

平成23年 5 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570039

研究課題名 (和文) 光・熱ストレス下での光化学系 II D1 タンパク質凝集の分子機構の
解明研究課題名 (英文) Study on the molecular mechanism of D1 protein aggregation in
photosystem II under light and heat stresses

研究代表者

山本 泰 (YAMAMOTO YASUSHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：40091251

研究成果の概要 (和文)：光化学系 II の品質管理に関する 3 年間の研究成果は以下のように要約できる。(1) 光や熱ストレス下では脂質の過酸化と活性酸素の発生が起こり、それが光化学系 II の反応中心結合タンパク質 D1 の酸化的損傷、凝集および分解の原因の一つとなることが明らかになった。(2) 光や熱ストレス下では、光化学系 II での光化学反応や脂質過酸化の結果生じる活性酸素の発生量を減らし、光化学系 II への損傷を防ぐために、チラコイド膜が unstacking を含む種々の構造変化を起こすことが分かった。(3) チラコイド膜ではグラナに多く存在する光化学系 II が強光で損傷を受けると、グラナ、恐らくグラナマージン、に存在する金属プロテアーゼの FtsH hexamer の作用によって損傷 D1 タンパク質が分解されることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：The results of our 3 years' research activity are summarized as follows: (1) Under light and heat stresses, lipid peroxidation and the subsequent production of reactive oxygen species take place, which become one of the causes for oxidative damage, aggregation and degradation of the D1 protein. (2) To prevent further damage to the D1 protein under light stress, the thylakoid membranes show structural changes including membrane unstacking. (3) When the photosystem II complexes in the grana are photodamaged under high light, subunits of metalloprotease FtsH forms hexamers at the grana, probably at the grana margin, and carry out degradation of the damaged D1 protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：光化学系 II, D1 タンパク質, 光ストレス, 熱ストレス, FtsH プロテアーゼ, チラコイド, 活性酸素, 光化学系 II の品質管理

1. 研究開始当初の背景

光化学系Ⅱは、シアノバクテリア、藻類、および高等植物のチラコイド膜に存在し、全部で25種類以上のタンパク質サブユニットからなる超分子複合体である。光化学系Ⅱは、水を分解し酸素を発生する重要な働きをするが、一方で、強光や熱ストレスの影響を受けやすい。特に反応中心結合タンパク質D1は、これらのストレス下で容易に酸化損傷を受ける。従って、D1タンパク質を中心として行われる光化学系Ⅱの品質管理は、酸素発生型光合成生物にとって極めて重要な意味をもつ [Yamamoto : Plant Cell Physiol. 42 (2001) 121-128]。

光ストレス下に置かれた光化学系Ⅱでは、電子伝達が阻害され(光阻害)、それと同時に損傷D1タンパク質が速やかに分解される。その後、新規に合成されたD1タンパク質が光化学系Ⅱ複合体に挿入されて、損傷の修復が終わる。これに対し、熱ストレス下で光化学系Ⅱがどのような応答をするか、については、よく分かっていない。最近、熱ストレスで損傷を受けたD1タンパク質の分解は、光阻害の場合と同様、金属プロテアーゼ FtsH によって行われることが、*Synechocystis* PCC6803 とホウレンソウで明らかとなった [Kamata et al. (2005) Photochem. Photobiol. Sci. 4, 983-990, Yoshioka et al. (2006) J. Biol. Chem. 281, 21660-21669]。

光化学系Ⅱの光阻害と高温阻害では、D1タンパク質の分解に加えて、D1と周辺タンパク質との凝集が起きる。凝集は、光阻害の場合にはD1とD2、CP43、cytb559 α -subunitとの間で (Yamamoto 2001)、高温阻害の場合は、D1とD2、CP43 との間で起きる [Komayama et al. : Biochim. Biophys. Acta (2007) 838-846]。この D1タンパク質凝集とD1の分解との関係については、まだ不明な点が多い。D1タンパク質の凝集産物が蓄積すると、光化学系Ⅱの機能が阻害される可能性が大きい。従って、チラコイド膜には凝集を防ぐか、凝集物を除去する機構が存在するはずである。

2. 研究の目的

(1) 光化学系Ⅱの高温阻害に伴うD1タンパク質の凝集の解析：

シアノバクテリア *Synechocystis* PCC6803 に対して強光照射や穏やかな熱処理を行うと、D1タンパク質の凝集が起こる。強光照射の場合、これはD1タンパク質の酸化損傷に伴う現象であることが示されてきた [Yamamoto : Plant Cell Physiol. 42 (2001) 121-128]。興味深いことに、現在、高温ストレスで起きるD1タンパク質の凝集も、光化学系Ⅱ周辺に生じた活性酸素(特に一重項酸素とヒドロキシルラジカル)によるD1タンパク質の酸化損傷で生じることを確認しつつある [Yamashita et al. J. Biol. Chem. 283 (2008) 28380-28391]。

本研究では、この光化学系Ⅱの高温阻害に関して更に詳細なデータを集め、その解析を進める。

(2) 高温ストレスによる光化学系Ⅱ阻害の原因解明：

光化学系Ⅱの高温阻害の原因としては、①上に述べた、熱による活性酸素の発生と活性酸素によるタンパク質の酸化損傷、②熱による Q_B プラストキノン結合部位の不安定化とプラストキノンの遊離、③膜表在性タンパク質(Psb0など)の遊離とMnの遊離があげられる。これらのそれぞれの過程が、光化学系Ⅱの高温阻害に関与する割合を決定し、高温阻害の主要因を解明する。

(3) 高温ストレスによるD1タンパク質の分解過程の解析：

熱ストレスによって起きる光化学系Ⅱ複合体内の構造変化(光化学系Ⅱの単量体化D1タンパク質の脱リン酸化、光化学系ⅡからのCP43の脱離、D1タンパク質の分解、D1タンパク質の凝集の過程)を時間系列で整理し、光阻害と比較検討する。D1タンパク質の分解に関わっている可能性が高いFtsHプロテアーゼについて、その作用機構を解析する。

3. 研究の方法

(1) 光化学系Ⅱの高温阻害に伴うD1タンパク質の凝集の解析：

特に、EPR spin trapping 法による活性酸素分子の同定、また、活性酸素の発生源と関連して、熱による脂質過酸化について検討する。一方、強光や高温ストレス下のホウレンソウチラコイド膜では、チラコイド膜が

stack したグラナ部分 D1 タンパク質の凝集が多くみられることが、最近の研究で明らかとなった [Komayama et al. : Biochim. Biophys. Acta (2007) 838-846]。これは、損傷 D1 タンパク質を分解する FtsH プロテアーゼがグラナで少ないため、またグラナに phosphatase が無いので、D1 タンパク質の分解開始をコントロールする D1 タンパク質の脱リン酸化が起きないため、と思われる。この2点を重点的に検討したい。また、チラコイドの強光や熱による unstacking の程度を調べ、これらのストレス下で D1 タンパク質を速やかに分解するために、チラコイドの unstacking が重要な役割を果たす可能性について検討する。

(2) 高温ストレスによる光化学系 II 阻害の原因解明：

脂質過酸化が高温ストレスによる光化学系 II の損傷の原因になる可能性を追求する。脂質過酸化の定量法の確立、脂質過酸化による D1 タンパク質の分解の可能性の検討などが必要である。

(3) 高温ストレスによる D1 タンパク質の分解過程の解析：

FtsH プロテアーゼのチラコイド膜での存在状態に関して詳細な検討を行い、D1 分解にかかわる FtsH の作用機構を解析する。

4. 研究成果

(1) 光や熱ストレス下では脂質の過酸化と活性酸素の発生が起これ、それが光化学系 II の反応中心結合タンパク質 D1 の酸化的損傷、凝集および分解の原因の一つとなることがホウレンソウチラコイド膜と光化学系 II 膜を用いて明らかになった [Yamashita et al. J. Biol. Chem. 283 (2008) 28380-28391]。脂質は単にタンパク質の作用の場を提供するだけの役割を担うのではなく、タンパク質の作用に重要な役割を果たすことが示唆されているが、本研究によって脂質が光化学系 II の D1 タンパク質の損傷に関わることが明らかとなり、脂質の光化学系 II 品質管理における役割が明らかになった。特に重要な点は、脂質の過酸化によって活性酸素（一重項酸素とヒドロキシルラジカル）が生じ、それが D1 タンパク質の酸化的損傷を引き起こすことの発見である。今後は、光化学系 II 複合体の結晶構造解析から明らかとなった光化学系 II の脂質の種類と存在部位に注目し、個別の脂質の役割を特定する努力を行う予定である。

(2) 光や熱ストレス下では、光化学系 II での光化学反応や脂質過酸化の結果生じる活性酸素の発生量を減らし、光化学系 II への損傷を防ぐために、チラコイド膜が unstacking を含む種々の構造変化を起こすことが分かった [Khatoon et al. J. Biol. Chem. 284 (2009) 25343-25352]。光や熱ストレスでチラコイドが unstacking のような大きな構造変化を起こすことを示したのは今回が最初である。恐らくストレス下では活性酸素が光化学系 II 周辺で生じ易く、その原因となっているのが、膜の流動性を維持するための脂肪酸の不飽和度の高さと共に伴う脂質過酸化の可能性の増大であると考えられる。チラコイドの unstacking は、強光下では光化学系 II と I の間の電子伝達をスムーズに進めるために光化学系 II と I の複合体の移動を進め、結果として光化学系 II からの活性酸素の発生を少なくすること、損傷を受けた光化学系 II の D1 タンパク質の分解に必要な FtsH プロテアーゼが光化学系 II に近づきやすい条件を作ること、の主に2つの目的で起きると考えられる。高温下では、恐らくチラコイドの全面で脂質過酸化が起き、それとタンパク質の酸化損傷とが原因となってチラコイドの unstacking が生じる可能性がある。いずれにしても、強光・高温ストレス下でのチラコイドの unstacking は電子顕微鏡を用いて証明し、その原因も分子レベルで突き止めなければならない。

(3) チラコイド膜ではグラナに多く存在する光化学系 II が強光で損傷を受けると、グラナ、恐らくグラナマージン、に存在する金属プロテアーゼの FtsH hexamer の作用によって損傷 D1 タンパク質が分解されることがホウレンソウチラコイド膜で明らかとなった [Yoshioka et al. J. Biol. Chem. 285 (2010) 41972-41981]。研究ではチラコイド膜をグラナ、光化学系 II 膜、光化学系 II コアに分画し、FtsH の抗体を用いた Western 解析で FtsH の量、存在状態、安定性を調べた。その結果、FtsH hexamer はグラナに多く存在していることが分かった。恐らく、グラナに多数存在する光化学系 II が光で損傷を受けた後、速やかに D1 を分解するために、FtsH そのような存在場所を確保していると思われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

① Assay of photoinhibition and heat inhibition of photosystem II in higher

plants. N. Nijo, Y. Yamamoto 以下3名, 査読有

Methods in Mol. Biol. (2010) 684, 201-215, Humana press

② Quality control of Photosystem II: FtsH hexamers are localized near Photosystem II at grana for the swift repair of damage.

M. Yoshioka, Y. Yamamoto 以下5名, 査読有
J. Biol. Chem. 285, 41972-41981 (2010)

③ Study on the effects of chloride depletion on photosystem II using different chloride depletion methods.

A. Jajoo, Y. Yamamoto 以下4名, 査読有
J. Bioenerg. Biomembr. 42, 47-53 (2010)

④ Quality control of Photosystem II: thylakoid unstacking is necessary to avoid further damage to the D1 protein and to facilitate D1 degradation under light stress in spinach thylakoids.

M. Khatoun, Y. Yamamoto 以下9名, 査読有
J. Biol. Chem. 284, 25343-25352 (2009)

⑤ Quality control of Photosystem II: impact of light and heat stresses.

Y. Yamamoto 以下11名, 査読有
Photosynth. Res. 98, 589-608 (2008)

⑥ Quality control of Photosystem II: reactive oxygen species are responsible for the damage to Photosystem II under moderate heat stress.

A. Yamashita, Y. Yamamoto 以下6名, 査読有
J. Biol. Chem. 283, 28380-28391 (2008)

[学会発表] (計 29 件)

① M. Yoshioka, 光合成光化学系 II の quality control: グラナにおける六量体 FtsH プロテアーゼの役割, 日本植物学会第 7 4 回大会(愛知), 2010 年 9 月 9 日 - 11 日

② Y. Shimizu, Quality control of Photosystem II: 光ストレス下におけるハウレンソウチラコイドのタンパク質酸化, 15th International Congress of Photosynthesis (北京), 2010 年 8 月 22 日 - 27 日

③ S. Morita, Quality control of Photosystem II: *Arabidopsis thaliana* のキナーゼ STN7/STN8 ノックアウト mutant の光ストレス下での D1 タンパク質分解, 15th International Congress of Photosynthesis (北京), 2010 年 8 月 22 日 - 27 日

④ T. Chan, Peroxidation of phosphatidylglycerol plays a critical role in the oxidative damage to Photosystem II under moderate heat stress, 15th International Congress of

Photosynthesis(北京), 2010 年 8 月 22 日 - 27 日

⑤ M. Yoshioka, Quality control of Photosystem II: FtsH hexamers are closely associated with Photosystem II at grana for swift repair of damage, 15th International Congress of Photosynthesis (北京), 2010 年 8 月 22 日 - 27 日

⑥ B. Lundin, Quality control of Photosystem II core D1 protein is regulated by stability of the Photosystem II complex, access to FtsH protease and stability of FtsH, 15th International Congress of Photosynthesis (北京), 2010 年 8 月 22 日 - 27 日

⑦ M. Yoshioka, Quality control of Photosystem II: FtsH hexamers are closely associated with Photosystem II at grana for swift repair of damage, Plant Biology 2010(Montreal, Canada), 2010 年 7 月 31 日 - 8 月 4 日

⑧ B. Lundin, Quality control of Photosystem II core D1 protein is regulated by stability of the Photosystem II complex, access to FtsH protease and stability of FtsH, 21st International Conference on Arabidopsis Research(横浜), 2010 年 6 月 6 日 - 10 日

⑨ 吉岡美保, 光化学系 II の quality control: 損傷 D1 タンパク質の分解場所と FtsH プロテアーゼの役割, 生物系三学会中国四国支部(山口), 2010 年 5 月 16 日

⑩ B. Lundin, Quality control of Photosystem II core D1 protein is regulated by stability of the Photosystem II complex, access to FtsH protease and stability of FtsH, 生物系三学会中国四国支部(山口), 2010 年 5 月 16 日

⑪ T. Chan, Quality control of Photosystem II: peroxidation of phosphatidylglycerol plays a critical role in the oxidative damage to PSII under moderate heat stress, 生物系三学会中国四国支部(山口), 2010 年 5 月 16 日

⑫ 大橋研介, 光化学系 II の quality control: 光ストレス下でのハウレンソウ葉緑体チラコイド膜上の FtsH プロテアーゼの存在状態解析, 生物系三学会中国四国支部(山口), 2010 年 5 月 15 日

⑬ 清水由梨香, 光化学系 II の quality control: 光ストレス下におけるハウレンソウ

チラコイドのタンパク質酸化, 生物系三学会中国四国支部(山口), 2010年5月15日

⑭ 森田聖也, 光化学系 II の quality control: *Arabidopsis thaliana* のキナーゼ STN7/STN8 ノックアウト mutant の光ストレス下での D1 タンパク質分解, 生物系三学会中国四国支部(山口), 2010年5月15日

⑮ T. Chan, Peroxidation of phosphatidylglycerol plays a critical role in the oxidative damage to Photosystem II under moderate heat stress, 第 51 回日本植物生理学会年会(熊本), 2010年3月20日

⑯ 猪名川佳代, 光化学系 II の quality control: ホウレンソウチラコイドの unstacking は, 光ストレスでの D1 タンパク質のダメージを避け D1 タンパク質の分解を容易にするために必要である, 第 51 回日本植物生理学会年会(熊本), 2010年3月20日

⑰ B. Lundin, Rate-limiting step for degradation of D1 is the separation of CP43 from Photosystem II, 第 51 回日本植物生理学会(熊本), 2010年3月20日

⑱ 吉岡美保, 光化学系 II の quality control: 光・熱ストレスやチラコイド膜での存在場所に依存する FtsH プロテアーゼのサブユニット構造, 第 51 回日本植物生理学会年会(熊本), 2010年3月20日

⑲ 二條庸好, 山本泰, 光化学系 II の品質管理, 第 20 回関西光合成研究会(奈良) 2009年11月21日

⑳ M. Khatoun, Quality control of Photosystem II: thylakoid unstacking is necessary to avoid further damage to the D1 protein and also to facilitate D1 degradation under light stress in spinach thylakoids, 第 50 回日本植物生理学会(名古屋) 2009年3月22日

㉑ 吉岡美保, 光化学系 II の quality control: 光・熱損傷 D1 タンパク質の分解に関する FtsH プロテアーゼの分布と存在状態, 第 50 回日本植物生理学会年会(名古屋) 2009年3月22日

㉒ B. Lundin, Nucleotide dependent processes in the thylakoid lumen of higher plant chloroplast, 第 50 回日本植物生理学会年会(名古屋) 2009年3月22日

㉓ 吉岡美保, 光化学系 II の quality control: 光および熱で損傷を受けた D1 タンパク質の分解に関する FtsH プロテアーゼの存在状態, 日本植物学会第 72 回大会(高知) 2008年9月24日

㉔ 猪名川佳代, 光化学系 II の quality control: ホウレンソウチラコイドからの FtsH プロテアーゼの可溶化と精製の試み, 生物系三学会中国四国支部大会(東広島) 2008年5月17日

㉕ 網中良太, 光化学系 II の quality control: *Synechocystis* sp. PCC 6803 由来 FtsH プロテアーゼの精製, 第 49 回日本植物生理学会年会(札幌) 2008年3月20日

㉖ M. Khatoun, Quality control of Photosystem II: relationship between the thylakoid unstacking and degradation of the D1 protein under light and heat stresses in spinach thylakoids, 第 49 回日本植物生理学会年会(札幌) 2008年3月20日

㉗ 吉岡美保, 光化学系 II の quality control: 熱ストレス下でのホウレンソウチラコイド膜の D1 タンパク質分解に関する FtsH の精製, 第 49 回日本植物生理学会年会(札幌) 2008年3月20日

㉘ 山下亜夢, 光化学系 II の quality control: D1 ターンオーバーで FtsH プロテアーゼは 2 つの役割を果たす, 第 49 回日本植物生理学会年会(札幌) 2008年3月20日

㉙ 二條庸好, 光化学系 II の quality control: 熱ストレス下での活性酸素分子の発生、D1 タンパク質の分解および膜表面性タンパク質 PsbO の遊離, 第 49 回日本植物生理学会年会(札幌) 2008年3月20日

[その他]

ホームページ等

<http://www.biol.okayama-u.ac.jp/yamamoto/home.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 泰 (YAMAMOTO YASUSHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号: 40091251