

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	シロイヌナズナ色素体におけるTrx-likeタンパク質の機能解析
Title(English)	
著者(和文)	福士結香
Author(English)	Yuka Fukushi
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12674号, 授与年月日:2024年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:吉田 啓亮,田中 寛,瀧ノ上 正浩,増田 真二,下嶋 美恵,久堀 徹,矢 守 航
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12674号, Conferred date:2024/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

2023 年度 博士論文

シロイヌナズナ色素体における
Trx-like タンパク質の機能解析

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

田中・吉田研究室

福土 結香

指導教員 吉田 啓亮 准教授

副指導教員 田中 寛 教授

第 1 章

序論

1-1. 背景

1-1-1. Thioredoxin によるレドックス制御システム

レドックス制御とは、タンパク質のシステイン(Cys)残基の酸化還元(reduction/oxidation、レドックス)状態を変化させることで、その酵素活性などを制御する分子機構である。この制御において中心的な役割を果たす Thioredoxin(Trx)は、生物界に普遍的に存在する分子量約 12,000 のタンパク質であり、その活性部位には保存されたアミノ酸配列-WCGPC-を持つ(Collect and Messens 2010)。植物葉緑体内において Trx は、活性部位中のふたつの Cys 残基を用いたジチオール-ジスルフィド交換反応を介して、標的が持つジスルフィド結合を還元する。Trx の標的となるタンパク質(Trx 標的タンパク質)は、活性部位とは異なる部位に活性調節のスイッチとなる Cys 残基のペアを持っており、多くの Trx 標的タンパク質は、この Cys 残基ペアがジスルフィド結合を形成した状態(酸化型)では不活性化されているが、ジスルフィド結合が還元された状態(還元型)になると活性化する(図 1-1)。

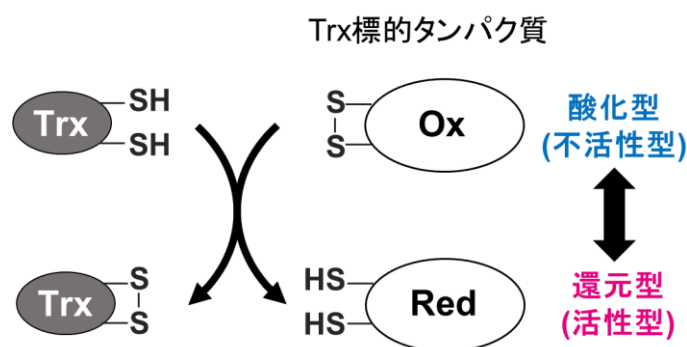


図 1-1 ジチオール-ジスルフィド交換反応を介した Trx によるレドックス制御

多くの Trx 標的タンパク質は酸化型では不活性化、還元型では活性化状態となる。Red は還元型、Ox は酸化型を示す。

植物葉緑体では、光により光合成電子伝達系が駆動されると、ferredoxin(Fd)が電子を受け取り、その還元力は ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase(FNR)を介して nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH)として蓄えられる。このとき、還元力の一部は、Fd から ferredoxin-thioredoxin reductase(FTR)および Trx を介して Trx 標的タンパク質まで伝達される(Wolosiuk and Buchanan 1977)(図 1-2)。これまでに、炭素固定を行うカルビン・ベンソン回路、ATP 合成、葉緑体生合成など、様々な葉緑体機能に関与しているタンパク質が、Trx の制御下にあることがわかっている(Yoshida and Hisabori 2023)。したがって、Trx が関わるレドックス制御は、光合成の電子伝達反応と代謝反応を結びつけることで、光環境の変化に応じて葉緑体機能の制御全体に重要な役割を果たしていると考えられている(Buchanan 1980)。

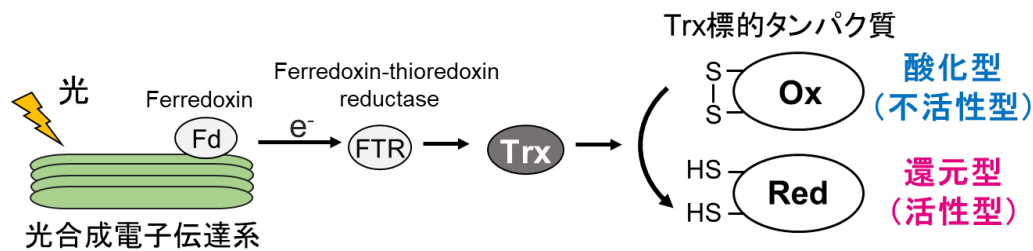


図 1-2 葉緑体における Trx によるレドックス制御

光により光合成電子伝達系が駆動されると、Fd が電子を受け取り、FTR を介して Trx、Trx 標的タンパク質まで還元力が伝達される。Red は還元型、Ox は酸化型を示す。

1-1-2. 葉緑体内の Trx 標的タンパク質

これまでに行われてきた Trx 標的タンパク質の網羅的探索から、Trx は葉緑体内に存在する多種多様なタンパク質の機能調節を担っていることが明らかになっている。特によく知られている Trx 標的タンパク質として、カルビン・ベンソン回路に関わる酵素である、fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase)、sedoheptulose 1,7-bisphosphatase (SBPase)、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、phosphoribulokinase (PRK) が挙げられる (Schürmann et al. 1976; Wolosiuk and Buchanan 1977; Wolosiuk and Buchanan 1978a; Wolosiuk and Buchanan 1978b; Buchanan 1980; Michelet et al. 2013)。また、炭素固定反応を触媒する酵素である ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) の活性化を担う Rubisco activase (RCA) も、Trx によるレドックス制御を受けることが知られている (Zhang and Portis 1999)。これらのタンパク質は、基本的に Trx による還元によって活性化する。反対に、暗所や非光合成組織において NADPH の生産を担う経路である酸化的ペントースリン酸経路に関わる酵素 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) は、Trx による還元により不活性化することが知られている (Akamba and Anderson 1981; Scheibe et al. 1989)。

葉緑体チラコイド膜に存在する膜タンパク質である葉緑体型 ATP 合成酵素も、よく知られた Trx 標的タンパク質のひとつである。ATP 合成酵素は、膜内外のプロトン濃度差と電位差からなる電気化学ポテンシャル差 ($\Delta\mu H^+$) を駆動力として、ADP と無機リン酸から ATP を合成する。葉緑体型 ATP 合成酵素は、明所において、光合成電子伝達系により形成された $\Delta\mu H^+$ を駆動力として ATP 合成を行う。そのため、 $\Delta\mu H^+$ が解消される暗所では、ATP 合成反応の逆反応である ATP 加水分解反応が起こり、ATP は分解される。これを防ぐために、葉緑体型 ATP 合成酵素には固有の活性制御機構が複数存在しており、そのひとつが Trx によるレドックス制御である (Hisabori et al. 2013)。葉緑体型 ATP 合成酵素は、複数のサブユニットからなる複合体であるが、回転軸としてはたらく γ サブユニット (CF_1 - γ) 内に、レドックス制御を受ける Cys 残基ペアが存在する (Nalin and McCarty 1984; Miki et al. 1988)。葉緑体型 ATP 合成酵素は、この Cys 残基ペアが形成するジスルフィド結合が明所で Trx によって還元されることによって活性化する (Mills and Mitchell 1980; Konno et al. 2012)。

最近の研究で、チラコイド膜のサイクリック電子伝達系に関連するタンパク質も、レドックス制御を受けていることが示唆された。サイクリック電子伝達とは、リニア電子伝達とは異なり、光化学系 I (PSI) 周辺で電子を循環させることで NADPH を生成せずにチラコイド膜内外のプロトン勾配を形成し、ATP 合成に寄与する電子伝達である(図 1-3)。被子植物では、proton gradient regulation5 (PGR5)タンパク質に依存した経路と、NADH 脱水素酵素様 (NDH) 複合体に依存した経路という、2 つのサイクリック電子伝達経路が機能していると考えられている(Shikanai 2014)。Proton gradient regulation5-like photosynthetic phenotype1 (PGRL1) は、PGR5 経路に関わる膜タンパク質で(DalCorso et al. 2008)、ジスルフィド結合の還元/形成を介した機能制御を受けることが示唆されている(Hertle et al. 2013; Okegawa and Motohashi 2020; Wolf et al. 2020)。 *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) においては、葉緑体型 Trx のアイソフォームのひとつである Trx-*m4* が PGRL1 とジスルフィド結合を介したヘテロ複合体を形成し、サイクリック電子伝達活性を低下させるという報告がある(Okegawa and Motohashi 2020)。

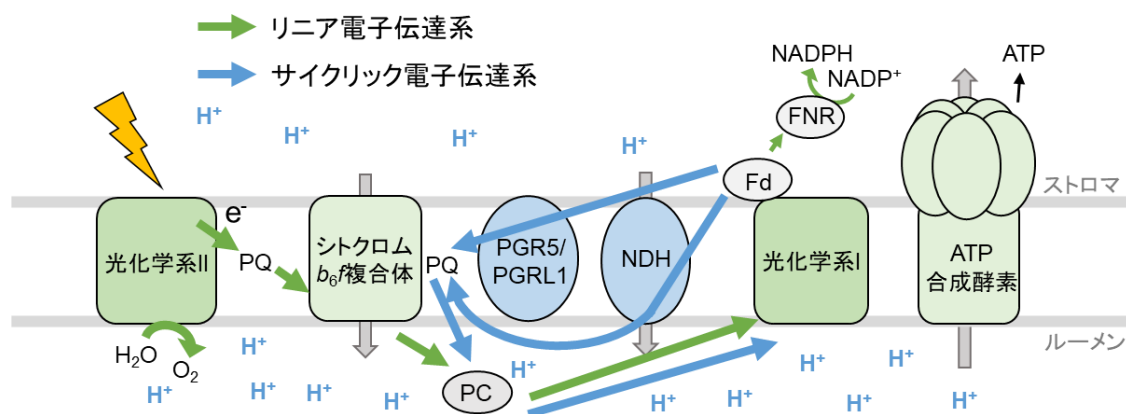


図 1-3 リニア電子伝達とサイクリック電子伝達

緑矢印はリニア電子伝達、青矢印はサイクリック電子伝達による電子の流れを示す。灰色の矢印はプロトンの流れを示す。PQ: plastoquinone, PC: plastocyanin

1-1-3. 葉緑体の Trx と Trx-like タンパク質のアイソフォーム

葉緑体内には標的選択性や存在量の異なる5つのTrxサブタイプ(Trx-*f*、Trx-*m*、Trx-*x*、Trx-*y*、Trx-*z*)が存在することが知られている(Lemaire et al. 2007; Serrato et al. 2013)。これらのサブタイプは、中点酸化還元電位や標的認識残基、タンパク質の表面電荷などの分子特性が異なっており、この違いがTrx標的タンパク質の選択性を決めている(Collin et al. 2003; Toivola et al. 2013; Yoshida et al. 2015; Yokochi et al. 2019; Le Moigne et al. 2021)。例えば、カルビン・ベンソン回路の酵素は、主にTrx-*f*とTrx-*m*によって還元される(Michelet et al. 2013; Yoshida et al. 2015)。先に述べたように、Trx-*m*は、ヘテロ複合体形成を介したPGRL1の制御を担うという報告もある(Okegawa and Motohashi 2020)。光合成組織におけるTrx-*x*、Trx-*y*、およびTrx-*z*の存在量はTrx-*f*やTrx-*m*と比較して非常に少ないが(Yoshida et al. 2015)、それぞれ特異的な役割を担っていると考えられている。Trx-*x*とTrx-*y*は、2-Cys peroxiredoxin(2CP)やperoxiredoxin Q(PrxQ)などの抗酸化に関わる酵素の還元を担うという報告がある(Collin et al. 2003; Collin et al. 2004)。Trx-*z*は、葉緑体コードのRNAポリメラーゼ(PEP)の機能に関与していると考えられている(Arsova et al. 2010)。このように、葉緑体内には、標的選択性や役割の異なる複数のTrxアイソフォームが支配する、複雑なネットワークシステムが構築されていると考えられている。

葉緑体には、Trxの他に、Trx-likeタンパク質が複数存在することが知られている(Meyer et al. 2012)。Trx-likeタンパク質とは、Trxの活性部位のアミノ酸配列WCGPCによく似た、CXXCという配列を持つタンパク質を指す。いくつかのTrx-likeタンパク質は、Trxと同じく還元力伝達因子としてレドックス制御に関与することが示唆されているが(Dangoor et al. 2009; Chibani et al. 2012)、その機能はまだ完全には明らかになっていない。

1-1-4. レドックス制御の重要性

ここまで述べてきたように、還元側のレドックス制御については、これまでに様々な知見が蓄積されてきた。例えば最近の研究で、Fd/Trx経路においてFdとTrxをつなぐ因子であるFTRの欠損株の解析から、Trxによる還元制御の重要性が実証された(Yoshida et al. 2022)。FTR欠損株において、葉緑体のTrx標的タンパク質は明所で一様に還元が阻害され、植物個体自身も非常に顕著な生育阻害を示す。したがって、Fd/Trx経路が担う葉緑体の還元側の制御は、明所での葉緑体の機能制御および植物の生育に必須であることが明らかになった。

また、リンゴ酸バルブではたらくTrx標的タンパク質であるmalate dehydrogenase(MDH)のレドックス制御の研究を通して、自然界のように周辺環境が常に変化する場では、植物が効率よく生育するためにレドックス制御が必須であることもわかってきた(Yokochi et al. 2021a)。MDHのレドックス制御部位を欠損させ、常に活性型を示すよう改変したMDHを発現する株は、変動光下で生育阻害を示すようになる。このことから、光環境の変化に応じて、適切に酵素を酸化し、その機能を不活性化することこそ、レドックス制御の真の意義であると考えられる。しかし、このような重要性にもかかわらず、酸化側の制御に関する研究はほとんど手つかずで、酸化を担う因子さえ、長く未解明だった。

1-1-5. 葉緑体内 Trx 標的タンパク質の酸化因子

2018 年以降に行われた、当研究室の吉田らによる *in vitro/in vivo* の研究を通して、thioredoxin-like2 (TrxL2) と atypical Cys His-rich thioredoxin (ACHT) という Trx-like タンパク質が、代謝に関わる Trx 標的タンパク質の酸化を担う因子であることが明らかになった (Yoshida et al. 2018; Yokochi et al. 2019; Yoshida et al. 2019a; Yoshida et al. 2019b; Yokochi et al. 2021b)。TrxL2 と ACHT は、それぞれ WCRKC、WCG (or A) SC という、Trx によく似た活性部位の配列を有しており、典型的な Trx よりも中点酸化還元電位が高いという特徴がある (図 1-4) (Dangoor et al. 2009; Dangoor et al. 2012; Yoshida et al. 2018; Yokochi et al. 2019)。ACHT と TrxL2 は、Trx 標的タンパク質を酸化し、Trx 標的タンパク質から受けとった還元力を、2CP を介して効率的に H_2O_2 にまで伝達することができる (図 1-5)。したがって、TrxL2 と ACHT は、光合成の副産物として H_2O_2 が生成される環境下では (Asada 2006)、常に Trx 標的タンパク質の酸化因子として機能していると考えられている。

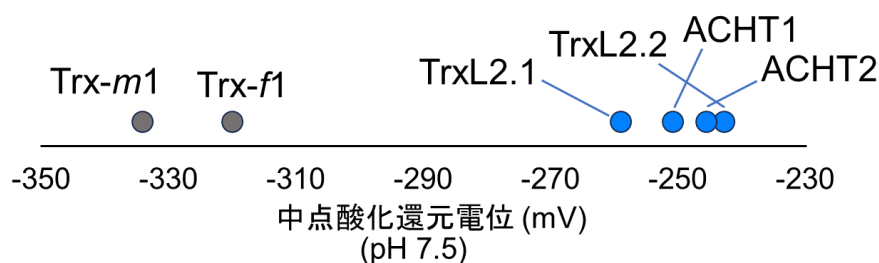


図 1-4 ACHT と TrxL2 の中点酸化還元電位

典型的な Trx と Trx-like タンパク質の、pH 7.5 における中点酸化還元電位を示す。値は Yoshida et al. 2015、Yoshida and Hisabori 2017、Yoshida et al. 2018、Yokochi et al. 2019 に記載のものを使用した。

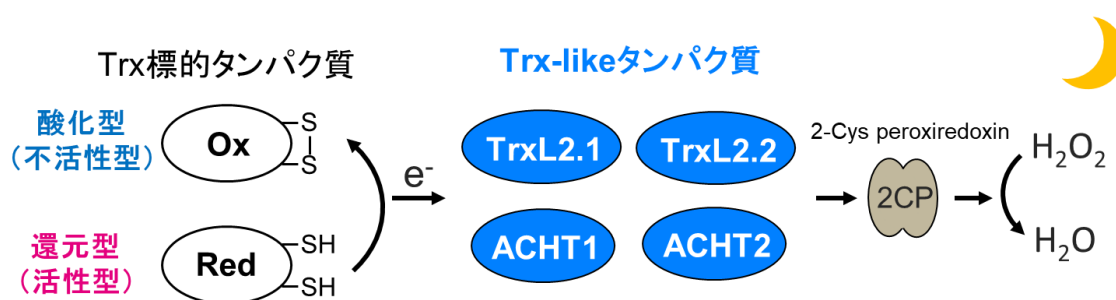


図 1-5 ACHT と TrxL2 による Trx 標的タンパク質の酸化

ACHT と TrxL2 は Trx 標的タンパク質を酸化し、通常、その機能を不活性化する。標的タンパク質から受け取った電子は 2CP に渡され、2CP は H_2O_2 を還元する。黒矢印は電子の流れを示す。Red は還元型、Ox は酸化型を示す。

シロイヌナズナでは、TrxL2 は 2 種類 (TrxL2.1 と TrxL2.2)、ACHT は 5 種類 (ACHT1 から ACHT5) のアイソフォームを持ち、それぞれ異なる組織特異的発現パターンを示す (Chibani et al. 2009; Belin et al. 2015)。最近の研究で、TrxL2 は主に CF_I-γ を酸化するのに対し、ACHT は主に FBPase を酸化することが示された (Yokochi et al. 2021b; Sekiguchi et al. 2022)。また、デンプン合成系ではたらく ADP-glucose pyrophosphorylase の酸化に ACHT4 と 2CP が関与することも示唆されている (Eliyahu et al. 2015)。さらに、Trx のアイソフォームもタンパク質の酸化を担うことが示唆されている (Ojeda et al. 2018; Vaseghi et al. 2018; Yokochi et al. 2021b) したがって、複数の Trx および Trx 様タンパク質が、葉緑体における Trx 標的タンパク質の酸化に関与している可能性が高いが、それらの役割や機能的な違いはまだ不明の点が多い。

ACHT と TrxL2 をそれぞれ単独で欠損しても、各変異株は生育阻害を示さない (Yokochi et al. 2021b)。しかし、ACHT と TrxL2 は、同時に欠損すると、胚発生に異常が生じる可能性が報告されている (横地 2019 年度博士論文)。また、ACHT は、過剰な光エネルギーを熱として散逸するしくみである non-photochemical quenching (NPQ) の制御に関与することが示唆されている (Yokochi et al. 2021b)。このように、胚発生や NPQ といった、これまで知られていなかった新たな機能に Trx-like タンパク質が関与している可能性が示唆されているが、その詳細は不明である。

1-2. 本研究の目的

Trx-like タンパク質である ACHT と TrxL2 は、ごく最近、葉緑体におけるレドックス制御の酸化を担う因子として同定された。その後の研究で、代謝に関わる Trx 標的タンパク質の酸化を担うだけでなく、胚発生や NPQ 制御にも関与することが示唆されたが、その詳細は不明である。また、ACHT と TrxL2 以外にも Trx やその他の Trx-like タンパク質が葉緑体における酸化制御を担うことが示唆されており、酸化側のレドックス制御も、還元側と同様に、複数の制御因子や制御経路に関わる複雑なネットワークを構築していると考えられるが、その全貌は未解明である。そこで、本研究では、ACHT と TrxL2 に着目し、胚発生と NPQ 制御への関与を明らかにすることで、色素体における Trx-like タンパク質の新たな機能の解明を目指した。

第 2 章

胚発生における Trx-like タンパク質の役割の解明

2-1. 本章の概要

先行研究より、ACHT と TrxL2 の同時欠損は胚発生に影響を与える可能性があるが、胚発生時の ACHT と TrxL2 の役割は不明である(横地 2019 年度博士論文)。そこで本章では、ACHT と TrxL2 が胚発生においてどのような役割を果たすのかを明らかにするために、ACHT と TrxL2 の多重欠損株 (*acht/trxl2*) の作製と解析を行った。

異なる条件下で生育した *acht/trxl2* 株の種子の形態比較と親植物の生理学解析を行ったところ、*acht/trxl2* 株の胚は、半数以上が胚形成の途中で致死になることがわかった。さらに、レドックス制御部位に存在する Cys 残基をセリン (Ser) 残基に置換した変異体 Trx-like タンパク質を *acht/trxl2* 株に発現させても、種子の致死率は回復しなかった。また、蛍光タンパク質を融合した ACHT または TrxL2 を発現する株の共焦点顕微鏡観察を行ったところ、ACHT と TrxL2 が胚の色素体に局在することがわかった。以上の結果から、ACHT と TrxL2 は、胚形成時における色素体機能のレドックス制御に重要な役割を果たすと結論した。

第 3 章

NPQ 制御に関わる ACHT の機能の解明

3-1. 本章の概要

第 1 章で述べたように、ACHT は NPQ 制御に関与する可能性が示唆されているが、その制御の詳細は不明である。本章では、生化学および生理学解析を通して、ACHT が NPQ 制御にどのように関与するのかを調べた。はじめに、ACHT のアフィニティクロマトグラフィーにより ACHT の標的候補タンパク質の1つとして、サイクリック電子伝達に関連するチラコイド膜局在のタンパク質である PGRL1 を同定した。サイクリック電子伝達は、チラコイド膜の内腔(ルーメン)の酸性化を介して NPQ 誘導に関与すると考えられている(Munckage et al. 2002)。生化学解析により ACHT と PGRL1 の直接的な相互作用の有無を調べた結果、少なくとも本研究で調べた範囲では ACHT は PGRL1 を直接的に制御しないことが明らかになった。次に、ACHT2 過剰発現株を用いて、ACHT2 の過剰発現が植物の生育や NPQ 制御へ及ぼす影響を評価した。異なる光条件下での生育解析、生体内の Trx 標的タンパク質のレドックス状態の解析、各種光合成パラメータの測定、キサントフィルサイクル色素の定量解析を行った。その結果、ACHT2 過剰発現株は、生育阻害とともに Y(II)の低下と NPQ の上昇を示し、葉緑体内の Trx 標的タンパク質のうち、特にカルビン・ベンソン回路のタンパク質の還元率の低下を示すことがわかった。このことから、ACHT2 の過剰発現は、カルビン・ベンソン回路の活性低下を引き起こし、その結果として電子伝達に負のフィードバック制御がかかることで、Y(II)の低下や NPQ の上昇を引き起こすものと考えられる。以上の結果から、ACHT2 はカルビン・ベンソン回路に関わる Trx 標的タンパク質のレドックス制御を介して、間接的に NPQ の形成に影響を与えると結論した。

3-1. 背景

先行研究から、ACHT が光防御に関わる NPQ の制御に関与している可能性が示唆されている。NPQ 制御とは、植物において、クロロフィルが吸収した過剰な光エネルギーを熱として安全に散逸するしくみである (Ruban 2016)。NPQ は、ルーメンの酸性化が原因で誘導される qE、PSI と PSII 間のステート遷移に関わる qT、低温かつ強光条件で誘導される qH など、複数の要因によって引き起こされることが知られている (Nilkens et al. 2010; Ruban 2016; Malnoë et al. 2018)。なかでも qE は、被子植物における NPQ の主要な要因であり、光照射したあと数分以内に誘導され、再び暗所に戻した際にも数分以内に緩和する速い NPQ 成分である (Nilkens et al. 2010; Ruban 2016)。qE の誘導は、PSII のサブユニットである PsbS のプロトン化と、PSII に結合するキサントフィルサイクル色素の脱エポキシ化によって行われ、それぞれルーメンの酸性化によって引き起こされることが知られている (図 3-1) (Niyogi et al. 1998; Li et al. 2000)。PsbS はルーメンの pH のセンサーとして機能し、プロトン化によって、PSII 複合体の再構成を引き起こすことで、NPQ を誘導すると考えられている (Rochaix 2014)。キサントフィルサイクル色素であるビオラキサンチンは、ルーメンの酸性化によって活性化される violaxanthin de-epoxidase (VDE) によって、アンテラキサンチンを経てゼアキサンチンまで脱エポキシ化される。ビオラキサンチンはアンテナとして吸収した光エネルギーをクロロフィルに渡すことができるが、ゼアキサンチンはこの機能がないため、光エネルギーは熱として放出される (Niyogi et al. 1998)。このように、ルーメンの酸性化が誘導するこれらの反応を介して、過剰な光エネルギーは熱として散逸され则认为られている。

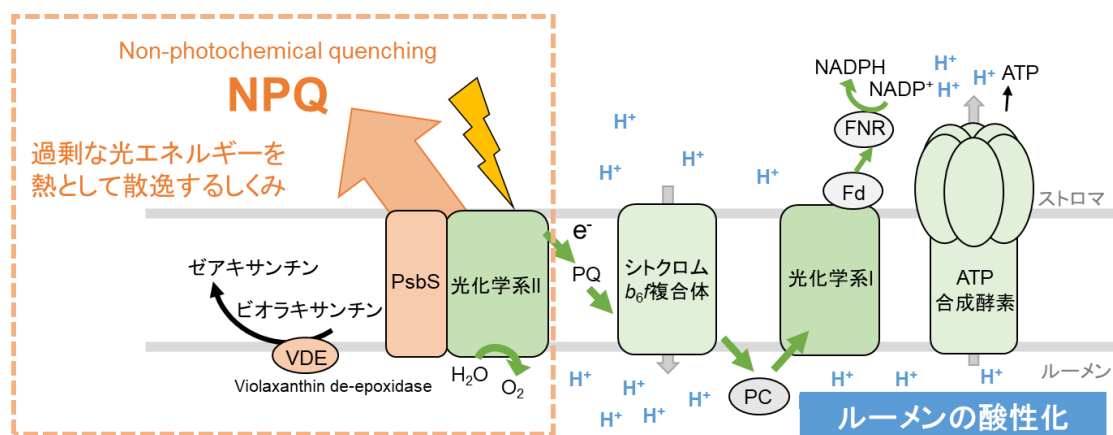


図 3-1 NPQ(qE)の誘導メカニズム

緑矢印はリニア電子伝達、青矢印はサイクリック電子伝達による電子の流れを示す。灰色の矢印はプロトンの流れを示す。ルーメンの酸性化により活性化した VDE によって、ビオラキサンチンはゼアキサンチンに脱エポキシ化され、NPQ が誘導される。

以下に記述する、NADPH-Trx reductase C (NTRC)と呼ばれるタンパク質と ACHT との多重欠損株の表現型解析を通して、ACHT が NPQ に関与する可能性が示唆された (Yokochi et al. 2021b)。NTRC は、葉緑体内において、NADPH の還元力を利用することで、Fd/Trx 経路とは異なる経路でレドックス制御を行う還元力伝達タンパク質である (Serrato et al. 2004) (図 3-2A)。NTRC は、2CP および、いくつかの Trx 標的タンパク質を還元することが知られている (Pérez-Ruiz et al. 2006; Michalska et al. 2009; Pérez-Ruiz et al. 2014; Yoshida and Hisabori 2016)。また、NTRC は、Trx に比べて 2CP の還元活性が非常に高いことも知られている (Yoshida and Hisabori 2016)。NTRC 欠損株 (*ntrc* 株) は強い生育阻害と高い NPQ を示すことから、NTRC はレドックス制御を介して NPQ の制御に関わるという報告もなされている (Naranjo et al. 2016; Naranjo et al. 2021)。横地らの研究で、*ntrc* 株と *acht* 株もしくは *trx12* 株との交配株 (*ntrc/acht* 株、*ntrc/trx12* 株) では、*ntrc* 株が示す生育阻害が回復することがわかった (図 3-2B) (Yokochi et al. 2021b)。しかし、興味深いことに、このときの NPQ を比較すると、*ntrc/acht* 株でのみ、NPQ が野生株 (WT) と同程度に回復した。このことから、ACHT が特異的に NPQ 制御に関与することが示唆されたが、その詳細は不明である。

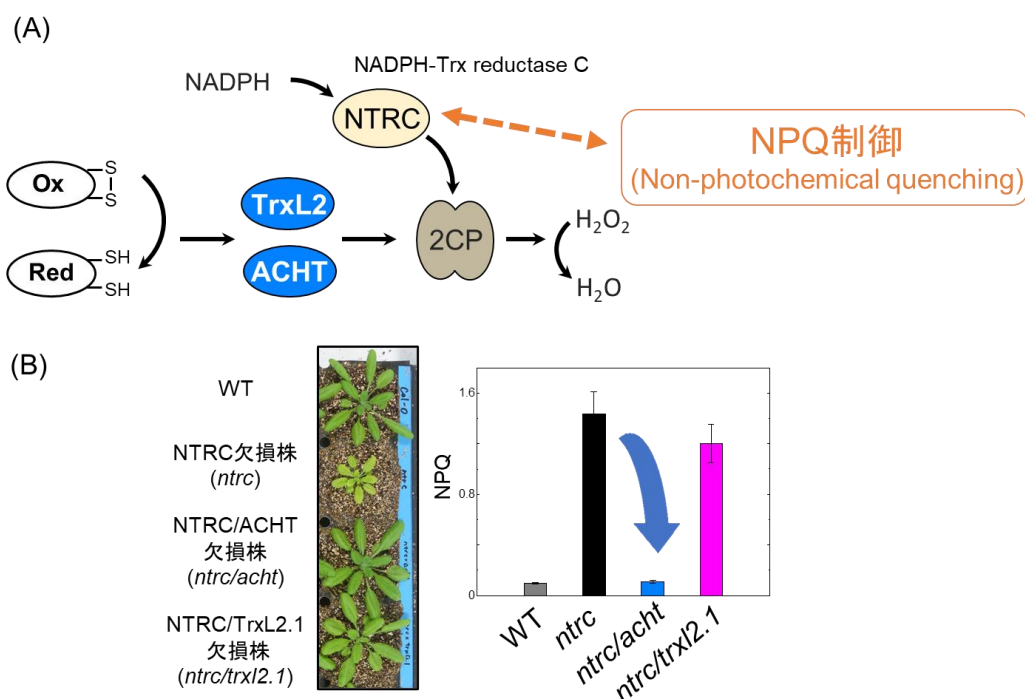


図 3-2 ACHT は NPQ 制御に関与している可能性がある

(A) NTRC から 2CP への還元力伝達。NTRC は NADPH 由来の還元力を用いて 2CP を還元する。黒矢印は電子の流れを示す。Red は還元型、Ox は酸化型を示す。(B) *ntrc* 株、*ntrc/acht* 株、*ntrc/trx12* 株の表現型。*ntrc/acht* 株は生育と NPQ が WT と同程度に戻る。Yokochi et al. 2021b より引用改変。

3-2. 目的

先行研究より、ACHT は NPQ 制御に関与する可能性が示唆されている (Yokochi et al. 2021b)。これまでに、レドックス制御による NPQ の制御に関する報告はあるが、その詳細な分子メカニズムは明らかになっていない (Kang and Wang 2016; Naranjo et al. 2016; Okegawa and Motohashi 2020)。また、ACHT が NPQ 制御において標的とする因子も不明である。そこで、本研究では、アフィニティクロマトグラフィーとシロイヌナズナの ACHT2 過剰発現株を用いた解析を通して、ACHT が標的とする NPQ 制御因子の探索と、ACHT が NPQ 制御への及ぼす影響の評価を行い、NPQ 制御に関わる ACHT の機能を明らかにすることを目的とした。

3-3. 方法

3-3-1. ACHT-アフィニティクロマトグラフィー

葉緑体内に存在する ACHT1 および ACHT2 の標的タンパク質を明らかにするため、ホウレンソウの葉から無傷葉緑体を単離し、アフィニティクロマトグラフィーにより ACHT1/2 の標的タンパク質候補の捕捉と同定を行った。Trx の標的タンパク質捕捉のために広く用いられている Trx アフィニティクロマトグラフィーの手法 (Motohashi et al. 2001) を基に、ACHT1 および ACHT2 の活性部位の 2 つの Cys 残基のうち 1 つ (ACHT1 は Cys56、ACHT2 は Cys57) を Ser 残基に置換した大腸菌組換えタンパク質を捕捉担体とすることで、レドックス依存的に相互作用するタンパク質特異的な捕捉を試みた (図 3-3)。捕捉したタンパク質は、SDS-PAGE、質量分析、標的タンパク質特異的な抗体を用いたイムノブロット解析で同定した。

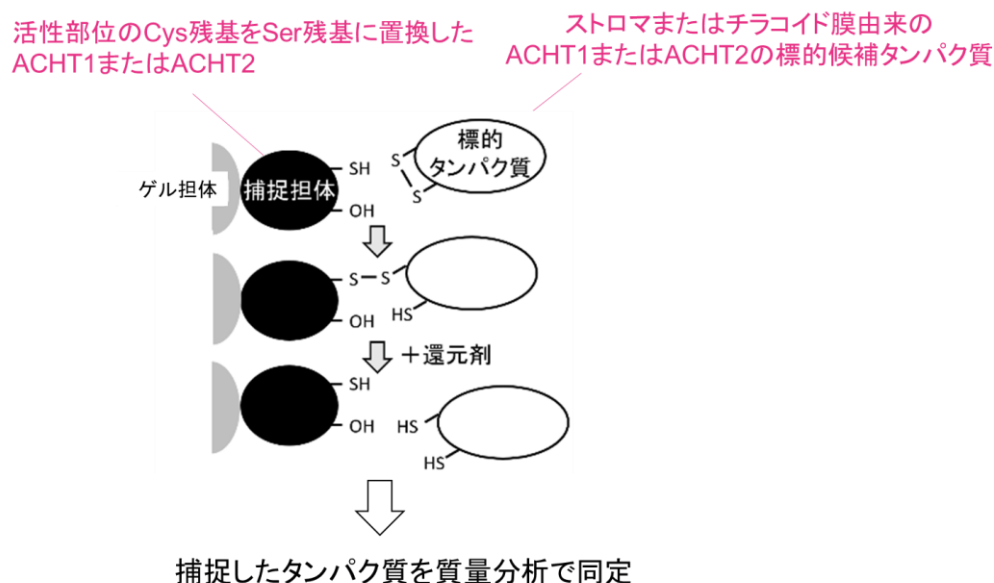


図 3-3 Trx アフィニティクロマトグラフィーの原理

3-3-1-1. C/S 置換型 ACHT の精製

はじめに、PrimeSTAR Max(タカラバイオ)を用いた点変異導入によって、活性部位の Cys 残基を Ser 残基に置換した ACHT 発現プラスミドを作製した。鋳型として、C 末端にヒスチジンタグ (6×His-tag) が融合した野生型 ACHT (葉緑体移行シグナルを除く) を発現するプラスミドを用いた。このプラスミドは、久堀・若林研究室の横地佑一博士から提供を受けた。使用したプライマーは表 3-1 に示した。作製した C/S 置換型 ACHT1、ACHT2 発現用プラスミドを用いて、大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換し、LB (+50 µg/ml Amp) 寒天培地上で、37 °C で一晩培養した。生育したコロニーは LB (+50 µg/ml Amp) 液体培地 10 mL に植え継ぎ、37 °C で 5 時間程度振盪培養した。培養液を LB (+50 µg/ml Amp) 液体培地 1.5 L に 5 mL 分注し、37 °C で OD₆₀₀ が 0.3–0.5 になるまで振盪培養した。その後、終濃度 1 mM の IPTG を加え、21 °C で一晩振盪培養した。培養液を遠心管 (容量 1L) に入れ遠心分離 (4,000 × g、6 分、4 °C) し菌体を回収した。上清を除去したあと、菌体懸濁液をコニカルチューブ (容量 50 mL) に入れ、再び遠心分離 (2,000 × g、10 分、4 °C) を行った。上清を除去したあと、菌体を液体窒素で凍結し、-80 °C で凍結保存した。

次に、回収した大腸菌から、C/S 置換型 ACHT を精製した。以下の精製手順は、すべて 4 °C で行った。凍結保存した菌体について、cOmplete protease inhibitor cocktail (ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-free) (Roche) を含む TN バッファー① (25 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl) を加えて懸濁し、超音波処理 (Output 3、Duty 40、10 分) により菌体を破碎した。破碎液を超遠心分離 (55,000 × g、40 分) し、上清を回収した。次に、Ni-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) クロマトグラフィーを行うため、TN バッファー① で平衡化しておいた Ni-NTA カラム (容量 5 mL) に上清をアプライした。素通り画分 (Flow-through, FT) を回収した後、TN バッファー① 50 mL、次いで 10 mM imidazole を含む TN バッファー① 50 mL で洗浄した。その後、200 mM imidazole を含む TN バッファー① 26 mL を用いて、目的タンパク質を溶出した。SDS-PAGE を用いて目的のタンパク質が溶出した画分を確認して回収したあと、溶出液に終濃度が 1 mM になるよう EDTA を添加した。その後、Spectra/Por Dialysis Membrane (Cut off MW: 12,000–14,000) を用いて、MES バッファー (25 mM MES-NaOH (pH 6.1)、0.5 mM 還元型 dithiothreitol (DTT_{red})、1 mM EDTA) 2.5 L に対して一晩透析した。続いて、陽イオン交換クロマトグラフィーを行うため、透析後のタンパク質溶液を、TOYOPEARL SP-650M (Tosoh) 30 mL に添加し、MES バッファー中に 0–300 mM NaCl の直線濃度勾配をかけて目的タンパク質を溶出した。SDS-PAGE を用いて、目的のタンパク質が溶出した画分を確認、回収し、Cut off MW : 10,000 の Amicon Ultra-15 (Merck Millipore) を用いて限外濾過により約 1 mL まで濃縮した。得られたタンパク質溶液を、500 µL ずつ 2 回に分けて Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) に添加し、50 µM EDTA を含む TN バッファー② (25 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl) 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、回収した。その後、タンパク質溶液を Amicon® ultra (Merck Millipore, MW Cut off; 10K) で 2 mL まで濃縮した。終濃度 20% (v/v) になるようにグリセロールを加え、液体窒素中で凍結し、-80 °C で保存した。得られたタンパク質の濃度は、BCA Protein Assay Kit (Pierce) により定量した。

表 3-1 第 3 章で使したプライマー

名称	配列 (5' to 3')
ACHT1_C56S_F*	GGTTCTT CA CGTGCAATGTTCCCAAAG
ACHT1_C56S_R*	TGCACG TGA AAGAACACACCAAGTTCCG
ACHT2_C57S_F*	GCTTCTT CA AGAGCATTGTTCCCAAAGC
ACHT2_C57S_R*	TGCTCT TGA AAGAGCACACCAAGTTCCA

* ACHT への点変異導入に用いたプライマー (太字は変異導入箇所を示す)

3-3-1-2. 無傷葉緑体の単離

ハウレンソウの葉から、Percoll 不連続密度勾配遠心法を用いて無傷葉緑体を単離し、可溶性画分であるストロマ画分および、不溶性画分であるチラコイド膜画分に分画した。実験方法は、先行研究を参考にした (Yoshida et al. 2018)。

以下の操作はすべて 4°Cで行った。市販のハウレンソウの葉を約 100 g 採取し、破碎用溶液 (0.33 M Sorbitol、2 mM EDTA、50 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、1 mM MnCl₂、1 mM MgCl₂、5 mM sodium ascorbate、0.05% (w/v) BSA) 約 500 mL とともにミキサーを用いて破碎した。得られた破碎液は、4 層のガーゼでろ過し、遠心分離 (500 × g、6 分) した。得られた沈殿を葉緑体懸濁溶液 (0.33 M Sorbitol、2 mM EDTA、50 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、1 mM MnCl₂、1 mM MgCl₂) に懸濁し、40% (v/v) および 70% (v/v) Percoll (GE Healthcare) を含む葉緑体懸濁溶液を用いた Percoll 密度勾配に重層後、遠心分離 (3,200 × g、20 分) することで、無傷葉緑体を単離した。その後、無傷葉緑体を葉緑体懸濁溶液で再懸濁し、遠心分離 (1,300 × g、2 分) することで 2 回洗浄し、−80°Cで凍結保存した。

3-3-1-3. ACHT-アフィニティクロマトグラフィー

3-3-1-1.で精製した C/S 置換型 ACHT を捕捉担体としたアフィニティクロマトグラフィーは、先行研究の方法を参考に行った (Yoshida et al. 2013)。

はじめに、C/S 置換型 ACHT の固定に用いるゲル担体である CNBr-activated SepharoseTM4B (Cytiva) 0.57 g を 1 mM HCl 5 mL 中に懸濁した。振とう (ローテータ、140 rpm、室温、5 分) させ、10 分間静置後に遠心分離 (1000 × g、室温、1 分) し、上清を除去した。沈殿したゲル担体に 1 mM HCl 10 mL を加えて懸濁し、遠心分離 (1000 × g、室温、1 分) し、上清を除去する操作を 2 回繰り返した。次に、カップリングバッファー (0.1 M NaHCO₃ (pH 8.3)、0.5 M NaCl) 4 mL を加えてよく混ぜ、遠心分離 (1000 × g、室温、1 分) し、上清を除去した。さらに、カップリングバッファー 10 mL を加えてよく混ぜ、遠心 (1000 × g、室温、1 分)、上清を除去する操作を 2 回繰り返した。そして、C/S 置換型 ACHT (約 2 mg) とカップリングバッファー 2 mL を加え、振盪 (ローテータ、140 rpm、室温、1 時間以上)、遠心分離 (1000 × g、室温、1 分) し、上清をマイクロチューブ 2 本に 1 mL ずつ分取した。再度遠心分離 (20,400 × g、室温、1 分) し、上清の 280 nm の吸光度を測定し、値がゼロに近いことを確認し、C/S 置換型 ACHT がゲル担体に結合していることを確かめた。

次に、ブロッキングバッファー (0.1 M Tris HCl (pH 8.0)) 10 mL を加えてよく混ぜ、振盪 (ローテータ, 140 rpm, 4°C, O/N)、遠心分離 (1000 × g、室温、1 分) し、上清を除去した。二量体となった C/S 置換型 ACHT を解離させるため、10 mM DTT_{red} を含むブロッキングバッファー 3 mL を加え、振盪 (ローテータ, 140 rpm、室温、30 分) したあと、カラムに充填した。その後、DTT_{red} の洗浄を行った。洗浄は、カップリングバッファー 10 mL で 2 回、洗浄バッファー (0.1 M 酢酸-NaOH (pH 4.0)、0.5 M NaCl) 10 mL で 1 回、カップリングバッファー 10 mL で 3 回、TB バッファー (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.1% (w/v) tween 20) 10 mL で 1 回、の順番で行った。

3-3-1-2. で回収した無傷葉緑体を、凍結再融解により破裂させ、遠心分離 (20,400 × g、4°C、10 分) し、上清 (ストロマ画分) および沈殿 (チラコイド膜画分) を回収した。チラコイド膜画分には、可溶化試薬 (10 mM TES-KOH (pH 7.5)、1 mM EDTA、1% (v/v) protease inhibitor mixture (sigma)、1% (w/v) n-Dodecyl-β-D-maltoside) を添加し、90 分間かけて 4°C で可溶化した。その後、遠心分離 (140,000 × g、4°C、40 分) し、上清をアフィニティクロマトグラフィーに供した。

ストロマ画分または可溶化したチラコイド膜画分をカラムに添加し、振盪 (ローテータ, 140 rpm、室温、1 時間) したあと、素通り画分を flow through (FT) として回収した。チラコイド膜画分を用いた場合は、タンパク質を捕捉するための以下のすべての操作に用いた溶液に、1% (w/v) n-Dodecyl-β-D-maltoside を添加して使用した。TN バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、500 mM NaCl) 10 mL を添加し、Wash として回収する操作を 5 回繰り返した。各 Wash 画分 (1-5) の 280 nm の吸光度を測定し、280 nm の吸収が無くなったことを確認した。20 mM DTT_{red} を含む TN バッファー 5 mL を添加し、振盪 (ローテータ, 140 rpm、室温、30-1 時間) したあと、DTT elution として回収し、更に 20 mM DTT_{red} を含む TN バッファー 1 mL を添加し、DTT elution と合わせて回収した (標的候補タンパク質の溶出)。DTT elution 画分を 500 μL ずつ分注し -80°C に保存した。

3-3-2. ACHT 標的候補タンパク質の同定

捕捉した標的候補タンパク質画分の溶出パターンの確認およびタンパク質の同定は、SDS-PAGE、イムノブロット解析、質量分析によって行った。サンプルは、2×SDS-PAGE サンプルバッファーと 1 対 1 で混合し、SDS-PAGE に用いた。2×SDS-PAGE サンプルバッファーの組成は、2-3-4. と同様とした。質量分析に用いるサンプルを作製するための SDS-PAGE を行った際には、DTT elution を TCA 沈殿により 50 倍程度濃縮したサンプルを使用した。

3-3-2-1. 質量分析用サンプルの調製

はじめに、SDS-PAGE および CBB 染色を行ったゲルから、ACHT1、ACHT2 の標的候補タンパク質のバンド部分を切り出した。これらのゲル切片を約 1 mm 角に切り刻んだあと、マイクロチューブに入れ、超純水に浸した。次に、超純水を除去し、50% (v/v) アセトニトリルを含む 50 mM 重炭酸アンモニウム 400 μL を添加し、室温で 10 分間振とうしたあと、上清を除去した。上述の操作を 2 回繰り返したあと、上清を除去し、10 mM DTT_{red} を含む 100 mM 重炭酸アンモニウム 100 μL を添加した。さらに、56°C で 1 時間インキュベートしたあと、上清を除去した。次に、55 mM ヨードアセ

トアミドを含む 100 mM 重炭酸アンモニウムを 100 μ L 加え、遮光して室温で 45 分間振とうしたあと、上清を除去した。続いて、50 mM 重炭酸アンモニウム 400 μ L を添加し、室温で 10 分間振とうしたあとに上清を除去した。そして、50% (v/v) アセトニトリルを含む 50 mM 重炭酸アンモニウム 400 μ L を添加し、室温で 10 分間振とうした。上述の操作を再度繰り返し、ゲルを脱色した。脱色が不十分なサンプルについては、さらに 70% (v/v) アセトニトリルを添加し、室温で 10 分間振とうする操作を、ゲルが十分に脱色されるまで繰り返した。その後、上清を除去し、濃縮遠心機を用いてゲルを乾燥させたあと、20 ng/ μ L トリプシン(ブタ膵臓由来、Wako)を含む 50 mM 重炭酸アンモニウム 8 μ L を添加し、氷上で 30 分静置してゲルを膨潤させた。さらに、100 mM 重炭酸アンモニウムを 16 μ L 添加し、37°Cで一晩インキュベートすることで、ゲル内のタンパク質を分解し、上清を除去した。続いて、0.1% (v/v)トリフルオロ酢酸(TFA)を含む 50% (v/v) アセトニトリル 40 μ L を添加し、マイクロチューブごと超音波洗浄器に浮かべ、15 分間インキュベートした。上清はペプチド溶液としてマイクロチューブに回収し、マイクロチューブに残ったゲルには、0.1% (v/v) TFA を含む 75% (v/v) アセトニトリル 40 μ L を添加し、再び超音波洗浄器で 15 分間インキュベートした。その後、ボルテックスミキサーを用いて 15 分間振とうさせ、上清をペプチド溶液として回収した。回収したペプチド溶液を合わせ、容量が 20 μ L 程度になるまで濃縮遠心機で濃縮し、-30°Cで保存した。ペプチド溶液は Solid Phase Extraction C-Tip KT-200(日京テクノス)を用いて脱塩・濃縮し、質量分析に用いた。

3-3-2-2. 質量分析

マトリックスとして α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸(HCCA)を使用した。マトリックス溶液(HCCA、10% (v/v) TFA、30% (v/v) アセトニトリル)と 3-3-2-1.で調製したペプチド溶液をサンプルプレート上で混合し、完全に乾燥した後、MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics ultraflex TOF/TOF)により分析を行なった。得られた測定結果を MASCOT peptide mass fingerprint search engine (Matrix Science)を用いて解析し、ペプチドを帰属した。MASCOT による解析条件を表 3-2 に示す。

表 3-2 質量分析の解析条件

Database	18nport-spiol 20171102x ^{*1} Araport11 180216 ^{*2}
Enzyme	Trypsin
Fixed modifications	Carbamidomethyl (C)
Variable modifications	Oxidation (M)
Mass values	Monoisotopic
Peptide Mass Tolerance	$\pm$ 100 ppm

*1 ホウレンソウ (*Spinacia oleracea*) 由来のタンパク質の同定に用いたデータベース。Universal Protein Resource (UniProt) のデータベースからホウレンソウで絞り込みを行い、データを取得した(データ取得日: 2017 年 11 月 2 日)

*2 シロイヌナズナ由来のタンパク質の同定に用いたデータベース。Arabidopsis Information Portal (Araport) 11 からデータを取得した(データ取得日: 2018 年 2 月 16 日)

3-3-3. PGRL1 の in vitro 酸化実験

ACHT1 および ACHT2 が PGRL1 を酸化できるか否かを調べるために、単離したチラコイド膜、または組換え体 PGRL1 を用いて、ACHT1 または ACHT2 による in vitro での PGRL1 酸化実験を行った。ただし、組換え体 PGRL1 は、ストロマ側に露出している N 末端側のみを精製した組換え体 (PGRL1_{Nter}) を使用した。使用した組換え体 ACHT1、ACHT2 は久堀・若林研究室の横地佑一博士より、組換え体 PGRL1_{Nter} は当研究室の吉田啓亮准教授より提供を受けた。また、還元チラコイド膜は、久堀・若林研究室の関口敬俊博士より提供を受けた。還元チラコイド膜の調製方法は 3-3-3-1. に記載した。

3-3-3-1. ホウレンソウからのチラコイド膜の単離

市販のホウレンソウから、葉柄を含まないように葉を約 10 g 採取し、チラコイド膜調製用バッファー (50 mM Tricine-NaOH (pH 7.5)、0.4 M Sucrose、5 mM MgCl₂、10 mM NaCl) 200 mL とともにミキサーで破碎した。破碎液を、4 重にしたガーゼで濾過したあと、遠心分離 (3,000 × g、10 分、4°C) して沈殿を回収した。チラコイド膜調製用バッファー 40 mL で沈殿を懸濁し、遠心分離 (300 × g、1 分、4°C) を行い、上清を回収した。その後、遠心分離 (3,000 × g、10 分、4°C) し、沈殿を回収し、上記の洗浄操作を再度行った。得られた沈殿を、チラコイド膜調製用バッファー 2 mL で懸濁し、チラコイド膜画分とした。

還元チラコイド膜の調製時には、次の方法でチラコイド膜の還元処理と単離を行った。まず、ホウレンソウの葉 10 g に対して、LED 装置を用いて、室温で 10 分間、光照射 (1,000–1,500 μmol photons m⁻² s⁻¹) を行った。その後、葉を幅 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 MgCl₂、10 mM NaCl、20 mM DTT_{red}) に浸し、室温で 3 分間、吸引鐘とアスピレーターを用いた減圧処理に供した。その後、還元バッファー 200 mL とともにミキサーで破碎した。破碎液を、4 重にしたガーゼで濾過したあと、遠心分離 (3,000 × g、10 分、4°C) して沈殿を回収した。還元バッファー 30 mL で沈殿を懸濁し、遠心分離 (300 × g、1 分、4°C) を行い、上清を回収した。続いて、遠心分離 (3,000 × g、10 分、4°C) し、沈殿を回収したあと、チラコイド膜調製用バッファーを用いて、上記の洗浄操作を 2 回行い、DTT_{red} を除いた。得られた沈殿を、チラコイド膜調製用バッファー 2 mL で懸濁し、還元チラコイド膜画分とした。

3-3-3-2. クロロフィル量の定量

チラコイド膜調製用バッファーで任意の倍率で希釈したチラコイド膜画分 200 μL に対して、100%アセトン 800 μL を加え、ボルテックスミキサーで 10 分間懸濁した後、遠心分離 (20,400 × g、5 分、20°C) した。回収した上清を用いて、2-3-6. と同様の方法でクロロフィル定量を行った。

3-3-3-3. チラコイド膜を用いた PGRL1 の in vitro 酸化実験

ACHT1 および ACHT2 が PGRL1 を酸化できるか否かを調べるために、チラコイド膜を用いた in vitro 実験系で酸化実験を行った。PGRL1 の酸化は、チラコイド膜反応用バッファー (50 mM

HEPES-NaOH (pH 8.0)、7 mM MgCl₂、1 mM MnCl₂、2 mM EDTA、30 mM KCl、0.25 mM KH₂PO₄)を用いて、25°Cで行った。実験に用いた ACHT1 と ACHT2 は、50 μM ACHT1 または ACHT2 と 1 mM 酸化型 DTT (DTT_{ox})を含むチラコイド膜反応用バッファー中でインキュベート (25°C、5 分) することであらかじめ酸化した。はじめに、チラコイド膜反応用バッファーに、チラコイド膜を添加し、マグネティックスターラーで攪拌した (25°C、5 分)。その後、ACHT1/ DTT_{ox} または ACHT2/ DTT_{ox} を添加した。反応溶液の最終的な組成は、50 μg Chl/mL チラコイド膜、100 μM DTT_{ox}、5 μM ACHT1/ACHT2 である。ACHT1/ DTT_{ox} または ACHT2/ DTT_{ox} の添加時を 0 秒として、1800 秒まで、一定時間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 (TCA) と混和して反応を停止させた。その後、氷上で 30 分以上静置し、タンパク質を沈殿させた。遠心分離 (20,400 × g、15 分、4°C) によって上精を除き、得られた沈殿を氷冷した 100% アセトンを用いて 2 回洗浄し TCA を除いた。沈殿を 3 mM AMS を含む非還元 SDS サンプルバッファーに溶解し、1 時間振盪することで、タンパク質のチオール基を AMS で化学修飾した。サンプルを 95°C で加熱処理し、非還元 SDS-PAGE およびイムノブロット解析を行った。使用した非還元 SDS サンプルバッファーの組成は 2-3-7. と同様である。

還元チラコイド膜を用いた解析は、上述の方法と同様の *in vitro* 実験系で行った。ただし、反応溶液はチラコイド膜調製用バッファー (50 mM Tricine-NaOH (pH 7.5)、0.4 M Sucrose、5 mM MgCl₂、10 mM NaCl) を使用した。また、実験に用いた ACHT1 と ACHT2 は、50 μM ACHT1 または ACHT2 と 5 mM DTT_{ox} を含むチラコイド膜反応用バッファー中でインキュベート (25°C、5 分) することであらかじめ酸化した。

3-3-3-4. 組換え体タンパク質を用いた PGRL1 の *in vitro* 酸化実験

ACHT1 および ACHT2 が PGRL1 を酸化できるか否かを調べるために、N 末端のみを大腸菌で発現させ精製した組換え体 PGRL1_{Nter} を用いて、ACHT1、ACHT2 による PGRL1 の経時的な酸化還元状態変化を測定した。

実験に用いた ACHT1 または ACHT2 は、50 μM ACHT1 または ACHT2 と 1 mM DTT_{ox} を含む反応溶液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50 mM NaCl) 中でインキュベート (25°C、5 分) することであらかじめ酸化した。ACHT1 と ACHT2 による PGRL1 の酸化反応は、25°C において、10 μM PGRL1_{Nter} を含む反応溶液中に、ACHT1 または ACHT2 を終濃度 5 μM になるように添加することで開始した。反応開始後、一定時間ごとに反応溶液の一部を等量の 20% (w/v) TCA と混和し、氷上で 30 分以上静置し、タンパク質を沈殿させた。その後、3-3-3-3. と同様の方法で、TCA の除去・洗浄、チオール基修飾、非還元 SDS-PAGE を行った。

3-3-4. Trx-like タンパク質過剰発現株の作製

Trx-like タンパク質の過剰発現が NPQ 制御に及ぼす影響を調べるために、各 Trx-like タンパク質の過剰発現株を作製し、解析を行った。シロイヌナズナの形質転換に使用したプラスミドは、久堀・若林研究室の横地佑一博士から提供を受けた。

はじめに、ACHT1、ACHT2、TrxL2.1 または TrxL2.2 過剰発現用プラスミドを用いて、WT をバックグラウンドに、2-3-8.と同様の方法で植物の形質転換を行った。各世代から得られた種は、ハイグロマイシン耐性を基に選抜した。

3-3-5. Trx-like タンパク質過剰発現株における Trx-like タンパク質の発現確認

ACHT および TrxL2 の発現は、それぞれの特異的抗体を用いたイムノブロット解析によって確認した。方法は 2-3-4.と同様である。ACHT1、TrxL2.1、TrxL2.2 の過剰発現株については、組換え体タンパク質を用いた希釈系列のイムノブロット解析結果から各タンパク質の発現量を見積もった。その際に使用した組換え体 ACHT1、ACHT2 は久堀・若林研究室の横地佑一博士より、組換え体 TrxL2.1、TrxL2.2 は久堀・若林研究室の関口敬俊博士より提供を受けた。

3-3-6. Trx-like タンパク質過剰発現株の生育条件

本研究では、特に記載のない限り、シロイヌナズナおよびその過剰発現株は、22°Cにおいて、長日条件下(明期 16 時間、暗期 8 時間)で生育させた。生育光強度および生育日数は、弱光 ($20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) および通常光 ($60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) では 4 週間、強光 ($650 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) では 3 週間である。

3-3-7. Trx-like タンパク質過剰発現株の生重量、クロロフィル量、Fv/Fm の解析

2-3-6.と同様の手法で行った。

3-3-8. Trx-like タンパク質過剰発現株内の Trx 標的タンパク質のレドックス状態

各 Trx-like タンパク質過剰発現株における Trx 標的タンパク質のレドックス状態は、以下の方法で解析した。8 時間以上暗処理した植物に通常光 ($60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) または強光 ($650 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を照射し、一定時間ごとに葉を採取した(図 3-4)。チオール基修飾法を用いた生体内の Trx 標的タンパク質のレドックス状態を識別は、2-3-7.と同様の方法で行った。

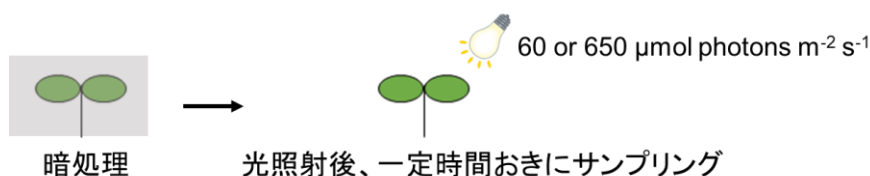


図 3-4 Trx 標的タンパク質のレドックス状態解析時の明暗処理の方法

3-3-9. 光合成パラメータの測定

通常光条件で生育した Trx-like タンパク質過剰発現株について、PSII 関連の光合成パラメータ (Y(II)、NPQ)、PSI 関連の光合成パラメータ (Y(I)、Y(NA)、Y(ND)) の測定を行った。Y(II) は PSII の量子収率、NPQ は非光化学的消光、Y(I) は PSI の量子収率、Y(NA) は PSI のアクセプター側の制限、Y(ND) は PSI のドナー側の制限を示す。Y(II)、NPQ は $60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の赤色光を 8 分間照射したあと、再び暗所に戻してさらに 8 分間測定した。測定時は、 $6000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の飽和パルス光 (持続時間 0.4 秒) を照射した。Y(I)、Y(NA)、Y(ND) の測定は、 $167 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の赤色光を 8 分間照射したあと、再び暗所に戻してさらに 8 分間測定した。測定時は、 $10,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の飽和パルス光 (持続時間 0.8 秒) を照射した。各光合成パラメータの数値は、DUAL-PAM-100 ソフトウェアを用いて、先行研究の式を用いて計算した (Kramer et al. 2004)。

3-3-10. ACHT2-過剰発現株におけるキサントフィルサイクル色素の定量

ACHT2 過剰発現株が示す高 NPQ の要因を調べるために、NPQ 誘導に関わるキサントフィルサイクル色素の定量を行った。通常光条件で 4 週間生育した植物を、暗所で 8 時間置き、 $60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光を 30 分間照射した後、再び暗所に戻し 90 分間静置した (図 3-5)。葉は、最初の 8 時間の暗処理 (DA)、光照射 10 分 (L10)、30 分 (L30)、再暗処理 90 分 (D90) のタイミングでサンプリングし、液体窒素により凍結した。サンプリングした 20–30 mg の葉は、液体窒素中で凍結破砕し、100% (v/v) アセトン 300 μL を加え混合した後、全量を回収した。ボルテックスミキサーを用いて 1 分間攪拌後、遠心分離 ($20,400 \times g$, 20 秒、室温) し、得られた上清を回収した。さらに、沈殿に対して新たに 100% (v/v) アセトン 300 μL を加え、ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌後、遠心分離 ($20,400 \times g$, 20 秒、室温) し、得られた上清を回収した。回収した上清をひとつにまとめ、さらに遠心分離 ($20,400 \times g$, 20 秒、室温) した後、得られた上清をフィルターろ過し、回収した。

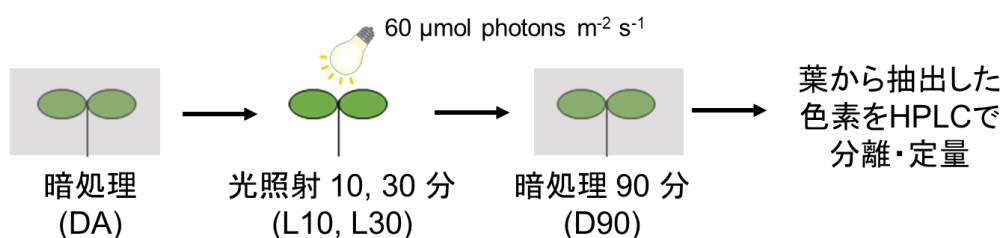


図 3-5 キサントフィルサイクル色素の定量時の明暗処理の方法

HPLC によるキサントフィルサイクルの色素(ビオラキサンチン、アンテラキサンチン、ゼアキサンチン)の定量分析は、先行研究を参考にして行った(Müller-Moulé et al. 2002)。抽出後の色素溶液を、Spherisorb S5 ODS1 4.6 x 250 mm cartridge column (Waters) 4 mL に添加し、移動相 A(アセトニトリル:メタノール:0.1 M Tris-HCl(pH 8.0), 84:2:14 (v/v/v))と移動相 B(メタノール:酢酸エチル, 68:32 (v/v))に直線濃度勾配をかけて(移動相 A:100%→0%、移動相 B:0%→100%)、30℃で色素を溶出した。また、ビオラキサンチン、アンテラキサンチン、ゼアキサンチンのそれぞれについて、異なる濃度の標準色素を用いた HPLC 測定を行い、得られたクロマトグラムからそれぞれのピーク面積を定量し、その数値を基に算出した検量線を作成した。このとき、各色素のピーク面積の定量は、各色素の極大吸収波長において実施した(ビオラキサンチン 440 nm、アンテラキサンチン 452 nm、ゼアキサンチン 460 nm)。葉抽出液については、得られたクロマトグラムから、標準色素との溶出時間の比較から色素を同定し、各色素の極大吸収波長におけるピーク面積を定量し、前述の検量線を基に濃度の算出を行った。

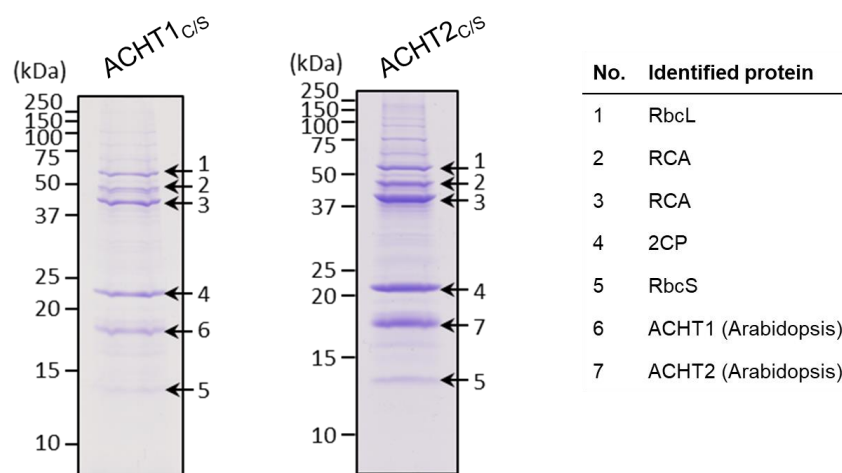
3-4. 結果と考察

3-4-1. ACHT-アフィニティクロマトグラフィーによる標的候補タンパク質の同定

葉緑体において ACHT1、ACHT2 と相互作用するタンパク質を探索するため、組換え体 C/S 置換型 ACHT (ACHT1_{C/S}、ACHT2_{C/S}) を担体として、アフィニティクロマトグラフィーを用いたスクリーニングを実施した。ホウレンソウの葉から抽出した葉緑体のストロマのタンパク質、またはチラコイド膜を可溶化して得たタンパク質を、ACHT1_{C/S}、ACHT2_{C/S} を固定したアフィニティクロマトグラフィーカラムにロードした。ジスルフィド結合を介して ACHT1_{C/S}、ACHT2_{C/S} と結合したタンパク質は、還元剤である DTT_{red} で溶出した。溶出液は SDS-PAGE により分離し、CBB 染色後、各バンドをそれぞれトリプシン消化し、質量分析により標的タンパク質を同定した。

その結果、RCA や 2CP をはじめとした複数のタンパク質が、ACHT1、ACHT2 と相互作用する可能性のある標的候補タンパク質として同定された (図 3-6)。これらのタンパク質の多くは、先行研究にて、ACHT と相互作用することがすでに明らかになっている (Dangoor et al. 2012; Yokochi et al. 2019; Yokochi et al. 2021b)。イムノブロット解析を用いた標的タンパク質の解析により、チラコイド膜画分に存在する PGRL1 も ACHT1 および ACHT2 の標的として同定された (図 3-7)。PGRL1 はサイクリック電子伝達に関連するチラコイド膜局在のタンパク質で、先行研究にて、Trx-*m4* との複合体形成を介したレドックス制御を受けるという報告がある (Okegawa and Motohashi 2020)。

(A) ストロマ画分



(B) チラコイド膜画分

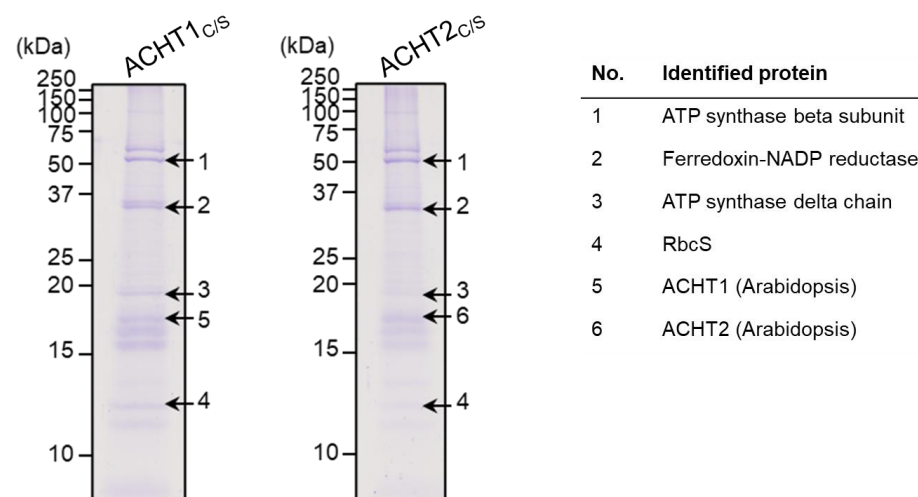


図 3-6 ACHT1 および ACHT2 の標的タンパク質のスクリーニング

図の右に記した番号は、質量分析により同定したタンパク質と対応している。(A) ホウレンソウ葉緑体のストロマ画分のタンパク質に対する ACHT-アフィニティクロマトグラフィーで捕捉されたタンパク質。(B) ホウレンソウ葉緑体のチラコイド膜画分のタンパク質に対する、ACHT-アフィニティクロマトグラフィーで捕捉されたタンパク質。RbcS: Rubisco 小サブユニット

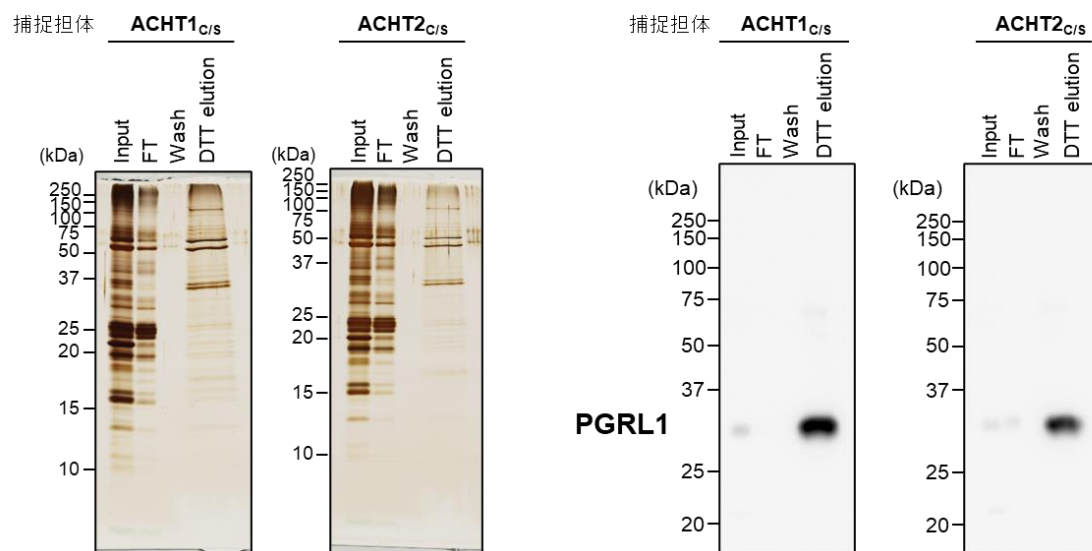


図 3-7 ACHT 標的候補タンパク質としての PGRL1 の同定

ホウレンソウ葉緑体のチラコイド膜画分のタンパク質に対する、ACHT-アフィニティクロマトグラフィーの各画分に対し、PGRL1 特異的抗体を用いてイムノブロット解析を行った。Input は可溶化したチラコイド膜画分、FT は素通り画分、Wash は Wash 画分 (5 回目)、DTT elution は DTT_{red} による溶出画分を示す。ロード量のコントロールとして、イムノブロット解析時と同量のサンプルをロードした時の銀染色像を左側に示す。

3-4-2. ACHT による PGRL1 の in vitro 酸化実験

PGRL1 は、分子内にシステイン残基が複数存在しており、レドックス制御を受けるという報告も複数あるが、その機能制御メカニズムについては未だ不明な点が多い。Hertle らは、PGRL1 は分子間ジスルフィド結合で結ばれたホモ二量体を形成しており、これを Trx が還元しモノマー化させることで、PGRL1 を機能的な状態へと移行させると報告している (Hertle et al. 2013)。また、シロイヌナズナにおける Trx-*m4* との複合体形成による PGRL1 の活性制御のモデルも提案されている (Okegawa and Motohashi 2020)。このモデルでは、暗所で PGRL1 は Trx-*m4* とジスルフィド結合を介したヘテロ複合体を形成しているが、明所では、光合成誘導期に分子間のジスルフィド結合が還元され、PGRL1 は還元型 (活性型) の単量体となる。その後、酸化により、PGRL1 分子内、あるいは PGRL1 分子間のジスルフィド結合が形成され、酸化型 PGRL1 単量体あるいは二量体の PGRL1 となったあと、再度 Trx-*m4* とヘテロ複合体を形成することで不活性化されると考えられている。このような、ジスルフィド結合を介した PGRL1 の複合体形成については、Wolf らも報告しているが、その組成の決定には至っていない (Wolf et al. 2020)。また、別のグループによる最近の研究で、イムノブロット解析の結果、PGRL1 と Trx-*m4* のヘテロ複合体と同じサイズのコグロマトバンドが、WT だけでなく Trx-*m4* の欠損株にも存在したという、ヘテロ複合体形成による PGRL1 の機能制御を疑問

視する報告もなされている(Naranjo et al. 2021)。このように、PGRL1 の活性制御メカニズムの詳細については未だ議論が続いている。また、現時点で、PGRL1 単量体の酸化を担う因子は、明らかにされていない。図 3-7 より、ACHT1 および ACHT2 の標的候補タンパク質として PGRL1 が同定されたことから、ACHT が PGRL1 の酸化因子である可能性が示された。また、PGRL1 が関わるサイクリック電子伝達はルーメンの酸性化の誘導を介して NPQ 制御に関与すると考えられている(Munekage et al. 2002)。このことから、ACHT は PGRL1 の酸化還元状態を制御することで NPQ 制御に関与する可能性がある。

3-4-2-1. 単離チラコイド膜を用いた解析

ACHT による PGRL1 の直接的な酸化の有無を明らかにするために、単離チラコイド膜を用いて、ACHT 存在下の PGRL1 のレドックス状態の経時的な変化を調べた(図 3-8)。酸素による自然酸化の影響を考慮し、何も処理を行わないチラコイド膜を用いてネガティブコントロールとした。PGRL1 は何も処理を行わない条件下では、酸化型と還元型の両方で存在していたが、DTT_{red} 添加による還元処理、または CuCl₂ 添加による酸化処理を行うと、すべての PGRL1 が還元型あるいは酸化型になった。一方、ACHT1 と ACHT2 を添加しても、PGRL1 のレドックス状態に明確な変化は見られなかった。

次に、還元処理を行ったチラコイド膜を用いて、同様の解析を行った(図 3-9)。まず、コントロールとして、CF₁- γ のレドックス状態を調べた(図 3-9A)。その結果、CF₁- γ は、何も処理を行わない条件下では還元型のみの状態で存在していたが、ACHT1 によって、全て酸化型になった。続いて、同じサンプルを用いて、PGRL1 のレドックス状態を調べた(図 3-9B)。その結果、PGRL1 は、何も処理を行わない条件下では還元型のみの状態で存在していたが、diamide 添加による酸化処理を行うと、一部が酸化型になった。一方、ACHT1 を添加しても、PGRL1 のレドックス状態に明確な変化は見られなかった。以上の結果から、少なくとも本研究で調べた範囲では、単離チラコイド膜に ACHT を添加しても、PGRL1 の酸化は起こらないことがわかった。

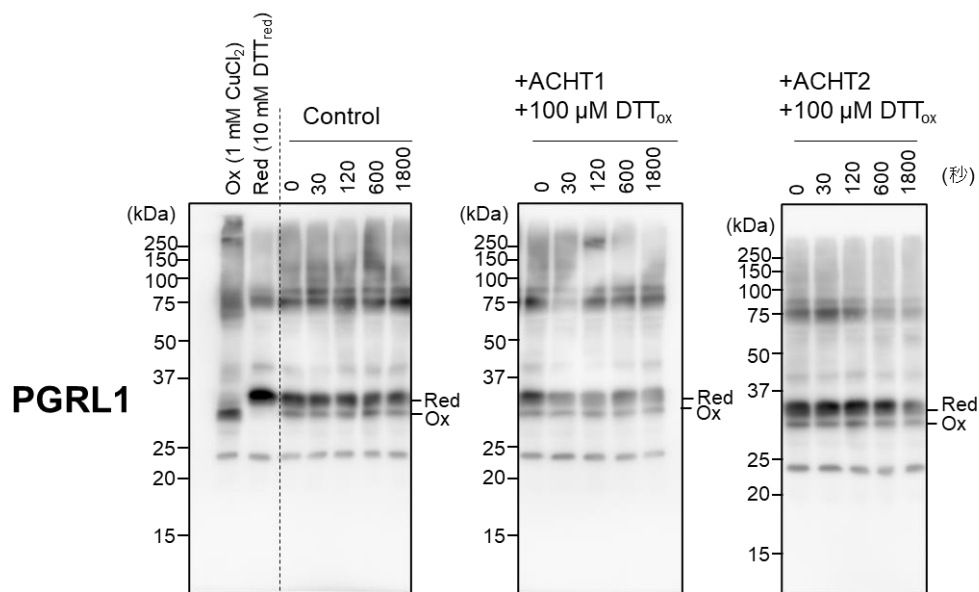


図 3-8 単離チラコイド膜を用いた PGRL1 酸化実験

ハウレンソウ由来のチラコイド膜に対し、組換え体 ACHT を添加した後の、PGRL1 の経時的なレドックス状態の変化を示すイムノブロット像。

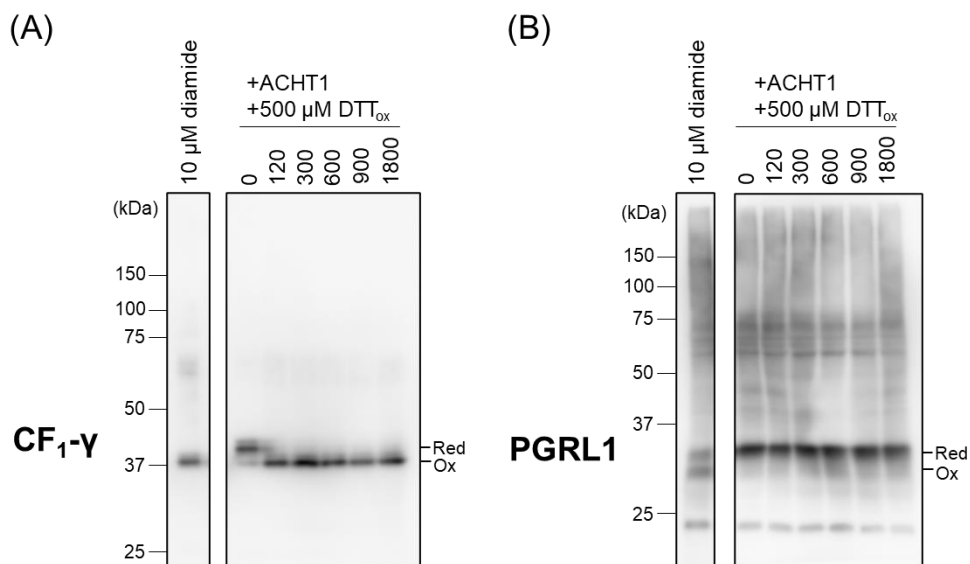


図 3-9 還元チラコイド膜を用いた in vitro 酸化実験

還元処理を行ったハウレンソウ由来のチラコイド膜に対し、組換え体 ACHT1 を添加した後の、CF₁-γ (A)、PGRL1 (B) の経時的なレドックス状態の変化を示すイムノブロット像。

3-4-2-2. 組換え体 PGRL1 を用いた解析

最後に、組換え体 PGRL1 を用いて、ACHT 存在下の PGRL1 のレドックス状態の経時的な変化を調べた(図 3-10)。PGRL1 は膜タンパク質であり、ストロマ側に露出している N 末端側には、Trx と相互作用をするという報告のあるシステイン残基が 2 個存在する(Hertle et al. 2013)。そこで、本研究には、PGRL1 の N 末端のみを精製した組換え体 PGRL1_{Nter} を用いた。その結果、組換え体 PGRL1_{Nter} は ACHT1、および ACHT2 の存在下ではレドックス状態に変化がないことがわかった。

以上の結果から、少なくとも本研究で調べた範囲では、ACHT1 と ACHT2 は PGRL1 を直接酸化することができないことが明らかになった。

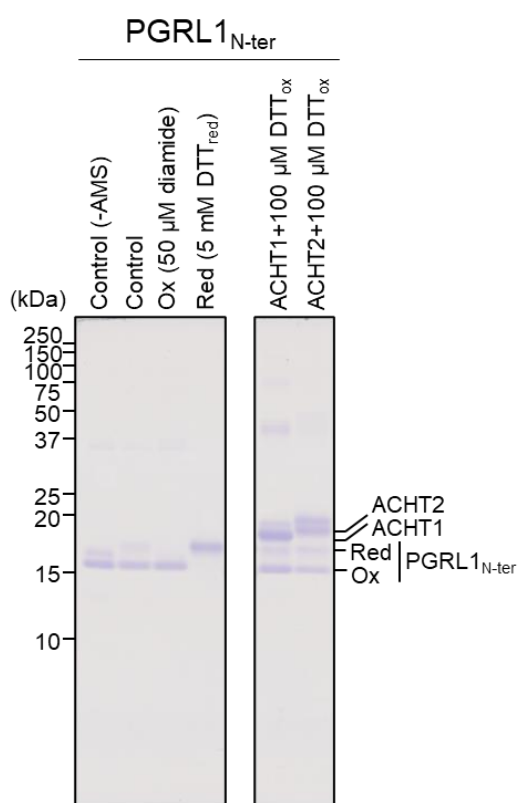


図 3-10 組換え体 PGRL1 を用いた in vitro 酸化実験

PGRL1 の N 末端のみを発現した組換え体 PGRL1_{Nter} に対して、組換え体 ACHT を添加した後の、PGRL1 のレドックス状態の変化を示す SDS-PAGE 像。

3-4-3. ACHT2 過剰発現株の作製

そこで次に、NPQ 制御への ACHT の関与の有無を検討するために、Trx-like タンパク質を過剰発現した株を用いて NPQ に与える影響を評価した。本研究では、ACHT1 よりも、葉における発現量が多い ACHT2 を研究のターゲットとした。その他の Trx-like タンパク質の過剰発現についての解析結果は、3-4-8.にまとめて示した。

WT をバックグラウンドに、35s プロモーターを用いて ACHT2 を過剰発現させた株を作製し、ACHT2 の発現量が異なる4系統(ACHT2-OE1、-OE2、-OE3、-OE4)を得た(図 3-11)。ACHT2 の発現量は、イムノブロット解析結果を定量し、算出した。その結果、ACHT2 の発現量を WT と比較すると、ACHT2-OE1 は 25 倍、ACHT2-OE2 は 0.8 倍、ACHT2-OE3 は 2.5 倍、ACHT2-OE4 は 16 倍の発現量であることがわかった。

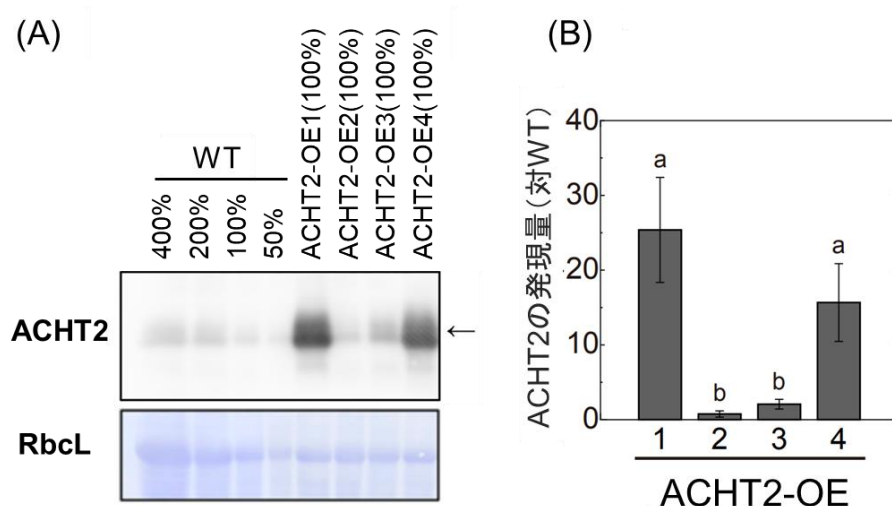


図 3-11 ACHT2 過剰発現株における ACHT2 の発現量

(A) イムノブロット解析による、ACHT2 の過剰発現の確認。ACHT2 の発現量を見積もるため、WT の葉抽出液の希釈系列を並べて示した。黒矢印は目的タンパク質のバンドを示す。ロード量のコントロールとして RbcL の CBB 染色像を示した。(B) ACHT2 過剰発現株における ACHT2 発現量の比較。(A)のバンド強度を定量し、WT における ACHT2 の発現量に対する割合として、ACHT2 過剰発現株の ACHT2 発現量を示した。値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3) を示す。異なるアルファベットで示された値の間には、有意差 (TurkeyHSD、 $P < 0.05$) が確認された。横地 2019 年度博士論文より引用改変。

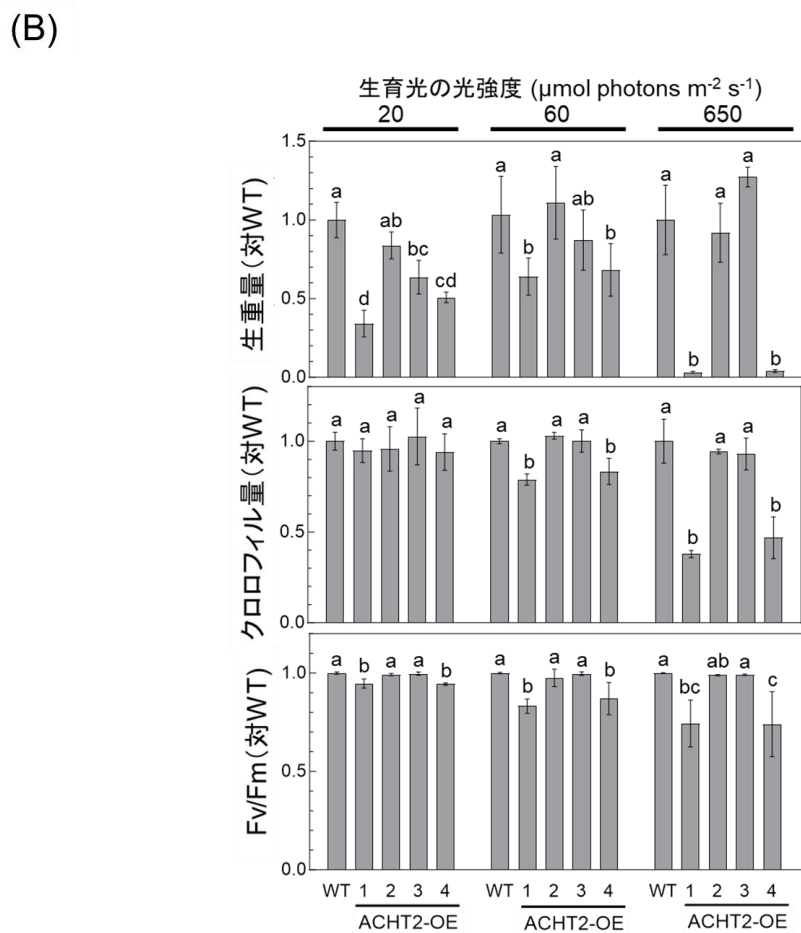
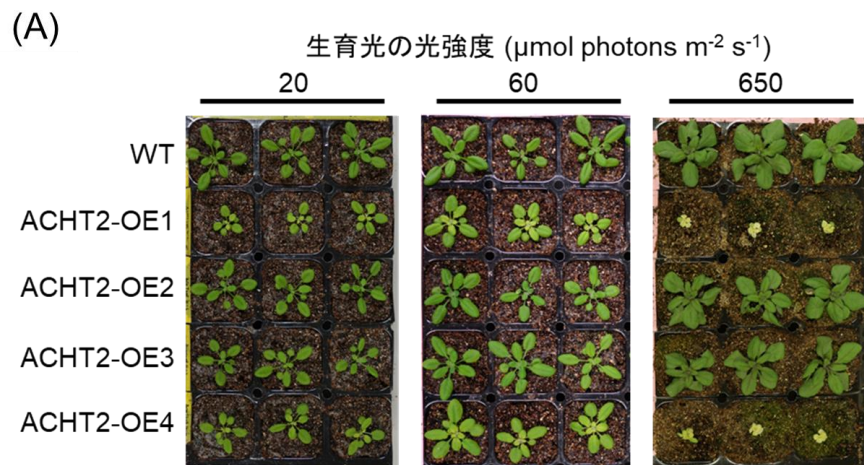


図 3-12 ACHT2 過剰発現株の生育

(A) 異なる光強度で生育させた ACHT2 過剰発現株の生育。(B) 異なる光強度で生育させた ACHT2 過剰発現株の生重量、クロロフィル量、Fv/Fm の比較。値はすべて、WT の値に対する相対値である。値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=3-11$) を示す。異なるアルファベットで示された値の間には、有意差 (TurkeyHSD、 $p < 0.05$) が確認された。

3-4-4. ACHT2 過剰発現株の生重量、クロロフィル量、Fv/Fm の解析

ACHT2 の過剰発現が植物個体レベルでどのような影響を及ぼすかを調べるために、異なる光条件で生育した ACHT2-OE 株について、生重量、クロロフィル量、Fv/Fm をそれぞれ測定した(図 3-12)。解析には、弱光 ($20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)、通常光 ($60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) および、強光 ($650 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) 条件で生育した植物を用いた。その結果、解析に用いたすべての条件で ACHT2-OE2 株と ACHT2-OE3 株は WT と同程度の生重量、クロロフィル量、Fv/Fm の値を示した。一方で、ACHT2-OE1 株と ACHT2-OE4 株は、特に通常光条件と強光条件において、生重量、クロロフィル量、Fv/Fm のすべてについて、WT よりも低下していた。特に強光条件において、ACHT2-OE1 株と ACHT2-OE4 株の生重量は WT の 3-4% まで低下しており、非常に強い生育阻害が観測された。このことから、ACHT2 の過剰発現は生育阻害を引き起こすこと、さらに、この生育阻害は生育光の光強度と相関があることが示された。なお、これ以降の実験はすべて、通常光条件で生育した植物を使用して、実験を行った。

3-4-5. ACHT2 過剰発現株における Trx 標的タンパク質のレドックス状態

次に、ACHT2-OE 株における、葉緑体内の Trx 標的タンパク質のレドックス状態がどのように変化するかを調べた。解析の対象としたタンパク質は、代表的な Trx 標的タンパク質である、CF₁- γ 、FBPase、RCA である。

はじめに、ACHT2 の発現量が多い ACHT2-OE1 株と ACHT2-OE4 株を用いて、光合成の定常状態における各 Trx 標的タンパク質のレドックス状態を解析した(図 3-13A、B)。暗順応した植物に、通常光 ($60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) または強光 ($650 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) を照射し 30 分後にサンプリングを行った。その結果、ACHT2-OE1 株、ACHT2-OE4 株ともに、CF₁- γ 、FBPase、RCA の還元率は、いずれの光強度下でも WT よりも低下していた。特に、FBPase と RCA の還元率は、強光照射下で大きく低下した(それぞれ WT の約 15%、40% まで低下)。

次に、暗順応した植物に通常光 ($60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) を照射し、0 分から 10 分まで経時的にサンプリングを行うことで、暗所から明所への移行期における Trx 標的タンパク質のレドックス状態を調べた(図 3-13C、D)。光照射後 5 分以降の、還元が平衡状態に達した際の還元率については、ACHT2-OE 株の全系統について、CF₁- γ の還元率は WT と同程度だった。一方、FBPase や RCA の平衡状態の還元率は、ACHT2-OE2 株と ACHT2-OE3 株は WT と同程度だったが、ACHT2-OE1 株と ACHT2-OE4 株では低下し、WT よりもレドックス状態が酸化になっていた。これらの結果は、酸化因子である ACHT2 の過剰発現に由来すると考えられる。また、いずれの Trx 標的タンパク質も、3 点目の測定点である光照射 1 分後には還元が平衡状態に達していたため(図 3-13C、D)、本研究結果のみから各 Trx 標的タンパク質の還元のキネティクスの違いについて議論することは難しい。この議論のためには、今後、より詳細なレドックス制御の解析を行う必要がある。例えば、強光下では、CF₁- γ 、FBPase、RCA の還元のキネティクスがそれぞれ異なることが知られているため(Yoshida et al. 2018)、強光を用いて、より短い測定間隔でサンプリングを行うことで、ACHT2 過剰発現株における各 Trx 標的タンパク質の還元のキネティクスをより詳細に明らかにで

きと考えられる。以上のことから、ACHT2 の過剰発現が Trx 標的タンパク質、特にカルビン・ベンソン回路の酵素の還元率に影響を与えることが明らかになった。

先行研究にて、ACHT2 を欠損した株では、明所から暗所への移行時に FBPase の酸化が遅れることが示された (Yokochi et al. 2021b)。この結果は、ACHT2 過剰発現株において FBPase の還元率が低下するという本研究の結果と一致しており (図 3-13)、ACHT2 が生体内で FBPase の主要な酸化因子として働いていることを強く示唆している。一方で、ACHT2 の欠損は RCA や CF₁-γ の酸化に大きな影響を与えなかったが (Yokochi et al. 2021b)、ACHT2 過剰発現株では RCA、CF₁-γ はともに定常状態における還元率が低下した (図 3-13A、B)。これらの結果は、ACHT2 は RCA や CF₁-γ を酸化できるが、その機能は他の Trx および Trx-like タンパク質によって相補されうること示していると考えられる。実際に、先行研究では、RCA の酸化には Trx-f、CF₁-γ の酸化には TrxL2.1 がそれぞれ最も寄与していることが示唆されている (Yokochi et al. 2021b)。

FBPase と RCA は、Trx による還元によって活性化する (Wolosiuk and Buchanan 1977; Zhang and Portis 1999)。したがって、ACHT2 過剰発現株では、FBPase と RCA の還元率が低いため (図 3-13)、カルビン・ベンソンサイクルが抑制されている可能性がある。また、ACHT2 過剰発現株では、生重量やクロロフィル含量など、いくつかの生育のパラメータも低下し、これらの表現型はいずれも、強光条件下で顕著であった (図 3-12)。このことから、ACHT2 の過剰発現が引き起こすカルビン・ベンソン回路の活性低下は、過剰発現株における生育阻害を引き起こす要因のひとつであると考えられる。

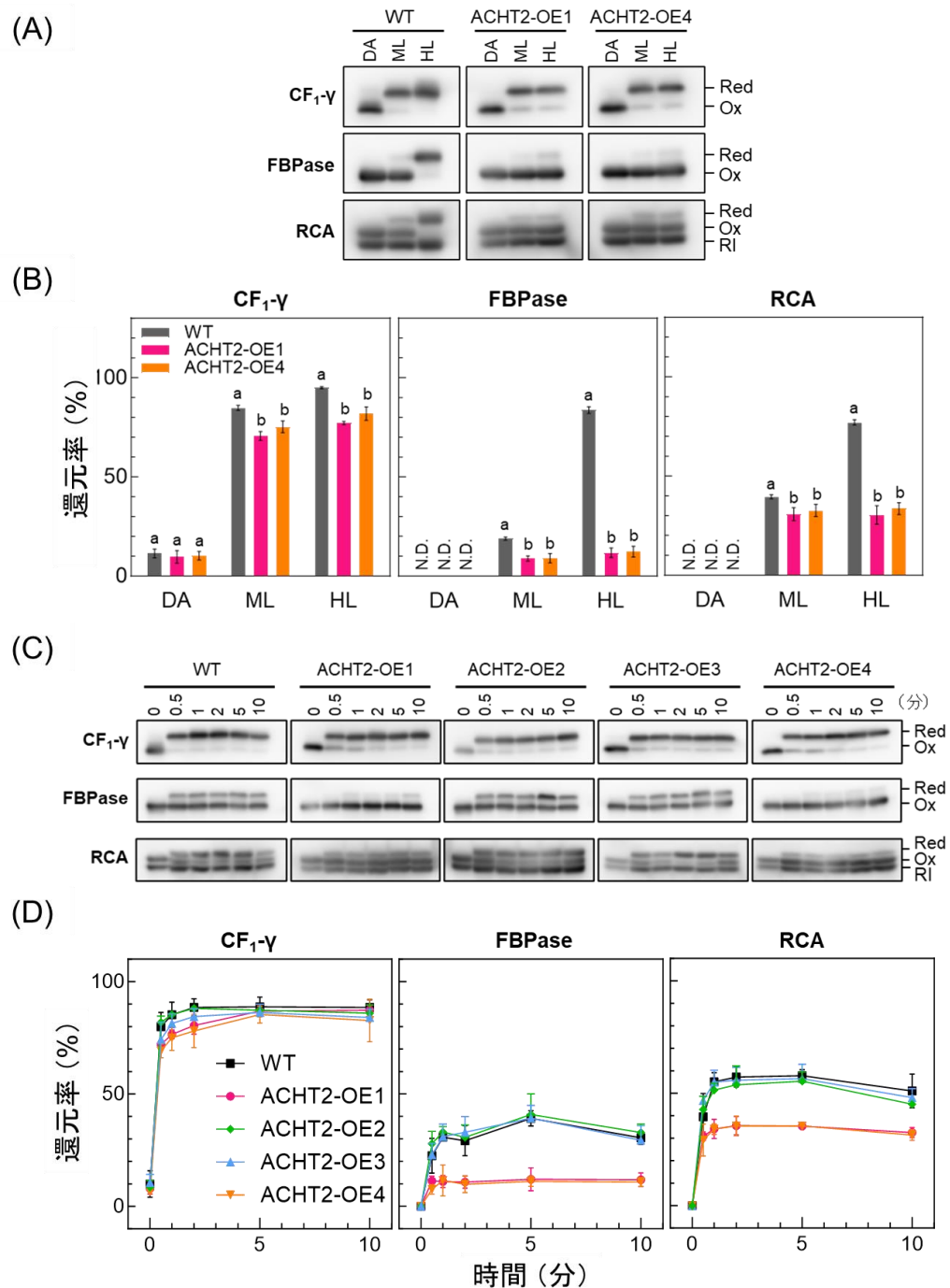


図 3-13 ACHT2 過剰発現株における Trx 標的タンパク質のレドックス状態
 (A) 8 時間の暗順応 (DA) と、60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (通常光、ML) または 650 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (強光、HL) の光照射 (30 分) 後の CF₁-γ、FBPase、RCA のレドックス状態を比較したイムノブロット像。(B) (A) が示すバンド強度を定量し算出した CF₁-γ、FBPase、RCA の還元率。(C) 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光照射 (0–10 分間) による CF₁-γ、FBPase、RCA のレドックス状態を比較したイムノブロット像。(D) (C) が示すバンド強度を定量し算出した CF₁-γ、FBPase、RCA の還

元率。(B, D) 還元率は、酸化型と還元型のバンドに対する還元型のバンドの割合として算出した。値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=3$) を示す。異なるアルファベットで示された値の間には、有意差 (TurkeyHSD, $p < 0.05$) が確認された。Red は還元型、Ox は酸化型、RI はレドックス非感受性の RCA のスプライシングバリエントを示す。N.D. は不検出 (not detected) を示す。

3-4-6. ACHT2 過剰発現株における光合成パラメータの評価

ACHT2 の過剰発現が植物生体内に及ぼす影響をさらに評価するため、クロロフィル蛍光法によって、PSII に関連するパラメータである $Y(II)$ および NPQ を調べた。 $Y(II)$ は PSII の量子収率を示し、NPQ は PSII 周辺の過剰な光が熱として散逸される程度を反映する。図 3-14 に示すように、WT では、 $Y(II)$ は光照射後すぐに低下したが、その後増加し、3-4 分で定常状態に達した。ACHT2-OE2 株および ACHT2-OE3 株は WT と同じ挙動を示した一方で、ACHT2-OE1 株および ACHT2-OE4 株では、光照射中の $Y(II)$ の値が WT よりも低かった。また、WT の NPQ の値は光照射 1 分後に一過性に増加したが、その後すぐに低下した。ACHT2-OE2 株および ACHT2-OE3 株は WT と同じ挙動を示した一方で、ACHT2-OE1 株および ACHT2-OE4 株では、光照射中、WT よりも高い NPQ を示し続けた。同様の方法で、*acht* 株、*trxl2* 株、*acht/trxl2* 株についても光合成パラメータの測定を行ったが、 $Y(II)$ および NPQ とともに、WT との間に大きな差は見られなかった (図 3-15)。以上の結果から、ACHT2 の過剰発現は定常状態の $Y(II)$ を低下させ、NPQ の誘導を促進することがわかった。また興味深いことに、ACHT1 および ACHT2 の欠損は光合成パラメータには大きな影響を示さないことも明らかになった。これは、葉緑体内の Trx や他の Trx-like タンパク質が ACHT の機能を相補しうることを示唆している。

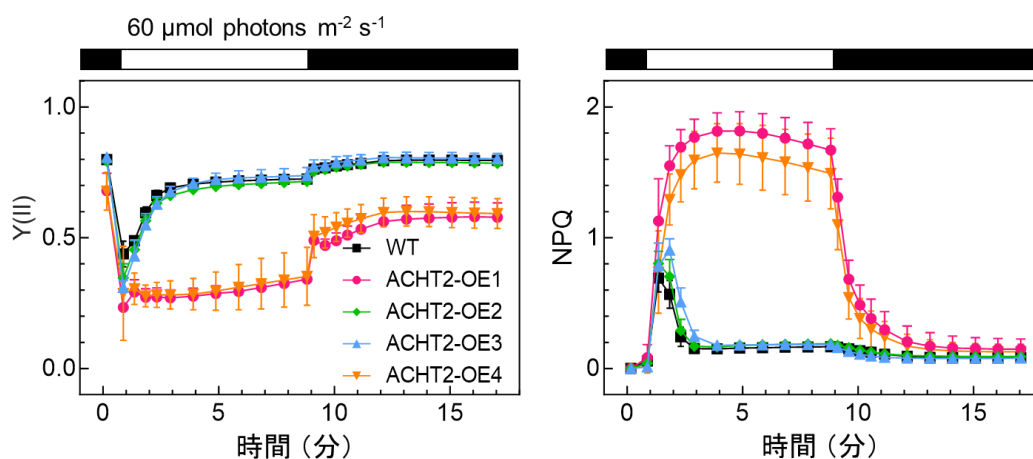


図 3-14 ACHT2 過剰発現株の PSII に関わる光合成パラメータ

明所から暗所への移行時における、ACHT2 過剰発現株の $Y(II)$ と NPQ のタイムコース。各グラフの上の白と黒のバーは、それぞれ光照射 ($60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 時間と暗処理の時間を示す。値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=4-5$) を示す。

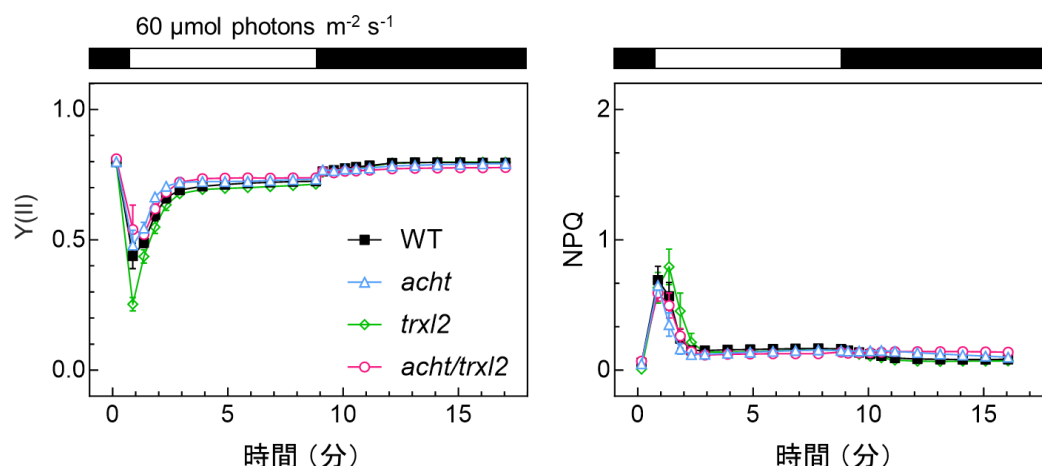


図 3-15 Trx-like タンパク質欠損株の PSII に関わる光合成パラメータ

明所から暗所への移行時における、Trx-like タンパク質欠損株の $Y(II)$ と NPQ のタイムコース。各グラフの上の白と黒のバーは、それぞれ光照射 ($60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 時間と暗処理の時間を示す。値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=4$) を示す。

次に、WT よりも顕著に低い $Y(II)$ と高い NPQ を示した ACHT2-OE1 株と ACHT2-OE4 株について、光合成活性をより詳しく評価するため、PSI に関連するパラメータ ($Y(I)$ 、 $Y(ND)$ 、 $Y(NA)$) を調べた。 $Y(I)$ は PSI の量子収率を示し、 $Y(ND)$ は PSI の電子ドナー側の制限の指標であり、 $Y(NA)$ は PSI の電子アクセプター側の制限の指標である。図 3-16 に示すように、 $Y(NA)$ の値は ACHT2-OE1 株と ACHT2-OE4 株ともに WT と同程度だったが、 $Y(ND)$ の値は、ACHT2-OE1 株と ACHT2-OE4 株ともに、WT よりも有意に高かった。この結果は、PSI の上流で電子の流れに制限が生じていることを示している。光合成電子伝達反応において、PSII から放出された電子は、プラストキノン、シトクロム b_6/f 複合体、プラストシアニンを経て、PSI に伝達される (図 1-3)。したがって、 $Y(ND)$ の上昇は、PSI の上流に存在するこれらの因子を介した電子の流量の低下を意味する。このような PSI 上流の電子伝達の制限を引き起こす要因のひとつが、シトクロム b_6/f 複合体の活性制御により、過剰な電子流入による PSI の損傷を防ぐしくみ (photosynthetic control) である (Stiehl and Witt 1969; Foyer et al. 1990; Tikhonov 2013)。一般に、強光照射下で光合成電子伝達活性が上昇すると、ストロマからルーメンへのプロトンの流入量が増加することで、ルーメンの酸性化が引き起こされる。Photosynthetic control は、このルーメンの酸性化に応じて、シトクロム b_6/f 複合体の活性を制限することで、PSI への電子の流入を抑えていると考えられている (Stiehl and Witt 1969; Foyer et al. 1990; Tikhonov 2013)。このことから、ACHT2 の過剰発現株では、通常光照射下においても、photosynthetic control が誘導されており、ルーメンの酸性化が引き起こされているものと考えられる。また、ルーメンの酸性化は、サイクリック電子伝達の活性化によって維持され则认为られている

(Munekage et al. 2002)。サイクリック電子伝達では、PSI 下流に存在する電子アクセプターである Fd から、PGR5/PGRL1 依存経路と NDH 依存経路を介してプラストキノンまで電子が伝達される (図 1-3)。したがって、NADPH の生産を伴わずに、チラコイド膜内外のプロトン勾配を形成できる。通常、Fd の還元力の大部分は FNR を介して NADP^+ へ伝達する。しかし、強光下のように、光合成の電子伝達活性が上昇する一方で、カルビン・ベンソン回路が十分に活性化していないような状況では、NADPH の消費が滞り、PSI より下流の電子伝達が滞ってしまう。このような状況下では、サイクリック電子伝達が機能することで PSI に電子が過剰に溜まるのを防いでいると考えられる (Munekage et al. 2002)。このことは、ACHT2 過剰発現株において、明所でカルビン・ベンソン回路の酵素の還元率が低下し (図 3-13)、 $Y(\text{NA})$ が低下した結果 (図 3-16) と一致する。したがって、ACHT2 過剰発現株でも、明所でサイクリック電子伝達が活性化しているのではないかと予想できる。

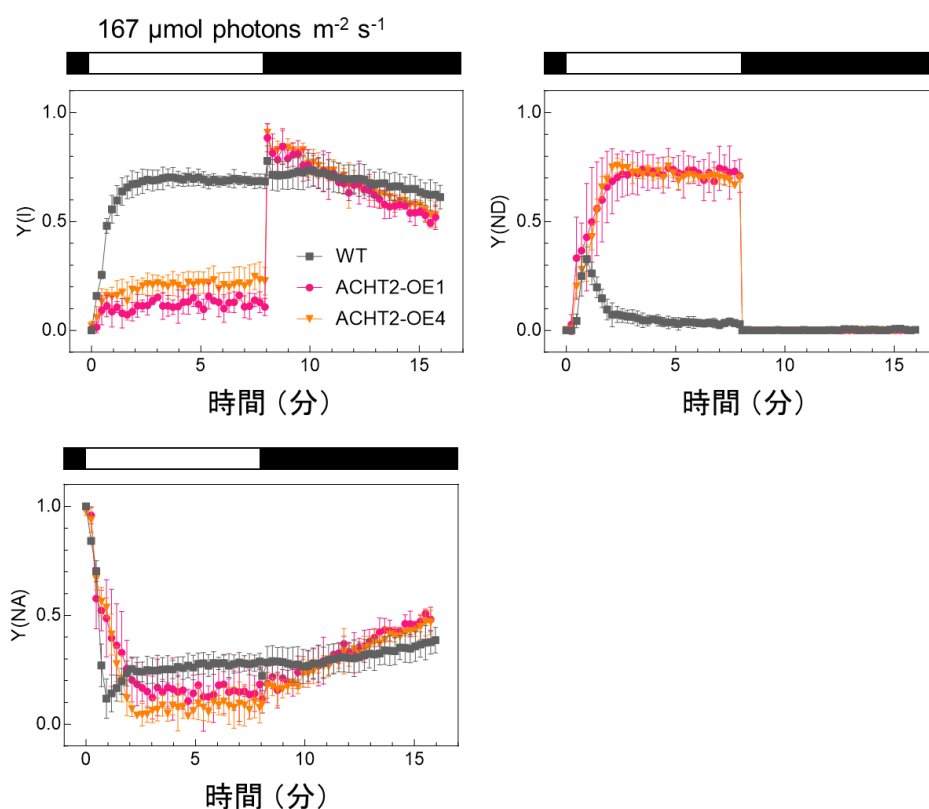


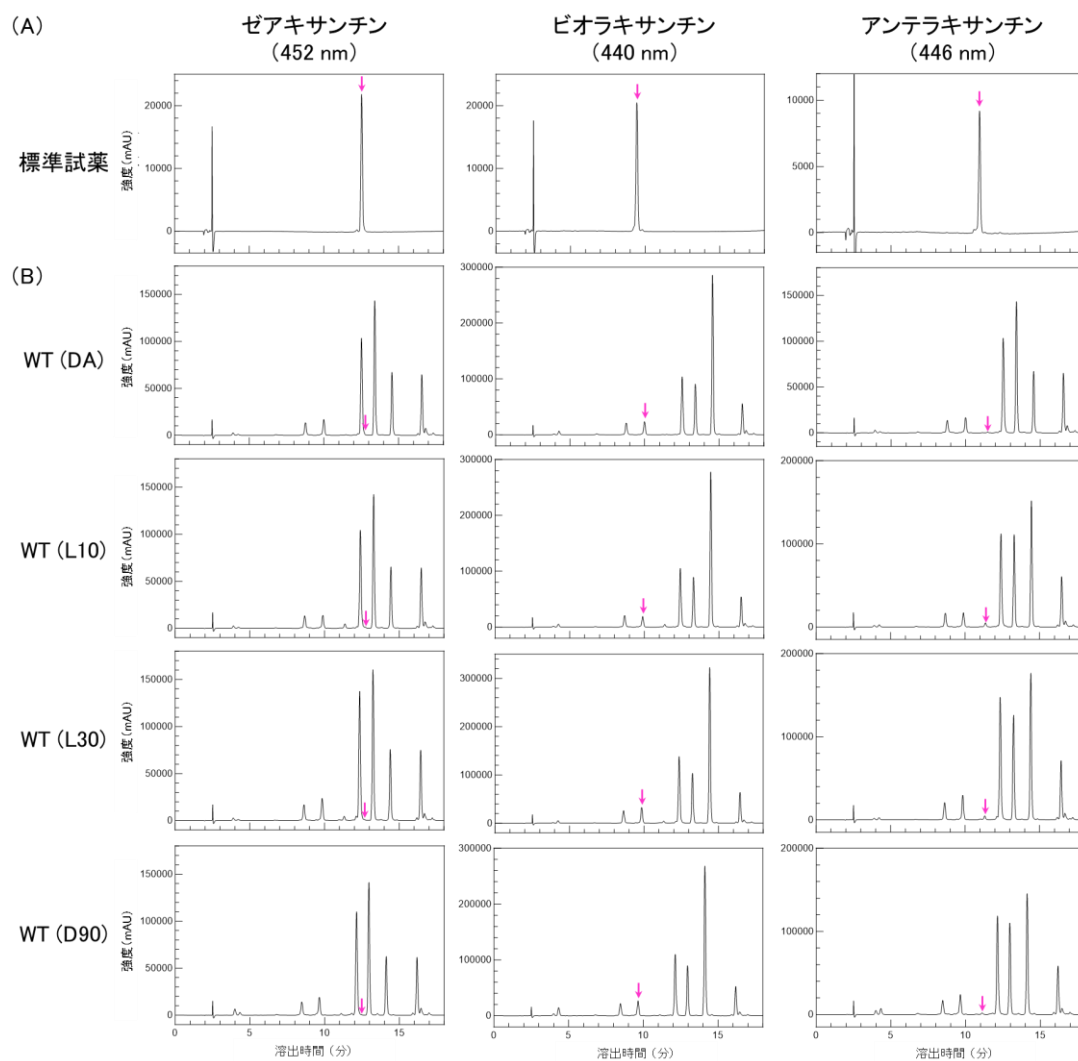
図 3-16 ACHT2 過剰発現株の PSI に関わる光合成パラメータ

明所から暗所への移行時における、ACHT2 過剰発現株の $Y(\text{I})$ 、 $Y(\text{NA})$ 、 $Y(\text{ND})$ のタイムコース。各グラフの上の白と黒のバーは、それぞれ光照射 ($167 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 時間と暗処理の時間を示す。値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=3$) を示す。

3-4-7. ACHT2 過剰発現株におけるキサントフィルサイクル色素の定量

キサントフィルサイクル色素の脱エポキシ化は、NPQ の要素のひとつである qE を誘導するメカニズムのひとつである (Niyogi et al. 1998)。キサントフィルサイクルにおいて、ビオラキサンチンは、ルーメンの酸性化によって活性化される violaxanthin de-epoxidase (VDE) によって、アンテラキサンチンを経てゼアキサンチンまで脱エポキシ化され、これが NPQ 誘導の引き金となる (図 3-1) (Szabó et al. 2005)。暗所では、ゼアキサンチンは zeaxanthin epoxidase によってビオラキサンチンに再変換される。そこで、高い NPQ を示す 2 つの ACHT2 過剰発現株 (ACHT2-OE1 株、ACHT2-OE4 株) について、NPQ が引き起こされる要因を明らかにするために、キサントフィル色素の脱エポキシ化状態を解析した。葉に含まれるキサントフィルサイクル色素の組成を調べるため、植物を 8 時間の暗順応させたあと、通常光 ($60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) の光照射後 10 分と 30 分、および暗所に戻し 90 分後にサンプリングおよび色素抽出を行い、逆相クロマトグラフィーによる HPLC 分析を行った (図 3-17)。その後、キサントフィルサイクル色素の全量に対する、アンテラキサンチンとゼアキサンチンの蓄積量、としてキサントフィルサイクルの脱エポキシ化状態を評価した (図 3-18)。

図 3-18 に示すように、ACHT2 過剰発現株におけるキサントフィルサイクル色素の脱エポキシ化状態は、WT 株に比べ、特に光照射中に 3 倍から 4 倍高かった。この結果から、ACHT2 過剰発現株が示す高い NPQ は、キサントフィルサイクルの高い脱エポキシ化により引き起こされることが明らかになった。またこの結果は、ACHT2 の過剰発現株において、ルーメンの酸性化が起きていることも示している。このことは、ACHT2 過剰発現株において、明所でのルーメンの酸性化によって photosynthetic control が誘導されたために Y(ND)が上昇したという、3-4-6.での推測とも一致する。



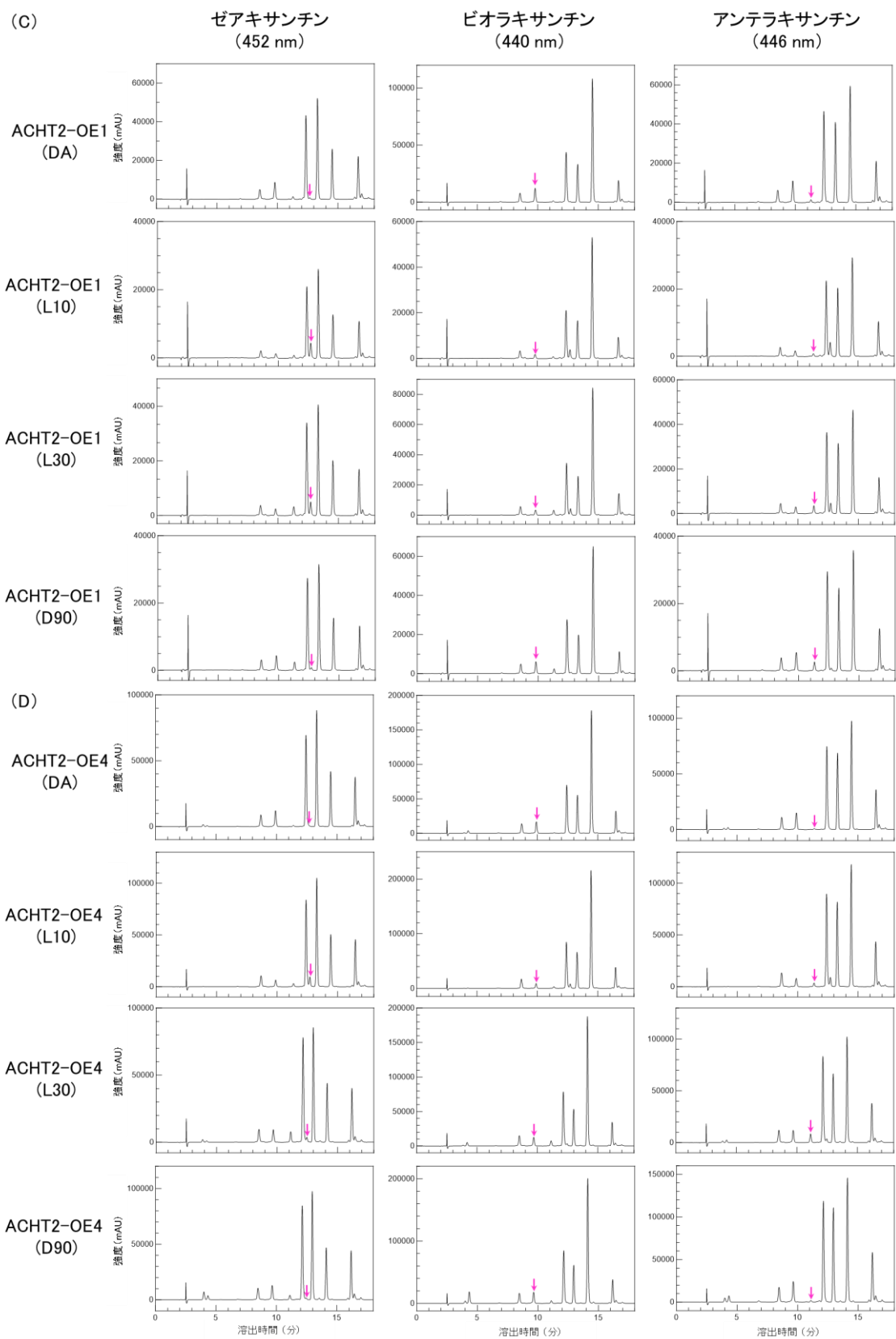


図 3-17 キサントフィルサイクル色素分析時のクロマトグラム

色素ごとに、それぞれの極大吸収波長におけるクロマトグラムを示した(極大吸収波長:ビオラキサンチン 440 nm、アンセラキサンチン 452 nm、ゼアキサンチン 460 nm)。マゼンタの矢印は同定した各色素のピークを示す。(A) ビオラキサンチン、アンセラキサンチン、ゼアキサンチンの標準色素のクロマトグラム。(B) WT の葉抽出液のクロマトグラム。(C) ACHT2-OE1 株の葉抽出液のクロマトグラム。(D) ACHT2-OE4 株の葉抽出液のクロマトグラム。葉のサンプリングは、8 時間の暗順応(DA)後、10 分(L10)または 30 分(L30)の光照射後、およびその後 90 分間暗所に戻した後(D90)に実施した。

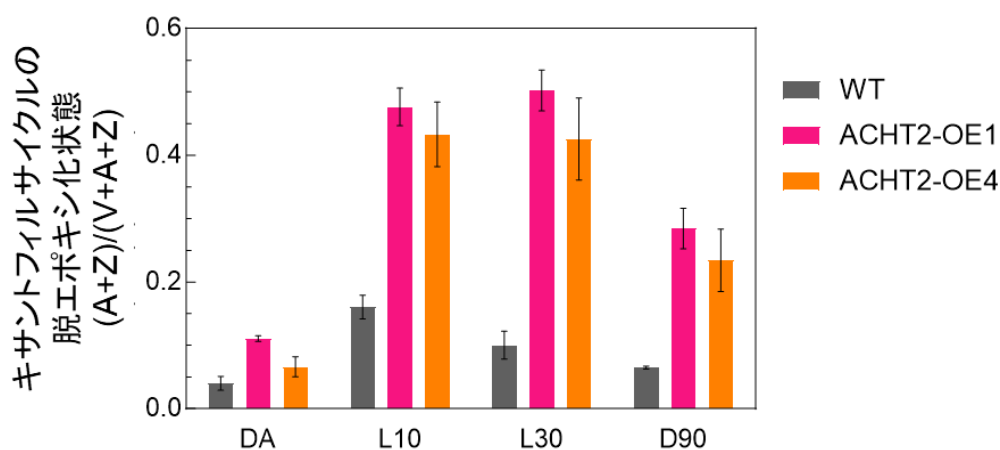


図 3-18 ACHT2 過剰発現株におけるキサントフィルサイクルの色素組成

図 3-17 のクロマトグラムからビオラキサンチン(V)、アンセラキサンチン(A)、ゼアキサンチン(Z)が示すピーク面積を定量し、キサントフィルサイクル色素の脱エポキシ化状態を評価した。キサントフィルサイクル色素の脱エポキシ化状態は、キサントフィルサイクルの色素総量に対するアンセラキサンチンとゼアキサンチンの総量の比として算出した。値は、平均値 ± 標準偏差 (n=3) を示す。

3-4-8. ACHT1、TrxL2.1、TrxL2.2 の過剰発現株の解析

ACHT2 以外の Trx-like タンパク質の過剰発現が植物の生育にどのような影響を及ぼすかを調べるために、ACHT1、TrxL2.1 または TrxL2.2 の過剰発現株 (ACHT1-OE、TrxL2.1-OE、TrxL2.2-OE) を作製した。植物株の選抜は抗生物質耐性と、イムノブロット解析によるタンパク質発現の確認によって行い、各 2 系統 (ACHT1-OE1、-OE2、TrxL2.1-OE1、-OE2、TrxL2.2-OE1、TrxL2.2-OE2) の過剰発現株を得た。次に、それぞれのタンパク質発現量をイムノブロット解析により調べた (図 3-19)。WT では、内在性の ACHT1 および TrxL2.2 の発現レベルはイムノブロット解析での検出限界以下であったため、各タンパク質の発現量はそれぞれの組換え体タンパク質と比較した。その結果、*in vivo* での ACHT1、TrxL2.1 または TrxL2.2 それぞれの発現量は、ACHT1-OE 株では 25–60 nmol/g、TrxL2.1-OE 株は約 20 nmol/g、TrxL2.2-OE 株は約 40 nmol/g であることがわかった。

次に、ACHT1-OE 株、TrxL2.1-OE 株および TrxL2.2-OE 株の生重量、クロロフィル含量、Fv/Fm を測定した。その結果、すべての株で WT と同程度であることがわかった (図 3-20)。さらに、ACHT1-OE 株、TrxL2.1-OE 株および TrxL2.2-OE 株における、暗所から明所の移行期の Trx 標的タンパク質 (CF_I-γ、FBPase、RCA) のレドックス状態を解析した。その結果、調べたすべての Trx 標的タンパク質の還元のキネティクス、および、定常状態における還元率ともに、すべての株で WT と同程度であることがわかった (図 3-21)。また、暗所から明所への移行期における PSII に関する光合成パラメータ (Y(II)、Y(NPQ)) についても、WT と同じ挙動を示した (図 3-22)。以上の結果から、本実験で調べた範囲では、ACHT1、TrxL2.1、TrxL2.2 の過剰発現は、生育や Trx 標的タンパク質のレドックス状態、光合成パラメータに影響を及ぼさないことが明らかになった。

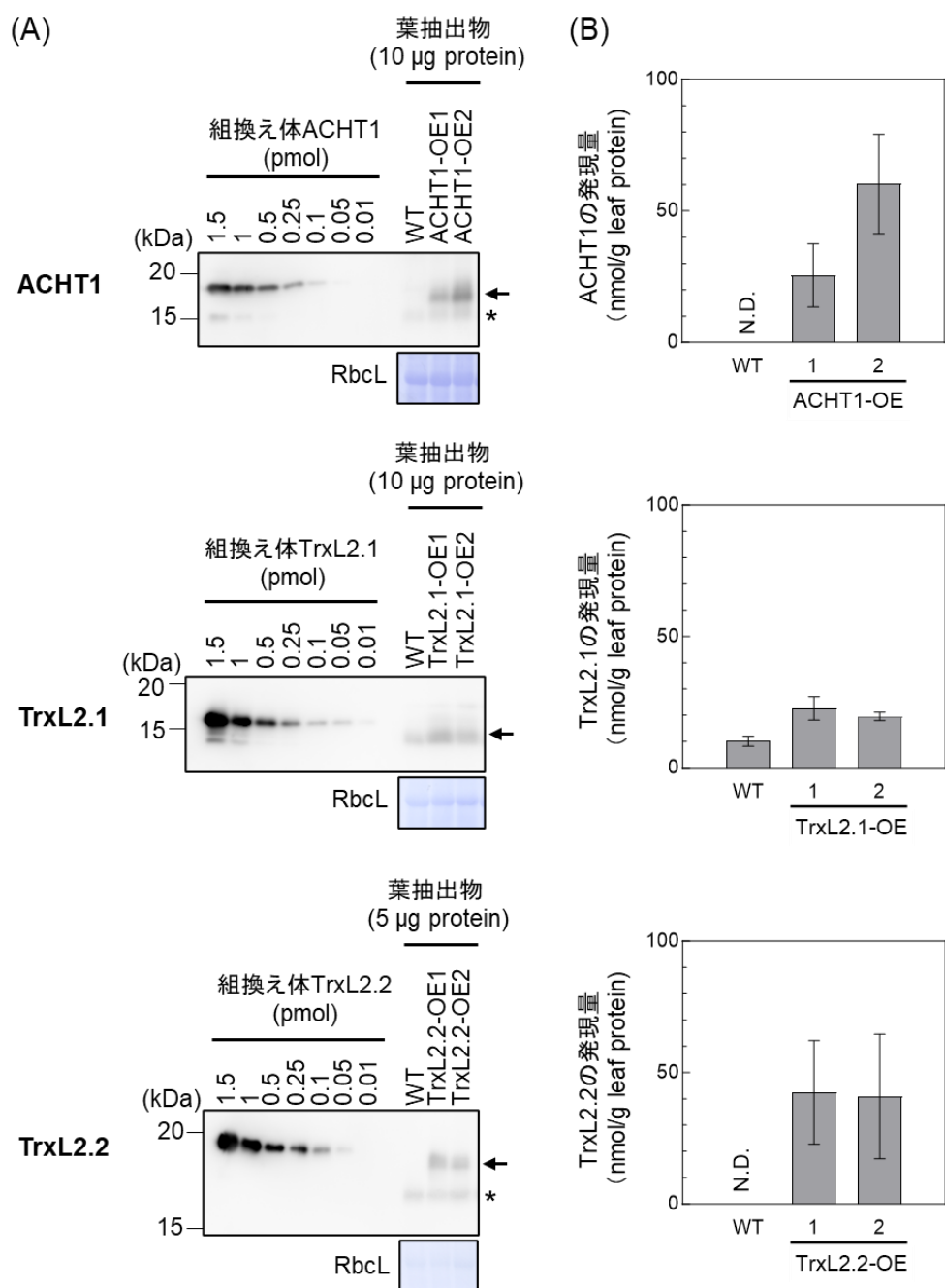


図 3-19 ACHT1、TrxL2.1、TrxL2.2 過剰発現株における Trx-like タンパク質の発現量

(A) イムノブロット解析による、ACHT1、TrxL2.1、TrxL2.2 の発現の確認。各タンパク質の発現量を見積もるため、組換え体 ACHT1、TrxL2.1、TrxL2.2 を用いた希釈系列を並べて示した。黒矢印は目的タンパク質のバンドを示す。ロード量のコントロールとして RbcL の CBB 染色像を示した。

(B) ACHT1、TrxL2.1、TrxL2.2 過剰発現株における各タンパク質の発現量の比較。各タンパク質の発現量は、(A) のバンド強度を定量し、組換え体タンパク質の希釈系列から作成した検量線を基に、算出した。値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3) を示す。黒矢印は目的タンパク質のバンド、アスタリスクは非特異的バンド、N.D. は不検出 (not detected) を示す。

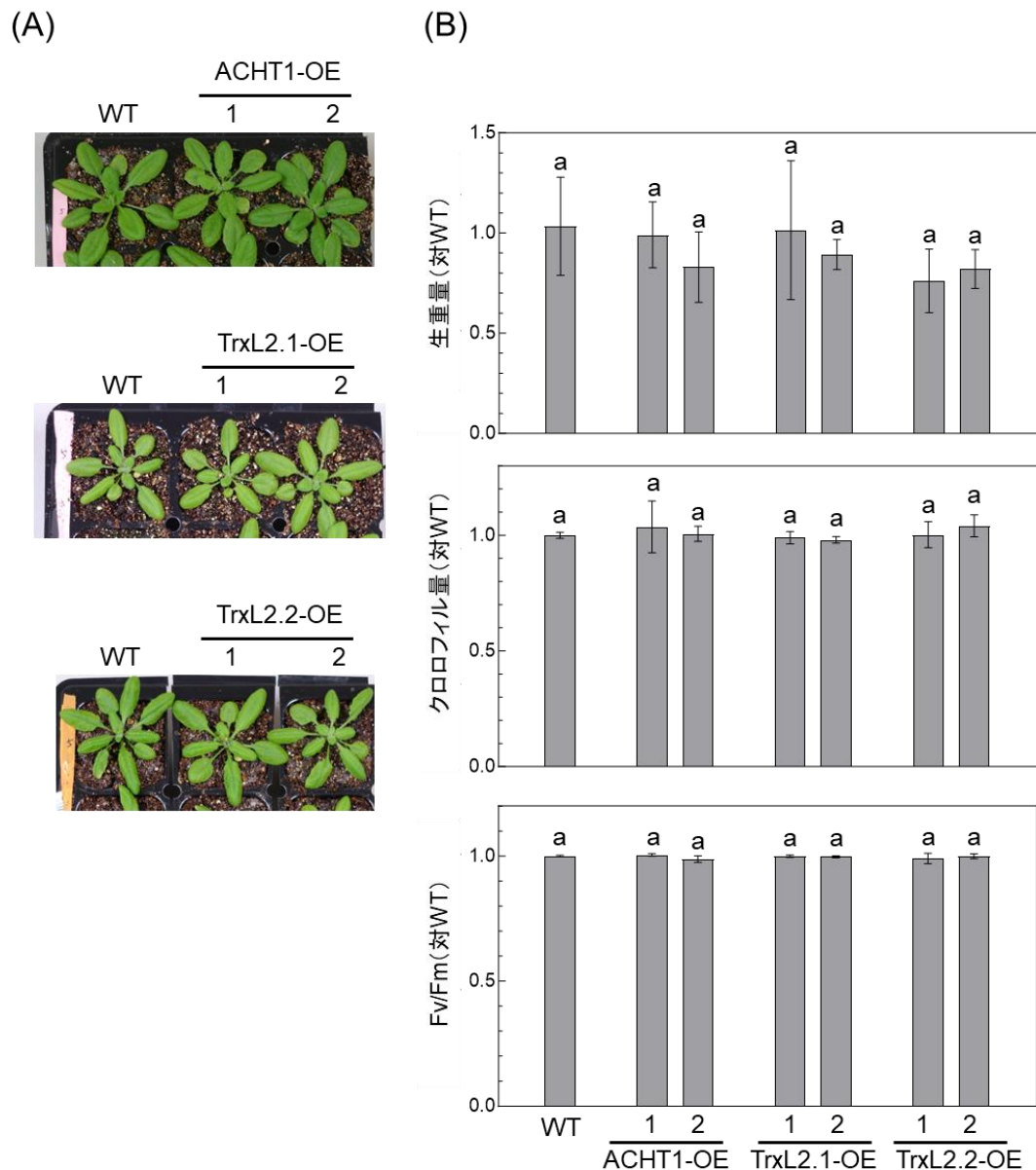


図 3-20 ACHT1、TrxL2.1、TrxL2.2 過剰発現株の生育

(A) 長日条件下で生育した ACHT1、TrxL2.1、TrxL2.2 過剰発現株の生育。(B) ACHT1、TrxL2.1、TrxL2.2 過剰発現株の生重量、クロロフィル量、Fv/Fm の比較。値はすべて、WT の値に対する相対値である。値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=3-11$) を示す。WT と各過剰発現株の間で有意差 (TurkeyHSD、 $p < 0.05$) はみられなかった。

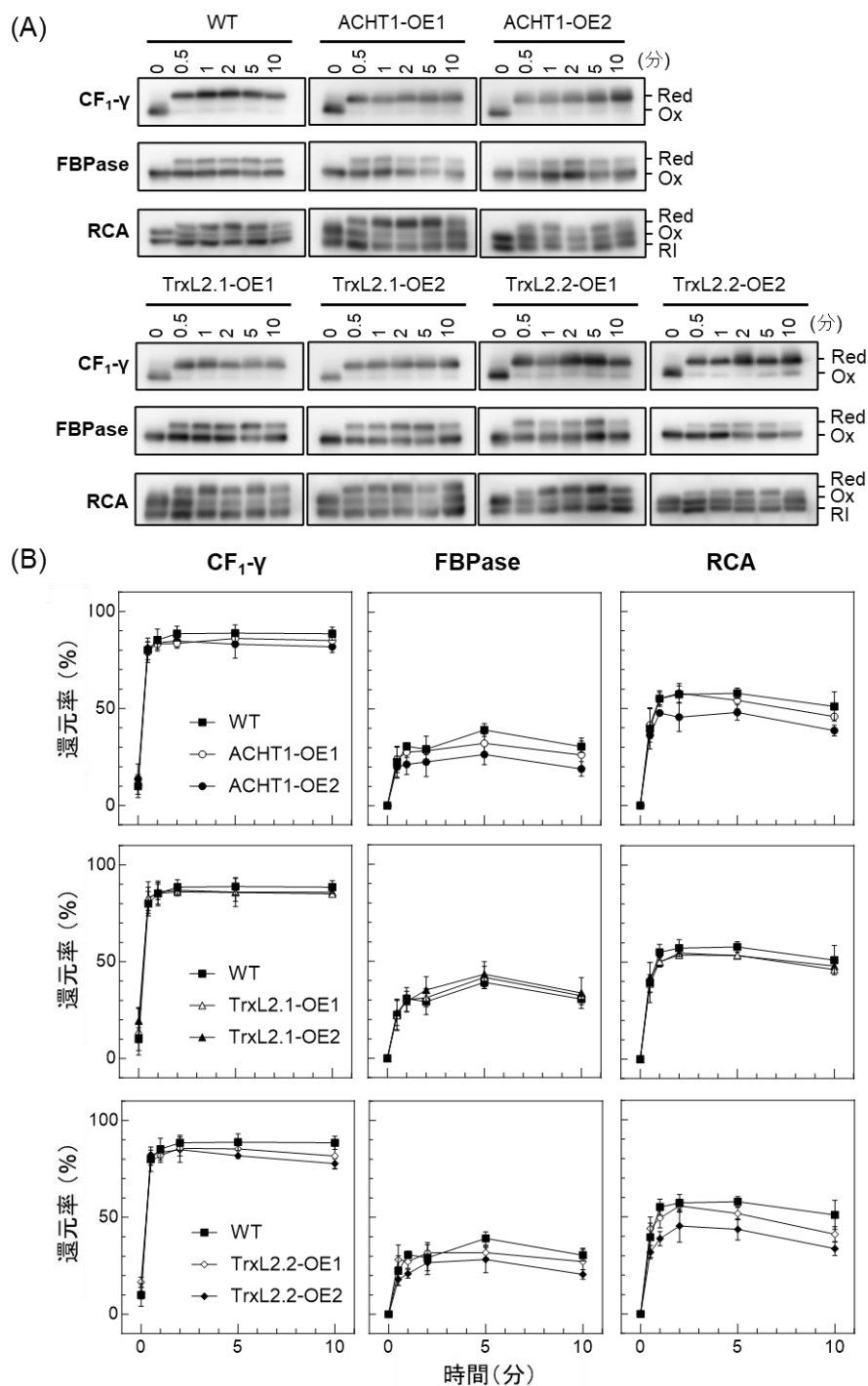


図 3-21 ACHT1、TrxL2.1、TrxL2.2 過剰発現株における Trx 標的タンパク質のレドックス状態
 (A) 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光照射(0-10 分間)による CF₁-γ、FBPase、RCA のレドックス状態を比較したイムノプロット像。(B) が示すバンド強度を定量し算出した CF₁-γ、FBPase、RCA の還元率。還元率は、酸化型と還元型のバンドに対する還元型のバンドの割合として算出した。値は、平均値 $\pm$ 標準偏差(n=3)を示す。Red は還元型、Ox は酸化型、RI はレドックス非感受性の RCA のスプライシングバリエントを示す。

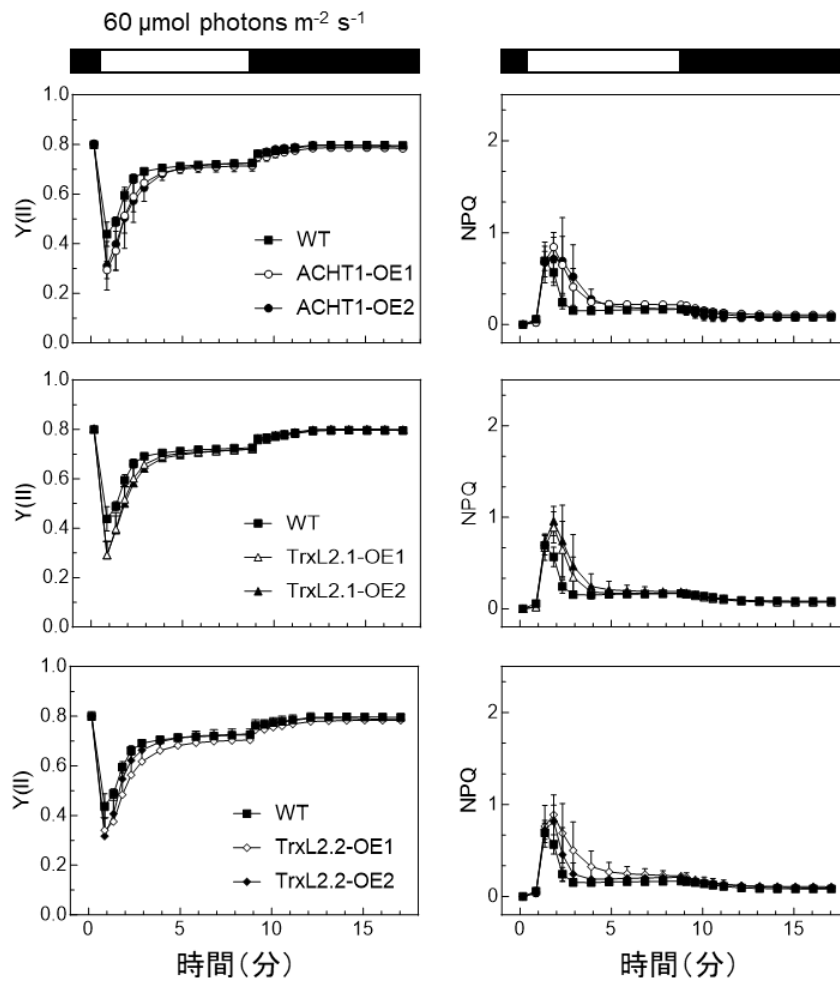


図 3-22 ACHT1、TrxL2.1、TrxL2.2 過剰発現株の PSII に関わる光合成パラメータ
明所から暗所への移行時における、ACHT1、TrxL2.1、TrxL2.2 過剰発現株の $Y(II)$ と NPQ のタイムコース。各グラフの上の白と黒のバーは、それぞれ光照射 ($60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) 時間と暗処理の時間を示す。値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=4-7$) を示す。

3-4-9. ACHT2 の過剰発現による高 NPQ の要因

ACHT2 の過剰発現は、明所での Trx 標的タンパク質の酸化を促進し、主にカルビン・ベンソン回路に関わる Trx 標的タンパク質の還元率の低下を引き起こした。カルビン・ベンソン回路の活性が低下すると、ATP や NADPH の消費が滞り、リニア電子伝達が阻害される (Joliot and Alric 2013)。このような条件下では、光合成色素に過剰に吸収された光エネルギーにより、PSII の光阻害が引き起こされると考えられている (Takahashi and Murata 2005)。この場合、過剰な光エネルギーから PSII を保護するために、PSI 周辺のサイクリック電子伝達が活性化される。サイクリック電子伝達は、PSII を経由せず、さらに、NADPH の生産を行わない電子伝達である。ただし、このサイクリック電子伝達では、ストロマ側からルーメン側へのプロトンの流入は起こる。そのため、サイクリック電子伝達が活性化された結果、ルーメンの酸性化が起き、NPQ (qE) が活性化される (Munekage et al. 2002; Szabó et al. 2005; Ruban et al. 2012)。このような現象の例として、カルビン・ベンソン回路の活性を、阻害剤の添加や FBPase の活性部位への変異導入により阻害すると、高い NPQ が誘導され、リニア電子伝達が抑制されることが知られている (Livingston et al. 2010; Joliot and Alric 2013)。同様に、ADP と NADP⁺の再生が制限される大気圧以下の CO₂ レベルでは、Y(II)が低下し NPQ が上昇する (Kramer et al. 2004)。さらに、Trx-f 欠損株では FBPase や RCA の還元率が低下し、CO₂ 固定速度の低下と NPQ の上昇が起きるという報告もある (Naranjo et al. 2016)。図 3-18 が示すように、ACHT2 過剰発現株における高 NPQ は、キサントフィルサイクルの高い脱エポキシ化状態を伴っており、qE に起因する NPQ が上昇していることが示唆された。また、このとき、Y(ND)の上昇が示す photosynthetic control の誘導は、ルーメン側が酸性化状態にあるという考えを支持し、Y(NA)の低下はサイクリック電子伝達の活性が上昇しているという考えを支持する (図 3-16)。すなわち、ACHT2 の過剰発現は、カルビン・ベンソン回路の活性低下を引き起こし、その結果として電子伝達に負のフィードバック制御がかかることで、Y(II)の低下や NPQ の上昇を引き起こすものと考えられる (図 3-23)。以上の結果から、ACHT2 はカルビン・ベンソン回路に関わる Trx 標的タンパク質のレドックス制御を介して、間接的に NPQ の形成に影響を与えると結論した。

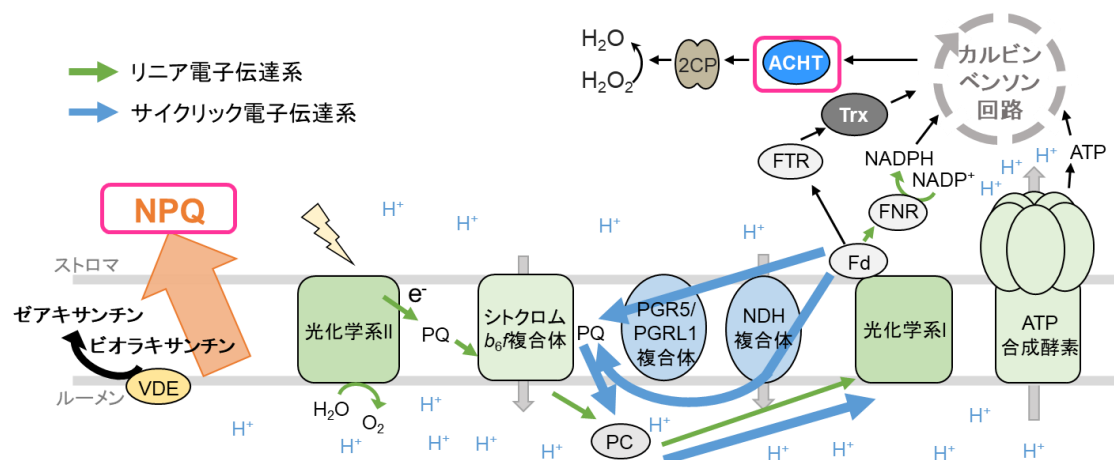


図 3-23 ACHT はカルビン・ベンソン回路の酵素のレドックス制御を介して、間接的に NPQ 制御に関わる。緑矢印はリニア電子伝達、青矢印はサイクリック電子伝達による電子の流れを示す。

灰色の矢印はプロトンの流れを示す。ACHT の過剰発現の影響でカルビン・ベンソン回路の活性が低下すると、電子伝達が阻害され、高い NPQ を伴う光合成の阻害が生じる。

3-4-10. ACHT2 過剰発現株における生育阻害の原因

ACHT2 過剰発現株における生育阻害の主な原因としては、カルビン・ベンソン回路の活性低下と、それに伴う CO₂ 固定量の低下が考えられる。その他の原因としては、過剰な NPQ の誘導 (図 3-14 右図) や PSII の光阻害 (図 3-14 左図) によって引き起こされる光合成活性の低下も挙げられる。これらの要因が複合的に生育阻害を引き起こした可能性も含め、ACHT2 過剰発現株における生育阻害の理由を説明するためには、今後さらなる研究が必要である。たとえば、Naranjo らは、PsbS を欠損した株 (*npq4*) と、*ntrc* 株との交配株を用いた解析を通して、*ntrc* 株が示す生育阻害が過剰な NPQ 誘導によって引き起こされている可能性を検証している (Naranjo et al. 2016)。したがって、*npq4* 株と ACHT2 過剰発現株の交配を行い、得られた株の解析を行うことで、ACHT2 過剰発現株の生育阻害と NPQ 誘導の関係性を特徴づけることが可能になると考えられる。

第 4 章

総括

4-1. 本章の概要

本章は、本研究で得られた結果を総括し、Trx-like タンパク質の機能解明、および、酸化側レドックス制御ネットワークの全貌を明らかにするための今後の研究課題を示している。

参考文献

- Akamba, L. M. and Anderson, L. E. (1981) Light modulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase by photosynthetic electron flow in pea chloroplasts. *Plant Physiol* 67: 197–200
- Allorent, G., Osorio, S., Ly Vu, J., Falconet, D., Jouhet, J., Kuntz, M., et al. (2015) Adjustments of embryonic photosynthetic activity modulate seed fitness in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 205: 707–719
- Andriotis, V. M. E. and Smith, A. M. (2019) The plastidial pentose phosphate pathway is essential for postglobular embryo development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 15267–15306
- Armenta-Medina, A., Gillmor, C. S., Gao, P., Mora-Macias, J., Kochian, L. V., Xiang, D. and Datla, R. (2021) Developmental and genomic architecture of plant embryogenesis: from model plant to crops. *Plant Commun* 2: 100136
- Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141: 391–396
- Arsova, B., Hoja, U., Wimmelbacher, M., Greiner, E., Üstün, Ş., Melzer, M., Petersen, K., Lein, W. and Börnke, F. (2010) Plastidial thioredoxin z 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: 1498–1515
- Belin, C., Bashandy, T., Cela, J., Delorme-Hinoux, V., Riondet, C. and Reichheld, J. P. (2015) A comprehensive study of thiol reduction gene expression under stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 38: 299–314
- Broin, M. and Rey, P. (2003) Potato plants lacking the CDSP32 plastidic thioredoxin exhibit overoxidation of the BAS1 2-cysteine peroxiredoxin and increased lipid peroxidation in thylakoids under photooxidative stress. *Plant Physiol* 132: 1335–1343
- Broin, M., Cuiné, S., Eymery, F. and Rey, P. (2002) The plastidic 2-cysteine peroxiredoxin is a target for a thioredoxin involved in the protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage. *Plant Cell* 14: 1417–1432
- Buchanan, B. B. (1980) Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annu Rev Plant Physiol* 31: 341–374
- Cairns, N. G., Pasternak, M., Wachter, A., Cobbett, C. S. and Meyer, A. J. (2006) Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiol* 141: 446–455
- Chibani, K., Tarrago, L., Gualberto, J. M., Wingsle, G., Rey, P., Jacquot, J. P. and Rouhier, N. (2012) Atypical thioredoxins in poplar: The glutathione-dependent thioredoxin-like 2.1 supports the activity of target enzymes possessing a single redox active cysteine. *Plant Physiol* 159: 592–605

- Chibani, K., Wingsle, G., Jacquot, J. P., Gelhaye, E. and Rouhier, N. (2009) Comparative genomic study of the thioredoxin family in photosynthetic organisms with emphasis on *Populus trichocarpa*. *Mol Plant* 2: 308–322
- Clough, S. J. and Bent, A. F. (1998) Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735–743
- Collect, J. F. and Messens, J. (2010) Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid Redox Signal* 13: 1205–1216
- Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Marchand, C., Hirasawa, M., Lancelin, J. M., Knaff, D. B. and Miginiac-Maslow, M. (2003) The *Arabidopsis* plastidial thioredoxins. New functions and new insights into specificity. *J Biol Chem* 278: 23747–23752
- Collin, V., Lamkemeyer, P., Miginiac-Maslow, M., Hirasawa, M., Knaff, D. B., Dietz, K. J. and Issakidis-Bourguet, E. (2004) Characterization of plastidial thioredoxins from *Arabidopsis* belonging to the new γ -type. *Plant Physiology* 136: 4088–4095
- DalCorso, G., Pesaresi, P., Masiero, S., Aseeva, E., Schunemann, D., Finazzi, G., et al. (2008) A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*. *Cell* 132: 273–285
- Dangoor, I., Peled-Zehavi, H., Levitan, A., Pasand, O. and Danon, A. (2009) A small family of chloroplast atypical thioredoxins. *Plant Physiol* 149: 1240–1250
- Dangoor, I., Peled-Zehavi, H., Wittenberg, G. and Danon, A. (2012) A chloroplast light-regulated oxidative sensor for moderate light intensity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 1894–1906
- Deslandes-Hérolde, G., Zanella, M., Solhaug, E., Fischer-Stettler, M., Sharma, M., Buerge, L., et al. (2023) The PRK/Rubisco shunt strongly influences *Arabidopsis* seed metabolism and oil accumulation, affecting more than carbon recycling. *Plant Cell* 35: 808–826
- Diaz, M. G., Hernandez-Verdeja, T., Kremnev, D., Crawford, T., Dubreuil, C. and Strand, Å. (2018) Redox regulation of PEP activity during seedling establishment in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun* 9: 50
- Dietz, K. J. (2011) Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxid Redox Signal* 15: 1129–1159
- Dietz, K. J., Jacob, S., Oelze, M. L., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S. M. N., et al. (2006) The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *J Exp Bot* 57: 1697–1709
- Eastmond, P., Kolacna, L. and Rawsthorne, S. (1996) Photosynthesis by developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J Exp Bot* 47: 1763–1769
- Eliyahu, E., Rog, I., Inbal, D. and Danon, A. (2015) ACHT4-driven oxidation of APS1 attenuates starch synthesis under low light intensity in *Arabidopsis* plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 12876–12881
- Feng, J. and Ma, L. (2017) A method for characterizing embryogenesis in *Arabidopsis*. *JoVE* 2017: 1–

- Foyer, C., Furbank, R., Harbinson, J. and Horton, P. (1990) The mechanisms contributing to photosynthetic control of electron transport by carbon assimilation in leaves. *Photosynth Res* 25: 83–100
- Gallardo-Martínez, A. M., Jiménez-López, J., Hernández, M. L., Pérez-Ruiz, J. M. and Cejudo, F. J. (2023) Plastid 2-Cys peroxiredoxins are essential for embryogenesis in Arabidopsis. *Redox Biol* 62: 102645
- Hertle, A. P., Blunder, T., Wunder, T., Pesaresi, P., Pribil, M., Armbruster, U. and Leister, D. (2013) PGRL1 Is the Elusive Ferredoxin-Plastoquinone Reductase in Photosynthetic Cyclic Electron Flow. *Molecular Cell* 49: 511–523
- Higuchi, R., Krummel, B. and Saiki, R. K. (1988) A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 16: 7351–67
- Hisabori, T., Sunamura, E. I., Kim, Y. and Konno, H. (2013) The chloroplast ATP synthase features the characteristic redox regulation machinery. *Antioxid Redox Signal* 19: 1846–1854
- Joliot, P. and Alric, J. (2013) Inhibition of CO₂ fixation by iodoacetamide stimulates cyclic electron flow and non-photochemical quenching upon far-red illumination. *Photosynth Res* 115: 55–63
- Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M. and Ohta, H. (2007) Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17216–17221
- Kang, F. and Rawsthorne, S. (1994) Starch and fatty acid synthesis in plastids from developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant J* 6: 795–805
- Kang, Z. H., and Wang, G. X. (2016) Redox regulation in the thylakoid lumen. *J Plant Physiol* 192: 28–37
- Konno, H., Nakane, T., Yoshida, M., Ueoka-Nakanishi, H., Hara, S. and Hisabori, T. (2012) Thiol modulation of the chloroplast ATP synthase is dependent on the energization of thylakoid membranes. *Plant Cell Physiol* 53: 626–634
- Kramer, D. M., Johnson, G., Kiirats, O. and Edwards, G. E. (2004) New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth Res* 79: 209–218
- Kremnev, D. and Strand, Å. (2014) Plastid encoded RNA polymerase activity and expression of photosynthesis genes required for embryo and seed development in Arabidopsis. *Front Plant Sci* 5: 1–12
- Le Moigne, T., Gurrieri, L., Crozet, P., Marchand, C. H., Zaffagnini, M., Sparla, F., Lemaire, S. D. and Henri, J. (2021) Crystal structure of chloroplastic thioredoxin z defines a type-specific target recognition. *Plant J* 107: 434–447
- Lemaire, S. D., Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V. and Issakidis-Bourguet, E. (2007) Thioredoxins in chloroplasts. *Curr Genet* 51: 343–365

- Li, X. P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A. R., Rosenquist, M., Jansson, S., et al. (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403: 391–395
- Li, Y., Beisson, F., Pollard, M. and Ohlrogge, J. (2006) Oil content of Arabidopsis seeds: The influence of seed anatomy, light and plant-to-plant variation. *Phytochemistry* 67: 904–915
- Liu, H., Wang, X., Ren, K., Li, K., Wei, M., Wang, W. and Sheng, X. (2017) Light deprivation-induced inhibition of chloroplast biogenesis does not arrest embryo morphogenesis but strongly reduces the accumulation of storage reserves during embryo maturation in arabidopsis. *Front Plant Sci* 8: 1287
- Livingston, A. K., Cruz, J. A., Kohzuma, K., Dhingra, A. and Kramer, D. M. (2010) An Arabidopsis mutant with high cyclic electron flow around photosystem I (hcef) involving the NADPH dehydrogenase complex. *Plant Cell* 22: 221–233
- Lorenz, C., Brandt, S., Borisjuk, L., Rolletschek, H., Heinzl, N., Tohge, T., et al. (2018) The role of persulfide metabolism during arabidopsis seed development under light and dark conditions. *Front Plant Sci* 9: 1381
- Malnoć, A., Schultink, A., Shahrabi, S., Rumeau, D., Havaux, M. and Niyogi, K. K. (2018) The plastid lipocalin LCNP is required for sustained photoprotective energy dissipation in arabidopsis. *Plant Cell* 30: 196–208
- Mansfield, S. G. and Briarty, L. G. (1991) Early embryogenesis in Arabidopsis thaliana. II. The developing embryo. *Can J Plant Sci* 69: 461–476
- Marty, L., Bausewein, D., Müller, C., Bangash, S. A. K., Moseler, A., Schwarzländer, M., et al. (2019) Arabidopsis glutathione reductase 2 is indispensable in plastids, while mitochondrial glutathione is safeguarded by additional reduction and transport systems. *New Phytol* 224: 1569–1584
- Meinke, D. W., Franzmann, L. H., Nickle, T. C. and Yeung, E. C. (1994) Leafy Cotyledon Mutants of Arabidopsis. *Plant Cell* 6: 1049–1064
- Melkus, G., Rolletschek, H., Fuchs, J., Radchuk, V., Grafahrend-Belau, E., Sreenivasulu, N. et al. (2011) Dynamic ¹³C/¹H NMR imaging uncovers sugar allocation in the living seed. *Plant Biotechnol J* 9: 1022–1037
- Meyer, Y., Belin, C., Delorme-Hinoux, V., Reichheld, J. P. and Riondet, C. (2012) Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: Molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxid Redox Signal* 17: 1124–1160
- Michalska, J., Zaubert, H., Buchanan, B. B., Cejudo, F. J. and Geigenberger, P. (2009) NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 9908–9913
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Morisse, S., Sparla, F., Pérez-Pérez, M. E., Francia, F., et al. (2013) Redox regulation of the Calvin-Benson cycle: Something old, something new. *Front Plant Sci* 4: 470

- Miki, J., Maeda, M., Mukohata, Y. and Futai, M. (1988) The γ -subunit of ATP synthase from spinach chloroplasts Primary structure deduced from the cloned cDNA sequence. *FEBS Lett* 232: 221–226
- Mills, J. D. and Mitchell, P. (1980) Modulation of coupling factor ATPase activity in intact chloroplasts. Reversal of thiol modulation in the dark. *Biochim Biophys Acta* 679: 75–83
- Motohashi, K. and Hisabori, T. (2010) CcdA is a thylakoid membrane protein required for the transfer of reducing equivalents from stroma to thylakoid lumen in the higher plant chloroplast. *Antioxid Redox Signal* 13: 1169–1176
- Motohashi, K., Kondoh, A., Stumpp, M. T. and Hisabori, T. (2001) Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11224–11229
- Muller, P., Li, X. P. and Niyogi, K. K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125: 1558–1566
- Müller-Moulé, P., Conklin, P. L. and Niyogi, K. K. (2002) Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity in vivo. *Plant Physiol* 128: 970–977
- Munekage, Y., Hojo, M., Rg Meurer, J., Endo, T., Tasaka, M. and Shikanai, T. (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in Arabidopsis. *Cell* 110: 361–371
- Nalin, C. M. and McCarty, R. (1984) Role of a disulfide bond in the gamma subunit in activation of the ATPase of chloroplast coupling factor 1. *J Biol Chem* 259: 7275–7280
- Naranjo, B., Migné, C., Krieger-Liszkay, A., Hornero-Méndez, D., Gallardo-Guerrero, L., Cejudo, F. J. and Lindahl, M. (2016) The chloroplast NADPH thioredoxin reductase C, NTRC, controls non-photochemical quenching of light energy and photosynthetic electron transport in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* 39: 804–822
- Naranjo, B., Penzler, J. F., Rühle, T. and Leister, D. (2021) NTRC Effects on Non-Photochemical Quenching Depends on PGR5. *Antioxidants* 10: 900
- Née, G., Zaffagnini, M., Trost, P. and Issakidis-Bourguet, E. (2009) Redox regulation of chloroplastic glucose-6-phosphate dehydrogenase: A new role for f-type thioredoxin. *FEBS lett* 583: 2827–2832
- Neuhaus, H. E. and Emes, M. J. (2000) Non-photosynthetic metabolism in plastids. *Annu Rev Plant Physiol* 51: 111–140
- Nilkens, M., Kress, E., Lambrev, P., Miloslavina, Y., Müller, M., Holzwarth, A. R., et al. (2010) Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in Arabidopsis. *Biochim Biophys Acta* 1797: 466–475
- Niyogi, K. K., Grossman, A. R. and Björkman, O. (1998) Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* 10: 1121–1134

- Ojeda, V., Pérez-Ruiz, J. M. and Cejudo, F. J. (2018) 2-Cys Peroxiredoxins Participate in the Oxidation of Chloroplast Enzymes in the Dark. *Mol Plant* 11: 1377–1388
- Okegawa, Y. and Motohashi, K. (2015) Chloroplastic thioredoxin m functions as a major regulator of Calvin cycle enzymes during photosynthesis in vivo. *Plant J* 84: 900–913
- Okegawa, Y. and Motohashi, K. (2020) M-type Thioredoxins Regulate the PGR5 / PGRL1-dependent Pathway by Forming a Disulfide-linked Complex with PGRL1. *Plant Cell* 32: 3866–3883
- Pérez-Ruiz, J. M., Guinea, M., Puerto-Galán, L. and Cejudo, F. J. (2014) NADPH Thioredoxin Reductase C Is Involved in Redox Regulation of the Mg-Chelatase I Subunit in Arabidopsis thaliana Chloroplasts. *Mol Plant* 7: 1252–1255
- Pérez-Ruiz, J. M., Spínola, M. C., Kirchsteiger, K., Moreno, J., Sahrawy, M. and Cejudo, F. J. (2006) Rice NTRC Is a High-Efficiency Redox System for Chloroplast Protection against Oxidative Damage. *Plant Cell* 18: 2356–2368
- Porra, R. J., Thompson, W. A. and Kriedemann, P. E. (1989) 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: 384–394
- Puthur, J. T., Shackira, A. M., Saradhi, P. P. and Bartels, D. (2013) Chloroembryos: A unique photosynthesis system. *J Plant Physiol* 170: 1131–1138
- Rochaix, J. D. (2014) Regulation and Dynamics of the Light-Harvesting System. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65: 287–309
- Ruban, A. (2016) Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: Mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant Physiol* 170: 1903–1916
- Ruban, A., Johnson, M. and Duffy, C. (2012) The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochim Biophys Acta* 1817: 167–81
- Ruuska, S. A., Schwender, J. and Ohlrogge, J. B. (2004) The capacity of green oilseeds to utilize photosynthesis to drive biosynthetic processes. *Plant Physiol* 136: 2700–2709
- Sasaki, Y., Kozaki, A. and Hatano, M. (1997) Link between light and fatty acid synthesis: Thioredoxin-linked reductive activation of plastidic acetyl-CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11096–11101
- Scheibe, R. and Anderson, L. E. (1981) Dark modulation of NADP-dependent malate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the chloroplast. *Biochim Biophys Acta* 636: 58–64
- Scheibe, R., Geissler, A. and Fickenscher, K. (1989) Chloroplast glucose-6-phosphate dehydrogenase: Km shift upon light modulation and reduction. *Arch Biochem Biophys* 274: 290–297
- Schürmann, P., Wolosiuk, R. A., Breazeale, V. D. and Buchanan, B. B. (1976) Two proteins function in the regulation of photosynthetic CO₂ assimilation in chloroplasts. *Nature* 263: 257–8

- Schwender, J., Goffman, F., Ohlrogge, J. B. and Shachar-Hill, Y. (2004a) Rubisco without the Calvin cycle improves the carbon efficiency of developing green seeds. *Nature* 432: 779–782
- Schwender, J., Ohlrogge, J. and Shachar-Hill, Y. (2004b) Understanding flux in plant metabolic networks. *Curr Opin Biotech* 7: 309–317
- Sekiguchi, T., Yoshida, K., Wakabayashi, K. I. and 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: 102541
- Serrato, A. J., Fernández-Trijueque, J., Barajas-López, J. D., Chueca, A. and Sahrawy, M. (2013) Plastid thioredoxins: A “one-for-all” redox-signaling system in plants. *Front Plant Sci* 4: 463
- Serrato, A. J., Pérez-Ruiz, J. M., Spínola, M. C. and Cejudo, F. J. (2004) A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 279: 43821–43827
- Stiehl, H. H. and Witt, H. T. (1969) Quantitative treatment of the function of plastoquinone in photosynthesis. *Z Naturforsch. B* 24: 1588–1598
- Shikanai, T. (2014) Central role of cyclic electron transport around photosystem I in the regulation of photosynthesis. *Curr Opin Biotech* 26: 25–30
- Szabó, I., Bergantino, E. and Giacometti, G. M. (2005) Light and oxygenic photosynthesis: Energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. *EMBO Rep* 6: 629–634
- Takahashi, S. and Murata, N. (2005) Interruption of the Calvin cycle inhibits the repair of Photosystem II from photodamage. *Biochim Biophys Acta* 1708: 352–361
- Tian, G. W., Mohanty, A., Chary, S. N., Li, S., Paap, B., Drakakaki, G., et al. (2004) High-throughput fluorescent tagging of full-length *Arabidopsis* gene products in planta. *Plant Physiol* 135: 25–38
- Tikhonov, A. N. (2013) pH-dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts. *Photosynth Res* 116: 511–534
- Toivola, J., Nikkanen, L., Dahlström, K. M., Salminen, T. A., Lepistö, A., Vignols, F. and Rintamäki, E. (2013) Overexpression of chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase in *Arabidopsis* enhances leaf growth and elucidates in vivo function of reductase and thioredoxin domains. *Front Plant Sci* 4: 389
- Vaseghi, M. J., Chibani, K., Telman, W., Liebthal, M. F., Gerken, M., Schnitzer, H., et al. (2018) The chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin functions as thioredoxin oxidase in redox regulation of chloroplast metabolism. *eLife* 7: e38194
- Watson, P. A. and Duffus, C. M. (1991) Light-Dependent CO₂ Retrieval in Immature Barley Caryopses. *J Exp Bot* 42: 1013–1019
- Wimmelbacher, M. and Bornke, F. (2014) Redox activity of thioredoxin z and fructokinase-like protein 1 is dispensable for autotrophic growth of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 65: 2405–2413

- Wolf, B. C., Isaacson, T., Tiwari, V., Dangoor, I., Mufkadi, S. and Danon, A. (2020) Redox regulation of PGRL1 at the onset of low light intensity. *Plant J* 103: 715–725
- Wolosiuk, R. A. and Buchanan, B. B. (1977) Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. *Nature* 266: 565–7
- Wolosiuk, R. A. and Buchanan, B. B. (1978a) Activation of Chloroplast NADP-linked Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase by the Ferredoxin/Thioredoxin System. *Plant Physiol* 61: 669–671
- Wolosiuk, R. A. and Buchanan, B. B. (1978b) Regulation of chloroplast phosphoribulokinase by the ferredoxin/thioredoxin system. *Arch Biochem Biophys* 189: 97–101
- Yamaryo, Y., Motohashi, K., Takamiya, K., Hisabori, T. and Ohta, H. (2006) In vitro reconstitution of monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) synthase regulation by thioredoxin. *FEBS Lett* 580: 4086–4090
- Yokochi, Y., Fukushi, Y., Wakabayashi, KI., Yoshida, K. and Hisabori, T. (2021b) Oxidative regulation of chloroplast enzymes by thioredoxin and thioredoxin-like proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118: e2114952118
- Yokochi, Y., Sugiura, K., Takemura, K., Yoshida, K., Hara, S., Wakabayashi, KI., Kitao, A. and Hisabori, T. (2019) Impact of key residues within chloroplast thioredoxin-f on recognition for reduction and oxidation of target proteins. *J Biol Chem* 294: 17437–17450
- Yokochi, Y., Yoshida, K., Hahn, F., Miyagi, A., Wakabayashi, KI., Kawai-Yamada, M., Weber, A. P. M. and Hisabori, T. (2021a) Redox regulation of NADP-malate dehydrogenase is vital for land plants under fluctuating light environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118: e2016903118
- Yoshida, K., Yokochi, Y., Tanaka, K. and 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: 102650
- Yoshida, K. and Hisabori, T. (2016) Two distinct redox cascades cooperatively regulate chloroplast functions and sustain plant viability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E3967–3976
- Yoshida, K. and Hisabori, T. (2017) Distinct electron transfer from ferredoxin-thioredoxin reductase to multiple thioredoxin isoforms in chloroplasts. *Biochem J* 474: 1347–1360
- Yoshida, K. and Hisabori, T. (2018) Determining the rate-limiting step for light-responsive redox regulation in chloroplasts. *Antioxidants* 7: 153
- Yoshida, K. and Hisabori, T. (2023) Current Insights into the Redox Regulation Network in Plant Chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 64: 704–715
- Yoshida, K., Hara, A., Sugiura, K., Fukaya, Y. and Hisabori, T. (2018) Thioredoxin-like2/2-Cys peroxiredoxin redox cascade supports oxidative thiol modulation in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: E8296–E8304

- Yoshida, K., Hara, S. and Hisabori, T. (2015) Thioredoxin selectivity for thiol-based redox regulation of target proteins in chloroplasts. *J Biol Chem* 290: 14278–88
- Yoshida, K., Matsuoka, Y., Hara, S., Konno, H. and Hisabori, T. (2014) Distinct redox behaviors of chloroplast thiol enzymes and their relationships with photosynthetic electron transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 55: 1415–1425
- Yoshida, K., Noguchi, K., Motohashi, K. and Hisabori, T. (2013) Systematic exploration of thioredoxin target proteins in plant mitochondria. *Plant Cell Physiol* 54: 875–892
- Yoshida, K., Uchikoshi, E. Hara, S. and Hisabori, T. (2019a) Thioredoxin-like2/2-Cys peroxiredoxin redox cascade acts as oxidative activator of glucose-6- phosphate dehydrogenase in chloroplasts. *Biochem J* 476: 1781–1790
- Yoshida, K., Yokochi, Y. and Hisabori, T. (2019b) New Light on Chloroplast Redox Regulation: Molecular Mechanism of Protein Thiol Oxidation. *Front Plant Sci* 10: 1534
- Zhang, N. and Portis, A. R. (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 U S A* 96: 9438–9443
- Zhu, X., Zhang, L., Kuang, C., Guo, Y., Huang, C., Deng, L. et al. (2018) Important photosynthetic contribution of silique wall to seed yield-related traits in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth Res* 137: 493–501
- 横地佑一 (2019) 葉緑体におけるレドックス制御機構の研究ーレドックス制御の分子機構とその生理的役割の解明ー 博士論文