

高等植物葉緑体におけるレドックス制御 ～チラコイド内腔におけるレドックス調節機構について～[§]

¹東京工業大学 資源化学研究所 附属資源循環研究施設

²京都産業大学 総合生命科学部 生命資源環境学科

本橋 健^{1,2,*}

1. はじめに

高等植物の葉緑体では、光合成で生じる還元力からNADPHを生産し、炭酸固定に用いている。この還元力の一部はフェレドキシン、フェレドキシン-チオレドキシン還元酵素を通じて、チオレドキシン (Trx) にも受け渡される (図1)。分子内ジスフィド結合が還元された還元型チオレドキシンは、葉緑体ストロマ中に存在する様々なタンパク質のジスルフィド結合を還元することで、タンパク質の機能を制御している。例えば、カルビンサイクルのいくつかの酵素は、酸化状態で不活性であり、チオレドキシンにより還元されることで活性化されることが古くから知られていた¹⁾。

今世紀に入り、私たちのグループを含むいくつかのグループが、Trxにより還元される標的タンパク質を効率的に捕捉、同定する手法を開発した²⁻⁴⁾。このブレイクスルーにより、葉緑体ストロマのTrxによる標的タンパク質のレドックス制御研究は大きく進んできた。そこからわかったことは、葉緑体ストロマのTrxはカルビンサイクルを始めとする炭酸固定系酵素群の活性調節を行うだけでなく、光合成により生じる還元力を使うことで、デンプン合成^{5,6)}、テトラピロール代謝⁷⁾、脂質代謝^{8,9)}、タンパク質フォールディング¹⁰⁾など葉緑体の機能に関わる実に様々なタンパク質のジスルフィド結合のレドックス状態を制御し、その機能を調節していることが明らかとなっている。こ

の研究の進展を通じて、葉緑体Trxによるレドックス制御の重要性が再認識されている。

2. 葉緑体チラコイド内腔におけるレドックス状態

昼夜でのレドックス状態変化がよく知られている葉緑体ストロマに対して、チラコイド膜を隔てたチラコイド内腔側には、ストロマのような光合成とリンクした還元力蓄積機構は知られておらず、そのような環境では、チオレドキシンのようなレドックスタンパク質は機能することができないと考えられる (図1)。しかし、Lennartzらがクロロフィル蛍光に異常を示

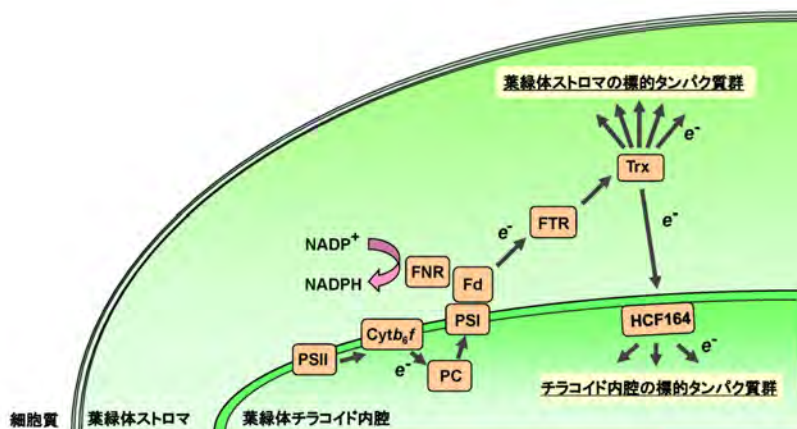


図1 高等植物葉緑体におけるTrxを中心としたレドックスカスケード
光合成電子伝達系によって生成された還元力 (電子) は、フェレドキシン(Fd)を經由しフェレドキシン-NADP⁺還元酵素(FNR)を介してNADPHを産生する。この電子の一部は、Fdからフェレドキシン-チオレドキシン還元酵素(FTR)を介してTrxを還元する。生じた還元型Trxは、さまざまな標的タンパク質に還元力を供給して、ジスルフィド結合の還元を行うことで酵素の活性制御を行うほか、酵素反応に必要な還元力(電子)そのものを供給する。

[§] 第9回日本光合成研究会シンポジウム ポスター賞受賞論文

* 連絡先 E-mail: motohas@cc.kyoto-su.ac.jp

すシロイヌナズナ*hcf164*変異体を同定した。*hcf164*変異体ではチラコイド内腔のシトクローム*b₆f*が正常にアッセムリーしないという事実から、原因遺伝子をコードするHCF164というチオレドキシン様タンパク質は、チラコイド内腔側にチオレドキシン領域(Trx領域)を持つタンパク質であることが予想された¹¹⁾。私は、還元力の供給がないチラコイド内腔のような環境下でレドックスタンパク質であるチオレドキシン様タンパク質が、いったいどのように機能するのか、という疑問を持ち、このタンパク質の研究を始めた。

まず始めに、レドックスタンパク質であるHCF164のTrx領域が本当に還元力の蓄積が知られていないチラコイド内腔側を向いているのだろうか、という疑問を解決するために、無傷チラコイドをプロテアーゼ処理することでTrx領域の配向性を生化学的に調べた。その結果として、HCF164のTrx領域はたしかにチラコイド内腔側に存在していることを明らかにした¹²⁾。

3. チラコイド内腔への還元力伝達機構

では、内腔側に配向するTrx領域はいったいどこから還元力となる電子を受け取るのだろうか。内腔側には光合成電子伝達系に関わる様々な因子が存在する。これらの因子からHCF164へ電子の受け渡しを行っている可能性がある。しかし、HCF164のTrx領域の酸化還元電位を測定すると -224 mVであり、光合成電子伝達系のプラストシアニンと電子の授受はむずかしい。文献を調べると、バクテリアにおいても細胞質からペリプラズム側へのジスルフィド結合を介した電子の伝達経路があることがわかった¹³⁾。バクテリアにおける膜を介した還元力伝達経路では、還元力の豊富な細胞質側から内膜を超えてペリプラズム側へ還元力を受け渡す際に、細胞質側のTrxが電子の供給源になっている。そのことをヒントに、葉緑体ストロマ側に局在する代表的なTrxを使って実験を行った。無傷チラコイドを調製し、外から還元型Trxを加えるとたしかにチラコイド内腔側のHCF164のTrx領域が還元された¹²⁾。HCF164の還元は、葉緑体に局在する2つの代表的なチオレドキシン(f型とm型)のうち、m型に特異的であった。ジスルフィド結合を介した還元力の受け渡し経路は、元々バクテリアから受け継がれたシステムであると考え、その起源がバクテリアと言われるm型Trxにより、還元力の伝達が行われるのは納得がいく。一方、真核生物が起源と言われているf型Trx

ではこの反応は進まない。このようにして、チラコイド内腔におけるレドックスタンパク質HCF164は、ストロマ側に局在するTrxから還元力の供給を受けて機能することがわかってきた。

チラコイド内腔のHCF164は、還元力が豊富な葉緑体ストロマTrxから何らかのメカニズムでチラコイド膜を超え電子が受け渡されることがわかった。では、チラコイド膜を介してどのようにジスルフィド結合還元のための電子が受け渡されるのであろうか。膜を超えて、電子が受け渡されるためには何らかの装置(タンパク質)が必要なはずである。ここで、シロイヌナズナ変異体を用いた研究から、葉緑体局在が予想されるCcdAと呼ばれるタンパク質が候補としてのぼってきた。シロイヌナズナ*ccda*変異体と*hcf164*変異体では、シトクローム*b₆f*が正常に分子集合できないという同じ表現型を示すことから、その関与が示唆されていた¹⁴⁾。CcdAは、6回膜貫通領域を持つと予想されるタンパク質で、N末端から1番目と4番目の膜貫通領域に保存されたシステイン残基を持つ。そこで、このCcdAタンパク質がチラコイド膜上で、葉緑体ストロマTrxからチラコイド内腔HCF164への還元力の受け渡しに関与しているのであろうと予想して実験を進めた。

まず始めに葉緑体中のCcdAを特異的に検出するために特異的抗体を作成した。CcdAは6回膜貫通タンパ

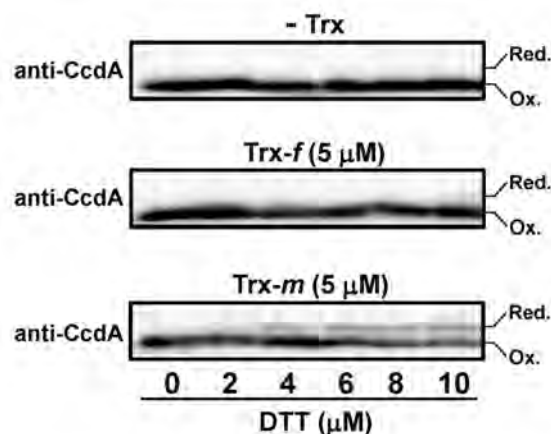


図2 ストロマTrxによるチラコイド膜タンパク質CcdA還元アッセイ

超音波破碎したチラコイド膜に葉緑体ストロマTrxを作用させ、チラコイド膜上のCcdAの酸化還元状態を検出した(ジスルフィド結合の酸化還元状態を決定するためのシステイン残基特異的修飾法については文献12, 15を参照)。m型Trxでチラコイド膜上のCcdAを効果的に還元できることがわかった。

ク質で、コンピュータによる予想では膜外領域をほとんど持たない。一般的にこのようなタンパク質の抗体は作成することは困難なことが多い。私はいくつかの方法を試すことにより、チラコイド膜上のCcdAを特異的に認識する抗体を得ることができた。

この抗体を使用して実験を進めると、CcdAはたしかにチラコイド膜上に局在する膜タンパク質であり、レドックス状態で保存されたシステイン残基の酸化還元状態の変化を確認した¹⁵⁾。

また、超音波により処理したチラコイド膜のCcdAは、ストロマのm型Trxによって、膜上のCcdAはたしかに還元されるが、f型Trxではその効果が見られない(図2)。このことは、無傷チラコイドで内腔側のHCF164が還元される条件と同じである。つまり、HCF164の還元、チラコイド膜タンパク質CcdAが関与することを強く示唆する。現在考えられるモデルを図3に示した。これまでの実験ではチラコイド膜上のCcdAと内腔のHCF164の受け渡しについて直接的な証拠を得たわけではなく、状況証拠としてその可能性を示したにすぎない。この経路の詳細なメカニズムの解明のためには、今後も研究を進めていく必要がある。

4 チラコイド内腔ジスルフィド還元システムの役割と今後の課題

ここまで、高等植物葉緑体チラコイド内腔でのジスルフィド結合還元システムのメカニズムに関することを記述してきた。チラコイド内腔のHCF164はストロマからの還元力を使って、一体どのようなタンパク質のジスルフィド結合を還元するのだろうか。私はこれまでにTrxの標的タンパク質を同定する際に用いたTrxアフィニティークロマトグラフィー法¹⁶⁾をHCF164にも適用し、シロイヌナズナのチラコイド膜画分を可溶化後、その標的タンパク質の同定を行った¹²⁾。この解析から、HCF164の標的タンパク質候補として、チラコイド膜内腔に局在するPSI-N、シトクロームf、RieskeFeSなどのタンパク質を同定している。このうち、光化学系IのサブユニットPSI-Nについて実験を進めると、HCF164がPSI-Nサブユニットを還元することができた¹²⁾。これは、2種類の精製タンパク質標品を用いた実験系、無傷チラコイドを用いた実験系の双方で確認できる。

このように、光合成電子伝達系からの還元力の一部を使って、昼には還元的な状態にある葉緑体ストロマに対して、還元力の蓄積が知られていないチラコイド内腔にもレドックスタンパク質が存在し、その還元力の供給は葉緑体ストロマ側から供給されることもわかってきた。しかし、チラコイド内腔でなぜジスルフィド結合が還元される必要があるのか、またジスルフィド結合が還元されたチラコイド内腔タンパク質は、酸化状態と還元状態でタンパク質の機能を調節されているのだろうか。新しく明らかになってきたチラコイド膜を介したジスルフィド結合還元のための還元力供給経路は、いったいどのような意味を持っているのか。これらの疑問を明らかにしていくのがこれからの課題である。これに関連してRochaixのグループは、光環境に適応するために集光アンテナを再配置するステート遷移に重要な役割を担うStt7キナーゼ(シロイヌナズナではSTN7キナーゼ)を同定し、研究を進めている^{17,18)}。このキナーゼは以前からレドックス制御によりその活性が調節される可能性が指摘されており、同定されたタンパク質を調べると保存されたシステイン残基はチラコイド内腔に存在すると予想されている。内腔側のジスルフィド結合の酸化還元状態の変化で活性が調節されているとすれば、それを制御する内腔側のジスルフィド結合還元酵素は何なのだろうか。Rochaixらもストロマからチラコイド膜を介したジスルフィド結合還元経路が、Stt7キナーゼの酸化還元に関与する可能性については興味があるようだが、今のところはっきりとした答えは出ていない¹⁹⁾。今後の解明が待たれるところだ。

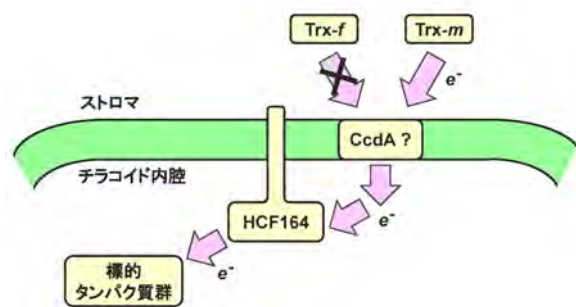


図3 チラコイド膜を介したジスルフィド結合リレーによる還元力伝達モデル

Trx, チオレドキシシン; e⁻, 電子。現在、考えられる還元力(電子)の流れをモデル図で表した。矢印は、電子の流れを示す。

また、このシステムの反応メカニズムに関しても、膜タンパク質CcdAを介してストロマ側の還元力がジスルフィド結合のリレーで受け渡されることは明らかになってきたが、この経路に関わる新たな因子が存在する可能性もあり、チラコイド膜を介したシステムの詳細な反応メカニズムの解明はこれからである。実際、チラコイド膜タンパク質であるCcdAのジスルフィド結合にストロマ側のTrxがどのようにアタックし、ジスルフィド結合のリレー反応を進めるのか、また、還元されたCcdAがチラコイド膜内腔側のHCF164を直接相互作用し、還元するのか、それとも未知の因子が介在するのかなど還元力の伝達メカニズムについての疑問も尽きない。これらの問題を解決すべく今後の研究を進めていきたい。

謝辞

最後に、ここで紹介した研究内容は、東京工業大学資源化学研究所 久堀 徹 教授のもとで行ってきた研究であり、研究を含めさまざまな面からサポートいただいたことに感謝いたします。

Received March 10, 2010, Accepted March 24, 2010,
Published April 30, 2010

参考文献

- Buchanan, B. B. (1980) Role of Light in the Regulation of Chloroplast Enzymes, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31, 341-374.
- Yano, H., Wong, J. H., Lee, Y. M., Cho, M. J., and Buchanan, B. B. (2001) A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4794-4799.
- Motohashi, K., Kondoh, A., Stumpp, M. T., and Hisabori, T. (2001) Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11224-11229.
- Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schurmann, P., and Buchanan, B. B. (2003) Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 370-375.
- Ballicora, M. A., Frueauf, J. B., Fu, Y., Schurmann, P., and Preiss, J. (2000) Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin, *J. Biol. Chem.* 275, 1315-1320.
- Kolbe, A., Tiessen, A., Schluepmann, H., Paul, M., Ulrich, S., and Geigenberger, P. (2005) Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 11118-11123.
- Ikegami, A., Yoshimura, N., Motohashi, K., Takahashi, S., Romano, P. G., Hisabori, T., Takamiya, K., and Masuda, T. (2007) The CHLI1 subunit of *Arabidopsis thaliana* magnesium chelatase is a target protein of the chloroplast thioredoxin, *J. Biol. Chem.* 282, 19282-19291.
- Sasaki, Y., Kozaki, A., and Hatano, M. (1997) Link between light and fatty acid synthesis: thioredoxin-linked reductive activation of plastidic acetyl-CoA carboxylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11096-11101.
- Yamaryo, Y., Motohashi, K., Takamiya, K., Hisabori, T., and Ohta, H. (2006) *In vitro* reconstitution of monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) synthase regulation by thioredoxin, *FEBS Lett.* 580, 4086-4090.
- Motohashi, K., Koyama, F., Nakanishi, Y., Ueoka-Nakanishi, H., and Hisabori, T. (2003) Chloroplast cyclophilin is a target protein of thioredoxin. Thiol modulation of the peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase activity, *J. Biol. Chem.* 278, 31848-31852.
- Lennartz, K., Plucken, H., Seidler, A., Westhoff, P., Bechtold, N., and Meierhoff, K. (2001) HCF164 encodes a thioredoxin-like protein involved in the biogenesis of the cytochrome *b₆f* complex in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 13, 2539-2551.
- Motohashi, K., and Hisabori, T. (2006) HCF164 receives reducing equivalents from stromal thioredoxin across the thylakoid membrane and mediates reduction of target proteins in the thylakoid lumen, *J. Biol. Chem.* 281, 35039-35047.
- Katzen, F., Deshmukh, M., Daldal, F., and Beckwith, J. (2002) Evolutionary domain fusion expanded the substrate specificity of the transmembrane electron transporter DsbD, *EMBO J.* 21, 3960-3969.
- Page, M. L., Hamel, P. P., Gabilly, S. T., Zegzouti, H., Perea, J. V., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Theg, S. M., Christensen, S. K., and Merchant, S. (2004) A homolog of prokaryotic thiol disulfide transporter CcdA is required for the assembly of the cytochrome *b₆f* complex in *Arabidopsis* chloroplasts, *J. Biol. Chem.* 279, 32474-32482.
- Motohashi, K., and Hisabori, T. (2010) CcdA is a thylakoid membrane protein required for the transfer of reducing equivalents from stroma to thylakoid lumen in the higher plant chloroplast, *Antioxid. Redox. Signal.* (in press).
- Motohashi, K., Romano, P. G., and Hisabori, T. (2009) Identification of thioredoxin targeted proteins using thioredoxin single cysteine mutant-immobilized resin, *Methods Mol. Biol.* 479, 117-131.
- Bellafiore, S., Barneche, F., Peltier, G., and Rochaix, J. D. (2005) State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7, *Nature* 433, 892-895.

18. Depege, N., Bellafore, S., and Rochaix, J. D. (2003) Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHCII phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*, *Science* 299, 1572-1575.
19. Lemeille, S., Willig, A., Depege-Fargeix, N., Delessert, C., Bassi, R., and Rochaix, J. D. (2009) Analysis of the chloroplast protein kinase Stt7 during state transitions, *PLoS Biol.* 7, e45.

Redox Modulation System in Thylakoid Lumen Side of Higher Plant Chloroplasts

Ken Motohashi^{1,2,*}

¹Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology

²Department of Bioresource and Environmental Sciences,
Faculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University