

令和元年5月16日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07409

研究課題名(和文) 葉緑体活性酸素種消去システムにおけるペルオキシレドキシンの役割

研究課題名(英文) Physiological function of peroxyredoxins in chloroplast ROS-scavenging system

研究代表者

本橋 健 (MOTOHASHI, Takeshi)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：90301952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体は、光合成による酸素発生に伴い、多くの活性酸素種(ROS)を生成する。そのため、葉緑体は抗酸化ストレスシステムとして、アスコルビン酸ペルオキシダーゼをはじめとして、複数のROS消去システムを備えている。複数のROS消去システムのうち、ペルオキシレドキシリンという一連のペルオキシダーゼが、葉緑体で機能していることがわかってきた。しかし、葉緑体ROS消去システムにおけるペルオキシレドキシリンの生理的な役割は、明らかでない。本研究は、葉緑体ROS消去システムのうちペルオキシレドキシリンについて、その機能欠失体を作成し機能欠失が植物体に与える影響を調べ、葉緑体ROS消去系に対する寄与を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペルオキシレドキシリンのROS消去系に対する生理的な寄与が明らかになれば、葉緑体ROS消去メカニズムで重要な役割を担うシステムが判明し、葉緑体ROS消去系に関する理解が進む。また、陸上植物の葉緑体における抗酸化システムについて、生理的意義の理解を深めることができる。これらのことが明らかになることで、植物の機能改良に向けた技術開発のための基礎的知見となるはずである。

研究成果の概要(英文)：Plants produce abundant oxygen and Reactive Oxygen Species (ROS) by photosynthesis. To protect themselves from oxidative stress, several ROS-scavenging system are identified in chloroplast of plants. Recently, several works indicate that peroxyredoxin-family proteins function in ROS-scavenging system of chloroplast. In this study, we evaluated physiological impacts for peroxyredoxins in ROS-scavenging system of chloroplast.

研究分野：植物生理学

キーワード：活性酸素 葉緑体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

陸上植物では、光合成による酸素発生に伴い、葉緑体は多くの活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) を生成する。そのため、抗酸化ストレスシステムとして、葉緑体は様々な ROS 消去システムを備えている。

代表的な抗酸化システムに、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) が古くから知られているが、葉緑体 APX を完全に欠失した植物でも、不思議なことに ROS 消去系は大きな影響を受けずに生育することができる (Plant Mol Biol. (2007))。これに対して、この 10 年ほどの間に、ペルオキシレドキシシン (Prx) と呼ばれる一連のペルオキシダーゼも葉緑体で様々な種類が存在し、ROS 消去システムに機能していることが分かってきた。モデル植物のシロイヌナズナ葉緑体では、3 グループ 4 種類の Prx が確認されている。

葉緑体が複数の抗酸化ストレスシステムを持つことからわかるように、ROS 消去は、植物の葉緑体にとって非常に重要である。しかし、複数の ROS 消去系のうち、APX は古くから研究が行われてきているのに対し、Prx が葉緑体の抗酸化ストレスシステムにどれほど寄与するかは明らかになっていない。Prx の ROS 消去系に対する生理学的な意義を調べるためには、Prx の欠失植物体を用いた機能解析を行うのが常法である。しかし、これまでのところ、複数ある Prx の個々の変異体は、ROS 消去系に対して明らかな表現型を示さず、葉緑体のペルオキシレドキシシンシステムがどの程度、葉緑体の抗酸化システムに寄与するかは評価できない状況にある。

2. 研究の目的

葉緑体は、光合成による酸素発生に伴い、多くの活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) を生成する。そのため、葉緑体は抗酸化ストレスシステムとして、アスコルビン酸ペルオキシダーゼをはじめとして、複数の ROS 消去システムを備えている。複数の ROS 消去システムのうち、この 10 年間でペルオキシレドキシシンという一連のペルオキシダーゼが、葉緑体で機能していることがわかってきた。しかし、葉緑体 ROS 消去システムにおけるペルオキシレドキシシンの生理的な役割は、明らかになっていない。

本研究は、葉緑体 ROS 消去システムのうち、ペルオキシレドキシシンについて、その機能欠失が植物体に与える影響を調べることで、葉緑体 ROS 消去系に対する寄与を明らかにする。

3. 研究の方法

シロイヌナズナ変異体表現型の解析

これまでにシロイヌナズナ葉緑体のペルオキシレドキシシン (Prx) は、一次配列の異なる 3 グループ 4 種類あることが分かっている (表 1)。これらの Prx の ROS 消去システムに対する寄与を解析するには、個々の遺伝子欠失植物体を用いた T-DNA 挿入変異株などを用いて単離し、解析するのが常法である。しかし、これら個々の遺伝子欠失体は、「強光耐性の低下」などの ROS 消去システムが欠損したときに予想される表現型を示さない。そのため、これらの Prx は一部に機能重複があると考えられている。また、Prx の ROS 消去反応に必要な電子はすべて Trx から供給されることもわかっている (Collin et al. JBC(2003))。そこで本研究では、葉緑体の 4 つの Prx すべてに対して、ROS 消去に必要な電子供給を断つことができる実験系を構築するため、Trx 変異体を用いた。葉緑体 Trx は、葉緑体のレドックス制御で機能する f 型、m 型以外に x 型、y 型、z 型のサブファミリーが存在し (図 2)、このうち、x 型と y 型が ROS 消去システムである Prx へ電子を供給すると考えられる。そこで、x 型 Trx、y 型 Trx の T-DNA 変異体を用いることで、葉緑体 Prx へ電子供給を遮断することにした。シロイヌナズナでは、x 型は 1 種、y 型は 2 種のサブファミリーから成り立っており、x、y 型の一重

表 1 葉緑体のペルオキシレドキシシンファミリー

type	isoform
PrxQ type	PrxQ
2-Cys type	PrxA, PrxB
atypical 2-Cys type	PrxIIIE

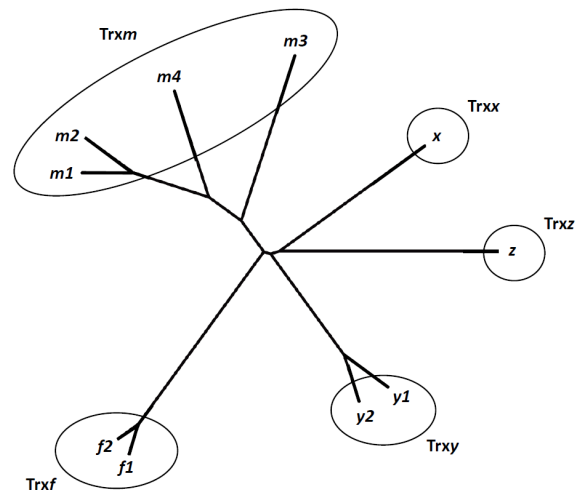


図 2 *Arabidopsis* 葉緑体 Trx-family の分子系統樹

変異体を取得する。

4. 研究成果

葉緑体 ROS 消去システムのうち、ペルオキシレドキシンについて、その機能欠失体を作成し、その欠失が植物体に与える影響を調べることで、葉緑体 ROS 消去系に対する寄与を評価した。現在のところ、各ペルオキシレドキシン変異体の表現型を解析した。また、各欠失体について、活性酸素種の蓄積を検討した。これに加えて、電子供給側のチオレドキシン変異体についても各種欠失株の整備を進めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Ken Motohashi*

"A novel series of high-efficiency vectors for TA cloning and blunt-end cloning of PCR products"

Sci. Rep. 9, 6417 (2019)

査読あり

2. Hokuto Nakayama, Tomoaki Sakamoto, Yuki Okegawa, Kaori Kaminoyama, Manabu Fujie, Yasunori Ichihashi, Tetsuya Kurata, Ken Motohashi, Ihsan Al-Shehbaz, Neelima Sinha and Seisuke Kimura*

"Comparative transcriptomics with self-organizing map reveals cryptic photosynthetic differences between two accessions of North American Lakecress"

Sci. Rep. 8, 3302 (2018)

査読あり

3. Ken Motohashi*

"Evaluation of the efficiency and utility of recombinant enzyme-free seamless DNA cloning methods"

Biochem. Biophys. Rep. 9, 310-315 (2017)

査読あり

4. Ken Motohashi*

"Seamless ligation cloning extract (SLiCE) method using cell lysates from laboratory Escherichia coli strains and its application to SLiP site-directed mutagenesis"

Methods Mol. Biol. 1498, 349-357 (2017)

査読あり

5. Yuki Okegawa and Ken Motohashi*

"Expression of spinach ferredoxin-thioredoxin reductase using tandem T7 promoters and application of the purified protein for in vitro light-dependent thioredoxin-reduction system"

Protein Expr. Purif. 121, 46-51 (2016)

査読あり

6. Yuki Okegawa, Masanori Koshino, Teruya Okushima and Ken Motohashi*

"Application of preparative disk gel electrophoresis for antigen purification from inclusion bodies"

Protein Expr. Purif. 118, 77-82 (2016)

査読あり

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 桶川友季、本橋健

m 型チオレドキシンは光化学系 I サイクリック電子伝達を負に制御する
第 60 回日本植物生理学会年会

2019.3.13-15

名古屋市、名古屋大学(口頭発表)

2. Yuki Okegawa, Ken Motohashi

Regulation of cyclic electron transport around Photosystem I by thioredoxin

International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis 2018
7-10 November 2018
岡山県倉敷市(ポスター発表)

3. Yuki Okegawa, Ken Motohashi
Roles of thioredoxin-dependent redox regulation in photosynthesis
Japan-Finland Seminar 2018
23-28 September 2018
兵庫県神戸市(ポスター発表)

4. 桶川友季、本橋健
チオレドキシンによる光化学系Ⅰサイクリック電子伝達の制御メカニズム解析
第9回日本光合成学会年会およびシンポジウム
2018.5.26-27
仙台市、東北大学青葉山新キャンパス青葉山commons(ポスター発表)

5. 天野瑠美、中山北斗、桃井理沙、群司玄、竹林裕美子、桶川友季、本橋健、笠原博幸、Ferjani Ali、木村成介
Exploration of genes regulating vegetative propagation in *Rorippa aquatica*
第59回日本植物生理学会年会
2018.3.28-30
札幌市、札幌コンベンションセンター(ポスター発表)

6. 桶川友季、本橋健
チオレドキシンによる光化学系Ⅰサイクリック電子伝達制御機構の解析
第59回日本植物生理学会年会
2018.3.27-30
札幌市、札幌コンベンションセンター(口頭発表)

7. 本橋健
SLiCEをはじめとする精製酵素を用いないシームレスDNAクローニング法の評価
第90回日本生化学会大会
2017.12-6-9
神戸市、神戸ポートアイランド(ポスター発表)

8. 桶川友季、本橋健
Analysis of overexpressor of chloroplastic thioredoxins in *Arabidopsis thaliana*
第58回日本植物生理学会年会
2017.3.16-18
鹿児島市、鹿児島大学(ポスター発表)

9. 本橋健
Evaluation of the efficiency and utility of recombinant enzyme-free seamless DNA cloning methods.
第58回日本植物生理学会年会
2017.3.16-18
鹿児島市、鹿児島大学(ポスター発表)

10. 本橋健
レドックス制御～光に応答して植物の代謝を制御する仕組み
関西学院大学セミナー
2016.11.18
三田市、関西学院大学(招待講演)

11. Ken Motohashi, Yuki Okegawa
Thioredoxin-dependent redox regulatory system in chloroplasts
The 17th International Congress on Photosynthesis Research(国際光合成会議)
2016.8.7-12
オランダ; マーストリヒト, MECC Maastricht(招待講演)

12. Yuki OKEGAWA, Ken MOTOHASHI
Arabidopsis m-type thioredoxin regulates the Calvin cycle enzymes in vivo.
The 17th International Congress on Photosynthesis Research(国際光合成会議)

2016.8.7-12

オランダ；マーストリヒト，MECC Maastricht(ポスター発表)

〔図書〕(計 0 件)

〔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)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。