

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 7 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780103

研究課題名(和文) 葉緑体酸素発生系ホモログ群の分子機能の全容解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular functions of the oxygen-evolving complex homologs in chloroplasts

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：緑色植物の葉緑体には、水分解-酸素発生反応を行う光化学 II 複合体の、水分解-酸素発生側に結合する膜表面性タンパク質であるPsbPとPsbQのホモログ(酸素発生系ホモログ)が、数多く存在する。本研究では、シアノバクテリアやシロイヌナズナの変異体を用いて、それらの分子機能を解析した。その結果、PsbPとPsbQホモログが、光合成電子伝達鎖において、光化学系II活性の光環境適応や、光化学系II周辺の循環的電子伝達に関わる葉緑体NDH複合体の蓄積など、重要かつ多様な機能を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The oxygen-evolving complex (OEC) proteins are membrane-peripheral proteins bound to thylakoid lumenal side of photosystem (PS) II, and PsbP and PsbQ are the OEC proteins found in green plants. In addition, multiple homologs for PsbP and PsbQ have been identified in chloroplasts and in cyanobacteria; however, their functions have not been fully elucidated yet. In this study, we characterized molecular functions of the OEC homologs using mutants of Arabidopsis and cyanobacteria. It was found that the OEC homologs indeed have various functions in photosynthetic electron transport, such as the regulation of PSII activity under various light conditions and the accumulation of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase (NDH) complex that operates in cyclic electron transport around PSI. These results suggest that functional diversification of the OEC homologs has occurred during evolution to support the optimum photosynthesis.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：植物 光合成 電子伝達 環境応答 分子進化

1. 研究開始当初の背景

緑色植物には、葉緑体酸素発生系 (Oxygen-Evolving Complex: OEC) ファミリータンパク質として、光化学系 II (Photosystem II: PSII) の膜表面性サブユニットである PsbP と PsbQ のホモログ (酸素発生系ホモログ、OEC ホモログ) が、数多く存在する。それらの OEC ホモログのほとんどは、葉緑体チラコイド膜内腔への蓄積が推定されている。葉緑体チラコイド膜内腔は光合成エネルギー生産の反応場であり、植物の生理状態によって pH やイオン環境がダイナミックに変化する。そのため、OEC ホモログ群は、光合成電子伝達鎖に関与する膜タンパク質の機能調節を介し、植物の環境応答において重要な役割を担っている可能性が考えられる。しかしながら、それらの分子機能の実態は未解明な部分が多かった。

2. 研究の目的

我々の過去の mRNA 転写プロファイル解析を用いた研究によって、葉緑体の OEC ホモログが、光合成電子伝達鎖の機能調節に係る役割を持つことが示唆されていた。そこで本研究では、これまでの研究で得られた知見をもとに、緑色植物特有に発達した OEC ホモログ群の分子機能の全容を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 標的 OEC ホモログ遺伝子に関するシアノバクテリア変異体、及び、シロイヌナズナ T-DNA 挿入変異体もしくは RNAi 変異体を、作成、ないし取得し、光合成機能への影響をクロロフィル蛍光分析等によって解析する。特に、強光ストレスなどの光環境変動における光合成への影響を解析する。

(2) 各変異株から抽出した葉緑体を材料に、Blue Native/SDS 二次元電気泳動やスクロース密度勾配遠心により、チラコイド膜タンパク質複合体の形成状態への影響を解析する。

(3) 各種、生化学的手法を用いて、各 OEC ホモログと相互作用する複合体、及び、タンパク質因子の同定を試みる。

4. 研究成果

(1) 原核生物型 PsbP (CyanoP) の分子機能解析
PsbP ホモログの基本的機能を有すると考えられる原核生物型 PsbP (CyanoP) の分子機能を解明すべく、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の CyanoP 欠損変異株 (P 株) を作出し、様々な生育条件下における野生株との生育比較を行った。その結果、光化学系 II (PSII) の酸素発生反応に必須であるカルシウム、塩素イオンを除いた培地で植え継ぎを繰り返すことで P 株の増殖の遅れ、PSII の酸素発生活性の低下が顕著に観察された。そこで CyanoP

の PSII への結合様式を明らかにするため、界面活性剤によるチラコイド膜の可溶化条件を詳細に検討し、最適化した界面活性剤を用いてチラコイド膜の可溶化を行い、Blue-Native PAGE やゲル濾過、ショ糖密度勾配遠心法による PSII 複合体の分離を試みた。その結果、CyanoP と複合体との相互作用を示唆する結果を得ることができた。

(2) PsbP-like protein 1 (PPL1) の生理的役割の解析

CyanoP と進化的に最も近いと考えられる PPL1 について、シロイヌナズナ *PPL1* 遺伝子発現抑制株、及び、過剰発現株を用いて、様々な光条件下における野生株との生育比較実験を行った。その結果、PSII-LHCII の安定性のみならず、迅速な集光機能の調節に PPL1 が関わることを示唆する結果を得た。一方、活性型 PSII が局在するグラナチラコイドには PPL1 の蓄積がほとんど認められなかったことから、PPL1 は PSII-LHCII 複合体の形成過程に関わる可能性が考えられた (投稿準備中)。シアノバクテリアと緑色植物は異なる集光タンパク質を有することから、PPL1 と CyanoP の分子機能は大きく異なっていると考えられた。

(3) 循環的電子伝達における酸素発生系ホモログの役割の解析

我々はこれまでに、PPL2 と 2 種の PsbQ-like protein (PQL1, 2) が、光合成の循環的電子伝達を行う葉緑体 NAD(P)H デヒドロゲナーゼ (NDH) 複合体の新規サブユニットであることを報告している。本研究では、新たに PQL3 の葉緑体 NDH 複合体における役割を明らかにした (投稿準備中)。

近年、他研究グループによる研究結果もあわせて、高等植物の葉緑体 NDH 複合体が、進化の過程で OEC ホモログを含む新しいサブユニットを多数獲得し、非常に大きな超複合体を形成していることが明らかとなっている。そこで葉緑体 NDH 複合体の新規サブユニットに対する統一した名称を、関連する研究者とともに提案した (図 1)。

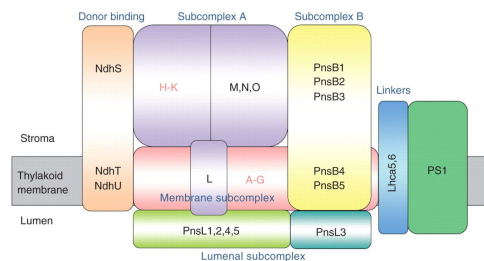


図 1. 葉緑体 NDH-like 複合体のサブユニット構造

我々が同定したルーメン側サブコンプレックスを形成する OEC ホモログには、新たに Photosynthetic NDH subunit of lumenal location (PnsL) の名称が与えられた。

(4) まとめと展望

近年、外国の研究グループにより、PEC ホモログの一つである PPD1 が、光化学系 I の分子集合に関わることが報告された。また、最近の国際会議では、新たな PPD や PQL の存在が示唆されるなど、OEC ホモログの重要性と多様性は、研究当初の予想よりも大きく広がりを見せている。本研究で蓄積したデータを、今後、さらに発展させることで、緑色植物特有に発達した OEC ホモログ群の分子機能の全容解明につなげていきたい。

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 9 件、全て査読あり)

Ido, K., Nield, J., Fukao, Y., Nishimura, T., Sato, F., Ifuku, K. “Cross-Linking Evidence for Multiple Interactions of the PsbP and PsbQ Proteins in a Higher Plant Photosystem II Supercomplex” *J. Biol. Chem.* (2014), in press.

Aoi, M., Kashino, Y., Ifuku, K., “Function and association of CyanoP in photosystem II of *Synechocystis* sp. PCC 6803” *Res. Chem. Intermed.* (2014) in press.

Ifuku, K., “The PsbP and PsbQ family proteins in the photosynthetic machinery of chloroplasts” *Plant Physiol. Biochem.* (2014), in press.

DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.01.001.

Nishimura, T., Uno, C., Ido, K., Nagao, R., Noguchi, T., Sato, F., Ifuku, K. “Identification of the basic amino acid residues on the PsbP protein involved in the electrostatic interaction with photosystem II” *Biochim. Biophys. Acta* (2014), in press.

DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.12.012.

伊福健太郎, 「光化学系 II の光阻害に対するチラコイド膜内腔タンパク質の役割」, 光合成研究 23 (2), 86-93 (2013)

<http://photosyn.jp/journal.html>

Ido, K., Kakiuchi, S., Uno, C., Nishimura, T., Fukao, Y., Noguchi, T., Sato, F., and Ifuku, K. “The Conserved His-144 in the PsbP Protein Is Important for the Interaction between the PsbP N-terminus and the Cyt *b*₅₅₉ Subunit of Photosystem II” *J. Biol. Chem.* 287: 26377-26387 (2012)

DOI: 10.1074/jbc.M112.385286.

Kakiuchi, S., Uno, C., Ido, K., Nishimura, T., Noguchi, T., Ifuku, K., and Sato, F. “The PsbQ protein stabilizes the functional binding of the PsbP protein to photosystem II in higher plants” *Biochim Biophys Acta (Bioenergetics)* 1817: 1346-1351 (2012)

DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.01.009.

伊福健太郎, 「葉緑体酸素発生系タンパク質の分子進化と植物の環境適応」, 生

化学, 84(11): 934-938 (2012)

http://www.jbsoc.or.jp/mini_review

Ifuku, K., Endo, T., Shikanai, T., and Aro, E.M. “Structure of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex: nomenclature for nuclear-encoded subunits” *Plant Cell Physiol.* 52:1560-1568 (2011)

DOI: 10.1093/pcp/pcr098.

[学会発表](計 15 件)

草間翔子, 松井信太郎, 佐藤文彦, 伊福健太郎, 「PsbP-Like protein 1 (PPL1) の光化学系 II 超複合体における分子機能」, 第 55 回 日本植物生理学会年会, 富山大学, 2014/03/18-20 (ポスター発表)

西村太志, 宇野千尋, 井戸邦夫, 長尾遼, 深尾陽一郎, 野口巧, 佐藤文彦, 伊福健太郎, 「高等植物の光化学系 II 膜表在性サブユニットの結合様式」, 第 55 回 日本植物生理学会年会, 富山大学, 2014/03/18-20 (口頭発表)

伊福健太郎, 「葉緑体酸素発生系タンパク質の分子進化と機能分化」, 第 27 回 インターゲノミクスセミナー, 神戸大学, 2013/12/06 (招待講演)

伊福健太郎, 「チラコイド膜タンパク質複合体の機能を支える膜表在性タンパク質の役割」, 日本植物学会第 77 回大会, 札幌, 2013/9/15 (シンポジウム講演)

Nishimura, T., Asada, M., Ido, K., Mino, H., Sato, F., and Ifuku, K., “Interaction of the PsbP protein in higher plant PSII complex”, The 16th International Congress on Photosynthesis, St. Louis, MO, USA August 11-16, 2013. (ポスター発表)

Kusama, S., Matsui, S., Sato, F., Ifuku, K., “Functional analysis of PsbP-like protein 1 (PPL1) in the PSII-LHCII supercomplex”, The 16th International Congress on Photosynthesis, St. Louis, MO, USA August 11-16, 2013. (ポスター発表)

Ifuku, K., “Interaction and function of the membrane-extrinsic proteins of photosystem II in higher plants” International Conference, Photosynthesis Research for Sustainability, Baku, Azerbaijan, 2013/06/06 (招待講演)

Ifuku, K., “Functions of Thylakoid Lumenal Proteins Against Photoinhibition of Photosystem II”, 第 54 回 日本植物生理学会年会 シンポジウム, 岡山, 2013/03/23 (シンポジウム講演)

伊福健太郎, 「緑色植物型の膜表在性タンパク質による光化学系 II 水分解反応の制御機構」, 日本植物生理学会 シンポジウム, 岡山, 2013/03/21 (シンポジウム講演)

青井政樹, 菓子野康浩, 佐藤文彦, 伊福

健太郎, 「シアノバクテリア型 PsbP (Cyano P) の分子機能に関する研究」, 第 54 回 日本植物生理学会年会, 岡山, 2013/03/21-23 (ポスター発表)

草間翔子、松井信太郎、佐藤文彦、伊福健太郎, 「PsbP-Like protein 1 (PPL1) の発現抑制が光化学系 II 複合体形成に与える影響」, 第 54 回 日本植物生理学会年会, 岡山, 2013/03/21-23 (ポスター発表)

山口 咲希、井戸 邦夫、遠藤 剛、佐藤 文彦、伊福 健太郎, 「光化学系 II 光阻害感受性植物における光合成馴化機構の解析」, 第 54 回 日本植物生理学会年会, 岡山, 2013/03/21-23 (ポスター発表)

Ifuku, K., “Evolution of the OEC family proteins in chloroplasts and plant adaptation to the environment”, Japan-Finnish Seminar 2012, Naantali, Finland, 2012/09/8-13 (招待講演)

松井信太郎, 石原靖子, 井戸邦夫, 佐藤文彦, 伊福健太郎, 「強光ストレス耐性に関わる PsbP-Like 1 (PPL1) の分子機能解析」, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都女子大, 2012/03/25 (口頭発表)

Ifuku, K., “Functional Diversification of photosystem II extrinsic subunits in higher plants”, International Conference, Photosynthesis Research for Sustainability, Baku, Azerbaijan, 2011/07/27 (招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

取得状況 (計 0 件)

なし

〔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