

令和 6 年 4 月 23 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06221

研究課題名（和文）高温障害に应答する新たなチラコイド膜品質管理システムの解明

研究課題名（英文）Research of protein quality control system in thylakoid membranes under high temperature stress

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：葉緑体の膜タンパク質の品質管理に膜局在型のFtsHプロテアーゼが重要である。ftsH変異体var1-1で熱ストレス耐性の低下が認められたことから、本研究では熱ストレスによるタンパク質品質管理にFtsHが機能するかを検証することを目的とし、研究を進めた。しかし、ftsH変異体での熱ストレスに対する異常は別の遺伝子に生じた変異によるもので、その原因遺伝子を探索した結果、第一染色体にある遺伝子の変異である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高温下での植物の応答は近年の地球温暖化により注目されており、熱ストレスに対する植物の適応メカニズムを応用することで作物生産に貢献できると考えられる。本研究では葉緑体のFtsHプロテアーゼ変異体で見られた熱耐性異常に注目して研究を進めたが、結果としてFtsHそのものではなく別遺伝子の変異が原因であることが示唆された。ただし、見つかった新規遺伝子はこれまで報告されたものではなく、新規な熱ストレス応答につながると予想され、今後その仕組みを理解し、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）：Chloroplast FtsH protease is critical for the quality control of chloroplast membrane proteins. Since the ftsH mutant, var1-1, showed a reduced heat stress tolerance phenotype, we verified whether FtsH functions in heat stress-induced protein quality control in this study. However, the abnormal response to heat stress in the ftsH mutant was due to another mutation, which is located in a new candidate gene on chromosome 1.

研究分野：植物生理学

キーワード：葉緑体 高温ストレス タンパク質品質管理

## 1. 研究開始当初の背景

温度は植物の生育や季節的な反応に影響を与える主要な環境因子であり、世界的な温暖化は植物成長に悪影響を及ぼし、作物収量にとって深刻な脅威と考えられている。植物細胞内において、高温はタンパク質および膜脂質に損傷を与える。特に葉緑体内の様々な光合成プロセスは熱ストレスに敏感であり、高温応答遺伝子の発現誘導にも葉緑体が重要な役割を果たすことが示唆されている。

葉緑体内において、タンパク質の損傷が最も頻繁に起きているのは光化学系であり、これは光合成プロセスにおいて、光を利用する2つの光化学系で生じる大きな酸化力、還元力によってもたらされるものである。葉緑体のタンパク質損傷とその品質管理は、これら光化学系複合体の損傷を中心に研究されてきた。光合成生物は損傷D1タンパク質のみを分解、修復する洗練されたタンパク質品質管理システム(光化学系II修復)を構築しており、この過程にはチラコイド膜に局在するFtsHが関わる。FtsHは損傷D1タンパク質を選択的に分解し、チラコイド膜でのタンパク質品質管理を行う。葉緑体には複数のFtsHが存在することが知られており、このうちチラコイド膜上ではType AとType BのサブユニットからなるABヘテロ六量体が機能する。ヘテロ六量体構造は光合成生物に特徴的であり、シロイヌナズナではType AはFtsH1とFtsH5、Type BはFtsH2とFtsH8である。またFtsHはチラコイド膜の形成/維持にも関与するため、その欠損は斑入り葉をもたらす。一方、FtsHは元来、大腸菌のフィラメント状温度感受性変異株から同定された。シロイヌナズナでは、これまでにミトコンドリア局在のFtsH4、10、13及び葉緑体包膜局在のFtsH11の欠損変異体での高温感受性が報告され、さらにチラコイド膜のFtsH6が高温ストレス後のHSP21分解に関わることが示唆された(図1)。

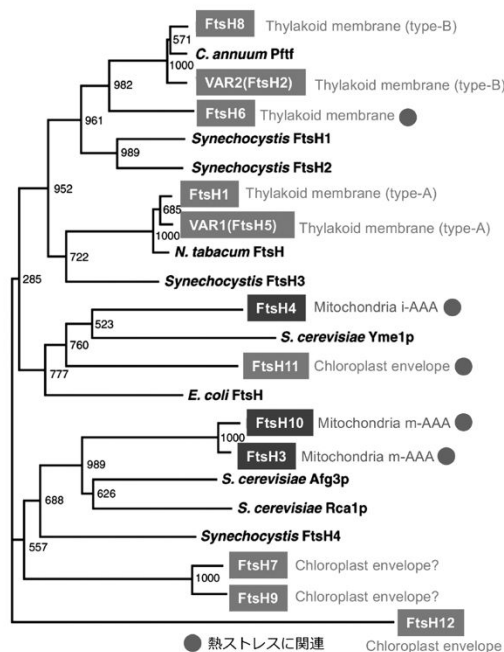


図1 シロイヌナズナにおけるFtsH系統樹

## 2. 研究の目的

FtsHは元来、大腸菌の温度感受性変異株から同定されており、高温で変性したタンパク質の除去にも関与することが予想されていた。植物においては、ミトコンドリアに局在するFtsHプロテアーゼの熱ストレスへの関与が先に報告されている。また最近、葉緑体包膜に存在するFtsH11の欠損株で熱ストレスへの耐性が低下していることが報告された。これら背景をもとに、予備的実験としてFtsH5欠損変異体 *var1-1* の高温下での表現型について解析を試みた結果、熱ストレスによって生育が大きく阻害されることが確かめられた。さらに胚軸や葉柄が伸長するという熱誘導性形態形成が認められないことも確かめられた。これら状況をふまえ、本研究ではFtsHプロテアーゼによる葉緑体タンパク質の品質管理と熱ストレスの関係を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では後述するが、申請時の予備実験で示された *ftsH* 変異体 *var1-1* での熱ストレス応答異常の表現型がセカンドミュレーションによる影響であることが研究開始後に明らかとなっていった。そこで、本来の熱ストレス下でのFtsHの機能解析とともに *ftsH* 変異体 *var1-1* で認められた熱ストレス応答異常につながる原因遺伝子の追求を進めることとした。熱ストレス応答異常につながる原因遺伝子の同定では、Col背景である *var1-1* と *Ler* を掛け合わせて得たF2集団を用いて、熱ストレス応答異常を指標にラフマッピングを行なった。同時に *var1-1* のリシーケンスを行なった。

高温下でのFtsH複合体状態の解析では、高温下では既知のヘテロ六量体以外のFtsH複合体が機能すると考え、高温処理後に単離したチラコイド膜から、FtsH5を認識する抗体によりpull-downした画分に対して、他のFtsHが結合し、複合体を形成しているかの解析を行なった。また葉緑体局在の他FtsH変異体(*ftsh7*, *ftsH9*)の高温下での生理学的解析を行なった。

#### 4. 研究成果

予備実験において短時間の高温処理により *ftsH5* 変異体 *var1-1* で熱ストレスの影響が強く認められた。そこで、生理的条件下に近い高温条件下での熱ストレスに対する影響を主要な FtsH 複合体の構成因子である FtsH1, 2, 5, 8 の変異体で解析した。その結果、予備実験同様に *var1-1* 変異体で、熱ストレス耐性の低下と熱誘導性形態形成の不全が認められた。しかし、*ftsH5* の別アレル *var1-2*, *var1-3* の解析では、*ftsH5* 変異体が示す斑入り表現型が増強したものの(図2)、明確な熱誘導性形態形成の不全は認められなかった(図3)。斑入り表現型の増強は、FtsH5 の熱ストレス下、特に葉緑体発達過程においての機能を示唆するものであったが、*var1-1* で認められた明確な熱ストレス応答への異常は *var1-1* が持つセカンドミューテーションによる影響によるものであることが示唆された。そこで、この変異を明らかにするために、*var1-1* と *Ler* を掛け合わせた。その結果、熱ストレス応答への異常をもたらす変異は潜性的変異であり、F<sub>2</sub> 種子を用いたラフマッピングでは、第一染色体の下腕に原因遺伝子が存在することが示唆された。*var1-1* 変異体のゲノム配列のリシーケンスの結果と照らし合わせたところ、ラフマッピングによって見出された候補領域内にアミノ酸変異を持つ遺伝子を見出し、これが原因遺伝子であると考えた。なお、この候補遺伝子はこれまでに熱ストレスに関連する因子として報告されておらず、新規の熱ストレス関連タンパク質と考えられる。

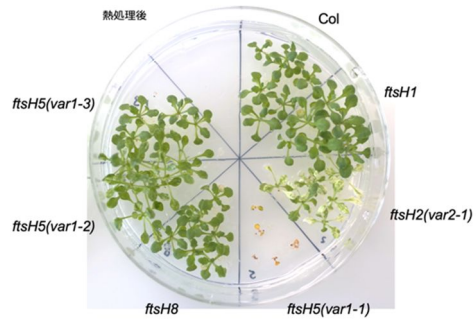


図2 各*ftsH*変異体の熱ストレス耐性

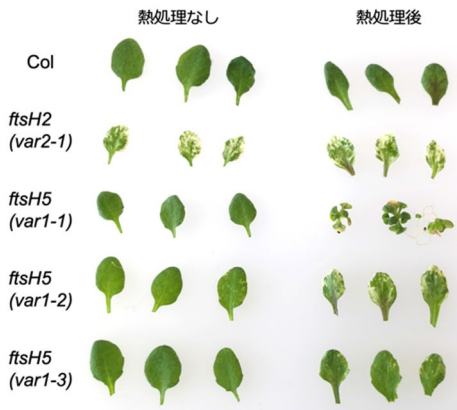


図3 熱ストレスは斑入りを増強

一方、熱ストレス下での FtsH 複合体の働きについて解析を試みた。FtsH はチラコイド膜上では FtsH は、系統的に Type A と Type B の二種類に分けることができ、両サブユニットを持つ AB ヘテロ六量体を構成する。ヘテロ六量体構造は光合成生物に特徴的であり、シロイヌナズナでは Type A は FtsH1 と FtsH5、Type B は FtsH2 と FtsH8 である。また Type B に近い、FtsH6 が熱ストレスに関連することから、これが Type A の FtsH5 と熱ストレス下で複合体を作るかどうかを検証した。熱ストレス後の植物から単離したチラコイド膜を用いて、FtsH5 の抗体により pull-down を試み、その画分に FtsH6 が含まれるかどうか western 解析を行なったが、FtsH6 のシグナルは検出されなかった。ただし、検出感度が低いこともあり、今後実験系の改良が必要であることが示唆された。

次いで、その他の葉緑体局在型 FtsH の変異体が熱ストレス下で示す表現型の解析を進めた。その結果、*ftsH7ftsH9* の二重変異体において熱ストレス下で生育が阻害される傾向が見られた。一方で、*ftsH7*, *ftsH9* の単独の変異体においては熱ストレスによる影響は認められなかった。FtsH7 と FtsH9 は高い相同性を持つこと知られており、これら結果は互いが機能を相補している可能性を示唆する。FtsH7 および FtsH9 は包膜上に存在するとされており、熱ストレス下での葉緑体包膜機能維持に働くことが示唆された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kato Yusuke, Kuroda Hiroshi, Ozawa Shin-Ichiro, Saito Keisuke, Dogra Vivek, Scholz Martin, Zhang Guoxian, de Vitry Catherine, Ishikita Hiroshi, Kim Chanhong, Hippler Michael, Takahashi Yuichiro, Sakamoto Wataru	4. 巻 12
2. 論文標題 Characterization of tryptophan oxidation affecting D1 degradation by FtsH in the photosystem II quality control of chloroplasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.88822	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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤裕介
2. 発表標題 Phos-tag を用いた葉緑体チラコイド膜におけるタンパク質リン酸化の解析
3. 学会等名 第72回日本電気泳動学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------