

機関番号：34419

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780101

研究課題名 (和文) カルビン回路の新規調節機構の解明と分子育種への応用

研究課題名 (英文) Analysis of regulatory mechanisms of the Calvin cycle  
for application to molecular breeding

研究代表者

田茂井 政宏 (TAMOI MASAHIRO)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：70340768

研究成果の概要 (和文)：

カルビン回路で機能するセドヘプツロース-1,7-ビスホスファターゼ (SBPase) は、フェレドキシソ/チオレドキシソ系を介したレドックスによる活性調節に加えて、リン酸化などの修飾による活性調節を受けていることを明らかにした。

また、カルビン回路の GAPDH および PRK の調節因子である CP12 が、酸化的ストレス時の光合成機能維持にも機能していることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

We found that the activity of sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase) was regulated by not only ferredoxin/thioredoxin system, but also by protein modification such as phosphorylation. On the other hand, we found that CP12, regulator of GAPDH and PRK in the Calvin cycle, functioned to protect photosynthetic apparatus under photooxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：色素体機能・光合成

## 1. 研究開始当初の背景

光合成カルビン回路の明暗調節には、主に4つのチオール酵素 (GAPDH、FBPase、SBPase、PRK) がフェレドキシソ/チオレドキシソ系により制御を受けることが重要とされてきたが、新たな制御系の存在も示唆されている。これまでのこのような報告とは異なり、最近の研究により、還元処理による活性化を受けない SBPase の存在が明らかとなった。

## 2. 研究の目的

本研究では、光合成カルビン回路の新規調節機構を明らかにすることを目的として、酸化還元に依存しない SBPase 活性調節機構を明らかにする。さらに、これまで葉緑体に局在する小タンパク質 CP12 は GAPDH および PRK と複合体を形成することにより、これらの活性調節を行っていることを明らかにしてきたが、NADPH との結合能を有す

ることから、ストレス応答への関与を明らかにし、CP12 の新規機能探索を行う。

### 3. 研究の方法

SBPase 活性を制御する新たなメカニズムを明らかにするため、明暗による SBPase の mRNA、タンパク質、酵素活性の相関を明らかにすると共に、BlueNative-PAGE により SBPase の活性制御へのタンパク質相互作用の関与を解析した。

一方、CP12 の新規機能を明らかにするために、パラコート (0.1~1  $\mu\text{M}$ ) および強光ストレス (500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) 条件下における *S. 7942* 野生株および CP12 欠損株の生育、光合成機能を比較し、ストレス応答における CP12 欠損の影響を明らかにした。

### 4. 研究成果

(1) 明期 6 時間 (150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , 22°C)、暗期 6 時間 (0  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , 18°C) で栽培したシロイヌナズナを用いて、リアルタイム-PCR 及び RT-PCR により SBPase の mRNA 量を比較した結果、これまでの報告どおり明期での誘導が認められた。

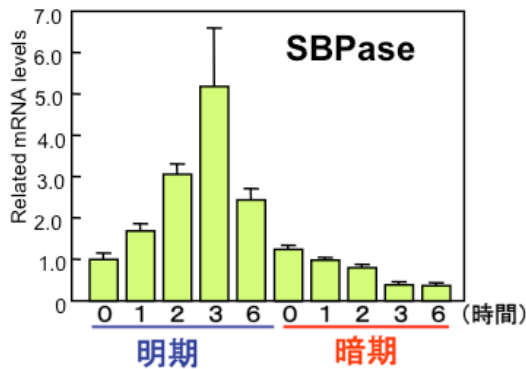


図 1 明暗条件下におけるシロイヌナズナ SBPase mRNA 発現量

(2) ウェスタンブロッティングにより SBPase のタンパク質量を比較した結果、明暗によるタンパク質量の大きな変動は認められなかった。しかし、還元状態での SBPase 活性を比較した結果、明期には SBPase 活性が認められたが、暗期では SBPase タンパク質が存在するにも関わらず SBPase 活性が認められなかった。これらの結果から、暗所では、SBPase は酸化還元以外の修飾により不活性化を受けていることが示された。

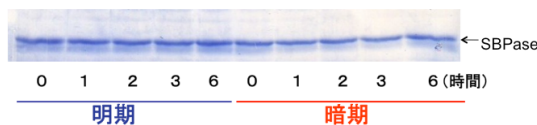


図 2 明暗条件下におけるシロイヌナズナ SBPase タンパク質量

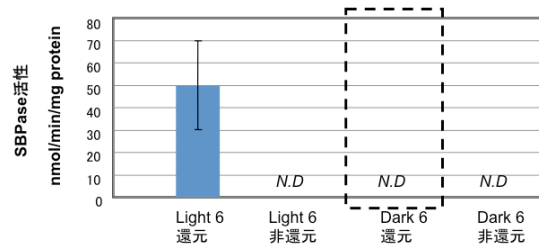


図 3 還元/非還元条件化での明暗による SBPase 活性の変動

(3) BlueNative-PAGE により SBPase の活性制御へのタンパク質相互作用の関与を解析した。その結果、暗期の SBPase の分子量は明期の SBPase と比較してわずかに増大していた。種々のシロイヌナズナ粗抽出液を種々の酸化還元条件下 (1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , DTT,  $\text{NAD}^+$ , NADPH) で処理し、Blue Native PAGE により複合体状態の解析を行った結果、いずれの条件下においても、抗 SBPase 抗体交差反応を示すタンパク質バンドに大きな変化は認められなかった。これらのことから、SBPase タンパク質は、リン酸化などの修飾を受けていることが示唆された。

(4) CP12 の新規機能を明らかにするために、パラコート (0.1~1  $\mu\text{M}$ ) および強光ストレス (500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) 条件下における *S. 7942* 野生株および CP12 欠損株の生育を比較した結果、CP12 欠損株はいずれのストレス条件下においても野生株と比較して有意にクロロフィル量の減少が認められ、ストレス感受性が增大していた。

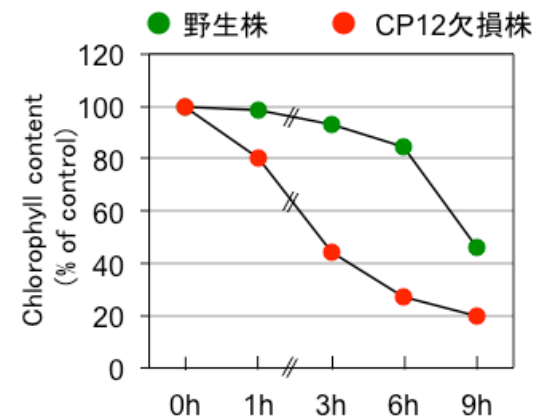


図 4 ラン藻野生株および CP12 欠損株の生育に及ぼす強光ストレス (500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) の影響

(5) 強光ストレス (300  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) 条件下における *S. 7942* 野生株および CP12 欠損株の光合成活性を比較した結果、ストレス処理後 4 時間目以降の CP12 欠損株の光合成活性に著しい低下が認められた。さらに、ストレス条件下でのピリジンスクレオチド量を

比較した結果、強光ストレス 3 時間目の CP12 欠損株では、有意に NADP<sup>+</sup>が蓄積しており、CP12 欠損により電子伝達系での電子の流れが阻害されていることが示唆された。

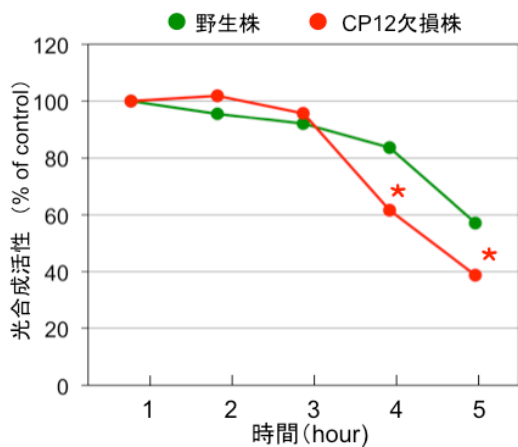


図 5 ラン藻野生株および CP12 欠損株の光合成活性に及ぼす強光ストレス (500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) の影響

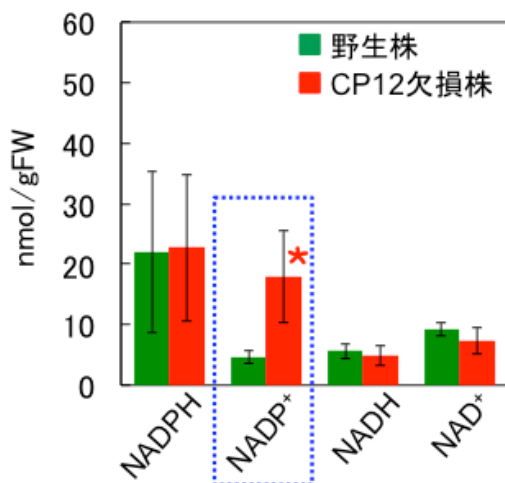


図 6 ラン藻野生株および CP12 欠損株のピリジヌクレオチド量に及ぼす強光ストレス (500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) の影響

[その他]

ホームページ等

<http://web.me.com/p.m.p/jpn/Home.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田茂井 政宏 (TAMOI MASAHIRO)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：70340768