

令和 3 年 4 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07431

研究課題名(和文)クロロフィル結合モチーフをもつ低温誘導型チラコイド膜タンパク質LILの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of LIL proteins that have chlorophyll-binding motifs, thylakoid localized and low-temperature responsive

研究代表者

田中 亮一 (Tanaka, Ryouichi)

北海道大学・低温科学研究所・准教授

研究者番号：20311516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：寒冷圏の植物が低温下で光障害を回避するメカニズムの解明を目指して、光化学系の調節や保護に機能すると考えられる、クロロフィル結合モチーフを持つLight-harvesting-likeタンパク質(LIL)の機能解明を目指した。シロイヌナズナのLIL8変異体の解析や複合体の解析、時間分解クロロフィル蛍光測定によって、LIL8が集光装置のダイナミクスの制御に関与していることが示唆された。また、イチイのIso-seq解析、イムノブロットングによって、光化学系II量子収率の年間変化とLIL1の蓄積が逆相関を示すことがわかった。LIL1が冬季に光化学系IIに結合して、熱放散に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

寒冷圏の植物、とくに樹木は寒冷圏の生態系のみならず、地球全体の生態系を支える上で重要な役割を果たしている。しかし、物質生産の原動力となる光合成の反応は気温の影響を受けやすく、とくに低温下では、光合成に関わるタンパク質や葉緑体が障害を受けやすいことが知られている。寒冷圏の植物は他の地域の植物に比べて低温下で光合成のタンパク質を守る機能が発達していると考えられる。本研究は、このLILというタンパク質ファミリーの研究を通して、低温下で光合成を守る機能の解明に貢献した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism by which plants in the cryosphere avoid photodamages at low temperatures, we sought to understand the function of light-harvesting-like proteins (LILs) with chlorophyll-binding motifs, which are thought to function in the regulation and protection of the photosystem. Analysis of Arabidopsis LIL8 mutants and complexes, as well as time-resolved chlorophyll fluorescence measurements, suggested that LIL8 is involved in the regulation of light-harvesting system dynamics. Iso-seq analysis and immunoblotting in yew showed an inverse correlation between annual changes in photosystem II quantum yield and LIL1 accumulation, suggesting that LIL1 binds to photosystem II in winter and is involved in heat dissipation.

研究分野：植物生理

キーワード：光合成 低温

## 1. 研究開始当初の背景

寒冷圏の多くの植物は低温下(凍結をしない程度の気温)で光障害を受けずに光合成をすることができる。寒冷圏の植物は光障害を回避するために、吸収した光エネルギーを熱として放散する複数のメカニズムをもつと考えられる。これらのメカニズムには、エネルギー伝達が可能な補欠分子(クロロフィルやカロテノイドなど)をもつタンパク質が関与していると予想される。クロロフィルやカロテノイドの大半は、光学系複合体のタンパク質に結合しているが、植物には、光化学系の集光装置(LHC)と相同性をもち、色素を結合すると考えられる Light-harvesting-like タンパク質(LIL)が存在する。種子植物には、LIL1-LIL6, LIL8, ferrochelatase 2 の8種類のLILタンパク質が存在する(Engelken et al., 2010)。このうち、われわれは、LIL3がフィトール代謝に関わる geranylgeranyl reductase と相互作用をし、この酵素の安定化と局在に寄与することを報告している(Tanaka et al., 2010, Takahashi et al., 2014)。また、LIL1(別名 early light induced protein: ELIP)は、低温で誘導され、クロロフィル a とβカロテンを結合すると報告されている(Adamska et al., 1999)。

## 2. 研究の目的

研究開始当初は、これ以外の本研究では低温下で誘導される3種類のLILに焦点をあて、LIL複合体の分離精製と解析およびLIL欠損植物の光合成やエネルギー移動の解析をとおして、植物の低温下での光合成維持機能の一端を明らかにすることを目指した。研究の経過の中で、低温では誘導されないものの、ストレス条件下での光合成の調節に関係があると考えられたLIL8の機能についても研究を進めた。また、イチイ(*Taxus cuspidata*)を主な材料として研究を進めていく上で、過去の文献とは異なり、低温誘導されるLIL4, LIL5が見つからなかったため、冬季に大きく誘導されるLIL1を中心に研究を進め、その機能解析を研究の主目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を材料としたLIL8の研究とイチイを材料としたLIL1の研究を並行して進めることとした。

まず、LIL8に関しては、抗体を作成し、Clear-Native電気泳動で光化学系複合体との相互作用を調べた。次に、シロイヌナズナのLIL8欠損株をアメリカのストックセンターより入手し、その欠損株の形質を野生型のシロイヌナズナと比較することにより、LIL8の機能を調べた。LIL8の形質を調べるにあたり、Walz社のPAMクロロフィル蛍光測定装置を主に用いた。また、神戸大学の秋本誠志准教授の研究室との共同研究により、クロロフィル蛍光の時間分解解析をおこなった。また、タンパク質やRNAの分析に関しては、一般的に行われているイムノブロットイングやqRT-PCRの手法を用いた。

イチイにおけるLIL1の解析をするにあたり、まず、イチイの北側と南側の葉で、光化学系IIの量子収率(Phi2)の変動を年間を通して測定した。測定には、アメリカのPhotosynQ LLCのMultispeQ測定装置を用いた。また、LIL1の抗体をペプチド配列を抗原として用いて作成した。イチイのIso-seq解析のため、イチイのRNAをPureLink Plant RNA reagent (Thermo Fisher)およびRNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を併用した。Iso-seq解析はかずさDNA研究所において、PacBio Sequel (イルミナ)によっておこなった。

## 4. 研究成果

LIL8のClear-Native電気泳動によって、LIL8は光化学系I-IIメガ複体に結合していることが示唆された。また、界面活性剤の種類によっては、LIL8がさらに小さい複体に結合していることが示唆された(図1)。この結果から、LIL8は光化学系複合体のLHCと相互作用していることを考えている。

LIL8変異体と野生型の形質の違いはわずかではあるが、定常状態のクロロフィル蛍光

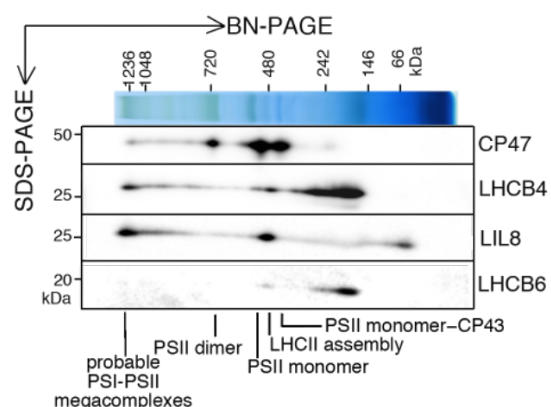


図1 光化学系I-IIメガ複合体へのLIL8の結合  
野生型シロイヌナズナのチラコイド膜をジギトニンで可溶化し、BN-PAGE/SDS-PAGEでタンパク質を分離したあと、CP47, LHCB4, LIL8, LHCB6の抗体でタンパク質を検出した。LIL8は、光化学I-IIメガ複合体およびLHCIIアセンブリ複体に結合していることが示唆された

の解析から、LIL8 変異体では LHCII の一部が光化学系 II から乖離していることが示唆された。また、近赤光の照射によって、LHCII の光化学系 I への移動が見られなかった。さらに、光化学系 I の時間分解クロロフィル蛍光の測定から、光化学系 I のエネルギー移動が遅くなっているという結果が出た。この結果から、一部の LHCII がより多く光化学系 I に結合していると考えられた。これらの結果を総合して、LIL8 は LHCII のダイナミクスを制御する因子ではないかと考えられる。

LIL1 については、主にイチイを材料として研究を行った。イチイの年間の Phi2 を南側と北側の葉で比較したところ、春から秋にかけて、Phi2 は光強度に応答することが示されたが、これは、他の草本類とほぼ同様の結果であった。北側の葉の Phi2 は、春から秋にかけては、ほぼ一定であったが、11 月に徐々に低下し、12 月から 3 月半ばまでは、常に低い値を示した。特筆すべき点として、11 月には、気温が 0°C を下回る日でも Phi2 は高い値を示したことがあげられる。これは、Phi2 の低下が気温の低下による炭素固定系などの代謝活性の低下では説明できないことを示している。

Iso-seq の結果で、冬季は LIL1 タンパク質をコードする RNA がもっとも大量に発現しており、分子種としても少なくとも 16 種類存在することが明らかとなった。もっとも発現量の多い LIL1 に対して抗体を作成し、免疫ブロッティングを行ったところ、南側の葉でも北側の葉では 12 月から 3 月にかけて LIL1 が蓄積していることが明らかとなった。また、南側の葉では、量は少ないものの、10 月から蓄積し、4 月まで蓄積が続くことが明らかとなった。これらの結果から、LIL1 の蓄積は、Phi2 の変化と逆相関を示すことが明らかとなった。

イチイのチラコイド膜を単離し、光化学系複合体を  $\alpha$ -dodecyl maltoside で可溶化した後、Clear-Native PAGE によって、複合体を分離し、免疫ブロッティングによって、LIL1 がどの複合体に結合しているのかを調べた。その結果、多くの LIL1 は単独で存在するものの、一部の LIL1 は光化学系 II-LHCII の超複合体のいくつかのフォームに結合していることが示唆された。一方で、光化学系 I への結合も見られたが、光化学系 II に比べるとその量は少なかった。

これらの結果を総合すると、冬季間、Phi2 が低下する時期にイチイの葉では LIL1 が大量に蓄積しており、LIL1 が光化学系 II に結合しているとすると、LIL1 が光化学系 II の熱放散を誘導していると考えられる。

#### 引用文献

- Engelken, J., Brinkmann, H. & Adamska, I. Taxonomic distribution and origins of the extended LHC (light-harvesting complex) antenna protein superfamily. *BMC Evol Biol* **10**, 233 (2010).
- Tanaka, R. *et al.* LIL3, a light-harvesting-like protein, plays an essential role in chlorophyll and tocopherol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 16721-16725 (2010).
- Takahashi, K., Takabayashi, A., Tanaka, A. & Tanaka, R. Functional Analysis of Light-harvesting-like Protein 3 (LIL3) and Its Light-harvesting Chlorophyll-binding Motif in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 987-999 (2014).
- Adamska, I., Roobol-Boza, M., Lindahl, M. & Andersson, B. Isolation of pigment-binding early light-inducible proteins from pea. *European Journal of Biochemistry* **260**, 453-460 (1999).

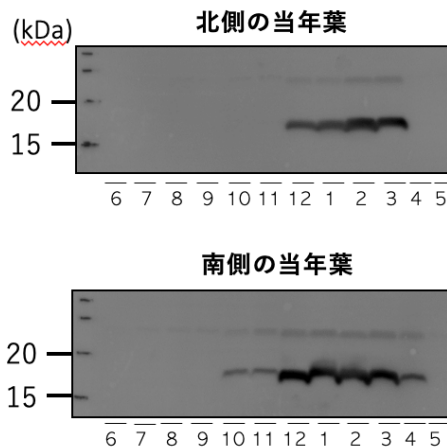


図2 冬季のイチイにおける LIL1 の蓄積  
イチイの北側と南側において、LIL1 タンパク質の蓄積を免疫ブロッティングによって解析した。

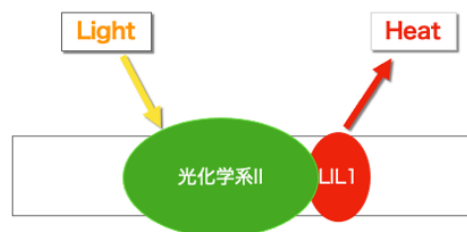


図3 冬季の常緑樹における LIL1 の蓄積  
イチイの北側と南側において、LIL1 タンパク質の蓄積を免疫ブロッティングによって解析した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hu X, Ting J, Hortensteiner S, Tanaka A, Tanaka R	4. 巻 290
2. 論文標題 Subcellular localization of chlorophyllase2 reveals it is not involved in chlorophyll degradation during senescence in Arabidopsis thaliana.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Science	6. 最初と最後の頁 110314-110314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plantsci.2019.110314	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 Yukako, Yokono Makio, Akimoto Seiji, Takabayashi Atsushi, Tanaka Ayumi, Tanaka Ryouichi	4. 巻 58
2. 論文標題 Deficiency of the Stroma-Lamellar Protein LIL8/PSB33 Affects Energy Transfer Around PSI in Arabidopsis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 2026 ~ 2039
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcx124	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5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 澤田 未菜, 岩佐 万紀子, 森山 亮, 原 登志彦, 田中 歩, 伊藤 寿, 高林 厚史, 田中 亮一
2. 発表標題 秋から冬にかけてのイチイの光化学系 II 量子収率 の漸次的変化
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Zihao Ye, Mina Sawada, Ryo Moriyama, Toshihiko Hara, Ayumi Tanaka, Atsushi Takabayashi, Ryouichi Tanaka
2. 発表標題 Correlation of winter-specific gene expression and sustained thermal dissipation in over-wintering yew leaves
3. 学会等名 日本植物生理学会第62回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryouichi Tanaka
2. 発表標題 A stable intermediate pigment-protein complex for photosystem II assembly.
3. 学会等名 First Japan-US Binational Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryouichi Tanaka
2. 発表標題 Multiple roles of light-harvesting-like proteins in the regulation and maintenance of the photosynthetic machinery
3. 学会等名 Japan-Finland Seminar on "Shaping photosynthesis against climate change and toward efficient water and nutrient management" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukako Kato, Makio Yokono, Seiji Akimoto, Atsushi Takabayashi, Ayumi Tanaka, Ryouichi Tanaka
2. 発表標題 ストロマラメラに局在するLight-harvesting-likeタンパク質LIL8の機能解析
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学・低温科学研究所・生物適応科学ホームページ  
<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/plantadapt/>

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
---------	---------