

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25251032

研究課題名(和文) NDH複合体を中心とする葉緑体機能制御の進化

研究課題名(英文) Regulation of chloroplast function by the NDH complex

## 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) 34,200,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体NDHは、NAD(P)Hではなく、フェレドキシンから電子を受け取る。NdhSタンパク質は、SH3ドメインに正の表面電化をもち、負の電化をもつフェレドキシンとの静電的結合に寄与する。シロイヌナズナにおいて、NDHは、PSIサイクリック電子伝達を駆動し、プロトン駆動力の形成に寄与する。NDHは、PSIと超複合体を形成するが、その際、Lhca5とLhca6は、リンカーとして機能する。Lhca6は、Lhca2より分岐したが、両者のキメラタンパク質の解析から、リンカーとしての機能に関わる領域を特定した。また、NDH複合体のアセンブリに関わる、CRR3、CRR9タンパク質の機能について情報を得た。

研究成果の概要(英文)：Chloroplast NDH accepts electrons from ferredoxin rather than NAD(P)H. The SH3 domain of the NdhS protein has positive charge, contributing to the electrostatic interaction with ferredoxin with negative charge. In Arabidopsis, chloroplast NDH mediates PSI cyclic electron transport, contributing to the formation of proton motive force across the thylakoid membrane. Chloroplast NDH forms the supercomplex with PSI, in the process which Lhca5 and Lhca6 function as linkers. Lhca6 originated from Lhca2 during the evolution of land plants. Analysis of chimeric proteins between two Lhca proteins clarified the Lhca6 region required for the linker function. We also obtained the molecular information on CRR3 and CRR9, which were required for the assembly of chloroplast NDH.

研究分野：植物生理学

キーワード：葉緑体 光合成 チラコイド膜 NDH 光化学系 フェレドキシン アセンブリ 超複合体

## 1. 研究開始当初の背景

葉緑体 NDH 複合体は、葉緑体ゲノムにコードされる 11 の *ndh* 遺伝子として発見された。当時は、葉緑体に呼吸鎖関連の複合体が存在する理由は分からなかったが、その後、NDH 複合体は、光合成電子伝達 (サイクリック電子伝達) を触媒することが明らかになった。しかしながら、その生理機能は、よくわかっていなかった。ミトコンドリアや光合成を行わないバクテリアの NDH 複合体は、NADH を電子供与体にするが、葉緑体 NDH には、NAD(P)H 酸化に関わる N モジュールが見つからず、電子供与体が何であるかも不明であった。

本研究の開始に先立って、我々は、葉緑体 NDH 複合体が光化学系 (PSI) と超複合体を形成すること<sup>1)</sup>、NAD(P)H ではなくフェレドキシンを電子供与体とすること<sup>2)</sup>、を明らかにした。また、ゼニゴケでは、NDH 複合体のサブユニット組成がシロイヌナズナとはやや異なり、PSI と超複合体を形成しないことを報告した<sup>3)</sup>。さらに、キノン還元に関わる Q モジュールの詳細なアセンブルモデルを報告した<sup>4)</sup>。

## 2. 研究の目的

(1) NDH 複合体の電子供与体との結合部位について  
葉緑体 NDH は、NAD(P)H の酸化に関わる N モジュールを欠き、長らく電子供与体が何であるのか不明であった。我々は、NDH 複合体にフェレドキシン結合部位を作る NdhS/CRR31 を発見し、電子供与体がフェレドキシンであることを提唱した<sup>1)</sup>。本研究は、葉緑体 NDH 複合体が、フェレドキシンからいかに電子を受け取るのかを明らかにすることを目的とする。

(2) NDH 複合体の生理機能解析  
NDH 複合体は、葉緑体でサイクリック電子伝達に関わるが、シロイヌナズナなど被子植物での貢献は大きくなく、PGR5 タンパク質に依存するアンチマイシン A 感受性のサイクリック電子伝達が重要である。両方のサイクリック電子伝達を欠く二重変異体は、光合成に大きな異常を示す。本研究では、プロトン駆動力形成に対する貢献を定量的に評価することで、NDH 複合体が、野生株でいかなる生理機能をもつのかを明らかにすることを目的とする。

(3) NDH-PSI の超複合体の構造解析  
被子植物において NDH 複合体は、PSI と超複合体を形成する。しかしゼニゴケでは、この超複合体は確認されず、陸上植物の進化の過程で、起こったことと考えられる。超複合体形成において、リンカーとして働くのが、マイナー集光アンテナの Lhca6 である。

Lhca6 は、主要な集光アンテナである Lhca2 より進化的に分かれ、リンカーとしての機能を獲得した。本研究では、その進化をタンパク質の構造のレベルで明らかにする。

(4) NDH 複合体のアセンブリ機構の解析  
NDH 複合体は、11 の葉緑体遺伝子と 16 以上の核コード因子にコードされ、さらに 2 つのリンカータンパク質を介して PSI と超複合体を形成する。NDH 複合体は、グロースチャンパーにおける光合成に必要ではなく、その欠損による二次的な影響はほとんどない。したがって、巨大タンパク質複合体のアセンブリ研究において、良い研究材料であり、実際、我々は、Q モジュールの詳細なアセンブルモデルを報告した<sup>4)</sup>。しかし、膜に埋まった部分や、PSI との超複合体の形成過程は、未知の部分が多い。本研究は、NDH-PSI 超複合体のアセンブリをさらに詳細に調べることが目的にした。

## 3. 研究の方法(括弧内の番号は目的に対応)

(1) *in silico* で、NdhS の表面膜電位を予測し、それに影響を与えるアミノ酸残基を予測した。フェレドキシンとの親和性に与える影響をチラコイド膜と葉で調べた。

(2) シロイヌナズナ野生株、*pgr5* 変異株、NDH 欠損株及び両方のサイクリック電子伝達を欠損する二重変異体を用いて、Dual PAM システムによる electrochromic shift 解析を行った。

(3) シロイヌナズナの Lhca2 と Lhca6 の間で、一連のキメラタンパク質をコードする遺伝子を作成し、*lhca6* 変異株に導入した。NDH-PSI 超複合体の形成を評価した。さらに主要 Lhca1 (Lhca1-4) を欠損する変異株で、超複合体の形成を調べた。

(4) シロイヌナズナ *crr3* および *crr9* 変異株を用いて、遺伝学、生化学解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 本研究では、NdhS タンパク質の構造と表面電位の予測を行い、SH3-like ドメインが、正の電化を持ち、負の電化を持つフェレドキシンと静電的に相互作用するモデルを提唱した。さらに、*in silico* の予測から、NdhS の表面電位を変える変異を導入し、193 アルギニンがフェレドキシンとの相互作用に重要な役割を果たすことを証明し、モデルを支持した(発表論文)。

また進化的な考察から、葉緑体 NDH は、フェレドキシンを電子供与体とする [NiFe] ヒドロゲナーゼを起源とすると考えられる。光合成型 NDH の進化の過程で、電子供与体はフェレドキシンのままであったが、呼吸型

NDH は、N モジュールを獲得し、NADH を電子供与体にするようになったと考えられる(発表論文、図書)。この考えに基づき、NdhS は、葉緑体 NDH の Q モジュールに結合し、フェレドキシンは、Q モジュールに存在する電子キャリアに直接電子を渡すモデルを考えている。

(2) Electrochromic shift 解析は、チラコイド膜を介したプロトン駆動力(プロトン濃度勾配と膜電位から成る)の形成を非破壊的にモニターできる技術である。*pgr5* 変異株では、プロトン駆動力の大幅な減少が確認されたが、重要なことに、NDH 複合体の欠損株においても、統計的に有為なプロトン駆動力の減少が見られた。このことから、NDH 複合体は、PGR5 経路同様に、サイクリック電子伝達によるプロトン駆動力の形成に関わっていることが明らかになった(発表論文)。また、*pgr5* 変異株では、ATP 合成酵素の  $H^+$  conductivity を表すという考えられる  $g_{H^+}$  の上昇が、強光時に確認された。 $g_{H^+}$  の上昇は、弱光下で、短時間で解消され、チラコイド膜の損傷ではなく、ATP 合成酵素の制御を反映しているのではないかと考えている(発表論文)。

共同研究者の矢守博士により、イネにおいて NDH 複合体が、弱光時(発表論文)および変動光下(発表論文)で、重要な生理機能を持つことが明らかになった。

(3) シロイヌナズナは、6 つの遺伝子が PSI の集光アンテナ(LhcI)をコードするが、Lhca1-4 は、主要 LhcI として機能する。一方、Lhca5 と Lhca6 は、NDH と PSI の超複合体形成において、リンカーとして機能する。そのうち Lhca6 は、NDH の安定化に必須である。系統樹解析を行うと、Lhca6 は、Lhca2 ともっと相同性が高く、陸上植物の進化の過程で、リンカーとしての機能をもつように分岐したものと考えられる。そこで、様々な光合成生物の Lhca2 と Lhca6 の配列情報をもとに、Lhca2 と Lhca6 それぞれをベースに、多くのキメラタンパク質をコードする遺伝子を作成し、シロイヌナズナの *lhca6* 変異株に導入した。クロロフィル蛍光解析による NDH 活性測定を指標に、最終的には、BN ゲル解析により NDH-PSI 超複合体の形成を調べた。その結果、Lhca6 のリンカーとしての機能に必要で十分な領域を決定した。これらの結果は、学会発表を行った(学会発表)。具体的なデータは、論文として発表の予定である。

Lhca5 と Lhca6 は、NDH-PSI 超複合体のリンカーとして機能するが、どのように2つの複合体をつなぐのかは、わかっていない。最近、一分子の電子顕微鏡解析から、NDH は、2分子の PSI 超複合体の集光アンテナ側と相互作用していることが考えられた。そこで、Lhca5 と Lhca6 は、Lhca1-4 の形成する集光アンテナの外側に位置するモデルと、Lhca5 と

Lhca6 が、Lhca1-4 の一部と置き換わるモデルが考えられる。そこで、Lhca1-4 を欠損する変異株を用いて、超複合体の形成を調べた。その結果、Lhca5 と Lhca6 の機能は、ある程度可塑性があり、いくつかの位置に入りうるが、おそらく野生株で見られる超複合体のモデルを提唱するに至った。

これらの結果は、学会発表を行った(学会発表)。具体的なデータは、論文として発表の予定である。

(4) シロイヌナズナ CRR3 タンパク質は、NDH 複合体のアセンブリに必要である。本研究では、CRR3 が関わるアセンブリ過程を遺伝学的に調べ、CRR3 を含むアセンブリ中間体を生化学的に解析した。また、NDH 複合体のアセンブリが、少なくとも一部は、PSI に結合した状態で進行することを明らかにした。本件研究成果は、学会発表を行った(学会発表)。またその詳細を論文として投稿している(未発表)。

CRR9 タンパク質は、NDH 活性を欠くシロイヌナズナ変異株から単離された。*crr9* 変異株は、Q モジュールのアセンブリに異常を示した。生化学解析により、CRR9 タンパク質が関わるアセンブリ過程を特定した。本件研究成果は、学会発表を行った(学会発表)。またその詳細を論文として投稿している(未発表)。

#### <引用文献>

1. Peng L, Fukao Y, Fujiwara M, Takami T, Shikanai T (2009) Efficient operation of NAD(P)H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCI in Arabidopsis. *Plant Cell* 21, 3623-3640.
2. Yamamoto H, Peng L, Fukao Y, 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.
3. Ueda M, Kuniyoshi T, Yamamoto H, Sugimoto K, Ishizaki K, Kohchi T, Nishimura Y, Shikanai T (2012) Composition and physiological function of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Marchantia polymorpha*. *Plant J* 72, 683-693.
4. Peng L, Fukao Y, Fujiwara M, 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.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計13件)

Shikanai T (2016) Regulatory network of proton motive force: Contribution of cyclic electron transport around photosystem I. *Photosynthesis Res.* in press. doi: 10.1007/s11120-016-0227-0.

Yamamoto H, Takahashi S, Badger MR, Shikanai T (2016) Artificial remodeling of alternative electron flow by flavodiiron proteins in *Arabidopsis*. *Nature Plants* 16012. doi: 10.1038/NPLANTS.2016.12.

Yamori W, Shikanai T (2016) Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis and plant growth. *Annu Rev Plant Biol* 67, 81-106. doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-112002

Peltier G, Aro E-M, Shikanai T (2016) NDH-1 and NDH-2 plastoquinone reductases in oxygenic photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 67, 55-80. doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-114752.

Yamori W, Makino A, Shikanai T (2016) A physiological role of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis under fluctuating light in rice. *Sci Rep* 6, 20147. doi: 10.1038/srep20147.

Shikani T (2015) Chloroplast NDH: a different enzyme with a structure similar to that of respiratory NADH dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* in press. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.10.013.

Yamori W, Shikanai T, Makino A (2015) Photosystem I cyclic electron flow via chloroplast NADH dehydrogenase-like complex performs a physiological role for photosynthesis at low light. *Sci Rep* 5, 13908. doi: 10.1038/srep15593.

Wang C, Yamamoto H, Shikanai T (2015) Role of cyclic electron transport around photosystem I in regulating proton motive force. *Biochim Biophys Acta* 1847, 931-938. doi: 10.1016/j.bbabi.2014.11.013.

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.

Yamamoto H, 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.

Taira Y, Okegawa Y, Sugimoto K, Abe M, Miyoshi H, 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. eCollection 2013.

Fujii S, Sato N, Shikanai T (2013) Modulation of the RNA-binding activity of individual PPR motifs reveals the functional partitioning of PROTON GRADIENT REGULATION 3. *Plant Cell* 25, 3079-3088. doi: 10.1105/tpc.113.112193.

Sugimoto K, Okegawa Y, Tohri A, Long TA, Sarah FS, Hisabori T, 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.

#### [学会発表](計5件、他多数)

Shikanai T, Regulation of photosynthesis by PSI cyclic electron transport, 16th International Congress on Photobiology, Córdoba, Argentina, 2014.9.8.

大谷卓人、山本宏、鹿内利治、NDH-光化学系 I 超複合体に介在するリンカータンパク質の分子進化、日本植物生理学会年会、東京、2015.3.17.

大谷卓人、山本宏、鹿内利治、NDH リンカータンパク質はどのように PSI と相互作用しているのか、第 57 回日本植物生理学会年会、盛岡、2016.3.18-20.

加藤義宣、鹿内利治、Lhca6 を介した NDH と PSI の超複合体形成は subcomplex B アセンブリの初期段階で起こる、第 57 回日本植物生理学会年会、盛岡 2016.3.18-20.

山本宏、Xiangyuan Fan、杉本和彦、Lianwei Peng、鹿内利治、CRR9 は、葉緑体 NDH 複合体サブコンプレックス A の会合因子である、第 57 回日本植物生理学会年会、盛岡、2016.3.18-20

#### [図書](計2件)

Shikanai T, Aro E-M (2016) Evolution of photosynthetic NDH-1: Structure and physiological function. W.A. Cramer and T. Kallas (eds.), *Cytochrome complexes: Evolution, Structures, Energy Transduction, and Signaling, Advances in Photosynthesis and Respiration* 41. Springer Science+Business Media Dordrecht.

Ifuku K, Shikanai T (2015) Regulation of photosynthetic electron transport via supercomplex formation in thylakoid membrane. R.R. Louro and I. Diaz-Moreno (eds.), *Redox proteins in supercomplexes and signalosomes*. CRC Press.

#### [産業財産権]

出願状況(計0件)  
該当無し

取得状況(計0件)  
該当無し

〔その他〕  
ホームページ等  
該当なし

6．研究組織

(1)研究代表者

鹿内 利治 (SHIKANAI, Toshiharu)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：70273852