

## 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8日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570033

研究課題名（和文） 光合成における翻訳のレドックス制御と環境応答の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of the redox regulation of translation and the response of photosynthesis to environmental changes

## 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（和文）：ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 において、翻訳系の構成要素である翻訳因子 EF-G が酸化ストレス傷害の標的となり、システイン残基のジスルフィド結合の形成を介して失活することが明らかになった。また、このジスルフィド結合がチオレドキシンによって還元され、EF-G が再活性化することがわかり、翻訳系が光合成電子伝達に由来する還元力によってレドックス制御を受けることが示唆された。さらに、EF-G の標的システイン残基を改変することにより光化学系 II の強光ストレス耐性が増大した。

研究成果の概要（英文）：Elongation factor G, a key protein in translation elongation, was inactivated via the formation of an intramolecular disulfide bond between two specific cysteine residues under oxidative conditions in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Reduction of the disulfide bond by thioredoxin resulted in the reactivation of EF-G, suggesting that translation might be regulated by the reducing power derived from the photosynthetic electron transport. Replacement of the target cysteine residue of EF-G by serine in *Synechocystis* cells protected photosystem II from photoinhibition.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：色素体機能・光合成

## 1. 研究開始当初の背景

光化学系 II 複合体は、光エネルギー変換を担う装置でありながら、光に対して感受性が高く、強光下では容易に活性を失う。この現象は光阻害と呼ばれ、強光下における植物の生長阻害のおもな要因になっている。従来、光阻害は、活性酸素による光化学系 II の損傷

によって引き起こされると考えられてきた。しかし、研究代表者らは、光化学系 II の損傷は活性酸素によるのではなく、酸素発生系マンガクラーの光吸収と崩壊に起因する光依存的なプロセスであり、活性酸素は、損傷を受けた光化学系 II を修復するプロセスを阻害することを発見した。つまり、光阻

害は、光損傷と活性酸素による修復阻害という、二つの異なる作用が相乗的に働いた結果であるといえる。

損傷を受けた光化学系 II は、反応中心 D1 タンパク質の分解と新規合成、光化学系 II 複合体への挿入によって修復される。この一連のプロセスの中で、D1 タンパク質の新規合成の過程が活性酸素によって阻害されることがわかった。さらに、翻訳阻害がペプチド鎖伸長過程で起きていることも明らかになった。活性酸素による翻訳阻害は D1 タンパク質だけに限らず、ほとんどすべてのタンパク質で見られることから、翻訳装置そのものが活性酸素に対して感受性が高く、その酸化的傷害が修復阻害の要因になっていることが示唆された。

翻訳装置の酸化傷害のメカニズムを生化学的に解析するために、研究代表者らはラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 から *in vitro* 翻訳系を開発した。この *in vitro* 翻訳系を用いて D1 タンパク質の合成とその酸化的傷害を解析した結果、ペプチド鎖伸長反応の要となる翻訳因子 EF-G が活性酸素のターゲットとなり、翻訳阻害を引き起していることが明らかになった。活性酸素によって EF-G が酸化されると翻訳活性が抑制され、EF-G が還元されると翻訳活性が回復することから、EF-G のレドックス状態によって翻訳活性が制御されることが示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて、EF-G の酸化傷害とレドックス制御機構のメカニズムを明らかにし、翻訳系の制御機構と光合成の環境応答との関係を解明することを目的とした。また、得られた知見をもとにして、光合成の環境ストレス耐性を向上させることも目指した。さらに、シロイヌナズナや大腸菌を対象に、翻訳系の制御機構の普遍性と差異を明らかにすることも試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) EF-G の酸化傷害とレドックス制御機構

EF-G の酸化傷害のメカニズムを *Synechocystis* 由来の *in vitro* 翻訳系を用いて生化学的手法によって解析した。また、レドックス制御機構を酸化還元酵素チオレドキシンの相互作用を中心に生化学的に解析した。

(2) 翻訳系のレドックス制御と光合成の関係  
チオレドキシ還元酵素を欠損した *Synechocystis* 変異株を用いて、EF-G のシステイン残基のレドックス状態を *in vivo* で解析した。

### (3) EF-G 改変による光阻害への影響

酸化傷害の標的 Cys105 をセリンに改変した EF-G を発現する *Synechocystis* 変異株を作製し、強光ストレス下でのタンパク質合成および光化学系 II に対する影響を調べた。

### (4) 翻訳のレドックス制御の普遍性と差異

大腸菌の EF-G に関して、酸化条件下および還元条件下における EF-G のシステイン残基のレドックス状態と翻訳機能との関係を生化学的に解析した。

## 4. 研究成果

### (1) EF-G の酸化傷害とレドックス制御機構

EF-G の酸化傷害のメカニズムを *Synechocystis* 由来の *in vitro* 翻訳系を用いて生化学的手法によって解析した。その結果、EF-G の失活は、特定の2つのシステイン残基 (Cys105 と Cys242) の酸化と、それに伴う分子内ジスルフィド結合の形成によることが明らかになった。さらに、このジスルフィド結合が、チオレドキシによって還元され、EF-G が再活性化されることもわかった。これらの結果から、活性酸素による酸化と失活、およびチオレドキシによる還元と再活性化が、EF-G のシステイン残基のレドックス状態に依存していることが明らかになった。したがって、EF-G がチオレドキシを介したレドックス調節を受け、タンパク質合成を制御していることが示唆された。

### (2) 翻訳系のレドックス制御と光合成の関係

チオレドキシ還元酵素の欠損株を用いて、EF-G のシステイン残基のレドックス状態を解析したところ、この欠損株では酸化型 EF-G の割合が野生株に比べて高く、強光下でその割合が著しく増大することが観察された。この結果から、光合成電子伝達に由来する還元力がチオレドキシを介して EF-G に到達し、翻訳系を活性化していることが示唆された (図 1)。この成果によって、光合成電子伝達と翻訳系がリンクしていることが

示唆された。また、活性酸素は EF-G の酸化を促進してタンパク質合成を抑制していることが推測された (図 1)。

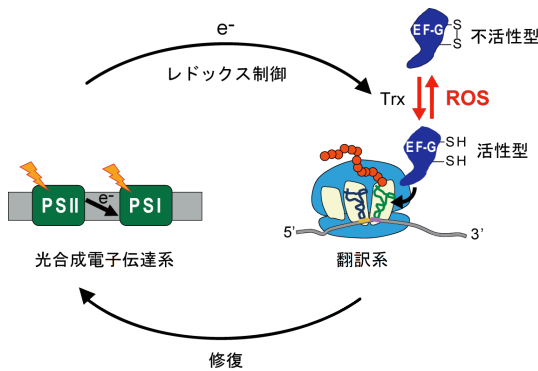


図 1. 光合成と翻訳系の相互作用。光合成電子伝達に由来する還元力によって翻訳系が活性化され、光化学系の修復が促進する。しかし、活性酸素 (ROS) はこの活性化機構を阻害する。

### (3) EF-G 改変による光合成光阻害への影響

酸化傷害の標的 Cys105 をセリンに改変した EF-G を発現する *Synechocystis* 変異株を作製し、強光ストレス下でのタンパク質合成および光化学系 II に対する影響を調べた。改変型 EF-G を野生型 EF-G とともに共発現させた株では、光化学系 II 反応中心を構成する D1 タンパク質の新規合成が著しく促進した。さらに、この変異株では光化学系 II の光阻害が緩和した。光化学系 II の光損傷の過程が影響を受けなかったことから、修復が促進していることが考えられる。すなわち、EF-G の改変によってタンパク質合成系の酸化ストレス耐性が増大し、その結果、修復の酸化ストレス阻害が抑制され、光阻害が緩和したことが示唆された。

### (4) 他の生物における翻訳のレドックス制御

ラン藻の EF-G で明らかになった翻訳傷害のメカニズムをもとにして、大腸菌の EF-G に関して、酸化条件下および還元条件下における EF-G のシステイン残基のレドックス状態と翻訳機能との関係を、システイン残基の修飾や改変、大腸菌の *in vitro* 翻訳系 Puresystem を用いた翻訳活性測定により調べた。その結果、大腸菌 EF-G も、酸化条件下では特定のシステイン残基で分子内ジスルフィド結合が形成され失活することが明らかになった。また、EF-G の酸化に伴い

GTPase 活性が低下することが観察され、ジスルフィド結合の形成が GTPase 活性を阻害していることが示唆された。さらに、このジスルフィド結合がチオレドキシシンによって還元され、EF-G が再活性化することを明らかにした。これらの結果から、光合成生物のみならず、大腸菌においてもタンパク質合成が EF-G のレドックス状態によって制御されていることが示唆された。

### 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 9 件)

1. Ejima, K., Kawaharada, T., Inoue, S., Kojima, K. and Nishiyama, Y. (2012) A change in the sensitivity of elongation factor G to oxidation protects photosystem II from photoinhibition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.*, 586(6): 778-783 (査読あり).
2. Murata, N., Allakhverdiev, S.I. and Nishiyama, Y. (2012) The mechanism of photoinhibition *in vivo*: re-evaluation of the roles of catalase,  $\alpha$ -tocopherol, non-photochemical quenching, and electron transport. *Biochim. Biophys. Acta*, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.02.020, in press (査読あり).
3. Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I. and Murata, N. (2011) Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Physiol. Plant*, 142: 35-46 (査読あり).
4. Inoue, S., Ejima, K., Iwai, E., Hayashi, H., Appel, J., Tyystjärvi, E., Murata, N. and Nishiyama, Y. (2011) Protection by  $\alpha$ -tocopherol of the repair of photosystem II during photoinhibition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta*, 1807: 236-241 (査読あり).
5. Nanjo, Y., Mizusawa, N., Wada, H., Slabas, A.R., Hayashi, H. and Nishiyama, Y. (2010) Synthesis of fatty acids *de novo* is required for photosynthetic acclimation of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to high temperature. *Biochim. Biophys. Acta*, 1797: 1483-1490 (査読あり).

6. Rowland, J.G., Simon, W.J., Nishiyama, Y. and Slabas, A.R. (2010) Differential proteomic analysis using iTRAQ reveals changes in thylakoids associated with Photosystem II acquired thermotolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proteomics*, 10: 1917-1929 (査読あり).
  7. Horiuchi, M., Nakamura, K., Kojima, K., Nishiyama, Y., Hatakeyama, W., Hisabori, T. and Hihara, Y. (2010) The PedR transcription factor interacts with thioredoxin to link photosynthesis with gene expression. *Biochem. J.*, 431(1): 135-140.
  8. Kojima, K., Motohashi, K., Morota, T., Oshita, M., Hisabori, T., Hayashi, H. and Nishiyama, Y. (2009) Regulation of translation by the redox state of elongation factor G in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.*, 284 (28): 18685-18691 (査読あり).
  9. Nishiyama, Y. and Hisabori, T. (2009) Physiological impact of thioredoxin- and glutaredoxin-mediated redox regulation in cyanobacteria. In *Advances in Botanical Research* (Jean-Pierre Jacquot, ed), Elsevier, 52: 187-205 (査読あり).
- 〔学会発表〕 (計 23 件)
1. 江島加余子、西山佳孝、タンパク質合成系の改変による光化学系 II の強光耐性の向上、第 53 回日本植物生理学会年会、京都産業大学、2012.3.17.
  2. 井上修平、Jens Appel、高市真一、村田紀夫、西山佳孝、光化学系 II の光阻害に対する抗酸化物質の役割、第 53 回日本植物生理学会年会、京都産業大学、2012.3.17.
  3. 上野護、西山佳孝、穏やかな高温ストレス下における光化学系 II の光阻害の緩和、第 53 回日本植物生理学会年会、京都産業大学、2012.3.17.
  4. 永野孝典、小島幸治、林秀則、金森崇、宮城智子、上田卓也、西山佳孝、翻訳因子 EF-G による翻訳制御機構 -種を超えて存在するレドックス制御-、かずさ DNA 研究所、2011.12.2
  5. 永野孝典、小島幸治、林秀則、金森崇、宮城智子、上田卓也、西山佳孝、大腸菌翻訳因子 EF-G の酸化傷害と翻訳制御、第 6 回無細胞生命科学研究会、大腸菌翻訳因子 EF-G の酸化傷害と翻訳制御、兵庫県立大学姫路書写キャンパス、2011.11.17.
  6. 永野孝典、小島幸治、林秀則、金森崇、宮城智子、上田卓也、西山佳孝、大腸菌翻訳因子 EF-G のレドックス翻訳制御機構、第 84 回日本生化学会、京都国際会館、2011.9.21.
  7. 西山佳孝、シアノバクテリア翻訳系のレドックス制御と環境応答、第 84 回日本生化学会、京都国際会館、2011.9.21.
  8. 井上修平、Jens Appel、林秀則、村田紀夫、西山佳孝、光化学系 II の光阻害に対する  $\alpha$ -トコフェロールの役割、日本植物学会第 75 回大会、東京大学駒場キャンパス、2011.9.17.
  9. 西山佳孝、光合成とタンパク質合成系の環境応答、埼玉大学環境科学研究センターシンポジウム、埼玉大学、2011.7.21
  10. Y. Nishiyama, N. Murata、Role of reactive oxygen species in the regulation of photosynthesis and protein synthesis under photoinhibition、10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants、*Budapest, Hungary*, 2011.7.7.
  11. 井上修平、江島加余子、Jens Appel、林秀則、村田紀夫、西山佳孝、光化学系 II の光阻害における  $\alpha$ -トコフェロールの保護作用、第 52 回日本植物生理学会年会、東北大学、2011.3.21.
  12. 江島加余子、西山佳孝、光合成の強光ストレス応答における翻訳因子 EF-G の役割、第 52 回日本植物生理学会年会、東北大学、2011.3.20.
  13. 諸田拓哉、小島幸治、日原由香子、本橋健、畠山和佳子、久堀徹、西山佳孝、シアノバクテリア翻訳因子 EF-G の光合成依存的なレドックス制御、第 52 回日本植物生理学会年会、東北大学、2011.3.20.
  14. Y. Nishiyama、Interactive regulation of protein synthesis and photosynthesis under strong light, *Japanese-Finnish Seminar 2011*, Okayama, 2011.3.4.

15. K. Ejima and Y. Nishiyama, Roles of elongation factor G in the response of protein synthesis and photosynthesis to strong light in *Synechocystis* sp. PCC 6803, Japanese-Finnish Seminar 2011, Okayama, 2011.3.2.
16. 井上修平、J. Appel、村田紀夫、西山佳孝、 $\alpha$ -トコフェロールによる光化学系II光阻害の防御機構、第1回日本光合成学会大会、東京大学(駒場)、2010.6.4.
17. 上野護、西山佳孝、光化学系IIの光阻害に対する低温・高温ストレスの影響、第1回日本光合成学会大会、東京大学(駒場)、2010.6.4.
18. 江島加余子、西山佳孝、シアノバクテリアの強光応答における翻訳因子EF-Gの役割、第51回日本植物生理学会年会、熊本大学、2010.3.21.
19. 諸田拓哉、小島幸治、日原由香子、本橋健、畠山和佳子、久堀徹、西山佳孝、強光条件下におけるシアノバクテリアの翻訳因子EF-Gのレドックス制御、第51回日本植物生理学会年会、熊本大学、2010.3.19.
20. Y. Nishiyama, Responses of photosystem II to high temperature and strong light in cyanobacteria, Department Seminar, University of Turku, Turku, Finland, 2010.3.17.
21. 西山佳孝、光化学系IIの高温適応における脂肪酸合成の役割、かずさDNA研究所研究会「ラン藻の分子生物学2009」、かずさDNA研究所、2009.12.5.
22. 江島加余子、西山佳孝、光合成の強光応答における翻訳因子EF-Gの役割、かずさDNA研究所研究会「ラン藻の分子生物学2009」、かずさDNA研究所、2009.12.5.
23. 井上修平、林秀則、村田紀夫、西山佳孝、光化学系IIの光阻害に対する $\alpha$ -トコフェロールの保護作用、かずさDNA研究所研究会「ラン藻の分子生物学2009」、かずさDNA研究所、2009.12.5.

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.molbiol.saitama-u.ac.jp/nishiyama/kankyo/Top.html>

#### 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) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

久堀 徹 (HISABORI TORU)

東京工業大学・資源化学研究所・教授

研究者番号：40181094