

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450081

研究課題名(和文) 酸素酸化によるルビスコの失活を防ぐメカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism to prevent the inactivation of Rubisco by oxygen oxidation

研究代表者

島田 裕士 (Hiroshi, Shimada)

広島大学・理学研究科・准教授

研究者番号：80301175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナBSD2はジスルフィド結合を還元開裂するProtein disulfide reductase活性を有しており、葉緑体内ストロマに局在していた。BSD2は、光合成において二酸化炭素を固定化する酵素ルビスコタンパク質と相互作用し、酸化失活したルビスコを還元活性化することが示された。BSD2を高発現させたシロイヌナズナでは、光合成における二酸化炭素固定化速度が上昇し、35日齢のBSD2高発現シロイヌナズナの地上部乾燥重量がコントロールに対して約40%上昇した。これらの結果より、BSD2高発現によって植物バイオマス上昇が可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) is the key enzyme for atmospheric CO₂ fixation. The Arabidopsis bsd2 mutant showed a significant reduction in photosynthetic capacity and was unable to grow autotrophically. BSD2 directly interacts with Rubisco, and recombinant BSD2 could reduce the oxidized form of Rubisco in vitro via disulfide reductase activity. A role for BSD2 in maintaining Rubisco activity was further supported in Arabidopsis BSD2-overexpression lines where Rubisco activation status and photosynthetic activity were higher than wild type. Our results demonstrate that BSD2 is key in the mechanisms that regulates the reactivation of oxidized Rubisco, thereby maintaining functional photosynthesis in plants.

研究分野：光合成

キーワード：光合成 ルビスコ 炭酸固定 BSD2 CY02

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Ribulose1,5-bisphosphate

carboxylase/oxygenase (ルビスコ) は、植物の光合成において二酸化炭素を固定する酵素であり、植物のバイオマスを決定する重要な働きを担っている。ルビスコタンパク質は還元状態では酵素活性を有しているが、酸化状態では失活する事が報告されている。葉緑体では光合成によって酸素が大量に発生しており、ルビスコが存在しているストロマ画分の溶存酸素濃度は飽和状態の高濃度となっている。また、照射下のストロマ画分の pH は弱アルカリになっている。このような条件下ではタンパク質の構成成分であるシステイン残基のチオール基は、酸素分子によって非酵素的に容易に酸化されジスルフィド結合を形成する。ルビスコは大小サブユニットそれぞれ 8 個からなる複合体であり、シロイヌナズナルビスコ複合体は合計 112 個のシステイン残基を有している。精製したルビスコタンパク質は還元剤非存在下では、大気中では容易に酸化する。しかし、野生型植物においてジスルフィド結合を形成している酸化状態のルビスコは、ルビスコ全体の約 2 割程度に抑えられている。この事は、ルビスコの酸素酸化を防ぐメカニズムの存在か、酸化状態になったルビスコを還元状態に戻すメカニズムの存在が考えられるが、その詳細は未だ不明である。

葉緑体内では光合成の明反応によって生じた還元力によって NADPH が作られ、カルビンサイクルにおける二酸化炭素固定反応に用いられている。明反応で生じた還元力はフェレドキシン、フェレドキシン-チオレドキシ還元酵素を介した経路によって、多くの光合成関連酵素の活性を調製している。チオレドキシンは多くの標的酵素のジスルフィド結合を還元し、酵素活性を調製している。国内外の研究グループによって、葉緑体ストロマ中のチオレドキシンはカルビンサイクルの酵素群の活性調節のみならず、デンプン合成やタンパク質の立体構造形成など、葉緑体の様々な機能発現に関与していることが近年明らかになりつつあるが、ルビスコのジスルフィド結合を介した酸化還元制御機構については未解明のままである。

申請者は葉緑体のバイオジェネシス解明を目的とした研究をこれまで行ってきた。近年は子葉と本葉で異なる葉緑体形成機構の違いを明らかにする事を目的として、子葉特異的葉緑体形成因子 CY01 の解析をシロイヌナズナを用いて行ってきた。CY01 タンパク質は Protein disulfide reductase (PDR) 活性を有しており、酸化によって形成されたタンパク質のジスルフィド結合を還元する活性 ($R_1-S-S-R_2$ R_1-SH + $HS-R_2$) を有している。

本研究では CY01 の研究過程で同定された、CY01 ホモログであるシロイヌナズナ BSD2 はイギリスの Landgale らのグループによって最初トウモロコシで発見され、ルビスコ複合体の形成に関与するシャペロンとして報告された。それ以来、国内外の多くの研究者が BSD2 に注目しているが、BSD2 の詳細な機能解析は未だなされていない。申請者の予備実験から以下の事が明らかになっている。

- ①シロイヌナズナ *bsd2* 変異体は、Pale-green で矮化していた。
- ②野生型シロイヌナズナの酸化型ルビスコの割合が約 2 割であるのに対して、*bsd2* 変異体のルビスコは 7 割以上が酸化状態であった。
- ③BSD2 は CY01 同様 PDR 活性を有していた。
- ④タマネギ表皮細胞を用いた BiFC (bi-molecular fluorescent complementation) 法解析から、BSD2 はルビスコ大・小サブユニットタンパク質それぞれと相互作用していた。

これらの事から申請者は、BSD2 は酸化によって生じたルビスコのジスルフィド結合を PDR 活性によって還元し、ルビスコの再活性化に関与しているという仮説を立て、本研究を行った。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの予備実験結果をもとに、本研究では BSD2 の機能に関する上記仮説の検証を行い、これまで未解明であった酸素酸化によるルビスコの失活を防ぐメカニズムの解明を行なう。同時に、BSD2 の機能強化による還元活性型ルビスコの割合が上昇した植物作成を目指し、バイオマス増大植物の育種の可能性を探索する。研究期間内に以下のことを明らかにすることを目的とした。

- ①BSD2 タンパク質の詳細な酵素学的解析 (至適 pH・温度 K_m や K_{cat} 等の測定) を行なう。
- ②BSD2 タンパク質の細胞内局在と、BSD2 タンパク質とルビスコタンパク質との相互作用を明らかにする。
- ③シロイヌナズナ *bsd2* 変異体の解析を行い、生体内における BSD2 の機能を明らかにする。
- ④BSD2 タンパク質による酸化失活ルビスコの還元活性ルビスコへの還元活性化機構を明らかにする。
- ⑤BSD2 高発現植物の作出とその解析を行ない、バイオマス増大植物の育種の可能性を探索する。

3. 研究の方法

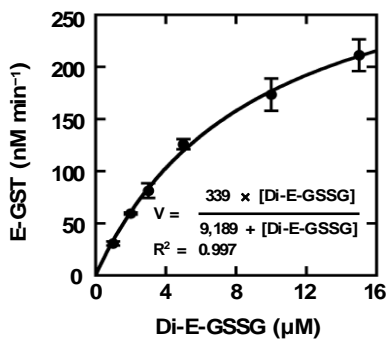
「BSD2 は、酸化型ルビスコを還元してルビスコの再活性化に関与している」という申請者の仮説検証とバイオマス増大植物育種

の可能性を探索するために、下記の方法で研究を行った。

- ・シロイヌナズナ BSD2 タンパク質の酵素学的解析
- ・BSD2 タンパク質の細胞内局在解析
- ・BSD2 タンパク質とルビスコタンパク質との相互作用解析
- ・BSD2 タンパク質による酸化失活ルビスコの還元活性化機構の解明
- ・シロイヌナズナ *bsd2* 変異体の表現型解析
- ・BSD2 高発現植物の作出とその解析

4. 研究成果

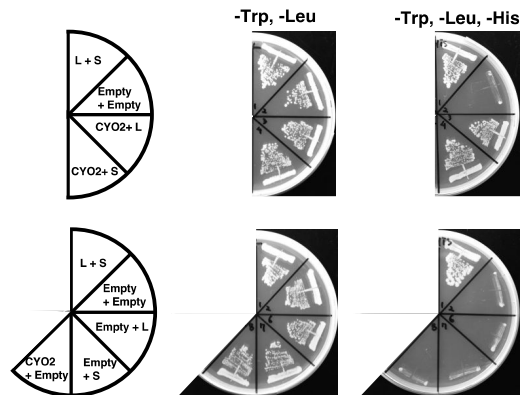
シロイヌナズナ BSD2 について、C 末に 6×His を付加した BSD2 タンパク質を大腸菌で発現し、Ni-カラムを用いて精製したタンパク質を用いて酵素学的解析を行った。自作した Di-E-GSSG を基質として BSD2 の Protein disulfide reductase (PDR) 活性を測定した。その結果、BSD2 の K_m 値 ($9,189 \pm 928$ nM) や K_{cat} 値 (3.39 ± 0.16 min⁻¹), $K_{cat}K_m^{-1}$ ($6.2 \times 10^3 \pm 0.8 \times 10^3$ M⁻¹s⁻¹) を得る事ができた。その結果 BSD2 の K_m 値は、良く似た酵素である CYO1 (824 ± 87 nM) に比べて約 10 倍程高く、BSD2 は基質との親和性が低い事と植物細胞内における基質濃度が高い事が示唆された。



BSD2 タンパク質の細胞内局在を明らかにするために、BSD2-GFP 融合タンパク質をシロイヌナズナ葉肉細胞で発現させ、GFP のシグナルを観察した結果、BSD2-GFP タンパク質は葉緑体内で局在していることが示された。また、シロイヌナズナ BSD2 のアミノ酸配列から合成ペプチドを作成し、抗 BSD2 抗体作成を試みたがウエスタンブロットで使用可能な抗体を得る事が出来なかった。そこでシロイヌナズナ *bsd2* 変異体へ *BSD2-FLAG* 遺伝子を導入した相補株と抗 FLAG 抗体を用いて BSD2 タンパク質の細胞内局在を調べた結果、BSD2 タンパク質は葉緑体可溶性画分に局在する事が示された。

シロイヌナズナ葉肉細胞を用いて BiFC (bi-molecular fluorescent complementation) 法で BSD2 タンパク質とルビスコタンパク質との相互作用を解析した。その結果パーティクルガンあるいは PEG を用いた BiFC 用ベクター類導入方法どち

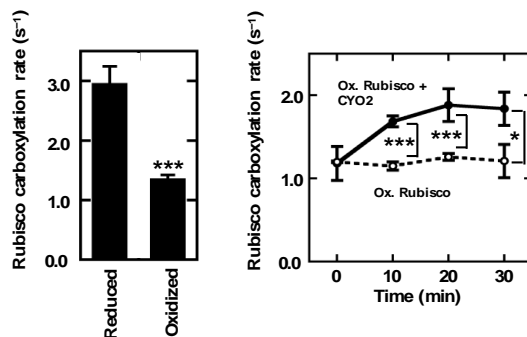
らにおいても BSD2 タンパク質とルビスコタンパク質大・小サブユニット両方との相互作用が確認された。さらに Yeast two-hybrid 法も用いた方法でも BSD2 タンパク質とルビスコタンパク質大・小サブ



ユニット両方との相互作用が確認された。

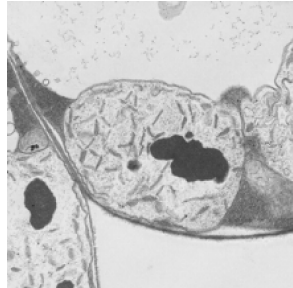
シロイヌナズナ植物細胞内でのルビスコタンパク質の酸化還元状態の解析方法を確立した。還元剤を含まない Buffer でシロイヌナズナタンパク質を抽出し、非還元状態 SDS-PAGE でタンパク質を分離後に抗ルビスコ抗体を用いてルビスコタンパク質を抽出すると、移動度の違いから還元型と酸化型ルビスコをそれぞれ検出することが可能となった。また、酸化型ルビスコを非還元状態 SDS-PAGE ゲルから抽出しマスマスペクトル解析を行うことで、酸化型ルビスコタンパク質内のジスルフィド部位を同定した。その結果、酸化型ルビスコでは大サブユニット間でジスルフィド結合をしていることが明らかになり、このサブユニット間のジスルフィド結合の有無が上記非還元状態 SDS-PAGE での移動度の違いを生じていることが示唆された。通常生育条件下で生育している野生型シロイヌナズナでは約 20% のルビスコが酸化型であった。このことは通常生育条件下でも 20% のルビスコは酸化失活していることを示しており、理論上は光合成カルビン回路を 20% 上昇させる余地があることを示唆していた。

また、酸化失活したルビスコの BSD2 タンパク質による還元活性化を調べた。大腸菌で発現・精製した BSD2 タンパク質と酸化失活状態のルビスコをインキュベートすると、ルビスコ活性の有意な回復が観察された。



この結果は、*in vitro*におけるBSD2 タンパク質のルビスコの還元活性可能を示した。

シロイヌナズナ *bsd2* 変異体の表現型解析を行った。*bsd2* 変異体は Pale-green で dwarf であった。また、葉緑体は野生型に比べ小さく歪な形をしていた。透過型電子顕微鏡で葉緑体内部の構造観察を行ったところ、チラコイド膜の発達が見られず電子密度の高い構造体が観察された。

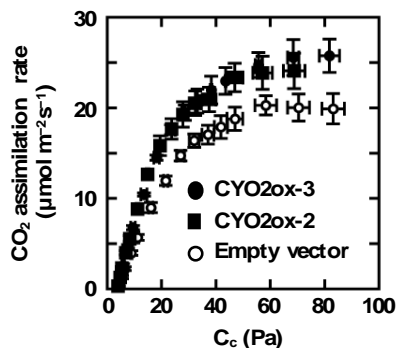


bsd2 変異体の光合成効率を PAM (pulse amplitude modulated fluorometry) で調べた結果、ETR, Y(II), qP とともに野生型よりも小さかったが、NPQ は野生型よりも大きかった。

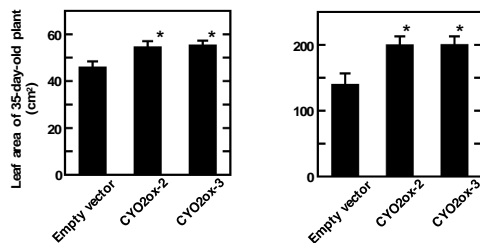
また、シロイヌナズナ *bsd2* 変異体における各種葉緑体遺伝子の発現と葉緑体タンパク質の蓄積量解析を行った結果、*bsd2* 遺伝子の変異は主として葉緑体遺伝子の転写以降のタンパク質の翻訳・安定性に影響を与えていることが示唆された。

BSD2 高発現シロイヌナズナを作成し、その表現型解析を行った。空ベクター導入株 (コントロール株) に対して高発現株では、BSD2/CYO2 遺伝子の転写量が約 10 倍であった。コントロール株と高発現株においてルビスコの含有量に違いは観察されなかったが、コントロール株のルビスコは約 2 割が酸化型であったが、高発現株では酸化型ルビスコはほとんど存在していなかった。酸化型ルビスコは活性を有しない事を前年までの研究で明らかにしており、高発現株ではコントロール株に対して活性型ルビスコの存在量が増加していることが示された。PAM (Pulse Amplitude Modulation) による光合成効率測定の結果、コントロール株と高発現株との間で Fv/Fm (光化学系 2 の最大量子収率) に違いは観察されなかったが、Y(II) (光化学系 2 の実効量子収率) と qP (反応中心が open である割合) とともに測定した光強度全てにおいて高発現株ではコントロール株よりも有意に高かった。

LI-6400XT を用いて光合成による CO₂ 固定



化速度 (A-Ci カーブ) を測定した結果、高発現株はコントロール株に対して有意に CO₂ 固定化速度が上昇していた。35 日齢の植物体において、高発現株はコントロール株よりも全葉面積が有意に上昇していた。また、植物地上部の乾燥重量がコントロール株では平均 140 mg であったのに対して高発現株では平均 200 mg と約 40% 上昇していた。



研究期間全体を通じて得られた結果より、当初の研究目的であった「BSD2 タンパク質は酸素酸化によって失活したルビスコを還元活性化する因子」である事を *in vitro* と *in vivo* で示すことができた。また、BSD2 高発現によって植物バイオマス増大が可能である事を示す事もできた。

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 5 件)

1. Rice CYO1, an ortholog of *Arabidopsis thaliana* cotyledon chloroplast biogenesis factor AtCYO1, is expressed in leaves and involved in photosynthetic performance. (2016) Tominaga, J., Mizutani, H., Horikawa, D., Nakahara, Y., Takami, T., Sakamoto, W., Sakamoto, A. and Shimada, H. *J. Plant Physiol.* 207: 78-83. 査読あり (<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.10.005>)
2. Allantoin, a stress-related purine metabolite, can activate jasmonate signaling in a MYC2-regulated and abscisic acid-dependent manner. (2016) Takagi, H., Ishiga Y., Watanabe W., Konishi T., Egusa M., Akiyoshi N., Matsuura T., Mori I. C., Hirayama T., Kaminaka H., Shimada H. and Sakamoto A. *J. Ext. Bot.* 67: 2519-2532. 査読あり (<https://doi.org/10.1093/jxb/erw071>)
3. (6E) and (6Z)-9'-Aporhodoxanthinone, novel carotenoids produced in zeaxanthin-synthesizing-*Escherichia coli* by redox stress. (2015) Takemura, M., Maoka, T., Osawa, A., Higashinaka, H., Shimada, H., Shindo, K. and Misawa, N. *Tetrahedron Letter* 56: 6063-6065. 査読あり (<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.09.058>)
4. In vitro and in vivo evidence for oxalate oxidase activity of a germin-like protein from

- azalea. (2015) Sakamoto, A., Nishimura, T. Miyaki, Y-I., Watanabe, S., Takagi, H., Izumi, S. and **Shimada, H.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458: 536-542. 査読あり (DOI:10.1016/j.bbrc.2015.02.002)
5. Arabidopsis xanthine dehydrogenase mutants defective in purine degradation show a compromised protective response to drought and oxidative stress. (2014) Watanabe, S., Kounosu, Y., **Shimada, H.** and Sakamoto A. *Plant Biotech.* 31: 173-178. 査読あり (https://www.jstage.jst.go.jp/article/plantbiotechnology/31/2/31_14.0117a/_article)

〔学会発表〕(計 12件)

1. 富永淳, 水谷春香, 堀川大輔, 中原恭俊, 高見常明, 坂本亘, 坂本敦, **島田裕土**, イネ葉緑体タンパク質ジスルフィド酸化還元酵素は明暗下で機能する, 第58回日本植物生理学会年会, 鹿児島大学郡元キャンパス, 2017年3月16-18日
2. 吉田昇平, 高畑周平, 岩瀬駿志, **島田裕土**, 石川孝博, 清水英寿, 地阪光生, 横田一成, 中川強, 西村浩二, 蛍光レポーターを用いたタンパク質のトポロジーや細胞内局在の解析, 蛍光レポーターを用いたタンパク質のトポロジーや細胞内局在の解析, 第58回日本植物生理学会年会, 鹿児島大学郡元キャンパス, 2017年3月16-18日
3. 田中翔真, 韓邑平, 渡邊俊介, 高木紘, **島田裕土**, 坂本敦, アラントインによるシロイヌナズナの熱応答遺伝子発現と熱ショック耐性の向上, 第58回日本植物生理学会年会, 鹿児島大学郡元キャンパス, 2017年3月16-18日
4. 堀川大輔, 富永淳, 中原恭俊, 近藤真紀, 亀井保博, 田中歩, 坂本敦, **島田裕土**, Protein disulfide isomeraseの高発現により惹起される葉のStay green表現型, 第58回日本植物生理学会年会, 鹿児島大学郡元キャンパス, 2017年3月16-18日
5. 高木紘, 石賀康博, 江草真由美, **島田裕土**, 上中弘典, 坂本敦, シロイヌナズナ XDH1は幅広い病原性微生物に対する抵抗性に関与する, 第58回日本植物生理学会年会, 鹿児島大学郡元キャンパス, 2017年3月16-18日
6. 窒素再利用代謝としてのプリン分解の役割検証 高木紘, 渡邊俊介, 田中翔馬, **島田裕土**, 坂本敦 第57回日本植物生理学会年会, 岩手大学上田キャンパス, 2016年3月18日-20日
7. 小胞体におけるストレス誘導的なアブシジン酸生成に関する細胞生物学的解析, 韓邑平, 渡邊俊介, 木下大地, 高木紘, **島田裕土**, 坂本敦 第57回日本植物生理学会年会, 岩手大学上

8. 田キャンパス, 2016年3月18日-20日 シロイヌナズナの熱ショック耐性に与えるアラントイン蓄積の影響, 田中翔真, 渡邊俊介, 高木紘, 韓邑平, **島田裕土**, 坂本敦 第57回日本植物生理学会年会, 岩手大学上田キャンパス, 2016年3月18日-20日
9. CYO1高発現によるStay green化とA-Ciカーブ上昇の解析, 堀川大輔, 中原恭介, 白上典彦, 高木紘, 高見常明, 坂本亘, 坂本敦, **島田裕土**, 第6回日本光合成学会年会および公開シンポジウム, 岡山国際交流センター, 2015年5月22-23日
10. シロイヌナズナの窒素再利用機構におけるプリン分解の役割検証, 高木紘, 渡邊俊介, 田中翔馬, **島田裕土**, 坂本敦 第56回日本植物生理学会年会, 東京農業大学世田谷キャンパス, 2015年3月16日-18日
11. シロイヌナズナのストレス応答におけるプリン分解中間体の代謝シグナル作用の検証, 渡邊俊介, 木下大地, YiPing HAN, **島田裕土**, 坂本敦 第56回日本植物生理学会年会, 東京農業大学世田谷キャンパス, 2015年3月16日-18日
12. CYO2によるルビスコの活性化解析, 白上典彦, 高橋俊一, 室屋誠人, 北岡拓也, 西村浩二, 木下俊則, 伊東千賀子, 村中厚子, 高見常明, 坂本 亘, 渡邊俊介, 坂本敦, **島田裕土** 第56回日本植物生理学会年会, 東京農業大学世田谷キャンパス, 2015年3月16日-18日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 裕土 (HIROSHI SHIMADA)
 広島大学・大学院理学研究科・准教授
 研究者番号: 80301175