

令和元年5月20日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18573

研究課題名(和文)葉緑体チラコイド内腔におけるレドックス制御機構の解明

研究課題名(英文)Study on the redox regulation mechanism in the thylakoid lumen.

研究代表者

桶川 友季(OKEGAWA, Yuki)

京都産業大学・総合生命科学部・研究助教

研究者番号：10582439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高等植物の葉緑体では、ストロマだけでなくチラコイド膜を隔てた内腔にもレドックス制御システムが存在することがわかってきた。本研究の目的はこれまでにストロマからチラコイド内腔への還元力伝達に関与することが示唆されているHCF164とCcdAタンパク質を含めた還元力伝達システム全体の分子機構を明らかにすることである。シロイヌナズナの変異株を用いた表現型回復実験から、チラコイド内腔でのレドックス制御の重要性が明らかになった。またチラコイド内腔への還元力伝達に関与するチオレドキシンのアイソフォームを同定するためにチオレドキシンの欠損変異株および過剰発現株を作成し、評価をおこなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チラコイド内腔でのタンパク質のレドックス制御は光合成反応と光防御機構に重要である。高等植物ではまだあまりわかっていないチラコイド内腔への還元力伝達システムの制御機構を分子レベルで明らかにすることは、植物の光合成を理解する上で不可欠である。チラコイド内腔でのレドックス制御システムの分子機構を解明することで、葉緑体全体の制御機構を統合して理解することができる。

研究成果は将来的に植物の光合成機能を向上させることにつながると考えている。

研究成果の概要(英文)：Redox regulation of the thylakoid luminal proteins is important for the assembly and photoprotection of the photosynthetic photosystem and electron transport. CcdA and HCF164 serves as transducers of reducing equivalent from the stroma into the thylakoid lumen. However, its regulatory mechanism is not yet fully understood.

To study the molecular mechanism of the trans-thylakoid thiol reduction system, we performed the rescue experiments. The growth defects of ccda mutant was partially recovered when grown on the MS media supplemented with TCEP as a reductant, suggesting that the trans-thylakoid thiol reduction pathway is important.

To further characterize the trans-thylakoid thiol reduction system, we investigated the reductant of the system on the stroma side. Because thioredoxins are possible candidate protein, the transgenic plants overexpressing chloroplastic thioredoxins in Arabidopsis wild type were analyzed.

研究分野：植物生理学

キーワード：光合成 チオレドキシソ 還元力 シロイヌナズナ 葉緑体 レドックス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、チラコイド膜を隔てたチラコイド内腔でもレドックス制御の存在を示唆する報告がなされている。チラコイド内腔と似た環境である大腸菌のペリプラズムではタンパク質のジスルフィド結合の形成と還元を制御する膜を介したレドックス経路が発見されており、ペリプラズムでのタンパク質のフォールディング酸化ストレス防御機構に寄与している(Cho et al., 2013; *Antioxid. Redox. Signal.*)。大腸菌で還元システムに寄与する DsbD の機能的ホモログである CcdA が植物の葉緑体に局在することが明らかとなった(Page et al., 2004; *J Bio Chem*, 図 1)。CcdA はチラコイド膜に局在し膜貫通領域に保存されたシステイン残基を持つタンパク質で、このタンパク質の欠損はシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体のアッセンブリー異常が原因で光合成電子伝達に影響を示す。2010 年には、CcdA がストロマの Trx からチラコイド内腔の HCF164 タンパク質に還元力を伝達することが示された(Motohashi et al., 2010; *Antioxid. Redox. Signal.*)。HCF164 は、チラコイド内腔側に二つのシステイン残基を持つ Trx 様タンパク質であり、チラコイド内腔でのレドックス制御の存在が示唆された(Motohashi et al., 2006)。また最近になって、チラコイド内腔での還元システムに加えて、酸化システムに関与するタンパク質も同定された(Karamoko et al., 2011; *Plant Cell*)。チラコイド内腔側にレドックスモチーフと保存されたシステイン残基をもつ LTO1 (Lumen Thiol Oxidoreductase 1)は標的タンパク質のジスルフィド結合の形成をおこなう。LTO1 は光化学系 II のサブユニットである PsbO の安定化、光防御機構において機能するピオラキサンチンデポキシダーゼ(VDE)の活性化への寄与が明らかとなっている。このように近年、葉緑体ストロマでの研究に加え、チラコイド内腔での酸化システム還元システムを含めたレドックス制御に関する研究に注目が集まっている。

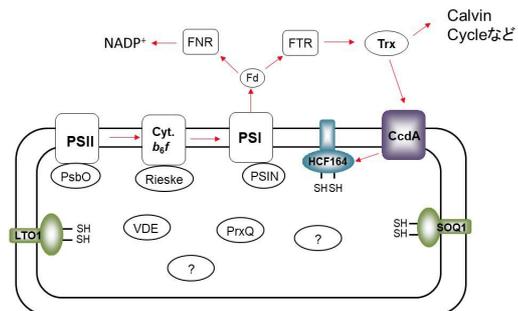


図 1. チラコイド内腔におけるタンパク質のレドックス制御

### 2. 研究の目的

LTO1 の発見以来、LTO1 による標的タンパク質の酸化システム、LTO1 の標的タンパク質の同定に関する研究が相次いで発表されている(Lu et al., 2015; Du et al., 2014)。その一方で、チラコイド内腔での還元システムについては CcdA と HCF164 がチラコイド内腔への還元力伝達に関与することが明らかとなっただけで、その詳細な分子機構、CcdA、HCF164 による標的タンパク質のレドックス制御の生理学的な意義はわかっていない。またこれまでの研究からチラコイド内腔に局在する光化学系 I のサブユニットである PSI-N、活性酸素種の消去に働くペルオキシレドキシシン PrxQ、および NPQ の誘導に寄与する SOQ1 タンパク質が還元システムの下流で働くと考えられているがそれを証明する生理学的な結果は得られていない。本研究の 1 つ目の目的はこれまでにストロマからチラコイド内腔への還元力伝達に関与することが証明されている HCF164 と CcdA を含めた還元力伝達システム全体の分子機構を明らかにすることである。具体的にはチラコイド内腔での還元力伝達システムにおいて HCF164 が CcdA から直接電子を受け取る可能性を評価し、CcdA の上流で働く Trx アイソフォームを同定する。さらにチラコイド内腔に局在し、レドックス制御を受けるタンパク質を同定し、その調節にどのような生理的意義があるかを明らかにすることを目的にしている。これまで未知のチラコイド内腔のジスルフィド結合還元システムの分子機構を解明することで、植物葉緑体の重要な光合成の制御機能のひとつであるレドックス制御機構を総合して理解できるようになるはずである。

### 3. 研究の方法

(1) チラコイド内腔への還元力伝達システムの生理学的重要性の評価  
HCF164 のクラミドモナスのホモログである CCS5 の欠損は生育阻害を引き起こす。しかし、還元剤である DTT(dithiothreitol) を生育培地に加えることによって生育の回復を示した(Gabilly et al., 2010; *J. Bio.Chem.*)。シロイヌナズナの *ccda*, *hcf164* 変異株もシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体のアッセンブリー異常のため植物は生育阻害を示す。これらの変異株を DTT を含む培地で生育させ、その生育の表現型を解析する。*ccda*, *hcf164* 変異株で見られる生育阻害が軽減されれば、チラコイド内腔の還元システムの生理学的重要性を証明できる。

さらにチラコイド内腔に局在する還元力伝達システムの下流にある標的タンパク質のジスルフィド結合の還元条件を特定する。チラコイド内腔には少なくとも 80 のタンパク質が局在し、そのうちの 30 を超えるタンパク質がジスルフィド結合を持ち、レドックス制御を受ける可能性が示唆されている。これらの標的候補タンパク質のレドックス状態を通常の生育条件において評価する。タンパク質の酸化還元状態はチオール基を特異的に修飾する化学試薬、AMS の

特性を用いることによって評価することが出来る。通常の生育条件ではレドックス状態に変化が見られない場合は、植物の葉緑体内が還元状態となる強光や低温条件などストレス環境で植物を生育させ、*in vivo*での標的タンパク質のレドックス状態を明らかにする。これらの標的候補タンパク質が多くのレストランタンパク質と同様、還元型で活性化されるタンパク質であれば還元状態となる条件を見つけることが出来る。

## (2) ストロマからチラコイド内腔への還元力伝達システムの解明

シロイヌナズナの葉緑体ストロマには10個のTrxアイソフォームの存在が明らかになっている。植物体を用いて*in vivo*においてどのTrxアイソフォームによってHCF164、CcdAおよびチラコイド内腔に局在する標的タンパク質が還元されるかを明らかにする。具体的にはTrxの欠損変異株を単離し、その変異体バックグラウンドでHCF164やCcdAおよび標的タンパク質が還元されないことを示す。またTrxの欠損変異株だけではなく、Trxの過剰発現株を作成し、Trxの過剰発現が下流で働くタンパク質の還元状態に与える影響を調べる。特異的な電子供与体であるTrxを過剰発現させれば、HCF164やCcdAおよびチラコイド内腔に局在する標的タンパク質の還元レベルは高くなると考えられる。

## 4. 研究成果

### (1) チラコイド内腔への還元力伝達システムの生理学的重要性の評価

生育阻害を示すシロイヌナズナの *ccda* 変異株を用いて表現型の回復実験をおこなった。Murashige Skoog(MS)培地に還元剤であるDTTを添加し、植物の生育を観察した。その結果、*ccda*変異株においてDTTの添加では表現型の緩和はほとんど見られなかった。DTTは植物の生育への影響が大きく、WTに1mMのDTTを添加すると生育阻害が見られた。そこで、別の還元剤であるTCEP(Tris (2-carboxyethyl) phosphine)を生育培地へ添加し、同様に生育実験をおこなった。その結果、0.5mM以上のTCEPをMS培地に添加することによって、*ccda*変異株の生育(生重量)が部分的に回復することが明らかになった(図2)。この結果からチラコイド内腔への還元力伝達システムの重要性が示唆された。

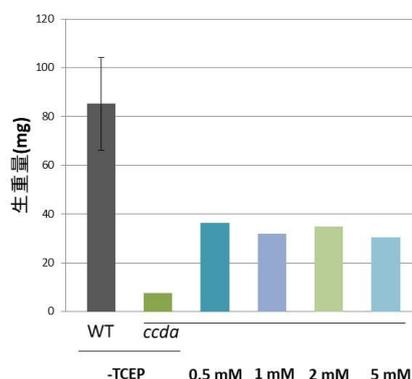


図2. TCEP含有培地での*ccda*変異株の生育

さらにチラコイド内腔への還元力伝達システムの生理学的重要性を明らかにするために、チラコイド内腔に局在する標的候補タンパク質のレドックス状態を調べた。HCF164の下流で働くとして示唆されているPSI-N、SOQ1、PrxQタンパク質に注目し実験をおこなった。まず初めにこれらのタンパク質のレドックス状態を調べるために特異的な抗体を作成した。作出した抗体を用いて暗条件および弱光から強光まで様々な光条件でタンパク質のレドックス状態を調べたが、ストロマのレドックスタンパク質に見られるようなレドックス状態の変動は見られなかった。さらに条件検討が必要だと考えている。

### (2) ストロマからチラコイド内腔への還元力伝達システムの解明

ストロマからCcdAとHCF164への還元力伝達に寄与するTrxを明らかにするためにTrxの欠損変異株とTrx fおよびTrx mの過剰発現株を作成した。作出した過剰発現株においてTrxが蓄積していることを確かめるために特異的な抗体を用いて調べた結果、どのラインにおいても野生株より多くのTrxを蓄積していることが明らかになった(図3)。得られた過剰発現株は通常の生育条件において野生株と同様の成長を示した。過剰発現株の解析についての研究結果は2017年に開催された第58回日本植物生理学会および新光合成&若手の会ジョイント若手ワークショップで発表した。得られたTrxの過剰発現株およびTrxの欠損変異株を用いてCcdA、HCF164および標的候補タンパク質のレドックス状態を調べた。しかしこれまでのところ、Trxの欠損株においても過剰発現株においてもこれらのタンパク質のレドックス状態に野生株との違いは見られていない。(1)の結果と同様、さらなる条件検討が必要だと考えている。

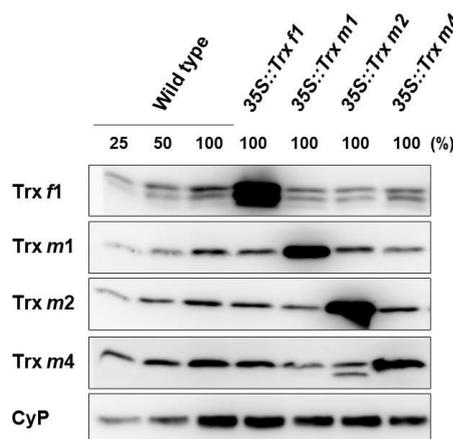


図3. Trx過剰発現株でのTrxタンパク質の蓄積量

## 引用文献

1. M.L. Page, P.P. Hamel, S.T. Gabilly, H. Zegzouti, J.V. Perea, J.M. Alonso et al., A homolog of prokaryotic thiol disulfide transporter CcdA is required for the assembly of the cytochrome b6/f complex in Arabidopsis chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 32474–32482.
2. K. Motohashi, T. Hisabori., HCF164 receives reducing equivalents from stromal thioredoxin across the thylakoid membrane and mediates reduction of target proteins in the thylakoid lumen. *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 35039–35047.
3. K. Motohashi, T. Hisabori., CcdA is a thylakoid membrane protein required for the transfer of reducing equivalents from stroma to thylakoid lumen in the higher plant chloroplast. *Antioxid. Redox Signal.* 13 (2010) 1169–1176.
4. S.T. Gabilly, B. W. Dreyfuss, M. Karamoko, V. Corvest, J. Kropat et al., CCS5, a thioredoxin-like protein involved in the assembly of plastid c-type cytochromes. *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 29738–29749.
5. M. Karamoko, S. Cline, K. Redding, N. Ruiz, P.P. Hamel, Lumen thiol oxidoreductase 1, a disulfide bond-forming catalyst, is required for the assembly of photosystem II in Arabidopsis, *Plant Cell* 23 (2011) 4462–4475.
6. S.H. Cho, J.F. Collet, Many Roles of the Bacterial Envelope Reducing Pathways. *Antioxid. Redox. Signal.* 18 (2013) 1690–1698

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

H. Nakayama, T. Sakamoto, Y. Okegawa, K. Kaminoyama, M. Fujie, Y. Ichihashi, T. Kurata, K. Motohashi, I. Al-Shehbaz, N. Sinha and S. Kimura: Comparative transcriptomics with self-organizing map reveals cryptic photosynthetic differences between two accessions of North American Lake cress. *Scientific Reports.* 8: 3302 (2018). DOI:10.1038/s41598-018-21646-w 査読有

Y. Okegawa and K. Motohashi. Comparative transcriptomics with self-organizing map reveals cryptic photosynthetic differences between two accessions of North American Lake cress. *Scientific Reports. Protein Expression and Purification.* 121; 46-51 (2016). DOI:10.1016/j.pep.2016.01.005. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

桶川友季、本橋健、*m*型チオレドキシンは光化学系 I サイクリック電子伝達を負に制御する、第 60 回日本植物生理学会年会、2019 年

Yuki Okegawa and Ken Motohashi. Regulation of cyclic electron transport around Photosystem I by thioredoxin. *International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis 2018.* 2018 年

桶川友季、本橋健、チオレドキシシンによる光化学系 I サイクリック電子伝達の制御メカニズム解析、第 9 回日本光合成学会年会およびシンポジウム、2018 年

天野瑠美、中山北斗、桃井理沙、郡司玄、竹林裕美子、桶川友季、本橋健、笠原博幸、Ali Ferjani、木村成介、*Rorippa aquatica* の栄養繁殖を制御する遺伝子群の探索、第 59 回日本植物生理学会、2018 年

桶川友季、本橋健、チオレドキシシンによる光化学系 I サイクリック電子伝達制御機構の解析、第 59 回日本植物生理学会、2018 年

桶川友季、シロイヌナズナの葉緑体におけるチオレドキシシン依存のレドックス制御システム、第 47 回植物バイテクシンポジウム、2017 年 (招待講演)

桶川友季、シロイヌナズナにおける m 型チオレドキシン過剰発現株の解析、新光合成 & 若手の会ジョイント若手ワークショップ、2017 年

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過剰発現株の解析、第 58 回日本植物生理学会、2017 年

Yuki Okegawa and Ken Motohashi. Arabidopsis m-type thioredoxin regulates the Calvin cycle enzymes in vivo. The 17th International Congress on Photosynthesis Research; Photosynthesis in a Changing World. 2016 年

Ken Motohashi and Yuki Okegawa. Thioredoxin-dependent redox regulatory system in chloroplasts. The 17th International Congress on Photosynthesis Research; Photosynthesis in a Changing World. 2016 年 (招待講演)

〔図書〕(計 1 件)

桶川友季、本橋健、チオレドキシンシステムによる光合成の調節機構：変動する光環境で植物はどのように効率良く光合成を行っているのか？ 化学と生物、56(7) 452 – 453. (2018)

〔その他〕

ホームページ

[http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~motohas/motohashi\\_lab/index.html](http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~motohas/motohashi_lab/index.html)

## 6 . 研究組織

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：本橋 健

ローマ字氏名：MOTOHASHI, Ken

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。