

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840090

研究課題名(和文) 葉緑体機能のレドックス制御ネットワークから理解する植物の生存戦略

研究課題名(英文) Comprehensive study on chloroplast redox regulation network

## 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物の葉緑体は、絶えず変動する外的環境に自身の生理機能を適合させるために、酸化還元(レドックス)反応を基盤とした機能制御ネットワークを獲得してきた。本課題では、葉緑体レドックスネットワークの分子基盤および生理意義について包括的な研究を行った。その結果、このシステムは従来のモデルよりもはるかに複雑であり、植物を取り巻く環境変動に対して柔軟に応答し、植物のバイオマス生産に深く関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Plant chloroplast has a redox-based regulatory network for adjusting its biological systems to environmental fluctuations. In this study, I performed a comprehensive study addressing the molecular basis and physiological significance of chloroplast redox regulation network. The results showed that this system is highly organized beyond current expectation. I further clarified that this system drastically responds to environmental fluctuations and plays an important role in plant biomass production.

研究分野：植物生化学・生理学

キーワード：レドックス制御 チオレドキシン 葉緑体 光合成 シロイヌナズナ

## 1. 研究開始当初の背景

植物の葉緑体は、光合成により太陽の光エネルギーを化学エネルギーに変換する場であり、地球上のあらゆる生命活動を支えている細胞小器官である。自然界では、光強度、温度、湿度等の環境条件が常に変動しているが、葉緑体はそのような変動環境下において最大限に光合成能力を発揮するために、様々な機能調節メカニズムを獲得している。私は、還元力を利用した機能制御系である“レドックス制御システム”に着眼し、このシステムの実態解明に向けた基礎研究を行った。

レドックス制御とは、酸化還元状態に応じて特定の酵素が持つジスルフィド結合の形成解離を制御することにより、その酵素活性を調節するメカニズムである。このシステムは、生物界に普遍的に存在しており、チオレドキシニン (Trx) という分子量約 12,000 の小さなタンパク質が還元力伝達因子として中心的な役割を果たしている。植物葉緑体においては、1970 年代に Trx および電子伝達系成分であるフェレドキシニン依存型の Trx 還元酵素 (FTR) が相次いで同定され、*in vitro* 再構成実験系によって、これらの因子が揃ったときに標的酵素のレドックス制御能を持つことが報告された。その結果、手元にある植物生理学・生化学の教科書には、電子伝達系のフェレドキシニンを起点とし FTR/Trx システムを経由して標的酵素へと至る単方向の還元力カスケードが、葉緑体レドックス制御の反応基盤であり、光照射および電子伝達系の駆動と連動した葉緑体の機能調節を可能にしていると記述されている。しかし、2000 年のシロイヌナズナ全ゲノム解読を皮切りとした植物ゲノム情報の集積に伴い、葉緑体には 5 つの Trx サブタイプ (f-, m-, x-, y-, z-type) や、Trx 活性部位と類似したモチーフを持つ多様な Trx 様タンパク質が存在することが明らかになった。さらに、Trx 標的酵素の網羅的捕捉法の開発やプロテオミクス技術の進展によって、レドックス制御下にある標的酵素は、古くから知られていた一部の酵素のみならず、多岐にわたる葉緑体の生理機能に関与している可能性が示唆されている。このように近年飛躍的に蓄積した葉緑体レドックス制御システムの分子カタログ情報は、植物が直面するであろう環境変動の荒波に対し、制御システムをネットワーク状に高度に組織化することで、植物の生存戦略に高次の可塑性を与えている可能性を想起させるものである。しかしながら、その制御ネットワークの連携機構や環境応答、生物学的重要性に関する具体的な研究はほとんど報告がなく、その実態の多くは謎に包まれていた。

このような研究背景のもと、葉緑体レドックスネットワークの全貌解明を目指した研究を行っている。本研究課題の開始以前に、タンパク質の生体内レドックス状態を決定する実験系を確立し、環境変化に応じた葉緑

体レドックスダイナミクスを明らかにしていた (Yoshida et al. 2014)。そこで、本研究課題では、そのような応答の背景にある分子基盤、および、システムの生理学的な意義にも研究項目を拡張し、葉緑体レドックスネットワークをより包括的に理解することを目指した。

## 2. 研究の目的

葉緑体内のレドックス制御を受ける一群の酵素は、光環境に応じて劇的にそのレドックス状態を変化させ、機能調節を行っていることがわかってきた。このようなレドックスダイナミクスはどのように光照射とリンクし、またその制御システムは植物の生存戦略においてどのような重要性を持つのだろうか。これらの基礎学術的な疑問に回答するため、本研究課題では、葉緑体レドックスネットワークの基盤全体像、および、生理学的意義を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### < 1 > 葉緑体レドックスネットワーク全体の分子基盤の解明

葉緑体内に存在する Trx や Trx 様タンパク質等 (以後、まとめて酸化還元タンパク質と記述) がそれぞれどのような酵素を標的としているのかを、プロテオミクス・生化学的手法によって調べる。得られる結果を統合することで、レドックスネットワーク全体の分子基盤を解明する。

#### 1 - 1 . レドックス制御の標的タンパク質のスクリーニング

アフィニティークロマトグラフィーをベースとした手法により、酸化還元タンパク質の葉緑体内標的酵素の候補を捕捉・同定する。さらに、それらの標的プロファイルと比較し、それぞれが共通あるいは特異的に標的としている酵素群を選抜する。タンパク質の同定は質量分析を用いて行う。

#### 1 - 2 . 酸化還元タンパク質の標的選択性の詳細な生化学解析

1 - 1 の研究項目の結果も参照しながら、酸化還元タンパク質と標的酵素の還元力伝達における親和性を詳細に明らかにする。各酸化還元タンパク質および標的酵素の組換え体タンパク質を作成し、それらの組み合わせを変えながら還元力伝達の効率の違いを比較する。標的酵素のレドックス状態シフトの直接可視化や酵素活性の測定により分析を行う。

### < 2 > 葉緑体レドックスネットワークの生理学的意義の解明

葉緑体レドックスネットワークの各還元力経路が保有している生理機能を、シロイヌナズナの欠損変異株を用いた逆遺伝学的なアプローチにより調べる。得られる結果から、レドックスネットワークが葉緑体の機能調

節および植物の生育に果たすインパクトを明らかにする。

## 2 - 1 . 酸化還元タンパク質の欠損変異株シロイヌナズナの単離

各酸化還元タンパク質の欠損変異株シロイヌナズナを単離する。さらに、それらを交配し多重変異株を作出する。これらを用いて以降の実験を行い、各経路の特異的あるいは重複的な生理機能について評価する。

## 2 - 2 . 標的酵素の生体内レドックス状態の可視化

既に確立している生体内レドックス状態の可視化法によって、様々な標的酵素のレドックス状態を調べる。野生株と変異株間で、対象とした標的酵素の光強度に依存した還元パターンを比較することで、その標的酵素が変異株で欠損している経路から還元力供給を受けているのかを決定する。

## 2 - 3 . 光合成をはじめとする一連の生理パラメータの分析

上記の研究で得られる「どの経路がどの葉緑体機能を制御するのか」という情報を指針として、葉緑体機能に関連する生理パラメータを分析する。

## 4 . 研究成果

### < 1 > 葉緑体レドックスネットワーク全体の分子基盤の解明

#### 1 - 1 . レドックス制御の標的タンパク質のスクリーニング

ゲノム情報の集積によって新たに見つかった酸化還元タンパク質である NADPH-Trx reductase C (NTRC) に注目し、その標的酵素を捕捉・同定した。さらに、比較のために、f-type Trx の標的スクリーニングを同じ実験条件で行った。その結果、NTRC はある標的酵素に対して f-type Trx よりも強い親和性で相互作用していることが明らかになった。

#### 1 - 2 . 酸化還元タンパク質の標的選択性の詳細な生化学解析

5 つの Trx サブタイプの標的選択性の違いを分析した。その結果、現在までに FB Pase, SBPase, NADP-MDH, CHLI, 2-Cys Prx, PrxQ という 6 つの標的に対し、各 Trx サブタイプは異なる還元力伝達効率を持っていることを明らかにした。

さらに、1 - 1 の項目の結果を参照しながら、NTRC と Trx ファミリーの標的選択性について同様に分析した。そして、CHLI や 2-Cys Prx といった一部の標的に対しては、NTRC は Trx と比べてかなり高い還元力伝達効率を持っていることを明らかにした。

以上の研究項目により、葉緑体レドックスネットワークにおける新たな還元力のベクトルの向き・太さを明らかにした。新規のシステム分子基盤を提示したものと言える。

### < 2 > 葉緑体レドックスネットワークの生理学的意義の解明

#### 2 - 1 . 酸化還元タンパク質の欠損変異株シ

## ロイヌナズナの単離

シロイヌナズナの種子のストックセンターである ABRC から T-DNA 挿入変異株の候補を取り寄せ、ゲノミック PCR によって遺伝子型を確認し、RT-PCR、ウェスタンブロッティングによって該当遺伝子の発現が抑えられている株を選抜した。さらに、変異株を交配することで、現在までに様々な組み合わせの多重変異株を作出した。

## 2 - 2 . 標的酵素の生体内レドックス状態の可視化

複数の変異株において、複数の標的酵素の光還元応答を可視化した。その結果、例えば f-type Trx の欠損株では、標的酵素の 1 つである FB Pase の光還元が抑制されていることを発見し、これらの間の還元力伝達を生体内で実証することができた。一方、著しい生長の表現型を示す変異株では、非特異的な要因が拭えず、該当する酸化還元タンパク質の欠損の影響を純粋に評価することが困難であった。

## 2 - 3 . 光合成をはじめとする一連の生理パラメータの分析

複数の変異株において、バイオマス生産量、クロロフィル量、光合成関連タンパク質の蓄積レベル、光合成電子伝達効率といった、基礎生理学パラメータを分析した。例えば FTR と NTRC の二重変異株は、独立栄養条件下で致死性を示し、従属栄養条件下でも生育障害および光合成システムの機能不全といった著しい表現型を示した。< 1 > の大項目の結果も統合し、FTR/Trx システムと NTRC システムは、異なるレドックス制御能を発揮し、それらが協調的に働くことで植物の生存を支えているという、従来のパラダイムを打ち破る知見を得ることができた。

## 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 6 件)

Yoshida K., Hisabori T.

Two distinct redox cascades cooperatively regulate chloroplast functions and sustain plant viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, in press.

Yoshida K., Hisabori T.

Adenine nucleotide-dependent and redox-independent control of mitochondrial malate dehydrogenase activity in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1857: 810-818, 2016.

Yutthanasirikul R., Nagano T., Jimbo H., Hihara Y., Kanamori T., Ueda T., Haruyama T.,

Konno H., Yoshida K., Hisabori T., Nishiyama Y.

Oxidation of a cysteine residue in elongation factor EF-Tu reversibly inhibits translation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.*, 291: 5860-5870, 2016.

Yoshida K., Hara S., Hisabori T.

Thioredoxin selectivity for thiol-based redox regulation of target proteins in chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, 290: 14278-14288, 2015.

Yoshida K., Hisabori T.

Mitochondrial isocitrate dehydrogenase is inactivated upon oxidation and reactivated by thioredoxin-dependent reduction in *Arabidopsis*. *Front. Environ. Sci.*, 2: 38, 2014.

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 Cell Physiol.*, 55: 1415-1425, 2014.

[学会発表](計 12 件)

吉田啓亮、原 怜、久堀 徹

葉緑体リンゴ酸脱水素酵素のレドックス制御のチオレドキシントラニチン特異性：Trx-m より Trx-f が重要である

日本植物学会第 78 回大会、3aB04、明治大学生田キャンパス 2014 年 9 月 12 日 14 日(口頭・査読無)

杉浦 一徳、永井 健治、原 怜、吉田啓亮、久堀 徹

光合成生物細胞内のレドックス環境の可視化

日本遺伝学会第 86 回大会、WS13-3、長浜バイオ大学、2014 年 9 月 17 日 19 日(招待講演)

久堀 徹、杉浦 一徳、原 怜、永井 健治、吉田啓亮  
植物体内のレドックス制御を可視化する

第 87 回日本生化学会大会、4S06a-3、国立京都国際会館、2014 年 10 月 15 日 18 日(招待講演)

吉田啓亮、久堀 徹

シロイヌナズナ変異株解析から見えてきた葉緑体の機能調節におけるレドックス制御の重要性

第 56 回日本植物生理学会年会、2aF11、東京農業大学世田谷キャンパス、2015 年 3 月 16 日 - 18 日(口頭・査読無)

見原 翔子、吉田啓亮、肥後 明佳、久堀 徹

*Anabaena* sp. PCC 7120 における NTRC の標的タンパク質の探索

第 56 回日本植物生理学会年会、1U49、東京農業大学世田谷キャンパス、2015 年 3 月 16 日 - 18 日(ポスター・査読無)

吉田啓亮、久堀 徹

FTR/Trx 経路と NTRC 経路は協調的に葉緑体機能のレドックス制御および植物の生育を支えている

第 6 回日本光合成学会、P59、岡山国際交流センター、2015 年 5 月 22 日 23 日(ポスター・査読無)

見原 翔子、吉田啓亮、肥後 明佳、久堀 徹

*Anabaena* sp. PCC 7120 における NADPH-Thioredoxin Reductase C の機能解析

第 6 回日本光合成学会、P60、岡山国際交流センター、2015 年 5 月 22 日 23 日(ポスター・査読無)

吉田啓亮

葉緑体レドックスネットワークによる光合成の機能制御

日本植物学会第 79 回大会、1pSH03、朱鷺メッセ・新潟コンベンションセンター、2015 年 9 月 6 日 8 日(シンポジウム企画・講演)

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新奇活性

## 調節メカニズム

日本植物学会第 79 回大会、1pSH03、朱鷺メッセ・新潟コンベンションセンター、2015 年 9 月 6 日 - 8 日 (ポスター・査読無)

Yoshida K., Hara S., Sugiura K., Hisabori T.

Significance of the redox regulation networks in plants

Yamada Conference International Symposium on Dynamics and Regulation of Photosynthesis, Nara Kasugano International Forum, Oct. 29-31, 2015 (招待講演)

見原翔子、吉田啓亮、肥後明佳、久堀徹

*Anabaena* sp. PCC 7120 の NADPH-thioredoxin reductase C は抗酸化ストレス系に重要である  
第 57 回日本植物生理学会年会、2pE04、岩手大学上田キャンパス、2016 年 3 月 18 日 - 20 日 (口頭・査読無)

吉田啓亮、久堀徹

葉緑体レドックスネットワークにおける還元力伝達の複雑さ: シロイヌナズナ FTR ヘテロ二量体は 10 種の Trx を異なる効率で還元する

第 57 回日本植物生理学会年会、3aD03、岩手大学上田キャンパス、2016 年 3 月 18 日 - 20 日 (口頭・査読無)

〔図書〕(計 1 件)

吉田 啓亮

葉緑体とミトコンドリアの代謝クロストーク, **生物科学**(日本生物科学者協会 編), 第 66 巻, 第 4 号, pp. 235-243, 2015.

〔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 :