

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570043
 研究課題名（和文） 翻訳のレドックス制御を介する光合成の環境応答の分子メカニズム
 研究課題名（英文） Molecular mechanisms of the response of photosynthesis via redox regulation of translation
 研究代表者
 西山 佳孝（NISHIYAMA YOSHITAKA）
 埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授
 研究者番号：30281588

研究成果の概要：活性酸素によるタンパク質合成（翻訳）の阻害機構、および翻訳のレドックス制御と光合成の環境応答との関係を、原核光合成生物ラン藻を用いて研究した。タンパク質合成の阻害が、活性酸素による翻訳因子 EF-G の特定のシステイン残基の酸化と、ジスルフィド結合の形成によることが明らかになった。また、このジスルフィド結合が光合成電子伝達体チオレドキシンによって還元され、EF-G が活性化することもわかり、翻訳と光合成がレドックス制御によってリンクしていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：光合成、光化学系 II、修復、活性酸素、タンパク質合成、翻訳、EF-G、ラン藻

1. 研究開始当初の背景

(1) 光化学系 II の光阻害における活性酸素の作用機構

光化学系 II の光阻害は、従来、活性酸素による光化学系 II の損傷が原因だと言われてきた。しかし近年、研究代表者らの研究によって、光阻害は、光による光化学系 II 酸素発生系の損傷と、活性酸素による光化学系 II の修復阻害が原因となって起こることが明らかになっている。さらに、活性酸素が修復に必要なタンパク質の合成を翻訳伸長の段階で抑制していることが明らかになった。

(2) 活性酸素による翻訳阻害の分子機構

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 から *in vitro* 翻訳系を作製し、活性酸素による翻訳阻害のメカニズムを生化学的に解析した。その結果、翻訳伸長反応を担う翻訳因子 EF-G の酸化が、翻訳阻害の主要因になっていることが示唆された。しかしながら、EF-G の酸化の化学的な性質や、酸化された EF-G を還元するメカニズムに関しては不明であった。また、EF-G の酸化還元（レドックス）の生理学的な意義については、*in vivo* における解析が必要であった。

2. 研究の目的

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて、活性酸素による EF-G の酸化のメカニズム、および酸化された EF-G を還元するメカニズムを明らかにし、EF-G を介した翻訳の制御機構を解明する。さらに、この翻訳のレドックス制御が光合成とどのようにリンクしているか、*in vivo* の系を用いて解明するとともに、光合成の環境応答における翻訳のレドックス制御の意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) EF-G の酸化の化学的性質の解析

EF-G の酸化が可逆的であることから、システイン残基の酸化の可能性があげられる。そこで、チオール基修飾試薬の PEG-maleimide (5 kDa) を用いて EF-G のシステイン残基を修飾した後、SDS-PAGE で分離し、レドックス状態を解析した (以下、この方法をチオール修飾法と呼ぶ)。さらに、ペプチドマッピング解析によって、酸化されたシステイン残基の同定を行った。

(2) EF-G の酸化と翻訳阻害の関係

個々のシステイン残基をセリンに改変した改変 EF-G を作製し、ラン藻 *Synechocystis* の *in vitro* 翻訳系を用いて、システイン残基の酸化と翻訳活性の関係を調べた。

(3) EF-G の酸化還元電位の測定

還元型 DTT と酸化型 DTT の割合を変えた緩衝液中で、EF-G の酸化還元状態を解析し、その酸化還元電位を測定した。

(4) チオレドキシンの相互作用

酸化型 EF-G に還元型チオレドキシソおよび DTT を加えた後、還元型への変換をチオール修飾法によって調べた。

(5) *in vivo* におけるチオレドキシソとの相互作用

NADPH-チオレドキシソ還元酵素の欠損株を用いて、細胞中の EF-G のレドックス状態を解析した。

(6) *in vivo* における EF-G のレドックス状態の解析

ラン藻を様々な光強度のもとで培養した後、細胞中の EF-G のレドックス状態を解析した。

(7) 光合成の環境応答との関係

EF-G 過剰発現株を作製して、光合成の光阻害の様子を解析した。

4. 研究成果

(1) EF-G の酸化の化学的性質

チオール修飾法を用いて酸化型 EF-G のレドックス状態を解析し、個々のシステイン残基をセリンに改変した改変 EF-G のレドックス状態と比較した。その結果、過酸化水素によって2つのシステイン残基 (Cys105 と

Cys242) が酸化されることがわかった。分子間の結合が見られなかったため、これら2つのシステイン残基間で分子内ジスルフィド結合が形成していることが示唆された。ペプチドマッピング解析によっても、これらのシステイン残基の酸化が確認された。

(2) EF-G の酸化と翻訳阻害の関係

過酸化水素で阻害させた *in vitro* 翻訳系に、各々の改変型 EF-G を添加して、翻訳活性の回復を調べた。改変体 Cys105S および Cys242S では、酸化処理を行っても、還元型と同様に翻訳活性を回復させる効果があった (図1)。しかし、その他の改変型 EF-G や野生型 EF-G では、酸化型は翻訳を回復させる能力はなかった (図1)。したがって、これらの2つのシステイン残基が酸化されると、翻訳阻害が起こることが確認された。

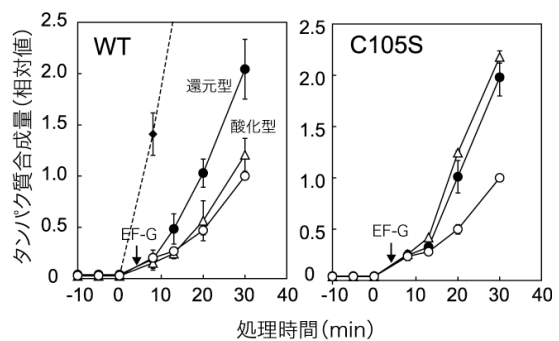


図1. EF-G の酸化還元状態と翻訳活性

過酸化水素で処理した *in vitro* 翻訳系に、還元型 EF-G または酸化型 EF-G を添加して、翻訳活性の回復をタンパク質合成能力を指標に解析した。○、過酸化水素で処理した翻訳系の翻訳活性；◆、過酸化水素で処理していない翻訳系の翻訳活性

(3) EF-G の酸化還元電位

Synechocystis の EF-G およびチオレドキシソの酸化還元電位を測定した結果、それぞれ -221 mV、-282 mV であった。これらの電位から、EF-G がチオレドキシソから電子を受け取ることが可能であることが示された。

(4) チオレドキシソとの相互作用

チオレドキシソの存在下で、EF-G のレドックス状態を解析した結果、EF-G がチオレドキシソによって還元されることがわかった。

(5) *in vivo* におけるチオレドキシソとの相互作用

NADPH-チオレドキシソ還元酵素の欠損株では、還元型チオレドキシソの割合が大きく低下していることが報告されている。この変異株と野生株において、EF-G のレドックス状態をチオール修飾法によって解析した。その結果、変異株では還元型 EF-G の割合が低下していることがわかった。したがって、

*in vivo*においても EF-G がチオレドキシンによって還元されることが明らかになった。この結果から、光合成電子伝達で生じた還元力がチオレドキシンを經由して EF-G に到達していることが示唆された。

(6) *in vivo* における EF-G のレドックス状態の解析

細胞に異なった光強度の光を照射した後、細胞中の EF-G のレドックス状態を解析した。弱光 $70 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のもとでは、EF-G は主に還元型であった。中光 $200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のもとでは、ほぼすべてが還元型になっていたが、強光 $1,500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のもとでは、一部が酸化型へと変換していた。これらの結果から、光強度が増大すると、光合成電子伝達速度が上昇して EF-G が還元されるが、強光では活性酸素が発生して、EF-G が酸化されることが示唆された。

(7) 光合成の環境応答との関係

EF-G 過剰発現株では、光化学系 II の光阻害が緩和されることが観察された。しかし、クロラムフェニコールで修復を止めた際には、この保護作用が見られなかった。したがって、過剰の EF-G によってタンパク質合成の酸化ストレス耐性が増大して、光損傷を受けた光化学系 II の修復を促進していることが考えられる。

(8) まとめ

光合成電子伝達から生じた還元力がチオレドキシンを介して EF-G を還元し、翻訳活性を促進する。しかし、強光下では、過剰の電子の蓄積から活性酸素が発生して、このレドックスシグナルを妨害し、EF-G を酸化状態にして翻訳活性を抑制する。この迅速な制御機構は、強光ストレス時において、過剰エネルギーを作り出さないための安全弁として働いていることが考えられる。

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 6 件)

- ①. Kojima, K., Oshita, M., Nanjo, Y., Kasai, K., Tozawa, Y., Hayashi, H. and Nishiyama, Y. Oxidation of elongation factor G inhibits the synthesis of the D1 protein of photosystem II. *Mol. Microbiol.*, 65(4): 936-947 (2007)査読有り
- ②. Tozawa, Y., Teraishi, M., Sasaki, T., Sonoike, K., Nishiyama, Y., Itaya, M., Miyao, A. and Hirochika, H. The plastid sigma factor SIG1 maintains photosystem I activity via regulated expression of the *psaA* operon in rice chloroplasts. *Plant J.*,

52(1): 124-132 (2007)査読有り

- ③. Allakhverdiev, S.I., Los, D.A., Mohanty, P., Nishiyama, Y. and Murata, N. Glycinebetaine alleviates the inhibitory effect of moderate heat stress on the repair of photosystem II during photoinhibition. *Biochim. Biophys. Acta*, 1767: 1363-1371 (2007)査読有り
- ④. Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y. and Allakhverdiev, S.I. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim. Biophys. Acta*, 1767: 414-421 (2007)査読有り
- ⑤. Kojima, K., Oshita, M., Hayashi, H., Nishiyama, Y. Role of elongation factor G in the inhibition of the synthesis of the D1 protein of photosystem II under oxidative stress. In *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis*, Springer, pp. 1319-1322 (2008)査読有り
- ⑥. Kojima, K., Motohashi, K., Morota, T., Oshita, M., Hisabori, T., Hayashi, H. and Nishiyama, Y. Regulation of translation by the redox state of elongation factor G in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.*, in press (2009)査読有り

[学会発表] (計 21 件)

- ①. Nishiyama, Y. Action of reactive oxygen species on the photoinhibition of photosystem II. The 14th International Congress of Photosynthesis. (2007) 7.22-27 イギリス・グラスゴー
- ②. Nishiyama, Y. Oxidative stress to photosynthesis: translation is a critical target of ROS. Department Seminar, University of Turku. (2007) 9.19 フィンランド・トゥルク
- ③. Nishiyama, Y., Kojima, K., Murata, N. and Hayashi, H. Oxidative stress to photosynthesis: protein synthesis is the primary target of inhibition by reactive oxygen species. ROS in Plants. (2007) 9.12-14 ベルギー・ゲント
- ④. Kojima, K., Oshita, M., Hayashi, H. and Nishiyama, Y. Effects of oxidative stress on the synthesis of the D1 protein of photosystem II in a cell-free translation system from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. The 5th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences. (2007) 9.28 松山
- ⑤. Oshita, M., Kojima, K., Hisabori, T., Hayashi, H. and Nishiyama, Y. Redox

- regulation of elongation factor G in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. The 5th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences. (2007) 9.28 松山
- ⑥. 西山佳孝「翻訳の酸化ストレス傷害とレドックス制御」ラン藻ゲノム研究交流会(2007) 7.14 東京
- ⑦. 西山佳孝「光合成の光阻害と酸化ストレス傷害」近畿大学学術フロンティアセミナー(2007) 10.22 奈良
- ⑧. 西山佳孝、武田祐輔、井出有紀、小島幸治、林秀則「ラン藻の酸化ストレス耐性における翻訳伸長因子 EF-G の役割」第 49 回日本植物生理学会(2008) 3.20-22 札幌
- ⑨. 小島幸治、大下将、久堀徹、林秀則、西山佳孝「ラン藻における翻訳伸長因子 EF-G の酸化還元と翻訳制御」第 49 回日本植物生理学会(2008) 3.20-22 札幌
- ⑩. 南條洋平、和田元、林秀則、西山佳孝「ラン藻の光化学系 II の高温適応に関する脂肪酸合成酵素」第 49 回日本植物生理学会(2008) 3.20-22 札幌
- ⑪. 岩井恵理、西山佳孝、林秀則「光化学系 II の光阻害に対するビタミン E の保護作用」第 49 回日本植物生理学会(2008) 3.20-22 札幌
- ⑫. 相原加奈子、西山佳孝、林秀則「*Synechococcus* sp. PCC 7002 のメタロチオネイン遺伝子のクローニングとその発現様式」第 49 回日本植物生理学会(2008) 3.20-22 札幌
- ⑬. Nishiyama, Y. Translational regulation in cyanobacteria. 日本学術振興会-埼玉大学国際シンポジウム(2008) 6.19 埼玉
- ⑭. Nishiyama, Y. Photoinhibition and repair mechanisms. 大阪大学蛋白質研究所国際シンポジウム The Ins and Outs of Chloroplasts. (2008) 10.15 大阪
- ⑮. Nishiyama, Y. Redox regulation of the translation system in cyanobacteria. The 3rd Finnish-Japanese Binational Seminar. (2008) 10.31 Helsinki, Finland
- ⑯. Nishiyama, Y. Regulation of photosynthesis by the redox state of translation in cyanobacteria. 第 31 回日本分子生物学会(2008) 12.11 神戸
- ⑰. 西山佳孝「光合成の光阻害と修復の分子機構」東京大学理学部生物科学セミナー(2009) 1.14 東京
- ⑱. 小島幸治、諸田拓哉、日原由香子、本橋健、畠山和佳子、久堀徹、林秀則、西山佳孝「シアノバクテリアの

翻訳因子 EF-G のレドックス制御」第 3 回日本ゲノム微生物学会(2009) 3.6 東京

- ⑲. 堀内真由美、中村絹、小島幸治、西山佳孝、畠山和佳子、久堀徹、日原由香子「シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における光合成電子伝達に依存的な転写因子 PedR の解析」第 3 回日本ゲノム微生物学会(2009) 3.6 東京
- ⑳. 小島幸治、諸田拓哉、日原由香子、本橋健、畠山和佳子、久堀徹、林秀則、西山佳孝「シアノバクテリアの翻訳因子 EF-G のレドックス状態を介した翻訳調節」第 50 回日本植物生理学会(2009) 3.21 名古屋
21. 堀内真由美、中村絹、小島幸治、西山佳孝、畠山和佳子、久堀徹、日原由香子「シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における光合成電子伝達に依存的な転写因子 PedR の解析」第 50 回日本植物生理学会(2009) 3.21 名古屋

〔その他〕

ホームページ

<http://www.molbiol.saitama-u.ac.jp/~nishiyama/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 佳孝 (NISHIYAMA YOSHITAKA)

埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：30281588

(2) 連携研究者

戸澤 譲 (TOZAWA YUZURU)

愛媛大学・無細胞生命科学工学研究センター・教授

研究者番号：90363267

久堀 徹 (HISABORI TORU)

東京工業大学・資源化学研究所・准教授

研究者番号：40181094