

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02508

研究課題名（和文）チラコイド膜リモデリングと光合成の環境適応

研究課題名（英文）Thylakoid Membrane Remodeling and Optimization of Photosynthetic Activity

研究代表者

坂本 亘（Sakamoto, Wataru）

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号：20222002

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、チラコイド膜ホメオスタシスと光合成の環境適応を明らかにするため、最近機能が明らかになりつつある膜リモデリング分子VIPP1に着目した。VIPP1タンパク質の精製、また、VIPP1-GFPによるシロイヌナズナvipp1ノックアウト変異体の相補系により、VIPP1複合体形成と膜リモデリング活性の詳細な解析を行なった。葉緑体型HSP70がVIPP1と相互作用することも明らかにした。VIPP1のチラコイド膜リモデリング機能は、シアノバクテリアとシロイヌナズナではヌクレオチド結合部位などの違いがわかり、維管束植物におけるダイナミックなチラコイドホメオスタシスに適応した機能が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の環境適応には光合成機能の調節が重要であり、本研究が対象とするチラコイド膜ホメオスタシスは、光合成反応の足場を支える重要な生存戦略機構でもある。植物の光合成反応が変動する環境に適応して生存する生理作用の理解は、気候変動による温暖化と地球環境の保全、あるいは作物生産による食糧供給にも新たな技術開発につながる基盤研究である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on VIPP1, a membrane remodeling molecule whose function has recently been elucidated, in order to understand thylakoid membrane homeostasis and photosynthetic adaptation to the environment. We performed a detailed analysis of VIPP1 complex formation and membrane remodeling activity. Furthermore, we found that chloroplast HSP70 interacts with VIPP1. Altogether, VIPP1's thylakoid membrane remodeling function appears to differ between cyanobacteria and Arabidopsis, including nucleotide hydrolysis activity, indicating that VIPP1 is adapted to the dynamic thylakoid homeostasis in vascular plants.

研究分野：植物生理学

キーワード：チラコイド膜 光合成 膜リモデリング 葉緑体 NTPase

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

チラコイドは、光合成細菌(シアノバクテリア)と葉緑体を持つ扁平で円盤状の膜構造体である。ここが光合成明反応の場であり、チラコイド膜に内在する光化学系複合体の機能解明が進んでいる。酸素発生型光合成におけるエネルギー転換反応の足場とも言えるチラコイドにおける膜のホメオスタシスは、内包膜からの小胞形成、あるいは内包膜と連結したコンタクトサイトの関与が顕微観察により提唱されているが、膜自体の発生や、分裂・傷害・修復による膜維持の詳細な分子機構は、本研究を開始した当初、未解明の点が多かった。2021年に、チラコイドと葉緑体膜の維持に必須のタンパク質であるVIPP1の分子構造が明らかとなり、膜維持に関与するリモデリング分子の構造に基づく機能とその普遍性が示された。このような状況を踏まえ、本研究ではVIPP1をはじめとするチラコイド膜リモデリング分子に焦点を当て、膜の変形・融合・修復によりチラコイド膜の分化・恒常性を保ち、光合成を最適化する根本現象を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

本研究では2021年にシアノバクテリアで構造が決定されたVIPP1の*in vivo*での機能と普遍性を検証するため、我々が研究対象とするシロイヌナズナを材料にVIPP1の持つ新規GTPase/ATPase活性の意義とリング構造の機能、膜結合を介したチラコイド膜リモデリング活性、特に膜変形・収縮と融合活性を明らかにし、葉緑体におけるチラコイド膜形成の実体とそれらの光合成活性、環境ストレスへの応答作用を明らかにする。これらの研究を通して、チラコイド膜の恒常性維持と光合成の環境適応について統合的な理解を深める。

3. 研究の方法

本研究では、当研究室で一連の実験を進めているシロイヌナズナを用いて、以下の実験を進めた。

(1) VIPP1の*in vitro*解析

大腸菌で発現して精製したVIPP1-Hisタンパク質を用いたヌクレオチド分解活性(NTPase活性)部位の解析と複合体構造の変化について点突然変異を導入して検討する。精製したタンパク質のネガティブ染色による観察も進め、均一な構造を取る変異体があれば構造解析が可能かどうかを検討し、NTPase活性とオリゴマー構造の相関を調べる。

(2) VIPP1の*in vivo*解析

これまでに確立したシロイヌナズナ*vipp1*ノックアウト変異(*vipp1-ko*)をVIPP1-GFPで相補する実験系により、VIPP1に突然変異を導入し、相補性とGTPase活性との関連性、GFPダイナミクスの観察を細胞レベルで行う。チラコイド膜を直接観察する手法としてトモグラフィー電子顕微鏡解析を試み、いくつかのシロイヌナズナ突然変異体を用いた観察を行って膜リモデリング分子とチラコイド膜形成との関係を調べた。

(3) VIPP1相互作用分子の解析

昨年度までの結果で、GFPをタグに用いるGFP-trapでのVIPP1-GFPの精製は困難であったが、相互作用するタンパク質の同定が可能であることがわかってきた。そこで本研究では、GFP-trapで得られた画分の質量分析などにより相互作用分子の特定を試みた。加えてVIPP1以外のチラコイド膜リモデリング因子であるCURT1やFZLでもGFP融合タンパク質を発現させその機能を解析した。

4. 研究成果

(1) VIPP1 タンパク質の *in vitro* 解析

本研究では、シアノバクテリアVIPP1のオリゴマー構造として発表されたリング構造(Gupta et al., Cell, 2021)を起点に、シロイヌナズナVIPP1をHisタグタンパク質として精製してその性質を調べ、チラコイド膜リモデリングの共通性を明らかにする研究を進めた。Hisタグとして精製されたVIPP1-Hisタンパク質はシアノバクテリアで報告されたリング状構造は取らずに球状、口

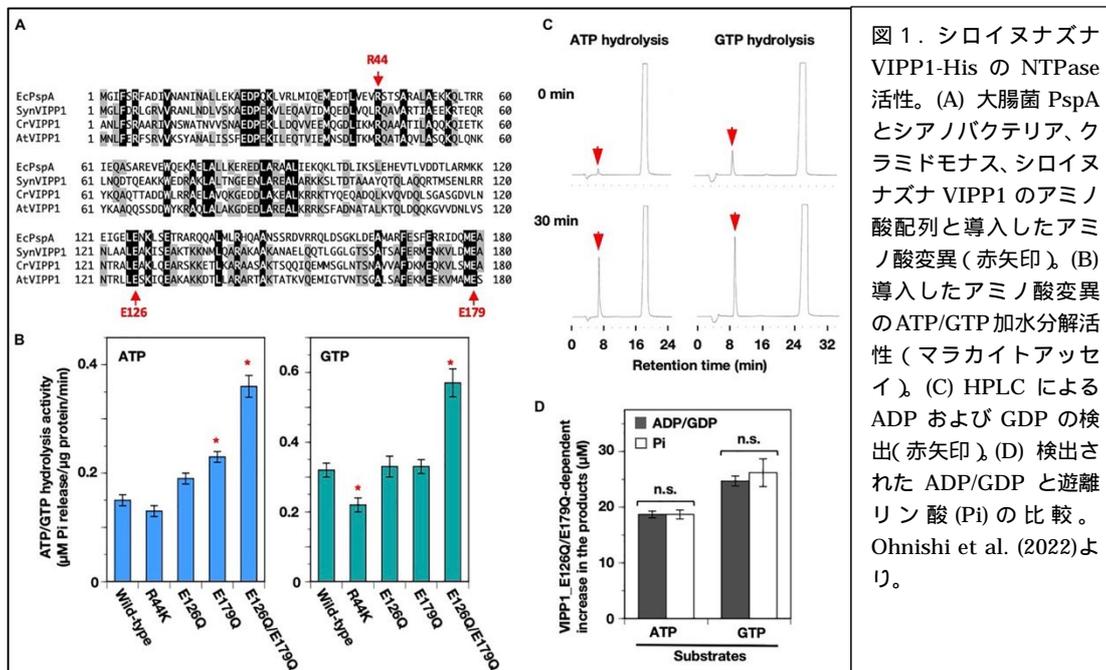


図 1. シロイヌナズナ Vipp1-His の NTPase 活性。(A) 大腸菌 PspA とシアノバクテリア、クラミドモナス、シロイヌナズナ Vipp1 のアミノ酸配列と導入したアミノ酸変異 (赤矢印)。(B) 導入したアミノ酸変異の ATP/GTP 加水分解活性 (マラカイトアッセイ)。(C) HPLC による ADP および GDP の検出 (赤矢印)。(D) 検出された ADP/GDP と遊離リン酸 (Pi) の比較。Ohnishi et al. (2022) より。

ッド状などの多様な構造を示した。まず、シアノバクテリアで見出されたヌクレオチド結合部位と GTP 加水分解活性をシロイヌナズナ Vipp1-His で確認した。マラカイトアッセイによる遊離リン酸の比色定量に加え、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による GDP の検出でも Vipp1-His に GTP と ATP の加水分解活性があることを確認した (図 1) (Ohnishi et al., 2022)。GTPase 活性は典型的な Mg 依存性を示したが、ATPase 活性は Mg だけでなく Ca 依存性も示し、アルカリ性で高い活性を示した。このことは葉緑体ストロマの Ca 濃度や pH などの生理条件に应答した ATPase 活性を Vipp1 が持つ可能性を示唆しており、膜維持との関連性が考えられた。シアノバクテリアで予想されたヌクレオチド結合部位に変異を入れた Vipp1 タンパク質は NTPase 活性を失うが、本研究で精製したシロイヌナズナ Vipp1-His は同じ変異 (E126Q/E179Q) を導入しても活性が失活しないことが明らかとなった。一方で、N 末端側で膜結合性と関わる α ヘリックスの両親媒性を乱す変異 (V11E, N16I) を導入した Vipp1-His では NTPase 活性の低下が確認できた。これらの結果から、シアノバクテリアで見出されたヌクレオチド結合部位はシロイヌナズナでは機能していない可能性が強く示唆された。

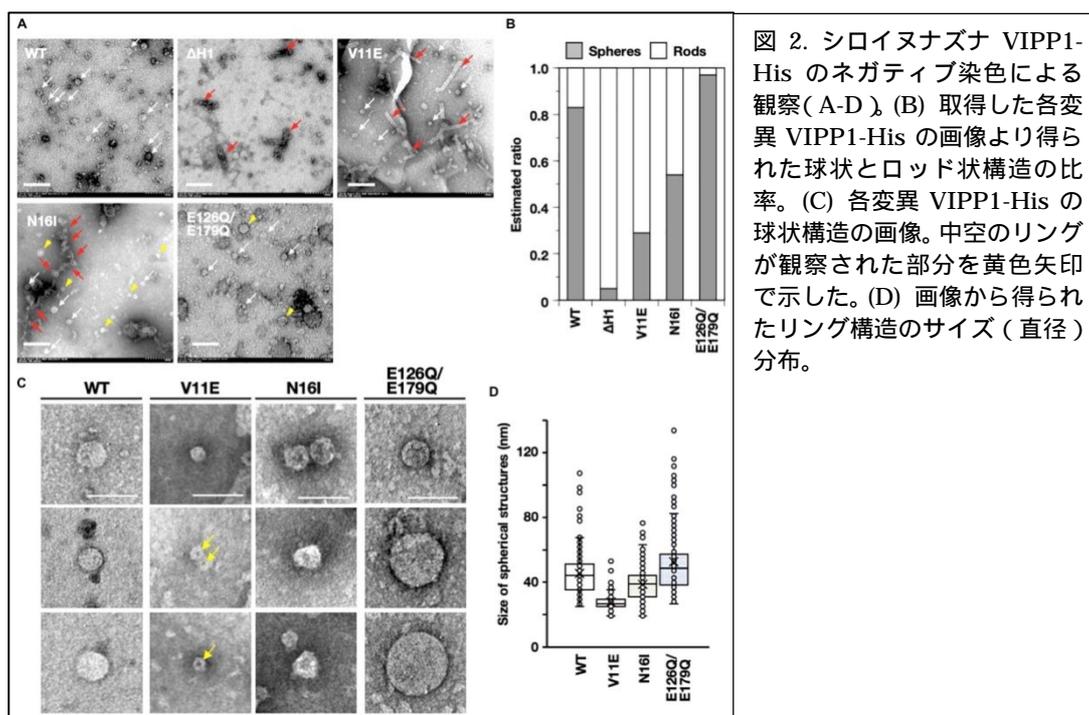


図 2. シロイヌナズナ Vipp1-His のネガティブ染色による観察 (A-D)。(B) 取得した各変異 Vipp1-His の画像より得られた球状とロッド状構造の比率。(C) 各変異 Vipp1-His の球状構造の画像。中空のリングが観察された部分を黄色矢印で示した。(D) 画像から得られたリング構造のサイズ (直径) 分布。

上で得られた結果を支持する結果として、シロイヌナズナ Vipp1-His のネガティブ染色による電子顕微鏡観察ではリング状の構造は観察されず、ほとんどが球状あるいはロッド状の構造として観察された (図 2) (Ohnishi et al., 2022)。変異を導入した Vipp1-His は N 末端 α ヘリックス

の変異では球状よりもロッド状の構造を示す傾向が強く、逆に E126Q/E179Q 変異ではほとんどがロッド状になっていた。球状の構造にも若干の差が見られたが、これらを NTPase 活性との関連性は明らかにできなかった。

(2) VIPP1 タンパク質の in vivo 観察

VIPP1 の葉緑体内での複合体形成とそのダイナミクスを観察するため、GFP を C 末端に融合した VIPP1-GFP をシロイヌナズナ *vipp1* ノックアウト変異体で発現させて機能を相補する系を構築した。VIPP1 リング構造からは、C 末端側には天然変性性の構造があり、GFP の付加は VIPP1 の機能に影響しないと考えられる。この系で、上記の(1)で示したアミノ酸変異を導入した VIPP1-GFP を発現させたところ、E126Q/E179Q と N16I のどちらを導入しても *vipp1* ノックアウト変異を相補できることが明らかとなった。このことは(1)の結果と同様に、ヌクレオチド結合部位に相当する変異は VIPP1 機能に影響しないことがわかった。上記の変異を導入した VIPP1 では、野生型と比べて VIPP1 の大きな構造が観察される傾向を示した。加えて、N16I ではクロロフィル蛍光で測定した光合成活性に若干の低下が見られた。

(3) VIPP1 相互作用分子の解析

上記の(2)で得られた VIPP1-GFP 個体を材料に GFP trap 免疫沈降を行い、GFP 抗体により共沈降するタンパク質の同定を試みた。その結果、葉緑体でタンパク質のフォールディングや膜間移動、ターンオーバーに関わる葉緑体型の HSP70 (cpHsc70-1 および cpHSC702) が VIPP1 と相互作用することがわかった。興味深いことに、これら HSP70 との相互作用は、C 末端側のアミノ酸配列 (ヘリックス H7) を欠損させると結合性が見られなかった。従って、HSP70 との相互作用はリング構造の外側にある C 末端側を介すると予想された。

(4) その他 (今後の展望)

本研究では、VIPP1 を中心にチラコイド膜リモデリング機能を解析した。シアノバクテリアとシロイヌナズナではヌクレオチド結合部位などの違いが鮮明になり、高等植物におけるダイナミックなチラコイドホメオスタシスに適応した機能がある可能性が示唆された。今後、VIPP1 の in vivo 構造を明らかにしそれらの可塑性と HSP70 などの相互作用分子との協調性を通してチラコイド膜リモデリングの更なる機能解明が進むことが期待できる。加えて、本研究では VIPP1 以外の膜リモデリング分子 CURT1, FZL についても並行して実験を進めているので、それらを基盤としたチラコイド膜研究を今後も展開する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Sakamoto Wataru, Takami Tsuneaki	4. 巻 65
2. 論文標題 Plastid Inheritance Revisited: Emerging Role of?Organelle DNA Degradation in?Angiosperms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant And Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcad104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato Yusuke, Kuroda Hiroshi, Ozawa Shin-Ichiro, Saito Keisuke, Dogra Vivek, Scholz Martin, Zhang Guoxian, de Vitry Catherine, Ishikita Hiroshi, Kim Chanhong, Hippler Michael, Takahashi Yuichiro, Sakamoto Wataru	4. 巻 12
2. 論文標題 Characterization of tryptophan oxidation affecting D1 degradation by FtsH in the photosystem II quality control of chloroplasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.88822	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ogawa Yu, Iwano Megumi, Shikanai Toshiharu, Sakamoto Wataru	4. 巻 14
2. 論文標題 FZL, a dynamin-like protein localized to curved grana edges, is required for efficient photosynthetic electron transfer in Arabidopsis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2023.1279699	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Wataru, Takami Tsuneaki	4. 巻 S0168-9525(23)00058-6
2. 論文標題 Maternal plastid inheritance: two abating factors identified	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Trends in Genetics	6. 最初と最後の頁 S0168-9525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tig.2023.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohnishi Norikazu, Sugimoto Manabu, Kondo Hideki, Shioya Ken-ichi, Zhang Lingang, Sakamoto Wataru	4. 巻 13
2. 論文標題 Distinctive in vitro ATP Hydrolysis Activity of AtVIPP1, a Chloroplastic ESCRT-III Superfamily Protein in Arabidopsis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 949578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2022.949578	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takanashi Hideki, Kajiya-Kanegae Hiromi, Nishimura Asuka, Yamada Junko, Ishimori Motoyuki, Kobayashi Masaaki, Yano Kentaro, Iwata Hiroyoshi, Tsutsumi Nobuhiro, Sakamoto Wataru	4. 巻 63
2. 論文標題 <i>DOMINANT AWN INHIBITOR</i>Encodes the ALOG Protein Originating from Gene Duplication and Inhibits AWN Elongation by Suppressing Cell Proliferation and Elongation in Sorghum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 901 ~ 918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 小川由、坂本巨	4. 巻 32
2. 論文標題 チラコイド膜の形成と構造維持に関与する膜リモデリング分子	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 光合成研究	6. 最初と最後の頁 64-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Gupta TK, Klumpe S, Gries K, Heinz S, Wietrzynski W, Ohnishi N, Niemeyer J, Spaniol B, Schaffer M, Rast A, Ostermeier M, Strauss M, Plitzko JM, Baumeister W, Rudack T, Sakamoto W, Nickelsen J, Schuller JM., Schroda M, Engel BD	4. 巻 184
2. 論文標題 Structural basis for VIPP1 oligomerization and maintenance of thylakoid membrane integrity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 3643 ~ 3659.e23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2021.05.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Jing Zihuan, Wacera W. Fiona, Takami Tsuneaki, Takanashi Hideki, Fukada Fumi, Kawano Yoji, Kajiya-Kanegae Hiromi, Iwata Hiroyoshi, Tsutsumi Nobuhiro, Sakamoto Wataru	4. 巻 11
2. 論文標題 NB-LRR-encoding genes conferring susceptibility to organophosphate pesticides in sorghum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98908-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamatani Hiroshi, Ito Takeshi, Nishimura Kenji, Yamada Tetsuya, Sakamoto Wataru, Kusaba Makoto	4. 巻 189
2. 論文標題 Genetic analysis of chlorophyll synthesis and degradation regulated by BALANCE of CHLOROPHYLL METABOLISM	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 431-444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiac059	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Wataru Sakamoto
2. 発表標題 Thylakostasis: versatile roles of thylakoid membrane remodeling proteins Arabidopsis chloroplasts
3. 学会等名 2023 International Symposium on Plant Cell and Developmental Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wataru Sakamoto
2. 発表標題 Thylakostasis and membrane remodeling molecules
3. 学会等名 US-Japan Binational Photosynthesis Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sarah Wanjiru Gachie, Wataru Sakamoto
2. 発表標題 Site-directed mutagenesis and in vivo observation of VIPP1, an ESCRT-III super family protein involved in thylakoid membrane remodeling in Arabidopsis chloroplasts
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川由、岩野恵、川本晃大、栗栖源嗣、鹿内利治、坂本亘
2. 発表標題 チラコイドに局在するダイナミン様タンパク質FZLの多面的な生理機能
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高見常明、坂本亘
2. 発表標題 オートファジー変異体早枯れ表現型のdpd1変異による抑制に関するトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Di Li, Shin-ichiro Ozawa, Michael Hippler, Wataru Sakamoto
2. 発表標題 Characterization of the proteins interacting with VIPP1 involved in thylakoid membrane remodeling in Arabidopsis chloroplasts
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Gupta, T., Klumpe, S., Gries, K., Heinz, S., Wietrzynski, W., Ohnishi, N., Sakamoto, W., Nickelsen, J., Schuller, J., Schroda, M., Benjamin Engel, B.
2. 発表標題 The role of VIPP1 in thylakoid biogenesis and maintenance
3. 学会等名 18th International Congress on Photosynthesis Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sakamoto, W.
2. 発表標題 Thylakogenesis: maintenance of thylakoid membrane architecture and integrity in Arabidopsis
3. 学会等名 Seminar at Agricultural Biotechnology Research Center, Academia Sinica, (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sakamoto, W.
2. 発表標題 Maintenance of thylakoid membrane architecture and integrity in Arabidopsis.
3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Regulation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本巨
2. 発表標題 葉緑体膜の維持に関わる VIPP1タンパク質の解析
3. 学会等名 第 12 回日本光合成学会年会およびシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yu Ogawa, Megumi Iwano, Akihiro Kawamoto, Genji Kurisu, Toshiharu Shikanai, Wataru Sakamoto
2. 発表標題 Maintenance of the thylakoid membrane by FZL, a dynamin-like protein localized to the grana margin in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 第 64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tsuneaki Takami, Wataru Sakamoto
2. 発表標題 Suppression mechanism of early senescence phenotype in atg5 mutant by DPD1 mutation
3. 学会等名 第 64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Md. Faridul Islam, Hiroshi Yamatani, Tsuneaki Takami, Makoto Kusaba, Wataru Sakamoto
2. 発表標題 Characterization of rice mutants lacking organelle exonuclease DPD1
3. 学会等名 第 64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wataru Sakamoto
2. 発表標題 Revisiting photo-oxidative damage of D1 protein in the PSII repair cycle.
3. 学会等名 Finland-Japan Seminar 2021 Understanding the integrative systems to coordinate paradoxes between enhanced efficiency and stress tolerance of photosynthesis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本 亘・西岡佳司・加藤裕介
2. 発表標題 Phos-tag を用いた葉緑体チラコイド膜におけるタンパク質リン酸化の解析
3. 学会等名 第72回日本電気泳動学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川 由・田草川 真理・岩野 恵・Lianwei Peng・明賀 史純・鹿内 利治・坂本 亘
2. 発表標題 シロイヌナズナFZLタンパク質によるグラナマージンにおけるチラコイド膜リモデリングの生理機能
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桶川友季・本橋健・坂本亘
2. 発表標題 PGR5の欠損はフェレドキシンからの電子の流れを変えることによってntrc 変異株の生育阻害を回復させる
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fiona W. Wacera・山崎清志・高梨秀樹・藤原徹・堤伸浩・坂本亘
2. 発表標題 Mapping and characterization of QTLs for sorghum seed ionome reveals differential cadmium accumulation in a recombinant inbred population
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高見常明・Islam Md. Faridul・坂本亘
2. 発表標題 オルガネラDNA 分解の異常はオートファジー変異体の早枯れ表現型を抑制する
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
中国	内蒙古大学			
ドイツ	ミュンヘン大学	カイザースラウテルン工科大学	マールブルグ大学	他1機関