

平成17年度科学研究費補助金（学術創成研究費）研究進捗状況報告書

ふりがな		はせ としはる				
①研究代表者氏名		長谷 俊治		②所属研究機関 ・部局・職 大阪大学 ・蛋白質研究所・教授		
③研究課題名	和文	植物細胞エネルギー・代謝ネットワークを制御する分子マシナリー				
	英文	Molecular machineries controlling energy and metabolism network in plant cells				
④研究経費 (直接経費) 18年度以降は内約額 単位:千円	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
	73,700	72,300	76,900	51,000	52,000	325,900
⑤研究組織 (研究代表者及び研究分担者)						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担 (研究実施計画に対する分担事項)			
長谷 俊治	大阪大学 ・蛋白質研究所・教授	生物化学	研究の総括と分子マシナリーの生化学的・生理学的解析、NMRによる構造解析			
月原 富武 (平成16年10月まで)	大阪大学 ・蛋白質研究所・教授	蛋白質結晶学	分子マシナリーのx結晶構造解析			
栗栖 源嗣 (平成16年10月から)	東京大学大学院・総合文化研究科・助教授	蛋白質結晶学	分子マシナリーのx結晶構造解析と膜局在型分子マシナリーの調製			
高尾 敏文	大阪大学 ・蛋白質研究所・教授	蛋白質化学	分子マシナリーの構成蛋白質の探索と修飾構造のプロテオーム解析			
⑥当初の研究目的 (交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。)						
<p>植物の光合成で生じる強い還元力は、電子キャリアー蛋白質であるフェレドキシン (Fd) を電子供与体とするエネルギー・代謝ネットワークに供給される。Fdをめぐってクロストークしている個々のルートの駆動が統合的に制御されることにより、生体成分として量的に過不足のない一定比率の炭素、窒素、硫黄の同化が達成できると考えられる。植物細胞構築の基本原則ともいえるべきこの物質同化の特性がどのような仕組みで発揮されるのか、植物科学上の大きな課題の一つとして21世紀に持ち越されている。本研究は、電子キャリアー蛋白質と酵素群との間における還元力の分配機構という切り口から、この課題に取り組む。具体的には、Fdを電子供与体とする酵素・蛋白質群はFdと電子伝達複合体を形成するので、Fdとの物理的な相互作用力を活用したプロテオーム解析によりそれらを探索・同定し、ネットワークを形成するルートやそこで機能する分子マシナリーの作動機構の完全解明を目的とする。このためには、植物酵素・蛋白質の分子生理学的な研究と、X結晶構造解析、溶液構造解析、質量分析を活用した構造の精密な解析等、多くの手法を動員した研究を展開して、学際的な蛋白質科学の研究領域を創成することを目指す。</p>						

⑦これまでの研究経過

I 本研究は、学術創成研究費の趣旨の3つの観点のうち、どの観点到に主眼を置いて研究を行っているかについてお書きください。

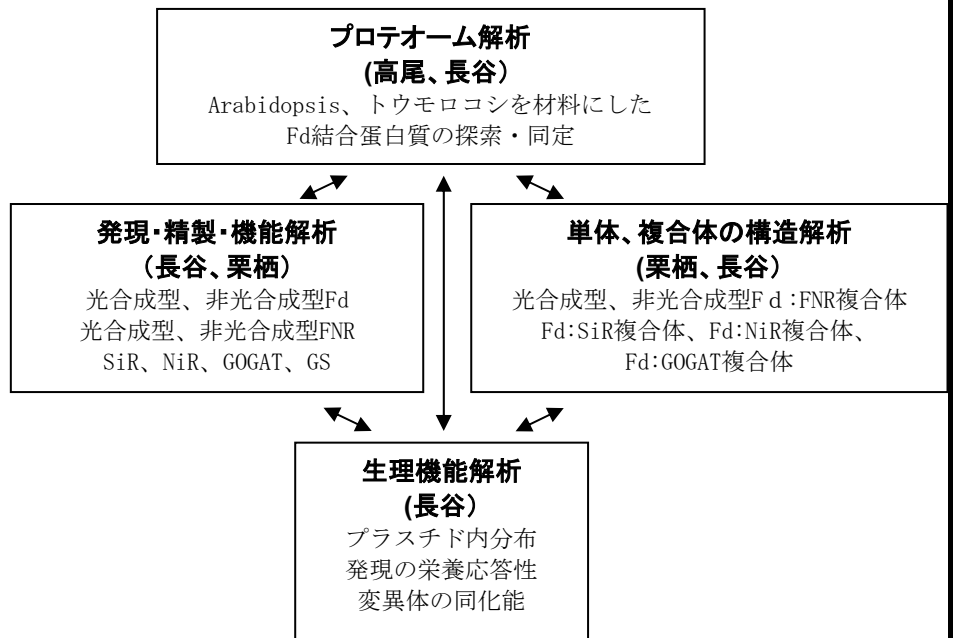
本研究は、植物のエネルギー・代謝系のネットワークの構成員である個々の蛋白質がどのように組み合わされて分子マシナリーが出来上がっているのかを、またそれらがどのように生体反応を駆動するのかを、原子・分子レベルで解明することを目指している。そして、ポストゲノム時代の植物科学の課題に挑戦し、今後の当該分野の発展を念頭に置いた、創造的・革新的・学際的学問領域を創成する使命を持つものと認識して、総合的な蛋白質科学の研究を展開している。

II 研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、研究組織内の連携状況を含め、具体的に記入してください。

Fdを電子供与体とするエネルギー・代謝ネットワークは、葉緑体及びその他の非光合成プラスチドにも存在し、植物体全体で機能している。電子キャリアーであるFd依存性の酸化還元酵素・蛋白質群を、植物体の組織抽出物や葉緑体画分からFdに対する親和性を利用して取り出し、得られた分画をプロテオーム解析し、ゲノム情報を活用して分子種の網羅的同定を行っている。高等植物ではFdが遺伝子ファミリーを形成しており、植物組織ごとのパートナー酵素群との組み合わせにおいて、機能の差異があることを見出した。このFd分子種別やプラスチド種類別の解析も行い、植物体全体の状況を把握した。Fd:NADPH酸化還元酵素 (FNR)、亜硫酸還元酵素 (SiR)、亜硝酸還元酵素 (NiR)、グルタミン酸合成酵素 (GOGAT)、及びそれとサイクルを形成して働くグルタミン合成酵素 (GS)については、生化学的

解析や構造解析を行うため組換え分子の発現・精製、結晶化を行った。結晶構造解析は実験室レベルの回折計や大型放射光Spring-8のビームラインを活用した。溶液状態での複合体形成解析にはNMR分光法も導入した。これらの構造解析の結果、後述したように本研究課題の主軸となる新知見を得ている。物質レベルの知見が集積してきた平成17度には、Fdの電子の分配変異や酵素側のレッドクス制御変異等を導入した、ラン藻細胞や形質転換植物体を作製できるレベルに到達し、研究全体の中期段階へと進みつつある。

これと平行して、マラリア原虫・アピコプラストの Fd/FNR のレッドクスカスケードの解析を進めた。立体構造を決定したマラリア Fd の NMR 解析し、プロトンの HSQC シグナルの帰属を完成した。これにもとづきマラリア FNR との相互作用を解析し、植物酵素とは異なる認識領域が存在することを見出した。



III その他

⑧特記事項

〔 これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入するとともに、推薦者の期待がどの程度達成されつつあるかについて記入してください。 〕

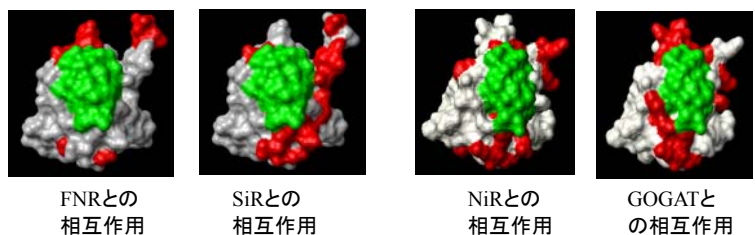
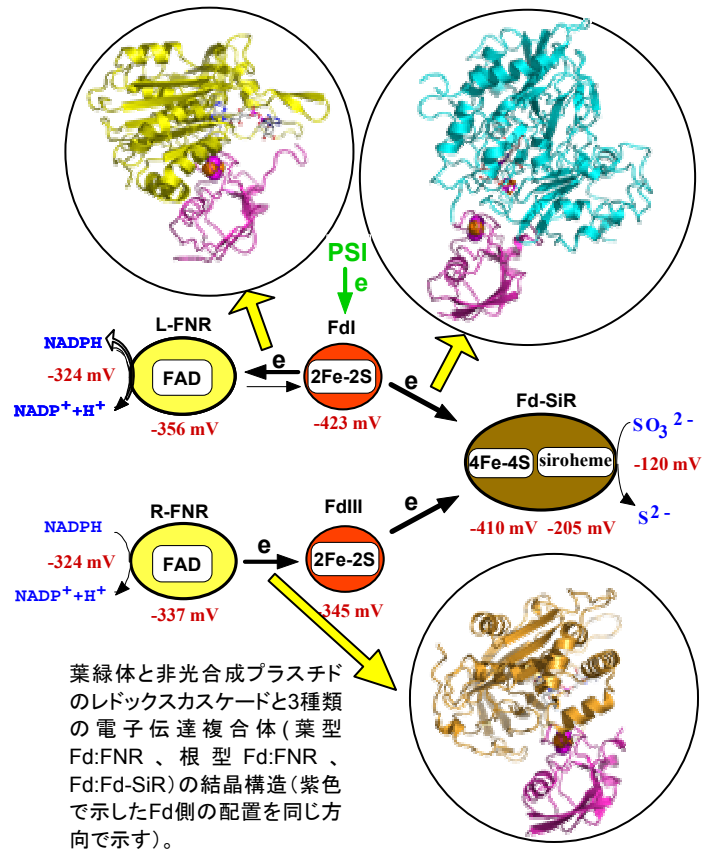
カルビン回路、硝酸・アンモニア同化系、硫酸同化系の酵素群へ還元力を供給するレドックス酵素蛋白質群は、電子分配役を果たすFdとの物理的な相互作用により蛋白質複合体を形成して生理機能を発揮している。このエネルギー・代謝系のネットワークで働く酵素・蛋白質の分子種組成をプロテオーム手法で同定し、次にその複合体を生化学的に調製して、物理化学的特性と立体構造に基づいて分子マシナリーとしての機能を明らかにすることを目指して、これまで研究を進めてきた。右図にその結果の概要を示し、以下に新たな知見と学術的重要性を記す。

1) トウモロコシと Arabidopsis を材料に、葉緑体の L-FNR と FdI、根プラスチドの R-FNR と FdIII の酸化還元中心である FAD と [2Fe-2S] クラスターの酸化還元電位を調べ、葉緑体では Fd から FNR へ、根プラスチドでは FNR から Fd への電子移動に適したものであり、いずれのプラスチドの Fd でも SiR への電子の供給は可能であることを明らかにした。

2) これらの蛋白質間の電子伝達複合体の構造解析を行った。L-FNR:FdI の構造はすでに報告しているが、新たに他の2組についても共結晶構造の決定に成功した。L-FNR と SiR は、FdI との複合体形成にはそれぞれ特有の構造を認識していること、及び Fd:FNR 複合体の場合には光合成と非光合成のレドックスカスケードで相互作用の様式は大きく異なることを見出した。これら3種の複合体では酸化還元中心間の距離は 6Å-12Å となり、電子の授受が直接行なわれることが予想される。

3) 溶液状態での Fd と Fd 依存性酵素群との蛋白質相互作用を NMR 分光法で解析する実験系を新たに立ち上げた。上記の酵素に加え、硝酸還元系で働く NiR とアンモニア同化系で働く GOGAT についても新規の情報を得た。下図に示すように、Fd の相互作用領域は鉄硫黄クラスター側の分子表面である点は酵素全般に共通であるが、相互作用残基は酵素毎に特有であることが判明した。

以上の知見より、現時点での中間まとめが提出できる。光還元力を直接利用する Fd:FNR と異化過程の NADPH を元に働く Fd:FNR とでは、レドックス特性及び電子伝達複合体の形成様式は使い分けられており、これが高等植物の光合成器官と非光合成器官のエネルギー・代謝系を成立させるためのおそらく普遍的な特徴であると考えられる。Fd の電子キャリアーとしての多機能性は、多くの酵素との分子間相互作用に必要な領域を分子表面にかなり広く備えていることにより発揮され、各酵素はその Fd 領域の一部を活用して効率の良い分子間電子移動の複合体を形成している。そして、そのための構造を酵素側も保持していると考えられる。概念的に表現すれば、電子伝達複合体形成機構の普遍性は Fd 側の構造に、多様性は酵素側の構造により支えられており、この構造基盤はシアノバクテリアから高等植物に至る長い進化上で保存されているものと思われる。これは葉緑体のエネルギー・代謝ネットワークのダイナミクスを具体的に記述したものであり、学術上の意義と波及効果は大きいと判断する。



主鎖アミドHSQCの化学シフト変化によるFdの各酵素との相互作用の解析。赤色領域は化学シフト変化が大きい残基、緑色領域は鉄硫黄クラスターの常磁性の影響が及ぶ残基。

⑨研究成果の発表状況

〔 この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。 〕

学術雑誌等に発表した論文

Hase T., Shurman P., and Knaff D.B. (2005) The interaction of ferredoxin with ferredoxin-dependent enzymes
In:Photosystem I, Golbeck J. (ed) Springer, Dordrecht, The Netherlands, in press

Okada, K. and Hase T. (2005) Cyanobacterial non-mevalonate pathway: (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GpcE) interacts with ferredoxin in *Termostynechococcus elongates* BP-1. J. Biol. Chem. in press

Hirasawa M., Nakayama M., Kim S-K., Hase T., and Knaff D.B. (2005) Chemical modification studies of maize chloroplast ferredoxin:sulfite oxidoreductase. Photosyn. Res. in press

Hanke G.T., Okutani S., Satomi Y., Takao T., Suzuki A., and Hase T. (2005) Multiple iso-proteins of FNR in Arabidopsis: Evidence for different contributions to chloroplast function and nitrogen assimilation. Plant Cell Environ. in press

Satomi Y., Kudo Y., Sasaki K., Hase T., and Takao T. (2005) Accurate mass measurement in nano-electrospray ionization mass spectrometry by alternate switching of high voltage between sample and reference sprayers. Rapid Commun Mass Spectrom. 19, 540-6

Kurisu G., Nishiyama D., Kusunoki M., Fujikawa S., Katoh M., Hanke G.T., Hase T., and Teshima K. (2005) A structural basis of *E. arvense* ferredoxin isoform II producing an alternative electron transfer with ferredoxin-NADP⁺ reductase. J. Biol. Chem. 280, 2275-81

Satomi Y., Shimonishi Y., Hase T., and Takao T. (2004) Site-specific carbohydrate profiling of human transferrin by nano-flow liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 18, 2983-8.

Hanke G.T., Kurisu G., Kusunoki M., and Hase T. (2004) Fd:FNR electron transfer complexes: evolutionary refinement of structural interactions. Photosyn. Res. 81, 317-327

Onda Y. and Hase T. (2004) FAD assembly and thylakoid membrane binding of ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase in chloroplasts. FEBS Lett. 564, 116-120

Hirasawa M., Nakayama M., Hase T., Knaff D.B. (2004) Oxidation-reduction properties of maize chloroplast ferredoxin:sulfite oxidoreductase. Biochim. Biophys. Acta, 1608, 140-148

Hanke G.T., Kimata-Arigo Y., Taniguchi I. and Hase T. (2004) A post genomic characterization of *Arabidopsis thaliana* ferredoxins. Plant Physiol. 134, 255-264

Fukuchi-Mizutani M., Okuhara H., Fukui Y., Nakao M., Katsumoto Y., Yonekura-Sakakibara K., Kusumi T., Hase T. and Tanaka Y. (2003) Biochemical and molecular characterization of a novel UDP-Glucose:anthocyanin 3'-O-glucosyltransferase, a key enzyme for blue anthocyanin biosynthesis, from gentian. Plant Physiol. 132, 1652-1663

Teshima K., Fujita S., Hirose S., Nishiyama D., Kurisu G., Kusunoki M., Kimata-Arigo Y., and Hase T. (2003) A ferredoxin Arg-Glu pair important for efficient electron transfer between ferredoxin and ferredoxin-NADP⁺ reductase. FEBS Lett., 546, 189-194

Kada S., Koike H., Satoh K., Hase T., and Fujita Y. (2003) Arrest of chlorophyll synthesis and differential decrease of photosystems I and II in a cyanobacterial mutant lacking light-independent protochlorophyllide reductase. Plant Mol. Biol., 51, 225-235

中山雅登、Guy T. Hanke、長谷俊治（2003）フェレドキシンを要としたプラスチドのレドックス代謝の制御、蛋白質核酸酵素、48、2138-2144

国際会議等における発表
(招待講演)

Hase T., Hanke G.T., Kimata-Arigo Y., Gou Ping, Kusunoki, M., and Kurisu G. Structure and function of electron transfer complex of ferredoxin and ferredoxin:NADP(H) oxidoreductase. 15th International Symposium on Flavins and Flavoproteins. April 17-22, 2005, Shonan

Hase T., A redox cascade in human malaria parasite apicoplast. The Awaji international Forum on Infection and Immunity, August 25-28, 2003, Hyogo

(一般発表)

Saito T., Toyota H., Nakayama M., Ikegami T., Kurisu G., Kusunoki M., and Hase T. Structure analysis of the interaction between plant sulfite reductase and ferredoxin. XX Congress of the International Union of Crystallography, August 23-31, 2005, Florence, Italy

Unno H., Uchida T., Sugawara H., Kurisu G., Sakakibara H., Hase T., and Kusunoki, M. Crystal structure analysis of maize glutamine synthetase. XX Congress of the International Union of Crystallography, August 23-31, 2005, Florence, Italy

Nakayama M., Kurisu G., and Hase T. Structure and characterization of active site of maize sulfite reductase. 6th International Workshop on Plant Sulfur Metabolism, May 17-21, 2005, Chiba

Sato T., Toyota H., Nakayama M., Ikegami T., and Hase T. NMR study of the interaction between plant sulfite reductase and ferredoxin. 6th International Workshop on Plant Sulfur Metabolism, May 17-21, 2005, Chiba