

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06290

研究課題名(和文) 光化学系I光阻害におけるタンパク質品質管理機構の解明

研究課題名(英文) Protein quality control of photosystemI in thylakoid membranes

研究代表者

加藤 裕介 (KATO, YUSUKE)

摂南大学・農学部・講師

研究者番号：10437569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：光合成において、光を利用する光化学系複合体では光による損傷が起きている。複合体の損傷は光合成機能の低下(光阻害)を引き起こす要因であることから、光損傷のメカニズムを知ることは重要である。これまで多くの研究されてきた光化学系IIに対し、光化学系Iの損傷については未解明な点が多い。そこで本研究では光化学系Iの損傷に注目し、解析を進めた。その結果、光化学系Iの鉄-硫黄クラスター周辺の特定タンパク質で光損傷時にプロテアーゼによる速やかな分解が起きていること、これらタンパク質のTrpやMetに酸化修飾が起きていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光合成は植物の生長を支えるが、一方で光によるストレスが光合成装置(光合成タンパク質複合体)を損傷している。本研究では光化学系Iの光損傷、その損傷によるタンパク質の傷害のメカニズムを研究し、特定タンパク質が光損傷のターゲットである可能性を見出した。この成果から、多様な光ストレス環境で生きる植物の仕組みを理解し、活用することで、環境ストレス耐性の付与、作物の生育促進といった応用研究の基盤となると期待される。

研究成果の概要(英文)：In the photosynthesis process, two large protein complexes called photosystem I (PSI) and II (PSII) are targets of photo-oxidative damage. The irreversible inactivation of photosynthetic apparatuses causes an inhibitory effect on photosynthesis (termed photoinhibition) and consequently leads to impaired plant growth. Thus, photosynthetic organisms have built sophisticated protein repair mechanisms to avoid photoinhibition. Compared with the extensive studies on the PSII repair system, the mechanism of photo-oxidative damage and repair on the PSI complex remain to be elucidated. In this study, we analyzed the degradation and the photo-oxidative modifications of the PSI complex proteins. Results show that the specific degradation of PsaC protein binding FeS cluster in PSI. Further study using LC-MS/MS revealed photo-oxidative modifications of Trp and Met in the protein under light-induced stress.

研究分野：植物分子・生理科学

キーワード：葉緑体 チラコイド膜 光阻害 タンパク質品質管理 光合成

1. 研究開始当初の背景

光合成電子伝達は連続した酸化還元反応であり、光を利用する 2 つの光化学系では非常に大きな酸化力、還元力が生成される。しかしながら、制御しきれない酸化力・還元力は同時に光化学系複合体に損傷(光損傷)を与える。光損傷は本質的に避けられない事象であり、結果として光合成機能の低下(光阻害)を引き起こす。光阻害は植物の成長や物質生産を妨げる要因であり、光阻害の克服は植物生理学や農学の重要課題として取り上げられている。

光化学系 II は強光下で光阻害を受け、強光下での最大光合成を制限する要因である。一方、近年、低温や変動光下で起きる光化学系 I の光阻害が注目されている。光化学系 I 損傷メカニズムの解析から、鉄-硫黄クラスターが光損傷の初発標的的部位であることが示唆されており、さらに発生する活性酸素がさらに周辺タンパク質の損傷を引き起こすと考えられている。光化学系 I 光阻害からの光合成機能の回復は遅く、光阻害により植物の生育は大きく阻害される。しかしながら、光化学系 I の損傷ならびに損傷したタンパク質の品質管理などが多く未解明であった。本研究ではこれらを明らかにすることを目的とし、研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究の開始当初、変動光による光化学系 I の損傷が注目されていた。変動光条件下では光化学系 I に蓄積した還元力が鉄・硫黄クラスター周辺のタンパク質を損傷していることが考えられた(図 1)。損傷したタンパク質は選択的に分解されると予想され、この主体であるプロテアーゼを知ることはタンパク質の品質管理機構の解明につながると思われた。申請者はこれまでに葉緑体チラコイド膜の損傷タンパク質分解において主要な役割をはたす FtsH プロテアーゼをこれまで研究しており、FtsH プロテアーゼが光化学系 I 損傷にはたす役割について未知であったため、本研究では光化学系 I での損傷部位について、タンパク質のアミノ酸レベルで酸化修飾を検討するとともに、それら損傷を受けたタンパク質が FtsH プロテアーゼにより積極的に分解されるか否かを検討、さらにこれら解析から光化学系 I 光阻害でタンパク質分解が関与する品質管理の作用点を明らかにすることを目的とした。

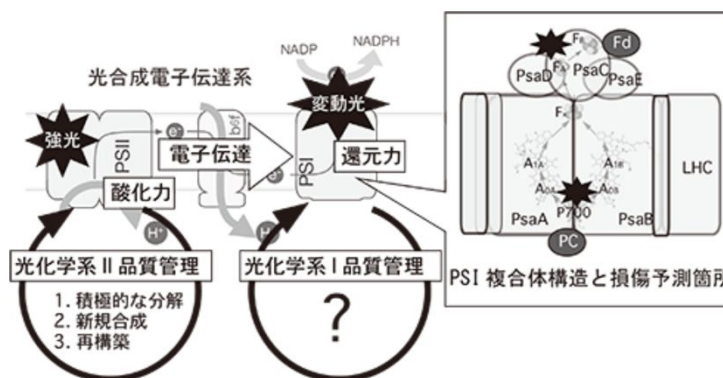


図 1 光化学系 I の品質管理メカニズムは未解明

3. 研究の方法

光化学系 I 複合体を構成するタンパク質において、光損傷を受けると予想されたタンパク質の光化学系 I 光阻害時の分解程度を解析するために、タンパク質合成阻害剤(リンコマイシン、シクロヘキシミド)処理後、変動光による光化学系 I 光阻害を誘導、タンパク質量変動からタンパク質分解効率を評価した。また多種のタンパク質の分解状況を見積もるため、光化学系複合体の各タンパク質の定量的 LC-MS/MS による検出を行った。光傷害では活性酸素が発生し、反応中心ならびに周辺タンパク質を損傷すると思われた。そこで質量分析による光化学系構成タンパク質のアミノ酸酸化修飾の検出を行った。変異体を用いたアプローチとしては、FtsH 欠損変異体 *var2* の光化学系 I 光阻害時を評価するとともに、FtsH 欠損変異体での斑入り表現型による光化学系 IP700 活性測定の影響を低減するために、斑入り回復変異体(*var2 fug1*)を用いて P700 活性測定を行った。

4. 研究成果

1) 光化学系 I 複合体タンパク質分解について

シロイヌナズナ野生株に変動光(800 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$, 5 sec., 30 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$, 55 sec.)を照射すると光化学系 I の光阻害が見られる。この光阻害条件下でのタンパク質分解を見るために、成熟葉にタンパク質合成阻害剤リンコマイシンもしくはシクロヘキシミドを処理した後、光化学系 I を構成するタンパク質の変動をウエスタン解析で解析した。その結果、反応中心を構成する PsaA/B(CPI)は 8 時間までの変動光処理でほとんど減少しなかった。一方で、鉄-硫黄クラスターを近傍の PsaC タンパク質は有意に減少していることが示された(図 3)。また光化学系 I 集光アンテナタンパク質 Lhca, 光化学系 II 複合体の構成タンパク質 D1, 光化学系 II 集光アンテナタンパク質 Lhcb では減少は見られず、PsaC の減少が特異的であることが示唆され

た。しかしながら、他の鉄-硫黄クラスター近傍タンパク質のウエスタン解析は市販抗体の反応性が乏しく、十分な解析が行えなかった。この問題を解決するために大阪大学豊島博士の協力のもとにチラコイド膜タンパク質の定量的LC-MS/MS解析について検討した結果、定量的にチラコイド膜タンパク質の解析が行えることが確認できた (Toyoshima et al., J. Biosci. Bioeng.2019)。今後、この手法を用いることでより包括的な解析ができること期待できる。

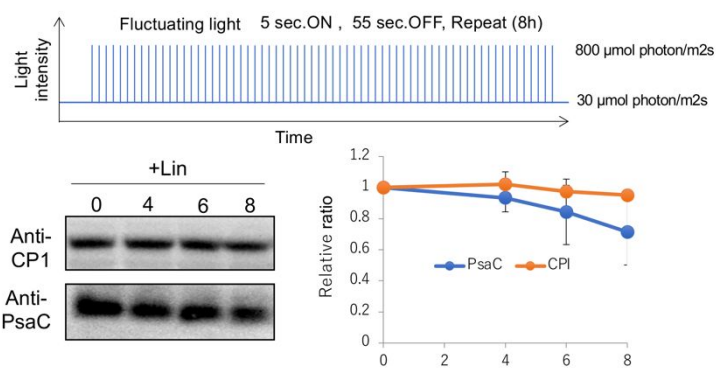


図2 光化学系II光阻害時のPsaCの選択的分解

2) 光化学系 I 光阻害時に関与するプロテアーゼの検討

これまでに光化学系 II の光阻害時に FtsH, Deg プロテアーゼの関与が示されてきた。そこで、これらプロテアーゼ変異体への変動光の影響を解析した。まず Deg 変異体では野生株と比較して、変動光下(800 μmol photons/m²s, 5 sec., 30 μmol photons/m²s, 55 sec.)での生育、P700 活性において有意な差は認められず、Deg プロテアーゼの寄与は少ないと考えた。次いで、FtsH プロテアーゼ変異体 var2 の解析を行った結果、変異体は変動光下で明らかに生育が阻害された。生育は、強光を 40 分/日 (変動光条件での強光照射時間の合計) 照射した場合と比較しても阻害されていた。すなわち、FtsH 変異体での生育阻害は、光化学系 I の光阻害の影響であると考えられ、FtsH プロテアーゼが光化学系 I 光阻害時も機能することが示唆された。斑入り回復変異体 (var2 fug1) を用いて P700 活性測定した結果では、予想通り光化学系 I の活性が FtsH の欠損により低下しており、FtsH プロテアーゼによる損傷タンパク質の除去が光化学系 I の光阻害からの回復に必要なことが示唆された。

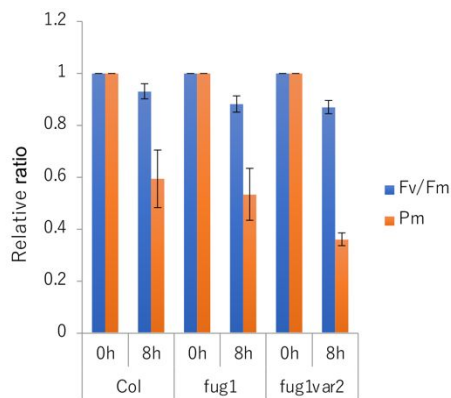


図3 光化学系I活性指標であるP700測定結果

3) 光化学系 I 複合体タンパク質における酸化アミノ酸の検出

光化学系 II 光阻害の研究から、光阻害時に光化学系 I 複合体の特定のアミノ酸残基に酸化修飾が起きることが予測された。そこで、既に光化学系 II 複合体で酸化アミノ酸検出が成功しているクラミドモナスを用いて、光化学系 I 構成タンパク質における酸化アミノ酸の検出を試みた。その結果、光化学系 I 複合体および集光アンテナの複数のタンパク質で、酸化アミノ酸 (Met, Trp) が検出された (詳細は省略)。速い分解が認められた PsaC においては表 1 に示すように 28 番目の Met および 31 番目の Trp で酸化が生じていた。今後、アミノ酸置換変異の導入等により、これらがタンパク質分解のシグナルとなる可能性について検討する必要があると考えられた。

表 1 PsaC サブユニットで検出された酸化アミノ酸

Accession	category	gene	type and position of oxidation							range	Peptide Modified Sequence
			# of ox	position	1st		2nd		type		
					a.a.	codon	a.a.	codon			
PSI subunit	PsaC	0	-	-	-	-	-	-	-	20-35	AC [+57] PLDVLEMVPWDGC [+57] K
PSI subunit	PsaC	1	28	M	28	Oxidation	-	-	-	20-35	AC [+57] PLDVLEM [+16] VPWDGC [+57] K
PSI subunit	PsaC	1	31	-	-	-	W	31	Oxidation	20-35	AC [+57] PLDVLEMVPW [+16] DGC [+57] K
PSI subunit	PsaC	2	28, 31	M	28	Oxidation	W	31	Oxidation	20-35	AC [+57] PLDVLEM [+16] VPW [+16] DGC [+57] K
PSI subunit	PsaC	2	28, 31	M	28	Oxidation	W	31	Dioxidation	20-35	AC [+57] PLDVLEM [+16] VPW [+32] DGC [+57] K
PSI subunit	PsaC	2	28, 31	M	28	Oxidation	W	31	Hydrokynurein	20-35	AC [+57] PLDVLEM [+16] VPW [+20] DGC [+57] K
PSI subunit	PsaC	2	28, 31	M	28	Oxidation	W	31	Kynurein	20-35	AC [+57] PLDVLEM [+16] VPW [+4] DGC [+57] K

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Duan J, Lee KP, Dogra V, Zhang S, Liu K, Caceres-Moreno C, Lv S, Xing W, Kato Y, Sakamoto W, Liu R, Macho AP, Kim C.	4. 巻 180
2. 論文標題 Impaired PSII proteostasis promotes retrograde signaling via salicylic acid.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Physiol.	6. 最初と最後の頁 2182-2197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.19.00483	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 該当する
1. 著者名 Kato Y, Sakamoto W.	4. 巻 10
2. 論文標題 Phosphorylation of the Chloroplastic Metalloprotease FtsH in Arabidopsis Characterized by Phos-Tag SDS-PAGE.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 1080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.01080	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, Y., Hyodo, K., Sakamoto, W.	4. 巻 178
2. 論文標題 The Photosystem II Repair Cycle Requires FtsH Turnover through the EngA GTPase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiol.	6. 最初と最後の頁 596-611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.18.00652	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 Toyoshima, M., Sakata, M., Ohnishi, K., Tokumaru, Y., Kato, Y., Tokutsu, R., Sakamoto, W., Minagawa, J., Matsuda, F., Shimizu, H.	4. 巻 127
2. 論文標題 Targeted proteome analysis of microalgae under high-light conditions by optimized protein extraction of photosynthetic organisms.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Biosci. Bioeng.	6. 最初と最後の頁 394-402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2018.09.001	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 Kato, Y. and Sakamoto, W.	4. 巻 9
2. 論文標題 FtsH protease in the thylakoid membrane: physiological functions and the regulation of protease activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2018.00855	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 Tanaka, M., Iamshchikov, I., Kato, Y., Sabirov, R., Gusev, O., Sakamoto, W. and Sugimoto, M.	4. 巻 6
2. 論文標題 Structure and molecular characterization of diadenosine polyphosphate hydrolase in brachypodium distachyon	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Plant Biochem. Physiol.	6. 最初と最後の頁 220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/2329-9029.1000220	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 -

[学会発表] 計15件(うち招待講演 0件/うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Kato Y
2. 発表標題 FtsH and D1 degradation in PSII repair cycle
3. 学会等名 International Symposium -Photosynthesis Research for the Future (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤裕介・Dogra Vivek・Li Mingyue・黒田洋詩・高橋裕一郎・Kim Chanhong・坂本 亘
2. 発表標題 光化学系II 修復サイクル におけるD1 タンパク質の酸化修飾の影響
3. 学会等名 第60 回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西岡佳司・加藤裕介・小澤真一郎・高橋裕一郎・坂本 亘
2. 発表標題 Phos-tag を用いたチラコイド膜におけるリン酸化タンパク質の解析
3. 学会等名 第60 回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤裕介・Vivek Dogra・Mingyue Li・黒田洋詩・高橋裕一郎・斉藤圭亮・石北 央・Chanhong Kim・坂本 亘
2. 発表標題 D1 タンパク質の酸化修飾がFtsH による基質認識につながる可能性 .
3. 学会等名 第10 回日本光合成学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kato, Y., Hyodo, K. and Sakamoto, W.
2. 発表標題 Regulation of FtsH function and proper FtsH turnover in the PSII repair cycle
3. 学会等名 1st Asia-Oceania International Congress on Photosynthesis. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kato, Y. and Sakamoto, W.
2. 発表標題 Regulation of FtsH function in Photosystem II repair cycle
3. 学会等名 Japan-Finland Seminar 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kato, Y., Dogra, V., Li, M., Kuroda, H., Takahashi, Y., Kim, C. and Sakamoto, W
2. 発表標題 Effects of oxidative post-translational modification in PSII repair.
3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤 裕介・兵頭 究・坂本 亘
2. 発表標題 光化学系II修復サイクルとFtsHプロテアーゼ自身の品質管理の重要性
3. 学会等名 第9回日本光合成学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤裕介, Dogra Vivek, Li Mingyue, 黒田洋詩, 高橋裕一郎, Kim Chanhong, 坂本亘
2. 発表標題 光化学系II修復サイクルにおけるD1タンパク質の酸化修飾の影響
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西岡佳司, 加藤裕介, 小澤真一郎, 高橋裕一郎, 坂本亘
2. 発表標題 Phos-tagを用いたチラコイド膜におけるリン酸化タンパク質の解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019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
---------	---------