

令和元年6月6日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07690

研究課題名(和文) 酸素発生を調節する光化学系II膜表在性タンパク質の相互作用と分子機能

研究課題名(英文) Interaction and function of the extrinsic subunits of photosystem II regulating the oxygen-evolving reaction.

研究代表者

伊福 健太郎 (Ifuku, Kentaro)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：50359783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：光化学系IIの酸素発生反応を調節する膜表在性タンパク質は、各々の真核光合成生物で独自の進化を遂げたことが知られている。本研究では、特に緑色植物型の光化学系II(PSII)に特有な膜表在性タンパク質であるPsbPに関して、そのタンパク質相互作用と分子機能解析を行った。その結果、進化の過程で、原核生物型のPsbPホモログがN末端配列やループ4領域などを新たに獲得してPsbPとなり、PSII膜表在性タンパク質として水分解・酸素発生反応を調節する仕組みが解明された。さらに原核生物型のPsbPホモログ自体もPPL1として緑色植物の光環境適応に重要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の光合成において、光化学系IIが行う水酸化-酸素発生反応は、地球上の生命を支える究極の光エネルギー変換反応である。その分子メカニズムは、シアノバクテリアという光合成を行うバクテリアのタンパク質を用いて解析されてきたが、我々が普段目にする陸上植物などの緑色植物は、シアノバクテリアとは異なるタンパク質を用いて光化学系IIの水酸化-酸素発生反応の最適化と調節を行なっている。本研究では、緑色植物に特有に光化学系IIに結合している膜表在性タンパク質、PsbPに焦点をあて、新しい光化学系II活性の調節機構を見出すことに成功した。得られた知見は酸素発生型光合成生物の進化を考える上でも重要である。

研究成果の概要(英文)：The extrinsic subunits of photosystem II (PSII) regulate the oxygen-evolving reaction, while their subunit composition differs among the eukaryotic photosynthetic organisms. In this study, we have investigated the interaction and function of the PsbP protein, which is specifically developed in the green plants. Our results suggest that a prokaryote-type PsbP became PsbP by the addition of the N-terminal extension and the specific loop regions to develop the functions as an PSII extrinsic subunit, essential for the optimum oxygen-evolving activity. Furthermore, we revealed the function of prokaryote-type PsbP (PPL1) in green plants during photosynthetic acclimation in fluctuating light environments.

研究分野：植物分子生物学・生化学

キーワード：光合成 光化学系II 水酸化反応 酸素発生反応 タンパク質相互作用 タンパク質立体構造 光阻害
光合成電子伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光化学系 II (Photosystem II: PSII) は、2011 年に好熱性シアノバクテリア由来の PSII の X 線結晶構造が原子分解能で明らかとなり、水酸化-酸素発生の反応機構と調節機構の解明が世界中で進められている。一方、PSII の膜表在タンパク質については、その組成がシアノバクテリアと真核光合成生物で異なるため、緑色植物型の PSII における膜表在タンパク質の結合配置や機能発現の詳細は未解明であった。

2. 研究の目的

本研究では、化学架橋と高感度質量分析などの情報をもとに、緑色植物型 PSII における膜表在性タンパク質の分子配置を詳細に解析する。さらに新たに見出したタンパク質間の相互作用が、PSII の機能調節に生体内でどのように機能しているかを、*in vitro* 再構成実験と形質転換植物を用いた *in vivo* の解析から明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

緑色植物特有の PSII 膜表在性タンパク質である PsbP や PsbQ、及び、申請者が見出した PsbP-like protein (PPL1) について、相互作用する PSII タンパク質を、化学架橋や質量分析などを用いて生化学的に同定する。さらに得られた結果を、ESR や FTIR などの物理化学的知見と統合し、緑色植物特有の膜表在性タンパク質によって実現される PSII 複合体の安定化と活性化の分子機構を解析する。

4. 研究成果

1) 高等植物独自の光化学系 II (PSII) 表在性タンパク質である PsbP の N 末端配列が、PSII の副次的電子伝達に関わる Cyt b_{559} の酸化還元電位を調節することを化学架橋と *in vitro* 再構成実験で証明した。さらに PsbP の N 末端配列と相互作用する Cyt b_{559} の酸化還元電位に、光化学系 I 循環的電子伝達を阻害することが知られている Antimycin A が作用し、光阻害を引き起こすこと認めた (図 1)。Antimycin A は PsbP の結合には影響しなかったため、各々別の機構で作用すると考えられた。以上の結果より、PSII 周辺の循環的電子伝達の機能について、新しい機能を提唱した (Takagi et al. 2019)。

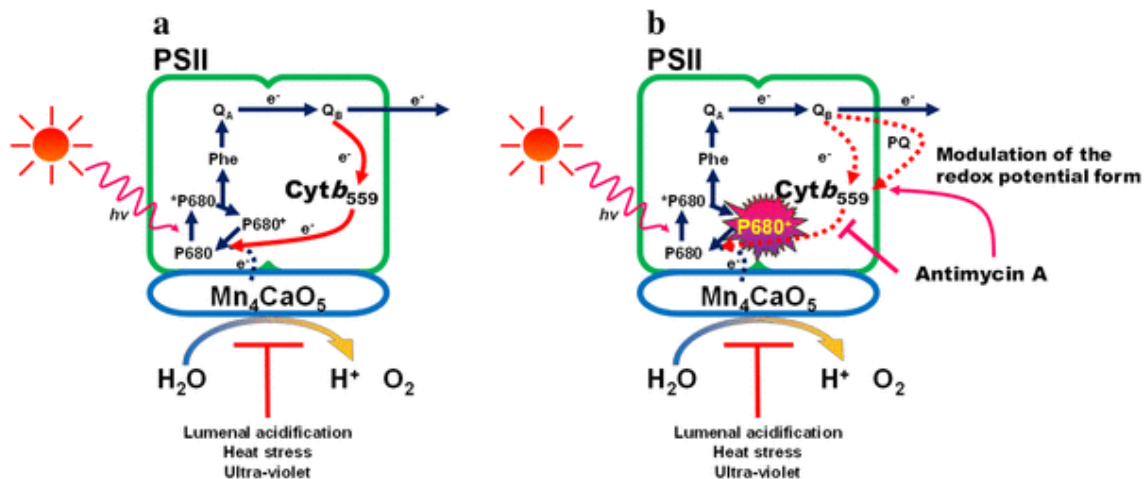


図 1. a) Cyt b_{559} を介した PSII 循環的電子伝達の機能と、b) アンチマイシンの効果

2) クラミドモナス *psbP* 欠損株 (BF25) の変異位置を同定し、His タグ配列を付加した *psbP* 遺伝子の形質転換による導入で機能相補に成功した。さらに導入 PsbP-His を利用して PSII-LHCII 超複合体の精製に成功した (Nishimura et al. 2017)。アフィニティ精製された PSII 複合体を SDS-PAGE により分離後、各バンドに含まれるタンパク質を LC-MS 解析に供した。その結果、精製 PSII 複合体には主要な PSII 膜内在性サブユニットに加え、全ての表在性サブユニット、ならびに各種アンテナタンパク質が含まれていることを確認した。続いて、アフィニティ精製 PSII サンプルをネガティブ染色し、電子顕微鏡解析を行った。その結果、集光アンテナタンパク質複合体を結合した $C_2S_2M_2$ 型、あるいは $C_2S_2M_2L_2$ 型であると考えられる PSII-LHCII 超複合体の像を検出することができた。さらに上記の実験系を用いて、PsbP の N 末端配列が PSII 複合体のアッセブリーに重要であることを *in vivo* で証明した。

3) PsbP の PSII 複合体における結合様式を検証するために、スピンラベル法と再構成実験を用いた PELDOR 測定を行なった (Asada et al. 2018)。ホウレンソウ由来 PsbP について、立体構造の外側にあるアミノ酸残基 (Pro20、Ser82、Ala111、Ala186) をそれぞれ Cys に変異させ、

スピラベル(4-Maleimido TEMPO)を導入した。高濃度 NaCl 洗浄により PS II の表在性サブユニット PsbP、PsbQ を除去した後、各々のラベル化 PsbP を再構成した。まず CW-ESR 測定により、PS II に再構成した PsbP のスピラベルの運動性を調べた。その結果、PsbP の Ala111 残基は運動性の自由度が小さく、PS II コアと PsbP の結合に挟まれる位置にあると考えられた。一方、Ala186 は運動性の自由度が大きく、PS II との結合面と反対側に位置すると考えられた。次に PsbP に結合したスピラベルと PSII 内の安定な YD ラジカル間の PELDOR 測定を行い、変異体導入したアミノ酸残基と YD ラジカルとの位置関係から、PsbP の結合様式を推定し、最近報告された電子顕微鏡による PSII 複合体構造と比較した(図2)。その結果、結果には相違が認められ、PsbP の結合様式についてはさらなる検討が必要だと考えられた。

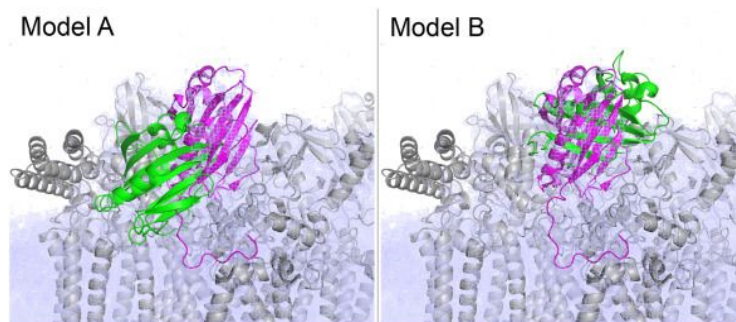


図2. PELDOR 解析の結果から考えられる PsbP 結合モデル(緑)と、電子顕微鏡の構造(紫)との違い。Model A と B は二つの可能性を示す。

4) PsbP の原核生物型ホモログである PPL1 に関して、詳細な生化学的解析を行うとともに、遺伝子欠損変異体 (*pp11-2*) を新たに単離して分子機能解析を行った。PPL1 は葉緑体チラコイド膜のストロマラメラ領域とグラナマージン領域に分布し、PSII 分子集合の中間体だけでなく、集光タンパク質(LHCII)にも相互作用することが示唆された。実際、*pp11-2* では、PSII の最大量子収率 F_v/F_m が弱光条件でも低く、ステート遷移における LHCII の PSII から解離も早いなど、PSII コア複合体と LHCII の相互作用が不完全であることが示唆された。その結果、*pp11-2* は自然光などの変動する光環境での生育が野生株に比べて劣っていた。

以上の結果から、緑色植物の進化の過程で、原核生物型の PsbP ホモログが N 末端配列やループ領域などを新たに獲得して PsbP となり、PSII 膜表在性タンパク質として水分解-酸素発生反応を調節する仕組みが解明された。さらに原核生物型の PsbP ホモログ自体も PPL1 として緑色植物の光環境適応に重要であることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Takagi, D., Ifuku, K., Nishimura, T., Miyake, C. (2019) Antimycin A inhibits cytochrome b_{559} -mediated cyclic electron flow within photosystem II. *Photosynth. Res.* 139(1-3):487-498. doi: 10.1007/s11120-018-0519-7.

Asada, M., Nishimura, T., Ifuku, K., Mino, H. (2018) Location of the extrinsic subunit PsbP in photosystem II studied by pulsed electron-electron double resonance. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics* 1859: 394-399.

Nishimura, T., Sato, F., *Ifuku, K. (2017) In vivo system for analyzing the function of the PsbP protein using *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.* 133: 117-127.

高木大輔、伊福健太郎「アンチマイシン A が引き起こす光化学系 II 内部のシトクロム b_{559} への阻害効果」*光合成研究*, 28(2), 82-93 (2018)

伊福健太郎「光化学系 II 表在性タンパク質の分子進化と酸素発生における役割」, *光合成研究*, 27(3), 191-200 (2017)

〔学会発表〕(計11件)

Kentaro Ifuku, "The PsbP- and PsbQ-family proteins as assembly factors for thylakoid membrane protein complexes", the 1st Asia-Oceania International Congress on Photosynthesis (AOICP2018), Beijing, China, 2018年8月

高木大輔、伊福健太郎、西村太志、三宅親弘「光化学系 II シトクロム b_{559} におけるアンチマイシン A の影響」第59回日本植物生理学会年会, 2018年3月

Kentaro Ifuku, "INTERACTION AND FUNCTION OF THE MEMBRANE-EXTRINSIC PROTEINS OF PHOTOSYSTEM II IN HIGHER PLANTS" International Conference, Photosynthesis Research for Sustainability, Hyderabad, India, 2017年10月

Kentaro Ifuku, “ Evolution and function of OEC-family proteins in chloroplasts ”, 第 55 回生物物理学会年会シンポジウム, 熊本, 2017 年 9 月

伊福健太郎「光化学系 II 表在性タンパク質の分子進化と水分解反応における役割」, 第 8 回日本光合成学会年会およびシンポジウム, 龍谷大学, 2017 年 5 月

Kentaro Ifuku, “ Management of PSII photoinhibition to suppress ROS production in thylakoid membranes ”, 第 58 回日本植物生理学会年会シンポジウム, 鹿児島, 2017/03/16

Mino H., Asada M., Nishimura T., Sato F, Ifuku K, “ Structure of extrinsic subunit PsbP of photosystem II investigated by PELDOR ”, The 17th International Congress on Photosynthesis Research, Maastricht, 2016 年 8 月

Nishimura T, Sato F, Ifuku K, “ Functional complementation and purification of photosystem II with His-tagged PsbP protein in *Chlamydomonas reinhardtii* ”, The 17th International Congress on Photosynthesis Research, Maastricht, 2016 年 8 月

Ifuku K, Nishimura T, Nagao R, Nield J, Ido K, Noguchi T, Sato F, “ Multiple interactions of the PsbP protein regulate the electron transfer within photosystem II ”, The 17th International Congress on Photosynthesis Research, Maastricht, 2016 年 8 月

伊福健太郎「光合成の水分解-酸素発生反応の制御機構 ~ 植物が進化の過程で得たもの ~ 」, 中部大学, 2016 年度 33rd O-say Open Seminar, 2016 年 6 月

Kentaro Ifuku, “ Regulation of the oxygen-evolving reaction of photosystem II by the membrane-extrinsic subunits in higher plants ” International Conference, Photosynthesis Research for Sustainability, Pushchino, Russia, 2016 年 6 月

〔図書〕(計 0 件)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。