

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2007～2009

課題番号：19687003

研究課題名（和文） 葉緑体における包括的なタンパク質分解則の解明

研究課題名（英文） Analysis of the protein-turnover mechanisms in the chloroplast

研究代表者

田中 亮一 (TANAKA RYOUICHI)

北海道大学・低温科学研究所・准教授

研究者番号：20311516

研究成果の概要（和文）：葉緑体タンパク質である chlorophyllide a oxygenase において、このタンパク質の正常な turnover に必要な 10 残基の配列を同定した。また、この配列が葉緑体の Clp プロテアーゼのデグロンである傍証を得た。さらに、この配列に類似な配列が他の葉緑体タンパク質にも見つかり、デグロンとして機能しうることが明らかになった。これらの結果から、このデグロンを介した protein turnover は葉緑体において一般的なメカニズムの一つであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We found that a specific sequence in a chloroplast protein, chlorophyllide a oxygenase, is essential in the turnover of this protein. This sequence is most likely a degron for the chloroplast Clp protease. We obtained evidence for the presence of similar degrons in the other chloroplast proteins, indicating that the protein turnover mechanism is rather general in the chloroplast.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	9,300,000	2,790,000	12,090,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、植物生理・分子

キーワード：葉緑体、プロテアーゼ、シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

葉緑体には、光合成、脂質合成、など、植物にとって重要なさまざまな代謝経路が存在する。植物細胞にとって非常に重要なオルガネラである。葉緑体の祖先は、真核細胞に共生したラン藻であると考えられており、葉緑体のタンパク質の代謝に関しては、ラン藻に由来するプロテアーゼなどが大きな役割を果たしていると考えられている。葉緑体のプロテアーゼは、Clp, FtsH, DegP など、原核生物タイプのもがよく知られているが、

これらのプロテアーゼに関する研究は、光化学系タンパク質の代謝に偏っている傾向があり、葉緑体内の多くのタンパク質がどのような仕組みで代謝されているか、また、どのような仕組みで代謝が制御されているか、についての知見は限られていた。一方で、原核生物においては、特に大腸菌をモデル生物として、Clp プロテアーゼなどの主要なプロテアーゼが基質となるタンパク質の（主に）N 末端の配列を認識して、タンパク質の代謝速度を決定する仕組みが詳細に解明されてい

る。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、葉緑体のさまざまなタンパク質の代謝の制御について、より一般的な法則を見いだすことを目的とした。特に、葉緑体のタンパク質の代謝制御のモデル系となる可能性を持つ、クロロフィリド a オキシゲナーゼ(CAO)の分解系をモデル系として、大腸菌の Clp プロテアーゼの研究例に匹敵するような、基質とプロテアーゼの関係を明らかにすべく、研究を進めた。

3. 研究の方法

葉緑体のタンパク質の多くは、核ゲノムにコードされていることが知られている。そこで、本研究においては、葉緑体を単離し、細胞質からの新たなタンパク質のインポートが無い状態において、タンパク質の代謝を観察した。特に分離が容易なストロマタンパク質を対象として、2次元電気泳動法(等電点電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせた方法)によって、タンパク質の代謝を網羅的に研究した。また、原核生物において、広くタンパク質の代謝速度を決めているとされている Clp protease とその基質であるタンパク質のひとつである、chlorophyllide a oxygenase (CAO) をモデル系として、CAO の分解を制御している配列やその分解を制御するメカニズムについて、さまざまな配列の CAO を過剰発現するシロイヌナズナを用いて、研究を行った。また、CAO の末端に green fluorescent protein (GFP) を融合し、これをタンパク質の安定性の指標とした。さらに、CAO 活性のない、変異型(truncated) CAO-GFP の融合タンパク質を CAO 遺伝子を欠くシロイヌナズナ変異体で過剰発現することによって、CAO の蓄積に関わるフィードバック制御についても研究を進めた。

4. 研究成果

まず、単離葉緑体におけるタンパク質の代謝について、数 10 種類のストロマタンパク質を 2次元電気泳動上で分離した。代謝速度の異なるストロマタンパク質を同定することができた。(図 1 参照)

次に、CAO の分解経路については、CAO の N 末端ドメインの配列を順次 Deletion した過剰発現株の解析から、N 末端ドメインのほぼ中央に、CAO の分解に必要な 10 アミノ酸の配列(QDLLTIMIL)を同定することに成功した。この配列は、*Salmonella typhimurium* の glutamyl-tRNA reductase のアミノ酸配列における Clp プロテアーゼのデグロン配列と類似していた(Wang et al., 2001, J. Biol Chem)。

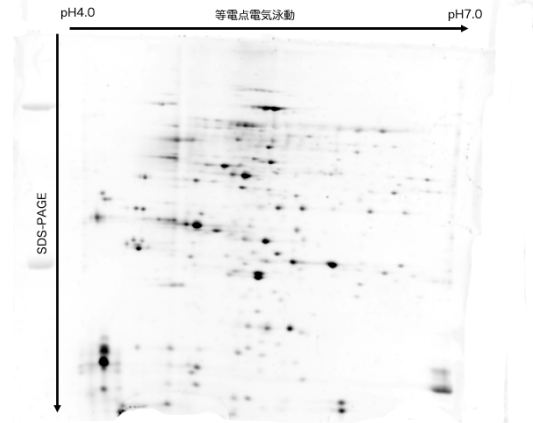


図 1 無償葉緑体から単離したストロマ画分の 2次元電気泳動の例

また、これまでに申請者らは Clp プロテアーゼの ClpC サブユニットの変異体の研究から、CAO が Clp プロテアーゼによって分解される、という間接的な証拠を得ている(Nakagawara et al., 2007, Plant J.)。この結果と上記の結果を総合して考えると、CAO のデグロンは Clp プロテアーゼによって認識されると考えられる。

また、この配列と類似の配列が、植物の葉緑体移行タンパク質の予想配列からも見つかった。(配列上のミスマッチを 2 つ以上考慮すると、1000 以上の配列が見つかった。)特に、葉緑体の CP47 の N 末端部分の配列と CAO のデグロンの類似性に着目し、CP47 の N 末端配列を GFP に融合し、シロイヌナズナにおいて、過剰発現をした。その結果、CP47 の N 末端配列を付加することによって、GFP の蓄積量が減少する、という結果を得た。この結果は、CP47 の N 末端部分の配列がデグロンとして機能しうることを示唆している。これらの結果から、申請者らは葉緑体内で一般的に機能しうるデグロン配列を発見したと考えている。

また、興味深いことに、CAO の N 末端ドメインは chlorophyll b の存在下でのみ、CAO (または GFP) を不安定化することが明らかとなっているが、上記のデグロン配列だけでは、chlorophyll b の存在の有無にかかわらず、GFP を不安定化することが明らかになった。この結果は、CAO の N 末端ドメインに chlorophyll b が存在しないときには、デグロンの機能を抑制するはたらきがあることを示している。

上記の知見を総合して、以下のような仮説をたてた。(図 2) この仮説では、chlorophyll b が蓄積していない場合は、デグロンは CAO の N 末端ドメインに埋没しているが、chlorophyll b が存在する場合には、デグロンが露出し、Clp プロテアーゼによって、分

解されると考えている。このようなメカニズムは、Clp が広い範囲の基質を認識することと矛盾せず、広い基質特異性をもつプロテアーゼが特異的な分解調節メカニズムに参与する機構として、新しいモデルとあると考えている。

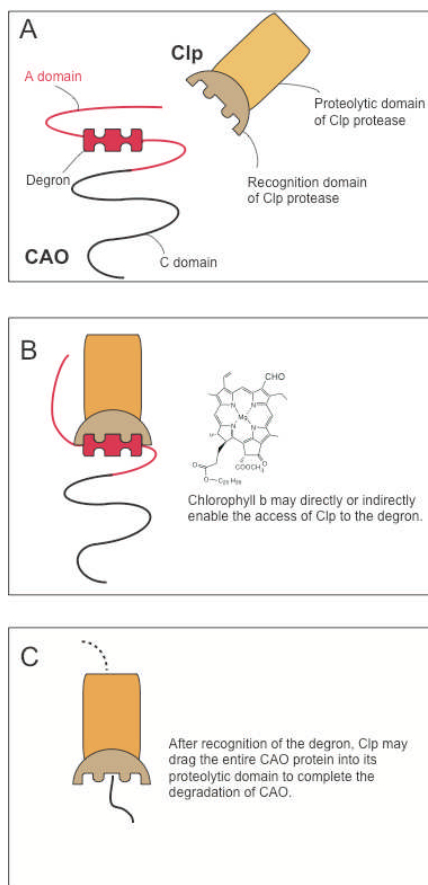


図2 chlorophyll b を介した CAO のデグロン配列認識および分解機構のモデル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 15 件) すべて査読有り

1. Tanaka R, Rothbart M, Oka S, Takabayashi A, Takahashi K, Shibata M, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Grimm B, Tanaka A (2010) LIL3, a light-harvesting-like protein, plays an essential role in chlorophyll and tocopherol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 16721-16725
2. Kato K, Tanaka R, Sano S, Tanaka A, Hosaka H, (2010) Identification of a gene essential for protoporphyrinogen IX oxidase activity in the

cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803.

Proc Natl Acad Sci U S A 107: 16649-16654

3. Sakuraba Y, Yokono M, Akimoto S, Tanaka R and Tanaka A (2010) Deregulated chlorophyll *b* synthesis reduces the energy transfer rate between photosynthetic pigments and induces photodamage in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 51: 1055-1065

4. Fujii M, Takano Y, Kojima H, Hoshino T, Tanaka R and Fukui M (2010) Microbial community structure, pigment composition, and nitrogen source of red snow in Antarctica. *Microb Ecol.* 59: 466-475

5. Nagane T, Tanaka A and Tanaka R (2010) Involvement of AtNAP1 in the regulation of chlorophyll degradation in *Arabidopsis thaliana* *Planta* 231: 939-949

6. Sakuraba Y, Tanaka R, Yamasato A and Tanaka A. (2009) Determination of a chloroplast degron in the regulatory domain of chlorophyllide *a* oxygenase. *J Biol Chem* 284: 36689-36699

7. Horie Y, Ito H, Kusaba M, Tanaka R and Tanaka A (2009) Participation of chlorophyll *b* reductase in the initial step of the degradation of light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complexes in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 284: 17449-17456

8. Chikaraishi Y, Tanaka R, Tanaka A and Ohkouchi N (2009) Fractionation of hydrogen isotopes during phytol biosynthesis *Organic Geochemistry* 40: 569-573

9. Hirashima M, Tanaka R and Tanaka A (2009) Light-independent cell death induced by accumulation of pheophorbide *a* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 50: 719-729

10. Mochizuki N, Tanaka R, Tanaka A, Masuda T and Nagatani A (2008) The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of

plastid-to-nucleus signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15184-15189

11. Yamasato A, Tanaka R, Tanaka A (2008)

Loss of the N-terminal domain of chlorophyllide *a* oxygenase induces photodamage during greening of *Arabidopsis* seedlings *BMC Plant Biology* 8:64

12. Kanematsu S, Sakuraba Y, Tanaka A, Tanaka R (2008) Characterization of

Arabidopsis mutants defective in the regulation of chlorophyllide *a* oxygenase *Photochem Photobiol Sci* 7: 1196-1205

13. Ito H, Yokono M, Tanaka R Tanaka A (2008) Identification of a novel vinyl reductase gene essential for the biosynthesis of monovinyl chlorophyll in *Synechocystis* sp. PCC6803 *J Biol Chem* 283: 9002-9011

14. Nagata N, Tanaka R and Tanaka A (2007) The major route for chlorophyll synthesis includes [3,8-divinyl]-chlorophyllide *a* reduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 48: 1803-1808

15. Sakuraba Y, Yamasato A., Tanaka R and Tanaka A (2007) Functional analysis of N-terminal domains of *Arabidopsis* chlorophyllide *a* oxygenase *Plant Physiol Biochem* 45: 740-749

[学会発表] (計 13 件)

1. Ryouichi Tanaka Light-harvesting-like proteins: Functions and evolution, XIII Seoul National University – Hokkaido University Joint Symposium 2010年11月26日, 札幌市、北海道大学
2. 田中亮一 クロロフィル合成およびトコフェロール合成に関与する, LHCモチーフを持つタンパク質の同定、第51回日本植物生理学会 2010年3月18日、熊本市、熊本大学
3. 伊藤寿, 田中亮一, 田中歩 D1タンパ

ク質の改変によるジビニルクロロフィルへの適合性の獲得、第51回日本植物生理学会 2010年3月18日、熊本市、熊本大学

4. 中島沙織, 伊藤寿, 田中亮一, 田中歩 シロイヌナズナの種子形成におけるクロロフィルb還元酵素の機能解析、第51回日本植物生理学会 2010年3月18日、熊本市、熊本大学
5. 目黒美生, 伊藤寿, 高林厚史, 田中亮一, 田中歩クロロフィル分解に関与するフラビントタンパク質、第51回日本植物生理学会 2010年3月18日、熊本市、熊本大学
6. 中島沙織, 伊藤寿, 草場信, 田中亮一, 田中歩, シロイヌナズナのクロロフィルb還元酵素の生理機能解析、第50回日本植物生理学会年会、2009年3月23日、名古屋大学東山キャンパス、名古屋市
7. 長谷川博之, 伊藤寿, 田中亮一, 田中歩 クロロフィル分解の中間体を蓄積する変異株の解析、第50回日本植物生理学会年会、2009年3月21日~24日、名古屋大学東山キャンパス、名古屋市
8. 加登 一成, 田中 亮一, 田中 歩, 保坂 秀夫 ラン藻*Synechocystis* sp. PCC 6803由来プロトポルフィリノーゲンIXオキシダーゼ遺伝子の探索、第49回日本植物生理学会年会 2008年3月22日、札幌コンベンションセンター、札幌市
9. 兼松 慧, 櫻庭 康仁, 田中 亮一, 田中 歩 クロロフィリドaオキシゲナーゼ(CAO)の蓄積制御機構に異常のあるシロイヌナズナ変異体の解析、第49回日本植物生理学会年会、2008年3月22日、札幌コンベンションセンター、札幌市

10. 櫻庭 康仁, 田中 亮一, 田中 歩
クロロフィリドaオキシゲナーゼの蓄積量を調節する内部配列の解析、第49回日本植物生理学会年会 2008年3月20日～22日、札幌コンベンションセンター、札幌市
11. 田中亮一：テトラピロール代謝に関わる新しい因子の探索、第10回オルガネラワークショップ 2008年3月19日札幌コンベンションセンター、札幌
12. R. Tanaka, T. Nagane, F. Myouga, R. Motohashi, K. Shinozaki and A. Tanaka, HPLC-based screening for pigment metabolism mutants in *Arabidopsis thaliana*., 7th International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptor in Photosynthetic Organisms, 7th International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptor in Photosynthetic Organisms, 2007.12.9-14, Kyoto TERRSA, Kyoto
13. 藤井 正典¹、小島 久弥¹、田中 亮一¹、高野 淑識²、星野 保³、的場 澄人¹、伊村 智⁴、福井 学¹ (1北大低温研、²JAMSTEC、³産総研、⁴極地研)南極ラングホブデの氷雪藻ブルームにおける微生物群集構造、第30回極域生物シンポジウム、2007年11月15-16日、東京

[その他]

ホームページ等

<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/plantadapt/ayumi/ryouichi/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 亮一 (TANAKA RYOUICHI)

北海道大学・低温科学研究所・准教授

研究者番号：20311516

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし