

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H00992

研究課題名(和文) 合成生物学のアプローチを導入したプロトン駆動力ネットワークの解明

研究課題名(英文) Synthetic biological approach to clarify the network of proton motive force

研究代表者

鹿内 利治 (Shikanai, Toshiharu)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：70273852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,000,000円

研究成果の概要(和文)：陸上の過酷な光環境に適応するため、被子植物はいくつか後戻りのできない選択をした。その理由を明らかにするため、合成生物学のアプローチを採り、異なる進化を選択した植物を創作した。被子植物が優秀な電子の安全弁であるFlvを捨てたことは大きな謎である。実際、被子植物へのFlv導入は、植物に変動光耐性を与える。本研究では、プラストキノンから電子を抜き取るPTOXを活用した。葉緑体ATP合成酵素のFo-リングは14のcサブユニットから成る。この数は1分子のATP合成に必要なプロトンの数を決定し、プロトン収支を決める決定的な選択であった。我々は、この数を15に変更した植物を作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の基本的な光合成反応装置は、シアノバクテリアから被子植物まで保存されているが、調節機構については、ある程度の多様性が見られる。それは、それぞれの光合成生物が異なる光環境に適応したためである。本研究は、適応装置を大きく入れ替えることにより、被子植物が何故、現在の装置を選んだのか、今まで答える手段がなかった問いに迫るものである。またその成果から、調節機構には驚くべき可塑性があり、作物の光環境ストレスに対する耐性を強化する試みにつながる可能性がある。実際、我々は、安全弁の一つであるFlvをイネに導入し、その変動光耐性の強化を報告している。

研究成果の概要(英文)：To adapt to the stressful light environments, angiosperms have made some decisions which could not be canceled. To ask the reason for the decision, we took the synthetic biological approach to create the plants which selected the different evolution. It is mysterious that angiosperms gave up the flavodiiron (Flv) protein, which is an excellent safety valve for electrons. Introduction of *Physcomitrella patens* Flv into angiosperms actually makes them more resistant to fluctuation of light intensity. In this study, we focused on another safety valve PTOX, which leaks electrons from the plastoquinone pool. In the chloroplast ATP synthase, the Fo-ring consists of 14 c subunits. This number determines how many protons are needed for the synthesis of a molecule of ATP. Because it affects the total proton budget in chloroplasts, this was also a definitive design of eukaryotic photosynthetic machinery. We created the tobacco plants with a ring consisting of 15 c subunits.

研究分野：植物生理学

キーワード：光合成 葉緑体 電子伝達 サイクリック電子伝達 PTOX ATP合成酵素

## 1. 研究開始当初の背景

光は光合成を駆動するために必須であるが、過剰な光エネルギーの受容は、活性酸素の生成を介して光合成装置を破壊する。植物は、この光傷害を回避するため、チラコイド膜ルーメンの酸性化をモニターすることで光の過剰を感知し、光合成電子伝達にブレーキをかける。被子植物は、陸上の過酷な光環境に適応するため、様々な光の利用効率の調節メカニズムを進化させてきた。それらは単一に機能するだけでなく、相互に影響し合い、複雑なネットワークを形成している。この光環境適応機構をネットワークとして捉える視点は、ごく最近生まれたものであり、その理解は、十分ではない。

光合成の基本装置は、シアノバクテリアから被子植物まで高く保存されているが、この光合成調節ネットワークを司る装置には、ある程度多様性が見られる。被子植物が、何故現在の装置を選んだのか、不明な点が多い。例えば、被子植物は優秀な電子の安全弁である Flv (Flavodiiron タンパク質) をその進化の初期に失い、PGR5 (PROTON GRADIENT REGULATION 5) タンパク質に依存するサイクリック電子伝達を使ってチラコイド膜ルーメンを酸性化し、そのことでシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体での電子伝達のブレーキ (photosynthetic control) を強化する戦略を選んだ。しかしながら、我々は、シロイヌナズナとイネを用いて、Flv が PGR5 に機能の大部分を代替可能であり、Flv を導入した組換え植物は、非組換えの野生型植物より優れた面をもつことを報告している。合成生物学的なアプローチの採用により、光合成制御の主要なメンバーを入れ替えることにより、現存の植物が何故この進化を選択したのか、さらには、現在の植物の光環境適応能力を環境に再適応させることで、向上させることができるのか、それらの問いに答えるヒントが得られるかもしれない。

## 2. 研究の目的

ATP 合成酵素は、葉緑体において ATP を産み出す装置である。ATP 合成には、Fo-リングと呼ばれる部分の回転が必要であるが、それをもたらすのがチラコイド膜を介したプロトン駆動力である。プロトン駆動力は、プロトン濃度勾配と膜電位差から成る。そのうちプロトン濃度勾配は、ATP 合成のみならず、チラコイド膜ルーメンの酸性化を介して電子伝達にブレーキをかける (photosynthetic control)。したがって、プロトン駆動力の大きさだけでなく、その成分 (プロトン濃度勾配と膜電位差) の比の調整が、植物の光環境適応を決めている。近年、チラコイド膜に局在するイオンチャネルやトランスポーターの解析から、成分制御の重要性が明らかになりつつある。

陸上の過酷な光環境に適応する植物の進化において、プロトン駆動力制御のメカニズムについて、何度か引き返すことのできない選択が行われた。本研究は、合成生物学のアプローチを用いて、植物が進化の過程で選択しなかった戦略をとる植物を創作する。その人工的な光合成制御を行う植物を解析することで、現在の植物がもつ制御システムが選ばれた理由を明らかにすることを目的とする。特に、被子植物が採用しなかった電子の安全弁 (PTOX は、プラスとキノールから電子を引き抜き、酸素を水まで還元する) の活用と葉緑体が決めた ATP 合成のプロトン収支 (1 分子の ATP の合成にプロトンが幾つ必要か?) の改変という大きな進化の変更に対する植物の応答を調べる。

## 3. 研究の方法

光合成生物にとって大変危険なのは、電子伝達回路の内部、特に光化学系に過剰な電子が蓄積することである。この問題を解決する能力を持つのが、回路から電子を引き抜き、電子の安全弁としての働きである。CrPTOX2 は、単細胞緑藻クラミドモナスにおいてプラストキノンから電子を効率よく抜き取り、酸素を水まで還元し、Flv 同様、電子の安全弁として機能しうる。シロイヌナズナも PTOX をもち、それは葉緑体の分化のごく初期に酸化型のプラストキンを供給することで、カロテノイドを合成するのに必要である。しかし、電子の安全弁としての機能は限定的であることが、我々の研究を含めて報告されている。シロイヌナズナでは、その機能は、皆無と言っても良い。そこで、被子植物において強い電子の安全弁の影響を調べるため、CrPTOX2 遺伝子を単離し、シロイヌナズナの野生株および変異株に導入した。サイクリック電子伝達は、プロトン駆動力の大きさを調節するものであり、PGR5 タンパク質と NDH 複合体に依存する二つの経路がある。野生株に加えて、それぞれを欠損する変異株を CrPTOX2 を導入する標的として選んだ。

ATP 合成酵素は、プロトン駆動力の最大の消費者であり、光合成駆動時に、その活性を制御することは、チラコイド膜ルーメンの pH を適切に保つことで、電子伝達速度を制御するために重要である。1 分子の ATP の合成にプロトンが幾つ必要かは、酵素の回転部分 (Fo-リング) を構成する c サブユニットの数で決まり、葉緑体の場合は 14 である。バクテリアにおいて、c サブユニ

ット遺伝子に変異を入れることで、Fo-リングを構成する c サブユニットの数を変更する技術が確立している。本研究では、この技術をタバコに導入し、葉緑体形質転換により c15 のリングをもつタバコを創り上げた。

#### 4. 研究成果

1) シロイヌナズナ野生株およびサイクリック電子伝達を欠損する *pgr5* 変異株に *rbcS* プロモーターに繋いだ *CrPTOX2* 遺伝子を導入した。形質転換体は通常の生育を示したが、光照射直後に光化学系 の高い電子伝達活性が見られた。これは、*CrPTOX2* が電子の安全弁として、光合成始動時に、電子の受け皿として機能するからである。この電子移動に連動して、光化学系 の働きにより、チラコイド膜を介してルーメンにプロトンが取り込まれる。これに伴い、野生株背景だけではなく、*pgr5* 変異株背景においても、野生株を上回る一過的な NPQ の誘導が観察された。このことは、*CrPTOX2* に依存した電子の動きが、一過的にルーメンを酸性化していることを示している。

一方で、光化学系 のスペシャルペアクロロフィルである P700 は、*pgr5* 変異株同様、強く還元されたままであった。この結果の解釈は難しいが、*CrPTOX2* の導入により、NPQ の誘導がむしろ亢進されたことから、チラコイドルーメンは、十分に酸性化されたものと考えられる。したがって、シトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体の活性を抑制 (photosynthetic control) は、誘導されていることが推察される。

この結果から、PGR5 依存のサイクリック電子伝達が、ルーメンの酸性化を介して photosynthetic control を誘導する以外に、電子のプールを光化学系 の受容側からプラストキノンプールに移す機能があることを提唱した。これをアクセプター側制御と呼ぶ。これまで、アクセプター側制御は、ATP と NADPH の合成バランスを保つことで、光化学系 からの受容体 (NADP<sup>+</sup>) を確保するモデルが考えられてきたが、この一部修正を提案した。

2) 同じ *CrPTOX2* のコンストラクトを NDH 複合体を欠損するシロイヌナズナ *crr2* (*chlororespiratory reduction 2*) 変異株に導入した。*CrPTOX2* は、NDH 複合体の逆反応 (大きなプロトン駆動力の存在下で、プロトンをチラコイド膜から排出する) と思われる機能以外は相補した。特に、P700 は酸化されており、NDH 複合体のアクセプター側制御における機能は、小さいものであることが明らかになった。

また、*CrPTOX2* を野生型、*pgr5* および *crr2* 背景に導入した植物の変動光に対する応答を調べた。*pgr5* 背景では、変動光により光化学系 が深刻な光傷害を受け、PGR5 のアクセプター側制御の生理的な重要性が確認された。一方、*crr2* 背景では、変動光の弱光時において光化学系 の電子受容側での電子伝達律速が観察され、NDH 複合体の弱光での機能が示された。しかし、この機能は、変動光から光化学系 を守るには、それほど重要でないことも明らかになった。二つサイクリック電子伝達経路は、変動光下において、異なる光強度で機能を発揮していることが示された。

3) タバコは本来 c14 の Fo-リングをもつが、c13 の Fo-リングをもつタバコの作出を試みた。しかし、植物はアルピノになってしまった。一方、c15 リングをもつタバコは、野生株と変わらない光合成による生育を示した。このことに合致して、光合成電子伝達パラメータの光強度依存性も野生株と変わらなかった。SDS-PAGE により、このタバコの Fo-リングが、c14 をもつ野生株のものより大きくなっていることを確認した。

このタバコでは、大きな Fo-リングを回すため、ATP 合成酵素を通過するプロトンの速度 ( $v_{H^+}$ ) が増加していた。 $v_{H^+}$  の増加は、主にプロトン駆動力の増加によるものであった。プロトン駆動力の増加は、膜電位成分の増加によるものであり、プロトン濃度勾配の大きさは、野生株と変わらなかった。このことは、電子伝達に過剰なブレーキをかけないために重要である。

植物は、Fo-リングの増大という基本光合成装置の変更に対して驚くべき可塑性を示した。その可塑性は、チラコイド膜を介したプロトン以外のイオンの動きを制御することでもたらされていることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Zhou Qi, Wang Caijuan, Yamamoto Hiroshi, Shikanai Toshiharu	4. 巻 188
2. 論文標題 PTOX-dependent safety valve does not oxidize P700 during photosynthetic induction in the Arabidopsis <i>ptox5</i> mutant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1264 ~ 1276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiab541	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Basso Leonardo, Sakoda Kazuma, Kobayashi Ryouhei, Yamori Wataru, Shikanai Toshiharu	4. 巻 189
2. 論文標題 Flavodiiron proteins enhance the rate of CO <sub>2</sub> assimilation in Arabidopsis under fluctuating light intensity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 375 ~ 387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiac129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kato Yoshinobu, Odahara Masaki, Shikanai Toshiharu	4. 巻 12
2. 論文標題 Evolution of an assembly factor-based subunit contributed to a novel NDH-PSI supercomplex formation in chloroplasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24065-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamamoto Hiroshi, Shikanai Toshiharu	4. 巻 184
2. 論文標題 Does the Arabidopsis proton gradient regulation5 Mutant Leak Protons from the Thylakoid Membrane?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 421 ~ 427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.20.00850	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okegawa Yuki, Basso Leonardo, Shikanai Toshiharu, Motohashi Ken	4. 巻 184
2. 論文標題 Cyclic Electron Transport around PSI Contributes to Photosynthetic Induction with Thioredoxin f	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1291 ~ 1302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.20.00741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Basso Leonardo, Yamori Wataru, Szabo Ildiko, Shikanai Toshiharu	4. 巻 184
2. 論文標題 Collaboration between NDH and KEA3 Allows Maximally Efficient Photosynthesis after a Long Dark Adaptation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 2078 ~ 2090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.20.01069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamamoto Hiroshi, Sato Nozomi, Shikanai Toshiharu	4. 巻 62
2. 論文標題 Critical Role of NdhA in the Incorporation of the Peripheral Arm into the Membrane-Embedded Part of the Chloroplast NADH Dehydrogenase-Like Complex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1131 ~ 1145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa143	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Higashi Haruka, Kato Yoshinobu, Fujita Tomoya, Iwasaki Shintaro, Nakamura Masayuki, Nishimura Yoshiki, Takenaka Mizuki, Shikanai Toshiharu	4. 巻 62
2. 論文標題 The Pentatricopeptide Repeat Protein PGR3 Is Required for the Translation of petL and ndhG by Binding Their 5' UTRs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1146 ~ 1155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa180	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhou Qi、Yamamoto Hiroshi、Shikanai Toshiharu	4. 巻 192
2. 論文標題 Distinct contribution of two cyclic electron transport pathways to P700 oxidation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 326-341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiac557	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamamoto Hiroshi、Cheuk Anthony、Shearman Julia、Nixon Peter J、Meier Thomas、Shikanai Toshiharu	4. 巻 192
2. 論文標題 Impact of engineering the ATP synthase rotor ring on photosynthesis in tobacco chloroplasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1221-1233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiad043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Toshiharu Shikanai and Caijuan Wang
2. 発表標題 Regulatory network of proton motive force in chloroplasts
3. 学会等名 30th International Conference on Arabidopsis Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshinobu Kato and Toshiharu Shikanai
2. 発表標題 The chloroplast NDH complex: Evolution of assembly and supercomplex formation with PSI
3. 学会等名 JPN-US Binational Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiharu Shikanai
2. 発表標題 Molecular mechanism for the proton budget homeostasis
3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Regulation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Toshiharu Shikanai	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Regulation of photosynthesis by cyclic electron transport around photosystem I.	5. 総ページ数 30
3. 書名 Advances in Botanical Research 96	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
英国	Imperial College London		