により低 pH 下で中性時よりも大きなクエンチング能を示すこと（Tokutsu, Minagawa 2013）、さらに *Chlamydomonas* の LHCSR1 は低 pH で LHCII から（PSII ではなく）PSI へのエネルギー移動を強化することが知られている（Kosuge et al.2018）。これらの現象は光合成に伴ってルーメンの酸性化が起こること、それをトリガーとして PSII の熱放散が誘導されることとよく一致している。これらの報告から *Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex も LHCSR によって低 pH で大きなクエンチング能を示すのではないかと考えた。その仮説を検証するため、本研究では分離した PSI-PSII

megacomplex を pH7 と pH4.5 の buffer に浸しその蛍光を解析した。なお PSI-PSII megacomplex の吸光度スペクトルは低 pH や強光処理によって変化は見られなかった（Fig. 19）。pH や強光によって吸収スペクトルに大きな差が認められないことは、蛍光の変化（の少なくとも大部分）は pH や強光による色素の変化に依存していないことを強く示唆している。

Fig. 17A は強光処理をしていない *Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex の蛍光減衰スペクトルである。蛍光寿命は Table 2 にまとめた。まず、中性条件において（Fig. 17A 実線）その減衰パターンは *Arabidopsis* の PSI-PSII megacomplex と類似していた（Yokono et al.2015）。最初の寿命成分（~50ps）は PSII と PSI の間の非常に速いエネルギー移動を示している。PSI, PSII 間の素早いエネルギー移動は PSI と PSII の結合が、整然と組織立ったものであり、決してランダムな結合によるものではないことを示唆している。これは *Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex の構造が *Arabidopsis* のものと似ているという仮説と一致するものでもある。そして 2-5 番目の成分は非常に速いエネルギー移動の後に、励起エネルギーを光化学系反応中心や PSI-LHCI の low-energy chlorophyll（red form）がトラップしたものを反映している。そして、最後の 6 番目の寿命成分は遅延蛍光スペクトルであり、PSII の反応中心クロロフィルの励起の後に生じた電荷再結合後の励起エネルギーの分配を表している。6 番目の蛍光寿命で PSI-LHCI から放出された約 725nm にピークを持つ蛍光のシグナルが約 690nm にピークを持つ PSII-LHCII の蛍光のシグナルよりも強度が高いことは、PSI-PSII megacomplex の中で PSII から PSI にエネルギーが効率的に移動したことを示している。なお、スピルオーバーの活性の強さは強光照射の有無によって大きく変化しなかった（Table 2）。

興味深いことに、低 pH に曝したサンプルにおいて、約 710nm にピークを持つ蛍光の速い減衰が認められた（Fig.17A 第 2 寿命成分）。この傾向は強光処理によってより顕著になった（Fig. 17B 第 2 寿命成分）。強光処理によって LHCSR と PsbS が誘導され、zeaxanthin

の蓄積量が多くなったことを考えると、この蛍光スペクトルの変化は LHCSR/PsbS および zeaxanthin に依存する熱放散によるものであろうと考えられた。約 710nm にピークを持つ蛍光スペクトルは熱放散状態（クエンチングフォーム）の LHCII もしくは PSI に由来するものであると考えられる（Vasil'ev et al.1997; Iwai et al.2010; Kosuge et al.2018）。さらに、約 710nm にピークを持つ蛍光が、クエンチングフォームの LHCII による熱放散、もしくはその LHCII から PSI への励起エネルギー移動によって早い（~200ps）減少を示すことがすでに報告されている（Mimuro et al.2010; Bos et al.2017）。なお、LHCII は強光によってチラコイド膜のルーメン側が低 pH になると aggregation form を形成し約 710nm にピークを持つ蛍光スペクトルを示すことが知られており、これが LHCII のクエンチングフォームであろうと考えられている（Johnson et al. 2011）。

逆に LHCI の low-energy chlorophyll にトラップされたことを表す 740nm にピークを持つ蛍光（Iwai et al.2015; Mazor et al.2015）は低 pH で減少していた（Fig17 第 5 寿命成分）。これは低 pH では、励起エネルギーが LHCI に届く前に LHCII から放散されやすくなること、PSI にトラップされやすくなることを示唆している。低 pH での 710nm 付近にピークを持つ蛍光の増大は、遅延蛍光スペクトルでも観測され（Fig17 第 6 寿命成分）、低 pH では PSII からのエネルギーの移動先が多様化することを示している。

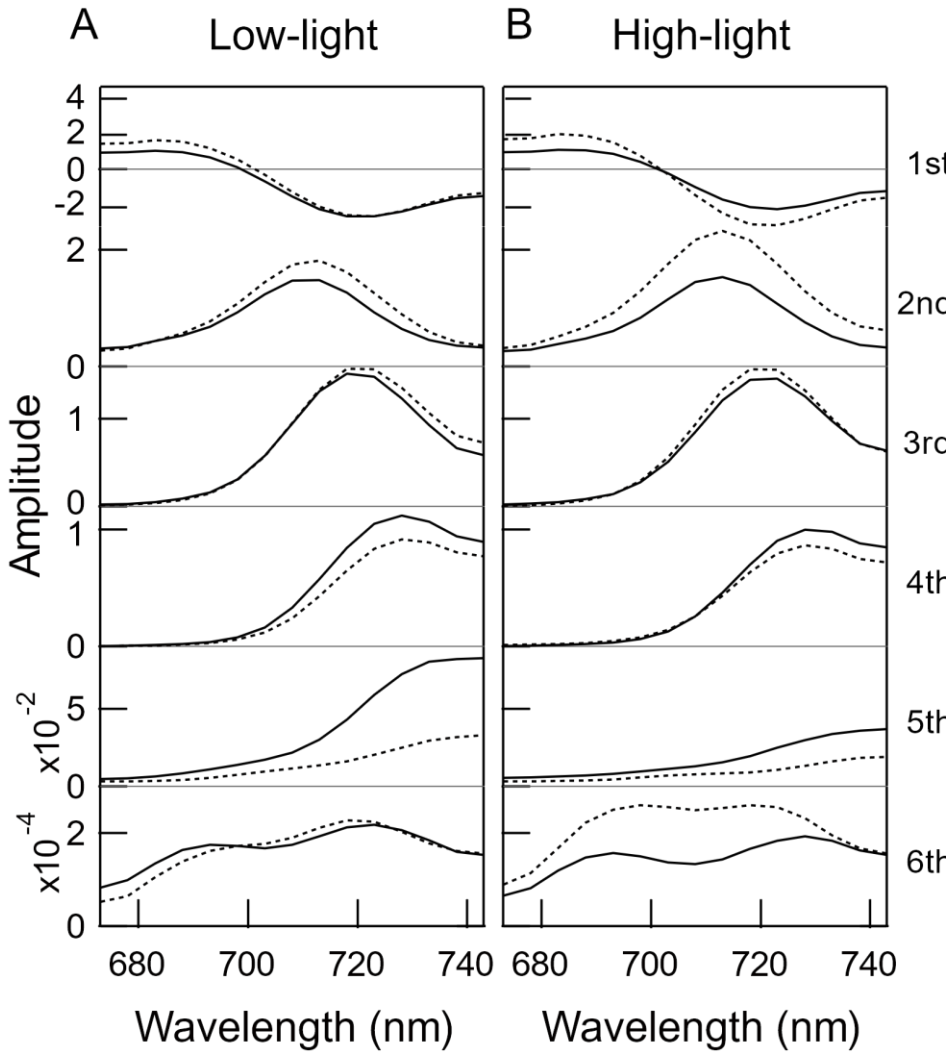


**Fig.17　PSI-PSII megacomplex の時間分解蛍光解析**

Low-light で培養した *Physcomitrella* の原糸体から分離したPSI-PSII megacomplex（A）、およびHigh-light処理後の *Physcomitrella* の原糸体から分離したPSI-PSII megacomplex（B）の時間分解蛍光解析。実線はpH7、点線はpH4.5 の溶液に浸したPSI-PSII megacomplex を測定したデータ 。測定温度は77K。蛍光寿命はTable2にまとめた。

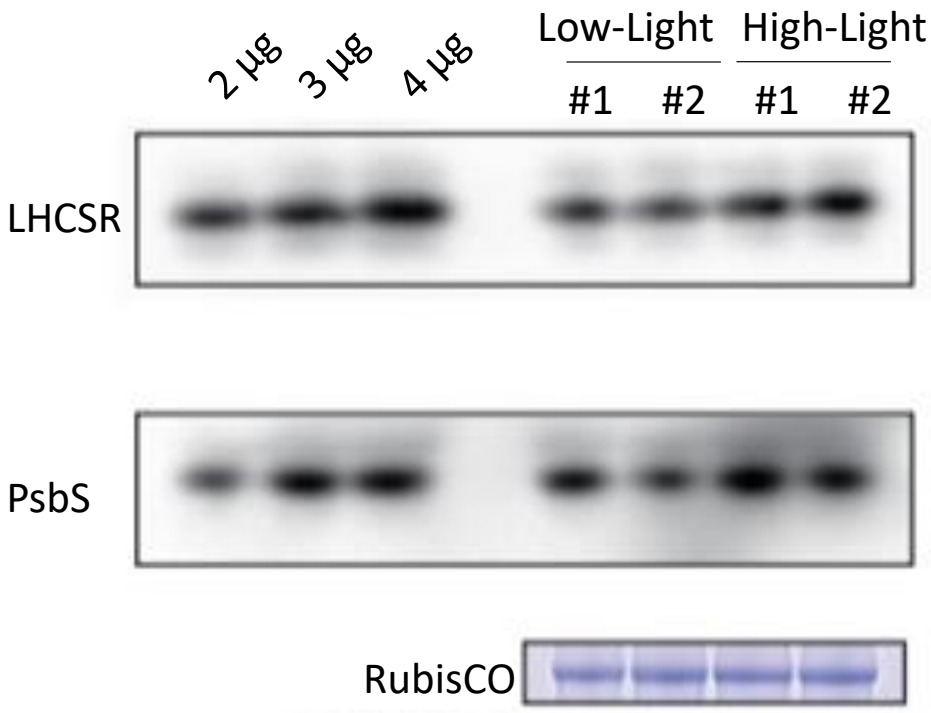


**Fig.18 強光処理前後の LHCSR、PsbS タンパク質の蓄積量の変化**

タンパク質を1hの強光処理前（LL）、および処理後（HL）の*Physcomitrella* 全細胞から抽出し、SDS-PAGE で分離した。タンパク質のロード量（2µg）は BSA の standard curve を用いて調製した。RubisCO バンドの CBB 染色の強度をロードしたタンパク質量の指標とした。2回の生物学的な再現（#1、#2）をLL、HLのそれぞれで用いた。希釈系列（2µg、3µg、4µg）はLL（#1）サンプルを希釈して作成した。

| | LL | HL |
|---|---|---|
| Z / Chl *a* ratio | 0.030 ± 0.011 | 0.123 ± 0.006 |
| Z / VAZ ratio | 0.171 ± 0.055 | 0.703 ± 0.010 |

**Table 1　1h の強光処理前後の zeaxanthin レベルの変化**

1h の強光処理の前（LL）と後（HL）で*Physcomitrella* 細胞から光合成色素を抽出し、zeaxanthin（Z）の量を chlorophyll（Chl） *a* と全 xanthophyll 色素（Violaxanthin（V）、Antheraxanthin（A）、Z）で規格化した。

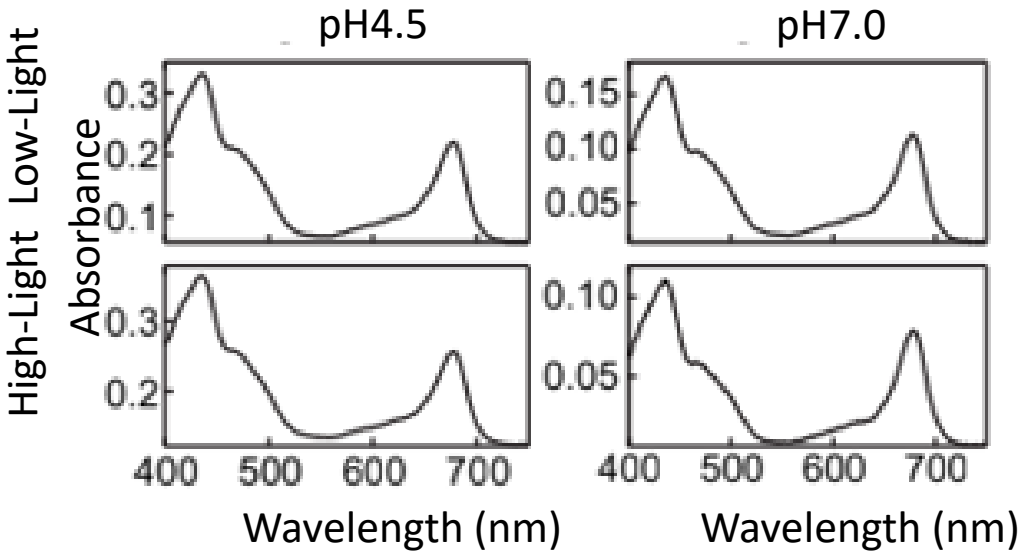


**Fig.19 中性 pH（7.0）と低 pH（4.5）における*Physcomitrella*の PSI-PSII megacomplex の吸収スペクトルの変化**

1h の強光処理前後の *Physcomitrella* 細胞からチラコイド膜を単離し、1% digitonin でタンパク質複合体を可溶化した後、lpCN-PAGEで分離した。その後、PSI-PSII megacomplex のバンドを pH7.0 と pH4.5 のbufferに浸してから、吸収スペクトルを測定した結果、大きな変化は認められなかった。

| | Low-light | | High-light | |
|---|---|---|---|---|
| | **pH7.0** | **pH4.5** | **pH7.0** | **pH4.5** |
| **1st** | 45 ps | 50 ps | 50 ps | 40 ps |
| **2nd** | 200 ps | 220 ps | 230 ps | 210 ps |
| **3rd** | 750 ps | 850 ps | 860 ps | 840 ps |
| **4th** | 1.9 ns | 2.1 ns | 2.1 ns | 2.1 ns |
| **5th** | 4.1 ns | 4.8 ns | 4.9 ns | 5.5 ns |
| **6th** | 30 ns | 25 ns | 31 ns | 25 ns |
| **Mean Lifetime** | | | | |
| **PSII: PSI (ns)** | 1.07: 1.46 | 0.90: 1.41 | 1.15: 1.47 | 0.95: 1.31 |
| **Delayed fluorescence Intensity (after vibrational band correction)** | | | | |
| **PSII: PSI** | 0.183: 0.191 | 0.168: 0.216 | 0.163: 0.137 | 0.265: 0.22 |
| **Spillover ratio** | 43% | 45% | 40% | 38% |

**Table 2 PSI-PSII megacomplexの蛍光減衰スペクトルの蛍光寿命**

## [考察]

### lpCN-PAGE による *Physcomitrella* の LHCSR 結合型 PSI-PSII megacomplex の分離

本研究では *Physcomitrella* の原糸体を用いて PSI-PSII megacomplex を lpCN-PAGE により分離した（Fig. 6 および Fig. 9）。*Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex のバンドがサンプルゲルを通り抜けて移動したことは、このバンドが非常に大きなタンパク質複合体であることを示している（<10MDa）（Strecker et al.2010）。*Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex が *Arabidopsis* と同程度の泳動度を示したこと（Fig. 9）から、*Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex のサイズも *Arabidopsis* の PSI-PSII megacomplex （Yokono et al.2019）と同程度であると考えられる。ネガティブ染色された *Arabidopsis* の PSI-PSII megacomplex の電顕像に基づく、その構造モデルでは 1 つの PSII dimer が 2 つの PSI-LHCI の間に挟まれていてその周りに LHCII trimer が結合している（Yokono et al.2019）。*Physcomitrella* と *Arabidopsis* の PSI-PSII megacomplex を比べ、電気泳動における移動度、77K での定常状態蛍光スペクトル（Fig. 12）、時間分解蛍光解析における励起エネルギーの挙動（Fig. 17）が似ていることは *Physcomitrella* と *Arabidopsis* の PSI-PSII megacomplex の分子構造が似ていることを強く示唆している（Yokono et al.2019）が、その証明には、更なる研究が必要である。

また *Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex において PSII から PSI への非常に速いエネルギー移動が観測されたことは（Fig. 17 第 1 寿命成分）、PSII と PSI が LHCII などを介さずに直接結合していることを示唆している（Yokono et al.2015; Yokono and Akimoto 2018）。分子間のエネルギー移動効率は分子間の距離と配向に非常に大きな影響を受けるため、Yokono et al.2015 の Fig 1c の w2 バンドと w3 バンドで示されたように PSII と PSI が同じ泳動度であるだけではそれらの間でエネルギー移動は見られないはずであるからである。つまり、PSI-PSII megacomplex の内部での PSI と PSII の配向性が PSII から PSI

への迅速なエネルギー移動に重要であり、非常に速いエネルギー移動が生じていることは、PSI と PSII が直接結合していること、しかも構造的に組織立って結合していることを示唆している。その構造の詳細に関しては、単粒子解析などを用いた今後の構造学的解析に期待したい。

*Arabidopsis* の PSI-PSII megacomplex においては PSI, PSII,LHCII に加えて、PsbS が結合しているという報告（Suorsa et al.2015）がある。さらに、本研究では、*Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex には PSI, PSII,LHCII に加えて *Arabidopsis* 同様に PsbS がおそらく結合しており、さらに *Arabidopsis* には存在しない LHCSR も結合しているだろうことが明らかになった。*Chlamydomonas*（Peer et al.2009）や *Physcomitrella*（Alboresi et al.2010）を用いた先行研究から、LHCSR は過剰なエネルギーを熱として放散することで光化学系を保護するのに重要な役割を果たしていることが明らかになっている。*Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex に LHCSR や PsbS が結合していたことは、それらタンパク質が過剰なエネルギーを熱として放散することにより、PSI-PSII megacomplex 内の光酸化的障害を軽減することが可能であることを示している。

### *Physcomitrella* PSI-PSII megacomplex の pH 依存的な熱放散

低 pH では、約 710nm にピークを持つ蛍光の強度（~200ps）が強くなったことに付随して、LHCI の low-energy chlorophyll（740nm）へのトラップが弱くなっていることが明らかになった（Fig. 17）。このことから約 710nm にピークを持つ chlorophyll 蛍光の早い減衰は、エネルギー放散状態の LHCII や PSI にトラップされて熱放散されたことを反映するのではないかと考えた。また低 pH でも PSII から PSI へのエネルギー移動効率に変化は見られなかった（第 1 寿命成分（~50ps）in Fig. 17）。このことは低 pH で約 710nm にピークを持つ蛍光の強度が高くなったのは、PSI が低 pH に応答して変化した結果ではなく、*Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex に結合する LHCII の変化によることを示唆し

ている。先行研究によれば、LHCII から PSI への LHCI を介さないエネルギー伝達経路が存在するため（Benson et al.2015; Ferroni et al.2018）、もし低 pH で活性化される LHCII の熱放散機構があれば、それは PSI からエネルギーを受け取ることができるかもしれない。

また、*Physcomitrella* の LHCSR は PSI-LHCI/II の LHCII に結合すること（Pinnola et al.2017）に加え、*Physcomitrella* と *Chlamydomonas* において、LHCSR が pH 依存の熱放散を示すという報告がある（Tokutsu and Minagawa 2013; Pinnola et al.2017）。その際、*Physcomitrella* では LHCSR 自身がクエンチャーとして機能し、直接熱放散に関与するのではなく、LHCII の蛍光寿命を変化させることで間接的に熱放散に寄与するとの報告がある（Pinnola et al.2015, 2017）。この分子機構の詳細に関しては、今後のさらなる解析が必要であろう。さらに *Chlamydomonas* の LHCII は 77K のクロロフィル蛍光解析において、710nm にピークを持つ蛍光スペクトルを示し、同時に pH 依存の熱放散能を持つことを示した（Dinc et al.2016）。この約 710nm にピークを持つ蛍光スペクトルは本研究においても検出されており（Fig. 17）、強光かつ低 pH でその強度が増加していた。*Chlamydomonas* の結果を合わせて考えると、約 710nm にピークを持つその蛍光スペクトルは熱放散能が高い LHCII に由来する可能性が高く、しかも LHCSR はその LHCII の熱放散能に関与している可能性が高いと考えられる。これらのデータを合わせて考えると、LHCSR は *Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex を取り囲む LHCII に結合し、pH や zeaxanthin に依存した形の熱放散を行っていると考えられる。

さらに、LHCSR に加えて PsbS も PSII-LHCII の LHCII に結合し、pH および zeaxanthin に依存する NPQ 形成に関与していることが明らかにされている（Correa-Galvis et al.2016; Sacharz et al.2017）。それを考慮すると、*Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex の pH 依存的なクエンチングに LHCSR と PsbS の両方が関係していることは十分に考えられる。

### *Physcomitrella* の PSI-LHCI における、深い low-energy chlorophyll と浅い low-energy chlorophyll の使い分け

植物は PSI-LHCI に low-energy chlorophyll（red form）と呼ばれる特別なクロロフィルを有している。これは、緑色植物の PSI-LHCI に特有の、長波長シフトしたクロロフィルのことであり、その励起エネルギー準位は通常のクロロフィルよりも低い。そして、この low-energy chlorophyll はその低い励起エネルギー準位を利用して、PSI における熱放散に寄与しているのではないかと考えられている（Yokono et al. 2019）。

*Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex の蛍光減衰スペクトル（Fig17）においては、第 2-5 寿命成分で 710, 720, 730, 740nm の low-energy chlorophyll に由来する蛍光が検出された。一方、Arabidopsis の PSI-PSII megacomplex は同様の時間領域で、720, 725, 735, 740nm の low-energy chlorophyll に由来する蛍光を示した（Fig. S3b in Yokono et al.（2015））。それらのクロロフィル蛍光の波長ピークが（700nm よりも）顕著に長波長シフトしていることから、これらは全て low-energy chlorophyll であると考えられる。なお、*Arabidopsis* と *Physcomitrella* の low-energy chlorophyll の組成の違いは *Physcomitrella* の LHCI タンパク質の多様性を反映している可能性がある（Busch et al.2013）。

機能的な観点から、low-energy chlorophyll はそのエネルギーレベルによって浅い low-energy chlorophyll と深い low-energy chlorophyll の 2 つのタイプに分けることができる。緑色植物では PSI に浅い low-energy chlorophyll を持ち、LHCI に深い low-energy chlorophyll を持つ（Kunugi et al.2016）。通常、浅い low-energy chlorophyll は約 720nm より短波長で最大の蛍光を示す。そして、PSI の反応中心である P700 に直接励起エネルギーを伝達することで光合成を駆動することができる（Melkozernov et al.2004; Melkozernov and Blankenship 2005）。逆に、PSI-LHCI の深い low-energy chlorophyll は以下の 2 つの機構によって熱として励起エネルギーを放散することができる（Yokono and Akimoto 2018）。1 つ目の機構は $P700^+$に励起エネルギーを伝達することにより $P700^+$がク

エンチャーとして働き、そのエネルギーを熱として放散する機構である（Shubin et al.1995; Schlodder et al.2011）。深い low-energy chlorophyll の蛍光は約 725nm より長波長で最大の蛍光を示し、$P700^+$と大きな Forster の重なりを持つ。$P700^+$は優れたクエンチャーであるため（Croce and van Amerongen2013）$P700^+$へエネルギーを伝達できることは過剰なエネルギーを熱として放散するのに貢献しているはずである。2 つ目の機構は PSI の内部で low-energy chlorophyll が carotenoid と電荷移動状態を形成することである。これによっても過剰な励起エネルギーを熱として放散することができる（Ballottari et al.2014）。これら 2 つの機構により PSI-LHCI は深い low-energy chlorophyll を持つことで強光に対する高い耐性を持っている（Yokono et al.2019）。

そして、*Physcomitrella* と *Arabidopsis* は両方とも浅い low-energy chlorophyll と深い low-energy chlorophyll を持っている。*Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex では amplitude の 72%が浅い low-energy chlorophyll によって占められており、*Arabidopsis* の PSI-PSII megacomplex では amplitude の 72%が深い low-energy chlorophyll によって占められていた（Table 3）。Amplitude はそれぞれの low-energy chlorophyll のエネルギー受容の確率を表している。それゆえ *Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex で吸収された励起エネルギーは主に P700 に伝達されて光合成を行い、深い low-energy chlorophyll への移動（とその後の熱放散）はそれに比べて効率が低い。対して *Arabidopsis* の PSI-PSII megacomplex に吸収された励起エネルギーは光合成に利用するよりも主に熱として放散される。その *Physcomitrella* と *Arabidopsis* の違いは PSI-LHCI の構造的な違いに関係しているかもしれない。*Arabidopsis* の PSI-LHCI は 4 つの Lhca タンパク質からなる 1 層の LHCI ベルトを持ち、そのすべてが $P700^+$とエネルギー伝達をする Forster の有効範囲内（<80-90Å）に存在する（van Grondelle 1985; Mazor et al.2015）。それゆえ *Arabidopsis* の LHCI ベルトにあるすべての low-energy chlorophyll は励起エネルギーの放散のために$P700^+$へのエネルギー伝達に参加しているかもしれない（Yokono and Akimoto 2018）。逆

に *Physcomitrella* は 8 つの Lhca タンパク質からなる 2 層の LHCI ベルトを持つ（Iwai et al.2018）。しかし 2 層目の LHCI と P700 との距離は、Forster のエネルギー伝達有効範囲を超えている可能性がある。そのため 2 層目の LHCI ベルトが深い low-energy chlorophyll を持っていたとしても、そこにトラップされたエネルギーを $P700^{+}$を用いた熱放散で散逸することはできないかもしれない。代わりに *Physcomitrella* は LHCSR と PsbS を有しており、それらが PSI-LHCI（Pinnola et al.2015, 2017）や PSII-LHCII（Correa-Galvis et al.2016; Sacharz et al.2017）の周辺の LHCII と結合して、おそらく浅い low-energy chlorophyll が受け取ったエネルギーのクエンチャーとして働いているのではないかと考えられる。

| Peak wavelength | Lifetime | Amplitude | Amplitude ration (%) | Deeper ratio (%) |
|---|---|---|---|---|
| Physcomitrella patens [in this study] | | | | |
| 710nm | 200ps | 1.5 | 36 | 28 |
| 720nm | 750ps | 1.5 | 36 | |
| 730nm | 1.9ns | 1.1 | 26 | |
| 740nm | 4.1ns | 0.08 | 2 | |
| Arabidopsis thaliana [from Yokono et al. (2015)] | | | | |
| 720nm | 240ps | 0.35 | 28 | 72 |
| 725nm | 1.0ns | 0.26 | 20 | |
| 735nm | 2.2ns | 0.44 | 35 | |
| 740nm | 3.3ns | 0.22 | 17 | |

**Table 3 low-energy chlorophyllのエネルギー受容確率比**

### 本研究から想定される *Physcomitrella* の光防御戦略

これまで議論してきたように、*Physcomitrella* の PSI-LHCI の浅い low-energy chlorophyll は吸収したエネルギーを P700 に効率的に伝達して光合成を駆動することができる（Yokono and Akimoto 2018）。また、強光下では、LHCSR や PsbS のタンパク質の発現が誘導されることが明らかになっている（Gerotto et al.2011）。最近の研究では *Chlamydomonas* の LHCSR タンパク質は青色光（Petroutsos et al.2016）や紫外線（Tilbrook et al.2016; Allorent et al.2016; Tokutsu et al.2019）によって誘導されることが明らかになっている。もしコケ植物が青色光や紫外線に応答して LHCSR タンパク質を誘導する *Chlamydomonas* と類似の機構を持つのなら、それは陸上環境への適応に貢献し得るはずである。一方、*Physcomitrella* の PsbS は grana stack に局在しており PSII-LHCII に吸収された励起エネルギーを熱として放散することができる（Pinnola et al.2015）。それゆえ強光環境では、直鎖上の電子伝達経路（いわゆる Z スキーム）は PsbS による NPQ や PSI 周辺の循環的電子伝達経路（Allahverdiyeva et al.2015）により抑制される。Grana margin に局在すると予想される PSI-PSII megacomplex 内に蓄積した $P700^+$は、PSI-PSII megacomplex 内の深い low-energy chlorophyll から励起エネルギーをトラップして効率的に放散する。このシナリオは *Arabidopsis* では起こっているようである（Fig. 20）。しかし *Physcomitrella* では深い low-energy chlorophyll からのエネルギー伝達の効率は低い（Fig. 17 and Table 2）。その代わりに、*Physcomitrella* では、LHCSR が PSI からトラップした励起エネルギーを熱として放散できる（Pinnola et al.2015）。これは陸上のような強光環境への適応に役立ったと考えられる。*Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex 周辺の LHCII 由来と思われる 710nm にピークを持つ chlorophyll 蛍光はエネルギー分配を熱放散側に傾けているのかもしれない。それにより低 pH でエネルギーの放散効率が上がっているのかもしれない（Yokono et al.2018）。この仮説の流れは、強光環境では効率的に機能し得るのではないかと考えられる（Fig. 20）。しかし、仮説の立証には更なる研究が必要である。

この研究の 1 つの限界は PSI-PSII megacomplex の変化が *Physcomitrella* の発達段階とどのように関連しているかに関する情報が得られなかったことである。本研究では原糸体を用いて解析したが、茎葉体への分化に伴い、光合成活性やその制御機構などが変わる可能性もあると考えている。*Physcomitrella* の原糸体から茎葉体への分化に伴い、PSI-PSII megacomplex の構造や機能がどのように変化するのか、そのような解析も興味深いのではないだろうか。

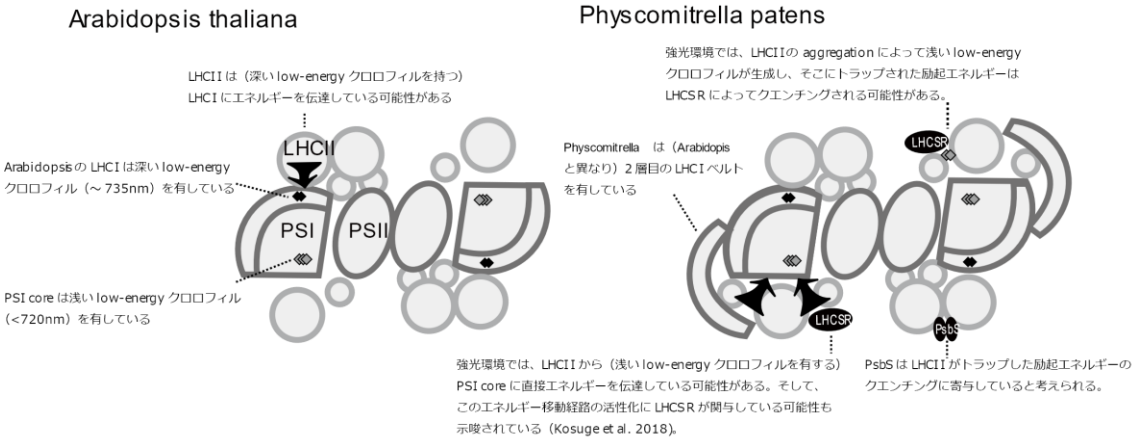


**Fig. 20 *Arabidopsis* と *Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex のモデル図**

大小の円は LHCII trimer と LHCII monomer を表している。エネルギーが深い low-energy クロロフィルに伝達された場合、効率的に熱として放散される。一方、エネルギーが浅い low-energy クロロフィルにわたると、常温で PSI の反応中心の P700 に伝達されて光合成に利用できる。

*Arabidopsis* では PSI は浅い low-energy クロロフィル を持ち、LHCI は深い low-energy クロロフィルを持つ。また、digitonin-sensitive LHCII は LHCI を経由してPSI にエネルギーを伝達できる（Benson et al.2015）。

*Physcomitrella* の PSI-PSII megacomplex の LHCII はおそらく浅い low-energy クロロフィルを持ち、PSIに直接エネルギーを伝達する可能性がある。LHCII の結合部位の違いが励起エネルギーの経路に影響していると考えられる。強光下では *Physcomitrella* のPSI-PSII megacomplex の LHCSR やPsbS が励起エネルギーの熱放散に寄与していると考えられる。

**[謝辞]**

本研究を行うにあたり多くのご指導をいただきました北海道大学低温科学研究所の田中歩名誉教授、田中亮一准教授、高林厚史助教、伊藤寿助教に感謝いたします。コケ植物に関してご指導いただきました北海道大学大学院理学研究院生物科学部門の藤田知道教授、エルさんをはじめとする藤田研の皆様に感謝いたします。本研究を行うにあたりクロロフィルの蛍光測定をしていただきました神戸大学理学研究科科学専攻状態解析化学分野の秋本誠志准教授に感謝いたします。本研究を行うにあたり多くのご指導をいただき、クロロフィルの蛍光解析をしていただきました横野牧生博士に感謝いたします。研究という枠を超えて様々な面でお世話になりました生物適応研究室のスタッフと院生に感謝いたします。そしてこれまで支えてくれた両親に感謝の意を表し謝辞とさせていただきます。

[参考文献]

**Alboresi A, Gerotto C, Giacometti GM, Bassi R, Morosinotto T (2010)**

Physcomitrella patens mutants affected on heat dissipation clarify the evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization.

*Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(24):11128-33. doi: 10.1073/pnas.1002873107.

**Allahverdiyeva Y, Suorsa M, Tikkanen M, Aro EM (2015)**

Photoprotection of photosystems in fluctuating light intensities.

*J Exp Bot.* 66(9):2427-36. doi: 10.1093/jxb/eru463.

**Allorent G, Lefebvre-Legendre L, Chappuis R, Kuntz M, Truong TB, Niyogi KK, Ulm R, Goldschmidt-Clermont M (2016)**

UV-B photoreceptor-mediated protection of the photosynthetic machinery in Chlamydomonas reinhardtii.

*Proc Natl Acad Sci U S A.* 113(51):14864-14869. doi: 10.1073/pnas.1607695114.

**Ballottari M, Alcocer MJ, D'Andrea C, Viola D, Ahn TK, Petrozza A, Polli D, Fleming GR, Cerullo G, Bassi R (2014)**

Regulation of photosystem I light harvesting by zeaxanthin.

*Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(23):E2431-8. doi: 10.1073/pnas.1404377111.

**Bellafiore S, Barneche F, Peltier G, Rochaix JD (2005)**

State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7.

*Nature.* 433(7028):892-5.

**Benson SL, Maheswaran P, Ware MA, Hunter CN, Horton P, Jansson S, Ruban AV, Johnson MP (2015)**

An intact light harvesting complex I antenna system is required for complete state transitions in Arabidopsis.

*Nat Plants.* 1:15176. doi: 10.1038/nplants.2015.176.

**Bos I, Bland KM, Tian L, Croce R, Frankel LK, van Amerongen H, Bricker TM, Wientjes E (2017)**

Multiple LHCII antennae can transfer energy efficiently to a single Photosystem I.

*Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 1858(5):371-378. doi: 10.1016/j.bbabio.2017.02.012.

**Busch A, Petersen J, Webber-Birungi MT, Powikrowska M, Lassen LM, Naumann-Busch B, Nielsen AZ, Ye J, Boekema EJ, Jensen ON, Lunde C, Jensen PE (2013)**

Composition and structure of photosystem I in the moss Physcomitrella patens.

*J Exp Bot.* 64(10):2689-99. doi: 10.1093/jxb/ert126.

**Correa-Galvis V, Poschmann G, Melzer M, Stühler K, Jahns P (2016)**

PsbS interactions involved in the activation of energy dissipation in Arabidopsis.

*Nat Plants.* 2:15225. doi: 10.1038/nplants.2015.225.

**Correa-Galvis V, Redekop P, Guan K, Griess A, Truong TB, Wakao S, Niyogi KK, Jahns P (2016)**

Photosystem II Subunit PsbS Is Involved in the Induction of LHCSR Protein-dependent Energy Dissipation in Chlamydomonas reinhardtii.

*J Biol Chem.* 291(33):17478-87. doi: 10.1074/jbc.M116.737312.

**Croce R, van Amerongen H (2013)**

Light-harvesting in photosystem I.

*Photosynth Res.* 116(2-3):153-66. doi: 10.1007/s11120-013-9838-x.

**Dinc E, Tian L, Roy LM, Roth R, Goodenough U, Croce R (2016)**

LHCSR1 induces a fast and reversible pH-dependent fluorescence quenching in LHCII in Chlamydomonas reinhardtii cells.

*Proc Natl Acad Sci U S A.* 113(27):7673-8. doi: 10.1073/pnas.1605380113.

**Ferroni L, Suorsa M, Aro EM, Baldisserotto C, Pancaldi S (2016)**

Light acclimation in the lycophyte Selaginella martensii depends on changes in the amount of photosystems and on the flexibility of the light-harvesting complex II antenna association with both photosystems.

*New Phytol.* 211(2):554-68. doi: 10.1111/nph.13939.

**Ferroni L, Cucuzza S, Angeleri M, Aro EM, Pagliano C, Giovanardi M, Baldisserotto C, Pancaldi S (2018)**

In the lycophyte Selaginella martensii is the "extra-qT" related to energy spillover? Insights into photoprotection in ancestral vascular plants.

*Enrion Exp Bot* 154:110–122. doi: 10.1016/j.envex pbot.2017.10.023

**Gerotto C, Alboresi A, Giacometti GM, Bassi R, Morosinotto T (2011)**

Role of PSBS and LHCSR in Physcomitrella patens acclimation to high light and low temperature.

*Plant Cell Environ.* 34(6):922-932. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02294.x.

**Giovanardi M, Poggioli M, Ferroni L, Lespinasse M, Baldisserotto C, Aro EM, Pancaldi S (2017)**

Higher packing of thylakoid complexes ensures a preserved photosystem II activity in mixotrophic Neochloris oleoabundans.

*Algal Res* 25:322–332. doi: 10.1016/j.algal .2017.05.020

**Goss R, Lepetit B (2015)**

Biodiversity of NPQ.

*J Plant Physiol.* 172:13-32. doi: 10.1016/j.jplph.2014.03.004.

**Hohmann-Marriott MF, Blankenship RE (2011)**

Evolution of photosynthesis.

*Annu Rev Plant Biol.* 62:515-48. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103811. Review.

**Iwai M, Yokono M, Inada N, Minagawa J (2010)**

Live-cell imaging of photosystem II antenna dissociation during state transitions.

*Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(5):2337-42. doi: 10.1073/pnas.0908808107.

**Iwai M, Yokono M, Kono M, Noguchi K, Akimoto S, Nakano A (2015)**

Light-harvesting complex Lhcb9 confers a green alga-type photosystem I supercomplex to the moss Physcomitrella patens.

*Nat Plants.* 1:14008. doi: 10.1038/nplants.2014.8.

**Iwai M, Yokono M (2017)**

Light-harvesting antenna complexes in the moss Physcomitrella patens: implications for the evolutionary transition from green algae to land plants.

*Curr Opin Plant Biol.* 37:94-101. doi: 10.1016/j.pbi.2017.04.002.

**Iwai M, Grob P, Iavarone AT, Nogales E, Niyogi KK (2018)**

A unique supramolecular organization of photosystem I in the moss Physcomitrella patens.

*Nat Plants.* 4(11):904-909. doi: 10.1038/s41477-018-0271-1.

**Järvi S, Suorsa M, Paakkarinen V, Aro EM (2011)**

Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super- and mega-complexes.

*Biochem J.* 439(2):207-14. doi: 10.1042/BJ20102155.

**Johnson MP, Goral TK, Duffy CD, Brain AP, Mullineaux CW, Ruban AV (2011)**

Photoprotective energy dissipation involves the reorganization of photosystem II light-harvesting complexes in the grana membranes of spinach chloroplasts.

Plant Cell. 23(4):1468-79. doi: 10.1105/tpc.110.081646.

**Kosuge K, Tokutsu R, Kim E, Akimoto S, Yokono M, Ueno Y, Minagawa J (2018)**

LHCSR1-dependent fluorescence quenching is mediated by excitation energy transfer from LHCII to photosystem I in Chlamydomonas reinhardtii.

*Proc Natl Acad Sci U S A.* 115(14):3722-3727. doi: 10.1073/pnas.1720574115.

**Kunugi M, Satoh S, Ihara K, Shibata K, Yamagishi Y, Kogame K, Obokata J, Takabayashi A, Tanaka A (2016)**

Evolution of Green Plants Accompanied Changes in Light-Harvesting Systems.

*Plant Cell Physiol.* 57(6):1231-43. doi: 10.1093/pcp/pcw071.

**Mazor Y, Borovikova A, Nelson N (2015)**

The structure of plant photosystem I super-complex at 2.8 Å resolution.

*Elife.* 4:e07433. doi: 10.7554/eLife.07433.

**Melkozernov AN, Blankenship RE (2005)**

Structural and functional organization of the peripheral light-harvesting system in photosystem I.

*Photosynth Res.* 85(1):33-50. Review.

**Melkozernov AN, Kargul J, Lin S, Barber J, Blankenship RE (2005)**

Spectral and kinetic analysis of the energy coupling in the PS I-LHC I supercomplex from the green alga Chlamydomonas reinhardtii at 77 K.

*Photosynth Res.* 86(1-2):203-15.

**Mimuro M, Yokono M, Akimoto S (2010)**

Variations in photosystem I properties in the primordial cyanobacterium Gloeobacter violaceus PCC 7421.

*Photochem Photobiol.* 86(1):62-69. doi: 10.1111/j.1751-1097.2009.00619.x.

**Minagawa J, Tokutsu R (2015)**

Dynamic regulation of photosynthesis in Chlamydomonas reinhardtii.

*Plant J.* 82(3):413-428. doi: 10.1111/tpj.12805.

**Nishiyama T, Hiwatashi Y, Sakakibara I, Kato M, Hasebe M (2000)**

Tagged mutagenesis and gene-trap in the moss, Physcomitrella patens by shuttle mutagenesis.

*DNA Res.* 7(1):9-17.

**Niyogi KK, Truong TB (2013)**

Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis.

*Curr Opin Plant Biol.* 16(3):307-14. doi: 10.1016/j.pbi.2013.03.011.

**Peers G, Truong TB, Ostendorf E, Busch A, Elrad D, Grossman AR, Hippler M, Niyogi KK (2009)**

An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis.

*Nature.* 462(7272):518-21. doi: 10.1038/nature08587.

**Pesaresi P, Hertle A, Pribil M, Kleine T, Wagner R, Strissel H, Ihnatowicz A, Bonardi V, Scharfenberg M, Schneider A, Pfannschmidt T, Leister D (2009)**

Arabidopsis STN7 kinase provides a link between short- and long-term photosynthetic acclimation.

*Plant Cell.* 21(8):2402-23. doi: 10.1105/tpc.108.064964.

**Petroutsos D, Tokutsu R, Maruyama S, Flori S, Greiner A, Magneschi L, Cusant L, Kottke T, Mittag M, Hegemann P, Finazzi G, Minagawa J (2016)**

A blue-light photoreceptor mediates the feedback regulation of photosynthesis.

*Nature.* 537(7621):563-566. doi: 10.1038/nature19358.

**Pinnola A, Cazzaniga S, Alboresi A, Nevo R, Levin-Zaidman S, Reich Z, Bassi R (2015)**

Light-Harvesting Complex Stress-Related Proteins Catalyze Excess Energy Dissipation in Both Photosystems of Physcomitrella patens.

*Plant Cell.* 27(11):3213-27. doi: 10.1105/tpc.15.00443.

**Pinnola A, Dall'Osto L, Gerotto C, Morosinotto T, Bassi R, Alboresi A (2013)**

Zeaxanthin binds to light-harvesting complex stress-related protein to enhance nonphotochemical quenching in Physcomitrella patens.

*Plant Cell.* 25(9):3519-34. doi: 10.1105/tpc.113.114538.

**Pinnola A, Ballottari M, Bargigia I, Alcocer M, D'Andrea C, Cerullo G, Bassi R (2017)**

Functional modulation of LHCSR1 protein from Physcomitrella patens by zeaxanthin

binding and low pH.

*Sci Rep.* 7(1):11158. doi: 10.1038/s41598-017-11101-7.

**Popot JL, Althoff T, Bagnard D, Banères JL, Bazzacco P, Billon-Denis E, Catoire LJ, Champeil P, Charvolin D, Cocco MJ, Crémel G, Dahmane T, de la Maza LM, Ebel C, Gabel F, Giusti F, Gohon Y, Goormaghtigh E, Guittet E, Kleinschmidt JH, Kühlbrandt W, Le Bon C, Martinez KL, Picard M, Pucci B, Sachs JN, Tribet C, van Heijenoort C, Wien F, Zito F, Zoonens M (2011)**

Amphipols from A to Z.

*Annu Rev Biophys.* 40:379-408. doi: 10.1146/annurev-biophys-042910-155219.

**Ruban AV (2015)**

Evolution under the sun: optimizing light harvesting in photosynthesis.

*J Exp Bot.* 66(1):7-23. doi: 10.1093/jxb/eru400.

**Ruban AV (2016)**

Nonphotochemical Chlorophyll Fluorescence Quenching: Mechanism and Effectiveness in Protecting Plants from Photodamage.

*Plant Physiol.* 170(4):1903-16. doi: 10.1104/pp.15.01935.

**Sacharz J, Giovagnetti V, Ungerer P, Mastroianni G, Ruban AV (2017)**

The xanthophyll cycle affects reversible interactions between PsbS and light-harvesting complex II to control non-photochemical quenching.

*Nat Plants.* 3:16225. doi: 10.1038/nplants.2016.225.

**Schlodder E, Hussels M, Cetin M, Karapetyan NV, Brecht M (2011)**

Fluorescence of the various red antenna states in photosystem I complexes from cyanobacteria is affected differently by the redox state of P700.

*Biochim Biophys Acta.* 1807(11):1423-31. doi: 10.1016/j.bbabio.2011.06.018.

**Shubin VV, Bezsmertnaya IN, Karapetyan NV (1995)**

Efficient energytransfer from the long-wavelength antenna chlorophylls to P700 in photosystem-I complexes from Spirulina platensis.

*J Photochem Photobiol B* 30:153–160. doi: 10.1016/10111344(95)07173 –Y

**Stomp M, Huisman J, Stal LJ, Matthijs HC (2007)**

Colorful niches of phototrophic microorganisms shaped by vibrations of the water molecule.

*ISME J.* 1(4):271-82.

**Strecker V, Wumaier Z, Wittig I, Schägger H (2010)**

Large pore gels to separate mega protein complexes larger than 10 MDa by blue native electrophoresis: isolation of putative respiratory strings or patches.

*Proteomics.* 10(18):3379-87. doi: 10.1002/pmic.201000343.

**Suorsa M, Rantala M, Mamedov F, Lespinasse M, Trotta A, Grieco M, Vuorio E, Tikkanen M, Järvi S, Aro EM (2015)**

Light acclimation involves dynamic re-organization of the pigment-protein

megacomplexes in non-appressed thylakoid domains.

*Plant J.* 84(2):360-73. doi: 10.1111/tpj.13004.

**Tilbrook K, Dubois M, Crocco CD, Yin R, Chappuis R, Allorent G, Schmid-Siegert E, Goldschmidt-Clermont M, Ulm R (2016)**

UV-B Perception and Acclimation in Chlamydomonas reinhardtii.

*Plant Cell.* 28(4):966-83. doi: 10.1105/tpc.15.00287.

**Tokutsu R, Minagawa J (2013)**

Energy-dissipative supercomplex of photosystem II associated with LHCSR3 in Chlamydomonas reinhardtii.

*Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(24):10016-21. doi: 10.1073/pnas.1222606110.

**Tokutsu R, Fujimura-Kamada K, Yamasaki T, Matsuo T, Minagawa J (2019)**

Isolation of photoprotective signal transduction mutants by systematic bioluminescence screening in Chlamydomonas reinhardtii.

*Sci Rep.* 9(1):2820. doi: 10.1038/s41598-019-39785-z.

**Ueno Y, Aikawa S, Kondo A, Akimoto S (2019)**

Adaptation of light-harvesting functions of unicellular green algae to different light qualities.

*Photosynth Res.* 139(1-3):145-154. doi: 10.1007/s11120-018-0523-y.

**Umetani I, Kunugi M, Yokono M, Takabayashi A, Tanaka A (2018)**

Evidence of the supercomplex organization of photosystem II and light-harvesting complexes in Nannochloropsis granulata.

*Photosynth Res.* 136(1):49-61. doi: 10.1007/s11120-017-0438-z.

**Van Grondelle R (1985)**

Excitation-energy transfer, trapping and annihilation in photosynthetic systems. *Biochim Biophys Acta* 811:147–195. doi: 10.1016/0304-4173(85)90017 -5

**Vasil'ev S, Irrgang KD, Schrötter T, Bergmann A, Eichler HJ, Renger G (1997)**

Quenching of chlorophyll a fluorescence in the aggregates of LHCII: steady state fluorescence and picosecond relaxation kinetics.

*Biochemistry.* 36(24):7503-12.

**Watanabe A, Kim E, Burton-Smith RN, Tokutsu R, Minagawa J (2019)**

Amphipol-assisted purification method for the highly active and stable photosystem II supercomplex of Chlamydomonas reinhardtii.

*FEBS Lett.* 593(10):1072-1079. doi: 10.1002/1873-3468.13394.

**Wobbe L, Bassi R, Kruse O (2016)**

Multi-Level Light Capture Control in Plants and Green Algae.

*Trends Plant Sci.* 21(1):55-68. doi: 10.1016/j.tplants.2015.10.004.

**Xu DQ, Chen Y, Chen GY (2015)**

Light-harvesting regulation from leaf to molecule with the emphasis on rapid changes

in antenna size.

*Photosynth Res.* 124(2):137-58. doi: 10.1007/s11120-015-0115-z.

**Yokono M, Akimoto S (2018)**

Energy transfer and distribution in photosystem super/megacomplexes of plants.

*Curr Opin Biotechnol.* 54:50-56. doi: 10.1016/j.copbio.2018.01.001.

**Yokono M, Umetani I, Takabayashi A, Akimoto S, Tanaka A (2019)**

Regulation of excitation energy in Nannochloropsis photosystem II.

*Photosynth Res.* 139(1-3):155-161. doi: 10.1007/s11120-018-0510-3.

**Yokono M, Takabayashi A, Kishimoto J, Fujita T, Iwai M, Murakami A, Akimoto S, Tanaka A (2019)**

The PSI-PSII Megacomplex in Green Plants.

*Plant Cell Physiol.* 60(5):1098-1108. doi: 10.1093/pcp/pcz026.

**Yokono M, Takabayashi A, Akimoto S, Tanaka A (2015)**

A megacomplex composed of both photosystem reaction centres in higher plants.

*Nat Commun.* 6:6675. doi: 10.1038/ncomms7675.