

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月11日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20370022

研究課題名（和文）蛋白質の原子構造情報を活用した植物のレドックス代謝機能の制御

研究課題名（英文）Regulation of plant redox metabolic function based on the atomic structure of proteins

研究代表者

長谷 俊治 (HASE TOSHIHARU)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：00127276

研究成果の概要（和文）：植物の炭素・窒素・硫黄の無機物同化の代謝ネットワークの酵素群と電子キャリアーであるフェレドキシンから構成される電子伝達複合体の成り立ちを、生化学的手法と構造生物学的手法により明らかにするとともに、それぞれの酵素蛋白質のノックアウトやノックダウン植物を作製して、個体レベルでのレドックス代謝系の駆動状況を解析した。その結果、光合成のレドックス代謝の分子装置の作動機構に電子分配の観点から新知見を提出した。

研究成果の概要（英文）：Formation of electron transfer complexes of ferredoxin and ferredoxin-dependent redox enzymes involved in carbon, nitrogen and sulfur assimilation has been studied through biochemical and structural biological analyses. Knock-out and knock-down plants of the corresponding enzymes and ferredoxin were also produced to study their functions at in vivo level. Combined results give a new insight into the electron partitioning via the molecular machineries of ferredoxin and related enzymes in photosynthesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：蛋白質、植物、光合成、代謝

## 1. 研究開始当初の背景

研究開始当初は、電子キャリアーであるフェレドキシン (Fd) 依存性の酸化還元酵素・蛋白質群を、植物体の組織抽出物や葉緑体画分から Fd に対する親和性を利用して取り出し、得られた分画をプロテオーム解析し、ゲ

ノム情報を利用して分子種の網羅的同定を行っていた。高等植物では Fd が遺伝子ファミリーを形成しており、植物組織ごとのパートナー酵素群との組み合わせにおいて、機能の差異があることも見出していた。この Fd 分子種別やプラスチド種類別の解析により、

植物体全体の状況を把握することが重要だと考えていた。具体的には、Fd:NADPH酸化還元酵素 (FNR)、亜硫酸還元酵素 (SiR)、亜硝酸還元酵素 (NiR)、グルタミン酸合成酵素 (GOGAT)、及びそれとサイクルを形成して働くグルタミン合成酵素 (GS)について、生化学的解析や構造解析を行うため、組換え分子の発現・精製、結晶化を行ない、結晶構造解析やNMR解析の結果により本研究課題の主軸となる知見を得つつあった。植物のレドックス代謝系のネットワークの構成員である個々の蛋白質がどのように組み合わされて分子マシナリーが出来上がっているのかを、またそれらがどのように生体反応を駆動するのかを、*in vitro*での機能評価を行うとともに、植物の代謝系の駆動状況を解析して、生理的状況下での作動原理を明らかにする段階に進むことを目指して、本研究提案を行ったものである。

## 2. 研究の目的

植物の独立栄養機能を分子レベルで理解し、制御機構を解明する研究は、ポストゲノムやプロテオミクス時代の基礎植物科学の重要課題であると再認識されている。その知見は応用的観点からも波及効果が大い期待される。本研究は、光合成の同化機能を司る酵素・蛋白質群を研究対象とした。そして、植物生化学と構造生物学に十分な実績を持つ研究者が連携して、蛋白質の構造・機能研究の知見を植物個体レベルに適用して新たな研究を展開することを目指して、プラスチドのレドックス代謝の制御機構を明らかにしたものである。具体的には、炭素・窒素・硫黄の無機物同化の代謝ネットワークの酵素群に光還元力を供給する電子伝達複合体の構造をこれまで明らかにして来ているので、それに基づく新しい分子装置を作製して *in vitro*での機能評価を行うとともに、それを導入した形質転換植物の代謝系の駆動状況を解析して、生理的状況下での作動原理を明らかにしたものであった。そして、本研究を蛋白質の構造生物学から個体の生理学にまたがる学際領域の植物科学研究として位置づけて、研究成果を発信しようとするものである

## 3. 研究の方法

(1) 分子レベルの研究では、多くの改変体を葉型の Fd と FNR、根型の Fd と FNR、NiR、SiR、GOGAT で作製し、順次解析を進めた。Fd/SiR と Fd/GOGAT の共結晶にも取り組んだ。その中で Fd と FNR を人工的に

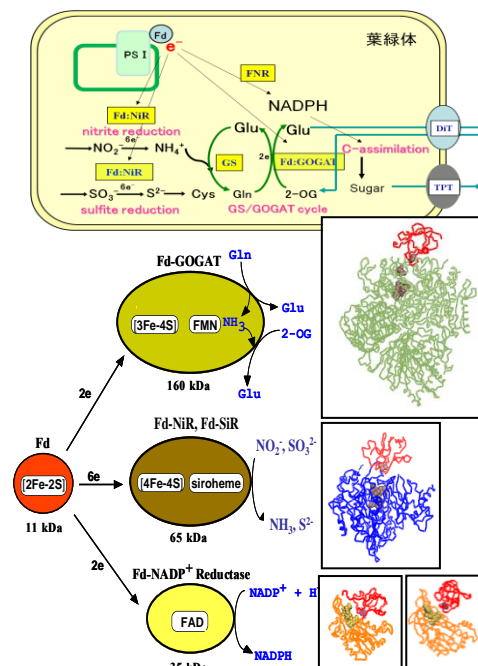
融合させた分子種も作製し、Fd と FNR の配向位置と電子伝達を解析できる系も立ち上げた。これらの電子伝達複合体については X 線結晶構造解析を行うとともに、その知見をもとに、分子間相互作用領域の部位特異的改変を行い、分子間相互作用を生化学的に検証する実験も行った。

(2) 個体レベルの研究については、アラビドプシスを用いて、RNAi 植物や T-DNA 挿入変異植物の作製やスクリーニングを行った。葉型の Fd をノックダウンした株、2種類の FNR のうち一方の欠損株、トウモロコシ FNR を新たに導入した株を作製して、葉緑体での局在性、光合成電子伝達鎖の駆動状況や還元力の炭素・窒素同化への配分比率を解析した。

## 4. 研究成果

植物の光合成で生じる強い還元力は、電子キャリアー蛋白質であるフェレドキシン (Fd) を電子供与体とする炭素、窒素、硫黄等の同化を司るレドックス代謝ネットワークに供給される。この物質同化の特性とそれを支える酵素蛋白質の作動原理を、電子の分子間授受と葉緑体内での還元力の分配機構という切り口から解明することを目指して研究に取り組んで来た。

下図にその概要と、各種酵素と Fd との蛋白質複合体の構造を示している。これらはすべて、本グループが明らかにした、あるいは決定中のものである。



以下にその成果を具体的に記した。

### (1) 分子レベルの基礎的研究

①Fd:NADPH酸化還元酵素(FNR)、亜硫酸還元酵素(SiR)、グルタミン酸合成酵素(GOGAT)は、Fdとの間で電子伝達複合体を作り、その際には酸化還元中心間の距離は6Å-18Åとなって電子の授受が直接行なわれる。

②Fdは多くの酵素との分子間相互作用領域を分子表面に広く備えている。一方、酵素群は分子サイズがFdよりはるかに大きく酸化還元中心の種類も多様であり、共通したFdの結合モチーフはない。酵素毎に特有の結合部位が存在して、Fdと複合体を形成すると考えられる。

③葉緑体内でのFdの濃度は数10μMから100μMである。電子授受のパートナーとなる酵素群の総量は、Fdと同程度かそれ以上であると見積られる。Fdがまんべんなく酵素群に行き渡るわけではないので、各々の酵素が電子キャリアーをめぐる競争関係にあると推定される。

④Fdと酵素の複合体の解離定数は酵素ごとに異なるが、数μMから数10μMの範囲内にあり、全体として比較的弱い相互作用である。酵素側にFdとの親和性に変化が生じる状況が葉緑体内で起こるならば、レドックス代謝を駆動している電子分配に大きな影響が生じる。

⑤GOGATはグルタミン酸合成酵素(GS)と酵素サイクルを構成しており、アンモニアを炭素骨格である2-OGを受容体としてアミノ酸へ取り込む。このサイクルは炭素・窒素同化の連結点にあり、還元力供給が同化バランスを制御する重要な要因となっている。

### (2) 個体レベルの研究

①3種類のFdイソ蛋白質を個々にノックダウンしたArabidopsisを作製した。存在量が多いFd分子種のノックダウン株では成長が遅延したが、レドックスパートナーの一つであるFNRの発現量は大きな変動は無かった。複数のレドックス代謝系への電子分配の度合いやその調節の仕組みの解析を行った。

②葉型2種類のFNRが欠損した変異体では明瞭な表現型は認められないが、光合成電子伝達鎖の駆動状況や還元力の炭素・窒素同化への配分比率が変化している。窒素栄養が制限された生育条件下では、この変異体のバイオマスが多くなる。野生型では窒素栄養状況に応じて炭素同化のダウンレギュレーションが働くが、FNR欠損によりレドックスバ

ランスが崩れて制御能が低下するとの仮説を提案した

③トウモロコシでは葉型FNRに3種類のアイソザイムがあり、それぞれ葉緑体内での存在部位がチラコイド膜とストロマで異なる。シロイヌナズナにこのアイソザイム遺伝子を導入してヘテロガスに発現させたFNRの葉緑体内局在性を調べ、トウモロコシの場合と類似する性質を示した。この存在部位を規定している領域がFNR分子のN末端領域にある可能性が考えられたので、この領域を繋ぎ換えたキメラ分子種を作製し、シロイヌナズナの形質転換系で局在を調べてこのN末端領域仮説がほぼ正しいことを結論した。

### 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13件)

- 1) Sakakibara Y., Kimura H., Iwamura A., Saitoh T., Ikegami T., Kurusu G., and Hase T. (2012) A new structural insight into differential interaction of cyanobacterial and plant ferredoxins with nitrite reductase as revealed by NMR and X-ray crystallographic studies. *J Biochem.* 151, 483-492  
DOI: 10.1093/cjb/mvs028、査読有
- 2) Shinmura K., Muraki N., Yoshida A., Hase T., and Kurusu G. (2012) Crystallization and preliminary X-ray studies of an electron-transfer complex of ferredoxin and ferredoxin-dependent glutamate synthase from the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Acta Crystallographica Section F*, 68, 483-492  
DOI: 10.1107/S1744309112003387、査読有
- 3) Lee Y.-H., Ikegami T., Standley D.M., Sakurai K., Hase T., and Goto Y. (2011) Binding energetics of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase with ferredoxin and its relation to function. *ChemBioChem*, 12, 2062-2070  
DOI: 10.1002/cbic.20100189、査読有
- 4) Voss I., Goss T., Murozuka E., Altman B., McLean K.J., Rigby S.E.J., Munro A.W., Scheibe R., Hase T., and Hanke G.T. (2011) FdC1, a novel ferredoxin protein capable of alternative electron partitioning, increases in conditions of acceptor limitation at PSI. *J. Biol. Chem.* 286, 50-59  
DOI: 10.1074/jbc.M110.161562、査読有
- 5) Hanke G.T., Satomi T., Shinmura K., Takao T., and Hase T. (2011) A screen for potential ferredoxin electron transfer partners uncovers new, redox dependent interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1814, 366-374  
DOI: 10.1016/j.bbabs.2010.09.011、査読有
- 6) Kimata-Arigo Y., Sakakibara Y., Ikegami T.,

and Hase T. (2010) Electron transfer of site-specifically cross-linked complexes between ferredoxin and ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase. *Biochemistry*, 49, 10013-10023  
DOI: 10.1021/bi100855a、査読有

- 7) Terauchi AM., Lu SF., Zaffagnini M., Tappa S., Hirasawa M., Tripathy JN., Knaff DB., Farmer P.J., Lemaire SD., Hase T., and Merchant SS. (2009) Pattern of expression and substrate specificity of chloroplast ferredoxins from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 284, 25867-25878  
DOI: 10.1074/jbc.M109.023622、査読有
- 8) Hanke GT. and Hase T. (2008) Variable photosynthetic roles of two leaf type ferredoxins in Arabidopsis, as revealed by RNA interference. *Photochem. Photobiol.* 84, 1302-1309  
DOI: 10.1111/j.1751-1097.2008.00411.x、査読有
- 9) Hanke G.T., Endo T., Satoh F., and Hase T. (2008) Altered photosynthetic electron channeling into cyclic electron flow and nitrite assimilation in a mutant of ferredoxin:NADP(H) reductase. *Plant Cell Environ.* 31, 1017-1028  
DOI:10.1111/j.1365-3040.2008.01814.x、査読有

[学会発表] (計 23 件)

- 1) 金宙妍、フェレドキシンと亜硫酸還元酵素の電子伝達複合体の構造と分子間相互作用の解析、第84回日本生化学会大会、2011.9.22、国立京都国際会館
- 2) 長谷俊治、植物葉緑体のレドックスネットワークの分子基盤と光合成機能の制御、岡崎統合バイオサイエンスセンター10周年記念シンポジウム、2010.2.11、岡崎コンファレンスセンター
- 3) Hase T.、Structural basis for molecular recognition of Fd and Fd-dependent proteins。Arnon Centennial Symposium、2010.1.7-8、Asilomar Conference Ground, California, USA
- 4) 長谷俊治、フェレドキシンからの電子分配のダイナミクス、学術創成シンポジウム光合成研究の道標-現在地と地平の先-、2009.7.10、京都大学
- 5) Hase T.、Structural basis for redox cascades in chloroplasts and nonphotosynthetic plastids、*Chloroplast Biology*、2008.9.25-26、中央研究院、台北

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長谷 俊治 (HASE TOSHIHARU)  
大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号 : 00127276

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

栗栖 源治 (KURISU GENJI)  
大阪大学・蛋白質研究所・教授  
研究者番号 : 90294131