

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22247005

研究課題名(和文)被子植物型NDH複合体構築の進化的戦略

研究課題名(英文)Evolutional strategy for the establishment of angiosperm-type chloroplast NDH

研究代表者

鹿内 利治 (SHIKANAI, TOSHIHARU)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70273852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,800,000円、(間接経費) 10,140,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体NDH複合体とフェレドキシンの高親和性結合に関わるNdhSタンパク質を発見した。NDHはNAD(P) dehydrogenaseではなく、アンチマイシンA耐性のフェレドキシン依存プラストキノン還元酵素であることを明らかにした。またシロイヌナズナNDH複合体サブ複合体Aのアセンブリ過程を明らかにし、この過程に特異的に関わるアセンブリ因子を多数発見した。さらにゼニゴケのNDH複合体が、光科学系と超複合体を形成しないこと、また弱光下で葉緑体内のレドックスバランスの維持に機能することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We discovered that a novel protein, NdhS is necessary for the high-affinity binding of chloroplast NDH with ferredoxin. Chloroplast NDH is not NAD(P)H dehydrogenase but antimycin A-resistant ferredoxin-dependent plastoquinone reductase (FQR). We also clarified the assembly process of subcomplex A of chloroplast NDH in Arabidopsis with the discovery of several assembly factors specifically required for this process. We further discovered that in Marchantia chloroplast NDH does not form the supercomplex with photosystem I and is involved in the redox homeostasis in chloroplasts at low light intensity.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 植物分子 生理科学

キーワード：葉緑体 NDH サイクリック電子伝達 光合成 アセンブリ 進化 シロイヌナズナ ゼニゴケ

1. 研究開始当初の背景

葉緑体 NDH (NADH dehydrogenase-like) 複合体は、光化学系 (PSI) サイクリック電子伝達と葉緑体呼吸を触媒する。NDH 複合体は、ミトコンドリアやバクテリアの NADH dehydrogenase (complex I) と構造が類似するが、NADH の酸化に関わる N モジュールのサブユニットを欠き、電子供与体は何であるのかは不明であった。またシロイヌナズナでは PSI 複合体と超複合体を作ることが知られているが、その生理的意義は充分理解されていない。NDH 複合体は、シアノバクテリアにおいて、サブユニット組成を換えることで、呼吸鎖電子伝達、PS サイクリック電子伝達、無機炭素の濃縮に関わる。被子植物の NDH 複合体は強光ストレスの緩和に関わると考えられるが、その構造の違いが機能とどのように結びつくかは理解されていない。ゼニゴケは陸上植物の進化を研究するモデル生物となりつつあり、ゼニゴケの NDH 複合体の解析は重要な研究課題である。

2. 研究の目的

葉緑体 NDH 複合体は PSI サイクリック電子伝達の装置で、11 のサブユニットが葉緑体ゲノムにコードされる。葉緑体 NDH はシアノバクテリアの複合体に由来する。しかし我々は、その構造と機能がシアノバクテリアのものとは異なること示し、コケ植物の NDH がその中間的な位置を占めることを示唆している。本研究ではシロイヌナズナとコケ植物を用いて NDH 複合体の構造、機能、アセンブリ装置を比較解析することを目指した。そのことで、シアノバクテリアにおいて PSI サイクリック電子伝達の主役を務めた NDH 複合体が、陸上植物の進化の過程で光ストレスに対する適応装置として作り変えられた進化の過程を明らかにすることを目的とした。

具体的な研究の目的は以下の3点に絞られる。

- (1) NDH への電子供与体の決定
- (2) NDH 複合体アセンブリ機能の解明
- (3) ゼニゴケの NDH の機能と構造の解明

3. 研究の方法

(1) NDH-PSI 超複合体の質量分析解析の情報をもとに、NdhS/CRR31、NdhT、NdhU タンパク質をピックアップした。各遺伝子のノックアウト株を取得し、電子伝達、生化学、遺伝学解析を行った。大腸菌で NdhS の組換えタンパク質を作成し、*crr31* 変異株のチラコイドで NDH 依存的プラストキノン還元をモニターする再構成系を構築し、NDH 複合体活性のフェレドキシン濃度依存性を調べた。

(2) CRR6 や CRR1 など、アセンブリ因子の C 末端にタグを付加し、変異株を相補する。タグを認識する抗体を用いて、ストロマ画分からアセンブリ中間体を精製し、質量分析に供

した。新規に発見されたアセンブリ因子の候補について、ノックアウト株を取得し、NDH 欠損が確認されたものは、同様のアセンブリ中間体の精製を行った。またアセンブリ因子の抗体を作成した。野生株、変異株のアセンブリ中間体を Clear Native (CN)ゲルで分離し、抗体を用いて各中間体の構成成分を調べ、アセンブリモデルを構築した。

(3) ゼニゴケ葉緑体を単離し、Blue Native (BN)ゲルで NDH 複合体を分離した。抗体を用いて、NDH 複合体の位置を特定した。葉緑体形質転換の技術を用いて、*ndhB* をスペクチノマイシン耐性遺伝子の挿入により破壊した。野生型ゲノムコピーを完全に欠くラインを複数取得し、電子伝達解析に供した。

4. 研究成果

(1) CRR31 は NDH-PSI 超複合体の質量分析で見つかったタンパク質で、ノックアウトは NDH 活性の欠損に至る。シアノバクテリアには NdhS のホモログがあり、機能未知ながら結晶構造が解かれており、PSI でフェレドキシン結合サイトを形成する PsaE と構造的に類似 (Src homology 3 domain-like fold) することが明らかになっていた。チラコイドを用いて *crr31* 変異株で NDH 活性を再構築する系を確立し、NdhS が NDH のフェレドキシンに対する高親和性の結合に必須であることを明らかにした。このことから、葉緑体 NDH は当初考えられていたような NAD(P)H dehydrogenase ではなく、フェレドキシン依存のプラストキノン還元酵素 (FQR) であることが明らかになった (文献 9)。同様に同定された NdhT、NdhU はそれぞれ J タンパク質と J-like タンパク質であり、NdhS とともに電子供与体結合 (Donor bonding) サブ複合体を形成する (図 1)。また NdhS とフェレドキシンとの相互作用には、NdhS の表面が正電荷を帯びている必要があることを明らかにした (文献 2)。

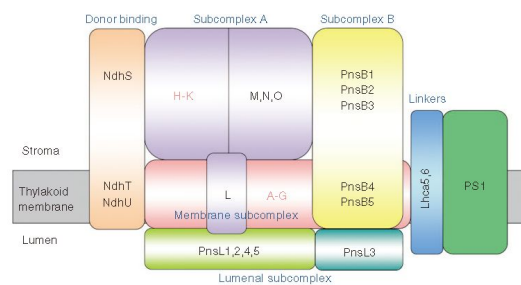


図1 シロイヌナズナ葉緑体 NDH 複合体の構造モデル 文献 8 より。

また FQR の阻害剤として知られるアンチマイシン A は PGR5 タンパク質あるいはその近傍のタンパク質の機能を阻害することを明らかにし (文献 4)、NDH がアンチマイシン A 耐性の FQR であることを明らかにした。

(2) Cpn60 4 は、NDH 活性を欠くシロイヌナズナ *crr27* 変異株から見つかった。Cpn60 4 は、他の や とシャペロン複合体を作ることを明らかにした。また Cpn60 4 を含むシャペロン複合体は、NdhH のアセンブリに必須であることを明らかにした(文献 10)。

CRR6 は、NDH 活性を欠くシロイヌナズナ *crr6* 変異株から見つかったタンパク質で、ストロマに局在し、NDH 複合体のサブ複合体 A のアセンブリに必須である。CRR6 にタグを付加し、共沈降するタンパク質を質量分析することで新規アセンブリ因子 CRR41 と CRR42 を同定した。新たに発見されたタンパク質にタグを付加し、同様の解析を繰り返すことで、図 2 に示すように NDH のサブ複合体 A のアセンブリの過程を明らかにした。NdhH は NdhO、CRR41 とともに NDH assembly intermediate (NAI) 500 と名づけたアセンブリの足場となる中間体を形成する。CRR6 は NdhI のアセンブリに必須で、NdhI を NAI500 に取り込む際、NAI500 と相互作用する。CRR1 は同様に、NdhK あるいは NdhM のアセンブリに関わる。NdhJ も含めてこれらのサブユニットがストロマでアセンブルされ、CRR42はこのNAI400に含まれる。NAI400がチラコイド膜に存在する NDH 本体に取り込まれる際に、CRR41 と CRR42 が取り除かれ、NdhN が取り込まれる。以上の結果を文献 7 に論文として報告した。

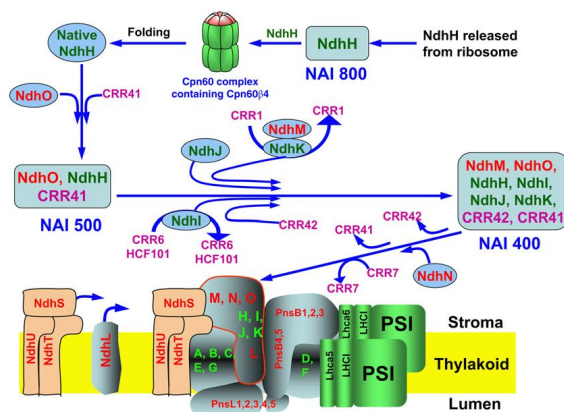


図 2 葉緑体 NDH 複合体サブ複合体 A のアセンブリモデル サブ複合体 A は、アセンブリ中間体 (NAI800, NAI500, NAI400) を介してほぼ完全な形でストロマで組み上がり、NdhN と NdhL を取り込んでチラコイド膜に収まる。多くのアセンブリ因子(Cpn60 4, CRR1, CRR6, CRR7, CRR41, CRR42, HCF101)がこの過程に関わる。文献 7 より。

(3) ゼニゴケのゲノム情報に対して NDH のサブユニット遺伝子を検索したところ、ルーメンサブ複合体 (図 1) のほとんどのサブユニットをコードする遺伝子が欠落していた。また Lhca6 (図 1) をコードする遺伝子も存

在せず、BN ゲルで解析したところ、ゼニゴケの NDH は PSI と超複合体を形成しないことが明らかになった(図 3)。ルーメンサブ複合体の獲得と PSI との超複合体の形成は、陸上植物の進化の過程で生じたことが明らかになった。また葉緑体形質転換技術を活用して、*ndhB* 遺伝子のノックアウト株を作成した。葉状体は、野生株と変わらない生育を示した。*ndhB* 破壊株の光合成電子伝達はおおむね正常であったが、弱光下でプラストキノンプールが野生株より還元していることが明らかになった。以上の結果を文献 6 として論文発表した。

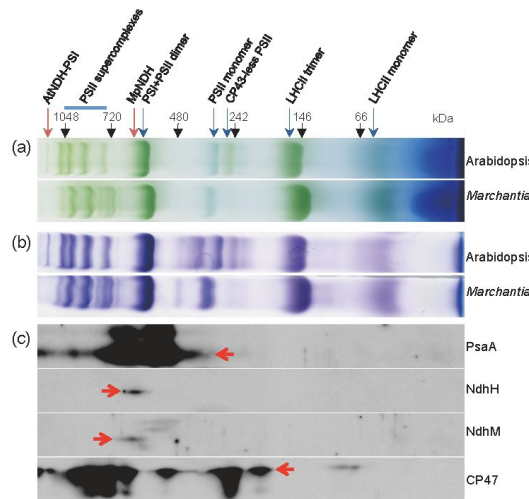


図 3 シロイヌナズナとゼニゴケの NDH 複合体の比較 両植物から単離したチラコイド膜タンパク質複合体を BN ゲルで分離した。シロイヌナズナで NDH は PSI との超複合体 (AtNDH-PSI) として検出される。一方、ゼニゴケでは、NDH サブユニットは PSI と結合しない分子量に相当する位置 (MpNDGH) に検出される。文献 6 より。

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 14 件)

(1) Shikanai T. (2014) Central role of cyclic electron transport around photosystem I in the regulation of photosynthesis. *Curr. Opin. Biotech.* 26, 25-30.
DOI: 10.1016/j.copbio.2013.08.012.

(2) Yamamoto H. and Shikanai T. (2013) *In planta* mutagenesis of Src homology 3 domain-like fold of NdhS, a ferredoxin-binding subunit of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*. A conserved Arg-193 plays a critical role in ferredoxin binding. *J. Biol. Chem.* 288, 36328-36337.
DOI: 10.1074/jbc.M113.511584.

(3) Taira Y., Okegawa Y., Sugimoto K., Abe M., Miyoshi H. and Shikanai T. (2013) Antimycin A-like molecules inhibit cyclic electron transport around photosystem I in ruptured chloroplasts. *FEBS Open Bio.* 3, 406-410.
DOI: 10.1016/j.fob.2013.09.007.

(4) Sugimoto K., Okegawa Y., Tohri A., Long T.A., Sarah F.S., Hisabori T. and Shikanai T. (2013) A single amino acid alteration in PGR5 confers resistance to antimycin A in cyclic electron transport around PSI. *Plant Cell Physiol.* 54, 1525-1534.
DOI: 10.1093/pcp/pct098.

(5) Nishikawa Y., Yamamoto H., Okegawa Y., Wada S., Sato N., Taira Y., Sugimoto K., Makino A. and Shikanai T. (2012) PGR5-dependent cyclic electron transport around PSI contributes to the redox homeostasis in chloroplasts rather than CO₂ fixation and biomass production in rice. *Plant Cell Physiol.* 53, 2117-2126.
DOI: 10.1093/pcp/pcs153.

(6) Ueda M., Kuniyoshi T., Yamamoto Y., Sugimoto K., Ishizaki K., Kohchi T., Nishimura Y. and Shikanai T. (2012) Composition and physiological function of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Marchantia polymorpha*. *Plant J.* 72, 683-693.
DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2012.05115.x.

(7) Peng L., Fukao Y., Fujiwara M. and Shikanai T. (2012) Multistep assembly of chloroplast NADH dehydrogenase-like subcomplex A requires several nucleus-encoded proteins, including CRR41 and CRR42, in Arabidopsis. *Plant Cell* 24, 202-214.
DOI: 10.1105/tpc.111.090597.

(8) Ifuku K., Endo T., Shikanai T. and Aro E.-M. (2011) Structure of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex: nomenclature for nuclear-encoded subunits. *Plant Cell Physiol.* 52, 1560-1568.
DOI: 10.1093/pcp/pcr098.

(9) Yamamoto H., Peng L., Fukao Y. and Shikanai T. (2011) An Src homology 3 domain-like fold protein forms a ferredoxin-binding site for the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 1480-1493.
DOI: 10.1105/tpc.110.080291.

(10) Peng L., Fukao Y., Myouga F., Motohashi R., Shinozaki K. and Shikanai T. (2011) A chaperonin subunit with unique structures is essential for folding of a specific substrate. *PLoS Biol.* 9, e1001040.

DOI: 10.1371/journal.pbio.1001040.

(11) Peng L. and Shikanai T. (2011) Supercomplex formation with photosystem I is required for the stabilization of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 155, 1629-1639.
DOI: 10.1104/pp.110.171264.

(12) Peng L., Yamamoto H. and Shikanai T. (2011) Structure and biogenesis of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 945-953.
DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.10.015.

[学会発表](計 18 件)

Shikanai T., "Machinery and function of PSI cyclic electron transport" "2nd Kyoto-Bristol Symposium, Kyoto, Jan 10, 2014.

Shikanai T., "Regulation of photosynthesis by PSI cyclic electron transport." 3rd International Symposium on Chloroplast Genomics and Genetic Engineering. New Brunswick, USA, 11 May 2013.

Shikanai T., "Regulation of photosynthesis by PSI cyclic electron transport." PhD Summer School: New Frontiers in Photosynthesis. San Michele all'Adige, Italy, 30 Jul 2013.

Shikanai T., "Regulation of photosynthesis by PSI cyclic electron transport." 24th International Conference on Arabidopsis Research. Sydney, Australia, 25 Jun 2013.

Shikanai T., "Regulation of photosynthetic electron transport." NC-CARP·CREST/さきがけ国際シンポジウム、東京、8 Nov 2013.

Shikanai T., "Structure and assembly of the chloroplast NDH complex." GNU Plant Science Symposium 2012, Jinju, Korea, 11 May 2012.

Shikanai T., "Chloroplast NADH dehydrogenase-like complex: function and assembly." Gordon Research Conference, Mitochondria & Chloroplasts, Smithfield, USA, 1 Aug 2012.

Shikanai T., "Assembly of the chloroplast NDH complex." The 11th Nordic Photosynthesis Congress, Naantali, Finland, 12 Sep 2012.

Shikanai T., "Cyclic electron flow: new structural components and regulation." IPMB 2012, Jeju, Korea, 23 Oct 2012.

Shikanai T., "Machinery and assembly of PSI cyclic electron transport." Gordon Research Conference, Photosynthesis, Davidson, USA, 12-17 June 2011.

Shikanai T., "Machinery and assembly of the chloroplast NDH complex." Switzerland-Japan Workshop, Ollon, Swiss, 10-14 Jan 2011.

Shikanai T., "Structure and function of machinery of photosystem I cyclic electron transport." APRU Research Symposium, Kyoto, 24-26 Nov 2010.

Shikanai T., "Regulation of photosynthetic electron transport by PSI cyclic electron transport." The 15th International Congress of Photosynthesis. Beijing, China, 22-27 Aug 2011.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0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0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
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鹿内 利治 (SHIKANAI TOSHIHARU)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：70273852

(2)連携研究者

槻木 竜二 (TSUGEKI RYUUJI)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：50303805

(3)連携研究者

西村 芳樹 (NISHIMURA YOSHIKI)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：70444099