

## 自己評価報告書

平成 23年 5月 2日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20370022

研究課題名（和文） 蛋白質の原子構造情報を活用した植物のレドックス代謝機能の制御

研究課題名（英文） Regulation of plant redox metabolic function based on the atomic structure of proteins

研究代表者

長谷 俊治 (HASE TOSHIHARU)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：00127276

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子生物・生理学

キーワード：蛋白質、植物、光合成、代謝

## 1. 研究計画の概要

植物の独立栄養機能を分子レベルで理解してその制御機構を解明する研究は、ポストゲノムやプロテオミクス時代の基礎植物科学の重要課題であると認識されている。本研究は、光合成の同化機能を司る酵素・蛋白質群の構造・機能研究の知見を植物個体レベルに適用して、プラスチドのレドックス代謝の制御機構を明らかにすることを目指している。本研究がスタートして3年間の間に、炭素・窒素・硫黄の無機物同化の代謝ネットワークの酵素群と電子キャリアーの構造を基盤に、新しい分子装置の *in vitro* での機能評価と各種形質転換植物を作出してきた。最終年度は引き続いてこの構造・機能情報を深化させると共に、取得した代謝系の駆動状況を解析し生理的状況下での作動原理を明らかにする。これらのレドックス代謝の基礎と応用の両側面を視野に入れて本研究課題をまとめる。

## 2. 研究の進捗状況

(1) 分子レベルの基礎的研究の範囲では、葉型のフェレドキシン(Fd)と Fd:NADPH 還元酵素(FNR)、根型の Fd と FNR、亜硝酸還元酵素(NiR)、グルタミン酸合成酵素(GOGAT)、グルタミン合成酵素(GS)で多くの改変体の解析を進め、以下の成果を得た。

①窒素同化系の NiR と Fd の電子伝達複合体の生化学的解析を進め、複合体形成に関わる Fd 部位の特定と分子間の相互作用力の評価を行った。

②アンモニア同化系の GOGAT と Fd の電子

伝達複合体構造解析を NMR 分光法を進めた。

③GOGAT の光合成と非光合成組織での駆動状況を葉型、根型の Fd と FNR を生理的な還元力供給系として再構成して、その特性を明らかにした。

④GS の系統的変異体の作製と生化学的評価を行い、基質であるグルタミン酸及びその阻害剤であるメチオニンスルフォキシミドやフォスフィンスリシンの親和性を決定している部位を同定した。

(2) 上記の蛋白質群の RNAi 植物や T-DNA 挿入変異植物の作製やスクリーニングを行い、それらの表現型を解析して以下の成果を得た。

①3種類の Fd イソ蛋白質を個々にノックダウンした *Arabidopsis* を作製した。存在量が多い Fd 分子種のノックダウン株では成長が遅延したが、レドックスパートナーの一つである FNR の発現量は大きな変動はなかった。複数のレドックス代謝系への電子分配の度合いやその調節の仕組みの解析を行った。

②葉型2種類の FNR が欠損した変異体では明瞭な表現型は認められないが、光合成電子伝達鎖の駆動状況や還元力の炭素・窒素同化への配分比率が変化している。窒素栄養が制限された生育条件下では、この変異体のバイオマスが多くなる。野生型では窒素栄養状況に応じて炭素同化のダウンレギュレーションが働くが、FNR 欠損によりレドックスバランスが崩れて制御能が低下するとの仮説を提案した

③トウモロコシでは葉型 FNR に3種類のアイソザイムがあり、それぞれ葉緑体内での存

在部位がチラコイド膜とストロマで異なる。シロイヌナズナにこのアイソザイム遺伝子を導入してヘテロガスに発現させたFNRの葉緑体内局在性を調べ、トウモロコシの場合と類似する性質を示した。この存在部位を規定している領域がFNR分子のN末端領域にある可能性が考えられたので、この領域を繋ぎ換えたキメラ分子種を作製し、シロイヌナズナの形質転換系で局在を調べてこのN末端領域仮説がほぼ正しいことを結論した。

### 3. 現在までの達成度

炭素・窒素・硫黄の無機物同化の代謝ネットワークの酵素群やそれに還元力を供給する電子伝達複合体の構造と機能を明らかにし、さらにそれを構造生物学と生化学的手法で研究を深化させる段階に至った。そして、*in vivo*での機能評価を視野に入れた研究として、*Arabidopsis*を用いた個体レベルの研究がスタートし、一定の成果が論文として報告されている状況である。NiRやGOGATとFdとの電子伝達複合体のx線結晶構造解析はまだ持ち越す課題となっている。これらを総合して、自己評価は「②おおむね順調に進展している」とした。

### 4. 今後の研究の推進方策

レドックス蛋白質の欠失や量が顕著に低下した変異植物株が多数得られているが、それらの光合成やレドックス代謝系の個体レベルでの解析方法の確立がまだ不十分である。この領域にはまだ経験が浅いので、今後重点的に実験系の整備と開発に力をつぎ込む必要があると判断している。国内外の植物生理学を専門とする研究者との共同研究も視野に入れる。

### 5. 代表的な研究成果

(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10件)

- ① Bowsher C. G., Eyres L. M., Gummadova J. O., Hothi P., McLean K. J., Munro A. W., Scrutton N. S., Hanke G. T., Sakakibara Y., and Hase T. (2011) Identification of N-terminal regions of wheat leaf ferredoxin NADP<sup>+</sup> oxidoreductase important for interactions with ferredoxin. *Biochemistry*, 50, 1778-1787 (査読有り)
- ② Voss I., Goss T., Murozuka E., Altman B., McLean K. J., Rigby S. E. J., Munro A. W.,

Scheibe R., Hase T., and Hanke G. T. (2011) FdC1, a novel ferredoxin protein capable of alternative electron partitioning, increases in conditions of acceptor limitation at PSI. *J. Biol. Chem.* 286, 50-59 (査読有り)

- ③ Kimata-Arigo Y., Sakakibara Y., Ikegami T., and Hase T. (2010) Electron transfer of site-specifically cross-linked complexes between ferredoxin and ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase. *Biochemistry*, 49, 10013-10023 (査読有り)
- ④ Terauchi AM., Lu SF., Zaffagnini M., Tappa S., Hirasawa M., Tripathy JN., Knaff DB., Farmer P. J, Lemaire SD., Hase T., and Merchant SS. (2009) Pattern of expression and substrate specificity of chloroplast ferredoxins from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 284, 25867-25877 (査読有り)
- ⑤ Hanke GT. and Hase T. (2008) Variable photosynthetic roles of two leaf type ferredoxins in *Arabidopsis*, as revealed by RNA interference. *Photochem. Photobiol.* 84, 1302-130 (査読有り)
- ⑥ Hanke G. T., Endo T., Satoh F., and Hase T. (2008) Altered photosynthetic electron channeling into cyclic electron flow and nitrite assimilation in a mutant of ferredoxin:NADP(H) reductase. *Plant Cell Environ.* 31, 1017-1028 (査読有り)

[学会発表] (計20件)

- ① 長谷俊治、植物葉緑体のレドックスネットワークの分子基盤と光合成機能の制御岡崎統合バイオサイエンスセンター10周年記念シンポジウム、2011.2.11、岡崎コンファレンスセンター
- ② Hase T. Structural basis for molecular recognition of Fd and Fd-dependent proteins. Arnon Centennial Symposium, 2010.1.7-8. Asilomar, California
- ③ Hase T. Structural basis for redox cascades in chloroplasts and nonphotosynthetic plastids. *Chloroplast Biology*, 2008. 9. 25-26, IPMB Acaemia Sinica, Taipei