



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	葉緑体のイソプレノイド代謝に関わるLight-harvesting-like protein (LIL3)の機能解析
Author(s)	高橋, 香織
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第12271号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12271
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/64863
Type	doctoral thesis
File Information	Kaori_Takahashi.pdf



平成 27 年度

博士論文

葉緑体のイソプレノイド代謝に関わる

Light-harvesting-like protein (LIL3)の機能解析

北海道大学大学院 生命科学院 生命システム科学コース

低温科学研究所 生物適応機構学研究室

高橋香織

目次

1. 要旨	3-4
2. 序論	5-9
3. 材料と方法	10-23
4. 結果	24-32
5. 考察	33-42
6. 図	43-74
7. 謝辞	75
8. 参考文献	74-79

1. 要旨

光合成生物は光エネルギーを用いて光合成を行う。高等植物の場合、光合成の第一段階は、Light-harvesting chlorophyll a/b binding protein complex (LHC)による光エネルギーの集光である。LHC の機能において重要な役割を担うのが、LHC motif と呼ばれる保存されたアミノ酸配列である。光合成生物のゲノム解析が進んだ結果、LHC 近縁なタンパク質がいくつか発見された。これらのタンパク質は、LIL タンパク質と呼ばれ、LHC と同様に LHC motif を持つ。

北海道大学・生命科学院・生物適応機構学研究室では、2002 年より継続的にシロイヌナズナを用いてクロロフィル代謝に異常をきたす変異体のスクリーニングを行っている。このスクリーニングにおいて、側鎖の還元が不完全なクロロフィルを蓄積する 2 つの変異体が単離された。これらの変異体では、それぞれ *LIL3:1* (At4g17600)遺伝子と *LIL3:2* (At5G47110)遺伝子の最初のエキソンにトランスポゾンが挿入されていた。*LIL3* は、まだ機能の同定されていない LIL タンパク質の一種であった。当研究室の研究により、*lil3:1/lil3:2* 二重変異体では、 α -tocopherol および phytylated chlorophyll (Chl-phytol) の蓄積が見られないことが明らかとなった。この表現型は、geranylgeranyl reductase (GGR)と呼ばれる酵素を欠損した変異体の表現型と非常によく似ている。GGR は geranylgeranyl diphosphate (GGPP)を phytyl diphosphate (PPP)へと還元する酵素であり、生じた PPP は、クロロフィル合成、および α -tocopherol 合成に利用される。実際、*lil3:1/lil3:2* 二重変異体では GGR の蓄積がみられなかった。

では、なぜ、*LIL3* 遺伝子を欠損させると GGR が蓄積しなくなるのか。*LIL3* は GGR

の蓄積にどのような影響を与えているのか。さらには、LIL3 が GGR の酵素活性に関与している可能性はあるのか。本研究では、これらの疑問を解決し、LIL3 の機能を明らかにすること、また、LIL タンパク質で保存されている LHC motif の機能を明らかにすることを目的に実験を行った。

まず、LIL3 に FLAG タグを融合した形質転換植物を作成し、免疫沈降によって LIL3 複合体の単離・精製を行った。その結果、LIL3 は GGR と約 200kDa と約 160kDa の複合体を形成していることが明らかとなった。さらに、GGR に膜貫通ドメインを融合したコンストラクトを作成し、*lil3:1/lil3:2* 二重変異体に形質転換したところ、部分的にはあるが、表現型の回復が見られた。また、LHC がもつ LHC motif はクロロフィルが結合していることが明らかになっており、この結合したクロロフィルが LHC の機能に重要であると考えられている。そこで、LIL3 がもつ LHC motif のうち、クロロフィルが結合すると推測されるアミノ酸をアラニンに置換した形質転換植物を用いて、LHC motif の機能解析を試みた。その結果、LIL3 アミノ酸置換変異体では、野生型植物と同レベルの GGR が蓄積しているにも関わらず、Chl-phytol の割合は 4 割程度までしか回復せず、また、野生型植物で見られる LIL3-GGR 複合体の高分子のバンドが検出されなかった。これらの結果を総合的に考えると、LIL3 の主な機能は、GGR のチラコイド膜へのアンカーであり、GGR の酵素活性には直接的には影響を与えないこと、さらに、LIL3 は LHC motif を介してチラコイド膜上で複合体を形成しており、複合体を形成することで、GGR が効率的に酵素反応を触媒することができることが明らかとなった。

2. 序論

2.1. 代謝経路の研究について

植物は光合成を行うことで、二酸化炭素から酸素を作り出すだけでなく、植物の生存に必要な有機物を合成している。光合成は非常に複雑な反応である。植物の場合、光合成は **Light-harvesting complex (LHC)** による光エネルギーの集光から始まり、水の分解、クロロフィルの励起、糖の合成へと進み、その過程で生じたプロトンの濃度勾配を利用して **ATP** が合成される。光合成に限らず、代謝は生命活動の基本を担う重要なプロセスである。

代謝についての理解を深めるためには、まず、代謝経路とそれに関わる酵素を同定する必要がある。植物においては、多くの代謝経路と酵素が 1990 年から 2000 年代前半に同定された。例えば、クロロフィル合成経路は、1990 年代までに代謝経路の概要が明らかとなり、2005 年までに主要な酵素がすべて同定された (Nagata et al., 2005; Ryouichi Tanaka, 2011)。さらに、DNA microarray などの解析技術によって、これらの酵素の発現パターンなどが詳細に解析された (Matsumoto, 2004)。

しかし、酵素の発現パターンを明らかにするだけでは、代謝の流れを理解するには不十分である。多くの場合、代謝経路は、酵素の活性や安定性など、さまざまな点で制御されている。クロロフィル合成の酵素がすべて同定されたとは言っても、活性の制御や葉緑体内での酵素の局在、酵素の安定性などについての知見は不足していた (Ryouichi Tanaka, 2011)。特に、酵素の活性や安定性を制御する因子に関する知見は乏しく、glutamyl-tRNA reductase を制御すると考えられる Flu タンパク質、また、Mg-chelatase

を制御すると考えられる、**Gun4** タンパク質が知られているのみであった。代謝経路の制御について理解するためには、それを制御している因子を同定することが必要であると考えられた。

2.2 *lil3* 欠損変異体

北海道大学・生命科学院・生物適応機構学研究室では、2002 年より、理化学研究所の *Dissociation (Ds)*-tagged ライン (シロイヌナズナ) や、ethylmethane sulfonate (EMS) 処理した変異体プールを用いて、クロロフィル代謝に異常をきたす変異体の大規模なスクリーニングを行っている (Nagata et al., 2005; Tanaka et al., 2010)。クロロフィル代謝を制御する新たな制御因子を発見することが、このスクリーニングの目的である。スクリーニングの結果、クロロフィル代謝に異常をきたす 2 つのライン、**Ds13-3953**、**Ds-13-0193** が単離された。これらの変異体では、それぞれ、*LIL3:1* (At4g17600) と *LIL3:2* (At5g47110) の最初のエキソンにトランスポゾンが挿入されていた。*LIL3* は、まだ機能が同定されていない *LIL* タンパク質の一種である (*LIL* タンパク質については、2 章 3 節を参照)。そこで、*lil3:1* と *lil3:2* を掛け合わせた *lil3:1/lil3:2* 二重変異体を作成し、さらに詳しく、*lil3* 変異体の解析を行った。

植物は通常、側鎖が完全に還元された phytylated chlorophyll (Chl-phytol) を蓄積する。しかし、*lil3:1/lil3:2* 二重変異体では、Chl-phytol の蓄積がほとんど見られず、代わりに、側鎖の還元が不完全な geranylgeranylated chlorophyll (Chl-GG) の蓄積が確認された。さらに、この変異体では α -tocopherol の蓄積も確認されなかった (Tanaka et al., 2010)。Chl-phytol と α -tocopherol に共通する特徴として、両者が側鎖に phytyl 基をもつことが挙げられる。Chl-phytol の代わりに Chl-GG を蓄積したことから、

lil3:1/lil3:2 二重変異体では geranylgeranyl diphosphate (GGPP) から phytyl diphosphate (PPP) への還元が正常に行われていないのではないかと推測された。GGPP から PPP への 3 段階の還元反応は geranylgeranyl reductase (GGR) と呼ばれる酵素によって触媒される (Fig. 4) (Keller et al., 1998)。まず、GGPP が 4 つもつ二重結合のうちの 1 つが還元され、dihydrogeranylgeranyl diphosphate (DHGG) が生じ、さらにもう 1 つ二重結合が還元されて tetrahydrogeranylgeranyl diphosphate (THGG) が生じる。そして最後に、もう 1 つ二重結合が還元され PPP となる。また、GGR は GGPP から PPP への還元反応だけではなく、Chl-GG から Chl-phytol への還元反応も触媒する。これらの事実から、*lil3:1/lil3:2* 二重変異体では GGR の活性、または GGR の蓄積になんらかの異常が生じているのではないかと推測された。そこで、まず、GGR の mRNA 量とタンパク質量が調べられた。その結果、*lil3:1/lil3:2* 二重変異体では、GGR の mRNA 量には異常がないにもかかわらず、GGR タンパク質の蓄積が減少していることが明らかとなった (Tanaka et al., 2010)。これらの結果から、GGR の蓄積には LIL3 が必須であると考えられた。

2.3 Light-harvesting-like protein (LIL protein)

先に述べた通り、LHC は光エネルギーの集光において重要な役割を果たす。LHC は 3 つの膜貫通ドメインを持ち、1 つ目と 3 つ目の膜貫通ドメインに LHC motif と呼ばれる保存されたアミノ酸配列をもつ (典型的なアミノ酸配列 :

EKWNGRLAMIGFVAALTELTG) (Engelken et al., 2010)。この LHC motif は、22 個の疎水性アミノ酸からなり、クロロフィルやカロテノイドといった光合成色素を結合している (Barros and Kühlbrandt, 2009)。

光合成生物のゲノム解析が進んだ結果、LHC と近縁なタンパク質がいくつか発見された。これらのタンパク質は、Light-harvesting-like (LIL)タンパク質とよばれ、LHC で保存されている LHC motif をもつ。当研究室がスクリーニングの結果同定した LIL3 も、この LIL タンパク質の一種であり、機能未知のタンパク質であった。LIL3 に限らず、多くの LIL タンパク質の機能が不明であること、その系統関係が確定していないことから、LIL タンパク質は複数の名前で呼ばれている。初めて高等植物における LIL タンパク質の分類を試みた Jansson は、6 種類の LIL タンパク質を発見した順番に LIL1 から LIL6 と命名した (Jansson, 1999)。一方、Adamska らは、LIL タンパク質の膜貫通ドメインの数を指標に命名を行っている (Engelken et al., 2010)。本論文では、それぞれの LIL タンパク質に関して、2015 年の時点で最も頻繁に文献で使われていた命名を用いている。結果として、Jansson ら (Jansson, 1999) と Adamska ら (Engelken et al., 2010) の命名法の両方を用いているが、混乱を避けるため、命名法と遺伝子番号、および現時点で予測されている機能、さらには色素結合の有無を Fig. 3 にまとめた。

2.4 本研究の目的

本研究は大きく 2 つの目的のもと行われた。

まずは、1 つ目の目的は、LIL3 がどのように GGR の蓄積を制御しているのか、LIL3 の機能を明らかにすることである。本研究の最初の実験により LIL3 と GGR が複合体を形成することが明らかとなった。しかし、過去の論文から、*in vitro* では GGR 単独で酵素活性があることがわかっている (Keller et al., 1998)。では、なぜ、*in vivo* では複合体を形成する必要があるのだろうか。LIL3 が何らかの形で代謝を制御しているならば、それを明らかにすることで、葉緑体内の代謝の理解に貢献したい。

そして2つ目の目的は、LIL3がもつLHC motifの機能を明らかにすることである。

現在のところ、最も研究が進んでいるLHC motifは、LHCがもつLHC motifである。

このLHC motifにはクロロフィルが結合しており (Barros and Kühlbrandt, 2009)、この結合した chlorophyll が LHC の機能と構造に重要な役割を担っていると考えられている。前述の事実から、LIL3 がもつ LHC motif にもクロロフィルが結合している可能性が高く、このクロロフィルがLIL3の機能に重要な役割を担っている可能性が高い。

本論文では、免疫沈降を利用した色素結合解析や、LHC motif の中でもクロロフィルが結合すると予測されたアミノ酸を置換した形質転換植物の解析を通して、LIL3 がもつ LHC motif の機能解析に挑戦した。

3. 材料と方法

3.1 植物材料

本研究では、実験材料として、モデル植物である *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ)を用いている。シロイヌナズナはゲノム中に 2 つの LIL3 遺伝子を有しており、それぞれ LIL3:1 (At4g17600) 、LIL3:2 (At5g47110) と名付けられている。本研究では主に、野生型植物である Columbia エコタイプと *lil3:1/lil3:2* 二重変異体を用いた。LIL3 の欠損変異体は、理化学研究所の *Dissociation (Ds)*-tagged ラインをスクリーニングしている際に発見された (Nagata et al., 2005)。LIL3:1 一重変異体、LIL3:2 一重変異体は、それぞれ Ds13-3953、Ds13-0193 であり、一つ目のエキソンにトランスポゾンが挿入されている (Myouga et al., 2010)。

3.2 生育条件

植物は、三共園芸培土 (北海三共)と太平洋バーミライト (太平洋石炭販売輸送) を用い、基本的には 23 °C、明所 14 時間暗所 10 時間の長日条件下(およそ 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$)で生育した。

3.3 形質転換植物の作成

3.3.1 コンストラクトの作成

本研究のために作成したコンストラクトと使用したプライマーは Fig. 1 に、プライマーの配列は Fig. 2 に示している。

コンストラクトはオーバーラッピング PCR を利用して作成した。例えば、コンストラクト 15 (GGR の 5'UTR-GGR transit-GGR-LIL3 helix 1-LIL3 helix 2-GGR 3'UTR)を作成するためには、まず、PCR によって、GGR の 5' UTR から GGR までの配列、LIL3 の helix 1 から helix2 までの配列、GGR の 3' UTR の配列、以上の 3 つの配列を増幅させる。その際のテンプレートにはシロイヌナズナの cDNA を用い、使用したプライマーは、それぞれ C28F と C2R、C3F と C4R、C5F と chlp-to-pENTR-R である。また、PCR の増幅は KOD-FxNEO (TOYOBO)を用いて行い、PCR 条件は KOD-FxNEO のプロトコルに従った。PCR 後、反応液を 0.8%アガロースゲルで電気泳動し、Gel Extraction Kit (Qiagen)を用いて、ゲルから DNA を抽出する。その後、増幅させた 3 つの配列をテンプレートに、C28 プライマーと chlp-to-pENTR プライマーを用いて再び PCR を行い、電気泳動の後、ゲルから DNA 抽出を行う。一方、プラスミド (pENTR4-dual)は、制限酵素 SalI と EcoRV で切断し、電気泳動の後、特異的なバンドを切り出して DNA 抽出を行う。その後、増幅させた PCR 産物を In-Fusion HD Cloning Kit (TAKARA)を用いて、切断したプラスミドに組み込んだ。作成したプラスミドはヒートショック法を用いて大腸菌 (Thermo Fisher)を形質転換し、菌体内で増幅後、FastGene Plasmid Mini Kit (NIPPON Genetics co, Ltd)を用いてプラスミドを精製した。次に、得られたプラスミドを NheI と PvuI で制限酵素処理し、電気泳動、ゲルからの抽出の後、Gateway LR Clonase Enzyme Mix (Invitrogen)を用いて、pEarlyGate 101 に導入した (Earley et al., 2006)。

3.3.2 植物の形質転換

作成したコンストラクトをアグロバクテリウムに形質転換し、50mg/L kanamycin、50mg/L rifampicin、50mg/gentamicin を含む LB 培地のプレート上で 30℃、48 h 生育した。その後、コロニーを 2 mL の LB 液体培地で培養し、アグロバクテリウムを増殖後、8000 ×g、2 min、室温で遠心し、集菌した。集菌したアグロバクテリウムは懸濁液 (0.5% Sucrose、0.0005% SILWET L-77)に懸濁し、シロイヌナズナの花芽部分に感染させた。

その後、形質転換した植物体から採種した種を播種し、10 倍希釈した日農バスタ液剤 0.2 (日本農薬株式会社)によって選抜した。

3.4 LIL3 および GGR の局在解析

3.4.1 無傷葉緑体の単離

無傷葉緑体の単離は Salvi らの方法をもとに、一部改良を加えて行った (Salvi et al., 2008)。

以下の操作はすべて氷上、または 4 °Cで行う。また、遠心には swing ローター (HITACHI T5SS31) を用いた。

刈り取った植物をミキサーに入れ、破碎 buffer (0.45 M Sorbitol, 20 mM Tricine-KOH (pH 8.4), 10 mM EDTA, 10 mM NaHCO₃, 0.1% BSA) を加えて破碎する。破碎液をミラクロス (Calbiochem)で濾過し、2500 ×g で 5 min 遠心する。上清を捨て、ペレットを wash buffer (0.3 M sorbitol, 20 mM Tricine-KOH (pH 7.6), 5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA) に懸濁する。次に、Percoll を用いて無傷葉緑体と破損葉緑体の分離を行う。80% Percoll (0.6 M sorbitol, 40 mM Tricine-KOH (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 5 mM EDTA)の上に、40% Percoll を積み、さらにその上に葉緑体懸濁液を積

む。3000 ×g で 10 min 遠心し、80% Percoll の上の無傷葉緑体を回収する。回収した無傷葉緑体は wash buffer で 2 度 wash する。

3.4.2 チラコイド膜、包膜、ストロマ画分の分画

無傷葉緑体の単離と同様、Salvi らの方法をもとに、一部改良を加えて行った (Salvi et al., 2008)。

以下の操作はすべて氷上、または 4 °C で行う。

まず、回収した無傷葉緑体を少量の wash buffer に懸濁し、そこに適量の swelling buffer (10 mM MOPS, 4 mM MgCl₂)を加える。超遠心用のチューブに 0.93 M Sucrose (10 mM MOPS-NaOH (pH 7.8) , 4m M MgCl₂)、0.6 M Sucrose、0.3 M Sucrose を積み、さらにその上に懸濁液を乗せて、100000 ×g で 1 h 超遠心する。超遠心後、ペレットとなったチラコイド膜、0.93 M Sucrose の上の包膜、0.3 M Sucrose の上のストロマをそれぞれ回収する。チラコイドと包膜は再び swelling buffer に懸濁し、wash することで、余分な sucrose を除く。

3.4.3 チラコイド膜の subfractionation

チラコイド膜の subfractionation は JARVI らの方法をもとに、一部改良を加えて行った (Järvi et al., 2011)。

以下の操作はすべて氷上、または 4 °C で行う。また、遠心には swing ローター (HITACHI T5SS31) を用いた。

刈り取った植物をミキサーに入れ、Grinding buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 330 mM Sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 5 mM Sodium ascorbate, 0.05% BSA,

10 mM sodium fluoride)を加えて破碎する。破碎液をミラクロス (Calbiochem)で濾過し、2800 ×g で 7 min 遠心する。上清を捨て、ペレットを shock buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 10 mM Sodium fluoride, 5 mM Sorbitol) に懸濁する。懸濁液を新しいファルコンチューブに移し、2800 ×g で 7 min 遠心する。その後、上清を捨て、storage buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 100 mM Sorbitol, 10 mM MgCl₂, 10mM Sodium fluoride)に懸濁し、再び 2800 ×g で 7 min 遠心する。遠心後、上清を捨て、少量の storage buffer に懸濁する。この際、土の破片のようなものが一番下に、さらにその上に白いデンプンのようなものが沈殿するので、深緑色のペレットのみを懸濁する。懸濁液のクロロフィル濃度を測定し、1.5 mg/ml クロロフィルとなるように希釈し、液体窒素中で急速凍結した後、-80 °Cに保存する。

-80 °Cに保存してあったサンプルを氷上で融解する。そこに、BTH buffer (25 mM BisTris-HCl (pH 7.0), 20% (w/v) glycerol, 10 mM Sodium fluoride, 0.25 mg · ml⁻¹ Pefabloc)を加え、1 mg/ml クロロフィルとなるように希釈する。さらに、等量の 2% Digitonin (sigma)を加え、暗所にてローテーターで 5 min、18 °Cで攪拌する。攪拌後、21600 ×g、20 min 遠心する。上清をストロマチラコイドとして回収し、ペレットは n-Dodecyl- α -D-maltoside (α DM)で可溶化後、グラナチラコイドとして回収する。

3.4.4 クロロフィル定量

サンプルを 80% Acetone 1 ml に懸濁し、吸収分光光度計を用いて 750 nm、646 nm、663 nm の吸光度を測定する。Porra らの係数を用いて chlorophyll 濃度を算出した (P E Kriedemann, 1989)。

3.4.5 タンパク質濃度測定

タンパク質濃度測定は DC Assay kit (Bio-Rad)にて行う。まず、サンプルを 2% SDS 入りの solubilization buffer (50 mM Imidazole-HCl (pH 7.0), 20% glycerol, 5 mM 6-ACA, 1 mM EDTA)、または swelling buffer で 10 倍希釈し、全量を 15 μ l とする。1 ml の reagent A に対し、20 μ l の reagent S を加え、reagent A'を作成する。15 μ l のサンプルに、75 μ l の reagent A'、600 μ l の reagent B を加え、ボルテックスでよく攪拌する。その後、室温で 15 min インキュベートする。15 min 後、吸収分光光度計で 750 nm の吸光度を測定する。タンパク質の濃度は、BSA を用いた検量線から算出する。

3.4.6 SDS-PAGE

SDS-PAGE には、14%の分離ゲルと 3%の濃縮ゲルを用いる。ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (AE-6500 ATTO)を使用し、ゲル 1 枚に対し、250 V、25 mA で 1 h 泳動する。

泳動ゲル (14%)		濃縮ゲル (3%)	
30% アクリルアミド	8.4 ml	30% アクリルアミド	0.75 ml
超純水	7.11 ml	超純水	4.8 ml
3M Tris-HCl (pH8.8)	2.25 ml	0.5M Tris-HCl (pH6.8)	1.9 ml
10% SDS	180 μ l	10% SDS	75 μ l
10 % APS	150 μ l	10 % APS	62.5 μ l
TEMED	15 μ l	TEMED	6 μ l
total volum	18 ml	total volum	7.5 ml

APS=Ammonium PeroxodiSulphate

3.4.7 Western blotting

タンク式ブロッティング装置 (BIO CRAFT MODEL BE-350w) を用いて 40 V、200

mA で 2 h、HybondTM-P membrane (GE Healthcare)へブロッティング処理を行う。

ブロッティング後、メンブレンを 3% skim milk に浸し、1 h 以上ブロッキング処理を行う。PBST (137 mM NaCl, 8.1 mM NaHPO₄·7H₂O, 2.7 mM KCl, 1.47mM KH₂PO₄, 0.1% Tween 20)で 2 min、2 回 wash し、一次抗体に浸して室温で 1 h 反応させる。反応後、PBST で 5 min、3 回 wash し、二次抗体中で 1 h 反応させる。反応後、再び PBST で 5 min、3 回 wash する。wash 後、Western Lightning Plus-ECL (Perkin Elmer) を用いて 1 min 反応させ、発光をルミビジョンプロ (アイシン精機) によって検出する。

なお、詳しい抗体の希釈濃度については下記に示した。

	抗体の希釈倍率		溶液	備考
	1次抗体	2次抗体		
LIL3:2 (lot2)	4000	20000 (ウサギ)	0.5% skim milk in PBST	当研究室作成
GGR (lot2)	10000	20000 (ウサギ)	CanGet Signal (TOYOBO)	当研究室作成
Rubisco	20000	20000 (ウサギ)	CanGet Signal (TOYOBO)	当研究室作成
LHCB1	4000	20000 (ウサギ)	CanGet Signal (TOYOBO)	Agrisera
LHCB4	5000	20000 (ウサギ)	CanGet Signal (TOYOBO)	Agrisera
Tic110	2000	20000 (ウサギ)	CanGet Signal (TOYOBO)	Agrisera
CP1	100000	20000 (ウサギ)	CanGet Signal (TOYOBO)	当研究室作成

3.5 LIL3 複合体の精製

3.5.1 FG Beads (はんだビーズ)を用いた免疫沈降

以下の操作は全て氷上、または 4℃で行う。

はんだビーズとは東京工場大学半田研究室にて開発されたナノ磁性微粒子で、フェライト粒子をポリマーで強固に被覆した約 200 nm の粒子であり、表面に設けられたリンカーの先端にペプチドを固定化し、その標的物質をアフィニティー精製 (スクリーニング)する。はんだビーズの特徴としては、ナノサイズであるために表面積が大きく、ま

た、溶液中での分散性が高いために、標的物質を効率よく結合できること、表面が特殊な構造であるために、タンパク質の非特異な吸着が極めて少ないことが挙げられる。また、磁気ビーズであるため、マグネットを利用して緩やかにビーズから buffer を取り除くことも可能である。

まず、FLAG 抗体 (sigma) をタンパク質固定化 buffer (25 mM MES-NaOH (pH 6.8)) で 5 倍希釈にする。続いて、ビーズを必要量マイクロチューブに移し、マグネットに置いて上清を取り除く。メタノールを加えてビーズを分散させる。その後、再びマイクロチューブをマグネットに置き、メタノールを取り除く。タンパク質固定化 buffer と抗体を加え、1 h、ローテーターで反応させる。反応後、再マグネットの上に乗せ、上清を取り除く。1 M のアミノエタノール (pH 8.0) を加え、ビーズを分散させ、16-20 h ローテーターで反応させる。反応後、マイクロチューブをマグネットに置いて上清を取り除き、固定化ビーズ洗浄・保存 buffer (10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol) でビーズを数回 wash する。ビーズを必要量別のチューブに移し、1% α DM で数回 wash する。続いてサンプルの調整を行う。サンプルには LIL3-FLAG 植物の単離葉緑体と、そのネガティブコントロールとして野生型植物の単離葉緑体を用いる。各植物から葉緑体を単離後、葉緑体を少量の swelling buffer に懸濁する。さらに、等量の 2% α DM を加え、氷上で 5 min 放置し、タンパク質を可溶化する。21600 $\times$ g、で 10 min 遠心し、上清を別のチューブに移し、これをサンプルとして用いる。1% α DM で wash したビーズに、サンプル加え、ローテーターで 2 h 反応させる。その後、1% α DM でビーズを数回 wash し、サンプルを完全に除去する。wash 後、ビーズに DYKDDDDK ペプチド溶液を加え、ローテーターで 30 min 反応させ、目的のタンパク質を溶出する。

3.5.2 Blue-Native-PAGE (BN-PAGE)

まず、PERISTA pump (BIOINSTRUMENT ATTO) を用いて 5%→14%のグラジエントゲルを作成する。詳しいゲルの組成は下記に示した。

サンプルに 50% Coomassie Brilliant Blue (CBB) (SERVA Blue G)を 1/20 量加える。
サンプルをゲルにロードし、下層に Anode buffer (25mM Imidazole-HCl (pH 7.0))、
上層に Cathode buffer (50mM Tricine, 7.5mM Imidazole)をセットし、40 V、1 mA、
で 800 min 泳動する。

グラジエントゲル			濃縮ゲル (3%)	
	5%	14%		
30% アクリルアミド	3 ml	7 ml	30% アクリルアミド	0.75 ml
3 × Gel buffer	6 ml	5 ml	超純水	4.8 ml
Glycerol	–	3 g	0.5M Tris-HCl (pH6.8)	1.9 ml
超純水	9 ml	–	10% SDS	75 μ l
10 % APS	100 μ l	75 μ l	10 % APS	62.5 μ l
TEMED	10 μ l	7.5 μ l	TEMED	6 μ l
total volum	18 ml	15 ml	total volum	7.5 ml

3 × Gel Buffer (75mM Imidazole/HCl (pH7.0)、1.5M Amino Capronic Acid)

3.5.3 銀染色

SilverQuest Silver Staining Kit (Invitrogen)を用いて行う。ゲルを固定液 (Ethanol

40 ml, Acetic acid 10 ml, 超純水 50 ml)に浸し、20 min 以上インキュベートする。その後、30% Ethanol で 10 min、wash する。Sensitizing solution (Ethanol 30 ml, Sensitizer 10 ml, 超純水 60 ml)を加え、10 min インキュベートした後、10% Ethanol で 10 min、wash する。Staining solution (超純水 100 ml, Stainer 1 ml)で 15 min インキュベートし、超純水で 20-60 sec、wash する。Developing solution (Developer 10 ml, Developer enhancer 1 drop, 超純水 90 ml)にバンドが現れるまで浸す。Stopper を 10 ml 加えて、反応を止めた後、超純水で 10 min、wash する。

4.5.4 SDS-PAGE

切り出した BN-PAGE のゲルは可溶化 buffer (脱イオン交換水 90 ml, 10% SDS 10 ml, 2-Mercaptoethanol 500 μ l)に浸し、1 h、30 °Cで静置後、4%のスタッキングゲルの上に乗せ、0.5% アガロースゲルを用いてスタッキングゲルに固定する。ラピダス・二連スラグ電気泳動槽 (AE-5220 ATTO) を使い、ゲル 1 枚につき、250 V、25 mA で泳動する。

4.5.5 質量分析

SDS-PAGE、または BN-PAGE を行ったゲルは銀染色後、北海道大学低温科学研究所生物環境部門微生物生態学共同研究推進部の桑野研究支援推進員にお願いし、LC-ESI-MS/MS 解析を行った。また、質量分析をお願いした SDS-PAGE のゲルに限り、e-PAGEL (E-R15L ATTO) を用いた。

4.6 コンストラクトの解析

4.6.1 タンパク質抽出

上から 3 枚目または 4 枚目の葉を 1 枚切り取り、質量を測定する。葉 0.1 g に対し、100 μ l の whole tissue homogenize buffer (50 mM Tri-HCl (pH 8.0), 2% Lithium Dodecyl Sulfate, 12% Sucrose, 1.5% DTT) を加え、ガラスホモジナイザーで破碎する。破碎液をマイクロチューブに移し、75 $^{\circ}$ C で 3 min 加熱処理する。21600 $\times$ g、室温で 5 min 遠心し、上清を回収する。

4.6.2 HPLC による色素解析

葉のサンプリングから粉碎までは液体窒素で冷やしながら行い、その後の操作は 4 $^{\circ}$ C、または氷上で行う。

上から 3 枚目または 4 枚目の葉を 1 枚切り取り、2 ml のマイクロチューブに入れ、タングステンビーズ (バイオメディカルサイエンス株式会社) と 100% Acetone を加えてシェイクマスター (バイオメディカルサイエンス株式会社) で粉碎する。粉碎後、ピンセットでタングステンビーズを取り除き、21600 $\times$ g で 10 min 遠心し、上清を回収する。

HPLC は HITACHI のシステムを用いた (column oven L-7300, autosampler L-7200, pump L-7100, degasser L-7610, diode array detector L-2450, FL detector L-2485)。

クロロフィル、トコフェロールの検出プログラム

FLOW 1.0 ml/min

時間 (min)	A液 (%)	B液 (%)
0	94	6
10	94	6
18	99	1
20	99	1
21	94	6

A液 : 10% 0.1M Ammonium Acetate (pH5.2)、30% Methanol

B液 : Methanol

クロロフィルの検出プログラム

FLOW 1.0 ml/min

時間 (min)	A液 (%)	B液 (%)
0	100	0
10	55	45
18	2	98
20	2	98
21	100	0

A液 : 50% Methanol、25% acetonitril、25% 0.25M pyridine

B液 : 60% acetonitril、20% methanol、20% acetone

4.6.3 チラコイド膜単離 (簡易版)

操作は全て氷上、または 4℃で行う。

植物体をサンプリングし、適量の破砕 buffer を加えて乳鉢ですりつぶす。1000 ×g で 15 sec 遠心することで余計な粉碎物を沈殿させ、上精を回収する。回収した上精をさらに 2700 ×g で 5 min 遠心し、膜画分を沈殿させる。沈殿した緑の部分だけを少量の swelling buffer に懸濁し、回収する。そこに等量の 2% α-DM を加えて氷上で 5 min

静置する。15000 rpm で 10 min 遠心し、上清をサンプルとして回収する。その後の BN-PAGE に用いる。

4.7 色素実験

4.7.1 Clear-Native-PAGE (CN-PAGE)

CN-PAGE のゲルには BN-PAGE と同じものを用いる。

サンプルに 1/3 量の 1% デオキシコール酸ナトリウム (DOC)を加える。サンプルをゲルにロードし、下層に Anode buffer、上層に Cathode buffer (50 mM Tricine, 7.5 mM Imidazole、0.05% DOC、0.02% α -DM)をセットし、40 V、1 mA、で 800 min 泳動する。

4.7.2 蛍光検出

CN-PAGE ゲル中の色素は、Blue LED で励起し、530 nm 以下の波長をカットする MC YA3 フィルター (株式会社ケンコー)をかけ、Western Lightning Plus-ECL (Perkin Elmer)を用いて検出する。

4.7.3 蛍光波長解析

ゲルを切り出し、F-2500 fluorescence Spectrophotometer (HITACHI)を用いて、蛍光波長の測定を行う。

4.7.4 ゲルからの色素抽出

蛍光を発しているバンドを切り出し、1.5 mL のマイクロチューブに入れる。Gel buffer

を少量加え、プラスチック製のペストツールでゲルを破碎する。4 倍量の 100% Acetone を加え、ボルテックスでしっかりと混ぜる。15000 rpm、4 °C で 10 min 遠心し、上清を回収する。

4. 結果

4.1 LIL3 の局在

北海道大学・生命科学院・生物適応機構学研究室の研究により、植物では LIL3 が欠損すると GGR が蓄積しなくなるが、LIL3 の欠損が GGR の mRNA レベルには影響を与えていないことが明らかとなっていた (Tanaka et al., 2010)。そこで、LIL3 が GGR の蓄積にどのような影響を与えているのか調べるため、まず、LIL3 と GGR の局在を調べた。

無傷葉緑体を単離、破碎後、Sucrose の密度勾配超遠心により、葉緑体をチラコイド膜、包膜、ストロマの 3 つの画分に分画した。分画後、SDS-PAGE を行い、各種抗体を用いて Immunoblotting 解析を行った。解析の結果、LIL3 はチラコイド膜にのみ局在することが明らかとなった。一方、GGR もその大部分がチラコイド膜に局在し、わずかながら、包膜とストロマに局在していた。(Fig. 5)

チラコイド膜は、さらにグラナチラコイドとストロマチラコイドに分画することができる。グラナチラコイドとストロマチラコイドでは、その性質や局在しているタンパク質が異なる。一般的に、グラナチラコイドには密に光化学系 II と LHCII が局在しており、他のタンパク質が入り込む余地はほとんど無い。一方、ストロマチラコイドには光化学系 I が局在しているほか、光によりダメージを受けたタンパク質の修復や、タンパク質の構築が行われる。そのため、ストロマチラコイドにはタンパク質の修復や構築に関わるタンパク質が多く局在している。チラコイド膜上のタンパク質の機能を調べる上では、そのタンパク質の局在もまた重要な情報となる。

チラコイド膜をグラナチラコイドとストロマチラコイドに分画して LIL3 と GGR の局在を調べた結果、LIL3、GGR とともにストロマチラコイドに局在し、グラナチラコイドには局在していないことが明らかとなった。グラナチラコイド画分でわずかに見られるバンドはストロマチラコイド画分の混入が原因だと思われる。(Fig. 6)

4.2 LIL3 複合体の解析

LIL3 および GGR の局在を調べた結果、LIL3 と GGR がともにストロマチラコイドに局在していることが明らかとなった。LIL3 が欠損した変異体で GGR が蓄積しないことと併せて考えると、LIL3 と GGR が複合体を形成している可能性が高いと考えられた。そこで、本当に LIL3 が GGR と複合体を形成しているのか明らかにするため、タンパク質複合体解析データベースである PCoM-DB を用いて解析を行った (Takabayashi et al., 2006)。このデータベースは、野生型植物から精製したチラコイド膜を α DM で可溶化して BN-PAGE を行った後、ゲルを高分子側から 1 mm 間隔で切り出し、LC-MS/MS 解析行うことで切り出したゲルスライスにどのようなタンパク質が存在するのかを解析したものである。BN-PAGE は Native-PAGE の一種であり、複合体構造を取るタンパク質複合体をその分子量に従って分離する上で有効な手法である。つまり、このデータベースを利用すれば、目的のタンパク質がどのくらいの大きさの複合体を形成しており、またそこにどのようなタンパク質が含まれているのかを大まかに予測することができる。PCoM-DB による解析の結果、LIL3 が GGR と複合体を形成している可能性が強く示唆された (Fig. 7)。

そこで、実際に LIL3 を含むタンパク質複合体を精製し、その複合体組成を明らかにするため、LIL3:2 に FLAG タグを融合した形質転換植物を作成し、FLAG タグを利用

して免疫沈降を行った。その後、複合体構造を保ったまま溶出するために、FLAG ペプチドによる競合溶出を行った。溶出液をサンプルに SDS-PAGE を行い、銀線色でバンドの検出を行ったところ、LIL3-FLAG のバンドとは別に、GGR のバンドを確認することができた。このバンドが GGR であることは、LC-MS/MS 解析や Immunoblotting によって確認している (Fig. 8)。また、GGR の他には LIL3-FLAG 形質転換植物に特異的なバンドを確認することができなかったことから、LIL3 は GGR とのみ複合体を形成していることが明らかとなった。

さらに、溶出液をサンプルに BN-PAGE、さらに、BN-PAGE と SDS-PAGE を組み合わせた二次元電気泳動を行うことで、LIL3 と GGR がどのようなサイズの複合体を形成しているのか解析を行った (Fig. 9 &10)。当研究室では2種類の Native Marker を用いて実験を行っており、使用する Native Marker によって予想されるバンドサイズが若干異なるため、Fig. 9 では Native Mark (Invitrogen)と HMW Calibration Kit (GE Healthcare)の2種類のマーカーサイズを示した。LIL3 の分子量は 30 kDa、GGR の分子量は 47 kDa である。N-PAGE の結果、LIL3-FLAG 植物をサンプルとして免疫沈降を行ったレーンでは、計 5 本のバンドを確認することができた。まず、1 番上の約 200 kDa (HMW Calibration Kit 参照)のバンドは、サイズから考えると LIL3-GGR の trimer の複合体だと思われる。そして、上から 2 番目の約 160 kDa のバンドが、LIL3-GGR の dimer の複合体と考えられる。また、上から 3 番目のバンドは、二次元電気泳動の結果を考慮すると、GGR が含まれず、LIL3 のみから構成されていることがわかる。そして、上か 4 番目の GGR の oligomer のバンドには、LIL3 が含まれず、GGR のみから構成されている。おそらく、競合溶出の後、LIL3 との結合が切れて GGR の oligomer として検出されたのだと思われる。そして最後が、LIL3 や GGR の monomer

のバンドではないかと思われる。

LIL3 の複合体解析の結果、LIL3 は GGR とチラコイド膜上で約 200 kDa と 160 kDa の複合体を形成していると結論した。

4.3 GGR に膜貫通ドメインを融合した形質転換植物

LIL3 は、LHC で広く保存された LHC motif をもつ LIL タンパク質の一種である。その LIL3 がなぜ、GGR と複合体を形成しているのか。LIL3 の機能は GGR を安定化なのか、GGR の酵素活性に何らかの影響を与えているのか、それとも別の機能を有するのか。さらに詳しく LIL3 の機能を調べるため、GGR に膜貫通ドメインを融合した形質転換植物を作成した。仮に、LIL3 が GGR を安定化しているだけなのであれば、GGR に膜貫通ドメインを融合させた形質転換植物でも野生型植物と同様の表現型を示すはずである。また、LIL3 が GGR の安定化以外の機能を持つのであれば、大幅な GGR 活性の低下が見られるはずである。融合した膜貫通ドメインの 1 つは、LIL3 がもつ二つの膜貫通ドメイン（1 つ目の膜貫通ドメインに LHC motif が保存されている。）で、もう 1 つが Ascorbate Peroxidase (APX) がもつ膜貫通ドメインである。APX はチラコイド膜局在のタンパク質で、膜貫通ドメインにクロロフィルなどの色素は結合していない。GGR に LIL3 の膜貫通ドメインを融合した形質転換植物を C15 植物、GGR に APX の膜貫通ドメインを融合した形質転換植物を C16 植物と名付けた。また、それぞれ LIL3 の二重変異体に形質転換している。(Fig. 11)

まず、Immunoblotting 解析により、融合タンパク質の蓄積の確認を行った。C15 植物、C16 植物ともに、膜貫通ドメインを融合した GGR のバンドと、わずかながら、LIL3 の二重変異体でも確認される内在の GGR の蓄積を確認することができた。(Fig. 12

&14)

続いて、HPLC によりクロロフィルの解析を行った。野生型植物では、全クロロフィルのうち、ほぼ 100% Chl-phytol なのに対し、LIL3 の二重変異体では Chl-phytol の割合は 5%程度しかなく、80%近くが、側鎖が全く還元されていない Chl-GG であった (Fig. 13 &15)。その一方で、C15 植物では Chl-phytol の割合が 20%程度にまで、また、C16 植物では 40%程度にまで回復していた。膜貫通ドメインを融合した GGR の活性が、LIL3 を欠損させた条件下でも確認できたことから、LIL3 の主な機能は GGR のチラコイド膜へのアンカーであり、LIL3 は GGR の酵素活性に直接的な影響を与えていないものと考えられる。また、C15 植物に比べ、C16 植物の方が GGR の活性が高い (Fig. 13 &15)。これは、C15 植物には膜貫通ドメインが 2 つ付いており、膜貫通ドメインを 1 つ融合させた C16 植物に比べ、GGR の酵素活性ドメインが構造的に不安定になっており、GGPP を PPP へと還元しづらくなっているためではないかと考えられる。

4.4 LIL3 の LHC motif を置換した形質転換植物

LIL3 の主な機能が GGR のチラコイド膜へのアンカーであるならば、LIL3 の LHC motif を別の膜貫通ドメインに置換しても問題なく機能するはずである。そこで、LIL3 がもつ LHC motif を APX の膜貫通ドメインと置換した形質転換植物を作成し、C18 植物を名付けた。先に述べた実験と同様に、LIL3 の二重変異体に形質転換している (Fig. 11)。

まず、Immunoblotting 解析により、GGR および、LHC motif を置換した LIL3 の蓄積レベルを確認した。まず、line16 では野生型と同レベルの LIL3 が蓄積しているに

もかわらず、line5、line15 では LIL3 はそこまで蓄積していなかった。また、GGR の蓄積レベルを見ると、どの line でも野生型植物ほどは GGR が蓄積しておらず、LIL3 と GGR の蓄積レベルにも相関が見られなかった (Fig. 16)。

HPLC によりクロロフィルの蓄積を調べた結果では、どの line でも全クロロフィルに対する Chl-phytol の割合が、60%~80%程度にまで回復が見られた。しかし、この回復の割合にも GGR および LIL3 の蓄積レベルと相関は見られなかった (Fig. 17)。

4.5 クロロフィルを結合すると推測されるアミノ酸を置換した形質転換植物

LHC がもつ LHC motif にはクロロフィルが結合しており、この結合したクロロフィルが LHC の機能において重要な役割を担っていることが知られている (Liu et al., 2004)。そのため、LIL3 がもつ LHC motif にもクロロフィルが結合しており、結合したクロロフィルが LIL3 の機能において重要な役割を担っているのではないかと考えた。そこで、代表的な LHC および LIL タンパク質がもつ LHC motif のアミノ酸配列を比較した (Fig. 18)。2016 年現在、LHC motif を有するタンパク質の中で結晶構造が解析されているのは LHC のみであり、LHC 以外の LIL タンパク質がどのような構造をとるのか、また、どのアミノ酸に色素が結合しているのかといったことに関しては明らかとなっていない。アミノ酸配列の比較解析を行った結果、LIL3:2 がもつ LHC motif のうち、クロロフィルが結合すると推測されたアミノ酸が 3 つあった。すなわち、171 番目のグルタミン (E) と 174 番目のアスパラギン (N)、189 番目のアスパラギン酸 (D) である。前者の 2 つのアミノ酸は、LHC がもつ LHC motif のクロロフィルが結合するとわかっているアミノ酸である。そして、189 番目のアスパラギン酸は LHC でクロロフィルが結合するといわれているアミノ酸ではないが、正に電荷しており、クロロフィ

ルと相互作用する可能性もあるのではないかと考え着目した。これら 3 つのアミノ酸をアラニンに置換した形質転換植物を作成し、3m 植物と名付けた (Fig. 11)。この 3m 植物も、他の実験と同様に LIL3 の二重変異体に形質転換して作成した。

LIL3:2 のアミノ酸置換が植物の表現型にどのような影響を与えるのか、まず、Immunoblotting 解析により、GGR および LIL3 の蓄積を調べた。その結果、line 31 では野生型植物に比べ、多量の LIL3 の蓄積が確認された。また、3m 植物では、本来の LIL3 のバンドとは別に、わずかに高分子側にシフトした LIL3 のバンドを確認することができた。これは、LIL3 が何らかの修飾を受けたものと思われるが、どのような修飾を受けたのかはわかっていない。また、GGR は LIL3 の蓄積量に応答してその量を変化させているようである (Fig. 19)。

さらに、HPLC によりクロロフィルの蓄積も調べた。line 5、line 11 では、全クロロフィルに対する Chl-phytol の割合が 40%程度までしか回復しなかったのに対し、line 31 では野生型植物と同レベルにまで回復していた (Fig. 20)。

line 5 や line 11 では表現型が完全に回復しなかったにも関わらず、なぜ line 31 では野生型植物と同レベルにまで回復したのか、その理由を詳しく調べるため、BN-PAGE と SDS-PAGE を組み合わせた二次元電気泳動法により、複合体解析を行った。複合体解析の結果、3m 植物では、野生型植物で確認された高分子の LIL3-GGR 複合体が確認されなくなっていた (Fig. 21)。Fig. 21 では line 11 の結果を代表例として載せているが、他の line でも同様の結果が得られている。この結果より、LIL3 と GGR が高分子の複合体を形成することで、GGR が効率的に酵素反応を触媒することができるのではないかと考えられる。そのため、高分子の LIL3-GGR 複合体を形成できない line5、line11 では、GGR の酵素活性が確認できるにもかかわらず、表現型の完全な回復が見

られない。一方、line 31 では高分子の LIL3-GGR 複合体が確認できないにも関わらず、野生型植物と同レベルにまで表現型が回復している。これは、line31 で野生型植物や他の line の倍以上、GGR が蓄積しているためであると考えられる。つまり、line 31 では、GGR は効率的に酵素反応を触媒することはできないが、量が多いため、すべての Chl-GG を Chl-phytol にできているものと推測される (Fig. 19& 20)。

4.6 LIL3 への色素結合の有無

LIL3 に本当に色素が結合しているのか、直接的な証拠を得るために以下の実験を行った。まず、LIL3-FLAG 植物を用いて、FLAG タグを利用した免疫沈降により LIL3-GGR 複合体の精製を行った。免疫沈降後、Native-PAGE の一種である、CN-PAGE により、LIL3-GGR 複合体とコンタミしたその他の複合体を分離した。そこに、青色光を当ててクロロフィルを励起し、蛍光の検出を行った (Fig. 22)。また、同じサンプルを CN-PAGE 後に銀染色することで、LIL3-GGR 複合体が単離できていることを確認した (Fig.22)。

まず、蛍光検出を行った結果を見ると、免疫沈降サンプルを泳動したレーンでは、5 つの蛍光を観察することができる。上から 2 つの赤い星印をつけたバンドが LIL3-GGR 複合体の蛍光バンド。上から 3 つ目の一番明るいバンドがコンタミした LHCII trimer のバンド。4 つ目が同じくコンタミした LHCII monomer のバンド、そして最後が様々なタンパク質を含んだ monomer のバンドである (Fig. 22)。

このうち、上から 2 番目のバンドを切り出し、F-2500 Fluorescence Spectrophotometer (HITACHI)によって、どのような色素を結合しているのか、蛍光スペクトルの解析を行った (Fig. 23)。まず、436nm の光で励起し、蛍光スペクトルの

検出を行ったところ、682nm にクロロフィル a のピークを検出することができた。さらに、検出スペクトルを 680nm に固定し、380nm から 550nm の光で励起し、蛍光スペクトルの検出を行ったところ、435nm にクロロフィル a のピークを、さらに、465nm のあたりにクロロフィル b だと思われるピークを検出することができた。この結果から、LIL3-GGR 複合体にはクロロフィル a と、おそらくクロロフィル b が結合しているものと思われる。

4.7 植物の経時変化に伴う LIL3 の発現量の変化

LIL3 の機能についてより深く知るために、植物の経時変化が LIL3 の発現や phytol の蓄積にどのような影響を与えるのか検証を行った。

シロイヌナズナは LIL3 遺伝子を 2 つ持つ。そこで、*LIL3:1* が欠損した Ds13-3953、と *LIL3:2* が欠損した Ds13-1953、コントロールである親株 (CS 植物) の 3 種類の植物を用いて研究を行った。まず、ポットで生育した植物体の葉を上から順番に切り取ってサンプリングを行った (Fig. 24)。次に、切り取った葉を順番に Immunoblotting 解析 (Fig. 25) と HPLC による色素解析 (Fig. 26 & 27) を行うことによって、経時変化の影響を検証した。

本研究で用いている抗 LIL3 抗体は、LIL3:2 の N 末端 (膜貫通ドメインを含まない) に対する抗体である。しかし、LIL3:1、LIL3:2 の N 末端の配列が非常によく似ていることから、抗 LIL3:2 抗体であるにもかかわらず、LIL3:1 にも反応する (Fig. 28)。それを踏まえて Immunoblotting 解析の結果を見てみると、*LIL3:1* が欠損した Ds13-3953 植物では、葉が老化するにつれ、LIL3 の発現量にも減少が見られた。一方、*LIL3:2* が欠損した Ds13-0193 植物で常に一定量 LIL3 のバンドを検出することができた。また、

どの植物でも GGR の蓄積量は LIL3 の蓄積量と一致しており、LIL3 が GGR の量を制御しているという事実が伺える (Fig. 25)。

さらに、HPLC により chlorophyll および α -tocopherol の解析を行った。まず、コントロールである CS 植物の結果を見ると、どの葉でも蓄積しているクロロフィルはほぼすべて Chl-phytol であった。また α -tocopherol に関しては、若い葉で蓄積量が多く、徐々に減少し、老化した葉で再び蓄積量の増加が見られた。一方、*LIL3:1* が欠損した Ds13-3953 植物、*LIL3:2* が欠損した Ds13-0193 植物ではともに、若い葉で Chl-phytol の割合が 60%~80%割程度と低く、葉の老化と共に Chl-phytol の割合に増加が見られた。また、Chl-phytol の傾向と同じく、 α -tocopherol 含量も若い葉では少なく、葉の老化と共に増加が見られた (Fig. 26 &27)。

5. 考察

5.1 LIL3 の機能解析

本研究により、LIL3 は GGR と複合体を形成し、GGR を安定化していることが明らかとなった。しかしながら、この結果は予期していたものではなかった。なぜなら、prokaryote の GGR は、その活性に他のタンパク質を必要としないからである (Sasaki et al., 2011)。また、植物の GGR であっても *in vitro* で発現させ、酵素活性を測定すると、活性があることがわかっているからである (Keller et al., 1998)。では、なぜ *in vivo* では LIL3 を必要とするのか。この疑問に対してはいくつかの仮説が考えられる。1 つ目の仮説は、LIL3 が GGR と複合体を形成することで、GGR を分解酵素から守っているということである。また、LHC がもつ LHC motif にはクロロフィルを結合する能力があることから、LIL3 が LHC motif を介して GGR に基質を供給しているという可能性も考えられる。この疑問を解決するために、いくつかの形質転換植物を作成し、実験を行った (Fig. 1 & 11)。

まず、C15 植物 (GGR に LIL3 がもつ 2 つの膜貫通ドメインを融合した形質転換植物) や C16 植物 (GGR に APX の膜貫通ドメインを融合した形質転換植物) を用いて、Immunoblotting によるタンパク質の解析と HPLC による色素解析を行った。C15 植物、C16 植物ではともに、内在の LIL3 の蓄積の蓄積がないにもかかわらず、植物体内で GGR の活性を確認することができた (Fig. 12 & 13 & 14 & 15)。さらに、C18 植物 (LIL3 がもつ LHC motif を APX がもつ膜貫通ドメインで置換した形質転換植物) で同様の実験を行ったところ、C18 植物においても GGR の活性を確認することができた

(Fig.16 &17)。これらの結果を合わせて考えると、GGR に膜貫通ドメインを融合した形質転換植物で GGR の蓄積、および GGR の活性を確認することができたことから、LIL3 の主な機能は GGR の膜へのアンカーであると考えられる。また、LIL3 がもつ LHC motif がなくても、植物体内で GGR の活性があることから、LHC motif を介して LIL3 が GGR に基質を供給するなど、LIL3 が GGR の活性に直接的な影響を与えている可能性は極めて低いと思われる。

5.2 イソプレノイド代謝

植物は2つのイソプレノイド代謝経路を持つ。ひとつは細胞質に存在する mevalonate (MVA) 経路、もうひとつは葉緑体に存在する 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) 経路である (Fig. 31)。前者の経路で合成されたイソプレノイドは、主に sesquiterpene (C30) 、triterpene (C15) の合成に利用され、一方、後者の経路で合成されたイソプレノイドは、主に monoterpene (C10) 、diterpene (C20) 、tetraterpene (C40) の合成に利用される (Tholl and Lee, 2011)。

MEP 経路では pyruvate と glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) を基質とし、数段階の反応を経て、isopentenyl pyrophosphate (IPP) が合成される。IPP は IPP isomerase の働きにより、IPP の異性体である dimethylallyl disphosphate (DMAPP) へと変換される。IPP と DMAPP が反応し、geranyl disphosphate (GPP) が生じる。さらに、GPP に IPP が付加されて farnesyl disphosphate (FPP) となり、FPP にもう1つ IPP が付加されると GGPP となる。それぞれの反応は、geranyl disphosphate synthase、farnesyl disphosphate synthase、geranylgeranyl synthase (GGPS) により触媒される (Tholl and Lee, 2011)。

生じた GGPP はカロテノイド合成やジベレリン合成に利用される。カロテノイド合成で GGPP を直接基質とする反応は *phytoen synthase* と呼ばれる酵素によって触媒される (Shumskaya et al., 2012)。この酵素は予測される膜貫通部位を持たず、ストロマ局在または膜表在性と思われる。また、ジベレリン合成で GGPP を直接必要とする反応は *copalyl diphosphate synthase* と呼ばれる酵素によって触媒され、この酵素もまた、予測される膜貫通部位を持たないことからストロマ局在または膜表在性と思われている。

一方、GGPP が GGR により還元されて生じる PPP はクロロフィル合成やトコフェロール合成に使用される。クロロフィル合成において、PPP を直接基質とする反応は、チラコイド膜局在の *chlorophyll synthase* と呼ばれる酵素によって触媒される (Joyard et al., 2009)。また、トコフェロール合成で PPP を直接基質とする反応は *homogentisate phytyltransferase* (HPT または VTE2) と呼ばれる酵素によって触媒される (Collakova and DellaPenna, 2003)。現在のところ、HPT の局在はよくわかっていないが、包膜で HPT の活性があったという報告がある (Soll et al., 1985)。

5.3 イソプレノイド代謝への LIL3 の関与

先で述べた通り、GGR の基質である GGPP はストロマ中で合成される。しかし、GGPP、さらに GGPP が還元されて生じる PPP はともに炭素数 20 の直鎖化合物であり、疎水性が強い。また、葉緑体のプロテオーム解析の結果、GGPP を基質とする酵素がストロマに、PPP を基質とする酵素がチラコイド膜に多く局在する (Joyard et al., 2009) ことが示唆されている。これらの知見から、ストロマ中で合成された GGPP はチラコイド膜表面に近づくと、チラコイド膜に局在している GGR によって還元されて

PPP となり、その局在をストロマからチラコイド膜に移すのではないかと考えた。すなわち、LIL3 が GGR をチラコイド膜に繋ぎ止めることによって、葉緑体内で、GGPP と PPP を基質する場に空間的な違いが生じ、基質特異性の低い酵素でも正しく酵素反応を触媒できるようになっているのではないだろうか。すなわち、LIL3 は、GGR を空間的に制御することによって、葉緑体内のイソプレノイド代謝を制御しているのではないかと考えられる。

5.4 LHC motif の機能

LHC がもつ LHC motif にはクロロフィルが結合している。また、LHC 以外にも、LIL タンパク質のいくつかで色素が結合しているとの報告があり、例えば、光防御に関わるとされる Early light-induced protein (ELIP)にはクロロフィルとルテインが、光化学系の構築に関わるとされる One helix protein (OHP)にはクロロフィル、クロロフィライド、さらにはカロテノイドが結合していると言われている (Fig. 3) (Chidgey et al., 2014; Knoppová et al., 2014; Adamska et al., 1999)。ただし、ELIP や OHP に関しては、結合している色素が LHC motif に結合しているのか、または別の部分に結合しているのかはわかっていない。

他の LIL タンパク質と同様に、LIL3 にも色素が結合しているのかを検証するため、免疫沈降により LIL3-GGR 複合体を精製し、色素を結合しているのか否か実験を行った。その結果、LIL3 にはクロロフィルが結合していることが明らかとなった (Fig.22 &23)。

さらに、代表的な LHC、および LIL タンパク質がもつ LHC motif のアミノ酸配列を比較解析した結果、LIL3:2 がもつ LHC motif のうち、クロロフィルが結合すると推

測されたアミノ酸 (171 番目のグルタミン、174 番目のアスパラギン、189 番目のアスパラギン酸)を別のアミノ酸 (アラニン)に置換した形質転換植物を作成した (Fig.11 &18)。この形質転換植物では、全クロロフィルに占める Chl-phytol、および α -tocopherol の割合が減少した (Fig. 20)。そこで、BN-PAGE と SDS-PAGE を組み合わせた二次元電気泳動により LIL3-GGR 複合体の有無を確認したところ、この形質転換植物では野生型植物で確認される高分子の LIL-GGR 複合体の蓄積が確認されなかった (Fig. 21)。一方で、line 31 のように過剰に GGR が蓄積したラインでは、高分子の LIL3-GGR 複合体が蓄積しなくても、全クロロフィルに対する Chl-phytol の割合は野生型植物と差がみられなかった (Fig. 19 &20)。

これらの事実を合わせて考えると、LIL3-GGR 複合体の最小の構成要素は LIL3 monomer と GGR monomer の複合体である。この最小の複合体は、アミノ酸置換を導入した形質転換植物の二次元電気泳動の結果得られている (Fig. 21)この最小の複合体を構成するためには、LIL3 の N 末端ドメインのみ必要であり、LHC motif は必要としない。そして、LHC motif に結合したクロロフィル、またはその配列自身は、LIL3 同士の複合体形成に重要であり、アミノ酸置換を導入した形質転換植物では、重要なアミノ酸を置換したことが原因で、LIL3 同士の複合体を形成できなくなったのではないかとと思われる。結果として、LIL3 と複合体を形成している GGR も他の GGR と複合体を形成することができなくなった。おそらく GGR は、他の GGR と複合体を形成することで GGPP から PPP への還元反応を効率的に行っているのではないだろうか。例えば、クロロフィル合成に関わる Urogen decarboxylase は同じタンパク質同士で Dimer を作り、さらには、活性部位同士を向かい合わせて基質のやり取りをしながら脱炭酸反応を触媒することで、酵素反応の効率を上げているとの報告がある (Whitby, 1998)。植物

の GGR は結晶構造が明らかになっていないため、GGR がどのような形で複合体を形成しているのかははっきりとはわからないが、もしかすると Urogen decarboxylase のように、活性部位を向かい合わせることで GGPP から PPP への 3 段階の還元反応の効率を上げているのかもしれない。少なくとも、野生型植物ではライン 31 のように過剰に GGR を蓄積させなくても、高分子の複合体を形成することで、GGPP から PPP への還元反応の効率的に行っているようである。

5.6 LHC motif の進化

LHC や LIL タンパク質はすべて、シアノバクテリアがもつ High light-induced protein (HLIP) から進化したと考えられている (Engelken et al., 2010)。HLIP の起源は古く、現在知られている最古のシアノバクテリアである *Gloeobacter* においても保持されている。HLIP は、シアノバクテリアにおいて、すでに機能分化しており、HliC と HliD は光化学系 2 の構築または修復に関与しており、それ以外の Hlip は他の機能をもつと考えられている (Chidgey et al., 2014; Knoppová et al., 2014)。真核型光合成生物が出現した際に、HLIP は最初の内部共生により細胞内に取り込まれ、その後、核ゲノムに移行したとされている。その後、核移行した HLIP の遺伝子は、遺伝子配列の一部分の重複や欠損などによって、緑藻や植物で保存されている OHP1 と、灰色藻、紅色藻、緑藻、植物で保存されている SEP に進化したと考えられる。さらに SEP の一部は緑藻、植物で保存されている ELIP や、紅色藻、緑藻、植物で保存されている LHC に進化したとされる (Fig.30)(Engelken et al., 2010)。

これらの LHC motif をもつタンパク質を比較してみると、その機能は多岐に渡っており、LHC は集光とエネルギー伝達、OHP は光化学系の構築または修復、LIL3 はイ

ソプレノイド代謝、Ferrochelatase 2 (FC2)はヘム合成に関わっている (Fig. 3)。これらのタンパク質に共通する特徴として、LHC motif を有していること、(真核型光合成生物の場合は) チラコイド膜に局在すること、さらに、Dimer などのタンパク質複合体をつくることがあげられる。しかし、膜貫通ドメインの数や予測される機能、タンパク質サイズなどはすべて異なる (Fig. 3)。

本研究や、これまでの報告を合わせて考えると、LHC motif の機能は、光合成色素を結合し、チラコイド膜上で複合体を形成することであると推測される。この仮説を支持するように、5章4節の「LHC motif の機能」でも述べた通り、ELIP や OHP、LIL3、LHC には色素が結合している。また、LHC、FC2、LIL3、ELIP、OHP は自身と複合体を作ることが知られている (Sobotka et al., 2011)、(Takahashi et al., 2014))。進化の過程で広く保存されている LHC motif の機能が、光合成色素を結合し、チラコイド膜上だと聞くと、もしかすると、大したことのない平凡な機能だと思われるかもしれない。しかし、こういったシンプルな機能だからこそ、進化の過程で広く保存され、様々なタンパク質で保持される応用性の高い motif なのかもしれない。

5.7 イソプレノイドの再利用

植物の経時変化に伴う LIL3 と GGR の蓄積量、および色素組成の変化を調べた。*LIL3* の一重変異体の結果を見てみると、LIL3:1 は葉のエイジにかかわらず、常に一定量植物体内に蓄積していることが明らかとなった (Fig. 25)。一方、LIL3:2 は葉の老化が進むにつれて蓄積量が大きく減少していた。また、GGR の蓄積量は *lil3:1* 変異体、および、*lil3:2* 変異体のどちらにおいても、それぞれ、LIL3 と同様の変化を示した。この結果は、GGR の蓄積量が LIL3:1 と LIL3:2 をあわせた LIL3 全体の蓄積量によって決

まっていることを示している。

GGR は GGPP から PPP への還元反応を触媒する酵素である。一見、GGR の蓄積量の多い若い葉で、Chl-phytol および α -tocopherol の蓄積量が多いように思われる。しかし、*LIL3* の一重変異体の結果を見てみると、実際には、若い葉ほど全クロロフィルに対する Chl-phytol の割合、および α -tocopherol の蓄積量は少なく、葉が老化するに従って増加する (Fig. 25)。これは、葉緑体内に phytol の salvage pathway (後述) が存在するためだと考えられる (Fig. 31)(Ischebeck et al., 2006; Valentin et al., 2006; Dorp et al., 2015)。クロロフィルは必要がなくなると pheophorbide と phytol に分解される。pheophorbide はそのままでは植物にとって有害なため、いくつかの酵素反応を経て無害な物質へと分解される。一方、phytol は phytol kinase (VTE5)、phytol-phosphate kinase (VTE6)によってリン酸化され、再び PPP となる (Valentin et al., 2006; Ischebeck et al., 2006; Dorp et al., 2015)。生じた PPP はクロロフィル合成、および、トコフェロール合成に利用される。このように、クロロフィル分解で生じた phytol が再びリン酸化され、再利用される経路を phytol の salvage pathway と呼ぶ。この経路を念頭に、経時変化にともなう *LIL3*、GGR の発現量の変化、および、全クロロフィルに対する Chl-phytol の割合、 α -tocopherol の蓄積量の変化を考えると、おそらく、*LIL3* の一重変異体では、GGR の蓄積量が十分ではないため、GGPP から PPP への還元量が少なく、若い葉で Chl-phytol の割合が少ないのだと推測される。しかし、時間の経過とともに、クロロフィルの分解と合成を繰り返すうちに、植物体内に十分な量の PPP が蓄積し、老化した葉では Chl-phytol の割合が増加するのではないだろうか。また、 α -tocopherol も同様に、若い葉では少ないが、葉の老化とともに PPP の割合が増加し、 α -tocopherol もまた増加する。この結果は、PPP の量がトコフェロ

ール合成と Chl-phytol 合成を律速しており、PPP の量が葉のエイジとともに増加するという仮説を支持している。

5.8 まとめ

本研究では、LIL3 というイソプレノイド代謝に関わる新たな制御タンパク質について解析を行った。

LIL3 は、GGR という GGPP から PPP への還元反応を触媒する酵素と複合体を形成しており、複合体を形成することで GGR が効率的に酵素反応を触媒できるように制御していた。また、LHC および LIL タンパク質間で保持されている LHC motif は、色素結合能力を有し、チラコイド膜上で複合体を形成させる機能があることが明らかとなった。

6. 図

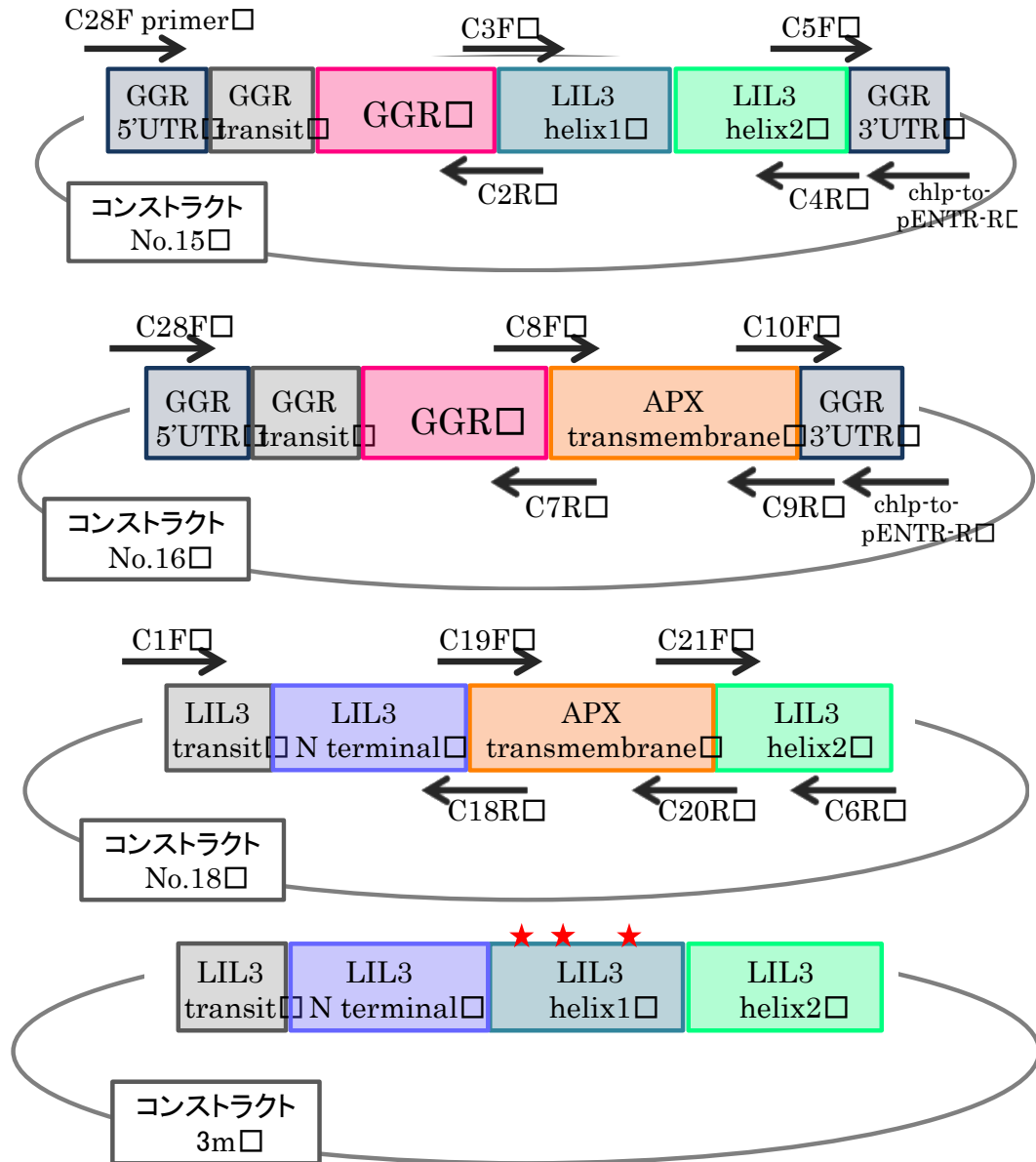


Fig. 1 実験に使用したコンストラクト一覧

実験に使用したコンストラクトの概略図、および、コンストラクト作成に用いたプライマー名を示した。プライマーの配列は Fig. 2 を参照。また、赤い星印は、LIL3 がもつ LHC motif にアミノ酸置換を入れたことを示している。アミノ酸置換の詳細な位置は Fig. 17 を参照。

プライマー名	配列
C1F	AACCAATTCAGTCGACATGTCTATATCCATGGCGTTA
C2R	TTGAGAAGTTCAGCTTCAGGTAGAACACTAAGCTTCTCAATCTCT
C3F	AGAGATTGAGAAGCTTAGTGTTCTACCTGAAGCTGAACTTCTCAA
C4R	ATAGACCTCATTATTTGTTTCTTACTTCTTTGAAGAACTGTTGATGAA
C5F	TTCATCAACAGTTTCTTCAAAGAAGTAAGAAACAAATAATGAGGTCTATCT
C6R	AAGAAAGCTGGGTCTAGATATCTCACTTCTTTGAAGAACTGTT
C7F	TTTTTCATCGAATCCGAAAGCTCAACACTAAGCTTCTCAATCTCT
C8R	AGAGATTGAGAAGCTTAGTGTTGAGCTTTCGGATTTCGATGAA
C9F	ATAGACCTCATTATTTGTTTCTTAGAAACCAGAGAAATCGGAGTT
C10R	TAACAACTCCGATTTCTCTGGTTTCTAAGAAACAAATAATGAGGTCTATct
C18R	TTCTTTTTCATCGAATCCGAAAGCTCATGGTATCTCTTCATCCATGCCCA
C19F	GCATGGATGAAGAGATACCATGAGCTTTCGGATTTCGATGAAAAAGAA
C20R	TGTTTTGCAGAAGAAATTTCCCATGAAACCAGAGAAATCGGAGTTGTT
C21F	TAACAACTCCGATTTCTCTGGTTTCATGGGAAATTTCTTCTGCAAA
C28F	AACCAATTCAGTCGACACAAACTCAAAACACAGAGAA
chlp_to_pENTR4_R	AAGCTGGGTCTAGATATCGATTGTAAAGCCAAATGCTTTTTGA

Fig. 2 コンストラクト作成に用いたプライマーの配列一覧

遺伝子番号	Janssonらの名称	Adamskaらの名称	本論文で用いる名称	予測機能	光合成色素の結合
AT3G22840	LIL1	ELIP	ELIP	光防御？	クロロフィルa、ルテイン
AT5G02120	LIL2	OHP1	OHP1	光化学系の構築 or修復	クロロフィルa、クロロフィライドa、カロテノイド
AT4G17600	LIL3:1	SEP3:1	LIL3:1	イソプレノイド代謝	クロロフィルa、プロトクロロフィライドa
AT5G47110	LIL3:2	SEP3:2	LIL3:2	イソプレノイド代謝	クロロフィルa、プロトクロロフィライドa
AT4G34190	LIL4	SEP1	SEP1	光防御？	？
AT2G21970	LIL5	SEP2	SEP2	光防御？	？
AT1G34000	LIL6	OHP2	OHP2	光化学系の構築 or修復	クロロフィルa、クロロフィライドa、カロテノイド

Fig. 3 主な LIL タンパク質一覧

多くの LIL タンパク質は、機能が明らかになっていないこと、また、系統関係が確定していないことから複数の名前では呼ばれている。一般的には、Jansson らの命名法、または、Adamska らの命名法に従って呼ばれることが多い。混乱を避けるために、本論文中で用いる名称と、Jansson ら (Jansson, 1999) と Adamska ら (Engelken et al, 2010) の名称、遺伝子番号、さらには予測される機能、色素結合の有無を図に示した。

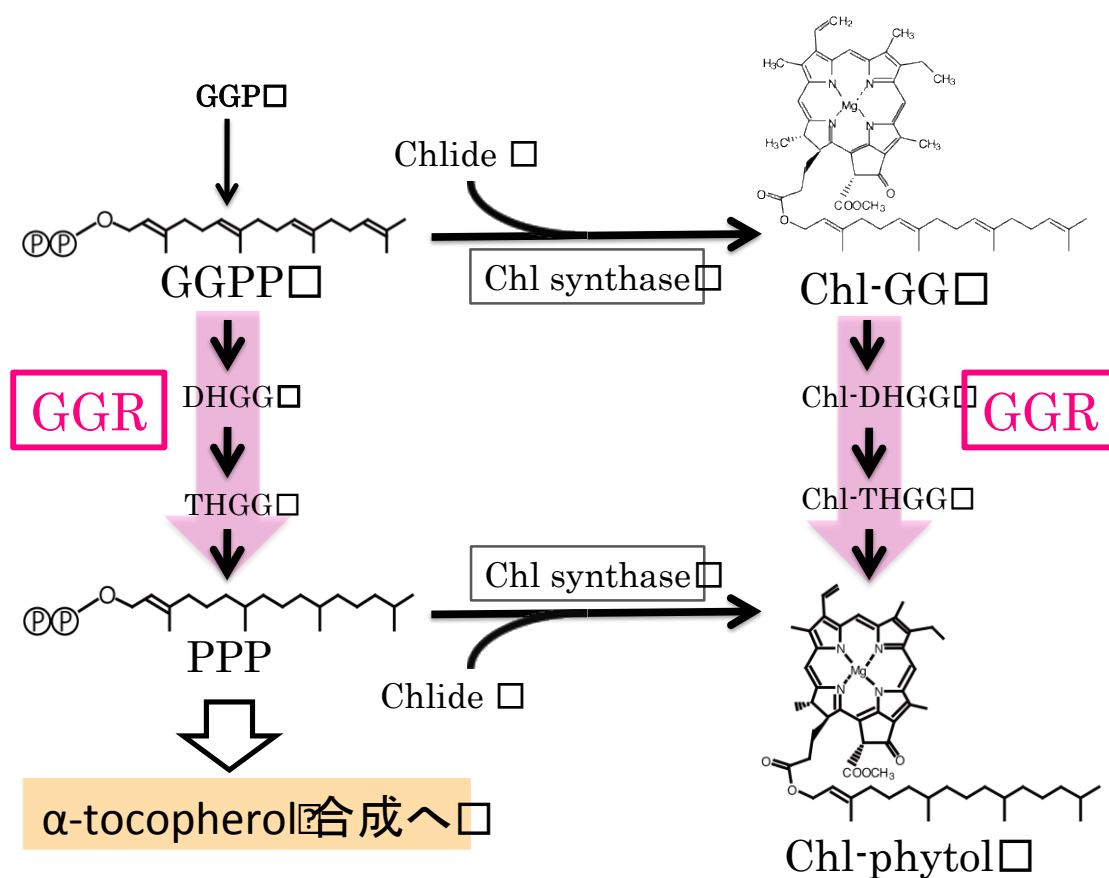


Fig. 4 GGR の代謝経路

GGR は GGPP から PPP へ 3 段階の還元反応、および、Chl-GG から Chl-phytol への 3 段階の還元反応を触媒する。また、還元されて生じた PPP はクロロフィル合成、またはトコフェロール合成に利用される。

GGR: geranylgeranyl reductase、Chl synthase: chlorophyll synthase、Chlide: monovinyl chlorophyllide、GGPP: geranylgeranyl diphosphate、DHGG: dihydrogeranylgeranyl diphosphate、THGG: tetrahydrogeranylgeranyl diphosphate、PPP: phytol diphosphate、Chl-GG: geranylgeranylated chlorophyll、Chl-DHGG: dihydrogeranylgeranylated chlorophyll、Chl-THGG: tetrahydrogeranylgeranylated chlorophyll、Chl-phytol: phytolated chlorophyll

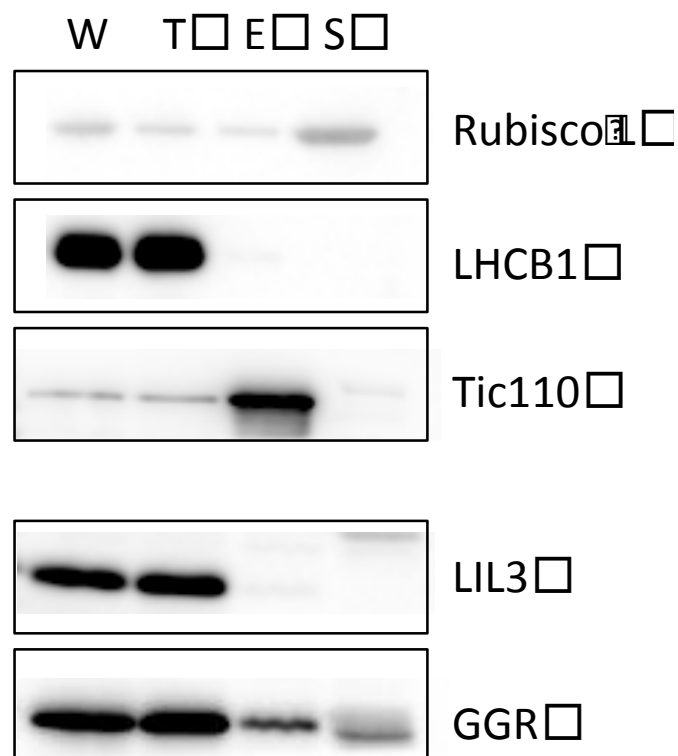


Fig. 5 LIL3 および GGR の局在解析

各レーンにタンパク質を 10 μ g ずつロードし、SDS-PAGE を行った。その後、各種抗体を用いて Immunoblotting によりタンパク質の検出を行った。ただし Rubisco と LHCB1.1 の検出にはタンパク質を 2 μ g ずつロードした。

W: 密度勾配超遠心をする前のサンプル、T: Thylakoid 画分、E: Envelope 画分、S: Stroma 画分

Rubisco L: ストロマ局在 Rubisco Large subunit 抗体、

LHCB1: チラコイド膜局在 Light-harvesting chlorophyll binding protein for PSII type 1 抗体、

Tic110: 包膜局在タンパク質輸送複合体のサブユニット抗体

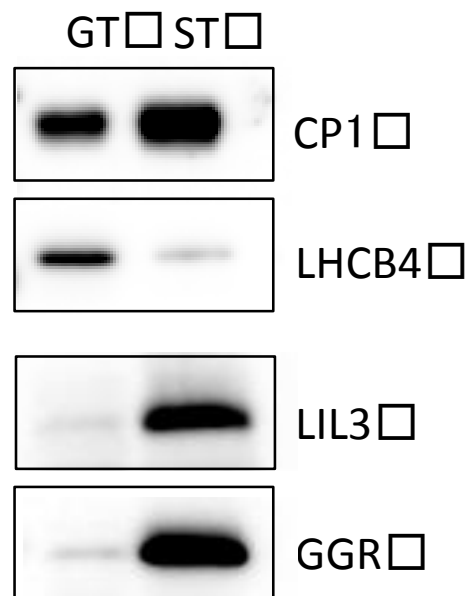


Fig. 6 LIL3 および GGR の局在解析

各レーンにタンパク質を 10 μ g ずつロードし、SDS-PAGE を行った。その後、各種抗体を用いて Immunoblotting によりタンパク質の検出を行った。ただし LHCB4 と CP1 の検出には、それぞれタンパク質を 0.5 μ g、0.1 μ g ずつロードした。

GT: Granathylakoid 画分、ST: Stromathylakoid 画分

AT1G74470 [Arabidopsis thaliana_thylakoid_2] [normal](#)

max100%



symbols :

description :Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein

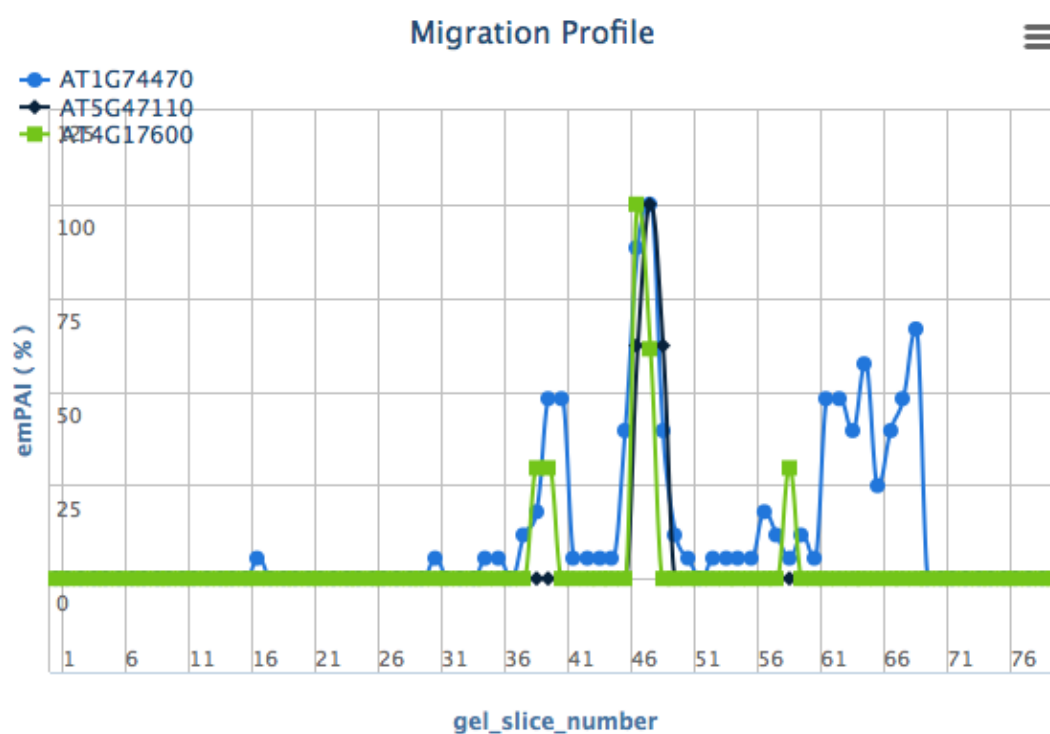


Fig. 7 LIL3 および GGR の複合体解析

当研究室が作成したタンパク質複合体解析データベースである PCoM-DB を用いて、LIL3 および GGR の複合体解析を行った結果。縦軸が emPAI 値。横軸がゲルのスライズナンバーで、数字が小さい方が高分子である。青の折れ線グラフが GGR (AT1G74470)、黒の折れ線グラフが LIL3:2 (AT5G47110)、黄緑の折れ線グラフが LIL3:1 (AT4G17600)を示している。

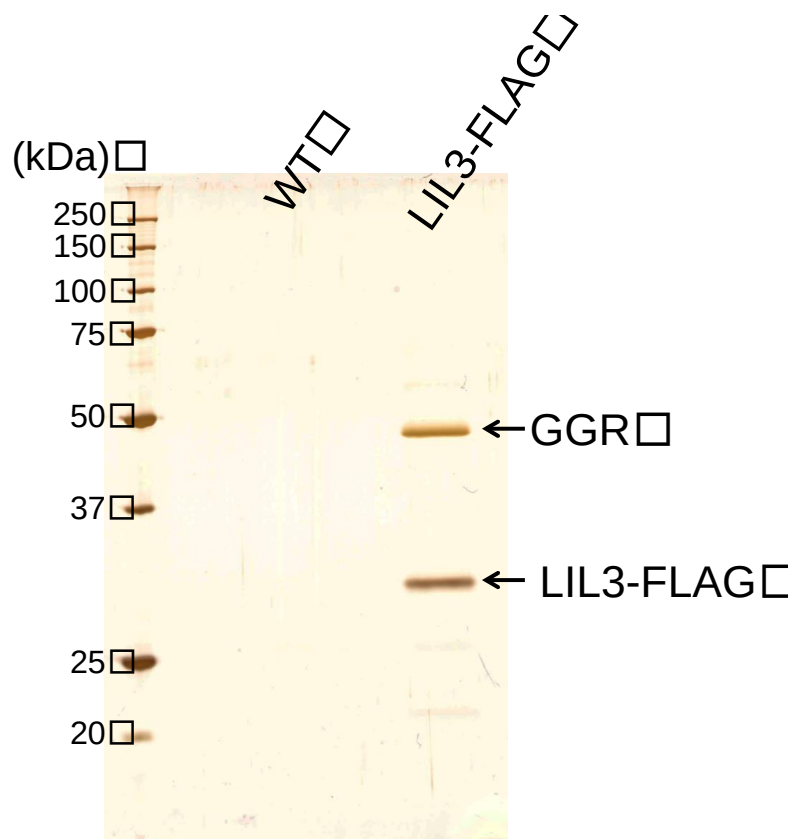


Fig. 8 免疫沈降による複合体解析 (SDS-PAGE)

野生型植物、LIL3-FLAG 植物からそれぞれタンパク質を抽出後、免疫沈降によって LIL3-FLAG タンパク質を含む複合体を精製し、SDS-PAGE を行った。その後、銀染色によりタンパク質の検出を行った。矢印は、それぞれ GGR のバンド、LIL3 に FLAG タグが融合したバンドである。

WT: 野生型植物 (ネガティブコントロール)、LIL3-FLAG: LIL3:2 の C 末端に FLAG タグを融合した形質転換植物。 *lil3:2* 一重変異体バックグラウンド。

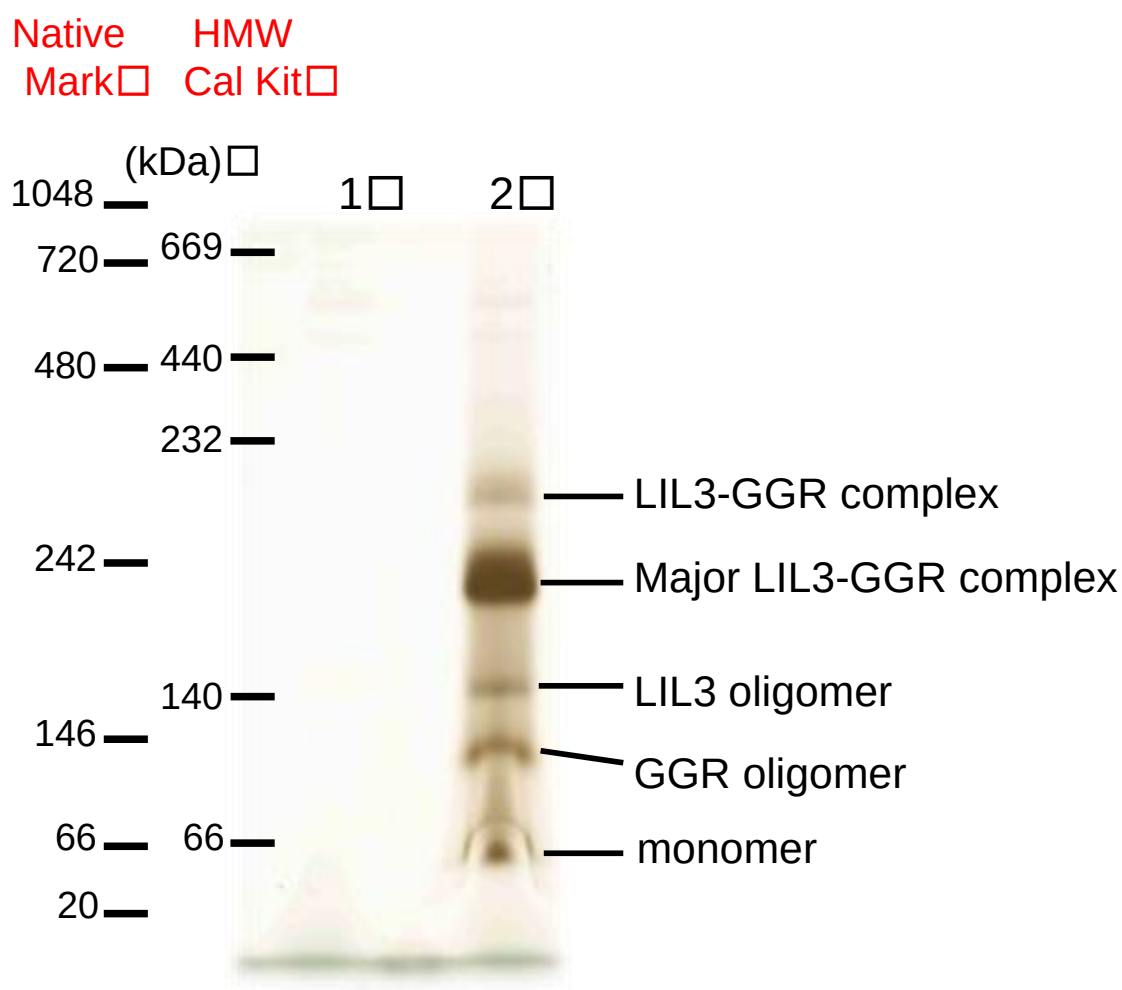


Fig. 9 免疫沈降による複合体解析 (BN-PAGE)

野生型植物、LIL3-FLAG 植物からそれぞれタンパク質を抽出後、免疫沈降によって LIL3-FLAG タンパク質を含む複合体を精製し、BN-PAGE を意地張った。その後、銀線色によりタンパク質の検出を行った。矢印はそれぞれ LIL3-FLAG 植物に特異的なバンドであり、推測される複合体組成を示した。また、BN-PAGE には 2 種類のマーカーを用いており、Native Mark (Invitrogen) と HMW Calibration Kit (GE Healthcare) である。

- 1: 野生型植物 (ネガティブコントロール)、
- 2: LIL3:2 の C 末端に FLAG タグを融合した形質転換植物。 *lil3;2* 一重変異体バックグラウンド。

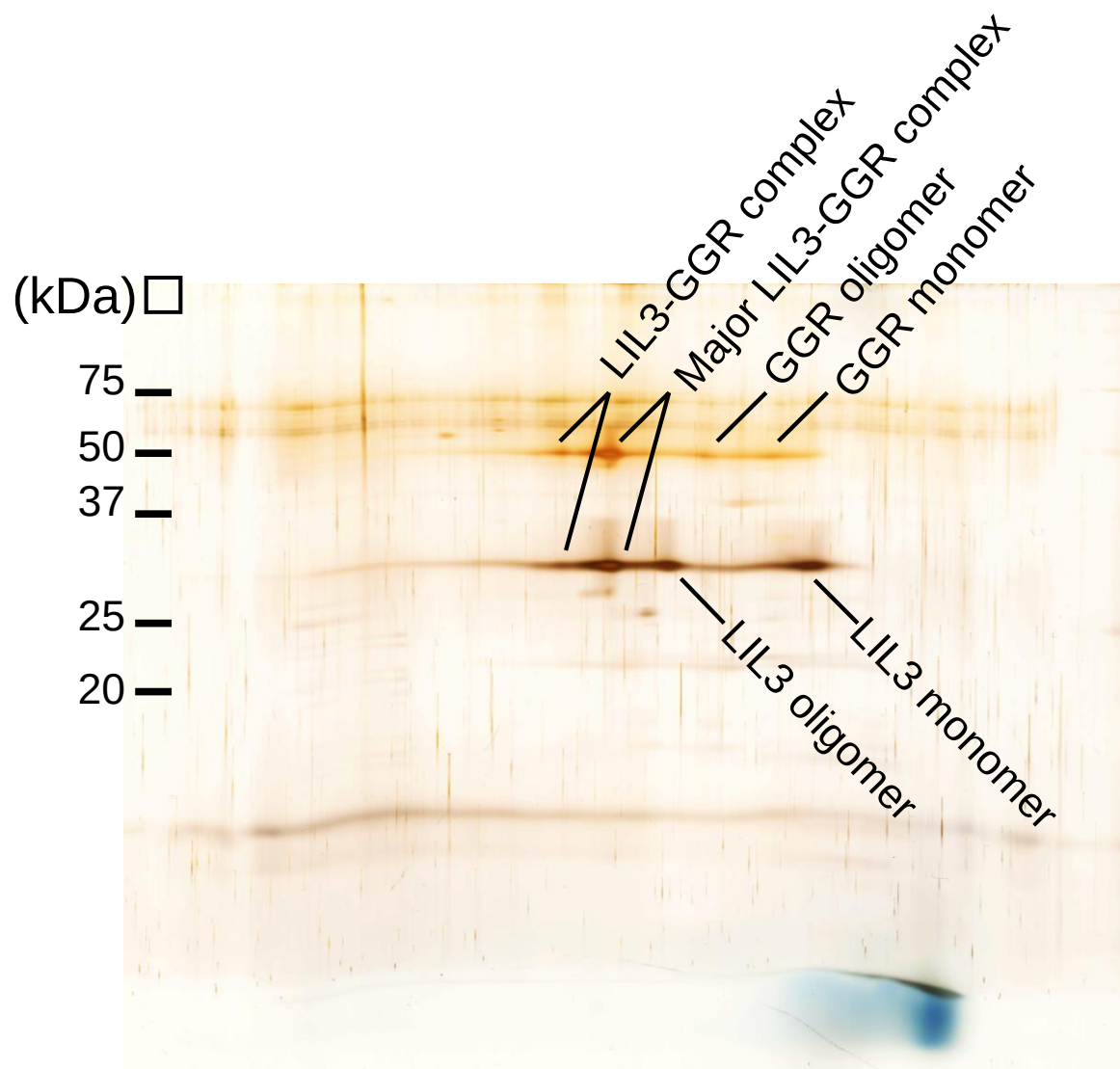


Fig. 10 免疫沈降による複合体解析（二次元電気泳動）

LIL3-FLAG 植物からタンパク質を抽出後、免疫沈降によって LIL3-FLAG タンパク質を含む複合体を精製し、BN-PAGE と SDS-PAGE を組み合わせた二次元電気泳動を行った。その後、銀染色によりタンパク質の検出を行った。LIL3-GGR 複合体の推測される複合体組成を示した。

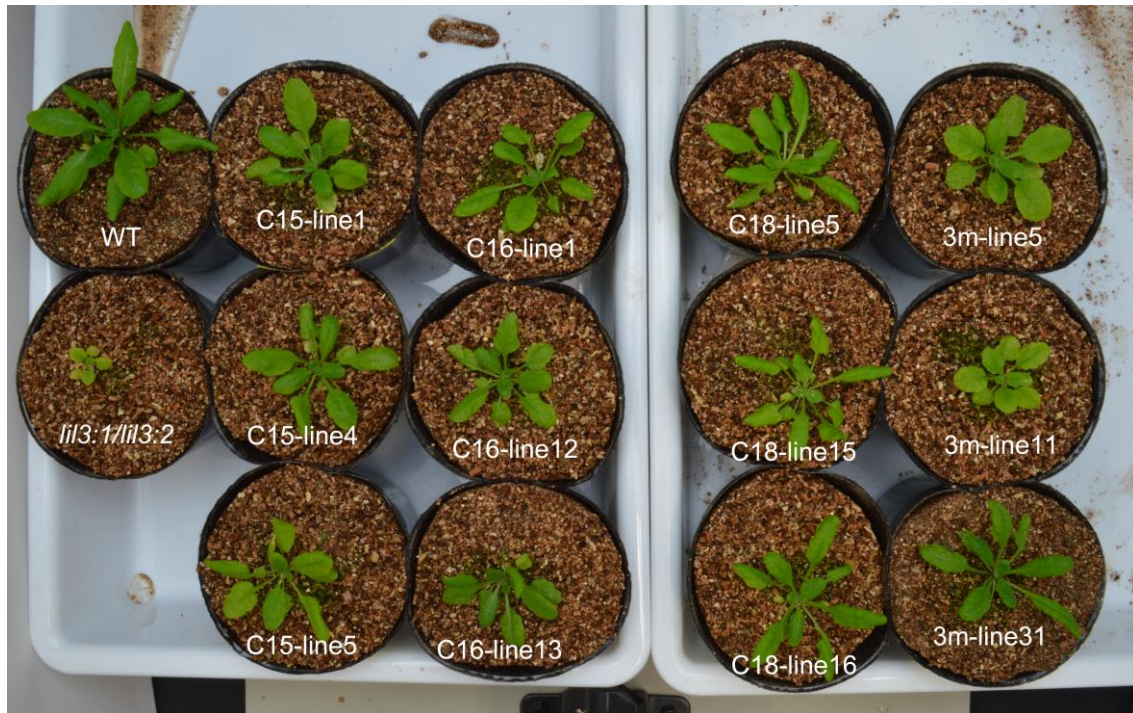


Fig.11 形質転換植物の写真

WT: 野生型植物、

C15: GGR に LIL3 がもつ二つの膜貫通ドメインを融合した形質転換植物、

C16: GGR に APX がもつ膜貫通ドメインを融合した形質転換植物、

C18: LIL3 がもつ LHC motif を APX の膜貫通ドメインと置換した形質転換植物、

3m: LIL3 がもつ LHC motif の保存されている 3つのアミノ酸をアラニンに置換した形質転換植物

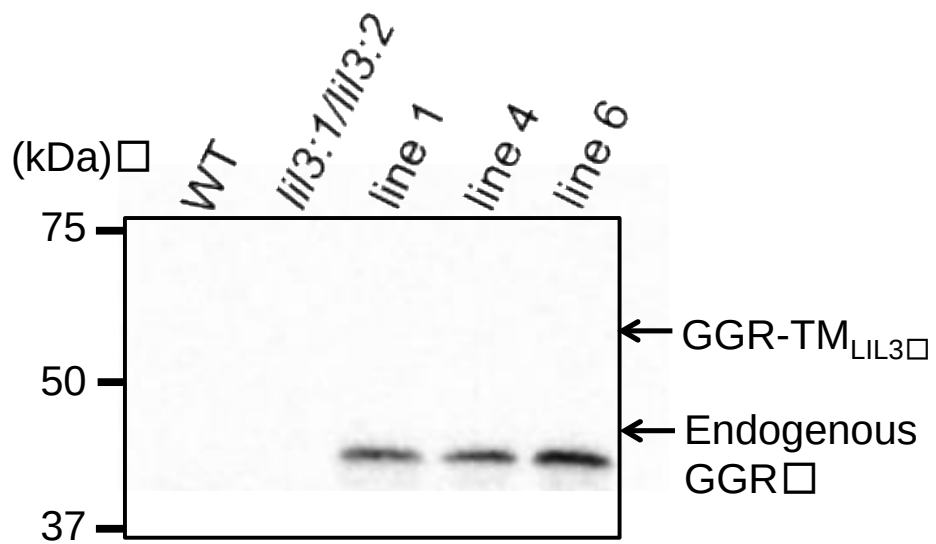


Fig. 12 コンストラクト 15 の結果 (SDS-PAGE)

各レーンにタンパク質抽出液を 10 μ l ずつロードし、SDS-PAGE を行った。その後、抗 GGR 抗体を用いてタンパク質の検出を行った。

WT: 野生型植物、

line 1、4、6: GGR に LIL3 がもつ二つの膜貫通ドメインを融合した形質転換植物 (C15 植物)、

GGR-TM_{LIL3}: LIL3 の膜貫通ドメインが融合した GGR のバンド

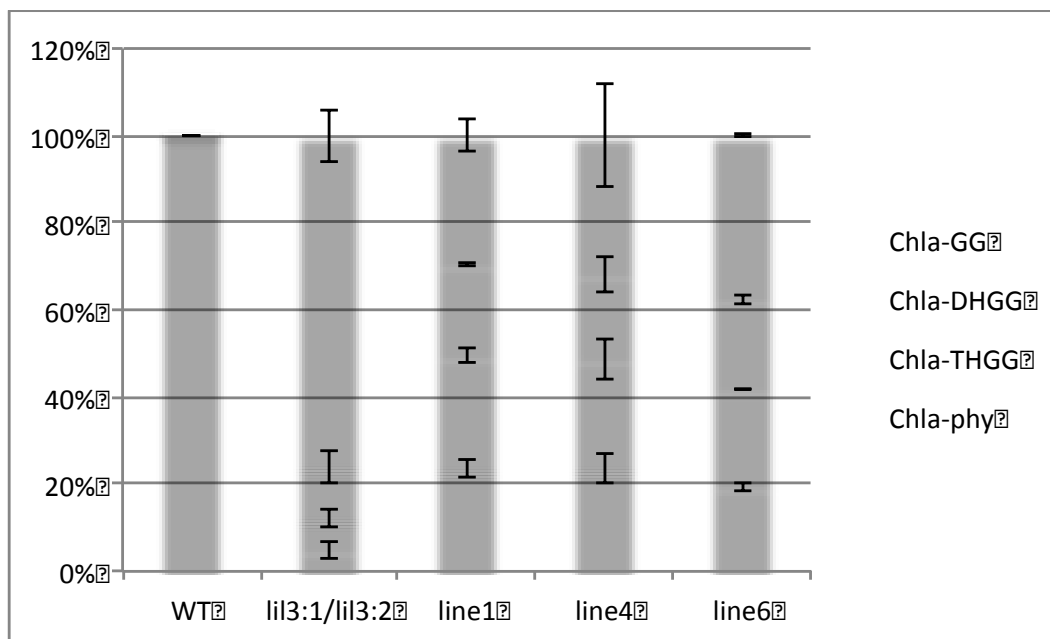


Fig. 13 コンストラクト 15 の結果 (HPLC)

植物体の全クロロフィルを 100%とし、全クロロフィルに対する各種クロロフィルの割合を棒グラフで示した。

WT: 野生型植物、

line 1、4、6: GGR に LIL3 がもつ二つの膜貫通ドメインを融合した形質転換植物 (C15 植物)

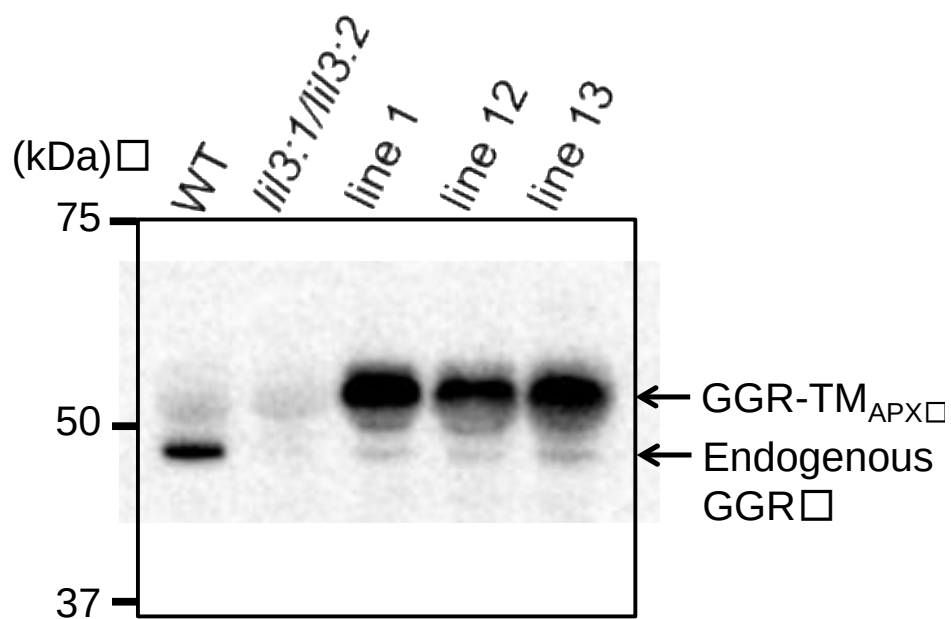


Fig. 14 コンストラクト 16 の結果 (SDS-PAGE)

各レーンにタンパク質抽出液を 10 μ l ずつロードし、SDS-PAGE を行った。その後、抗 GGR 抗体を用いてタンパク質の検出を行った。

WT: 野生型植物、

line 1、12、13: GGR に APX がもつ膜貫通ドメインを融合した形質転換植物 (C16 植物)、

GGR-TM_{APX}: APX の膜貫通ドメインが融合した GGR のバンド

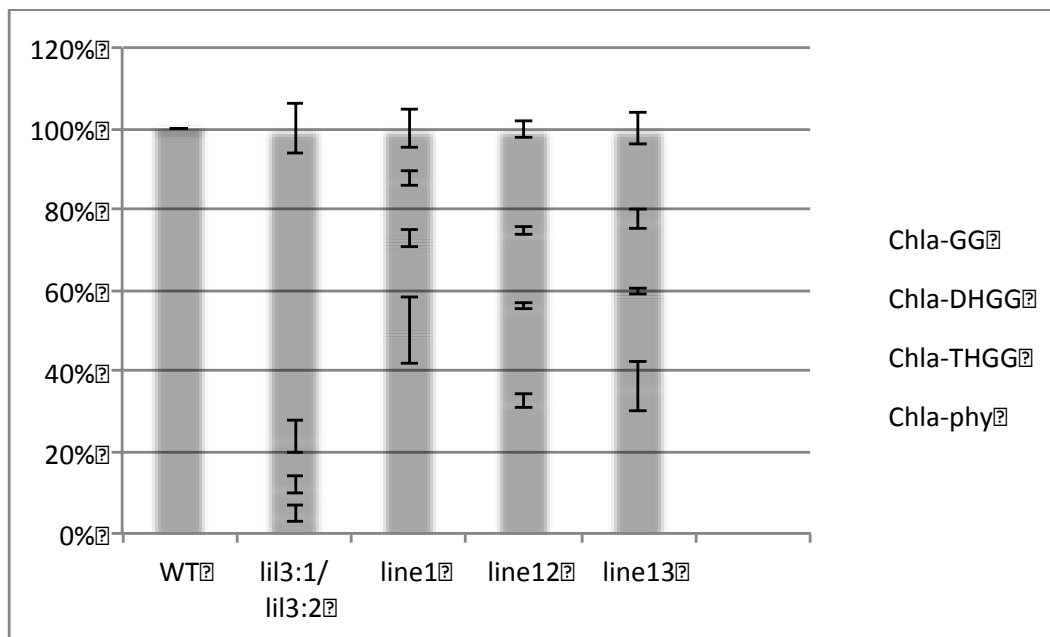


Fig. 15 コンストラクト 16 の結果 (HPLC)

植物体の全クロロフィルを 100%とし、全クロロフィルに対する各種クロロフィルの割合を棒グラフで示した。

WT: 野生型植物、

line 1、12、13: GGR に APX がもつ膜貫通ドメインを融合した形質転換植物 (C16 植物)

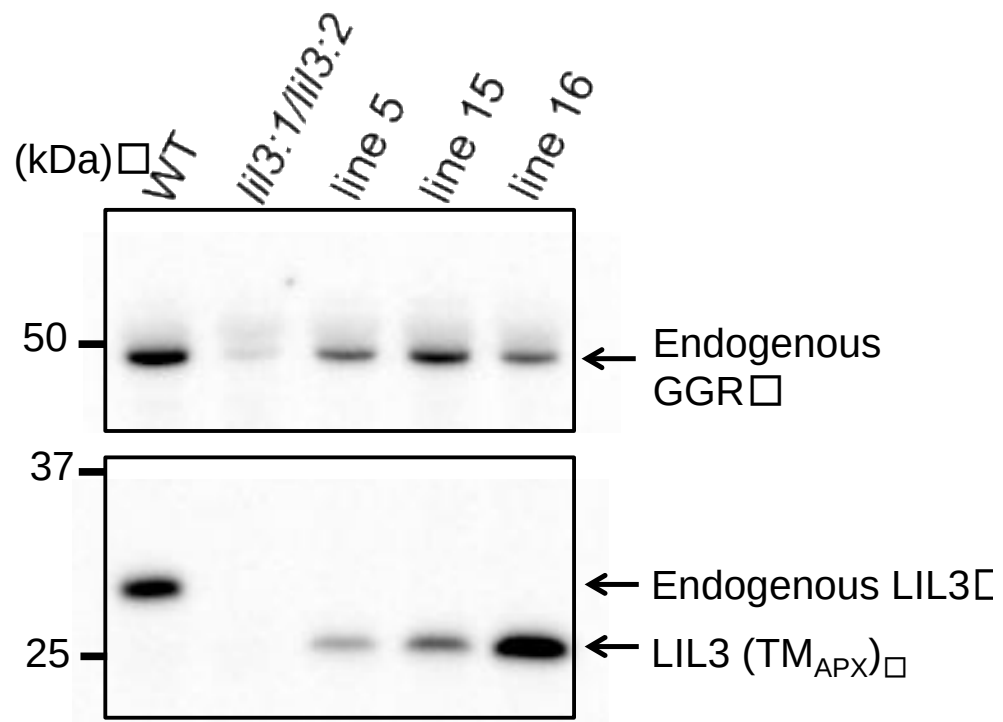


Fig. 16 コンストラクト 18 の結果 (SDS-PAGE)

各レーンにタンパク質抽出液を 10 μ l ずつロードし、SDS-PAGE を行った。その後、抗 GGR 抗体、抗 LIL3 抗体を用いてタンパク質の検出を行った。

WT: 野生型植物、

line 5、15、16: LIL3 がもつ LHC motif を APX の膜貫通ドメインと置換した形質転換植物 (C18 植物)、

LIL3 (TMAPX): LHC motif を APX の膜貫通ドメインと置換した LIL3 のバンド

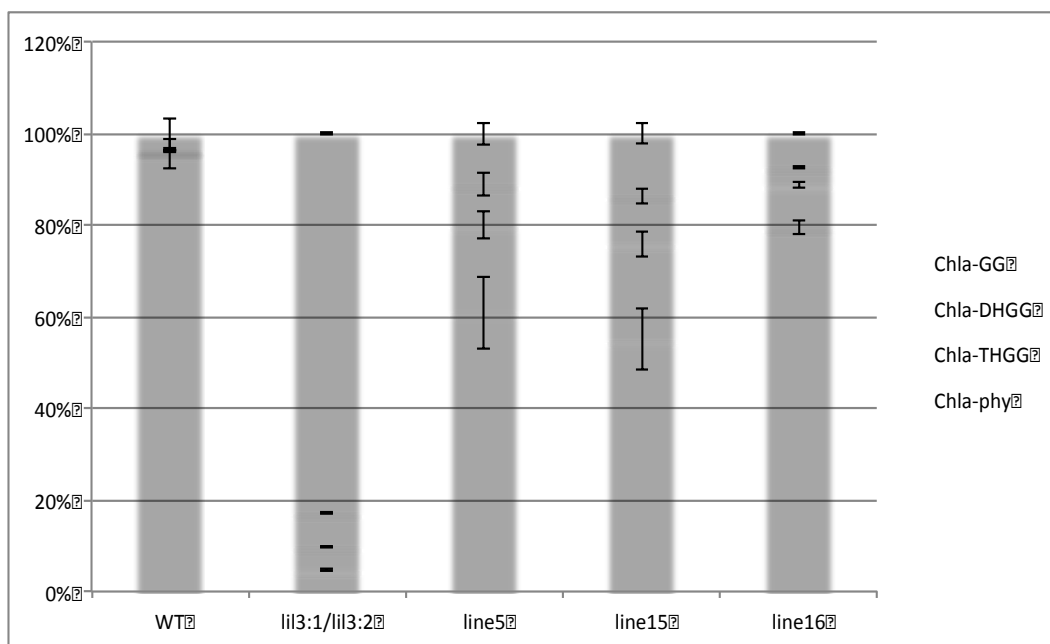


Fig. 17 コンストラクト 18 の結果 (HPLC)

植物体の全クロロフィルを 100%とし、全クロロフィルに対する各種クロロフィルの割合を棒グラフで示した。

WT: 野生型植物、

line 5、15、16: LIL3 がもつ LHC motif を APX の膜貫通ドメインと置換した形質転換植物 (C18 植物)

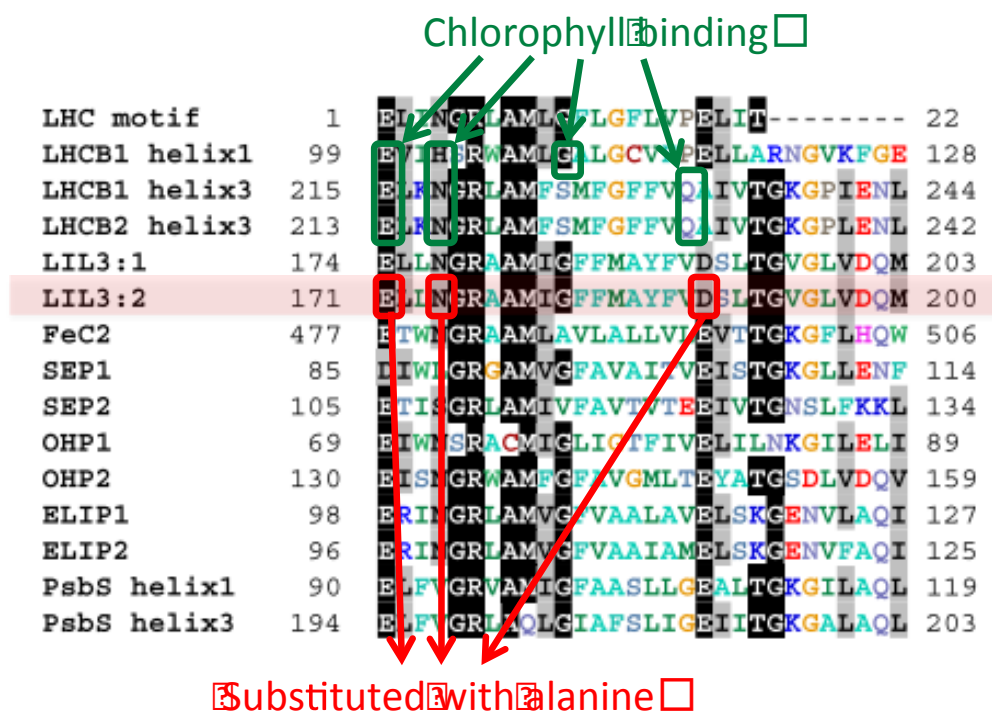


Fig. 18 主な LHC および LIL タンパク質がもつ LHC motif のアミノ酸配列

LHC がもつ LHC motif のうち、2009 年の Barros と Kühlbrandt らの論文中でクロロフィルが結合すると言われているアミノ酸を緑の矢印で示した。また、代表的な LHC motif のアミノ酸配列を比較した結果、LIL3:2 がもつ LHC motif の中でクロロフィルが結合すると推定された二つのアミノ酸と、正に電化しておりクロロフィルが相互作用できるのではないかと推定されたアミノ酸を赤い矢印で示した。これら 3 つのアミノ酸をアラニンに置換した。

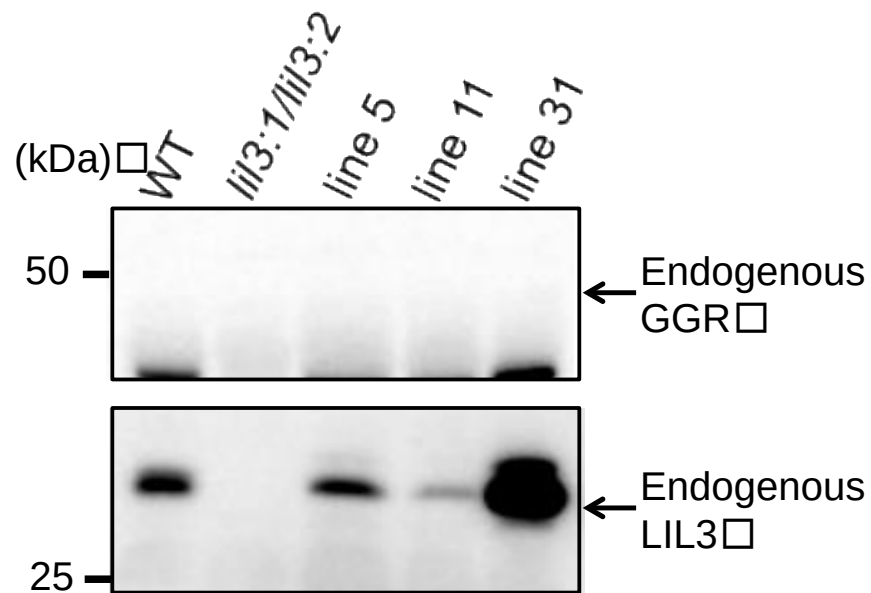


Fig. 19 コンストラクト 3m の結果 (SDS-PAGE)

各レーンにタンパク質抽出液を 10 μ l ずつロードし、SDS-PAGE を行った。その後、抗 GGR 抗体、抗 LIL3 抗体を用いてタンパク質の検出を行った。

WT: 野生型植物、

line 5、11、31: LIL3 がもつ LHC motif の保存されている 3 つのアミノ酸をアラニンに置換した形質転換植物 (3m 植物)

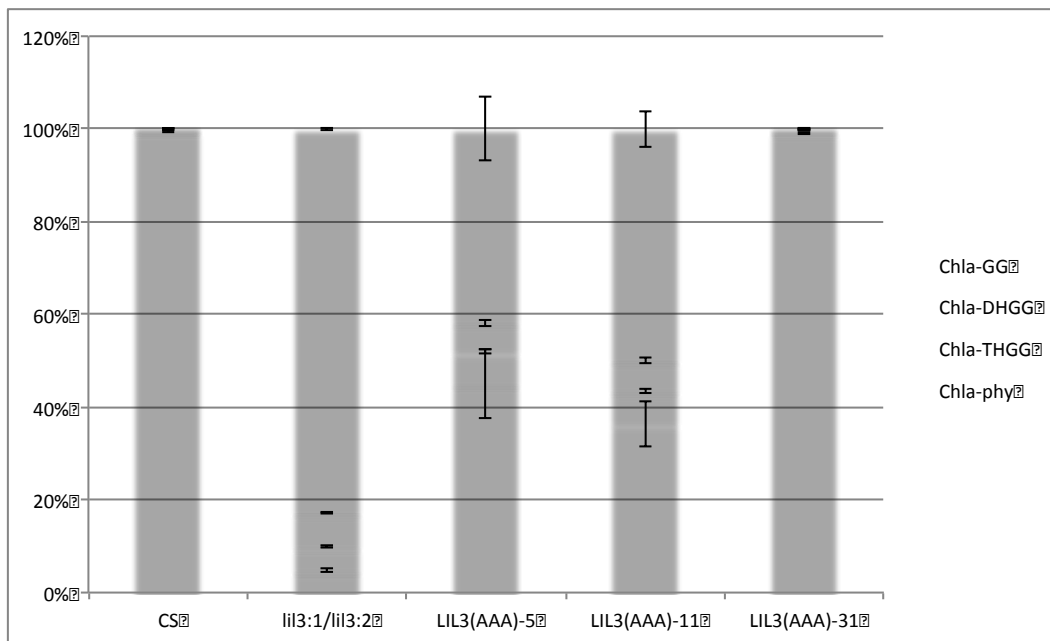


Fig. 20 コンストラクト 3m の結果 (HPLC)

植物体の全クロロフィルを 100%とし、全クロロフィルに対する各種クロロフィルの割合を棒グラフで示した。

WT: 野生型植物、

line 5、11、31: LIL3 がもつ LHC motif の保存されている 3 つのアミノ酸をアラニンに置換した形質転換植物 (3m 植物)

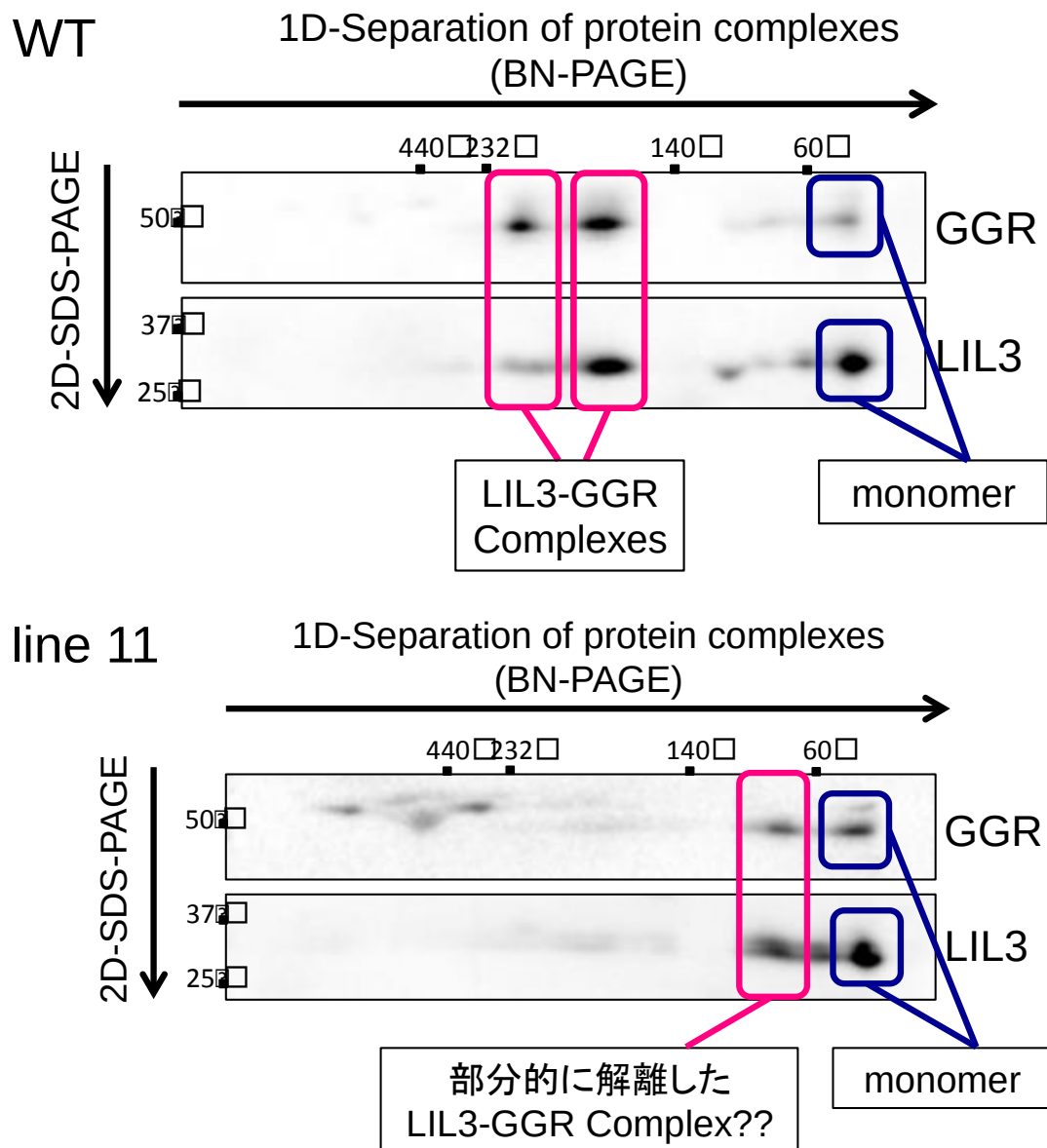


Fig. 21 二次元電気泳動 (BN-PAGE/SDS-PAGE)による複合体解析

チラコイド膜を α DM で可溶化後、二次元電気泳動を行い、抗 GGR 抗体、抗 LIL3 抗体を用いてタンパク質の検出を行った。

WT: 野生型植物、

line 11: LIL3 がもつ LHC motif の保存されている 3 つのアミノ酸をアラニンに置換した形質転換植物

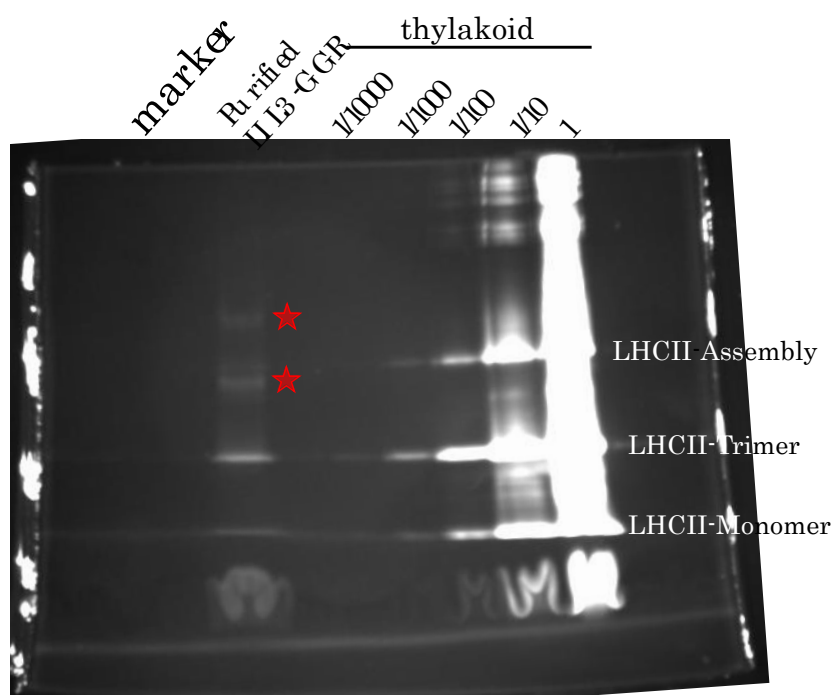
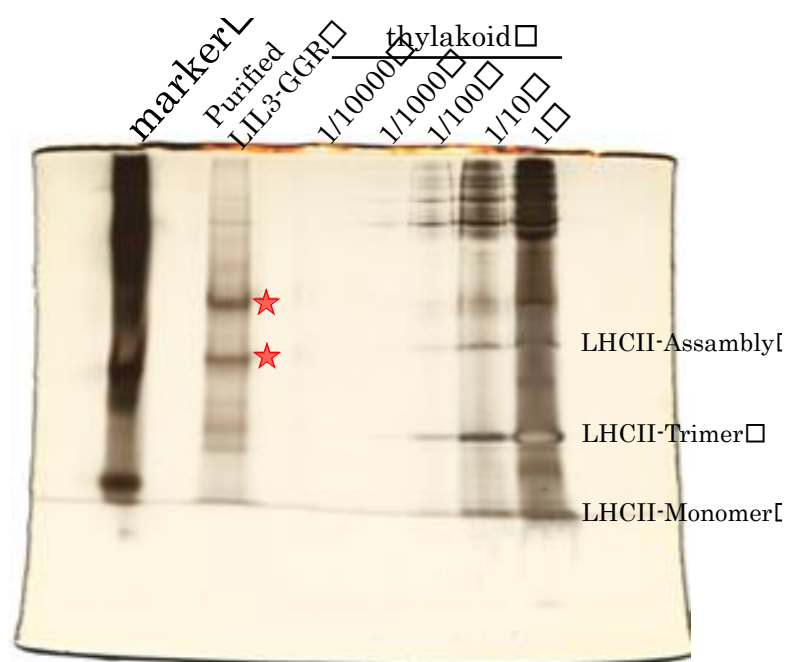


Fig. 22 LIL3-GGR 複合体の蛍光観察

LIL3-FLAG 植物を用いて免疫沈降を行い、その後、CN-PAGE を行うことで LIL3-GGR 複合体の単離・精製を試みた。上の図が銀染色の結果、下の図が蛍光観察の結果である。どちらの図も同じゲルの結果である。LIL3-GGR 複合体を赤い星印で示した。

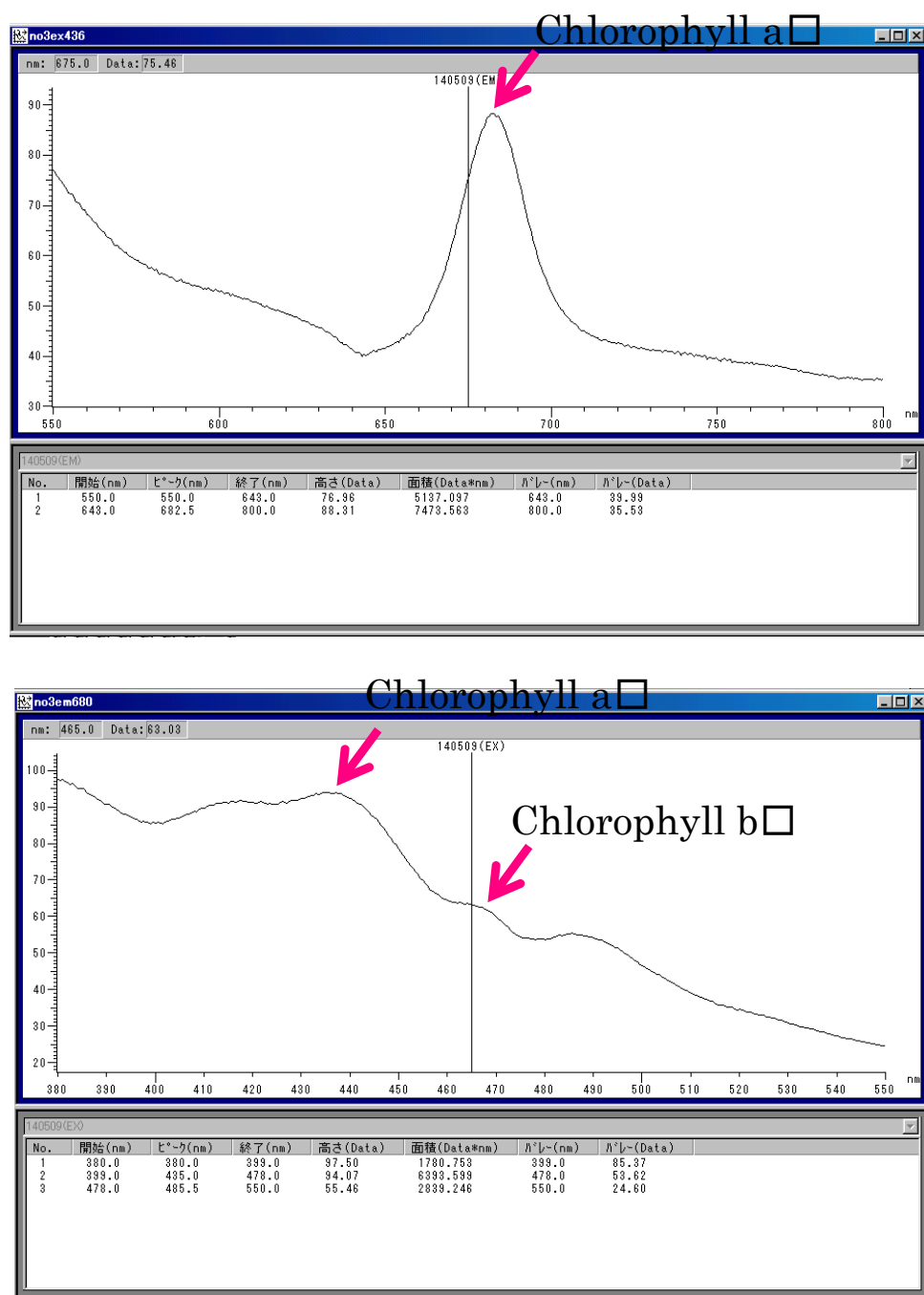


Fig. 23 LIL3-GGR 複合体での蛍光スペクトルの測定結果

Fig. 21 の上から 2 番目の LIL3-GGR 複合体のバンドを切り出し、蛍光スペクトルの測定を行った。上のグラフが 436nm の光で励起し、蛍光スペクトルを検出した結果。下のグラフが、680nm に検出のスペクトルを固定し、380nm から 550nm の光で励起した結果。

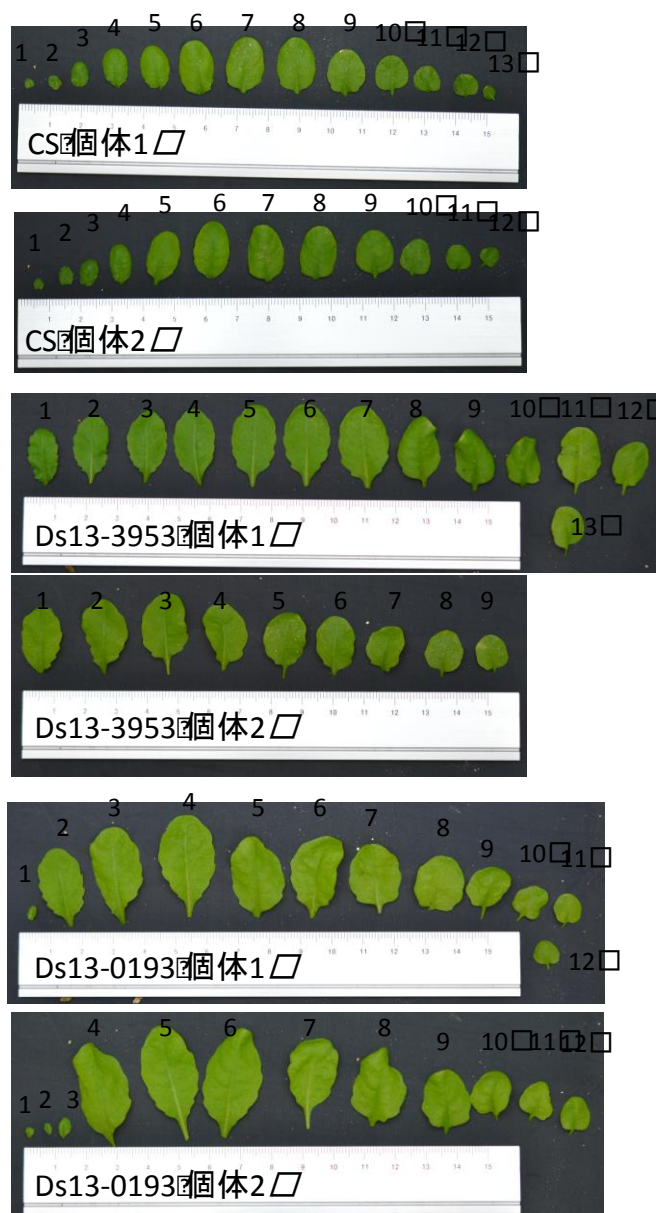


Fig. 24 経時変化の実験に用いた植物サンプルの写真

植物の葉を若い順に上から切り取りサンプリングした結果。数字が小さいほど上の若い葉である。

CS: コントロール植物、

Ds13-3953: *lil3;1* の 1 つ目のエキソンにトランスポゾンが挿入されているライン、

Ds13-0193: *lil3;2* の 3 つ目のエキソンにトランスポゾンが挿入されているライン

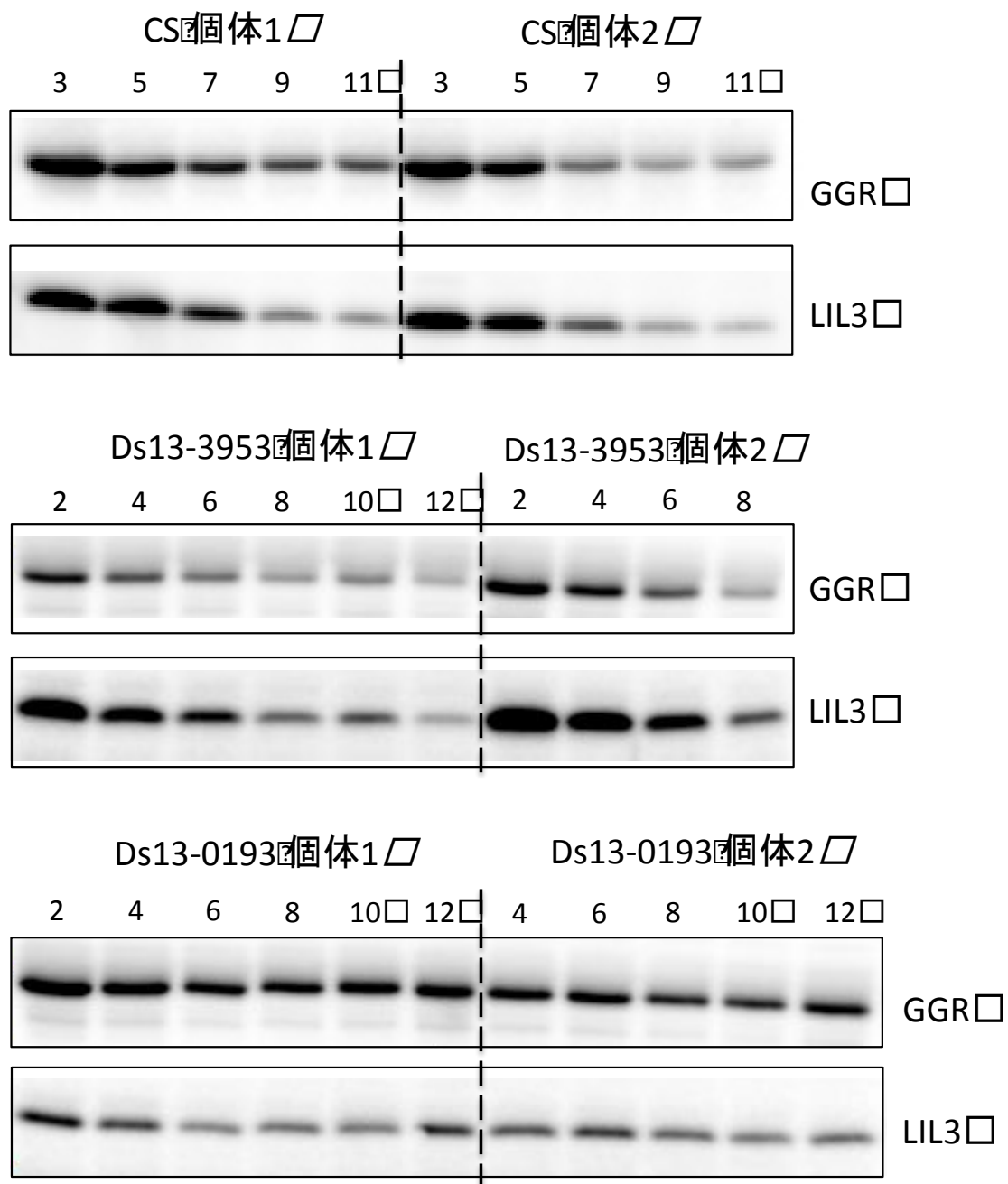


Fig. 25 経時変化に伴った LIL3 および GGR の発現パターンの変化

各レーンにタンパク質抽出液を 10 μ l ずつロードし、SDS-PAGE を行った。その後、抗 GGR 抗体、抗 LIL3 抗体を用いてタンパク質の検出を行った。レーンの上の数字は、Fig. 23 の葉の番号を示している。

Ds13-3953: *lil3;1* の 1 つ目のエキソンにトランスポゾンが挿入されているライン、
Ds13-0193: *lil3;2* の 3 つ目のエキソンにトランスポゾンが挿入されているライン

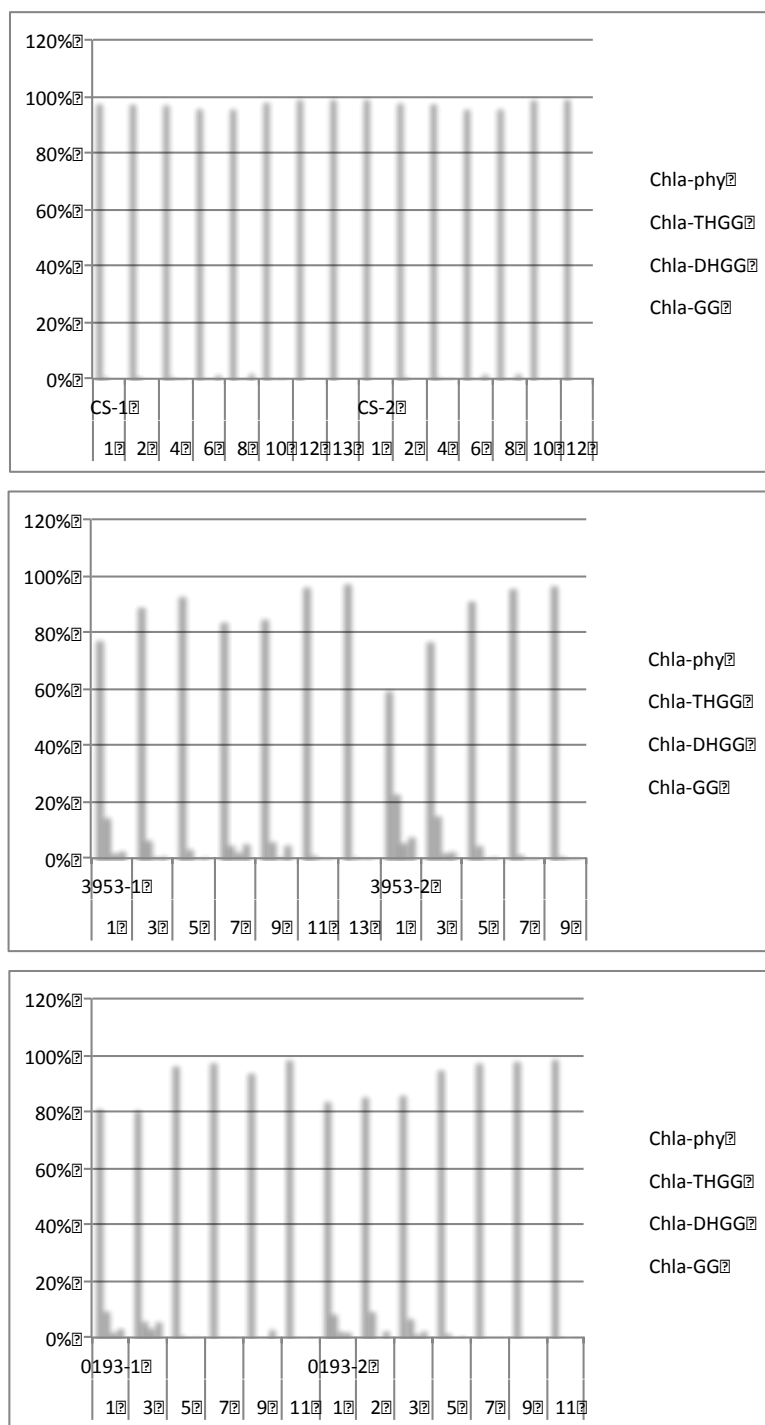


Fig. 26 経時変化に伴った各クロロフィルの割合の変化

葉の全クロロフィルを 100%とし、全クロロフィルに対する各種クロロフィルの割合を示した。グラフの数字は Fig. 23 の葉の番号を示している。

Ds13-3953: *lil3;1* の 1 つ目のエキソンにトランスポゾンが挿入されているライン、
Ds13-0193: *lil3;2* の 3 つ目のエキソンにトランスポゾンが挿入されているライン

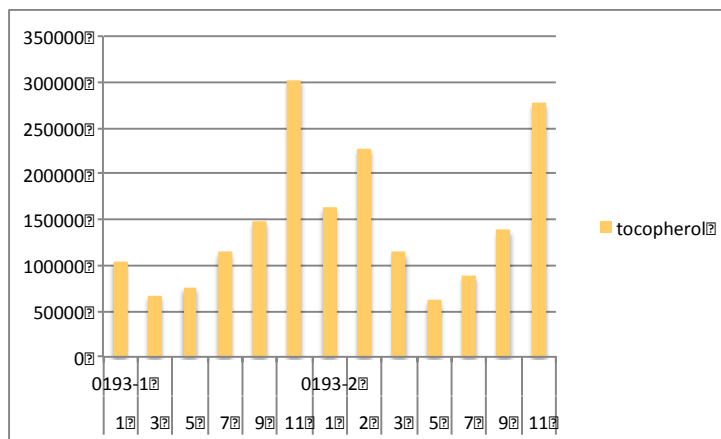
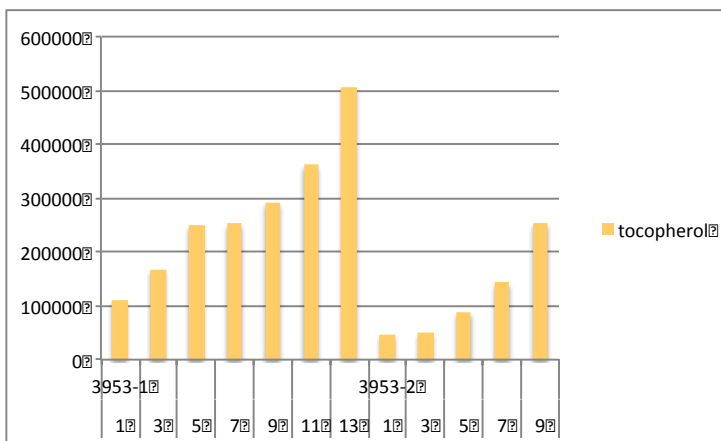
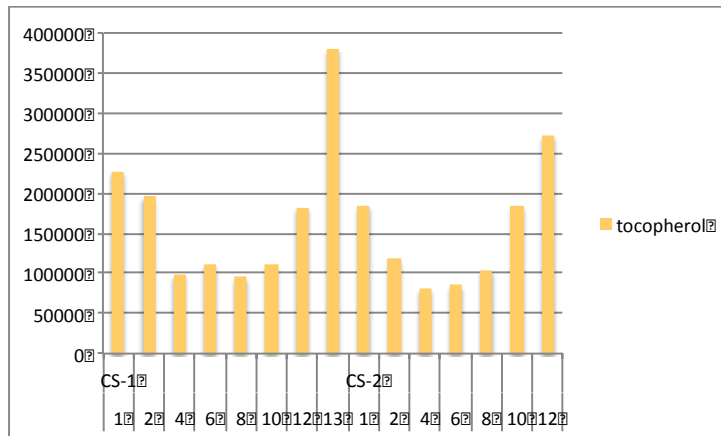


Fig. 27 経時変化に伴ったビタミン E の蓄積の変化

葉 1 mg あたりのビタミン E のピーク面積を示した。グラフの数字は Fig. 23 の葉の番号を示している。

Ds13-3953: *lil3;1* の 1 つ目のエキソンにトランスポゾンが挿入されているライン、
Ds13-0193: *lil3;2* の 3 つ目のエキソンにトランスポゾンが挿入されているライン

CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

File: /Users/rtanaka/Desktop/LIL3-comparison.ps
Page 1 of 1

Date: Fri Dec 4 13:52:31 2015

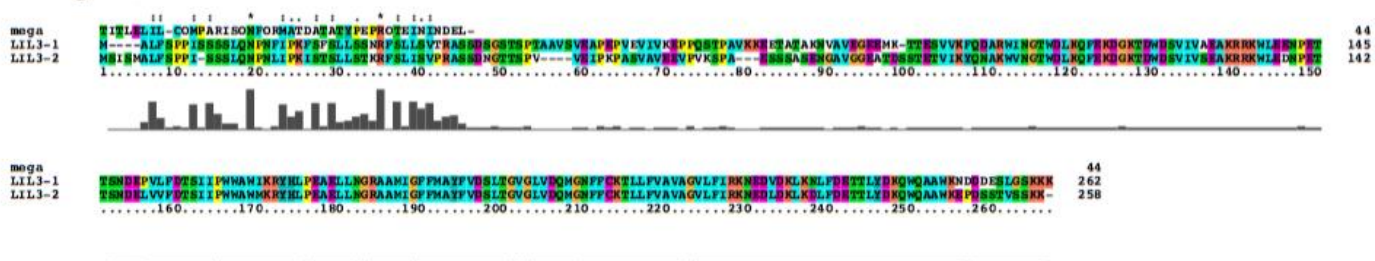


Fig. 28 LIL3 の N 末端のアミノ酸配列の比較

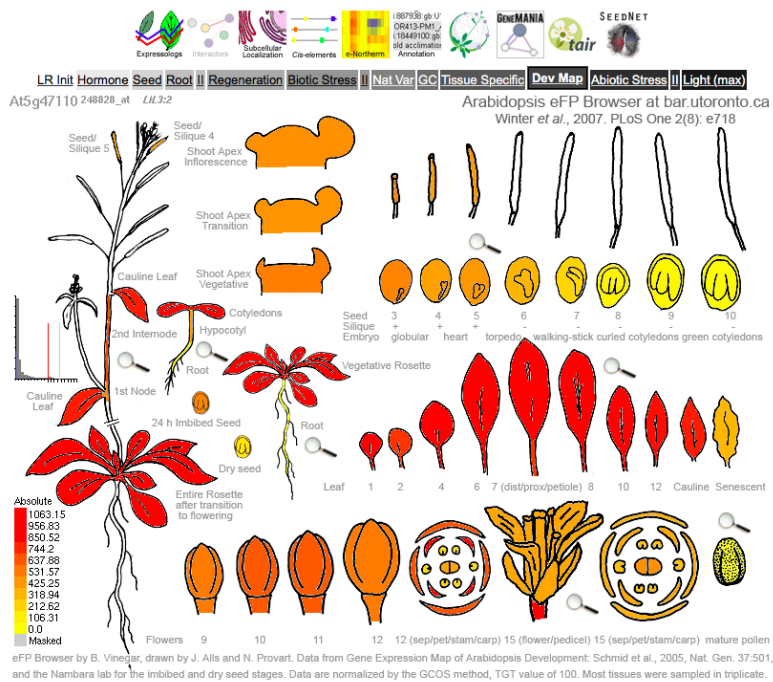
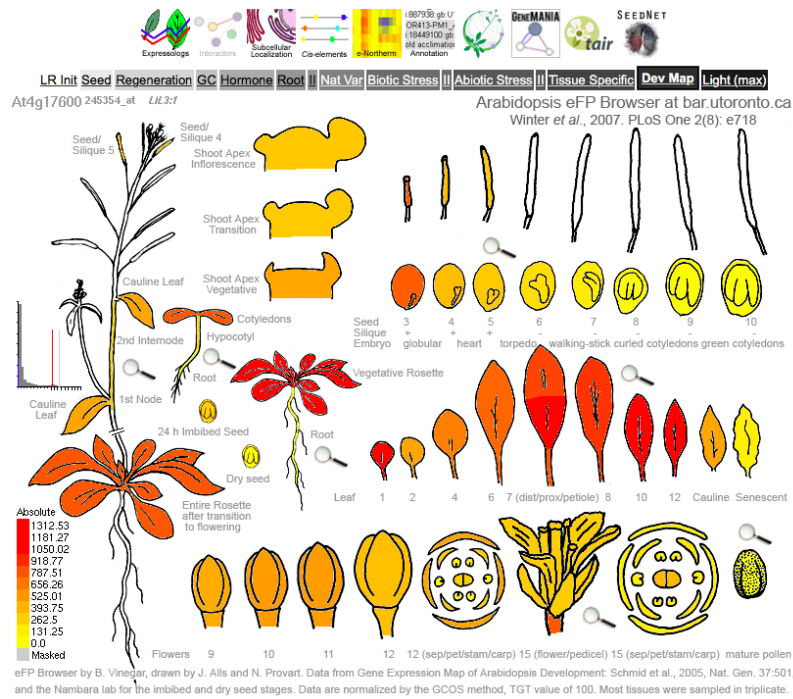


Fig. 29 *LIL3:1* および *LIL3:2* の発現パターン (eFP Browser)

シロイヌナズナの eFP Browser にて *LIL3:1* (上図) および *LIL3:2* (下図) の発現パターンを解析した。

	Gleobacter□	Synechocystis□	Cyanophora□	Galdieria□	Thalassiosira□	Chlamydomonas	Arabidopsis□
HLIP/OHP1-like	○		○	○	○		
OHP1						○	○
OHP2			○	○	○	○	○
SEP			○	○	○	○	○
LIL3			○	○	○	○	○
ELIP						○	○
LHC				○	○	○	○
	Cyanobacteria□灰色藻□ 紅藻、珪藻□ 緑藻、植物□						

Fig. 30 LHC および LIL タンパク質の分布

Engelken ら ((Engelken et al., 2010)の Fig. 2 をもとに図を再構成した。

○はそのタンパク質を保持していることを示している。

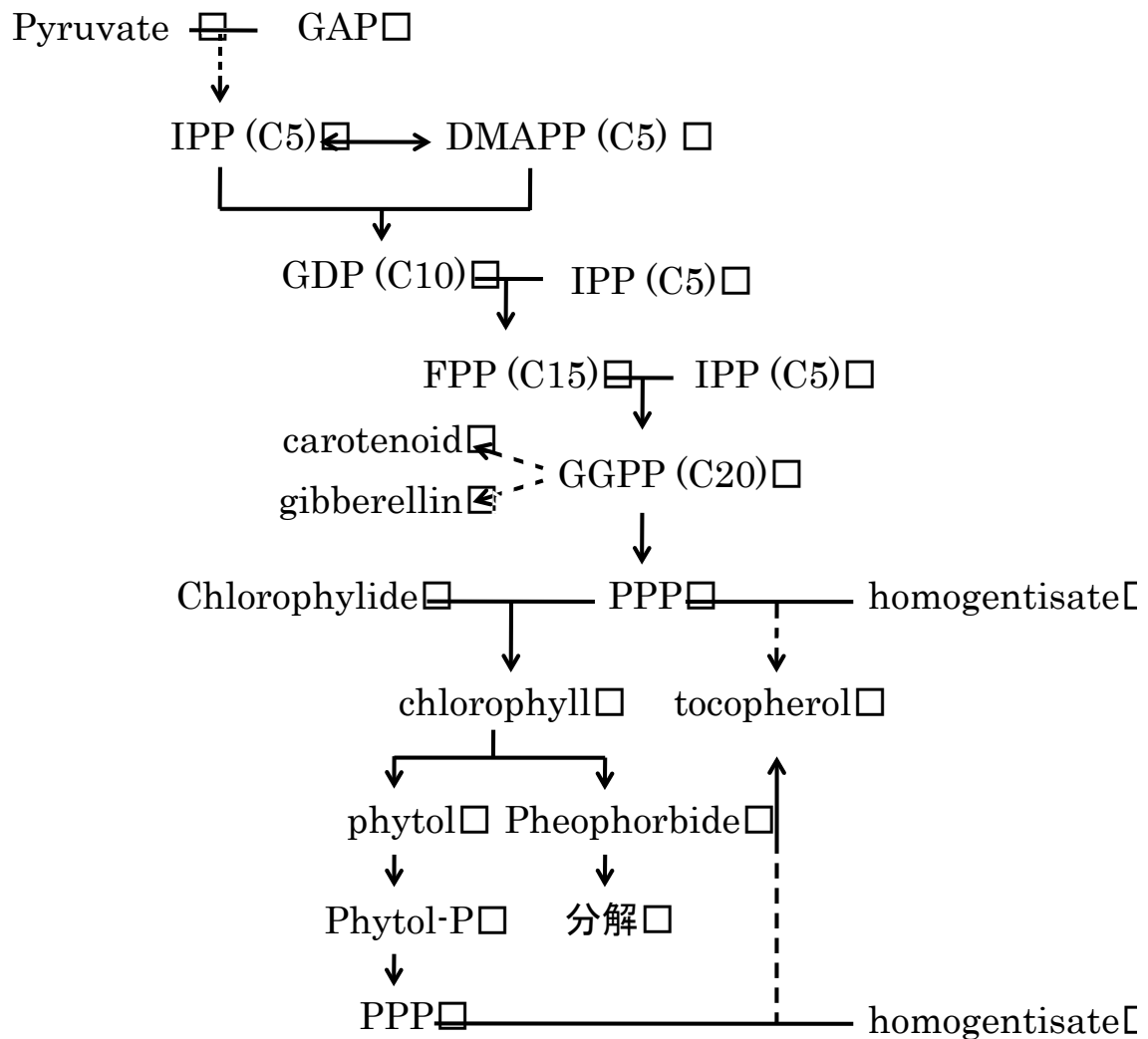


Fig. 31 葉緑体内のイソプレノイド代謝経路

葉緑体内のイソプレノイド代謝経路 (MEP 経路)を図示した。

MEP: 2-C-methyl-D-erytritol 4-phosphate、GAP: glyceraldehyde-3-phosphate、IPP: isopentenyl diphosphate、DMAPP: dimethylallyl diphosphate (IPP の異性体)、GDP: geranyl diphosphate、FDP: farnesyl diphosphate、GGPS: GGDP synthase、CPS: ent-copalyl diphosphate synthase、HPT: homogentisate phytyltransferase
点線の矢印は数段階の酵素反応を経ることを示している。

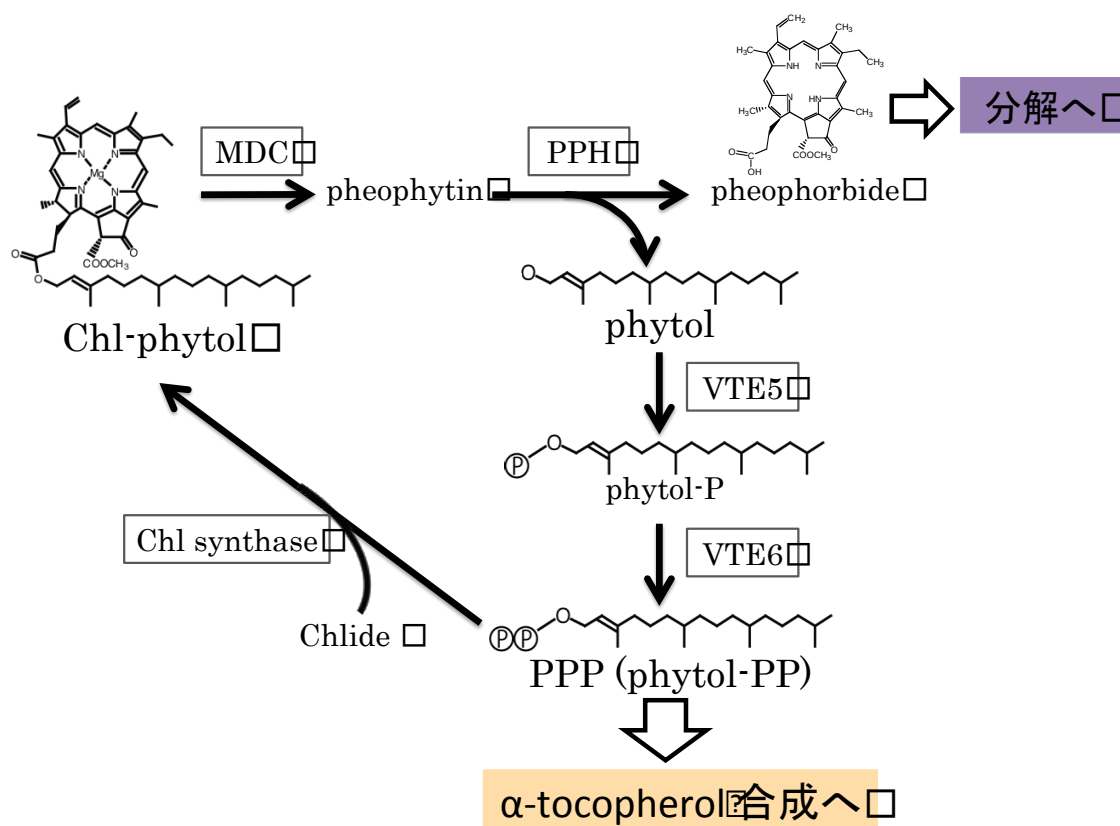


Fig. 32 イソプレノイドの salvage pathway

クロロフィルはMDS、PPHによってpheophorbideとphytolに分解される。生じたpheophorbideは、その後いくつかの酵素反応によってさらに分解が進み、無害化される。一方、クロロフィルの分解によって生じたphytolはVTE5によってリン酸基が一つ添加されphytol-Pとなり、さらにVTE6によってもう一つリン酸基が添加されてPPPとなる。生じたPPPは、再びクロロフィル合成やトコフェロール合成に利用される。

MDS: magnesium dechelataase、PPP: pheophytinase、VTE5: phytol kinase、VTE6: phytol-phosphate kinase、Chl synthase: chlorophyll synthase、Chlide: monovinyl chlorophyllide、PPP: phytyl diphosphate、Chl-phytyl: phytylated chlorophyll

7. 謝辞

本研究を行うにあたり、日頃から熱心にご指導頂きました北海道大学低温科学研究所 田中亮一准教授に深く感謝申し上げます。日頃から数々の貴重なご助言を頂き、また、日々の研究を支えて頂きました北海道大学低温科学研究所 田中歩教授、伊藤寿助教、高林厚史助教に深く感謝申し上げます。副指導教員として多くのご助言を頂きました北海道大学 山本興太郎教授、加藤敦之教授に深く感謝申し上げます。LC-ECL-MS/MS 解析にご協力、ご助言を頂きました低温科学研究所 共同研究推進部の桑野晶喜研究員、門屋亨介研究員に深く感謝申し上げます。また、研究という枠を越えて様々な面でお世話になりました生物適応研究室の院生の皆様に感謝の意を表し、謝辞にかえさせていただきます。

8. 参考文献

- Adamska, I., Roobol-B za, M., Lindahl, M., and Andersson, B. (1999). Isolation of pigment-binding early light-inducible proteins from pea. *Eur J Biochem* 260: 453–460.
- Barros, T. and Kühlbrandt, W. (2009). Crystallisation, structure and function of plant light-harvesting Complex II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787: 753–772.
- Chidgey, J.W., Linhartová, M., Komenda, J., Jackson, P.J., Dickman, M.J., Canniffe, D.P., Koník, P., Pilný, J., Hunter, C.N., and Sobotka, R. (2014). A cyanobacterial chlorophyll synthase-HliD complex associates with the Ycf39 protein and the YidC/Alb3 insertase. *THE PLANT CELL ONLINE* 26: 1267–1279.
- Dorp, vom, K., Hölzl, G., Plohmman, C., Eisenhut, M., Abraham, M., Weber, A.P.M., Hanson, A.D., and Dörmann, P. (2015). Remobilization of Phytol from Chlorophyll Degradation Is Essential for Tocopherol Synthesis and Growth of Arabidopsis. *Plant Cell* 27: 2846–2859.
- Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., and Pikaard, C.S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J* 45: 616–629.
- Engelken, J., Brinkmann, H., and Adamska, I. (2010). Taxonomic distribution and origins of the extended LHC (light-harvesting complex) antenna protein superfamily. *BMC Evolutionary Biology* 10: 233.
- Ischebeck, T., Zbierzak, A.M., Kanwischer, M., and Dörmann, P. (2006). A salvage pathway for phytol metabolism in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 281: 2470–2477.

- Järvi, S., Suorsa, M., Paakkarinen, V., and Aro, E.-M. (2011). Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super- and mega-complexes. *Biochem. J.* 439: 207–214.
- Joyard, J., Ferro, M., Masselon, C., Seigneurin-Berny, D., Salvi, D., Garin, J., and Rolland, N. (2009). Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Mol Plant* 2: 1154–1180.
- Keller, Y., Bouvier, F., d'Harlingue, A., and Camara, B. (1998). Metabolic compartmentation of plastid prenyl lipid biosynthesis. Evidence for the involvement of a multifunctional geranylgeranyl reductase. *Eur J Biochem* 251: 413–417.
- Knoppová, J., Sobotka, R., Tichý, M., Yu, J., Koník, P., Halada, P., Nixon, P.J., and Komenda, J. (2014). Discovery of a chlorophyll binding protein complex involved in the early steps of photosystem II assembly in *Synechocystis*. *THE PLANT CELL ONLINE* 26: 1200–1212.
- Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X., and Chang, W. (2004). Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* 428: 287–292.
- Matsumoto, F. (2004). Gene Expression Profiling of the Tetrapyrrole Metabolic Pathway in *Arabidopsis* with a Mini-Array System. *PLANT PHYSIOLOGY* 135: 2379–2391.
- Myouga, F., Akiyama, K., Motohashi, R., Kuromori, T., Ito, T., Iizumi, H., Ryusui, R., Sakurai, T., and Shinozaki, K. (2010). The Chloroplast Function Database: a large-scale collection of *Arabidopsis* Ds/Spm- or T-DNA-tagged homozygous lines for nuclear-encoded chloroplast proteins, and their systematic phenotype analysis. *Plant J* 61: 529–542.
- Nagata, N., Tanaka, R., Satoh, S., and Tanaka, A. (2005). Identification of a Vinyl Reductase Gene for Chlorophyll Synthesis in *Arabidopsis thaliana* and

Implications for the Evolution of *Prochlorococcus* Species. *Plant Cell* 17: 233–240.

P E Kriedemann, R.J.P.W.A.T. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous for assaying chlorophylls a verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*.

Ryouichi Tanaka, K.K.T.M. (2011). Tetrapyrrole Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *arbo* 9.

Salvi, D., Rolland, N., Joyard, J., and Ferro, M. (2008). Purification and Proteomic Analysis of Chloroplasts and their Sub-Organellar Compartments J.M. Walker, D. Pflieger, and J. Rossier, eds (Humana Press: Totowa, NJ).

Sasaki, D., Fujihashi, M., Iwata, Y., Murakami, M., Yoshimura, T., Hemmi, H., and Miki, K. (2011). Structure and mutation analysis of archaeal geranylgeranyl reductase. *J. Mol. Biol.* 409: 543–557.

Shumskaya, M., Bradbury, L.M.T., Monaco, R.R., and Wurtzel, E.T. (2012). Plastid Localization of the Key Carotenoid Enzyme Phytoene Synthase Is Altered by Isozyme, Allelic Variation, and Activity. *THE PLANT CELL ONLINE* 24: 3725–3741.

Sobotka, R., Tichy, M., Wilde, A., and Hunter, C.N. (2011). Functional Assignments for the Carboxyl-Terminal Domains of the Ferrochelatase from *Synechocystis* PCC 6803: The CAB Domain Plays a Regulatory Role, and Region II Is Essential for Catalysis. *PLANT PHYSIOLOGY* 155: 1735–1747.

Soll, J., Schultz, G., Joyard, J., Douce, R., and Block, M.A. (1985). Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 238: 290–299.

Takabayashi, A., Kadoya, R., Kuwano, M., Kurihara, K., Ito, H., Tanaka, R., and Tanaka, A. (2006). Protein co-migration database (PCoM -DB) for *Arabidopsis* thylakoids and *Synechocystis* cells. *Nat Protoc* 1: 418–428.

- Takahashi, K., Takabayashi, A., Tanaka, A., and Tanaka, R. (2014). Functional analysis of light-harvesting-like protein 3 (LIL3) and its light-harvesting chlorophyll-binding motif in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 289: 987–999.
- Tanaka, R., Rothbart, M., Oka, S., Takabayashi, A., Takahashi, K., Shibata, M., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K., Grimm, B., and Tanaka, A. (2010). LIL3, a light-harvesting-like protein, plays an essential role in chlorophyll and tocopherol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 16721–16725.
- Tholl, D. and Lee, S. (2011). Terpene Specialized Metabolism in Arabidopsis thaliana. 9: e0143.
- Valentin, H.E., Lincoln, K., Moshiri, F., Jensen, P.K., Qi, Q., Venkatesh, T.V., Karunanandaa, B., Baszis, S.R., Norris, S.R., Savidge, B., Gruys, K.J., and Last, R.L. (2006). The Arabidopsis vitamin E pathway gene5-1 mutant reveals a critical role for phytol kinase in seed tocopherol biosynthesis. *Plant Cell* 18: 212–224.
- Whitby, F.G. (1998). Crystal structure of human uroporphyrinogen decarboxylase. *The EMBO Journal* 17: 2463–2471.