

機関番号 : 14301

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21770043

研究課題名 (和文) PsbP ホモログを介した植物の強光ストレス耐性機構の解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of the PsbP homologs in response to high light stress in plants.

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

研究成果の概要 (和文) :

高等植物は光化学系 II (PSII) の構成タンパク質である PsbP に加え、複数の PsbP パラログ (PsbP-like タンパク質:PPL, PsbP-domain タンパク質:PPD) を有する。このうち PPL1 は強光照射下において損傷した PSII 修復過程への関与が示唆されており、PPD3 は PPL1 と mRNA の発現パターンが類似する。シロイヌナズナ変異株を用いた解析の結果、*ppd3* 変異株は明確な強光感受性を示さなかったが、*pp11* 変異株は明確な強光感受性を示し、PPL1 が植物の強光ストレス耐性に必須であることが示された。

研究成果の概要 (英文) :

Higher plants have a number of PsbP homologs (PsbP-like proteins: PPLs, PsbP-domain proteins: PPDs) in addition to the authentic PsbP, which regulates the oxygen-evolving reaction in photosystem II (PSII). Among the PsbP homologs, PPL1 is co-expressed with PPD3 and required for the repair of photo-damaged PSII. Further analyses suggest that PPD3 is dispensable for high-light stress tolerance, while PPL1 has an important role in response to high-light stress in plants.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野 : 植物分子生物・生理学

科研費の分科・細目 : 植物分子生物・生理学

キーワード : 植物、光合成、環境ストレス応答、光化学系 II、酸素発生系

## 1. 研究開始当初の背景

光合成を行う植物にとって、過剰な光(強光ストレス)へ如何に対応するかはその生存に欠かすことができない課題である。特に、光合成の初発段階である水分解-酸素発生反応は、光エネルギーが生じる強力な酸化力を利用することから、その反応を担う光化学系 II 色素タンパク質複合体(以下、略して PSII) は常に損傷を受けやすい状況に置かれてい

る。そのため、植物は PSII の機能維持のために非常に巧妙かつ高度なシステムを発達させているが、その分子機構の全ては未だ解明されていない。

高等植物には光化学系 II (PSII) 酸素発生系の構成タンパク質である PsbP に加えて、複数の PsbP パラログ (PsbP-like タンパク質:PPL, PsbP-domain タンパク質:PPD) が存在する。このうち、PPL1 タンパク質は、その

配列からシアノバクテリアの PsbP ホモログ (cyanoP) に最も近いホモログである。我々の転写プロファイル解析から、PPL1 は強光照射下において PSII 修復過程に関与することが示唆された。また、PPL1 と mRNA レベルで高い発現相関を示す PsbP ホモログとして PPD3 が見出されていたが、その分子機能は明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

強光ストレス応答への関与が考えられる PsbP ホモログ、PPL1 と PPD3 タンパク質の分子機能を解明し、PSII における光合成水分分解-酸素発生反応の未知なる強光ストレス耐性機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- 1) PPL1, PPD3 の欠損、もしくは発現抑制シロイヌナズナ変異株を選抜、もしくは作出し、その強光ストレス耐性を評価した。
- 2) 上記変異体から抽出した葉緑体を用いて、PSII 複合体の形成状態、チラコイド膜タンパク質のリン酸化状態等を野生株と比較解析し、両 PsbP ホモログの PSII ライフサイクルにおける役割を解析した。
- 3) 各種生化学的手法を用いて、各 PsbP ホモログと相互作用する複合体、タンパク質因子の同定を試みた。
- 4) 葉の成長段階、及び、既知の PSII の複合体生成や修復サイクルに関わる遺伝子に変異を持つシロイヌナズナ変異株における PsbP ホモログの遺伝子発現から、それらの分子機能を検討した。

## 4. 研究成果

- 1) *PPL1* 遺伝子に T-DNA が挿入された変異体において *PPL1* 発現抑制が不完全であったため、新たに *PPL1* の発現が抑制された RNAi 株 (*pp11i* 株) を作製し、その表現型を解析した (図 1)。クロロフィル蛍光解析とウエスタン解析から、複数の *pp11i* ラインにおいて、*PPL1* 発現抑制レベルに応じた強光感受性が認められた (図 2)。一方、*PPL1* との mRNA 共発現関係が認められている *PPD3* タンパク質に関しても、シロイヌナズナ遺伝子欠損変異株を用いて強光ストレス応答を解析したが、*ppd3* 変異株においては明確な強光感受性は認められなかった。
- 2) *pp11i* 株、及び、*ppd3* 株のチラコイド膜を用いて BN-PAGE 解析を行った結果、PSII-LHCII 超複合体の蓄積が減少し、PSII サブユニットのリン酸化パターンにも変化が認められた。明確な表現型を示さない *ppd3* 株でも差が認められたこ

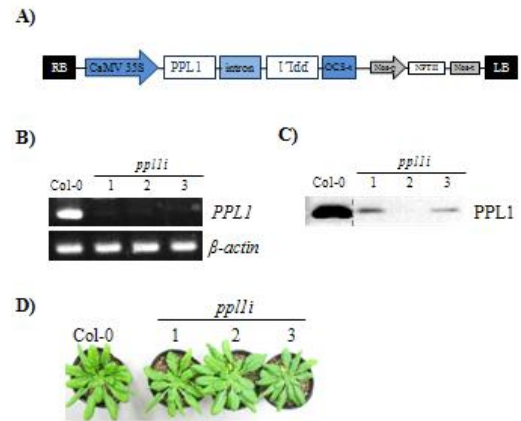


図 1 : PPL1 発現抑制株の作成

A) RNAi ベクター B) RT-PCR による mRNA 発現解析 C) ウエスタン解析 D) 発芽後 5 週間の植物体の写真。

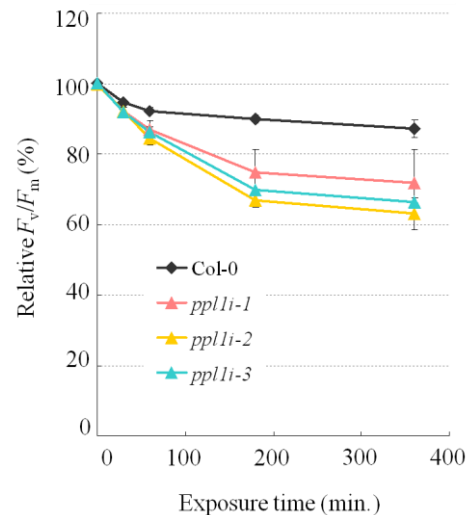


図 2 : 強光処理による光阻害の推移

野生株、及び、*pp11i* 株の切断葉に  $650 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の強光を照射し、PSII 最大量子収率 ( $F_v/F_m$ ) の変化をモニターした。

とから、PPD3 も PSII 機能と何らかの関わりを持つ可能性が考えられた。

- 3) BN-PAGE では、PPL1 とチラコイド膜タンパク質複合体との相互作用は検出できない。そこでショ糖密度勾配遠心法によりチラコイド膜タンパク質複合体を分離し、分画したサンプルを SDS-PAGE/Immunoblot により解析した。その結果、PPL1 は比較的比重の重い画分で検出され、高分子量の複合体と相互作用することが示唆された。別の実験で

PPL1 は、損傷した PSII の修復が行われるとされるストロマメラでの局在が認められたことから、修復過程にある PSII の安定化などの機能が推定される。しかしながら、PPL1 と複合体の相互作用は低濃度の塩で阻害されるなど比較的弱いことが判明し、相互作用相手の同定には至らなかった。

- 4) PPL1 タンパク質の蓄積は、若い葉に比べ光阻害を受け易い成熟した展開葉で多く認められた。また、光阻害感受性の *psbO1* 変異株においても PPL1 の蓄積の増加を認めた。以上の結果から、PPL1 の強光ストレス応答における重要性が示された。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- 1) Ido K, Gross CM, Guerrero F, Sedoud A, Lai TL, Ifuku K, Rutherford AW, Krieger-Liszkay A (2011) High and low potential forms of the  $Q_A$  quinone electron acceptor in Photosystem II of *Thermosynechococcus elongatus* and spinach. *J. Photochem. Photobiol. B*. in press. 査読有
- 2) Ifuku K, Ido K, Sato F (2011) Molecular functions of PsbP and PsbQ proteins in the photosystem II supercomplex. *J. Photochem. Photobiol. B*, in press. 査読有
- 3) Ifuku K, Ishihara S, Sato F (2010) Molecular functions of oxygen-evolving complex family proteins in photosynthetic electron flow. *J. Integr. Plant Biol.* **52**: 723-734. 査読有
- 4) Yabuta S, Ifuku K, Takabayashi, A Ishihara S, Ido K, Ishikawa N, Endo T, Sato F (2010) Three PsbQ-like proteins are required for the function of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **51**: 866-876. 査読有
- 5) Tomita M, Ifuku K, Sato F, Noguchi T (2009) FTIR evidence that the PsbP extrinsic protein induces protein conformational changes around the oxygen-evolving Mn cluster in photosystem II. *Biochemistry* **48**: 6318-6325, 査読有
- 6) Kato Y, Miura E, Ido K, Ifuku K, Sakamoto W (2009) The variegated mutants lacking chloroplastic FtsHs are defective in D1 degradation and accumulate reactive oxygen species. *Plant Physiol.* **151**:1790-1801, 査読有

他、学会プロシーディングス 3 件を投稿中  
(査読なし)

[学会発表] (15 件)

- 1) 井戸邦夫, 伊福健太郎, Anja Krieger-Liszkay, 佐藤文彦, PsbP が光化学系 II  $Q_A$  の酸化還元電位に及ぼす影響の解析、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 27 日、京都女子大学
- 2) 松井信太郎, 石原靖子, 伊福健太郎, 佐藤文彦、シロイヌナズナ PsbP-Like 1 (PPL1) タンパク質の分子機能解析、第 52 回 日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 21 日、東北大学
- 3) 伊福健太郎、高等植物における光化学系 II 酸素発生系タンパク質の進化と機能、光合成シンポジウム「光合成による光エネルギー利用の過去・現状・未来」、2010 年 12 月 29 日、京都大学
- 4) Matsui S, Ishihara S, Ido K, Ifuku K, Sato F, Molecular function of PsbP-like protein 1 (PPL1) in Arabidopsis, APRU Research Symposium-Interface between Molecular Biology and Nano-Biology-, Nov. 25th 2010, Kyoto
- 5) Ifuku K, 他 8 名、Molecular functions of oxygen-evolving complex family proteins in linear and cyclic photosynthetic electron flows, 15th International Congress on Photosynthesis, 北京, 2010 年 8 月 24 日
- 6) Matsui S, Ishihara S, Ido K, Ifuku K, Sato F, Functional analysis of PsbP-like protein 1 (PPL1) in Arabidopsis, 15th International Congress on Photosynthesis, 北京, 2010 年 8 月 26 日
- 7) Kakiuchi S, Tomita M, Ido K, Ifuku K, Noguchi T, Sato F, Functional roles of the amino- and carboxyl-regions of PsbP protein in photosystem II, 15th International Congress on Photosynthesis, 北京, 2010 年 8 月 24 日
- 8) Ido K, Ifuku K, Sato F, Functional Analysis of PsbR in PsbP Binding to Photosystem II, 15th International Congress on Photosynthesis, 北京, 2010 年 8 月 26 日
- 9) Kentaro Ifuku 「Molecular functions of OEC family proteins in linear and cyclic photosynthetic electron flow」, French photosynthesis meeting, Paris, 2010 年 05 月 07 日
- 10) 伊福健太郎、他 7 名、植物の環境応答における OEC ホモログタンパク質の多様な機能、日本農芸化学会 2010 年度大会、東京大学、2010 年 3 月 28 日
- 11) 松井信太郎、石原靖子、井戸邦夫、伊福健太郎、佐藤文彦、シロイヌナズナ PsbP ホモログを介した強光ストレス応答機構の解析、第 51 回 日本植物生理学会年会、熊本大学、2010 年 3 月 18 日
- 12) 藪田真也、石原靖子、高林厚史、井戸邦夫、遠藤剛、伊福健太郎、佐藤文彦、葉緑

体 NAD(P)H dehydrogenase 複合体機能には複数の PsbQ-Like(PQL)タンパク質が関与する、第 51 回 日本植物生理学会年会、熊本大学、2010 年 3 月 20 日

- 13) 垣内秀介、富田めぐみ、井戸邦夫、伊福健太郎、野口巧、佐藤文彦、高等植物 PsbP タンパク質の C 末端側ドメイン機能の解析、第 51 回 日本植物生理学会年会、熊本大学、2010 年 3 月 21 日
- 14) Kentaro Ifuku, 「Molecular functions of OEC protein family regulating photosynthetic electron transport chain」, the 5<sup>th</sup> Germany-Japan Binational Seminar, 筑波、2009 年 6 月 3-7 日
- 15) 伊福健太郎 「OEC protein family: thylakoid luminal factors regulating the photosynthetic electron transport」、NAIST グローバル COE ワークショップ「植物の環境応答」、奈良、2009 年 3 月 4 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/callus/>

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし