

研究種目：学術創成研究費

研究期間：2005～2009

課題番号：17GS0316

研究課題名（和文）光合成電子伝達系のダイナミクス：
未知のネットワークの解明

研究課題名（英文）New insight into the photosynthetic electron transport networks

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

研究成果の概要（和文）：変動する環境下で光阻害を回避しつつ最大の光合成活性を維持するため、植物は様々な光合成の調節機構を有している。我々は遺伝学と生化学により、光化学系 I サイクリック電子伝達 (PGR5 タンパク質および NDH 複合体依存経路)、葉緑体内のレドックス制御、銅イオン欠乏に対する応答の分子基盤について、多くの遺伝子情報を得て、タンパク質の機能を明らかにし、さらに制御系の生理的機能を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Under fluctuating light conditions, plants have to regulate photosynthesis to sustain its maximum performance and avoid photoinhibition. On the basis of genetics and biochemistry, we clarified many key genes involved in PGR5- and NDH-dependent PSI cyclic electron transport, redox homeostasis in chloroplasts and response to copper deficiency. We further clarified the physiological significance of each regulatory process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	54,400,000	16,320,000	70,720,000
2006年度	58,100,000	17,430,000	75,530,000
2007年度	54,000,000	16,200,000	70,200,000
2008年度	54,000,000	16,200,000	70,200,000
2009年度	54,000,000	16,200,000	70,200,000
総計	274,500,000	82,350,000	356,850,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学／植物生理・分子

キーワード：光合成、電子伝達、葉緑体、レドックス制御、銅イオン

1. 研究開始当初の背景

光は植物の行う光合成に必須であるが、過剰な光の受容は、活性酸素の生成を介し、植物の光合成装置に障害を与える。この光阻害を回避するため、植物は様々な適応戦略を備えているが、その分子メカニズムの多くは未知であった。近年、シロイヌナズナやクラミド

モナスを用いた遺伝学により光合成の光利用の効率を調節する分子機構の解明が進められ、光合成研究に新しい流れが生まれた。光合成の調節機構のなかでも、光化学系 I サイクリック電子伝達は最も謎に包まれたものであった。その発見は、半世紀を遡り、光エネルギーを用

いてATPを生産するという根源的な反応であるにも関わらず、その生理機能の重要性は疑問視されてきた。C4植物においては、この電子伝達の重要性は認識されて来たとは言え、電子伝達経路に関する分子情報は限られていた。2002年と2004年に、我々はシロイヌナズナの光化学系Iサイクリック電子伝達に関する変異株を発表し、その結果は、電子伝達の重要性を強く示唆するものであった。このことはサイクリック電子伝達の再評価のきっかけとなったが、研究領域は、半世紀の混沌とした時代から抜け出たとは言えない状況にあった。強く求められたのは、遺伝学で示唆された電子伝達経路の、生化学のよる特定であった。

2. 研究の目的

光化学系Iサイクリック電子伝達は、光合成と光環境適応に、極めて重要な生理機能を持つ。しかしながら、その重要性が認識されたのは、最近のことであり、電子伝達の経路の詳細など、その分子の実体は未知の部分が多い。本研究では、光化学系Iサイクリック電子伝達に関わるタンパク質の特定と電子伝達経路の全貌解明を目指した。また、光化学系Iサイクリック電子伝達以外にも、光合成電子伝達には、実体のよくわかっていない経路があり、それらは光合成の制御に働いている可能性がある。分子遺伝学と生化学により複雑なネットワークとして存在する光合成電子伝達の実像を明らかにすることをもう一つの目的とした。

3. 研究の方法

(1) PGR5タンパク質に依存するサイクリック電子伝達は、半世紀前に発見されたものであるが、PGR5とPGRL1タンパク質以外、分子情報は無い。そこで、PGR5タンパク質について生化学によりその機能を明らかにする。また電子伝達はアンチマイシンAにより阻害されることが知られている。遺伝学により、その作用部位を明らかにすることで、電子伝達に関わる新規タンパク質を特定する。

(2) NDH複合体に依存する経路は、PGR5経路に比べて分子情報が蓄積している。しかし、複合体への電子供与体や供与体サブユニットが未知であり、電子供与体が何であるのか(NADH、NADPHあるいはフェレドキシン)。生化学と遺伝学により、それらを明らかにする。

(3) 近年の研究により、チオレドキシンを介した葉緑体機能の制御は、これまで考えられていた以上に重要な光合成制御に関わることが示され、多くの標的候補が示唆されている。葉緑体電子伝達系から還元力を受け取るチオレドキシンが標的とする候補タンパク

質について、生化学により制御を証明し、逆遺伝学により制御の生理機能の解明を行う。

(4) サイクリック電子伝達以外にも、光合成電子伝達はさまざまに分岐することが知られているが、それぞれの生理機能は未知の部分が多い。water-water cycle, PTOX などについて遺伝学と生理学により、それぞれの電子伝達制御の生理機能を評価する。

(5) 銅は、プラスチックアンニオンやSODの成分として光合成に深く関わる。光合成は光以外にも、土中の栄養の欠乏にも応答する必要がある。主に遺伝学により、銅の欠乏に対して光合成が応答する分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) PGR5タンパク質を葉緑体から直接単離精製し、そのN末を決定した。また、葉緑体膜タンパク質の複合体構成成分の分析により、PGR5がチラコイド膜において光化学系Iと相互作用していることを明らかにした。さらに、PGR5タンパク質の1アミノ酸置換が、アンチマイシンAに対して耐性を与えることを明らかにした。アンチマイシンAは、PGR5タンパク質か、その近傍に位置するタンパク質を標的とすることが示唆された。また、チラコイド膜において、光照射下でサイクリック電子伝達活性を評価する系を確立し、サイクリック電子伝達がNADP⁺の光還元(リニア電子伝達)と競合することを示した(文献⑩)。

(2) NDH複合体が光化学系Iと超複合体を形成していることを示した(文献⑬)。また超複合体形成は、特に強光下においてNDH複合体の安定化に重要であることを明らかにした(文献④)。またNDH複合体が、4つのサブ複合体から成ること、超複合体形成には、Lhca5とLhca6が必須であることを明らかにした(文献⑦)。さらにNDH複合体の電子供与体結合サブユニットを同定し、電子供与体がフェレドキシンであることを示した(文献②)。またNDH複合体葉緑体コードサブユニット遺伝子の発現に必要な因子(文献⑨)、複合体のアッセンブリーに必要な因子(文献⑥)を多数同定、解析した。

(3) チラコイド膜を介して、ストロマ側のチオレドキシンからルーメン側に還元力を運ぶ生体膜を介した新たな還元力伝達系の存在を実験的に証明し、それ

に関わるタンパク質を明らかにした。さらに、葉緑体ルーメンにおいて還元力の受け手となるタンパク質候補を同定した(文献①④)。また、葉緑体機能に重要なクロロフィルの生合成系の酵素が、酸化還元調節されることを生化学的に証明した。

(4) 葉緑体研究のモデル生物であるシアノバクテリアを用いて、チオレドキシンを介した還元力伝達系を同定し、それぞれの役割を明らかにした。また、シアノバクテリアの遺伝子発現が転写因子の酸化還元調節によって光合成の電子伝達系に支配されていることや、タンパク質翻訳の伸長因子が酸化還元調節されていることを示した。さらに、光合成生物の起源生物である緑色光合成細菌についても還元力伝達システムの全貌を調べ、酸化還元調節を受けるタンパク質を新規に同定した(文献⑩)。

(5) 二つのサイクリック電子伝達経路とPTOXはプラストキノンプールのレドックス状態を制御することで、葉緑体分化と光合成の調節に機能していることを明らかにした(文献⑤)。

(6) シロイヌナズナにおいて銅濃度を感知し、銅欠乏に対する様々な応答を制御する転写因子SPL7を明らかにした。銅欠乏時、SPL7は、*miR398*を発現することで、銅亜鉛SODのmRNAを分解し、また鉄SOD、銅シャペロン、銅トランスポーター、機能未知の転写因子等、さまざまな銅欠乏応答に関わる遺伝子の発現を誘導する。SPL7はクラミドモナスにおいて銅濃度センサーとして働くCrr1のオルソログであり、シロイヌナズナとクラミドモナスにおいて、銅センサーは保存されているが、下流の銅欠乏に応答する遺伝子群が異なることが明らかになった(文献⑧)。

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55件、全て査読有り)

- ① Yamamoto H., Peng L., Fukao Y. & Shikanai T. (2011) A Src homology 3 domain-like fold protein forms a ferredoxin-binding site for the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell* in press.
- ② Peng L., Fukao Y., Myouga F., Motohashi R., Shinozaki K. & Shikanai T. (2011) A chaperonin subunit with unique structures is essential for folding of a specific substrate. *PLoS Biol.* 9, e1001040.
- ③ Peng L. & Shikanai T. (2011) Supercomplex formation with photosystem I is required for

the stabilization of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 155, 1629-1639.

- ④ Motohashi K. & Hisabori T. (2010) 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, 1169-1176.
- ⑤ Okegawa Y., Kobayashi Y. & Shikanai T. (2010) Physiological links among alternative electron transport pathways reducing and oxidizing plastoquinone in *Arabidopsis*. *Plant J.* 63, 458-468.
- ⑥ Peng L., Cai W. & Shikanai T. (2010) Chloroplast stromal proteins, CRR6 and CRR7, are required for assembly of the NAD(P)H dehydrogenase subcomplex A in *Arabidopsis*. *Plant J.* 63, 203-211.
- ⑦ 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.
- ⑧ Yamasaki H., Hayashi M., Fukazawa M., Kobayashi Y. & Shikanai T. (2009) SPL7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 347-361.
- ⑨ Okuda K., Chateigner-Boutin A.-L., Nakamura T., Delannoy E., Sugita M., Myouga F., Motohashi R., Shinozaki K., Small I. & Shikanai T. (2009) Pentatricopeptide repeat proteins with the DYW motif have distinct molecular functions in RNA editing and RNA cleavage in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell* 21, 147-156.
- ⑩ Okegawa Y., Kagawa Y., Kobayashi Y. & Shikanai T. (2008) Characterization of factors affecting the activity of photosystem I cyclic electron transport in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 49, 825-834.
- ⑪ Hosoya-Matsuda N., Inoue K. & Hisabori T. (2008) Roles of thioredoxins in the obligate anaerobic green sulfur photosynthetic bacterium *Chlorobaculum tepidum*. *Mol. Plant* 2, 336-343.
- ⑫ Peng L., Shimizu H. & Shikanai T. (2008) The chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex interacts with photosystem I in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 283, 34873-34879.
- ⑬ Shikanai T. (2007) Cyclic electron transport

around photosystem I; genetic approaches. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 199-217.

- ⑭ Motohashi K. & Hisabori T. (2006) HCF164 receives the reducing equivalents from stroma thioredoxin across thylakoid membrane and mediates reduction of target proteins in thylakoid lumen. *J. Biol. Chem.* 281, 35039-47.
- ⑮ Hara S., Motohashi K., Arisaka F., Romano P.G., Hosoya-Matsuda N., Kikuchi N., Fusada N., & Hisabori T. (2006) Thioredoxin-*h1* reduces and reactivates the oxidized cytosolic malate dehydrogenase dimer in higher plants. *J. Biol. Chem.* 281, 32065-71.

[学会発表] (計 100 件)

- ① Shikanai T. Cyclic photophosphorylation, machinery and physiological function. Arnon Centennial Symposium Asilomar, USA 2010.1.6.
- ② Shikanai T. and Peng L. Machinery of photosystem I cyclic electron transport. 15th International Congress on Photobiology. Düsseldorf, Germany 2009.6.21.
- ③ Shikanai T. RNA editing in plastids. SAB Meeting Perth, Australia 2009.4.6
- ④ Shikanai T. Regulation of photosynthesis by PSI cyclic electron transport. Japanese-Finish Seminar 2008, 2008.10.30. Helsinki, Finland.
- ⑤ Hisabori T. New target enzymes for redox regulation in chloroplasts. Gordon Research Conference, CO₂ assimilation. USA 2008.8.17-22.
- ⑥ Shikanai T. Mechanism of RNA editing in plastids. The Plant and Animal Genome XVI Conference. San Diego, USA 2008.1.14
- ⑦ Shikanai T. Machinery of RNA editing contains PPR protein in plastids. Plant Winter Conference. POSTECH, Korea 2008.1.7.
- ⑧ Okegawa Y. and Shikanai T. Regulation of photosynthesis via PSI cyclic electron transport. International Congress of Photosynthesis. Glasgow, UK 2007.7.25.
- ⑨ Hisabori T. Functional analysis of thioredoxin networks in cyanobacteria, chloroplasts and plant cytosol. German-Japanese workshop. Konstanz, Germany 2007.3.19.
- ⑩ Shikanai T. Physiological function and machinery of PSI cyclic electron transport. International Symposium on Photosynthesis and Environment. Pusan, Korea 2007.2.8.
- ⑪ Shikanai T. and Okuda K. Machinery for RNA editing includes a PPR protein in plastids. Japanese-Finnish Seminar. Molecular mechanisms for regulation of photosynthetic organisms under stressed conditions. 奈良, 2006.10.29-11.2.

⑫ Shikanai T. Machinery of RNA editing in the chloroplast. The 53rd NIBB Conference. Dynamics Organelles in Plants. 岡崎 2006.6.14-17.

⑬ Shikanai T. Photosystem I cyclic electron transport; machinery and regulation of photosynthesis. The 5th Germany-Japan Binational Seminar 筑波 2006.6.4

⑭ Hisabori T. et al. Redox regulation system in chloroplasts: What we learn from the thioredoxin affinity chromatography. Swiss-Japan Workshop. Luzern, Swiss 2005.10.5-8.

⑮ Shikanai T. PSI cyclic electron transport; physiological function and machineries. Swiss-Japan Workshop. Luzern, Swiss 2005.10.5-8.

⑯ Hisabori T. Thioredoxin network in the plant cells: What we revealed using thioredoxin affinity chromatography. XVII International Botanical Congress, Austria 2005.7.17-23.

⑰ Hisabori T. Regulation of rotation of chloroplast F1-ATPase. Gordon Research Conferences, Photosynthesis. Smithfield, USA. 2005.7.3-8.

⑱ Shikanai T. Physiological function of PSI cyclic electron transport. Gordon Research Conferences, Photosynthesis. Smithfield, USA 2005.7.3-8.

⑲ Shikanai T. Function of PPR proteins in the maturation of chloroplast RNA. International Congress on Plant mitochondrial Biology. Obernai, France 2005.5.28-6.2.

⑳ Shikanai T. Physiological characterization of PSI cyclic electron transport pathway in Arabidopsis. 1st International Symposium on Chloroplast Bioengineering. Illinois, USA 2005.5.2-7.

[図書] (計 2 件)

① Shikanai T. (2010) Regulation of photosynthetic electron transport. In *The Chloroplast: Basics and Application*, Rebeiz C.A. et al. (eds) 347-361.

② Shikanai T. & Obokata J. (2008) Machinery of RNA editing in plant organelles. In "RNA and DNA editing: Molecular mechanisms and their integration into biological system." pp99-119.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鹿内 利治 (SHIKANAI TOSHIHARU)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：70273852

(2) 研究分担者

久堀 徹 (HISABORI TORU)

東京工業大学・資源化学研究所・教授

研究者番号：40181094

小林 善親 (KOBAYASHI YOSHICHIKA)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：90087594

(3) 連携研究者

津山 孝人 (TSUYAMA MICHITO)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：10380552