

光阻害における光化学系II反応中心タンパク質D1の分解と 葉緑体プロテアーゼ‡

岡山大学 資源植物科学研究所
加藤 裕介* 坂本 亘

光は植物の生育に必須であるが、同時にチラコイド膜上の光合成装置に損傷をもたらし、光合成能の低下を引き起こす。光化学系における光による損傷のターゲットは光化学系IIの反応中心タンパク質D1であり、植物は損傷を受けたD1を特異的に分解し、新たなD1に置き換える修復サイクルにより光合成能を維持する。損傷を受けたD1の分解は光化学系II修復のキーププロセスと考えられ、私達はシロイヌナズナを用いてこれを担うプロテアーゼの解析を進めてきた。本稿では修復サイクルにおけるD1分解に焦点をあて、二つの原核生物型プロテアーゼ (FtsH、Deg) の役割とその協調的な分解機構について紹介する。

1. はじめに

光合成の電子伝達反応に必要なエネルギーは文字通り光であるが、同時に光合成装置に恒常的に損傷を与えている。特に過剰な光エネルギーは光合成装置の修復能力を超える損傷を与え、その結果、光合成能力の低下 (光阻害) を引き起こし、植物の生育を阻害する^{1,2)}。そのため、陸上植物は光阻害を避ける為に、過剰な光ストレスに対応する様々な機構を個体から細胞、オルガネラのレベルで発達させている。個体レベルでは、葉の形や葉面の角度を調整することで葉にあたる光の量を調整し、細胞内では葉緑体の光逃避運動により光によるダメージを軽減している。さらに葉緑体内では、ステート遷移による励起エネルギーの分配、熱放散による過剰なエネルギーの散逸、water-waterサイクル、サイクリック電子伝達による電子伝達系の調節が行われている³⁾。それでもなお光合成装置が損傷を受けたとき、損傷を受けたタンパク質の修復が行われる。

チラコイド膜上の光合成装置において、光による損傷の主なターゲットは、光化学系II複合体の反応中心タンパク質D1 (以下D1と略す) である。光合成装置の修復では損傷を受けたD1が特異的に分解され、新規に合成されたD1に置き換えられる⁴⁾。実際にD1のターンオーバーは他の光合成タンパク質に比べ、著し

く速いことが以前から知られている²⁾。葉緑体におけるD1の修復過程では、①損傷を受けた光化学系II複合体のグラナチラコイドからストロマチラコイドへの移行、②酸素発生系表在タンパク質ならびにCP43タンパク質の光化学系II複合体からの解離、そして、③損傷を受けたD1の分解が行われる。D1の分解と連動して、④新規D1の合成とプロセッシングが行われ、続いて、⑤光化学系II複合体の再構築、⑥グラナチラコイドへの移行が行われる。この一連の修復過程は機能的な光化学系II複合体に戻る様子から光化学系II修復サイクル (PSII repair cycle) と呼ばれ、損傷を受けたD1のみを入れ換える効率の良いタンパク質複合体の品質管理機構と考えられている。光化学系II修復サイクルの仕組みについては、その重要性から活発な研究が行われており、数年毎に総説が出されている。より詳細な光化学系II修復サイクルのメカニズムについては、それらを参照していただきたい^{5,6)}。筆者らは、光化学系II修復サイクルに関わるプロテアーゼの解析を長らく行っており、本稿では、これまでの研究と筆者らの研究結果を交えて紹介する。

2. D1タンパク質分解に関わるプロテアーゼ -FtsH-

シロイヌナズナを用いた研究から、植物では二種類の原核生物型プロテアーゼがD1の分解に関わっている

‡ 解説特集「光阻害」

* 連絡先 E-mail: ykato@rib.okayama-u.ac.jp

ことが明らかとなってきた。そのひとつは、葉緑体チラコイド膜に局在するATP依存型の亜鉛メタロプロテアーゼFtsHである。FtsHは大腸菌で最初に報告されて解析が進み、タンパク質分解などの多様な細胞機能にエネルギー依存的に関わるAAA (ATPases associated with diverse cellular activities) タンパク質ファミリーに属するAAAプロテアーゼの1つに分類されている⁷⁾。N末側に1つの膜貫通ドメインを持ち、続いてATPaseドメイン、プロテアーゼモチーフが並んでいる。FtsHは六量体の構造をとって機能していると考えられており、膜側にATPase部分が面している。このことから、FtsHは膜内にある基質タンパク質の末端を認識し、ATPase活性によりタンパク質の折り畳み構造をほどき(アンフォールディング活性)、プロテアーゼ活性により膜から引き抜くことで連続的(プロセッシブ)に基質を分解していると考えられている⁷⁾。シロイヌナズナでは、12のFtsHホモログが確認されており、そのうちの9つが葉緑体で、残り3つがミトコンドリアで機能すると推定されている⁸⁾。また、FtsHの亜鉛結合モチーフを欠損し、プロテアーゼ活性を失ったホモログFtsHiが5つ存在し、これらも葉緑体に局在すると推定されている⁹⁾。そのうちFtsHi2、4、5は胚発生に関与し、FtsHi1は葉緑体分裂の異常から多数の葉緑体が生じる*arc1*変異の原因遺伝子であることが最近報告されている¹⁰⁾。これらの機能解析についても今後の解析が待たれる。

チラコイド膜上のFtsHは、系統的にType AとType Bの二種類のタイプに分けることができ、それぞれのタイプのサブユニットから成るABヘテロ六量体を構成し、ATPaseドメイン、プロテアーゼドメインがストロマ側に配向している^{8,11)}。ヘテロ六量体構造は、シアノバクテリアでも報告されており、光合成生物を通じた特徴的な構造のようである¹²⁾。シロイヌナズナでは、Type AサブユニットはFtsH1とFtsH5、Type BサブユニットはFtsH2とFtsH8から構成されており、FtsH2、FtsH5、FtsH8、FtsH1の順に存在量が多いと考えられている^{11,13)}。特にFtsH2とFtsH5が主要な構成因子であり、その欠損によりFtsH複合体の存在量が大きく減少する。FtsHは、チラコイド膜の形成/維持にも関与するため、その欠損は葉緑体の発達異常を引き起こす。このため、FtsH2もしくはFtsH5を欠損したシロイヌナズナ変異体 (*yellow variegated2* [*var2*]ならびに*var1*) では、葉緑体の発達異常が生じ、斑入り表現型を示す^{14,15)}。

var2、*var1*変異体の特徴として、光ストレスに対して脆弱であり、光阻害を起こしやすい点がある^{14,15)}。また*in vitro*の実験系では、FtsH1がD1の断片を分解することが明らかにされ¹⁶⁾、原因遺伝子の同定時からFtsHが実際に葉緑体内でD1分解に関与することが推定されていた。しかしながら、斑入り表現型は*in vivo*でのFtsHによるD1分解の検証ならびに詳細な解析には不向きな点も多い。そこで筆者らは、*var2*変異体の斑入り表現型を抑圧する二次的なサプレッサー変異を導入した変異体を用いて、この問題を解決した¹⁷⁾。このサプレッサー変異は葉緑体の原核型翻訳開始因子2 (IF2) のアミノ酸置換により生じており、葉緑体発達時のタンパク質合成と分解のバランスが釣り合うことで葉緑体の発達異常が抑制されると考えられている¹⁸⁾。またサプレッサー変異が入った二重変異体も*var2*変異体同様に光ストレスに対して脆弱であった。サプレッサー変異が入った二重変異体を用いて、葉緑体での新規タンパク質の合成を止める阻害剤リンコマイシンの存在下でのD1分解を解析した結果、強光照射によって生じるD1の分解がFtsHの欠損により明らかに抑制されることが示され、この結果から*in vivo*でのFtsHによるD1の分解を確かめることができた。

3. D1タンパク質分解に関わるプロテアーゼ -Deg-

FtsHと共に近年のシロイヌナズナを用いた研究からATP非依存型のセリンプロテアーゼDegがD1分解に関与していることが示唆された。シロイヌナズナでは16のDegホモログが存在し、これまで5つのDegプロテアーゼ (Deg1、Deg2、Deg5、Deg7、Deg8) が葉緑体に局在すると報告されている^{19,20)}。これら葉緑体Degの局在はストロマとチラコイド内腔に分かれており、Deg2、Deg7がストロマ側にDeg1、Deg5、Deg8がチラコイド内腔に局在し、チラコイド膜にゆるやかに結合し、膜タンパク質を切断すると考えられている。D1はN末端をストロマ側に、C末端をチラコイド内腔にして、チラコイド膜を膜貫通ヘリックスによって5回横切る構造をとっている。Degはこれら膜貫通ヘリックス同士をつなぐループ構造をストロマ、チラコイド内腔側それぞれにおいて切断すると推定されている。単離チラコイド膜を用いた*in vitro*での解析から、ヘリックスDとEを結ぶストロマ側のD-Eループの切断にDeg2が関与していることが示唆された²¹⁾。しかしながら、*deg2*変異体の解析ではD1分解に異常は認められていな

いことから、Deg2のD1分解における寄与度は低いと考えられた²²⁾。Deg7もストロマ側でD1を切断すると示唆されているが、その分解産物のサイズからヘリックスBとCを結ぶ短いB-Cループを切断するのではないかと推定されている²³⁾。

Zhangらの研究によれば、強光条件下において野生株で検出されるD1の分解産物がチラコイド内腔側のDeg5、Deg8を欠損した二重変異体では検出されない。この結果から、ヘリックスCとDを結ぶC-Dループの切断に二つのDegが相乗的に機能していることが示唆された²⁴⁾。一方、Adamらの研究では、*DEG1-RNAi*導入株では光阻害を受けやすくなるとともに、D1のC末端側に由来する16 kと5.2 kの分解産物が減少し、A-BループならびにヘリックスEの下流でのD1切断に働いている可能性が示唆された²⁵⁾。しかしながら、Deg1の発現減少と共にFtsHやDeg2の発現も減少しており、Deg1のD1分解における寄与は明確ではない。またDeg1のノックアウト変異体が単離できず、Deg1の他のチラコイド膜タンパク質分解への関与や光化学系II構築過程への関与も示唆されていることから、Deg1はより広範な葉緑体機能制御に機能している可能性がある。

4. FtsHとDegのD1タンパク質分解における役割

筆者らの研究では、FtsHを欠損した変異体では光阻害が起きないような弱い光条件下 (20, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) においても、強光条件下と同様にD1の分解が遅れることがわかっている¹⁷⁾。したがって、FtsHは損傷を受けたD1の分解を恒常的に行っていると思われる。一方で、Degは特に強光条件下で機能しているようである^{23,24)}。例えば*deg5 deg8*変異体の生育は強光照射下において明確に阻害されるが、光阻害が起きないような光条件下では野生株と同等に生育する²⁴⁾。またDegにより切断されたD1の分解産物は強光条件下でのみ検出されており、これらの結果はDegが強光下で機能していることを示唆している。実際に筆者らがFtsHの解析と同様の実験条件で*deg5 deg8*変異体におけるD1の分解速度を確認した結果でも、強光条件下では野生株と比較してD1分解の遅れが認められたが、生育光 (180 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) や弱光条件下 (20 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ではD1分解速度に有意な差は認められなかった²⁶⁾。

このFtsHとDegのD1分解における働きの差は二つのプロテアーゼのタンパク質分解方法の違いに起因して

いると思われた。すなわち、FtsHは基質タンパク質のN末端もしくはC末端部を認識してプロセッシブに分解するエキソペプチダーゼであるのに対し、Degは基質タンパク質の配列中央を切断するエンドペプチダーゼである。この性質の違いは、FtsHが単独でD1の完全な分解が可能であるのに対し、DegはD1を切断するのみで、D1の完全な分解には他のプロテアーゼの協力が必要であることを示している。そのため、光阻害が起きないような光条件下でのD1分解では、FtsHが主要な役割を果たし、FtsH単独では分解が間に合わないような強光下では、DegがD1を断片化し、認識される末端を増やすことでD1分解の効率を高めているというモデルが考えられた^{27,28)}。このモデルを指示する実験データとして、後述するように、Degの光依存的なチラコイド膜への結合や多量体化と立体構造変化も示唆されている^{23,29)}。

光合成細菌の結果に目を向けてみると、*Synechocystis* sp. PCC 6803では4つのFtsHホモログが存在し^{12,30)}、そのうちシロイヌナズナFtsH2に相同性の高いFtsH2 (slr0228) とFtsH3 (slr1604) がヘテロ六量体を形成し、光化学系IIの修復、D1分解に関与していると考えられている^{31,32)}。一方、Degホモログは*Synechocystis* sp. PCC 6803に3つ存在する。これらは熱や光といったストレスに応答して機能することが示唆されているものの、これまでにシアノバクテリアのD1分解に直接関与するという報告はなされていない³³⁾。これらの結果は、初期に構築されたD1分解系では、FtsHが主要な分解経路であったことを示唆し、植物の進化過程で光阻害における光化学系II修復機能の強化が必要となり、DegによるD1の断片化と分解の効率化の機構が獲得されたことを示しているであろう。

5. FtsHとDegの協調的なD1タンパク質分解

それでは、実際に葉緑体内でDegによって切断されたD1の断片をFtsHが分解しているのだろうか？ FtsHがDegによって切断されたD1の断片を分解しているのであれば、FtsH2を欠損する*var2*変異体では、D1の分解断片が蓄積しているはずである。この予想に基づいて、筆者らはまず、D1の分解断片の検出を試みた。しかしながら、これまでD1分解を解析していた実験条件では分解断片は検出できなかった。そこで、さらに強い光を照射できるLED光源を利用し、2500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光強度で1時間処理した葉

からタンパク質を抽出し、感度の高いウエスタンブロット検出試薬を用いて検出した結果、D1の分解断片を検出することができた²⁶⁾。図1に示すように、D1のN末端を認識する抗体を用いた解析では、約18 kの分解産物が蓄積しており、C末端を認識する抗体を用いた解析では、約12 kと16 kのふたつの分解産物が検出された。またこれら分解産物がセリンプロテアーゼ (Degはセリンプロテアーゼ) の働きによって生成されたものか確認するために、セリンプロテアーゼの阻害剤である4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride (AEBSF) で処理した後に同様の実験を行っ

た。その結果、AEBSF存在下ではD1の分解断片は検出されず、分解断片がDegによって生成されたものと強く示唆された²⁶⁾。

検出されたD1断片のサイズから予想すると、N末端を認識する抗体で検出された18 kのバンドとC末端を認識する抗体で検出された16 kのバンドは、C-Dループで切断された産物と考えられた。また、C末端を認識する抗体で検出された12 kのバンドはD-Eループでの切断により生じたと考えられた。先に述べたように、チラコイド内腔側のC-Dループの切断にはDeg1、Deg5、Deg8が、ストロマ側のD-Eループでの切断にはDeg2がそれぞれ関わりと示唆されている^{21,24,25)}。このうちDeg1は広範な葉緑体機能制御に機能している可能性があり、Deg2は*in vivo*での明確な表現型が観察されていない。そこで私達はDeg5、Deg8の働きとFtsHによるD1分解に焦点を絞って、*var2 deg5 deg8*三重変異体を作成し、解析を行った。光化学系IIの最大光量子収率Fv/Fmの強光感受性を指標に強光ストレス耐性を調べた結果、*var2 deg5 deg8*三重変異体は*var2*変異体や*deg5 deg8*二重変異体よりさらに光阻害を受けやすく、光ストレスに対してより脆弱であることが示された。また*var2*変異体同様に斑入りの表現型を示し、Deg5、Deg8の欠損が斑の形成には直接関わらないことが示された。このような*var2 deg5 deg8*三重変異体でのD1分解断片の検出を行った結果、N末端側D1抗体で検出される18 kのバンドとC末端側D1抗体で検出される16 kのバンドが明らかに減少しており、この分解断片のバンドがDeg5、Deg8の働きにより作られることが示された²⁶⁾。以上の結果から、Degプロテアーゼの働きにより生成されたD1の分解断片がFtsHによってさらに分解されていることが確かめられ、葉緑体内でのDegとFtsHによる協調的なD1分解モデルが確認された (図2)。

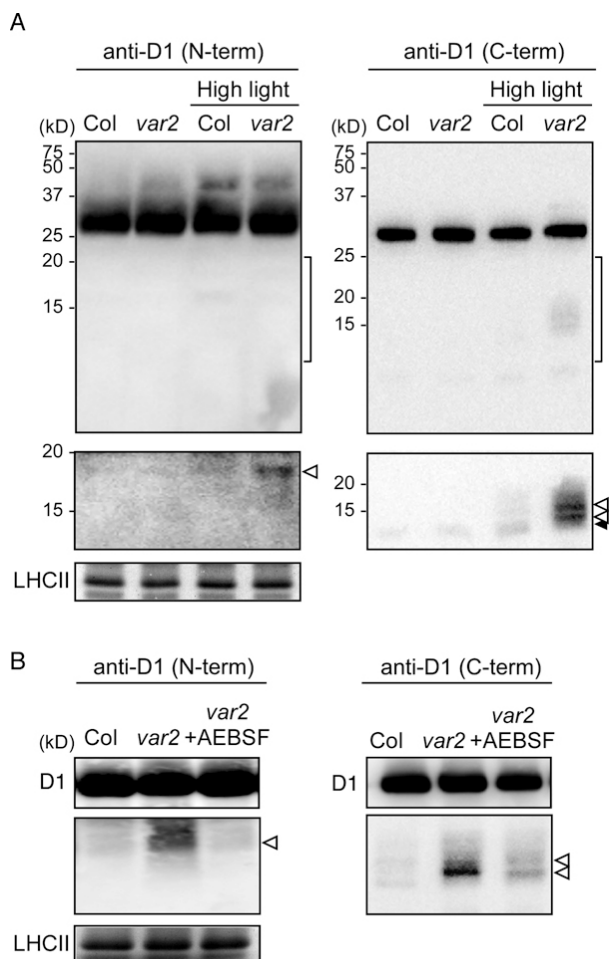


図1 *var2*変異体でのD1分解断片の蓄積

野生株と*var2*変異体の成熟葉に生育光と非常に強い光を1時間照射した後、膜タンパク質を抽出し、D1のN末端側もしくはC末端側を認識する抗体を使用してウエスタン解析を行った (A)。真ん中のパネルはD1の分解断片を検出するために、D1本体の強いシグナルが入らないようアルミホイルで隠した後、露光したもの。強光を照射した*var2*変異体のサンプルでは、D1の分解断片が検出された。同様の実験をセリンプロテアーゼ阻害剤であるAEBSF存在下で行った結果では、D1の分解断片の量が大きく減少している (B)。(Kato et al.²⁶⁾より許可を得て転載)

6. プロテアーゼの機能調節と基質認識

筆者らの研究結果も含め、この10年余りのシロイヌナズナ変異体を用いた解析から、D1分解に関与する主要なプロテアーゼとそのホモログはすべて出揃ったと考えられる。それでは、プロテアーゼはどのように損傷を受けたD1を認識し、分解しているのだろうか？

FtsHによるタンパク質の分解には、ある程度 (20残基程度) のアミノ酸末端が必要であり、基質タンパク質のアミノ酸末端が何らかの理由でアンフォールド

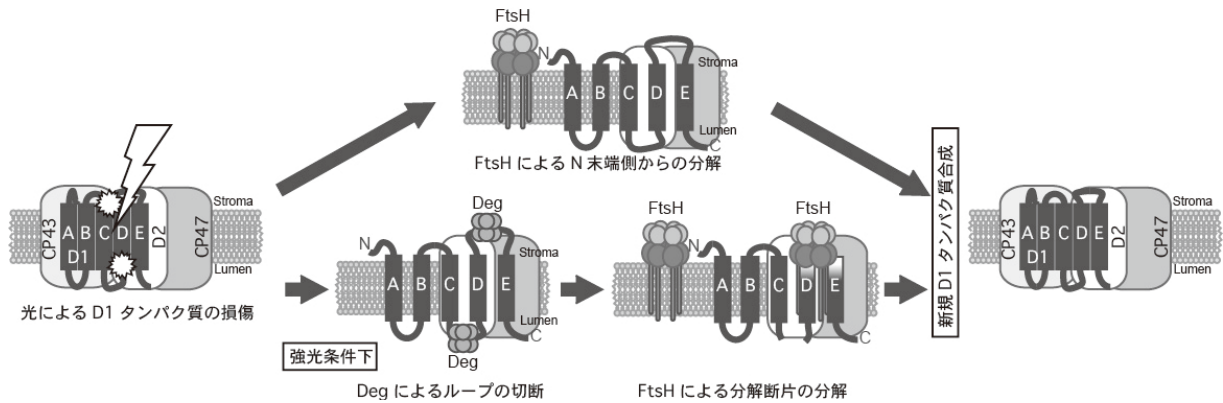


図2 二つのD1分解経路

損傷を受けたD1は、通常はFtsHによりN末端側から分解される。強光条件下ではこれに加えて、Degがストロマ側、ルーメン側でD1を切断し、FtsHによって認識される末端部を増やすことで基質認識を容易にし、分解効率を高めていると考えられる。

の状態になれば基質を認識し、分解がはじまると考えられている。D1も光によって損傷を受けた際に、立体構造に何らかの変化を起こし、それが分解の引き金になっているようである。実際に、シアノバクテリアのD1分解に関する研究では、D1のN末端側の20アミノ酸残基を除いた改変D1の分解が阻害されるという報告がされており³⁴⁾、葉緑体内でも同様にN末端側のアンフォールディングをFtsHが認識し、分解を行っていると考えられる。

一方、FtsHがアンフォールディングしたD1を認識するためには他の因子が必要である可能性がある。大腸菌ではFtsHは六量体構造をつくるだけでなく、別のタンパク質複合体 (HflKC) と結合し、1000 k以上の巨大複合体 (FtsHホロ酵素) として機能している³⁵⁾。また酵母のミトコンドリアでもHflKCに類似するタンパク質であるProhibitinと複合体を形成し、機能していることが明らかとなっており、これらFtsHと複合体を形成するHflKC/Prohibitin複合体は、FtsHの基質選択の調節因子として機能していることが示唆されている³⁵⁾。しかしながら、葉緑体ではこれらHflKC/Prohibitinに対応するタンパク質やFtsHの巨大複合体構造は未だ確認されていない。このため、葉緑体でのFtsHの基質選択に関与する他の因子が存在するかどうかは、今後、興味深い課題の1つであろう。これとは別に、FtsHの機能がレドックス調節やリン酸化によって制御されている可能性も示唆されている。具体的には、葉緑体のチラコイド膜内腔におけるレドックス調節に関わるチオレドキシシン様タンパク質HCF164により還元される標的タンパク質としてFtsH2とFtsH8が³⁶⁾、リン酸化を受けるタンパク質としてFtsH1とFtsH5が報告さ

れている^{37,38)}。これらのシグナルによるFtsHの機能調節は明らかではないが、FtsHの還元/リン酸化による修飾とプロテアーゼ機能の活性化は、今後、検討すべき課題の1つである。

Degの機能調節については、生化学的な解析からDeg1がpH依存的に多量体化していることが示されている。この結果では、pH 8で不活性型のモノマーとして存在しているDeg1が、酸性条件pH 6では六量体構造をとり、活性型となることが示された²⁹⁾。光合成の際にチラコイド膜内腔の酸性化が進むとDeg1が活性型となり、D1の切断に寄与していると考えられる。またストロマ側では、チラコイド膜近辺に存在すると考えられるDeg7のチラコイド膜への局在が強光条件下において促進することが示された²³⁾。これらの結果から、Degはその局在やオリゴマー形成によって活性を制御し、光条件に応じて機能的になることでD1を分解していると推定され、今後の更なる解析が待たれる。

7. おわりに

筆者らの最近の論文では、もうひとつ興味深い現象を提示している。それは、FtsHが欠損した*var2*変異体において、主にストロマに存在するClpプロテアーゼの膜への局在が増加している点である²⁶⁾。このClpプロテアーゼの膜局在化は、*var2*変異体だけではなく、長時間、強光ストレスに晒した野生株でも観察することができた³⁹⁾。ClpプロテアーゼはFtsH同様にATP依存型のプロテアーゼであり、タンパク質の構造をほどこしながら連続的にタンパク質分解を行う。どのようなメカニズムでClpプロテアーゼが膜に局在するようになるかは不明であるが、その機能の相同性が

らFtsHの役割を補っていることが考えられる。葉緑体の中では、それぞれのプロテアーゼが互いに機能を相補しつつ、協調的に働くと考えられ、多様に変化する生理的条件下でその局在や活性を補完しあっているのだろう。タンパク質の分解、品質管理に関する研究では、ようやく主要なプロテアーゼの役回りがわかってきたところであり、解明すべき課題がまだ多く残されている。特に基質認識や活性の制御といった点は興味深い研究テーマであり、今後、筆者らの研究室でも取り組んでいきたい課題である。

Received July 19, 2013, Accepted July 24, 2013, Published August 31, 2013

参考文献

1. Takahashi, S., and Murata, N. (2008) How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci.* 13, 178-182.
2. Barber, J., and Andersson, B. (1992) Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 17, 61-66.
3. Takahashi, S., and Badger, M. R. (2011) Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends Plant Sci.* 16, 53-60.
4. Nixon, P. J., Michoux, F., Yu, J., Boehm, M., and Komenda, J. (2010) Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. *Ann. Bot.* 106, 1-16.
5. Komenda, J., Sobotka, R., and Nixon, P. J. (2012) Assembling and maintaining the Photosystem II complex in chloroplasts and cyanobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 245-251.
6. Mulo, P., Sirpio, S., Suorsa, M., and Aro, E. M. (2008) Auxiliary proteins involved in the assembly and sustenance of photosystem II. *Photosynth. Res.* 98, 489-501.
7. Ito, K., and Akiyama, Y. (2005) Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 211-231.
8. Sakamoto, W., Zaltsman, A., Adam, Z., and Takahashi, Y. (2003) Coordinated regulation and complex formation of *YELLOW VARIEGATED1* and *YELLOW VARIEGATED2*, chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in *Arabidopsis* thylakoid membranes. *Plant Cell* 15, 2843-2855.
9. Wagner, R., Aigner, H., and Funk, C. (2012) FtsH proteases located in the plant chloroplast. *Physiol. Plant.* 145, 203-214.
10. Kadirjan-Kalbach, D. K., Yoder, D. W., Ruckle, M. E., Larkin, R. M., and Osteryoung, K. W. (2012) *FtsH1/ARCI* is an essential gene in *Arabidopsis* that links chloroplast biogenesis and division. *Plant J.* 72, 856-867.
11. Yu, F., Park, S., and Rodermel, S. R. (2004) The *Arabidopsis* FtsH metalloprotease gene family: interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes. *Plant J.* 37, 864-876.
12. Boehm, M., Yu, J., Krynicka, V., Barker, M., Tichy, M., Komenda, J., Nixon, P. J., and Nield, J. (2012) Subunit organization of a synechocystis hetero-oligomeric thylakoid FtsH complex involved in photosystem II repair. *Plant Cell* 24, 3669-3683.
13. Sinvany-Villalobo, G., Davydov, O., Ben-Ari, G., Zaltsman, A., Raskind, A., and Adam, Z. (2004) Expression in multigene families. Analysis of chloroplast and mitochondrial proteases. *Plant Physiol.* 135, 1336-1345.
14. Sakamoto, W., Miura, E., Kaji, Y., Okuno, T., Nishizono, M., and Ogura, T. (2004) Allelic characterization of the leaf-variegated mutation *var2* identifies the conserved amino acid residues of FtsH that are important for ATP hydrolysis and proteolysis. *Plant Mol. Biol.* 56, 705-716.
15. Sakamoto, W., Tamura, T., Hanba-Tomita, Y., and Murata, M. (2002) The *VAR1* locus of *Arabidopsis* encodes a chloroplastic FtsH and is responsible for leaf variegation in the mutant alleles. *Genes Cells* 7, 769-780.
16. Lindahl, M., Spetea, C., Hundal, T., Oppenheim, A. B., Adam, Z., and Andersson, B. (2000) The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell* 12, 419-431.
17. Kato, Y., Miura, E., Ido, K., Ifuku, K., and Sakamoto, W. (2009) The variegated mutants lacking chloroplastic FtsHs are defective in D1 degradation and accumulate reactive oxygen species. *Plant Physiol.* 151, 1790-1801.
18. Miura, E., Kato, Y., Matsushima, R., Albrecht, V., Laalami, S., and Sakamoto, W. (2007) The balance between protein synthesis and degradation in chloroplasts determines leaf variegation in *Arabidopsis* yellow variegated mutants. *Plant Cell* 19, 1313-1328.
19. Huesgen, P. F., Schuhmann, H., and Adamska, I. (2009) Deg/HtrA proteases as components of a network for photosystem II quality control in chloroplasts and cyanobacteria. *Res. Microbiol.* 160, 726-732.
20. Schuhmann, H., Huesgen, P. F., and Adamska, I. (2012) The family of Deg/HtrA proteases in plants. *BMC Plant Biol.* 12, 52.
21. Haussühl, K., Andersson, B., and Adamska, I. (2001) A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *EMBO J.* 20, 713-722.
22. Huesgen, P. F., Schuhmann, H., and Adamska, I. (2006) Photodamaged D1 protein is degraded in *Arabidopsis*

- mutants lacking the Deg2 protease. *FEBS Lett.* 580, 6929-6932.
23. Sun, X., Fu, T., Chen, N., Guo, J., Ma, J., Zou, M., Lu, C., and Zhang, L. (2010) The stromal chloroplast Deg7 protease participates in the repair of photosystem II after photoinhibition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 152, 1263-1273.
 24. Sun, X., Peng, L., Guo, J., Chi, W., Ma, J., Lu, C., and Zhang, L. (2007) Formation of DEG5 and DEG8 complexes and their involvement in the degradation of photodamaged photosystem II reaction center D1 protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 1347-1361.
 25. Kapri-Pardes, E., Naveh, L., and Adam, Z. (2007) The thylakoid lumen protease Deg1 is involved in the repair of photosystem II from photoinhibition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 1039-1047.
 26. Kato, Y., Sun, X., Zhang, L., and Sakamoto, W. (2012) Cooperative D1 degradation in the photosystem II repair mediated by chloroplastic proteases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 159, 1428-1439.
 27. Itzhaki, H., Naveh, L., Lindahl, M., Cook, M., and Adam, Z. (1998) Identification and characterization of DegP, a serine protease associated with the luminal side of the thylakoid membrane. *J. Biol. Chem.* 273, 7094-7098.
 28. Kato, Y., and Sakamoto, W. (2009) Protein quality control in chloroplasts: a current model of D1 protein degradation in the photosystem II repair cycle. *J. Biochem.* 146, 463-469.
 29. Kley, J., Schmidt, B., Boyanov, B., Stolt-Bergner, P. C., Kirk, R., Ehrmann, M., Knopf, R. R., Naveh, L., Adam, Z., and Clausen, T. (2011) Structural adaptation of the plant protease Deg1 to repair photosystem II during light exposure. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 728-731.
 30. Mann, N. H., Novac, N., Mullineaux, C. W., Newman, J., Bailey, S., and Robinson, C. (2000) Involvement of an FtsH homologue in the assembly of functional photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* 479, 72-77.
 31. Silva, P., Thompson, E., Bailey, S., Kruse, O., Mullineaux, C. W., Robinson, C., Mann, N. H., and Nixon, P. J. (2003) FtsH is involved in the early stages of repair of photosystem II in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant Cell* 15, 2152-2164.
 32. Komenda, J., Barker, M., Kuviková, S., de Vries, R., Mullineaux, C. W., Tichy, M., and Nixon, P. J. (2006) The FtsH protease slr0228 is important for quality control of photosystem II in the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 281, 1145-1151.
 33. Barker, M., de Vries, R., Nield, J., Komenda, J., and Nixon, P. J. (2006) The deg proteases protect *Synechocystis* sp. PCC 6803 during heat and light stresses but are not essential for removal of damaged D1 protein during the photosystem two repair cycle. *J. Biol. Chem.* 281, 30347-30355.
 34. Komenda, J., Tichy, M., Prásil, O., Knoppová, J., Kuviková, S., de Vries, R., and Nixon, P. J. (2007) The exposed N-terminal tail of the D1 subunit is required for rapid D1 degradation during photosystem II repair in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant Cell* 19, 2839-2854.
 35. Akiyama, Y. (2009) Quality control of cytoplasmic membrane proteins in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 146, 449-454.
 36. Motohashi, K., and Hisabori, T. (2006) HCF164 receives reducing equivalents from stromal thioredoxin across the thylakoid membrane and mediates reduction of target proteins in the thylakoid lumen. *J. Biol. Chem.* 281, 35039-35047.
 37. Reiland, S., Messerli, G., Baerenfaller, K., Gerrits, B., Ender, A., Grossmann, J., Gruissem, W., and Baginsky, S. (2009) Large-scale *Arabidopsis* phosphoproteome profiling reveals novel chloroplast kinase substrates and phosphorylation networks. *Plant Physiol.* 150, 889-903.
 38. Stael, S., Rocha, A. G., Wimberger, T., Anrather, D., Voithknecht, U. C., and Teige, M. (2012) Cross-talk between calcium signalling and protein phosphorylation at the thylakoid. *J. Exp. Bot.* 63, 1725-1733.
 39. Kato, Y., and Sakamoto, W. (2013) Possible compensatory role among chloroplast proteases under excess-light stress condition. *Plant Signal Behav.* 8, e23198.

The Cooperative Degradation of D1 Protein in Photosystem II Repair Cycle

Yusuke Kato*, Wataru Sakamoto

Institute of Plant Science and Resources, Okayama University