

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：34304

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650037

研究課題名(和文) 光合成産物可視化のための蛍光プローブ開発

研究課題名(英文) Development of FRET-sensor for photosynthetic products

研究代表者

本橋 健 (MOTOHASHI, Takeshi)

京都産業大学・総合生命科学部・准教授

研究者番号：90301952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：光合成の明反応ではNADPHとATPを産生する。これらの化合物は、二酸化炭素固定に用いられ、光合成エネルギー代謝の重要な代謝産物である。本研究は、光合成明反応で産生するNADPHに注目し、細胞内でリアルタイムに濃度変化を観測するセンサーを作成することを目的とした。

生体内でNADPHを結合するタンパク質とGFP誘導体融合タンパク質の大腸菌での発現系を構築し、各種発現条件を検討し、タンパク質の調製を試みた。組換えタンパク質が可溶性として回収できなかったため、低温培養、誘導条件の検討を行った。また、融合タンパク質の融合部位を変化させた複数の発現系も構築し、可溶性画分発現するものを選抜した。

研究成果の概要(英文)：In the light conditions, photosynthetic systems produce NADPH and ATP in higher plants. NADPH and ATP are further used for the reduction of CO₂ in the chloroplast stroma. In this study, we proposed to develop NADPH sensor by fluorescent energy transfer (FRET) using NADPH-binding protein and Green fluorescent protein (GFP)-derivatives.

We constructed the fused proteins which CFP (GFP-derivative) protein was fused at N-terminus of NADPH-binding protein and YFP (GFP-derivative) protein was fused at C-terminus of NADPH-binding protein. The fusion-proteins were overexpressed.

研究分野：植物生理学

キーワード：生体エネルギー変換 光合成

1. 研究開始当初の背景

高等植物の光合成は、太陽などの光を受けるとNADPHとATPを生成し、この2つの物質を用いて、カルビンサイクルを利用し、二酸化炭素を糖に固定する(図1)。そのため、光合成を行う植物の葉(または、植物細胞)でこれら2つの物質が生成する様子をリアルタイムにモニターすることは光合成の反応メカニズムを理解する観点から非常に重要な課題である。2つの物質のうちNADPHは、これまで煩雑な生化学的手法を用いてしか定量することができなかった。すなわち、葉全体、細胞全体を破碎抽出後、高速液体クロマトグラフィーを利用して定量していた。そのため、採取した葉全体のNADPHは定量できたが、葉の生きた細胞内でのNADPHの生成が、細胞内のどこで、どのようなタイムスケールで行われているかをリアルタイムで観測することは不可能であった。本研究では、光合成の中間産物のひとつであり、二酸化炭素固定に重要な役割を担うNADPHを、植物の生きた細胞内でリアルタイムに観測するために必要な実験系構築を目指した。

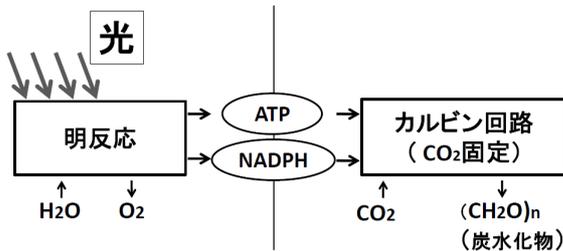


図1 植物光合成の概要

これまでに、研究者は、高等植物の光合成機能を制御する未知の標的タンパク質を同定する方法を考案し、網羅的に標的タンパク質を同定した。またこの方法により、新たな制御タンパク質を多数明らかにしてきた(文献1)。また、葉緑体ストロマでは、明暗の光条件変化に応じて、カルビンサイクルの酵素だけでなく数多くの酵素が、その活性を制御されていることも明らかにしてきた(文献2-4)。一方、ストロマとはチラコイド膜を隔てたチラコイド内腔でも類似した機能制御システムが存在し、植物内で働いていることも示した(文献5,6)。このような実績を元に、光合成とタンパク質科学の両分野での経験から、本テーマを構想し、計画した。

1. Motohashi et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11224-11229 (2001)
 2. Motohashi et al. *J. Biol. Chem.* **278**, 31848-31852 (2003)
 3. Hara & Motohashi et al. *J. Biol. Chem.* **281**, 32065-32071 (2006)

4. Ikegami et al. *J. Biol. Chem.* **282**, 19282-19291 (2007)
 5. Motohashi et al. *J. Biol. Chem.* **281**, 35039-35047 (2006)
 6. Motohashi et al. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 1169-1176 (2010)

2. 研究の目的

光合成は、NADPHとATPを生成する明反応とそれを消費する炭酸固定反応に分かれている。このうち、明反応で生成するNADPHとATPは、その後の二酸化炭素固定反応に用いられる重要な化学物質である。植物の光合成反応において重要な役割を担うNADPHとATPのうち、NADPHを生きた細胞内でリアルタイムに観測する実験系を構築することができれば、光合成の理解は大きく進むことが期待できる。これまでNADPHの定量は古典的な生化学的手法のみで行うことができたが、生きた細胞内のNADPHをリアルタイムに観測することは不可能だった。生きた細胞内でNADPHをリアルタイムに観測できれば、細胞内の光合成反応を、時間的、空間的に高い分解能で解析することができる。この手法は、「いつ」、「どこで」、光合成明反応の産物が生成しているのか明らかにでき、光合成反応の理解を大きく進めることが可能となる。そこで、本研究では、生きた細胞内でNADPH濃度をリアルタイムに計測することが可能なNADPH濃度センサーを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

生きた細胞内でのNADPH濃度変化を捉えるための蛍光エネルギー移動(Fluorescent Energy Transfer, FRET)センサーを構築する。そのために、NADPHを結合するタンパク質と2つの緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent protein, GFP)誘導体の融合タンパク質を作成する(図2)。光合成の明反応におけるもうひとつの

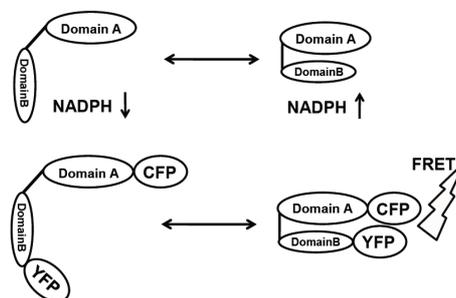


図2 NADPH結合タンパク質の構造変化とCFP, YFPによるFRET変化(予想)

産物であるATPについては、同様なGFP誘導体を用いたFRET法を応用して、AT

P濃度を細胞内でリアルタイムに観測する実験系が構築されている(文献7)。NADPHのFRETセンサーを開発する第一段階として、このNADPH結合タンパク質と2つのGFP誘導体(CFPおよびYFP)の融合タンパク質を大腸菌で発現させ、精製し、*in vitro*において、FRETセンサーとしての機能を評価する必要がある。これまでの研究から、このNADPH結合タンパク質は、NADPH濃度依存的にタンパク質の構造が変化す可能性が予想されている。

7. Imamura *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 15651-15656 (2009)

4. 研究成果

生体内でNADPHを結合するタンパク質とGFP誘導体の融合タンパク質を作成し、NADPH濃度変化に応答した蛍光エネルギー移動(Fluorescent Energy Transfer, FRET)により、NADPHの濃度変化を捉えることを目的としているので、候補となるNADPH結合タンパク質とGFP誘導体の融合タンパク質を大腸菌で発現させるため、2つのGFP誘導体とNADPH結合タンパク質を融合してタンパク質発現するための発現プラスミドを構築した。また、この発現系を用いて、大腸菌を用いた組換えタンパク質を調製するために、各種培養、および発現条件を検討し、上記の融合タンパク質の発現を試みた。

培養、発現等に関するいくつかの条件検討を試みたところ、いずれの場合も組換えタンパク質が可溶性タンパク質として回収できなかった。これを改善するために、通常検討される低温培養、誘導条件の検討を行った。また、GFPとNADPH結合タンパク質の融合タンパク質の融合位置を変化させた複数の発現系も構築し、可溶性画分に発現するものの選抜を行った。

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 3件)

1. Ken Motohashi

A simple and efficient seamless DNA cloning method using SLiCE from *Escherichia coli* laboratory strains and its application to SLiP site-directed mutagenesis

BMC Biotechnol. *in press* (2015)

doi: 10.1186/s12896-015-0162-8

査読あり

2. Ken Motohashi and Yuki Okegawa
Method for enhancement of plant redox-related protein expression and its application for *in vitro* reduction of chloroplastic thioredoxins.

Protein Expr. Purif. 101, 152-156 (2014)

doi: 10.1016/j.pep.2014.07.001

査読あり

3. Keisuke Yoshida, Ko Noguchi, Ken Motohashi and Toru Hisabori

Systematic Exploration of Thioredoxin Target Proteins in Plant Mitochondria.

Plant Cell Physiol. 54, 875-892 (2013)

doi: 10.1093/pcp/pct037

査読あり

[学会発表](計 7件)

1. 桶川 友季、本橋 健

シロイヌナズナの Trx m 変異株はカルビンサイクル酵素の光活性化を減少させ、植物の成長阻害を引き起こす

第56回日本植物生理学会年会

2015.3.16-18

世田谷区; 東京農業大学

2. 桶川 友季、本橋 健

シロイヌナズナの m 型チオレドキシンノックダウン株におけるチオール酵素のレドックス状態の解析

第86回日本生化学会

2014.10.15-18

京都市; 京都国際会館

3. 本橋 健、桶川友季

葉緑体レドックス関連タンパク質発現系の改良と葉緑体チオレドキシン *in vitro* 還元システムへの応用

第86回日本生化学会

2014.10.15-18

京都市; 京都国際会館

4. 桶川 友季、本橋 健

シロイヌナズナにおけるm型 Trx の標的タンパク質の解析

2014.5.30-31

第5回日本光合成学会年会

奈良市; 近畿大学農学部奈良キャンパス

5. 桶川 友季、本橋 健

シロイヌナズナのレドックス制御におけるm型 Trx の役割

2014.3.18-20

第55回日本植物生理学会年会

富山市; 富山大学

6. 桶川 友季、本橋 健

シロイヌナズナにおける葉緑体チオレドキシンの生理学的解析
第 85 回日本生化学会
2013.9.11-13
横浜市；パシフィコ横浜

7. 桶川 友季、本橋 健
シロイヌナズナの m 型チオレドキシソ変異株の解析
第 4 回日本光合成学会年会
2013.5.31-6.1
名古屋市；名古屋大学

〔その他〕

ホームページ等

http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~motohas/motohashi_lab/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

本橋 健 (MOTOHASHI, Takeshi)
京都産業大学・総合生命科学部・准教授
研究者番号：90301952