

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：12608

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24870010

研究課題名(和文)ミトコンドリア機能のレドックス制御：分子基盤から生理応答まで

研究課題名(英文) Redox regulation of mitochondrial functions: from molecular basis to physiological response

研究代表者

吉田 啓亮 (Yoshida, Keisuke)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：40632310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：植物ミトコンドリアのレドックス状態は外的環境に応じて変化することが知られている一方、そのときミトコンドリア機能がどのように制御されるのかについては知見が乏しい。レドックス制御に重要な役割を果たすのがチオレドキシソ(Trx)である。私は本研究の開始に先立ち、ミトコンドリア内のTrx標的を網羅的に捕捉し、レドックス制御下にあるタンパク質候補のリストを作成していた。そこで、そのリストの中から特に興味深いタンパク質に注目し、レドックス制御の実態について生化学・生理学の両側面から迫った。これらの研究を通して、いくつかのミトコンドリアタンパク質について、レドックス制御の分子基盤を解明することができた。

研究成果の概要(英文)：Redox state of plant mitochondria is known to fluctuate in response to environmental stimuli, but it is largely unknown how mitochondrial functions are regulated under such conditions. I screened mitochondrial target proteins of thioredoxin (Trx) that plays a pivotal role in redox regulation, and provided a list of redox-regulated protein candidates. Furthermore, using biochemical and physiological approaches, I examined molecular basis and physiological responses of redox regulation system in mitochondria. By these studies, I revealed that several key proteins in mitochondria is subjected to Trx-dependent redox regulation.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：レドックス制御 植物生理学 植物生化学 チオレドキシソ ミトコンドリア シロイヌナズナ

## 1. 研究開始当初の背景

絶えず環境変動にさらされている植物は、個体～分子レベルであらゆる調節機構を働かせて驚くべき柔軟さで対応している。レドックスシステムは、植物を含む生命の根幹であり、その調節は細胞機能を的確に維持するために欠くことができない。そのひとつの様式であるタンパク質のレドックス制御は、標的タンパク質の活性を酸化還元によって制御する機構である。植物が過酷な環境下で生き抜くためには、この変動に対応したタンパク質のレドックス制御が必須であり、その中心的な役割を果たすのがチオレドキシン (Trx) である。

Trx は約 100 個のアミノ酸で構成される小さなタンパク質であり、酸化状態でジスルフィド結合を形成できる一対のシステインを持つ。植物 Trx システムによるレドックス制御の代表的な例としては、葉緑体カルビンサイクル酵素の光依存的な活性化が古くから知られていた (Buchanan 1980)。この系では、Trx が光によって駆動された光合成電子伝達系から電子を受け取り、カルビンサイクルの特定の標的酵素のジスルフィド結合を還元して活性化させ、継続的な炭酸固定を可能にしている。葉緑体 Trx システムを介したレドックス制御は現在でも活発に研究されており、例えばカルビンサイクル以外の代謝系に関わる様々なタンパク質が Trx の標的として決定されるなど、その理解は日々広がり深みを増している (Buchanan and Balmer 2005, Hisabori et al. 2007)。しかし、葉緑体以外の細胞内区画における Trx システムに関しては、まだ知見が乏しい。特に、細胞内エネルギーの生産工場としての機能を担うミトコンドリアについては、Trx システムが存在することは確認されていたものの (Laloi et al. 2001, Reichheld et al. 2007)、その標的酵素や生理意義等については不明であった。

ミトコンドリアは、エネルギー生産に必要な好気呼吸反応だけでなく、多様な生体システムを備えたオルガネラである。それらのシステムは細胞機能の維持、ひいては生命の維持に必須であるから、システムの基盤であるタンパク質の柔軟な活性制御もまた必須なはずである。私は、本申請課題の開始以前に、ミトコンドリア内のレドックス状態が環境に応じて変化することを見出していた (Yoshida et al. 2010, Yoshida et al. 2011)。さらに、Trx アフィニティクロマトグラフィーの手法 (Motohashi et al. 2001) を用い、植物ミトコンドリア内の Trx 標的候補タンパク質の網羅的な捕捉・同定に成功していた (Yoshida et al. 2013)。これらの知見が、後述する本申請課題の着想の直接の契機となった。

## 2. 研究の目的

本申請課題では、(1) 既に得られていたミトコンドリア内 Trx 標的候補タンパク質について、個別の詳細な生化学解析を行うことでレドックス制御の分子基盤を構築すること、(2) シロイヌナズナのミトコンドリア局在型 Trx の欠損株を用いた生理学実験を行うことで、ミトコンドリア Trx システムの植物体での生理意義や環境応答を解明することを目的とした。

### (1) 生化学解析によるミトコンドリアレドックス制御システムの分子基盤の解明

前述した通り、私は本申請課題の開始に先立って、Trx アフィニティクロマトグラフィー法によってミトコンドリア内の Trx 標的候補タンパク質のリストを作成していた (Yoshida et al. 2013)。この研究によって、Trx システムによりレドックス制御を受け得るミトコンドリアタンパク質の全体像の概略を把握することができたと言える。しかし、この手法で捕捉された標的タンパク質はあくまで“候補”であり、Trx によるレドックス制御の分子機構について不明瞭な部分が残る。これらのタンパク質を“真の” Trx 標的タンパク質と結論づけるためには、それぞれ個別かつ詳細な生化学実験を行い、(i) 実際に *in vitro* で Trx による還元を受けるのか、(ii) 酸化状態と還元状態で酵素活性がどのように影響を受けるのか、(iii) レドックス制御に決定的な役割を果たすシステイン残基はどれか、といった疑問にアドレスする必要がある。

そこで、Trx や Trx 標的候補の組換え体タンパク質を用い、レドックス状態の分析、酵素活性の測定、制御下にあるシステイン残基の特定などの実験項目を行うことで、Trx によるレドックス制御の分子基盤を詳細に明らかにすることを目的とした。

### (2) 生理学解析によるミトコンドリアレドックス制御システムの生理意義の解明

(1) の生化学を基盤とした研究の遂行により、Trx システムによるミトコンドリア機能制御を分子レベルで理解できると期待される。しかし、生化学解析のみでは、生きた植物内での Trx システムの作用機序に関して情報を得ることができない。環境変動によるレドックス変化を感知し、的確な機能調節を可能にするという Trx の潜在的役割を考慮すれば、ミトコンドリア Trx システムがどのような環境下でどのように機能するかという環境応答の実態を明らかにすることは極めて重要である。植物体内での生理機能やその応答様式を解き明かすには、目的となるタンパク質、すなわち、本研究課題の場合にはミトコンドリアの Trx を欠損した変異株を用い、その表現型を詳細に分析する方法が最も有効であろう。例えば、

変異株においてレドックス状態が影響を受けているタンパク質を発見できれば、ミトコンドリア内で Trx が機能しているという強力な証拠となるし、in vivo の観点からもそのタンパク質は Trx 標的であると結論づけることができる。

そこで、シロイヌナズナのミトコンドリア局在型 Trx の欠損変異株を用い、標的候補タンパク質の in vivo でのレドックス状態の可視化やそのタンパク質が関わる生理パラメータの分析を行い、それらに基づいて生理意義を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

Trx によるミトコンドリア機能のレドックス制御の分子基盤から生理意義まで幅広く解明するため、生化学と生理学の両側面から切り込む研究を実施する。

#### (1) 生化学解析

既に得られているミトコンドリア Trx 標的候補タンパク質について、組換え体タンパク質を調製する(対象としたタンパク質については4. 研究成果参照)。その後、以下の実験項目を行う。

酸化・還元によってジスルフィド結合の形成・開裂が起こるか：システイン修飾試薬を用いたレドックス状態の可視化

組換え体タンパク質に酸化・還元処理を行い、その後システイン残基を AMS 等のシステイン修飾試薬で修飾する。非還元 SDS-PAGE での移動度の差から、そのレドックス状態を識別し、酸化・還元処理による違いが生まれるかを分析する。

Trx は標的候補タンパク質の還元を促進できるか

酸化処理によってジスルフィド結合の形成が確認されたタンパク質について、Trx がその再還元を促進できるかを、と同じ実験手法で明らかにする。

レドックス状態の変化が酵素活性の変化に結び付くか：分光学的な酵素活性測定

の実験でジスルフィド結合の形成・開裂が明らかになったタンパク質について、次にその形成の有無が酵素活性にインパクトを与えるかを、分光学的な酵素活性測定により明らかにする。

レドックス制御に重要なシステインはどれか：ペプチドマッピングによる特定

の実験によりレドックス制御が明らかになったタンパク質については、さらにレドックス制御に決定的な役割を果たすシステイン残基の同定を行う。酸化型と還元型のタンパク質をそれぞれトリプシン消化し、MALDI-TOFMS によってマススペクトルを

分析・比較する。それぞれに特異的なマスピークを検出することで、ジスルフィド結合を形成するシステイン残基を特定する。さらに、そのシステインを置換した変異体タンパク質を調製し、レドックス制御が起こらなくなるかを調べる。

以上の生化学解析により、各 Trx 標的候補タンパク質のレドックス制御の有無を結論づけ、レドックス制御が認められたタンパク質についてはその分子基盤を解明する。

#### (2) 生理学解析

シロイヌナズナのミトコンドリア局在型 Trx 欠損変異株を用い、以下の生理学解析を行う。

Trx 標的候補タンパク質は植物体内でレドックス変動を示すのか：抗体の作成～in vivo レドックス状態の可視化

システイン修飾試薬を植物体から抽出したタンパク質に反応させ、目的タンパク質の抗体を用いたウェスタンブロットティングと組み合わせることによって、そのタンパク質の in vivo でのレドックス状態を可視化する実験系を確立する。そして、明暗でのレドックス応答や Trx 欠損の影響等を分析する。

Trx 欠損はどのようにミトコンドリア機能制御に影響するか：関連する生理パラメータの分析

対象とする各タンパク質の関連パラメータを分析し、野生株と Trx 変異株間で比較する。

以上の生理学解析により、ミトコンドリアの Trx を介したレドックス制御の in vivo での作用機序に迫る。

### 4. 研究成果

本申請課題の研究期間に、以下の Trx 標的候補タンパク質に焦点をあてて研究を行った。また、3. 研究の方法の(2) - で述べた in vivo レドックス状態の可視化技術を確立し、実際に葉緑体 Trx 標的タンパク質の in vivo レドックスダイナミクスを実証することができた(Yoshida et al. 印刷中)。

標的候補 1 : alternative oxidase (AOX)

AOX は、エネルギー生産と結び付かない電子伝達に関わる呼吸鎖タンパク質であり、細胞内過剰還元力の散逸系として植物のストレス応答に働いていると提案されている(Yoshida and Noguchi 2010)。AOX はレドックス制御を受け、酸化型でダイマー構造をとることによって不活性化されることが分かっていたが(Siedow and Umbach 2000)、Trx との相互作用については不明であった。組換

え体 Trx とミトコンドリア内膜を使った実験によって、in vitro での Trx 依存的な AOX の還元が観測された。この結果は、Trx がミトコンドリア内の還元に応じて AOX を還元することにより、過剰還元力散逸系としての機能のスイッチをオンにしている可能性を示している (Yoshida et al. 2013)。

標的候補 2 : isocitrate dehydrogenase (IDH)

IDH は、TCA サイクルの律速段階であると言われているタンパク質である (Tcherkez et al. 2005)。IDH は、制御サブユニットと触媒サブユニットからなるヘテロダイマーで機能する。両サブユニットともに Trx 標的候補タンパク質として同定されていたが、それぞれの組換え体タンパク質を調製して生化学実験を行ったところ、触媒サブユニットの酸化処理は IDH 活性に影響を与えなかったのに対し、制御サブユニットの酸化処理は IDH を不活性化させた。IDH 制御サブユニットは酸化型でオリゴマーを形成し、また Trx 依存的に再還元が促進された。このことから、IDH は酸化ストレス下で不活性化され、Trx はその再還元・再活性化に機能することが示唆された。また、ペプチドマッピングによって、IDH 制御サブユニットのレドックス制御に関するシステインを決定した (論文執筆中)。

標的候補 3 : malate dehydrogenase (MDH)

MDH は、TCA サイクルの構成タンパク質であると同時に、余剰還元力をミトコンドリア外に排出するシャトル機構にも関与している (Scheibe and Dietz 2011)。MDH は、酸化処理によって分子内ジスルフィド結合を形成するものの、酸化型と還元型で酵素活性に違いはなかった。また、Trx による再還元の促進も観測されなかった。さらに、MDH の in vivo レドックス状態の可視化実験を行ったところ、野生株と Trx 変異株の両方において、光環境に依らず安定して還元型で存在していた。このことから、Trx 標的候補タンパク質として同定された MDH は、実はレドックス制御を受けないタンパク質であることがわかった。また、研究の過程で、MDH がアデニレートによって阻害を受けるといった新しい活性調節メカニズムを明らかにした (論文執筆中)。

標的候補 4 : peroxiredoxin PrxIII

PrxIII は、活性酸素種の 1 つである過酸化水素の消去に関わる。Trx が PrxIII への還元力のドナーとして働いていることが予想されていたが、組換え体タンパク質を組み合わせた還元力伝達過程をモニターする実験系において、Trx は PrxIII を還元できないことが明らかとなった。しかし、PrxIII はグルタチオン/グルタレドキシシステムを介して還元力の供給を受けるといった新奇の還元力伝達経路が明らかになった。

今後の展望

以上に記述した通り、4 つの Trx 標的候補タンパク質について生化学解析を行い、そのレドックス制御の可否、およびレドックス制御の分子基盤を明らかにすることができた。しかしその一方で、生理学解析は、当初掲げていた目標まで研究期間内に達することはできなかった。生化学解析において Trx 依存的なレドックス制御を受けるタンパク質と決定された AOX や IDH 制御サブユニットは、Trx 欠損株において酸化型で多く存在することを示すデータが得られているものの、まだ再現性が十分ではない。in vivo でのレドックス状態を可視化する技術は十分に確立できたので、今後、環境ストレス等の要因も加味しながら、さらなる研究を行う。

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 2 件)

1. Yoshida K., Matsuoka Y., Hara S., Konno H., Hisabori T.

**Distinct redox behaviors of chloroplast thiol enzymes and their relationships with photosynthetic electron transport in *Arabidopsis thaliana***

Plant and Cell Physiology, Oxford Journal, 印刷中 (PMID: 24850837) 査読有

2. Yoshida K., Noguchi K., Motohashi K., Hisabori T.

**Systematic exploration of thioredoxin target proteins in plant mitochondria**

Plant and Cell Physiology, Oxford Journal, Vol. 54. Pp. 875-892 (2013) 査読有

[学会発表](計 9 件)

1. Rayakorn Yutthanasirikul, Takanori Nagano, Takashi Kanamori, Takuya Ueda, Takamitsu Haruyama, Hiroki Konno, Keisuke Yoshida, Toru Hisabori, Yoshitaka Nishiyama  
**Redox regulation of the translation factor EF-Tu in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803**

第 55 回日本植物生理学会年会、3aG03, 富山大学五福キャンパス、2014 年 3 月 18 日 - 20

日

2. 松岡裕太 吉田啓亮 紺野宏記 久堀徹

葉緑体チオール酵素の in vivo レドックス状態に影響を与える因子の探索

第 55 回日本植物生理学会年会、PL036, 富山大学五福キャンパス、2014 年 3 月 18 日 - 20 日

3. 吉田啓亮 久堀徹

ミトコンドリア TCA サイクル酵素のレドックスとアデニレート状態に応じた活性調節

第 55 回日本植物生理学会年会、PL033, 富山大学五福キャンパス、2014 年 3 月 18 日 - 20 日

4. 姜振祥 吉田啓亮 寺島一郎 野口航  
葉における光合成系と呼吸系の相互作用

第 55 回日本植物生理学会年会、2aF04, 富山大学五福キャンパス、2014 年 3 月 18 日 - 20 日

5. 姜振祥 吉田啓亮 寺島一郎 野口航  
葉における光合成系と呼吸系の相互作用

日本植物学会第 77 回大会、1aC09、北海道大学札幌キャンパス、2013 年 9 月 13 日 15 日

6. 吉田啓亮 松岡裕太 紺野宏記 久堀徹

葉緑体チオール酵素の in vivo レドックス応答とその制御

日本植物学会第 77 回大会、P-096、北海道大学札幌キャンパス、2013 年 9 月 13 日 15 日

7. 吉田啓亮 久堀徹

ミトコンドリアのエネルギー状態に依存した mt-MDH の活性調節

第 4 回日本光合成学会年会、P5、名古屋大学、2013 年 5 月 31 日-6 月 1 日

8. 吉田啓亮 松岡裕太 紺野宏記 久堀徹

葉緑体チオール酵素の in vivo レドックス応答とその制御

第 4 回日本光合成学会年会、O1、名古屋大学、2013 年 5 月 31 日-6 月 1 日

9. 吉田啓亮 松岡裕太 紺野宏記 久堀徹

葉緑体チオール酵素の光還元応答は一様ではない

第 54 回日本植物生理学会年会、2pA04、岡山大学、2013 年 3 月 21 日 - 23 日

〔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  
[http://www.res.titech.ac.jp/~junkan/Hisabori\\_HomePage/index.html](http://www.res.titech.ac.jp/~junkan/Hisabori_HomePage/index.html)

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
吉田 啓亮 (YOSHIDA, Keisuke)  
東京工業大学・資源化学研究所・助教  
研究者番号：40632310

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：