

科学研究費補助金（学術創成研究費）公表用資料
〔事後評価用〕

平成15年度採択分

平成20年 3月31日現在

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

研究課題名（英文）Molecular machinery regulating energy
and metabolic networks in plant cells

研究代表者

氏名 長谷 俊治 (Hase, Toshiharu)

所属研究機関・部局・職 大阪大学・蛋白質研究所・教授



研究の概要：植物の葉緑体のレドックス代謝系で機能している電子キャリアー蛋白質と複数の酸化還元酵素との電子伝達複合体形成の分子間相互作用をX線結晶構造解析やNMR解析で明らかにした。この分子マシナリーの作動原理を *in vitro* と植物個体の両方の実験系で解明した。

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：植物、蛋白質、構造生物学、プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物は炭素、窒素等の無機物を還元同化して、糖、アミノ酸、脂肪酸、核酸等の生体物質を合成する。この独立栄養機能を支える生体反応は、電子キャリアー蛋白質であるフェレドキシン (Fd) を電子供与体として、葉緑体でエネルギー・代謝のネットワークを形成している。

(2) この 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、硫黄の同化が起こる。

(3) 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を、構造生物学の発展により、蛋白質の原子構造レベルで解き明かすことができる時代に入っている。

2. 研究の目的

(1) 葉緑体や非光合成プラスチドでの Fd を介したレドックスカスケードを明らかにする。

(2) Fd と電子の授受を行うパートナー酵素との電子伝達複合体の構造を決定し、蛋白質間の相互作用の構造基盤を明らかにする。

(3) Fd による電子分配の切り口から、このエネルギー・代謝ネットワークの駆動原理を解明する。

3. 研究の方法

(1) 葉緑体や根プラスチドに存在する Fd とその関連酵素・蛋白質群をプロテオーム解析で同定する。

(2) 標的とする酵素・蛋白質群を物理化学的解析が可能な十分量を組換え体として調製する。

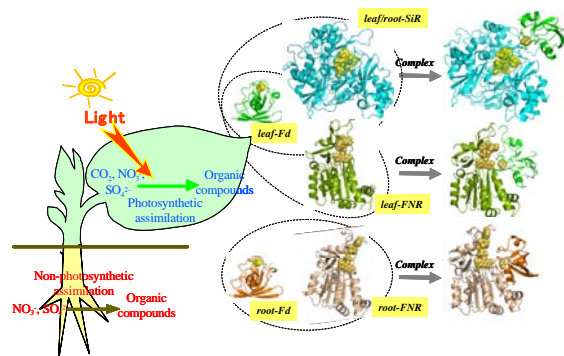
(3) Fd とパートナー酵素との電子伝達複合体の構造を X 線結晶構造解析や NMR 解析で明らかにする。

(4) この構造の知見に基づき、植物の物質同化能の人工的改変を行う。

4. 研究の主な成果

(1) 結晶構造解析

トウモロコシの葉型 Fd、根型 Fd、葉型 FNR、根型 FNR、SiR の単体、及び Fd とそれぞれの酵素との電子伝達複合体の X 線結晶構造を決定した。3 種類の酵素は複合体でそれぞれ



別々に Fd の表面構造を認識していること、Fd:FNR と Fd:SiR の複合体では、酸化還元中心間の距離はそれぞれ 6Å と 12Å となり、電子移動の距離は異なるが共に電子の授受が直接行なわれる位置関係にあることが判明した。

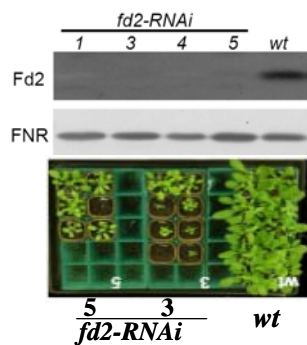
〔4. 研究の主な成果 (続き)〕

(2) NMR解析: ¹⁵NラベルしたFdを用いて、溶液状態でのFd:FNRとFd:SiRとの分子間相互作用をNMR法で解析した。HSQCシグナルの帰属を基にFd分子表面の相互作用領域のマッピングを完成させた。パートナーをFNRにするか、SiRにするかで相互作用領域が異なることが初めて明らかにされた。また、FNRを安定同位体標識して、FNR側のFdとの相互作用領域の解析にも成功した。これにより結晶状態と溶液状態における複合体形成の構造は両方で基本的には一致することが示された。

(3) 植物個体における物質同化の解析: 2分子種の葉型FNRのうち一方をノックアウトした変異体シロイヌナズナを選別した。下図に示すようにFNR1とFNR2共にストロマ(S)とチラコイド膜(M)に2重の分布を示すが、FNR1を欠損するとFNR2の大部分がストロマに局在するようになる。FdやNiRは不変である。このFNRの量的減少と局在性の変化をきたした植物体では、野生型に比べ、NADP⁺の光還元系より亜硝酸還元系への電子分配が優先された。炭素と窒素への還元力配分が変化し、硝酸イオンが欠乏する条件下では、むしろ変異体の方が野生型よりバイオマスが増える傾向を示した。



葉型Fd2のRNAiラインを用いて、特定のFd分子種の減少の影響を調べた。下図に示すように、Fd2のノックダウンが植物の生育不全をもたらすこと、非循環的電子伝達が低下し、光化学系2が還元状態になることが分かった。Fd分子種の存在量、即ちFNRとの比率が電子伝達の効率や分配を決める要因であることがin vivoの実験系で示された。興味深いことはFd2のRNAiラインではFd量が野生型の10分の1以下に低下しているが、植物体が低速度で生育できる光合成能は保持される。この制限状態でのレドックスカスケードの作動制御やストレス対応の仕組みは、今後の課題として残されている。



5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

(1) Fdやその他の電子キャリアー蛋白質が関係する生体の酸化還元反応を化学、生物学の分野で研究しているグループは世界に多数あり、今回の電子伝達複合体の蛋白質・蛋白質相互作用を原子レベルで明らかにした一連の成果は、物質科学や生命科学における重要な情報である。

(2) Fdを介した還元力の分配機能の切り口から、Fdとその依存性酵素・蛋白質群との分子種の組み合わせや量的関係で、葉緑体内の複数の電子の流れが決められている実験的根拠を示した。植物の炭酸固定や窒素同化等、一次同化機能の制御を目指した研究分野にインパクトを与える。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

(1) Hanke G.T., Endo T., Satoh F., **Hase T.**; Altered photosynthetic electron channeling into cyclic electron flow and nitrite assimilation in a mutant of ferredoxin:NADP(H) reductase. *Plant Cell Environ.*, (2008) doi: 10.1111/j.1365-3040

(2) Kimata-Arigo Y., Saitoh T., Ikegami T., Horii T., **Hase T.**; Molecular interaction of Ferredoxin and Ferredoxin-NADP⁺ reductase from human malaria parasite. *J. Biochem.*, 142, 715-720 (2007)

(3) **Hase T.**, Shurman P., Knaff D.; The interaction of ferredoxin with ferredoxin-dependent enzymes. In: Golbeck J (ed) *Photosystem 1*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 477-498 (2006)

(4) Unno H., Uchida T., Sugawara H., Kurisu G., Sugiyama T., Yamaya T., Sakakibara H., **Hase T.**, Kusunoki M.; Atomic structure of plant glutamine synthetase: a key enzyme for plant productivity. *J. Biol. Chem.*, 281, 29287-29296 (2006)

(5) Saitoh T., Ikegami T., Nakayama M., Teshima K., Akutsu H., **Hase T.**; NMR study of the electron transfer complex of plant ferredoxin and sulfite reductase: Mapping the interaction sites of ferredoxin. *J. Biol. Chem.*, 281, 10482-10488 (2006)

(6) Okutani S., Hanke G.T., Satomi Y., Takao T., Kurisu G., Suzuki A., **Hase T.**; Three maize leaf ferredoxin:NADP(H) oxidoreductases vary in sub-chloroplast location, expression, and interaction with ferredoxin. *Plant Physiol.*, 139, 1451-1459 (2005)

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