

光合成光化学系II の quality control

Quality control of photosystem II in photosynthesis

(日本植物生理学会推薦)

代表研究者 岡山大学 山本 泰 Okayama University Yasusi Yamamoto

Photosystem II is vulnerable to various environmental stresses. Especially, light and heat stress cause serious damage to the reaction-center binding protein D1 in photosystem II. Once damaged, the D1 protein is efficiently digested by specific proteases and is removed from photosystem II. Finally, a newly synthesized D1 protein is incorporated into photosystem II and photosystem II is repaired. In the present study, we showed that there are various strategies in photosystem II to avoid the stresses and also to tolerate the stresses. In the stroma of chloroplasts, there is an unknown proteolytic enzyme(s) which digests the cross-linked products of the D1 protein generated by excessive illumination of photosystem II. Within the thylakoid membranes, several proteases including the well known FtsH and DegP may function as the enzymes recognizing the damaged D1 protein. In the lumen of the thylakoids, extrinsic proteins of photosystem II, PsbO, P and Q stabilize photosystem II and probably function as scavengers of hydroxyl radicals generated in photosystem II under light stress. Using these various means, photosystem II can survive the hazardous environmental stresses.

研究目的

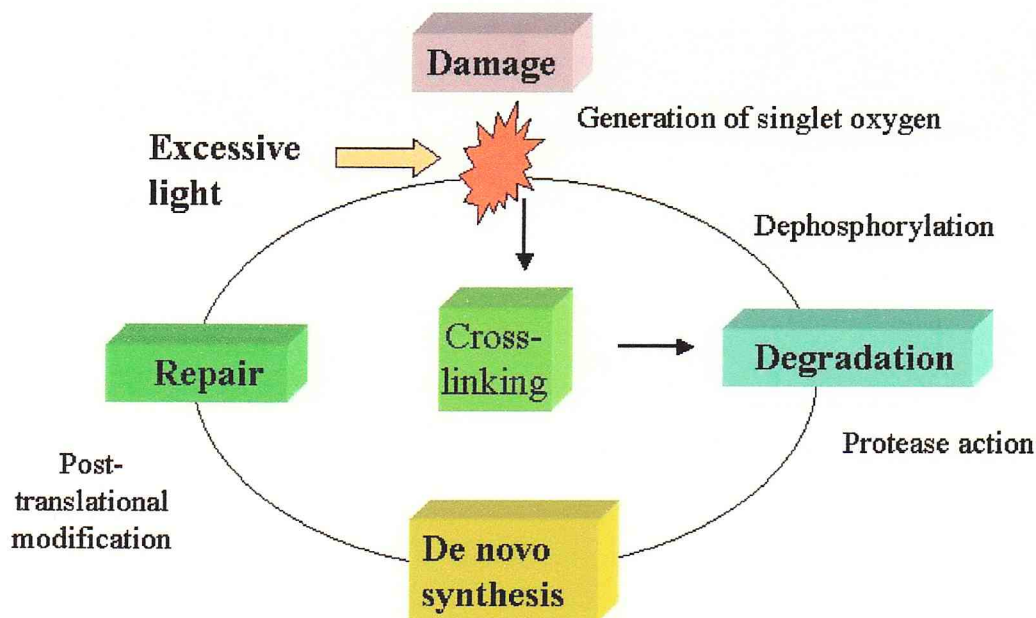
光合成の光化学系II は光や熱などの環境ストレスの標的となる。特に光化学系II の反応中心結合タンパク質 D1 は、これらのストレス条件下で極めて損傷を受けやすく、直ち

に特異的なプロテアーゼの働きで分解される。これまでの研究では主に光損傷を受けたD1タンパク質の分解や修復を中心に盛んに解析が進められてきた。特にD1タンパク質の分解に関しては、現在、原核生物型のFtsHとDegP2の2種類のプロテアーゼの関与が示唆されている。本研究で、我々は光損傷を受けたD1タンパク質は葉緑体中でもっと多様なルートで分解されるのではないかと考え、その新たなD1タンパク質分解ルートを探す目的で研究を展開した。その過程で、光損傷D1タンパク質が光化学系IIの周辺のタンパク質と架橋し、その架橋産物が分解される経路を新たに見いだした。タンパク質架橋産物は速やかに除去されなければその形成部位に蓄積し、光化学系IIの構造と機能に対して致命的な影響を与える可能性がある。本研究では光化学系IIが損傷D1タンパク質の架橋反応を防ぐためにどのような戦略をもっているのかを調べた。特に、光化学系IIのルーメン側に存在するPsb0タンパク質が重要な働きをする可能性が考えられたので、その点について重点的に解析を行った。

研究経過

1. 高等植物（ホウレンソウおよびエンドウ）の葉から葉緑体のチラコイド膜、さらに光化学系II膜を調製し、それぞれに強光を照射すると光化学系IIのD1タンパク質の分解と架橋が起こった。特にD1タンパク質の架橋はこれまで殆ど取り上げられることはなかったが、分解と並んで無視出来ない現象であることが分かった。特異的抗体を用いたWestern解析の結果、D1タンパク質の架橋の相手はD2、CP43、およびPsbE (Cyt b_{559} α -subunit)であることが判明した。
2. 葉緑体のストロマにはD1タンパク質の架橋産物を分解するプロテアーゼ活性があることが分かった。ただし、種々の試みにもかかわらずこのプロテアーゼの同定にはまだ成功していない。
3. D1タンパク質は光化学系IIのストロマに面した側とルーメン（内腔）に面した側の両方で形成されることが分かった。このうちルーメン側のD1タンパク質とCP43の架橋は酸素発生系のMnとPsb0タンパク質が光化学系IIからはずれると起こることが新たに分かった。この架橋を引き起こすのは光化学系IIの第1次および第2次電子供与体の酸化型 (TyrZ⁺、P680⁺) であると考えられる。Psb0タンパク質を再構成するとD1タンパク質とCP43の架橋は抑制されることから、Psb0が構造的にD1タンパク質架橋抑制に働いていることが示唆される。
4. 上に述べた架橋実験の結果は、単にD1タンパク質のターンオーバーの経路に関して新たな知見を加えただけでなく、光化学系IIの酸素発生系の構築に関する情報を与え

Damage-repair cycle of the D1 protein – a new version



ることとなった。すなわち、D1タンパク質、D2タンパク質、CP43、PsbE、PsbOがそれぞれ近接して存在していることが、この結果から明らかである。

5. さらに、酸素発生系のMnが酸素発生部位のコンフォメーションの維持にどのような役割を果たすのかについて、同じ光によるタンパク質架橋反応を用いて調べた。その結果、Mnが4原子光化学系IIに結合したコントロールでは酸素発生活性は維持されているがMnが完全に遊離すると酸素発生活性が無くなることと、その時、Mnが4原子あるとD1とCP43の架橋が起きず、Mnが完全に無くなるとD1とCP43の架橋が起ることが分かった。次にMnを順次再構成して光化学系IIに結合させる実験を行なうと、Mnが1原子結合することでD1の架橋はほぼ100%抑制された。この時、酸素発生活性は完全には回復していないが、Mnからの電子伝達は可能なので、恐らくMnはTyrZ+やP680+に電子を与えることでタンパク質架橋の原因を除去していることが考えられる。
6. D1タンパク質の分解に関しては、チラコイド膜を用いて強光照射の他に熱ショックによる分解を調べた。その結果、熱では光ストレスと同じパターンでD1タンパク質が特異的に分解されることが分かった（分解断片は光ストレスと同じ23 kDaと10 kDaで、

D1以外のタンパク質は分解されない)。この熱ショックによるD1タンパク質の分解はZnの添加で著しく促進されEDTAの添加で阻害された。したがって、金属プロテアーゼがD1タンパク質の分解に関与すると考えられる。このプロテアーゼをチラコイド膜をKSCNで処理することで可溶化したところ、分子量77 kDaのプロテアーゼが同定された。

7. Psb0は光化学系II のチラコイドルーメン側に結合した膜表在性タンパク質であるが、一部はルーメン中にも存在し、構造的に極めて安定なタンパク質であることが知られている。本研究ではPsb0が光ストレス下で光化学系II から遊離した後、光化学系II で生じたヒドロキシルラジカルで損傷を受けることを初めて示した。損傷を受けたPsb0は再び光化学系II に結合することは出来ない。

考察

1. 光化学系II の反応中心結合タンパク質D1は光ストレスを受けると分解と周辺タンパク質との架橋という2つの経路をたどる。分解はチラコイド膜に結合したプロテアーゼの働きで行われ、そのプロテアーゼの候補としてはFtsHおよびDegP2があげられている。D1タンパク質の架橋産物についてはその分解はストロマに存在するプロテアーゼで行われる可能性が高いが、その過程の詳細はまだ明らかではない。一旦架橋産物が形成されるとそれを分解するのは容易ではない可能性がある。架橋産物はグラナチラコイドで形成されるとその後ストロマチラコイドへ輸送され、そこでストロマプロテアーゼに認識される。低温条件などでチラコイド膜上での光化学系II 複合体の移動が阻害されたり、またストロマプロテアーゼの作用が低下したりすると、D1タンパク質架橋産物がチラコイドに蓄積する可能性がある。そのような葉緑体は恐らく機能不全に陥り、またその機能不全葉緑体が細胞内に蓄積すると植物細胞全体が機能なくなる可能性がある。このように考えると、光化学系II のD1タンパク質の損傷は、植物の光環境ストレス応答の最も初期の、しかも最も重要な出来事ととらえることができる。
2. D1タンパク質の周辺タンパク質との架橋はチラコイドのストロマ側とルーメン側の二カ所で起きる。そのうち、ルーメン側のD1とCP43との架橋は光化学系II の酸素発生系の構造変化を反映すると考えられる。その理由としては、酸素発生系の膜表在性タンパク質Psb0やMnを除去した光化学系II 膜サンプルに光照射すると架橋が起き、Psb0やMnを再構成すると架橋が抑制されることがあげられる。Psb0はD1とCP43の表面にまたがるように結合し、D1とCP43との架橋反応を構造的に妨げている可能性が高い。一方、Mnは光化学系II 酸素発生系では4原子が集合してMnクラスターを形成している。

このMn原子が全て除去されるとD1とCP43の架橋が起きるが、Mnの再構成実験では1原子のMnの再結合でD1とCP43の架橋が抑制された。電子伝達は1原子のMn(II)の結合で可能となり、それによってTyrZ⁺やP680⁺は還元され、架橋の原因となるラジカルの性質は消去されると思われる。

3. これらの結果は酸素発生系を構成すると考えられるD1タンパク質、CP43、PsbOおよびMnクラスターの構築過程を考える上で重要なデータを与える。D1タンパク質が光損傷で分解、除去されると一旦Mn原子やPsbOは光化学系IIから遊離すると考えられる。その後、D1タンパク質が新たに作られて光化学系IIに挿入されると、直ちにMn(II)がD1に結合し、電子を弱光下で反応中心へ渡す。酸化されたMnは安定にD1に結合し、Mnクラスター形成の基礎となる。また、このMnからの電子伝達で第1次および2次の電子供与対は還元され、もはやD1とCP43とを架橋させる原因とはなくなる。Mnはフリーの状態でもD1に結合する可能性もあるが、金属結合性の高いPsbOに予め結合してから酸素発生の触媒部位へ運ばれる可能性もある。PsbOは光化学系IIに結合するとMnを安定化し、さらにそれ自身も構造的にD1とCP43との架橋を妨げる位置に存在して、酸素発生ドメインの安定化に寄与する。
4. PsbOはこのような恐らくMnを結合する能力があるので、もし過酸化水素が光化学系IIの光化学反応で生じると金属イオンを介したフェントン反応を引き起こし、その結果生じたヒドロキシルラジカルで損傷を受けるはずである。実際、そのような結果が得られ、PsbOはMnを貯蔵する役割をしていることが示唆される。

研究発表

口頭発表

1. 山崎 仁志、山本 泰；「光阻害による架橋反応を用いた高等植物光化学系IIポリペプチド空間配置の決定」、日本植物生理学会(2003、近畿大学)
2. 逸見 隆博、徳富(宮尾) 光恵、山本 泰；「強光ストレス下における光化学系II膜表在性33-kDaタンパク質(OEC33)の損傷」、日本植物生理学会(2003、近畿大学)
3. 大平 聡、山本 泰；「高温下での光化学系II反応中心D1蛋白質の分解」、日本植物生理学会(2003、近畿大学)
4. 内田 優、森 宏樹、山本 泰；「The effect of GTP on the D1 degradation under heat stress」、アメリカ植物生理学会(2003、ハワイ)
5. 内田 優、森 宏樹、山本 泰；「GTPによる光化学系IID1タンパク質分解の促進」、植物学会(2003、札幌)

6. 山本 泰 ; 「光化学系II複合体の “Quality control” 」、日本植物生理学会 (2004、東京)

紙上発表

1. T. Henmi, H. Yamasaki, S. Sakuma, Y. Tomokawa, N. Tamura, J.-R. Shen and Y. Yamamoto: “Dynamic interaction between the D1 protein, CP43 and OEC33 at the luminal side of photosystem II in spinach chloroplasts: evidence from light-induced cross-linking of the proteins in the donor-side photoinhibition.” **Plant Cell Physiol.** 44, 451-456 (2003).
2. T. Henmi, M. Miyao and Y. Yamamoto: “Release and reactive-oxygen-mediated damage of the oxygen-evolving complex subunits of PS II during photoinhibition.” **Plant Cell Physiol.** 45, 243-250(2004).
3. Y. Yamamoto, S. Sakuma and J.-R. Shen: “Isolation of photosystem II-enriched membranes and the oxygen-evolving complex (OEC) subunit proteins from higher plants.” In “**Methods in Molecular Biology: Photosynthesis Protocols**” (ed. by R. Carpentier) , Humana Press, in the press (2004).
4. Y. Yamamoto, Y. Nishi, H. Yamazaki, S. Uchida and S. Ohira: “Assay of photoinhibition of photosystem II and protease activity.” in “**Methods in Molecular Biology: Photosynthesis Protocols**” (ed. by R. Carpentier), Humana Press, in the press (2004).