



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	光化学系IIの構築に関わるONE-HELIX-PROTEIN1複合体の解析
Author(s)	前田, 華希
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第14833号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14833
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89180
Type	doctoral thesis
File Information	Hanaki_Maeda.pdf



博士論文

光化学系 II の構築に関わる
ONE-HELIX-PROTEIN1 複合体の解析

北海道大学大学院 生命科学院 生命システム科学コース

低温科学研究所 生物適応機構研究室

令和4年3月

前田 華希

目次

1. 要旨	1
2. 序論	3
2.1 光化学系 II について	3
2.2 光化学系 II の <i>de novo</i> 合成と repair cycle について	4
2.3 OHP1 複合体に関わる補助タンパク質の研究背景について	6
2.4 本研究の目的	7
2.4-1 OHP1 複合体の構成タンパク質の同定	7
2.4-2 OHP1 複合体の分光学的性質	8
2.4-3 補助タンパク質のチラコイド膜上の局在	8
2.4-4 強光応答に対する補助タンパク質の役割	9
3. 材料と方法	11
3.1 植物材料と育成条件	11
3.1-1 OHP1-FLAG 過剰発現株	11
3.1-2 OHP2-RNAi 株	11
3.2 チラコイド膜の単離	12
3.2-1 Large Scale	12
3.2-2 Small Scale	12
3.3 OHP1 複合体の精製	13
3.3-1 カラムクロマトグラフィーによる OHP1 複合体精製	13
3.3-2 磁気ビーズを用いた免疫沈降法による OHP1 複合体精製	13
3.4 Clear-Native-PAGE (CN-PAGE) と Blue-Native-PAGE (BN-PAGE)	14
3.5 2D-CN/SDS-PAGE	14
3.6 SDS-PAGE	15
3.7 Immunoblotting	15
3.8 ゲルの染色	16
3.8-1 銀染色	16
3.8-2 Flamingo 染色	16
3.8-3 Coomassie Brilliant Blue : CBB 染色	16
3.9 分光解析	16
3.10 チラコイド膜の分画と SDS-PAGE 及び Immunoblotting への濃度調節	17
3.11 Dexamethasone 処理による OHP2-RNAi 株の RNAi 誘導	18
3.11-1 Dexamethasone 処理による RNAi 誘導	18
3.11-2 RNA 抽出と cDNA の作成	18
3.11-3 qRT-PCR	18
3.11-4 光化学反応の最大量子収率(F_v/F_m)の測定	19

4. 結果	20
4.1. OHP1 複合体の構成サブユニットの同定	20
4.1-1. OHP1 複合体精製方法の検討	20
4.1-2. OHP1 複合体の構成サブユニットの同定	22
4.2. OHP1 複合体の分光学的性質の解析	24
4.2-1. 蛍光スペクトルと励起光スペクトル	24
4.2-2. 時間分解クロロフィル蛍光（蛍光寿命）	25
4.3. OHP1 複合体構成補助タンパク質のチラコイド膜の局在解析	25
4.4. 強光応答に対する補助タンパク質の機能解析	26
5. 考察	28
5.1. OHP1 複合体の構成サブユニット	28
5.2. OHP1 複合体の分光学的解析	29
5.3. 補助タンパク質のチラコイド膜上での局在	30
5.4. 強光ストレス条件下での補助タンパク質の役割	33
5.5. まとめ	34
6. 図表	36
7. 謝辞	66
8. 参考文献	67

1. 要旨

陸上植物を含む酸素発生型の光合成生物は2種類の光化学系（Photosystem I, II : PS I、PS II）と呼ばれる色素タンパク質複合体で光エネルギーを吸収する。本研究で主題として扱う光化学系 II（PS II）は光エネルギーを用いて水を酸化し、電子伝達の起点の役割を担う酸化還元酵素である。PS II は葉緑体のチラコイド膜に内包される、20種類以上のサブユニットから構成された巨大なタンパク質複合体である。PS II はその構成サブユニットの多さから、*de novo* 合成の際には、中心のサブユニット（D1、D2）に周辺のサブユニットが順に結合していく段階的な過程を踏む。PS II は光合成に必要不可欠な酵素であるが、一方で、強光ストレスに弱く、光強度に比例して複合体が損傷を受け、分解されるという性質がある。これは、吸収した過剰な光エネルギーにより活性酸素が発生し、この活性酸素が反応中心サブユニットである D1 に損傷を与えることに起因する。損傷を受けた D1 を含む PS II は、複合体を一時的に分解され、新しく合成された D1 が置換された後、再度複合体が構築される。この過程を repair cycle と呼ぶ。

PS II は *de novo* 合成でも、repair cycle でも構築に段階的な過程を踏むことが知られているが、それらの構築過程がどの程度共通しているのかは不明である。また、この構築過程には完成した PS II に含まれないいくつかの補助タンパク質が関与することが報告されているが、これらの補助タンパク質が構築のどのタイミングで、どのような役割を担うのかは未解明な点が多く残っている。

本研究室では2017年より、陸上植物の PS II *de novo* 合成の初期に見られる構築中間体に着目して研究を進めており、この複合体が反応中心である D1、D2 の他に、補助タンパク質である ONE-HELIX-PROTEIN1（OHP1）を結合することを明らかにした。加えて、OHP1 複合体と名付けたこの複合体を精製し、関与する他の補助タンパク質を同定しようと試みてきた。しかしながら、OHP1 複合体は細胞内の存在量が少なく、精製過程で壊れやすいという性質があるため、精製した結果検出される複合体の種類や量が安定しないという課題を抱えていた。そこで本研究では、OHP1 複合体の精製方法を改良することで構成サブユニットを同定し、関与する補助タンパク質の機能解明を目的として研究を行った。

精製方法の改良の結果、OHP1 複合体は、D1、D2、Cytochrome *b*₅₅₉ に加えて、3種類の補助タンパク質（OHP1、OHP2、High-Chlorophyll-Fluorescence 244 : HCF244）を安定して結合することが示さ

れた。一方、先行研究で結合する可能性が示唆されていた HCF136、RubA、APE1 は精製された OHP1 複合体のうち、ごく一部に結合していることが示唆された。さらに、OHP1 複合体の分光学的性質を解析し、OHP1 複合体が余剰に吸収した光エネルギーを熱として放散する仕組みを持つことを示した。また、OHP2 と HCF244 のチラコイド膜内の分布を解析し、PS II の構築の初期段階がチラコイド膜のグラナマージン、及び/あるいは、ストロマラメラと呼ばれる領域で行われる可能性を提示した。さらに、本研究室で作製した OHP2 のノックダウン株（OHP2-RNAi 株）を用いて、*de novo* 合成より repair cycle が盛んに行われると考えられる強光ストレス条件下で、損傷を受けた PS II の割合を示す Fv/Fm を測定した。その結果、WT と比較して OHP2-RNAi 株では Fv/Fm の大幅な低下が認められたため、OHP2 が *de novo* 合成だけでなく、repair cycle にも関与することが示唆された。

2. 序論

2.1 光化学系 II について

光合成は光のエネルギーを吸収し、還元剤や ATP という物質の形で化学エネルギーとして固定するしくみである。光合成は光捕集、光化学反応、電子伝達、ATP 合成、二酸化炭素の還元・固定など複数の過程から成っている。陸上植物や藻類、葉緑体の起源と考えられているシアノバクテリアは、水を電子供与体とする酸素発生型の光合成を行っており、2 種類の光化学系 (Photosystem I、II : PSI、PS II) を持っている。光化学系は、光化学系反応中心複合体 (Reaction center : RC) と光捕集アンテナからなる。

本研究で主題として扱う光化学系 II (PS II) は、光エネルギーを用いて水を酸化し、酸素、プロトン、電子に分解することで電子伝達を行う酸化還元酵素である。PS II は 20 種類以上のサブユニットから構成される巨大な膜タンパク質複合体であり、2 量体として葉緑体のチラコイド膜に内在している (Suga et al., 2015; Van Bezouwen et al., 2017; Su et al., 2017) (図 1)。PS II の反応中心は D1 (PsbA) 及び D2 (PsbD) サブユニットから構成され、PS II の電子伝達成分の全てが結合している。この 2 つのサブユニットはそれぞれ 5 回膜貫通ヘリックスを持っており、緑色色素であるクロロフィル a (Chl a) を 3 分子、クロロフィル a の代謝産物であるフェオフィチン a (Pheo a) を 1 分子、電子受容体であるキノン (Q) を 1 分子ずつ有している。PS II と PS II に結合する光捕集アンテナ複合体 (light-harvesting-complex II : LHCII) が集めた光エネルギーは、D1/D2 に結合する Chl a へと運ばれ、電荷分離が生じる。この反応中心を囲むような形で、CP47 (PsbB)、CP43 (PsbC) と呼ばれるサブユニットが結合する。CP47 と CP43 はそれぞれ 6 回膜貫通ヘリックスを持ち、アンテナ色素複合体とも呼ばれる。CP47 には 16 分子、CP43 には 13 分子の Chl a が結合しており、光捕集の役割を果たしている。これら 4 つのサブユニットの周辺には、さらに 13 種類の低分子量サブユニットが結合し、PS II の構造の安定性や色素の PS II への結合の維持などに関与している。さらに、いくつかの膜表在性サブユニットが結合しており、これらは PS II の構造構築に必要だと考えられている。加えて、D1 のルーメン側には水を分解して酸素を発生させる触媒中心である Mn_4CaO_5 クラスターが結合している。

PS II は光合成に必要不可欠な酵素であるが、一方で、光ストレスに弱く、光強度に比例して複合体が損傷を受けるという性質がある。これは、吸収した過剰な光エネルギーにより Mn_4CaO_5 クラスターで活性酸素が発生し、この活性酸素が D1 に損傷を与えることに起因する (Murata et al., 2012)。損傷を受けた D1 を含む PS II は、複合体を一時的に分解し、新しく合成された D1 と置換した後、再度複合体を構築し直す修復作業を行う。これらの過程を repair cycle と呼ぶ

2.2 光化学系 II の *de novo* 合成と repair cycle について

PS II を構築する主要なサブユニットの遺伝子は葉緑体ゲノムでコードされており、チラコイド膜表面に結合したリボソームによって、膜内でタンパク質が合成されていく。PS II の *de novo* 合成は、より中心のサブユニットから順に、段階的に結合する過程を踏む (Aro et al., 2005; Rokka et al., 2005; Nixon et al., 2010; Nickelsen and Rengstl, 2013; Lu, 2016) (図 2)。始めに、D1 と低分子量サブユニットである PsbI が結合した D1-PsbI 複合体と、D2 と低分子量サブユニットの Cytochrome b_{559} :Cyt $b_{559} \alpha$ (PsbE)、Cyt $b_{559} \beta$ (PsbF) が結合した D2-Cyt b_{559} 複合体が合成される。次に、この 2 つの複合体が結合することで形成される複合体は RC 複合体と呼ばれる。その後、CP47 が結合することで RC47 複合体 (RC47a、RC47b) が形成され、CP43 及びいくつかの低分子量サブユニットが結合することで PS II コア単量体 (PS II core monomer) が形成される。その後、2 量体 (PS II core dimer) を形成し、光捕集アンテナ複合体である LHC II を結合することで、活性を持つ PS II-LHC II 超複合体 (PS II-LHC II supercomplex) が形成される。なお、この構築過程の大部分はシアノバクテリアから陸上植物まで保存されていると考えられているが、陸上植物では D1-PsbI 複合体、及び D2-Cyt b_{559} 複合体は発見されていない。

一方 repair cycle では、損傷を受けた D1 を含む PS II-LHC II supercomplex から LHC II が分離し、単量体化した後、部分的に複合体が分解されることが考えられているが、下記で述べるように、この修復過程の詳細はわかっていない (図 3)。D1 が特異的に分解されることは、 ^{35}S メチオニン標識 *in vivo* ラベリング解析によって、D1 の優先的な合成を確かめられたことを基にしている (Sundby et al., 1993; Zhang et al., 1999)。一方で、D1 以外のサブユニットがどの程度置換されるのかという点については未解明な点

が多いが、Järvi ら(Järvi et al., 2015)は、D1 のみ、あるいは D2、CP43、及び低分子量サブユニットの PsbH も置換されるという説を提案している。損傷したサブユニットの置換後は、複合体が再構築され、PS II は再び活性を持つ(Mattoo et al., 1984; Barber and Andersson, 1992; Adir et al., 2003; Rokka et al., 2005)。

遺伝学的アプローチにより、*de novo* 合成と repair cycle には、完成した PS II には含まれない多数の補助タンパク質が関与することが知られている(Pagliano et al., 2013; Järvi et al., 2015; Lu, 2016)。これらの補助タンパク質の一覧を表 1 に示した。本研究は PS II 構築過程の中でも、初期の過程である D1 タンパク質の合成や RC 複合体の形成に着目して研究を進めたため、これに関連する補助タンパク質をいくつか紹介する。シグナル認識粒子 (SRP) タンパク質は *psbA* mRNA を翻訳中のリボソームに結合し、チラコイド膜へのターゲティングに機能する(Cline and Dabney-Smith, 2008; Walter et al., 2015)。この際、SRP の受容体となるのが FtsY タンパク質である(Cline and Dabney-Smith, 2008; Albiniak et al., 2012; Walter et al., 2015)。その後、合成されたペプチドは SecY/ALB3 トランスロカーゼによって膜内に埋め込まれ、色素などの補因子の結合に伴って適切なフォールディングが行われる(Cline and Dabney-Smith, 2008; Albiniak et al., 2012; Walter et al., 2015)。このように、D1 タンパク質は翻訳と同時にチラコイド膜に挿入される(Jagendorf and Michaels, 1990; Kim et al., 1991; Zhang et al., 1999; Zoschke and Barkan, 2015; Króliczewski et al., 2016)。膜内に挿入された新生 D1 タンパク質は前駆体型 D1 (pD1) と呼ばれ、CtpA タンパク質によって C 末端プロセッシングを受けた後、活性型の D1 タンパク質となる(Yamamoto et al., 2001; Che et al., 2013)。また、D1 が光損傷を受けた際には、STN7/STN8 プロテインキナーゼにより PS II がリン酸化された後、チラコイド膜内の PS II が電子伝達を行う場であるグラナコアと呼ばれる領域から、タンパク質の分解と合成が盛んなグラナマージン/ストロマラメラと呼ばれる領域に複合体が輸送される(Bellaflora et al., 2005; Bonardi et al., 2005; Tikkanen et al., 2008; Tikkanen and Aro, 2012; Nath et al., 2013)。次いで、PBCP ホスフォキナーゼにより脱リン酸化された PS II は部分的に解体され(Samol et al., 2012)、FtsH 及び Deg プロテアーゼにより D1 が分解される(Sakamoto et al., 2002; Yu et al., 2004; Zaltsman et al., 2005; Chassin et al., 2002; Kapri-Pardes et al., 2007; Sun et al., 2010; Schuhmann and Adamska, 2012)。その後、新規合成された D1 を中心とした PS II の再構築が起こる (図 3)。

2.3 OHP1 複合体に関わる補助タンパク質の研究背景について

本研究では、陸上植物の RC 複合体に着目して研究を進めており、ここで扱った補助タンパク質は、表 1 の PS II の *de novo* 合成、repair cycle に関与する補助タンパク質の中で、赤字で示している。High-Chlorophyll-Fluorescence173: HCF173、HCF136、HCF244 はその変異体が、吸収したエネルギーが何らかの理由で効率的に光合成に利用できないことの指標となる強いクロロフィル蛍光を発すること、及び、PS II の蓄積が大きく阻害されたことから特徴付けられたタンパク質である (Meurer et al., 1998; Schult et al., 2007; Link et al., 2012)。HCF173 は陸上植物でのみ認められる補助タンパク質であり、D1 の翻訳開始に関与すると考えられている (Schult et al., 2007; Link et al., 2012)。HCF136 は *psbA* mRNA との結合は認められていないものの、暗所においてその変異体では、*psbA* mRNA へ結合するポリソームが増加することが報告されている (Chotewutmontri and Barkan, 2020)。また、シアノバクテリアで発現する HCF136 のホモログである Ycf48 は、pD1、RC 複合体、RC47 複合体への結合が報告されており、翻訳された D1 の膜への挿入や、RC 複合体の形成、安定性の維持への関与が示唆されている (Komenda et al., 2008; Yu et al., 2018)。HCF244 の変異体では、*psbA* mRNA に結合するポリソームの低下が認められ、D1 合成に必須の補助タンパク質だと考えられている (Chotewutmontri et al., 2020)。加えて、HCF244 のシアノバクテリアのホモログである Ycf39 は RC 複合体に結合することが報告されている (Knoppová et al., 2014)。OHP1、OHP2 は、アンテナタンパク質である LHC に類似した膜貫通構造を持ち、LHC family タンパク質と呼ばれ、*in vitro* 再構成実験で色素を結合することが報告されている (Hey and Grimm, 2020)。OHP1、OHP2 は本研究の最も要となる補助タンパク質であるため、その機能に関する研究の流れを表 2 に示した。機能研究の始まりは、2017 年に Beck ら (Beck et al., 2017) により、OHP1、OHP2 が *de novo* 合成における PS II コアの蓄積に必須であると報告されたことである。翌年、本研究室と理化学研究所の明賀、篠崎らの研究チームとの共同研究により、OHP1 と OHP2 が RC 複合体に結合することが報告された (Myouga et al., 2018)。本研究では以降、陸上植物の RC II 複合体を OHP1 複合体と呼ぶ。加えて、同論文では HCF173、HCF136、HCF244 などのいくつかの補助タンパク質も

OHP1 複合体と共精製されることを報告している。しかしながら、この研究では複合体の精製度が十分でなく、非特異的に検出されたタンパク質も多数混入しており、正確なサブユニット組成の同定には至っていない。一方、Hey and Grimm (Hey and Grimm, 2018) は、免疫共沈殿により OHP1、OHP2、HCF244 が相互作用することを示した。また、Li ら (Li et al., 2019) は、HCF136 が OHP1 と複合体を形成していないと報告した。この報告は Myouga ら (Myouga et al., 2018) の示した結果とは異なっており、OHP1 複合体の構成サブユニットに関する議論は結論が出ないままとなっている。一方で、Chotewutmontri ら (Chotewutmontri et al., 2020) は、OHP1、OHP2 の機能として、HCF244 と同様に *psbA* mRNA の翻訳開始を制御する役割を報告した。

2.4 本研究の目的

本研究は、OHP1 複合体の精製純度の向上による構成サブユニットの同定、及び、OHP1 複合体や補助タンパク質の基本的な性質と機能解明を目的として研究を行った。以下に、それぞれの本研究の具体的な目標を詳細に述べる。

2.4-1 OHP1 複合体の構成タンパク質の同定

葉緑体の祖先と考えられているシアノバクテリアの RC 複合体には、PS II のサブユニットである D1/D2/PsbI/PsbE/PsbF に加えて、補助タンパク質として Ycf39、Ycf48、HliC、HliD、RubA の結合が報告されている (Knoppová et al., 2014; Kiss et al., 2019) (図 4)。HliC、HliD は、LHC family タンパク質であり、OHP1、OHP2 のホモログである。一方で、陸上植物の RC 複合体 (OHP1 複合体) の構成サブユニットは明確な同定がなされていない。OHP1 複合体の研究が難航した理由としては、シアノバクテリアと比較して細胞内の RC 複合体の存在量が少ないこと、及び、複合体を形成するタンパク質間の結合が弱く、精製過程で壊れやすい性質があることが挙げられる。そこで本研究では、タンパク質複合体の構造や機能を維持したまま分離・精製する技術を用いて、精製過程を最適化し、OHP1 複合体の構成サブユニットを同定することを目指した。

2.4-2 OHP1 複合体の分光学的性質

一般的に、光化学系タンパク質複合体内部では、結合する色素の1つが光エネルギーを吸収すると、近くの色素へ、その励起エネルギーを移動させる反応（excitation energy transfer: EET）が起こる。EETは反応中心 Chl a まで進行し、電荷分離を引き起こす。吸収した光エネルギーの大部分は、このように光合成反応に用いられるが、残りは熱または蛍光として放出される。

この時放出される蛍光の波長は、光合成タンパク質複合体の種類によって固有の値を持つ。一方で、光合成タンパク質複合体が吸収し、励起される光エネルギーの波長は、その複合体が結合する色素分子の種類によって大まかに決定される。光合成タンパク質複合体ごとの異なる蛍光の波長と、励起に寄与する吸収した光の波長を解析する方法として、それぞれ蛍光スペクトル解析、励起光スペクトル解析がある。本研究では、OHP1 複合体の基本的な性質を明らかにすることを目指し、これら2つの解析を行った。

また、光合成タンパク質複合体が放出する蛍光の強さが $1/e$ になるまでにかかる時間は蛍光寿命と呼ばれ、EET にかかる時間や熱放散能の有無などに依存しており、複合体の種類によって、大きく異なる (Croce and van Amerongen, 2020) (図5)。よって、光化学系タンパク質複合体の蛍光寿命を測定することは、その複合体に内包される色素の配置や種類、接続性、エネルギー伝達率などの理解へ役立てることができる。また、光合成タンパク質複合体の蛍光寿命を、光化学反応や EET を行わない遊離 Chl a の蛍光寿命（約 5 ns）と比較することにより、複合体の熱放散能の有無を調べることが可能である。そこで本研究では、精製した OHP1 複合体の時間分解クロロフィル蛍光（蛍光寿命）を測定した。

2.4-3 補助タンパク質のチラコイド膜上の局在

2.2 項、及び図3にて、PS II の活性部位と分解・合成が行われる部位がチラコイド膜上で異なることに触れた。チラコイド膜には、円盤状のチラコイド膜が積み重なったグラナと呼ばれる構造と、グラナを繋ぐ細長く伸びたチラコイド膜であるストロマラメラと呼ばれる構造がある(図6)。グラナはさらに、各

円盤が互いに接したグラナコアと呼ばれる領域と、円盤辺縁のカーブした部位を指すグラナマージンと呼ばれる領域に細分化される。また、ストロマラメラも視覚的な区別はされていないが、タンパク質の密度が高い領域と密度が低い領域に区別されることがあり、前者を狭義のストロマラメラ、後者を Y100 と呼び分けることもある (Danielsson et al., 2006; Suorsa et al., 2014)。PS II は活性型では LHC II と複合体を形成し、グラナコアに分布している。グラナの積み重なりは、LHC II の膜表面に露出したサブユニット同士が結合することによって形成されていると考えられている。一方で、ストロマラメラにはリボソームが多数結合している様子が確認されており (Liang et al., 2018)、この場所がタンパク質合成の場であると考えられている。グラナマージンは、そのカーブした構造からタンパク質あたりの脂質含有量が高く密度が低いため (Koochak et al., 2019)、チラコイド膜を回収し、分画した際に、しばしば Y100 と同一のフラクションに分画されてしまうことがある。この Y100 とグラナマージンの混在したフラクションに、FtsH や Deg プロテアーゼなどの D1 を分解するプロテアーゼが多く分布することが報告されており、これらの場所が光損傷を受けた PS II の分解の場として考えられている (Puthiyaveetila et al., 2014; Wang et al., 2016)。

本研究では、OHP1 複合体に含まれる補助タンパク質とクロロフィル合成に関与する酵素がチラコイド膜上のどこに分布するのかを解析することで、ストロマラメラで D1 が合成された後、OHP1 複体の構築が行われる場を特定しようと試みた。

2.4-4 強光応答に対する補助タンパク質の役割

PS II の *de novo* 合成では、D1、D2 を中心に周辺のサブユニットが徐々に結合していく。その過程に OHP1、OHP2 が関わっていることは、OHP1、OHP2 の変異体では D1 の翻訳が抑制され、PSII の蓄積が減少すること (Chotewutmontri et al., 2020)、及び、OHP1、OHP2 が RC 複合体に結合していることにより証明されている (Myouga et al., 2018; Hey and Grimm, 2018; Li et al., 2019)。一方、PS II の repair cycle では D1 のみ、あるいは D1、D2、CP43、PsbH が外れる可能性も考えられており、再構築過程の中で OHP1、OHP2 が結合する RC 複合体が形成されるのかどうかは明らかになっていない

(Mattoo et al., 1984; Barber and Andersson, 1992; Adir et al., 2003; Rokka et al., 2005)。さらに、OHP1、OHP2 の D1 の翻訳制御への関与が repair cycle でも見られるのかも不明である。そこで本研究では、OHP1 複合体、あるいは、個々の補助タンパク質が PS II の repair cycle に関わるか否かに着目し、解析を試みた。しかしながら、PS II の構築中間体や関与する補助タンパク質の解析では、*de novo* 合成と repair cycle を厳密に区別することが難しいという問題点がある。その理由として、成長過程の葉では、PS II の盛んな *de novo* 合成と光強度に依存した repair cycle が同時に起きていると考えられるためである。この問題に対し、本研究では成長過程を終えた葉において、誘導 RNAi によって、補助タンパク質の蓄積を抑制する方法を採用した。これは、成長過程を終えた葉では新規のクロロフィル合成が少なく、大量のクロロフィルを必要とする PS II の *de novo* 合成はあまり起こらないと考えられるため(Akoyunoglou and Argyroudi - Akoyunoglou, 1969)、成熟した葉では *de novo* 合成よりも修復の方が大きな割合を占めると考えられるからである。また、OHP1、OHP2 などの補助タンパク質を欠失した変異体では、葉緑体が十分に発達しないことが報告されている(Beck et al., 2017)。このような葉緑体では、葉緑体の機能不全による 2 次的な効果により、PS II の修復が正常に行われれないという可能性があるため、正常な葉緑体を蓄積する葉において、補助タンパク質の機能を調べるのが望ましいと考えた。

具体的には pOpOff2(kan)というベクターを用いて、ラットの glucocorticoid 受容体と酵母の転写因子の Gal4 のドメイン II のキメラタンパク質をシロイヌナズナで発現し、同時に pOp6 プロモーターの下流で OHP2 の配列の一部をセンスとアンチセンス方向に結合させたコンストラクトを導入させることで、dexamethasone (DEX) 処理によって OHP2 の RNAi を誘導することができる植物 (OHP2-RNAi 株：坂田啓、2017 年、修士論文) を解析した。OHP2-RNAi 株を生育し、成長過程を終えた葉に DEX 処理を行った後、弱光条件 (Low light : LL)、repair cycle が盛んになる強光条件 (High light : HL)、HL から LL へ移した回復条件 (Recover : Rec) の各条件で PS II の最大量子収率 (Fv/Fm) を測定した。なお、この同様の実験は坂田の修士論文においても一部報告されているが、本研究ではその結果を追試し、OHP2、HCF244 のイムノブロッティングの結果を追加した。

3. 材料と方法

3.1 植物材料と育成条件

3.1-1 OHP1-FLAG 過剰発現株

OHP1 複合体の精製実験、及び、チラコイド膜の分画実験では、植物材料として、*Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) を使用し、野生株として Landsberg (Ler) エコタイプを用いた。形質転換株は、共同研究を行っている理化学研究所の明賀史純博士が作出した OHP1-FLAG 過剰発現株を用いた。OHP1-FLAG 過剰発現株は、CaMV35S プロモーターの制御下で、OHP1 の C 末端に 3×FLAG タグを付加した形質転換株である (Myouga et al., 2018)。土壌による生育は、蛍光ランプ (HITACHI、東京) を用いて、 $70 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ (GL) の光条件で行った。強光処理は、高照度型人工気象器 (LH-1000RDZL、日本医科器械製作所、大阪) を用いて $1,000 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ (HL) の光強度で行った。種子は、くみあい園芸培土 (ホクレン、北海道大) と太平洋バーミライト (太平洋石炭販売輸送、北海道) を、下から 1 : 1 で積層したものに播種した後、短日条件 (23 °C、明所 10 h 暗所 14 h) で生育を行った。

3.1-2 OHP2-RNAi 株

OHP2-RNAi の誘導実験で使用した OHP2-RNAi 株は本研究室で作出した株 (坂田啓、2017 年、修士論文) を用いた。この株は、Dexamethasone (DEX) の添加により、*OHP2* 遺伝子 (At1g34000) のノックダウンを誘導可能な形質転換株である。土壌による生育は、蛍光ランプ (HITACHI、東京) を用いて、 $50 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ (LL) の光条件で行った。土壌条件、及び強光処理は 3.1-1 と同様に行った。なお、生育は長日条件 (23 °C、明所 14 h 暗所 10 h) で行った。

3.2 チラコイド膜の単離

3.2-1 Large Scale

OHP1 複合体の精製実験、及びチラコイド膜の分画実験では、根より上部の植物体を全て刈り取り、そこからチラコイド膜を単離した。なお、刈り取り以降の操作は全て氷上で行った。短日条件で8週間生育した OHP1-FLAG 過剰発現株を、24 h 強光処理し、刈り取った後、1 トレー (30 cm×23 cm) 当たり 200 ml の 0.1 % (w/v) Ascorbic acid、0.01 % (w/v) Pefabloc (Roche) 加 Leaf grinding buffer (0.02 M Tricine-KOH pH8.4、0.01 M NaHCO₃、0.01 M EDTA-2Na、0.45 M Sorbitol、0.1 % (w/v) BSA、10 % (w/v) PEG6000、0.01M NaF) を加え、ミキサーで破碎した。破碎液は、Miracloth (Millipore) で濾過し、4 °C、7,000 rpm、8 分遠心後、上清を捨てた。ペレットに 1 ml の終濃度 1 % (v/v) の Protease inhibitor 加 Shock buffer (0.02 M Tris-KOH pH7.6、0.005 M MgCl₂、0.01 M NaF) を加え、懸濁し、同 buffer で 12 ml にメスアップした後、4 °C、150×g、1 分遠心し、上清を回収した。土壌やデンプンの沈殿がなくなるまで 4 °C、150×g、1 分の遠心を繰り返し、最終的に回収した上清を、4 °C、12,000 rpm、8 分遠心し、上清を捨てた。ペレットに Storage buffer① (0.05 M Hepes-KOH pH7.5、0.1 M Sorbitol、0.01 M MgCl₂) を加え、1.5 mg/ml の Chl 濃度に調整した。

3.2-2 Small Scale

OHP2-RNAi の誘導実験では、一株ずつ、植物の葉だけを刈り取った。刈り取った葉は凍結させ、Multi-beads Shocker (YASUI KIKAI) を用いて破碎し、葉の質量に対して 0.1 g/ml の LDS buffer (2 % (w/v) Lithium dodecyl sulfate、0.35 M Sucrose、0.1 M Dithiothreitol、0.05 M Tris-HCl pH8.0) になるように懸濁して使用した。

3.3 OHP1 複合体の精製

3.3-1 カラムクロマトグラフィーによる OHP1 複合体精製

空のカラムを TBS buffer (0.05 M Tris-HCl pH7.4、0.15 M NaCl) で洗い、よく懸濁した Anti-FLAG M2 Affinity Gel (SIGMA) を樹脂量で 2 ml 詰めた。樹脂を乾かさないう、直ちに TBS buffer を流し、カラム内の Glycerol を置換した。次いで、bed volume の 3 倍量の 0.1 M Glycin-HCl pH3.5 で洗った後、bed volume の 5 倍量の 0.1 % (w/v) digitonin 加 BTH buffer (0.025 M BisTris-HCl pH7.0、20 % (w/v) Glycerol、0.05 M Hepes-KOH pH7.5) で平衡化した。

続いて、3.2-1 で回収したチラコイド膜 2 ml を BTH buffer で 1.0 mg/ml の Chl 濃度に希釈し、等量の Solubilization buffer (2 % (w/v) digitonin、1 % (v/v) Protease inhibitor 加 BTH buffer) に懸濁し、15 ml のコニカルチューブで可能な限り緩やかに室温で 5 分間転倒混和した。その後、4 °C、15,000 rpm、20 分遠心し、上清を回収した。上清をカラムにロードし、漏出液を再度カラムにロードした。次に、bed volume の 1.5 倍量の Wash buffer① (1 % (w/v) digitonin 加 BTH buffer) で洗った。その後、bed volume の 5 倍量の Wash buffer② (0.2 % (w/v) digitonin 加 BTH buffer) で洗った。続いて、bed volume の 4 倍量の Elution buffer (0.2 % (w/v) digitonin、100 µg/ml DYKDDDDK peptide (WAKO) 加 BTH buffer) をロードし、500 µl ずつ溶出画分を回収した。溶出画分の 2 と 3 に OHP1 複合体が溶出されることを確認したため、100 kD の Amicon Ultra 0.5 mL Centrifugal Filters (Millipore) で、溶出画分 2 と 3 を濃縮した (FLAG 精製液)。

3.3-2 磁気ビーズを用いた免疫沈降法による OHP1 複合体精製

以下の操作は 4 °Cで行った。Anti-FLAG M2 Magnetic Beads (SIGMA) を 1.5 ml チューブに 40 µl ずつ分注し、磁気ブロック (Tamagawa) に吸着させつつ、各々 400 µl の BTH buffer で 3 回 wash した。3.3-1 と同様に可溶化したチラコイド膜を 1.2 ml ずつビーズ入りチューブに分注し、暗所、60 分、ローターで混和しながら FLAG タンパク質複合体をビーズに吸着させた。次いで、チューブ 1 本当たり 10 ml の Wash buffer①で wash した後、チューブ 1 本当たり 2 ml の Wash buffer②で wash した。続き

て、500 μ l の Elution buffer を分注後、10 分間ローテーターでビーズと混和し、溶出液を回収した (FLAG 精製液)。

3.4 Clear-Native-PAGE (CN-PAGE) と Blue-Native-PAGE (BN-PAGE)

PERISTA pump (ATTO) を用いて 4 %→13 %の濃度勾配をかけた泳動ゲルを作製した。なお、泳動ゲルと濃縮ゲルの組成は下記に示した。CN-PAGE では、サンプルをロードし、下層に Anode buffer (0.25 M Imidazole-HCl pH7.0)、上層に 0.05 % (w/v) DOC 加 Cathode buffer (0.5 M Tricine、0.075 M Imidazole) をセットし、250 V、5 mA、150 分泳動した。BN-PAGE では、Cathode buffer に、0.05 % (w/v) DOC の代わりに 0.01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue (SERVE Blue G) を加えた。

	泳動ゲル (4 %)	泳動ゲル (13 %)	濃縮ゲル (3.5 %)
30 % Acrylamide	2.46 ml	6.5 ml	0.72 ml;
3× Gel buffer	6 ml	5 ml	2 ml
Glycerol		3 g	
Mili-Q	9.54 ml	0.5 ml	3.28 ml
10 % APS	100 μ l	75 μ l	50 μ l
TENED	10 μ l	7.5 μ l	5 μ l
total volume	18 ml	15 ml	6 ml

3.5 2D-CN/SDS-PAGE

レーンに沿って切り出した CN-PAGE のゲルを、0.01 M DTT 加 1 % SDS 溶液に入れ、65 °C、45 分静置し、変性させた。その後、2 次元目 (SDS-PAGE) の濃縮ゲルの上に乗せ、1 % (w/v) Agarose S (日本ジェネティクス) 溶液で位置を固定した。なお、SDS-PAGE の泳動ゲルと濃縮ゲルの組成は下記に示した。その後、上部まで泳動 0.1 % SDS 加 Reserving buffer (0.025 M Tris、0.192 M Glycine) を満たし、300 V、100 mA、でサンプルが、泳動ゲルに到達するまで泳動した。一旦泳動を停止させ、1 次元目のゲルを取り除いた後、300 V、30 mA/ゲルの枚数、60 分泳動した。

	泳動ゲル (14 %)	濃縮ゲル (3 %)
4 M Urea	4.32 g	
30 % Acrylamide	8.4 ml	0.75 ml
Mili-Q	3.2 ml	4.8 ml
3 M Tris-HCl (pH8.8)	2.25 ml	
0.5 M Tris-HCl (pH6.8)		1.9 ml
10 % SDS	180 μ l	75 μ l
10 % APS	150 μ l	125 μ l
TEMED	15 μ l	12 μ l
total volume	18 ml	7.5 ml

3.6 SDS-PAGE

SDS-PAGE で使用したゲルの組成は 3.5 に記したものと同一である。泳動条件は、300 V、20 mA/ゲルの枚数、80 分で行った。

3.7 Immunoblotting

ブロッキング装置を用いて、40 V、200 mA、120 分、または、40 V、10 mA、overnight で PVDF メンブレンへ転写した。次に、4 % (w/v) skim milk 加 0.1 % Tween 20 加 phosphate-buffered saline 溶液 (PBST) にメンブレンを浸し、60 分間振盪させてブロッキング処理を行った。続いて、PBST で 3 回すすいだ後、さらに 5 分間の wash を 1 回行った。一次抗体への反応は、室温で 60 分間、振盪させて行い、PBST で 3 回すすいだ後、さらに 5 分間の wash を 3 回行った。二次抗体への反応も同様に、室温で 60 分間、振盪させて行い、PBST で 3 回すすいだ後、さらに 5 分間の wash を 3 回行った。検出は、WESTERN LIGHTNING Plus-ECL (Perkin Elmer) を用いて 1 分反応させ、発光を LuminoGraph I (ATTO) によって検出した。なお、各抗体は抗体希釈液 (0.2 % (w/v) lactalbumin、4 % (w/v) PEG6000 加 PBST) に希釈して使用し、希釈倍率は以下に示した。

抗体名	1 次抗体	2 次抗体	備考
-----	-------	-------	----

D1	× 20,000	× 20,000 (ウサギ)	岡山大学提供
D2	× 10,000	× 20,000 (ウサギ)	Agrisera (AS06 146)
CP47	× 10,000	× 20,000 (ウサギ)	Agrisera (AS04 038)
PsaD	× 10,000	× 20,000 (ウサギ)	Agrisera (AS09 461)
HCF173	× 5,000	× 20,000 (ウサギ)	当研究室作成
HCF136	× 5,000	× 20,000 (ウサギ)	当研究室作成
HCF244	× 5,000	× 20,000 (ウサギ)	当研究室作成
APE1	× 5,000	× 20,000 (ウサギ)	当研究室作成
OHP 2	× 5,000	× 20,000 (ウサギ)	当研究室作成
FLAG (OHP1-FLAG)	× 2,000	× 20,000 (マウス)	Sigma (anti-FLAG M2 affinity antibody)
CURT1A	× 1,000	× 20,000 (ウサギ)	Agrisera (AS08 316)
GSAAT	× 10,000	× 20,000 (ウサギ)	当研究室作成
ChlG	× 10,000	× 20,000 (ウサギ)	Agrisera (AS14 2793)

3.8 ゲルの染色

3.8-1 銀染色

Pierce Silver Stain Kit (Thermo Scientific) を使い、公式の方法に準じて行った。

3.8-2 Flamingo 染色

Flamingo Fluorescent Gel Stain (BIO RAD) を使い、公式の方法に準じて行った。

3.8-3 Coomassie Brilliant Blue : CBB 染色

Quick-CBB (Wako) を使い、公式の方法に準じて行った。

3.9 分光解析

FLAG 精製液を泳動した CN-PAGE ゲルに、LuminoGraph I (ATTO) の CyanoView LED illuminator を用いて 480-530 nm の blue-green light を当てることにより、Chl 蛍光を検出し、OHP1 複合体のバン

ドを特定し、切り出しを行った。さらに、WT (Ler) から回収したチラコイド膜をロードした CN-PAGE ゲルから、LHC II trimer のバンドを切り出した。続いて、切り出したバンドをガラス管に詰めて凍結させ、Spectrofluorometer (FP-8300/PMU-183; JASCO, 日本) を用いて 77 K の蛍光スペクトル (emission spectra : 440 nm (OHP1 複合体)、445 nm (LHC II)) と励起光スペクトル (emission spectra : 681 nm (OHP1 複合体)、680 nm (LHC II)) を測定した。次いで、Diode laser (PiL044X or PiL063X for 445-nm or 633-nm excitation, respectively; Advanced Laser Diode Systems GmbH, ドイツ) を用いて、OHP1 複合体は 681 nm、LHCII は 680 nm の 77 K のクロロフィル蛍光減衰曲線 (蛍光寿命) を測定した。

3.10 チラコイド膜の分画と SDS-PAGE 及び Immunoblotting への濃度調節

0.6 mg/ml の Chl 濃度に調整したチラコイド膜サンプル 1.25 ml を、5,000×g、4 分で遠心後、ペレットを終濃度 1 % (w/v) の Protease inhibitor 加 storage buffer② (0.5 M Hepes-KOH pH7.5、0.1 M Sorbitol、2 mM MgCl₂、0.04 % (w/v) NaF) に再懸濁した。25 °C で 60 分、暗所で静置してインキュベーションした。storage buffer に溶解した 1.6 % (w/v) GDN を等量加え、軽くピペッティングをした。ローテーターの速度を可能な限り下げ、25 °C で 10 分、遮光しながら可溶化した。次に、4 °C、1,000×g、1 分で遠心し、上清を超遠心チューブに移した。この時、上清を一部採取し、これを全チラコイド (T) フラクシオンとした。続いて、4 °C、40,000×g、30 分で超遠心し、上清を別の超遠心チューブに移した。この時のペレットを storage buffer に懸濁したものをグラナコア (GM) フラクシオンとした。最後に、4 °C、70,000×g、180 分で超遠心し、上清を捨てた。この時、ペレットは、チューブの底に溜まった緩いペレット (loose pellet: LP) と、壁に付着した固いペレット (solid pellet: SP) の 2 種類が得られる。前者はグラナマージン (GM) と密度の低いストロマラメラ (SL) を含み、後者は密度の高い SL を含むフラクシオンとした。この分画過程は、図 7 に示した。

分画された各チラコイド膜は、Chl 濃度と Chl a/b 比を測定し、150 ng/μl になるように storage buffer で調整し、2×SDS buffer を等量加え、75 ng/μl にした。SDS-PAGE では 750 ng Chl 量を、Immunoblotting では 1,125 ng Chl 量を使用した。

3.11 Dexamethasone 処理による OHP2-RNAi 株の RNAi 誘導

3.11-1 Dexamethasone 処理による RNAi 誘導

OHP2-RNAi 株 (3-2、5-1) と WT (Col) を長日条件で 3 週間育成した。その後、スプレーバイアルを用いて Dexamethasone (DEX) 処理 (10 μ M Dexamethasone、0.04% Dimethyl sulfoxide、0.015% SILWET L-77) を行い、RNAi 誘導を行った。DEX 処理は 1 週間に 3 回行った。ネガティブコントロールとして DEX を含まない溶液 (0.04% Dimethyl sulfoxide、0.015% SILWET L-77) を散布した OHP2-RNAi 植物を用いた。

3.11-2 RNA 抽出と cDNA の作成

OHP2-RNAi 株 (3-2、5-1) と WT (Col) の RNAi 誘導を行ったもの (DEX+) と、RNAi 誘導を行っていないもの (DEX-) をサンプルとして用いた。葉を数枚サンプリングし、マルチビーズショッカー (YASUI KIKAI) で 1 分間、振盪破碎し、RNeasy Mini Kit (50) (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。その後、PrimeScript RT reagent Kit (TAKARA) を用いて、ゲノム DNA の除去、cDNA への逆転写反応を行った。

3.11-3 qRT-PCR

作成した cDNA と SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BIO-RAD) を用いて qRT-PCR を行った。OHP2 とハウスキーピング遺伝子として用いた Act7 に使用したプライマーを以下に示した。

OHP2(Forward) : TATCGGATCCGAATTCAGTGCTGCAGCGGTTAATC

OHP2(Reverse) : GGTGGTGGTGCTCGAGGAAGTAGATGTCTGATTGCTTGGAT

Act7(Forward) : AAGTATTGTTGGTCGTCCTAG

Act7(Reverse) : CCTCTCTTGGACTGAGCTTCAT

また、定量には $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法を用い、RNAi誘導を行っていないWTのmRNA量を100%としたそれぞれの相対値を算出した。

3.11-4 光化学反応の最大量子収率(F_v/F_m)の測定

クロロフィル蛍光パラメーターとして光化学反応の最大量子収率(F_v/F_m)を測定した。測定前は、生育しているポッドごとに15分以上暗所処理を行った。測定にはPAM-2000(Walz)を用いた。1週間のDEX+/-処理直後の植物をLL、その後3時間HL処理を行った植物をHL3、HL処理後に3時間GLに戻した植物をRec3とした。サンプルとして、OHP2-RNAi株(3-2、5-1)とWT(Col)をそれぞれ4株ずつ、1株につき葉を4枚分測定した。

4. 結果

4.1. OHP1 複合体の構成サブユニットの同定

4.1-1. OHP1 複合体精製方法の検討

OHP1 複合体の構成サブユニットを同定するためには純度の高い複合体の精製が必要だが、OHP1 複合体には植物細胞内での存在量の少なさ、及び、精製過程で分解しやすいという問題点があった。本研究室では数年に渡り OHP1 複合体の精製に着手してきたが、これらの問題点によって精製結果が安定せず、検出される OHP1 複合体の種類が定まらないという課題を抱えていた（図 8）。そこで本研究では、安定した高純度の精製を目指し、大きく分けて 2 種類の精製法の検討を行った。1 つ目は、本研究室で従来から行っていたカラムクロマトグラフィーによる精製方法の改良であり、2 つ目は、磁気ビーズを用いた精製方法の導入である。カラムクロマトグラフィーによる精製方法は 3.3-1 項に、従来の方法からの改良点は図 9 に、磁気ビーズによる精製方法は 3.3-2 項に、共通する OHP1 複合体精製方法の概略は図 10 に示している。さらに、これら 2 種類の方法で得られた FLAG 精製液を CN-PAGE にロードし、銀染色でバンドパターンを検出した結果を図 11 に示した。

4.1-1-1. カラムクロマトグラフィーによる精製方法の改良

カラムクロマトグラフィーによる精製方法の改良内容としては、従来の方法から変更した工程、追加した工程、削除した工程がある（図 9）。具体的には、①植物の生育条件の変更（長日条件、4 週間→短日条件、8 週間）、②チラコイド膜単離工程の短縮（Percoll 密度勾配遠心分離の工程を除去）、③界面活性剤によるチラコイド膜の可溶化条件の変更、④2 種類目の Wash buffer の導入、⑤限外ろ過膜のポアサイズの拡大、⑥CN-PAGE 泳動の際に、タンパク質複合体の表面に負電荷を付与するための化合物の変更（Amphipol A8-35→Sodium deoxycholate : DOC）がある。①の変更は、OHP1 複合体の細胞内での存在量が少ないという問題点に対し、より植物の葉を大きく育てることができる生育条件を模索した結果

行きついた。②で削除した Percoll 密度勾配遠心分離の工程は、intact の葉緑体を回収するための方法であり、本研究では葉緑体内部のチラコイド膜の単離を目的としていたため省略した。これにより、葉緑体のロスがわずかに減少したと考えている。③の可溶化条件の最適化は、本研究で最も難航した点である。OHP1 複合体の分解しやすい性質が最も発揮されてしまうのがこの工程であったためである。界面活性剤の種類や濃度、可溶化に要する時間、遮光の有無、混和方法（ローテーター、スターラー、転倒混和、静置）、可溶化時の温度（室温、氷上、水中）など、様々な条件を検討した（図に示してはいない）。結論として、“遮光無し、室温、5 分間、手で穏やかに転倒混和”が最も安定した精製に繋がった。④で界面活性剤濃度の異なる 2 種類目の Wash buffer を追加したのは、非特異的なタンパク質複合体の結合を減らすことが目的であった。⑤濃縮フィルターのポアサイズは 10 kD から 100 kD に変更したことにより、遠心にかかる時間が短くなり、FLAG 精製液の CN-PAGE にロードする前の不安定な状態の時間を短縮することが出来た。⑥CN-PAGE 泳動時に、タンパク質複合体の表面に負電荷を付与するための化合物として Amphipol A8-35 を使用すると、複合体のアグリゲーションが起こるように見受けられたため、DOC に変更した。

これらの改良により、FLAG 精製液の溶出画分 2 と 3 に HCF244、OHP1、OHP2 の濃縮を確認することが出来た（図 10 下図、図 12）。さらに CN-PAGE の銀染色では、2019 年までの結果（高橋小春修士論文、横山明修士論文）と異なり、最も分子量サイズの小さい複合体（バンド IV）の検出が抑えられた（図 8 右端）。この複合体は、精製過程で高分子の複合体が分解されたことにより検出されたものと考えられるため、この結果は、より解離の少ない精製が成功したことを示している。

4.1-1-2. 磁気ビーズによる免疫沈降法の導入

本研究ではカラムクロマトグラフィーによる精製方法と並行して、磁気ビーズによる精製方法を試みた。本研究室では以前にも、NHS ビーズ（多摩川精機）に FLAG 抗体を固定化して精製を試みていたが、FLAG 抗体を固定する手間が煩雑だったため、その後の検討は行われていなかった。そこで本研究では、Anti-FLAG Magnetic Beads（SIGMA）を用いて精製を行った。その際の細かな条件（植物の生育条件、

チラコイド膜単離の方法、チラコイド膜の可溶化条件、FLAG 精製液精製液の濃縮条件、泳動条件など）は 3.3-1 項に示したカラムクロマトグラフィーによる精製方法と同一にした。磁気ビーズ精製法に最適な精製条件の検討としては、可溶化したチラコイド膜をビーズと反応させる時間、Wash buffer の量および時間を比較し、非特異的な結合をいかに減らせるかという点に重点を置いた。その結果、カラムクロマトグラフィーによる精製方法と同様に 3 種類の OHP1 複合体のバンドが検出された（図 1 1 右図）。

4.1-2. OHP1 複合体の構成サブユニットの同定

2017 年に本研究室の高橋小春（2018 年度修士課程卒業）が WT (Ler) と OHP1-FLAG 過剰発現株のチラコイド膜を digitonin で可溶化し、カラムクロマトグラフィーを用いて精製した後に CN-PAGE で泳動した結果を図 8 左端に示した。WT と OHP1-FLAG 過剰発現株の両方で、約 500 kD、約 700 kD に共通したバンドパターンが認められた。これらのバンドは非特異的にカラムに吸着したタンパク質複合体のものと考えられる。一方で、OHP1-FLAG 過剰発現株では、約 450、420、250、200 kD に特異的なバンドが認められた。よって、これらのバンドをバンド I、II、III、IV とした。精製方法の改良後に同様の実験を行ったところ、カラムクロマトグラフィー精製と磁気ビーズ精製の両方で 3 種類のバンド（バンド I、II、III）が検出された（図 8 右端、図 1 1）。

3 種類のバンドを形成する複合体の構成サブユニットを同定するため、カラムクロマトグラフィー精製法と磁気ビーズ精製法の両方で得られた CN-PAGE のゲルストリップを SDS-PAGE で 2 次元に展開し、タンパク質を分離した後、銀染色および immunoblotting を行った（図 1 3：カラムクロマトグラフィー精製法、図 1 4：磁気ビーズ精製法）。バンド I、II の構成サブユニットとしては、図 1 3 と図 1 4 の両方で、D1、D2、HCF244、OHP1、OHP2 のシグナルが検出された。しかしながら、図 1 3 のカラムクロマトグラフィーによる精製では、HCF136 と APE1 の弱いシグナルが検出されたが、図 1 4 の磁気ビーズによる精製では検出されなかった。バンド III に関しては、サブユニット組成の異なる 3 種類の複合体が混在して形成されているように見受けられた。最も高分子側の複合体には、D1、HCF244、OHP1、OHP2 が、中間の分子量の複合体には HCF244、OHP1、OHP2 が、最も低分子側の複合体には D2、

APE1 のシグナルが検出された。バンド III に含まれるこれらの複合体が精製過程でバンド I、II を構成する複合体の分解や解離によって生じたものか、あるいは、これらの複合体が細胞内に存在することを示唆しているのか、現段階で判断することは難しい。そこで、これより先はバンド I、II を OHP1 複合体 I、II と呼び、これらの複合体に絞って解析を進めることとした。

OHP1 複合体 I、II の構成サブユニットへの理解をさらに深めるため、高橋小春（2018 年度修士課程卒業）が行った FLAG 精製産物の質量分析の結果を再検討した（図 1 5、18）。高橋は、カラムクロマトグラフィー精製法を用いた 2D-CN/SDS-PAGE のゲルから OHP1 複合体 I、II のレーンを切り出した後、ゲルを縦に 21 個のピースに細分化して質量分析を行った。図 1 5 には高橋がゲルピースを切り出した方法を、図 1 6 には高橋が Max Quant のラベルフリー定量法で算出したタンパク質量 Score を、本研究で解釈した形として示した。OHP1 複合体は葉緑体に存在するタンパク質複合体であるが、質量分析では葉緑体以外に存在するタンパク質が非特異的に検出されたため、図 1 6 では検討の対象となる葉緑体タンパク質のみを赤色で示した。グラフのスポットのサイズは Score の高さに比例する形で示しており、RC 複合体の構成サブユニットである D1、D2、Cyt b₅₅₉ (PsbE/PsbF) は大きなスポットを形成している。補助タンパク質としては、HCF244、OHP1、OHP2 が大きなスポットを形成していることに対し、HCF136 と APE1 は非常に小さなスポットを形成している。これらの結果から、OHP1 複合体 I、II に安定して結合するサブユニットとして、D1、D2、Cyt b₅₅₉、HCF244、OHP1、OHP2 が同定された。HCF136 と APE1 に関しては、精製した OHP1 複合体への結合量が少ないことが明らかになった。図 1 3 の 2D-CN/SDS-PAGE の結果を踏まえると、APE1 は OHP1 複合体 I にのみ緩く結合し、HCF136 は OHP1 複合体 I、II の両方で緩く結合している可能性も考えられる。しかしながら、これらの補助タンパク質が OHP1 複合体と緩く結合しており、精製過程で外れてしまったため少量検出されたのか、あるいは非特異的に検出されたのかを判断することは難しい。よって、本研究では OHP1 複合体に“安定して”結合する補助タンパク質として HCF244、OHP1、OHP2 の 3 種類を同定した。

4.2. OHP1 複合体の分光学的性質の解析

4.2-1. 蛍光スペクトルと励起光スペクトル

OHP1 複合体の基本的な分光学的性質を調べるため、精製した OHP1 複合体を用いて蛍光スペクトルと励起光スペクトルを測定した（図 1 7）。測定には OHP1 複合体 II を用いたが、これは、OHP1 複合体 I と比較してより安定して蛍光を検出出来たためである。また、OHP1 複合体と光捕集アンテナ複合体である LHCII trimer の分子量が近似していたことから、OHP1 複合体の測定結果に LHCII trimer の混入があるか否かを調べるため、コントロールとして、WT の LHCII trimer の分光解析を同時に行った。

図 1 7 左図より、精製した OHP1 複合体 II と LHCII trimer の蛍光スペクトルのピーク波長はそれぞれ 681 nm、680 nm であった。完成した PS II のピーク波長は約 690 nm であり、完成した PS II から CP47 と CP43 を切り離して精製した D1/D2/Cyt b₅₅₉複合体のピーク波長は 683 nm であるという報告がある(Mimuro et al., 1988)。よって、OHP1 複合体 II はこの 2 種類の複合体とは異なる蛍光ピークを持つことが明らかになった。次に、得られた蛍光ピークの値を基に、OHP1 複合体 II と LHCII trimer の励起光スペクトルを emission spectra 681/680 nm で測定した（図 1 7 右図）。2 つの複合体で共通した所見として、415、438 nm のピークが認められた。これらのピークは Chl a の吸収波長と一致していることから、その吸収ピークを反映していると考えられる。一方で、2 つの複合体で 470 nm と 650 nm のピークが共通して検出されたが、ピークの高さは複合体間で大きな差が認められた。前者は、光捕集や熱放散などに寄与する色素であるカロテノイド（Car）と光捕集アンテナ複合体に特異的に結合する色素である Chl b の吸収波長と一致し、後者は、Chl b の吸収波長と一致している。OHP1 複合体の色素組成に関しては明らかになっていないが、Chl b を結合しない可能性が高いと考えられている。理由としては、D1/D2 の色素組成（Pheophytin×2、Chl a×6、Car×2）と OHP1、OHP2 のホモログである HliC、HliD の色素組成（Chl a×3、Car×1）(Niedzwiedzki et al., 2016)が明らかになっていることが挙げられる。また、先行研究から LHCII trimer の色素組成（Chl a×8、Chl b×6、Car×4）(Liu et al., 2004)も明らかになっている。よって、OHP1 複合体 II で認められた 650 nm の低いピークは少量の LHCII trimer の混入を、470 nm のピークは OHP1 複合体 II に結合する Car と少量の LHCII trimer に結合する

Chl b、Car の吸収を反映していると考えられる。しかしながら、470 nm 及び 650 nm のピークの高さに大きな差があるため、LHCII trimer とは異なる色素組成を持つ複合体が、OHP1 複合体 II のゲル内に含まれていることが明らかになった。

4.2-2. 時間分解クロロフィル蛍光（蛍光寿命）

蛍光寿命の測定には、蛍光スペクトルと励起光スペクトルの測定に使用したのと同じサンプルを使用した。図 18 に 77 K のクロロフィル減衰曲線と測定の実測値（蛍光寿命： τ ）を示した。OHP1 複合体 II の最短の蛍光寿命は 420 ps ($A : 0.445$) であり、有機溶媒中の Chl a の蛍光寿命（約 5 ns）と比較して短くなっていることが明らかになった。この結果から、OHP1 複合体は吸収した光エネルギーを熱として排出する仕組みを有することが示唆された。また、LHCII trimer で最も短い蛍光寿命は 445 ps であり、その割合は OHP1 複合体 II と比較して少なかったため、OHP1 複合体 II が LHC trimer より熱放散能が高いことが示された。

4.3. OHP1 複合体構成補助タンパク質のチラコイド膜の局在解析

OHP1 複合体の構築がチラコイド膜上のどの部位で行われるのかを調べるために、OHP1-FLAG 過剰発現株をサンプルとして 3.10 項と図 7 で示した方法を用いて OHP1、OHP2、HCF244 の局在解析を行った（図 19、図 20）。本研究で用いた、界面活性剤と超遠心によってチラコイド膜を分画する方法では、チラコイド膜（T）はグラナコア（GC）、loose pellet（LP）、solid pellet（SP）の 3 つの画分に分けられる。LP はグラナマージン（GM）と軽いストロマラメラ（SL）を含み、SP は重い SL を含んでいる。得られた画分を SDS-PAGE で泳動した結果を図 19 に、immunoblotting を行った結果を図 20 に示した。SDS-PAGE では、葉緑体タンパク質のチラコイド膜上の区分を示している。LHCII は PS II と超複合体を形成し、グラナコアに豊富に存在する。図 19 から、LHCII が GC 画分で最も多く認められたため、本研究の GC 画分の分画が正しく行われたことが確認出来た。ATP 合成酵素はストロマラメラに多く分布することが電子顕微鏡によって確認されている (Daum et al., 2010)。本研究では先行研究と一致し

て、SL を含む LP と SP 画分で ATP 合成酵素の構成サブユニットである AtpA、AtpB が豊富に検出された (図 19)。また、PSI もストロマラメラを活性部位としており、その構成サブユニットである PsaA、PsaB、PsaD が LP と SP 画分で豊富に認められた (図 19、図 20)。さらに、グラナマージンのマーカータンパク質として知られる CURT1 も LP 画分でのみ検出された (図 20)。これらの結果から、チラコイド膜の分画が正しく行われたことが確認出来た。

OHP2 と HCF244 は LP 画分に豊富に検出された一方で、LP 画分と同様に SL を含む SP 画分にはほとんど検出されなかった。同様に、Chl 合成経路の酵素である glutamate-1-semialdehyde aminotransferase : GSAAT と chlorophyll synthase : ChlG も LP 画分に特異的に豊富に検出された (図 20)。GSAAT は先行研究で LP 画分に豊富に検出されることが報告されていたが (Wang et al., 2016)、ChlG に関しては本研究が初めての報告となった。これらの結果から、OHP1 複合体に結合する補助タンパク質と Chl 合成酵素が、グラナマージン及び/あるいは、密度の低いストロマラメラに局在を示すことが明らかになった。

4.4. 強光応答に対する補助タンパク質の機能解析

OHP1 複合体、あるいは個々の補助タンパク質が、PS II の *de novo* 合成だけでなく、repair cycle にも関与するかどうかを調べるため、DEX 処理によって OHP2 のノックダウンが可能な OHP2-RNAi 株を用いて、強光条件での PS II の最大量子収率 (F_v/F_m) の測定を行った。始めに、WT (Col) と OHP2-RNAi 株 (3-2、5-1) を長日条件で 3 週間育成後、1 週間に 3 回 DEX 処理によって RNAi 誘導を行った。この生育及び DEX 処理に用いた期間は、PS II の *de novo* 合成が落ち着いたと考えられる時期の葉を用いるために設定した。DEX 処理を行った直後の植物を LL、3 時間 HL 条件に晒した植物を HL3、HL 処理の後に再び GL に 3 時間置いた植物を Rec3 とした。結果として、植物の表現型に関しては、DEX +/- 処理を行った WT と OHP2-RNAi 植物で変化は認められなかった (図 21)。次に、RNAi 誘導が適切に行われたかどうかを調べるため、生育条件下で DEX (+/-) 処理を行った植物をサンプルとし、qRT-PCR により、*Ohp2* mRNA レベルを比較した (図 22)。ハウスキーピング遺伝子として *Act7* mRNA を用い、

WT の DEX-処理株と比較すると、DEX+処理をした OHP2-RNAi 株 (3-2、5-1) の RNA 量は基準値の 7~8 %に低下した。さらに、ノックダウンがタンパク質レベルでも適切に行われているかどうかを調べるため、各光条件 (LL、HL3、Rec3) で葉をサンプリングし、SDS-PAGE と immunoblotting により OHP2 の発現量を解析した (図 2 3)。DEX-処理株では OHP2 の発現量は WT と OHP2-RNAi 株で変化が認められなかったが、DEX+処理株では、全ての光条件で OHP2-RNAi 株の OHP2 の発現量が低下した。また、DEX+処理株では、OHP2 と同様に HCF244 の発現量も低下した。この結果は、Hey and Grimm (Hey and Grimm, 2018) が報告した、virus-induced gene silencing によって OHP1、OHP2 のノックダウンを誘導した株で HCF244 のタンパク質発現量が低下したという結果と一致している。

qRT-PCR 及び immunoblotting により、OHP2 並びに HCF244 のノックダウンが適切に実行されていることが確認出来たため、各光条件で Fv/Fm の測定を行った (図 2 4)。図 2 4 の Fv/Fm の測定は、図 2 2 でタンパク質解析に用いた葉と同じ葉で行った。DEX-処理株ではいずれの光条件でも WT と OHP2-RNAi 株で Fv/Fm に差は認められなかった。一方で、DEX+株では LL では差は認められなかったが、HL では WT、3-2、5-1 でそれぞれ 0.685 ± 0.031 、 0.403 ± 0.117 、 0.493 ± 0.127 、Rec3 では、 0.766 ± 0.016 、 0.589 ± 0.085 、 0.674 ± 0.124 という結果が得られた。HL と Rec3 では WT と比較して 3-2 で顕著な Fv/Fm の低下が認められ、5-1 で僅かな低下が認められた。

5. 考察

5.1. OHP1 複合体の構成サブユニット

Myouga ら(Myouga et al., 2018)が行った先行研究では、OHP1-FLAG 過剰発現株をサンプルとし、磁気ビーズ精製法を用いて OHP1 複合体を精製した。CN-PAGE で認められた約 420 kD と約 200 kD のバンドを切り出し、質量分析を行った。その結果 420 kD のバンドには、D1、D2、Cyt b₅₅₉、HCF173、HCF136、HCF244、OHP2、OHP1、APE1、LQY1 が、200 kD のバンドには、D1、D2、HCF173、HCF136、HCF244、OHP2、OHP1 が含まれていたと報告している(Myouga et al., 2018)。OHP1 複合体の構成サブユニットに言及した報告はこれが初めてであり、構成サブユニット同定の指標とはなったが、この手法では非特異的なタンパク質の検出を除外することは難しいため、更なる検討が求められる状況であった。Li らはシロイヌナズナのチラコイド膜を精製せずに BN/SDS 2D-PAGE を行い、immunoblotting によって約 150 kD の位置に D1、D2、Cyt b₅₅₉、PsbI、HCF244、OHP2、OHP1 のシグナルが検出されたが、HCF136 のシグナルは検出されなかったことを報告した(Li et al., 2019)。Li らの研究チームはチラコイド膜の可溶化に、dodecyl- β -D-maltopyranoside (β DM) を用いている。しかし、 β DM は本研究で用いた digitonin よりもタンパク質複合体に対する解離・変性作用が強いことが知られており、精製された OHP1 複合体の分子量が Myouga らの、もしくは本研究で精製された OHP1 複合体の分子量よりも顕著に小さいのはそれが理由である可能性が考えられる。

シアノバクテリアの RC 複合体の構成サブユニットとしては、D1、D2、Cyt b₅₅₉、PsbI、Ycf48 (HCF136 のホモログ)、Ycf39 (HCF244 のホモログ)、HliC、HliD、RubA が結合することが報告されている(Kiss et al., 2019)。RC 複合体の形成過程は陸上植物とシアノバクテリアで高度に保存されていると考えられており(Rühle and Leister, 2016; Li et al., 2019)、OHP1 複合体の構成サブユニットとして、HCF136、APE1、RubA などの補助タンパク質の結合の有無は注目すべき点であった。

本研究では OHP1-FLAG 過剰発現株をサンプルとして、複合体の解離を可能な限り抑制したマイルドな精製方法を確立した。さらに、2D-CN/SDS-PAGE、immunoblotting、質量分析によって構成サブユニ

ットの同定を試みた。以前の精製方法では、CN-PAGE において 4 種類のバンド（バンド I、II、III、IV：約 450、420、250、200 kD）が検出されていたが、本研究で行った改良により、バンド IV は検出されなくなった（図 8）。バンド I、II をそれぞれ構成する OHP1 複合体 I と OHP1 複合体 II には、銀染色、及び、immunoblotting において D1、D2、Cyt b₅₅₉、PsbI、HCF244、OHP2、OHP1 の強いシグナルが確認されたが、HCF136、APE1 のシグナルは非常に弱かった。シアノバクテリアの RC 複合体に結合することが知られる RubA に関しては、質量分析では僅かに検出されたものの、銀染色では検出に至らなかった。APE1 は機能未知であるが、HCF136 と RubA に関しては、新規 D1 の合成、RC 複合体の形成、PS II の構築に何らかの役割をもつことが報告されている (Kiss et al., 2019; Chotewutmontri and Barkan, 2020)。よって、これらの補助タンパク質が OHP1 複合体に特異的に結合する可能性は十分に考えられる。しかしながら、現段階で構成要素として判断することは困難であるため、本研究では、HCF244、OHP1、OHP2 を OHP1 複合体に“安定して”結合する補助タンパク質と結論付けた（図 2 5）。バンド III に含まれる複合体に関しては、植物細胞内に実際に存在するかどうかは明らかでないため、精製過程で分解されて生じたアーティファクトの可能性を考慮しなければならない。一方で、OHP1、OHP2、HCF244 の変異体では D1 の翻訳開始が抑制されることが報告されており (Chotewutmontri et al., 2020)、D1 に特異的な機能を持つことから、バンド III を構成する複合体の 1 種である D1 と補助タンパク質から構成される複合体が生体内に存在する可能性は充分考えられる。陸上植物の D1 タンパク質は C 末端に 9 アミノ酸が負荷された前駆体型 (pD1) として合成され、RC 複合体 (OHP1 複合体) を形成する際に C 末端プロセッシングを受ける (Ivleva et al., 2000)。よって、pD1 に特異的な抗体を用いて免疫沈降を行うなどの実験系を構築することで、この問題の解明に繋がる可能性があると考ええる。

5.2. OHP1 複合体の分光学的解析

本研究では精製した OHP1 複合体 II と WT から得た LHCII trimer の蛍光スペクトル、励起スペクトル、時間分解クロロフィル蛍光を測定した（図 1 7、図 1 8）。蛍光スペクトルと励起スペクトルの測定結果から、OHP1 複合体 II は完成した PS II とは異なる固有の蛍光ピークを有し、ホモログである HliC、

HliD と類似した色素組成を持つ可能性が高いことが示された。また、OHP1 複合体 II のクロロフィル蛍光減衰曲線の急速な減衰カーブによって、LHCII trimer と比較してより高い熱放散能を有することが明らかになった。一方で、図 5 に示した PS II の蛍光寿命は、本研究で得られた OHP1 複合体 II の蛍光寿命と比較してかなり短くなっている。これは、完成した PS II と OHP1 複合体によって光化学反応（電荷分離）の起こりやすさに違いがあるためではないかと考えている。完成した PS II では反応中心である D1/D2 の周囲にアンテナタンパク質である CP47、CP43 を始めとして多くのサブユニットが結合し、量子収率を最適化するための色素配置や制御が行われていると考えられる。一方で、OHP1 複合体 II にはアンテナタンパク質は結合しておらず、D1、D2 の適切な結合や最適な色素配置が完成されているのかも定かではない。とは言え、OHP1 複合体 II が電荷分離能を持つかどうかを判断することは難しい。理由としては、PS II が電荷分離をした際に生じる蛍光寿命は数 ps (Roelofs et al., 1991) であり、本研究で用いた実験系の測定限界値よりも短いためである。

シアノバクテリアの先行研究では OHP1、OHP2 のホモログである HliC、HliD の蛍光寿命や色素組成が示されており、その機能として光防御の役割が提案されている (Chidgey et al., 2014; Staleva et al., 2015; Niedzwiedzki et al., 2016)。OHP1、OHP2 に結合する色素は同定されていないが、蛍光寿命の短縮と補助タンパク質の関係に着目して考えると、OHP1 と OHP2 が Car を結合し、熱放散を行うことで、構築過程の OHP1 複合体を光障害から保護している可能性も考えられる。今後、補助タンパク質単体や、人為的に作製した OHP1、OHP2 を結合しない RC 複合体の蛍光寿命を測定することで、その機能をより詳しく理解することが出来ると考えている。

5.3. 補助タンパク質のチラコイド膜上での局在

チラコイド膜の分画方法は大きく分けると 2 種類存在する。1 つは本研究で行った界面活性剤と超遠心により分画する方法で、もう 1 つは超音波破碎と界面活性剤により分画する方法である。前者の分画方法では、チラコイド膜は GC、LP、SP の 3 種類の画分に分けられる (Puthiyaveetila et al., 2014)。一方で、後者の方法を用いるとチラコイド膜は GC、GM、SL、Y100 の 4 種類の画分に分けられるとされて

いる (Danielsson et al., 2006; Suorsa et al., 2014)。より詳細な分画が可能という点で後者の分画方法には大きなメリットがあるが、実験難易度が高く再現性を得るのが難しいというデメリットもある。よって、本研究では界面活性剤を用いた方法を採用した。

チラコイド膜上のどの部位で PS II の合成、活性、分解が行われるのかという点に着目した先行研究はいくつか存在し、それらの結果から現在考えられている GC、GM、SL、Y100 の役割を図 2 6 に示した。Danielsson ら (Danielsson et al., 2006) は、超音波破碎による分画方法を用いて PS II-LHC II 超複合体、PS II 二量体、PS II 単量体、PS II 単量体から CP43 サブユニットが外れた (あるいは構築前の) CP43-less 複合体、RC 複合体の 5 種類の複合体がチラコイド膜上のどの画分に多く存在するのかを報告した。彼らは、PS II-LHCII 超複合体は PS II の電荷分離が盛んに行われる領域として知られる GC 画分に最も多く検出され、PS II 二量体は GC、GM 画分に豊富に検出されたと報告している。同時に、RC 複合体は GM、SL、Y100 で少量確認されたと報告している。その後、同研究チーム (Suorsa et al., 2014) は、D1 を分解するプロテアーゼである FtsH や Deg プロテアーゼが GM、SL、Y100 に豊富に分布することを報告した。これらの結果から、電荷分離を行う PS II はグラナコアに、分解、構築の場合はグラナマージン、ストロマラメラであると考えられるようになった。その後、Puthiyaveetila ら (Puthiyaveetila et al., 2014) が界面活性剤を用いた分画方法で、GC、LP、SP 画分の内、LP 画分で FtsH プロテアーゼが最も豊富に存在し、D1 の存在量が最も少ないことを報告した。このことから、LP 画分に含まれるグラナマージン、及び/あるいは、密度の低いストロマラメラが損傷を受けた D1 の分解の場であると考えられる。Wang ら (Wang et al., 2016) は、界面活性剤を用いた分画方法により、GSAAT を含むいくつかの Chl 合成酵素が LP 画分に限局して検出されることを報告した。D1 は翻訳後に、Chl が結合することで適切なコンフォメーションを形成すると考えられている (Eichacker et al., 1996)。この考えをさらに推し進めると、Chl 合成の場と D1 合成の場はある程度カップリングしていると考えられる。本研究で、クロロフィル合成の酵素と PS II の構築に関わる補助タンパク質が同じ画分に検出されたことから、グラナマージンや密度の低いストロマラメラに、分解だけでなく D1 合成、あるいは構築の初期段階も局在する可能性が考えられる。

シアノバクテリアや緑藻のチラコイド膜は陸上植物のようにグラナコア、グラナマージン、ストロマラ

メラと明確に分かれた構造は持たない (図 2 7)。シアノバクテリアでは、細胞内膜とチラコイド膜の両方の特性を混合して示す PratA-defined membrane (PDM) と呼ばれる膜と、PDM に囲まれたチラコイド中心 (TC) と呼ばれる構造があり、これらをまとめてチラコイド膜上のタンパク質複合体の Biogenesis center であると提唱されている (Stengel et al., 2012) (図 2 8)。C 末端プロセッシング前の pD1 は PDM に蓄積し、その場で RC 複合体が構築されることが報告されている (Ivleva et al., 2000)。さらに、PDM には電荷分離可能な RC 複合体が蓄積するが、CP47、CP43 は PDM には存在せず、チラコイド膜にのみ局在することが示されている (Keren et al., 2005; Zak et al., 2001)。また、PDM では Chl 合成酵素の 1 種である POR とそれによって生じる Chl 前駆体であるクロロフィライドの蓄積が報告された (Hinterstoisser et al., 1993; Rengstl et al., 2011; Schottkowski et al., 2009)。これらの結果から、PS II 構築がそのステップによって行われる場所が異なる可能性と、PDM のクロロフィル合成と PS II 構築の初期段階の場としての役割が示唆された (Nickelsen and Rengstl, 2013)。緑藻のクラミドモナスは単一のカップ型の葉緑体を持ち、その膜組織は基本的に陸上植物のものと似ている (Nickelsen and Rengstl, 2013) (図 2 7)。ただし、陸上植物の葉緑体とは異なり基底部にピレノイドと呼ばれる CO₂固定酵素 Rubisco が集積した領域を有している。さらに、中程度の光刺激に晒された後のクラミドモナスでは、ピレノイドの周囲に D1 の mRNA である *psbA* や新規 D1、POR が局在する領域が認められ (Sun et al., 2019)、この領域を翻訳領域 (T zone) と呼ぶ。このように、シアノバクテリアや緑藻では、PS II 構築の初期段階と Chl 合成が共に行われる領域が認められているが、陸上植物では詳細が明らかになっていなかった。OHP1 複合体の構成サブユニットである OHP2、HCF244 と Chl 合成酵素が共に LP 画分に豊富に存在するという本研究結果は、この課題に対して踏み込んだ仮説を提供するものと考えている。

OHP1、OHP2 の機能に関する仮説として、これらの補助タンパク質が D1 の翻訳に必須であり、かつ、色素を結合するという性質から、D1 へ色素を供給する役割を担うのではないかという仮説が考えられる (Li et al., 2019)。この仮説はシアノバクテリアの HliC、HliD でも同様に考えられている (Kiss et al., 2019) が、根拠となるデータは示されていない。本研究でも、要となるデータは示せていないが、Chl 合成酵素と補助タンパク質が同様の局在を示したことはこの可能性の補強になるのではないかと考えている。

5.4. 強光ストレス条件下での補助タンパク質の役割

OHP1、OHP2、HCF244 が PS II の *de novo* 合成に関わることは既に報告されている (Beck et al., 2017; Myouga et al., 2018; Hey and Grimm, 2018; Li et al., 2019)。しかしながら、その変異体では D1 の合成が阻害され、PS II が蓄積出来ずに枯死するため、これらの補助タンパク質の repair cycle への関与に関する先行研究は少ない。数少ない先行研究として、Li らは強光処理 ($1,200 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$, 8 h) により、D1 のタンパク質量が低下し、OHP1、OHP2、HCF244 のタンパク質量が増加することを報告している (Li et al., 2019)。Hey and Grimm (2018) は、アグロバクテリウムの感染により OHP2 をノックダウンさせた株に強光処理を行い、コントロールと比べて、D1 の蓄積量が著しく低下したことを報告している。しかしながらこの実験では、アグロバクテリウムの感染により、OHP2 ノックダウン株の D1 蓄積量が、強光処理前から既にコントロールの 3 分の 1 程度に減少しており、このデータを基に強光ストレス時の OHP2 の役割について議論を行うのは難しいと考えた。

本研究では DEX 処理により RNAi が誘導される植物を用いて、OHP1 複合体、あるいは OHP1、OHP2、HCF244 の repair cycle における役割を調べた。DEX 処理が強光処理前の PS II の光障害に影響を与えていないことは、DEX+処理株 (LL) の WT と OHP2-RNAi 株で F_v/F_m に差がなかったことから確認した (図 2 4)。DEX+処理を行った OHP2-RNAi 3-2 株では、LL において WT と差がない F_v/F_m の値を示したが、HL では顕著な低下が認められた。Rec3 においてやや回復はしたものの、WT のように LL と同レベルまでは上がらなかった。OHP2-RNAi 5-1 株でも 3-2 株と同様に HL と Rec3 での低下は認められたが、その差は僅かであった。これは株によって DEX の効きやすさに差があることを示している。HL における、WT と比較した OHP2-RNAi 株の F_v/F_m の低下は、電荷分離を行う PS II の蓄積量の低下を反映していると考えられる。その場合、PS II が光障害を受けやすくなった可能性と、PS II の構築 (*de novo* 合成、repair cycle の片方、あるいは両方) の速度が低下した可能性が考えられる。一方で、OHP1、OHP2、HCF244 は RC 複合体の構成サブユニットではあるが、完成した PS II には結合していない。よって、PS II の光障害の受けやすさにこれらの補助タンパク質が関与する可能性は低いと考えられる。す

なわち、この Fv/Fm の低下は OHP2 の低下が PS II の構築速度の低下を引き起こしているものと考えられる。OHP2 は D1 の翻訳開始に役割を持つことが報告されているため、この構築速度の低下は D1 の合成速度の低下を反映している可能性が高い。強光条件では、PS II の *de novo* 合成よりも repair cycle が盛んに行われると考えられるため、本研究結果は OHP2 が repair cycle にて、PSII の蓄積に関与する可能性を示唆している。一方で、本研究で用いた植物条件でも、*de novo* 合成が完全に起こらないとは考えにくいため、この PS II の蓄積量の低下は repair cycle の速度の低下だけでなく、*de novo* 合成過程の OHP1 複合体の形成速度の低下も影響していることは考慮すべきである。

Hey and Grimm(Hey and Grimm, 2018)は、OHP2 のノックダウン株では OHP1 と HCF244 の発現量も低下するが、OHP1 のノックダウン株では、OHP2 の発現量は変化しないことを報告している。図 23 より、本研究でも OHP2 のノックダウンが HCF244 の発現量の低下を引き起こすことを確認した。OHP1、OHP2、HCF244 はいずれも D1 の翻訳開始に必要であることが報告されているため、これらの補助タンパク質が前述した強光条件での PS II の蓄積 (repair cycle) に関与する可能性は高いと考えられる。しかしながら、repair cycle においてこれらの補助タンパク質が本研究で示した OHP1 複合体 I や II を形成しているかどうかは不明なままである。この点に関して、本研究で明らかにすることは出来なかった。今後、OHP1 に FLAG タグを付けた OHP2-RNAi 株を作製し、OHP1 複合体を精製することで、更なる解析が可能となると考えている。

5.5. まとめ

本研究では OHP1 複合体の構成サブユニットの同定と、OHP1 複合体の基本的な性質、及び、関与する補助タンパク質の機能解明に着手した。精製方法の改良によって、OHP1 複合体には 3 種類の補助タンパク質 (OHP1、OHP2、HCF244) が安定して結合することが明らかになった。さらに、OHP1 複合体の分光学的性質を解析し、OHP1 複合体が熱放散能を持つ可能性が示された。また、OHP2 と HCF244 のチラコイド膜上の局在を特定し、PS II の構築の初期段階が、グラナマージン、及び/あるいは、ストロマメラで行われる可能性を提示した。加えて、OHP2-RNAi 株を用いて強光ストレス条件下で Fv/Fm を測定し、OHP2 が *de novo* 合成だけでなく、repair cycle においても PS II の構築に重要であることを

示唆した。

6. 図表

タンパク質名	機能	タンパク質名	機能
cpSRP43	PS IIサブユニット (D1、D2、CP47、LHC IIなど) の膜への挿入・組み立てに関与	LTO1	PsbOのジスルフィド結合形成に関与
cpSRP54	PS IIサブユニット (D1、D2、CP47、LHC IIなど) の膜への挿入・組み立てに関与	RBD1	PS IIの構築と安定性に関与
cpFtsY	PS IIサブユニット (D1、D2、CP47、LHC IIなど) の膜への挿入・組み立てに関与	CYP20-3/ROC4	強光ストレス下のレドックス制御に関与
ALB3	PS IIサブユニット (D1、D2、CP47、LHC IIなど) の膜への挿入・組み立てに関与	CYP38/TLP40	PS II修復過程の脱リン酸化阻害、PS II単量体から超複合体への変換に関与
cpSecA1	PS IIサブユニット (PsbOなど) の膜への挿入・組み立てに関与	FKBP20-2	PS II-LHC II超複合体の形成に関与
cpSecA2	PS IIサブユニット (PsbOなど) の膜への挿入・組み立てに関与	STN7	LHC IIと弱光下のPS IIサブユニット (D1、D2、CP43、PsbH) のリン酸化に関与
cpSecE1	PS IIサブユニット (PsbOなど) の膜への挿入・組み立てに関与	STN8	PS IIサブユニット (D1、D2、CP43、PsbH) のリン酸化に関与
cpSecE2	PS IIサブユニット (PsbOなど) の膜への挿入・組み立てに関与	PBCP	PS IIサブユニット (D1、D2、CP44、PsbH) の脱リン酸化に関与
cpSecY1	PS IIサブユニット (D1、PsbOなど) の膜への挿入・組み立てに関与	TLP18.3	D1分解とPS IIの二量体化、PS IIコアサブユニットの脱リン酸化に関与
cpSecY2	PS IIサブユニット (D1、PsbOなど) の膜への挿入・組み立てに関与	PPH1/TAP38	LHC IIの脱リン酸化に関与
Tha4	PS IIサブユニット (PsbP、PsbQなど) の膜への挿入・組み立てに関与	FtsH1	光損傷を受けたD1の分解
HCF106	PS IIサブユニット (PsbP、PsbQなど) の膜への挿入・組み立てに関与	FtsH2/VAR2	光損傷を受けたD1の分解
cpTatC	PS IIサブユニット (PsbP、PsbQなど) の膜への挿入・組み立てに関与	FtsH5/VAR1	光損傷を受けたD1の分解
CRPabA5e	PS IIサブユニット (LHCBI、LHCBI、CP47など) の膜への輸送に関与	FtsH6	強光下でLHC IIの分解に関与?
CY01/SCO2	PS II-LHC II超複合体の安定性に関与	FtsH8	光損傷を受けたD1の分解
THF1/PSB29	PS II-LHC II超複合体の動態に関与	FtsH11	光化学系装置の耐熱に関与
TerC	PS IIサブユニット (D1、D2、CP43など) の膜への同時翻訳挿入に関与	Deg1	光損傷を受けたD1と、PsbOの分解、PS IIサブユニット (D1、D2、CP43、CP47) の組み込みに関与
VIPP1	D1の膜への輸送or/and同時翻訳挿入に関与	Deg2	ストレス誘導性LHCBIの分解と光損傷を受けたD1の分解に関与
PPL1	PS II修復サイクルに関与	Deg5	光損傷を受けたD1の分解に関与
ELIP1	不明	Deg7	光損傷を受けたD1と、D2、CP43、CP47の分解に関与
ELIP2	不明	Deg8	光損傷を受けたD1の分解に関与
SEP3.1/LIL3:1	LHC IIの安定性に関与	HCF243	D1のC末端プロセッシングと複合体への組み込みに関与
SEP3.2/LIL3:2	LHC IIの安定性に関与	PSB27-H1	修復過程でのD1のC末端プロセッシングに関与?
HCF173	D1の翻訳開始に関与	PSB27-H2/LPA19	de novo合成過程でのD1のC末端プロセッシングに関与
HCF244	D1の翻訳開始に関与	HCF136	RC、RC47a、RC47b複合体の構築に関与? 暗所でのD1翻訳制御
CtpA1	D1のC末端プロセッシングに関与	PAM68	D1のC末端プロセッシング、CP47の蓄積に関与
CtpA2	D1のC末端プロセッシングに関与	PsbN/PBF1	PS IIコアとアンテナサブユニットのリン酸化制御に関与
LPA1/PratA	D1の合成と組み立てに関与	PSB28	PS IIサブユニット (D1、CP43、CP47) の合成に関与
MET1	PS II修復過程のPS II超複合体の形成に関与	LPA2	CP43の合成と組み込みに関与
LQY1	PS II修復過程のPSサブユニットの分解・形成and/or再構築、D1の合成とターンオーバー	LPA3	CP43の合成と組み込みに関与
PDI6/PDIL1-2	D1合成の制御に関与	PSB33	LHC IIとPS IIの関連に関与
TRX-M1	CP47のPS IIへの組み込みに関与	HHL1	PS II修復過程におけるPS IIコア単量体のPS II-LHC II超複合体への組み込みに関与
TRX-M2	CP47のPS IIへの組み込みに関与	MPH1	強光下でのPS IIコア単量体の安定性と組み込みに関与
TRX-M4	CP47のPS IIへの組み込みに関与	OHP1	D1の翻訳開始に関与
		OHP2	D1の翻訳開始に関与

表1. PS II の *de novo*、repair cycle に関与する補助タンパク質一覧

PS II の *de novo*、repair cycle に関与する補助タンパク質の名称と、明らかになっている機能を示した。本研究で扱った補助タンパク質は赤字で示している。図の作成は(Lu, 2016)を参考にした。

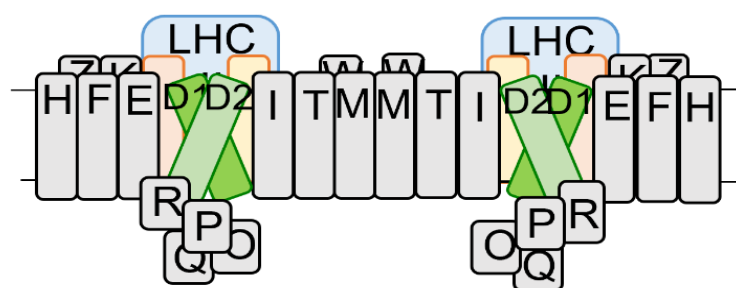
	OHP1の主要論文	新規性
2017	Beck et al., 2017	・ OHP1、OHP2がPS II コアの蓄積 (de novo 合成) に必須であることを初めて示した。 (OHP1、OHP2の変異体は枯死する)
2018	Myouga et al., 2018 (本研究室の共著論文) Hey and Grimm, 2018	・ OHP1複合体について初めて報告した。OHP1と複合体を形成するタンパク質を粗精製し、共精製されたタンパク質をMS解析した結果を示した。 OHP1複合体→D1, D2, PsbI, PsbE/F, OHP1, OHP2, HCF244, HCF136, HCF173, APE1, LQy1 ・ OHP1、OHP2、HCF244が相互作用することを示した。 ・ Thylakoid membranesをGranaとStromaに分け、OHP1、OHP2、HCF244がStromaに豊富なことを示した。 ・ アグロバクテリウムを用いて、OHP2の発現を成育の途中から抑制した植物では、D1合成が低下することを示した。
2019	Li et al., 2019	・ BN-PAGEと2D-PAGEでHCF136がOHPsと複合体を形成していないと報告した。 (複合体精製はしていない)
2020	Chotewutmontri et al., 2020	・ OHP1、OHP2、HCF244がD1の翻訳に重要であることを示した。
2021	Maeda et al., 2021 (査読中)	・ OHP1複合体を精製し、構成サブユニットを同定した。粗精製により検出された非特異的なタンパク質を除いた。 OHP1複合体→D1, D2, PsbI, PsbE/F, OHP1, OHP2, HCF244 ・ OHP1、OHP2が強光ストレスから複合体を保護する可能性を示した。 ・ Thylakoid membranesをGrana core、Grana margins、Stroma lamellaeに分け、OHP2とHCF244がGrana marginsに豊富なことを示した。 ・ OHP2-RNAi植物を用いて、OHP2がPS IIのde novo合成だけでなく、repairにも重要であることを示した。

表2. OHP1、OHP2、HCF244 に関する近年の研究まとめ

遺伝子名	タンパク質名	コード	遺伝子名	タンパク質名	コード
<i>psbA</i>	D1(PsbA)	葉緑体	<i>psbR</i>	PsbR	核/葉緑体
<i>psbB</i>	CP47(PsbB)	葉緑体	<i>psbS</i>	PsbS	核/葉緑体
<i>psbC</i>	CP43(PsbC)	葉緑体	<i>psbTc</i>	PsbTc	核
<i>psbD</i>	D2(PsbD)	葉緑体	<i>psbTn</i>	PsbTn	核/葉緑体
<i>psbE</i>	Cyt b ₅₅₉ α (PsbE)	葉緑体	<i>psbU</i>	12kDa	核/葉緑体
<i>psbF</i>	Cyt b ₅₅₉ β (PsbF)	葉緑体	<i>psbV</i>	Cyt C ₅₅₀	核/葉緑体
<i>psbH</i>	PsbH	葉緑体	<i>psbW</i>	PsbW	核/葉緑体
<i>psbI</i>	PsbI	葉緑体	<i>psbX</i>	PsbX	核/葉緑体
<i>psbJ</i>	PsbJ	葉緑体	<i>psbY</i>	PsbY	核/葉緑体
<i>psbK</i>	PsbK	葉緑体	<i>psbZ</i>	PsbZ(Ycf9)	核
<i>psbL</i>	PsbL	葉緑体	<i>psb30</i>	Psb30(Ycf12)	核
<i>psbM</i>	PsbM	葉緑体	<i>psb27</i>	Psb27	核/葉緑体
<i>psbN</i>	PsbN	葉緑体	<i>psb28</i>	Psb28	核/葉緑体
<i>psbO</i>	OEC33	核			
<i>psbP</i>	OEC23	核			
<i>psbQ</i>	OEC17	核			

生物種間で保存性が高い

生物種間で保存性が低い



光化学系II
PS II-LHC II supercomplex

図 1. 光化学系 II (PS II) のサブユニット組成

光化学系 II (PS II) の構成サブユニットの一覧を上図に示した。左側に生物種間で保存性が高いサブユニットを、右側に保存性が低いサブユニットを示している。活性型の PS II は二量体を形成し、チラコイ膜に埋め込まれた形で存在している。下図は活性型の PS II-LHCII 超複合体の模式図を示している。

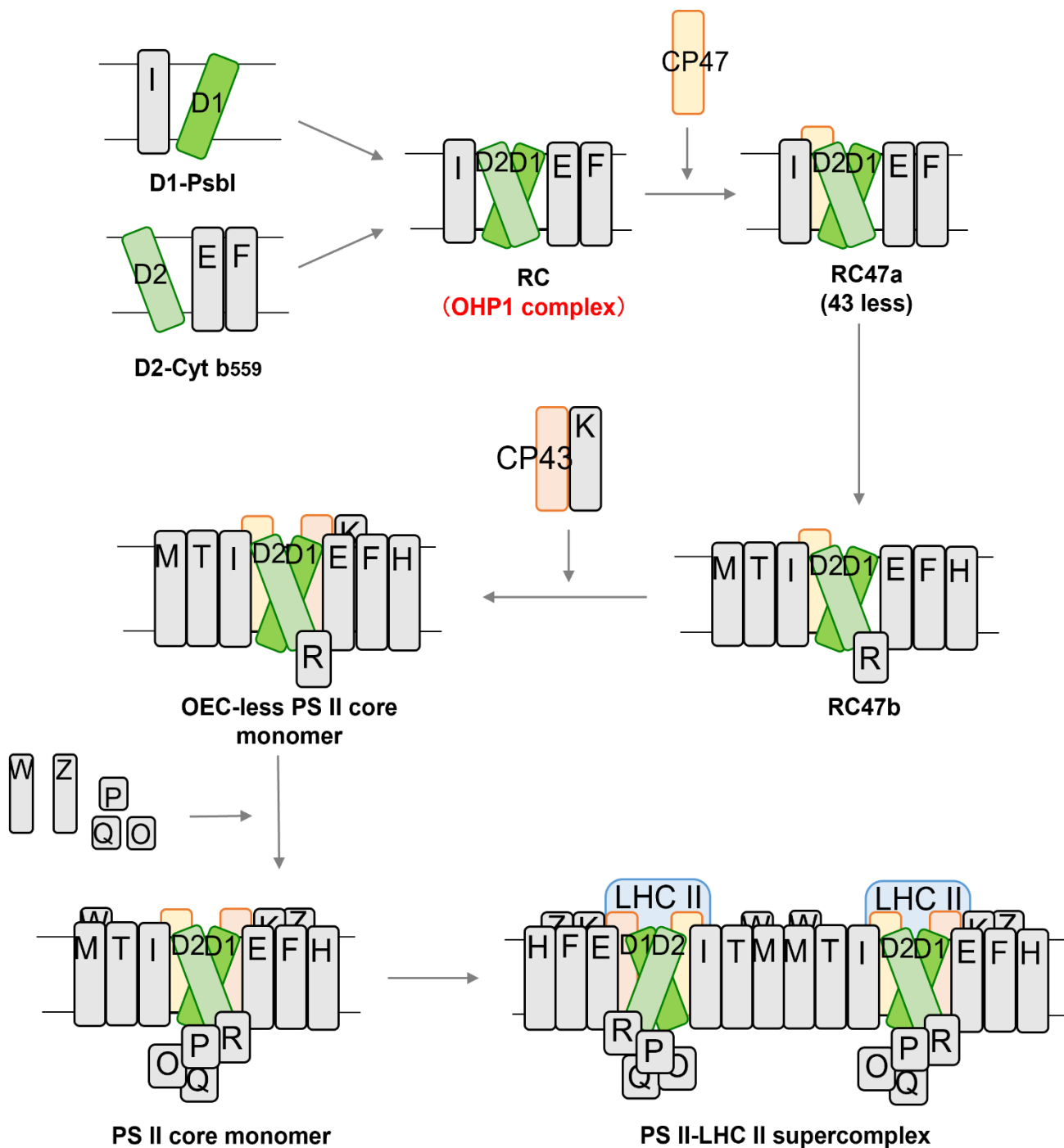


図 2. PS II の *de novo* 合成過程の模式図

PS II は中心のサブユニットから段階的に構築される。反応中心である D1、D2 の合成から、光捕集アンテナ複合体である LHC II が結合した PS II-LHC II 超複合体の形成過程を示した。模式図の作成は(Lu, 2016) を参考にした。

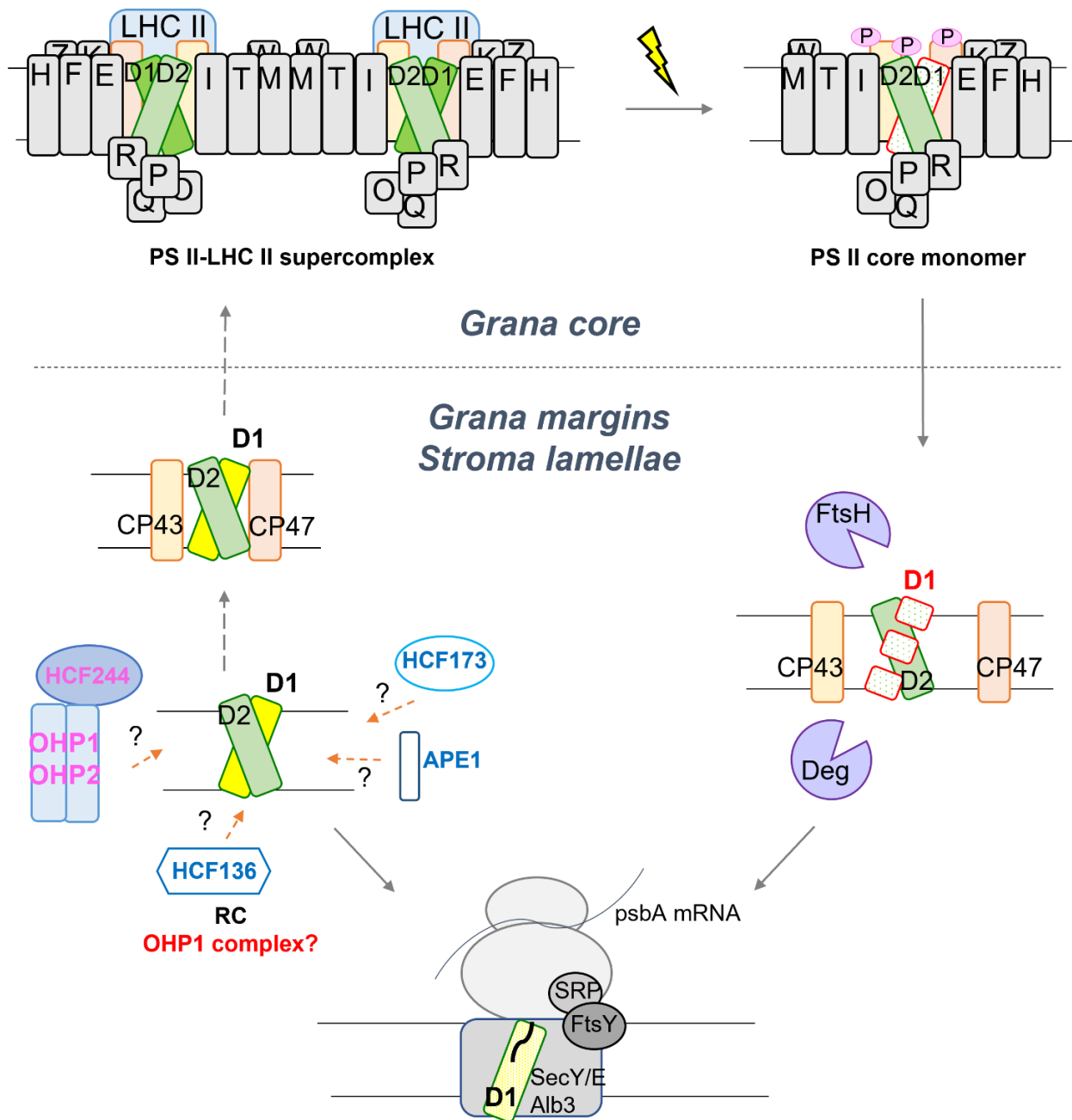


図 3. 光損傷を受けた PS II の repair cycle の模式図

PS II は強光ストレスに晒されると、反応中心である D1 に損傷を受ける。壊れた D1 を分解し、新たに合成された D1 と置換する repair cycle を示した。損傷を受けた PS II-LHC II 超複合体は、リン酸化を受け、活性部位であるグラナコアから、タンパク質の分解・合成部位であるグラナマージン/ストロマメラに運ばれる。FtsH 及び Deg プロテアーゼにより損傷 D1 は分解され、SRP、SecY、ALB3 などの補助タンパク質により新規 D1 が膜内に埋め込まれ、複合体に組み込まれることで、再び PS II-LHC II 超複合体が構築される。repair cycle に、OHP1 などの RC 複合体に関連の強い補助タンパク質が関与するかどうかは不明である。なお、模式図の作成は(Järvi et al., 2015) を参考にした。

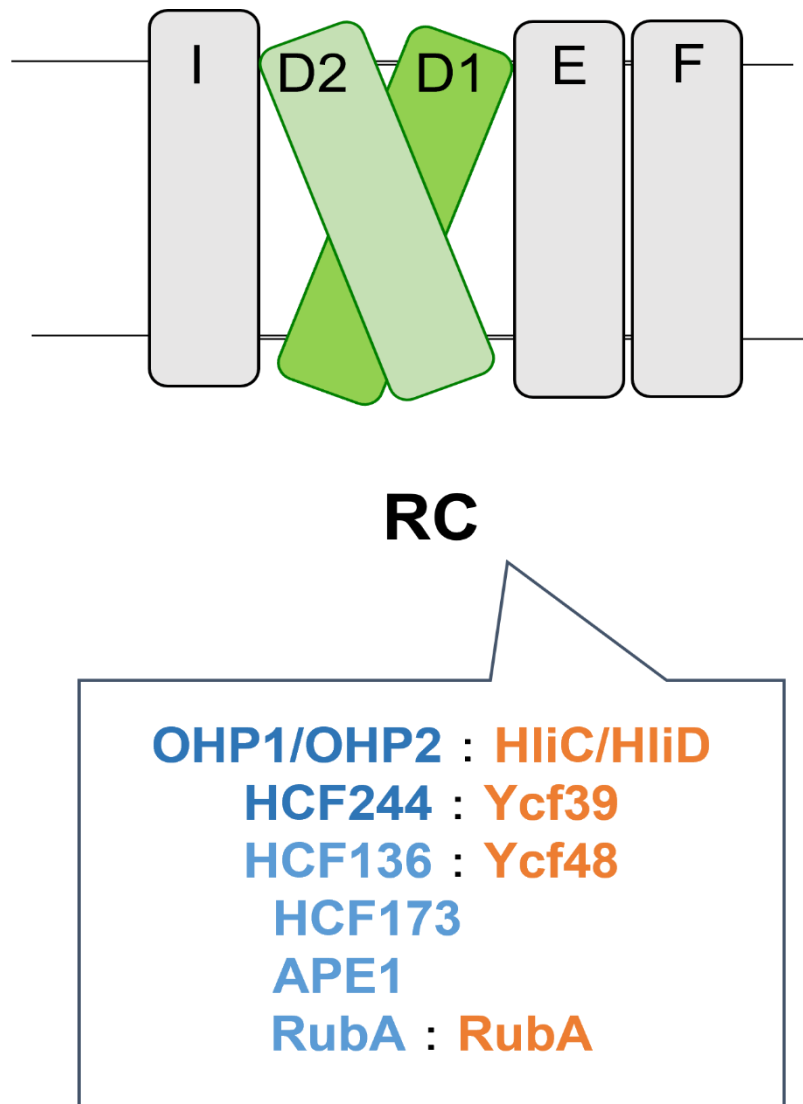


図4. 陸上植物とシアノバクテリアの RC 複合体に結合する補助タンパク質

陸上植物の RC 複合体に結合が認められている補助タンパク質を青字で、シアノバクテリアの RC 複合体に結合が認められている補助タンパク質を橙色字で示した。対になっているタンパク質同士はホモログの関係である。陸上植物では、結合の有無が明確でない補助タンパク質も複数存在しており、それらの補助タンパク質は水色字で示した。

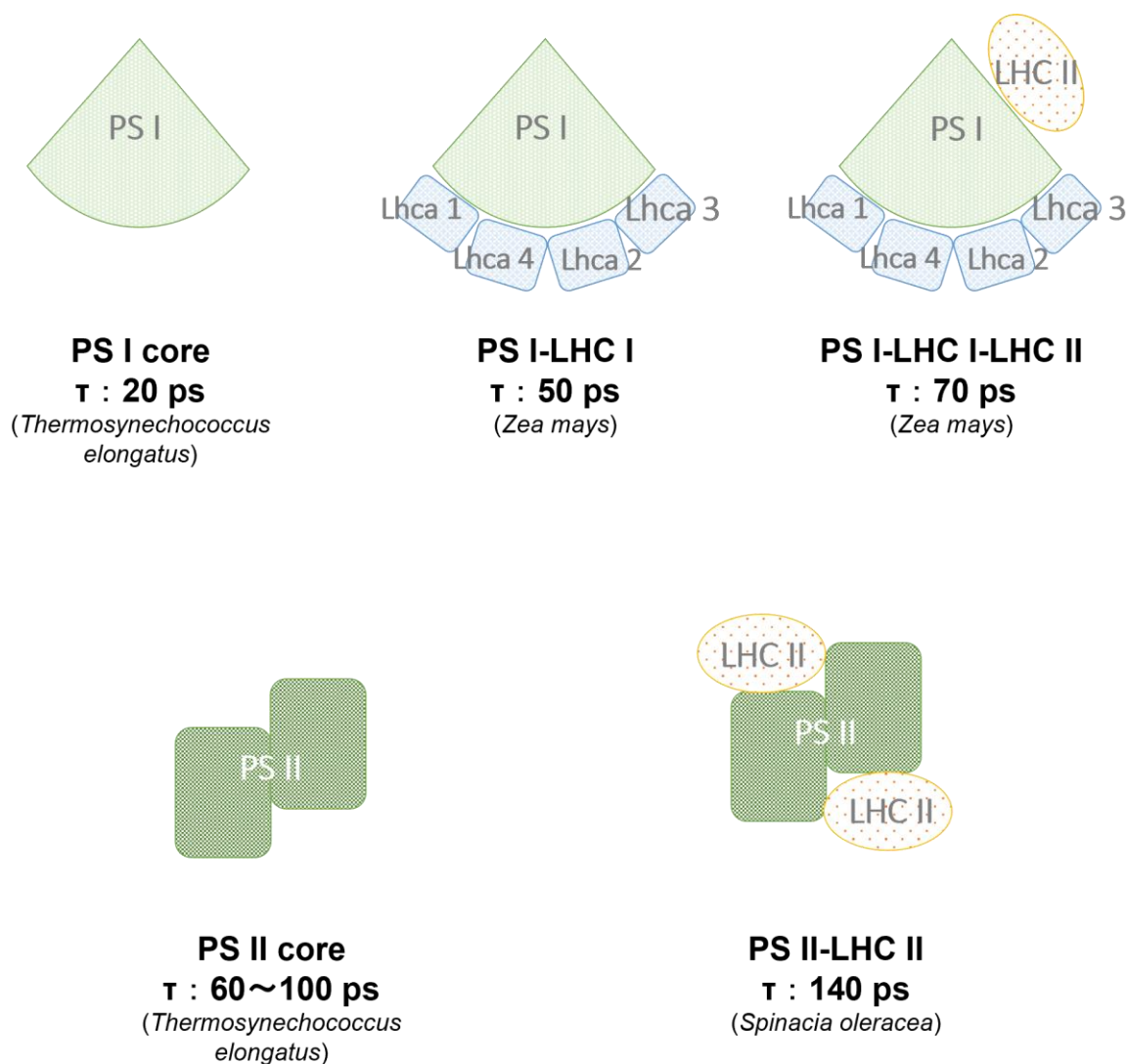


図5．各種光化学系タンパク質複合体の蛍光寿命

光化学系タンパク質複体内では、結合する色素の1つが光エネルギーを吸収し、近くの色素へ励起エネルギーを移動させる反応（excitation energy transfer : EET）が起こる。EETは反応中心Chlまで進行し、電荷分離を引き起こす。吸収した光エネルギーの大部分はどのように光合成反応に用いられるか、熱として排出され、最終的に残った余剰エネルギーが蛍光として放出される。この蛍光放出時間は、EETにかかる時間や、光化学系タンパク質複合体の最大量子効率などに依存して決定され、各種質複合体が固有の値を有する。上図に代表的な光化学系タンパク質複合体の蛍光寿命（ τ ）を示した。なお、これらの値は(Croce and van Amerongen, 2020)を参考に記載している。

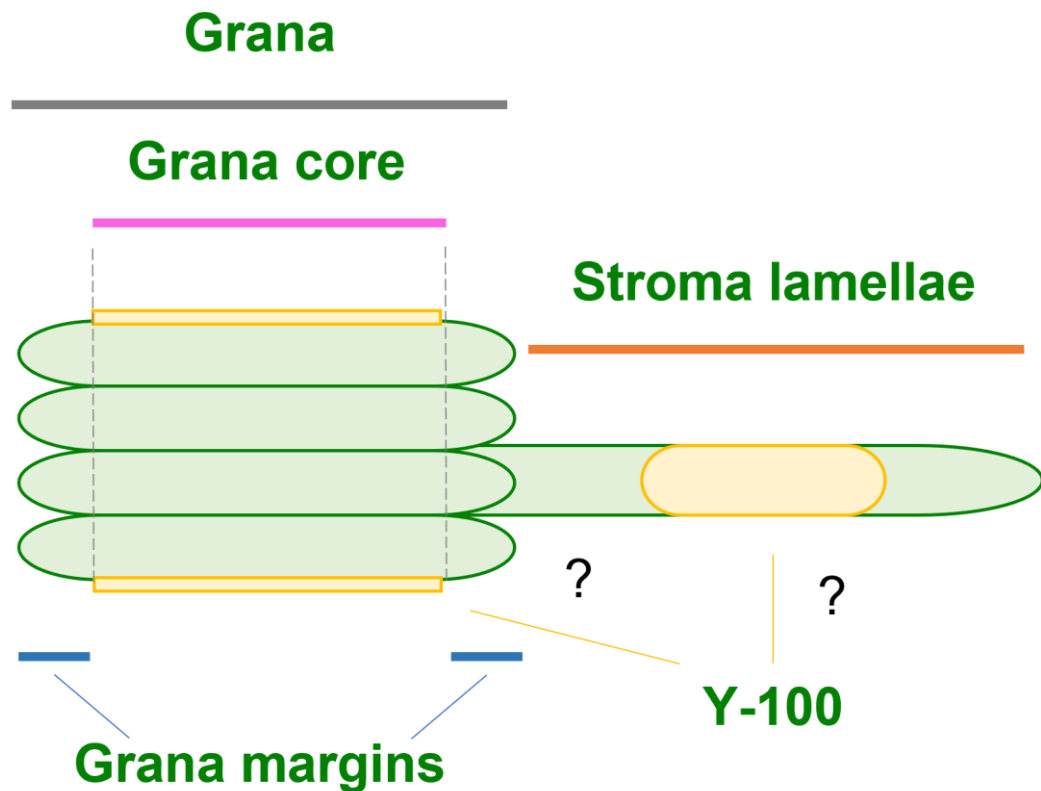


図6．チラコイド膜の模式図

陸上植物のチラコイド膜はグラナと呼ばれる、円盤状のチラコイド膜が積み重なったような構造と、グラナを繋ぐ細長く伸びたチラコイド膜であるストロマラメラと呼ばれる構造を持つ。グラナはさらに、各円盤が互いに接したグラナコアと呼ばれる領域と、円盤の辺縁のカーブした部位を指すグラナマージンと呼ばれる領域に細分化される。また、ストロマラメラも密度が高い領域と密度が低い領域に区別されることもあり、前者を狭義のストロマラメラ、後者を Y100 と呼び分けることもある。しかしながら、Y100 が実際にどの部位を指す名称であるかは不明確である。

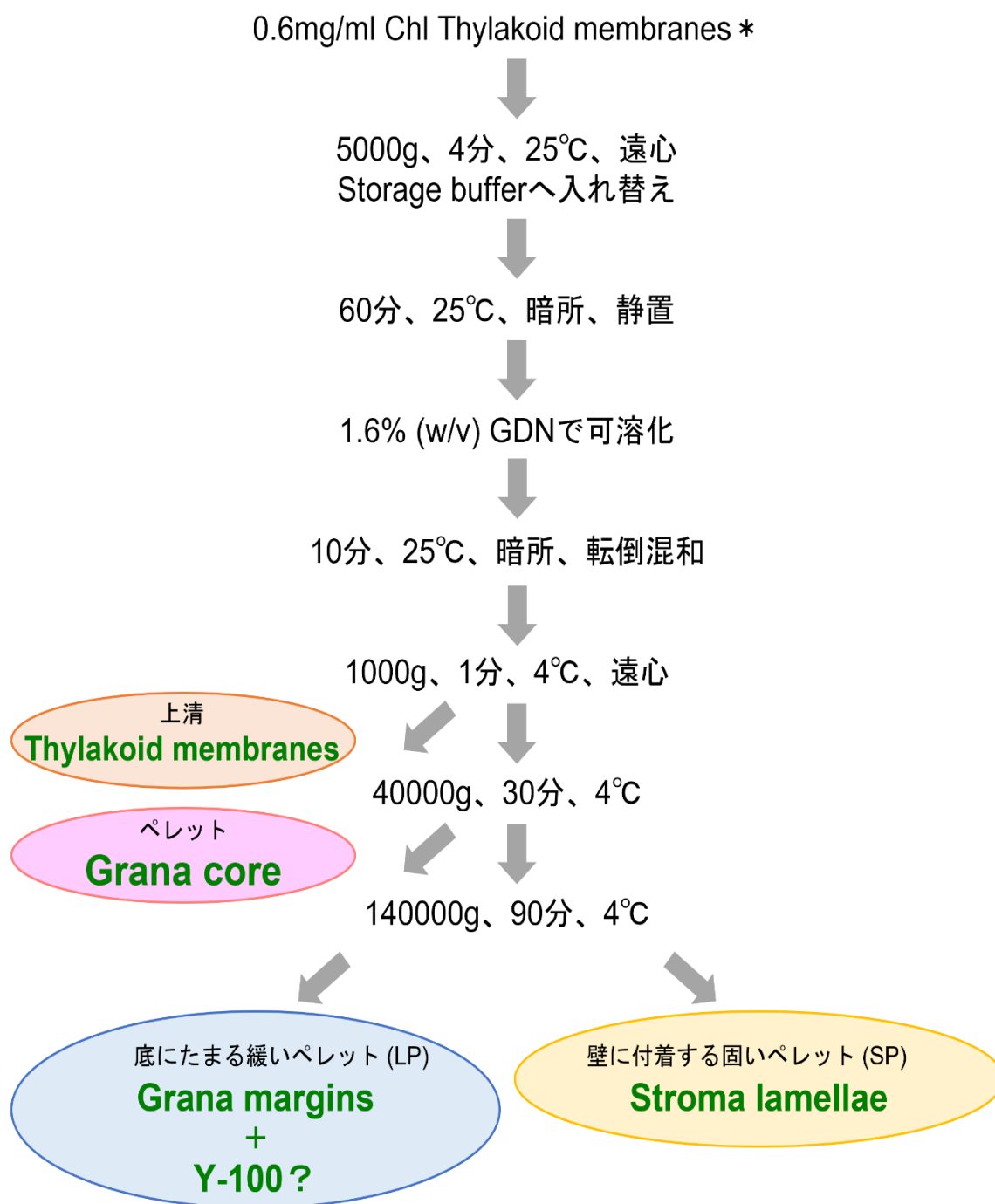


図7. チラコイ膜の分画法

チラコイド膜を、マイルドな界面活性剤である GDN で部分的に可溶化し、超遠心により、Total thylakoids (T)、Grana core (GC)、Loose pellet (LP) : Grana margins (GM)+Y-100?、Solid pellet (SP) : Stroma lamellae に分画する過程を図示した。

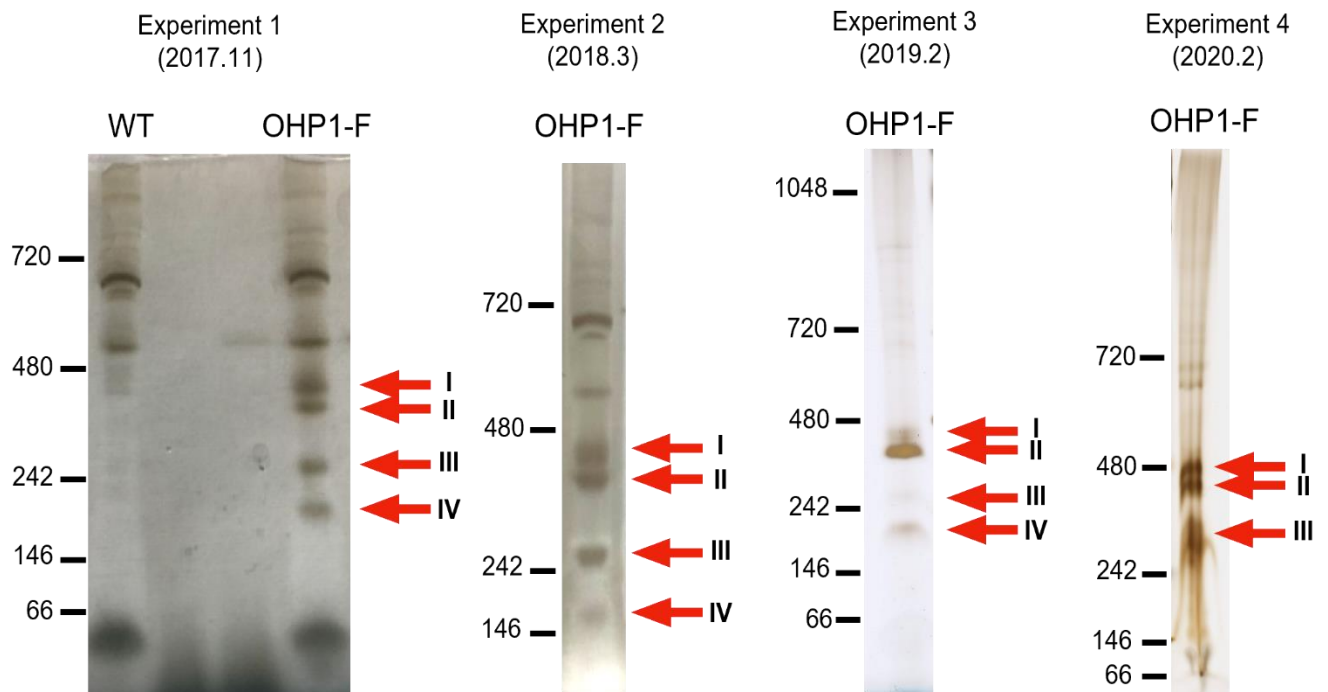


図 8. 本研究室で行われた OHP1 複合体精製結果の比較

上図は 2017 年～2020 年までに本研究室で行われた OHP1 複合体精製実験の結果である。FLAG 精製液を CN-PAGE/BN-PAGE にロードし、銀染色で OHP1 複合体（赤矢印）を検出した結果を示している。2019 年までの精製方法と 2020 年の精製方法の細かい違いは、図 9 と 4.1-1-1 項に示している。検出される OHP1 複合体の数が 2020 年の結果では 4 種類から 3 種類に減っている。OHP1 複合体 IV は精製過程で分解されて生じた複合体である可能性が高く、精製方法の改良により 2020 年には検出されなくなったものと考えられる。なお、Experiment 1～3 の引用元を以下に記載する。Experiment 1:高橋小春（2018 年度修士課程卒業）修士論文、Experiment 2:高橋小春未発表データ、Experiment 3:横山明（2020 年度修士課程卒業）修士論文。

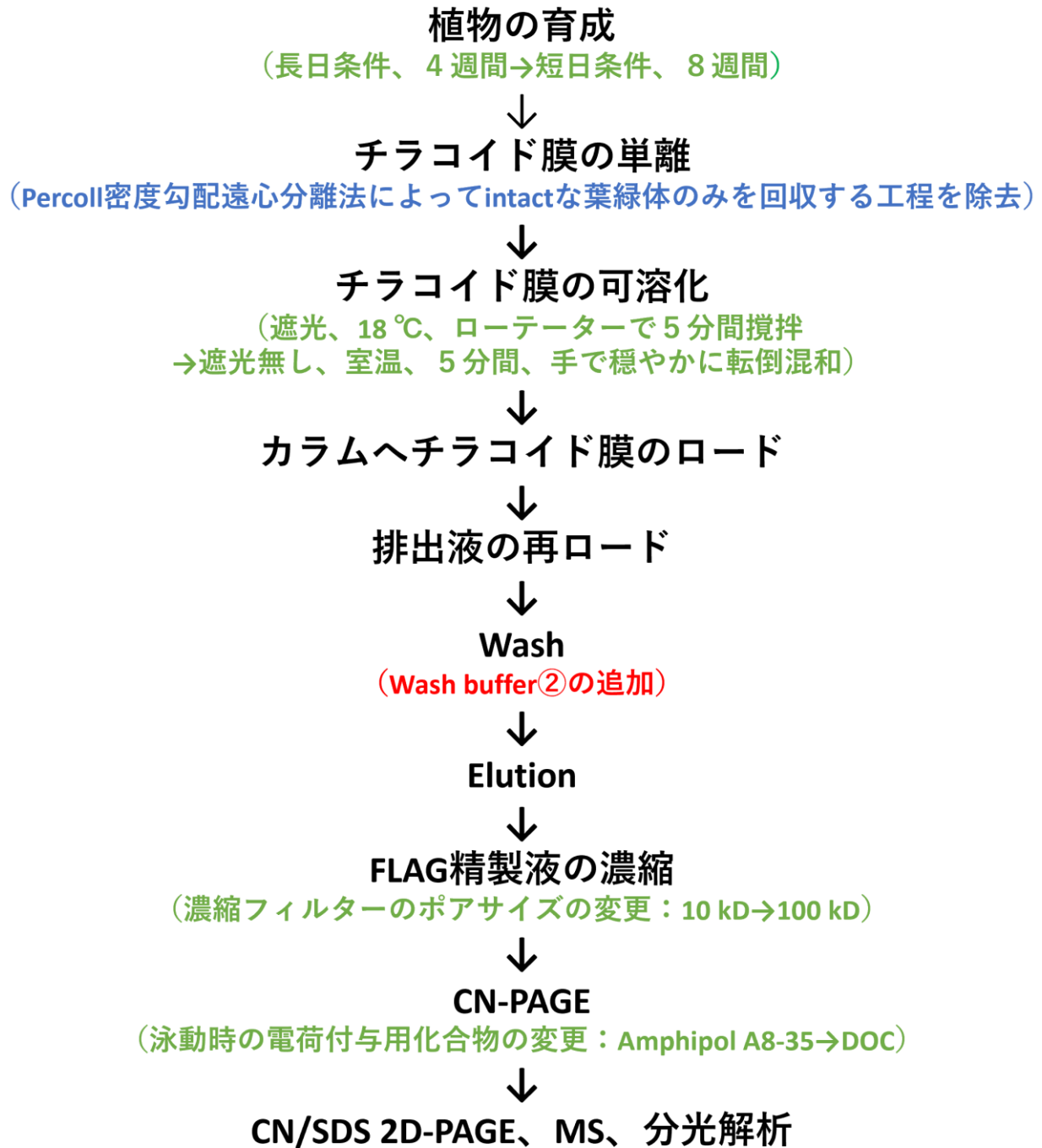


図9. カラムクロマトグラフィーによる精製方法の改良点

OHP1 複合体を純度高く精製するため、本研究で従来行っているカラムクロマトグラフィーによる精製方法の改良を行った。本研究の精製法は 3.3-1 項に示してあるが、従来からの変更点（緑字）、追加点（赤字）、削除した点（青字）をここに記載した。

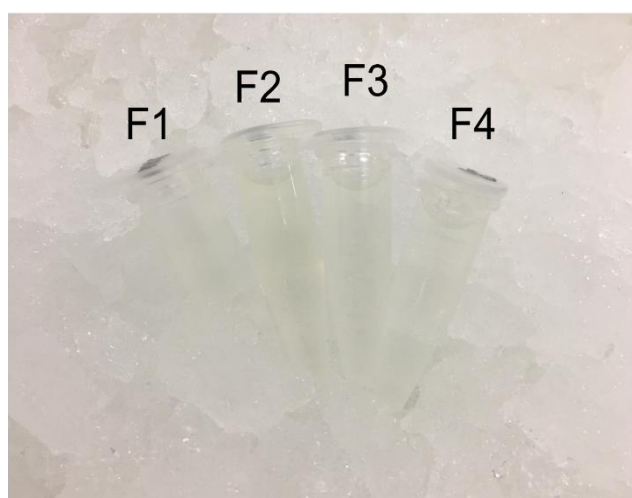
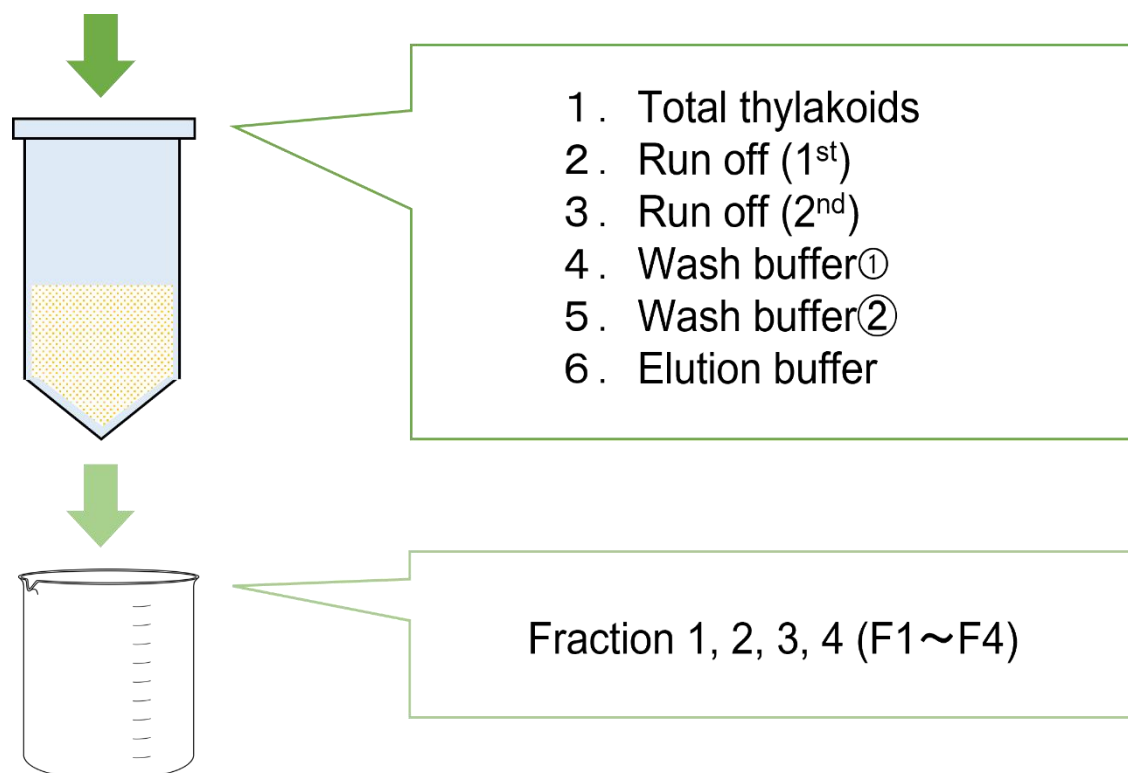


図 1 0. FLAG 結合タンパク質複合体の精製法

チラコイド膜をマイルドな界面活性剤である digitonin で可溶化し、Anti-FLAG Affinity Gel を充填したカラム（または、Anti-FLAG Magnetic Beads (SIGMA)を充填した 1.5 ml チューブ）にロードした。続いて、回収した排液のリロード、Wash buffer①、Wash buffer②、Elution buffer の順にロードした。カラムクロマトグラフィーによる精製の際は、Elution buffer の溶出画分を 500 μ l ずつ 4 つの Fraction (F1~F4) に回収した。下図は、回収した溶出画分であり、F2 と F3 がやや緑がかっていることが確認できる。

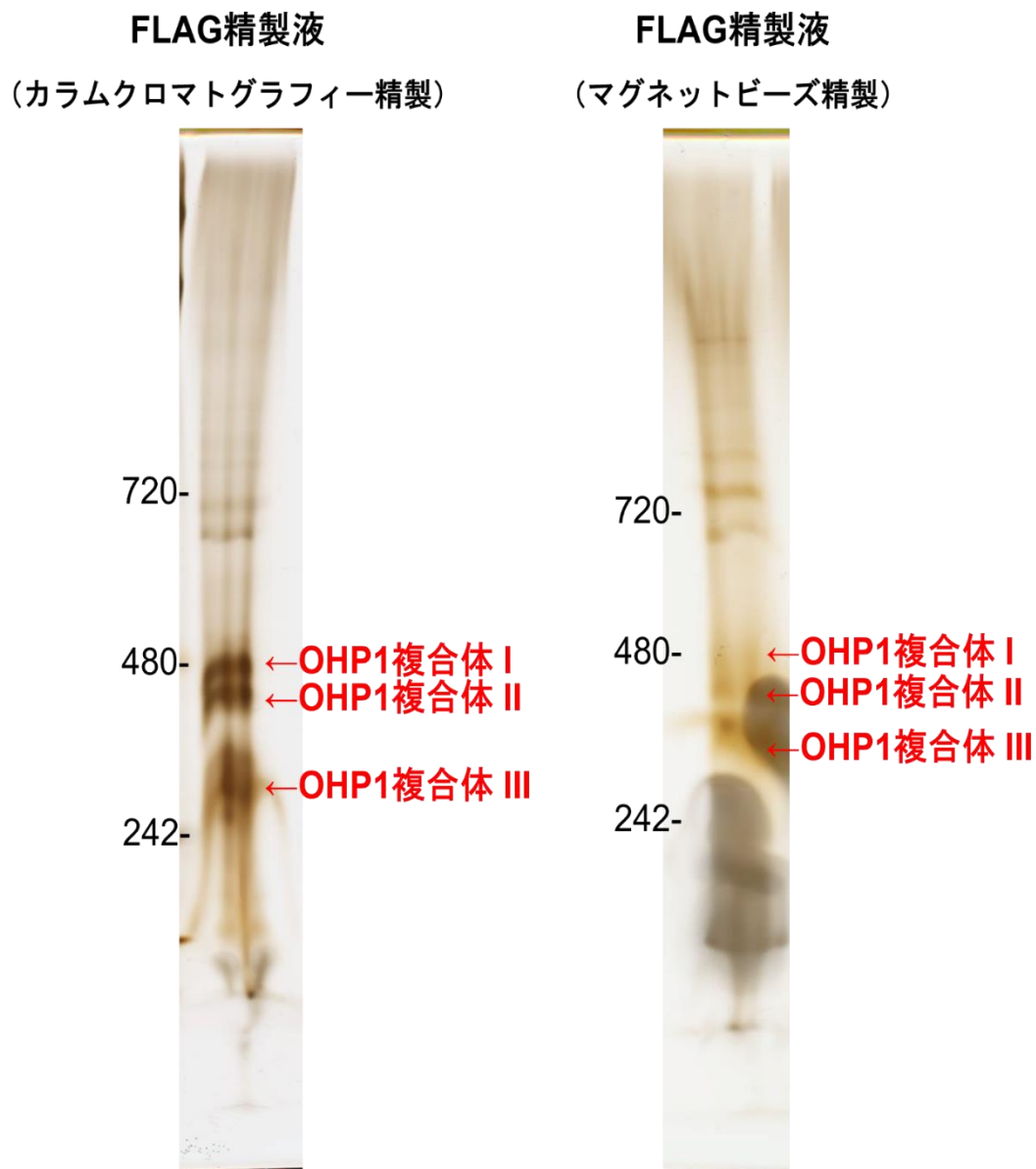


図 1 1. カラムクロマトグラフィー精製法と磁気ビーズ精製法の比較

カラムクロマトグラフィー (左図) と磁気ビーズ (右図) を用いて精製した FLAG 精製液を CN-PAGE で泳動し、銀染色でタンパク質複合体を検出した結果を示した。両者で認められる 700 kD 前後の複数のバンドは、図 8 左図から非特異的なバンドだと考えた。いずれの方法でも、約 450、420、300 kD のサイズの 3 種類の OHP1 複合体 (OHP1 複合体 I、II、III) が認められた。

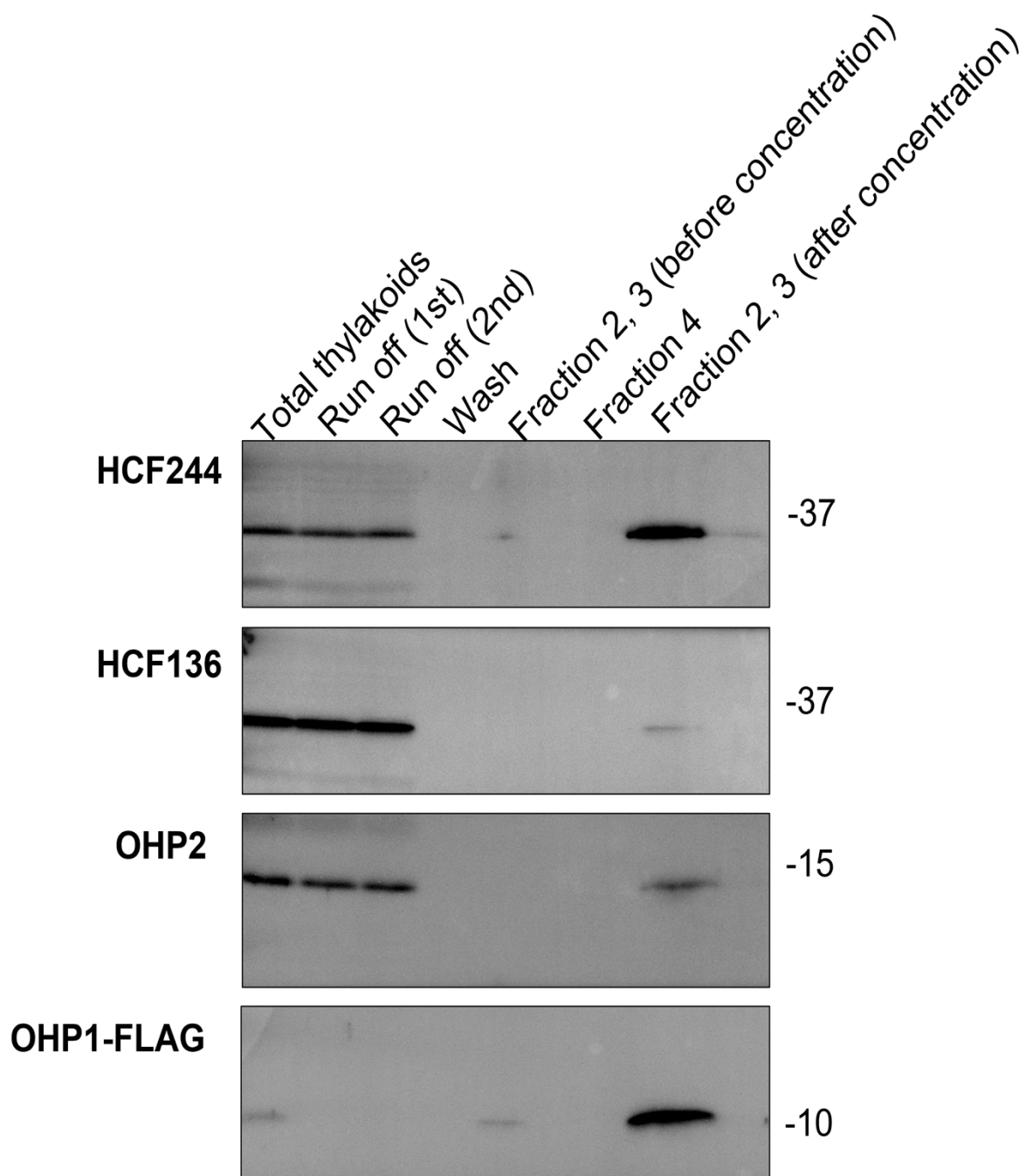


図 1 2. FLAG 結合タンパク質複合体精製の各過程による補助タンパク質の immunoblotting 解析

図 1 0 に示した FLAG 結合タンパク質複合体精製過程の各ステップで、補助タンパク質の精製状況を確かめるため、immunoblotting 解析を行った。digitonin で可溶化したチラコイド膜を Total thylakoids とし、リロード (Run off)、Wash、Elution (F2~F4)、F2 と F3 を 100 kD の Amicon Ultra 0.5 mL Centrifugal Filters (Millipore) で濃縮した溶液を SDS-PAGE し、immunoblotting に用いた。なお、各抗体の希釈率は 3.7 項に示している。

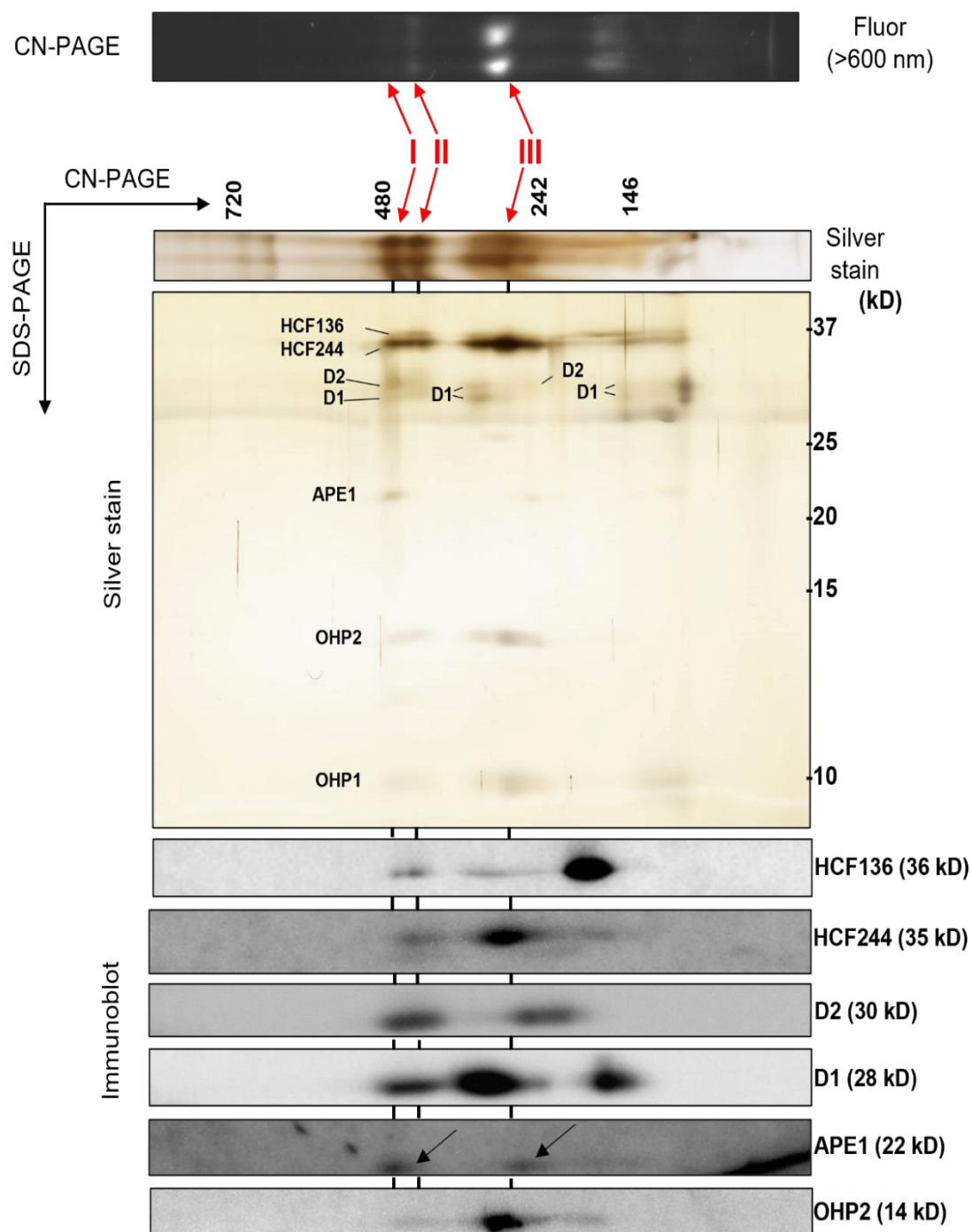


図 1 3. カラムクロマトグラフィー精製法を用いた 2D-CN/SDS-PAGE と immunoblotting 解析

カラムクロマトグラフィーを用いて精製した図 1 1 左図の CN-PAGE ゲルを 1 次元とし、SDS-PAGE で 2 次元電気泳動を行ったゲルを用いて、銀染色と immunoblotting を行った。また、最上部には、CN-PAGE のゲルに LuminoGraph I (ATTO) の CyanoView LED illuminator を用いて 480-530 nm の blue-green light を当てることにより、Chl 蛍光を検出した結果を示している。赤矢印は 3 種類の OHP1 複合体のバンドを示している。なお、各抗体の希釈率は 3.7 項に示している。

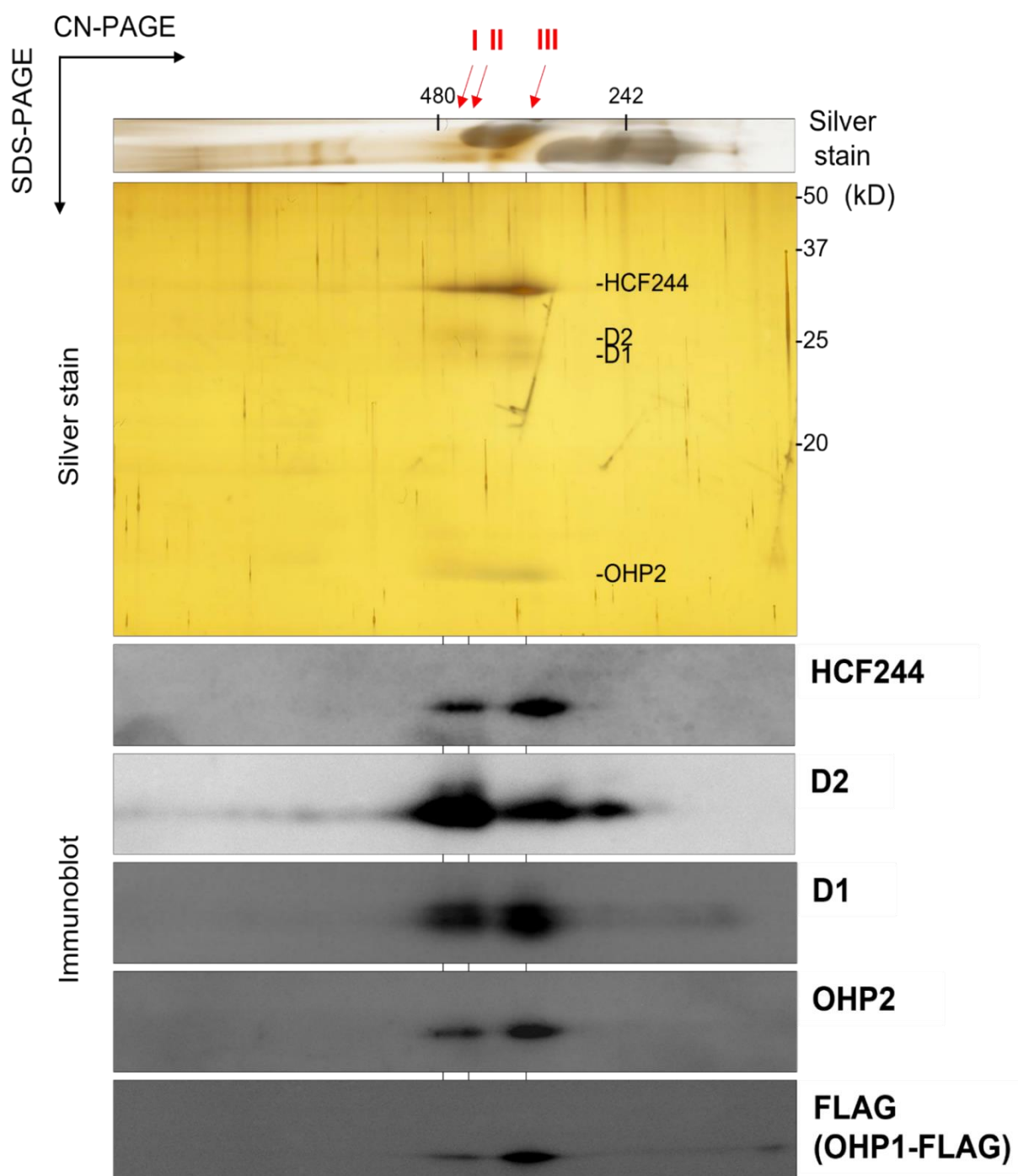
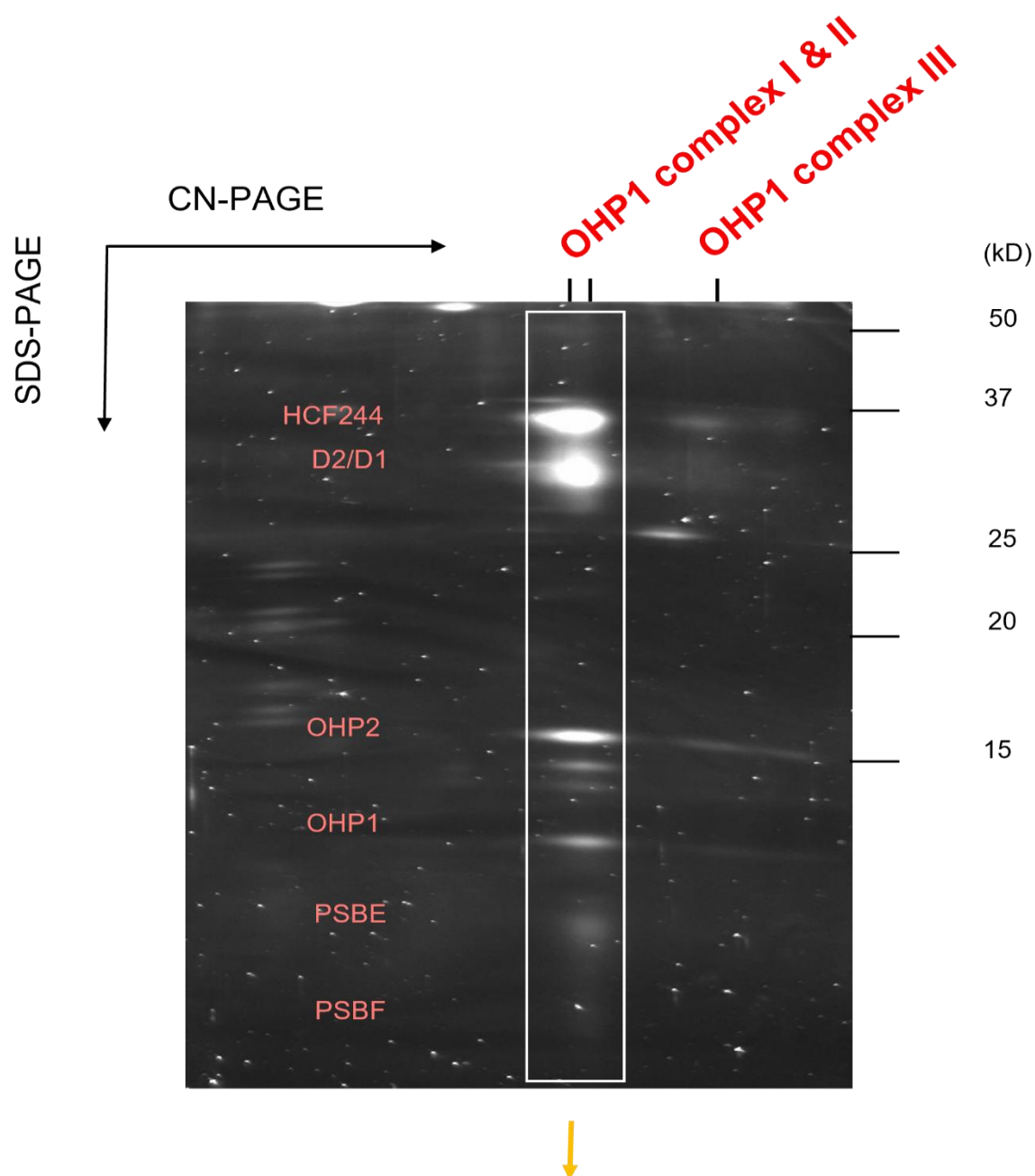


図 1 4. 磁気ビーズ精製法を用いた 2D-CN/SDS-PAGE と immunoblotting 解析

磁気ビーズを用いて精製した図 1 1 右図の CN-PAGE ゲルを 1 次元とし、SDS-PAGE で 2 次元電気泳動を行ったゲルを用いて、銀染色と immunoblotting を行った。赤矢印は 3 種類の OHP1 複合体のバンドを示している。なお、各抗体の希釈率は 3.7 項に示している。



Cut gel strip in 21 pieces for MS analysis

図 1 5. OHP1 複合体 I、II に含まれるサブユニットの同定①

OHP1 複合体 I、II に含まれるサブユニットを同定するために、カラムクロマトグラフィーにより得た FLAG 精製液を CN-PAGE で泳動し、SDS-PAGE で 2 次元電気泳動を行った結果を示した。タンパク質は Flamingo 染色により検出した。このゲルを質量分析のサンプルとして使用するため、図中の白枠のラインを高分子側から順に 21 個のピースにカットした。図中には、質量分析の結果に準じてタンパク質名を記載している。なお、図 1 5 の泳動と質量分析は本研究室の高橋小春（2018 年修士課程卒業）が行ったデータを示している。

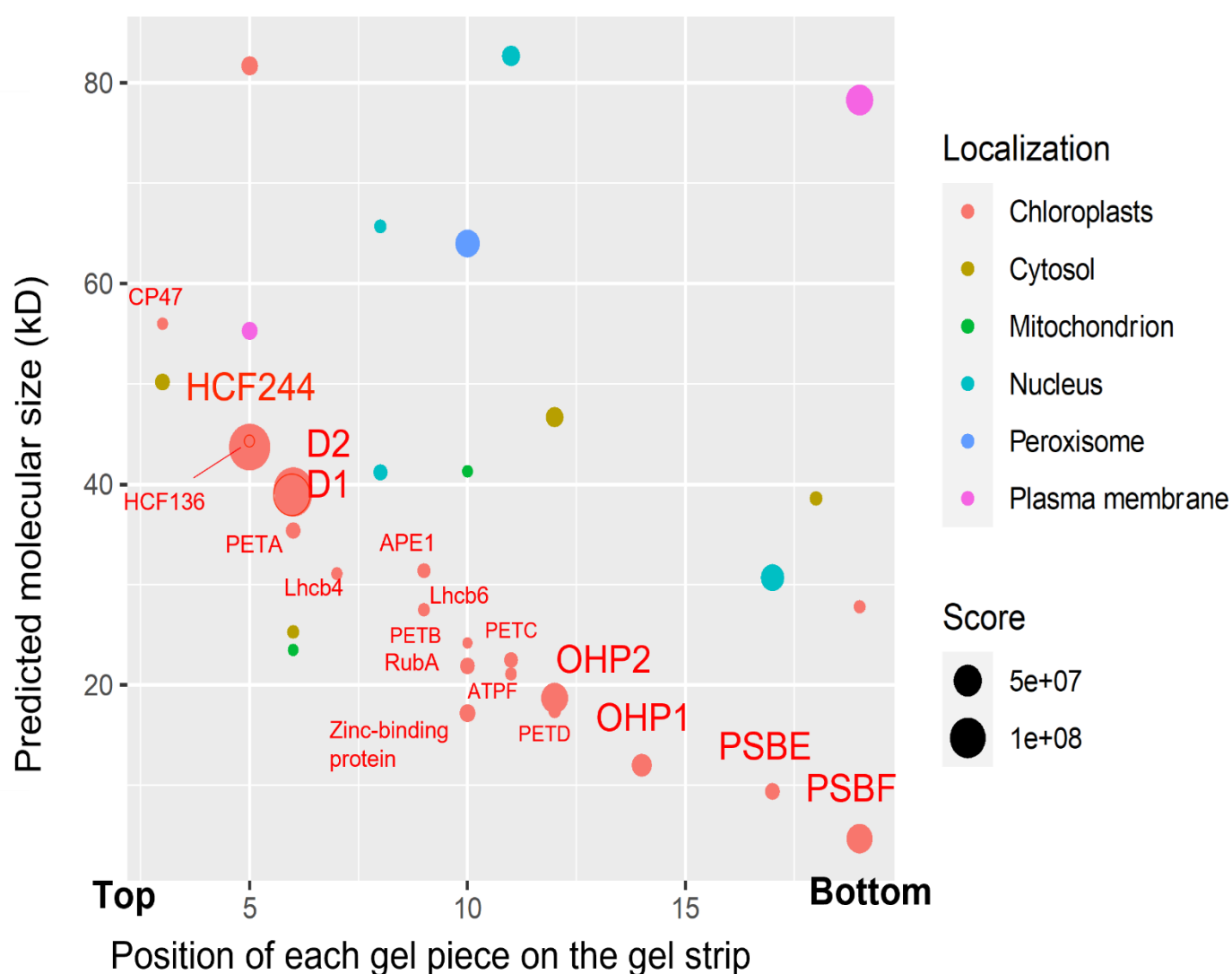


図 1 6. OHP1 複合体 I、II に含まれるサブユニットの同定②

図 1 5 の SDS-PAGE から切り出した 2 1 ピースのゲルを質量分析にかけた結果を示した。縦軸は、タンパク質の分子量、横軸はゲルピースの番号を示しており、左側が高分子側である。また、検出されたタンパク質のうち、葉緑体内に存在するものを赤字で示しており、非特異的に検出された考えられるタンパク質（茶：細胞質基質、緑：ミトコンドリア、水色：核、青：ペルオキシソーム、桃色：細胞膜）と区別している。なお、各スポットのサイズは質量分析の Score の高さに比例する形で示している。なお、本研究室の高橋小春（2018 年修士課程卒業）が質量分析を行い、本研究でその Score を基に図 1 6 に示したように解釈し、OHP1 複合体の構成サブユニットの同定を行った。

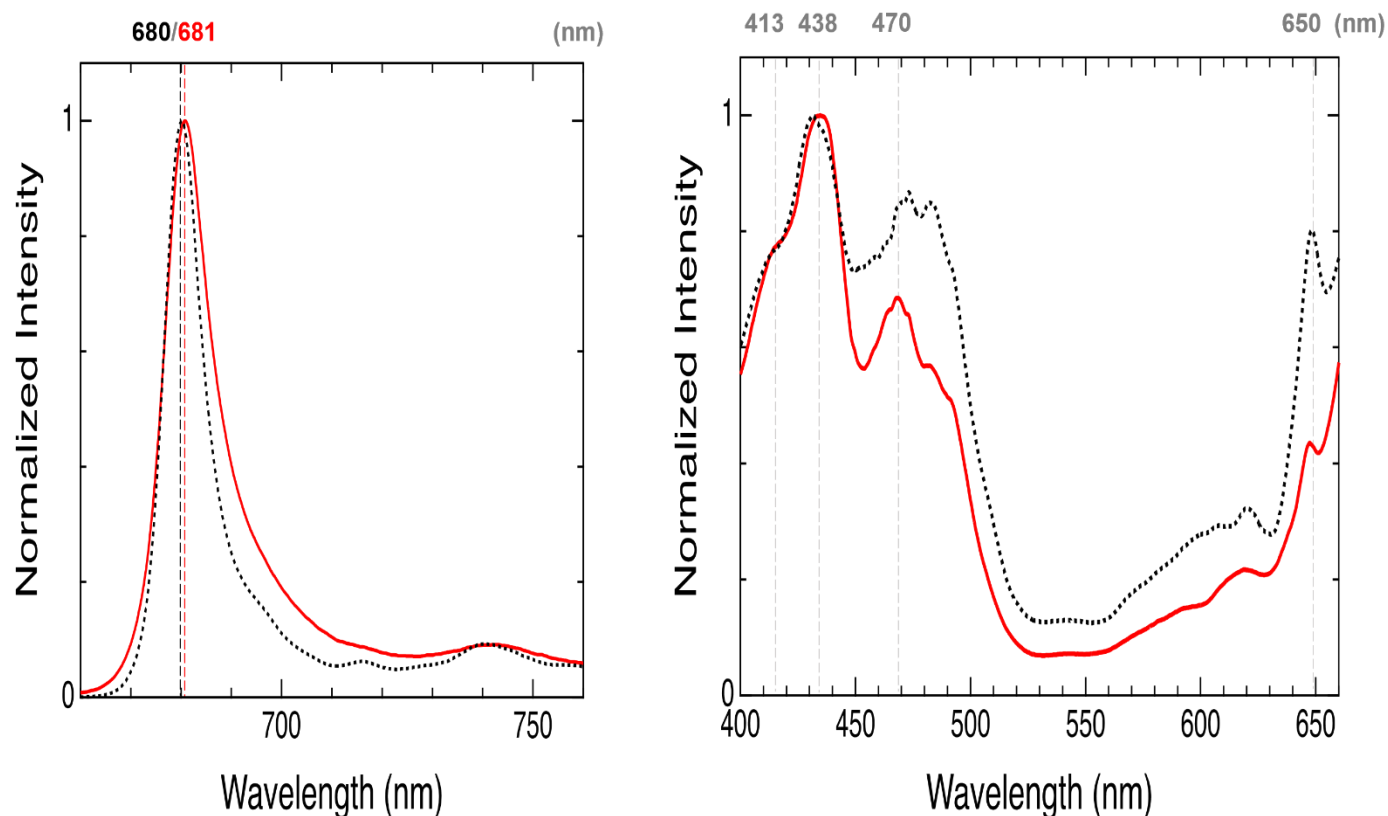
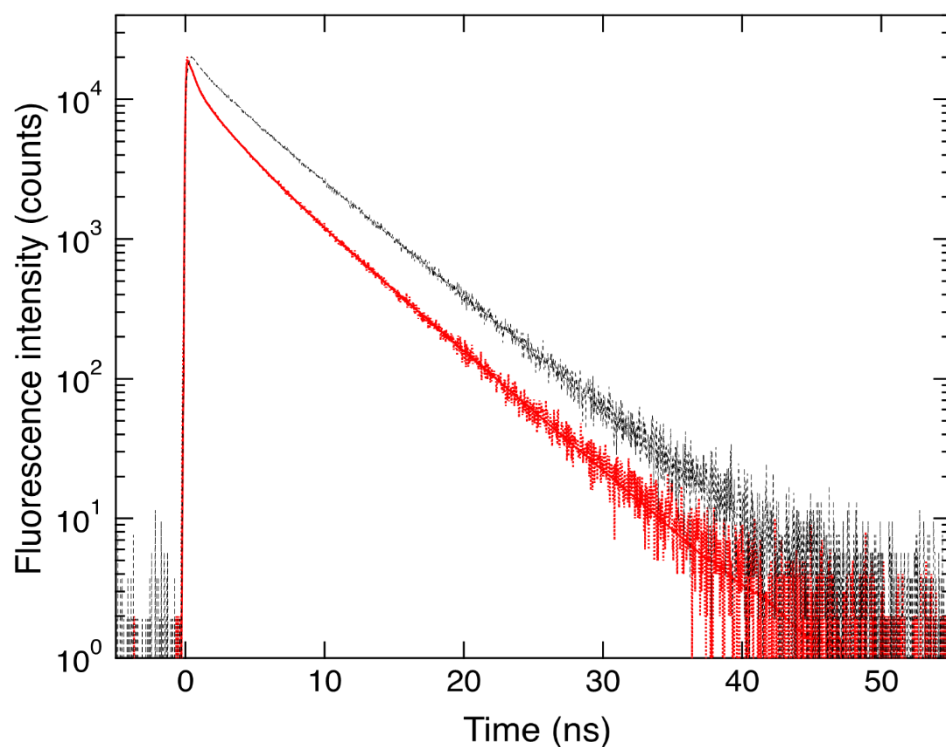


図 17. OHP1 複合体 II と LHCII の蛍光スペクトルと励起光スペクトル

カラムクロマトグラフィー法により精製した FLAG 精製液で CN-PAGE を行い、ゲルに LuminoGraph I (ATTO) の CyanoView LED illuminator を用いて 480-530 nm の blue-green light を当て、OHP1 複合体の位置を特定した。続いて、OHP1 複合体のバンドを切り出し、ガラス管に詰めて凍結させ、Spectrofluorometer (FP-8300/PMU-183; JASCO, 日本) を用いて 77 K の蛍光スペクトル (emission spectra : 440 nm (OHP1 複合体)、445 nm (LHC II)) と励起光スペクトル (emission spectra : 681 nm (OHP1 複合体)、680 nm (LHC II)) を測定した。なお、黒線は WT (Ler) の LHCII trimer、赤線は OHP1-FLAG 過剰発現株の OHP1 複合体 II を示している。



	τ_1 (ps) (A_1)	τ_2 (ns) (A_2)	τ_3 (ns) (A_3)
OHP1 complex II	420 (0.445)	2.21 (0.236)	5.06 (0.319)
LHCII	445 (0.215)	2.30 (0.170)	5.36 (0.615)

図 1 8．OHP1 複合体 II と LHCII のクロロフィル蛍光減衰曲線

図 1 7 で解析したサンプルと同じサンプルを使用し、Diode laser (PiL044X or PiL063X for 445-nm or 633-nm excitation, respectively; Advanced Laser Diode Systems GmbH、ドイツ) を用いて、OHP1 複合体は 681 nm、LHCII trimer は 680 nm の 77 K のクロロフィル蛍光減衰曲線（蛍光寿命）を測定した。上図には減衰曲線を、下図には測定の実測値（蛍光寿命： τ ）を示している。なお、黒線は WT (Ler) の LHCII trimer、赤線は OHP1-FLAG 過剰発現株の OHP1 複合体 II を示している。

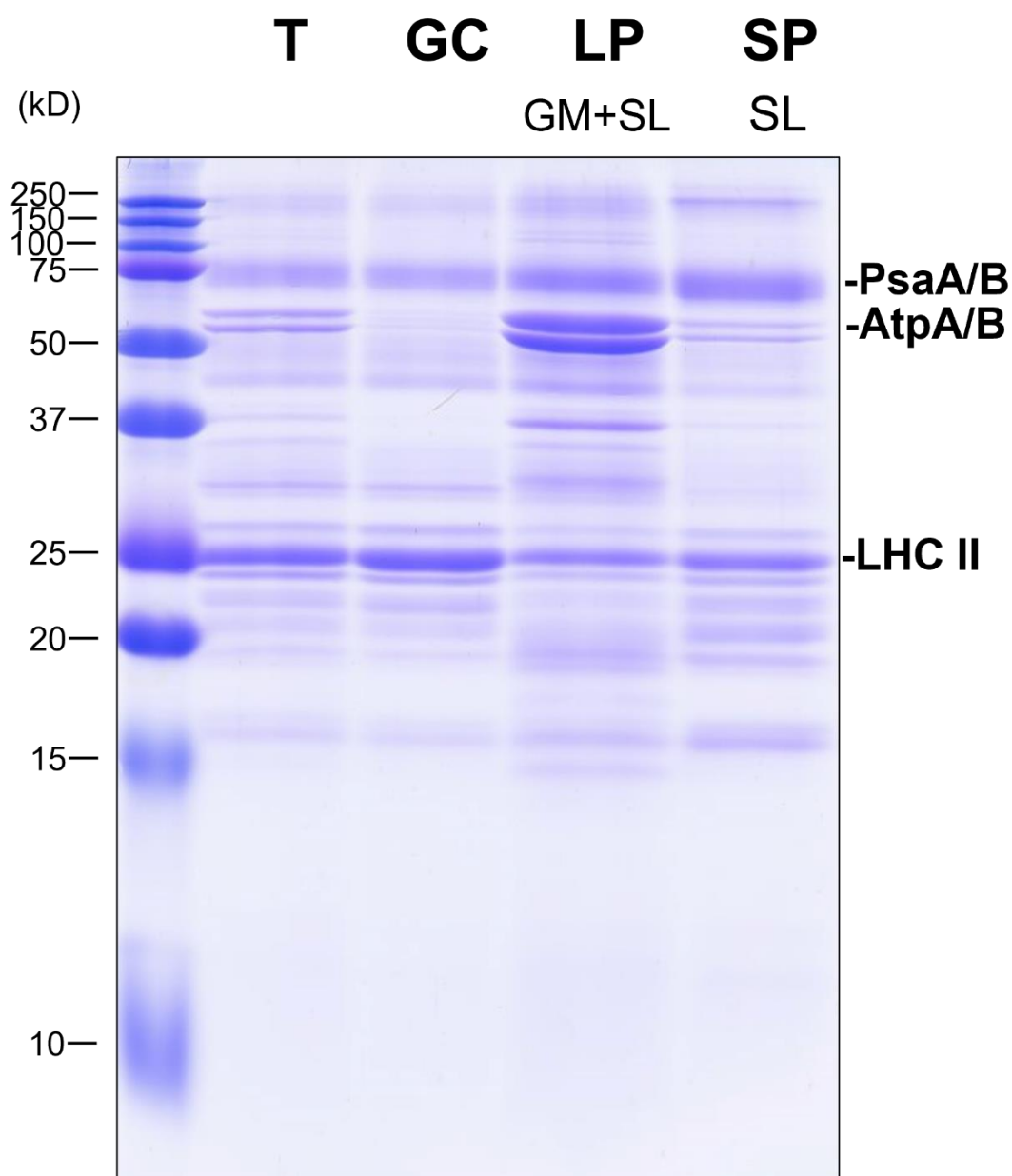


図 19. 葉緑体タンパク質のチラコイド膜上の区分

図 7 及び 3.10 項で示した界面活性剤と超遠心によって分画する方法では、チラコイド膜 (T) は 3 つの画分 (Grana core : GC、Loose pellet : LP、Solid pellet : SP) に分けられる。LP は Grana margins : GM と軽い Stroma lamellae : SL を含み、SP は重い SL を含む。上図は得られた T、GC、LP、SP の画分を SDS-PAGE にロードし、Coomassie Brilliant Blue で染色した結果である。

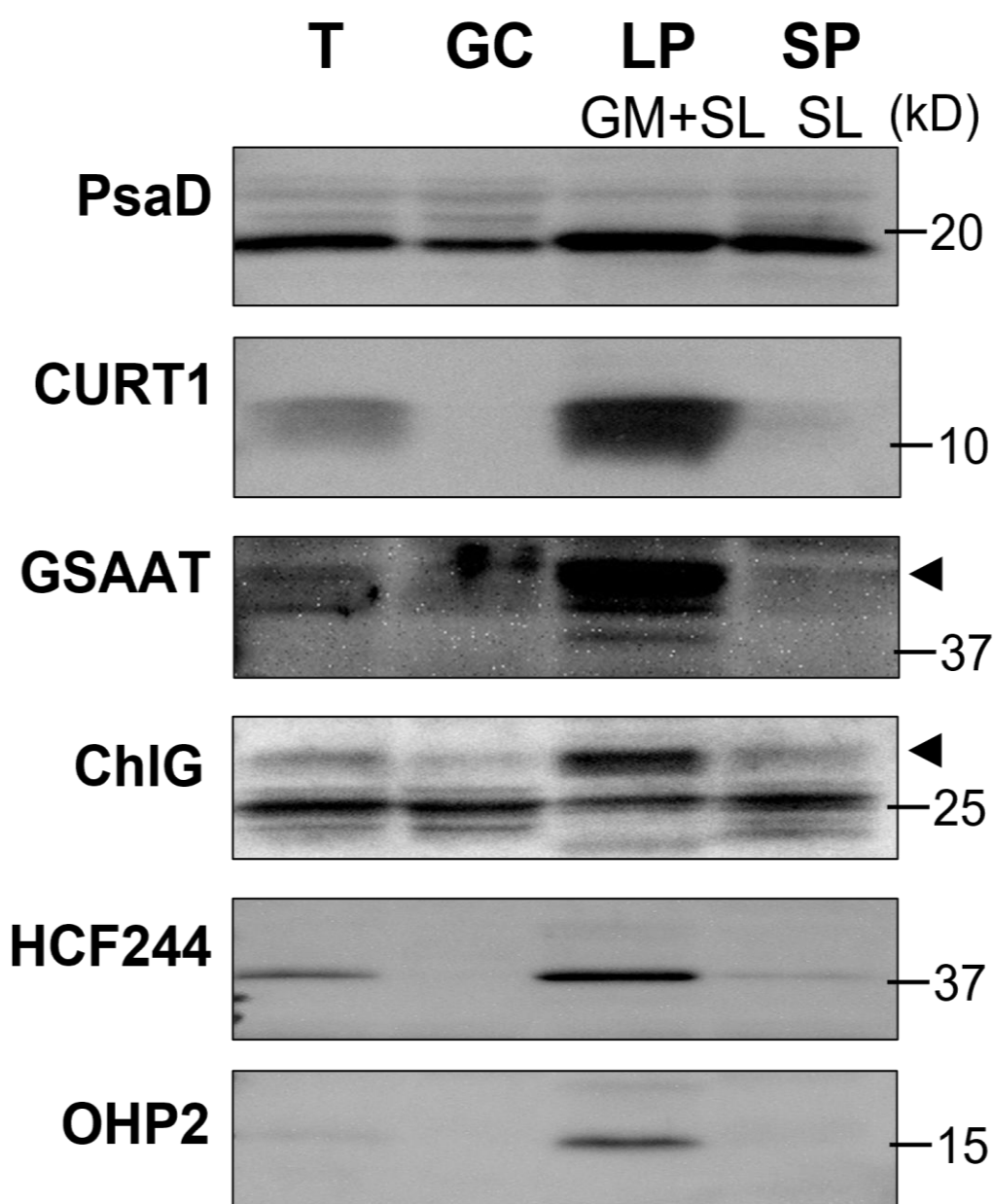


図 2 0. 補助タンパク質と Chl 合成酵素のチラコイド膜上のローカリゼーション

図 1 9 で示した SDS-PAGE のゲルを用いて immunoblotting を行った。PS I の構成サブユニットである PsaD、GM のマーカートンパクである CURT1、Chl 合成酵素であり、先行研究で GM に分画されると報告されている GSAAT、同じく Chl 合成酵素であるが、本研究で初めて局在を調べた ChlG、補助タンパク質として HCF244 と OHP2 の抗体を用いて解析を行った。GSAAT と ChlG のバンドは黒矢印で示した。なお、各抗体の希釈率は 3.7 項に示した。

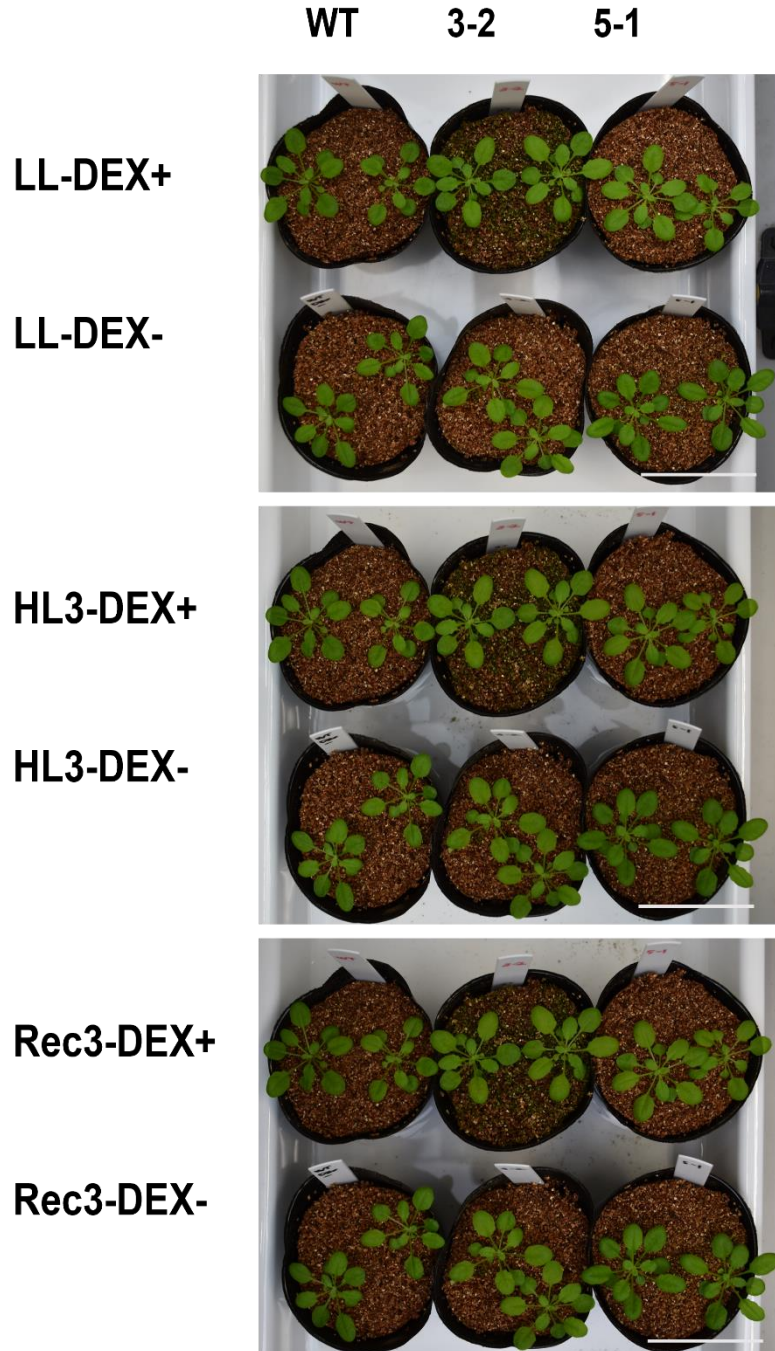


図 2 1. DEX+/-処理植物 (WT (Col)、OHP2-RNAi 株) の光変化による phenotype

WT (Col) と OHP2-RNAi 株 (3-2、5-1) を長日条件で 3 週間育成後、1 週間 Dexamethasone : DEX 処理 (10 μ M Dexamethasone、0.04% Dimethyl sulfoxide、0.015% SILWET L-77) によって RNAi 誘導を行った。DEX 処理は 1 週間に 3 回行った。ネガティブコントロールとして DEX-処理株には、(0.04% Dimethyl sulfoxide、0.015% SILWET L-77) を散布した。DEX (+/-) 処理を行った直後の植物を LL、3 時間 HL 条件に晒した植物を HL3、HL 処理の後に再び GL に 3 時間置いた植物を Rec3 とした。なお、白線は 5 cm を表している。

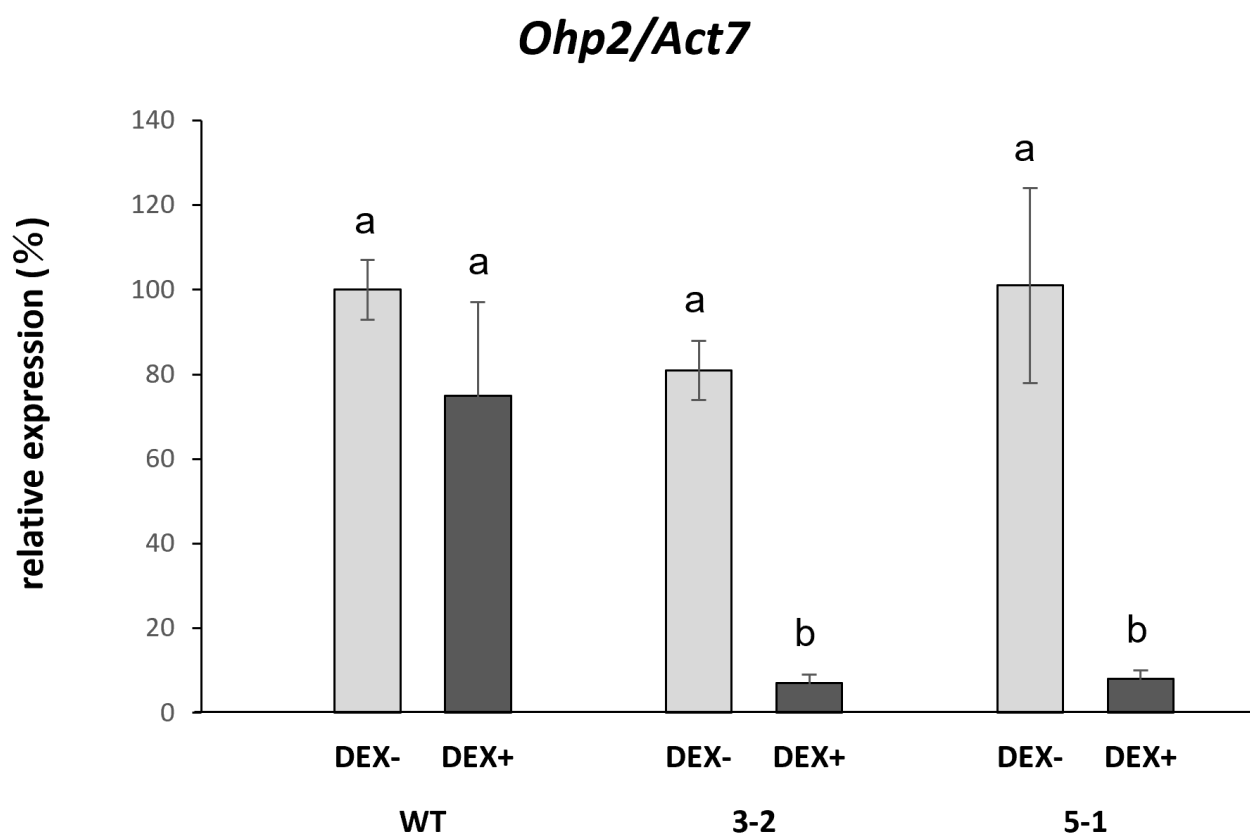


図 2 2. DEX 処理の有無による *Ohp2*mRNA レベルの比較

3.11-1 項に示した方法で DEX(+/-)処理を行った植物をサンプルとし、qRT-PCR により、*Ohp2*mRNA レベルを比較した。ハウスキーピング遺伝子として *Act7*mRNA を用い、WT の DEX-処理株を基準値とした各株の *Ohp2*mRNA レベルを示した。それぞれのバーは SD 値を示しており、有意差の検定は Tukey's multiple comparison test ($P>0.05$) で行った。

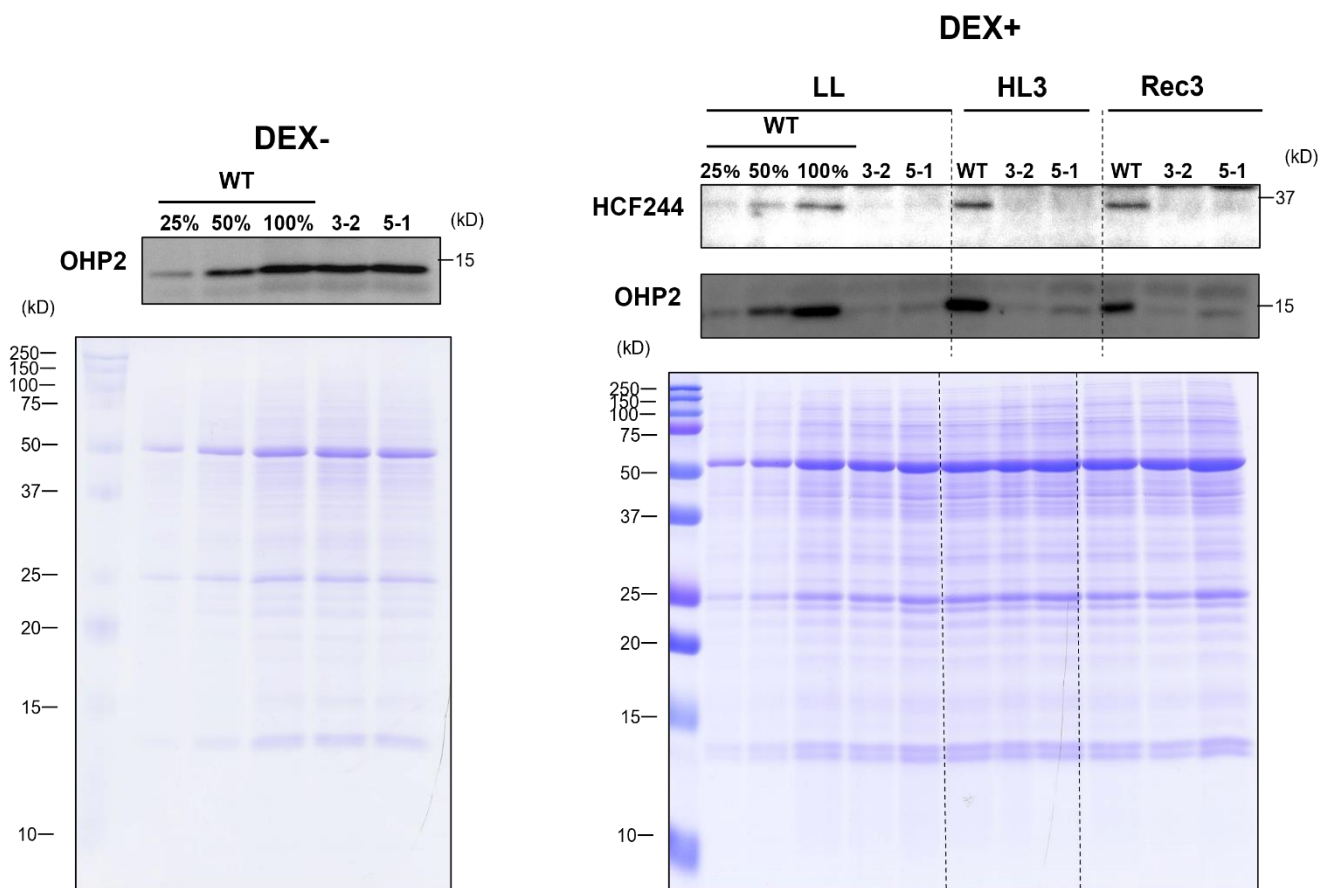


図 2 3. DEX 処理の有無による OHP2、HCF244 発現レベルの比較

3.11-1 項に示した方法で 1 週間 DEX (+/-) 処理を行った直後の植物を LL、3 時間 HL 条件に晒した植物を HL3、HL 処理の後に再び GL に 3 時間置いた植物を Rec3 とした。各植物の OHP2 と HCF244 のタンパク質発現レベルを比較するため、これらの植物をサンプルとして SDS-PAGE、immunoblotting を行った。なお、DEX-処理株に関しては mRNA レベルが WT と比較して有意差が認められなかったため、LL のみの結果を示している。抗体の希釈率は 3.7 項に示した。

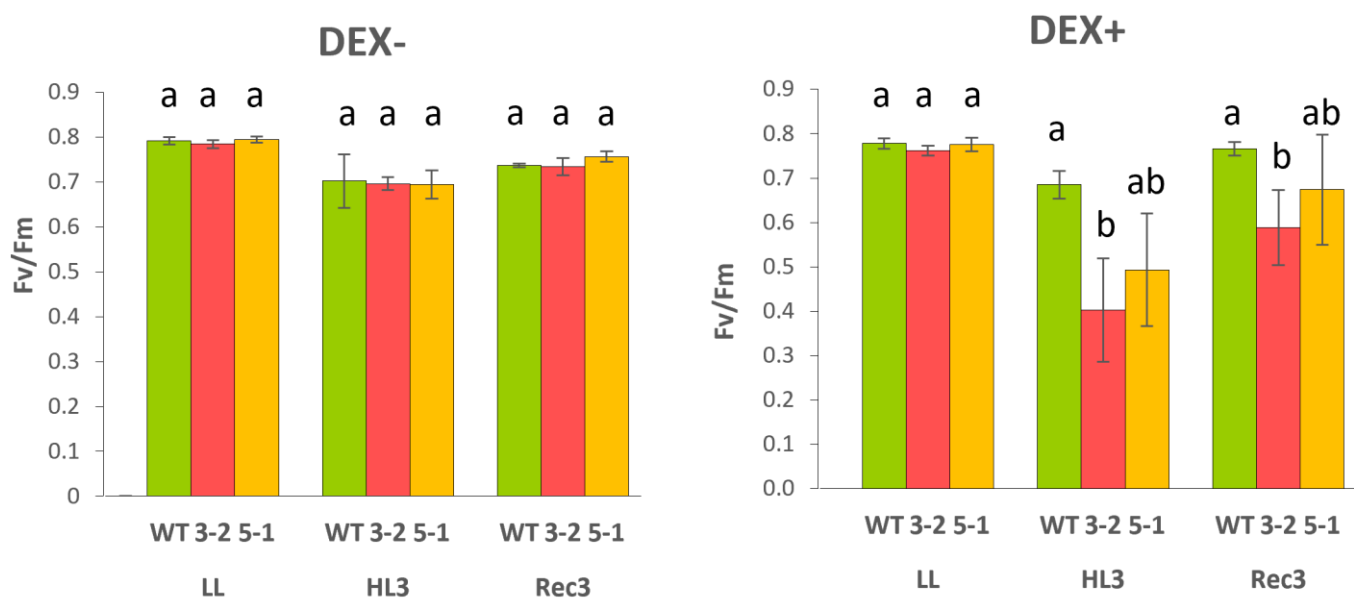


図 2 4 . DEX 処理の有無による光化学反応の最大量子収率 (F_v/F_m) の変化

OHP2 が強光ストレス下で果たす役割を調べるため、クロロフィル蛍光パラメーターとして光化学反応の最大量子収率 (F_v/F_m) を測定した。サンプルは図 2 3 で用いた葉と同じ葉を使用し、OHP2-RNAi 株 (3-2、5-1) と WT (Col) をそれぞれ 4 株ずつ、1 株につき葉を 4 枚分測定した。測定前は、生育しているポッドごとに 15 分以上暗所処理を行った。測定には PAM 2000 を用いた。それぞれのバーは、SD 値を示しており、有意差の検定は Tukey's multiple comparison test ($P>0.05$) で行った。

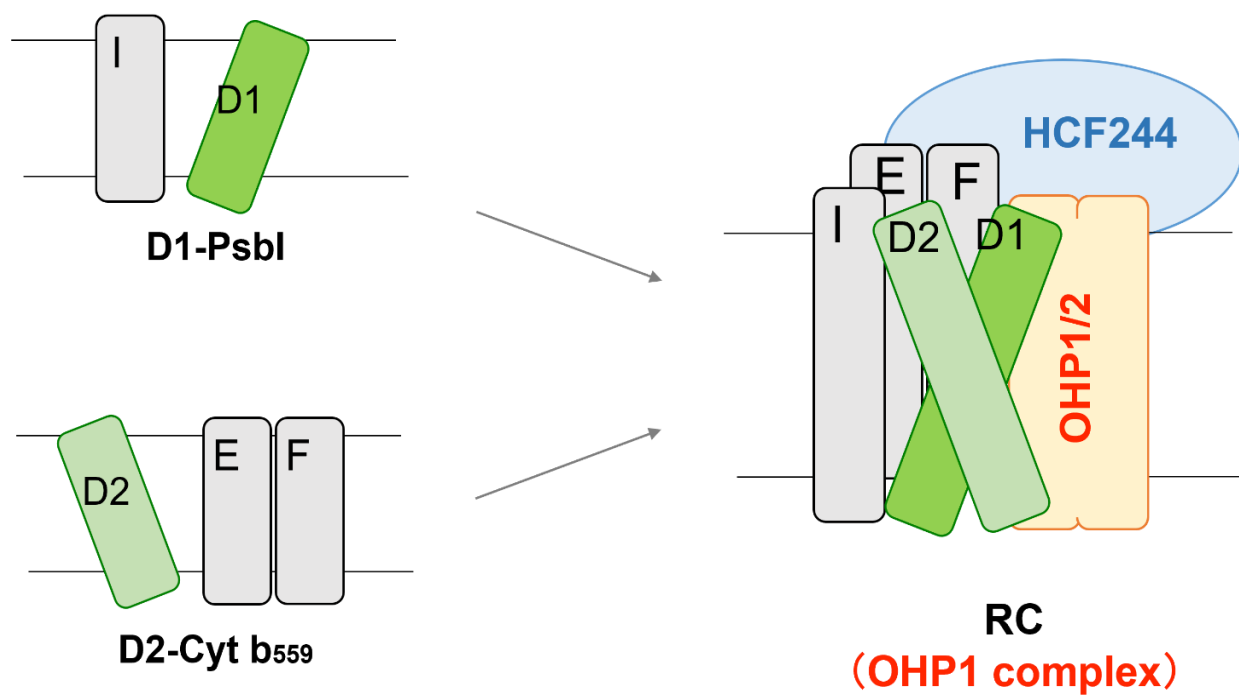


図 2 5．OHP1 複合体の模式図

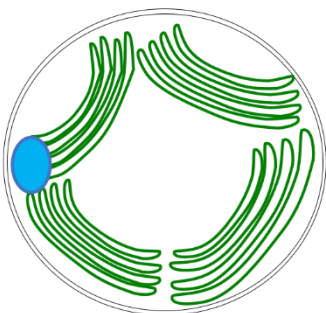
図 1 0 ～18 までの結果をもとに、陸上植物の RC 複合体に安定して結合する補助タンパク質は OHP1、OHP2、HCF244 の 3 種類であると結論付けた。なお、これらの補助タンパク質が D1-PsbI 複合体や、D2-Cyt b₅₅₉複合体とも結合するか否かは現段階では分からないため、図への記載はしていない。

	分布するPS II構築中間体	PS IIアセンブリについて推定される役割
Grana core	PS II super-complex 約45% PS II dimer 約25% PS II monomer 約25% PS II monomer (CP43-less) 約5%	・ PS II活性部位 光障害を受けたPS II は、プロテインキナーゼ Stn8にリン酸化された後、膜内を移動する。
Grana margins	PS II super-complex 約13% PS II dimer 約28% PS II monomer 約41% PS II monomer (CP43-less) 約14% PS II reaction center 約4%	・ 損傷を受けたPS II の一部のサブユニットを 分解する部位？ →D1分解酵素のFtsHが豊富に存在する ・ PS II構築にも関与？ →Chl合成酵素が局在する
Stroma lamellae	PS II dimer 約15% PS II monomer 約51% PS II monomer (CP43-less) 約28% PS II reaction center 約6%	・ PS II サブユニットの 新規合成部位 →リボソームが豊富 →PS IIアセンブリ初期の複合体が豊富 ・ 損傷を受けたPS II の一部のサブユニットを 分解する部位？ →D1分解酵素のFtsHが豊富に存在する
Y-100 (Stroma lamellaeの一部と考えられている)	PS II dimer 約11% PS II monomer 約48% PS II monomer (CP43-less) 約29% PS II reaction center 約12%	・ 詳細不明。 分解、合成の両方に関与？ →PS IIアセンブリ初期の複合体が豊富であり、かつD1分解酵素のFtsHが豊富に存在する。

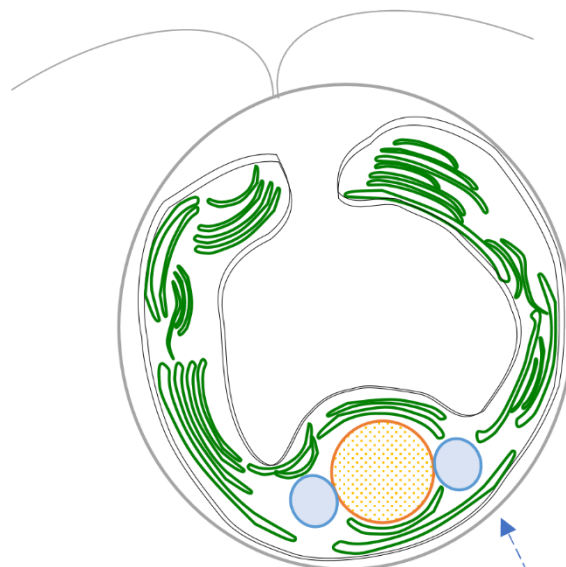
図 2 6. 陸上植物のチラコイド膜における PS II 構築のローカリゼーションの先行研究

先行研究により、チラコイド膜上の各部位が PS II 構築にどのような役割を果たすのか、いくつかの仮説があるため上図にまとめた(Danielsson et al., 2006; Suorsa et al., 2014; Puthiyaveetila et al., 2014; Wang et al., 2016; Koochak et al., 2019)。

Biogenesis
center

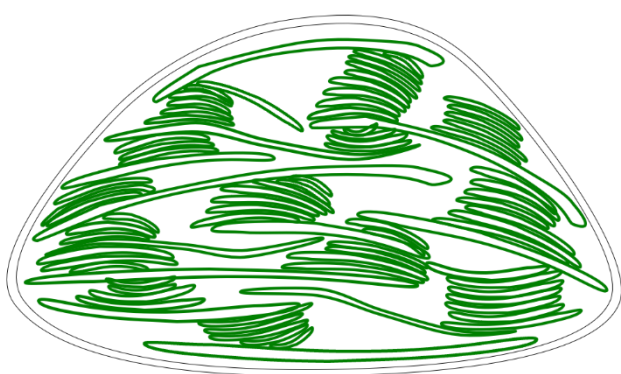


シアノバクテリア
Synechocystis 6803



T zone

緑藻
Chlamydomonas
reinhardtii



植物の葉緑体

図 2 7. シアノバクテリア、緑藻、陸上植物のチラコイド膜の模式図

シアノバクテリア (*Synechocystis* 6803)、緑藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)、陸上植物のチラコイド膜の模式図を示した。各図で、チラコイド膜は緑で表してある。シアノバクテリアと緑藻クラミドモナスにおいて、初期の PS II アセンブリが行われる場を青で示している(シアノバクテリア:biogenesis center、クラミドモナス:T zone)。また、クラミドモナスのピレノイド (CO₂固定酵素 Rubisco の集積部位) はオレンジで示した。なお、模式図は(Nickelsen and Rengstl, 2013)を参考にした。

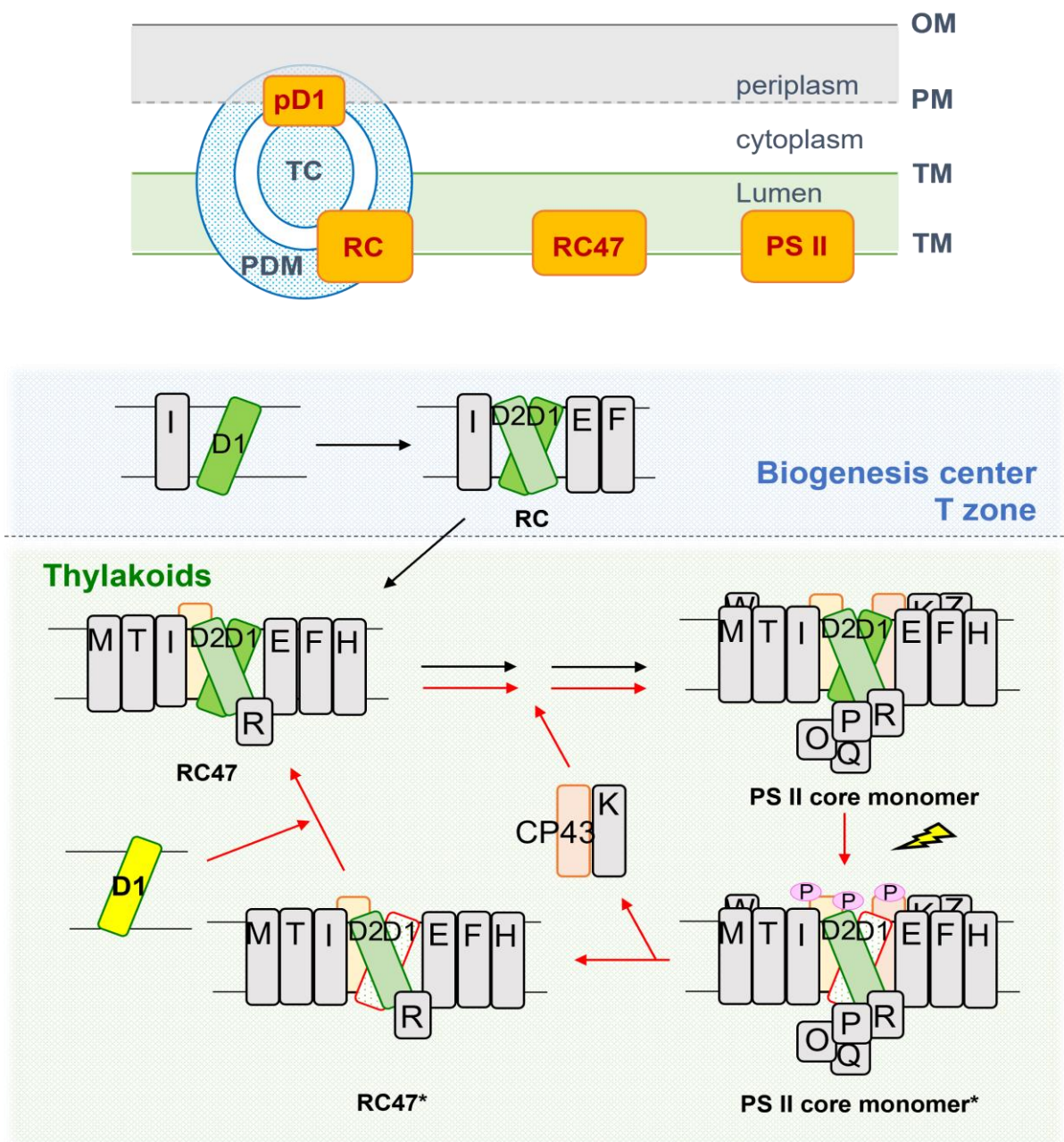


図 2 8. PS II de novo 合成/repair cycle のローカリゼーションのイメージ図

シアノバクテリアの Biogenesis center は PS II 構築の初期段階がおこなわれる場であり、図中に青で示している。Biogenesis center はチラコイド中心 (TC) と PratA-defined membrane (PDM) と呼ばれる膜から構成されており、D1 前駆体 (pD1) から RC 複合体への構築過程はこの場で行われていると考えられている。構築ステップが進むにつれ、複合体は緑で示したチラコイド膜 (TM) へ移行する。略語として、外膜 (outer membrane : OM)、内膜 (inner plasma membrane : PM) を追加する。下図は、シアノバクテリアの Biogenesis center とチラコイド膜で、構築過程のどのステップが行われているかを示した模式図である。黒矢印は de novo 合成を、赤矢印は repair cycle を示している。なお、上図は(Nickelsen and Rengstl, 2013)を参考にした。

7. 謝辞

本研究を行うにあたり、OHP1-FLAG 過剰発現株を頂きました、理化学研究所 明賀史純博士、分光解析を行って頂きました、神戸大学 秋本誠志教授、植野嘉文研究員に深く感謝申し上げます。日頃から熱心にご指導頂きました、北海道大学低温科学研究所 田中亮一教授、伊藤寿助教、高林厚史助教に深く感謝申し上げます。また、日常の雑談から研究のサポートまで幅広く支えて頂きました、北海道大学低温科学研究所 岸本純子研究補助員に深く感謝申し上げます。最後に、日頃から様々な面でお世話になりました、生物適応研究室の院生の皆様に感謝の意を表し、謝辞にかえさせていただきます。

8. 参考文献

- Adir, N., Zer, H., Shochat, S., and Ohad, I. (2003). Photoinhibition – a historical perspective *: 343–370.
- Akoyunoglou, G. and Argyroudi - Akoyunoglou, J.H. (1969). Effects of Intermittent and Continuous Light on the Chlorophyll Formation in Etiolated Plants at Various Ages. *Physiol. Plant.* **22**: 288–295.
- Albiniak, A.M., Baglieri, J., and Robinson, C. (2012). Targeting of lumenal proteins across the thylakoid membrane. *J. Exp. Bot.* **63**: 1689–1698.
- Aro, E.M., Suorsa, M., Rokka, A., Allahverdiyeva, Y., Paakkarinen, V., Saleem, A., Battchikova, N., and Rintamäki, E. (2005). Dynamics of photosystem II: A proteomic approach to thylakoid protein complexes. *J. Exp. Bot.* **56**: 347–356.
- Barber, J. and Andersson, B. (1992). Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 61–66.
- Beck, J., Lohscheider, J.N., Albert, S., Andersson, U., Mendgen, K.W., Rojas-Stütz, M.C., Adamska, I., and Funck, D. (2017). Small one-helix proteins are essential for photosynthesis in arabidopsis. *Front. Plant Sci.* **8**: 1–14.
- Bellaflöre, S., Barneche, F., Peltler, G., and Rochalx, J.D. (2005). State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature* **433**: 892–895.
- Van Bezouwen, L.S., Caffarri, S., Kale, R., Kouřil, R., Thunnissen, A.M.W.H., Oostergetel, G.T., and Boekema, E.J. (2017). Subunit and chlorophyll organization of the plant photosystem II supercomplex. *Nat. Plants* **3**: 1–11.
- Bonardi, V., Pesaresi, P., Becker, T., Schleiff, E., Wagner, R., Pfannschmidt, T., Jahns, P., and Leister, D. (2005). Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases. *Nature* **437**: 1179–1182.
- Chassin, Y., Kapri-Pardes, E., Sinvany, G., Arad, T., and Adam, Z. (2002). Expression and characterization of the thylakoid lumen protease DegP1 from Arabidopsis. *Plant Physiol.* **130**: 857–864.
- Che, Y., Fu, A., Hou, X., McDonald, K., Buchanan, B.B., Huang, W., and Luan, S. (2013). C-terminal processing of reaction center protein D1 is essential for the function and assembly of photosystem II in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 16247–16252.
- Chidgey, J.W., Linhartová, M., Komenda, J., Jackson, P.J., Dickman, M.J., Canniffe, D.P., Koník, P., Pilný, J., Hunter, C.N., and Sobotka, R. (2014). A Cyanobacterial Chlorophyll Synthase-HliD complex associates with the Ycf39 protein and the YidC/Alb3 insertase. *Plant Cell* **26**: 1267–1279.
- Chotewutmontri, P. and Barkan, A. (2020). Light-induced psbA translation in plants is triggered by photosystem II damage via an assembly-linked autoregulatory circuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**: 21775–21784.
- Chotewutmontri, P., Williams-Carrier, R., and Barkan, A. (2020). Exploring the link between photosystem ii assembly and translation of the chloroplast psbA mRNA. *Plants*.

- Cline, K. and Dabney-Smith, C. (2008). Plastid protein import and sorting: different paths to the same compartments. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 585–592.
- Croce, R. and van Amerongen, H. (2020). Light harvesting in oxygenic photosynthesis: Structural biology meets spectroscopy. *Science* (80-.). **369**.
- Danielsson, R., Suorsa, M., Paakkarinen, V., Albertsson, P.Å., Styring, S., Aro, E.M., and Mamedov, F. (2006). Dimeric and monomeric organization of photosystem II: Distribution of five distinct complexes in the different domains of the thylakoid membrane. *J. Biol. Chem.* **281**: 14241–14249.
- Daum, B., Nicastro, D., Austin, J., Richard McIntosh, J., and Kühlbrandt, W. (2010). Arrangement of photosystem II and ATP synthase in chloroplast membranes of spinach and pea. *Plant Cell* **22**: 1299–1312.
- Eichacker, L.A., Helfrich, M., Rüdiger, W., and Müller, B. (1996). Stabilization of chlorophyll a-binding apoproteins P700, CP47, CP43, D2, and D1 by chlorophyll a or Zn-pheophytin a. *J. Biol. Chem.* **271**: 32174–32179.
- Hey, D. and Grimm, B. (2020). ONE-HELIX PrOteIN1 and 2 form heterodimers to bind chlorophyll in Photosystem II Biogenesis. *Plant Physiol.* **183**: 179–193.
- Hey, D. and Grimm, B. (2018). ONE-HELIX PROTEIN2 (OHP2) is required for the stability of OHP1 and assembly factor HCF244 and is functionally linked to PSII biogenesis. *Plant Physiol.*
- Hinterstoisser, B., Cichna, M., Kuntner, O., and Peschek, G.A. (1993). Cooperation of plasma and thylakoid membranes for the biosynthesis of chlorophyll in cyanobacteria: the role of the thylakoid centers. *J. Plant Physiol.* **142**: 407–413.
- Ivleva, N.B., Shestakov, S. V., and Pakrasi, H.B. (2000). The carboxyl-terminal extension of the precursor D1 protein of photosystem II is required for optimal photosynthetic performance of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* **124**: 1403–1411.
- Jagendorf, A.T. and Michaels, A. (1990). Rough thylakoids: translation on photosynthetic membranes. *Plant Sci.* **71**: 137–145.
- Järvi, S., Suorsa, M., and Aro, E.M. (2015). Photosystem II repair in plant chloroplasts - Regulation, assisting proteins and shared components with photosystem II biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1847**: 900–909.
- Kapri-Pardes, E., Naveh, L., and Adam, Z. (2007). The thylakoid lumen protease Deg1 is involved in the repair of photosystem II from photoinhibition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 1039–1047.
- Keren, N., Liberton, M., and Pakrasi, H.B. (2005). Photochemical competence of assembled photosystem II core complex in cyanobacterial plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **280**: 6548–6553.
- Kim, J., Klein, P.G., and Mullet, J.E. (1991). Ribosomes pause at specific sites during synthesis of membrane-bound chloroplast reaction center protein D1. *J. Biol. Chem.* **266**: 14931–14938.
- Kiss, É., Knoppová, J., Aznar, G.P., Pilný, J., Yu, J., Halada, P., Nixon, P.J., Sobotka, R., and Komenda, J. (2019). A photosynthesis-specific rubredoxin-like protein is required for efficient association of the D1 and D2 proteins during the initial steps of photosystem II assembly. *Plant Cell* **31**: 2241–2258.
- Knoppová, J., Sobotka, R., Tichý, M., Yu, J., Konik, P., Halada, P., Nixon, P.J., and Komenda, J. (2014).

Discovery of a chlorophyll binding protein complex involved in the early steps of Photosystem II assembly in *Synechocystis*. *Plant Cell* **26**: 1200–1212.

- Komenda, J., Nickelsen, J., Tichý, M., Prášil, O., Eichacker, L.A., and Nixon, P.J. (2008). The cyanobacterial homologue of HCF136/YCF48 is a component of an early photosystem II assembly complex and is important for both the efficient assembly and repair of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **283**: 22390–22399.
- Koochak, H., Puthiyaveetil, S., Mullendore, D.L., Li, M., and Kirchhoff, H. (2019). The structural and functional domains of plant thylakoid membranes. *Plant J.* **97**: 412–429.
- Króliczewski, J., Piskozub, M., Bartoszewski, R., and Króliczewska, B. (2016). ALB3 Insertase Mediates Cytochrome b 6 Co-translational Import into the Thylakoid Membrane. *Sci. Rep.* **6**: 1–14.
- Li, Y., Liu, B., Zhang, J., Kong, F., Zhang, L., Meng, H., Li, W., Rochaix, J.D., Li, D., and Peng, L. (2019). OHP1, OHP2, and HCF244 form a transient functional complex with the photosystem II reaction center. *Plant Physiol.* **179**: 195–208.
- Liang, Z., Zhu, N., Mai, K.K., Liu, Z.Y., Tzeng, D., Osteryoung, K.W., Zhong, S., Staehelin, L.A., and Kang, B.H. (2018). Thylakoid-bound polysomes and a dynamin-related protein, FZL, mediate critical stages of the linear chloroplast biogenesis program in greening arabidopsis cotyledons. *Plant Cell* **30**: 1476–1495.
- Link, S., Engelmann, K., Meierhoff, K., and Westhoff, P. (2012). The atypical short-chain dehydrogenases HCF173 and HCF244 are jointly involved in translational initiation of the *psbA* mRNA of arabidopsis. *Plant Physiol.* **160**: 2202–2218.
- Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X., and Chang, W. (2004). Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* **428**: 287–292.
- Lu, Y. (2016). Identification and roles of photosystem II assembly, stability, and repair factors in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* **7**.
- Mattoo, A.K., Hoffman-Falk, H., Marder, J.B., and Edelman, M. (1984). Regulation of protein metabolism: coupling of photosynthetic electron transport to in vivo degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes. *Isotopenpraxis* **20**: 1380–1384.
- Meurer, J., Plücken, H., Kowallik, K. V., and Westhoff, P. (1998). A nuclear-encoded protein of prokaryotic origin is essential for the stability of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* **17**: 5286–5297.
- Mimuro, M., Yamazaki, I., Itoh, S., Tamai, N., and Satoh, K. (1988). Dynamic fluorescence properties of D1-D2-cytochrome b-559 complex isolated from spinach chloroplasts: analysis by means of the time-resolved fluorescence spectra in picosecond time range.
- Murata, N., Allakhverdiev, S.I., and Nishiyama, Y. (2012). The mechanism of photoinhibition in vivo: Re-evaluation of the roles of catalase, α -tocopherol, non-photochemical quenching, and electron transport. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1817**: 1127–1133.
- Myouga, F., Takahashi, K., Tanaka, R., Nagata, N., Kiss, A.Z., Funk, C., Nomura, Y., Nakagami, H., Jansson, S., and Shinozaki, K. (2018). Stable accumulation of photosystem II requires ONE-HELIX PROTEIN1 (OHP1) of the light harvesting-like family. *Plant Physiol.* **176**: 2277–2291.
- Nath, K. et al. (2013). Loss-of-function of OsSTN8 suppresses the photosystem II core protein

- phosphorylation and interferes with the photosystem II repair mechanism in rice (*Oryza sativa*). *Plant J.* **76**: 675–686.
- Nickelsen, J. and Rengstl, B. (2013). Photosystem II assembly: From cyanobacteria to plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**: 609–635.
- Niedzwiedzki, D.M., Tronina, T., Liu, H., Staleva, H., Komenda, J., Sobotka, R., Blankenship, R.E., and Polívka, T. (2016). Carotenoid-induced non-photochemical quenching in the cyanobacterial chlorophyll synthase-HliC/D complex. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1857**: 1430–1439.
- Nixon, P.J., Michoux, F., Yu, J., Boehm, M., and Komenda, J. (2010). Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. *Ann. Bot.* **106**: 1–16.
- Pagliano, C., Saracco, G., and Barber, J. (2013). Structural, functional and auxiliary proteins of photosystem II. *Photosynth. Res.* **116**: 167–188.
- Puthiyaveetila, S., Tsabarib, O., Lowryc, T., Lenhertc, S., Lewisd, R.R., Reichb, Z., and Kirchhoffa, H. (2014). Compartmentalization of the protein repair machinery in photosynthetic membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 15839–15844.
- Rengstl, B., Oster, U., Stengel, A., and Nickelsen, J. (2011). An intermediate membrane subfraction in cyanobacteria is involved in an assembly network for photosystem II biogenesis. *J. Biol. Chem.* **286**: 21944–21951.
- Roelofs, T.A., Gilbert, M., Shuvalov, V.A., and Holzwarth, A.R. (1991). Picosecond fluorescence kinetics of the D1-D2-cyt-b-559 photosystem II reaction center complex. Energy transfer and primary charge separation processes. *BBA - Bioenerg.* **1060**: 237–244.
- Rokka, A., Suorsa, M., Saleem, A., Battchikova, N., and Aro, E.M. (2005). Synthesis and assembly of thylakoid protein complexes: Multiple assembly steps of photosystem II. *Biochem. J.* **388**: 159–166.
- Rühle, T. and Leister, D. (2016). Photosystem II assembly from scratch. *Front. Plant Sci.* **6**: 1–5.
- Sakamoto, W., Tamura, T., Hanba-Tomita, Y., Sodmergen, and Murata, M. (2002). The VAR1 locus of *Arabidopsis* encodes a chloroplastic FtsH and is responsible for leaf variegation in the mutant alleles. *Genes to Cells* **7**: 769–780.
- Samol, I., Shapiguzov, A., Ingelsson, B., Fucile, G., Crèvecoeur, M., Vener, A. V., Rochaix, J.D., and Goldschmidt-Clermont, M. (2012). Identification of a photosystem II phosphatase involved in light acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 2596–2609.
- Schottkowski, M., Ratke, J., Oster, U., Nowaczyk, M., and Nickelsen, J. (2009). Pitt, a novel tetratricopeptide repeat protein involved in light-dependent chlorophyll biosynthesis and thylakoid membrane biogenesis in *synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Plant* **2**: 1289–1297.
- Schuhmann, H. and Adamska, I. (2012). Deg proteases and their role in protein quality control and processing in different subcellular compartments of the plant cell. *Physiol. Plant.* **145**: 224–234.
- Schult, K., Meierhoff, K., Paradies, S., Töller, T., Wolff, P., and Westhoff, P. (2007). The nuclear-encoded factor HCF173 is involved in the initiation of translation of the *psbA* mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**: 1329–1346.
- Staleva, H., Komenda, J., Shukla, M.K., Šlouf, V., Kanâ, R., Polívka, T., and Sobotka, R. (2015). Mechanism of

- photoprotection in the cyanobacterial ancestor of plant antenna proteins. *Nat. Chem. Biol.* **11**: 287–291.
- Su, X., Wei, X., Zhu, D., Chang, W., and Liu, Z. (2017). Structure and assembly mechanism. **820**: 815–820.
- Suga, M., Akita, F., Hirata, K., Ueno, G., Murakami, H., Nakajima, Y., Shimizu, T., Yamashita, K., Yamamoto, M., Ago, H., and Shen, J.R. (2015). Native structure of photosystem II at 1.95Å^o resolution viewed by femtosecond X-ray pulses. *Nature* **517**: 99–103.
- Sun, X., Ouyang, M., Guo, J., Ma, J., Lu, C., Adam, Z., and Zhang, L. (2010). The thylakoid protease Deg1 is involved in photosystem-II assembly in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **62**: 240–249.
- Sun, Y., Valente-Paterno, M., Bakhtiari, S., Law, C., Zhan, Y., and Zerges, W. (2019). Photosystem biogenesis is localized to the translation zone in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **31**: 3057–3072.
- Sundby, C., McCaffery, S., and Anderson, J.M. (1993). Turnover of the photosystem II D1 protein in higher plants under photoinhibitory and nonphotoinhibitory irradiance. *J. Biol. Chem.* **268**: 25476–25482.
- Suorsa, M., Rantala, M., Danielsson, R., Järvi, S., Paakkari, V., Schröder, W.P., Styring, S., Mamedov, F., and Aro, E.M. (2014). Dark-adapted spinach thylakoid protein heterogeneity offers insights into the photosystem II repair cycle. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1837**: 1463–1471.
- Tikkanen, M. and Aro, E.M. (2012). Thylakoid protein phosphorylation in dynamic regulation of photosystem II in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1817**: 232–238.
- Tikkanen, M., Nurmi, M., Kangasjärvi, S., and Aro, E.M. (2008). Core protein phosphorylation facilitates the repair of photodamaged photosystem II at high light. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1777**: 1432–1437.
- Walter, B., Hristou, A., Nowaczyk, M.M., and Schünemann, D. (2015). In vitro reconstitution of co-translational D1 insertion reveals a role of the cpSec-Alb3 translocase and Vipp1 in Photosystem II biogenesis. *Biochem. J.* **468**: 315–324.
- Wang, L., Kim, C., Xu, X., Piskurewicz, U., Dogra, V., Singh, S., Mahler, H., and Apel, K. (2016). Singlet oxygen- and EXECUTER1-mediated signaling is initiated in grana margins and depends on the protease FtsH2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**: E3792–E3800.
- Yamamoto, Y., Inagaki, N., and Satoh, K. (2001). Overexpression and characterization of carboxyl-terminal processing protease for precursor D1 protein. Regulation of enzyme-substrate interaction by molecular environments. *J. Biol. Chem.* **276**: 7518–7525.
- Yu, F., Park, S., and Rodermel, S.R. (2004). The *Arabidopsis* FtsH metalloprotease gene family: Interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes. *Plant J.* **37**: 864–876.
- Yu, J., Knoppová, J., Michoux, F., Bialek, W., Cota, E., Shukla, M.K., Strašková, A., Pascual Aznar, G., Sobotka, R., Komenda, J., Murray, J.W., and Nixon, P.J. (2018). Ycf48 involved in the biogenesis of the oxygen-evolving photosystem II complex is a seven-bladed beta-propeller protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**: E7824–E7833.
- Zak, E., Norling, B., Maitra, R., Huang, F., Andersson, B., and Pakrasi, H.B. (2001). The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 13443–13448.
- Zaltsman, A., Ori, N., and Adam, Z. (2005). Two types of FtsH protease subunits are required for chloroplast

biogenesis and photosystem II repair in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**: 2782–2790.

Zhang, L., Paakkari, V., Van Wijk, K.J., and Aro, E.M. (1999). Co-translational assembly of the D1 protein into photosystem II. *J. Biol. Chem.* **274**: 16062–16067.

Zoschke, R. and Barkan, A. (2015). Genome-wide analysis of thylakoid-bound ribosomes in maize reveals principles of cotranslational targeting to the thylakoid membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: E1678–E1687.