

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19570033  
 研究課題名（和文）  
 植物葉緑体におけるチラコイド膜を介した新たな還元力伝達機構の解明  
 研究課題名（英文）  
 Functional analysis of reducing equivalents transfer system on the thylakoid membranes  
 研究代表者  
 本橋 健(MOTOHASHI TAKESHI)  
 東京工業大学・資源化学研究所・資源化学研究所特別研究員  
 研究者番号：90301952

## 研究成果の概要：

チラコイド膜を介した還元力供給過程に関連すると考えられるシステムを明らかにするため、本研究ではこれに関連することが予想されるタンパク質の抗体作成およびそれらの抗体を用いた *in vitro* アッセイ系の構築を目指して *in vitro* での還元力伝達アッセイ実験を行った。その結果、関連することが予想されるタンパク質の抗体を用いて *in vitro* 還元力伝達アッセイ系を行った結果、チラコイド膜を介した還元力の伝達に膜因子が関与する可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2008年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

## 研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：オルガネラ、葉緑体、酸化還元制御

## 1. 研究開始当初の背景

植物の葉緑体では、光合成反応で還元力をつくりだし、葉緑体ストロマ側に NADPH などの形で還元力を蓄積する（図2）。ストロマ

側に蓄積した還元力の一部は、葉緑体ストロマに局在する Trx に受け渡され、Trx が機能する。このように、光合成が行われるような条件下のストロマには Trx が機能するのに必要な還元力が十分に存在している。これに対

して、チラコイド膜を隔てたチラコイド内腔では還元力の蓄積は知られておらず、そこには、酸化還元による調節機構が存在するか否かすら、明らかになっていない。

実際、チラコイド内腔にはNADPHなどの還元力の蓄積は見られない。ということは、チラコイド内腔のような還元力の蓄積のないところで、Trxのような酸化還元タンパク質は、存在しないし、機能しないのだろうか？私は、還元力の蓄積がなさそうなチラコイド内腔にもTrx様のタンパク質HCF164が存在し、内腔のいくつかのタンパク質の酸化還元状態が制御されることを明らかにしてきた。Trxファミリータンパク質が機能するためには、還元力の源である電子が必須である。では、チラコイド内腔に存在するTrx様タンパク質HCF164はどこから還元力（電子）を受け取っているのか？その供給源を調べてみると、それは還元力が豊富な葉緑体ストロマ側のTrxからチラコイド内腔側のHCF164へ電子が受け渡されていることがわかった(Motohashi et al. JBC (2006))。このことは、これまで知られていない葉緑体ストロマからチラコイド内腔への還元力の受け渡し経路（電子の通り道）が存在することを表している。

## 2. 研究の目的

本研究では、私のこれまでの研究から明らかになってきた葉緑体ストロマからチラコイド内腔への還元力の新しい受け渡し経路の存在について解析を行う。

具体的には、

(1) ストロマTrxからチラコイド内腔HCF164へ電子が受け渡される際、ストロマ側のTrxと内腔側のHCF164以外の因子にどのような因子が関与するのか、それともしないのか。

(2) Trx, HCF164以外に関与する因子がある場合、ない場合、共に、いったいどのようなメカニズムで膜を超えて還元力（電子）の受け渡しが行われるのであろうか。

この電子伝達経路に関わる未知因子を同定し、TrxやHCF164を含むこれらの因子がどのようなメカニズムでチラコイド膜を超えた電子伝達を行っているのかを、植物葉緑体から調製したチラコイド膜を用いて、生化学的手法で詳細に明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 単離チラコイドを用いた *in vitro* でのHCF164還元アッセイ系を用いた新規タンパク質因子の探索

還元力である電子がチラコイド膜を超えて伝達されるためには、チラコイド膜外側のTrxと内側のHCF164だけでは不可能であると予想される。そこで、本電子伝達経路には何らかのタンパク質性の因子が関与するはずであるという予想のもと、未知タンパク質因子の同定を試みた。これまで、他の生物を中心としてチオレドキシシンファミリータンパク質の電子伝達は、ジスルフィド結合の受け渡しカスケードを用いた様式が多いので、本経路もこのメカニズムが働き、還元力（電子）の受け渡しが行われると仮定して、これまでに知られているジスルフィド結合形成関連因子について評価を行った。具体的には、これら関連因子の抗体を作成し、私が構築した *in vitro* の単離チラコイド膜還元力伝達アッセイ系を用いて評価を行った（図1）。

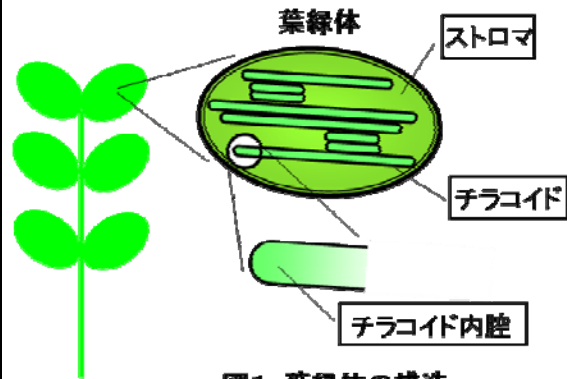
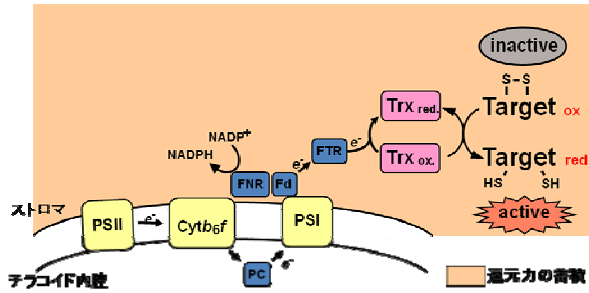


図1 葉緑体の構造

## 4. 研究成果

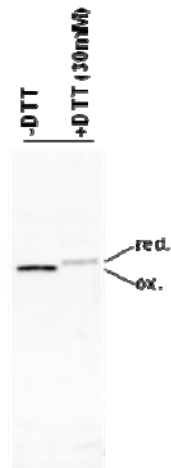
図3に示すように、還元力の蓄積がある葉緑体ストロマからどのようにチラコイド内腔へ還元力が受け渡されるかを検討した（図3）。実際、還元力供給過程に関連すると考えられるシステムを明らかにするため、本研究ではこれに関連することが予想されるタンパク質の抗体を作成した。予想される因子が6回膜貫通の膜タンパク質であるため、抗体の作成のための抗原調製に多くの労力をかけた。種々の検討結果により、封入体から精製した抗原では抗体価の高い抗体を得ることはできなかった。しかし、大腸菌膜に発現した少量のタンパク質を可溶化剤で可溶化後精製した抗原からは、抗体価が高く、本実験に用いることができる抗体を得ることができた。抗体の作成には当初予定していた



**図2 葉緑体における還元力の蓄積**  
 光合成により、ストロマ側(オレンジ部)に還元力(電子)は蓄積するが、チラコイド内腔(下部、白部)にはそういう機構は知られていない。

期間よりも時間を要したが、結果として抗体価が高く良い抗体を得ることができた。また、この抗体を用いて、チラコイド膜上でこの因子の酸化還元状態を調べることができるようになった(図3)。

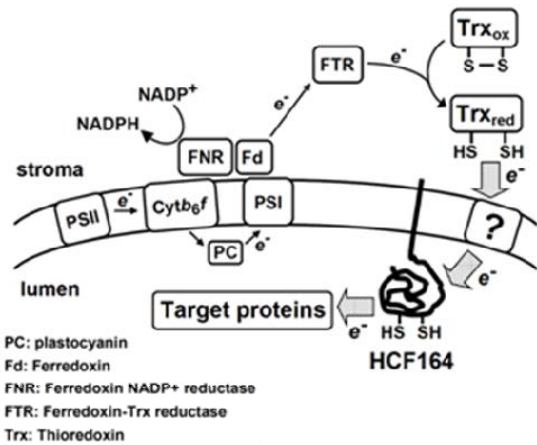
この抗体を用いて、in vitro 還元力伝達アッセイ系において、これらの関連候補タンパク質がどのような酸化還元状態を取るのか



**図3 チラコイド膜上の関連膜因子の酸化還元状態(ウェスタンブロッティング)**

詳細に調べた。また、関連することが予想されるタンパク質の抗体を用いて、この抗体が in vitro 還元力伝達アッセイ系に与える影響に関して評価を行った。

その結果、チラコイド膜を介した還元力の伝達系に、ストロマの Trx や内腔側の HCF164 以外に、チラコイド膜上の膜因子が関与する可能性が示唆された(図4)。



**図4 チラコイド膜を介した電子伝達経路のモデル**

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

①Ken Motohashi, Patrick G. N. Romano and Toru Hisabori  
 Identification of thioredoxin targeted proteins using thioredoxin single cysteine mutant-immobilized resin  
 Methods in Molecular Biology  
 479, 117-131 (2009)  
 査読あり

②Koichi Kobayashi, Nobuyoshi Mochizuki, Naho Yoshimura, Ken Motohashi, Toru Hisabori and Tatsuru Masuda  
 Functional analysis of Arabidopsis thaliana isoforms of the Mg-chelatase CHLI subunit  
 Photochemical & Photobiological Sciences7, 1188-1195 (2008)  
 査読あり

③Shoko Hishiya, Wakako Hatakeyama, Yoko Mizota, Naomi Hosoya-Matsuda, Ken Motohashi, Masahiko Ikeuchi and Toru Hisabori  
 Binary reducing equivalent pathways using NADPH-thioredoxin reductase and ferredoxin-thioredoxin reductase in the cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC 6803  
 Plant and Cell Physiology 49, 11-18 (2008)

査読あり

④ Masahiro Wakita, Shinji Masuda, Ken Motohashi, Toru Hisabori, Hiroyuki Ohta and Ken-ichiro Takamiya

The significance of type II and PrxQ peroxiredoxins for antioxidative stress response in the purple bacterium rhodobacter sphaeroides

The Journal of Biological Chemistry 282, 27792-27801 (2007)

査読あり

⑤ Akinori Ikegami, Naho Yoshimura, Ken Motohashi, Shigekazu Takahashi, Patrick G. N. Romano, Toru Hisabori, Ken-ichiro Takamiya and Tatsuru Masuda

The CHLI1 subunit of Arabidopsis thaliana magnesium chelatase is a target protein of the chloroplast thioredoxin

The Journal of Biological Chemistry 282, 19282-19291 (2007)

査読あり

[学会発表] (計4件)

① 本橋 健、久堀 徹

葉緑体チラコイド膜を介したストロマから内腔への還元力伝達機構の解明

第50回日本植物生理学会年会

2009年3月21-24日

名古屋大学東山キャンパス

② Ken MOTOHASHI, Toru HISABORI

Redox cascade through thioredoxin-family proteins in plant chloroplast

第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008)

2008年12月9-12日

神戸・ポートピア

③ 久堀 徹、本橋 健、原 怜、丸井 弘嗣、池上 陽紀、吉村 奈穂、増田 建

Physiological significance of the thioredoxin networks in chloroplasts

第30回日本分子生物学会、第80回日本生化学会 合同大会 (BMB2007) 2007.12.11-15

横浜、パシフィコ横浜

④ Ken MOTOHASHI, Masasuke YOSHIDA, Toru HISABORI

Functional analysis of the luminal thioredoxin-like protein, HCF164

The 14th International Congress of Photosynthesis

22nd-27th July 2007

Glasgow, United Kingdom

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本橋 健 (MOTOHASHI TAKESHI)

東京工業大学・資源化学研究所・資源化学研究所特別研究員

研究者番号：90301952

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし