

研究紹介

葉緑体ATP合成酵素の機能的多様性[§]

広島大学・大学院理学研究科・附属植物遺伝子保管実験施設
上妻馨梨*

葉緑体ATP合成酵素複合体は、その複合体の中心に位置する γ サブユニットのジスルフィド結合によって活性制御されており、光環境下ではジスルフィド結合の還元切断によって活性化されている。シロイヌナズナの γ サブユニット遺伝子は2つの*ATPC1*と*ATPC2*にコードされているが、光合成の場である葉において*ATPC2*の発現はほとんど検出されないことから、その機能は全く不明であった。本研究において、*ATPC2*は地下部で発現しており、*ATPC1*とは異なる機能を持つことが明らかになった。この結果は、葉緑体ATP合成酵素が光合成によるATPの合成だけでなく、器官別に異なる機能を持つことを示唆している。

1. はじめに

ATP合成酵素は原核生物の細胞膜、真核生物のミトコンドリア内膜、光合成生物の葉緑体チラコイド膜に存在し、電子伝達に伴って形成される膜を介したプロトンの電気化学的勾配を用いてATPを合成する。ATP合成酵素は生物種や細胞内小器官の由来に関わらず、酵素を構成するサブユニットが回転することでATPの合成/加水分解を行うというユニークな共通の動作原理で働いている。ATP合成酵素の基本構造は、膜内在のF₀部分と膜表在で球状のF₁部分の2つの複合体で構成され、それぞれのサブユニット構造と機能は、生物種を通じてほぼ保存されている¹⁾。しかし、葉緑体型

のATP合成酵素 (CF₀CF₁) には、細菌やミトコンドリア由来の酵素と大きく異なり、酵素活性はチオレドキシンを介して光制御されている。葉緑体型ATP合成酵素の回転軸である γ サブユニットには、中央付近にジスルフィド結合を形成する2つのシステイン残基 (Cys) があり、その酸化還元によって酵素活性が制御されている²⁾。この2つのシステインを含む制御領域は葉緑体型の γ サブユニットのみに特徴的なもので、制御領域を持たない細菌の γ サブユニットにこの制御領域を遺伝子的に挿入すると、酵素活性が光制御される^{3,4)}。

シロイヌナズナの葉緑体ATP合成酵素- γ サブユニットは、2種類の遺伝子*ATPC1*と*ATPC2* (At4G04640, At1G15700) によってコードされており、アミノ酸配列は73%と高い相同性を持つことが20年前にすでに報告されていた⁵⁾。しかし、*ATPC2*の発現量が極わずかであることから⁶⁾、その欠損変異体の光合成活性は野生型と変わらず、*ATPC2*の機能や生理的役割などの研究はこれまでほとんど行われていなかった。

本研究では γ 2-ATP合成酵素 (*ATPC2*由来) の機能を明らかにするために、*ATPC1*欠損変異体に*ATPC2*を過剰発現させた γ 2-ATP合成酵素優性植物体 (*gamera*) を作製し、解析することで、その新規な機能を明らかにしたので、その概要について紹介する。

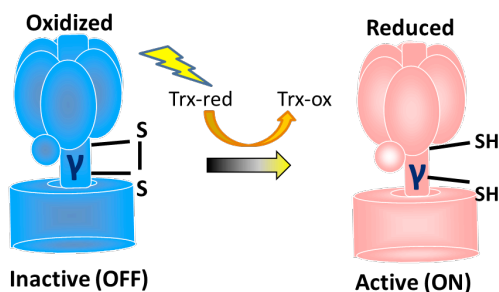


図1 光制御される葉緑体ATP合成酵素の模式図

光環境下ではチオレドキシ (Trx) を経由して γ サブユニットが還元型になり活性化する。暗黒下ではシステインがジスルフィド結合を形成し、不活性型になる。

§ 第5回日本光合成学会シンポジウム ポスター発表賞受賞論文

* 連絡先 E-mail: kohzuma@hiroshima-u.ac.jp

2. γ 2-ATP合成酵素の特性

ATPC2の機能解析を行うためにシロイヌナズナにおいて γ 2-ATP合成酵素優性な形質転換体を作製した。ATPC1にT-DNAが挿入されている*dpa1*変異体をバックグラウンドとし、*CaMV35S*プロモーターでATPC2を過剰発現させることで、全ATP合成酵素の約95%を γ 2型が占める γ 2-ATP合成酵素優性植物体 (*gamera*) を作製した。なお、野生型では葉における全ATP合成酵素の90%以上が γ 1-ATP合成酵素である。

γ 2-ATP合成酵素の特性を明らかにするために、チラコイド膜におけるカロテノイド吸収のElectrochromic Shift (ECS)を用いて*in vivo*で酵素の構造変化を見積もった。このECS解析法は、葉緑体のチラコイド膜内外に形成されるプロトンの電気化学的勾配 (*pmf*) を間接的に測定する手法である。電子伝達系によって形成された*pmf*は、主にATP合成酵素がATP合成を行う過程で解消していくため、*pmf*の挙動からATP合成酵素活性を測定することが可能である^{7,8)}。葉緑体ATP合成酵素（この場合 γ 1-ATP合成酵素を指す）の活性は光制御されており、光照射によって還元型（活性型）になった酵素はより多くのプロトンをチラコイドルーメンからストロマへ輸送する。しかし、消光後は徐々に酸化型（不活性型）へ構造を変化するためプロトンの流出は低下する。そのため、数分の光照射によって誘導された還元型ATP合成酵素、あるいは暗黒下で完全に酸化されたATP合成酵素を持つ植物葉にパルス光を照射するとチラコイド膜に*pmf*が形成され、その後、ATP合成酵素によるATP合成に伴って*pmf*は解消される。還元型のATP合成酵素を持つチラコイド膜の*pmf*解消速度は速く、酸化型では解消速度が遅くなる。野生型と*gamera*の成熟葉を用いて、光照射直後と光照射後60分間暗所に置いた場合でチラコイド膜の*pmf*解消の挙動を調査した（図2A）。光照射直後の野生型では速い*pmf*の解消が見られ、暗処理後はその解消速度は半分以下に遅くなった。一方、*gamera*では60分間以上暗黒下に置いても光照射直後と同様、速い*pmf*の解消速度を保持していることが観察された。この結果は、 γ 2-ATP合成酵素が γ 1-ATP合成酵素と異なり、光の有無によらず常に活性化状態を保持していることを示唆していた⁹⁾。

ATPC2はATPC1と同様に γ サブユニットの制御領域に2つのCysを持つ。*gamera*のチラコイド膜が暗所で高い*pmf*の解消能を持つ原因としては、 γ 2サブユニットの2つのCysがジスルフィド結合を形成しないこと、あるいは

2つのCysがジスルフィド結合しているものの何らかの理由でプロトンが漏洩しやすくなっていることの2通りが予想された。そこで、暗所における γ 2サブユニットのジスルフィド結合の有無を検証した（図2B）。検証には還元型のシステインを特異的に修飾する4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonate (AMS)を用いた。AMSと結合した還元型 γ サブユニットは酸化型 γ サブユニットに比べて電気泳動時の移動度が小さくなる。 γ サブユニットのバンドは特異的抗体によって検出した。野生型において、暗黒下では γ サブユニットは酸化型であり、光照射下 γ サブユニットは還元型であった。一方、*gamera*の γ 2サブユニットでは暗黒条件下においても還元型と同じ移動度であることが観察された。この事は、 γ 2サブユニットの制御領域に存在する2つのCysが、暗黒処理下においてもジスルフィド結合を形成できないことを示唆する⁹⁾。これらの結果から、 γ 2-ATP合成酵素は光に非感受性であり、その構造は還元型を保持することが明らかになった。

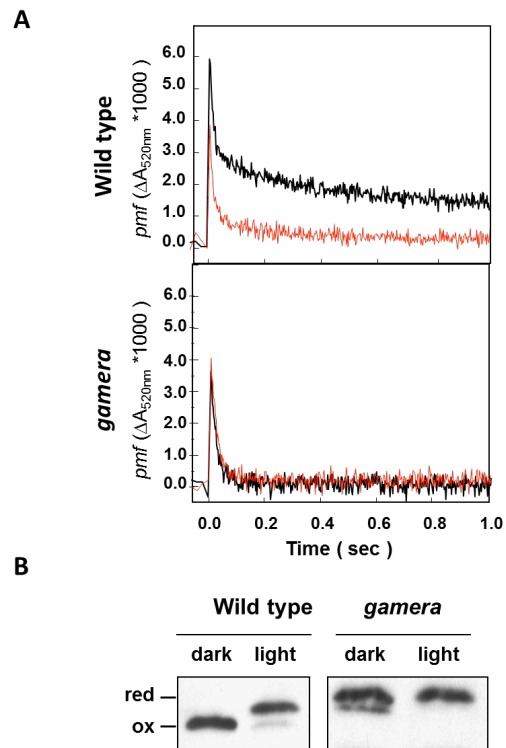


図2 γ 2-ATP合成酵素の酸化還元状態

(A) ECS解析法を用いた*pmf*解消速度の測定。赤ラインは光照射直後1分間、黒ラインは光照射後60分間暗処理し、非飽和パルス照射した後の*pmf*解消の挙動。*gamera*は暗処理後も速い*pmf*解消速度を保持した。(B) AMSラベリング法による γ サブユニットの酸化還元型の検出。*gamera*の γ 2サブユニットは暗黒処理をしても還元型を保持した。(Kohzuma et al., 2012を改変)

3. γ 2-ATP合成酵素の局在と側根形成への影響

γ 2-ATP合成酵素が暗黒下でも還元型を保持することから、光が照射されない環境下において重要な役割を持つ酵素であることが推測された。実際、*ATPC*プロモーターの局在解析を行った結果、*ATPC1*は植物全体に発現しているのに対し、*ATPC2*は葉などの地上部組織では発現せず、地下部組織、特に根と胚軸の境目に強く発現していることが明らかになった（図3A）。次に、根の形態を観察したところ、*gamera*では側根が野生型と比較して約2倍長いこと、また*ATPC2*の欠損変異体（*atpc2*）では野生型の1/3程度の長さであることが観察された⁶⁾（図3B）。これらの結果から、 γ 2-ATP合成酵素は根に近い光の微弱な環境下で発現しており、還元型（活性型）を保持することによって側根形成など光合成におけるATP合成とは異なる役割を持つことが示唆された。

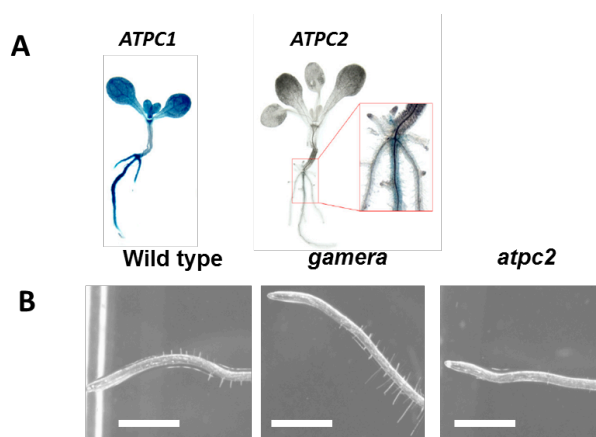


図3 *ATPC2*の局在と*ATPC2*発現量が側根形成に及ぼす影響

(A) プロモーター-GUSを用いた *ATPC1*, *2*の局在解析。*C1*は植物全体に、*C2*は地下部、特に根と胚軸の境目に強く局在することが明らかになった。(B) 野生型、*gamera*、*atpc2*の根の形態。*ATPC2*の発現量が多いほど側根伸張が観察された。スケールバーは1 mm。

4. 根における γ 2-ATP合成酵素の役割

地上部と地下部との境目の未熟なプラスチドにおいて γ 2-ATP合成酵素はどのような働きを持つのだろうか？その疑問に少しでも近づくため、*gamera*を最大4日間暗黒条件に曝し、その光合成明反応の挙動を調べた。通常、暗所に置かれた植物は光合成関連タンパク質の分解が積極的に誘導され、それと共に電子伝達活性も低下していく⁹⁾。4日間の暗黒処理で γ 1-ATP合成酵素優性である野生型のPSIIの最大量子収率（ F_v/F_m ）は50%低下したが、 γ 2-ATP合成酵素優性である

*gamera*ではほとんど低下しなかった（図4A）。この結果から*gamera*の電子伝達系が4日間の暗黒処理後も安定であることが予測されたため、PSIIタンパク質の蓄積量を観察した（図4B）。PSIIのルーメン側に局在する酸素発生複合体（OEC）を構成するOEC17、23は野生型においてその蓄積量が大きく低下したのに対し、*gamera*では非常に安定であった。一方、膜貫通タンパク質であり反応中心を構成するD1タンパク質は4日間の暗黒処理において、両者ともその蓄積量に変化は見られなかった。これらの現象から、ATP合成酵素が暗黒下で活性型であることがPSIIのタンパク質とその機能の安定性を高めていることが推測された。暗黒下において、野生型の γ サブユニット（主に γ 1）は酸化型になり酵素が不活性になるが、 γ 2-ATP合成酵素のように暗黒下において活性型を維持することは、 γ 2-ATP合成酵素が実際はATP加水分解酵素（ H^+ -ATPase）として機能している可能性を示唆する。ATP分解の過程でストロマのプロトンはルーメンへ流入するため、チラコイド膜を介したプロトン勾配つまり *pmf*の形成が推測される。そこで、 γ 2-ATP合成酵素優性である*gamera*が暗黒下で*pmf*を形成する能力を保持するかどうか検証した。チラコイド膜タンパク質が膜に移項、挿入される経路には幾つかメカニズムが存在するが、OEC17、23といったタンパク質はチラコイド膜を介して形成されるプロトン勾配、すなわち*pmf*を利用して挿入されるTwin arginine transporter (Tat) 依存型挿入経路を経由することが知られている¹⁰⁾。この機構を利用し、野生型および*gamera*の単離チラコイド膜を用いて、OEC23がチラコイド膜へ挿入される様子を *in vitro*で観察した（図4C）。その結果、暗黒下における野生型由来のチラコイド膜ではATP存在下、および還元剤であるDTT非存在下では、OEC23の挿入が起らなかったのに対し、*gamera*のチラコイド膜では挿入が起こった。Tat依存経路を要求するOEC23が膜へ挿入されたということは、 γ 2-ATP合成酵素をもつチラコイド膜に*pmf*が形成されていることを示唆しており、ATP分解によるプロトンのルーメンへの流入を意味している（図4D）。これらの結果から、チラコイド膜を介して形成された*pmf*がTat経路を含む何らかの機構によってタンパク質を安定に導き光合成活性を維持することが明らかになった（未発表）。

しかしながら、これらの現象は光合成器官である葉で観察されたものである。実際、未熟なプラスチドに

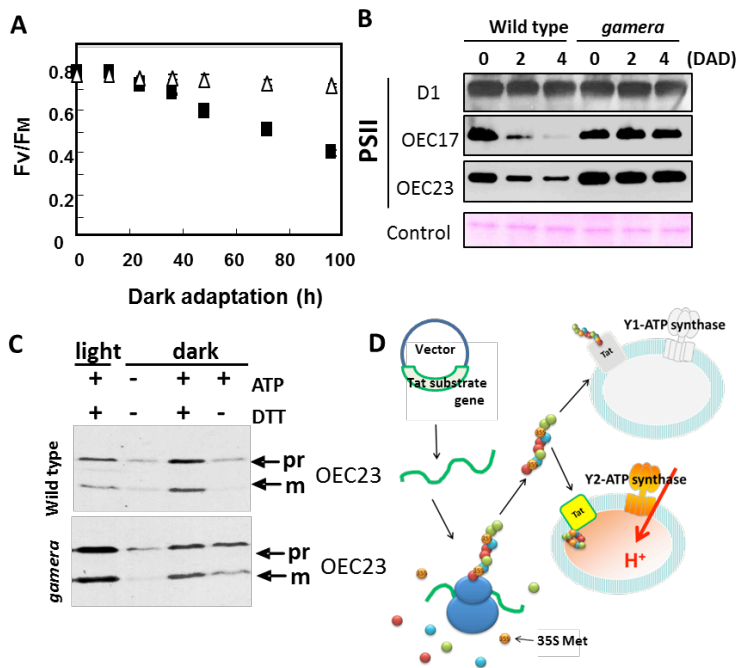


図4 暗黒処理した野生型とgamera

(A) 最大4日間暗黒処理した際のF_v/F_m。黒四角が野生型。白三角がgamera。(B) PSIIタンパク質の蓄積量の変化。野生型のOEC17、23の蓄積量低下が観察された。(C) OEC23を基質に用いたチラコイド膜への挿入実験。gameraにおいてOEC23の膜への挿入が観察された。(D) *in vitro*挿入実験における野生型とgameraのATP合成酵素特性とそれがTatタンパク質挿入に及ぼす影響をまとめた模式図。

光化学系は存在しないとされている。ただ、エチオプラストにおいてATP合成酵素 (CF₀CF₁の両方) の存在が確認されていることから¹¹⁾、ATPC2が存在するような組織のプラスチドにおいてATP合成酵素が複合体として存在し、何らかの働きを持っていてもおかしくない。未熟なプラスチドのチラコイド膜においてもタンパク質の合成と挿入は行われているはずである。そのエネルギーの担い手としてγ2-ATP合成酵素がpmfの形成に寄与しており、そのエネルギーが地下部における形態形成などに関与しているのかもしれない。

5. 今後の展望

夜間、ATP合成酵素が不活性化する理由はATP分解を抑制するためであると考えられてきた。今回、γ2-ATP合成酵素が暗所で高い活性を持つことと、それに伴うpmf形成の実態が明らかになった。その過程において、γ2-ATP合成酵素を優性に持つ植物体とγ1-ATP合成酵素を持つ野生型とを比較しても、通常生育下および長期暗黒条件下、いずれにおいても特に不利な点が見当たらない。つまり、ATP合成酵素が光制御されなければならない理由が明確に説明できないのである。ATP合成酵素はチラコイド膜における唯一のプロトンチャネルであり、プロトン濃度を調節している重要なタンパク質複合体である。今後は、ATP合成酵素が光制御されている理由をプロトン濃度調節という視点から観察し、その機能的多様性の全貌を明らかにしていきたい。

謝辞

本稿で紹介した研究はミシガン州立大学のDavid M Kramer博士の研究室在籍時に、ミュンヘン大学のJörg Meurer博士との共同研究のもと行われた。この場を借りて、二人の博士とこの研究に協力して下さった多くの方へ感謝申し上げたい。また、このような執筆の場を与えて下さった日本光合成学会および編集委員の皆様、執筆にあたりアドバイス下さった広島大学の島田裕士博士にお礼申し上げます。

Received November 2, 2014, Accepted November 15, 2014, Published December 31, 2014

参考文献

1. Capaldi, R.A. and Aggeler, R. (2002) Mechanism of the F₁F₀-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem. Sci.* 27, 154-160.
2. Groth, G. and Strotmann, H. (1999) New results about structure, function and regulation of the chloroplast ATP synthase (CF₀CF₁). *Physiol. Plant.* 106, 142-148.
3. Bald, D., Noji, H., Stumpp, M.T., Yoshida, M. and Hisabori, T. (2000) ATPase activity of a highly stable α3β3γ subcomplex of thermophilic F₁ can be regulated by the introduced regulatory region of gamma subunit of chloroplast F₁. *J. Biol. Chem.* 275, 12757-12762.
4. Kim, Y., Konno, H., Sugano, Y. and Hisabori, T. (2011) Redox regulation of rotation of the cyanobacterial F₁-ATPase containing thiol regulation switch. *J. Biol. Chem.* 286, 9071-9078.

5. Inohara, N., Iwamoto, A., Moriyama, Y., Shimomura, S., Maeda, M. and Futai, M. (1991) Two genes, *atpC1* and *atpC2*, for the gamma subunit of *Arabidopsis thaliana* chloroplast ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 266, 7333-7338.
6. Kohzuma, K., Dal Bosco, C., Kanazawa, A., Dhingra, A., Nitschke, W., Meurer, J. and Kramer, D. M. (2012) Thioredoxin-insensitive plastid ATP synthase that performs moonlighting functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 3293-3298.
7. Kanazawa, A. and Kramer, D.M. (2002) In vivo modulation of nonphotochemical exciton quenching (NPQ) by regulation of the chloroplast ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 12789-12794.
8. Kohzuma, K., Cruz, J.A., Akashi, K., Hoshiyasu, S., Munekage, Y.N., Yokota, A. and Kramer, D. M. (2009) The long-term responses of the photosynthetic proton circuit to drought. *Plant Cell Environ.* 32, 209-219.
9. Keech, O., Pesquet, E., Ahad, A., Askne, A., Nordvall, D., Vodnala, S.M., Tuominen, H., Hurry, V., Dizengremel, P. and Gardestrom, P. (2007) The different fates of mitochondria and chloroplasts during dark-induced senescence in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Environ.* 30, 1523-1534.
10. Braun, N.A. and Theg, S.M. (2008) The chloroplast Tat pathway transports substrates in the dark. *J. Biol. Chem.* 283, 8822-8828.
11. Ploscher, M., Reisinger, V. and Eichacker, L.A. (2011) Proteomic comparison of etioplast and chloroplast protein complexes. *J. Proteomics* 74, 1256-1265.

Characterization of the Novel Chloroplast ATP synthase

Kaori Kohzuma*

Lab of Plant Chromosome and Gene Stock, Hiroshima University