

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82641

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06695

研究課題名（和文）植物の電子受容体NADP再生ボトルネックの解明 なぜ夜間に減少するのか？

研究課題名（英文）Elucidating the bottleneck of NADP regeneration in plants

研究代表者

橋田 慎之介（Shin-nosuke, Hashida）

一般財団法人電力中央研究所・サステナブルシステム研究本部・上席研究員

研究者番号：60516649

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は葉緑体NADP+減少メカニズムの解明とNADP+再生経路の同定を目的として実施した。葉緑体NADP+減少に関わる活性特性および代謝解析から、光遮断後のNADP+ 脱リン酸化（NADPP）によってNADP+が減少する事を明らかにした。NADP+の増加と減少に関わる両酵素の活性特性解析によって、葉緑体のNADP+量がストロマpH変化に応答したリン酸化と脱リン酸化によって調節されるメカニズムを新たに見出した。さらに、分取精製した活性濃縮画分に含まれるタンパク質のアミノ酸配列を決定し、新規のNADPP酵素として関連タンパク質を同定し、それらのシロイヌナズナ変異体も併せて同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光合成の最終電子受容体であるNADP+は光条件によってその量変動するが、そのメカニズムは不明であり、NADP+とNADPHの総量であるNADPプールサイズの増加と減少の両面からの研究が必要であった。本研究では初めてNADPプールサイズ減少に関わる経路の同定に成功し、光依存性のpH変化に応答してNADPプールサイズが制御されるメカニズムを新たに提唱した。光エネルギーの入力強度に応じて出力が調節される仕組みの一旦が明らかになったことで、NADPプールサイズの調節によって光合成エネルギー収支を最適化できる事が示唆され、最適化に関わる植物育種戦略としても有望である可能性が見出された。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted to elucidate the mechanism of chloroplast NADP+ reduction and to identify the NADP+ regeneration pathway. Investigation of enzymatic properties and metabolic analysis involved in chloroplast NADP+ decrease revealed that NADP+ is converted to NAD+ by NADP+ dephosphorylation (NADPP) after shading. By characterizing the activities of both enzymes involved in the increase and decrease of NADP+, we have discovered an adjustment of chloroplastic NADP+ levels by phosphorylation and dephosphorylation in response to stromal pH conditions. Furthermore, the amino acid sequences of the proteins in the purified active fractions were determined, and the related proteins were identified as novel NADPP enzymes, together with their Arabidopsis mutants.

研究分野：植物生理学

キーワード：NADP+ NAD+ NADP+脱リン酸化 NAD+リン酸化 ストロマ pH NADK NADPP

1. 研究開始当初の背景

光合成は、電子伝達によって光を化学エネルギー (ADP → ATP, NADP⁺ → NADPH) に変換する反応である。光があると最終電子受容体である NADP⁺は速やかに増加し、一定時間 (数十分) のあいだ光がないと速やかに減少する。すなわち、積極的な葉緑体 NADP のプールサイズ (NADP⁺と NADPH の総和) 制御が行われている。しかし、このプールサイズ制御の意義や関わる経路の実態は不明である。申請者は、葉緑体 NADP プールサイズ制御を光合成の最適化システムの重要なモジュールの1つとして位置付けており、葉緑体への NADP⁺合成の前駆物質輸送メカニズムおよび合成と分解制御メカニズムの解明が重要である事を提唱している。

2. 研究の目的

本研究は、将来的には光合成エネルギー収支を最適化するシステムの解明をゴールとして、葉緑体 NADP プールサイズ制御機構の全容解明を目指すものである。そのため、本研究では「NADP⁺減少メカニズムと NADP⁺再生経路の解明」を目的とする。

3. 研究の方法

本研究ではシロイヌナズナを材料として、夜間の葉緑体 NADP⁺減少メカニズムと昼間の NADP⁺再生経路を明らかにする。暗条件で NADP プールの減少時に NAD プールが増加する結果を得ており、脱リン酸化反応の存在が示唆されている。はじめに、葉緑体に NADP⁺脱リン酸化酵素 (NADPP) の活性が存在するか否かを明らかにすることで NADP⁺減少に関与する酵素活を推定し、その結果に基づいてタンパク質を単離・同定して反応経路の特定を目指す。

4. 研究成果

(1) 葉緑体の NADP プールは、暗条件だけではなく光化学系阻害剤によって光依存性の電子伝達を阻害した時にも減少する事を見出した。その際、NAD プールが増加する事を明らかにした。葉緑体 NADP プールは光化学系の電子伝達活性に応答して調節される可能性が示唆された。

(2) 単離葉緑体の破碎液中に NADPP 活性が存在する事を明らかにした。さらに、NADPP は酸性から中性で高い活性を示し、アルカリ性では活性が消失する pH 特性を持つことを明らかにした (図 1)。NADP を合成する NAD リン酸化酵素 (NADK) はアルカリ性で高い活性を示すことから、NADP プールサイズが pH 環境によって NAD と NADP の相互変換されることで可逆的に調節されるメカニズムを見出した。

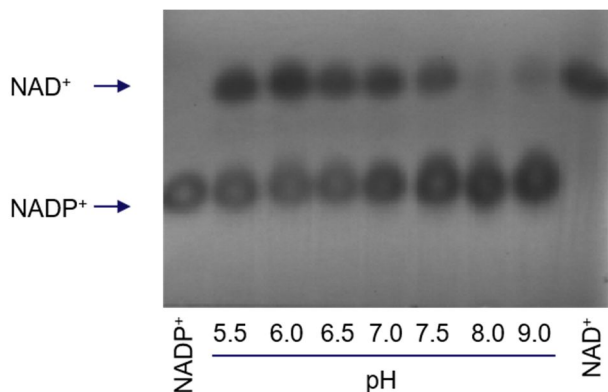


図 1. pH 依存性 NADPP 活性

(3) 上記の活性特性を指標としてカラムクロマトグラフィーによって破碎液中の NADPP 活性画分を単離精製し、nanoLC-MS/MS 分析によって NADPP 活性を有する候補タンパク質のアミノ酸配列を同定した。また、精製画分の脱リン酸化活性の基質特異性解析から、NADP と ATP から高効率で無機リン酸を遊離させることを明らかにした。

(4) アミノ酸配列から推定された原因遺伝子候補を複数同定し、細胞内局在予想から葉緑体局在と推定された 3 遺伝子を抽出した。いずれの遺伝子も明確な機能が報告されていない事から、遺伝子領域に T-DNA が挿入された変異体候補系統を入手して表現型解析を実施した。いずれの系統も対象遺伝子の発現量が低下する一方で、顕著な NADPP 活性の低下や表現型は示さなかったが、二重変異体では葉破碎液中の NADPP 活性が低下し開花遅延が認められた。

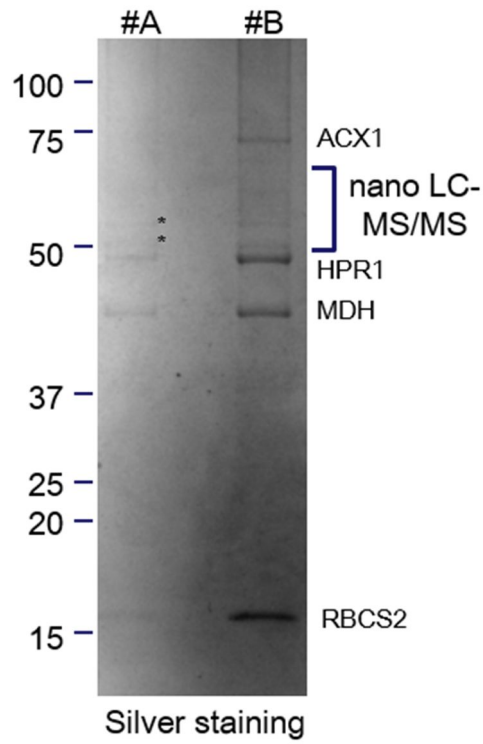


図 2. 分離精製後の活性画分の銀染色

(5)上記 3 遺伝子の大腸菌組換えタンパク質を作成し、酵素活性特性から NADP+脱リン酸化活性特性について検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawai-Yamada Maki, Miyagi Atsuko, Sato Yuki, Hosoi Yuki, Hashida Shin-Nosuke, Ishikawa Toshiki, Yamaguchi Masatoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Altered metabolism of chloroplastic NAD kinase-overexpressing Arabidopsis in response to magnesium sulfate supplementation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1844509 ~ 1844509
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15592324.2020.1844509	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 橋田慎之介	4. 巻 30
2. 論文標題 “NAD World” から見た光合成:電子受容体NADP+はどこから来る?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 光合成研究 (Journal of the Japanese Society of Photosynthesis Research)	6. 最初と最後の頁 176-187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Chaomurilege, Zu Yanhui, Miyagi Atsuko, Hashida Shin-nosuke, Ishikawa Toshiki, Yamaguchi Masatoshi, Kawai-Yamada Maki	4. 巻 136
2. 論文標題 Loss of chloroplast-localized NAD kinase causes ROS stress in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 97-106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10265-022-01420-w	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋田慎之介、石山千波、福田裕介、川合真紀
2. 発表標題 光応答性の可逆的リン酸化による NADPプールサイズ制御
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋田慎之介、福田裕介、川合真紀
2. 発表標題 暗条件下でのNADP+脱リン酸化が シロイヌナズナの呼吸代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shin-nosuke Hashida
2. 発表標題 Crosstalk between NADP dynamics and photosystem
3. 学会等名 フィンランド 日本 二国間セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Shin-nosuke Hashida, Yusuke Fukuda, Chinami Ishiyama, Maki Kawai-Yamada
2. 発表標題 NADP pool size regulation by light-responsive reversible phosphorylation between NADP+ and NAD+
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 チョモリグ、橋田慎之介、宮城敦子、石川寿樹、山口雅利、川合真紀
2. 発表標題 葉緑体局在性シロイヌナズナNADキナーゼの機能解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋田慎之介、宮城敦子、川合真紀
2. 発表標題 暗馴化過程におけるNADP+減少の遅延は代謝順応に重要な影響を及ぼす
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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		
フランス	INRA Bordeaux-Aquitaine		