

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 17 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22770042

研究課題名（和文）

光化学系 II 修復メカニズムの解明

研究課題名（英文） Study of photosystem II repair mechanisms

研究代表者

加藤 裕介 (KATO YUSUKE)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：10437569

研究成果の概要（和文）：光合成において、光エネルギーは光化学系 II に障害をあたえ、光合成機能の低下を引き起こす。これを回避するため、光化学系 II では傷害をうけた D1 タンパク質を分解／修復し、系全体の機能維持を行っている。本課題では、光化学系 II 修復サイクルでの、タンパク質分解酵素の役割ならびに機能調節機構を明らかにすることを目的とし研究を行い、ATP 依存型メタロプロテアーゼ FtsH と ATP 非依存型セリンプロテアーゼ DEG の協調的な働きにより、D1 タンパク質が分解されていることを示した。

研究成果の概要（英文）：To avoid photoinhibition (light-dependent irreversible inactivation of Photosystem II (PSII)), an efficient degradation of D1 protein in the repair cycle of PSII is important. In this study, we focused on the function of proteases that are involved in D1 protein degradation, our results revealed the in vivo cooperative function between the FtsH-dependent processive degradation of D1 and the Deg-dependent cleavage of D1.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2012年度 | 500,000   | 150,000 | 650,000   |
| 総計     | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

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：葉緑体機能、光合成、タンパク質分解、光阻害、FtsH、Deg、プロテアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

本研究課題申請時において、葉緑体プロテアーゼの欠損が植物の生育に多面的な影響を及ぼすことが明らかになりつつあり、葉緑

体内でのタンパク質分解／品質管理の重要性への関心が高まっていた。特に光化学系 II 反応中心タンパク質 D1 の品質管理は、植物が受ける光阻害を軽減する役割を持ち、その

重要性が注目されていた。

## 2. 研究の目的

本研究課題以前に D1 タンパク質分解については、FtsHプロテアーゼと Deg プロテアーゼが関与することが示唆されていたが、これらプロテアーゼ同士が協調して機能するのか、もしくは独立して機能するのかは明らかにされておらず、葉緑体内での D1 タンパク質分解の詳細は不明であった。また D1 タンパク質分解に影響があると考えられる D1 タンパク質のリン酸化とのタンパク質分解の関連についても不明であった。そこで、本研究では葉緑体プロテアーゼの欠損変異体ならびに光化学系 II リン酸化に関わる遺伝子を欠損した変異体を用いて D1 タンパク質分解の詳細を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では以下の研究計画に沿って、研究を進めた。

(1) D1 分解に関わる幾つかの因子(FtsH プロテアーゼ、Deg プロテアーゼ、光化学系 II リン酸化に関わるキナーゼ STN8)を欠損した多重変異体の作成、(2) 多重変異体の強光照射下での光障害に対する影響の解析、(3) NBT 染色による活性酸素種蓄積量の解析、(4) 葉緑体タンパク質合成阻害剤存在下での光照射による D1 タンパク質分解効率の評価、(5) D1 タンパク質特異的抗体による分解産物の検出、(6) Blue-Native PAGE による光化学系 II 複合体の状態の評価、以上の結果を議論して、各プロテアーゼの機能分担と生理的役割ならびに D1 リン酸化の意義を検討した。

## 4. 研究成果

本研究では、FtsH、Deg プロテアーゼが光化学系 II 修復サイクルに与える影響とその関係性を明らかにするために、変異体での D1

タンパク質分解能力の評価、ならびに多重変異体の解析を行った。はじめに *deg5 deg8* 変異体では強光条件下でのみ D1 タンパク質の分解が遅れることを確かめた。また実験条件を再度検討することで、これまで検出できなかった D1 タンパク質分解産物の検出を可能とした。この手法を用いて、D1 タンパク質の分解機構を解析した。その結果、FtsH プロテアーゼを欠損した *var2* 変異体において D1 タンパク質分解産物が有意に蓄積していることが示された。また、*var2* 変異体と *deg5* もしくは *deg8* 変異体をかけ合わせ作成した *var2 deg5*、*var2 deg8* 変異体をさらかけ合わせ作成した *var2 deg5 deg8* 変異体の解析を行い、D1 タンパク質分解産物が Deg プロテアーゼの活性によって産生されることを明らかとした。これらの結果から、D1 分解産物を FtsH がさらに分解するという D1 分解モデルが実際に葉緑体内で起こっていることが証明された。この結果は、これまで明確でなかった葉緑体内での D1 タンパク質の分解を明らかにするものであり、重要な意義を持つ。また葉緑体内の他のプロテアーゼの動向を解析した結果、FtsH を欠損した変異体では FtsH の代わりに Clp プロテアーゼの発現が増加し、その一部がチラコイド膜に局在するようになることを明らかとし、葉緑体内で複数のプロテアーゼが互いの役割を相補している可能性が示唆された。さらに、D1 タンパク質分解メカニズムと D1 リン酸化について変異体を用いて解析を行った。はじめに *var2* 変異体でリン酸化された D1 タンパク質量を解析した結果、野生株に比べ有意に増加していることが確認された。また D1 タンパク質のリン酸化が起きない *stn8* 変異体と *var2* 変異体をかけ合わせた *var2 stn8* 変異体の解析を行った結果、*var2* 変異体で見られる強光に対する脆弱性が緩和されていた。D1 タンパク

質の分解を検討した結果、D1 タンパク質分解産物の増加に伴い、*var2*変異体で抑制されていた D1 タンパク質の分解が回復しており、この結果、強光に対する脆弱性が緩和されたと考えられた。これらの結果から D1 タンパク質のリン酸化とプロテアーゼ機能に何らかの調節機構があるという新規の知見が得られた。以上の結果は、光化学系 II 修復サイクルへの理解を深め、今後、光ストレスに強い植物の開発等に役立つものと考えられる。

#### 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 3 件)

- ①. Kato Y, Sakamoto W. (2013) Possible compensatory role among chloroplast proteases under excess-light stress condition. *Plant Signaling Behavior* 8: e23198. 査読有 doi:pil: e23198
- ②. Kato Y, Sun X, Zhang L, Sakamoto W. (2012) Cooperative D1 Degradation in the Photosystem II Repair Mediated by Chloroplastic Proteases in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 159:1428-1439. 査読有 doi: 10.1104/pp.112.199042.
- ③. Kato Y, Kouso T, Sakamoto W. (2012) Variegated tobacco leaves generated by chloroplast FtsH suppression: implication of FtsH function in the maintenance of thylakoid membranes. *Plant Cell Physiol.* 53: 391-404. 査読有 doi: 10.1093/pcp/pcr189

[学会発表] (計 6 件)

- ①. 加藤裕介、羽田野和実、坂本亘: FtsH

高発現植物体における光合成能とストレス耐性の評価. 日本植物生理学会第 54 回年会, 岡山, 3 月 21-23 日, 2013.

- ②. Kato, Y. and Sakamoto, W. Analysis of D1 degradation in the mutants lacking phosphorylation of PSII core protein. Okayama University International Symposium "Structure and Dynamics of Photosynthetic Systems". Okayama, Japan, October 22-23, 2012.
- ③. 加藤裕介・坂本亘: FtsH, Deg プロテアーゼによる光化学系II 反応中心タンパク質D1 の協調的分解. 日本植物生理学会第 53 回年会, 京都, 3 月 16-18 日, 2012.
- ④. 加藤裕介・坂本亘: 光化学系II 修復サイクルにおけるD 1 タンパク質分解メカニズム. 日本植物学会第 76 回大会, 姫路, 9 月 15-17 日, 2012.
- ⑤. Kato, Y., Zhang, L., and Sakamoto, W. Cooperative roles of FtsH, Deg and phosphorylation in the degradation of D1 protein in Photosystem II. Japanese-Finnish Seminar 2011, Future prospects of photosynthetic organisms: from genomes to environment. Okayama, Japan, March 1-5, 2011
- ⑥. Kato, Y., and Sakamoto, W. Cooperative degradation in the PSII repair mediated by FtsH and Deg proteases in Arabidopsis chloroplasts. International Workshop on Photosystem II, Chengdu, China, November 3-6, 2011.

[図書] (計 1 件)

1. Kato, Y. and Sakamoto, W. (2013)

Plastid protein degradation during leaf development and senescence: Role of protease and chaperones. In Chloroplast Development during Leaf Growth and Senescence, Advances in Photosynthesis and Respiration Series (Ed. Govindjee), Springer (in press)

〔産業財産権〕

特になし

〔その他〕

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 裕介 (KATO YUSUKE)

岡山大学・資源植物科学研究所・その他

研究者番号：10437569