

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570037

研究課題名（和文）

高等植物葉緑体におけるチオレドキシンファミリータンパク質の機能分担解析

研究課題名（英文）

Functional analysis of thioredoxin family proteins in higher plant chloroplasts

研究代表者

本橋 健 (MOTOHASHI TAKESHI)

京都産業大学・総合生命科学部・准教授

研究者番号：90301952

研究成果の概要（和文）：高等植物葉緑体のチオレドキシンは、葉緑体ストロマに局在し、光合成から得られる還元力の一部をフェレドキシン、フェレドキシン・チオレドキシ還元酵素を経由して、電子として受け取る。電子を受け取り、還元型となったチオレドキシンはカルビンサイクルを始めとして、ストロマに局在する各種酸化還元応答タンパク質を還元し、酵素活性の調節を行う。本研究では、シロイヌナズナ葉緑体に局在すると考えられている4グループ、9種類のチオレドキシンタンパク質に加え、研究を開始してから発見された10種類目のチオレドキシンアイソフォームを含め、5グループ10種類のチオレドキシンタンパク質の機能分担解析を行った。

研究成果の概要（英文）：The redox state of higher plant chloroplasts fluctuates widely under light and dark conditions. Depending on the redox state, thioredoxins (Trx) regulate the function of proteins by reducing their disulfide bridge. In *Arabidopsis*, plastidial stroma Trx-isoforms comprise ten members, into five types. The *f* and *m*-type Trxs regulate the activity of enzymes mainly involved in the primary metabolism, including the Calvin cycles, while *x*, *y* and *z*-type Trxs are related with oxidative stress responses. However, the genetic evidence for its physiological importance is lacking. We prepared specific antibodies for each Trx isoforms and determined their concentration. The *m*-type Trx with four isoforms was major Trx proteins in the chloroplast stroma. We analyzed an *Arabidopsis* *trx m* mutant.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2012年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：オルガネラ、葉緑体、酸化還元制御

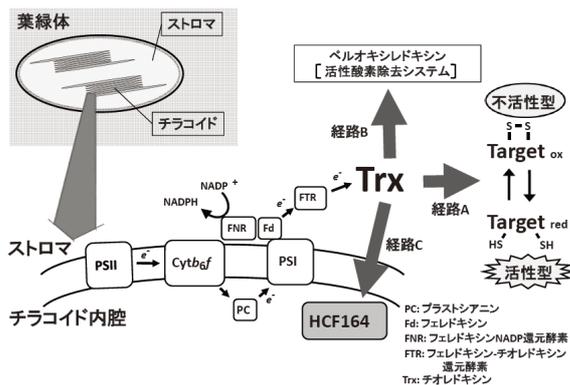
## 1. 研究開始当初の背景

高等植物葉緑体のチオレドキシン(Trx)は、

葉緑体ストロマに局在し、光合成から得られる還元力の一部をフェレドキシン、フェレドキシン・Trx還元酵素を経由して、電子とし

て受け取る (図 1)。電子を受け取り還元型となった Trx はカルビンサイクルを始めとして、ストロマに局在する各種酸化還元応答タンパク質を還元し、酵素活性の調節を行う (図 1 経路 A)。これは、昼と夜により光合成活性などを調製する必要のある植物葉緑体にとっては、非常に大切な制御メカニズムであり、ここ数年間の私たちを含む世界の Trx 研究者により、経路 A 以外にも、Trx の下流で酸化還元調節されるタンパク質が存在し、その経路が多方面に渡ることが明らかとなっている (図 1 経路 B、経路 C)。

これと並行して、最近進展した高等植物のゲノム解析結果によれば、高等植物葉緑体ストロマは、これまで考えられていたよりも多くの Trx アイソフォームを持つことがわかった。たとえば、ゲノム解析が終了したシロイヌナズナでは、f 型 (2 種)、m 型 (4 種) に加えて、x 型 (1 種)、y 型 (2 種) の 4 グループ 9 種類もの Trx が葉緑体に存在していることがわかっていた (図 2)。しかし、それらストロマ内でどのような役割分担を担って機能しているかは、部分的に機能分担が提唱されているだけだった。



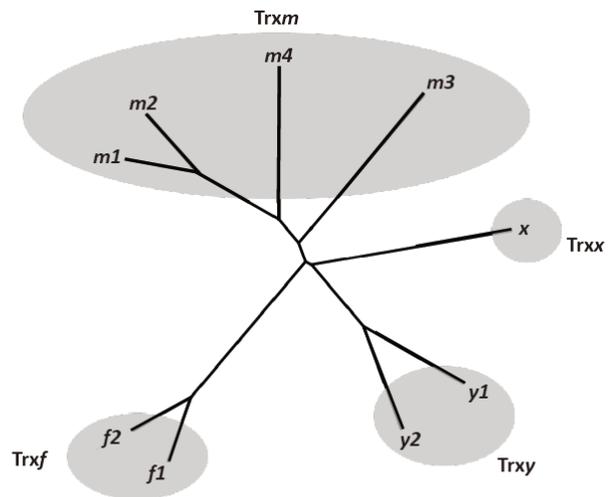
## 2. 研究の目的

植物は昼夜におけるレドックス変化に対応するために、Trx によるレドックス制御が必要である。葉緑体 Trx の研究は、この数年で大きく進んだ。しかし、そのおかげで新たな謎も出てきた。細胞内の葉緑体ストロマ Trx は、これまで考えられていたよりも多くのアイソフォームが存在し、多くのレドックス経路で働いている。では、葉緑体ストロマ Trx アイソフォームは、ジスルフィド結合を還元するという一見単純な活性を通じて、どのように電子の流れを調節し、交通整理しているのだろうか。私は、この問題を解決することを目的として、*in vivo*, *in vitro* の両方の側面から研究を進めた。

## 3. 研究の方法

高等植物葉緑体ストロマに存在するチオレドキシソファミリーの機能分担を明らかにするため、まず、シロイヌナズナ葉緑体に局在すると考えられる 4 グループ、9 種類の遺伝子をクローニングし (図 2)、大腸菌を用いた組換えタンパク質の大量発現系を構築した。その後、これらすべてのタンパク質の精製を行い、生化学的な解析に用いた (図 3)。

これと平行して、シロイヌナズナの葉緑体に局在するチオレドキシソファミリーを検出するために、シロイヌナズナの T-DNA 挿入変異体の整備を進めた。また、T-DNA 挿入変異株の取得と同時に、RNAi 株の作成も進めた。精製したタンパク質と整備した T-DNA 挿入変異体を用いて、生化学的、および生理学的解析を行った。



## 4. 研究成果

これらの研究を進める過程で、z 型 Trx が葉緑体ストロマで機能していることが報告されたため、これまでの 4 グループ 9 種類の Trx に加えて実験を進めた。合計して、5 グループ 10 種類の Trx を精製し、各 Trx タンパク質に特異的に反応する抗体の作成を進めた。組換え体タンパク質で特異的抗体が作成できないときには、Trx アイソフォームのドメインだけを発現させたタンパク質を用いたり、ペプチド抗体などを組み合わせることで、5 グループ 10 種類に特異的な抗体を得た。その結果、Arabidopsis 葉緑体ストロマに局在する各 Trx アイソフォームの量を定量することができた。細胞内の各種チオレドキシソファミリータンパク質の定量を行う

ことで、グループ間で存在量の違いを明らかにすることができた。

また、シロイヌナズナの葉緑体に局在するチオレドキシファミリーのタンパク質機能を生理的な環境下で理解するために、シロイヌナズナの T-DNA 挿入変異体の整備を進め、いくつかの変異体について、光合成活性を中心とした生理学的解析実験を行った。その結果、チオレドキシファミリータンパク質は、グループごとに、その表現型に差が見られることが明らかになった。これは、各 Trx グループ間にそれぞれの機能があり、グループごとに生理的機能分担を行っているらしいことを示唆するものであり、その機能分担がどのようなものかを具体的に明らかにすることが今後の課題である。

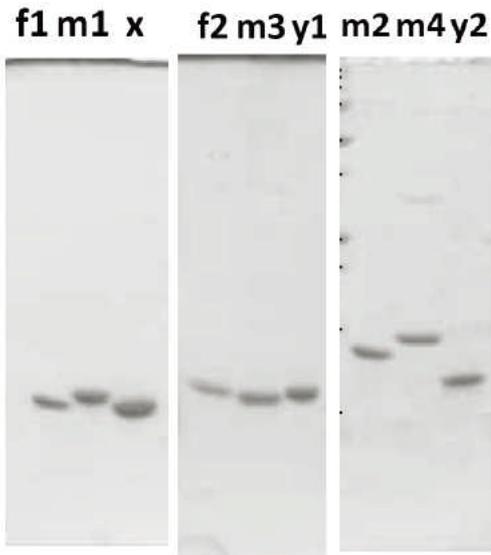


図3 Arabidopsis 葉緑体Trx(9種)の精製標品

#### 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 3 件)

1. Keisuke Yoshida, Ko Noguchi, Ken Motohashi and Toru Hisabori  
Systematic Exploration of Thioredoxin Target Proteins in Plant Mitochondria  
Plant Cell Physiol. *in press* (2013)  
doi: 10.1093/pcp/pct037  
査読あり

2. Ken Motohashi and Toru 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, 1169-1176  
(2010)

査読あり

#### 3. 本橋 健

高等植物葉緑体におけるレドックス制御～チラコイド内腔におけるレドックス調節機構について～  
光合成研究 20, 4-8 (2010)

査読あり

[学会発表] (計 11 件)

#### 1. 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生理学的解析  
第 85 回日本生化学会  
2013. 9. 11-13  
横浜市；パシフィコ横浜

#### 2. 桶川 友季、本橋 健

シロイヌナズナの m 型チオレドキシ変異株の解析  
第 4 回日本光合成学会年会  
2013. 5. 31-6. 1  
名古屋市；名古屋大学

#### 3. 桶川 友季、本橋 健

葉緑体ストロマにおける m-type チオレドキシンの生理機能の解析  
第 54 回日本植物生理学会年会  
2013. 3. 21-23  
岡山市；岡山大学

#### 4. 桶川 友季、本橋 健

葉緑体ストロマにおける m-type チオレドキシンの機能解析  
第 85 回日本生化学会  
2012. 12. 14-16  
福岡市；福岡国際会議場

#### 5. 吉田 啓亮、野口 航、本橋 健、久堀 徹

植物ミトコンドリアのチオレドキシ標的タンパク質  
第 84 回 日本生化学会大会  
2011. 9. 21-24  
京都；京都国際会館

#### 6. 本橋 健、久堀 徹

葉緑体チラコイド膜局在タンパク質 CcdA の還元力伝達機構  
第 52 回日本植物生理学会年会  
2011. 3. 20-22  
仙台；東北大学川内北キャンパス

7. 吉田 啓亮、野口 航、本橋 健、久堀 徹

プロテオミクスを用いたミトコンドリアのチオレドキシンの標的タンパク質の探索  
第52回日本植物生理学会年会  
2011.3.20-22  
仙台；東北大学川内北キャンパス

8. Ken MOTOHASHI, Toru HISABORI

“CcdA is a thylakoid membrane protein for the transfer of reducing equivalents across the thylakoid membrane in the higher plant chloroplast”

BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会)

2010.12.7-10

ポートアイランド (神戸)

9. Ken MOTOHASHI, Toru HISABORI

“CcdA is a thylakoid membrane protein for the transfer of reducing equivalents from stroma to thylakoid lumen in the higher plant chloroplast”

The 3rd International Symposium on Protein Community (ISPC-Nara2010)

September 13-16, 2010

Hotel Nikko Nara, Nara, Japan

10. 吉田 啓亮、本橋 健、久堀 徹

ミトコンドリアのチオレドキシンの標的タンパク質の探索

日本植物学会第74回大会

2010.9.9-11

春日井市；中部大学

11. 本橋 健、久堀 徹

葉緑体ストロマチオレドキシンのチラコイド膜を介した還元力伝達機構

第1回日本光合成学会公開シンポジウム

2010.6.4-5

東京；東京大学・駒場キャンパス

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本橋 健 (MOTOHASHI TAKESHI)

京都産業大学・総合生命科学部・准教授

研究者番号：90301952