

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580073

研究課題名（和文） 葉緑体型アルドラーゼのグルタチオンによる制御の分子機構と  
その生理的意義研究課題名（英文） Molecular mechanism and physiological function of  
glutathione-dependent regulation of plastidic aldolase

研究代表者

小川 健一（OGAWA KEN' ICHI）

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

研究者番号：70344405

研究成果の概要（和文）：

グルタチオンは植物の様々な生理現象を制御する。グルタチオンによる生理現象の制御機構を明らかにすべく、そのグルタチオンの結合タンパク質のひとつである葉緑体型アルドラーゼに注目し解析を行った。フルクトース-1, 6-ビスリン酸アルドラーゼ（FBA）の葉緑体型アイソザイム遺伝子は、シロイヌナズナのゲノム上には3つ存在したが、本研究で対象としたグルタチオン結合型アイソザイム FBA1 は、葉の葉緑体型アイソザイムタンパク質の2%程度しか存在せず、従来からカルビン回路酵素として知られてきたアイソザイム FBA2 および FBA3 とは、分子系統上離れていた。しかしながら、フルクトース-1, 6-ビスリン酸を合成する活性がグルタチオンで向上する FBA アイソザイムは、FBA1 だけであり、あり、その変異体は光に対する感受性が高まることが明らかとなった。つまり、本研究によって、従来カルビン回路の酵素とされたアイソザイム以外に、CO<sub>2</sub> 固定回路の重要なアイソザイムが見出された。

研究成果の概要（英文）：

Glutathione regulates various aspects of physiological events in plants. In order to understand the mechanism underlying the glutathione-dependent physiological events, we focused on a plastidic aldolase, one of proteins undergoing glutathionylation. There were three genes encoding plastidic fructose-1,6-bisphosphate aldolase in the Arabidopsis genome. The glutathione-binding isozyme FBA1 was quantitatively minor (2% of the total plastid FBA proteins in the leaf) and categorized into a phylogenetic branch different from that containing the other two isozymes FBA2 and FBA3, which were conventionally considered to be involved in the Calvin cycle. However, only FBA1 activity was upregulated by glutathione and the decrease in FBA1 increased the sensitivity against light. Taken together, the Calvin cycle involves new isozyme.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成20年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：植物栄養学・土壌学

科研費の分科・細目：植物成長・生理

キーワード：アルドラーゼ、暗反応、グルタチオン、光合成、収穫量向上、二酸化炭素固定、バイオマス増産、レドックス

## 1. 研究開始当初の背景

活性酸素は一般的には毒として認識されているが、適度な濃度の活性酸素処理は植物の成長を改善できることを研究代表者らは研究開始時までに明らかにした。さらに、そのメカニズムには抗酸化物質として知られるグルタチオン (GSH) が関わることを明らかにした。

GSH はチオール基を有する抗酸化トリペプチドであり、いくつかの嫌気生物の例外を除いて、生物界に広く存在する。植物の場合、GSH は細胞に (特に葉緑体に) 多量に存在し、アスコルビン酸-GSH 回路による過酸化水素の消去やペルオキシダーゼ反応による過酸化脂質の消去、GSH-S<sup>-</sup>トランスフェラーゼ (GST) による異物の解毒などに機能する。こうした酸化還元 (レドックス) 緩衝作用のため、GSH は生体構成成分の不可逆的な酸化損傷を防止していると信じられていた。一方、特定のタンパク質のジスルフィド結合を還元するチオレドキシシン (Trx) ファミリータンパク質は、その還元過程を通じて、標的タンパク質の機能を制御することが知られていた。GSH は、Trx と同様に、タンパク質のジスルフィド結合を還元できるが、Trx に比べ還元活性や標的タンパク質の特異性が低いこと、および細胞に多量に存在することなどのことから、細胞内のタンパク質機能のレドックス制御においては重要視されず、もっぱら Trx が中心的な役者として注目されてきたのが現状であった。しかしながら、タンパク質機能のレドックス制御という視点では、GSH は Trx とは異なる特徴をもつことが明らかになった。しかも GSH で制御される生理的現象が明らかになるにつれ、それらの多くが他のチオール試薬 (Trx と同等の効果を示す試薬) では代替できないことも明らかになってきた。つまり、生体内において Trx でなく GSH 分子そのものが必要な理屈がそこにあるはずと考えられた。

生理的な意義は十分には解明されていないが、GSH はタンパク質内のシステイン残基とジスルフィド結合を形成し、タンパク質と共有結合すること (グルタチオン化) が知られていた。我々は、GSH で特異的に制御される生理現象を解明するための鍵はタンパク質のグルタチオン化制御にあると考え、

研究を進めてきた。その結果、モデル植物シロイヌナズナにおいていくつかの鍵となるタンパク質を同定できた。

## 2. 研究の目的

本研究では、グルタチオンによる生理現象の制御機構を明らかにすべく、そのグルタチオン化タンパク質のひとつである葉緑体型フルクトース-1, 6-ビスリン酸アルドラーゼ (FBA) の生理学的意義を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

シロイヌナズナのゲノム上には、プラスチド移行型と考えられる FBA の遺伝子が3つ存在した。そのひとつが、本研究で対象とした FBA1 遺伝子である。分子系統上、従来からカルビン回路酵素とされてきた FBA には、FBA2 および FBA3 と名前を付けた。それぞれのアイソザイムはアミノ酸配列が酷似しており、他の植物でも保存性のない部位1か所のペプチド配列でのみ区別が可能であったため、その配列に対する特異的抗体を作成し、FBA1, FBA2, FBA3 を区別できるようにした。

また、シロイヌナズナの野生型 Co1 を用い、それぞれの配列を取得し、過剰発現体の作製を行った。一方、それぞれのアイソザイムの変異体の取得も行った。FBA2 および FBA3 については完全なノックアウト株を取得したが、FBA1 については60%程度まで減少した変異体しか得られなかった。

上記の材料を用いて、光条件を変えて生育させた植物体の表現型を調査することで各アイソザイムの光に対する重要性を評価するとともに、それぞれの植物の FBA1, FBA2, FBA3 の量を調べ、グルタチオンに対する FBA 活性の変化を観察することで、実際にどのアイソザイムがグルタチオンで活性が影響を受けるかを評価した。

## 4. 研究成果

様々な植物からプラスチドアルドラーゼと思われる配列を取得し、分子系統樹解析を行った。従来からカルビン回路とされた FBA は、FBA2/FBA3 グループに分類され、今回対象としたグルタチオン結合性アルドラー

ゼ FBA1 は、それとは別なブランチに分類されることが明らかとなった (図 1)。

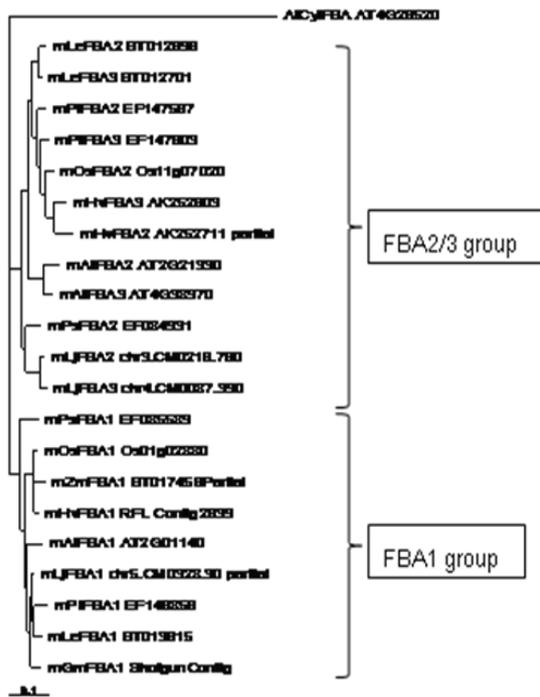


図 1. 植物のプラスチド型アルドラーゼの分子系統樹。それぞれのタンパク質の名称の頭文字は次の植物からの配列であることを意味している。At, *Arabidopsis thaliana*; Gm, *Glycine max*; Hv, *Hordeum vulgare*; Le, *Lycopersicon esculentum*; Lj, *Lotus japonicus*; Os, *Oryza sativa*; Ps, *Picea sitchensis*; Pt, *Populus trichocarpa*; Zm, *Zea mays*.

定量的 PCR および Western blot 法により、野生型植物 Col の葉身における FBA 1 と FBA2 および FBA3 のアイソザイムの mRNA 量とタンパク質量を比較した (図 2)。mRNA 量はゲノムをテンプレートにそれぞれの RNA 量を比較した。FBA1 と FBA2、および FBA3 の mRNA の比およびタンパク質量の比は一致はしなかったため、タンパク質としての寿命等が差がある可能性もあるが、定性的な量の順位が逆転するようになることは認められなかった。FBA1 は、タンパク質としての存在量が少なく、全 FBA の 2% 程度しかないことが明らかとなった。

さらに各 FBA アイソザイムの変異体について、各アイソザイムの存在量を定量した (図 2)。FBA2 および FBA3 については、タンパク質として検出できないほどのノックアウト変異体を取得されたが、*fbal-1* は、mRNA では野生型の 20-30% 程度に低下していたが、タンパク質としては野生型の 60%

程度の量であった。

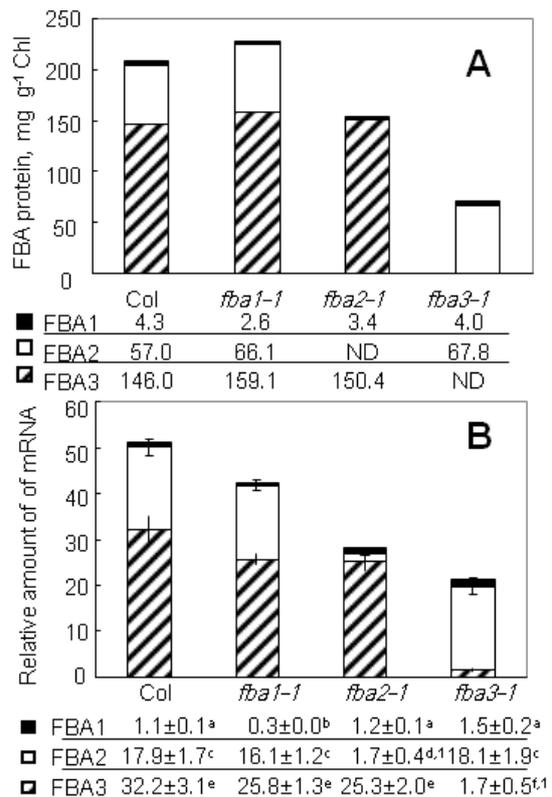
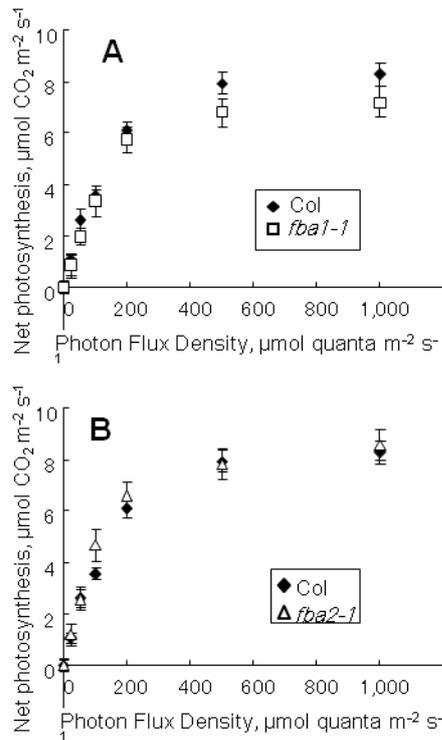


図 2. 野生型シロイヌナズナおよび FBA 変異体の葉身における各 FBA アイソザイムの相対 mRNA 量およびクロロフィルあたりのタンパク質量。



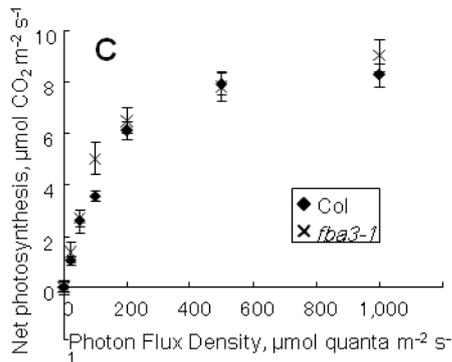


図3 野生型および各変異体の光-光合成曲線。LI-6400によるCO<sub>2</sub>固定能の評価。

これらの植物の表現型を調べると *fba1-1* 変異体は、野生型よりも生育が悪く、CO<sub>2</sub>固定能の低下が認められ(図3A)、野生型に比べて光に弱いことが認められた。一方、*fba2-1* 変異体は、むしろ、野生型よりも生育がよい場合が多く、野生型よりも生育が悪い条件は認められず、CO<sub>2</sub>固定能に有意な差は認められなかった(図3B)。また、*fba3-1* 変異体では、生育が多少悪い傾向が認められたが、*fba1* 変異体で認められたような光に対する感受性は認められず、タンパク質がほとんど欠損した変異体であるにもかかわらずCO<sub>2</sub>固定能に大きな変化は認められなかった(図3C)。その代わりに、稔性の低下が認められた。この傾向は、*fba3-1* および *fba2-1* の2重変異では顕著で、後代の種の取得はできなかった(図4)。

以上の結果から、FBA2 および FBA3 の役割は、カルビン回路というよりは、他の役割の方が強いと考えられた一方、FBA1 は微量でも Calvin 回路に寄与度が大きいと推定された。

それぞれの変異体の葉身から粗抽出液を調整し、グルタチオンに対する活性変化を測定し、各 FBA 量の定量結果をもとに、フルクトースビスリン酸合成活性への各アイソザイムの寄与率を下記の重回帰モデルで検証した。

$$\text{全 FBA 比活性} = a_1[\text{FBA1}] + a_2[\text{FBA2}] + a_3[\text{FBA3}]$$

ここで[FBAi]は FBAi アイソザイムの酵素量を示し、a<sub>i</sub>はその比活性を示す。a<sub>i</sub>のグルタ

チオン依存的な変化を計算したところ、表1

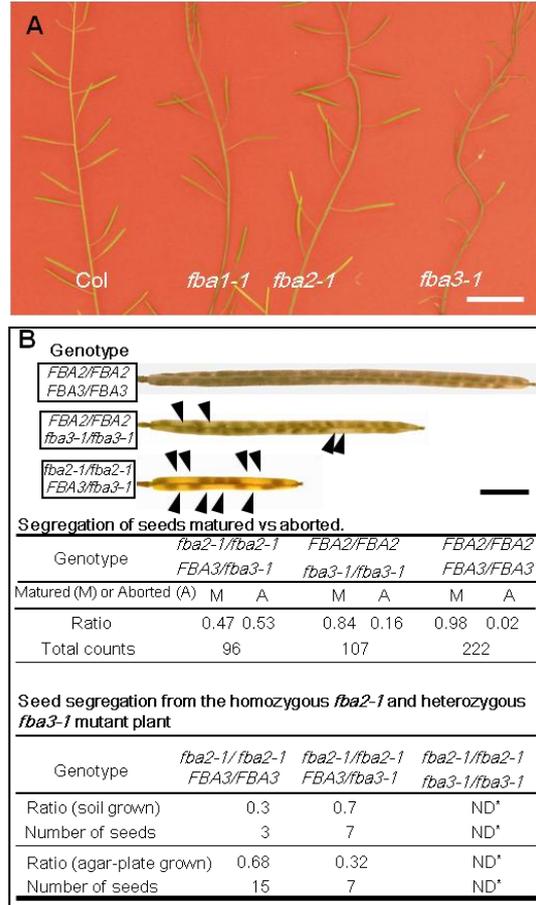


図4. *fba3* 変異および *fba2* 変異による稔性低下。

表1.各 FBA アイソザイムのグルタチオンによる比活性変化。回帰モデルで a<sub>i</sub> は FBA<sub>i</sub> の比活性に相当する。

GSH (mM)	偏回帰係数 (partial regression coefficient)				
	0	0.5	1	2.5	5
FBA1 (a <sub>1</sub> )	0.141**	0.185**	0.242**	0.264**	0.294**
FBA2 (a <sub>2</sub> )	0.005*	0.005	0.004	0.002	0.002
FBA3 (a <sub>3</sub> )	0.004**	0.004**	0.003*	0.003*	0.002
Coefficient of determination (R <sup>2</sup> )	0.95**	0.97**	0.97**	0.97**	0.96**

\*\* : p < 0.01, \* : p < 0.05

のデータを得た。これと同様の検証をアルドラーゼ過剰発現体において生育量との間で実施し、FBA1 は生育に正の因子、FBA3 は生育に負の因子、FBA2 はどちらにも影響が薄い因子とする結論を得た。

以上のように、本研究で、FBA1 の光合成における重要性は明らかになった。

研究代表者らは、グルタチオンの施用で植物体の種子収穫量が劇的に向上することを見出している。FBA タンパク質のアミノ酸配列上に、グルタチオンと作用しうるシステイン残基のうち、FBA1 のみに存在するシステイン残基の重要性について、さらなる検証が残るものの、FBA1 がグルタチオンで調節を受けることは明らかにできた。グルタチオン施用による種子収量の向上の効果が *fbal-1* 変異体では低下することの意義を探り、グルタチオンによる収穫量のさらなる向上に向けて、さらに研究を進めていく予定である。

#### 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 4 件)

① Matsumoto, M. and Ogawa, K. (2008) New insight into the Calvin cycle regulation - Glutathionylation of fructose bisphosphate aldolase in response to illumination. *In Photosynthesis 2007: Energy from the Sun* (Allen, J.F., Osmond, B., Bolbeck, J.H., Gantt, E. Eds), pp.877-880. Springer, Heidelberg, Germany.

② Jahan, M. S., Ogawa, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Mori, I. C., and Murata, Y. (2008) The deficient glutathione in guard cells facilitates abscisic acid-induced stomatal closure but does not affect light-induced stomatal opening. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 2795-2798.

③ 小川健一 (2009) 作物の収量品質向上を果たすグルタチオンの機能解明. *Research Journal of Food and Agriculture* 32: 44-47.

④ Gotoh, E., Matsumoto, M., Ogawa, K., Kobayashi, Y., Tsuyama, M. (2009) A qualitative analysis of the regulation of cyclic electron flow around photosystem I from the post-illumination chlorophyll fluorescence transient in Arabidopsis: a new platform for the in vivo investigation of the chloroplast redox state. *Photosynth Res.* 103: 111-123.

[学会発表] (計 6 件)

① Ogawa, K. New insight into the Calvin cycle regulation - Glutathionylation of fructose bisphosphate aldolase in response to illumination. The 14<sup>th</sup> International Congress on Photosynthesis Research 2007. Jul 23, 2007, Glasgow, UK.

② Ogawa, K. Regulation of the Calvin cycle

by glutathione. The annual symposium of the Korean Society of Photoscience. Jun 7, 2007, Pusan, Korea.

③ 小川健一. カルビン回路におけるフルクトース-1, 6-ビスリン酸アルドラーゼのレドックス制御. 第 49 回植物生理学会大会. 2008 年 3 月 22 日

④ Ogawa, K. The redox regulation of fructose-1,6-bisphosphate aldolase in the Calvin cycle. BMB2008. Dec 11, 2008, Kobe.

⑤ 岩崎 (葉田野) 郁, 小川健一. グルタチオンによる二酸化炭素固定の律速. 第 50 回日本植物生理学会年会. 2009 年 3 月 21 日、名古屋.

⑥ 岩崎 (葉田野) 郁, 前田貴史, 郷達明, 山里明弘, 深城英弘, 小川健一. 葉緑体におけるグルタチオン結合性アルドラーゼ FBA1 の機能. 第 51 回日本植物生理学会年会. 2010 年 3 月 20 日、熊本.

[その他]

ホームページ等

[http://www.pref.okayama.jp/soshiki/deta-il.html?lif\\_id=79451](http://www.pref.okayama.jp/soshiki/deta-il.html?lif_id=79451)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小川 健一 (OGAWA KEN' ICHI)

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・グループ長

研究者番号：70344405

##### (2) 連携研究者

岩崎 (葉田野) 郁 (Aya Hatano-Iwasaki)

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・流動研究員

研究者番号：40443593