

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06219

研究課題名（和文）チオレドキシンによるPGR5/PGRL1依存経路の制御機構とその生理的意義の解明

研究課題名（英文）Understanding the regulatory mechanism of the PGR5/PGRL1-dependent pathway by thioredoxin and its physiological significance

研究代表者

桶川 友季（Okegawa, Yuki）

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：10582439

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）：植物は常に変動する光環境下で光合成装置を守りながら光合成を最適化するために葉緑体内に様々な調節機構を持つ。これまでの研究から、これらの生育環境ではPGR5/PGRL1依存の光化学系Iサイクリック電子伝達が重要であることがわかってきた。本研究では、シロイヌナズナの変異体を解析することによって光合成反応の様々な調節に関わるチオレドキシントタンパク質も変動する光環境において光合成装置を保護し、光合成の最適化に寄与することを明らかにした。また、チオレドキシシステムと光化学系Iサイクリック電子伝達が葉緑体内の酸化還元バランスの維持に協調して働くことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光合成に光は必要だが、強すぎる光は植物にとってストレスとなり、光合成装置にダメージを与え、光合成の能力が低下する。光合成装置である光化学系Iをこのような光傷害から守るためには上流からの電子流入の抑制、下流への電子流出の促進が重要である。本研究では、新たに光合成の様々は調節反応に関わるチオレドキシシステムもまた植物が自然環境で経験する変動する光環境において光防御に関わることを明らかにした。チオレドキシシステムによる光合成装置の防御機構が解明されれば、将来的に環境ストレスに強い作物の作出につながり学術的にも応用的にも意義のある研究であると言える。

研究成果の概要（英文）：Excess light energy beyond plant photosynthetic capacity results in photoinhibition. Plants have various regulatory mechanisms within the chloroplast to optimize photosynthesis in response to the constantly changing light environment. Previous studies have shown that PGR5 (PROTON GRADIENT REGULATION 5)/PGRL1 (PGR5-LIKE 1)-dependent photosystem I cyclic electron transport is important for plant photoprotection under these conditions. In this study, we analyzed the Arabidopsis mutants and found that thioredoxin proteins, which are involved in regulating various photosynthetic responses in the chloroplasts, also contribute to optimizing photosynthesis by protecting the photosynthetic apparatus under fluctuating light environment. In addition, we revealed that the thioredoxin system and photosystem I cyclic electron transport work cooperatively to maintain the redox balance within the chloroplasts.

研究分野：植物生理学

キーワード：光合成 葉緑体 光化学系 サイクリック電子伝達 チオレドキシン 酸化還元 光防御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光合成の明反応は太陽の光エネルギーを NADPH と ATP の形で化学エネルギーに変換する。その実体は、葉緑体のチラコイド膜上で起こる電子伝達反応であり、リニア電子伝達と光化学系 I (PSI) サイクリック電子伝達からなる。リニア電子伝達が NADPH と ATP の両方を産出する一方、PSI サイクリック電子伝達は NADPH の産出なしにプロトン駆動力を形成し、ATP 合成に寄与する。また PSI サイクリック電子伝達でメインに働く PGR5 (PROTON GRADIENT REGULATION 5) 依存の経路によるチラコイドルーメンの酸性化は、光防御機構である photosynthetic control (シトクロム *b₆f* 複合体での電子伝達の抑制) の誘導と熱散逸 (過剰に吸収された光エネルギーの放出) の誘導に必要であることがわかっている (Munekage et al., 2004 Nature)。特に PGR5 依存の経路は、強光と弱光が繰り返し照射される光条件においては PSI の光保護に必須であり、シロイヌナズナ *pgr5* 変異株はこのような変動光条件で生育できない (Suorsa et al., 2012 Plant Cell)。このように PSI サイクリック電子伝達が光合成と光防御に重要であることに疑いの余地はない。その一方で、PGR5 タンパク質の過剰発現による PSI サイクリック電子伝達活性の上昇は、葉緑体の分化時に葉緑体の発達を阻害するため、その活性は厳密に制御される必要がある (Okegawa et al., 2007 Plant Cell Physiol)。しかしその活性の制御機構や活性制御の生理的意義についての理解はあまり進んでいなかった。

そのような中、私たちは低分子量の酸化還元タンパク質であるチオレドキシシン (Trx) が、PGR5 依存の PSI サイクリック電子伝達活性を制御することを明らかにした (Okegawa and Motohashi, 2020 Plant Cell)。Trx は生物界に普遍的に存在するタンパク質で、ジスルフィド結合 (S-S) を持つ酵素の活性化状態を酸化還元反応を介して調節する。葉緑体には、フェレドキシン (Fd) を電子供与体とする Fd-Trx 経路と NADPH を電子供与体とする NTRC (NADPH-Trx Reductase C) 経路の二つの Trx システムがある。さらに、Fd-Trx 経路には 5 グループ 10 種類の Trx アイソフォーム (Trx *f1, f2, m1, m2, m3, m4, x, y1, y2, z*) があり、カルビンサイクルの酵素の光依存的な活性化をはじめとして光合成反応の様々な調節に関わる。その中で *m* 型 Trx が PGR5 依存の経路で働く PGRL1 (PGR5-LIKE 1) とジスルフィド結合を介して複合体を形成することにより PSI サイクリック電子伝達を負に制御することがわかった。また、光合成誘導期において *f* 型 Trx が PGR5 依存の PSI サイクリック電子伝達と協調して効率的な光合成の開始に寄与することを発見した (Okegawa et al., 2020 Plant Physiol)。このように Trx と PSI サイクリック電子伝達には光合成制御において密接な関わりがあることが示唆された。

2. 研究の目的

PSI サイクリック電子伝達と Trx システムは、Fd を介したネットワークを形成しどちらも PSI の下流で働く。私たちのこれまでの研究からこれらのシステムが光合成制御において協調して働くことが明らかになってきた。本研究課題では、シロイヌナズナを材料として、「PSI サイクリック電子伝達と Trx システムによる光合成の制御機構」のさらなる解明を目的とした。PSI サイクリック電子伝達の欠損変異株、過剰発現株および Trx シンシステムの欠損変異株を用いて光合成の誘導期、定常状態、さらに変動光条件において光合成機能を詳細に解析する。

3. 研究の方法

(1) PGR5 依存の PSI サイクリック電子伝達と NTRC の遺伝的相互作用

NTRC を欠損する *ntrc* 変異株ではカルビンサイクルの酵素の活性化が抑制され、植物の生育阻害が見られる (Perez-Ruiz et al., 2017 Proc Natl Acad Sci U S A)。私たちもまた *m* 型 Trx 欠損変異株でも *ntrc* と同様に生育阻害が見られ、その変異体の表現型が *pgr5* 変異によって部分的に抑制されることを報告していた (Okegawa and Motohashi 2020 Plant Cell)。この結果から *pgr5* 変異が *ntrc* 変異株の表現型にも影響を与える可能性があると考え、*pgr5* 変異を *ntrc* 変異体に導入し植物の生育の表現型を調べた。さらに、PSI サイクリック電子伝達のもう一つの経路である NDH (NADH dehydrogenase-like complex) 依存経路の変異株、*crr2* (*chlororespiratory reduction 2*) についても *ntrc* 変異株への影響を評価した。

(2) Fd からの還元力分配の解析

PGR5 依存の PSI サイクリック電子伝達と Fd-Trx 経路はどちらも Fd を電子供与体として利用している。Fd からの電子分配は厳密に制御されていると考えられる。そこで、PGR5 依存の PSI サイクリック電子伝達の活性上昇が Trx 依存の酵素の活性化に与える影響を明らかにするために、PGR5 の過剰発現株を用いて Trx の標的酵素であるカルビンサイクルの酵素や ATP 合成酵素の活性化を調べた。タンパク質の活性化 (酸化還元) 状態は、チオール基を特異的に修飾する化学試薬、AMS (4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid) を用いて分子量の違いにより評価した。

(3) *f* 型 Trx と *m* 型 Trx による標的タンパク質の活性化の解析

これまでの *f* 型 Trx と *m* 型 Trx それぞれの欠損変異株 (*trx flf2* または *trx m124*) 解析から、*f* 型

Trx は光合成の誘導に、*m* 型 Trx は光合成電子伝達の制御に主として働くことがわかっている。これらの研究から、*f* 型と *m* 型 Trx は部分的に共通した標的酵素を持つことが示唆された。そこで、両方の Trx の欠損が植物の光合成制御に与える影響を調べるために *trx flf2 trx m124* 変異株を作出し、カルビンサイクルの酵素の活性化を調べた。

(4) 変動光条件下での *x* 型 Trx と *y* 型 Trx の機能解析

5 グループある Trx の中でも蓄積量の少ない *x* 型 Trx と *y* 型 Trx の機能はあまり解析されていなかった。これはこれらの欠損変異体 (*trx x*, *trx y1y2*) が一定の光条件では強光であっても植物の生育や光合成パラメーターに顕著な表現型を示さなかったからである。そこで弱光と強光を繰り返し照射する変動光条件に注目し、光合成解析をおこない *x* 型 Trx と *y* 型 Trx の光合成制御における役割を調べた。また両方の Trx を欠損した *trx x trx y1y2* 三重変異株も作出し解析に加えた。

4. 研究成果

(1) PGR5 依存の PSI サイクリック電子伝達と NTRC の遺伝的相互作用

NTRC 経路と PGR5 依存の経路を両方欠損した *ntrc pgr5* 変異株では、*ntrc* 変異株で見られた植物の生育阻害が部分的に回復していた。*ntrc pgr5* 変異株は *ntrc* 変異株より植物の生重量が大きく、クロロフィル含量も高かった。一方で、*ntrc err2* 変異株では生育の表現型の回復は見られなかった。また、*ntrc pgr5* 変異株では、カルビンサイクルの酵素である FBPase (fructose-1,6-bisphosphatase) と SBPase (sedoheptulose-1,7-bisphosphatase) の還元レベル (活性化) も回復していた。これらの酵素は暗条件では酸化型で不活性型であり、活性化されるためには *f* 型または *m* 型 Trx によって還元される必要がある (図 1)。*ntrc* 変異株では、葉緑体内の酸化還元バランスが崩れ、*f* 型と *m* 型 Trx がカルビンサイクルの酵素を活性化できなくなったと考えられる。この *ntrc* 変異体バックグラウンドで PGR5 依存の PSI サイクリック電子伝達を欠損させることによって葉緑体の酸化還元バランスの崩れが正常の状態に近づき、*ntrc* 変異体の表現型が部分的に回復したと考えられる。これらの結果から、PSI サイクリック電子伝達経路が Trx システムの一つである NTRC 経路と葉緑体内の酸化還元バランスの維持に寄与することが示唆された (図 1, Okegawa et al., 2022 Plant and Cell Physiology)。

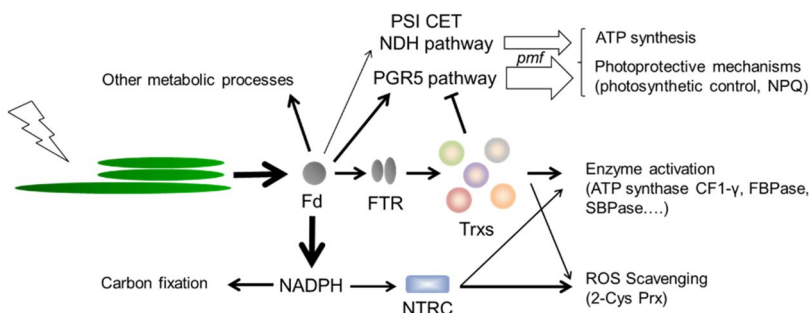


図 1. PSI サイクリック電子伝達と Trx システムの関係

(2) Fd からの還元力分配の解析

PGR5 過剰発現株では PSI サイクリック電子伝達活性の上昇により、FBPase と SBPase の活性化が抑制された。PGR5 過剰発現株では PSI サイクリック電子伝達経路に Fd からの電子が過剰に分配されたため、Fd-Trx 経路への電子の供給不足となり、これらの酵素の活性化が抑制されたと考えられた。一方で同じように Trx によって還元される ATP 合成酵素の活性化は影響を受けなかった。この結果から、ATP 合成酵素は還元力が限られた条件でも還元されやすいことがわかった。PGR5 の過剰発現による PSI サイクリック電子伝達の上昇は葉緑体分化時、葉緑体内の酸化還元バランスを崩した結果、葉緑体の発達に影響を与えるため、PGR5 の蓄積量は厳密に制御される必要があると考えられていた。本研究の成果からも Trx 標的タンパク質の適切な活性化のためには PGR5 依存の PSI サイクリック電子伝達活性が厳密に制御される必要があることが示唆された (Okegawa et al., 2022 Plant Cell Physiol)。

(3) *f* 型 Trx と *m* 型 Trx による標的タンパク質の活性化の解析

trx flf2 trx m124 変異株では FBPase および SBPase の還元レベルがそれぞれの単独変異株、*trx flf2* および *trx m124* より低かった。結果として、*trx flf2 trx m124* 変異株では、光照射時の光合成の開始がそれぞれの変異株よりもさらに遅れていた。その一方で、調べられた生育条件では植物の生育は *trx m124* 変異株と違いは見られなかった。以上の結果から、*f* 型と *m* 型 Trx が協調して効率的な光合成誘導に寄与することを明らかにした (Okegawa et al., 2022 J Plant Res)。

(4) 変動光条件下での *x* 型 Trx と *y* 型 Trx の機能解析

x 型 Trx の欠損変異株、*trx x* はこれまでの報告と一致して一定の光条件では光合成パラメーターに野生株との違いはほとんど見られなかったが、変動光処理条件で顕著な PSI の活性の低下が見られた (図 2)。*trx x* では PSI の電子受容体側が過還元となっており、これが PSI の活性を低下させたと考えられた。一方で、*y* 型 Trx の欠損変異株、*trx y1y2* は変動光条件でも光合成パラメーターに野生株との違いは見られなかった。しかし、*trx y* の変異を *trx x* 変異株に導入すると *trx x* 変異株の表現型はさらにシビアになったことから *x* 型 Trx と *y* 型 Trx の役割は重複しており *x* 型 Trx がメインに働くことが示唆された。しかし、それぞれの Trx の標的タンパク質の同定には至らず今後の研究課題として残っている。

さらにこれらの変異株を変動光条件 (30 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の弱光を 5 分、500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強光を 1 分繰り返し照射) で生育させると *trx x* および *trx x trx y1y2* 変異株は生育阻害を示した (図 3)。光合成解析の結果と一致して、生育の表現型も *trx x* 変異株よりも *trx x trx y1y2* 変異株の方が強かった。以上の結果から、*x* 型 Trx と *y* 型 Trx は植物が自然条件で経験する変動する光条件において PSI を光阻害から保護することが明らかになることができた (Okegawa et al., 2023 Plant Physiol)。これまで PSI の光保護には PSI サイクリック電子伝達が働くと考えられていたが本研究成果によって新たに Trx システムの貢献も明らかになり、これらのシステムがより密接に関係していることを示す結果が得られた。しかし、変動する光条件で植物がこれらのシステムをどのように使い分けているかはまだ明らかになっておらず、今後の研究課題として残っている。

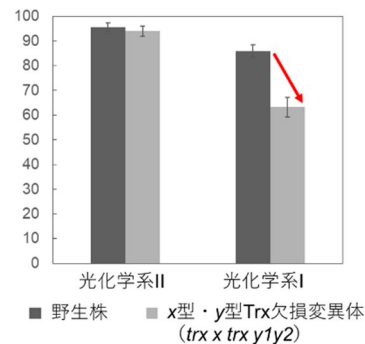


図 2. *x*型・*y*型チオレドキシンが変動光条件下で光化学系の活性に与える影響

*x*型・*y*型チオレドキシン変異体では変動光による光化学系Iの光阻害が顕著に見られた。



図 3. *x*型・*y*型チオレドキシンが変動光条件下での植物の生育に与える影響

*x*型・*y*型チオレドキシン変異株は変動光条件下で生育させると生育阻害が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okegawa Yuki, Sato Nozomi, Nakakura Rino, Murai Ryota, Sakamoto Wataru, Motohashi Ken	4. 巻 193
2. 論文標題 x- and y-type thioredoxins maintain redox homeostasis on photosystem I acceptor side under fluctuating light	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 2498 ~ 2512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiad466	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, Sakamoto Wataru, Motohashi Ken	4. 巻 135
2. 論文標題 Functional division of f-type and m-type thioredoxins to regulate the Calvin cycle and cyclic electron transport around photosystem I	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 543 ~ 553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-022-01388-7	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 Okegawa Yuki, Tsuda Natsuki, Sakamoto Wataru, Motohashi Ken	4. 巻 63
2. 論文標題 Maintaining the Chloroplast Redox Balance through the PGR5-Dependent Pathway and the Trx System Is Required for Light-Dependent Activation of Photosynthetic Reactions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 92 ~ 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcab148	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 桶川友季	4. 巻 31
2. 論文標題 シロイヌナズナにおいて光化学系 I サイクリック電子伝達は厳密に制御されている	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 光合成研究	6. 最初と最後の頁 154 ~ 161
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 桶川友季、坂本亘
2. 発表標題 PSI サイクリック電子伝達とチオレドキシシステムの PSI 光防御における関係
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yuki Okegawa
2. 発表標題 Redox regulation of photosynthesis by the thioredoxin system in Arabidopsis.
3. 学会等名 US-Japan Binational Photosynthesis Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuki Okegawa, Ken Motohashi, Wataru Sakamoto
2. 発表標題 x- and y-type thioredoxins protect photosystem I from photoinhibition under fluctuating light.
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2023 (TJPB2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 桶川友季、本橋健、坂本亘
2. 発表標題 x型およびy型チオレドキシンは光化学系Iの電子受容体側の制御に寄与する
3. 学会等名 第13回日本光合成学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 桶川友季、佐藤望、本橋健、坂本巨
2. 発表標題 シロイヌナズナのx-型、y-型チオレドキシン欠損変異株の解析
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 Yuki Okegawa
2. 発表標題 Balanced regulation of PGR5-dependent PSI cyclic electron transport is required for normal plant growth.
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

1. 発表者名 Yuki Okegawa, Ken Motohashi, Wataru Sakamoto
2. 発表標題 Impaired PGR5-dependent photosystem I cyclic electron transport alleviates the growth defects in the ntrc mutant by redirecting electron distribution from ferredoxin.
3. 学会等名 The 18th International Congress on Photosynthesis Research. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桶川友季、本橋健、坂本巨
2. 発表標題 f型とm型チオレドキシンの光合成制御における機能分担
3. 学会等名 第12回日本光合成学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桶川友季、坂本亘、本橋健
2. 発表標題 PGR5の欠損はフェレドキシンからの電子の流れを変えることによってntrc変異株の生育阻害を回復させる
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 桶川友季
2. 発表標題 チオレドキシンによる多様な葉緑体機能の酸化還元制御
3. 学会等名 第11回日本光合成学会年会およびシンポジウム（招待講演）
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