

Functional analysis of  
light harvesting complexes of diatom

「珪藻の光捕集系の機能解析」

2015年3月

SD13L001 石原 知子

兵庫県立大学大学院生命理学研究科

生命科学専攻

細胞機能解析部門 細胞構造学分野

## 目 次

略語	…3
概要	…4
第1章 序論 珪藻の光合成の特色	…5
第2章 材料と方法	…8
1-1 珪藻の培養	
1-2 チラコイド膜タンパク質複合体の精製	
1-3 タンパク質解析	
1-4 等電点電気泳動による解析	
1-5 分光学的解析	
第3章 結果	…15
3-1 FCP 複合体の精製	
3.1.1. BN-PAGE による膜タンパク質複合体の分離	
3.1.2. ショ糖密度勾配遠心法による膜タンパク質複合体の分画	
3-2 FCP の複合体を構成するタンパク質の同定	
3-3 等電点電気泳動法	
3-4 FCP の複合体の機能解析	
第4章 考察	…40
<引用文献>	…47
<参考文献>	…54
<謝辞>	…55

## 略語

BN-PAGE	blue native polyacrylamide gel electrophoresis
Cyt <i>b<sub>6</sub>/f</i>	cytochrome <i>b<sub>6</sub>/f</i> complex
Chl	葉緑素 (chlorophyll)
DDM	<i>n</i> -dodecyl-β-D-maltopyranoside
FCP	fucoxanthin-chlorophyll <i>a/c</i> binding protein
HPLC	high performance liquid chromatography
LHC	light harvesting chlorophyll <i>a/b</i> binding protein complex
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectroscopy
MES	2-morpholinoethanesulfonic acid
NPQ	non-photochemical quenching
PSI, PSII	光化学系 I、光化学系 II (photosystem I, photosystem II)
PVDF	polyvinylidene difluoride
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

## 概要

海洋性中心目珪藻 *Chaetoceros gracilis* の fucoxanthin chlorophyll *a/c* binding protein (FCP) 複合体をショ糖密度勾配遠心法によって精製した。動的光散乱測定の結果、得られた FCP 複合体には単一種の粒子のみが含まれていたため、純度の高い複合体であることが示された。変性条件下での電気泳動により、その FCP 複合体からはほぼ同量含まれる 2 つのポリペプチドバンドおよびそれよりも顕著に少ない 1 つのポリペプチドバンドが分離された。いずれの N 末端もブロックされてアミノ酸配列を得ることができなかったため、各バンドからポリペプチドを抽出した後、リシルエンドペプチダーゼによって限定分解し、内部アミノ酸配列解析を行った。加えて、独自に考案した膜タンパク質をも分離可能な等電点二次元電気泳動を用い、各ポリペプチドの泳動度と pI の差を明らかにした。このようにして、FCP 複合体を構成する主要タンパク質の 2 つを同定した。これらは、ゲノム解析済みの他種珪藻で Fcp3 および Fcp4 と名付けられたタンパク質と相同のものであった。

この精製 FCP 複合体を用いて機能の解析を行った。光吸収スペクトル測定および色素分析により、FCP 複合体に多量の chlorophyll *c* と fucoxanthin が結合している一方で、強光保護機構に関わっているとされている色素 diadinoxanthin は少量であることが示された。さらに、77K での蛍光スペクトルの解析により、FCP 複合体によって吸収された光エネルギーは、光化学反応中心複合体に伝達されることが示された。したがって、細胞内 chlorophyll *a* の約 60% を結合した FCP 複合体の主な機能は、光捕集機能であるといえる。

従来、珪藻の FCP 複合体は多種の FCP タンパク質により構成されており、構成サブユニットの異なる複合体が存在するとされていたが、本論文では、複合体としては単一であり、それを構成する主要タンパク質が 2 種類であることを示した。この研究の過程では、膜タンパク質の等電点電気泳動を可能にする系の考案を行い、活用した。そして、FCP 複合体の機能について、先行論文で述べられているような強光保護機能ではなく、もっぱら光捕集アンテナとして働くことを示した。したがって、FCP 複合体は、珪藻が弱光下で効率的な光合成を行う上で、非常に重要な存在であると言える。



## 第1章 序論

地球上には多種多様な藻類が生息している。これら藻類は、様々な生育環境に順応・適応して活発に光合成を行っている。珪藻は、淡水、海水どちらにも広く分布し、生息している温度環境も南極や北極といった低温域 (Horner 1976) から温泉のような高温域 (長島 2010) までと広い。珪藻は10万種あるといわれており (Sims et al. 2006)、地球上でもっとも繁栄している藻類である。珪藻は海洋の一次生産の40%、地球全体では20~25%を担っていると言われている (Nelson et al. 1995; Field et al. 1998)。珪藻が活発な光合成をすることが可能な理由のひとつが、珪藻特有の光捕集システムにあると考えられる。珪藻のチラコイド膜に存在する光捕集色素タンパク質は chlorophyll (Chl) *c* や fucoxanthin を結合しており (fucoxanthin-chlorophyll *a/c* binding protein; FCP) (Green 2003)、FCP に結合した fucoxanthin は 500~550 nm の光を吸収する。海洋では、珪藻は表層から有光層下部までと広く分布し、光環境への馴化を行いつつ光合成を行っているが、水中では深部ほど赤色光が減っていくので (Kirk 1994)、chlorophyll の長波長吸収帯 ( $Q_Y$  バンド) による光吸収効率が低くなる。一方、青緑色の光が残るので、珪藻が光合成を行う上で多数の fucoxanthin が結合したアンテナタンパク質を持つ意義は大きい。また、過剰な光エネルギーから光化学系を守る diadinoxanthin cycle 色素 (diadinoxanthin と diatoxanthin) (Olaizola et al. 1994) も FCP に結合していると考えられている。

近年、中心目珪藻 *Thalassiosira pseudonana* と羽状目珪藻 *Phaeodactylum tricorutum* のゲノムが解析され (Armbrust et al. 2004、Bowler et al. 2008)、どちらの珪藻も少なくとも30種のFCP 遺伝子を保持していることが示されている。これらの FCP 遺伝子の翻訳産物 (タンパク質) は、その配列を基に大きく3種類 (Lhcf、Lhcr、Lhcx) に分類されている。Lhcf は主要な古典的光捕集タンパク質、Lhcr は紅藻の光化学系 I (系 I) に結合して機能している LHCI に相同のタンパク質、Lhcx は緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* や *T. pseudonana* の LI818 (LhcSR) タンパク質 (Savard 1996; Richard 2000; Zhu and Green 2010) に相同性があり、非光化学消光 (non-photochemical quenching (NPQ)) に関わるものであ

る (Bailleul et al. 2010)。 *P. tricornutum* においていずれの FCP 遺伝子も発現していることが確認されているが (Scala et al. 2002)、30 種以上存在するそれぞれの遺伝子産物の機能の相違については、十分な解明は進められていない。

緑色植物の葉緑体チラコイド膜では、光を効率的に捕集するためのアンテナタンパク質、光捕集クロロフィル *a/b* 結合タンパク質複合体 (light harvesting chlorophyll *a/b* binding protein; LHC) が光化学系に結合して働いていることが知られている。珪藻の光捕集色素タンパク質 FCP も、LHC と同様に、光化学系に結合して働いていると考えられている。FCP のアポタンパク質は LHC アポタンパク質のホモログで、共通の一次構造が見られる。しかし LHC と異なり、FCP には Chl *b* の代わりに Chl *c* が結合し、lutein の代わりに fucoxanthin が結合している。また、chlorophyll と carotenoid の比が光化学系 II (系 II) の LHC、つまり LHClI ではおよそ 4:1 (Chl *a* および Chl *b* : carotenoids = 13-15 : 3-4) (Liu et al. 2004) であるが、FCP ではおよそ 1:1 (Ikeda et al. 2008) と、大きな差がある。そして、珪藻のチラコイド膜には多量の FCP が存在し、全 chlorophyll の 70% 以上が FCP に結合している (Fujita and Ohki 2004)。アンテナタンパク質が多いことは弱光環境において光合成を行うときに大変効果的である。しかし強光環境での過剰な光エネルギーは、光化学系に障害を与える (Demig-Adams 1990)。強光環境で培養された珪藻では、強光保護のための NPQ 機構に関わると考えられる diadinoxanthin サイクル色素が増加する (Arsalane et al. 1994; Ban et al. 2006; Ikeya et al. 2000; Kashino and Kudoh 2003; Lohr and Wilhelm 1999; Olaizola et al. 1994; Olaizola and Yamamoto 1994)。diadinoxanthin cycle は、xanthophyll cycle (Demig-Adams 1990) の一種であり、その活性は珪藻の種や生育光環境に依存する。例えば、海洋性中心目珪藻 *C. gracilis* では、強光で生育しても NPQ レベルは低いままであるが、海洋性羽状目珪藻 *P. tricornutum* では生育光強度が高くなるにつれて diadinoxanthin cycle 色素の蓄積量が増加するとともに NPQ も増加する (Ban et al. 2006)。一方、弱光で培養した *C. gracilis* の FCP 画分 (FCP-B/C) の過剰エネルギー消光が顕著であるとの対照的報告が見られる (Nagao et al. 2013b)。しかしながら、特定の種類の FCP が常に消光に関わっているというよ

り、FCP の構造変化や会合状態の変化が NPQ を担っている、という見方が出てきている (Büchel 2014)。したがって、自然界における光環境下での珪藻の適応・馴化の戦略を十分に理解するためには、FCP 複合体の詳細な生化学的解析が重要である。

珪藻の光合成系の生化学的研究は、長い間、珪藻の細胞を取り囲む堅いシリカの殻に阻まれてきた。中心目珪藻 *C. gracilis* から凍結・融解という簡便な方法で健全なチラコイド膜が所属研究室で開発されて発表されたのは、ようやく 2005 年のことである (Ikeda et al. 2005)。この手法により、光化学系 I (Ikeda et al. 2005; Ikeda et al. 2008)、光化学系 II (Nagao et al. 2007; Nagao et al. 2010) 複合体が単離された。そして、それら複合体は、他のどの珪藻よりも詳細に生化学的・分光学的解析が実施された。一方、淡水産中心目珪藻 *Cyclotella meneghiniana* の FCP 複合体について詳細な解析がなされているが (Büchel 2003)、*C. gracilis* の光捕集系については解析が不十分である。珪藻の種類により FCP の性質が大きく異なるため (Nagao et al. 2013a)、光化学系複合体についての詳細な生化学的・分光学的解析が進められてきた *C. gracilis* の FCP についての同様の詳細な解析が希求される。

本研究では、30 種類程度存在する FCP タンパク質のそれぞれの機能を特定することを目指す一環として、海洋性中心目珪藻 *C. gracilis* の細胞内に多量に存在する FCP 複合体の構成タンパク質の特定とその機能の解明を目指した。*C. gracilis* からショ糖密度勾配遠心法によって精製した FCP 複合体のタンパク質組成を解析することにより、Lhcf3 および Lhcf4 相同タンパク質が構成成分として同定された。また、蛍光発光スペクトルの解析により、この FCP 複合体は光エネルギーの捕集と伝達のために働いていることが示された。この結果から、珪藻のチラコイド膜に多量に含まれる FCP 複合体が、高等植物の LHClI 三量体と同様に光化学反応中心複合体に直接には結合しておらず、生育光強度に応じて間接的に結合する光化学反応中心を変えることにより、2つの光化学系の励起バランスの調節に関わっているというモデルを、提案するものである。



## 第2章 材料と方法

### 1-1 珪藻の培養

海洋性中心目珪藻 *C. gracilis* (UTEX LB 2658) を昼白色の蛍光灯を光源とした連続光下でダイゴIMK培地 (Nihon Pharmaceutical, Osaka, Japan) と 0.2 mM  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  を加えた人工海水 (Marine Art SF-1; Tomita Pharmaceutical, Tokushima, Japan) 中で、空気を通気し、20°Cで8 L(x 4本)の培養を行った (Ikeda et al. 2008)。2週間の培養後、Pellicon2 (Merck Millipore, Billerica, MA USA) を用いて細胞を濃縮した後、5,000 x g、15分、4°Cで遠心を行って細胞を集め、溶液A [1 M betaine, 5% (w/v) glycerol, 50 mM 2-*N*-morpholinoethanesulfonic acid-NaOH (pH 6.5), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , and 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ] で一度洗い、沈澱を同じ溶液Aに懸濁し、使用するまで凍結保存した。

### 1-2 チラコイド膜に含まれるタンパク質複合体の精製

*C. gracilis* のチラコイド膜は凍結破碎法で調製した (Ikeda et al. 2005; Ikeda et al. 2008)。簡潔には、凍結保存した細胞を解凍することにより細胞を破壊し、溶液Aで希釈し、4°C、5,000 x g、10分の遠心をした。得られた沈殿を溶液Aに懸濁して、チラコイド膜標品とした。そのチラコイド膜を1.0 mg Chl *a*/mLに調整し、2.0% (w/v) *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DDM) (Anatrace, Maumee, OH USA) で20分、4°C、暗所において可溶化処理し、4°C、5,000 x g、15分の遠心を行い、上清として可溶化チラコイド膜標品を得た。0.04% DDMと1.0-1.5 Mの連続的なショ糖濃度勾配を含む溶液Aの上に可溶化チラコイド膜標品を載せ、4°C、300,000 x g、16時間のショ糖密度勾配遠心を行い、タンパク質複合体を分離した。

### 1-3 タンパク質解析

#### Blue native-polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE)

Schägger (2002) および菓子野 (2009) に従い、5%T-10%T アクリルアミドの連続的濃度勾配のスラブゲルにより行った。1 レーンあたり 5  $\mu\text{g}$  Chl *a* 相当量

の標品を用い、0.5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 をサンプルに加え、泳動サンプルとした。泳動は、4°C、電圧 60 V で約 23 時間泳動した。原法では泳動先端が分離ゲルの中程に到達した段階で上部電極液（負極）を半分濃度（0.002% (w/v)）の CBB G-250 を含む電極液に交換するが（Schägger 2002）、本研究では、菓子野（2009）および Takahashi（2009）に記載のように、当初から半分濃度の 0.0025 (w/v) の CBB G-250 を含む上部電極液にて泳動を行った。

### 変性電気泳動

6 M urea を含む、18% (w/v) アクリルアミドゲルもしくは 16-22 % (w/v) アクリルアミド連続的濃度勾配ゲルにより、変性電気泳動（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE）を行った（Kashino et al. 2001; Kashino 2003）。泳動終了後、ゲルを染色液（0.04% (w/v) CBB R-250、10% (v/v) acetic acid、25% (v/v) methanol）で約 1 時間振盪してタンパク質を染色した。ゲルの脱色は脱色液（7% (v/v) acetic acid、25% (v/v) methanol）中でキムワイプに CBB R-250 を吸着させながら振盪しておこなった。必要に応じ、Kashino（2003）に記載の方法により、銀染色を行った。そのために、泳動後のゲルを 10% (v/v) acetic acid、40% (v/v) ethanol 溶液に 30 分以上浸漬した後、320  $\mu$ M dithiothreitol 溶液に 30 分間浸した。0.2% (w/v) AgNO<sub>3</sub> 溶液に 30 分浸漬後、発色液（3% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、0.25% (v/v) HCHO）を用いてタンパク質を染色した。適切な染色状態が得られた時点で、10% (v/v) acetic acid を加えて発色反応を停止した。CBB R-250 染色でポリペプチドの十分な検出が得られなかった場合、そのゲルをそのまま用いてこの方法により銀染色を行った。

### ウェスタンブロット

電気泳動後（BN-PAGE または SDS-PAGE）のゲルを、ブロッキング液（100 mM Tris、192 mM glycine、5% (v/v) methanol、0.02% (w/v) SDS）で約 15 分間浸漬した。ゲルと同じ大きさに polyvinylidene difluoride (PVDF; Merck-Millipore) 膜（ポアサイズ：0.45  $\mu$ m）1 枚、ろ紙 8 枚を切り抜いた。ろ紙はそのまま、PVDF

膜はメタノールによるウェッティング処理後、ブロッティング液に浸漬した。ホライズプロット (Nihon Eido, Tokyo, Japan) の下部電極板の上にもろ紙を4枚、PVDF膜、ゲルを順に載せた後、さらに4枚のろ紙を載せ、その上に上部電極板を被せた。ゲル面積1 cm<sup>2</sup>あたり2 mAとして、45分間通電した。その後PVDF膜を取り出し、amido black [0.1% (w/v) amido black, 10% (v/v) methanol, 2% (v/v) acetic acid]によりタンパク質バンドを確認した後、1次抗体 (抗CP1 (PsaA/B)、抗PsbC、抗CP43 (以上Kashino et al. 1990)、抗PetA、抗FCPs、抗Fcp4抗体)、2次抗体 (Goat Anti-Rabbit HRP Conjugate; Bio-Rad, Hercules, CA USA) を用いて検出した。抗FCPs抗体は、ラフィド藻*Heterosigma akashiwo*のFCPsに対する抗体で Prof. B. R. Green (the University of British Columbia) から分与頂いたものである。抗PetA抗体は、シアノバクテリア*Synechocystis* sp. PCC 6803のcytochrome *f* (PetA) の270番目から284番目までのアミノ酸配列 (KKKQIEKVQAAELNF) の合成ポリペプチドに対して作成した抗体で、抗Fcp4抗体は、中心目珪藻*T. pseudonana*のFcp4の31番目から44番目までのアミノ酸配列 (QERFDRLRYVEIKH) の合成ポリペプチドに対して作成した抗体である。一次抗体が反応したポリペプチドバンドは、LAS4000mini (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) を用いて化学発光 (WestPicoまたはWestFemto; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) により検出した。

#### ポリペプチドのアミノ酸配列分析

ショ糖密度勾配遠心法によって得られたFCP複合体に含まれるタンパク質を6 M ureaを含む、18-24% (w/v) アクリルアミド連続的濃度勾配ゲルを用いた SDS-PAGEによって分離し、半乾式ブロッティング装置 (モデルAE-6675; ATTO, Tokyo, Japan) を用い、転写溶液 (50 mM Tris, 30 mM boric acid, 0.02% (w/v) SDS and 5% (v/v) methanol) により2 mA/cm<sup>2</sup>の電流を50分間通電し、電気泳動的にPVDF膜 (Merck Millipor; ポアサイズ: 0.2 μm) に転写した。フォルミル化N末端のデブロッキングのため、転写後のPVDF膜を0.6 N HClで一晩処理した (Ikeuchi et al. 1989)。その後、転写されたポリペプチドバンドをamido blackにより染色し、



バンドを切り出してポリペプチドシーケンサ (Procise 494; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) によりN末端アミノ酸配列を解析した。

N末端がブロックされていた場合、FCP複合体に含まれるタンパク質を6 M ureaを含む、18-24% (w/v) アクリルアミド連続的濃度勾配ゲルを用いた SDS-PAGEによって分離し、CBB R-250により染色後、分離されたポリペプチドバンドをそれぞれ切り出した。0.1% (w/v) SDSを含む溶液Aを加え、ホモジナイザーULTRA-TURRAX DISPERSER T 10 (IKA, Staufen, Germany) によってゲルを破碎し、ゲルからタンパク質を抽出した。抽出液に含まれるタンパク質を Amicon Ultra-15 (10,000 NMWL, Merck-Millipore) によって濃縮し、溶液Aを加えて再び濃縮した (洗い)。この洗いにより、後述のリシルエンドペプチダーゼ処理の障害となるSDSの大部分が除去されたことが期待される。FCPのアポタンパク質は膜タンパク質であるが、タンパク質に結合したCBBにより可溶化状態が保持されたものと考えられる。このようにしてSDS-PAGEゲルから抽出、濃縮されたポリペプチドサンプル50  $\mu$ Lに、1 M Tris-HCl (pH 9.0)を50  $\mu$ L、2.75 AU/mL Lysyl Endopeptidase (Wako, Osaka, Japan) を1  $\mu$ L加え、37°Cで5時間酵素処理した。その後、適量の変性液とスクロース顆粒を比重を大きくするために加え、6 M ureaを含む、18-24% (w/v) アクリルアミド連続的濃度勾配ゲルを用いて SDS-PAGEを行った。そして、上記のようにしてPVDF膜 (ポアサイズ: 0.2  $\mu$ m) に転写した。フォルミル化N末端のデブロッキングのため、転写後のPVDF膜を0.6 N HClで一晩処理した後、amido black染色し、乾燥させた。膜上のタンパク質のバンドを切り出し、ポリペプチドの内部配列解析をProcise 494 (Applied Biosystems) にて行った。

#### 1-4 等電点二次元電気泳動

##### アガロースゲルを用いた等電点電気泳動法

アガロースを支持体として (Kashino et al. 2007)、膜タンパク質の分離が可能な等電点電気泳動法の条件検討を行った。最終濃度1.5% (w/v)のアガロース (isoelectrophoresis grade; GE Healthcare) を電子レンジを用いて溶かし、最終濃



度0.66 M ソルビトール、15% (v/v) 2-propanol, 3.5% (w/v) DDM, 5 M urea, 2 M thiourea, 25 mM dithiothreitol, 10% (v/v) pharmalyte (pI = 3-10), 0.002% (w/v) Orange Gとタンパク質サンプル（最終濃度0.12  $\mu$ g Chl *a*/mL）を混合した。ソルビトールを含むため、アガロースの迅速な固化が起こらず、余裕を持って作業を進めることができる。この混合液0.6 mLを5 x 120 mmのろ紙（No. 2; Advantec, Tokyo, Japan）に載せ、暗所、4°Cで一晩静置してアガロースを固化させた。アガロースの固化を確認後、ろ紙をそのまま等電点電気泳動槽（NA-1410R; Nihon-Eido）に載せ、ミネラルオイルを重層してゲルの乾燥を防ぎつつ、一次元目の等電点電気泳動を行った。印加電圧を徐々に上げ、最終的に500 Vの印加を12時間行った。一次元目の泳動が終了した後、ゲルをろ紙に載せたまま変性液（5.2% (w/v) LDS, 172 mM Tris-HCl (pH 8.0), 40 mM dithiothreitol, 0.5 M sucrose, 0.01% (w/v) pyronine）に浸した。このゲルストリップを6 M ureaを含む18% (w/v) アクリルアミドゲルに載せ、二次元目のSDS-PAGEを行った。銀染色を行い、タンパク質の検出を行った。

#### IPG ゲルを用いた等電点電気泳動法

等電点電気泳動に多用されているImmobilized pH gradient (IPG) gel strip (pI = 3-6; GE Healthcare) を用いた。タンパク質標品に1% (w/v) DDM, 15% (v/v) 2-propanol, 5 M urea, 2 M thiourea, 50 mM dithiothreitol, 10% (v/v) pharmalyte (pI = 4-6)を加え、泳動用サンプルとした。これを用いて24時間かけてIPG gel strip を膨潤させた。NA-1410R等電点電気泳動槽を用い、最終的に1,000 Vを15時間印加した。このゲルストリップを上記変性液に浸した後、6 M ureaを含む18% (w/v) アクリルアミドゲルに載せ、二次元目のSDS-PAGEを行った。銀染色を行い、タンパク質の検出を行った。

## 1-5 分光学的解析

### chlorophyll濃度測定

Chl *a*の濃度測定はPorra et al. (1989) の方法に従った。methanolで色素を抽出し、10,000 rpm、3分間、室温で遠心してタンパク質を沈澱として除去した。上清の750.0 nmと665.2 nmでの吸光度を測定し、Chl *a*濃度を下記の計算式で求めた。分光光度計はUV-2700 (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用い、スリット幅は1 nmとした。

$$\text{Chl } a \text{ (g/L)} = (A_{665.2} - A_{750.0})/79.95$$

### 吸収スペクトル測定

測定はMPS-2000 Spectrophotometer (Shimadzu) を用いて25°Cで行った。印刷されたスペクトルを、デジタイジングソフトウェア DataThief III (<http://www.datathief.org>) によりデジタイズし、KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA, USA) により再プロットした。

### 動的光散乱測定

Zetasizer  $\mu$ V system (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) を用いて動的光散乱の測定を行い、Zetasizer software ver. 6.01によりブラウン運動に基づいた分子サイズを得た。

### 蛍光スペクトル測定

蛍光スペクトルは、FluoroMAX-4 fluoro-spectrometer (Horiba, Kyoto, Japan) を用い、液体窒素温度 77 Kで測定した。サンプル濃度は、1.0  $\mu$ g Chl *a*/mLとした。蛍光スペクトルは、430 nm (スリット幅; 5 nm) で励起して測定した。検出条件は、スリット幅1 nmで、蓄積時間が 0.1 sであった。また、励起スペクトルは、400 nmから600 nmで励起し、675 nmの発光を測定した。生データは、まず機種

依存性感度補正を行い、ついで、光源のキセノンランプを用いて波長依存的感度補正を施した上で、データとして用いた。測定に際しては、キセノンランプを用いて励起側波長校正を行い、純水のラマンスペクトルを用いて検出側の波長校正を行った。校正の際のスリット幅は2 nmで、蓄積時間は0.4 sであった。

#### 1-6 色素分析

光合成色素を*N,N*-dimethyl-formamideで抽出し (Furuya et al. 1998; Hashihama et al. 2010)、Prodigy 5 (ODS 3) column (150 x 4.60 mm) (Phenomenex, Torrance, CA USA) を用いた逆相 HPLCによって分離した (Kashino and Kudoh 2003)。HPLCは、SCL-10Aコントローラを備えたLC-10ADポンプシステムを用い (いずれもShimadzu)、溶出色素をフォトダイオードアレー検出装置 (SPD-M10Avp) で検出し、解析ソフトウェアCLASS-M10Aによって分析した (いずれもShimadzu)。溶出溶媒A (0.02 M ammonium acetate, 80% (v/v) methanol) でカラムを平衡化させてサンプルをカラムに吸着させた後、0.8 mL/minの溶出流速で0~100% (v/v)への溶出溶媒B (methanol:ethylacetate = 7:3) の55分間の濃度勾配で色素の溶出を行った (Kashino and Kudoh 2003)。Chl *c*、fucoxanthin、diadinoxanthin、diatoxanthin、 $\beta$ -caroteneの標準色素は、Water Quality (Denmark) から得、Chl *a*は、Porra et al. (1989) にしたがって定量した色素を基にした。

## 第3章 結果

### 3.1. チラコイド膜上のタンパク質複合体の分離と解析

#### 3.1.1. BN-PAGE による膜タンパク質複合体の分離

*C. gracilis* から調製したチラコイド膜を 2.0% の DDM で可溶化し、膜タンパク質複合体を複合体のまま、分子量に応じて分離することが可能な BN-PAGE によって、チラコイド膜に含まれる膜タンパク質複合体の分離を行った (図 1)。100 kDa 以下から 700 kDa 以上にわたって複数の膜タンパク質複合体が分離された。それらの中には、chlorophyll を結合した 2 本の太いバンドおよび複数の細いバンドが見出された。分離された膜タンパク質複合体に含まれるタンパク質を、ウェスタンブロットによって解析した。系 I 複合体を特定するために抗 CP1 抗体 (シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* の反応中心タンパク質 PsbA /B に対する抗体)、系 II 複合体を特定するために抗 CP43 抗体 (シアノバクテリア *T. elongatus* の光化学系 II 内在性クロロフィル結合アンテナタンパク質 CP43 に対する抗体)、Cyt *b<sub>6</sub>/f* 複合体を検出するために抗 PetA 抗体 (シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の cytochrome *f* (PetA) の一部配列 (-KKKQIEKVQAAELNF-) に対する抗体) を用いた。また、FCP タンパク質を検出するために、珪藻 (珪藻綱) と同じ不等毛植物門に属するラフィド藻 (ラフィド藻綱) *Heterosigma akashiwo* の総 FCP から作られた抗体である抗 FCPs 抗体、および、*T. pseudonana* の Fcp4 (Lhcf4) の N 末端に近い部位 (-QERFDRLRYVEIKH-) に特異的な抗体である抗 Fcp4 抗体を用いた。抗 CP1 抗体、抗 CP43 抗体がシアノバクテリアから高等植物に至るまで幅広い交差反応性を示すことは、Kashino et al. (1990) により示されている。抗 FCPs 抗体が *C. gracilis* の多種の FCP アポタンパク質に反応することが Ikeda et al. (2008) により示されている。抗 FCP4 抗体作製に用いたアミノ酸配列は、本研究により *C. gracilis* の対応タンパク質であることが示されることになるタンパク質の対応部分アミノ酸配列と完全に一致することが、後に確認された。抗 PetA 抗体は、種間相同性の高い部位を抗原として作製されたものであるが、珪藻 *T. pseudonana* の cytochrome *f* の対応部分アミノ酸配列とも相同性が高く、KKKQIEKVQAAELNF の 5 番目の I が Y に置換されているのみである。6 番目



以降のアミノ酸が10残基であり、抗体はポリクローナル抗体である。したがって、この抗 PetA 抗体が *C. gracilis* の cytochrome *f* にも反応する可能性が高いと考えられる。

BN-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、上記の抗体を用いて検出した。転写後のゲルを CBB R-250 で染色したところ、ポリペプチドはほとんど染色されなかった。図 2 に示したように、抗 CPI、抗 CP43、抗 PetA、抗 FCPs 抗体すべてが約 600 kDa のバンド (a) に反応した。一方、抗 Fcp4 抗体は2つの光化学系反応中心複合体が含まれるこの約 600 kDa のバンド (a) には反応せず、約 66 kDa のバンド (b) に反応した。このバンドには、抗 FCPs 抗体も反応を示したが、抗 CPI、抗 CP43、抗 PetA 各抗体の反応はなかった (図 2)。

このようにして分離された各膜タンパク質複合体を構成しているタンパク質を解析するために、変性条件で二次元目の電気泳動を行った (図 3)。この結果、BN-PAGE により分離され、抗 Fcp4 抗体が反応した約 66 kDa のバンドからは、泳動度が近接した約 20 kDa の2～3個のポリペプチドスポットが得られた。したがって、Fcp4 を含むタンパク質複合体は、ほぼ同じ分子量のタンパク質から構成されていることになる。

他の2種の珪藻 *T. pseudonana* と *P. tricornutum* を用いて、同様にチラコイド膜タンパク質複合体の分離と解析を行った (図 4)。 *C. gracilis* の場合と同様に、光化学系複合体が存在しているバンド (a) に抗 FCPs 抗体が反応した一方で、抗 Fcp4 抗体は光化学系反応中心複合体が存在しない約 66 kDa のバンド (b) に反応した。このバンド (b) には、抗 FCPs 抗体も反応した。

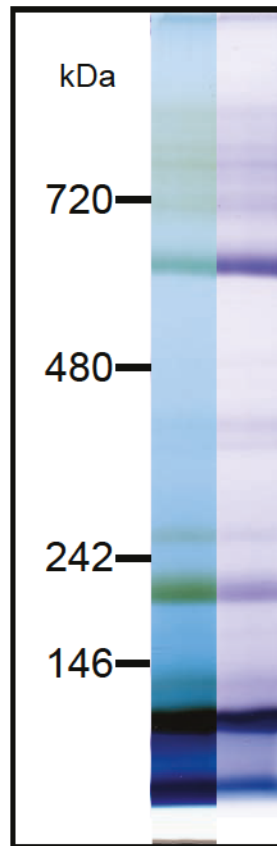


図 1；Blue Native PAGE による *C. gracilis* のチラコイド膜上のタンパク質複合体の分離

左；CBB R-250 染色前の画像。 右；CBB R-250 染色後の画像。同一のゲルの染色前後の画像を並列させたものである。

左の数字は分子量マーカー（Native Mark; Invitrogen）の位置を示している。

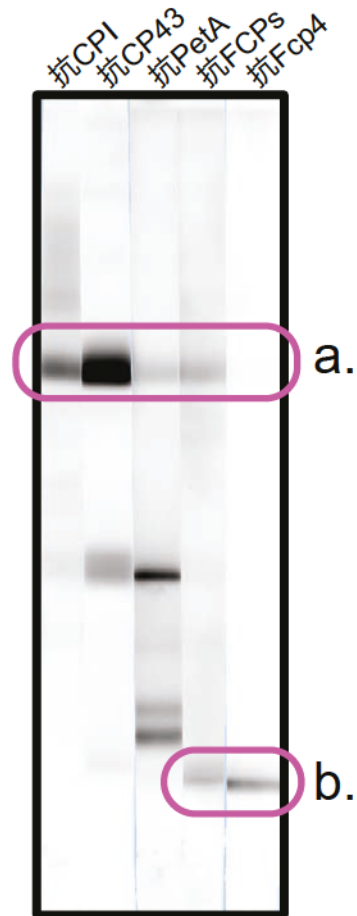


図 2； *C. gracilis* のチラコイド膜タンパク質複合体のウエスタンブロットによる解析

幅広ウェルを用いて BN-PAGE を行い、PVDF 膜への転写後に同一レーンを縦に 5 本に切り分け、抗 CPI、抗 CP43、抗 PetA、抗 FCPs および抗 Fcp4 抗体を用いて染色した画像を並べたものである。

- a. 抗 CPI、抗 CP43、抗 PetA、抗 FCPs のいずれの抗体も反応した複合体。
- b. 抗 Fcp4 抗体および抗 FCPs 抗体が反応した複合体。



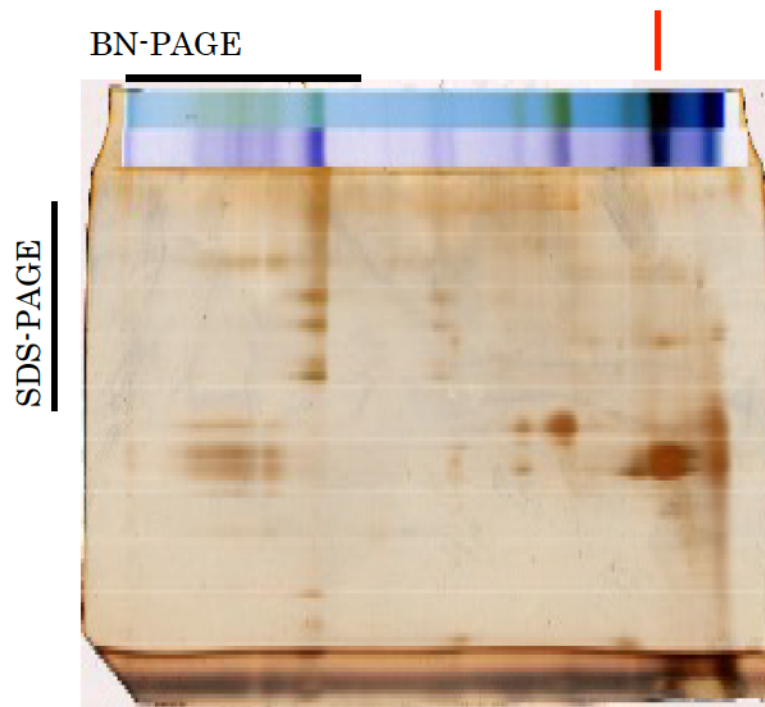


図 3； *C. gracilis* のチラコイド膜上のタンパク質複合体を構成しているタンパク質

図 1 の BN-PAGE 後（ゲル上部のストリップ、上；CBB R-250 染色前の画像、下；CBB R-250 染色後の画像）、変性条件で二次元目の泳動を行い、銀染色を行った画像。

矢印（赤）；Fcp4 を含む複合体。

楕円（赤）；約 20 kDa の泳動度が近接した 2 ～ 3 本のタンパク質のスポット。

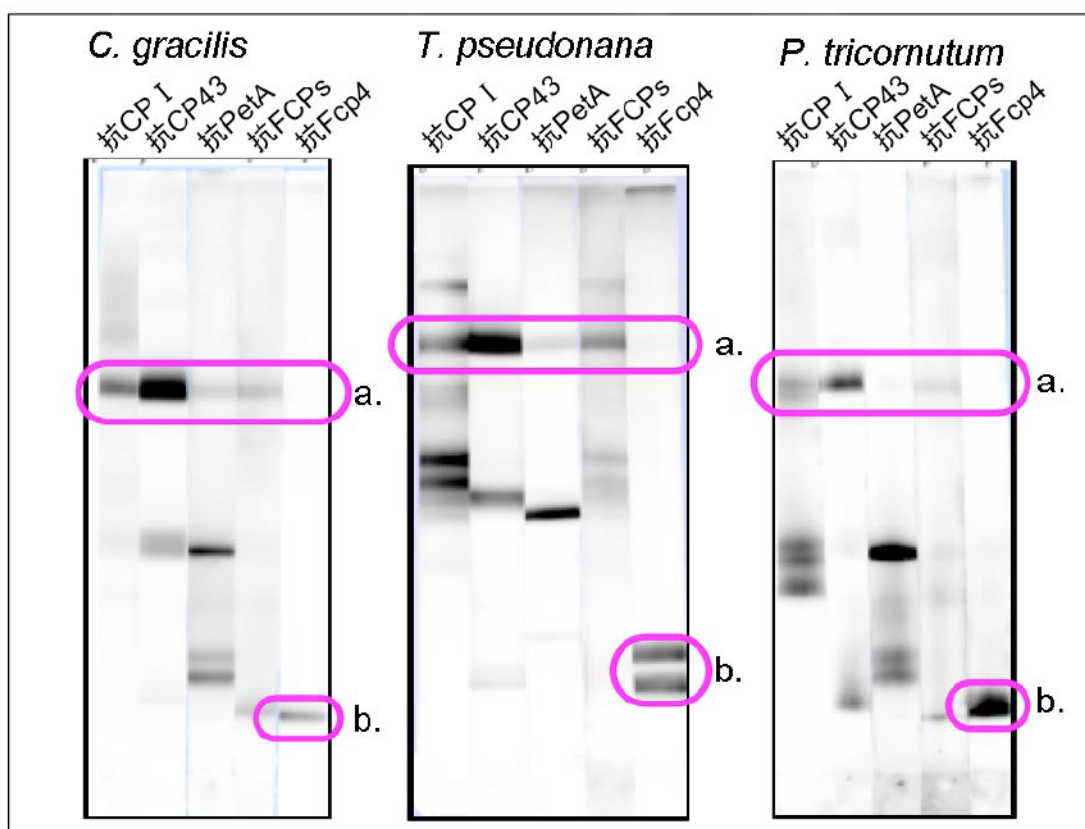


図 4； *C. gracilis*、*T. pseudonana* および *P. tricornutum* のチラコイド膜上のタンパク質複合体の分離と解析

幅広ウェルを用いて BN-PAGE を行い、PVDF 膜への転写後に同一レーンを縦に 5 本に切り分け、抗 CP1、抗 CP43、抗 PetA、抗 FCPs および抗 Fcp4 抗体を用いて染色した画像を並べたものである。

- a. 抗 CP1、抗 CP43、抗 PetA、抗 Fcp4 のいずれの抗体も反応した複合体。
- b. 抗 Fcp4 抗体および抗 FCPs 抗体が反応した複合体。

### 3.1.2. ショ糖密度勾配遠心法による膜タンパク質複合体の分画

3.1.1.と同様に、*C. gracilis* から調製したチラコイド膜を DDM で可溶化し、ショ糖密度勾配遠心法によって、チラコイド膜タンパク質複合体の分離を行った。条件検討を行った結果、2.0% (w/v) DDM でチラコイド膜を可溶化し、0.04% (w/v) の DDM を含んだ 0.8-1.5 M ショ糖の連続密度勾配に載せ、300,000 x g で 16 時間の遠心を行うことで、ひとつの褐色の画分 (F1) とふたつの緑色の画分 (F2、F3) が得られた (図 5)。chlorophyll 定量の結果、褐色の画分には細胞内 chlorophyll *a*、*c* のそれぞれ約 50%、約 70%が含まれていた (表 1)。

表 1 ショ糖密度勾配遠心分離により分画された画分に含まれていた Chl *a*、*c* の量の一例

	Chl <i>a</i> (μg)	Chl <i>c</i> (μg)
チラコイド膜 (出発材料)	977	172
F1	469	121
F2	278	37.7
F3	77.2	12.9

可溶化処理後の遠心により除去される不溶性画分にも光合成色素が含まれるため、画分 F1、F2、F3 の各色素の合計は、出発時のチラコイド膜に含まれる色素量よりも少なくなっている。

褐色の画分を、BN-PAGE によって解析したところ、約 66 kDa の主要なバンドおよびそれよりも顕著に少量の約 146 kDa のバンドが分離された。この主要な約 66 kDa のバンドは、チラコイド膜を同じ 2.0% (w/v) DDM で可溶化して BN-PAGE によって分離したときに多量に検出された膜タンパク質複合体のバンド (b) (図 1) とほぼ同じ分子量であった (図 6)。この褐色の画分の主要構成タンパク質は (図 7、F1 画分)、図 1 のバンド (b) の主要構成タンパク質 (図 3) に対応すると考えられる。さらに、タンパク質の分離がより良好なアクリルアミド連続的密度勾配ゲルを使った SDS-PAGE を行ったところ、主要な 2 つのタンパク質バンドの間に少量のタンパク質バンドが 1 つ確認され、画分 F1 に含

まれているタンパク質は、近接した泳動度を示す少なくとも3つのタンパク質から構成されていることが判明した（図 8）。

また、ショ糖密度勾配遠心分離によって分離された画分 F2 と F3 について、系 I に特異的な抗 Psa/PsaB 抗体と系 II に特異的な抗 PsbB 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、画分 F2 には主に系 I 複合体が、画分 F3 には主に系 II 複合体が含まれていることがわかった（図 7）。

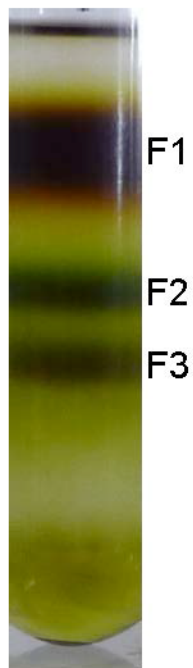


図 5; ショ糖密度勾配遠心法による *C. gracilis* チラコイド膜の色素結合タンパク質複合体の分画

1 mg Chl *a* 相当量の *C. gracilis* のチラコイド膜を 2.0% (w/v) の DDM によって可溶化し、ショ糖密度勾配遠心によって分画した。得られた主要画分を、ショ糖密度勾配の上からそれぞれ F1、F2 そして F3 とした。

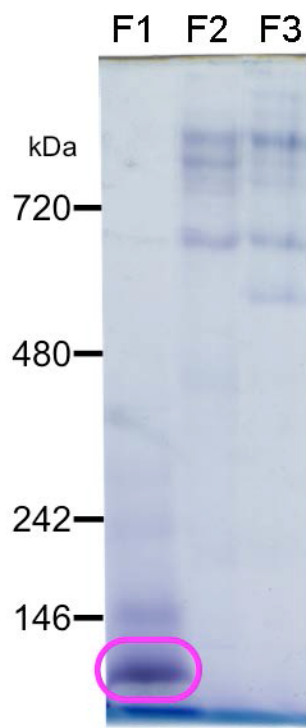


図 6; ショ糖密度勾配遠心により得られた *C. gracilis* の各色素結合膜タンパク質複合体の **Blue-Native PAGE** による解析

図 5 で得られた画分 F1、F2、F3 を BN-PAGE で泳動し、CBB R-250 で染色を行った画像である。

円で囲った複合体が、FCP 複合体である。

左の数字は分子量マーカーの位置を示している。

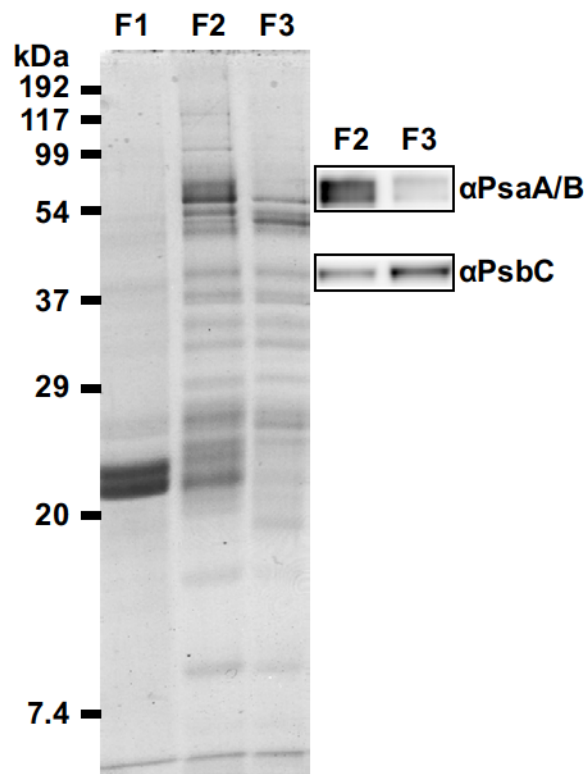


図 7；シヨ糖密度勾配遠心により得られた *C. gracilis* の各色素結合膜タンパク質複合体の SDS-PAGE による解析

1 mg Chl *a*/ mL のチラコイド膜に終濃度 2.0% の DDM を加えて可溶化し、シヨ糖密度勾配遠心法によって分画された画分 F1、F2、F3 から 10  $\mu$ L をそれぞれ SDS-PAGE (6 M urea, 18% acrylamide) によって分離し、CBB 染色した画像である。各泳動量は、F1 が 0.57  $\mu$ g Chl *a*、F2 が 0.30  $\mu$ g Chl *a*、F3 が 0.20  $\mu$ g Chl *a* 相当量であった。

枠内は画分 F2、F3 を泳動し、抗 CP1 抗体 ( $\alpha$ PsaA/B)、抗 CP43 抗体 ( $\alpha$ PsbC) で免疫染色を行った結果である。

左の数字は分子量マーカーの位置を示している (Prestained SDS-PAGE Standards (broad range), Bio-Rad)。



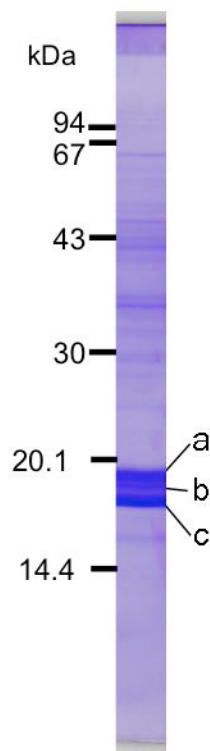


図 8；ショ糖密度勾配遠心により得られた *C. gracilis* の画分 F1 の色素結合膜タンパク質複合体の **SDS-PAGE** による解析

図 5 で得られた画分 F1 を SDS-PAGE (6 M urea, 18-24% acrylamide) によって分離し、3 つの主なバンド (a、b、c) を得た。

左の数字は分子量マーカーの位置を示している (Amersham low molecular weight calibration kit for SDS Electrophoresis, GE Healthcare)。

### 3-2 FCP の複合体を構成するタンパク質の同定

*C. gracilis* のチラコイド膜からショ糖密度勾配遠心法によって分画された褐色の画分は、その色および非変性・変性電気泳動（BN-PAGE、SDS-PAGE）の結果より、FCP の複合体である。そして、この精製された FCP の複合体は、精製過程および上記の性質を鑑みると、BN-PAGE によって分離される約 66 kDa の FCP 複合体と同じものであると判断できる。BN-PAGE によって分離される複合体には、CBB G-250 が多量に結合しているため、そのままでは分光学的な解析や色素分析に適さず、また、多量に調製することが難しかった。そこで、以降、ショ糖密度勾配遠心法によって分離した FCP 複合体を使って解析した。画分 F1 含まれる粒子の直径は、測定毎に若干のばらつきがあるものの、ほぼ一種類であることが動的光散乱の測定によって示された（図 9）。これは、この画分に含まれる粒子の大きさが均一であることを示す。したがって、精製された FCP の複合体の純度が高いことが示された。なお、動的光散乱に基づいた半径から推定される分子の大きさは、300～450 kDa であり、BN-PAGE で得られた分子の大きさ 66 kDa の約 5～7 倍の大きさとなった。

ショ糖密度勾配遠心法によって得られた褐色の画分（F1）を、SDS-PAGE によって解析したところ、泳動度の近接した 3 つのポリペプチドバンドが得られた（図 7）。ここで、便宜上分子量の大きい方から a、b、c とする。CBB R-250 で染色すると、18 kDa のポリペプチド a と 16 kDa のポリペプチド c が多量に含まれ、その中間の分子量のポリペプチド b が少量含まれていることがわかった。

画分 F1 から SDS-PAGE により分離して得られたポリペプチド a、b、c（図 7）のアミノ酸配列解析を行った。しかし、系 I 複合体に結合した FCP タンパク質（Ikeda et al. 2008）と同様に、N 末端がブロックされていた。そこで、内部配列解析を行うことで、各ポリペプチドの同定を目指した。内部配列解析を行うために、ポリペプチドを SDS-PAGE 泳動後のゲルから抽出し、リシルエンドペプチダーゼによって限定消化、6 M urea、18-24% acrylamide 濃度勾配ゲルを用いた電気泳動によって分離した（図 10）（Kashino et al. 2002）。ポリペプチド a、b、c

それぞれから得られた限定消化産物（ポリペプチド断片）の構成パターンは異なり、a、b、cが異なるポリペプチドであることが推測できる。分離されたポリペプチド断片のアミノ酸配列解析を行った。PVDF上で明確に視認できるポリペプチド断片全てについて解析を行ったが、4つのポリペプチド断片のみから、配列を得ることができた。ポリペプチドaから2つ、ポリペプチドbとcからそれぞれ1つが得られた（図 11）。ポリペプチドaとcから得られた配列はすべて同じで、「HGRIAQLAFLGN」という配列を得ることができた（図 11）。リシルエンドペプチダーゼ処理により得られたポリペプチド断片であるので、この断片の直前のアミノ酸残基はリシンである。したがって、アミノ酸配列は「KHGRIAQLAFLGN」となる。この配列を完全に含むタンパク質を検索すると、*T. pseudonana*のLhcf3とLhcf4の2つが見出された。また、ポリペプチドbからは、1つのポリペプチド断片から「(K)AEEKAGLAALLE」が得られたが、ゲノムデータベース上に相同性の高いタンパク質は見出されなかった。

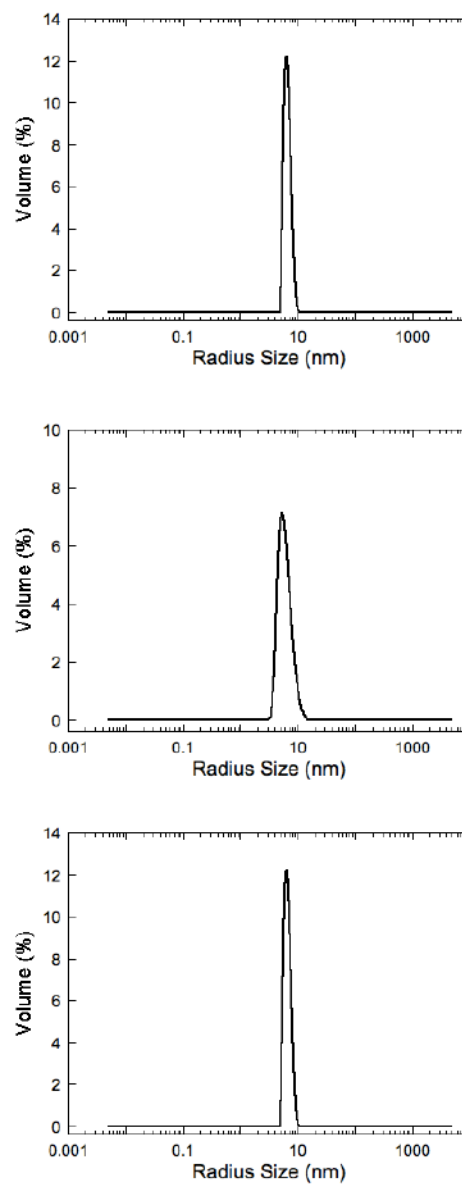


図 9；画分 F1 に含まれる粒子の大きさの分布

動的光散乱の測定により、ある大きさの粒子の体積が全粒子の合計体積に占める割合を粒子の半径に対してプロットしたもの。測定により若干のずれがあり、3例を示した。

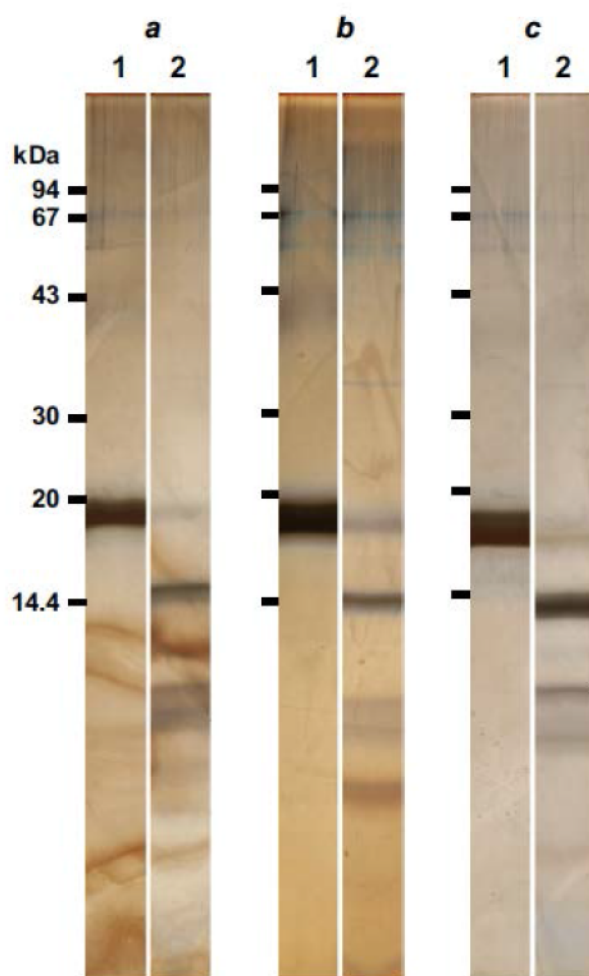


図 10； *C. gracilis* から得られた FCP の複合体の 3 つのポリペプチドの限定分解パターン

シヨ糖密度勾配遠心法によって得られた FCP の複合体から SDS-PAGE によって分離された 3 つのポリペプチド (a、b、c) をリシルエンドペプチダーゼで処理した。

1. リシルエンドペプチダーゼによる限定分解前。
2. リシルエンドペプチダーゼによる限定分解後。

各ポリペプチド a、b、c は、それぞれレーン 1 と 2 が同じゲルで泳動されたものである。左の数字は分子量マーカーの位置を示している。

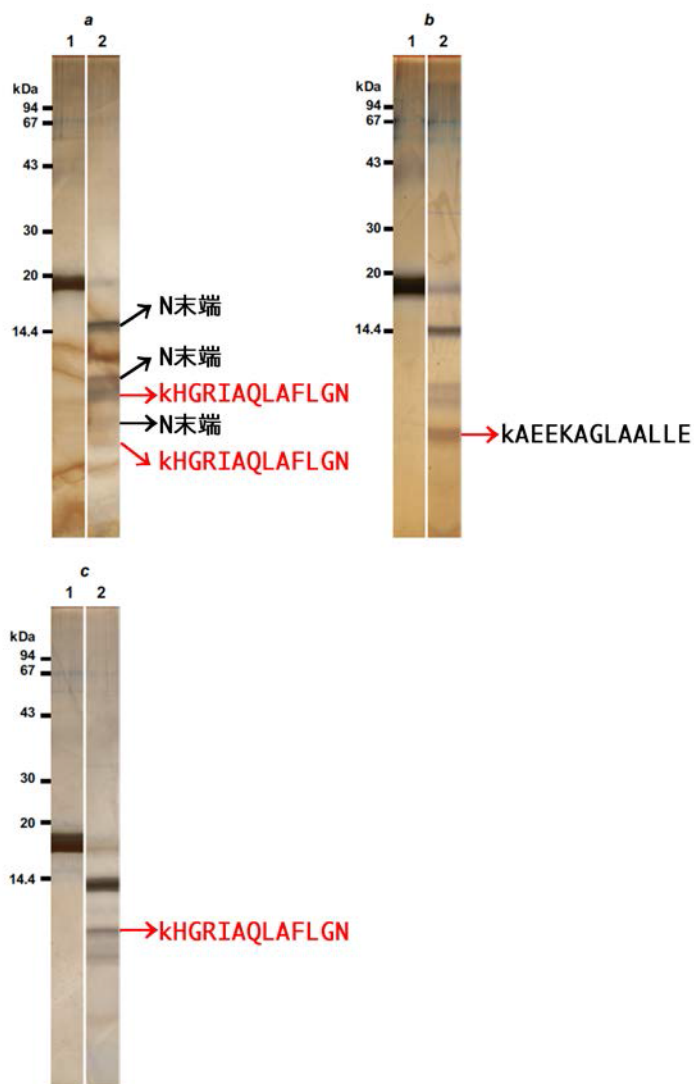


図 11; *C. gracilis* から得られた FCP の複合体の 3 つのポリペプチドの同定

FCP の複合体から得られたポリペプチド (a、b、c) をリシルエンドペプチダーゼによって限定分解処理した。レーン 1 が処理前、レーン 2 が処理後。それぞれのポリペプチドから得られた断片のうち、アミノ酸配列が得られた断片の右側にアミノ酸配列を示した (赤矢印)。

リシルエンドペプチダーゼ処理によって得られたポリペプチド断片 (レーン 2 の各バンド) にもアミノ酸配列を解析できなかったポリペプチド断片があり、それらは N 末端を含むものであると予想されるため、図中には「N 末端」と記した (黒矢印)。



### 3-3 等電点電気泳動による解析

ポリペプチドaとcから得られたペプチド断片のアミノ酸配列がまったく同じであったため（図 11）、タンパク質の大きさとpIから、より確からしい同定を目指し、ショ糖密度勾配遠心法によって得られたFCPの複合体を用いて、等電点二次元電気泳動によるタンパク質の解析を行った。一般的に用いられるIPGを用いた等電点二次元電気泳動を行ったが、FCPが膜タンパク質であるため、ポリペプチドのスポットを全く得ることができなかった。そこで、膜タンパク質を分離することができるように等電点電気泳動法の改良を行った。DNAのような巨大分子も分離することができ、疎水性の高い系II複合体構成タンパク質の分離実績（Kashino et al. 2007）もあるアガロースゲルを担体として、各種条件を検討した。その結果、「方法」に記載した等電点電気泳動後に変性条件で二次元目の電気泳動を行い、FCPの複合体から明瞭なポリペプチドのスポットを再現性良く得ることに成功した。図 12は、このようにして実用化した等電点電気泳動法を用いて一次元目の等電点電気泳動を行い、二次元目は6 M Ureaを含む、18%アクリルアミドゲルによってSDS-PAGEを行った結果である。FCPの複合体を変性条件で電気泳動を行うと、分子の大きさが近似した3つのポリペプチドバンドが分離されたが（図 7）、図 12では二次元目の変性条件の泳動の結果、泳動度の異なる2つの明瞭なポリペプチドがスポットとその間の大きさの薄いポリペプチドのスポットが得られた。スポットの大きさと濃さから、分子の大きい方からそれぞれ図 7で分離されたポリペプチドa、b、cであると判断できる。図 12から、ポリペプチドaとcのpIはポリペプチドaの方が小さい。



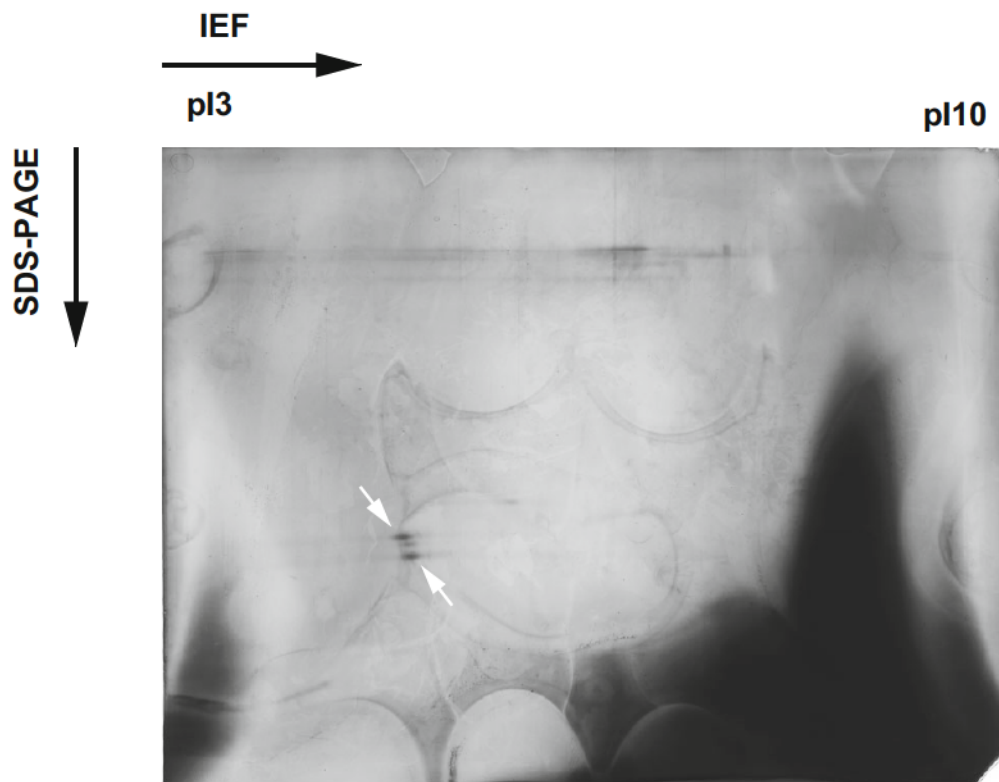


図 12；FCP の複合体の等電点二次元電気泳動解析

シヨ糖密度勾配遠心で得られた F1 画分を、アガロースゲルを用いた 1 次元目の等電点電気泳動を行い（水平方向）、変性条件で二次元目の SDS-PAGE（6 M urea, 18% (w/v) acrylamide）を行って（垂直方向）、銀染色した画像。図 8 のポリペプチド a と c に相当するポリペプチドのスポットを矢印で示した。2つの矢印で示したスポットの中間に認められる薄いスポットは、図 8 のポリペプチド b に相当する。

### 3-4 FCP の複合体の機能解析

図 5 で分離した FCP の複合体の機能解析を進めた。図 13 は、チラコイド膜とショ糖密度勾配遠心法によって得られた FCP の複合体の吸光スペクトルを比較したものである。チラコイド膜と比べて、FCP 複合体は 400 から 500 nm の光吸収が顕著に大きかった。この領域は、Chl *c* の Soret バンドや carotenoid の吸収帯に相当することから、FCP 複合体には Chl *c* や carotenoid が多量に含まれていることが示唆される。Chl *a* の Q<sub>Y</sub> バンドに由来する FCP の複合体の赤色域の光吸収ピークの半値半幅はチラコイド膜のものよりも小さく、また、ピーク波長は 673 nm で、チラコイド膜のピーク波長よりも 2 nm 短い。チラコイド膜上の Chl *a* 結合体は系 I・系 II・FCP の複合体であるが、チラコイド膜サンプルの赤色域の光吸収ピークはこれら 3 種の複合体のものの合算である。FCP の複合体の半値半幅が小さいのは、これを反映したものである。そして、FCP の複合体の赤色域光吸収ピークがチラコイド膜の対応ピークの青色側に沿い、吸収極大値がチラコイド膜よりも 2 nm 短いということは、本研究で精製された FCP の複合体がチラコイド膜上に存在していた時には、系 I・系 II 複合体に結合しているクロロフィルへ光エネルギーを伝達することができた、という可能性を示す。

図 14 は、チラコイド膜と本研究で精製された FCP の複合体の色素組成を比較したものである。可視光域で光吸収をする物質としては、どちらの標品においても Chl *a*、Chl *c*、fucoxanthin、diadinoxanthin + diatoxanthin、β-carotene が検出された。チラコイド膜には、Chl *c* が Chl *a* の約 35%、fucoxanthin が Chl *a* の約 85%含まれていた。これは、細胞の色素組成についての報告値とほぼ一致する(参考, Ban et al. 2006)。FCP 複合体では、吸収スペクトルからの予想通り、Chl *c* および fucoxanthin の含量が大きく増大しており、Chl *c* が Chl *a* の約 70%、fucoxanthin が Chl *a* の約 170%含まれていた。fucoxanthin の比率が従来の FCP 画分での報告値 (Chl *a* : fucoxanthin = 100 : ~130、Berkaloff et al. 1990; Ikeda et al. 2008) よりも非常に大きいことは、本研究で得られた FCP 複合体の純度が高いことを反映していると考えられる。一方、強光下での光化学系の保護機構に関与する diadinoxanthin の含量は低かった。

図 15-A は、FCP の複合体とチラコイド膜の 430 nm で励起した蛍光スペクトルを示したものである。430 nm は、chlorophyll の Soret バンドのピーク波長である。チラコイド膜では 690 nm 付近にピークがあり、710 nm 付近に肩が見られ、それぞれ系 II 複合体および系 I 複合体からの蛍光に対応する。FCP の複合体は 675 nm が極大となる蛍光を発し、チラコイド膜に比べ、およそ 15 nm も波長が短かった。また、735 nm に小さなピークが認められるが、これは Chl 分子のサテライト振動バンドに由来するものと見られる (Rijgersberg and Ames 1980)。FCP の複合体には、系 I・系 II 複合体由来の顕著な蛍光は認められず、光合成色素に関し、FCP の複合体の純度の高さを改めて支持するものである。チラコイド膜では、FCP の複合体の主ピーク波長 675 nm に明瞭なピークや肩は見られなかった。したがって、FCP の複合体がチラコイド膜上に存在するときには、FCP の複合体に吸収された光エネルギーは他の色素体、つまり系 I・系 II 複合体に、極めて高い効率で伝達されていることが強く示唆される。

図 15-B、C は、675 nm と 690 nm で検出した 77 K における蛍光励起スペクトルである。675 nm は FCP の複合体の蛍光の主ピーク波長、690 nm はチラコイド膜の主ピーク波長である (パネル A)。チラコイド膜 (パネル B) では、690 nm で測定すると ( $E_m; 690$ )、400~450 nm の Chl による光吸収域に加え、Chl がほとんど光を吸収しない 500~550 nm の波長域に顕著な肩があり、この波長域の光を吸収する物質から系 I ないし系 II に光エネルギーが伝達されたことが伺える。一方、675 nm で測定すると ( $E_m; 675$ )、蛍光強度は著しく小さくなり、FCP の複合体に吸収された光エネルギーは、他の色素体に、つまり系 I・系 II 複合体に、高い効率で伝達されていると言える。

FCP の複合体では (パネル C)、チラコイド膜とは逆に、690 nm で測定した時の蛍光強度は 675 nm で測定した蛍光強度に比べて著しく小さい。これは、FCP の複合体サンプルに、系 I・系 II 複合体がほとんど含まれていないことを反映したものである。675 nm で測定すると、チラコイド膜の場合と同様、Chl 以外に 500~550 nm の波長域の光吸収物質が存在し、その物質から FCP の複体内の Chl 分子に光エネルギーが伝達されていることが示された。色素分析の結果によ

ると、この波長域で光を吸収する物質は fucoxanthin と diadinoxanthi + diatoxanthin である。色素分析によって解析した FCP の複合体への結合量を考慮すると、500 ～550 nm の波長域の光吸収物質 fucoxanthin であることが強く示唆される。

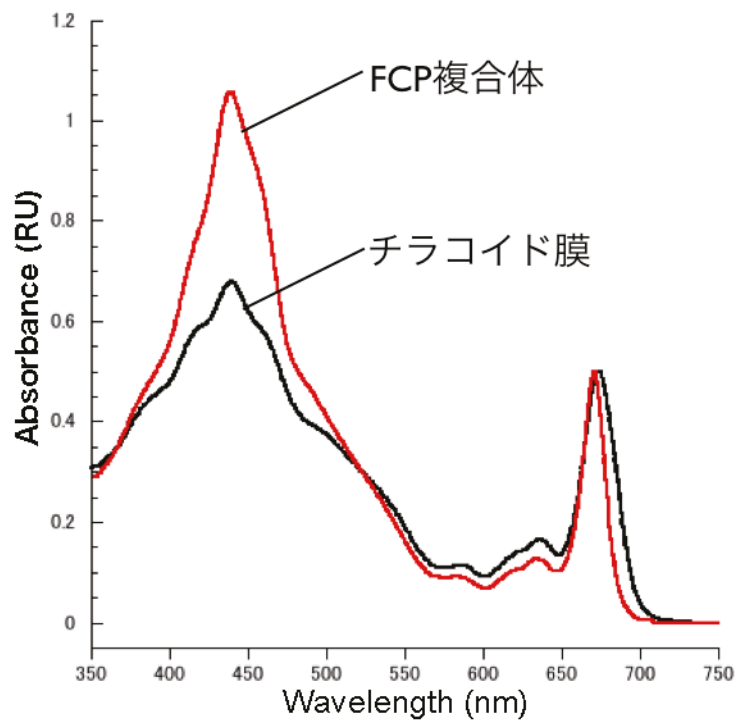


図 13；チラコイド膜および FCP の複合体の光吸収スペクトル

チラコイド膜(黒色)と FCP の複合体(シヨ糖密度勾配遠心で得られた画分 F1、赤色)の 350 - 750 nm における光吸収スペクトルを室温で測定した。比較のために、スペクトルはそれぞれ 750 nm での吸光度を 0 とし、Qy バンド（ピーク波長、約 670 nm）の最大吸光度を 0.5 に正規化した。



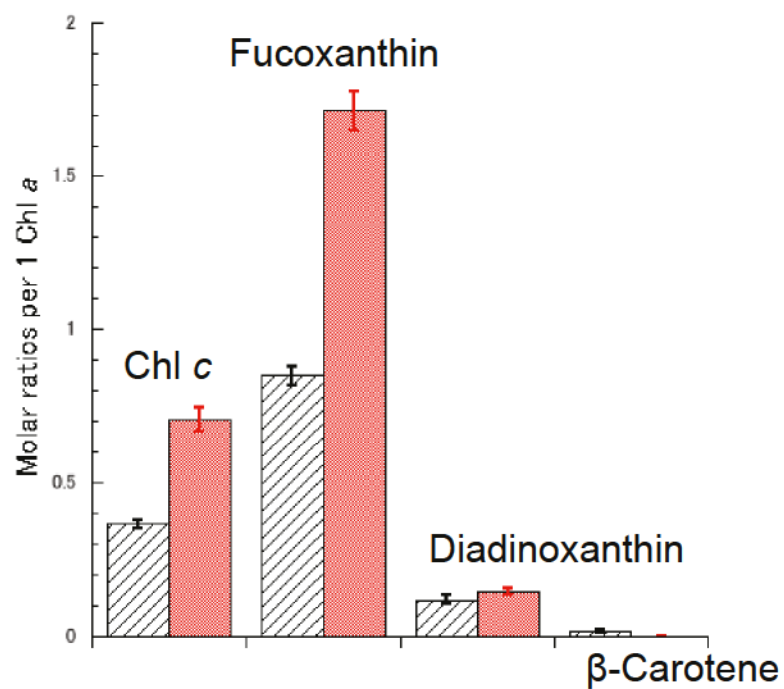


図 14；チラコイド膜および FCP 複合体の色素組成

HPLC により、チラコイド膜（ハッチ）と FCP の複合体（シヨ糖密度勾配遠心で得られた画分 F1、赤色）の色素組成を解析したもので、Chl *a* 一分子あたりの分子数で表されている。

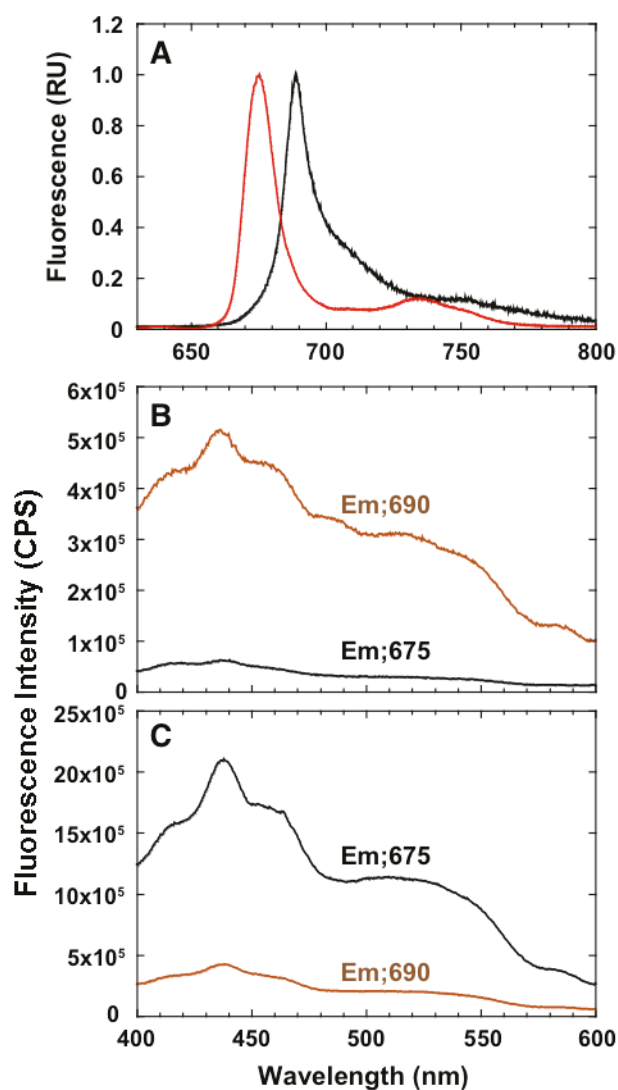


図 15; チラコイド膜および FCP の複合体の 77K における蛍光スペクトル。

A、蛍光スペクトル；チラコイド膜（黒色）と FCP の複合体（ショ糖密度勾配遠心で得られた画分 F1、赤色）の 77K での 630 - 800 nm における蛍光スペクトルで、励起波長は 430 nm。それぞれの蛍光の最大値で正規化した。

B、C、蛍光励起スペクトル；チラコイド膜（B）、FCP の複合体（C）からの蛍光を 690 nm（Em;690、茶）または 675 nm（Em;675、黒）で測定した。

## 第4章 考察

*C. gracilis* のチラコイド膜を可溶化し、BN-PAGE でチラコイド膜に含まれるタンパク質複合体の分離を行ったところ、複数の膜タンパク質複合体が認められた(図 1)。本研究では、チラコイド膜の可溶化のために、2.0% (w/v) の DDM を使用した。この DDM の濃度は、Nagao らが用いた 4% (w/v) (Nagao et al. 2012, 2013b) に比べると半分の濃度である。これは、界面活性剤の濃度が高くなると複合体中のタンパク質間の結合、ひいては色素間のエネルギー伝達に影響を及ぼす可能性が指摘されているため (Kashino et al. 2003)、本研究では、より低濃度の界面活性剤により、より穏和と考えられる可溶化処理を行った。ウェスタンブロット解析によって、そのような界面活性剤処理では解離しない程度に強く光化学系複合体に結合した FCP 複合体が存在する一方で(図 2、バンド(a))、FCP のひとつ Fcp4 に対する抗体が反応する FCP は光化学系複合体には結合していない状態で検出され(図 2、バンド(b))、チラコイド膜中では光化学系複合体に直接には結合していないことが示唆された。つまり、高等植物の LHCII 三量体に似た存在形態であることが考えられる。高等植物では、光化学系 II 複合体に LHC の一種 CP26 や CP29 が結合し、その外縁に LHCII 三量体が結合していると考えられている (Dekker and Boekema 2005)。本研究で精製した Fcp4 を含む FCP の複合体は、BN-PAGE で推定される分子の大きさ(約 66 kDa)から、三ないし五量体であると考えられる。BN-PAGE は膜タンパク質複合体の分離能が非常に高いが、分離される複合体には CBB G-250 が多量に結合している。そのため、分離された複合体を泳動ゲルから切り出して抽出・濃縮しても、そのままでは分光的な解析や色素分析に適さず、また、大量に精製することが難しい。そこで、ショ糖密度勾配遠心法によって FCP の複合体を精製した。

2.0% (w/v) DDMによって可溶化した後、ショ糖密度勾配遠心法によって、チラコイド膜は3つの色素結合性画分に分画された(図 5)。2つの緑色の画分 F2とF3にはそれぞれ主に系I、系IIが含まれていた(図 7)。また、褐色の画分 F1はFCPの複合体である(図 7、8)。先行論文(Nagao et al. 2012)では、本研究と同じ種の珪藻から得られたチラコイド膜を4% (w/v) DDMによって可溶化処理した後にショ糖密度勾配遠心法によって本研究と同様の3つの画分を得てい

る。しかし、それら3つの画分に加え、褐色の画分の上、つまりショ糖密度勾配の最上部に緑色の画分が認められる。この低密度の緑色の画分は、本研究では確認されなかった。上記先行論文では、この緑色の画分について言及を避けているが、ショ糖密度がもっとも低いところに分画されているため、遊離色素である可能性が高いのではないだろうか。本研究では低濃度の界面活性剤で可溶化したことで色素の遊離が抑えられ、より穏和な処理がなされたと考えられる。

上記先行論文 (Nagao et al. 2012, 2013b) でショ糖密度勾配遠心により得られた1つの褐色の画分と2つの緑色の画分は、本研究の画分F1、F2、F3 (図 5) に対応すると考えるのが妥当であろう。同一の珪藻種を用いていることと、SDS-PAGEにおける分離パターン (図 7) から、可溶化に用いられたDDMの濃度は異なるが、本研究の画分F1のふたつの主要ポリペプチドは、NagaoらのFCP-B/Cに対応していると考えるのが順当であろう。そして、高分離能のSDS-PAGE (Kashino et al. 2001) によって、画分F1にはFCP-B/Cに相当する2つのポリペプチドに加え、それらの中間の泳動度のポリペプチドの存在を明らかにすることが出来た (図 8)。また、上記先行論文では、FCP-B/Cに加え、FCP-Aの存在が取り上げられている。現在のところ検証の術はないが、状況的に、FCP-Aに対応するポリペプチドは、系Iが主な構成成分である画分F2 (図 7; 抗PsaA/B抗体) に含まれると考えられる。

動的光散乱測定により、ショ糖密度勾配遠心により得られた画分F1に含まれる粒子の大きさが1つであることが示された (図 9)。これは、この画分が均一な粒子で構成されていることを示す。したがって、高い純度のFCP複合体が得られたといえる。そして、精製したFCP複合体は単一のオリゴマーだと考えるのが妥当である。一種の珪藻のゲノムには30種類前後のFCP遺伝子が存在する

(Armbrust et al. 2004; Bowler et al. 2008)。そして、光化学系Iには他種のFCPが結合していると報告されている (Ikeda et al. 2008, 2013)。670 nmの光吸収測定で推定されたChl量から、画分F1には可溶化されたチラコイド膜の総Chl量の60%以上が結合していることがわかった (表 1 参照)。この研究において精製された全体の60%ものChl aを結合したFCPの複合体が、ほぼ単一のオリゴマーである



ことは興味深い。なお、動的光散乱に基づく推定分子量がBN-PAGEで得られた分子の大きさの約7倍の大きさであった。BN-PAGEでは、CBB G-250が膜タンパク質複合体に結合していた界面活性剤と置換されるとみられ、標準物質にも同様にCBB G-250が結合している。そのため、分子の大きさの評価に界面活性剤の影響が出にくいと考えられる。一方、膜タンパク質複合体の大きさを動的光散乱で評価する場合は、複合体に多量に結合している界面活性剤の存在が反映され、BN-PAGEで得られた分子の大きさよりも大きな値となったのではないかと考えられる。

画分F1をSDS-PAGEによって分離して得られたポリペプチドa、b、cのアミノ酸配列分析を行った(図 10)。しかし、系I複合体に結合したFCP(Ikeda et al. 2008)と同様に、N末端がブロックされていた。そこで、内部配列解析を行うことで、各ポリペプチドの同定を目指した。リシルエンドペプチダーゼによって限定消化、電気泳動によって分離した(図 11)(Kashino et al. 2002)。ポリペプチドa、b、cそれぞれから得られた断片のパターンは異なり、ポリペプチドa、b、cが異なるポリペプチドであることが推測できる。分離されたポリペプチド断片のアミノ酸配列解析を行ったところ、4つのポリペプチド断片だけから、意味のある配列を検出することができた(図 11)。これらの内、3つは同じ配列で、KHGRIAQLAFLGNであり、2つはポリペプチドaから、1つはポリペプチドcから得られた。ゲノム情報が公開されている中心目珪藻*T. pseudonana* (<http://genome.jgi.doe.gov/Thaps3/Thaps3.home.html>) に対して相同性解析を行い、Lhcf3 (Fcp3) とLhcf4 (Fcp4) が該当した。

両ポリペプチドには分子の大きさの差がほとんどない。そこで、FCP複合体を新規開発した等電点二次元電気泳動によって解析したが、2つのポリペプチドのpIはやはり近似していたものの、ポリペプチドaのpIがポリペプチドbよりも小さかった(図 12)。*T. pseudonana*は種が異なり、また、現時点で珪藻のトランジットペプチドの予測が可能ではないので、*T. pseudonana*の各FCPの分子量もpIも正確には計算できないが、表2は各遺伝子から予測される前駆ポリペプチドの分子量とpIを示したものである。そのような前提の元に、図 12の2つのポリ



ペプチドのスポットから計算されるpIの範囲に収まるのはLhcf3とLhcf4のみである。そして、Lhcf3の全長での予測分子量とpIは、それぞれ20,717と4.79、Lhcf4はそれぞれ21,807と4.71である。ポリペプチドaとbの分子の大きさとpIの違いから、それぞれはLhcf4とLhcf3に対応することが期待される。

そこで、未だ不十分な整備状況ではあるが、*C. gracilis*のドラフトゲノム解析データを使い、*lhcf3*、*lhcf4*に相同の遺伝子および翻訳産物が「KHGRIAQLAFLGN」の配列を有する遺伝子を探索した。その結果、翻訳産物が「KHGRIAQLAFLGN」を有する遺伝子は2つのみで、それぞれは*lhcf3*、*lhcf4*と相同の遺伝子と考えられた。*C. gracilis*の*lhcf3*相同遺伝子翻訳産物の予測分子量とpIはそれぞれ21,301と4.81、*lhcf4*はそれぞれ21,298と4.76であった。もちろん、ドラフトゲノムデータであるのでこれらふたつ以外に翻訳産物が「KHGRIAQLAFLGN」をもつ遺伝子の存在を否定はできないが、現時点では*T. pseudonana*のLhcf4とLhcf3に相同のポリペプチドがポリペプチドaとbに対応する可能性が高いと考えられる。

本研究で精製したFCP複合体は全体量の60%程度のChl *a*が結合しており、3種のタンパク質によって構成されている。アミノ酸配列解析や等電点電気泳動によって、それら3種のうち、多量に含まれる2つのタンパク質が*T. pseudonana*のFcp3とFcp4に相同のタンパク質である可能性を示すことができた。珪藻には約30種類のFCP遺伝子が存在しているにもかかわらず (Armbrust et al. 2004; Bowler et al. 2008)、精製したFCP複合体がこのような単純な組成であることは注目すべき結果である。これは、複数の先行研究 (Grouneva et al. 2011, 2013; Lepetit et al. 2007; Nagao et al. 2013a) でMS分析により多数のFCPが含まれているとされる複合体であるので、ポリペプチドバンドa、c (図 8) に複数のポリペプチドが含まれている可能性を完全に否定することはできない。しかし、40種のFCPの遺伝子を有する*P. tricornutum*から高度に精製されたFCPの複合体が、ほんの2つの種類のFCPで構成されていることと (Joshi-Deo 2010)、本研究で示したように、*C. gracilis*の主要なアンテナとして機能するFCPの複合体が単純な構成であることは良く一致している。

FCP複合体の吸光スペクトル（図 13）から、FCP複合体にはChl *c*やcarotenoidがチラコイド膜よりも多量に含まれていることが示唆された。HPLCによる色素分析により、チラコイド膜に比べてChl *c*やfucoxanthinが多量に存在していることが確認され、一方で、強光保護に関わるdiadinoxanthinや $\beta$ -caroteneの割合は低くなっていることがわかった（図 7）。このため、fucoxanthinに対するdiadinoxanthinの割合が大きく減少したことになる。

77 Kにおける蛍光スペクトルおよび蛍光励起スペクトルの測定により（図 15）、FCPに結合したfucoxanthinからChl *a*へ、そしてFCPの複合体がチラコイド膜中に存在する健全な状態では、さらにそのChl *a*から系I・系II複合体へ光エネルギーの伝達が起こっていることが示された。したがって、diadinoxanthinの含有量が極めて低いことと考え合わせると、Fcp4を含んでいるFCPの複合体は強光保護というより、もっぱら光化学系反応中心複合体のアンテナとして働いているとすることができる。つまり、生体中でFCPに結合したfucoxanthinによって捕集された光エネルギーはFCP複合体中のChl *a*に伝達され、そしてその後、光化学系複合体に結合しているChl *a*に伝達されることになる。

珪藻ではdiadinoxanthinサイクルが強光からの光化学系保護のために働いていると考えており、強光条件で培養された場合、diadinoxanthin + diatoxanthin の細胞内含量が増加する（Arsalane et al. 1994; Ban et al. 2006; Ikeya et al. 2000; Olaizola et al. 1994; Olaizola and Yamamoto 1994）。そして、それに伴い、光照射下では過剰な光エネルギーを熱として消散する非光化学的消光（NPQ）の活性が高くなる。本研究で精製したFCPの複合体には少量のdiadinoxanthinサイクル色素しか結合していなかったため、強光保護のためのNPQ機能はほとんど無いと考えられる。実際、*C. gracilis*細胞は $300 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 程度の光の元で培養されても、同条件の*P. tricornutum*よりもdiadinoxanthinサイクル色素含量が小さく、NPQ活性も顕著ではない。したがって、色素組成分析や77 Kでの蛍光スペクトル測定等に基づき、*C. gracilis*細胞内でのFCPの複合体の機能が、強光保護というより、もっぱら光化学系反応中心複合体のアンテナであるという本研究の結論は妥当である。これは、同じ種の珪藻から単離した同じFCPの複合体と見られる複合体、

FCP-B/C、が過剰光エネルギー消散機能を有しているという主張 (Nagao et al. 2013b) とは一線を画すものである。より強光の環境では、Lhcxに属するFCPなど (Bailleul et al. 2010)、他の種類のFCPが発現されて強光保護の機能を果たすのかもしれない。

珪藻が多様な環境に適応・馴化して活発な光合成を行っている理由のひとつは、変化する光環境に対しての応答能力であると考えられる。本研究で対象にしたFCPの複合体は、特に珪藻が弱光環境で効率よく光合成を行う上で、大変重要な役割を担っていると考えられる。そして、高等植物のLHCII三量体は、光環境に応じて、一部が系IIから遊離し、系Iに結合して系Iのアンテナとして機能する仕組みが働いている (ステート遷移)。本研究の対象とした珪藻のチラコイド膜に多量に含まれるFCPの複合体が、高等植物のLHCII三量体と同様に、光化学反応中心複合体に直接には結合しておらず、生育光強度に応じて間接的に結合する光化学系を変えることにより、2つの光化学系の励起バランスの調節に関わっていることが考えられる。

表2 *T. pseudonana*ゲノム上に見出される*fc*p遺伝子の翻訳産物の予測pIおよび分子量。ExPASyのpI/Mw計算ツール ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) (Gasteiger et al. 2005) を用いて計算した値である。

		pI	MW
Lhcf	Lhcf1	4.47	20354
	Lhcf2	4.54	21142
	Lhcf3	4.79	20718
	Lhcf4	4.71	21807
	Lhcf5	4.95	21515
	Lhcf6	5.17	21786
	Lhcf7	4.69	20883
Lhcr	Lhcr1	5.14	21780
	Lhcr2	4.84	27129
	Lhcr3	5.45	21420
	Lhcr4	4.79	21696
	Lhcr5	5.40	26361
	Lhcr6	4.79	22975
	Lhcr7	5.20	22738
	Lhcr8	5.47	23489
	Lhcr9	4.78	27691
	Lhcr10	6.43	23358
	Lhcr11	5.08	27203
	Lhcr12	5.04	27288
	Lhcr13		
	Lhcr14	5.67	21674
Lhrx	Lhcx1	4.49	22205
	Lhcx2	4.49	22191
	Lhcx3		
	Lhcx4	4.80	24478
	Lhcx5	4.51	25528
	Lhcx6	4.69	27330



## <引用文献>

- Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE, Bechner M, Brzezinski MA, Chaal BK, Chiovitti A, Davis AK, Demarest MS, Detter JC, Glavina T, Goodstein D, Hadi MZ, Hellsten U, Hildebrand M, Jenkins BD, Jurka J, Kapitonov VV, Kroger N, Lau WW, Lane TW, Larimer FW, Lippmeier JC, Lucas S, Medina M, Montsant A, Obornik M, Parker MS, Palenik B, Pazour GJ, Richardson PM, Rynearson TA, Saito MA, Schwartz DC, Thamtracoln K, Valentin K, Vardi A, Wilkerson FP, Rokhsar DS (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* 306(5693): 79–86. doi:10.1126/science.1101156
- Arsalane W, Rousseau B, Duval J-C (1994) Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: competition between photoprotection and photoinhibition. *Photochem Photobiol* 60: 237–243
- Bailleul B, Rogato A, de Martino A, Coesel S, Cardol P, Bowler C, Falciatore A, Finazzi G (2010) An atypical member of the light-harvesting complex stress-related protein family modulates diatom responses to light. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(42): 18214–18219. doi:10.1073/pnas.1007703107
- Ban A, Aikawa S, Hattori H, Sasaki H, Sampei M, Kudoh S, Fukuchi M, Satoh K, Kashino Y (2006) Comparative analysis of photosynthetic properties in ice algae and phytoplankton inhabiting Franklin Bay, the Canadian Arctic, with those in mesophilic diatoms during CASES 03-04. *Polar Biosci* 19: 11–28
- Berkaloﬀ C, Caron L, Rousseau B (1990) Subunit organization of PSI particles from brown algae and diatoms: polypeptide and pigment analysis. *Photosynth Res* 23(2): 181–193. doi:10.1007/BF00035009
- Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, Maheswari U, Martens C, Maumus F, Otiﬀar RP, Rayko E, Salamov A, Vandepoele K, Beszteri B, Gruber A, Heijde M, Katinka M, Mock T, Valentin K, Verret F, Berges JA, Brownlee C, Cadoret JP, Chiovitti A, Choi CJ, Coesel S, De Martino A, Detter JC, Durkin C, Falciatore A, Fournet J, Haruta M, Huysman MJ, Jenkins BD, Jiroutova K, Jorgensen RE, Joubert Y, Kaplan A, Kroger N, Kroth PG, La Roche J, Lindquist E, Lommer M, Martin-Jezequel V, Lopez PJ, Lucas S, Mangogna M, McGinnis K, Medlin LK, Montsant A, Oudot-Le Secq MP, Napoli C, Obornik M, Parker MS, Petit JL, Porcel BM, Poulsen N, Robison M, Rychlewski L, Rynearson TA, Schmutz J, Shapiro H, Siaut M, Stanley M, Sussman MR, Taylor AR,



- Vardi A, von Dassow P, Vyverman W, Willis A, Wyrwicz LS, Rokhsar DS, Weissenbach J, Armbrust EV, Green BR, Van de Peer Y, Grigoriev IV (2008) The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456(7219): 239–244. doi:10.1038/nature07410
- Büchel C (2003) Fucoxanthin-chlorophyll proteins in diatoms: 18 and 19 kDa subunits assemble into different oligomeric states. *Biochemistry* 42(44): 13027–13034. doi:10.1021/bi0349468
- Büchel C (2014) Fucoxanthin–chlorophyll-proteins and non-photochemical fluorescence quenching of diatoms. In: Demmig-Adams B, Garab G, Adams WW III, Govindjee (eds) Non-photochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 259–275
- Caron L, Berkaloﬀ C, Duval JC, Jupin H (1987) Chlorophyll fluorescence transients from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: relative rates of cyclic phosphorylation and chlororespiration. *Photosynth Res* 11(2): 131–139. doi:10.1007/BF00018271
- Dekker JP & Boekema EJ (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta* 1706: 12–39. doi:10.1016/j.bbabi.2004.09.009
- Demmig-Adams B (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim Biophys Acta* 1020(1): 1–24
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* 8(5): 978–984. doi:10.1110/ps.8.5.978
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2007) Locating proteins in the cell using targetP, signalP and related tools. *Nat Protoc* 2(4): 953–971. doi:10.1038/nprot.2007.131
- Fawley MW, Grossman AR (1986) Polypeptides of a light-harvesting complex of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* are synthesized in the cytoplasm of the cell as precursors. *Plant Physiol* 81(1): 149–155
- Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski PG (1998) Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281: 237–240.
- Fujita Y, Ohki K (2004) On the 710 nm fluorescence emitted by the diatom *Phaeodactylum tricornutum* at room temperature. *Plant Cell Physiol* 45(4): 392–397
- Furuya K, Hayashi M, Yabushita Y (1998) HPLC determination of phytoplankton pigments using N,N-dimethylformamide. *J Oceanogr* 54(2):199–203

- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, pp571-607, Humana Press.
- Gildenhoff N, Amarie S, Gundermann K, Beer A, Büchel C, Wachtveitl J (2010) Oligomerization and pigmentation dependent excitation energy transfer in fucoxanthin–chlorophyll proteins. *Biochim Biophys Acta* 1797(5): 543–549. doi:10.1016/j.bbabo.2010.01.024
- Green BR (2003) The evolution of light-harvesting antennas. In: Green BR, Parson WW (eds) Light-harvesting antennas in photosynthesis. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 129–168
- Grouneva I, Rokka A, Aro EM (2011) The thylakoid membrane proteome of two marine diatoms outlines both diatom-specific and species-specific features of the photosynthetic machinery. *J Proteome Res* 10(12): 5338–5353. doi:10.1021/pr200600f
- Gundermann K, Schmidt M, Weisheit W, Mittag M, Büchel C (2013) Identification of several sub-populations in the pool of light harvesting proteins in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochim Biophys Acta* 1827(3): 303–310. doi:10.1016/j.bbabo.2012.10.017
- Hashihama F, Umeda H, Hamada C, Kudoh S, Hirawake T, Satoh K, Fukuchi M, Kashino Y (2010) Light acclimation states of phytoplankton in the Southern Ocean, determined using photosynthetic pigment distribution. *Mar Biol* 157(10): 2263–2278. doi:10.1007/s00227-010-1494-5
- Horner, R.A., 1976. Sea-ice organisms. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 14, 167-182.
- Ikeda Y, Satoh K, Kashino Y (2005) Characterization of photosystem I complexes purified from a diatom, *Chaetoceros gracilis*. In: van der Est A, Bruce D (eds) Photosynthesis: fundamental aspects to global perspectives, vol 1. Alliance Communications Group, Kansas, pp 38–40
- Ikeda Y, Komura M, Watanabe M, Minami C, Koike H, Itoh S, Kashino Y, Satoh K (2008) Photosystem I complexes associated with fucoxanthin–chlorophyll-binding proteins from a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*. *Biochim Biophys Acta* 1777: 351–361. doi:10.1016/j.bbabo.2008.01.011

- Ikeya T, Kashino Y, Kudoh S, Imura S, Watanabe K, Fukuchi M (2000) Acclimation of photosynthetic properties in psychrophilic diatom isolates under different light intensities. *Polar Biosci* 13: 43–54
- Ikeda Y, Yamagishi A, Komura M, Suzuki T, Dohmae N, Shibata Y, Itoh S, Koike H, Satoh K (2013) Two types of fucoxanthin–chlorophyll-binding proteins tightly bound to the photosystem I core complex in marine centric diatoms. *Biochim Biophys Acta* 1827: 529–539. doi:10.1016/j.bbabi.2013.02.003
- Ikeuchi M, Takio K, Inoue Y (1989) N-terminal sequencing of photosystem II low-molecular-mass proteins. 5 and 4.1 kDa components of the O<sub>2</sub>-evolving core complex from higher plants. *FEBS Lett*; **242**: 263–269.
- Joshi-Deo J, Schmidt M, Gruber A, Weisheit W, Mittag M, Kroth PG, Büchel C (2010) Characterization of a trimeric light-harvesting complex in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* built of FcpA and FcpE proteins. *J Exp Bot* 61(11): 3079–3087. doi:10.1093/jxb/erq136
- Kashino Y (2003) Separation methods in the analysis of protein membrane complexes. *J Chromatogr B* 797(1–2): 191–216
- Kashino Y, Kudoh S (2003) Concerted response of xanthophyll-cycle pigments in a marine diatom, *Chaetoceros gracilis*, to the shifts of light condition. *Phycol Res* 51(3): 168–172
- Kashino Y, Enami I, Satoh K, Katoh S (1990) Immunological cross-reactivity among corresponding proteins of photosystems I and II from widely divergent photosynthetic organisms. *Plant Cell Physiol* 31: 479–488
- Kashino Y, Yamashita M, Koike H, Satoh K (1995) Properties of n-heptyl-β-D-thioglucoside-extracted photosystem II core complexes from spinach. In: Mathis P (ed) Photosynthesis: from light to biosphere, vol I. Kluwer, Dordrecht, pp 631–634
- Kashino Y, Koike H, Satoh K (2001) An improved sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis system for the analysis of membrane protein complexes. *Electrophoresis* 22(6):1004–1007
- Kashino Y, Koike H, Yoshio M, Egashira H, Ikeuchi M, Pakrasi HB, Satoh K (2002) Low-molecular-mass polypeptide components of a photosystem II preparation from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus vulcanus*. *Plant Cell Physiol* 43(11): 1366–1373

- Kashino Y, Harayama T, Pakrasi HB, Satoh K (2007) Preparation of membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *J Chromatogr B* 849: 282–292
- Kirk JTO (1994) Light & Photosynthesis in Aquatic Ecosystems, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge
- Lepetit B, Volke D, Szabo M, Hoffmann R, Garab G, Wilhelm C, Goss R (2007) Spectroscopic and molecular characterization of the oligomeric antenna of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochemistry* 46(34): 9813–9822. doi:10.1021/bi7008344
- Liu Z, Yan H, Wang K, Kuang T, Zhang J, Gul L, An X, Chan W (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* 428: 287–292
- Lohr M, Wilhelm C (1999) Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(15): 8784–8789
- Nagao R, Ishii A, Tada O, Suzuki T, Dohmae N, Okumura A, Iwai M, Takahashi T, Kashino Y, Enami I (2007) Isolation and characterization of oxygen-evolving thylakoid membranes and photosystem II particles from a marine diatom *Chaetoceros gracilis*. *Biochim Biophys Acta* 1767: 1353–1362. doi:10.1016/j.bbabo. 2007.10.007
- Nagao R, Tomo T, Noguchi E, Nakajima S, Suzuki T, Okumura A, Kashino Y, Mimuro M, Ikeuchi M, Enami I (2010) Purification and characterization of a stable oxygen-evolving photosystem II complex from a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*. *Biochim Biophys Acta* 1797(2): 160–166. doi:10.1016/j.bbabo. 2009.09.008
- Nagao R, Tomo T, Noguchi E, Suzuki T, Okumura A, Narikawa R, Enami I, Ikeuchi M (2012) Proteases are associated with a minor fucoxanthin chlorophyll *a/c*-binding protein from the diatom, *Chaetoceros gracilis*. *Biochim Biophys Acta* 1817(12): 2110–2117. doi:10.1016/j.bbabo.2012.08.005
- Nagao R, Takahashi S, Suzuki T, Dohmae N, Nakazato K, Tomo T (2013a) Comparison of oligomeric states and polypeptide compositions of fucoxanthin chlorophyll *a/c*-binding protein complexes among various diatom species. *Photosynth Res* 117(1–3): 281–288. doi:10.1007/s11120-013-9903-5
- Nagao R, Yokono M, Akimoto S, Tomo T (2013b) High excitation energy quenching in fucoxanthin chlorophyll *a/c*-binding protein complexes from the diatom *Chaetoceros gracilis*. *J Phys Chem B* 117(23): 6888–6895. doi:10.1021/jp403923q
- Nelson DM, Treguer P, Brzezinski MA, Leynaert A, Queguiner B (1995) Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: revised global estimates, comparison with



- regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Glob Biogeochem Cycles* 9: 359–372
- Olaizola M, Yamamoto HY (1994) Short-term response of the diadinoxanthin cycle and fluorescence yield to high irradiance in *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 30: 606–612
- Olaizola M, Laroche J, Kolber Z, Falkowski PG (1994) Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynth Res* 41: 357–370
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 975: 384–394
- Richard C, Ouellet H, Guertin M (2000) Characterization of the LI818 polypeptide from the green unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Mol Biol* 42: 303–316.
- Rijgersberg and Ames (1980) Fluorescence and energy transfer in phycobiliprotein-containing algae at low temperature, *Biochim Biophys Acta* 593: 261–271. doi: 10.1016/0005-2728(80)90064-X
- Savard F, Richard C, Guertin M (1996) The *Chlamydomonas reinhardtii* LI818 gene represents a distant relative of the *cabI/II* genes that is regulated during the cell cycle and in response to illumination, *Plant Mol Biol* 32: 461–473.
- Scala S, Carels N, Falciatore A, Chiusano ML, Bowler C (2002) Genome properties of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol* 129(3): 993–1002. doi:10.1104/pp.010713
- Schägger H (2002) Blue native electrophoresis. In: Hunte C, von Jagow G, and Schägger H, (eds) *Membrane Protein Purification and Crystallization: A Practical Guide*, pp. 105–130, Academic Press, Amsterdam
- Shibata K (1959) Spectrophotometry of translucent biological materials—opal glass transmission method. *Methods Biochem Anal* 7: 77–109. doi:10.1002/9780470110232.ch3
- Sims PA, Mann DG, Medlin LK (2006) Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data. *Phycologia* 4: 361–402
- Sonoike K, Katoh S (1990) Variation and estimation of the differential absorption coefficient of P-700 in spinach photosystem I preparations. *Plant Cell Physiol* 31(8): 1079–1082



- Sugiura M, Harada S, Manabe T, Hayashi H, Kashino Y, Boussac A (2010) Psb30 contributes to structurally stabilise the Photosystem II complex in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. *Biochim Biophys Acta* 1797(8): 1546–1554. doi:10.1016/j.bbabin.2010.03.020
- Takahashi T, Inoue-Kashino N, Ozawa S, Takahashi Y, Kashino Y, Satoh K (2009) Photosystem II complex in vivo is a monomer. *J Biol Chem* 284(23): 15598–15606. doi:10.1074/jbc.M109.000372
- Zhu SH, Green BR (2010) Photoprotection in the diatom *Thalassiosira pseudonana*: role of LI818-like proteins in response to high light stress. *Biochim Biophys Acta* 1797(8): 1449–1457. doi:10.1016/j.bbabin.2010.04.003
- 菓子野康浩 (2009) Blue-Native PAGE 低温科学 67 (光合成研究法) : 373-376.
- 長島秀之 (2010) 温泉微生物と社会 温泉科学 60, 278–286.

<参考文献>

本学位論文の一部は、以下の原著論文として公表済み

1. Tomoko Ishihara, Kentaro Ifuku, Eiki Yamashita, Yuko Fukunaga, Yuri Nishino, Atsuo Miyazawa, Yasuhiro Kashino & Natsuko Inoue-Kashino (2015) Utilization of light by fucoxanthin-chlorophyll-binding protein in a centric diatom, *Chaetoceros gracilis*. ***Photosynthesis Research*** **126**: 437-447.

## <謝辞>

本研究を行うに当たりご指導、ご鞭撻を賜りました兵庫県立大学大学院生命理学研究科の菓子野康浩先生に厚く御礼申し上げます。また、多くのご助言、ご協力いただきました宮澤淳夫先生、福永優子先生、ならびに研究室の皆様に深く感謝いたします。

LC-MS/MS 解析を行うに当たりお世話になりました岡山大学の高橋裕一郎教授、抗 FCP 抗体を分与くださった British Columbia 大学の Beverly R. Green 教授に御礼申し上げます。

京都大学の伊福健太郎先生、大阪大学の山下栄樹先生に大変多くのご助言、ご協力をいただきました。御礼申し上げます。

主査の吉久徹教授、副査の吉田秀郎教授には、グループ指導などでご鞭撻頂きました。御礼申し上げます。

本研究は 24 年度笹川科学研究助成を受け行いました。御礼申し上げます。

ありがとうございました。