

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2016～2020

課題番号：16H06555

研究課題名（和文）プロトン駆動力制御ネットワークの遺伝学解析

研究課題名（英文）Genetic analysis of regulatory network of proton motive force

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 72,700,000 円

研究成果の概要（和文）：光合成の電子伝達は、電子伝達に連動してチラコイド膜ルーメンを酸性化する。このプロトン濃度勾配は、ATP合成に使われるだけでなく、光合成電子伝達にブレーキをかける。我々は、植物がこのブレーキのかかりを、光合成速度を落とさず、光阻害を回避するように最適化する分子機構を明らかにし、さらにその人為的な改変を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光は光合成に必須であるが、過剰な光の需要は光合成装置を破壊する。我々は、チラコイド膜を介したプロトンの勾配に着目し、この光の効果の二面性を最適化する分子機構の一部を明らかにした。また積極的に光合成制御を改変するアプローチから、光合成を環境に再最適化することが可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：Photosynthetic electron transport is coupled with proton translocation across the thylakoid membrane. Resulting proton concentration gradient is utilized in ATP synthesis and also downregulates electron transport. We clarified the mechanism by which plants optimize the size of delta-pH to avoid photoinhibition without decreasing the rate of photosynthesis. We also tried to artificially modify the regulatory system.

研究分野：植物生理学

キーワード：光合成 葉緑体 電子伝達 プロトン サイクリック電子伝達

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

光は、光合成電子伝達を駆動するが、過剰な光の受容は、活性酸素の生成を介して光傷害を引き起こす。そのため、植物は、チラコイドルーメンの酸性化をモニターすることで光の過剰を感じ、光の利用効率を下げる。特にこの問題は、光強度が変動する際(変動光)深刻になる。研究開始当時は、このプレーキに必要な個別の装置の実体が理解され始めていた。しかし、全体の光合成を環境に対して最適化するネットワークとしての働きについては理解が乏しく、またネットワークを改変することで、光合成を環境に対して再最適化することは、冒険的な研究課題であった。

### 2. 研究の目的

プロトン駆動力とルーメンの pH の間に存在するトレードオフを生育環境に対して最適化する装置の相互作用を明らかにし、その改変の影響を調べる。具体的な研究課題は、以下のものである。

- 1) プロトン駆動力の成分(プロトン濃度勾配と膜電位差)を調節する KEA3 の制御ネットワークに対する貢献を解明する。
- 2) サイクリック電子伝達が、特に変動光下で、光化学系を光傷害から護るメカニズムを解明する。
- 3) チラコイドルーメンの酸性化によるシトクロム  $b_6/f$  複合体での電子伝達のプレーキの生理機能を解明する。
- 4) ATP 合成酵素の活性制御が制御ネットワークに与える影響を解明する。
- 5)  $C_4$  光合成を可能にしたプロトン駆動力制御の再調整の分子機構を解明する。
- 6) シロイヌナズナを用いて、プロトン駆動力制御の改変を試み、電子伝達制御の再最適化が可能であることを示す。

### 3. 研究の方法

すでに手に入れている変異株、高発現株を解析に用いるが、積極的に多重変異体(組換え体)を作成し、相互効果を解析する。*dpgr* 変異株や *pgr1* 変異株など、アミノ酸置換による固有の表現型を示す変異株を活用する。電子伝達解析は、Dual-PAM を用いて行い、ECS 解析も併用することで、プロトンの動きをモニターする。

### 4. 研究成果

$CO_2$  フリー、低  $O_2$  大気中で、電子伝達の制御異常により、高いクロロフィル蛍光を発するシロイヌナズナ *dpgr* (*disturbed proton gradient regulation*) 変異株が、チラコイド膜局在の  $H^+/K^+$  アンチポーター-KEA3 の活性を抑制できない優性/顕性の異常を示すことを明らかにした(Wang et al., 2017; Tsuji et al., 2019)。KEA3 のノックアウト株との比較から、KEA3 がチラコイドルーメンの pH を調整することで、光合成を効率的に立ち上げるのに必要であることを明らかにした(Wang et al., 2017)。野生型と *dpgr* 型の KEA3 をシロイヌナズナで高発現させると、 $b_6/f$  複合体でのプレーキの掛かりが軽減されるが、PSI は変動光に対して感受性になることを示した(Wang and Shikanai, 2019)。

サイクリック電子伝達を触媒する NDH 複合体は、2 コピートの PSI 複合体と超複合体を形成する。リンカーとして働く、Lhca6 がそのストロマループを介して NDH 複合体と相互作用することを明らかにした(Otani et al., 2017)。また超複合体におけるリンカー(Lhca5 と Lhca6)の位置を明らかにした(Otani et al., 2018)。

NDH-PSI 超複合体のアセンブリに働く CRR3 と NDF5 の機能を明らかにした(Kato et al., 2018; Kato et al., 2021)。また NDF5 から、遺伝子重複を介して、複合体のサブユニットである PnsB2 が分子進化したことを明らかにした(Kato et al., 2021)。コケ植物では、Lhca5 に依存する超複合体形成のみが行われることを示した(Kato et al., 2018)。

もう一つのサイクリック電子伝達に関わる PGR5 について、一部の研究者から、ATPase のプロトンの漏れを抑制する機能が提唱されてきた。*pgr5* 変異株に、プロトンの漏れの異常がないことを明らかにした(Yamamoto and Shikanai, 2020)。また、半世紀以上前に Arnon が行ったチラコイド膜を用いた ATP 合成実験を *pgr5* 変異株を用いて再現し、同一の現象を見ていることを報告した(Wang et al., 2018)。弱いアレルである *pgr5-2* の解析を行い、サイクリック電子伝達の欠損を示した(Nakano et al., 2019)。以上の結果は、PGR5 が、サイクリック電子伝達に関わるという従前の結論を支持するものである。

PGR5 依存のサイクリック電子伝達が、変動光下で PSI を護るメカニズムを解明した(Yamamoto and Shikanai, 2019)。また、クラミドモナスの PTOX2 を導入したシロイヌナズナの解析から、PSI の酸化には、 $b_6/f$  複合体の活性抑制だけでは不十分であり、PGR5 が PSI の受容側

に溜まった電子をプラストキノンを動かす必要があることを提唱した (Zhou et al., 2022)。

NDH 複合体が、非常に大きなプロトン駆動力が生じた時には、逆反応によりそれを減少させ、チラコイドルーメンの pH を最適化していることを明らかにした (Basso et al., 2022)。

KEA3 の高発現により、*b<sub>6</sub>f* 複合体でのブレーキを軽減した植物で、Flv に依存した安全弁を導入し、PSI の光傷害の問題を解決した。この植物は、変動光下での気孔の開口が促進されることで、CO<sub>2</sub> 固定と植物の生育が上昇した (Basso et al., 2022)。この結果は、プロトン駆動力ネットワークの改変で、光合成の環境への再最適化が可能であることを示唆している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計21件（うち査読付論文 21件 / うち国際共著 7件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Basso Leonardo, Sakoda Kazuma, Kobayashi Ryouhei, Yamori Wataru, Shikanai Toshiharu	4. 巻 189
2. 論文標題 Flavodiiron proteins enhance the rate of CO <sub>2</sub> assimilation in Arabidopsis under fluctuating light intensity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 375 ~ 387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiac064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Zhou Qi, Wang Caijuan, Yamamoto Hiroshi, Shikanai Toshiharu	4. 巻 188
2. 論文標題 PTOX-dependent safety valve does not oxidize P700 during photosynthetic induction in the Arabidopsis <i>ptox5</i> mutant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1264 ~ 1276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiab541	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamamoto Hiroshi, Sato Nozomi, Shikanai Toshiharu	4. 巻 62
2. 論文標題 Critical Role of NdhA in the Incorporation of the Peripheral Arm into the Membrane-Embedded Part of the Chloroplast NADH Dehydrogenase-Like Complex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1131 ~ 1145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa143	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Higashi Haruka, Kato Yoshinobu, Fujita Tomoya, Iwasaki Shintaro, Nakamura Masayuki, Nishimura Yoshiki, Takenaka Mizuki, Shikanai Toshiharu	4. 巻 62
2. 論文標題 The Pentatricopeptide Repeat Protein PGR3 Is Required for the Translation of <i>petL</i> and <i>ndhG</i> by Binding Their 5' UTRs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1146 ~ 1155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa180	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Yoshinobu, Odahara Masaki, Shikanai Toshiharu	4. 巻 12
2. 論文標題 Evolution of an assembly factor-based subunit contributed to a novel NDH-PSI supercomplex formation in chloroplasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24065-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Basso Leonardo, Yamori Wataru, Szabo Ildiko, Shikanai Toshiharu	4. 巻 184
2. 論文標題 Collaboration between NDH and KEA3 Allows Maximally Efficient Photosynthesis after a Long Dark Adaptation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 2078 ~ 2090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.20.01069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Okegawa Yuki, Basso Leonardo, Shikanai Toshiharu, Motohashi Ken	4. 巻 184
2. 論文標題 Cyclic Electron Transport around PSI Contributes to Photosynthetic Induction with Thioredoxin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1291 ~ 1302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.20.00741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Hiroshi, Shikanai Toshiharu	4. 巻 184
2. 論文標題 Does the Arabidopsis <i>proton gradient regulation</i> Mutant Leak Protons from the Thylakoid Membrane?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 421 ~ 427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.20.00850	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wang Caijuan, Shikanai Toshiharu	4. 巻 181
2. 論文標題 Modification of Activity of the Thylakoid H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> Antiporter KEA3 Disturbs pH-Dependent Regulation of Photosynthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 762 ~ 773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.19.00766	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsuji Masaru, Kera Kota, Hamamoto Shin, Kuromori Takashi, Shikanai Toshiharu, Uozumi Nobuyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Evidence for potassium transport activity of Arabidopsis KEA1-KEA6	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46463-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishibashi Kota, Small Ian, Shikanai Toshiharu	4. 巻 60
2. 論文標題 Evolutionary Model of Plastidial RNA Editing in Angiosperms Presumed from Genome-Wide Analysis of <i>Amborella trichopoda</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 2141 ~ 2151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mermod Melanie, Takusagawa Mari, Kurata Teruyuki, Kamiya Takehiro, Fujiwara Toru, Shikanai Toshiharu	4. 巻 38
2. 論文標題 SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7 mediates copper deficiency response in the presence of high nitrogen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Cell Reports	6. 最初と最後の頁 835 ~ 846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00299-019-02422-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakano Hiroshi, Yamamoto Hiroshi, Shikanai Toshiharu	4. 巻 1860
2. 論文標題 Contribution of NDH-dependent cyclic electron transport around photosystem I to the generation of proton motive force in the weak mutant allele of pgr5	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 369 ~ 374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2019.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Araki Ryoichi, Mermod Melanie, Yamasaki Hiroaki, Kamiya Takehiro, Fujiwara Toru, Shikanai Toshiharu	4. 巻 224-225
2. 論文標題 SPL7 locally regulates copper-homeostasis-related genes in Arabidopsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 137 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jplph.2018.03.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wang Caijuan, Takahashi Hiroko, Shikanai Toshiharu	4. 巻 1859
2. 論文標題 PROTON GRADIENT REGULATION 5 contributes to ferredoxin-dependent cyclic phosphorylation in ruptured chloroplasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 1173 ~ 1179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2018.07.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Yoshinobu, Odahara Masaki, Fukao Yoichiro, Shikanai Toshiharu	4. 巻 96
2. 論文標題 Stepwise evolution of supercomplex formation with photosystem I is required for stabilization of chloroplast NADH dehydrogenase-like complex: Lhca5-dependent supercomplex formation in Physcomitrella patens	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 937 ~ 948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Hiroshi, Shikanai Toshiharu	4. 巻 179
2. 論文標題 PGR5-Dependent Cyclic Electron Flow Protects Photosystem I under Fluctuating Light at Donor and Acceptor Sides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 588 ~ 600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.18.01343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Yoshinobu, Sugimoto Kazuhiko, Shikanai Toshiharu	4. 巻 176
2. 論文標題 NDH-PSI Supercomplex Assembly Precedes Full Assembly of the NDH Complex in Chloroplast	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1728 ~ 1738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.17.01120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Otani Takuto, Kato Yoshinobu, Shikanai Toshiharu	4. 巻 94
2. 論文標題 Specific substitutions of light-harvesting complex I proteins associated with photosystem I are required for supercomplex formation with chloroplast NADH dehydrogenase-like complex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 122 ~ 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.13846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wang Caijuan, Yamamoto Hiroshi, Narumiya Fumika, Munekage Yuri Nakajima, Finazzi Giovanni, Szabo Ildiko, Shikanai Toshiharu	4. 巻 89
2. 論文標題 Fine-tuned regulation of the K+/H+antiporter KEA3 is required to optimize photosynthesis during induction	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Journal	6. 最初と最後の頁 540 ~ 553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.13405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する



1. 著者名 Otani Takuto, Yamamoto Hiroshi, Shikanai Toshiharu	4. 巻 58
2. 論文標題 Stromal Loop of Lhca6 is Responsible for the Linker Function Required for the NDH?PSI Supercomplex Formation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 851 ~ 861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcx009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計12件 (うち招待講演 12件 / うち国際学会 12件)

1. 発表者名 Toshiharu Shikanai
2. 発表標題 Regulatory network of proton motive force in chloroplasts
3. 学会等名 The International Conference on Arabidopsis Research 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiharu Shikanai
2. 発表標題 The chloroplast NDH complex: Evolution of assembly and super complex formation with PSI
3. 学会等名 1st Japan-US Binational Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiharu Shikanai
2. 発表標題 Structure and assembly of the chloroplast NDH-PSI supercomplex
3. 学会等名 The International Conference on Arabidopsis Research 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tohsiharu Shikanai
2. 発表標題 Structure, assembly and physiological function of the chloroplast NDH-PSI supercompl
3. 学会等名 1st Asia-Oceania International Congress on Photosynthesis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tohsiharu Shikanai
2. 発表標題 Machinery and function of pmf regulation
3. 学会等名 Finish-Japanese Symposium, Kobe (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tohsiharu Shikanai
2. 発表標題 Machinery for the regulation of proton motive force in chloroplasts
3. 学会等名 Chloroplast Metabolism and Photosynthesis Meeting, Neuchatel (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tohsiharu Shikanai
2. 発表標題 Regulation of proton motive force by alternative electron transport
3. 学会等名 SEB GOTHEBURG 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tohsiharu Shikanai
2. 発表標題 Regulation of photosynthesis via proton motive force
3. 学会等名 IBC2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tohsiharu Shikanai
2. 発表標題 Molecular mechanisms for optimizing photosynthesis under fluctuating light
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tohsiharu Shikanai
2. 発表標題 Regulation of photosynthetic electron transport via proton motive force
3. 学会等名 8th Asia and Oceania Conference on Photobiology 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toshiharu Shikanai
2. 発表標題 Regulation of proton motive force in photosynthesis
3. 学会等名 17th International Congress on Photosynthesis Research, Maastricht, Netherland (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ryo Yokoyama, Toshiharu Shikanai
2. 発表標題 Thylakoid membrane structure and PSII dynamics
3. 学会等名 Finish-Japanese Symposium 2016, Finland (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

国際研究集会 第3回国際ワークショップ (Himadri Pakrasi 博士)	開催年 2018年 ~ 2018年
---	----------------------

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------