

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580105

研究課題名 (和文) 循環的電子伝達によるハッチ・スラック型光合成へのエネルギーチャージ機構の解明

研究課題名 (英文) Energy charge in C4 photosynthesis through cyclic electron transport

研究代表者

遠藤 剛 (ENDO TSUYOSHI)

京都大学・生命科学研究所・講師

研究者番号：90201962

研究成果の概要：葉緑体 NDH 複合体の未知サブユニットを同定する目的で、Arabidopsis 共発現解析データベース等を利用して新規 NDH 遺伝子の選抜をした。その結果、5 個の遺伝子の同定と解析をライバルに先駆けて、または同時に発表することができた。

C₄種、C₃種および intermediate のフラベリアを材料とし、4 個の NDH サブユニットに対する抗体を用いてイムノブロット解析を行った。また、C₄フラベリア (*F. bidentis*) から、シロイヌナズナで同定された核ゲノムコードの NDH サブユニット遺伝子 *ndhN* と本研究にて単離した *ndf4*, *ndf6* のホモログをクローニングした。単離した遺伝子配列を利用してその遺伝子の発現抑制を引き起こすための RNAi ベクターを作成し、形質転換を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：植物生化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：C4 光合成・循環的電子伝達系・NAD(P)H デヒドロゲナーゼ・ATP 生成

1. 研究開始当初の背景

生命活動の源である光合成明反応は、端的に言えば ATP と NADPH を生産する反応であり、暗反応で主として糖合成に利用されるが、その時々々の細胞の要求性に応じて ATP/NADPH 生成比を調節する必要がある。申請者らはこれまでに、光化学系 I 循環的電子伝達経路が ATP と NADPH の合成比の制御に必要であることを示してきた(業績 1 に総説)。循環的電子伝達経路とは、直線的電子伝達系 (Z-スキーム) で生

じた NADPH 等の還元型化合物が消費されずに電子伝達鎖を再還元することで、光化学系 I 周辺を循環的に電子が移動する経路である。直線的電子伝達経路では光化学系 I と光化学系 II を協調的に利用し ATP と NADPH の両方を生産するが、その合成比は一定である。循環的電子伝達経路では光化学系 I のみを利用し、ATP のみを生産する。つまり、光合成生物は循環的電子伝達の活性を調節することで、時々刻々変動する細胞のエネルギー要求性に

じ、ATP と NADPH の合成比を調節していると考えられている。

最近、鹿内らにより、循環的電子伝達経路には、NDH 経路と FQR(フェレドキシン・キノン還元酵素) 経路の 2 つの経路が存在し、両経路を欠損したシロイヌナズナの変異株の解析から、光化学系 I 循環的電子伝達経路は C₃ 光合成に必須であることが明らかとなった。

一方、トウモロコシ、サトウキビ等重要な作物を含むハッチ・スラック型光合成植物 (C₄ 植物) は、C₃ 植物に比べ、高温、強光下で効率のより光合成を行う能力を持つが、これを支えるのは、C₄ 植物特有の二酸化炭素濃縮機構である。この二酸化炭素濃縮装置の駆動には、ATP が必要であることが知られていたが、長らく C₄ 代謝駆動のための ATP 生成の機構は不明であった。申請者らは、葉緑体 NAD(P)H デヒドロゲナーゼ(NDH)による循環的電子伝達系が、C₄ 代謝のエネルギー補充機構の本体であることを示唆する結果を得た。本研究では、この仮説を実証するため、C₄ 植物での NDH の生理的役割を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

C₃ モデル植物シロイヌナズナで同定された核ゲノムコードの *ndh* 遺伝子群のホモログを形質転換可能な C₄ 植物であるフラベリアから単離し、その遺伝子を RNAi 法で抑制する。具体的には、シロイヌナズナ葉緑体の NDH 複合体の構造を明確にする。その知見に基づき、形質転換可能な C₄ 植物フラベリアを材料として NDH の発現のウエスタン解析と NDH ノックダウン株作成を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナ葉緑体 NDH 複合体の構造解析

シロイヌナズナ葉緑体 NDH 複合体の未知サブユニットを同定する目的で、インターネット上で公開されているマクロアレイデータの共発現解析データベース (ATTEDII) 等を利用して新規 NDH 遺伝子の選抜を行う。

(2) フラベリア NDH の発現解析

C₄ 種のフラベリア *F. bidentis* と *F. trinervia*、C₃ 種として *F. pringlei*、C₃-C₄ intermediate 種として *F. ramosissima* を材料とし、葉緑体コードの NDH サブユニット NDH-H と核コードのサブユニット NDF1, 2, 6 に対する抗体を用いてイムノブロット解析を行う。

(3) NDH 抑制変異株の作成

まず、C₄ 植物のフラベリア (*F. bidentis*) から、シロイヌナズナで同定された核ゲノムコードの NDH サブユニット遺伝子をクローニングする。単離した遺伝子配列を利用してその遺伝子の発現抑制を引き起こすためのベクターとして 37bpRNAi ベクター (pGWB2) を作成し、アグロバクテリウム (LBA4404) に形質転換する。

4. 研究成果

当初の研究計画では C₄ 植物での解析を主眼としていたが、シロイヌナズナの新規サブユニット遺伝子の同定と解析の研究が、予想以上に国際的競争にさらされていると判明したため、研究の主力をシフトせざるを得なかった。結果としてシロイヌナズナで新規 NDH 関連遺伝子として *ndf1, 2, 4, 5, 6* と命名した 5 個の遺伝子の同定と解析をライバルに先駆けて、または同時に発表することができた。一方、C₄ 植物における解析は現在までに公表するに至らなかった。

(1) シロイヌナズナ葉緑体 NDH 複合体の構造解析

呼吸および光合成という相反する反応で機能を果たすため、NDH は、分子進化の過程で呼吸型 (ミトコンドリア局在) と光合成型 (葉緑体局在) に分岐してきたと推定される。呼吸型 NDH の NADH 結合サブユニットに相同性を有する遺伝子は光合成生物では見出されず、まったく異なったタイプのサブユニットが機能を代替しているはずであるが、この光合成型 NDH に特異的な NAD(P)H 結合サブユニットは、未だ発見できずにいる。本研究では、比較ゲノム解析と、網羅的遺伝子発現情報とを組み合わせるにより生化学研究では同定不可能であった光合成型 NDH の新規サブユニットが、効率的に同定できることを見出し、これまでに 5 個の新規サブユニットの同定に成功した。

具体的には、シロイヌナズナ葉緑体 NDH 複合体の未知サブユニットを同定する目的で、インターネット上で公開されているマクロアレイデータの共発現解析データベースを利用して既知の *ndh* 遺伝子と共発現する (同じ器官で同じ環境条件で発現する) 遺伝子群を検索 (以後、共発現解析と略す) した。またこれを補完する方法として、NDH 複合体をもつことがわかっている高等植物とシアノバクテリアに存在する遺伝子のうち、NDH 複合体をもたない緑藻のゲノムには存在しない遺伝子を探索 (以後、系統プロファイリング) した。その結果、共発現解析において 33 の候補遺伝子を、系

統プロファイリングの手法において 28 の候補遺伝子を同定した。そのうち、37 遺伝子が機能未知遺伝子であり、2 つの機能未知遺伝子が両方の手法で単離された。候補遺伝子が実際に *ndh* 遺伝子かどうかを解析するため、単離した遺伝子内部に T-DNA が挿入されているシロイヌナズナ変異株を T-DNA 変異株コレクションから取り寄せ、NDH 活性が欠損している植物体を選抜した。以上の手法により、4 つの機能未知遺伝子の欠損が NDH 活性を欠損させることが明らかとなり、*ndf1-4* と命名した。*ndf3* に関しては、本研究の途中で、他グループにより報告があったため、*ndf1,2,4* について詳細な解析を行い、これらが、NDH 複合体の新規サブユニット遺伝子であることを明らかにした (成果 8)。さらに、共発現の閾値を下げることで *ndf6* を、また、*ndf2* のホモログとして *ndf5* を見いだし、詳細な解析を行った。NDF6 は、新規 NDH サブユニットであり (成果 4)、NDF5 は、完成した NDH 複合体を含む野生株には発現が少なく、親水性サブコンプレックスが欠損した変異株に発現量が多いことから、NDH 複合体の構造の構築に必要な因子であるが、サブユニットではない可能性が示された (成果 9)。

(2) フラベリア NDH の発現解析

C₄ 種のフラベリア *F. bidentis* と *F. trinervia*、C₃ 種として *F. pringlei*、C₃-C₄ intermediate 種として *F. ramosissima* を材料とし、葉緑体コードの NDH サブユニット NDH-H と核コードのサブユニット NDF1, 2, 6 に対する抗体を用いてイムノブロット解析を行った。葉緑体コードの NDH-H はすべての種で同一の分子量の単一のバンドが観察され、発現レベルは C₄ と C₃-C₄ intermediate 種に多く、C₃ 種では、かなり低いという結果となった。一方、核コードのサブユニットについては、イムノブロットでそれぞれのタンパク質について分子量がわずかに異なる複数本のバンドが見られた。NDF1 と NDF6 については、C₄ と C₃-C₄ intermediate 種では C₃ 種に比べて発現レベルが高く、NDH-H の結果と整合性がとれる結果となったが NDF2 については C₃ 種が他に比べて発現が高く、非特異的な抗体との結合や、交差活性の差等の解析が必要と考えられた。

(3) NDH 抑制変異株の作成

①フラベリア RNAi 発現抑制株の作成

まず、C₄ 植物のフラベリア (*F. bidentis*) から、シロイヌナズナで同定された核ゲノムコードの NDH サブユニット遺伝子 *ndhN* と本研究にて単離した *ndf4*, *ndf6* のホモロ

グをクローニングした。単離した遺伝子配列を利用してその遺伝子の発現抑制を引き起こすためのベクターとして 37bpRNAi ベクター (pGWB2) を作成し、アグロバクテリウム (LBA4404) に形質転換した。*F. bidentis* の胚軸を用いた形質転換を試みたが、これまでのところ、形質転換植物は得られていない。早急に、形質転換体を得るため、オーストラリア国立大学の Caemmerer 教授との共同研究のもとで形質転換実験を行っている。

②NDH 欠損変異株の単離

トウモロコシの NDH 欠損変異株を単離するため、Maize Targeted Mutagenesis Database (<http://mtm.cshl.org/>) もしくは、Photosynthetic Mutant library (<http://chloroplast.uoregon.edu/>) のスクリーニングサービスおよび RescueMu library を利用して、単離した *ndh* 遺伝子にトランスポゾンが挿入された変異株が存在するかどうかを探索した。*ndhO* については該当変異株がなく、現在 *ndhN* については依頼中。今後、*in silico* 解析によって当研究グループで同定した 5 つの新規 NDH 関連遺伝子についても同様にスクリーニングしている。

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 9 件)

1. Ishihara, S., Takabayashi, A., Ido, K., Endo, T., Ifuku, K. and Sato, F. (2007). Distinct functions for the two psbP-like proteins PPL1 and PPL2 in the chloroplast thylakoid lumen of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 145, 668-679.
2. Hanke, G.T., Endo, T., Satoh, F. and Hase, T. (2008). Altered photosynthetic electron channeling into cyclic electronflow and nitrite assimilation in a mutant of ferredoxin:NADP(H)reductase. *Plant Cell Environment* 31, 1017-1028.
3. Ishikawa, N., Takabayashi, A., Ishida, S., Hano, Y., Endo, T. and Sato, F. (2008). NDF6; a thylakoid protein specific to terrestrial plants is a novel subunit of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in Arabidopsis. *Plant Cell*

Physiol. 49, 1066-1073.

4. Ishikawa, N, Endo, T. and Sato, F. (2008). electron transport activities of Arabidopsis mutants with impaired chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase. *J. Plant Res.* 121, 521-526.
5. Takahagi, T., Endo, T., Yamamoto, Y. and Sato, F. (2008). Lichen photobionts show tolerance against lichen acids produced by lichen mycobionts. *Biosci. Biotech. Biochem.* 72, 3122-3127.
6. Endo, T., Ishida, S., Ishikawa, N., and Sato, F. (2008). Chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase complex and cyclic electron transport around photosystem I. *Mol. Cells* 25, 158-162.
7. 遠藤 剛, 石田 智, 石川規子, 佐藤文彦 (2008). 光合成における電子伝達系の最近の研究から ―葉緑体の「呼吸」電子伝達鎖 植物の生長調節 43, 89-94.
8. Takabayashi, A., Ishikawa, N., Obayashi, T., Ishida, S., Obokata, J., Endo, T. and Sato, F. (2009). Three novel subunits of Arabidopsis chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase identified by bioinformatic and reverse genetic approaches. *Plant J.* 57, 207-219.
9. Ishida, S., Takabayashi, A., Ishikawa, N., Hano, Y., Endo, T. and Sato, F. (2009). A novel nuclear-encoded protein, NDH-Dependent cyclic electron Flow 5, is essential for the accumulation of the chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase complexes. *Plant Cell Physiol.* 50, 383-393.

以上 1, 2, 5 以外の 6 報は研究代表者が corresponding author

[学会発表] (計 10 件)

第 49 回日本植物生理学会 2008. 3. 20-22、
札幌コンベンションセンター 計 7 件

第 50 回日本植物生理学会 2009. 3. 21-24、

名古屋大学 計 3 件
以上、発表者、演題は省略。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 剛 (ENDO TSUYOSHI)

京都大学・生命科学研究所・講師

研究者番号：90201962

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし