

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770049

研究課題名（和文） 葉緑体ストロマからチラコイド内腔への還元力伝達機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of reducing equivalent transfer system on the thylakoid membrane.

研究代表者

桶川 友季 (OKEGAWA YUKI)

京都産業大学・総合生命科学部・助教

研究者番号：10582439

研究成果の概要（和文）：植物の葉緑体内の酸化還元状態は昼と夜で大きく異なる。そのため、光合成関連酵素を初めとし、様々なタンパク質がその活性をレドックスによって制御される。しかしそれらのタンパク質がどのように制御されているかの詳細はわかっていない。本研究では、葉緑体のストロマにおいてタンパク質の制御に関与するチオレドキシニンに注目した。突然変異株の解析からチオレドキシニンが光合成の制御に大きく寄与していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The redox state of higher plant chloroplast varies greatly under light and dark conditions. Many proteins, including enzymes related to photosynthesis, are activated depending on its redox state. However, its mechanism remains to be fully elucidated. In this project, we focused on thioredoxins, which act as regulator of proteins in chloroplast stroma. Arabidopsis mutants defective in accumulation of thioredoxins were obtained and analyzed, which revealed that thioredoxins are important for photosynthesis and photoprotection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1050,000	4,550,000

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

Trx は葉緑体内のレドックス状態を感知して、標的タンパク質のジスルフィド結合を還元することでストロマ局在のタンパク質の機能を制御している。最近、葉緑体ストロマでは10個目のTrx (Trxz) が同定され (Arsova et al., 2010; Plant Cell)、葉緑体におけるTrxの重要性が再認識されている。これまでにTrxはカルビンサイクルを始めとする炭酸固定系酵素群の活性調節だけでなく、デンプン合成、テトラピロール代謝、脂質代謝、タンパク質のフォールディングなどの葉緑体機能に関わる様々なタンパク質の機能調節に関与していることが分かっている。最近では

Trx が葉緑体へのタンパク輸送にも関与することが明らかとなった (Balsera et al., 2010; Trends Plant Sci.)。このようにTrxは葉緑体において光合成の制御だけでなく葉緑体の分化や発達にも関与する重要なタンパク質である。

葉緑体ストロマでのTrxの重要性が明らかとなり、ストロマTrxが標的とするタンパク質のレドックス制御研究は大きく進んだ。しかしながらチラコイド膜を隔てたチラコイド内腔におけるレドックス環境の変化はほとんど明らかにされていない。そもそも、チラコイド内腔にTrxのようなレドックスタンパク質が存在し、機能していることもごく最近

までわかっていなかった。

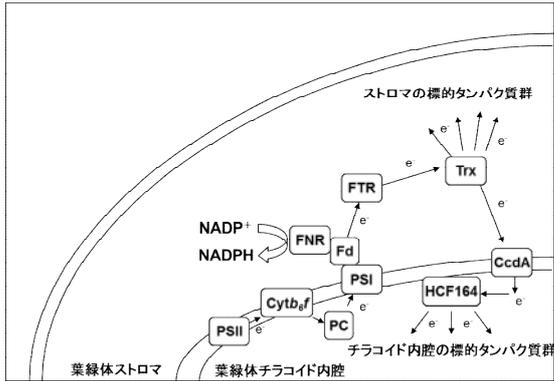


図1 チラコイド膜を介した還元力伝達モデル

このような現状の中、チラコイド内腔でのレドックス制御の可能性を示唆する報告がいくつかなされている。シロイヌナズナ突然変異株 *hcf164* は高いクロロフィル蛍光を示す突然変異株として単離された (Lennartz et al., 2001; Plant Cell)。Hcf164 はシトクロム *b6f* 複合体のアッセムブリ異常が原因で光合成能力が減少していた。原因遺伝子をコードする HCF164 はチラコイド内腔側に二つのシステイン残基を持つチオレドキシン様タンパク質であった。

2006年、Motohashi らがこの HCF164 がストロマ側に局在する Trx から還元力の供給を受けて機能することを明らかにした (Motohashi et al., 2006; J. Biol. Chem.:図1)。さらに2010年には、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 CcdA がストロマの Trx からチラコイド内腔の HCF164 への還元力の受け渡しに関与することが示唆された (Motohashi et al., 2010; Antioxid. Redox. Signal.)。

2. 研究の目的

本研究はこれまでの研究から還元力伝達に関与することが明らかとなっている HCF164 と CcdA を含めた全体の分子機構を明らかにすることと、チラコイド内腔でのレドックス制御の生理学的意義、特に光合成電子伝達との関連性を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

HCF164 と CcdA タンパク質はどちらもストロマに局在する Trx によって還元されること、その突然変異株が同じ表現型を示すということから、CcdA が HCF164 を還元することが示唆された (Motohashi et al., 2010; Antioxid. Redox. Signal.)。しかしこれまでのところそれを直接的に証明する証拠はない。また還元力伝達システムの全貌は明らかになっておらず、他にもこの経路に関与するタンパク質が存在する可能性がある。さらに

ストロマでの還元力供給の部分において葉緑体ストロマに局在する Trx アイソフォームが関与しているかもわかっていない。そこで HCF164 が CcdA を介してストロマの還元力を受け取ることを証明し、CcdA がストロマに局在する Trx を電子供与体とするかを明らかにするために以下の実験を行う。

(1) シロイヌナズナの突然変異株を用いた還元力供給経路の解析

CcdA タンパク質を蓄積できないシロイヌナズナの突然変異株のバックグラウンドで HCF164 のレドックス状態を調べる。ccda 変異株で HCF164 のジスルフィド結合が還元されなければ HCF164 への還元力の伝達には CcdA が必須であることを証明できる。

(2) 還元力供給源のストロマ Trx 特異性の解析

シロイヌナズナには 10 個のストロマ局在の Trx アイソフォームが存在することが分かっている。これら全ての Trx アイソフォームの精製タンパク質を作製し、単離チラコイドを用いて CcdA を特異的に還元する Trx の特定を目指す。さらに *in vivo* でも解析を行う。10 種類ある Trx アイソフォームそれぞれの突然変異株を取得し、変異株において HCF164 と CcdA の酸化還元状態を調べる。還元力供給に特異的に関与している Trx アイソフォームを特定する。葉緑体ストロマには Trx アイソフォームが複数存在するため機能重複が考えられる。そのため CcdA を還元する Trx アイソフォームとして複数の候補が見つかる可能性がある。その場合には多重変異株を作成し解析を行うことで研究を進める。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナの突然変異株を用いた還元力供給経路の解析

CcdA に T-DNA が挿入された変異株を得るため SALK 研究所から取り寄せた。RT-PCR を行った結果、CcdA の発現が抑制されたラインを得ることが出来た。以前の報告 (Page et al., 2004; J. Biol. Chem.) 一致して、ccda 変異株は成長阻害の表現型を示した。弱光条件下のみ生育可能で、光合成電子伝達速度も劇的に減少していた。ccda 変異株における HCF164 タンパク質の酸化還元状態を調べるために野生株と ccda 変異株の単離チラコイドを用いて実験を行った。HCF164 タンパク質の還元状態を野生株と ccda 変異株で比較したが大きな違いは見られなかった。今回の実験で用いた ccda 変異株はノックアウト株ではなくノックダウン株であるためわずかに蓄積している CcdA が HCF164 を還元しているのかもしれない。または、*in vitro* の実験では還元剤として DTT を添加している

ため DTT による還元かもしれない。今後、in vivo での HCF164 の還元状態を調べる必要がある。

(2)還元力供給源のストロマ Trx 特異性の解析

①Trx アイソフォームの特異的抗体の作製
シロイヌナズナのプラスチドには 10 個のチオレドキシニンアイソフォームが局在する。そこでそれぞれの Trx 精製タンパク質を抗原として特異的抗体を作出した。特異性の低い抗体については作製を繰り返すことで特異的な抗体を得た。作製した抗体を精製タンパク質と反応させ特異性を調べた(図 2)。全ての Trx アイソフォームについて特異的抗体を得ることが出来た。得られた特異的抗体を使って続く実験を行った。

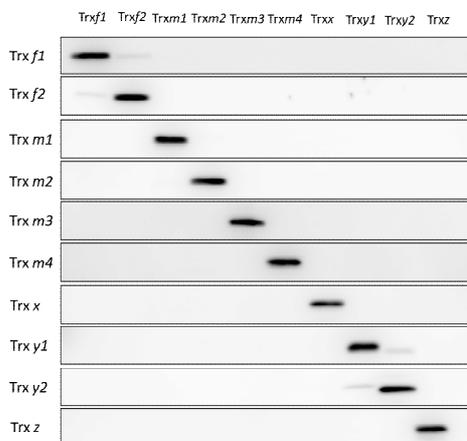


図2 Trxアイソフォームの特異的抗体

②Trx 変異株の解析

どの Trx アイソフォームがストロマからチラコイド内腔への還元力伝達に関与しているかを調べるために変異株の解析を行った。T-DNA 挿入変異株を得るため種子を SALK 研究所から取り寄せ、作製した特異的抗体を使ってタンパク質の蓄積を調べた。これまでに Trx f2、m3、z を除く Trx アイソフォームの変異株を得ている。Trx f2 についても RNAi 法によってノックダウン株を作出し、発現を調べているところである。得られた変異株の表現型を調べたが CcdA や HCF164 の蓄積を欠く変異株のように成長阻害を示す個体は得られなかった。Trx はアイソフォームが多数存在するため機能が重複しているかもしれない。そこで二重変異株、三重変異株を作成し解析を行った。Trx m1、m2、m3 タンパク質の蓄積が減少した *trx m124* 三重変異株は成長阻害が見られた。光合成電子伝達速度(ETR)を測定した結果、野生株に比べて減少していた。以上の結果から私たちは m 型 Trx がストロマからチラコイド内腔への還元力伝達に関与していると示唆している。

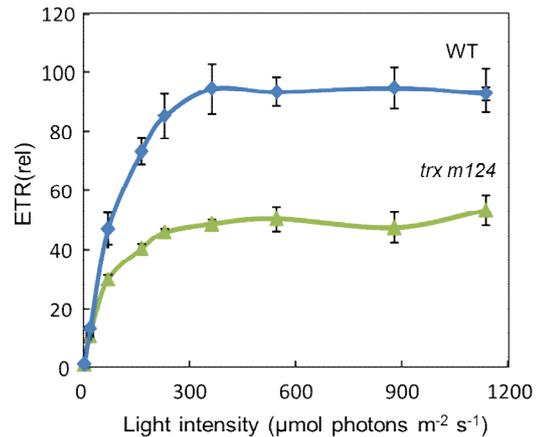


図3 光合成電子伝達速度

今後、Trx m のどのアイソフォームが還元力伝達を効率的に行うかを調べるために、それぞれの精製タンパク質を用いて Trx 依存の CcdA および HCF164 の還元実験を行う。

さらに *trx m124* 三重変異株において HCF164 と CcdA の酸化還元状態を調べることによってストロマからチラコイド内腔への還元力伝達機構の全貌を明らかにする。

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 1 件)

①Y. Nishikawa, H. Yamamoto, Y. Okegawa, S. Wada, N. Sato, Y. Taira, K. Sugimoto, A. Makino and T. Shikanai: PGR5-Dependent Cyclic Electron Transport Around PSI Contributes to the Redox Homeostasis in Chloroplasts Rather Than CO₂ Fixation and Biomass Production in Rice. *Plant Cell Physiol.* 53: 2117-2126 (2012), doi:10.1093/pcp/pcs153, 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

①平 純考、桶川友季、杉本和彦、三芳秀人、鹿内利治、アンチマイシン A に代わる新規な光合成サイクリック電子伝達阻害剤、第 2 回日本光合成学会、2011 年 6 月 3-4 日、京都市

②平 純考、桶川友季、杉本和彦、三芳秀人、鹿内利治、新規な PSI サイクリック電子伝達の阻害剤、Global COE Joint Symposium、2012 年 1 月 20 日・21 日、東京

③桶川友季、本橋健、葉緑体ストロマにおける m-type チオレドキシンの機能解析、第 85 回日本生化学会年会、2012 年 12 月 14 日・16 日、福岡市

④桶川友季、本橋健、葉緑体ストロマにおける m-type チオレドキシンの生理機能の解析、第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月

21日-23日、岡山市

[その他]

ホームページ等

http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~motohas/motohashi_lab/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桶川 友季 (OKEGAWA YUKI)

京都産業大学・総合生命科学部・助教

研究者番号：10582439