

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 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22580106

研究課題名（和文） 葉緑体ピリジンヌクレオチドデヒドロゲナーゼ複合体の新規サブユニット同定と構造解明

研究課題名（英文） Identification and characterization of new subunits of chloroplastic pyridine nucleotide dehydrogenase complex

研究代表者 遠藤 剛 (ENDO TSUYOSHI)

京都大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号 90201962

研究成果の概要（和文）：葉緑体NAD(P)Hデヒドロゲナーゼ複合体(NDH)とは、葉緑体チラコイド膜上の、光合成に不可欠な循環的電子伝達 経路を構成する複合体であり、循環的電子伝達にかかわることを近年の研究で明らかにしてきた。本研究ではNDH複合体の分子実体の解明に焦点を絞り、最近可能となった公開データベースを利用したバイオインフォマティクスを駆使して、未知サブユニットの同定を行うとともに、これまでの知見を総合した構造モデルを作成することおよび、新規同定サブユニットの機能解明を行った。

研究成果の概要（英文）：The chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase complex (NDH) is a newly found protein complex on the thylakoid membranes and functions in cyclic electron transport around photosystem I. In this study, I tried to find new subunits of NDH using expressional databases, and characterized a new subunit with Fe-S center motif.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成23年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成24年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：植物生化学

研究開始当初の背景

葉緑体 NAD(P)H デヒドロゲナーゼ複合体 (NDH)とは、葉緑体チラコイド膜上の、光合成に不可欠な循環的電子伝達 経路を構成する複合体であり、最近その分子的な実体や機能が明らかになりつつあるが、分子の実像がいまだ明らかでないため、なぜこのような巨大複合体を葉緑体が保持しているのかという 根源的な謎の解決に踏み込めないのが

現状である。本研究では分子実体の解明に焦点を絞り、最近可能となった公開データベースを利用したバイオインフォマティクスを駆使して、未知サブユニットの同定を基盤とした構造解明を目指してきた。

2. 研究の目的

葉緑体 NDH 複合体は光化学系 I の循環的電

子伝達系で、NADPH または還元型フェレドキシンから電子を受け取り、プラストキノンへ受け渡す機能をもつと推定されているが、複合体構成サブユニットの全容が不明であり、複合体内部での電子伝達フローも不明である。本研究では、新規 NDH サブユニットを同定するとともに、同定したサブユニットの機能を解析し、NDH 複合体の四次構造を明らかにすることを目的とする。また同定したサブユニットの生化学的機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) バイオインフォマティクスを利用した未知サブユニットの同定:

シロイヌナズナの網羅的遺伝子発現解析情報を集積した公開データベース(ATTED-II 等)を利用したバイオインフォマティクスを駆使して、既知サブユニットと共発現することを条件に絞り込んだ候補遺伝子から未知サブユニットの同定の同定を行い、機能解析と構造解明を行う。

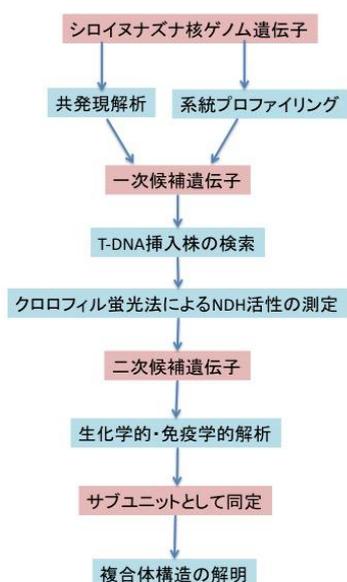


図 バイオインフォマティクスによるNDH遺伝子選抜法

(2) 電子受容体結合サブユニットの同定:

新規に同定したサブユニットのひとつ PnsB3 の 2S-2Fe クラスターモチーフに着目し、このサブユニットが複合体内部で果たす機能の解析を行う。具体的には S-Fe クラスターのリガンドとなるシステイン残基をアラニンに置換した遺伝子発現ベクターを作成し、内在の PnsB3 が挿入破壊されているシロイヌナズナに導入することで、NDH 複合体の構造は保持しているが、PnsB3 の電子伝達活性が失活している形質転換体の作成を行った。

4. 研究成果

(1) バイオインフォマティクスを利用した未知サブユニットの同定

ATTED-II を利用して既知サブユニットと共発現する遺伝子をサブユニット候補遺伝子とした (共発現解析)。次に真核藻類であるクラミドモナスとシズンは葉緑体 NDH 複合体をもたないことを利用して、植物ゲノムにはあるが、これら真核藻類のゲノムにはホモログの存在しない遺伝子のみを候補として残した (系統プロファイリング)。

選抜された候補遺伝子の破壊株を入手して、これらがサブユニットであるか否かを生化学的に確認した。これまでの知見で、NDH 複合体は一サブユニットの欠損で複合体全体の構造保持が不可能となることが知られているため、簡便に測れるクロロフィル蛍光法による NDH 活性が喪失する。すなわち、簡便な活性測定により候補遺伝子が NDH の新規サブユニットであるか否かを判別できる。最終的には特異的抗体を作成して欠損株でこの遺伝子産物および既知の NDH サブユニットが存在しないことを確認する。このスクリーニングの結果、現在までに 9 個の新規サブユニットを解析し報告することに成功した。また、新たに 2 個のサブユニット候補遺伝子を同定解析したが、競合グループから論文は発表されたため、解析を中断せざるをえなかった。

本研究までに同定した新規サブユニット一覧

PnsB1	(At1g15980)
PnsB2	(At1g64770)
PnsB3	(At3g16250)
PnsB4	(At1g18730)
PnsL1	(At2g39470)
PnsL2	(At1g14150)
PnsL3	(At3g01440)
PQL3*	(At2g01918)
NDF5*	(At1g55370)

* NDH 活性に必須であるがその存在位置が不明でありシャペロン様機能をもつ可能性もあるタンパク質。

本研究グループが同定した新規のサブユニット群は、既知のサブユニットが構成するサブコンプレックス (葉緑体コードのサブユニット群を骨格とするサブコンプレックス A およびチラコイド膜貫通サブコンプレックス) とは、異なったサブコンプレックスを構成することがわかり、この新たなサブコンプレックスをサブコンプレックス B と命名した。またこれまで知られていなかったチラコイド膜の内腔側に存在するサブコンプレックスが初めて明らかにされた。これらの知見を総合した構造モデルを研究競合者らとともに

に作成し、混乱したサブユニット名を統一し、複合体全体の構造をほぼ明らかにすることができた。

(2) 電子受容体結合サブユニットの同定

PnsB3: 本研究グループが同定した新規サブユニットのうち **PsnB3** は、**2S-2Fe** クラスタをもち、電子受容サブユニットの可能性が高いと推定される。このサブユニットの電子伝達活性の有無を明らかにすべく、**Fe-S** のリガンドと推定される **120, 126, 129** 番目のシステインをアラニンに置換したコンストラクトを作成した (**C120A PnsB3_FLAG** および **C126A/C129APnsB3_FLAG** の2種)。このサイトディレクテドミュータジェネシスにより、サブユニットとしての構造を保持しながら電子伝達活性のみを欠損させた変異タンパク質の発現が可能となる。これらの変異遺伝子を内在の **PnsB3** が挿入破壊されているシロイヌナズナに導入し発現させた。形質転換体には、**PnsB3** 抗体および **NDH-H** 抗体に反応するバンドを有する株が含まれていて、これらの株では、機能を持たない **PnsB3** ポリペプチドを含む **NDH** 複合体が蓄積していると推定される。すなわち、**NDH** 複合体の構造を安定に保持したまま、当該 **S-Fe** クラスタを欠損した株をえることができたと考えた。これらの株では、**NDH** 活性の指標のひとつである光照射後のプラストキノンの一過的還元がみられたことからこの活性に当該 **Fe-S** クラスタは関与しないという結論を得た。今後は、作成した変異 **PnsB3** 遺伝子を大腸菌で発現させて **Fe-S** クラスタを保持していないことを確認すると共に、当該 **Fe-S** クラスタの機能を明らかにするため、チラコイド膜を単離して、様々な酸化還元活性測定を行う。

CRR1: ストロマに存在し、**NDH** 複合体と比較的緩く結合していると考えられる **CRR1** の欠損株をシアノバクテリアで作成した。

CRR1 は **NADPH** 結合モチーフをもち **NDH** 複合体の電子供与体結合サブユニット候補である。**CRR1** 欠損のシロイヌナズナとシアノバクテリアはともに **NDH** 活性を失っていた。またタバコチラコイド膜は **NADPH** からプラストキノンの電子伝達活性をもつが、この活性のうちアンチマイシン耐性のものは **NDH** に起因すると考えられている。この **NDH** 活性には **CRR1** の存在が重要であることを示唆する結果が得られたことから **CRR1** は **NDH** 複合体で **NADPH** から電子を受容するサブユニットである可能性が示された。

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 4 件)

1. Einali, A., Shariati, M., Sato, F. and Endo, T. (2013) Cyclic electron transport around photosystem I and its relationship to non-photochemical quenching in the unicellular green alga *Dunaliella salina* under nitrogen deficiency. *J. Plant Res.* **126**, 179-186. 査読有
2. Ifuku, K., Endo, T., Shikanai, T., and Aro, E.-M. (2011) Structure of the chloroplast NADH dehydrogenase-Like complex: nomenclature for nuclear-encoded subunits. *Plant Cell Physiol.* **52**, 1560-1568. 査読有
3. Ishida, S., Morita, K., Kishine, M., Takabayashi, A., Murakami, R., Takeda, S., Shimamoto, K., Sato, F., and Endo, T. (2011) Allocation of absorbed light energy in Photosystem II to thermal dissipations in the presence or absence of PsbS subunits of rice. *Plant Cell Physiol.* **52**, 1822-1831. 査読有
4. Yabuta, S., Ifuku, K., Takabayashi, A., Ishihara, S., Ido, K., Ishikawa, N., Endo, T. and Sato, F. (2010). Three PsbQ-like proteins are required for the function of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **51**, 866-876. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

Ishikawa, N. 他 6 名 Screening of novel subunits of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in *Arabidopsis*. International Congress of Photosynthesis. 20 Aug 2010, 北京

[図書] (計 0 件)

[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
なし。

6. 研究組織
(1) 研究代表者
遠藤 剛 (ENDO TSUYOSHI)
京都大学・大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号： 90201962