

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25891018

研究課題名(和文) 葉老化時における葉緑体タンパク質分解メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the protein degradation mechanisms in chloroplast during leaf senescence

研究代表者

上妻 馨梨 (Kohzuma, Kaori)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：70704899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物の葉では老化時に下位葉のタンパク質を分解して上位葉へ転流させて“生かす”という生存戦略をとっている。しかしながら、そのタンパク質分解機構には不明な点が多い。本課題では、植物の総タンパク質の80%を含有する葉緑体において、主な膜タンパク質である光化学系IIのアンテナタンパク質の分解機構について研究を行った。その結果、光化学系IIの構造の変化がアンテナタンパク質分解酵素の活性を制御していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：During leaf senescence, degraded proteins are translocated from lower leaves to upper leaves. However, little is known concerning the mechanisms of the protein degradation. We have focused chloroplast, which includes 80% of the total leaf proteins; particularly the antenna proteins in Photosystem II, main membrane protein, on the thylakoids were studied. We consequently revealed the composition changing in Photosystem II is controlling the activity of the protease to the antenna proteins.

研究分野：植物分子・生理科学

キーワード：葉老化 葉緑体 タンパク質分解 光合成 光化学系II

1. 研究開始当初の背景

植物は不要になった下位葉を老化させ、その分解産物を若い組織や子実に移転させて再利用する。つまり、植物にとって葉老化とは受動的な死というよりはむしろ他組織を生かすための生存戦略『栄養素の再配分システム』としての役割を持つ。葉老化においてもっとも大きなイベントのひとつは植物細胞内のエネルギー生産を司り総タンパク質の80%を有する葉緑体の分解である。葉老化時の葉緑体ではクロロフィル分解や膜系の退縮等が起こるが、中でもタンパク質分解制御の解明は葉緑体老化の理解の鍵になると考えられる。しかしながら、現時点で老化時において葉緑体で機能するプロテアーゼを含め葉緑体タンパク質の分解制御機構はほとんど知られていない。

本研究課題では植物の葉老化時に誘導されるシステマティックな葉緑体タンパク質の分解機構を解明するために、シロイヌナズナの2つの変異体を用いることを試みた。1つは光化学系II (PSII) のマイナーサブユニットである Psb29 の欠損変異体 *thf1*、もう1つは葉緑体 ATP 合成酵素の機能改変形質転換体である *gamera* である。イネの *thf1* は老化時に長期間緑色を保つステイグリーンの表現型を示すこと、PSII 活性の指標である Fv/Fm というパラメータが野生型では著しく低下するのに対し、*thf1* では低下しないことが報告されていた。一方、ATP 合成酵素の機能改変植物である *gamera* もまた、暗黒処理下において PSII 活性 (Fv/Fm) が低下しないことが観察されていた。そして、両者は暗黒で葉老化を誘導させた際、老化の指標である遺伝子の発現は上昇するものの、PSII タンパク質は野生型と比較して分解しないことから、*thf1* と *gamera* の2つシロイヌナズナ系統を比較することで、老化時の葉緑体タンパク質の分解機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

植物の葉老化において葉緑体の分解は、もっとも大きなイベントの一つである。一般に老化時のタンパク質分解は厳密に制御されていないと考えられがちだが、これまでの私たちの研究結果から、葉緑体タンパク質の分解には各複合体ごとに異なる分解制御機構が存在することが示唆されている。本研究では老化時のシステマティックな葉緑体タンパク質の分解機構の解明を目指し、PSII の能動的な分解メカニズムを中心に研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

老化時における葉緑体タンパク質の分解メカニズムを明らかにするために、PSII の分解が正常に制御されない *thf1* (*psb29*) と *gamera* の2つのシロイヌナズナ系統を解析した。両者を暗黒処理し老化を誘導させた条件下で生理解析を行った (図1)。主にスペクトロフォトメーターを用いることで無傷葉を *in vivo* で測定した。また、光合成タンパク質の蓄積量解析をはじめ、クロロフィル量安定性の有無など基礎データも収集した。さらに、PSII の複合体構成の変化を Blue Native PAGE を用いて可視化した。

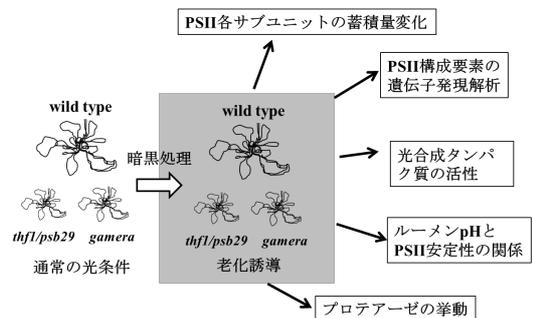


図1、研究開始当初の研究計画。PSII の挙動が共通する2つのシロイヌナズナ変異体を暗黒処理し、生理学的解析を行う。

4. 研究成果

老化時の葉緑体タンパク質の分解機構の解明を目指し、*thf1* と *gamera* の2つシロイヌナズナ系統を比較した。しかしながら、シロイヌナズナの *thf1* はイネのようなステイグリーン表現型を示さず、暗黒老化時において光合成も低下した。

シロイヌナズナの *thf1* がイネと大きく違う表現型を示したことから、当初計画していた変異体解析は断念せざるを得なくなった。しかしながら、研究目的は葉老化時における PSII の分解メカニズムの解明であることから、別の PSII 変異体を用いた研究に切り替えた。初年度は変異体の基礎的な生理解析を行うことを計画に掲げていた。その計画通り、ダイズの PSII 変異体 *psbm* の通常生育条件下での光合成生理活性の測定、暗黒老化時の生理活性および光合成タンパク質の蓄積量解析を行った。また、クロロフィル量安定性の有無を観察した。変異体の PSII のアンテナタンパク質である LHCII が非常に安定であることから、PSII の複合体解析も行った (図2)。

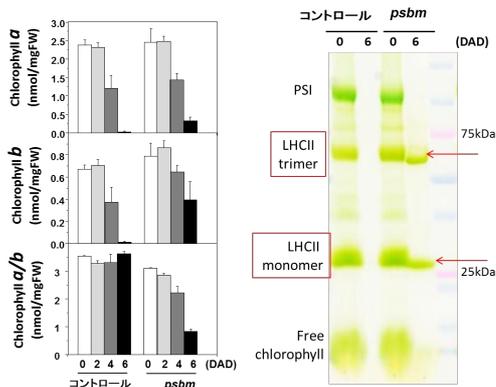


図2、ダイズの PSII 変異体 *psbm* を暗黒老化処理するとアンテナタンパク質である LHCII が分解されずに蓄積する。DAD は暗黒処理した日数。

その結果、変異体では老化時に5つのサブユニットの集合体が複合体から解離することが観察された。さらに変異体におけるクロロフィル分解酵素の活性が低下することも突き止めた。これらのことからクロロフィル分解酵素の働きと複合体形成に関連がある可能性が示唆された。実際、タバコを用いたアンテナタンパク質の特異的な分解酵素である NYC1 の RNAi 系統において、老化誘導時に PSII のアンテナタンパク質とクロロフィル *b* が分解されないことも確認した。同時に、タバコの *PsbM* 欠損系統も作製した。その結果、ダイズと同様の表現型を持つことが確認できた。ダイズの *PsbM* 突然変異体は自然発生的な品種であるのに対し、タバコの系統はバックグラウンドが同一であることから、2つの欠損系統を比較することができ、それらが酷似した表現型を持つことを観察することができた。計画時においては、PSII の *Psb29* に注目したが、シロイヌナズナの突然変異体ではイネのような明らかなステイグリーン表現型が観察されなかったことから、他の PSII 変異体で且つステイグリーンを示す *PsbM* に焦点を移したが、本課題を遂行する過程で、アンテナタンパク質を含む PSII の分解には、サブユニットの1つである *PsbM* が必須であることが明らかになった。また、*PsbM* の欠損がアンテナタンパク質を特異的に分解するプロテアーゼの活性低下に寄与していることも確認された。

LHCII は地球上でもっとも蓄積量の多い膜タンパク質である。そのため、LHCII の分解過程に PSII の構造が大きく関与するという新しい知見を得られたことの意義は大きい。しかしながら、PSII の構造変化と LHCII 分解酵素活性制御の間でそれらを調節する因子はまだ不明である。今後はその因子の探索を中心に、LHCII 分解メカニズムの全貌の解明に取り組みたい。

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 1 件)

上妻馨梨 (2014) 葉緑体 ATP 合成酵素の機能的多様性。光合成研究 第 24 卷 第 3 号 (通巻 71 号), pp76 - 80

[学会発表](計 2 件)

上妻馨梨, John E. Froehlich , Joshua A. Temple, and David M. Kramer 「なぜ葉緑体 ATP 合成酵素は光制御されているのか？」第 5 回 日本光合成学会 近畿大学 農学部 2014/5/30 - 2014/5/31

Kaori Kohzuma, John E. Froehlich, Joshua A. Temple, and David M. Kramer 「Down-regulation of the chloroplast ATP synthase in the dark: Why and why not? 」 16th INTERNATIONAL CONGRESS OF PHOTOSYNTHESIS (St.Louis MO, USA; Hyatt Regency at the Arch) Contributed talk session 10, 2013/8/11-2013/8/16

[その他]

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/shokui/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

上妻 馨梨 (Kaori Kohzuma)

広島大学・大学院理学研究科・特任助教

研究者番号：70704899