

強光ストレス下または高温ストレス下でおこる光化学系II反応中心タンパク質の損傷に関する研究

ABE, Shotaro / 安部, 笙太郎

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学研究科編

(巻 / Volume)

63

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2022-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00025411>

強光ストレス下または高温ストレス下でおこる 光化学系Ⅱ反応中心タンパク質の損傷に関する研究

STUDY ON DAMAGE TO REACTION CENTER PROTEINS OF PHOTOSYSTEM II UNDER STRONG LIGHT STRESS OR HIGH TEMPERATURE STRESS

安部笙太郎

Shotaro ABE

指導教員 水澤直樹

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

Strong light stress or moderate heat stress damages the D1 protein of photosystem II (PSII) reaction center. Although the mechanisms of photodamage to the D1 protein have been intensively studied using isolated PSII preparations, the mechanisms of photodamage and heat damage to the D1 protein *in vivo* are still unknown. In this study, damage to the D1 protein under heat stress was compared with that under strong light stress using unphosphorylated or phosphorylated spinach thylakoid membranes in which almost all the D1 protein was either unphosphorylated or phosphorylated. Fragments of the D1 protein derived from cleavage in the DE loop (N22-23 kDa and C9 kDa fragments) were generated both upon treatment with strong light and moderate heat. These results suggest that phosphorylation of the D1 protein does not affect the overall pattern of damage to the D1 protein.

Key Words : D1 protein, photosystem II, spinach

1. 緒言

強光や高温ストレス下では光合成装置の1つである光化学系Ⅱ(PSII)が選択的に損傷・失活する。PSIIは光合成酸素発生を担うチラコイド膜上の超分子複合体である。PSIIは反応中心のD1とD2、コアアンテナのCP47とCP43を含む数多くのタンパク質から構成される。D1タンパク質はA-Eの膜貫通領域をもち[1]、酸素発生を触媒するMnクラスターや反応中心Chl(P₆₈₀)を結合している。

光は光化学反応に必要なが、同時にD1に損傷を与え、損傷を受けたD1は切断される。D1切断のメカニズムにはPSII内部で生成した活性酸素が切断する説とプロテアーゼが切断する説がある。PSIIの光損傷部位は、単離PSII標品を用いた研究からPSIIのアクセプターサイド説とドナーサイド説がある。前者では、P₆₈₀が過剰に励起され還元側電子伝達が滞った結果、D1が損傷しDEループで切断を受け、N22 kDa断片とC9 kDa断片を生成する。後者では、Mnクラスターの機能が低下してP₆₈₀⁺への電子供与が滞った結果、D1が損傷しABループで切断を受け、N9 kDa断片とC24 kDa断片を生成する[1](図1)。しかし、生葉ではPSII標品とは異なり、弱光下でD1、D2、集光性Chlアンテナタンパク質(LHCII)がリン酸化されるため、リン酸化がD1損傷に与える影響を考慮する必要がある。

高温ストレス下では、Mnクラスターが不安定化し、酸素

発生が失活する。近年、ホウレンソウチラコイド膜標品を高温処理すると、酸素発生活性が低下するだけでなく、D1タンパク質が切断を受けることが報告された[2]。しかし、高温処理時のD1タンパク質切断が光損傷と同様の仕組みでおこっているかは不明である。

本研究ではPSII標品よりも*in vivo*に近い実験系のホウレンソウチラコイド膜を用いて、*in vivo*でのD1の光損傷や高温損傷の仕組みを明らかにすることを目的とする。まずD1をリン酸化する系を確立し、D1のリン酸化が、D1光損傷、高温損傷の様相に与える影響を解析した。光損傷の研究からホスファチジルグリセロール(PG)がD1の分解と修復に関わっているという説が提唱されている。そこで、チラコイド膜をホスホリパーゼA2(PLA2)処理して、膜表面のPGを分解したときに、強光や高温下でのD1の切断が影響を受けるかどうかを解析した。

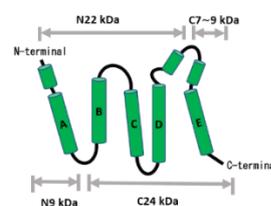


図1. D1タンパク質の構造・切断部位

2. 実験手法

(1) チラコイド膜のリン酸化処理と PLA2 処理

リン酸化処理では、ホウレンソウ葉より単離したチラコイド膜に ATP を添加し弱光 (0.1 mmol photons/m²s) を 25°C, 30 分照射した。PLA2 処理では、チラコイド膜に PLA2 (120 units/mgChl) を添加し 25°C, 暗所で 120 分静置した。

(2) チラコイド膜の強光および高温処理

リン酸化または PLA2 で前処理したチラコイド膜を用いて、強光処理では強光 (2 mmol photons/m²s) を 25°C, 60 分照射、高温処理では暗下 50°C で 30 分処理した。

3. 結果・考察

(1) リン酸化処理, PLA2 処理の効果

非リン酸化処理, リン酸化処理チラコイド膜と非 PLA2 処理, PLA2 処理チラコイド膜について各処理前後の酸素発生活性を測定した (図 2)。リン酸化処理チラコイド膜では、30 分の弱光照射で若干活性が低下したが、リン酸化の有無で活性の差はみられなかった (図 2a)。弱光下でのリン酸化処理により、ATP 濃度に依存して D1 に加え CP43, D2, LHCII がリン酸化された (図 3)。

PLA2 処理では 120 分の処理間に約 80% 活性が低下した (図 2b)。この活性低下は膜表面の PG が分解され PSII 還元側の電子伝達が失活したためであると考えられる。

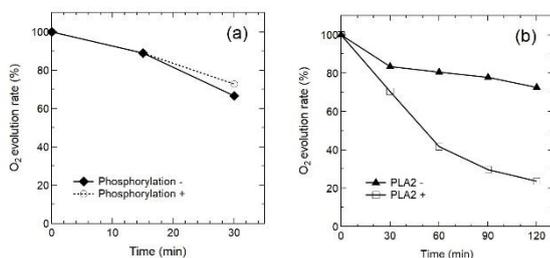


図 2. リン酸化処理, PLA2 処理中の酸素発生活性変化 (a)リン酸化処理, (b) PLA2 処理

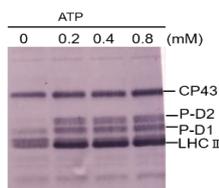


図 3. リン酸化処理が PSII リン酸化に与える影響
リン酸化スレオニンに対する抗体を用いてウェスタンブロットングで解析した。

(2) D1 タンパク質の光損傷と高温損傷に対するリン酸化前処理と PLA2 前処理の効果

各前処理を施したチラコイド膜に強光または高温処理すると、いずれも時間の経過に伴い酸素発生活性が低下した。次にタンパク質損傷の様相を SDS-PAGE とウェスタンブロットングで解析した。CBB 染色では、強光、高温処理前後でタンパク質組成に大きな変化はみられなかつ

た (図 4)。

D1 タンパク質の損傷を D1 の DE ループに対する抗体を用いてウェスタンブロットングで解析した (図 5)。リン酸化前処理した場合、強光・高温処理共にリン酸化の有無によらず D1 タンパク質は損傷し DE ループでの切断を示す N22-23 kDa と C9 kDa 断片が蓄積した。強光処理では 41 kDa の D1 とシトクロム (Cyt) *b*₅₅₉ α サブユニットとの架橋産物が生成したが、高温処理では 41 kDa よりも高分子量領域に D1 を含む架橋産物が生成した。PLA2 前処理についても、リン酸化前処理とほぼ同様な結果であった。

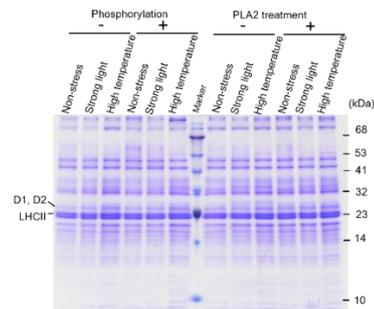


図 4. 強光または高温処理後のタンパク質組成の変化

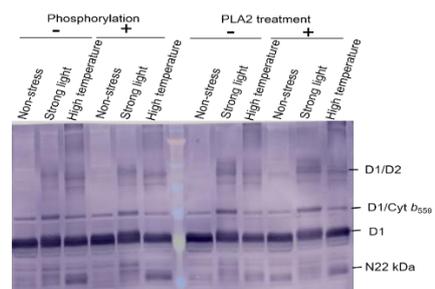


図 5. 強光または高温処理後の D1 タンパク質の損傷

4. 結言

本研究ではチラコイド膜を用いてリン酸化前処理と PLA2 前処理が強光・高温ストレス下での D1 タンパク質損傷に与える影響を調べた。リン酸化・PLA2 前処理の有無によらず、D1 は強光、高温ストレス下で、同様に DE ループで切断され、N22 kDa と C9 kDa 断片を生成することがわかった。高温処理では PSII のドナーサイド (Mn クラスター) が損傷・失活すると考えられているが、切断はアクセプターサイドに位置する DE ループでおこることは興味深い。現在、PLA2 処理で PG を分解した後、強光または高温に曝したときに D1 の切断量に変化がみられるかどうか検討しているところである。

参考文献

- Mizusawa et.al (2003) *Biochemistry* 42: 10034-10044.
- Komayama et.al (2007) *Biochimica et Biophysica Acta* 1767: 838-846.