

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710219

研究課題名(和文) 光合成集光性複合体様蛋白質の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism of light harvesting complex-like protein

研究代表者

明賀 史純 (Myoga, Fumiyo)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：10342859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では薄緑色を示す *apg16* 変異体の原因遺伝子がコードする OHP1 タンパク質の機能解析を行った。HPLC の溶出パターンの比較や葉緑体チラコイド膜タンパク質の蓄積量の比較により、変異体では光化学系 II (PSII) コア蛋白質がほとんど存在しないことが分かった。またタグ融合タンパク質を発現させた形質転換植物体を用いた OHP1 の局在解析により、OHP1 は多量体を形成すること、OHP1 と集光性クロロフィルタンパク質複合体(LHCII) とが同じ挙動を示すことが分かった。これらの結果から OHP1 が PSII コア蛋白質複合体形成に必要なタンパク質であり LHCII の近傍で複合体を形成することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Arabidopsis contain a gene coding for single predicted transmembrane helix protein called OHP1 with a light-harvesting chlorophyll a/b-binding (LHC) motif. Significant amounts of OHP1 protein were present in green tissue but their level increased in response to high-light stress. In this study we found that *ohp1* mutants showed pale-green phenotype on agar plates. Leaf chlorophyll fluorescence analysis and thylakoid membrane composition indicated that *ohp1* mutants had defects in PSII supercomplexes, but it did not affect the accumulation of LHCs. We also generated transgenic plants expressing the tag fusion protein in *ohp1* mutant that complement its pale-green phenotype. From the results of several biochemical analyses for revealing the localization of OHP1 on thylakoid membrane, the association of LHC-II with the OHP proteins has been deduced. These results suggest that OHP1 plays a fundamental role in assembly of photosystem II and is working around the LHCII SCs as oligomers.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学、ゲノム生物学

キーワード：植物ゲノム 葉緑体 光合成 強光ストレス シロイヌナズナ 複合体

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子の機能解析をする上で変異体を調べることは非常に有効な手段の1つである。本申請者はこれまでに植物細胞において重要な細胞内小器官である葉緑体に注目し、葉緑体を構成するタンパク質をコードする遺伝子内にトランスポゾンまたは T-DNA が挿入したタグラインを網羅的に収集している。これらのタグラインの表現型を育成培地中で観察し、*apg* (albino or pale-green) 変異体と名付けた植物体の芽生えが白色または薄緑色になったラインを多数単離している。既に6個の *apg* 変異体の機能解析結果を誌上報告しており、その他の *apg* 変異体の機能解析を他の機関との共同研究で行っている。これらの *apg* 変異体の原因遺伝子はすべて「葉緑体と環境ストレス応答」に関わる葉緑体タンパク質をコードしており葉緑体の機能に必須あるいは重要な遺伝子群である。本申請課題は、新たに単離した薄緑色変異体である *apg16* 変異体の原因遺伝子がコードする OHP1 タンパク質の分子メカニズムを解明するものである。

(2) OHP1 は LHC モチーフを持つ LHC スーパーファミリーのメンバーの1つである。これまでの研究により *apg16-1* 変異体は OHP1 遺伝子の内部にトランスポゾン *Ds* が挿入したものであり、異なる位置に T-DNA が挿入したアレル *apg16-2* も同様な植物体の薄緑化が見られること、OHP1 遺伝子を変異体に導入した形質転換体は野生型植物体に復帰したことから、葉の薄緑化とそれに伴う光合成能力の低下は OHP1 の機能欠損が原因であることが分かっている。OHP1 は LHC スーパーファミリーのメンバーであり、光エネルギーを捕捉する色素・タンパク複合体の補助因子と考えられているが、その機能は未だ不明である。しかし OHP1 は強光により発現誘導することが既存のマイクロアレイデータから分かっており、我々の RNA プロット解析からも光強度依存的・電照時間依存的に発現誘導されることを確認している。このことは、OHP1 が強光応答において重要な役割を担うことを示唆している。植物では、高温や乾燥などの環境ストレスによって光合成反応が低下した場合には、光合成電子伝達系に消費しきれない過剰な光エネルギーが生じ光阻害の危険性が増すため、これを防ぐようなメカニズムが存在している。本申請で行う OHP1 の機能はその初期段階で働くメカニズムの1つではないかと考えている。

2. 研究の目的

集光性色素複合体 LHC (Light-harvesting

pigment-protein complex) 様蛋白質のメンバーの1つである OHP1 は、膜貫通ドメインを1つ持つ約 7 kDa と小さい蛋白質で太陽からの光エネルギーを捕捉する色素・タンパク複合体の補助因子と考えられているがその機能はいまだ不明である。OHP1 機能欠損変異体はプレート培地でのみ生育可能で植物体サイズの縮小とクロロフィル含量の低下を示し、光合成能力が著しく低下している。本研究は光合成に重要かつ必須な役割を担う OHP1 の集光性色素複合体における分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) OHP1 は太陽からの光エネルギーを捕捉する色素・タンパク複合体の一部として、強光ストレス応答に関わるのではないかと推察している。そこで OHP1 の強光適応への役割を明らかにするために、変異体を用いた機能解析を行う。GM プレート培地に *apg16* 変異体のヘテロ接合体種子を播種し、弱光 (7 μ E)・通常光 (75 μ E)・強光 (230 μ E) の異なる3つの光強度条件で生育した播種後 10 日目の芽生えの植物体からホモ接合体である薄緑色変異体を選抜し液体窒素で凍結保存する。この植物体から光合成色素を溶出後、野生型と変異体とで HPLC の溶出パターンを比較する。異なる光条件下で生育させた野生型と変異体とを用いて PAM クロロフィル蛍光計による光合成パラメーターを測定し光合成パラメーター値の比較解析を行う。OHP1 以外の他の6つの LHC-like のメンバーのタグラインを収集し、これらのタグラインの光合成パラメーターと比較する。変異体から葉緑体を単離後チラコイド膜タンパク質を抽出し、イムノプロット法で光合成に働くタンパク質 (PSI-A/B, D1, Lhca1, Lhcb1, Cyt f, CF1-, OE23, OE33 等) の増減を調べることにより、変異体における光合成電子伝達に働くタンパク質の発現変化を調べる。

(2) 植物体に様々なコンストラクトを導入した形質転換体を作成し、これを用いて OHP1 の葉緑体内局在と光合成電子伝達系複体内でのチラコイド膜局在解析、相互作用分子の単離と複合体の機能解析を行う。変異体に OHP1 遺伝子を導入した相補性試験のための形質転換体、遺伝子の発現を向上させた高発現体、OHP1 プロモーターと GUS/LUC との融合コンストラクトを導入した植物体、OHP1 と HA、FLAG、GFP タグとの融合タンパク質を発現させた植物体の形質転換体を作成する。タグ融合タンパク質を発現させた形質転換体から葉緑体を単離し、チラコイド膜を抽出する。2次元電気泳動 (BN/SDS-PAGE) を行い、タグ抗体を

用いたイムノプロット法で OHP1 が光合成電子伝達系 I あるいは II のどちらに局在するのかを調べる。上記の形質転換体を用いてタグ抗体でアフィニティ精製後、質量分析装置で OHP1 の相互作用分子を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 薄緑色の表現型を示す *apg16* 変異体 (図 1) の原因遺伝子がコードする OHP1 タンパク質の機能解析を目的として、野生型と変異体とで HPLC の溶出パターンを比較した。その結果、変異体ではクロロフィル *a/b* 比が野生型と比べて 30% 程度低下していたことから、クロロフィル *a/b* 結合蛋白質であるアンテナ蛋白質 (LHC) に比べてクロロフィル *a* が結合する光化学系コアアンテナ蛋白質が減少していることが推測された。

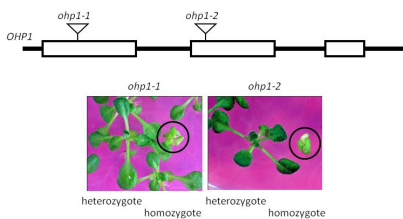


図1. 新規変異体の遺伝子内T-DNA挿入位置と表現型

(2) これを裏付けるように、変異体のチラコイド膜タンパク質の組成解析を Blue-Native PAGE を一次元目、SDS-PAGE を二次元目にした二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて行ったところ、*ohp1* 変異体では光化学系 (PSII) のモノマーと PSII スーパーコンプレックスの蓄積量が著しく減少していることが明らかとなった。この結果は上記の HPLC による色素分析結果と一致しており、変異体では PSII のコアタンパク質が欠損していると考えられた。

(3) イムノプロット法で変異体に含まれる光化学系のコア蛋白質 PSI, PSII とアンテナ蛋白質 LHCI, LHCII との増減を調べた。変異体では野生型と比較して同量のチラコイド膜に含まれる LHCI および LHCII の蛋白質量は変わらないかむしろ増加していたが、PSI コア蛋白質は微減、PSII コア蛋白質はほとんど存在しないことが分かった。本研究により OHP1 が PSII コア蛋白質複合体形成に必須なタンパク質であることを分子レベルで明らかにした。

(4) OHP1 遺伝子のプロモーターの下流

に OHP1 タンパク質の C 末端に FLAG, HA, cMyc の 3 つのタグを付加した融合タンパク質を変異体で発現させた形質転換植物体を作成した (図 2)。これらの内、OHP1-FLAG, OHP1-HA 形質転換体の 2 つは *apg16* 変異体の薄緑色の異常な表現型から野生型へと回復しており、タグ融合タンパク質は機能相補すると考えられた。一方、OHP1-cMyc 形質転換体は野生型への完全な機能相補は示さないが、やや薄緑色の次世代の種子が取れるまでの回復を示す植物体が生じる部分機能相補体である。

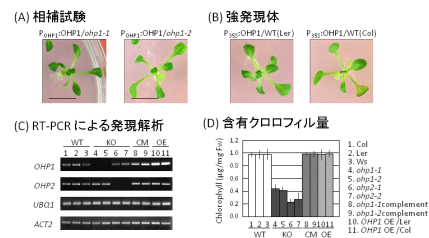


図2. 形質転換体の表現型、発現量、含有クロロフィル量解析

(5) これらの形質転換体のチラコイド膜タンパク質を Blue-Native PAGE を一次元目、SDS-PAGE を二次元目にした二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 BN/SDS-PAGE によりタンパク質を分離し、それぞれのタグ特異抗体でイムノプロットを行った。その結果、OHP1 融合タンパク質は多量体を形成することが示唆された。

(6) さらに形質転換体のチラコイド膜タンパク質をショ糖密度勾配遠心法により分離後に光合成蛋白質複合体の特異抗体でイムノプロットを行った結果、OHP1 と LHC II と同じ挙動を示すことが示唆された。

(7) 同様に等電点電気泳動 (iso electric focusing: IEF) を一次元目、SDSPAGE を二次元目にした二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 IEF/SDS-PAGE によって分離した場合も同じ結果が得られた。これらの結果は OHP1 が LHCII の近傍で複合体を形成することを示唆する。

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 1 件)

Myouga F, Akiyama K, Tomonaga Y, Kato A, Sato Y, Kobayashi M, Nagata N,

Sakurai T, Shinozaki K.
The Chloroplast Function Database II:
a comprehensive collection of
homozygous mutants and their
phenotypic/genotypic traits for
nuclear-encoded chloroplast proteins.
Plant Cell Physiol. 54: e2, 2013, 査
読有
DOI: 10.1093/pcp/pcs171.

〔学会発表〕(計 14 件)

明賀史純、小山内久益子、中野雄司、斎
藤臣雄、長田裕之、篠崎一雄

「高温による光合成傷害を緩和する化
合物の探索」第 55 回日本植物生理学
学会、2014 年 3 月 18-20 日、富山

中原仁、武智克彰、明賀史純、佐藤博、
滝尾進、高野博嘉

「シロイヌナズナにおいてグリコール
酸/グリセリン酸トランスポーターを
コードする AtLrgB/PLGG1 のヒメツリガ
ネゴケ相同遺伝子 PpLrgB の機能解析」
第 55 回日本植物生理学学会、2014 年 3 月
18-20 日、富山

山崎覚、鈴木康祐、明賀史純、篠崎一雄、
本橋令子

「シロイヌナズナの葉緑体リボソーム
30S サブユニット形成における補助因
子の機能解析」第 55 回日本植物生理
学会、2014 年 3 月 18-20 日、富山

東泰弘、岡咲洋三、明賀史純、篠崎一雄、
斉藤和季

「高温ストレス条件下におけるシロイ
ヌナズナ葉の脂質解析」第 55 回日本
植物生理学学会、2014 年 3 月 18-20 日、富
山

高崎寛則、圓山恭之進、藤田美紀、吉田
拓也、中島一雄、明賀史純、豊岡公德、
高橋史憲、篠崎和子、篠崎一雄

「Stress-Responsive NAC genes
involved in leaf senescence in
Arabidopsis」第 55 回日本植物生理学
学会、2014 年 3 月 18-20 日、富山

明賀史純

「LHC-like 蛋白質 OHP1 の局在解析」
第 4 回日本光合成学会年会、2013 年 5
月 31-6 月 1 日、名大

加藤綾、明賀史純、秋山顕治、佐藤由佳、
小林恵、櫻井哲也、篠崎一雄、永田典子

「シロイヌナズナ葉緑体突然変異体の
データベース構築に向けた網羅的な電
子顕微鏡解析」日本顕微鏡学会第 69
回学術講演会、2013 年 5 月 20-22 日、大
阪

Myouga F, Akiyama K, Tomonaga Y, Kato
A, Sato Y, Kobayashi M, Nagata N,
Sakurai T and Schinozaki, K

「Chloroplast function database II: a
large-scale collection of homozygous
mutants and their phenotype effects

for nuclear-encoded chloroplast
proteins.」International Conference
on Arabidopsis Research (ICAR 2013).
24-28 June, 2013. Sydney, Australia
明賀史純、秋山顕治、朝長優美、加藤綾、
佐藤由佳、小林恵、永田典子、櫻井哲也、
篠崎一雄

「Chloroplast Function Database II
は核コード葉緑体蛋白質変異体の網羅
的収集データと変異体の表現型デー
タとを提供する」第 54 回日本植物生理
学会年会、2013 年 3 月 21-23 日、岡山
近藤久益子、明賀史純、小野塚暁子、篠
崎一雄

「Functional analysis of an AGC-type
protein kinase in Arabidopsis」第 54
回日本植物生理学学会年会、2013 年 3 月
21-23 日、岡山

Myouga F, Akiyama K, Onozuka A,
Sakurai T, Shinozaki K

「A large-scale mutant collection and
phenotype analysis for
nuclear-encoded chloroplast
proteins.」23rd International
Conference on Arabidopsis Research
(ICAR 2012). 3-7 July 2012. Vienna,
Austria.

Myouga F, Akiyama K, Motohashi R,
Kuromori T, Onozuka A, Sakurai T,
Shinozaki K

「Chloroplast Function Database: a
database of a large-scale mutant
collection and phenotype analysis for
nuclear-encoded chloroplast
proteins.」Society of Experimental
Biology Annual Meeting 2012. 29 June-2
July, 2012. Salzburg, Austria.

Shinozaki K, Myouga F, Akiyama K,
Motohashi R, Sakurai T, Kuromori T,
Urano K

「Chloroplast Functions in Abiotic
Stress Response and Tolerance.」
Society of Experimental Biology
Annual Meeting 2012. 29 June-2 July,
2012. Salzburg, Austria.

明賀史純

「集光性タンパク質複合体スーパーフ
ァミリーに属する OHP1 の機能解析」第
3 回日本光合成学会年会、2012 年 6 月 1-2
日、東工大

〔その他〕

ホームページ等

タイトル: Chloroplast Function Database II
URL: <http://range.psc.riken.jp/chloroplast/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

明賀 史純 (MYOUGA, Fumiyoshi)
独立行政法人理化学研究所・環境資源科学
研究センター・研究員
研究者番号：10342859