

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

|                   |                                                                                                                                                                                              |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 題目(和文)            | 葉緑体ATP合成酵素のプロトン駆動力依存的な酸化還元制御機構                                                                                                                                                               |
| Title(English)    |                                                                                                                                                                                              |
| 著者(和文)            | 関口敬俊                                                                                                                                                                                         |
| Author(English)   | Takatoshi Sekiguchi                                                                                                                                                                          |
| 出典(和文)            | 学位:博士(理学),<br>学位授与機関:東京工業大学,<br>報告番号:甲第12345号,<br>授与年月日:2023年3月26日,<br>学位の種別:課程博士,<br>審査員:久堀 徹,若林 憲一,田中 寛,瀧ノ上 正浩,田口 英樹,増田 真二,山田 康之                                                           |
| Citation(English) | Degree:Doctor (Science),<br>Conferring organization: Tokyo Institute of Technology,<br>Report number:甲第12345号,<br>Conferred date:2023/3/26,<br>Degree Type:Course doctor,<br>Examiner:,,,,,, |
| 学位種別(和文)          | 博士論文                                                                                                                                                                                         |
| Category(English) | Doctoral Thesis                                                                                                                                                                              |
| 種別(和文)            | 要約                                                                                                                                                                                           |
| Type(English)     | Outline                                                                                                                                                                                      |

2022 年度 博士論文

葉緑体 ATP 合成酵素の  
プロトン駆動力依存的な酸化還元制御機構

東京工業大学 生命理工学院

生命理工学系 ライフエンジニアリングコース

久堀・若林研究室

関口 敬俊

指導教員 久堀 徹 教授

副指導教員 若林 憲一 准教授

---

## 略語

|                                 |                                                          |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------|
| ACHT                            | atypical Cys His-rich thioredoxin                        |
| ACMA                            | 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine                       |
| ADP                             | adenosine 5'-diphosphate                                 |
| AMS                             | 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid   |
| ATP                             | adenosine 5'-triphosphate                                |
| BPB                             | bromophenol blue                                         |
| CBB                             | coomassie brilliant blue                                 |
| CF <sub>0</sub>                 | chloroplast F <sub>0</sub>                               |
| CF <sub>0</sub> CF <sub>1</sub> | chloroplast F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATP synthase  |
| CF <sub>1</sub>                 | chloroplast F <sub>1</sub>                               |
| CRISPR                          | clustered regularly interspaced short palindromic repeat |
| Cyt c                           | cytochrome c                                             |
| DEAE                            | diethylaminomethyl                                       |
| Diamide                         | 1,1'-Azobis(N,N-dimethylformamide)                       |
| DTT <sub>ox</sub>               | oxidized dithiothreitol                                  |
| DTT <sub>red</sub>              | reduced dithiothreitol                                   |
| EDTA                            | ethylenediaminetetraacetic acid                          |
| FAD                             | flavin adenine dinucleotide                              |
| FBPase                          | fructose-1,6-bisphosphatase                              |
| FCCP                            | carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone     |
| Fd                              | ferredoxin                                               |
| FNR                             | ferredoxin-NADP <sup>+</sup> oxidoreductase              |
| F <sub>0</sub>                  | oligomycin-sensitive coupling factor                     |
| FTR                             | ferredoxin-thioredoxin reductase                         |
| F <sub>1</sub>                  | coupling factor 1                                        |
| G6PDH                           | glucose-6-phosphate dehydrogenase                        |
| IPTG                            | isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside                    |
| MES                             | 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid                     |
| NADH                            | nicotinamide adenine dinucleotide                        |
| NADPH                           | nicotinamide adenine dinucleotide phosphate              |
| NADP-MDH                        | malate dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> )                |
| Ni-NTA                          | Ni-nitrilotriacetic acid                                 |
| NPQ                             | non-photochemical quenching                              |
| NTRC                            | NADPH-dependent thioredoxin reductase C                  |

|                  |                                                 |
|------------------|-------------------------------------------------|
| OD               | optical density                                 |
| PC               | plastocyanin                                    |
| PMS              | phenazine methosulfate                          |
| PQ               | plastoquinone                                   |
| PQH <sub>2</sub> | plastoquinol                                    |
| PrxQ             | peroxiredoxin Q                                 |
| Q                | quinol                                          |
| QH <sub>2</sub>  | ubiquinol                                       |
| RCA              | Rubisco activase                                |
| Rubisco          | ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase |
| SBPase           | sedoheptulose-1,7-bisphosphatase                |
| SDS              | sodium dodecyl sulfate                          |
| SDS-PAGE         | SDS-polyacrylamide gel electrophoresis          |
| Tris             | tris(hydroxymethyl)aminomethane                 |
| Trx              | thioredoxin                                     |
| TrxL2            | thioredoxin-like 2                              |
| 1-Methoxy PMS    | 1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate     |
| 2-Cys Prx        | 2-cystein peroxiredoxin                         |

---

## 目次

### 第 1 章

|                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------|----|
| 1-1. ATP の生合成機構 .....                                     | 8  |
| 1-2. $F_0F_1$ -ATP 合成酵素とは.....                            | 10 |
| 1-3. 葉緑体 ATP 合成酵素 $CF_0CF_1$ の活性制御機構 .....                | 11 |
| 1-3-1. 酸化還元制御.....                                        | 11 |
| 1-3-2. $\Delta\mu H^+$ による活性化.....                        | 13 |
| 1-3-3. 酸化還元制御と $\Delta\mu H^+$ activation の協同的なはたらき ..... | 14 |
| 1-4. Trx とは.....                                          | 15 |
| 1-5. $CF_1\gamma$ の Trx による還元の特徴 .....                    | 17 |
| 1-5-1. $CF_1\gamma$ の Trx に対する選択性.....                    | 17 |
| 1-5-2. $CF_1\gamma$ の迅速な <i>in vivo</i> 光還元応答 .....       | 19 |
| 1-6. Trx 標的タンパク質の酸化過程.....                                | 21 |
| 1-7. 本研究の目的 .....                                         | 23 |
| 1-7-1. Trx 以外の $CF_1\gamma$ の還元経路の決定 .....                | 23 |
| 1-7-2. $CF_1\gamma$ の酸化制御機構.....                          | 23 |
| 1-7-3. $\Delta pH$ と $\Delta\Psi$ の酸化還元制御への寄与度の違い .....   | 23 |

### 第 2 章

|                                                  |    |
|--------------------------------------------------|----|
| 2-1. 本章の概要 .....                                 | 25 |
| 2-2. 実験方法 .....                                  | 26 |
| 2-2-1. 組換えタンパク質の発現.....                          | 26 |
| 2-2-2. 組換えタンパク質の精製.....                          | 26 |
| 2-2-2-1. Trx-f1 の精製.....                         | 26 |
| 2-2-2-2. FNR、FTR の精製 .....                       | 27 |
| 2-2-2. Fd の精製.....                               | 27 |
| 2-2-3. ホウレンソウ緑葉からチラコイド膜の調製.....                  | 28 |
| 2-2-4. クロロフィル定量.....                             | 28 |
| 2-2-5. $CF_1\gamma$ の <i>in vitro</i> 還元実験 ..... | 29 |
| 2-2-6. $CF_1\gamma$ の酸化還元状態の決定.....              | 30 |
| 2-3. 結果 .....                                    | 31 |
| 2-3-1. FNR、Fd、FTR の精製.....                       | 31 |
| 2-3-2. Fd/Trx システムによる $CF_0CF_1$ の還元.....        | 31 |
| 2-3-3. グルタチオンが Fd/Trx システムへ及ぼす影響 .....           | 33 |
| 2-4. 考察 .....                                    | 35 |
| 2-4-1. Fd/Trx システムによる $CF_0CF_1$ の還元.....        | 35 |
| 2-4-2. 生体内の $CF_1\gamma$ の還元機構.....              | 36 |

### 第3章

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| 3-1. 本章の概要                                                             | 39 |
| 3-2. 実験方法                                                              | 40 |
| 3-2-1. 組換えタンパク質の発現                                                     | 40 |
| 3-2-2. 組換えタンパク質の精製                                                     | 40 |
| 3-2-2-1. TrxL2.1、TrxL2.2 の精製                                           | 40 |
| 3-2-2-2. ACHT1、ACHT2 の精製                                               | 40 |
| 3-2-2-3. Trx-m1 の精製                                                    | 41 |
| 3-2-2-4. Trx-x、Trx-y2 の精製                                              | 41 |
| 3-2-3. ホウレンソウ緑葉からの還元型 CF <sub>0</sub> CF <sub>1</sub> を含むチラコイド膜の調製     | 41 |
| 3-2-3-1. ホウレンソウ緑葉への光照射および還元剤の浸潤処理                                      | 41 |
| 3-2-3-2. 通常の方法でチラコイド膜を調製後、組換え Trx で CF <sub>1</sub> -γ を還元             | 43 |
| 3-2-4. プロトン輸送活性の測定                                                     | 44 |
| 3-2-5. CF <sub>1</sub> -γ の <i>in vitro</i> 酸化実験                       | 45 |
| 3-3. 結果                                                                | 46 |
| 3-3-1. ホウレンソウ緑葉からの還元型 CF <sub>0</sub> CF <sub>1</sub> を含むチラコイド膜の調製     | 46 |
| 3-3-2. プロトン輸送活性の測定                                                     | 47 |
| 3-3-3. CF <sub>1</sub> -γ の <i>in vitro</i> 酸化実験                       | 48 |
| 3-3-3-1. Trx 様タンパク質による CF <sub>1</sub> -γ の酸化                          | 48 |
| 3-3-3-2. Trx による CF <sub>1</sub> -γ の酸化                                | 55 |
| 3-4. 考察                                                                | 58 |
| 3-4-1. ホウレンソウ緑葉からの還元型 CF <sub>0</sub> CF <sub>1</sub> を含むチラコイド膜の調製     | 58 |
| 3-4-2. CF <sub>1</sub> -γ の <i>in vitro</i> 酸化実験                       | 58 |
| 3-4-2-1. CF <sub>1</sub> -γ の ΔμH <sup>+</sup> 依存的な酸化の観察               | 58 |
| 3-4-2-2. ΔμH <sup>+</sup> によって誘導される CF <sub>1</sub> -γ の構造変化と酸化還元制御の関係 | 59 |
| 3-4-2-3. 生体内での CF <sub>1</sub> -γ の酸化因子                                | 60 |

### 第4章

|            |    |
|------------|----|
| 4-1. 本章の概要 | 63 |
|------------|----|

### 第5章

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| 5-1. 本研究から明らかになったこと                            | 65 |
| 5-1-1. 各章の研究結果の要約                              | 65 |
| 5-1-2. CF <sub>0</sub> CF <sub>1</sub> の活性制御機構 | 66 |
| 5-1-2-1. これまでの研究と本研究の比較                        | 66 |
| 参考文献                                           | 67 |
| 研究業績書                                          | 73 |
| 学位論文                                           | 73 |

---

|                 |    |
|-----------------|----|
| 学位に含まれない論文..... | 73 |
| 学会発表 .....      | 73 |
| 受賞歴 .....       | 74 |
| 競争的研究費の獲得 ..... | 74 |
| 謝辞 .....        | 75 |

# 第 1 章

## 序論

---

## 1-1. ATP の生合成機構

生体内で起こるタンパク質や核酸の生合成・分解、膜間のイオン輸送、細胞内輸送や筋収縮のような反応は、自発的には起こらない吸エルゴン反応である。これらの反応の進行には、外部からのエネルギー供給を必要とする。生体内では、発エルゴン反応である ATP の加水分解と共役させることで、これらの生理的に重要な反応を可能にしている。高エネルギー化合物である ATP はあらゆる生物種で利用され、「生体内のエネルギー通貨」と呼ばれる。

ATP の生合成は、嫌気的反応と好気的反応の 2 過程に分かれる。まず、嫌気的反応では、細胞質中の解糖系の酵素群によって、1 分子のグルコースから 2 分子のピルビン酸に分解されるまでに、2 分子の ATP が得られる。嫌気的反応による ATP 合成は、高エネルギー化合物の代謝中間体から ADP へリン酸基を転移させることから、「基質レベルのリン酸化」と呼ばれる。これに対して、好気性細菌の形質膜や真核生物のミトコンドリアで行われる好気的反応では、2 分子のピルビン酸が二酸化炭素に完全酸化されるまでに、約 36 分子の ATP が得られる。好気的反応による ATP 合成は、ピルビン酸の酸化過程で生じる NADH や FADH<sub>2</sub> が、ミトコンドリア内膜や好気性細菌の形質膜に存在する電子伝達系によって酸化されることから、「酸化リン酸化」と呼ばれる。また、植物の葉緑体内に発達したチラコイド膜にも、類似した光合成電子伝達系が存在する。こちらは、光エネルギーを利用して ADP をリン酸化する「光リン酸化」であり、光合成のエネルギー合成過程として知られる。

「酸化リン酸化」と「光リン酸化」の電子伝達系における ATP 合成機構は、Mitchel の化学浸透圧説に基づき (1)、Jagendorf らによって実証された (2)。ここでは、葉緑体の光リン酸化について簡単に説明する (図 1-1A)。葉緑体の内部には、チラコイド膜と呼ばれる膜胞が発達しており、この膜中に光合成電子伝達系が存在する。光合成電子伝達系は、2 つの光化学系 (PS) とシトクロム *b<sub>6</sub>f*、および電子伝達体の PQ と PC から構成される。まず、光によって励起した PSII が、1 分子の水から 2 電子を引き抜き、チラコイド膜内腔のルーメンへと 2H<sup>+</sup>が放出される (実際には、2 分子の水から電子を 4 回引き抜いて 1 分子の酸素が発生する)。PSII が水から奪った電子は、PQ へと渡される。この時、PQ は 2 電子還元を受けた後、膜外のストロマ画分から 2H<sup>+</sup>を受け取り、還元型 PQ (PQH<sub>2</sub>) となる。そして、PQH<sub>2</sub> がシトクロム *b<sub>6</sub>f* へと 2 電子を渡すとともに、2H<sup>+</sup>がルーメンへと放出される。シトクロム *b<sub>6</sub>f* へと渡った 2 電子のうち、1 電子は PC を経て PSI へと渡る。また、残りのもう 1 電子は別の PQ へと渡される (つまり、結局 1 電子当たり 2H<sup>+</sup>がルーメンへと輸送されたことになる)。そして、光によって励起した PSI は、Fd や FNR のような酵素を介して、NADP<sup>+</sup>を還元する。以上のようにして、光合成電子伝達系が 1 分子の水から電子を引き抜き NADP<sup>+</sup>を還元するのに伴い、水分子の分解による 2H<sup>+</sup>の発生とストロマからの 4H<sup>+</sup>の輸送による計 6H<sup>+</sup>がルーメンへ放出され、結果としてチラコイド膜内外には H<sup>+</sup>濃度勾配 (および膜電位差) が形成される。そして、同じくチラコイド膜に存在する F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素が、この H<sup>+</sup>の電気化学的勾配を利用して、ATP を合成する。

また、ミトコンドリアの酸化リン酸化では、ピルビン酸の酸化過程によって生じた NADH と FADH<sub>2</sub> の酸化に伴って、電子伝達系が膜内外に H<sup>+</sup> 電気化学的勾配を形成する (図 1-1B)。これを利用して、F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素が ATP を合成する。

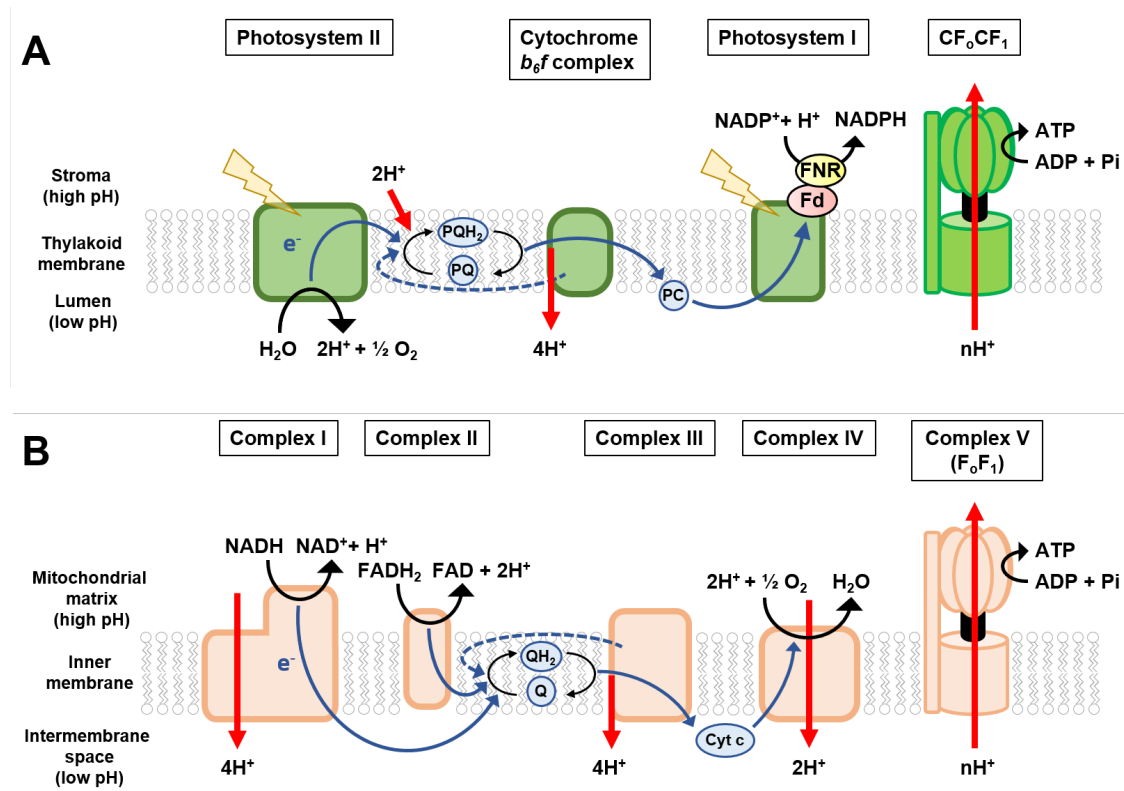


図 1-1. 電子伝達系による ATP の生合成機構  
 (A) 葉緑体チラコイド膜の光合成電子伝達系のモデル図。  
 (B) ミトコンドリア内膜の電子伝達系のモデル図。

## 1-2. F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素とは

F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素は、細菌の形質膜や真核生物のミトコンドリア内膜、葉緑体のチラコイド膜などに普遍的に存在する膜酵素である。生物は、呼吸や光合成によって電子伝達系を駆動した際、化学エネルギーや光エネルギーを、閉じた膜系の内外にH<sup>+</sup>濃度差 ( $\Delta pH$ ) と電位差 ( $\Delta \Psi$ ) からなる電気化学勾配 ( $\Delta \mu H^+$ ) として蓄える。F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素は、この  $\Delta \mu H^+$  を駆動力として利用し、膜を介した H<sup>+</sup> 輸送と共役して、ADP と無機リン酸から ATP を合成する (3)。このことから、 $\Delta \mu H^+$  は、プロトン駆動力とも呼ばれる。

F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素は、膜内在性の F<sub>0</sub> 部位 (4) と膜表在性の F<sub>1</sub> 部位 (5) から構成される (図 1-2)。F<sub>0</sub> は、 $ab_2c_{10-15}$  のサブユニットから構成され、膜を介した H<sup>+</sup> 輸送を担う。F<sub>0</sub> において、H<sup>+</sup> 結合部位を持つ  $c$  サブユニットは、環状の多量体を形成することから  $c$  リングと呼ばれ、生物種ごとに  $c$  リングを構成する  $c$  サブユニットの数が異なる (ホウレンソウの場合は  $c_{14}$  (6-8))。F<sub>1</sub> は、 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  のサブユニットから構成され、ATP 合成/加水分解を行う。また、F<sub>1</sub> は、単独で ATP 加水分解反応を触媒することから、F<sub>1</sub>-ATPase とも呼ばれる。

ATP の合成反応時には、 $\Delta \mu H^+$  が解消する方向への H<sup>+</sup> の輸送に伴い、F<sub>0</sub> の  $c$  リングが F<sub>0</sub> 側から見て時計回りに回転する。これが、F<sub>1</sub> の中心軸である  $\gamma\epsilon$  の回転を引き起こす。 $\gamma\epsilon$  の回転は、触媒部位を含む  $\alpha_3\beta_3$  の構造変化を誘導し、ATP 合成反応が進行する。

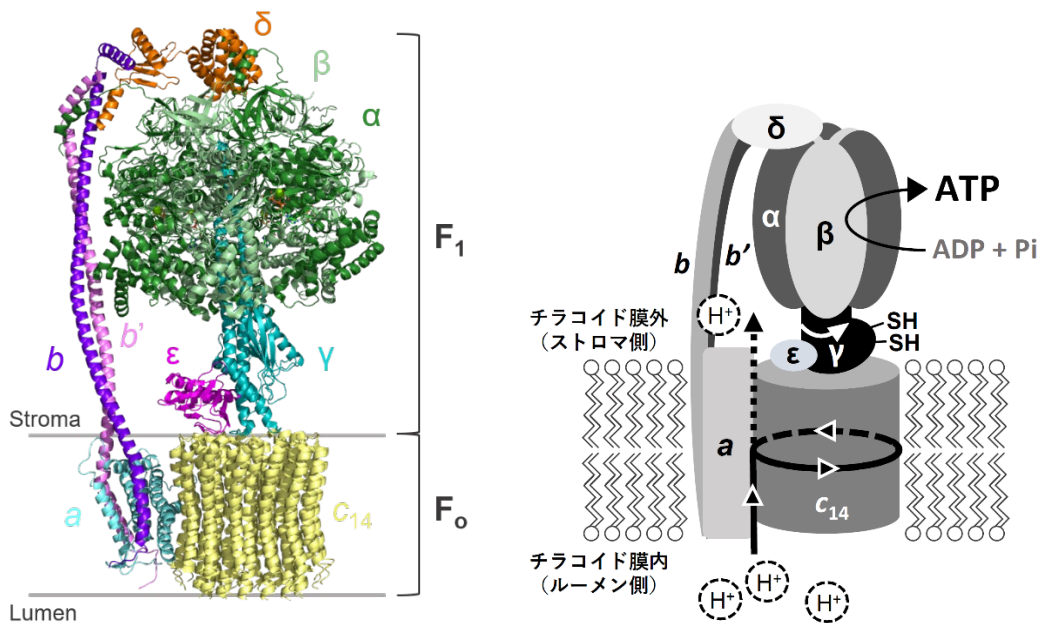


図 1-2. F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素の構造

(左) ホウレンソウ葉緑体 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素の構造 (PDB: 6FKF)。

(右) 葉緑体 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素のモデル図。

### 1-3. 葉緑体 ATP 合成酵素 $\text{CF}_0\text{CF}_1$ の活性制御機構

葉緑体 (Chloroplast)  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP 合成酵素  $\text{CF}_0\text{CF}_1$  は、植物のチラコイド膜に存在し、光合成電子伝達系によって形成される膜内外の  $\Delta\mu\text{H}^+$  を駆動力として ATP 合成を行う。 $\text{CF}_0\text{CF}_1$  の基本構造は、他の生物種の  $\text{F}_0\text{F}_1$  と同じであり、ATP 合成の分子機構も共通している。しかし、 $\text{CF}_0\text{CF}_1$  だけは、光合成の電子伝達系によって形成される  $\Delta\mu\text{H}^+$  を駆動力としている。すなわち、十分な  $\Delta\mu\text{H}^+$  が形成されない暗所では、 $\text{CF}_0\text{CF}_1$  が ATP を加水分解して消費してしまい、植物がエネルギー的に不利な状況に陥る可能性がある。そこで、 $\text{CF}_0\text{CF}_1$  には、とりわけ  $\Delta\mu\text{H}^+$  の形成状況、つまり光環境に厳密に応答する特有の活性制御機構が備わっている。

#### 1-3-1. 酸化還元制御

緑色植物や緑藻の  $\text{CF}_0\text{CF}_1$  の  $\gamma$  サブユニット ( $\text{CF}_1\text{-}\gamma$ ) には、N 末端と C 末端の  $\alpha$  ヘリックスに挟まれたロスマンフォールド部分に、約 40 アミノ酸残基の特有な領域が存在する (9) (図 1-3)。この領域は、回転軸に寄り添うように配置された  $\beta$ -hairpin 構造を取り、 $\beta$  サブユニットに高度に保存された DELSEED モチーフと相互作用することが示唆されている (7,10) (図 1-4)。そして、この領域に含まれる 2 つの Cys 残基は、葉緑体内の酸化還元状態に応答する活性制御スイッチとして機能する。1988 年、二井らによってホウレンソウ  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  の cDNA が解読され、これらの Cys の一次配列中の位置が決定された (葉緑体移行シグナルペプチドの切断後の N 末端の Ala から数えて Cys199 と Cys205) (11)。暗所では、このスイッチは酸化されてジスルフィド結合を形成し、酵素は不活性化される。これに対して、明所では、還元されてジスルフィド結合が開裂し、酵素は活性化する。そして、この活性制御スイッチのジスルフィド結合は、光合成の電子伝達系から間接的に還元力を受け取るチオレドキシン (Trx) によって行われる (12,13)。

|                       | 180                     | 190                                   | 200                          | 210            | 220        | 230   | 240 | 250 |
|-----------------------|-------------------------|---------------------------------------|------------------------------|----------------|------------|-------|-----|-----|
| <i>S. oleracea</i>    | VSLVKSDPVIHTLLPLSPKGEI  | CDINGK                                | VDAAEDELFRLLTKEGKLTVERDMIKT  | ETPAFSPILEFEQD | PAQILDAL   |       |     |     |
| <i>P. sativum</i>     | VSLVKSNPIIHTLLPLSPKGEI  | CDINGN                                | VDAAEDELFRLLTKEGKLTVERDVIRS  | KTVDSPILQFEQD  | PVQILDAL   |       |     |     |
| <i>A. thaliana</i>    | VSLVKSEPVIIHTLLPLSPKGEI | CDINGT                                | VDAAEDEFRLTKEGKLTVERETFR     | PTADFSPILOFEQD | PVQILDAL   |       |     |     |
| <i>N. tabacum</i>     | VSLVKSEPVIIHTLLPLSPKGEI | CDINGN                                | VDAAEDEFRLTKEGKLTVERDIIRT    | KTDFSPILQFEQD  | PVQILDAL   |       |     |     |
| <i>C. reinhardtii</i> | ISLINSNPTIQTLLPMTFPMGEL | CDVDGK                                | VDAAADDEIFKLTTKGGEFAVEREKTTI | ETEALDPSLIFEQE | PAQILDAL   |       |     |     |
| <i>T. elongatus</i>   | VSLISSKPVVQTLPLDPQG     | LEADDEIFRLTTRGSHLEVNREKVT             | TLFALPSDMIFEQD               | PLQILDAL       |            |       |     |     |
| <i>A. 7120</i>        | VSLVSSRPVIOQLPLDTQG     | LEAADDEIFRLTTRGGQFQVERQTVTS           | QARPLPRDMIFEQD               | PVQILDSL       |            |       |     |     |
| <i>S. 6803</i>        | VSLISSQPVVQTLPLDPQG     | LEADDEIFRLTTRGGQFQVEREKVEA            | PVESFPQDMIFEQD               | PVQILEAL       |            |       |     |     |
| <i>C. merolae</i>     | VSLISSKPSIRTMLPLTPVG    | LEMEGDEIFQLTTEEGKFAVKRSFQKPSPEAIEITPD | DMIFEQD                      | PLQLNAL        |            |       |     |     |
| <i>B. PS3</i>         | VSAIQQEVTERKLLPLTDLAEN  |                                       |                              | KQRTVYEFEP     | QEEILDVL   |       |     |     |
| <i>E. coli</i>        | INTMSQVPTISQLPLPASDDD   |                                       |                              | DLKHKSWDYL     | EPD        | PKALD | TL  |     |
| <i>S. cerevisiae</i>  | VSSLSFEPSEKFI           | FNAKTIEQ                              |                              | SFSFGKEID      | TDANVPRDL  |       |     |     |
| <i>B. taurus</i>      | RSVISYKTEEFIFSLDTISS    |                                       |                              | AESMSIYD       | DIDADVLRNY |       |     |     |
|                       | .                       | .                                     | .                            | .              | .          | .     | .   | .   |

図 1-3.  $\gamma$  サブユニットのアミノ酸配列の比較

*S. oleracea*, *Spinacia oleracea*; *P. sativum*, *Pisum sativum*; *A. thaliana*, *Arabidopsis thaliana*; *N. tabacum*, *Nicotiana tabacum*; *C. reinhardtii*, *Chlamydomonas reinhardtii*; *T. elongatus*, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1; *A. 7120*, *Anabaena* sp. PCC 7120; *S. 6803*, *Synechocystis* sp. PCC 6803; *C. merolae*, *Cyanidioschyzon merolae*; *B. PS3*, *Bacillus PS3*; *E. coli*, *Escherichia coli*; *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae*; *B. taurus*, *Bos taurus* (Bovine)の $\gamma$ サブユニットの配列を比較した。多重配列アライメント解析は、デフォルトのパラメーター設定の Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)を使用した。配列の上に表示した数字は、*S. oleracea*のCF<sub>1</sub>- $\gamma$ における、葉緑体移行シグナルペプチドの切断後のN末端のAlaから数えた残基番号を示す。配列の下に表示した記号は、コンセンサス（“:”, strongly similar; “.”, weakly similar）を示す。黒色で示したCys残基がCF<sub>1</sub>- $\gamma$ の活性制御スイッチに相当する。

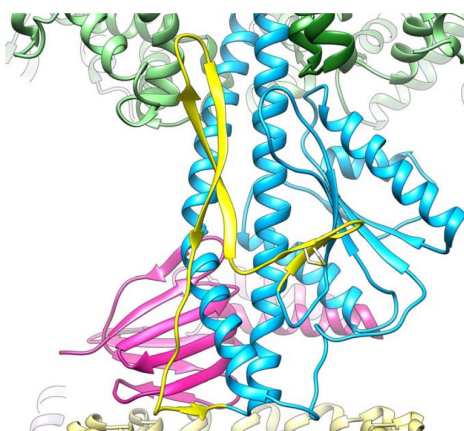


図 1-4. CF<sub>1</sub>- $\gamma$ の活性制御領域の構造

中央に位置する黄色で示した部分がCF<sub>1</sub>- $\gamma$ の活性制御領域に相当する。 $\beta$ -hairpinのLoop構造が $\beta$ サブユニット（薄緑）と相互作用する。他のサブユニットの配色は図 1-2 を参照。文献 (7) より抜粋改変。

### 1-3-2. $\Delta\mu\text{H}^+$ による活性化

$\text{CF}_0\text{CF}_1$  は、膜内外に閾値以上の  $\Delta\mu\text{H}^+$  が形成されなければ、酵素活性を示さない (14,15)。この  $\Delta\mu\text{H}^+$  による活性化 ( $\Delta\mu\text{H}^+$  activation) は、 $\Delta\mu\text{H}^+$  によって誘導される  $\text{CF}_1$  の構造変化に由来するものと考えられる。1990 年代、高木によって、チラコイド膜上の  $\text{CF}_1$  における、 $\beta$ 、 $\gamma$  および  $\epsilon$  サブユニット上のいくつかの Lys 残基が、光条件下でのみピリドキサルリン酸によって修飾されるという実験結果が報告された (16-18)。すなわち、各サブユニットにおいて、暗所では溶液中に露出していない領域が、 $\Delta\mu\text{H}^+$  によって誘導された構造変化により分子表面に露出した結果、その領域上の Lys がピリドキサルリン酸によって修飾可能になったものと考えられる。また、 $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  の活性制御領域上にも、ピリドキサルリン酸による標識効率が増加した Lys 残基が存在する (Lys222、Lys231)。

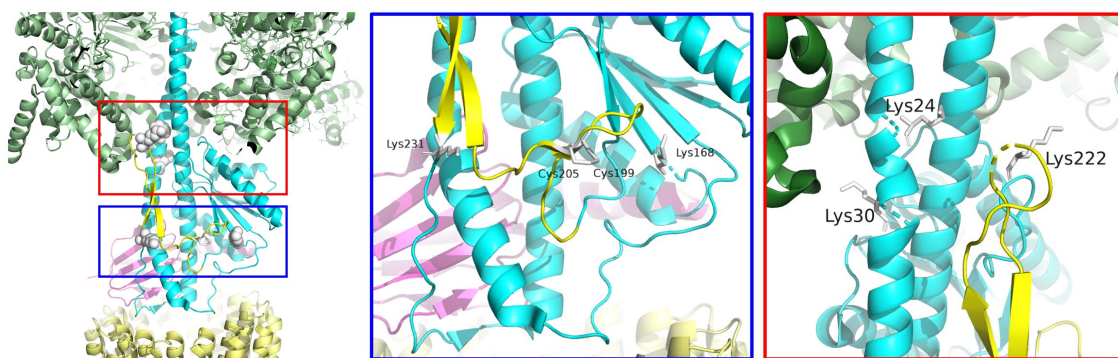


図 1-5. ピリドキサルリン酸による  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  の標識実験 (文献 (18))

(左) チラコイド膜への光照射によって、ピリドキサルリン酸による標識効率が増加した Lys 残基を球状表示で示した。(中央青枠、右赤枠) 該当する Lys 残基を拡大表示した。各サブユニットの配色は図 1-3 を参照。(PDB: 6FKH)

### 1-3-3. 酸化還元制御と $\Delta\mu\text{H}^+$ activation の協同的なはたらき

$\text{CF}_0\text{CF}_1$  の酸化還元制御と  $\Delta\mu\text{H}^+$  activation の 2 つの活性制御機構は、互いに協同してはたらくことが明らかになっている。1980 年代に、Junesh と Gräber らは、 $\text{CF}_0\text{CF}_1$  が、酸化還元状態とチラコイド膜内外の  $\Delta\mu\text{H}^+$  の形成状況に応じて、酵素活性の異なる 4 つの状態を示すことを報告した (図 1-6) (15,19)。彼らは、チラコイド膜に対して還元剤  $\text{DTT}_{\text{red}}$  を加えることで、 $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  の酸化還元状態をコントロールした。まず、膜内外に  $\Delta\text{pH}$  を形成しない時、 $\text{CF}_0\text{CF}_1$  は、酸化型 ( $\text{E}_i^{\text{ox}}$ )、還元型 ( $\text{E}_i^{\text{red}}$ ) に関わらず、ATP 合成活性・加水分解活性のいずれも示さなかった。次に、チラコイド膜内を低 pH 緩衝液で平衡化した後、高 pH 緩衝液に移すことで、チラコイド膜内外に任意の  $\Delta\text{pH}$  を形成させた。すると、 $\text{CF}_0\text{CF}_1$  は、酸化型 ( $\text{E}_a^{\text{ox}}$ ) と還元型 ( $\text{E}_a^{\text{red}}$ ) のどちらも酵素活性を示した。この時、酸化型 ( $\text{E}_a^{\text{ox}}$ ) と比べて、還元型 ( $\text{E}_a^{\text{red}}$ ) は、酵素活性を示し始める  $\Delta\text{pH}$  の閾値が低下していた。以上のように、酸化還元制御と  $\Delta\mu\text{H}^+$  activation は、それぞれ協同して  $\text{CF}_0\text{CF}_1$  の酵素活性の制御に寄与する。

また、チラコイド膜内外の  $\Delta\mu\text{H}^+$  の形成状況に応じて、 $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  の還元効率が変化することも明らかになっている。 $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  は、光照射下で膜内外に  $\Delta\mu\text{H}^+$  が形成されている場合にのみ、Trx によって還元される (20,21)。これは、図 1-5 に示したように、 $\Delta\mu\text{H}^+$  activation によって  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  の活性制御領域付近の構造が変化することが影響しているものと考えられている。

以上のように、 $\text{CF}_0\text{CF}_1$  には特有な活性制御機構が存在し、光合成が駆動しない夜間では酵素活性が抑制されている。

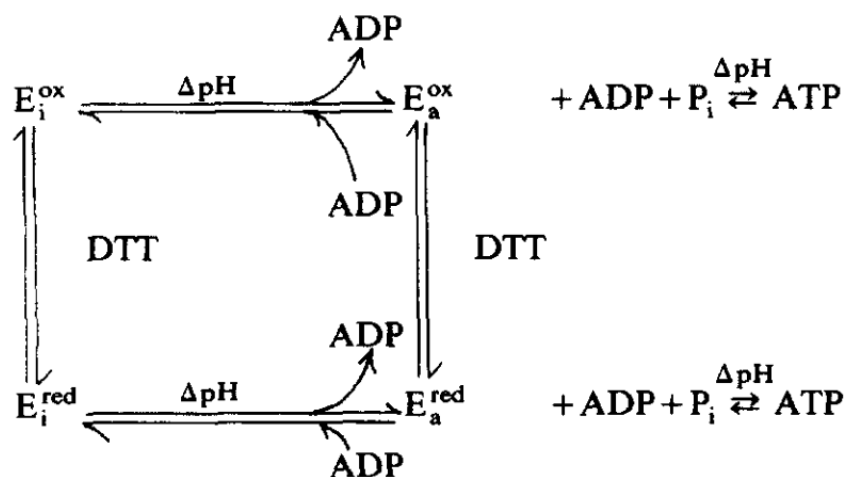


図 1-6. これまでに提唱された  $\text{CF}_0\text{CF}_1$  の活性制御スキーム。文献 (15) より抜粋。

## 1-4. Trx とは

CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> は、Trx によって CF<sub>1</sub>-γ を還元されることで活性化する。実際には CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> 以外にも、光合成に関連した様々な葉緑体タンパク質が、Trx によって酸化還元制御を受ける。例えば、炭素固定に関わる FBPase (22) や RCA (23)、リンゴ酸バルブを構成する NADP-MDH (22)、酸化のペントースリン酸経路の G6PDH (24) は、Trx の標的タンパク質であることが知られている。

Trx は、生物界に普遍的に存在する還元力メディエータータンパク質である。Trx は、分子量 12,000 程度の小さなタンパク質で、活性部位には-WCGC-というよく保存されたアミノ酸配列を持ち、この Cys ペアの酸化還元により標的の還元を行う (25-27)。還元型の Trx が酸化型の標的タンパク質を還元する時、まず、N 末端側 Cys の電離したチオール基が標的タンパク質のジスルフィド結合に求核攻撃し、標的タンパク質との間に分子間ジスルフィド結合を形成する。その後、Trx の C 末端側 Cys のチオール基が、この分子間ジスルフィド結合を求核攻撃することで、標的タンパク質は還元されて、Trx は酸化される。以上のようなジチオール／ジスルフィド交換反応の結果、Trx は標的タンパク質へ還元力を伝達する (図 1-7)。その後、酸化型となった Trx は、Trx レダクターゼによって再還元される。

植物の光合成の場合、太陽光エネルギーによって光合成電子伝達系が駆動し、水の分解によって生じた還元力が、PSI から Fd および FNR を経由して NADPH として蓄えられる (図 1-1A)。その際に生じた還元力の一部が、Fd および FTR を介して Trx へと伝達される (Fd/Trx システム) (28) (図 1-8)。このようにして、Trx は光化学反応に依存して還元力を伝達することから、光環境に応答した標的タンパク質の酸化還元制御を可能している (29)。

また、葉緑体に存在する Trx は、活性部位を除くアミノ酸配列の違いに基づいて 5 つのサブタイプ (Trx-f、Trx-m、Trx-x、Trx-y、Trx-z) に分類される 10 種類のアイソフォームが存在する (26,30)。そして、サブタイプごとに、存在量 (31)、標的タンパク質の選択性 (32,33) や、FTR からの還元力の伝達効率の違いなどが報告されている (34) (図 1-9)。

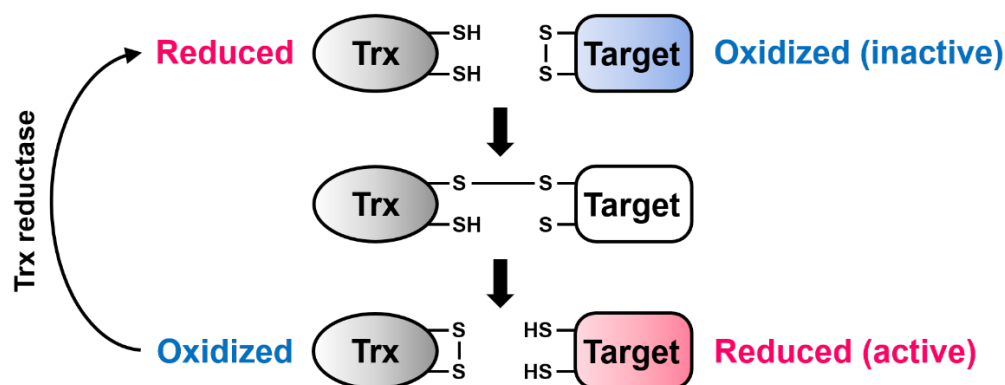


図 1-7. Trx と標的タンパク質のジチオール／ジスルフィド交換反応

Trx の活性部位と標的タンパク質の酸化還元制御部位に存在する、チオール基 (-SH) とジスルフィド結合 (-S-S-) が示されている。

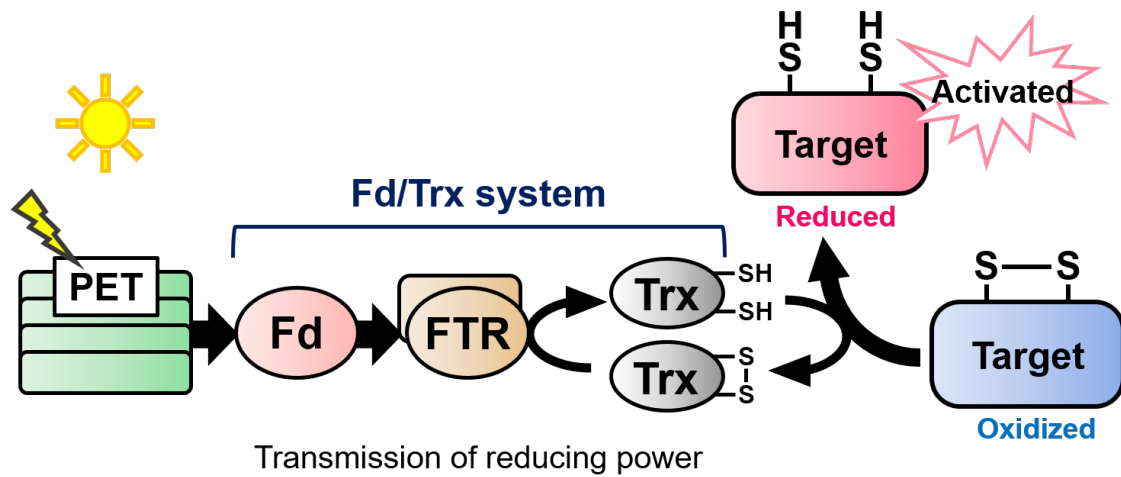


図 1-8. Fd/Trx システムの模式図

光によって駆動された光合成電子伝達系（PET, Photosynthetic electron transport system）から Fd が還元力を受け取り、FTR を介して Trx に伝達される。Trx は受け取った還元力を、標的タンパク質へと伝達する。還元型となった標的タンパク質は、一般に活性化する。

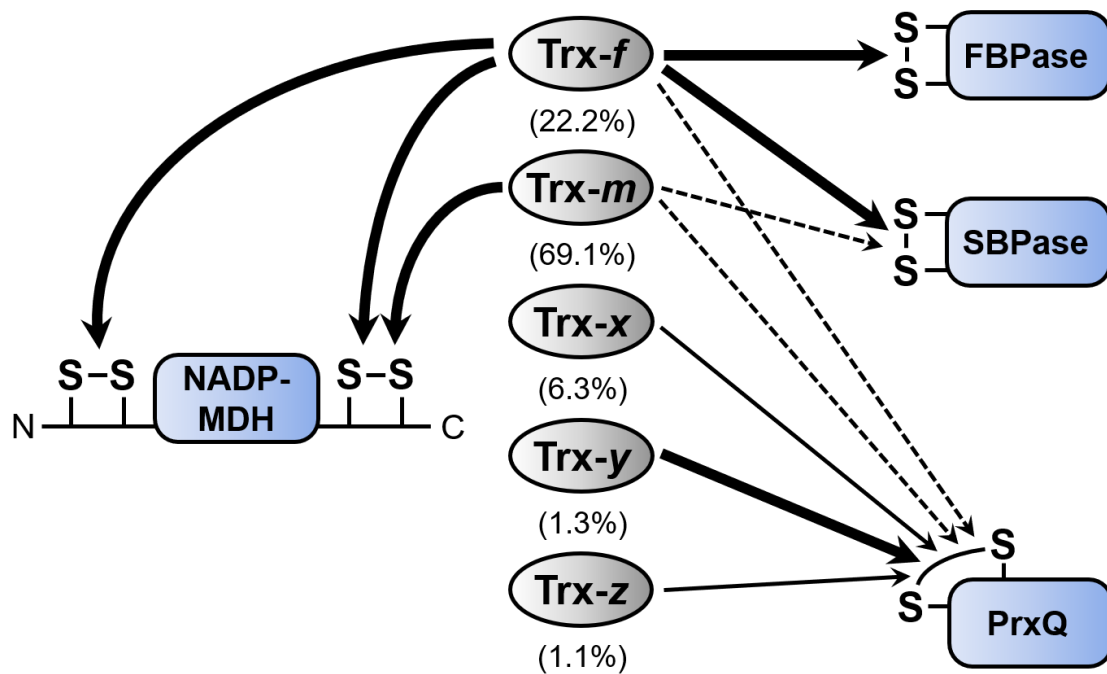


図 1-9. 葉緑体型 Trx の標的選択性

矢印の太さは、Trx による標的タンパク質の還元効率の違いを表している。括弧内の数字は、文献（31）より葉緑体内における存在比を示した。図は文献（33）を参考にした。

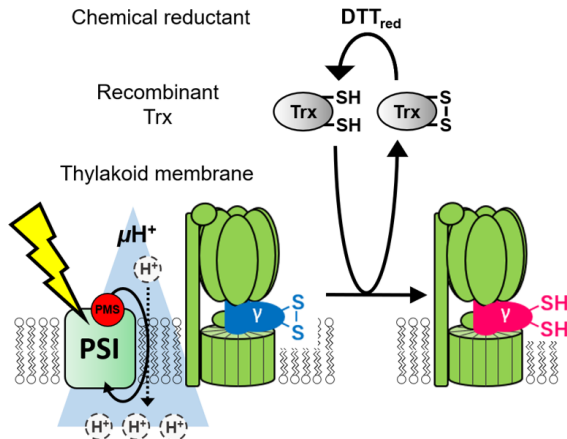
## 1-5. CF<sub>1</sub>- $\gamma$ の Trx による還元の特徴

### 1-5-1. CF<sub>1</sub>- $\gamma$ の Trx に対する選択性

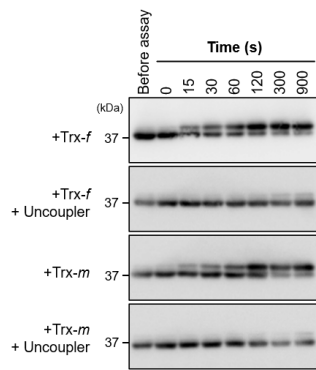
1-4 で述べた通り、葉緑体型 Trx は 5 つのサブタイプに分類され、それぞれが異なる標的選択性を示す (32,33)。例えば、FBPase は Trx-*f* によって特異的に還元される (22,33)。CF<sub>1</sub>- $\gamma$  を還元することができる Trx のサブタイプは、既に先行研究によって決定されている (20)。ホウレンソウから調製したチラコイド膜に対して光照射を行うことで、膜内外に  $\Delta\mu\text{H}^+$  を形成させることができる。このチラコイド膜に組換え Trx を添加することで、膜上の CF<sub>1</sub>- $\gamma$  を *in vitro* で還元させた (図 1-10A)。CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の酸化還元状態は、チオール基修飾試薬を用いて簡便に決定することができる。この方法の詳細は、第 2 章の実験方法に記載した。この実験の結果、CF<sub>1</sub>- $\gamma$  は Trx-*f* と Trx-*m* の両方のサブタイプによって還元されることが明らかになった (図 1-10BC)。また、どちらの Trx も、脱共役剤 (Uncoupler) によってチラコイド膜内外に形成された  $\Delta\mu\text{H}^+$  を解消すると、CF<sub>1</sub>- $\gamma$  をほとんど還元することはできない。

Trx-*f* は最も多くの標的が同定されており (33)、Trx-*m* は葉緑体において最も存在量の多いサブタイプである (31)。CF<sub>1</sub>- $\gamma$  は、これらの主要な葉緑体型 Trx から還元力を受け取ることで、様々な光環境下においても、CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> は安定して活性化することが可能であると考えられる。

**A**



**B**



**C**

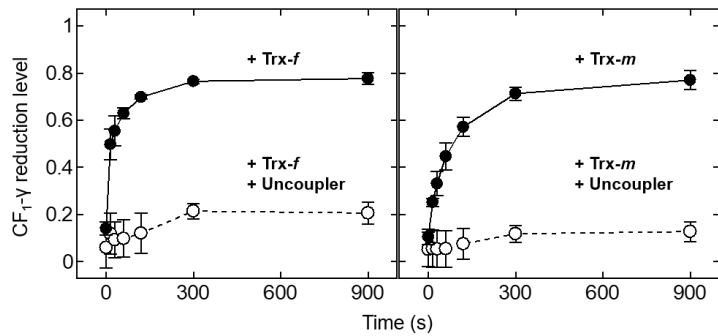


図 1-10. 組換え Trx による CF<sub>1</sub>-γ の *in vitro* 還元実験

(A) ホウレンソウ Trx による CF<sub>1</sub>-γ の *in vitro* 還元実験の模式図。DTT<sub>red</sub> によって Trx を持続的に還元し、チラコイド膜上の CF<sub>1</sub>-γ を還元するように設計した。また、チラコイド膜へ光照射を行い、膜内外に  $\Delta\mu\text{H}^+$  を形成させた。詳細は第 4 章の実験方法に記載した。(B) Trx-*f* と Trx-*m* によるチラコイド膜上の CF<sub>1</sub>-γ の還元。光条件下で、チラコイド膜を、DTT<sub>red</sub> と Trx とともに 900 s インキュベートした。指定の反応時間で反応溶液を分取し、チオール基修飾法によって還元型のタンパク質を標識した。チオール基修飾法については第 2 章実験方法に記載した。ウエスタンブロッティング解析によって還元型 (Red) と酸化型 (Ox) のタンパク質を識別し、CF<sub>1</sub>-γ の酸化還元状態を決定した。(C) CF<sub>1</sub>-γ の酸化還元状態の経時変化。B で決定した酸化還元状態をプロットした。値は、平均値  $\pm$  標準偏差 ( $n = 3$ ) の形で示されている。

### 1-5-2. CF<sub>I</sub>-γ の迅速な *in vivo* 光還元応答

植物へ光照射を行うと、緑葉内では Trx の標的タンパク質が還元される。この光還元応答の様子は、チオール基修飾試薬を用いることで実際に観察することができる。CF<sub>I</sub>-γ の光還元応答を経時的に観察した結果、他の Trx 標的タンパク質とはその様子が異なることが明らかになっている (図 1-11) (20)。

シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* の植物個体を暗処理したのち、弱光 (100 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) を照射すると、FBPase は光照射後 15 min で約 30%が還元型となる (図 1-11E、FBPase)。これに対して、CF<sub>I</sub>-γ の光還元は非常に迅速であり、光照射後 1 min ほどでほとんど完全に還元される (図 1-11E、CF<sub>I</sub>-γ)。また、Trx-*f* の欠損株 (*flf2*) においては、FBPase は光照射後 5 min までほぼ還元されず、光還元が遅延する様子が観察される。これは、*in vivo* において FBPase が主に Trx-*f* によって還元されていることを示唆している。一方で、CF<sub>I</sub>-γ の場合、Trx-*f* や Trx-*m* (*m12-2*) の欠損株においても、光還元応答は影響を受けない。すなわち、*in vivo* では、CF<sub>I</sub>-γ に対する様々な還元力伝達経路が存在すると考えられる。この特徴は、植物が様々な光環境下で、迅速に ATP 合成を開始するために合理的であると言える。

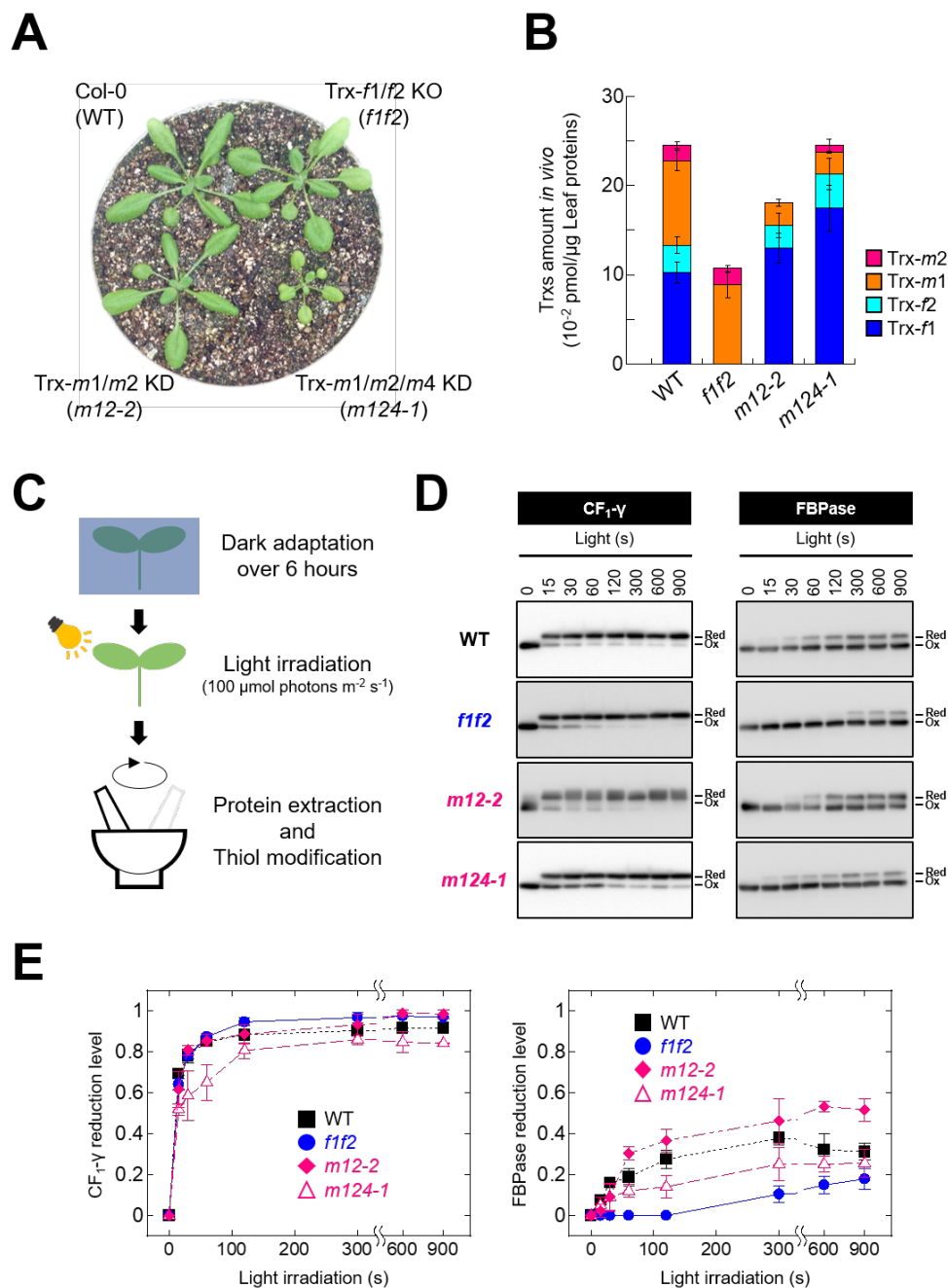


図 1-11. シロイヌナズナにおける CF<sub>1</sub>-γ の *in vivo* 光還元応答

(A) シロイヌナズナの Trx 欠損株。それぞれの株におけるノックアウト (KO) またはノックダウン (KD) されている遺伝子と、括弧内に株の略称が示されている。長日条件下で 25 days 生育させた植物を撮影した。(B) 植物緑葉内の Trx-*f*, Trx-*m* の存在量の比較。値は、平均値  $\pm$  標準偏差 ( $n=3$ ) の形で示されている。(C) 光環境下における植物緑葉内の Trx 標的タンパク質の光還元応答の調べ方。(D) Trx 欠損株における Trx 標的タンパク質の光還元応答。C のようにしてサンプリングを行った後、チオール基修飾法によって還元型のタンパク質を標識した。チオール基修飾法については第 2 章実験方法に記載した。ウエスタンブロットング解析によって還元型 (Red) と酸化型 (Ox) のタンパク質を識別し、CF<sub>1</sub>-γ と FBPAse の酸化還元状態を決定した。(E) CF<sub>1</sub>-γ と FBPAse の酸化還元状態の経時変化。D で決定した酸化還元状態をプロットした。値は、平均値  $\pm$  標準偏差 ( $n=3$ ) の形で示されている。

## 1-6. Trx 標的タンパク質の酸化過程

これまでの研究で、CF<sub>1</sub>-γの還元過程の詳細が明らかにされてきたが、酸化過程についてはほとんど研究が行われていなかった。その主な理由は、葉緑体内で酸化力を提供する実体そのものが不明だったことによる。実際には、CF<sub>1</sub>-γに限らず、Trx によって酸化還元制御を受ける葉緑体タンパク質の酸化過程は長年明らかにされていなかった。そこで、暗所でこれらのタンパク質が酸化によって不活性化される分子機構の解明が望まれていた。このような状況下で、所属研究室では、*A. thaliana* を材料として、炭素固定に関わる酵素群を酸化するいくつかの酸化因子タンパク質を同定した (35,36)。それらは Trx-like 2 (TrxL2) や atypical Cys-His rich Trx (ACHT) と命名されていたもので、Trx の活性部位とは異なる -CxxC- のモチーフを持つ “Trx 様タンパク質” に分類されている。例えば、Trx は活性部位に -WCGPC- の配列を持つのにに対して、TrxL2.1 は -WCRKC-、ACHT1 は -WCGSC- の配列を持つ (図 1-12)。また、TrxL2 と ACHT は共通して、Trx やその標的タンパク質よりも高い中点酸化還元電位 (Trx-f1: -321 mV、TrxL2.1: -258 mV、ACHT1: -252 mV (pH 7.5)) (35-37) を持っており、標的タンパク質から電子を引き抜きやすい (標的タンパク質を酸化しやすい)。ところが、活性酸素の除去に還元力を利用する 2-Cys Prx (2CP) (-345 mV (pH 7.5)) だけは、例外的に還元することができた (35)。つまり、これらの酸化因子タンパク質は、2CP を介して活性酸素を最終的な酸化力として利用し、標的タンパク質を酸化しているものと予想された (図 1-13) (38)。

|         |                |               |             |             |                 |
|---------|----------------|---------------|-------------|-------------|-----------------|
| Trx-f1  | 86 - GEKLVVLD  | MY TQWCGPC    | KVI APKYKAL | SEK YDDVVFL | KLD - 125       |
| Trx-f2  | 96 - GDKIVVLD  | MY TQWCGPC    | KVI APKYKEL | SEK YQDMVFL | KLD - 135       |
| Trx-m1  | 91 - ADEPVFVDF | FW APWCGPC    | KMI DPIVNEL | AQK YAGQFKF | YKL - 130       |
| Trx-m2  | 97 - ATGPVVVDF | FW APWCGPC    | KMI DPLVNDL | AQH YTGKIKF | YKL - 136       |
| Trx-m3  | 83 - SETPVLV   | EFY TSWCGPC   | RMV HRIIDEI | AGD YAGKLN  | CYLL - 122      |
| Trx-m4  | 103 - SDVPVL   | VEFW APWCGPC  | RMI HPIVDQ  | LAKD FAGK   | FKFYKI - 142    |
| Trx-x   | 86 - SAQPV     | LVFV ATWCGPC  | KLI YPAME   | ALSQE YGDK  | LTI             |
| Trx-γ1  | 80 - SDKPVL    | VDDYY ATWCGPC | QFM VPILN   | EVSET LKDK  | IQVVKI - 119    |
| Trx-γ2  | 75 - SDKPVL    | VDFY ATWCGPC  | QLM VPILN   | EVSET LKDI  | IAVVKI - 114    |
| Trx-z   | 93 - RKPVL     | I             | VDY ATWCGPC | ILM AQELE   | MLAVE YESNAI    |
| TrxL2.1 | 117 - LSQPII   | IEWM ASWCRK   | CIYL KPKLE  | KLAEE YNNRA | KFYV - 156      |
| TrxL2.2 | 97 - LGESV     | VIVWM AAWCRK  | CIYL KPKLE  | KLAEE FYPR  | LRFYHV - 136    |
| ACHT1   | 112 - GDRLV    | I             | VDY GTWCGS  | CRAM FPKLC  | KTAK HPN - IL   |
| ACHT2   | 122 - GERLV    | I             | VEFY GTWCAS | CRAL FPKLC  | KTAVE HPD - IV  |
| ACHT3   | 112 - GDKLV    | VVDFF SPSCGG  | C           | KAL HPKIC   | KIAEK NPE - VEF |
| ACHT4   | 116 - GDKLV    | VVDFF SPGCGG  | C           | KAL HPKIC   | QFAEM NPD - VQ  |
| ACHT5   | 104 - GDRLV    | V             | LDY SPGCGG  | C           | KSL HPKIC       |
|         |                | :.:           | * * :       | :           | :               |

図 1-12. シロイヌナズナの Trx と Trx 様タンパク質が持つ活性部位付近の配列の比較

多重配列アライメント解析は、デフォルトのパラメーター設定の Clustal Omega を使用した。配列の横に示した数字は、翻訳開始点の Met から数えた残基番号を示す。配列の下に示した記号は、コンセンサス (“\*”, conserved; “:”, strongly similar; “.”, weakly similar) を示す。オレンジ色で示した残基が活性部位に相当する。

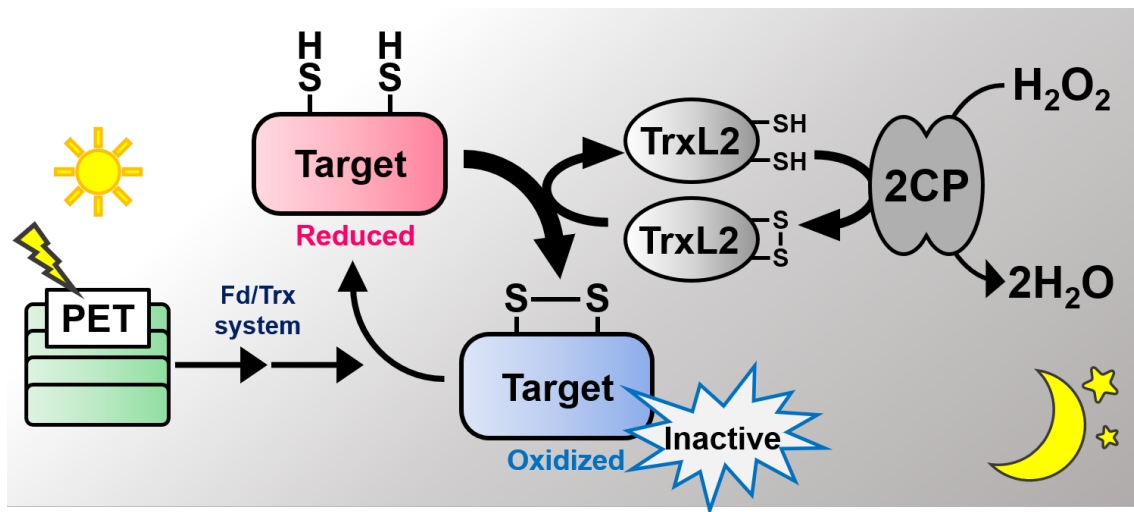


図 1-13. Trx 様タンパク質による標的タンパク質の酸化過程の模式図

TrxL2 や ACHT は、標的タンパク質から受け取った還元力を 2CP へ渡し、2CP は  $\text{H}_2\text{O}_2$  を還元する。この Trx 標的タンパク質と 2CP の還元力伝達カスケードによって、Trx 標的タンパク質の酸化が行われていると予想されている。

## 1-7. 本研究の目的

CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> の酵素活性は、酸化還元制御と  $\Delta\mu\text{H}^+$  activation の 2 つの制御機構が協同してはたらくことで、厳密に制御されている。この活性制御機構は、F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素の中でも、非常にユニークである。これまでに、CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の還元による CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> の活性化機構について、活発に生化学的な研究が行われてきた。その結果、酵素活性が切り替わる分子機構 (図 1-6) や、Trx による還元過程における  $\Delta\mu\text{H}^+$  の効果 (図 1-9) が明らかにされてきた。また、1-5-2 で述べたような生理学的解析によって、植物体内において、CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> が実際どのように制御されているか解明されつつある。しかし、以下に示す点は未解明のままであり、CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> の活性制御機構全貌は未だ明らかになっていないと言える。そこで、本研究では CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の酸化還元状態を実際に観察する手法を用いて、これらを明らかにすることを目指した。

### 1-7-1. Trx 以外の CF<sub>1</sub>- $\gamma$ の還元経路の決定

1-5 で述べたように、CF<sub>1</sub>- $\gamma$  は Trx-*f* と Trx-*m* のどちらからも還元力を受け取ることができる (図 1-9)。すなわち、CF<sub>1</sub>- $\gamma$  は Trx に対する選択性が低い。また、*in vivo* において、CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の光還元は迅速であり、Trx の欠損による影響を受けない (図 1-10)。これらの結果から、CF<sub>1</sub>- $\gamma$  は還元力を受け取りやすく、Trx 以外の還元因子によっても還元されるのではないかと予想した。そこで、第 2 章では、主に Fd/Trx システムにおける Trx 以外の構成因子に注目し、それらが CF<sub>1</sub>- $\gamma$  を直接還元するか否かを調べた。

### 1-7-2. CF<sub>1</sub>- $\gamma$ の酸化制御機構

1-6 で述べたように、CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の酸化過程は未だ明らかにされていない。しかし、近年、これまで大きな謎であった生体内の酸化因子タンパク質が同定されたことで、CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の酸化過程の研究を行う手掛かりが得られた。そこで、第 3 章では、2 種類の Trx 様タンパク質に注目し、それらが CF<sub>1</sub>- $\gamma$  を酸化するか否かを調べた。また、 $\Delta\mu\text{H}^+$  が、CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の還元過程へ影響を及ぼしたことから、酸化過程にも同様に影響するか否かを調べた。

### 1-7-3. $\Delta\text{pH}$ と $\Delta\Psi$ の酸化還元制御への寄与度の違い

1-2 で述べたように、 $\Delta\mu\text{H}^+$  は、 $\Delta\text{pH}$  と  $\Delta\Psi$  から構成される。CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> の ATP 合成において、これらはどちらも寄与することが明らかになっている (15,39,40)。すなわち、 $\Delta\text{pH}$  と  $\Delta\Psi$  の両方が  $\Delta\mu\text{H}^+$  activation に重要であると予想した。そこで、第 4 章では、チラコイド膜に対して  $\Delta\text{pH}$  と  $\Delta\Psi$  をそれぞれ単独で形成させる実験系を構築し、これらが Trx による CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の還元過程へ及ぼす影響をそれぞれ調べた。

---

## 第 2 章

### Fd/Trx システムによる $\text{CF}_0\text{CF}_1$ の還元制御

## 2-1. 本章の概要

これまでの研究で、Trx による  $CF_0CF_1$  の特徴的な還元過程の詳細が明らかとなってきた。植物体内では、 $CF_1$ - $\gamma$  の光還元応答は他の Trx 標的タンパク質と比べて非常に迅速であり (41,42)、弱光下 ( $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) であっても光照射後 1 min でほぼ完全に還元される (20)。また、Trx 以外の還元因子によって、 $CF_0CF_1$  が活性化されるという先行研究も報告されている。例えば、Trx へと還元力を伝達する FTR も  $CF_0CF_1$  を活性化する (12)。一方で、近年、CRISPR/Cas9 システムによって作出されたシロイヌナズナ *A. thaliana* の FTR 欠損株では、光環境下でもストロマに遊離する Trx 標的タンパク質は完全に還元されないのに対して、 $CF_1$ - $\gamma$  だけは例外的に還元される (43)。そこで、*in vivo* で見られる  $CF_1$ - $\gamma$  の迅速な光還元は、Trx 以外の還元力伝達経路によるものであると予想した。

本章では、Fd/Trx システムの還元力伝達カスケードを *in vitro* で再構成して、それぞれの構成因子が、 $CF_1$ - $\gamma$  の還元活性を持つか否かを調べた。また、葉緑体内に豊富に存在する還元物質であるグルタチオンにも注目し、グルタチオンが Fd/Trx システムの  $CF_1$ - $\gamma$  に対する還元活性へ及ぼす影響についても調べた。その結果、Fd/Trx システムが完全に構成されている場合にのみ、 $CF_1$ - $\gamma$  が還元されることを確認した。また、グルタチオンによる  $CF_1$ - $\gamma$  への影響は観察されなかった。これらの結果から、本実験においては Fd/Trx システムによる  $CF_1$ - $\gamma$  の還元は Trx が必須であることが実証された。

---

## 2-2. 実験方法

### 2-2-1. 組換えタンパク質の発現

本章で使用した組換えタンパク質は、すべて *A. thaliana* 由来である (Trx-*f1*, *At3g02730*; FNR, *At5g66190*; FTR, *At5g08410* and *At2g04700*)。また、発現プラスミドは、すべて先行研究で作製されたものを使用した (33,34)。それぞれの発現プラスミドを用いて *Escherichia coli* BL21(DE3)を形質転換し、50 mg/mL Ampicillin を含む LB (LB+Amp) 寒天培地に植菌し、37°Cで一晩培養した。生育したコロニーを 10 個程度採取し、10 mL の LB+Amp 液体培地に植え継ぎ、37°Cで約 5 h 培養した。培養液を、Trx-*f1* の場合は 1.5 L の LB+Amp 液体培地 2 本に 5 mL ずつ分注、FNR と FTR の場合は 2 L の LB+Amp 液体培地に全量を投入し、OD<sub>600</sub> が 0.3–0.8 に達するまで 37°Cで約 3.5 h 培養した。その後、1 mM IPTG を添加し、18–21°Cで約 16 h 培養した。菌体を遠心分離によって液体培地から回収し、液体窒素で冷凍した後、–80°Cで保存した。

### 2-2-2. 組換えタンパク質の精製

組換えタンパク質の精製は、全て 4°Cで行った。回収した目的のタンパク質は、20% (v/v) グリセロールを添加した後、液体窒素で冷凍し、–80°Cで保存した。タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンをスタンダードとして用いて、BCA protein assay kit (Pierce) によって測定した。

#### 2-2-2-1. Trx-*f1* の精製

菌体を、50 mL の 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) で懸濁した。懸濁液に対して、Ultrasonic Disruptor UD-201 (TOMY) を用いて超音波破碎 (Output control 5、Duty cycle 40、5 min) を 3 回行った後、超遠心分離 (185,300 × g、40 min、4°C) を行った。上清を回収し、30 mL の TOYOPEARL Q-600C AR (Tosoh) へ加え、25 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中の NaCl 濃度に 0–300 mM の直線濃度勾配をかけて、陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。その後、目的のタンパク質が溶出した画分を SDS-PAGE によって確認して回収し、Spectra/Por Dialysis Membrane (Cut off MW: 6,000–8,000) (Fujifilm) を用いて、3 L の 25 mM MES-NaOH (pH 6.1) に対して一晩透析した。透析後のタンパク質溶液を、30 mL の TOYOPEARL SP650M (Tosoh) へ加え、25 mM MES-NaOH (pH 6.1) 中の NaCl 濃度に 0–250 mM の直線濃度勾配をかけて、陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。その後、目的のタンパク質が溶出した画分を SDS-PAGE によって確認して回収し、Spectra/Por Dialysis Membrane (Cut off MW: 6,000–8,000) を用いて、3 L の 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) に対して 2 回透析した (1 回目 : 2 h、2 回目 : 一晩)。透析後のタンパク質溶液を、Cut off MW : 10,000 の Amicon Ultra-15 (Merck Milipore) を用いて限外濾過により濃縮した。

### 2-2-2-2. FNR、FTR の精製

菌体を、50 mL の 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) で懸濁した。懸濁液に対して、2-2-2-1 の Trx-f1 と同様に、超音波破碎と超遠心分離を行った。上清を回収し、30 mL の TOYOPEAL DEAE-650M (Tosoh) へ加え、25 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中の NaCl 濃度に 0–200 mM の直線濃度勾配をかけて、陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。その後、目的のタンパク質が溶出した画分を SDS-PAGE によって確認して回収し、飽和濃度 30%の硫酸アンモニウムを添加した。この時、FNR および FTR は硫酸アンモニウムによっては沈殿しない。そこで、これらのタンパク質を含む上清を、30 mL の TOYOPEAL Butyl-650M (Tosoh) へ加え、25 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中の硫酸アンモニウム濃度に 30–0%の直線逆濃度勾配をかけて、疎水性相互作用クロマトグラフィーを行った。その後、目的のタンパク質が溶出した画分を SDS-PAGE によって確認して回収し、Spectra/Por Dialysis Membrane (Cut off MW: 12,000–14,000) (Fujifilm) を用いて、3 L の 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) に対して 2 回透析した (1 回目 : 2 h、2 回目 : 一晩)。透析後のタンパク質溶液を、Cut off MW : 30,000 の Amicon Ultra-15 (Merck Milipore) を用いて限外濾過により約 1 mL まで濃縮した。FTR の場合、得られたタンパク質溶液を、500  $\mu$ L ずつ 2 回に分けて Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) へ加え、TNE バッファー① (25 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、50  $\mu$ M EDTA) を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。その後、目的のタンパク質が溶出した画分を SDS-PAGE によって確認して回収した。

### 2-2-2. Fd の精製

本章で使用した Fd は、ハウレンソウから精製した。市販の 6 把のハウレンソウを、使用前日に水洗いし、新聞紙に包んで冷暗所で立てて一晩放置した。ハウレンソウに付着した水滴をよくふき取り、葉柄を含まないように緑葉を切り取った。500 g の葉片と 500 mL の TN バッファー① (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50 mM NaCl) を予冷したミキサーに加え、3 s の破碎を 3 回行った。破碎液を、4 重にしたガーゼを用いて濾過した後、遠心分離 (5,000  $\times$  g、10 min、4°C) して上清を回収し、2 重にした円形定量濾紙 (No. 5B、ADVANTEC) を用いて再度濾過した。得られた濾液を、50 mL の DEAE Sepharose CL-6B (Sigma) へ加え、250 mL の TN バッファー② (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.2 M NaCl) で樹脂を洗浄した後、TN バッファー③ (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.7 M NaCl) を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。その後、目的のタンパク質が溶出した画分を、抗 Fd 抗体を用いたドットブロッキング解析によって確認して回収し、飽和濃度 70%の硫酸アンモニウムを加え、4°Cで 1 h 攪拌した。この時、沈殿が生じた場合は遠心分離によって除いた。また、使用した樹脂は、250 mL の 1 M NaCl、250 mL の 1 M NaOH、100 mL の 0.1 M 酢酸 + 0.5 % (v/v) Triton で順に洗浄した後、70%硫酸アンモニウムを含む TN バッファー②で平衡化した。タンパク質溶液を、樹脂へ加え、TN バッファー②で樹脂を洗浄した後、TN バッファー④ (50 mM Tris-HCl、0.3 M NaCl) を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。そ

の後、赤褐色を示す画分を回収し、Spectra/Por Dialysis Membrane (Cut off MW: 12,000–14,000) を用いて、2 L の TN バッファー⑤ (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.1 M NaCl) に対して一晩透析した。透析後のタンパク質溶液を、2-2-2-2 の FTR と同様に、濃縮してゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行った。ただし、溶離液には、TN バッファー⑤を用いた。その後、赤褐色を示す画分を回収した。

Fd は、460 nm、420 nm、330 nm 付近に[2Fe-2S]クラスター由来の吸収極大が認められている (44)。タンパク質濃度は、420 nm 付近の吸収極大のミリモル吸光係数 $\epsilon_{420} = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて決定した。また、精製標品の純度は、吸光度比  $\text{Abs}_{420}/\text{Abs}_{275}$  によって評価し、0.4–0.6 の範囲にあるものを使用した。



図 2-1. 使用した市販のホウレンソウ (1 把)

### 2-2-3. ホウレンソウ緑葉からチラコイド膜の調製

本章で使用したチラコイド膜は、ホウレンソウから調製した。市販の 1 把のホウレンソウを使用する前日に水洗いし、新聞紙に包んで冷暗所で立てて一晩放置した。ホウレンソウに付着した水滴をよくふき取り、葉柄を含まないように緑葉を切り取った。10 g の葉片と 200 mL の調製用バッファー (50 mM Tricine-NaOH (pH 7.5)、0.4 M Sucrose、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、10 mM NaCl) を予冷したミキサーに加え、3 s の破碎を 3 回行った。破碎液を、4 重にしたガーゼで濾過した後、遠心分離 ( $3,000 \times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ) した。沈殿を回収し、30 mL の調製用バッファーで懸濁した後、遠心分離 ( $300 \times g$ , 1 min,  $4^\circ\text{C}$ ) した。上清を回収し、遠心分離 ( $3,000 \times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ) した。沈殿を回収し、上記の洗浄操作をもう 1 回行った。最終的に得られた沈殿を、2 mL の調製用バッファーで懸濁し、チラコイド膜画分とした。

### 2-2-4. クロロフィル定量

チラコイド膜画分を、調製用バッファーで任意の倍率で希釈した。200  $\mu\text{L}$  の希釈液に 800  $\mu\text{L}$  の 100%アセトンを加え、10 min ボルテックスした後、遠心分離 ( $20,400 \times g$ , 5 min,  $20^\circ\text{C}$ ) した。上清を回収し、UV-1800 (島津製作所) を用いて 663.6 nm と 646.4 nm の吸光度を測定した。この値を用いて、クロロフィル濃度 [Chlorophyll  $a+b$ ] ( $\mu\text{g Chl/mL}$ ) を次式に従って算出した (45)。この時、750 nm の吸光度も併せて測定し、その値を各吸光度の値から引いたものを計算に用いた。

$$[\text{Chlorophyll } a + b] = 17.76 \times \text{Abs}_{646.6} + 7.34 \times \text{Abs}_{663.6}$$

### 2-2-5. CF<sub>1</sub>- $\gamma$ の *in vitro* 還元実験

Fd/Trx システムの構成因子が CF<sub>1</sub>- $\gamma$  を還元できるか否かを調べるために、図 2-2 に示した *in vitro* 実験系を構築した。CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の還元は、調製用バッファーを用いて、25°C で行った。反応溶液の基本的な組成は、50  $\mu$ g Chl/mL Thylakoid membrane、0.5 mM NADPH、2  $\mu$ M FNR、2  $\mu$ M Fd、2  $\mu$ M FTR、2  $\mu$ M Trx-f1 とし、全体量を 1 mL とした。反応溶液を、マグネティックスターラーを用いて攪拌し、暗所で 10 min 放置した後、LED パネルを用いて光照射（600–650  $\mu$ mol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>）を行った。この時、チラコイド膜への光照射によって、Fd による循環型電子伝達を発生させて、膜内外に  $\Delta\mu$ H<sup>+</sup> を形成させた (46)。光照射の開始から一定時間（0–900 s）ごとに、反応溶液から 100  $\mu$ L を分取し、同量の 20% (w/v) トリクロロ酢酸と混和し、反応を停止させた。

また、グルタチオンが CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の還元過程へ及ぼす影響を調べるために、10 mM 還元型グルタチオン (GSH) と 1 mM 酸化型グルタチオン (GSSG) を加え、同様の実験を行った。

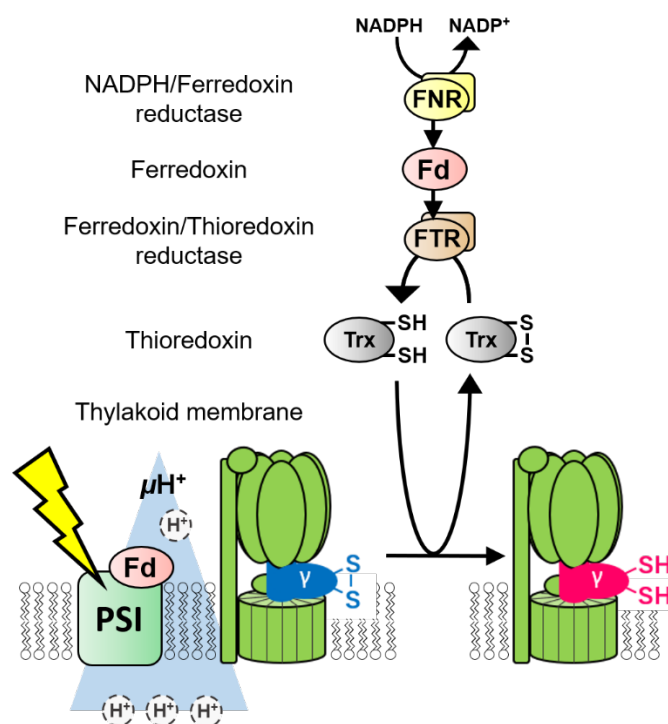


図 2-2. Fd/Trx システムによる CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の *in vitro* 還元実験の概略図

NADPH から、FNR と Fd を介して Trx へと持続的に還元力を供給し、チラコイド膜上の CF<sub>1</sub>- $\gamma$  を還元するように設計した。また、チラコイド膜へ光照射を行い、Fd によって膜内外に  $\Delta\mu$ H<sup>+</sup> を形成させた。

### 2-2-6. CF<sub>1</sub>-γ の酸化還元状態の決定

チラコイド膜溶液を、同量の 20% (w/v) トリクロロ酢酸と混和し、氷上で 30 min 放置した。その後、遠心分離 (20,400 × g、15 min、4℃) して沈殿を回収し、氷冷した 100%アセトンで洗浄した。沈殿を 2 mM AMS を含む非還元 SDS-PAGE サンプルバッファーで懸濁し、室温で 30 min ボルテックスすることでタンパク質のチオール基を AMS で標識した。AMS は、遊離のチオール基にのみ結合するため、還元型タンパク質は修飾されるが酸化型タンパク質は修飾されない。AMS の分子量は約 500 Da であり、還元型と酸化型で 1 kDa ほどの分子量の違いが生じる。そのため、SDS-PAGE によって還元型と酸化型のタンパク質を分離できる (図 2-5)。得られたサンプルを、95℃で 5 min 熱変性させた後、非還元 SDS-PAGE と抗 CF<sub>1</sub>-γ特異抗体を用いたウエスタンブロッティング解析を行った (41)。抗 CF<sub>1</sub>-γ特異抗体は、先行研究で作製されたものを使用した。酸化型と還元型のバンド強度から、CF<sub>1</sub>-γの還元率を算出した。

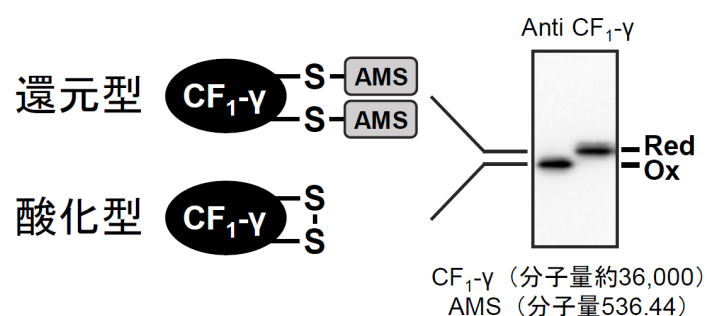


図 2-3. チオール基修飾法によるタンパク質の酸化還元状態の決定方法の概略図

完全に酸化 (Oxidized、Ox) /還元 (Reduced、Red) した CF<sub>1</sub>-γ を、非還元 SDS-PAGE によって分離し、ウエスタンブロッティング解析によって検出した結果を例示した。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. FNR、Fd、FTR の精製

FNR は FAD を含むフラビン酵素である (47)。また、Fd は[2Fe-2S]クラスター (44)、FTR は[4Fe-4S]クラスター (48) を持つ鉄-硫黄タンパク質である。CF<sub>I</sub>- $\gamma$ の還元実験を行うにあたって、それぞれの精製タンパク質が、還元力伝達に必要なこれらの補酵素を保持していることをスペクトル解析によって調べた (図 2-4)。その結果、いずれの精製タンパク質も、タンパク質由来の 275 nm 付近の吸収極大を持つ他に、FNR は FAD 由来の 460 nm、391 nm 付近に、Fd は[2Fe-2S]クラスター由来の 460 nm、420 nm、330 nm 付近に、FTR は[4Fe-4S]クラスター由来の 410 nm 付近に吸収を示すことを確認した。また、精製タンパク質は補酵素に由来する色をそれぞれ呈していた (FNR : 淡黄色、Fd : 赤褐色、FTR : 黄褐色)。

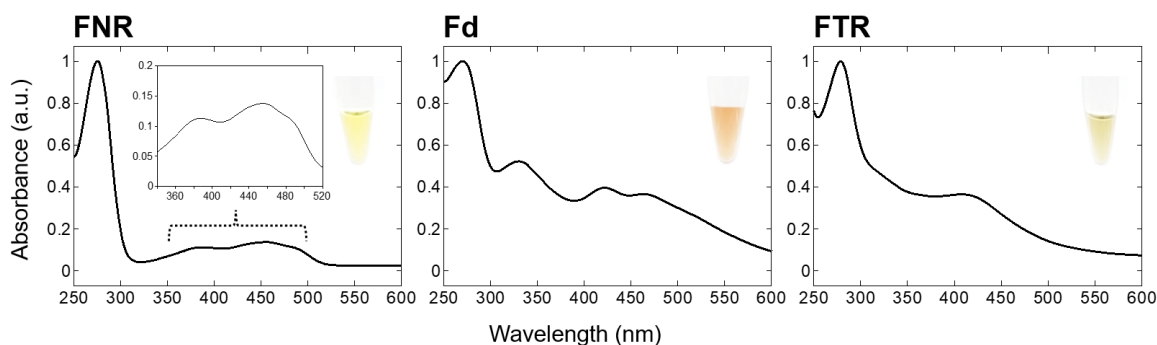


図 2-4. 精製タンパク質の吸収スペクトル

275 nm 付近の吸収極大の値を用いて規格化した。挿入図は各タンパク質の実際の画像を示す。

### 2-3-2. Fd/Trx システムによる CF<sub>0</sub>CF<sub>I</sub> の還元

本章では、*in vivo* で見られるような CF<sub>I</sub>- $\gamma$ の迅速な光還元 (20) が、Trx 以外の還元因子によって達成されていると予想し、チラコイド膜に対して Fd/Trx システムを再構成した。

まず、還元力伝達カスケードにおける Trx より上流の構成因子が CF<sub>I</sub>- $\gamma$ を直接還元するかどうかを調べた (図 2-5)。NADPH/FNR を還元力の供給源として Fd/FTR/Trx-*f1* をすべて再構成した場合、チラコイド膜への光照射を開始してから 120 s で CF<sub>I</sub>- $\gamma$ が還元され、900 s で約 40%が還元された (図 2-5AC、+ Fd/FTR + Trx-*f1*)。また、Trx-*f1* は、光照射を開始する前から還元されていたが、光照射を開始して 120 s で還元率がさらに上昇した (図 2-5B、+ Fd/FTR + Trx-*f1*)。これに対して、Fd/Trx システムから Trx を除いた場合、光照射後も CF<sub>I</sub>- $\gamma$ は還元されなかった (図 2-5AC、+ Fd/FTR)。以上の結果から、FNR、Fd、FTR のような Trx 以外の構成因子は、CF<sub>I</sub>- $\gamma$ を直接還元しないと結論した。

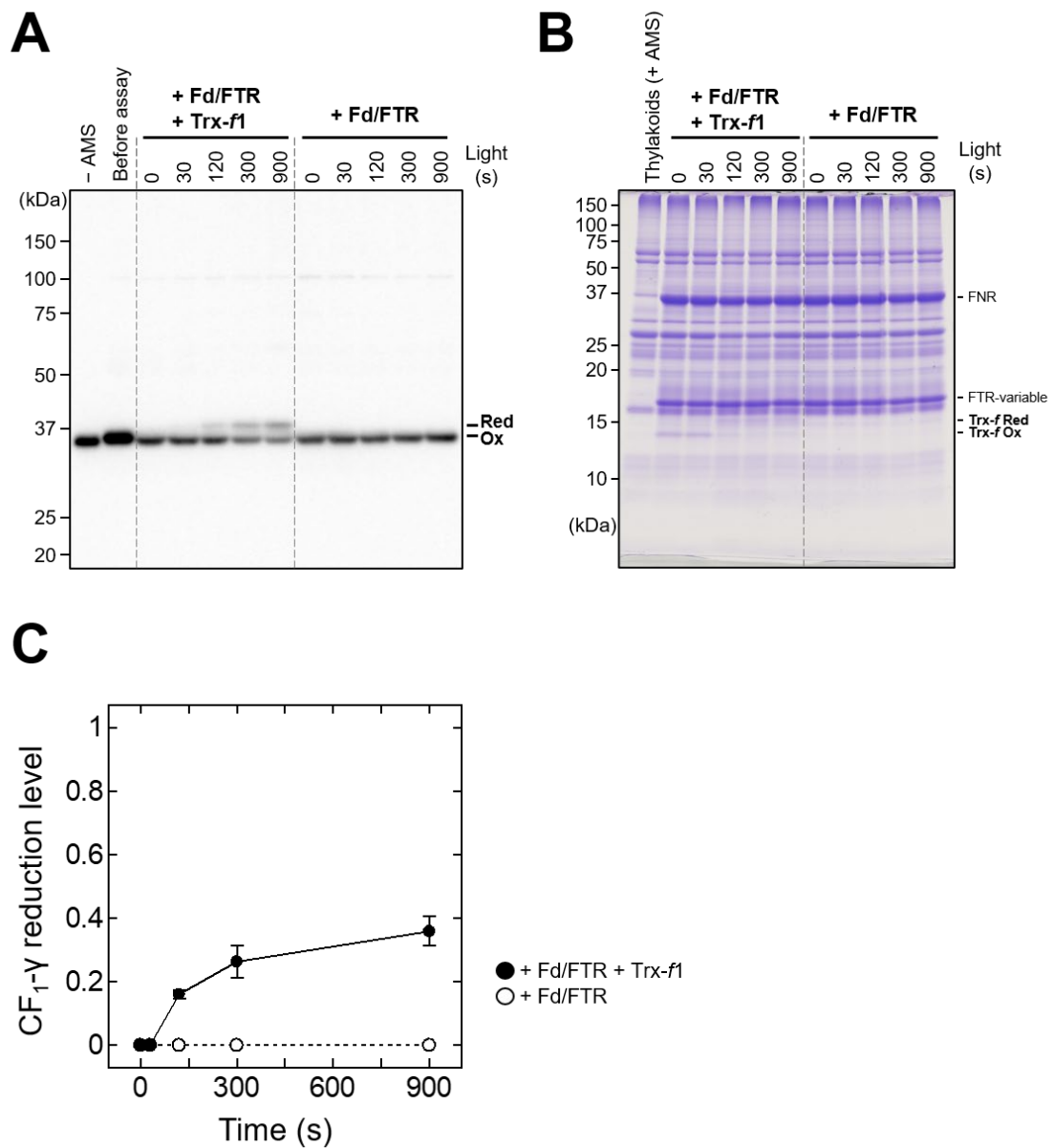


図 2-5. Fd/Trx システムによる CF<sub>1</sub>-γ の *in vitro* 還元実験

(A) Fd/Trx システムによるチラコイド膜上の CF<sub>1</sub>-γ の還元。チラコイド膜 (50 μg Chl/mL) を、0.5 mM NADPH、2 μM FNR、2 μM Fd、2 μM FTR、2 μM Trx-f1 とともに、暗所で 600 s インキュベートした後、900 s 光照射を行った。指定の反応時間で反応溶液を分取し、チオール基修飾法によって還元型のタンパク質を標識した。非還元 SDS-PAGE によってタンパク質を分離した後、ウエスタンブロッティング解析によって還元型 (Red) と酸化型 (Ox) の CF<sub>1</sub>-γ を識別した。(B) A のサンプルを非還元 SDS-PAGE によって分離後、CBB で染色した。(C) CF<sub>1</sub>-γ の酸化還元状態の経時変化。A から CF<sub>1</sub>-γ の還元率を定量し、反応時間に対してプロットした。値は、平均値 ± 標準偏差 (n = 3) の形で示した。

### 2-3-3. グルタチオンが Fd/Trx システムへ及ぼす影響

次に、グルタチオンが  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  の還元過程に及ぼす影響について調べた。グルタチオンは、ほぼすべての生物の細胞質に mM オーダーで豊富に存在するトリペプチド (Glu-Cys-Gly) であり、非タンパク質系還元型硫黄の主要な低分子物質である (49)。また、還元型グルタチオン GSH は酸化されると二量体 GSSG を形成する。細胞内では、NADPH とグルタチオンレダクターゼによって GSH/GSSG は非常に高く維持され、ほとんどが還元型 GSH で存在している (50)。本章では、 $\text{GSH}:\text{GSSG}=10:1$  として、 $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  および Fd/Trx システムへの影響を調べた (図 2-6)。

まず、GSH/GSSG が  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  を直接還元するか否かを調べた。チラコイド膜に対して、GSH/GSSG と、膜内外に  $\Delta\mu\text{H}^+$  を形成させるために Fd を添加し、光照射を行った。その結果、 $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  は全く還元されなかった (図 2-6AC、+ GSH/GSSG + Fd)。次に、GSH/GSSG の存在下で、チラコイド膜に対して Fd/Trx システムを再構成し、同様の実験を行った。その結果、GSH/GSSG の有無によって、Fd/Trx システムによる  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  の還元効率はほぼ変化せず、光照射後 900 s で約 30% が還元されていた (図 2-6AC、+ GSH/GSSG + Fd/FTR + Trx-f1)。また、Trx-f1 も、2-3-2 の結果と同様に、光照射を開始して 120 s で還元率がさらに上昇した (図 2-6B、+ GSH/GSSG + Fd/FTR + Trx-f1)。以上の結果から、GSH/GSSG は、Fd/Trx システムによる  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  の還元過程に影響しないと結論した。

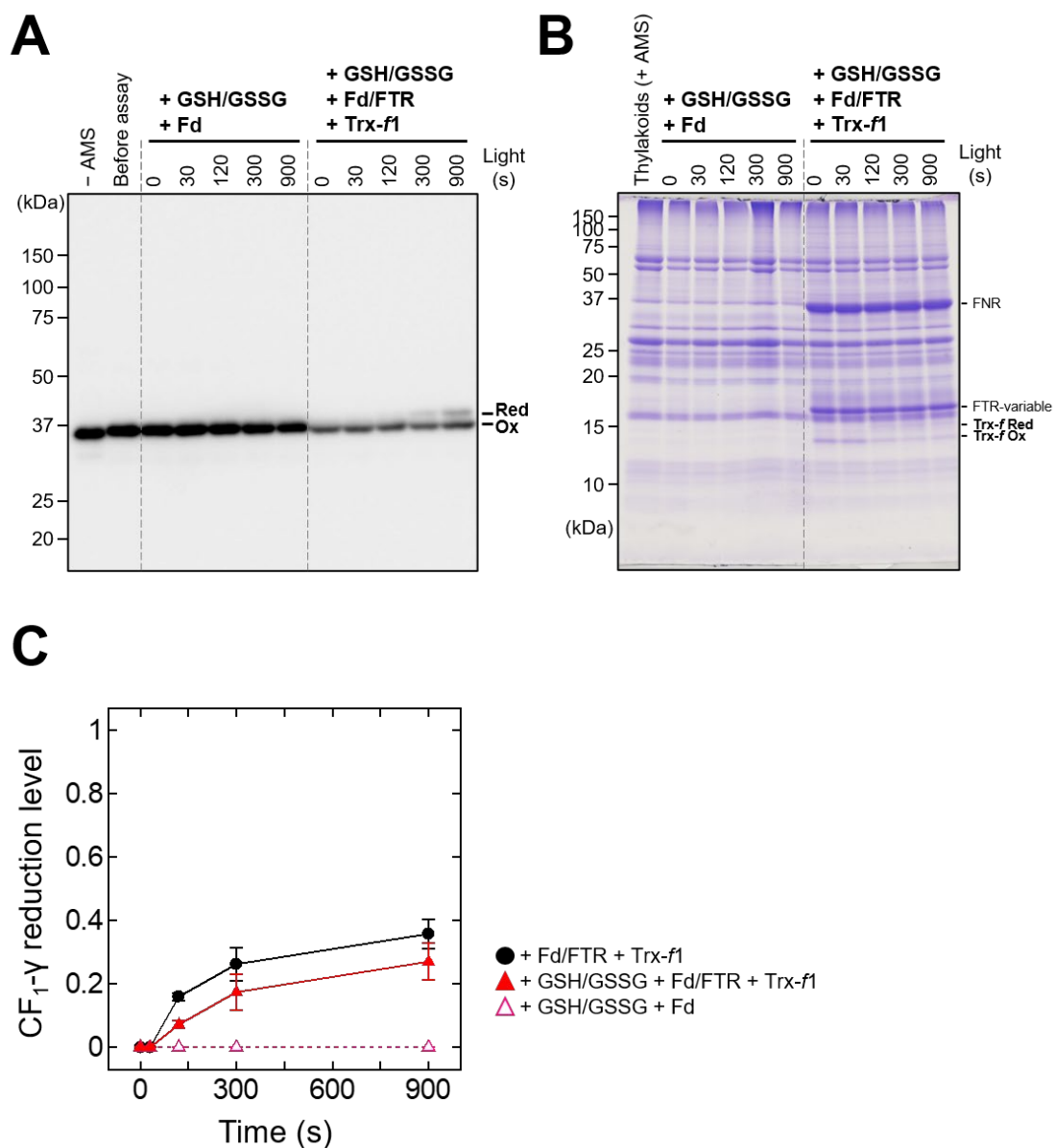


図 2-6. グルタチオン存在下での Fd/Trx システムによる CF<sub>1</sub>-γ の *in vitro* 還元実験

(A) Fd/Trx システムによるチラコイド膜上の CF<sub>1</sub>-γ の還元。チラコイド膜 (50 μg Chl/mL) を、0.5 mM NADPH、2 μM FNR、2 μM Fd、2 μM FTR、2 μM Trx-f1、10 mM GSH、1 mM GSSG とともに、暗所で 600 s インキュベートした後、900 s 光照射を行った。指定の反応時間で反応溶液を分取し、チオール基修飾法によって還元型のタンパク質を標識した。非還元 SDS-PAGE によってタンパク質を分離した後、ウェスタンブロットング解析によって還元型 (Red) と酸化型 (Ox) の CF<sub>1</sub>-γ を識別した。(B) A のサンプルを非還元 SDS-PAGE によって分離後、CBB で染色した。(C) CF<sub>1</sub>-γ の酸化還元状態の経時変化。A から CF<sub>1</sub>-γ の還元率を定量し、反応時間に対してプロットした。値は、平均値 ± 標準偏差 (n=3) の形で示した。

## 2-4. 考察

これまでの研究によって、 $CF_0CF_1$  の還元制御は、他の Trx 標的タンパク質と比べて特徴的であることが明らかになってきた。特に、*in vivo* での  $CF_1$ - $\gamma$  の光還元応答は、ストロマに存在する他の Trx 標的タンパク質と比べて迅速であり (41,42)、弱光下であっても数 min で完全に還元される (20)。この特徴は、様々な光環境下において、植物が ATP の生産を迅速に調節するうえで合理的であると言える。この他にも、Trx 以外の還元力伝達因子によって  $CF_0CF_1$  が活性化するという研究結果が報告されている (12)。そこで、本章では、Trx 以外の因子が  $CF_1$ - $\gamma$  を直接還元していると予想し、Fd/Trx システムを再構成した *in vitro* 還元系を構築した。また、この *in vitro* 実験系を利用し、グルタチオンによる影響についても調べた。これらの結果、予想に反して、本実験においては  $CF_1$ - $\gamma$  は Trx によってのみ還元された。

### 2-4-1. Fd/Trx システムによる $CF_0CF_1$ の還元

まず、NADPH/FNR を還元力の供給源とした Fd/Trx システムを、チラコイド膜に対して再構成した。その結果、光条件下では  $CF_1$ - $\gamma$  が還元されることを確認した (図 2-5AC、+ Fd/FTR + Trx-*f*1)。また、実験系に還元力が存在し、Trx が還元型で存在するにもかかわらず、暗条件下では  $CF_1$ - $\gamma$  は全く還元されなかった (図 2-5B、+ Fd/FTR + Trx-*f*1)。これら結果は、Trx による  $CF_1$ - $\gamma$  の還元には、チラコイド膜内外に  $\Delta\mu H^+$  が形成される必要があることを示唆しており、先行研究の結果と一致する (20,21)。 $\Delta\mu H^+$  は、Fd によって循環型電子伝達が発生したことで、膜内外に形成されたと考えられる。また、光照射後に Trx の還元率が上昇していたことから、光化学系が駆動していたことが示唆される (図 2-5B、+ Fd/FTR + Trx-*f*1)。次に、Fd/Trx システムから Trx のみを除いた条件で同様の実験を行ったところ、 $CF_1$ - $\gamma$  は全く還元されなかった (図 2-5AC、+ Fd/FTR)。この結果は、FTR を介した光合成電子伝達系からの還元力伝達において、 $CF_1$ - $\gamma$  の還元には Trx が必要不可欠であることを示唆する。また、FTR によって  $CF_0CF_1$  が活性化したという Mills らの先行研究 (12) とは異なる結果であった。Mills らは、エンドウ *Pisum sativum* から調製したチラコイド膜に対して、ハウレンソウから精製した FTR および Trx-*f* を添加し、光照射を行ったうえで、チラコイド膜の  $CF_0CF_1$  の ATP 加水分解活性を測定した。その結果、光照射下において  $CF_0CF_1$  は高い ATPase 活性を示し、尚且つ、この活性化は Trx-*f* の有無には依存しなかった。ただし、Trx-*f* の添加によって、 $CF_0CF_1$  の示す最大活性が僅かに増加している。本研究とこれらの結果の違いは、先行研究では、 $CF_0CF_1$  の酵素活性から活性化を判断したことに由来すると考えられる。 $CF_0CF_1$  の酵素活性は、 $CF_1$ - $\gamma$  が酸化型であっても  $\Delta\mu H^+$  の形成によって上昇するため (14,15)、この影響を反映していたと考えられる。

また、本研究を行うにあたって、FNR や Fd が  $CF_1$ - $\gamma$  を直接還元することも期待した。その理由は、これらが *in vivo* ではチラコイド膜の近傍に存在するためである。FNR は、シトクロム *b<sub>6</sub>f* によってチラコイド膜上にアンカーされていることが知られている (51)。また、

---

Fd は PSI から還元力を受け取ることから、チラコイド膜の近傍に存在することが多いと考えられる。膜近傍に存在する還元力伝達因子が、同じく膜上に存在する CF<sub>I</sub>-γ を直接還元することが可能であれば、還元力伝達の物理的な距離が近く、Trx と比べて還元速度が速くなると予想した。シロイヌナズナの FTR 欠損株においても、CF<sub>I</sub>-γ が光還元されていたことから (43)、FTR より上流の還元力伝達因子が CF<sub>I</sub>-γ を還元することが可能であれば、結果と予想の整合性が合う。しかし、本章の結果から、FNR や Fd も CF<sub>I</sub>-γ を還元しないことが確認された。

次に、グルタチオンが CF<sub>I</sub>-γ の還元過程へと与える影響について調べた (図 2-6)。グルタチオンは生体内に豊富に存在する還元物質であり、*in vitro* 実験系をより *in vivo* の環境に近づけるために添加した。また、グルタチオンの添加によって、実験系がより還元的になることで、Fd/Trx システムの還元力伝達が活性化する、または CF<sub>I</sub>-γ が還元力を受け取りやすくなると予想した。まず、光環境下であっても、グルタチオンが CF<sub>I</sub>-γ を直接還元しないことを確認した (図 2-6AC、+GSH/GSSG + Fd)。この時、Fd によって、チラコイド膜内外に ΔμH<sup>+</sup> は形成されていると想定される。次に、グルタチオンの存在下で Fd/Trx システムを再構成したが、CF<sub>I</sub>-γ の還元効率に大きな変化はなかった (図 2-6AC、+GSH/GSSG + Fd/FTR + Trx-*fl*)。これらの結果から、グルタチオンは CF<sub>I</sub>-γ の還元過程には影響しないと考えられる。

本章では、チラコイド膜に対して、Fd/Trx システムの再構成およびグルタチオンの添加を行ったことで、先行研究と比べて、より *in vivo* の還元条件に近づけたと考えている。しかし、CF<sub>I</sub>-γ の還元速度は遅く、また、完全には還元されなかった。以上の結果から、CF<sub>I</sub>-γ の還元速度を決定するような *in vivo* での要因が、他にも存在すると考えられる。

#### 2-4-2. 生体内の CF<sub>I</sub>-γ の還元機構

本章では、Trx 以外の生体内の還元因子の CF<sub>I</sub>-γ に対する還元活性を調べた。しかし、結果としては、Trx のみが CF<sub>I</sub>-γ を還元することは可能であった。ただし、本章で調べた還元力伝達因子にも、候補は存在する。

例えば、NTRC である。NTRC は、NADPH から還元力を受け取る NTR ドメインと、標的へ還元力を伝達する TRX ドメインから構成される (52)。先行研究によって、シロイヌナズナの NTRC 欠損株では、弱光下において、CF<sub>I</sub>-γ の光還元の効率が低下することが明らかになっている (53,54)。しかし、強光条件下では野生型と同程度まで還元され、FTR 欠損株と掛け合わせ株においても、CF<sub>I</sub>-γ は光還元される (43)。これらの結果から、Fd/Trx システムおよび NTRC 以外にも、CF<sub>I</sub>-γ を標的とする還元因子がいることが想定される。本章では、NTRC が NADPH を還元力とすることから、Fd およびチラコイド膜上の FNR によって循環型電子伝達の形成のために消費され、NTRC へと十分な還元力が供給できない可能性を想定し、実験系の構築は断念した。また、第 3 章では人工電子メディエーターである 1-Methoxy PMS を用いたが、これも NADPH を消費するため、NTRC と併用することができなかった。他にも、酸化因子としての性質が報告されている Trx 様タンパク質の ACHT が、Trx 標的のタ

ンパク質である FBPase を還元できることが報告されている (36)。ただし、Trx と比べてその還元の効率は悪い。従って、CF<sub>1</sub>-γ を標的とする未知の還元経路については、さらなる研究が必要である。

また、新規の還元力伝達因子以外にも、CF<sub>1</sub>-γ の光還元が速い理由があるのではないだろうか？例えば、CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> の膜への局在性自体が、*in vivo* における光還元速度の決定因子である可能性が考えられる。つまり、同じく膜に存在する PSI に、より近い距離に存在することが、ストロマに遊離する Trx 標的タンパク質より光還元が速い理由である可能性がある。例えば、ストロマの Trx 標的タンパク質の中でも、Rubisco の活性化に関わる RCA は、FBPase や SBPase と比べて光還元速度が速い (37)。一方で、所属研究室の先行研究によって、ストロマタンパク質をチラコイド膜にアンカーさせても、光還元速度に変化がないことが報告されている (55)。

---

## 第 3 章

### Trx 様タンパク質による $\text{CF}_0\text{CF}_1$ の酸化制御

### 3-1. 本章の概要

$\text{CF}_0\text{CF}_1$  における酸化還元制御は、特に暗所で酵素を不活性化することで、ATP 合成とは逆反応である ATP 加水分解を防ぐために重要であると予想されていた。しかし、その酸化過程については、これまでほとんど研究が行われていなかった。その主な理由は、酸化力を提供する実体そのものが不明であったことによる。本章では、近年、所属研究室が酸化因子として同定した Trx 様タンパク質である Trx-like2 (TrxL2) と atypical Cys-His rich Trx (AHT) に注目し、それらが  $\text{CF}_0\text{CF}_1$  を酸化できるか否かを *in vitro* 実験によって調べた。その結果、いずれの酸化因子も、 $\text{CF}_0\text{CF}_1$  を酸化できることが明らかになった。さらに、チラコイド膜内外に  $\Delta\mu\text{H}^+$  が形成しているときに比べて  $\Delta\mu\text{H}^+$  が形成されていないときに、これらの酸化因子による  $\text{CF}_0\text{CF}_1$  の酸化速度と親和性が上昇することを見出し、 $\text{CF}_0\text{CF}_1$  の還元過程で見られた  $\Delta\mu\text{H}^+$  への依存性とは対照的であることが明らかとなった。また、同様の実験系を用いて、還元側ではたらく Trx の酸化能力も検証したところ、いずれも  $\text{CF}_0\text{CF}_1$  を酸化することができなかった。これらの結果は、ATP 合成反応の駆動力が形成されない暗所で、 $\text{CF}_0\text{CF}_1$  が Trx 様タンパク質によって酸化（不活性化）されやすくなることを示すものである。

---

## 3-2. 実験方法

### 3-2-1. 組換えタンパク質の発現

本章で使用した組換えタンパク質はすべて、*A. thaliana* 由来である (TrxL2.1, At5g06690; TrxL2.2, At5g04260; ACHT1, At4g26160; ACHT2, AT4G29670.1; Trx-*m*1, At1g03680; Trx-*x*, At1g50320; and Trx-*y*2, At1g43560)。また、発現プラスミドは、すべて先行研究で作製されたものを使用した (33-36)。Trx-*m*1 の発現は、第 2 章 2-2-1 の Trx-*f*1 と同様に、それ以外の組換えタンパク質の発現は、第 2 章 2-2-1 の FNR と同様に行った。

### 3-2-2. 組換えタンパク質の精製

組換えタンパク質の精製は、全て 4°C で行った。また、回収した目的のタンパク質は、第 2 章 2-2-2 と同様にして保存し、濃度の定量を行った。

#### 3-2-2-1. TrxL2.1、TrxL2.2 の精製

菌体を 50 mL の TI バッファー① (25 mM Tris-HCl (pH 8.1)、10 mM imidazole) で懸濁した。懸濁液に対して、第 2 章 2-2-2-1 の Trx-*f*1 と同様に、超音波破碎と超遠心分離を行った。上清を回収し、Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーを行うために 5 mL の Ni-NTA superflow (QIAGEN) へ加え、混和転倒 (42 min, 4°C) した。50 mL の TI バッファー② (25 mM Tris-HCl (pH 8.1)、20 mM imidazole) で樹脂を洗浄し、40 mL の TI バッファー③ (25 mM Tris-HCl (pH 8.1)、250 mM imidazole) で溶出した。その後、溶出液を、Spectra/Por Dialysis Membrane (Cut off MW: 6,000–8,000) を用いて、3 L の TN バッファー⑥ (25 mM Tris-HCl (pH 7.8)、50 mM NaCl) に対して 2 h 透析、続いて 3 L の TN バッファー⑦ (25 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50 mM NaCl) に対して一晩透析した。透析後のタンパク質溶液を、第 2 章 2-2-2-2 の FTR と同様に、濃縮してゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行った。

#### 3-2-2-2. ACHT1、ACHT2 の精製

菌体を cOmplete protease inhibitor cocktail (EDTA-free) (Roche) を含む TN バッファー⑧ (25 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl) で懸濁した。懸濁液に対して、第 2 章 2-2-2-1 の Trx-*f*1 と同様に、超音波破碎と超遠心分離を行った。上清を回収し Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーを行うために 5 mL の Ni-NTA superflow (QIAGEN) へ加え、混和転倒 (30 min, 4°C) した。50 mL の TN バッファー⑧ (25 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl) と 50 mL の 10 mM imidazole を含む TN バッファー⑧で樹脂を洗浄し、22.5 mL の 200 mM imidazole を含む TN バッファー⑧で溶出した。その後、溶出液に 1 mM EDTA を添加し、Spectra/Por Dialysis Membrane (Cut off MW: 12,000–14,000) を用いて、2.5 L の MDE バッファー (25 mM MES-NaOH (pH 6.1)、0.5 mM DTT<sub>red</sub>、1 mM EDTA) に対して一晩透析した。透析後のタンパク質溶液を、30 mL の TOYOPEARL SP650M へ加え、MDE バッファー中の

NaCl 濃度に 0–300 mM の直線濃度勾配をかけて、陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。その後、目的のタンパク質が溶出した画分を SDS-PAGE によって確認して回収し、第 2 章 2-2-2-2 の FTR と同様に、濃縮してゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行った。ただし、カラムは Superdex 75 10/300 GL increase (GE Healthcare) を使用した。

### 3-2-2-3. Trx-*m1* の精製

第 2 章 2-2-2-1 の Trx-*f1* と同様に、陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。その後、目的のタンパク質が溶出した画分を SDS-PAGE によって確認して回収し、飽和濃度 30% の硫酸アンモニウムを添加した。この時、Trx-*m1* は硫酸アンモニウムによっては沈殿しない。そこで、Trx-*m1* を含む上清を、30 mL の TOYOPEARL Butyl-650M へ加え、25 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中の硫酸アンモニウム濃度に 30–0% の直線逆濃度勾配をかけて、疎水性相互作用クロマトグラフィーを行った。その後、目的のタンパク質が溶出した画分を SDS-PAGE によって確認して回収し、第 2 章 2-2-2-1 の Trx-*f1* と同様に、透析、濃縮した。

### 3-2-2-4. Trx-*x*、Trx-*y2* の精製

菌体を TED バッファー (25 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA、0.5 mM DTT<sub>red</sub>) で懸濁した。懸濁液に対して、第 2 章 2-2-2-1 の Trx-*f1* と同様に、超音波破碎と超遠心分離を行った。上清を回収し、40 mL の TOYOPEARL DEAE-600 に添加し、TED バッファー中の NaCl 濃度に 0–200 mM の直線濃度勾配をかけて、陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。その後、目的のタンパク質が溶出した画分を SDS-PAGE によって確認して回収し、飽和濃度の 30% の硫酸アンモニウムを添加した。この時、Trx-*x* および Trx-*y2* は硫酸アンモニウムによっては沈殿しない。このタンパク質溶液を、40 mL の TOYOPEARL Butyl-650M に添加し、TED バッファー中の硫酸アンモニウム濃度に 30–0% の直線逆濃度勾配をかけて、疎水性相互作用クロマトグラフィーを行った。その後、目的のタンパク質が溶出した画分を SDS-PAGE によって確認して回収し、第 2 章 2-2-2-1 の Trx-*f1* と同様に、透析、濃縮した。

## 3-2-3. ホウレンソウ緑葉からの還元型 CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> を含むチラコイド膜の調製

CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の酸化実験を行うためには、還元型 CF<sub>1</sub>- $\gamma$  を含むチラコイド膜を調製する必要がある。第 2 章 2-2-3 の通りホウレンソウ緑葉から通常の方法でチラコイド膜を調製すると、膜に存在している CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> 中の CF<sub>1</sub>- $\gamma$  は調製の過程で酸化されている。そこで、本章では以下の 2 通りの方法で還元型 CF<sub>1</sub>- $\gamma$  を含むチラコイド膜を調製し、どちらを酸化実験に用いるかを検討した。

### 3-2-3-1. ホウレンソウ緑葉への光照射および還元剤の浸潤処理

市販の 1 把のホウレンソウを使用する前日に水洗いし、新聞紙に包んで冷暗所で立てて一晩放置した。ホウレンソウに付着した水滴をよくふき取り、葉柄を含まないように緑葉を切

り取った。10 g の葉片に対して、図 3-1 の LED 装置を用いて光照射 ( $1,000\text{--}1,500\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ) を室温で 10 min 行った。その後、直ちに葉片を幅 1 cm 程度の短冊状に切り、300 mL の還元バッファー (50 mM Tricine-NaOH (pH 7.5)、0.4 M Sucrose、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、10 mM NaCl、20 mM DTT<sub>red</sub>) に浸し、吸引鐘とアスピレーターを用いて減圧処理を室温で 3 min 行った (図 3-2A)。減圧条件を開放した際、還元バッファーが葉片へと浸潤され、葉片の色が暗くなるため浸潤の有無を判別することができる (図 3-2B)。

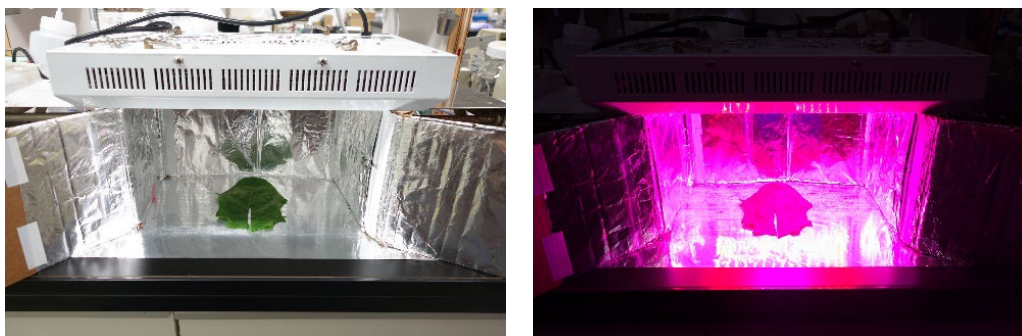


図 3-1. 破碎前の緑葉へ光照射を行うための LED 装置  
実際の使用時には、側面と底の 5 面をアルミホイルで覆い、上から LED 照射を行った。

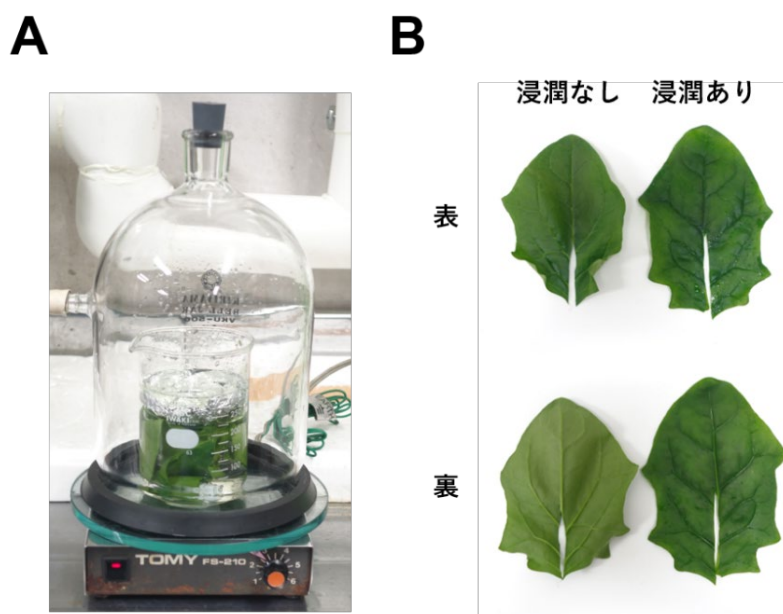


図 3-2. ホウレンソウ緑葉への浸潤処理  
(A) 吸引鐘を用いた浸潤処理の様子。(B) 浸潤前後のホウレンソウ緑葉の変化。

還元処理を行った葉片と 200 mL の還元バッファーを予冷したミキサーに加え、3 s の破碎を 3 回繰り返した。破碎液を、4 重にしたガーゼで濾過した後、遠心分離 ( $3,000 \times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ) した。沈殿を回収し、30 mL の還元バッファーで懸濁した後、遠心分離 ( $300 \times$

g、1 min、4°C) した。上清を回収し、遠心分離 (3,000 × g、10 min、4°C) した。沈殿を回収し、上記の操作を調製用バッファーでもう 2 回行い、DTT<sub>red</sub>を除いた。最終的に得られた沈殿を、2 mL の調製用バッファーで懸濁し、チラコイド膜画分とした。チラコイド膜画分のクロロフィル濃度を第 2 章 2-2-4 と同様に測定し、500 µg Chl/mL になるように調製用バッファーで希釈した後、冷暗所で 1 h 以上放置した。CF<sub>I</sub>-γ の酸化還元状態は、第 2 章 2-2-6 と同様に決定した。

### 3-2-3-2. 通常の方法でチラコイド膜を調製後、組換え Trx で CF<sub>I</sub>-γ を還元

第 2 章 2-2-3 の通りにチラコイド膜を調製した。ただし、400 mL の調製用バッファーを用いて 20 g の緑葉を破碎した。

調製したチラコイド膜に含まれる CF<sub>0</sub>CF<sub>I</sub> 中の CF<sub>I</sub>-γ を、組換え体 Trx と DTT<sub>red</sub> で還元した。CF<sub>I</sub>-γ の還元は、調製用バッファーを用いて、25°C で行った。反応溶液の組成は、50 µg Chl/ml Thylakoid membrane、100 µM 1-Methoxy PMS、2 µM Trx-f1、50 mM DTT<sub>red</sub> とし、全体量を 30 mL とした。反応溶液を、マグネティックスターラーを用いて攪拌し、LED パネルを用いて光照射 (600–650 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) を行った。この時、チラコイド膜への光照射によって、人工電子メディエーターである 1-Methoxy PMS により循環電子伝達を発生させて、膜内外に ΔμH<sup>+</sup> を形成させた (56)。光照射の開始から 10 min ごとに、反応溶液から 100 µL を分取し、同量の 20% (v/v) トリクロロ酢酸と混和して、タンパク質を沈殿させた。この沈殿は、CF<sub>I</sub>-γ の酸化還元状態を確認するために使用した。光照射の開始から 30 min で、反応溶液全量を遠心分離 (3,000 × g、10 min、4°C) した。沈殿を回収し、30 mL の調製用バッファーで懸濁した後、遠心分離 (300 × g、1 min、4°C) した。上清を回収し、遠心分離 (3,000 × g、10 min、4°C) した。沈殿を回収し、上記の洗浄操作をもう 2 回行った。また、洗浄を行うごとに、反応溶液から 100 µL を分取し、同量の 20% (v/v) トリクロロ酢酸と混和して、タンパク質を沈殿させた。最終的に得られた沈殿に 2 mL の調製用バッファーを加えて懸濁し、チラコイド膜画分とした。チラコイド膜画分のクロロフィル濃度を第 2 章 2-2-4 と同様に測定し、500 µg Chl/mL になるように調製用バッファーで希釈した後、冷暗所で 1 h 以上放置した。CF<sub>I</sub>-γ の酸化還元状態は、第 2 章 2-2-6 と同様に決定した。

### 3-2-4. プロトン輸送活性の測定

チラコイド膜に含まれる  $CF_0CF_1$  の  $H^+$  輸送活性を測定した。 $CF_0CF_1$  は、ATP 加水分解反応と共役して  $H^+$  をチラコイドルーメンへと輸送する。本章では、チラコイド膜内外に形成された  $\Delta pH$  を、蛍光指示薬である 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine (ACMA) の蛍光強度の減少として測定した ( $\lambda_{ex} = 410 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{em} = 480 \text{ nm}$ )。ACMA は、低 pH であるルーメンへ入るとプロトン化し、正に荷電して膜を透過できずにルーメンに蓄積する。その結果、高濃度状態では蛍光強度が低下する (57,58)。ACMA の蛍光は、FP-8500 (JASCO) を用いてモニターした。

$CF_0CF_1$  の ATP 加水分解反応は、調製用バッファーを用いて、 $25^\circ\text{C}$  で行った。まず、 $1,580 \mu\text{L}$  の調製用バッファーに、 $200 \mu\text{L}$  の  $200 \mu\text{g Chl/ml Thylakoid membrane}$  と  $20 \mu\text{L}$  の  $30 \mu\text{g/mL ACMA}$  を添加した。反応溶液を、マグネティックスターラーを用いて攪拌し、ACMA の蛍光を安定化させて、測定を開始した。測定開始から  $180 \text{ s}$  で  $200 \mu\text{L}$  の  $50 \text{ mM ATP}$  を添加し、 $900 \text{ s}$  で  $1 \mu\text{L}$  の  $5 \text{ mM FCCP}$  を添加した。反応溶液の最終的な組成は、 $20 \mu\text{g Chl/ml Thylakoid membrane}$ 、 $0.3 \mu\text{g/mL ACMA}$ 、 $5 \text{ mM ATP}$ 、 $5 \mu\text{M FCCP}$  とした。また、FCCP 添加後の蛍光強度を 1 として相対蛍光強度を算出した。

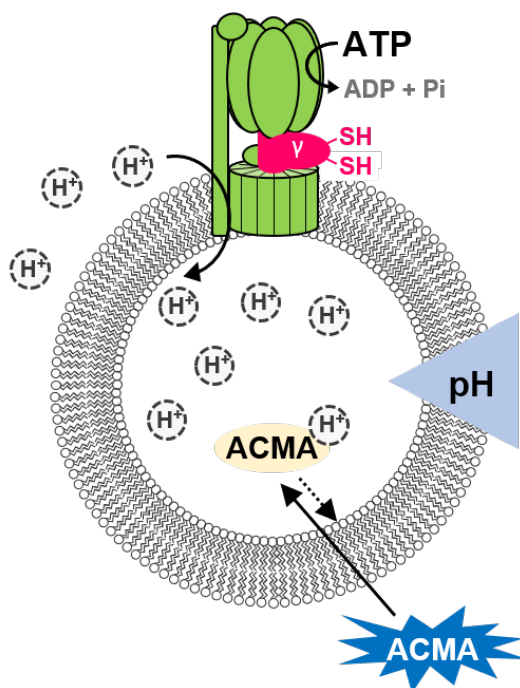


図 3-3. チラコイド膜の ATP 依存  $H^+$  輸送活性の測定方法の模式図

チラコイド膜に ATP を添加して、 $CF_0CF_1$  の  $H^+$  輸送活性を測定した。 $CF_0CF_1$  は、ATP 加水分解反応と共役して、 $H^+$  をチラコイドルーメンへと輸送する。その結果膜内外に生じた pH 勾配を、蛍光指示薬の ACMA を用いて検出した。

### 3-2-5. CF<sub>I</sub>-γ の *in vitro* 酸化実験

Trx 様タンパク質および Trx が CF<sub>I</sub>-γ を酸化できるか否かを調べるために、図 3-4 に示した *in vitro* 実験系を構築した。CF<sub>I</sub>-γ の酸化は、使用前に室温で 1 h 脱気した調製用バッファーを用いて、25°C で行った。実験に用いた Trx 様タンパク質と Trx は、150–5000 nM Trx 様タンパク質または Trx と 500 μM DTT<sub>ox</sub> を含む調製用バッファー中でインキュベート (25°C、10 min) することであらかじめ酸化した。まず、790 μL の調製用バッファーに、100 μL の 500 μg Chl/ml Thylakoid membrane と 10 μL の 10 mM 1-Methoxy PMS を添加し、マグネティックスターラーで攪拌しながら LED で光照射を行った (600–650 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>、25°C、5 min)。その後、光照射下の 900 μL のチラコイド膜/PMS 混合液に、100 μL の Trx 様タンパク質または Trx/DTT<sub>ox</sub> 混合液を添加することで、酸化反応を開始した。反応溶液の最終的な組成は、50 μg Chl/mL Thylakoid membrane、100 μM 1-Methoxy PMS、50 μM DTT<sub>ox</sub>、15–500 nM Trx 様タンパク質または Trx とした。反応の開始から一定時間 (0–900 s) ごとに、反応溶液から 100 μL を分取し、同量の 20% (v/v) トリクロロ酢酸と混和して反応を停止させた。CF<sub>I</sub>-γ の酸化還元状態は、第 2 章 2-2-6 と同様に決定した。

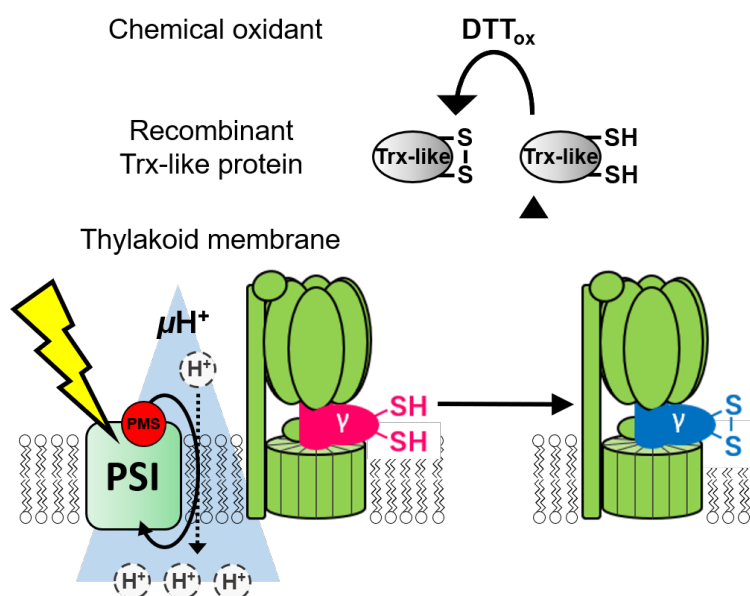


図 3-4. Trx 様タンパク質による CF<sub>I</sub>-γ の *in vitro* 酸化実験の模式図

DTT<sub>ox</sub> によって Trx 様タンパク質を持続的に酸化し、チラコイド膜上の CF<sub>I</sub>-γ を酸化するように設計した。また、チラコイド膜へ光照射を行い、1-Methoxy PMS によって膜内外に ΔμH<sup>+</sup> を形成させた。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. ホウレンソウ緑葉からの還元型 $\text{CF}_0\text{CF}_1$ を含むチラコイド膜の調製

はじめに、 $\text{CF}_1\text{-}\gamma$ の酸化実験を行うために、還元型  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$ を含むチラコイド膜を調製した。第2章 2-2-3 の通り、ホウレンソウ緑葉から通常の方法でチラコイド膜を調製すると、膜に存在している  $\text{CF}_0\text{CF}_1$  中の  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$ は酸化型であることを確認した(図 3-5A、Untreated)。そこで、本章では、3-2-3-1「ホウレンソウ緑葉への光照射および還元剤の浸潤処理」(図 3-5A)、3-2-3-2「通常の方法でチラコイド膜を調製後、組換え *Trx* で  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$ を還元」(図 3-5B)の二通りの調製方法を確立した。

まず、3-2-3-1の方法でチラコイド膜を調製した場合、膜上の  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$ は約 80%が還元型であった(図 3-5A、+DTT<sub>red</sub>(Vac.))。これに対して、還元処理のコントロール実験として、光照射を行わず還元剤を含まない調製用バッファーのみを減圧下で浸潤した緑葉からチラコイド膜を調製すると、 $\text{CF}_1\text{-}\gamma$ はほぼ完全に酸化型であった(図 3-5A、- DTT<sub>red</sub>(Vac.))。この結果は、 $\text{CF}_1\text{-}\gamma$ の酸化還元状態は、緑葉への浸潤処理には依存せず、還元処理の有無によって制御されたことを示唆する。また、3-2-3-2の方法でチラコイド膜を調製した場合も、*Trx* による還元後、洗浄過程でわずかに酸化されるものの(図 3-5B、Wash)、3-2-3-1と同様に、膜上の  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$ は約 80%が還元型であった(図 3-5B、Resulting thylakoids)。

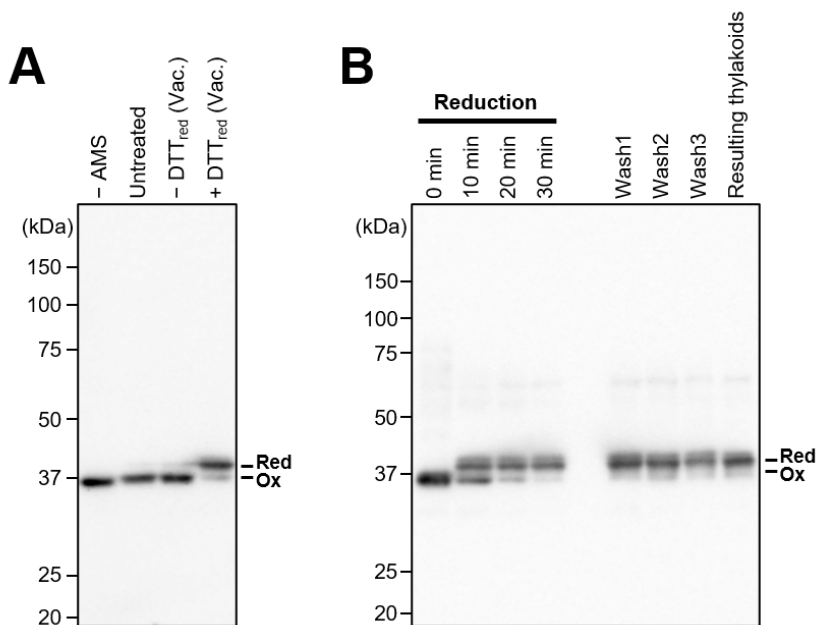


図 3-5. 還元処理を行ったチラコイド膜に含まれる  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  の酸化還元状態

チラコイド膜に含まれるタンパク質を抽出し、チオール基修飾法によって還元型のタンパク質を標識した。非還元 SDS-PAGE によってタンパク質を分離した後、ウェスタンブロットング解析によって還元型 (Red) と酸化型 (Ox) の  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  を識別した。(A) 3-2-3-1 の方法で調製したチラコイド膜。(B) 3-2-3-2 の方補で調製したチラコイド膜。

### 3-3-2. プロトン輸送活性の測定

3-2-3 で調製した 2 種類のチラコイド膜には、どちらも還元型  $\text{CF}_0\text{CF}_1$  が含まれていることが確認された。次に、この還元型  $\text{CF}_0\text{CF}_1$  が、酵素活性を維持しているか否かを調べた。本章では、ATP 加水分解反応と共役した  $\text{H}^+$  輸送活性を測定した (図 3-6)。いずれのチラコイド膜を用いた測定においても、ATP を添加した直後の急激な消光と、その後に続く緩やかな消光の 2 段階の消光を観察した。前者は ACMA と ATP の直接的な相互作用による結果であり、後者が  $\text{CF}_0\text{CF}_1$  による  $\text{H}^+$  輸送活性の結果であることが既に報告されている (59)。

まず、3-2-3-1 の方法で調製したチラコイド膜においては、 $\text{CF}_0\text{CF}_1$  の  $\text{H}^+$  輸送による顕著な ACMA の蛍光の消光 ( $\Delta\text{pH}$  の形成)、および脱共役剤 FCCP の添加による蛍光の回復 ( $\Delta\text{pH}$  の解消) が観察された (図 3-6A、+DTT<sub>red</sub> (Vac.))。なお、直線性を示した間 (300–420 s、 $r > 0.997$ ) の  $\text{CF}_0\text{CF}_1$  の  $\text{H}^+$  輸送に対応した ACMA の蛍光の消光速度は、 $2.11 \pm 0.315$  ( $\times 10^{-3}$  relative fluorescence intensity/s、平均値  $\pm$  標準偏差 ( $n=4$ )) であった。これに対して、酸化型  $\text{CF}_0\text{CF}_1$  しか含まないチラコイド膜においては、いずれも顕著な ACMA の蛍光の変化は観察されなかった (図 3-6A、Untreated、- DTT<sub>red</sub> (Vac.))。すなわち、 $\text{CF}_1$ - $\gamma$  の酸化還元状態に依存した  $\text{CF}_0\text{CF}_1$  の  $\text{H}^+$  輸送活性の変化を確認したことを示唆する。一方で、3-2-3-2 の方法で調製したチラコイド膜では、還元型  $\text{CF}_0\text{CF}_1$  を含むにも関わらず、 $\text{CF}_0\text{CF}_1$  の  $\text{H}^+$  輸送を観察することができなかった。つまり、 $\text{CF}_0\text{CF}_1$  の酵素活性が維持されていない、あるいは、チラコイド膜の一部が崩壊し、膜から  $\text{H}^+$  が漏洩しやすくなっていることで  $\Delta\text{pH}$  が形成されないことを示唆している。これらの結果から、以降の  $\text{CF}_1$ - $\gamma$  の *in vitro* 酸化実験では、3-2-3-1 の方法で調製したチラコイド膜を用いた。

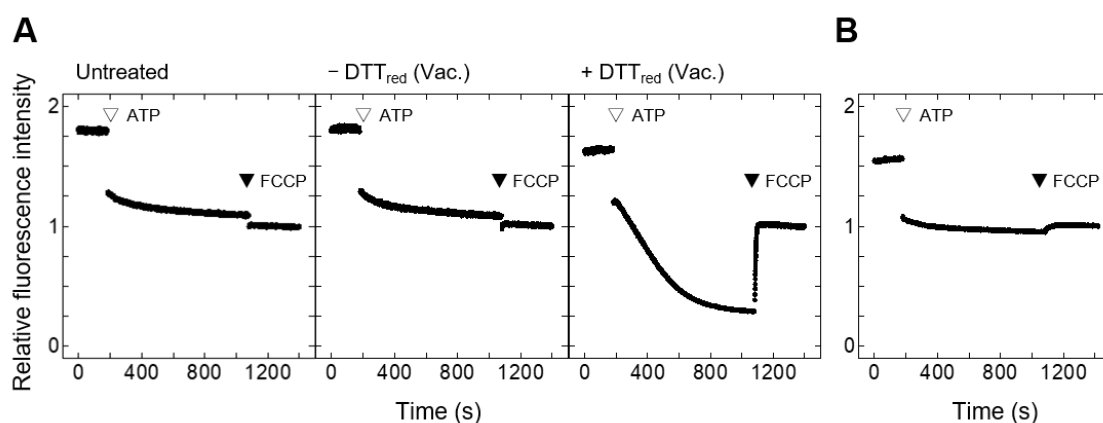


図 3-6. チラコイド膜の  $\text{CF}_0\text{CF}_1$  による ATP 依存  $\text{H}^+$  輸送活性の測定

チラコイド膜の ATP に依存した  $\text{H}^+$  輸送活性。チラコイド膜 (20  $\mu\text{g}$  Chl/mL) を、0.3  $\mu\text{g}$ /mL ACMA とインキュベートし、ACMA の蛍光強度 ( $\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$ ) をモニターした。▽は 5 mM ATP を添加した時間を、▼は 5  $\mu\text{M}$  FCCP を添加した時間を示している。(A) 3-2-3-1 の方法で調製したチラコイド膜の結果。(B) 3-2-3-2 の方法で調製したチラコイド膜の結果。

### 3-3-3. CF<sub>1</sub>- $\gamma$ の *in vitro* 酸化実験

CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> の還元状態と酵素活性が維持されていることが確認された 3-2-3-1 のチラコイド膜を用いて、Trx 様タンパク質および Trx による CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の *in vitro* 還元実験を行った。本章で構築した *in vitro* 実験系では、Trx 様タンパク質および Trx に対する最終的な酸化力として、DTT<sub>ox</sub> を設定した。また、Trx による CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の還元過程には、あらかじめチラコイド膜内外に  $\Delta\mu\text{H}^+$  が形成されている必要であることから、 $\Delta\mu\text{H}^+$  が酸化過程にも影響を及ぼすと予想した。そこで、チラコイド膜へ光照射を行い、人為的にチラコイド膜に  $\Delta\mu\text{H}^+$  を印加した。また、コントロール実験として、暗条件下で  $\Delta\mu\text{H}^+$  を形成させない場合と、光条件下で形成させた  $\Delta\mu\text{H}^+$  を 5  $\mu\text{M}$  FCCP によって解消した場合について同様の実験を行った。なお、DTT<sub>ox</sub> 単独では、 $\Delta\mu\text{H}^+$  の有無に関わらず、CF<sub>1</sub>- $\gamma$  を直接酸化する効率が低いことを確認した (図 3-7)。

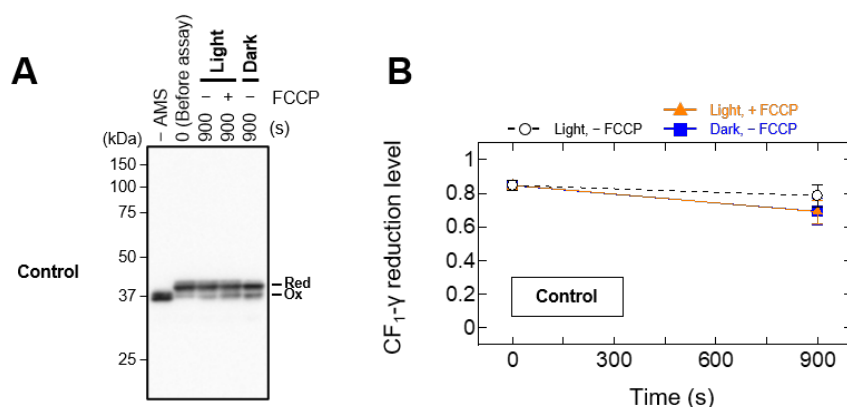


図 3-7. DTT<sub>ox</sub> による CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の *in vitro* 酸化実験

(A) DTT<sub>ox</sub> によるチラコイド膜上の CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の酸化。  $\Delta\mu\text{H}^+$  の形成または非形成条件下で、チラコイド膜 (50  $\mu\text{g}$  Chl/mL) を、100  $\mu\text{M}$  1-Methoxy PMS、50  $\mu\text{M}$  DTT<sub>ox</sub> とともに 900 s インキュベートした。その後、反応溶液を分取し、チオール基修飾法によって還元型のタンパク質を標識した。非還元 SDS-PAGE によってタンパク質を分離した後、ウエスタンブロッティング解析によって還元型 (Red) と酸化型 (Ox) の CF<sub>1</sub>- $\gamma$  を識別した。(B) CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の酸化還元状態の経時変化。A から CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の還元率を定量し、反応時間に対してプロットした。値は、平均値  $\pm$  標準偏差 ( $n = 7-8$ ) の形で示した。

#### 3-3-3-1. Trx 様タンパク質による CF<sub>1</sub>- $\gamma$ の酸化

本章では、既に *in vitro* 実験で酸化因子としての性質が報告されている TrxL2 (TrxL2.1、TrxL2.2) と ACHT (ACHT1、ACHT2) について注目した (35,36)。TrxL2 と ACHT の CF<sub>1</sub>- $\gamma$  に対する酸化活性を調べたところ、いずれのアイソフォームも CF<sub>1</sub>- $\gamma$  を酸化した (図 3-8)。しかし、それぞれのアイソフォームごとに、CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の酸化還元状態の変化のパターンに違いが見られた。さらに、 $\Delta\mu\text{H}^+$  の形成の有無が、この酸化パターンに影響を及ぼしている様子が観察された (図 3-9)。そこで、CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の酸化還元状態の経時的な変化と Trx 様タンパク質の濃度依存的な変化のデータを、次の式 (12) にフィッティングすることで、反応開始前の CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の還元率が半分になる時定数 ( $t_{1/2}$ ) および Trx 様タンパク質の濃度 ( $S_{1/2}$ ) を求めた (表 3-1)。

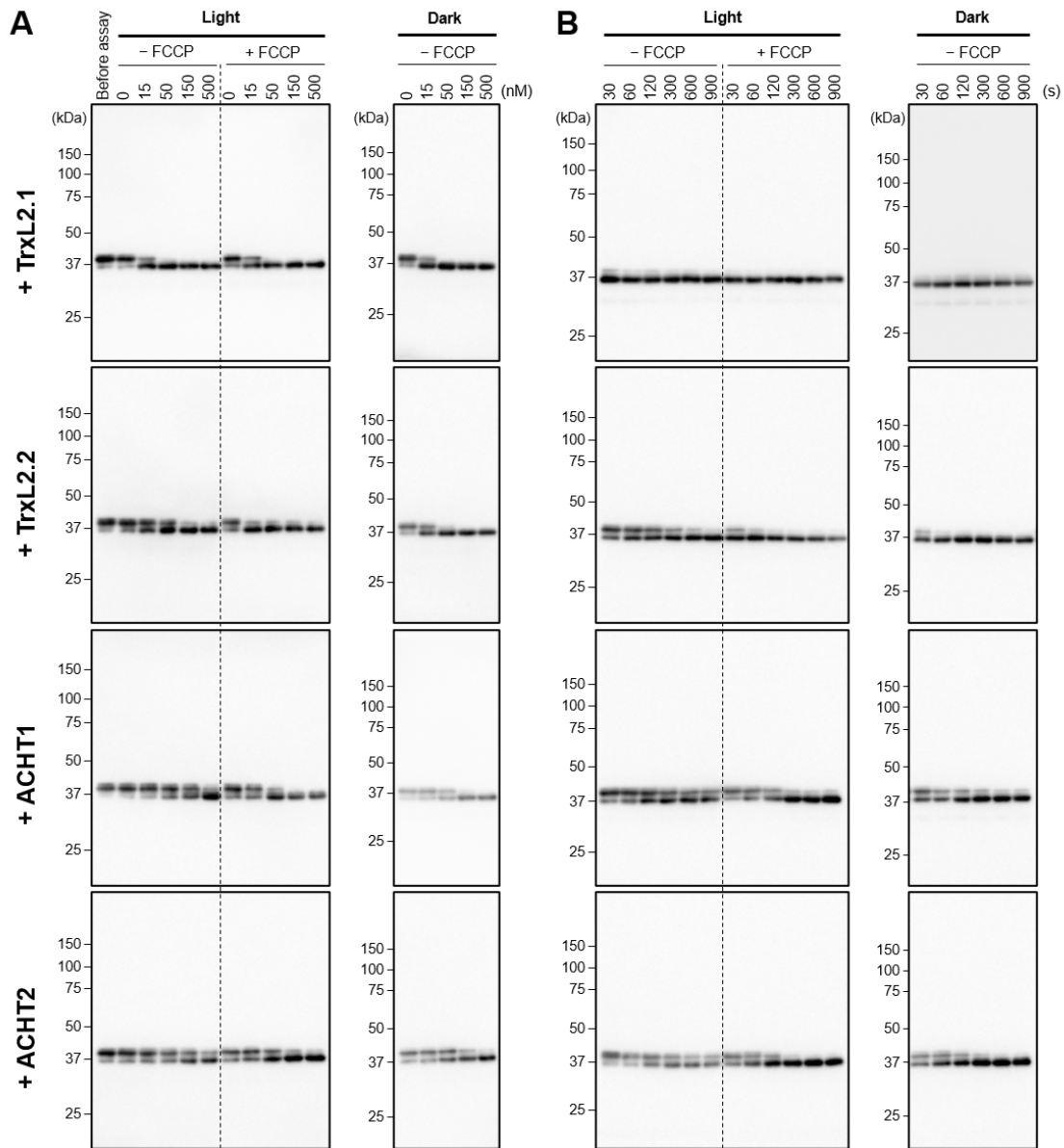
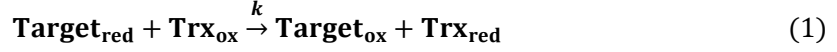


図 3-8. Trx 様タンパク質による CF<sub>1</sub>-γ の *in vitro* 酸化実験

(A) Trx 様タンパク質によるチラコイド膜上の CF<sub>1</sub>-γ の酸化の濃度依存性。ΔμH<sup>+</sup>の形成または非形成条件下で、チラコイド膜 (50 μg Chl/mL) を、100 μM 1-Methoxy PMS、50 μM DTT<sub>ox</sub>、0–500 nM Trx 様タンパク質とともに 900 s インキュベートした。その後、反応溶液を分取し、チオール基修飾法によって還元型のタンパク質を標識した。非還元 SDS-PAGE によってタンパク質を分離した後、ウエスタンブロッティング解析によって還元型 (Red) と酸化型 (Ox) の CF<sub>1</sub>-γ を識別した。

(B) Trx 様タンパク質によるチラコイド膜上の CF<sub>1</sub>-γ の酸化の時間変化。ΔμH<sup>+</sup>の形成または非形成条件下で、チラコイド膜 (50 μg Chl/mL) を、100 μM 1-Methoxy PMS、50 μM DTT<sub>ox</sub>、500 nM Trx 様タンパク質とともに 900 s インキュベートした。指定の反応時間で反応溶液を分取し、チオール基修飾法によって還元型のタンパク質を標識した。非還元 SDS-PAGE によってタンパク質を分離した後、ウエスタンブロッティング解析によって還元型 (Red) と酸化型 (Ox) の CF<sub>1</sub>-γ を識別した。

Trx による標的タンパク質の酸化反応、および DTT<sub>ox</sub> による Trx の酸化反応は、それぞれ式 (1) (2) のように表すことができる。



また、標的の全濃度  $[\mathbf{Target}_{\text{total}}]$  と Trx の全濃度  $[\mathbf{Trx}_{\text{total}}]$  は、以下のように定義した。

$$[\mathbf{Target}_{\text{total}}] = [\mathbf{Target}_{\text{ox}}] + [\mathbf{Target}_{\text{red}}] \quad (3)$$

$$[\mathbf{Trx}_{\text{total}}] = [\mathbf{Trx}_{\text{ox}}] + [\mathbf{Trx}_{\text{red}}] \quad (4)$$

$k' \gg k$  より、

$$[\mathbf{Trx}_{\text{total}}] \cong [\mathbf{Trx}_{\text{ox}}] \quad (5)$$

また、酸化型の標的タンパク質の濃度  $[\mathbf{Target}_{\text{ox}}]$  の時間変化は、式 (1) と式 (5) より、

$$\frac{d[\mathbf{Target}_{\text{ox}}]}{dt} = k[\mathbf{Target}_{\text{red}}][\mathbf{Trx}_{\text{total}}] \quad (6)$$

$$\frac{d[\mathbf{Target}_{\text{ox}}]}{[\mathbf{Target}_{\text{red}}]} = k[\mathbf{Trx}_{\text{total}}]dt \quad (7)$$

式 (3) から、 $d[\mathbf{Target}_{\text{ox}}] = -d[\mathbf{Target}_{\text{red}}]$  より、

$$\frac{d[\mathbf{Target}_{\text{red}}]}{[\mathbf{Target}_{\text{red}}]} = -k[\mathbf{Trx}_{\text{total}}]dt \quad (8)$$

また、反応開始前 ( $t=0$ ) の CF<sub>1</sub>-γ の還元率を  $M$  とする。

$$\int_{M[\mathbf{Target}_{\text{total}}]}^{[\mathbf{Target}_{\text{red}}]} \frac{d[\mathbf{Target}_{\text{red}}]}{[\mathbf{Target}_{\text{red}}]} = \int_0^t -k[\mathbf{Trx}_{\text{total}}]dt \quad (9)$$

$$\ln[\mathbf{Target}_{\text{red}}] - \ln M[\mathbf{Target}_{\text{total}}] = -k[\mathbf{Trx}_{\text{total}}]t \quad (10)$$

$$\ln \frac{[\mathbf{Target}_{\text{red}}]}{M[\mathbf{Target}_{\text{total}}]} = -k[\mathbf{Trx}_{\text{total}}]t \quad (11)$$

$$\frac{[\mathbf{Target}_{\text{red}}]}{[\mathbf{Target}_{\text{total}}]} = M e^{-k[\mathbf{Trx}_{\text{total}}]t} \quad (12)$$

以上。

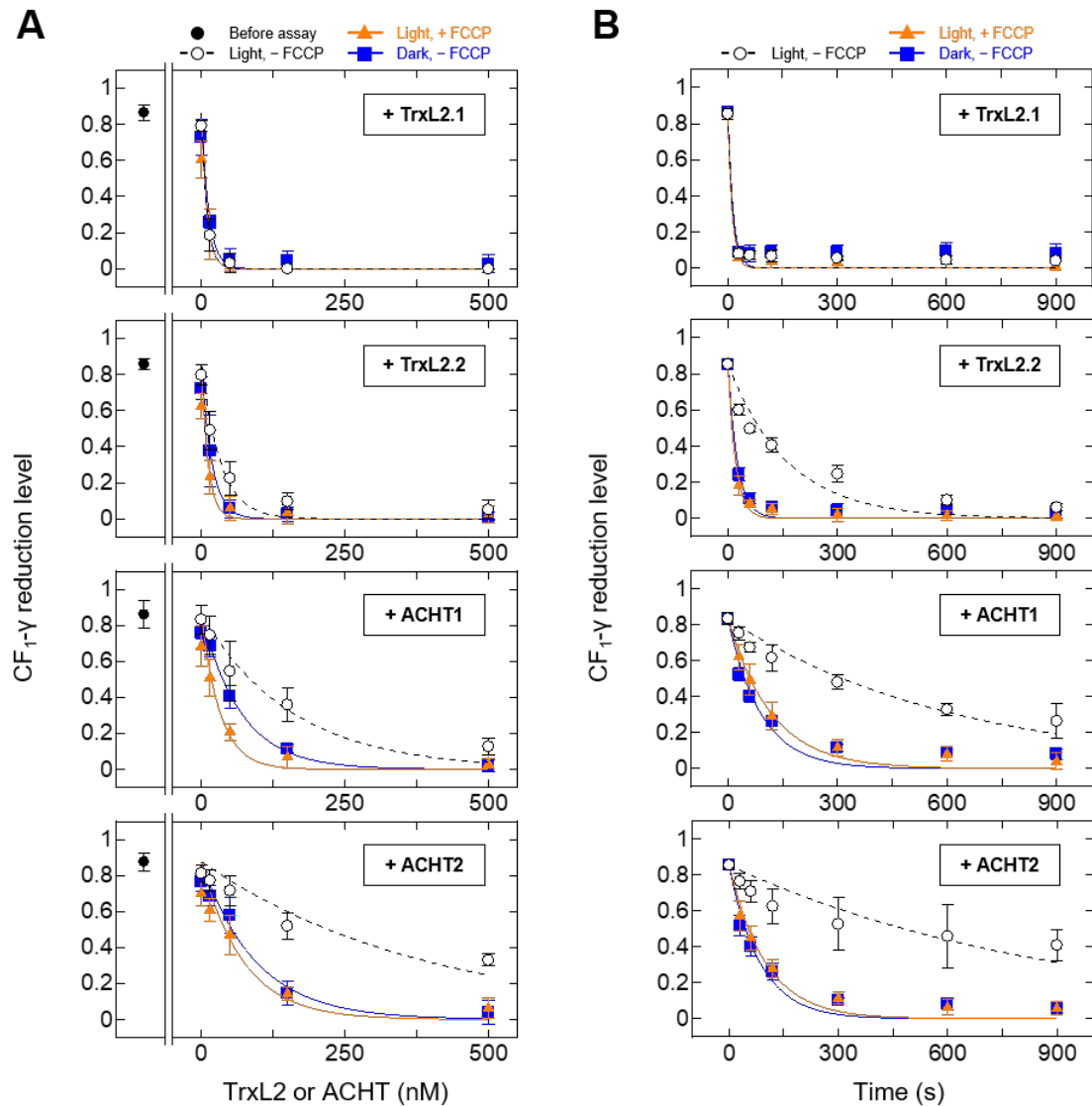


図 3-9. Trx 様タンパク質による CF<sub>1</sub>-γ の *in vitro* 酸化実験

(A) Trx 様タンパク質によるチラコイド膜上の CF<sub>1</sub>-γ の酸化の濃度依存性。図 3-8A から CF<sub>1</sub>-γ の還元率を定量し、Trx 様タンパク質の濃度に対してプロットした。値は、平均値 ± 標準偏差 (n=3) の形で示した。また、データを式 (15) (結果 3-3-3-1) にフィッティングし、得られた曲線も示した。

(B) Trx 様タンパク質によるチラコイド膜上の CF<sub>1</sub>-γ の酸化の時間変化。図 3-8B から CF<sub>1</sub>-γ の還元率を定量し、反応時間に対してプロットした。値は、平均値 ± 標準偏差 (n=3) の形で示した。また、データを式 (12) (結果 3-3-3-1) にフィッティングし、得られた曲線も示した。

まず、TrxL2.2 は、光照射下で $\Delta\mu\text{H}^+$ が形成されている場合と比べて、FCCP を用いて光照射下で形成された $\Delta\mu\text{H}^+$ を解消した時、または暗条件下で $\Delta\mu\text{H}^+$ を形成しなかった時、より低い  $t_{1/2}$  の値を示した。また、ACHT1 と ACHT2 も同様に、 $\Delta\mu\text{H}^+$ が形成されていない2つの条件下で顕著に低い  $t_{1/2}$  の値を示し、さらに、 $S_{1/2}$  の値も低下した。これらの結果は、チラコイド膜内外の $\Delta\mu\text{H}^+$ の有無が、ACHT と  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$ との親和性に影響を及ぼしたことを示唆する。しかし、TrxL2.1 は、いずれの条件においても  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$ を酸化する効率が著しく高く ( $S_{1/2} < 9 \text{ nM}$ 、 $t_{1/2} < 10 \text{ s}$ )、他の Trx 様タンパク質と同じ濃度では、 $t_{1/2}$  と  $S_{1/2}$  の値は $\Delta\mu\text{H}^+$ 依存して変化しなかった。そこで、より低濃度の TrxL2.1 を用いて  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$ の酸化速度を調べた (15 nM : 図 3-10、50 nM : 図 3-11)。その結果、 $\Delta\mu\text{H}^+$ 依存的な変化を確認することができた (表 3-2)。以上の結果から、いずれの Trx 様タンパク質による  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$ の酸化も、 $\Delta\mu\text{H}^+$ の形成・解消によって制御されていることが明らかになった。すなわち、 $\text{CF}_1\text{-}\gamma$ の酸化過程は、チラコイド膜内外の $\Delta\mu\text{H}^+$ の形成を必要とする還元過程とは、対照的な $\Delta\mu\text{H}^+$ 依存性を示した。

表 3-1. ACHT と TrxL2 による  $\Delta\mu\text{H}^+$ 形成条件ごとの  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  の酸化速度

図 3-9 から、 $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  の還元率が反応開始前から半分になる反応時間  $t_{1/2}$  と、Trx 様タンパク質の濃度  $S_{1/2}$  を求めた。異なるアルファベットは、各 Trx 様タンパク質における  $\Delta\mu\text{H}^+$ の形成条件ごとの有意差を表す ( $p < 0.05$ ; 一元配置分散分析および Tukey 検定) (<https://www.icalcu.com/stat/anova-tukey-hsd-calculator.html>)。

| Species | Conditions    | $\Delta\mu\text{H}^+$ | $S_{1/2}$ (nM)   | Significance<br>by condition<br>( $P < 0.05$ ) | R     | $t_{1/2}$ (s)     | Significance<br>by condition<br>( $P < 0.05$ ) | R     |
|---------|---------------|-----------------------|------------------|------------------------------------------------|-------|-------------------|------------------------------------------------|-------|
| TrxL2.1 | Light, - FCCP | Formed                | $7.1 \pm 2.5$    | a                                              | 0.993 | $9.4 \pm 1.1$     | a                                              | 0.986 |
|         | Light, + FCCP | Not formed            | $7.1 \pm 3.8$    | a                                              | 0.865 | $8.4 \pm 1.0$     | a                                              | 0.994 |
|         | Dark, - FCCP  | Not formed            | $8.9 \pm 1.0$    | a                                              | 0.966 | $9.9 \pm 1.9$     | a                                              | 0.964 |
| TrxL2.2 | Light, - FCCP | Formed                | $24.8 \pm 10.6$  | a                                              | 0.976 | $114.9 \pm 21.9$  | a                                              | 0.955 |
|         | Light, + FCCP | Not formed            | $8.1 \pm 2.0$    | a                                              | 0.878 | $14.4 \pm 3.0$    | b                                              | 0.995 |
|         | Dark, - FCCP  | Not formed            | $12.5 \pm 5.1$   | a                                              | 0.976 | $17.9 \pm 2.1$    | b                                              | 0.991 |
| ACHT1   | Light, - FCCP | Formed                | $110.8 \pm 43.4$ | a                                              | 0.973 | $433.2 \pm 62.5$  | a                                              | 0.964 |
|         | Light, + FCCP | Not formed            | $22.7 \pm 4.6$   | b                                              | 0.941 | $88.9 \pm 37.5$   | b                                              | 0.990 |
|         | Dark, - FCCP  | Not formed            | $48.1 \pm 8.7$   | ab                                             | 0.987 | $62.5 \pm 6.4$    | b                                              | 0.967 |
| ACHT2   | Light, - FCCP | Formed                | $272.4 \pm 50.2$ | a                                              | 0.916 | $688.9 \pm 385.9$ | a                                              | 0.855 |
|         | Light, + FCCP | Not formed            | $50.1 \pm 8.0$   | b                                              | 0.920 | $70.3 \pm 15.3$   | b                                              | 0.984 |
|         | Dark, - FCCP  | Not formed            | $66.1 \pm 6.4$   | b                                              | 0.974 | $59.2 \pm 11.3$   | b                                              | 0.974 |

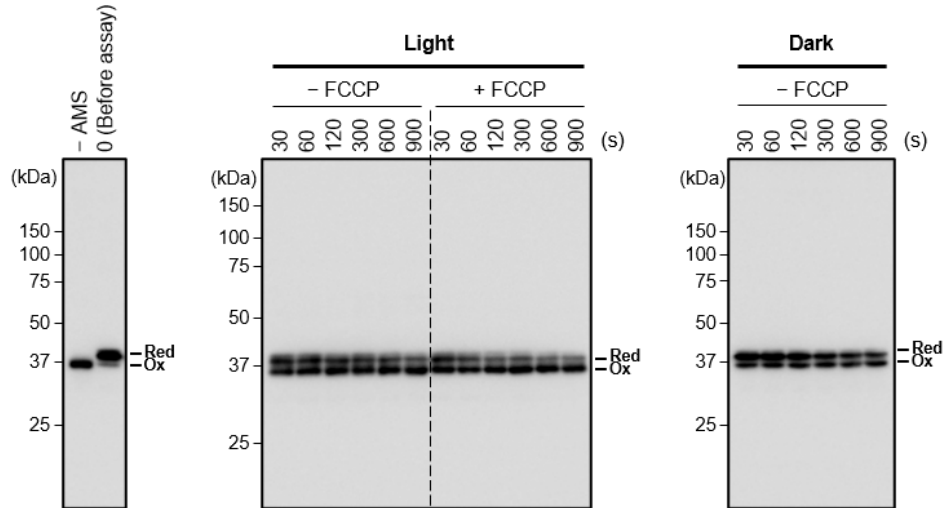
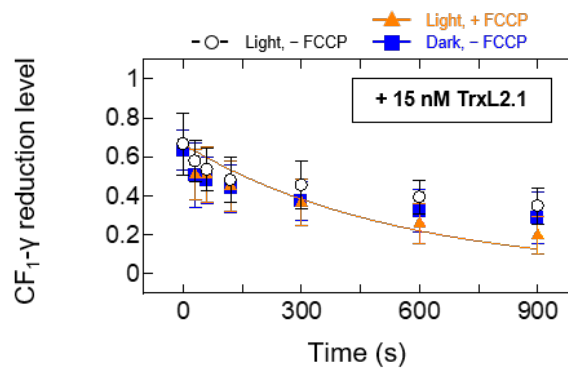
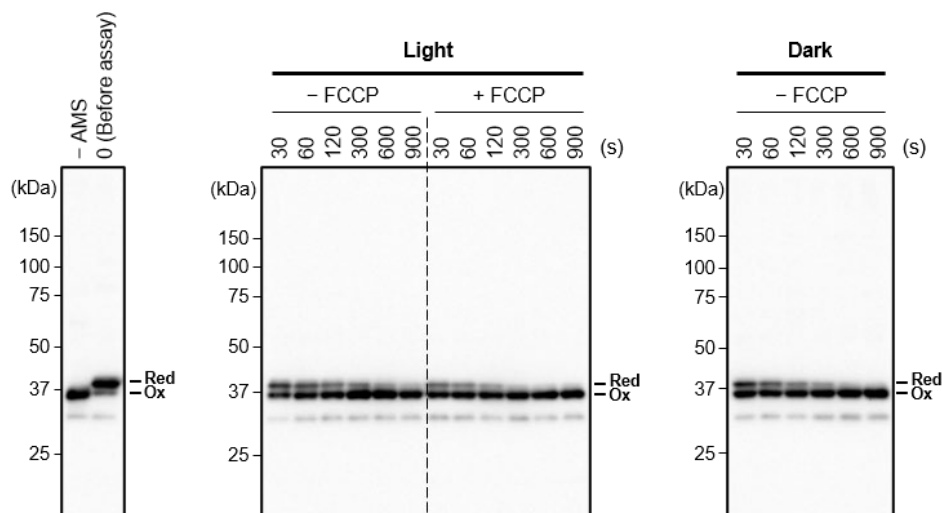
**A****B**

図 3-10. TrxL2.1 による CF<sub>1</sub>-γ の *in vitro* 酸化実験

(A) Trx 様タンパク質によるチラコイド膜上の CF<sub>1</sub>-γ の酸化の時間変化。ΔμH<sup>+</sup>の形成または非形成条件下で、チラコイド膜 (50 μg Chl/mL) を、100 μM 1-Methoxy PMS、50 μM DTT<sub>ox</sub>、15 nM TrxL2.1 とともに 900 s インキュベートした。指定の反応時間で反応溶液を分取し、チオール基修飾法によって還元型のタンパク質を標識した。非還元 SDS-PAGE によってタンパク質を分離した後、ウエスタンブロッティング解析によって還元型 (Red) と酸化型 (Ox) の CF<sub>1</sub>-γ を識別した。(B) A から CF<sub>1</sub>-γ の還元率を定量し、反応時間に対してプロットした。値は、平均値 ± 標準偏差 (n=3) の形で示した。また、データを式 (12) (結果 3-3-3-1) にフィッティングし、得られた曲線も示した。

**A**



**B**

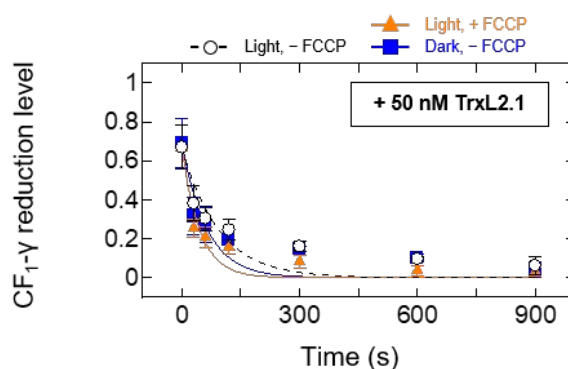


図 3-11. TrxL2.1 による CF<sub>1</sub>-γ の *in vitro* 酸化実験

(A) Trx 様タンパク質によるチラコイド膜上の CF<sub>1</sub>-γ の酸化の時間変化。ΔμH<sup>+</sup>の形成または非形成条件下で、チラコイド膜 (50 μg Chl/mL) を、100 μM 1-Methoxy PMS、50 μM DTT<sub>ox</sub>、50 nM TrxL2.1 とともに 900 s インキュベートした。指定の反応時間で反応溶液を分取し、チオール基修飾法によって還元型のタンパク質を標識した。非還元 SDS-PAGE によってタンパク質を分離した後、ウエスタンブロッティング解析によって還元型 (Red) と酸化型 (Ox) の CF<sub>1</sub>-γ を識別した。(B) A から CF<sub>1</sub>-γ の還元率を定量し、反応時間に対してプロットした。値は、平均値 ± 標準偏差 (n=3) の形で示した。また、データを式 (12) (結果 3-3-3-1) にフィッティングし、得られた曲線も示した。

表 3-2. TrxL2.1 による  $\Delta\mu\text{H}^+$  形成条件ごとの  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  の酸化速度

図 3-10B と図 3-11B から、 $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  の還元率が反応開始前から半分になる反応時間  $t_{1/2}$  を求めた。異なるアルファベットは、各 TrxL2.1 の濃度における  $\Delta\mu\text{H}^+$  の形成条件ごとの有意差を表す ( $p < 0.05$ ; 一元配置分散分析および Tukey 検定)

| Species       | Conditions    | $\Delta\mu\text{H}^+$ | $t_{1/2}$ (s)              | Significance<br>by condition<br>( $P < 0.05$ ) | R     |
|---------------|---------------|-----------------------|----------------------------|------------------------------------------------|-------|
| 15 nM TrxL2.1 | Light, - FCCP | Formed                | Failed to fit the equation |                                                |       |
|               | Light, + FCCP | Not formed            | $114.2 \pm 33.7$           | -                                              | 0.873 |
|               | Dark, - FCCP  | Not formed            | Failed to fit the equation |                                                |       |
| 50 nM TrxL2.1 | Light, - FCCP | Formed                | $65.4 \pm 14.7$            | a                                              | 0.904 |
|               | Light, + FCCP | Not formed            | $31.6 \pm 3.1$             | b                                              | 0.951 |
|               | Dark, - FCCP  | Not formed            | $42.8 \pm 9.6$             | ab                                             | 0.896 |

### 3-3-3-2. Trx による $\text{CF}_1\text{-}\gamma$ の酸化

次に、還元過程ではたらく Trx による  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  の酸化活性を、同様の *in vitro* 実験系を用いて調べた。シロイヌナズナの葉緑体型 Trx は、*f*, *m*, *x*, *y*, *z* の 5 つのサブタイプに分類され、それぞれ異なる標的選択性を示すことが報告されている (32,33)。これらのうち、Trx-*f* は最も多くの標的タンパク質が同定されており、 $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  も Trx-*f* によって還元される標的タンパク質のひとつである (12,13,20)。しかし、本研究で Trx-*f*1 は、 $\Delta\mu\text{H}^+$  が形成されない条件では、 $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  を約 20% に酸化したものの、最終的に完全に酸化した Trx 様タンパク質に比べると、その酸化効率は低かった (図 3-12A-D)。Trx-*f* の他にも、葉緑体内で最も豊富に存在し  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  を還元することができる Trx-*m* (20,31) や、抗酸化ストレス系に関わることが予想される Trx-*x* (60) および Trx-*y* (61) についても同様の実験を行ったが、いずれの Trx も  $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  を効率的に酸化しなかった (図 3-12EF)。Trx-*z* に関しては、RNA ポリメラーゼ複合体の一部として機能することが知られているため (62)、本研究では酸化因子の候補から除外した。これらの結果から、還元を担う Trx はいずれも、 $\text{CF}_1\text{-}\gamma$  の酸化には直接関与しないと結論した。

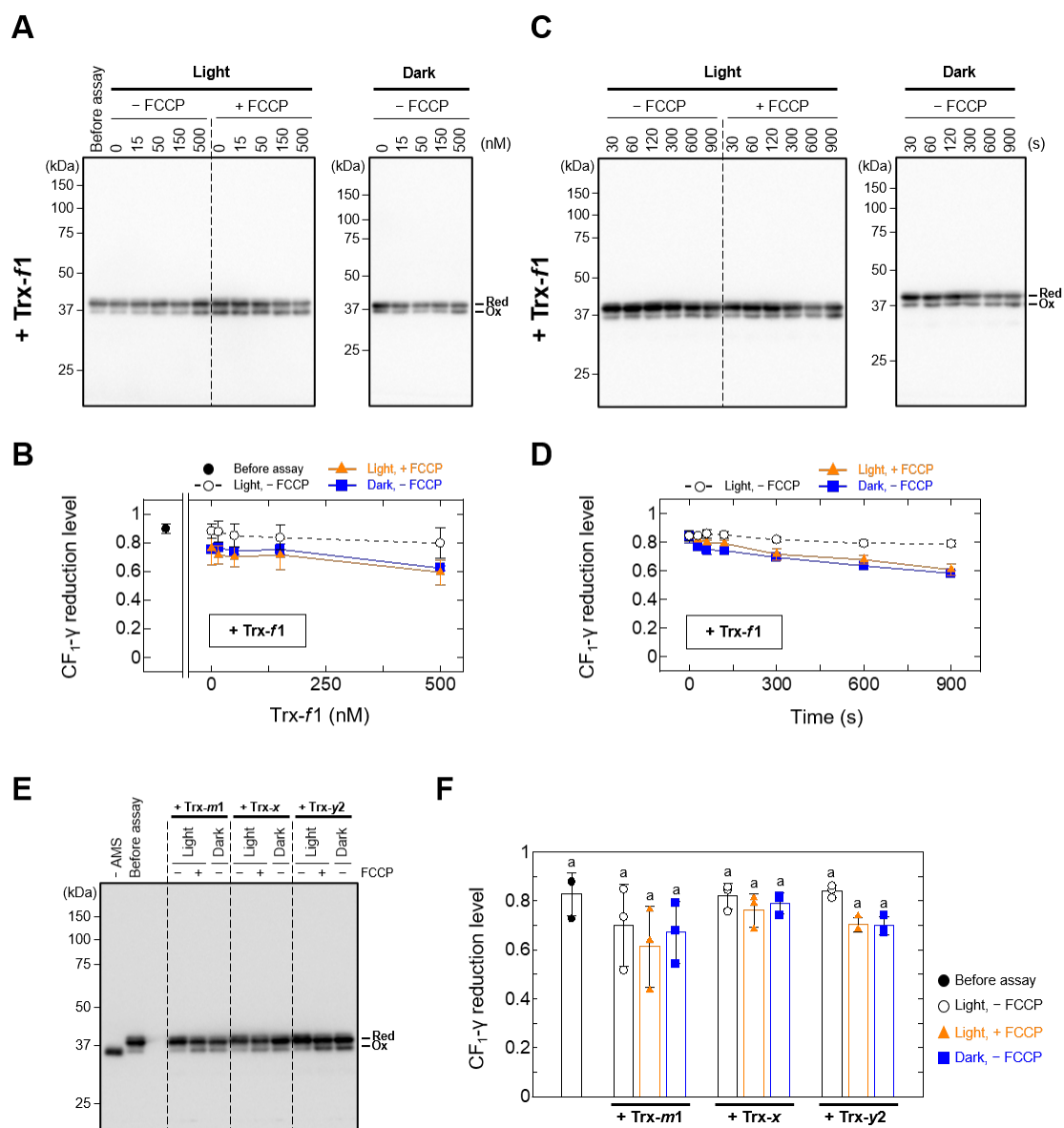


図 3-12. Trx による CF<sub>1</sub>-γ の *in vitro* 酸化実験

(A) Trx-f1 によるチラコイド膜上の CF<sub>1</sub>-γ の酸化の濃度依存性。ΔμH<sup>+</sup>の形成または非形成条件下で、チラコイド膜 (50 μg Chl/mL) を、100 μM 1-Methoxy PMS、50 μM DTT<sub>ox</sub>、0–500 nM Trx-f1 とともに 900 s インキュベートした。その後、反応溶液を分取し、チオール基修飾法によって還元型のタンパク質を標識した。非還元 SDS-PAGE によってタンパク質を分離した後、ウエスタンブロッティング解析によって還元型 (Red) と酸化型 (Ox) の CF<sub>1</sub>-γ を識別した。(B) A から CF<sub>1</sub>-γ の還元率を定量し、Trx-f1 の濃度に対してプロットした。値は、平均値 ± 標準偏差 (n=3–4) の形で示した。(C) Trx-f1 によるチラコイド膜上の CF<sub>1</sub>-γ の酸化の時間変化。ΔμH<sup>+</sup>の形成または非形成条件下で、チラコイド膜 (50 μg Chl/mL) を、100 μM 1-Methoxy PMS、50 μM DTT<sub>ox</sub>、500 nM Trx-f1 とともに 900 s インキュベートした。その後、反応溶液を分取し、チオール基修飾法によって還元型のタンパク質を標識した。非還元 SDS-PAGE によってタンパク質を分離した後、ウエスタンブロッティング解析によって還元型 (Red) と酸化型 (Ox) の CF<sub>1</sub>-γ を識別した。(D) C から CF<sub>1</sub>-γ の還元率を定量し、反応時間に対してプロットした。値は、平均値 ± 標準偏差 (n=3) の形で示した。

図 3-12. Trx による CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の *in vitro* 酸化実験（つづき）

（E）Trx-*m*1、Trx-*x*、Trx-*y*2 によるチラコイド膜上の CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の酸化。 $\Delta\mu\text{H}^+$ の形成または非形成条件下で、チラコイド膜（50  $\mu\text{g}$  Chl/mL）を、100  $\mu\text{M}$  1-Methoxy PMS、50  $\mu\text{M}$  DTT<sub>ox</sub>、500 nM Trx とともに 900 s インキュベートした。その後、反応溶液を分取し、チオール基修飾法によって還元型のタンパク質を標識した。非還元 SDS-PAGE によってタンパク質を分離した後、ウエスタンブロッティング解析によって還元型（Red）と酸化型（Ox）の CF<sub>1</sub>- $\gamma$  を識別した。（F）C から CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の還元率を定量した。値は、平均値  $\pm$  標準偏差（ $n=3$ ）の形で示した。異なるアルファベットは有意差を表す（ $p<0.05$ ; 一元配置分散分析および Tukey 検定）

### 3-4. 考察

CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>の酸化還元制御は、緑色植物が様々な光環境下で、ATPの生産と $\Delta\mu\text{H}^+$ の消費を厳密に管理するために重要であると予想されていた。しかし、これまでの研究でTrxによるCF<sub>1</sub>- $\gamma$ の還元過程の詳細が明らかにされてきたが(12,20,41,43)、酸化過程についてはほとんど研究が行われていなかった。1980年代には、CF<sub>1</sub>- $\gamma$ の酸化還元状態が、TrxからFdを介してNADP<sup>+</sup>/NADPH、あるいは直接的にグルタチオンの酸化還元状態と平衡化しているという説も議論された(63,64)。しかし、現在に至るまで、これらの還元経路がCF<sub>1</sub>- $\gamma$ を酸化することを生化学的に示した研究例は報告されていなかった。このような背景のもと、本章では、酸化因子としての性質を持つTrx様タンパク質であるTrxL2とACHTによって、CF<sub>1</sub>- $\gamma$ が酸化されることを生化学的に明らかにした。

#### 3-4-1. ホウレンソウ緑葉からの還元型CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>を含むチラコイド膜の調製

まず、還元型CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>を含むチラコイド膜の調製方法を独自に確立した。これまでも、緑色植物のチラコイド膜を用いて、CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>の酵素活性を測定した研究例は数多く報告されてきたが、そのほとんどの実験系にはCF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>を活性化するためにDTT<sub>red</sub>のような還元剤が含まれていた(12,15,19,40)。しかし、本研究の目的はCF<sub>1</sub>- $\gamma$ を酸化することであり、還元剤が含まれる実験系を用いることはできなかった。そこで、最終的に還元剤を取り除くことを前提として、還元処理のステップが異なる2通りのチラコイド膜の調製方法を確立し、比較した。このうち、破碎前の緑葉に光照射と還元剤の浸潤を行う3-2-3-1の方法では、調製したチラコイド膜に含まれるCF<sub>1</sub>- $\gamma$ は約80%以上が還元型であり(図3-5)、尚且つCF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>によるH<sup>+</sup>輸送活性を観察することができた(図3-6)。すなわち、酸化実験で用いるうえで、CF<sub>1</sub>- $\gamma$ の還元率が十分高いこと、ATP加水分解とH<sup>+</sup>輸送が共役するCF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>の構造が維持されていること、また、安定して $\Delta\text{pH}$ を形成することができる状態の膜であることが確認できた。また、本実験ではH<sup>+</sup>輸送活性の測定にあたって、あらかじめチラコイド膜に対して人為的に $\Delta\mu\text{H}^+$ を形成させていない。そのうえで、CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>のH<sup>+</sup>輸送活性を測定することができた。これは、酸塩基置換法によって事前に $\Delta\text{pH}$ を形成させてからATP加水分解活性を測定した先行研究とは異なる結果である(15)。本実験においては、チラコイド膜へATP添加後、CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>のATP加水分解反応によって徐々に $\Delta\mu\text{H}^+$ が形成された結果、CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>が活性化したことで、H<sup>+</sup>輸送活性の測定が可能になったものと考えられる。

#### 3-4-2. CF<sub>1</sub>- $\gamma$ の *in vitro* 酸化実験

##### 3-4-2-1. CF<sub>1</sub>- $\gamma$ の $\Delta\mu\text{H}^+$ 依存的な酸化の観察

次に、本章の主な目的であるCF<sub>1</sub>- $\gamma$ の*in vitro*酸化実験を行った。本章でチラコイド膜を用いた理由は、光照射によって簡便に膜内外に $\Delta\mu\text{H}^+$ を形成させることが可能なためである。様々な $\Delta\mu\text{H}^+$ 形成条件下で酸化実験を行った結果、TrxL2とACHTのどちらも、特に、 $\Delta\mu\text{H}^+$ が形

成されていない時、効率的に CF<sub>I</sub>-γ を酸化した (図 3-9)。

所属研究室で行われたハウレンソウの無傷葉緑体を用いた先行研究でも、類似した結果が報告されている (65)。葉緑体へ光照射を行うと、葉緑体内で Trx による標的タンパク質の還元が起こり、その酸化還元状態の変化をチオール基修飾法によって経時的に観察することができる。この光還元反応中に葉緑体へ脱共役剤を添加すると、2 min 以内に CF<sub>I</sub>-γ がほぼ完全に酸化される様子が観察された。一方で、ストロマに遊離する FBPase の酸化還元状態は、脱共役剤の添加による影響を受けなかった。これらの結果は、葉緑体レベルにおいても CF<sub>I</sub>-γ の酸化がチラコイド膜内外の  $\Delta\mu\text{H}^+$  によって制御されていることを示唆すると同時に、光環境下においても葉緑体内で酸化因子が常にはたらいっていることを明らかにした。この他にも、CF<sub>I</sub>-γ の *in vivo* での光還元ダイナミクスについて、興味深い結果が報告されている (41)。シロイヌナズナの植物個体を、野外を模して光強度が経時的に変動する環境に曝し、ストロマに遊離する Trx 標的タンパク質の酸化還元状態をチオール基修飾法によって観察すると、一般的には光強度に依存して還元率が変動する。しかし、膜タンパク質である CF<sub>0</sub>CF<sub>I</sub> は、光照射開始直後の弱光下 ( $> 100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で完全に還元され、光環境下では還元型が維持されていた。また、光強度を徐々に下げると、ストロマ中のタンパク質は再度酸化される。一方で、CF<sub>I</sub>-γ は完全に消光するまでは酸化されなかった。これらの結果から、*in vivo* においても、CF<sub>I</sub>-γ の酸化還元状態はチラコイド膜内外の  $\Delta\mu\text{H}^+$  によって制御されていることが考えられる。また、第 2 章で述べた通り、CF<sub>I</sub>-γ の *in vivo* での光還元応答の速度は、ストロマに存在する他の Trx 標的タンパク質と比べて非常に迅速である (20,41,42)。現在、Trx 標的タンパク質の酸化還元状態は、光合成電子伝達系からの還元力の供給と最終酸化力としてはたらく活性酸素の存在量とのバランスによって決定すると予想されている (38)。しかし、CF<sub>I</sub>-γ は、 $\Delta\mu\text{H}^+$  が形成されている時、Trx 様タンパク質による酸化効率は低下し、Trx による還元効率は上昇する。つまり、光環境下では、CF<sub>I</sub>-γ の酸化還元状態は、光合成電子伝達系からの還元力の供給による影響をより受けていると考えられる。以上の結果から、 $\Delta\mu\text{H}^+$  依存的な酸化機構は、光環境下での迅速な CF<sub>0</sub>CF<sub>I</sub> の活性化にも寄与していると期待される。

#### 3-4-2-2. $\Delta\mu\text{H}^+$ によって誘導される CF<sub>I</sub>-γ の構造変化と酸化還元制御の関係

本章では、Trx 様タンパク質による CF<sub>I</sub>-γ の酸化について、速度論的パラメーターを決定することで、 $\Delta\mu\text{H}^+$  への依存性を特徴づけることに成功した (表 3-1)。いずれの Trx 様タンパク質も、特に、脱共役条件下で  $t_{1/2}$  値が低下した (つまり、CF<sub>I</sub>-γ の酸化速度が上昇した)。また、 $S_{1/2}$  値を決定することで、 $\Delta\mu\text{H}^+$  の解消により ACHT は CF<sub>I</sub>-γ との親和性が上昇することを確認できた。一方で、TrxL2 については、 $\Delta\mu\text{H}^+$  に依存した  $S_{1/2}$  値の変化を確認することができなかった。これは、ACHT よりも TrxL2 の方が、CF<sub>I</sub>-γ との親和性が高かったためであると考えられる。特に、TrxL2.1 は、CF<sub>I</sub>-γ の酸化速度が最も速かったことから (図 3-10)、本研究で用いた Trx 様タンパク質の中で、TrxL2.1 が最も CF<sub>I</sub>-γ との親和性が高いと考えら

れる。また、同様の *in vitro* 実験系を用いて、還元過程ではたらく Trx の CF<sub>1</sub>-γ に対する酸化活性についても調べたが、いずれの Trx も CF<sub>1</sub>-γ を酸化しなかった。この結果は、CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> に関する先行研究の結果と一致する (66)。しかし、一部の Trx 標的タンパク質は、酸化的条件下では Trx によって酸化されることが、過去の *in vitro* 研究から報告されている (36,67)。それでは、なぜ CF<sub>1</sub>-γ は Trx によっては酸化されなかったのだろうか？ CF<sub>1</sub>-γ は、Trx と Trx 様タンパク質との親和性を切り替えるような、構造上の特徴を持つと考えられる。

チラコイド膜内外に形成される  $\Delta\mu\text{H}^+$  は、CF<sub>1</sub>-γ の構造を変化させることが明らかになっている (18,68,69)。これまでは、 $\Delta\mu\text{H}^+$  が形成されると、CF<sub>1</sub>-γ の活性制御スイッチとして機能する Cys ペア付近の領域が水溶液中に露出するように変化することで、Trx による求核攻撃が可能になると予想されてきた。しかし、本章の結果から、 $\Delta\mu\text{H}^+$  が形成されていない時、Trx 様タンパク質による CF<sub>1</sub>-γ の酸化が促進されることから、このような構造変化ではないことが明らかになった。例えば、 $\Delta\mu\text{H}^+$  の形成によって、CF<sub>1</sub>-γ の中点酸化還元電位が変化する、あるいは、2 つの Cys 間の距離が変化することで、CF<sub>1</sub>-γ の酸化／還元の効率が変化している等が考えられる。しかし、 $\Delta\mu\text{H}^+$  形成時の CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> の構造は未だ決定されていない。だが、 $\Delta\mu\text{H}^+$  が形成されていない時のホウレンソウ CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> については、酸化型と還元型の両方の構造がクライオ電子顕微鏡法によって既に決定されている (70)。酸化型と還元型の構造を比較すると、還元型では Cys ペアを含む Redox loop 自体が不安定化していた。また、Redox loop の C 末端側に位置する 3 つの負電荷アミノ酸 (Glu210、Asp211、Glu212) は、周囲のアミノ酸との相互作用が変化していた。これらの 3 つの負電荷アミノ酸は、Trx による酸化還元制御に重要であることが既に報告されている (71-74)。以上の結果から、CF<sub>1</sub>-γ の酸化還元状態も、Trx や Trx 様タンパク質との親和性を調節する要因である可能性がある。

### 3-4-2-3. 生体内での CF<sub>1</sub>-γ の酸化因子

所属研究室で行われた逆遺伝学的解析によって、*in vivo* での CF<sub>1</sub>-γ の酸化因子について重要な知見が明らかになった。CRISPR/Cas9 システムを用いてシロイヌナズナの TrxL2 および ACHT 欠損株を作出し、これらの Trx 様タンパク質の欠損が、Trx 標的タンパク質の酸化過程に及ぼす影響が調べられた。その結果、TrxL2.1 欠損株において、明所から暗所へ移した際、CF<sub>1</sub>-γ の酸化が顕著に遅くなる様子が観察された (75)。この結果は、本研究の *in vitro* 解析の結果と一致する (図 3-10)。一方で、ACHT 欠損株では、CF<sub>1</sub>-γ の酸化過程に変化は見られなかった。しかし、TrxL2.1 欠損株も、暗所に順化させると CF<sub>1</sub>-γ は完全に酸化されることから、ACHT のような TrxL2.1 以外の酸化因子も、CF<sub>1</sub>-γ の酸化に関与していると考えられる。ただし、TrxL2 や ACHT は、葉緑体内の存在量が Trx と比較して約 10 倍少ない (35,75)。例えば、*in vivo* においても、 $\Delta\mu\text{H}^+$  に依存して CF<sub>1</sub>-γ の Trx 様タンパク質や Trx との依存性が切り替わるとすれば、CF<sub>1</sub>-γ はより効率的に酸化されると考えられる。*In vivo* における  $\Delta\mu\text{H}^+$  が CF<sub>1</sub>-γ の酸化還元過程へ及ぼす影響については、第 4 章にて解析を試みた。

また、T-DNA 挿入によって作出された 2CP ノックダウン変異株においても、明所から暗

所への移行時に、CF<sub>1</sub>- $\gamma$ の酸化が遅くなることが観察されている (35)。TrxL2 は 2CP を例外的に還元することが可能であることから (35)、*in vivo* では TrxL2/2CP の還元力伝達カスケードが、CF<sub>1</sub>- $\gamma$ の主な酸化経路であると考えられる。

---

## 第 4 章

### $\text{CF}_0\text{CF}_1$ の還元制御に対する $\Delta\mu\text{H}^+$ の寄与

## 4-1. 本章の概要

これまでの研究から、 $\text{CF}_0\text{CF}_1$ の酸化と還元のプロセスが、チラコイド膜内外に形成される $\Delta\mu\text{H}^+$ によって制御されていることが明らかになった。 $\Delta\mu\text{H}^+$ は、 $\Delta\text{pH}$ と $\Delta\Psi$ から定義され、これらは熱力学的に等価であるとされている。例えば、好熱性細菌由来の $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP合成酵素の場合、ATP合成活性に対して、 $\Delta\text{pH}$ と $\Delta\Psi$ のどちらも等価に寄与していることが明らかになっている(76)。また、 $\text{CF}_0\text{CF}_1$ についても、ATP合成活性に対して、それぞれが寄与していることが明らかになっている(15,39,40)。しかし、葉緑体チラコイド膜の場合、 $\text{K}^+$ チャネルや $\text{Cl}^-$ チャネルによって、 $\Delta\Psi$ が $\Delta\text{pH}$ よりも低めに維持されている(77,78)(ホウレンソウのチラコイド膜では、 $\Delta\text{pH} : 150 \text{ mV}$ 、 $\Delta\Psi : 30 \text{ mV}$ )(8)。これは、植物の葉緑体において、 $\Delta\text{pH}$ の値(特にルーメンの酸性度)が、光環境下で、過剰な光エネルギーを熱として放散する非光化学的消光(NPQ)を誘導するための重要なシグナルであるためだと予想されている(79,80)。

それでは、 $\Delta\mu\text{H}^+$ を構成する $\Delta\text{pH}$ と $\Delta\Psi$ のうち、どちらが主に $\text{CF}_0\text{CF}_1$ の酸化還元制御に寄与しているのだろうか?そこで、本章では、 $\Delta\text{pH}$ と $\Delta\Psi$ をそれぞれ解消するイオノフォアを用いて、チラコイド膜に対して様々な $\Delta\mu\text{H}^+$ 形成条件を*in vitro*で印加し、Trxによる $\text{CF}_1\text{-}\gamma$ の還元実験を行った。その結果、 $\Delta\text{pH}$ と $\Delta\Psi$ それぞれの $\text{CF}_0\text{CF}_1$ の酸化還元制御への寄与の違いを示唆する結果を得た。

---

## 第 5 章

### 結論と展望

## 5-1. 本研究から明らかになったこと

### 5-1-1. 各章の研究結果の要約

#### 第2章：Fd/Trx 還元力伝達カスケードによる $CF_0CF_1$ の還元制御

- $CF_0CF_1$  は、Fd/Trx システムによって還元される。
- 生体内に最も豊富に存在する酸化還元物質である GSH は、Fd/Trx システムによる  $CF_0CF_1$  の還元には影響を及ぼさない。

#### 第3章：Trx 様タンパク質による $CF_0CF_1$ の酸化制御

- $CF_0CF_1$  は、Trx 様タンパク質に分類される TrxL2 や ACHT によって酸化される。
- チラコイド膜内外に  $\Delta\mu H^+$  が形成されていない時、 $CF_0CF_1$  の酸化は促進される。
- 還元側ではたらく Trx は、 $CF_0CF_1$  を酸化しない。

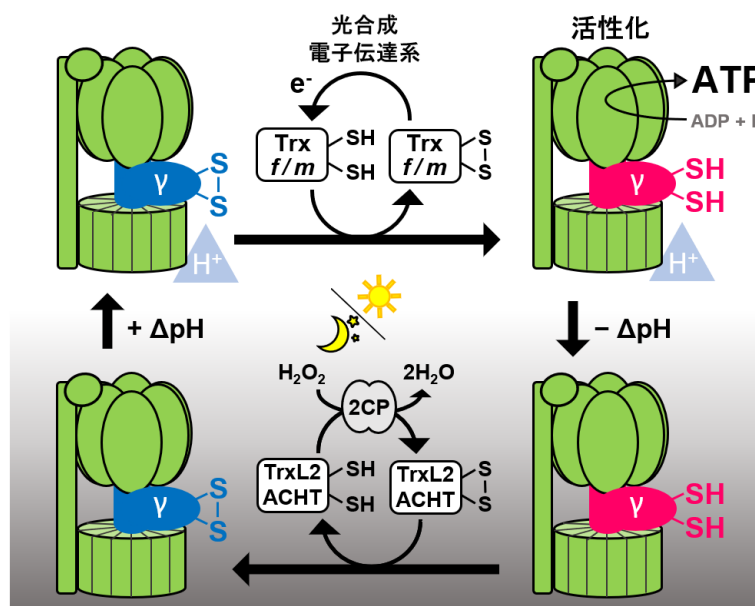


図 5-1.  $CF_0CF_1$  の  $\Delta\mu H^+$  依存的な酸化還元制御スキーム

$CF_0CF_1$  の Trx による還元、および Trx 様タンパク質による酸化は、 $\Delta\mu H^+$  の形成・解消によって支配される。図 1-6 を参考に、先行研究や本研究の結果から新規のスキームを描いた。Trx と Trx 様タンパク質について示した曲線矢印は還元力の流れ、直線矢印は  $CF_0CF_1$  の状態の変化、 $H^+$  を記した青い三角形は膜を介した  $\Delta\mu H^+$  の形成を表す。

---

## 5-1-2. CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>の活性制御機構

### 5-1-2-1. これまでの研究と本研究の比較

1980年代に、Junesh と Gräber らは、CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> が酸化還元状態とチラコイド膜内外の $\Delta\mu\text{H}^+$ の形成状況に応じて、酵素活性の異なる4つの状態を示すことを報告した(図1-6)(15)。しかし、当時は、ホウレンソウの緑葉から調製したチラコイド膜に数十 mM の DTT<sub>red</sub> を添加することで、CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> の酸化還元状態を制御し、酸塩基置換法で任意の $\Delta\text{pH}$  を数 s 間印加、塩化アンモニウムで散佚することで、ATP 合成・加水分解活性を測定していた。つまり、それぞれの状態を設定した後、酵素活性を測定しているため、実際には状態が切り替わる様子は観察していない。また、あくまで還元的・酸化的環境で測定した酵素活性の違いから酸化還元状態を見積もったのみで、実際の CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の酸化還元状態を確認してはいなかった。1989年には、Kramer らが、Electrochromic shift 解析によって、キュウリの緑葉内における、CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> の状態の切り替わりについて報告した(64)。この研究では、照射時間の異なるパルス光によって発生するチラコイド膜を介した H<sup>+</sup> の流量の増加・減少を経時的に観察することで、Junesh と Gräber らが提唱した先の CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> 活性制御スキームを *in vivo* で再現したとした。ただし、彼らも、CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の実際の酸化還元状態を決定しておらず、また、CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の酸化と還元を担う生体内の因子の同定には至っていなかった。

本研究では、第2章から第4章まで一貫して、チラコイド膜への光照射によって定常的に $\Delta\mu\text{H}^+$ を印加し、生体内の酸化還元因子タンパク質である Trx と Trx 様タンパク質によって CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の酸化還元状態を変化させ、チオール基修飾法によって実際の CF<sub>1</sub>- $\gamma$  の酸化還元状態を決定することで、CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> の4つの状態が切り替わる様子を、すべて観察することに成功した。本研究の結果とこれまでに報告された研究結果を合わせて、CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> の状態が切り替わる新規スキームを図5-1に示した。ATP 合成の駆動力である $\Delta\mu\text{H}^+$ による制御と酸化還元制御が結びついているこの活性制御機構は、F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素の中でも非常にユニークであり、 $\Delta\mu\text{H}^+$ の形成が光依存的である植物にとって合理的である。

## 参考文献

1. Mitchell, P. (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **41**(3):445-502.
2. Jagendorf, A.T., Uribe, E.G. (1966) ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55**(1):170-177.
3. Yoshida, M., Muneyuki, E., Hisabori, T. (2001) ATP synthase--a marvellous rotary engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**(9):669-677.
4. Rastogi, V.K., Girvin, M.E. (1999) Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature* **402**(6759):263-268.
5. Gibbons, C., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., Walker, G.E. (2000) The structure of the central stalk in bovine F<sub>1</sub>-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nature Struct. Biol.* **7**(11):1055-1061.
6. Vollmar, M., Schlieper, D., Winn, M., Büchner, C., Grothe, G. (2009) Structure of the c14 Rotor Ring of the Proton Translocating Chloroplast ATP Synthase. *J. Biol. Chem.* **284**(27):18228-18235.
7. Hahn, A., Vonck, J., Mills, D.J., Meier, T., Kühlbrandt, W. (2018) Structure, mechanism, and regulation of the chloroplast ATP synthase. *Science*. **360**(6389):eaat4318.
8. Cheuk, A., Meier, T. (2021) Rotor subunits adaptations in ATP synthases from photosynthetic organisms. *Biochem. Soc. Trans.* **49**(2):541-550.
9. Miki, J., Maeda, M., Mukohata, Y., Futai, M. (1988) The  $\gamma$ -subunit of ATP synthase from spinach chloroplasts. Primary structure deduced from the cloned cDNA sequence. *FEBS Lett.* **232**(1):221-226.
10. Murakami, S., Kondo, K., Katayama, S., Hara, S., Sunamura, E., Yamashita, E., Groth, G., Hisabori, T. (2018) Structure of the  $\gamma$ - $\epsilon$  complex of cyanobacterial F<sub>1</sub>-ATPase reveals a suppression mechanism of the  $\gamma$  subunit on ATP hydrolysis in phototrophs. *Biochem. J.* **475**(18):2925-2939.
11. Nalin, C.M., McCarty, R.E. (1984) Role of a disulfide bond in the  $\gamma$  subunit in activation of the ATPase of chloroplast coupling factor 1. *J. Biol. Chem.* **259**(11):7275-7280.
12. Mills, J.D., Mitchell, P., Schurmann, P. (1980) Modulation of coupling factor ATPase activity in intact chloroplasts. The role of the thioredoxin system. *FEBS Lett.* **112**(2):173-177.
13. Schwarz, O., Schürmann, P., Strotmann, H. (1997) Kinetics and thioredoxin specificity of thiol modulation of the chloroplast H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **272**(27):16924-16927.
14. Bakker-Grunwald, T., Dam, K.V. (1974) On the mechanism of activation of the ATPase in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **347**(2):290-298.
15. Junesch, U., Gräber, P. (1987) Influence of the redox state and the activation of the chloroplast ATP synthase on proton-transport-coupled ATP synthesis/hydrolysis. *Biochim. Biophys. Acta.* **893**(2):275-288.

- 
16. Komatsu-Takaki, M. (1989) Energy-dependent conformational changes in the  $\epsilon$  subunit of the chloroplast ATP synthase (CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>). *J Biol Chem.* **264**(30):17750-17753.
  17. Komatsu-Takaki, M. (1995) Effects of energization and substrates on the reactivities of lysine residues of the chloroplast ATP synthase  $\beta$  subunit. *Eur. J. Biochem.* **228**(2):265-270.
  18. Komatsu-Takaki, M. (1996) Energizing effects of illumination on the reactivities of lysine residues of the  $\gamma$  subunit of chloroplast ATP synthase. *Eur. J. Biochem.* **236**(2):470-475.
  19. Junesch, U., Gräber, P. (1985) The rate of ATP synthesis as a function of  $\Delta$ pH in normal and dithiothreitol-modified chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **809**(3):429-434.
  20. Sekiguchi, T., Yoshida, K., Okegawa, Y., Motohashi, K., Wakabayashi, K.-I., Hisabori, T. (2020) Chloroplast ATP synthase is reduced by both *f*-type and *m*-type thioredoxins. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1861**(11):148261.
  21. Ketcham, R., Davenport, J.W., Warncke, K., McCarty, R.E. (1984) Role of the  $\gamma$  subunit of chloroplast coupling factor 1 in the light-dependent activation of photophosphorylation and ATPase activity by dithiothreitol. *J. Biol. Chem.* **259**(11):7286-7293.
  22. Wolosiuk, R.A., Crawford, N.A., Yee, B.C., Buchanan, B.B. (1979) Isolation of three thioredoxins from spinach leaves. *J. Biol. Chem.* **254**(5):1627-1632.
  23. Zhang, N., Portis, A.R. Jr. (1999) Mechanism of light regulation of Rubisco: A specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-*f*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**(16):9438-9443.
  24. Wenderoth, I., Scheibe, R., Schaewen, A.V. (1997) Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **272**(43):26985-26990.
  25. Holmgren, A. (1985) Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* **54**:237-271.
  26. Jacquot, J.P., Lancelin, J.M., Meyer, Y. (1997) Thioredoxins: structure and function in plant cells. *New Phytol.* **136**(4):543-570.
  27. Collect, J.F., Messens, J. (2010) Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid Redox Signal.* **13**(8):1205-1216.
  28. Wolosiuk, R.A., Buchanan, B.B. (1977) Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. *Nature* **266**(5602):565-567.
  29. Buchanan, B.B. (1980) Role of Light in the Regulation of Chloroplast Enzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**:341-374.
  30. Meyer, Y., Reichheld, J.P., Vignols, F. (2005) Thioredoxins in Arabidopsis and other plants. *Photosynth Res.* **86**(3):419-433.
  31. Okegawa, Y., Motohashi, K. (2015) Chloroplastic thioredoxin *m* functions as a major regulator of Calvin cycle enzymes during photosynthesis *in vivo*. *Plant J.* **84**(5):900-913.
  32. Lemaire, S.D., Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V., Issakidis-Bourguet, E. (2007)

- Thioredoxins in chloroplasts. *Curr. Genet* **51**(6):343-365.
33. Yoshida, K., Hara, S., Hisabori, T. (2015) Thioredoxin selectivity for thiol-based redox regulation of target proteins in chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **290**(23):14278-14288.
  34. Yoshida, K., Hisabori, T. (2017) Distinct electron transfer from ferredoxin-thioredoxin reductase to multiple thioredoxin isoforms in chloroplasts. *Biochem J.* **474**(8):1347-1360.
  35. Yoshida, K., Hara, A., Sugiura, K., Fukaya, Y., Hisabori, T. (2018) Thioredoxin-like2/2-Cys peroxiredoxin redox cascade supports oxidative thiol modulation in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**(35):E8296-E8304.
  36. Yokochi, Y., Sugiura, K., Takemura, K., Yoshida, K., Hara, S., Wakabayashi, K.-I., Kitao, A., Hisabori, T. (2019) Impact of key residues within chloroplast thioredoxin-*f* on recognition for reduction and oxidation of target proteins. *J. Biol. Chem.* **294**(46):17437-17450.
  37. Dangoor, I., Peled-Zehavi, H., Levitan, A., Pasand, O., Danon, A. (2009) A small family of chloroplast atypical thioredoxins. *Plant Physiol.* **149**(3):1240-1250.
  38. Yoshida, K., Yokochi, Y., Hisabori, T. (2019) New Light on Chloroplast Redox Regulation: Molecular Mechanism of Protein Thiol Oxidation. *Front. Plant Sci.* **10**:1534.
  39. Uribe, E.G. (1973) ATP synthesis driven by a K<sup>+</sup>-valinomycin-induced charge imbalance across chloroplast grana membranes. *FEBS Lett.* **36**(2):143-147.
  40. Junesch, U., Gräber, P. (1991) The rate of ATP-synthesis as a function of  $\Delta\text{pH}$  and  $\Delta\psi$  catalyzed by the active, reduced H<sup>+</sup>-ATPase from chloroplasts *FEBS Lett.* **294**(3):275-278.
  41. Yoshida, K., Matsuoka, Y., Hara, S., Konno, H., Hisabori, T. (2014) Distinct redox behaviors of chloroplast thiol enzymes and their relationships with photosynthetic electron transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **55**(8):1415-1425.
  42. Yoshida, K., Hisabori, T. (2018) Determining the Rate-Limiting Step for Light-Responsive Redox Regulation in Chloroplasts. *Antioxidants* **7**(11):153.
  43. Yoshida, K., Yokochi, Y., Tanaka, K., Hisabori, T. (2022) The ferredoxin/thioredoxin pathway constitutes an indispensable redox-signaling cascade for light-dependent reduction of chloroplast stromal proteins. *J. Biol. Chem.* **298**(12):102650.
  44. Pagani, S., Bonomi, F., Cerletti, P. (1984) Enzymic synthesis of the iron-sulfur cluster of spinach ferredoxin. *Eur. J. Biochem.* **142**(2):361-366.
  45. Porra, R.J., Thompson, W.A., Kriedemann, P.E. (1979) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **975**(3):384-394.
  46. Nawrocki, W.J., Bailleul, B., Picot, D., Cardol, P., Rappaport, F., Wollman, F.A., Joliot, P. (2019) The mechanism of cyclic electron flow. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1860**(5):433-438.
  47. Zanetti, G., Arosio, P. (1980) Solubilization from spinach thylakoids of a higher molecular weight

- 
- form of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase. *FEBS Lett.* **111(2)**:373-376.
48. Walters, E.M., Johnson, M.K. (2004) Ferredoxin:thioredoxin reductase: disulfide reduction catalyzed via novel site-specific [4Fe-4S] Cluster Chemistry. *Photosynth. Res.* **79(3)**:249-264.
  49. Meyer, A.J., May, M.J., Fricker, M. (2001) Quantitative in vivo measurement of glutathione in Arabidopsis cells. *Plant J.* **27(1)**:67-78.
  50. Queval, G., Noctor, G. (2007) A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during Arabidopsis rosette development. *Anal. Biochem.* **363(1)**:58-69.
  51. Zhang, H., Whitelegge, J.P., Cramer, W.A. (2001) Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase is a subunit of the chloroplast cytochrome *b6f* complex. *J. Biol. Chem.* **276(41)**:38159-38165.
  52. Bernal-Bayard, P., Hervás, M., Cejudo, F.J., Navarro, J.A. (2012) Electron transfer pathways and dynamics of chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase C (NTRC). *J. Biol. Chem.* **287(40)**:33865-33872.
  53. Nikkanen, L., Toivola, J., Rintamäki, E. (2016) Crosstalk between chloroplast thioredoxin systems in regulation of photosynthesis, *Plant Cell Environ.* **39(8)**:1691-1705.
  54. Carrillo, L.R., Froehlich, J.E., Cruz, J.A., Savage, L., Kramer, D.M. (2016) Multi-level regulation of the chloroplast ATP synthase: the chloroplast NADPH thioredoxin reductase C (NTRC) is required for redox modulation specifically under low irradiance. *Plant J.* **87(6)**:654-663.
  55. Fukushi, Y., Yokochi, Y., Wakabayashi, K.-I., Yoshida, K., Hisabori, T. (2022) Verification of the Relationship between Redox Regulation of Thioredoxin Target Proteins and Their Proximity to Thylakoid Membranes. *Antioxidants.* **11(4)**:773.
  56. Schmid, G.H., Menke, W., Radunz, A., Koenig, F. (1978) Polypeptides of Thylakoid Membrane and Their Functional Characterization. *Z. Naturforsch.* **33c**:723-730.
  57. Baccarini-Melandri, A., Casadio, R., Melandri, B.A. (1977) Thermodynamics and Kinetics of Photophosphorylation in Bacterial Chromatophores and Their Relation with the Transmembrane Electrochemical Potential Difference of Protons. *Eur. J. Biochem.* **78**:389-402.
  58. Huang, C.S., Kopacz, S.J., Lee, C.P., (1983) Mechanistic differences in the energy-linked fluorescence decreases of 9-aminoacridine dyes associated with bovine heart submitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **722(1)**:107-115.
  59. McCarty, R.E., (2005) ATP synthase of chloroplast thylakoid membranes: a more in depth characterization of its ATPase activity. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37(5)**:289-297.
  60. Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Marchand, C., Hirasawa, M., Lancelin, J.M., Knaff, D.B., Miginiac-Maslow, M. (2003) The Arabidopsis plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity. *J. Biol. Chem.* **278(26)**:23747-23752.
  61. Collin, V., Lamkemeyer, P., Miginiac-Maslow, M., Hirasawa, M., Knaff, D.B., Dietz, K.-I., Issakidis-Bourguet, E. (2004) Characterization of plastidial thioredoxins from Arabidopsis

- belonging to the new  $\gamma$ -type. *Plant Physiol.* **136**(4):4088-4095.
62. Arsova, B., Hoja, U., Wimmelbacher, M., Greiner, E., Ustün, S., Melzer, M., Petersen, K., Lein, W., Börnke, F. (2010) Plastidial Thioredoxin  $\gamma$  Interacts with Two Fructokinase-Like Proteins in a Thiol-Dependent Manner: Evidence for an Essential Role in Chloroplast Development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* **22**(5):1498-1515.
  63. Quick, W.P., Mills, J.D. (1986) Thiol modulation of chloroplast CFo-CF1 in isolated barley protoplasts and its significance to regulation of carbon dioxide fixation. *Biochim. Biophys. Acta* **851**(2):166-172.
  64. Kramer, D.M., Crofts, A.R. (1989) Activation of the chloroplast ATPase measured by the electrochromic change in leaves of intact plants. *Biochim. Biophys. Acta* **976**(1):28-41.
  65. Konno, H., Nakane, T., Yoshida, M., Ueoka-Nakanishi, H., Hara, S., Hisabori, T. (2012) Thiol modulation of the chloroplast ATP synthase is dependent on the energization of thylakoid membranes. *Plant Cell Physiol.* **53**(4):626-634.
  66. Mills, J.D., Mitchell, P. (1982) Modulation of coupling factor ATPase activity in intact chloroplasts. Reversal of thiol modulation in the dark. *Biochim. Biophys. Acta* **679**(1):75-83.
  67. Vaseghi, M.J., Chibani, K., Telman, W., Liebthal, M.F., Gerken, M., Schnitzer, H., Mueller, S.M., Dietz, K.J. (2018) The chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin functions as thioredoxin oxidase in redox regulation of chloroplast metabolism. *eLife* **7**:e38194.
  68. Hightower, K.E., McCarty, R.E. (1996) Proteolytic cleavage within a regulatory region of the  $\gamma$  subunit of chloroplast coupling factor 1. *Biochemistry* **35**(15):4846-4851.
  69. Sugiyama, K., Hisabori, T. (2003) Conformational change of the chloroplast ATP synthase on the enzyme activation process detected by the trypsin sensitivity of the  $\gamma$  subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**(2):311-316.
  70. Yang, J.H., Williams, D., Kandiah, E., Fromme, P., Chiu, P.L. (2020) Structural basis of redox modulation on chloroplast ATP synthase. *Commun. Biol.* **3**(1):482.
  71. Konno, H., Yodogawa, M., Stumpp, M.T., Kroth, P., Strotmann, H., Motohashi, K., Amano, T., Hisabori, T. (2000) Inverse regulation of F<sub>1</sub>-ATPase activity by a mutation at the regulatory region on the  $\gamma$  subunit of chloroplast ATP synthase. *Biochem. J.* **352**:83-788.
  72. Ueoka-Nakanishi, H., Nakanishi, Y., Konno, H., Motohashi, K., Bald, D., Hisabori, T. (2004) Inverse regulation of rotation of F<sub>1</sub>-ATPase by the mutation at the regulatory region on the  $\gamma$  subunit of chloroplast ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **279**(16):16272-16277.
  73. Wu, G., Ortiz-Flores, G., Ortiz-Lopez, A., Ort, D.R. (2007) A point mutation in atpC1 raises the redox potential of the *Arabidopsis* chloroplast ATP synthase  $\gamma$ -subunit regulatory disulfide above the range of thioredoxin modulation. *J. Biol. Chem.* **282**:36782-36789.
  74. Kohzuma, K., Bosco, C.D., Meurer, J., Kramer, D.M. (2013) Light- and metabolism-related regulation of the chloroplast ATP synthase has distinct mechanisms and functions. *J. Biol. Chem.*

---

**288(18):13156-13163.**

75. Yokochi, Y., Fukushi, Y., Wakabayashi, K.-I., Yoshida, K., Hisabori, T. (2021) Oxidative regulation of chloroplast enzymes by thioredoxin and thioredoxin-like proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **118(51)**:e2114952118.
76. Soga, N., Kinoshita, K. Jr., Yoshida, M., Suzuki, T. (2012) Kinetic equivalence of transmembrane pH and electrical potential differences in ATP synthesis. *J. Biol. Chem.* **287(12)**:9633-9639.
77. Carraretto, L., Formentin, E., Teardo, E., Checchetto, V., Tomizioli, M., Morosinotto, T., Giacometti, G.M., Finazzi, G., Szabó, I. (2013) A thylakoid-located two-pore K<sup>+</sup> channel controls photosynthetic light utilization in plants. *Science*. **342(6154)**:114.
78. Herdean, A., Teardo, E., Nilsson, A.K., Pfeil, B.E., Johansson, O.N., Ünneper, R., Nagy, G., Zsiros, O., Dana, S., Solymosi, K., Garab, G., Szabó, I., Spetea, C., Lundin, B. (2016) A voltage-dependent chloride channel fine-tunes photosynthesis in plants. *Nat. Commun.* **7(1)**:1-11.
79. Ruban, A.V., Johnson, M.P., Duffy, C.D. (2012) The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1817(11)**:167-181.
80. Müller P., Li X.P., Niyogi K.K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant physiol.* **125(4)**:1558-1566.

## 研究業績書

### 学位論文

#### 第 3 章

- Sekiguchi, T., Yoshida, K., Wakabayashi, K.-I., Hisabori, T. (2022) Dissipation of the proton electrochemical gradient in chloroplasts promotes the oxidation of ATP synthase by thioredoxin-like proteins. *J. Biol. Chem.* **298**(11):102541.
- 関口敬俊, 吉田啓亮, 若林憲一, 久堀徹 (2022) チオレドキシン様タンパク質による葉緑体 ATP 合成酵素の酸化制御. *光合成研究* **32**(3):131-137.

### 学位に含まれない論文

#### 第 1 章

- Sekiguchi, T., Yoshida, K., Okegawa, Y., Motohashi, K., Wakabayashi, K.-I., Hisabori, T. (2020) Chloroplast ATP synthase is reduced by both *f*-type and *m*-type thioredoxin. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1861**(11):148261.

#### その他

- Fukui, K., Yoshida, K., Yokochi, Y., Sekiguchi, T., Wakabayashi, K.-I., Hisabori, T., Mihara, S. (2022) The Importance of the C-Terminal Cys Pair of Phosphoribulokinase in Phototrophs in Thioredoxin-Dependent Regulation. *Plant Cell Physiol.* **63**(6):855-868.

### 学会発表

- ○関口敬俊 吉田啓亮 桶川友季 本橋健 若林憲一 久堀徹、チオレドキシンによる葉緑体 ATP 合成酵素の還元分子機構、日本植物学会第 84 回大会、名古屋、2020 年 9 月（ポスター発表）
- ○関口敬俊 吉田啓亮 桶川友季 本橋健 若林憲一 久堀徹、チオレドキシンの還元制御による葉緑体 ATP 合成酵素の活性化機構、日本生体エネルギー研究会第 46 回討論会、金沢、2020 年 12 月（口頭発表）[受賞]
- ○関口敬俊 吉田啓亮 若林憲一 久堀徹、Trx 様タンパク質による葉緑体 ATP 合成酵素の酸化制御、第 11 回日本光合成学会年会、オンライン開催、2021 年 5 月（口頭発表）[受賞]
- ○関口敬俊 吉田啓亮 若林憲一 久堀徹、Trx 様タンパク質による葉緑体 ATP 合成酵素の不活性化制御、日本生体エネルギー研究会第 47 回討論会、東京、2021 年 12 月（口頭発表）[受賞]
- ○関口敬俊 吉田啓亮 若林憲一 久堀徹、Trx 様タンパク質による葉緑体 ATP 合成酵素の不活性化制御、第 63 回植物生理学会年会、筑波、2022 年月（口頭発表）
- ○関口敬俊 吉田啓亮 若林憲一 久堀徹、Trx 様タンパク質による葉緑体 ATP 合成酵素

---

の不活性化制御、第 95 回日本生化学会大会、名古屋、2022 年月（ポスター発表）

- Sekiguchi, T., Yoshida, K., Wakabayashi, K.-I., and Hisabori, T. Oxidative regulation of chloroplast ATP synthase by thioredoxin-like proteins. International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Regulation. Nov. 2022, Kobe in Japan (Short talk)

#### 受賞歴

- 関口敬俊、日本生体エネルギー研究会第 46 回討論会、学生口頭発表優秀賞、2020 年 12 月
- 関口敬俊、第 11 回日本光合成学会年会、優秀発表賞、2021 年 5 月
- 関口敬俊、日本生体エネルギー研究会第 47 回討論会、優秀発表賞、2021 年 12 月

#### 競争的研究費の獲得

- 日本学術振興会 特別研究員奨励費（DC2）、2022 年 4 月–2024 年 3 月  
「葉緑体 ATP 合成酵素が夜間に不活性化される制御機構全貌の解明」  
(研究課題／領域番号 22J13334)

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、多くの方々にご指導ご鞭撻を賜りました。

東京工業大学 化学生命科学研究所 久堀徹教授には、指導教官として研究活動における全てのご指導を賜りました。心より御礼申し上げます。久堀教授には、自由に研究を行うことができる環境と、多くの研究発表の機会、そして論文執筆の機会を与えていただきました。また、博士課程での3年間は、コロナ渦での行動制限もあり不安な日々もありましたが、研究室での生活における多大なお心遣いにより、充実した日々を送ることができました。

東京工業大学 化学生命科学研究所 若林憲一准教授には、副指導教官として、研究の手法や研究発表の方法に関して終始適切なご指導を賜りました。そして、研究者としての在り方も教えていただきました。深く御礼申し上げます。

東京工業大学 化学生命科学研究所 吉田啓亮准教授には、本研究で用いた発現プラスミドや抗体を提供していただきました。また、植物を用いた研究方法の基礎など、丁寧にご指導いただきました。深く感謝申し上げます。

関西学院大学 生命環境学部 宗景ゆり准教授には、ハウレンソウからのFdの精製方法をご教授いただきました。第2章の研究は、宗景准教授のご助力が無ければ行うことができませんでした。厚く御礼申し上げます。

株式会社カネカ 横地佑一博士には、所属研究室の先輩として、本研究で用いた発現プラスミドや精製タンパク質を提供していただきました。厚く感謝申し上げます。

研究室のスタッフの皆様には、日々の研究活動を送るうえで多大なご助言、ご協力いただきました。感謝申し上げます。そして、先輩方、同期、後輩の皆さんは、研究活動だけでなく、楽しい研究室生活を送るうえでかけがえのない存在でした。季節ごとの様々な催しも楽しい思い出になりました。ありがとうございました。

最後に、博士進学を認め、長い大学院生活を支えてくれた家族に、心から感謝します。

2023 年 2 月

関口敬俊