

平成30年6月18日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04384

研究課題名(和文) 光合成生物のレドックスネットワークを支える還元力の分配ルールの解明

研究課題名(英文) Analysis of the redox equivalent distribution for the redox network of photosynthetic organisms

研究代表者

久堀 徹 (Hisabori, Toru)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授

研究者番号：40181094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：光合成の制御に特に重要な要素である「還元力の分配機構」を理解するために、光合成生物のレドックス応答タンパク質の動態のリアルタイムの解析、光合成生物の細胞内レドックス動態のリアルタイム解析、レドックス関連小分子の動態解析、チオレドキシンのレドックスに応じた動態のリアルタイム解析、植物細胞内の酸素濃度測定系の開発、の5項目について研究を実施した。その結果、葉緑体のレドックス制御の鍵タンパク質であるチオレドキシンの特異性とNTRCタンパク質のレドックス制御因子としての重要性の解明、細胞内におけるグルタチオンの制御因子としての機能の解明、新規酸素センサータンパク質の開発などの成果を上げた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the significance of the redox regulation system in chloroplast, which governs the photosynthetic function, by using the biochemical and physiological analysis methods. Consequently, we revealed the specificity of chloroplast thioredoxin proteins, which are the key proteins for redox regulation, and the significance of NTRC. In addition, we succeeded the development of the new oxygen sensor protein, which is applicable to detect intracellular oxygen gas in vivo.

研究分野：植物生化学、生体エネルギー変換

キーワード：レドックス制御可視化 チオレドキシン 酸素 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

光合成の電子伝達装置は、水の酸化によって還元力(NADPH)を得ると同時に、分子状酸素を発生し、さらに電子伝達と共役してATPを生産している。NADPHとATPは炭酸同化反応に用いられるが、環境の変動によって還元力の需給バランスが崩れれば、余剰の還元力が酸素と反応して活性酸素種(ROS)が生成し、結果的にこれが生体内の重要な分子装置を破壊するなど、光合成生物は深刻な危険に曝されると考えられる。

このような事態を避けるために、光合成生物は還元力と酸化力の生成に関する精緻な制御機構と、酸化力に対する堅固な防御機構を備えている。細胞内の酸素濃度とレドックスバランスは密接な関係にあると考えられるが、意外にも細胞内の酸素濃度が直接測定された例はこれまで皆無であった。さらに、光合成条件下での細胞内レドックス状態の変化や、個々のレドックス応答タンパク質の動態も、最近になってようやく研究が始まったところである。

細胞内のレドックスを管理するシステムの中樞を担っているのは、チオレドキシ(Trx)を中心とするレドックスネットワークである。Trxは分子内にジスルフィド結合を形成可能なひと組のシステインペアを持つタンパク質である。植物の葉緑体のTrxが炭酸同化系の酵素のレドックス調節を行うことは、1980年代から知られていた。しかし、Trxの細胞内での役割に関する情報はこれまで限定的であった。また、炭酸同化に用いられる還元力と、上記の調節に用いられる還元力のバランスに関するデータは、これまで皆無である。

我々は、2001年に生体内のTrx標的タンパク質を網羅的に解析する方法を開発した。以来、多くの研究者により葉緑体、多くの光合成生物や種々のオルガネラ、大腸菌等でTrxと相互作用するタンパク質の網羅的な解析が進められ、生体内でレドックス関連タンパク質がTrxを中心として大きなネットワークを形成していることが明らかになって、先述したレドックスネットワークという新たな概念が生まれた。しかし、光合成条件下でのレドックス応答タンパク質やレドックスネットワークの動態は未解明のままであった。

2. 研究の目的

上記のような背景の下、本研究では、生体内のレドックス動態の視点から光合成機能の制御機構に着目し、酸素発生型光合成生物が様々な環境条件に対応するために、どのような仕組みを使って生体内の電子の流れを調節し、光合成機能を調節しているのかを分子レベルで明らかにすることを目指した。そのために、(1)光合成生物のレドックス応答タンパク質の動態のリアルタイム解析、(2)光合成生物の細胞内のレドックス動態のリアルタイム解析、(3)光合成生物細胞内のレドックス

関連小分子の動態の解析、(4)レドックス制御に中心的な役割を果たすTrxの細胞内動態のリアルタイム解析、および、(5)植物細胞内あるいはオルガネラ内の酸素濃度の測定系の開発を行った。

3. 研究の方法

(1) 光合成生物のレドックス応答タンパク質の動態のリアルタイム解析

本研究項目では、レドックスネットワークを構成するフェレドキシン-Trx還元酵素(FTR)複数のTrxアイソフォーム、および、その関連タンパク質について、それぞれの組換え体蛋白質を得て、試験管内で直接還元力の受け渡しを再現し、反応速度論解析を行うことによって、還元力伝達経路の実体を明らかにすることを目指した。

(2) 光合成生物の細胞内のレドックス動態のリアルタイム解析

本研究項目では、蛍光タンパク質GFPをベースとして、酸化還元応答機能を付与した誘導体タンパク質を作成し、これを光合成生物の細胞内に導入して、光環境条件変化などに応じた細胞内レドックス環境の変化を直接モニターすることを目指した。

(3) 光合成生物細胞内のレドックス関連小分子の動態の解析

本研究項目では、グルタチオンなどレドックス関連小分子の動態と酵素の機能調節など、その機能に着目して研究を実施した。実験系を単純化するため、動物細胞も利用した実験を行った。

(4) レドックス制御に中心的な役割を果たすTrxの細胞内動態のリアルタイム解析

本研究項目では、葉緑体内が光学顕微鏡で直接観察可能になるほどの巨大葉緑体を調製することの出来るヒメツリガネゴケ原系体を利用し、ヒメツリガネゴケのTrxに蛍光タンパク質GFPを融合させた蛍光Trxを原系体に導入した。この形質転換コケの原系体内を直接共焦点レーザー顕微鏡で観察し、Trxの葉緑体内動態のリアルタイム可視化を試みた。

(5) 植物細胞内あるいはオルガネラ内の酸素濃度の測定系の開発

本研究項目では、細胞内あるいは葉緑体内に直接発現させて、局所の酸素濃度に応じた蛍光シグナルの変化を示す新規酸素センサータンパク質を開発し、光合成条件下での光合成生物の局所の酸素濃度の測定を目指した。

そして、これらから得られた知見と統合して、生体内における還元力分配のルールの解明に迫った。

4. 研究成果

(1)では、葉緑体 Trx アイソフォームの還元経路、および、Trx から下流への電子伝達経路の速度論的な解析を行った。葉緑体 Trx のアイソフォームについては、標的酵素の特異性、および、同一の酵素でも複数のシステインペアの標的特異性の存在を明らかにした（発表論文）。また、緑色植物ミトコンドリアのレドックスタンパク質であるリンゴ酸脱水素酵素の活性制御の分子機構を解明した（発表論文）。シロイヌナズナ葉緑体に発現している NTRC(NADPH-Trx 還元酵素ドメインと Trx ドメインからなるハイブリッド酵素)が従来知られていた FTR - Trx 還元力伝達経路とは独立に還元力伝達の経路を構成していること、この経路が最終的に還元力を供給する相手タンパク質が FTR-Trx 経路とは異なること、両者は補完的に葉緑体内のレドックス制御ネットワークを構成していることを明らかにした（発表論文）(図1)。

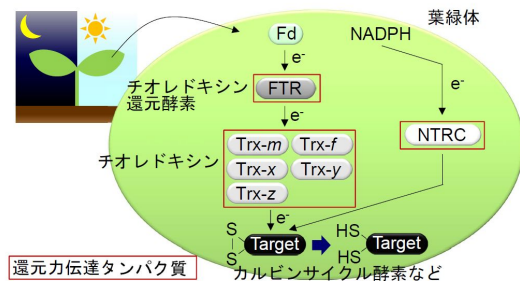


図1 葉緑体の NTRC を介した還元力伝達経路

また、FTR から Trx アイソフォームへの還元力伝達の速度論的な解析により、FTR の特異性を解明した（発表論文）。

さらに、糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC7120 を材料として NTRC の生理機能を調べ、この酵素が抗酸化ストレスシステムとして重要な機能を持っており、細胞内では 2-Cys ペルオキシレドキシニンに特異的に還元

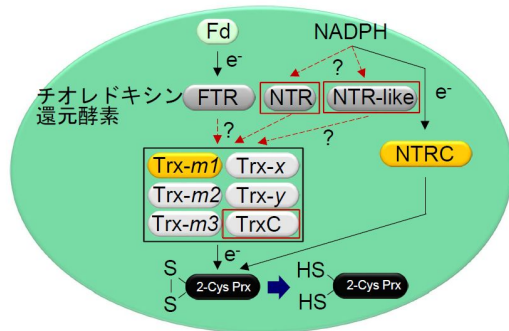


図2 . *Anabaena* の NTRC を介した還元力伝達経路

力を伝達することを明らかにした（発表論文）(図2)。

(2)では、新規に還元によって蛍光が消光する酸化還元応答蛍光タンパク質、および、酸化還元状態に応じて蛍光スペクトルが変化し見かけの色が変わる蛍光タンパク質の開発

に成功した（学会発表済、論文準備中）。さらに、二種類の蛍光タンパク質をチオレドキシニンが標的とするジスルフィド結合を有する紐状のタンパク質で接続することにより、酸化還元に応じて構造変化し FRET 効率を変化させる新規のレドックス応答タンパク質を開発した。このタンパク質が有するジスルフィド結合は、f 型および m 型のチオレドキシニンに対して還元の特異性を有するため、これらのチオレドキシニンアイソフォームの細胞内動態を蛍光変化によって調べることが可能になった（学会発表済、論文準備中）。

(3)では、細胞内動態の検出がより簡便な動物細胞の実験系を実施例として、グルタチオンに着目し、酸化修飾を受けた酵素の再還元に働くシステムの存在を確認した。そして、酸化修飾を受けた 6-Pyruvoyl-tetrahydropterin synthase (PTPS)が、生理的濃度の還元型グルタチオンによって還元されることを明らかにした。培養細胞を酸化ストレス条件下で培養すると PTPS の酸化修飾が促進すること、酸化ストレスを除くことで還元されることを明らかにした。

(4)については、ヒメツリガネゴケを材料として、この植物の f 型および m 型のチオレドキシニンの遺伝子に緑色蛍光タンパク質 GFP、および、(2)で開発した様々な誘導体タンパク質を標識として接続した形質転換プラスミドを作成し、名古屋大学遺伝子実験施設の杉田護教授の協力を得て、これらのタンパク質を葉緑体内で発現するヒメツリガネゴケの形質転換体を得た。アンピシリン存在下で生育させると、ヒメツリガネゴケ原系体内では葉緑体の分裂が起こらず、細胞内に巨大な葉緑体が観察される。これを利用して、葉緑体内におけるチオレドキシニン動態を蛍光の変化として直接観察する実験系の構築を目指した。しかし、共焦点レーザー顕微鏡で輝点を捉えるのに十分な発光強度を示す形質転換植物が得られないため、明暗条件下でのチオレドキシニン動態の直接観察には成功していない。

(5)植物細胞内の酸素濃度測定系の新規開発については、最近の持っているヘムタンパク質と GFP を特殊なリンカーで接続することにより、ヘムの酸素結合による吸収スペクトルの変化を利用して隣接する蛍光タンパク質の蛍光を吸収する新規酸素センサータンパク質の開発に成功した。リンカー部分の配列を最適化することによって、最終的には酸素の有無によって蛍光強度比が 2 倍以上変化する高感度なセンサータンパク質を開発した（特許申請中、論文投稿中）。

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 8 件)
(全て査読有り)

Yoshida K, Hara S, Hisabori T.
Thioredoxin Selectivity for Thiol-based Redox
Regulation of Target Proteins in Chloroplasts.
J Biol Chem. 2015 Jun 5;290(23):14278-88. doi:
10.1074/jbc.M115.647545.

Yoshida K, Hisabori T.
Adenine nucleotide-dependent and
redox-independent control of mitochondrial
malate dehydrogenase activity in Arabidopsis
thaliana.
Biochim Biophys Acta. 2016 Jun;1857(6):810-8.
doi: 10.1016/j.bbabi.2016.03.001.

Yoshida K, Hisabori T.
Two distinct redox cascades cooperatively
regulate chloroplast functions and sustain plant
viability.
Proc Natl Acad Sci USA. 2016 Jul 5;113(27):
3967-76. doi: 10.1073/pnas.1604101113

Mihara S, Yoshida K, Higo A, Hisabori T.
Functional Significance of NADPH-Thioredoxin
Reductase C in the Antioxidant Defense System
of Cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120.
Plant Cell Physiol. 2017 Jan 1;58(1):86-94. doi:
10.1093/pcp/pcw182.

Yoshida K, Hisabori T.
Distinct electron transfer from
ferredoxin-thioredoxin reductase to multiple
thioredoxin isoforms in chloroplasts.
Biochem J. 2017 Apr 4;474(8):1347-1360. doi:
10.1042/BCJ20161089.

〔学会発表〕(計 29 件)

(1) 吉田啓亮、久堀徹
FTR/Trx 経路と NTRC 経路は協調的に葉緑体
機能のレドックス制御および植物の生育を
支えている
第 6 回日本光合成学会年会およびシンポジウ
ム (2015) 岡山国際交流センター、岡山

(2) Toru Hisabori
New techniques to visualize the redox status in
cells and proteins
12th International Conference on Reactive
Oxygen and Nitrogen Species in Plants: from
model systems to field (2015) Verona, Italy

(3) 吉田啓亮、久堀徹
ミトコンドリア TCA サイクル酵素のレドッ
クスとアデニレート状態に応じた新奇活性
調節メカニズム
日本植物学会第 79 回大会(2015) 朱鷺メッセ、
新潟

(4) 西牧優太、杉浦一徳、久堀徹、若林恵一
新規レドックス感受性蛍光タンパク質 Oba-Q
を用いたクラミドモナス鞭毛内レドックス
状態の測定
第 53 回日本製物物理学会年会 (2015) 金沢
大、金沢

(5) Toru Hisabori
Significance of the redox regulation networks in
photosynthetic organisms
Yamada Conference: International Symposium
on Dynamics and Regulation of Photosynthesis
(2015) 奈良春日野国際フォーラム、奈良

(6) 立中佑希、大内雄也、原怜、久堀徹、佐々
本一美
新規タンパク質チオール解析用試薬 PEG
PCMal の開発
第 89 回日本生化学会大会 (2016) 神戸

(7) 原怜、安岡達矢、一瀬宏
ピルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素
の酸化還元制御機構の解明
第 89 回日本生化学会大会 (2016) 神戸

(8) 吉田啓亮、久堀徹
葉緑体レドックスネットワークにおける還
元力伝達の複雑さ: シロイヌナズナ FTR ヘテ
ロ二量体は 10 種類の Trx を異なる効率で還元
する
第 57 回日本植物生理学会年会 (2016) 岩手
大、盛岡

(9) 吉田啓亮、久堀徹
葉緑体の機能調節および植物の生育を虚長
的に支える 2 つの還元力カスケード
日本植物学会第 80 回大会 (2016) 沖縄

(10) 近藤 (小山内) 久益子、砂村英一郎、円
由香、井須敦子、深谷佑紀、久堀徹
シアノバクテリア *Thermosynechococcus*
elongatus BP-1 の F1-ATPase の サブユニ
ットによる活性制御機構の解析
日本植物学会第 80 回大会 (2016) 沖縄

(11) 吉田啓亮、久堀徹
葉緑体機能を統御するレドックス制御ネッ
トワークの解析
日本生体エネルギー研究会第 42 回討論会
(2016) 名古屋工大、名古屋

(12) 横地佑一、野亦次郎、久堀徹
嫌気実験系を用いた緑葉内のチオレドキン
標的タンパク質の探索
第 58 回日本植物生理学会年会 (2017) 鹿
児島大、鹿児島

(13) 見原翔子、若尾瞳、杉浦一徳、肥後明佳、
吉田啓亮、久堀徹
窒素固定型シアノバクテリア *Anabaena* sp.

PCC 7120 の G6PDH の OpcA を介したレドックス制御
第 58 回日本植物生理学会年会 (2017) 鹿児島大、鹿児島

(14) 吉田啓亮
葉緑体を統御するレドックス制御ネットワーク
第 8 回日本光合成学会シンポジウム (2017) 龍谷大、滋賀

(15) 久堀 徹、見原 翔子、Frederic Deschoenmaeker、丹羽達也、田口英樹
Anabaena sp. PCC 7120 のチオレドキシソニとレドックス制御
藍藻の分子生物学 2017 (2017) かずさアーク、千葉

(16) 吉田啓亮、久堀徹
葉緑体レドックス制御のボトルネック
日本植物学会第 81 回大会 (2017) 東京理科大、野田

(17) 西山真穂、吉田啓亮、若林憲一、久堀徹
植物ミトコンドリアのスクシニル CoA リガーゼの基質特異性とレドックス制御
日本植物学会第 81 回大会 (2017) 東京理科大、野田

(18) 見原翔子、吉田啓亮、若林憲一、久堀徹
Anabaena sp. PCC7120 のチオレドキシソニ還元酵素およびチオレドキシソニの機能解析
第 59 回日本植物生理学会年会 (2018) 札幌コンベンションセンター、札幌

(19) 杉浦一徳、横地佑一、久堀徹
チオレドキシソニセンサータンパク質 THIS
第 59 回日本植物生理学会年会 (2018) 札幌コンベンションセンター、札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

(1) 名称：細胞内の酸化還元状態をモニターするための蛍光タンパク質、DNA、ベクター、形質転換体、及び方法、並びに抗癌剤のスクリーニング方法
発明者：久堀徹、杉浦一徳
権利者：東京工業大学
種類：特許
番号：2016-156963
出願年月日：2016 年 8 月 9 日
国内外の別：国内

(2) 名称：細胞内の酸素濃度の変化をモニタ

ーするための融合タンパク質
発明者：久堀徹、野亦次郎
権利者：東京工業大学
種類：特許
番号：2017-040778
出願年月日：2017 年 3 月 3 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所 久堀・若林研究室
http://www.res.titech.ac.jp/~junkan/Hisabori_HomePage/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者
久堀 徹 (HISABORI TORU)
東京工業大学・科学技術創成研究院・教授
研究者番号：40181094

(2)研究分担者
原 怜 (HARA SATOSHI)
東京工業大学・生命理工学院・助教
研究者番号：70624815