

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	葉緑体におけるレドックス制御機構の研究 ―レドックス制御の分子機構とその生理的役割の解析―
Title(English)	
著者(和文)	横地佑一
Author(English)	Yuichi Yokochi
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11403号, 授与年月日:2020年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:久堀 徹,若林 憲一,上田 宏,田中 寛,増田 真二,園池 公毅
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11403号, Conferred date:2020/3/26, 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

2019 年度 博士論文

葉緑体におけるレドックス制御機構の研究
—レドックス制御の分子機構とその生理的役割の解析—

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

久堀・若林研究室

横地 佑一

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
AGPase	ADP-glucose pyrophosphorylase
AMS	4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonate
CF ₁ γ	chloroplast ATP synthase gamma subunit
CROST1	change in redox state of thioredoxin 1
Diamide	1,1'-Azobis(N,N-dimethylformamide)
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
E_m	midpoint redox potential
FBPase	fructose-1,6-bisphosphatase
Fd	ferredoxin
FNR	ferredoxin-NADP ⁺ reductase
FRET	Förster resonance energy transfer
FTR	ferredoxin-thioredoxin reductase
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
MD	molecular dynamics
MDH	malate dehydrogenase
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
Ni-NTA	Ni-nitrilotriacetic acid
NPQ	non-photochemical quenching
NTRC	NADPH-thioredoxin reductase C
PEP	plastid-encoded RNA polymerase
PET system	photosynthetic electron transport system
PFK	phosphofructokinase
PRK	phosphoribulokinase
Prx	peroxiredoxin
RCA	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase
ROS	reactive oxygen species
Rubisco	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
SBPase	sedoheptulose-1,7-bisphosphatase
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
Trx	thioredoxin
TrxL2	thioredoxin-like 2

TrxR	thioredoxin reductase
WT	wild type

目次

第1章 序論

1-1	Thioredoxin.....	2
1-2	葉緑体型 Trx の標的タンパク質.....	4
1-2-1	カルビン-ベンソン回路のタンパク質.....	4
1-2-2	ATP 合成酵素.....	8
1-2-3	NADP-malate dehydrogenase.....	9
1-2-4	ペルオキシレドキシシン.....	12
1-3	葉緑体型 Trx の標的選択性.....	13
1-4	Trx-like タンパク質.....	15
1-4-1	Trx-like 2.....	15
1-4-2	Atypical Cys His-rich Trx.....	16
1-4-3	NADPH-Trx reductase C.....	17
1-5	本研究の目的.....	19
1-5-1	葉緑体型 Trx の標的選択性を決定する残基.....	19
1-5-2	生体内における Trx 標的タンパク質の酸化因子.....	19
1-5-3	レドックス制御の生理的役割.....	20

第2章 Trx-*f*の標的選択性を決定する残基の解明

2-1	本章の概要.....	22
2-2	実験方法.....	23
2-2-1	In silico 解析.....	23
2-2-2	発現プラスミドの作製.....	25
2-2-3	組換えタンパク質の発現.....	27
2-2-4	組換えタンパク質の精製.....	28
2-2-4-1	Trx- <i>f</i> 1、Trx- <i>m</i> 2 (変異体) の精製.....	28
2-2-4-2	ACHT1、ACHT2a、AHCT4a の精製.....	28
2-2-4-3	FBPase、2-Cys PrxA、PrxQ の精製.....	29
2-2-4-4	CROST1 の精製.....	29
2-2-5	インシュリン還元活性測定.....	29
2-2-6	FBPase 酸化・還元活性測定.....	30
2-2-7	CROST1 酸化・還元活性測定.....	31
2-2-8	中間酸化還元電位の測定.....	31
2-2-9	H ₂ O ₂ 還元活性測定.....	32
2-3	結果と考察.....	33
2-3-1	各タイプの葉緑体型 Trx 特異的に保存されている残基.....	33

2-3-2	Trx- <i>f</i> 特異的な残基への変異導入が標的選択性に及ぼす影響.....	34
2-3-3	動的な複合体構造中での Trx- <i>f</i> 1 と FBPaase の相互作用.....	39
2-3-4	Trx- <i>m</i> への Trx- <i>f</i> の標的認識残基の導入.....	41
2-3-5	ACHT1 および ACHT2a による Trx- <i>f</i> 特異的な標的の還元.....	43
2-3-6	ACHT1 および ACHT2a による Trx- <i>f</i> 特異的な標的の酸化.....	43
2-4	結論.....	50
第 3 章 植物生体内における酸化因子と Trx-like タンパク質の役割		
3-1	本章の概要.....	52
第 4 章 NADP-MDH のレドックス制御の生理的役割の解明		
4-1	本章の概要.....	54
第 5 章 総括		
5-1	本章の概要.....	56
参考文献.....		57
発表論文.....		65
謝辞.....		66

第 1 章

序論

1-1. Thioredoxin

Thioredoxin (Trx) は、分子量約 12,000 のタンパク質であり、全ての生物に普遍的に存在する。Trx は、活性部位に高度に保存された配列 WCGPC を持つ他、Trx-fold と呼ばれる特徴的な構造を持つことが知られている (1-3)。Trx は、活性部位の 2 つの Cys 残基を介して、標的となる特定のタンパク質の Cys 残基とジチオール-ジスルフィド交換反応を行うことで、標的タンパク質が持つジスルフィド結合を還元する (図 1-1)。反応後、酸化型になった Trx は、Trx reductase によって還元されることで再び還元型に戻る。標的が持つ Cys 残基はスイッチのような役割を果たしており、主に、ジスルフィド結合を形成した酸化型では標的は不活性型、ジスルフィド結合が Trx によって還元されると標的は活性型になる。この活性制御機構は、酸化還元 (reduction/oxidation) の略語である“レドックス”を用いて、レドックス制御と呼ばれる (4)。

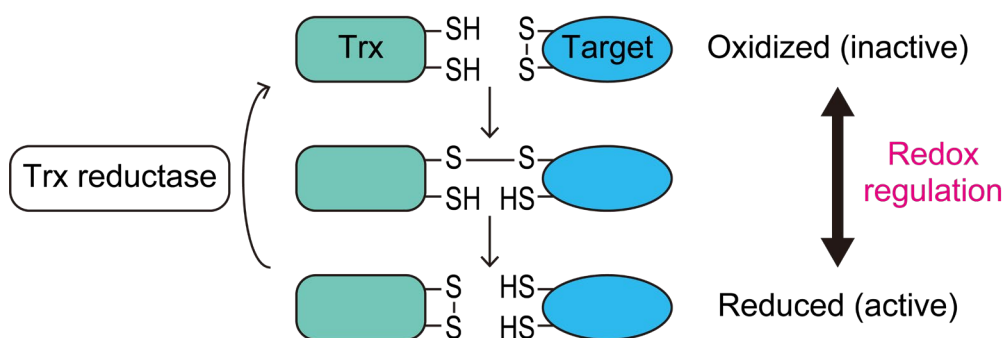


図 1-1. ジチオール-ジスルフィド交換反応とレドックス制御

Trx の活性部位と標的のレドックス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。ジスルフィド結合を持つ標的を酸化型 (Oxidized)、チオール基を持つ標的を還元型 (Reduced) と呼ぶ。Trx が持つ 2 つのチオール基と標的が持つジスルフィド結合は、ジスルフィド中間体 (図中段) を経て交換される。

植物のモデル生物である *Arabidopsis thaliana* は、計 21 種類の Trx アイソフォームを持ち、それぞれのアイソフォームは葉緑体型の *f*, *m*, *x*, *y*, *z*、ミトコンドリア型の *o*、細胞質型の *h* のいずれかのサブタイプに分類される (5)。葉緑体型 Trx は、葉緑体内に存在する Trx reductase である、ferredoxin-Trx reductase (FTR) によって還元される (6)。葉緑体では、光によって光合成電子伝達系が駆動されると ferredoxin (Fd) が電子を受け取って還元型となり、その還元力は FTR、Trx を通して標的まで伝達される (FTR/Trx システム) (図 1-2)。このシステムによって、葉緑体型 Trx は光環境と連動して光合成関連酵素の活性を制御しているため (7-9)、光合成の制御に重要な役割を果たしていると考えられている。

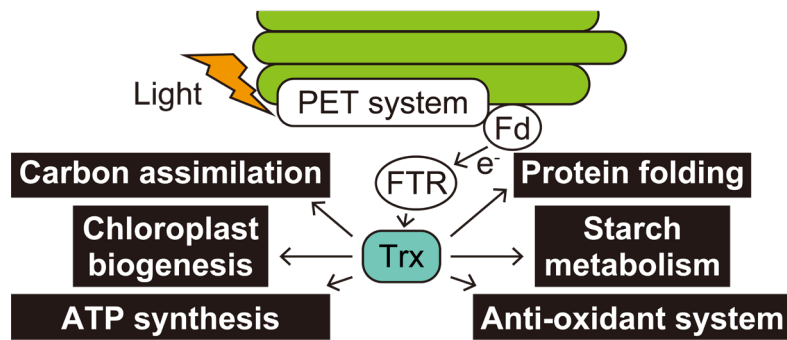


図 1-2. FTR/Trx システム

光によって駆動された光合成電子伝達系 (photosynthetic electron transport (PET) system) から Fd が電子を受け取り、FTR を介して Trx に伝達される。Trx は、受け取った還元力を、炭素同化を行うカルビン-ベンソン回路の酵素や ATP 合成酵素など、多数の葉緑体タンパク質に伝達する (8)。

1-2. 葉緑体型 Trx の標的タンパク質

Trx は多数のタンパク質を標的としてはたらくということが、標的タンパク質の網羅的探索から明らかにされている (10-13)。このことから、Trx は、環境シグナルを多数のタンパク質へ伝達するためのハブのような役割を果たしていると考えられている (14)。葉緑体型 Trx の標的タンパク質のうち、特によく調べられているものを以下に示す。

1-2-1. カルビン-ベンソン回路のタンパク質

カルビン-ベンソン回路は、葉緑体内に存在する炭素同化のための回路である。この回路は、図 1-3 に示す 11 種類の酵素によって触媒されているが、このうち fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)、sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase)、phosphoribulokinase (PRK)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の 4 つの酵素は、Trx によって直接制御されることが知られている (7, 15)。また、PRK と GAPDH は、CP12 と呼ばれるタンパク質と三者複合体を形成することで不活性化されることが知られている (15, 16)。 *A. thaliana* の CP12 は、約 8 kDa の小さなタンパク質で、ジスルフィド結合を形成可能な Cys 残基のペアを 2 つ持っている。CP12 自体は活性を持たないが、2 つの Cys 残基のペアは Trx の標的であり、酸化還元応答を示す。PRK や GAPDH との複合体形成は、CP12 の酸化還元状態によって制御されており、CP12 が酸化型の時は複合体形成によって PRK と GAPDH は不活性化され、Trx によって還元されると複合体は解離する。さらに、炭素同化反応を触媒する ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) は Rubisco activase (RCA) と呼ばれるタンパク質によって活性化されているが、RCA も Trx によって還元されることで活性化されることがわかっている (15, 17)。このように、カルビン-ベンソン回路の多くの酵素が直接もしくは間接的に Trx による活性化を受けるため、Trx が還元される明条件下でのみ葉緑体内で炭素同化反応が進む。

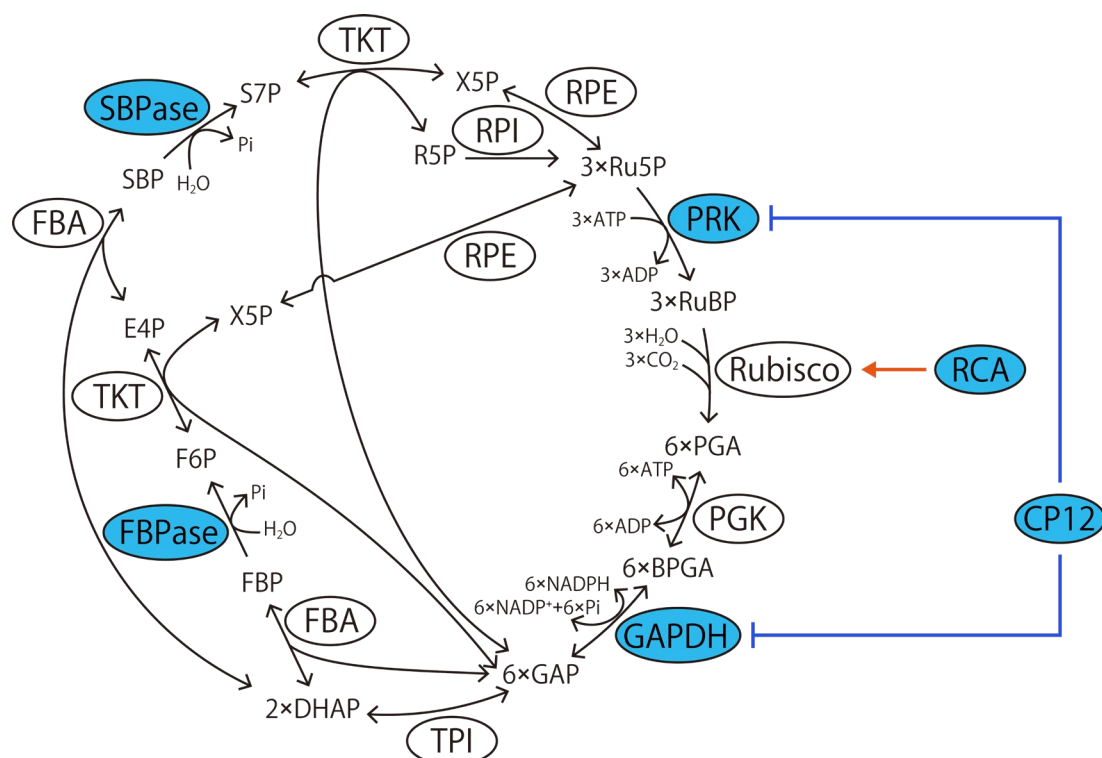


図 1-3. カルビン-ベンソン回路のレドックス制御

図中の楕円で囲まれているものは、カルビン-ベンソン回路ではたらく酵素、もしくはそれらの活性を制御するタンパク質である。そのうち、水色で示されているものが、Trx の標的タンパク質である。CP12 は PRK と GAPDH の活性を抑制し（青線）、RCA は Rubisco を活性化する（橙矢印）。Michelet et al. (2013) (15) を参考にしてこの図を作成した。略語：Rubisco, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; RCA, Rubisco activase; PGK, phosphoglycerate kinase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; TPI, triose phosphate isomerase; FBA, fructose-1,6-bisphosphate aldolase; FBPase, fructose-1,6-bisphosphatase; TKT, transketolase; SBPase, sedoheptulose-1,7-bisphosphatase; RPE, ribulose-5-phosphate 3-epimerase; RPI, ribose-5-phosphate isomerase; PRK, phosphoribulokinase; RuBP, ribulose-1,5-bisphosphate; PGA, 3-phosphoglycerate; BPGA, 1,3-bisphosphoglycerate; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; FBP, fructose-1,6-bisphosphate; F6P, fructose-6-phosphate; X5P, xylulose-5-phosphate; E4P, erythrose-4-phosphate; SBP, sedoheptulose-1,7-bisphosphate; S7P, sedoheptulose-7-phosphate; R5P, ribose-5-phosphate; Ru5P, ribulose-5-phosphate.

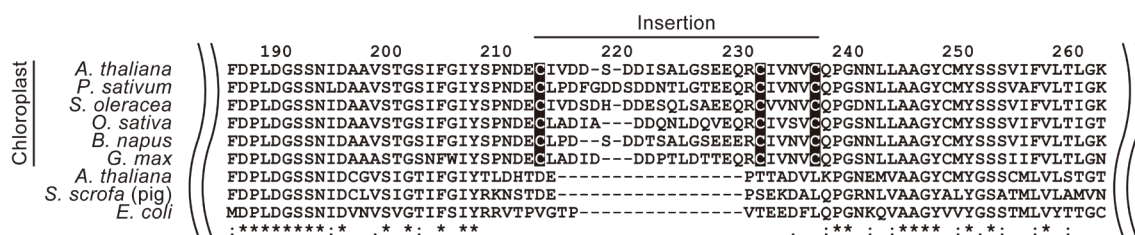


図 1-4. FBPase のレドックス制御部位周辺のアミノ酸配列の比較

葉緑体型の FBPase (*A. thaliana* (P25851)、*Pisum sativum* (P46275)、*Spinacia oleracea* (P22418)、*Oryza sativa* (O64422)、*Brassica napus* (Q07204)、*Glycine max* (Q42796)) と、非葉緑体型の FBPase (*A. thaliana* (Q9MA79)、*Sus scrofa* (P00636)、*Escherichia coli* (P0A993)) (カッコ内は UniProtKB におけるアクセッション番号) のアミノ酸配列を比較した。配列の上を示した数字は、*A. thaliana* の葉緑体型 FBPase の、翻訳開始点の Met から数えた残基番号。配列の下に示した記号は、Clustal Omega 解析 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) におけるコンセンサス記号 (“*”, fully conserved; “:”, strongly similar; “.”, weakly similar) を示している。黒塗りの残基は、レドックス応答を示す Cys 残基を示している。

図 1-4 に、FBPase のレドックススイッチとしてはたらく Cys 残基周辺のアミノ酸配列を示す。FBPase は、カルビン-ベンソン回路の他に糖新生でもはたらくため、植物では葉緑体以外に細胞質にも存在し、また植物以外の生物にも存在している (18)。糖新生は、大部分の反応を解糖系と共有しているが (図 1-5)、FBPase が触媒する反応は不可逆であるため、その逆反応を触媒する酵素 phosphofructokinase (PFK) が存在する。図 1-5 に示すように、PFK による反応は ATP を消費するが、FBPase による反応は ATP を生産せず無機リン酸 (Pi) を産出するのみである。従って、PFK と FBPase が同時にはたらくと、ATP を ADP と Pi に分解するだけの無益回路が形成されてしまう。これを防ぐため、葉緑体以外に存在する FBPase や PFK の活性は、AMP やクエン酸などの代謝物質によるフィードバック制御を受けており、同時にはたらかないように制御されている (19, 20)。一方、葉緑体型の FBPase は AMP による活性制御を受けないことが知られている (20)。そのため、葉緑体型 FBPase はレドックススイッチとしてはたらく Cys ペアを含む挿入配列を持っており (図 1-4)、Trx によって活性が制御されている。

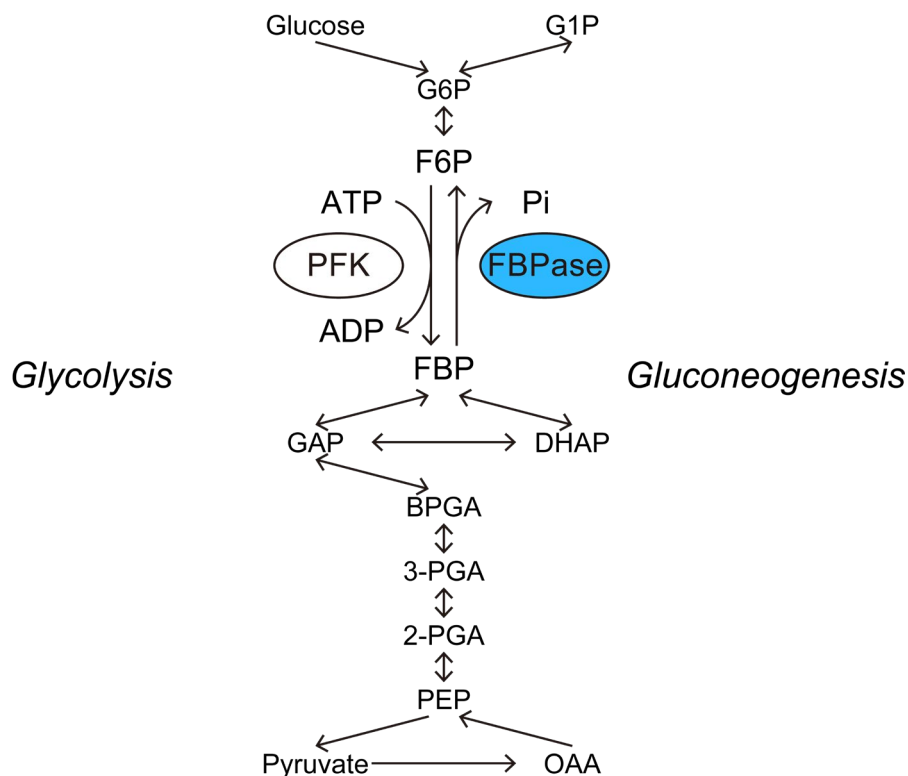


図 1-5. 解糖系と糖新生における FBPase と PFK による無益回路

解糖系 (Glycolysis) と糖新生 (Gluconeogenesis) の代謝経路を示した。PFK と FBPase によって触媒される反応以外は、酵素、補酵素を省略した。略語 : G1P, glucose-1-phosphate; G6P, glucose-6-phosphate; F6P, fructose-6-phosphate; FBP, fructose-1,6-bisphosphate; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; BPGA, 1,3-bisphosphoglycerate; 3-PGA, 3-phosphoglycerate; 2-PGA, 2-phosphoglycerate; PEP, phosphoenolpyruvate; OAA, oxaloacetate.

我々は、これまでに、CP12 の酸化還元状態を蛍光でモニターするためのセンサータンパク質を開発し、“change in redox state of thioredoxin 1 (CROST1)” と名付けた (21)。CROST1 は、*A. thaliana* 由来の CP12 のレドックス制御部位周辺の領域を用いており、その両端にシアン色蛍光タンパク質 (mTurquoise ΔC11) と黄色蛍光タンパク質 (Cp173 Venus) が融合されている (図 1-6A)。これらの蛍光タンパク質間の Förster resonance energy transfer (FRET) 強度を測定することで、CP12 の酸化還元状態のモニターが可能になる。具体的には、CP12 が酸化型の時は、CP12 が折りたたまれた形になるため、2つの蛍光タンパク質が近づき FRET 強度が高くなる (図 1-6)。一方、CP12 が Trx によって還元されると、2つの蛍光タンパク質間の距離が大きくなり、FRET 強度が小さくなる。FRET 強度は、430 nm の光で励起した時の 480 nm と 530 nm の蛍光強度の比によって求めることができ、その値から CP12 の酸化還元状態を推定することができる。

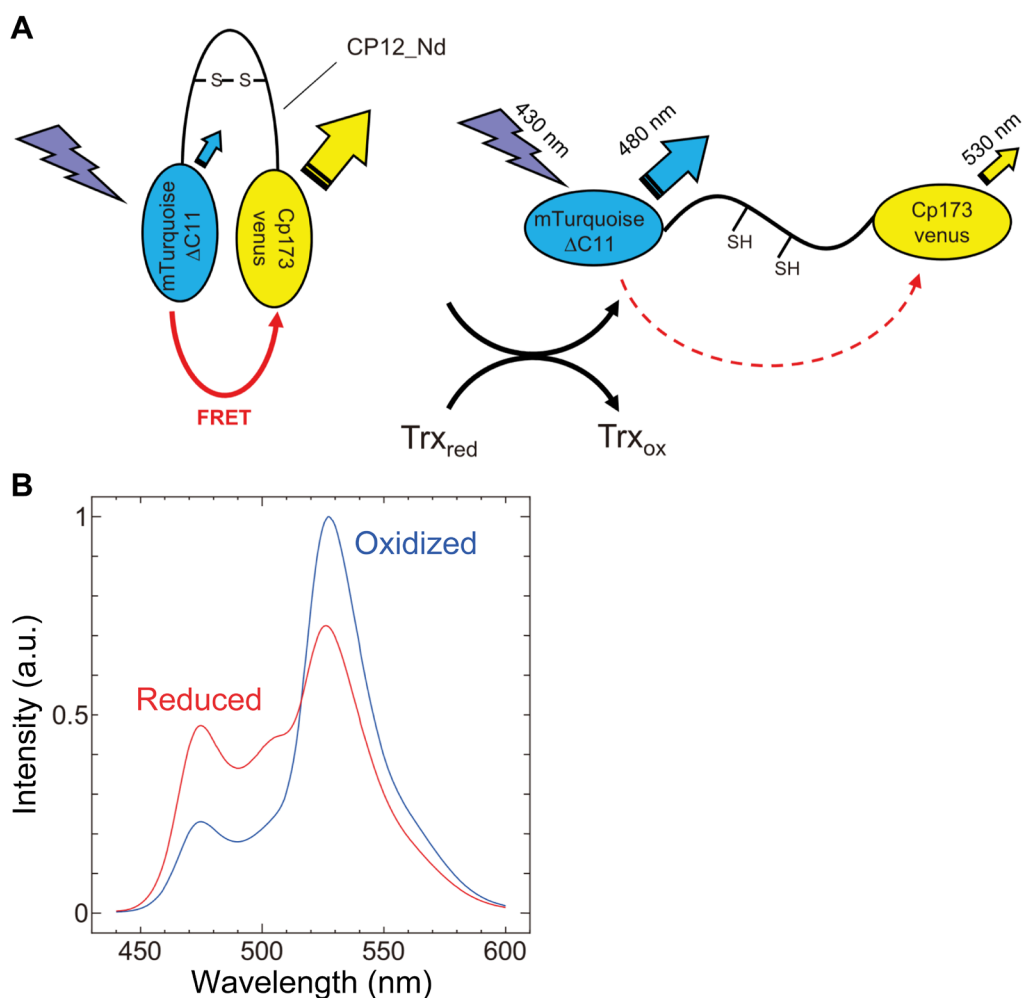


図 1-6. CROST1 による CP12 のレドックス状態のモニタリング

(A) CROST1 の構造の模式図。 *A. thaliana* の CP12 は、N 末端側と C 末端側にそれぞれレドックススイッチとしてはたらく Cys ペアをひとつずつ持っており、CROST1 では N 末端側の Cys ペア周辺の領域 (CP12_Nd) が用いられている。CP12_Nd の N 末端側にはシアン色蛍光タンパク質である mTurquoise Δ C11 が、C 末端側には黄色蛍光タンパク質である Cp173 venus が融合されている。CP12_Nd の Cys が酸化型の時は、mTurquoise Δ C11 から Cp173 venus への FRET が起こりやすいが、Cys が Trx によって還元されると、2 つの蛍光タンパク質の距離が離れ、FRET が起こりにくくなる。(B) CROST1 の蛍光スペクトル (励起波長: 430 nm)。酸化型 (Oxidized) の CROST1 は、FRET が起こりやすいため、530 nm の蛍光強度が 480 nm の蛍光強度に比べて 4–5 倍高くなる。一方、還元型 (Reduced) の CROST1 は、酸化型に比べて FRET が起こりにくいため、蛍光強度比は約 1.6 まで落ちる。CROST1 一分子は、酸化型と還元型の 2 状態のみをとるが、その混合物の蛍光強度比は酸化型と還元型の間の値をとる。この値から、酸化型と還元型の CROST1 の比率を算出することができる。この図は、Sugiura et al. (2019) (21) から改変して引用した。

1-2-2. ATP 合成酵素

ATP 合成酵素は、ミトコンドリアの内膜や葉緑体のチラコイド膜に存在する膜タンパク質で、膜内外のプロトン濃度勾配を利用して ADP と Pi から ATP を合成する。また、

ATP 合成酵素は、逆反応である ATP の加水分解を触媒することもできる。葉緑体型の ATP 合成酵素は、明条件下において光合成電子伝達系によって形成されたプロトン濃度勾配を利用して、ATP を合成する。しかし、暗条件下ではプロトン濃度勾配が小さくなるため、逆反応によって合成した ATP を分解してしまう恐れがある。これを防ぎ、効率よく ATP を合成するために、葉緑体型 ATP 合成酵素は複数の活性制御機構を有している (22)。そのうちのひとつが、Trx によるレドックス制御である。葉緑体型の ATP 合成酵素は、複数のタンパク質から成る複合体であり、 γ サブユニット ($CF_1\gamma$) にレドックススイッチとしてはたらく Cys 残基のペアを持っている (図 1-7)。この Cys 残基も、FBPase と同様に葉緑体型の $CF_1\gamma$ にのみ保存されており、暗所ではジスルフィド結合を形成することで ATP 合成酵素を不活性化する (23)。このジスルフィド結合が、Trx によって還元されると、ATP 合成酵素が再び活性化される (24)。

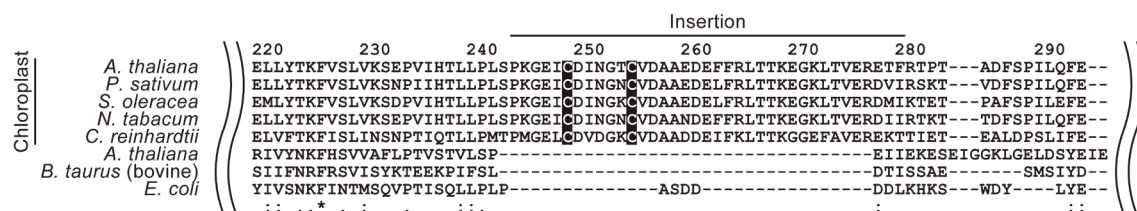


図 1-7. ATP 合成酵素 γ サブユニットのレドックス制御部位周辺のアミノ酸配列

葉緑体型の ATP 合成酵素 γ サブユニット (*A. thaliana* (Q01908)、*Pisum sativum* (P28552)、*Spinacia oleracea* (P05435)、*Nicotiana tabacum* (P29790)、*Chlamydomonas reinhardtii* (P12113)) と、非葉緑体型の ATP 合成酵素 γ サブユニット (*A. thaliana* (Q96250)、*Bos taurus* (P05631)、*Escherichia coli* (P0ABA6)) (カッコ内は UniProtKB におけるアクセッション番号) のアミノ酸配列を比較した。配列の上に示した数字は、*A. thaliana* の葉緑体型 ATP 合成酵素 γ サブユニットの、翻訳開始点の Met から数えた残基番号。配列の下に示した記号は、MUSCLE 解析 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) におけるコンセンサス記号 (“*”, fully conserved; “:”, strongly similar; “.”, weakly similar) を示している。黒塗りの残基は、レドックス応答を示す Cys 残基を示している。

1-2-3. NADP-malate dehydrogenase

葉緑体型の NADP-malate dehydrogenase (MDH) は、リンゴ酸バルブではたらく酵素であり (図 1-8)、Trx によって還元されることで活性化する (25, 26)。葉緑体型の NADP-MDH は、光合成によって生産される還元力である NADPH を補酵素とし、オキサロ酢酸からリンゴ酸を生成することで、NADPH の還元力をリンゴ酸の形で蓄積する。このリンゴ酸がリンゴ酸/オキサロ酢酸トランスロケーターによって葉緑体外に輸送され、葉緑体外の MDH によって NADH の生産に使われることで、結果的に葉緑体内の NADPH の還元力が葉緑体外に輸送される。もし、葉緑体型の NADP-MDH が常に活性を持つと、リンゴ酸バルブによって NADPH の還元力が葉緑体外に輸送され続けてしまい、光合成による NADPH 生産が起こらない暗所では葉緑体内の還元力が枯渇してしま

う可能性がある。これを防ぐために、MDH はレドックス制御によって明条件下でのみ活性化されると考えられている。(26)

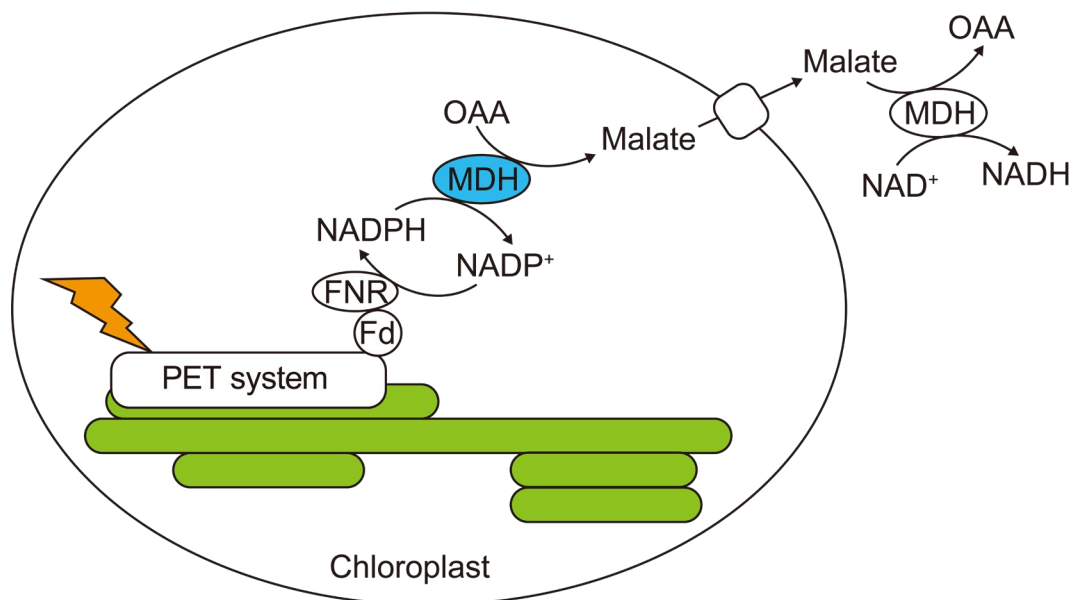


図 1-8. リンゴ酸バルブ

光によって駆動された光合成電子伝達系 (photosynthetic electron transport (PET) system) から Fd が電子を受け取ると、Fd-NADP⁺ reductase (FNR) によって NADPH が生産される。葉緑体型の MDH は、NADPH の還元力を使ってオキサロ酢酸 (OAA) からリンゴ酸 (malate) を生成する。葉緑体内のリンゴ酸は、葉緑体外に輸送されて NADH の生産に使われるため、リンゴ酸バルブは葉緑体内の還元力を葉緑体外に輸送する機構であると言える。

葉緑体型の NADP-MDH とその他の MDH のアミノ酸配列を比較すると、葉緑体型の NADP-MDH は N 末端と C 末端に伸長配列を持つことがわかる (図 1-9)。N 末端と C 末端の伸長配列に、レドックススイッチとしてはたらく Cys 残基のペアをそれぞれひとつずつ持っており、これら 2 つのスイッチによって MDH の活性は厳密に制御されている (27)。葉緑体型の NADP-MDH のレドックス制御のしくみは、生化学的解析や構造解析によってよく調べられている (25, 28–31)。葉緑体型の NADP-MDH はホモダイマーとして存在するが、N 末端側の伸長配列はこのダイマーの境界面に存在し、スイッチのレドックス状態によってダイマーの結合強度が変化することで活性制御を行っている。一方、C 末端側の伸長配列は、スイッチが酸化されると活性部位に入りこみ、基質の結合を阻害することで MDH を不活性化している (図 1-10)。2 つのスイッチがどちらも酸化状態の時、MDH の活性はほぼゼロになる (28)。

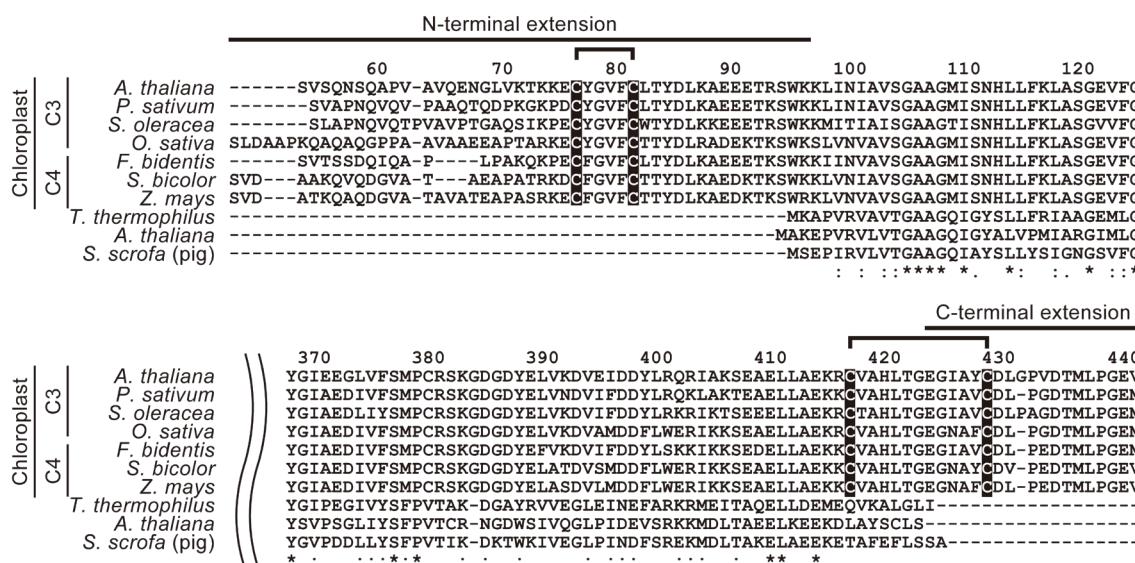


図 1-9. 葉緑体型 NADP-MDH のレドックス制御部位周辺のアミノ酸配列

葉緑体型の NADP-MDH (*A. thaliana* (Q8H1E2)、*Pisum sativum* (P21528)、*Spinacia oleracea* (P52426)、*Oryza sativa* (Q6YYW3)、*Flaveria bidentis* (P46489)、*Sorghum bicolor* (P17606)、*Zea mays* (P15719)) と、非葉緑体型の MDH (*Thermus thermophilus* (P10584)、*A. thaliana* (P93819)、*Sus scrofa* (P11708)) (カッコ内は UniProtKB におけるアクセッション番号) のアミノ酸配列を比較した。配列の上を示した数字は、*A. thaliana* の葉緑体型 NADP-MDH の、翻訳開始点の Met から数えた残基番号。配列の下に示した記号は、Clustal Omega 解析 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) におけるコンセンサス記号 (“*”, fully conserved; “:”, strongly similar; “.”, weakly similar) を示している。葉緑体型の NADP-MDH は、N 末端と C 末端にそれぞれ伸長配列 (extension) を持っている。また、N 末端と C 末端のそれぞれの領域に、レドックススイッチとしてはたらく Cys 残基 (黒塗りの残基) のペアを持っている。

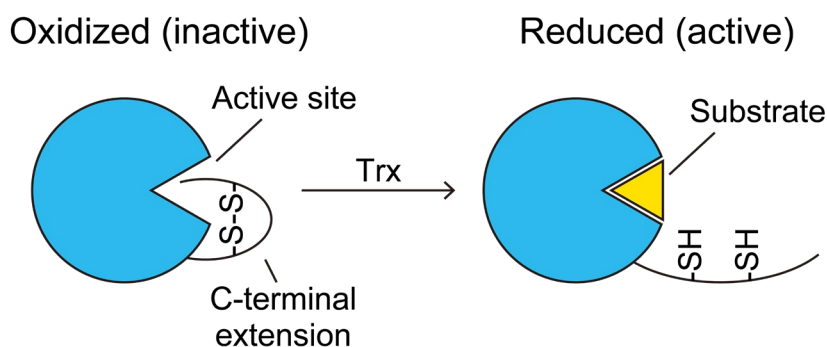


図 1-10. MDH の C 末端のレドックススイッチによる活性制御

C 末端の Cys ペアが酸化型の場合は、C 末端の伸長配列が活性部位に入りこみ、基質の結合を阻害する。C 末端の Cys ペアが Trx によって還元されると、C 末端の伸長配列が構造変化を起こし、基質が結合できるようになって MDH は活性型になる。

1-2-4. ペルオキシレドキシシン

ペルオキシレドキシシン (Prx) は、チオレドキシシン依存性のペルオキシダーゼであり、活性部位に2つの Cys 残基を持っている。Prx は細胞内の様々なコンパートメントに存在し、活性部位の Cys 残基を用いて、過酸化水素などの活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) を還元し消去する (32)。Prx は、上述の Trx 標的タンパク質とは異なり、Trx から受け取った還元力を直接 ROS の消去に利用する (図 1-11)。本研究では、葉緑体に存在する Prx のうち、ホモダイマーもしくはオリゴマーとしてはたらき分子間でジスルフィド結合を形成する 2-Cys Prx (図 1-11A) と、モノマーではたらき分子内でジスルフィド結合を形成する PrxQ (図 1-11B) を取り扱った。

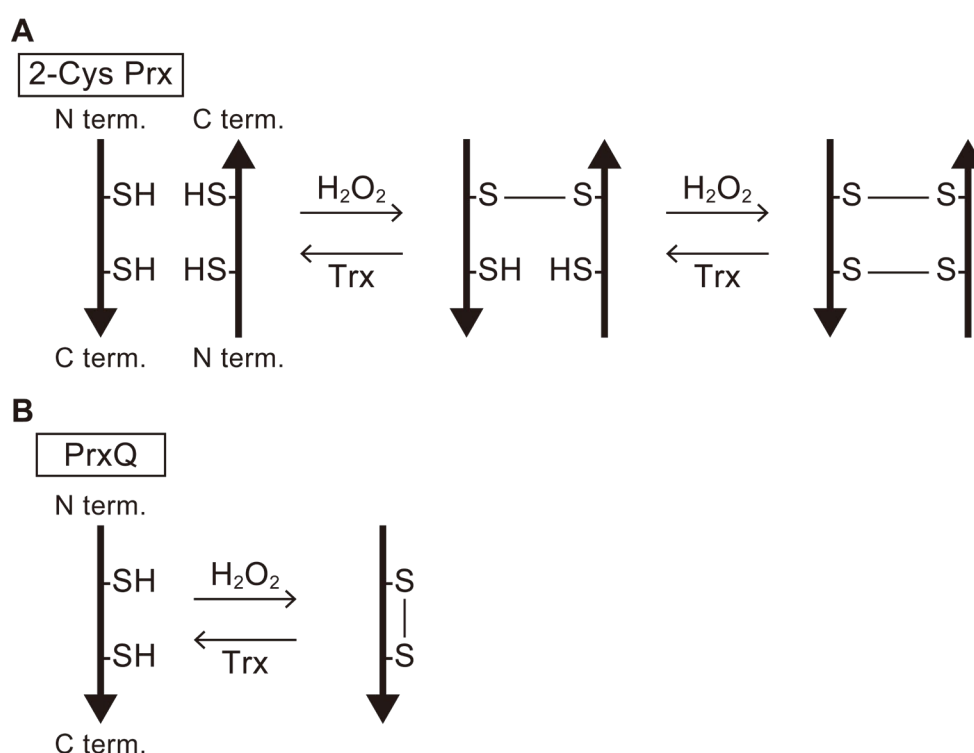


図 1-11. Prx による H_2O_2 の還元

(A) 2-Cys Prx と (B) PrxQ による H_2O_2 還元の反応機構。どちらも、 H_2O_2 還元時に Cys 残基のチオール基が酸化されてジスルフィド結合を形成し、そのジスルフィド結合は Trx によって還元される。このジスルフィド結合は、2-Cys Prx の場合は分子間、PrxQ の場合は分子内で形成される。

以上のように、Trx 標的タンパク質のアイソフォームは葉緑体外にも存在するが、以後特に断りがない場合は、FBPase 等のタンパク質の略称は葉緑体型の Trx 標的タンパク質を指すものとする。

1-3. 葉緑体型 Trx の標的選択性

1-2 で述べたように、葉緑体型 Trx の標的タンパク質は、これまでに多数見つかった。しかし、葉緑体型の Trx である Trx-*f*、Trx-*m*、Trx-*x*、Trx-*y*、Trx-*z* の全てがこれらの標的を還元できるわけではなく、図 1-12 に示す例のようにタイプごとに標的還元活性が異なる (33)。これを、Trx の標的選択性と呼ぶ。例えば、FBPase や SBPase、RCA などは Trx-*f* 特異的な標的であり、その他のタイプの Trx からはほぼ還元力を受け取ることができない (17,33)。CP12 のレドックス制御部位を持った CROST1 も、Trx-*f* のみに還元されることが知られている (21)。一方、MDH や PRK、CF₁γなどは Trx-*m* からも還元力を受け取ることができ、また PrxQ の還元活性は Trx-*y* が最も高いことがわかっている (33–36)。

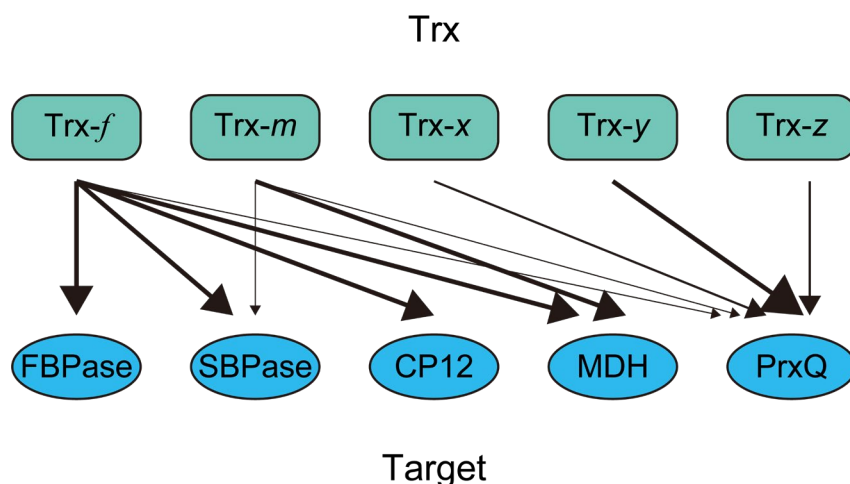


図 1-12. 葉緑体型 Trx の標的選択性

葉緑体型 Trx の標的選択性を、5 つの標的を例にとって示した。矢印の太さは、Trx による標的の還元活性を示している。例えば、Trx-*f* は FBPase を還元することができるが、その他のタイプの Trx は FBPase をほとんど還元することができない。Yoshida et al. (2015) (33) を参考にしてこの図を作成した。

先行研究によって、FTR による Trx の還元は十分に速く、葉緑体内の Trx は、光の照射開始から 30 sec 以内に還元されて定常状態になることがわかっている (37)。一方、Trx による標的の還元はほとんどの場合それよりも遅く、15 min 後にも酸化還元状態が定常状態に達しない標的もある (37)。このことから、Trx による標的の還元が光依存的な標的の活性化の律速段階になっており、Trx の標的選択性が標的活性化の度合いやタイミングを決定しているものと考えられる。標的選択性の存在は、Trx-*f* と Trx-*m* が同定された 1970 年代から知られており (34)、標的選択性に関わる Trx の残基を明らかにするため、1990 年代から 2000 年代の初めにかけて、Trx 変異体を用いた生化学的解析

が盛んに行われた (38-42)。

葉緑体型 Trx のタイプは、酸素発生型光合成生物の進化に伴い増加していったものと考えられている (43)。Trx のタイプが増加した理由として、以下の 2 つの可能性が挙げられる。酸素発生型光合成生物の進化に伴い、Trx の標的の種類も増加していったものと考えられている。Trx の標的には特定のモチーフが見つかっておらず (44)、ひとつの Trx ではアミノ酸配列の異なる多数の標的と相互作用することができないため、標的の増加に対応するために Trx のタイプを増加させた可能性がある。もう一つの可能性として、代謝経路ごとに異なるタイプの Trx を使い分けられているということが考えられる。例えば、Trx-*f* はカルビン-ベンソン回路やデンプン合成に関わるタンパク質を、Trx-*m* はリンゴ酸バルブや光合成電子伝達に関わるタンパク質を主に制御していることが知られている (45)。Trx-*x* や Trx-*y* は、還元できるタンパク質の種類が少ない代わりに、PrxQ などの Prx の還元活性が高いことが知られており (図 1-12) (33)、ROS の消去に多くの還元力を必要とする Prx の還元の特化していると考えられている (45)。このように、Trx の標的選択性によって代謝経路ごとに還元・活性化のタイミングや度合いを調節し、効率の良い光合成を実現している可能性がある。

1-4. Trx-like タンパク質

植物は、Trx の他に、Trx と構造や活性部位の配列がよく似た Trx-like タンパク質を持つ (5, 46)。Trx の活性部位のアミノ酸配列は WCGPC だが、Trx-like タンパク質の活性部位は CXXC と表される。2 つの Cys に挟まれた XX の部分の残基や、Trx の活性部位の Trp に対応する残基の違いは、Cys の酸化還元のされやすさに影響を及ぼすことが知られており、それらの残基が Trx-like タンパク質の特性を決める要因のひとつであると考えられている (2, 47, 48)。 *A. thaliana* には、葉緑体内外に多数の Trx-like タンパク質が存在している (図 1-13) (5)。このことから、Trx-like タンパク質は、Trx と同様にレドックス制御機構において重要な役割を果たしているものと考えられる。Trx-like タンパク質の研究は、Trx の研究に比べて遅れているが、いくつかの Trx-like タンパク質については、Trx と同様に標的還元活性を持つことなどがわかっている (48, 49)。その中でも、比較的良好に研究されているものについて以下に示す。

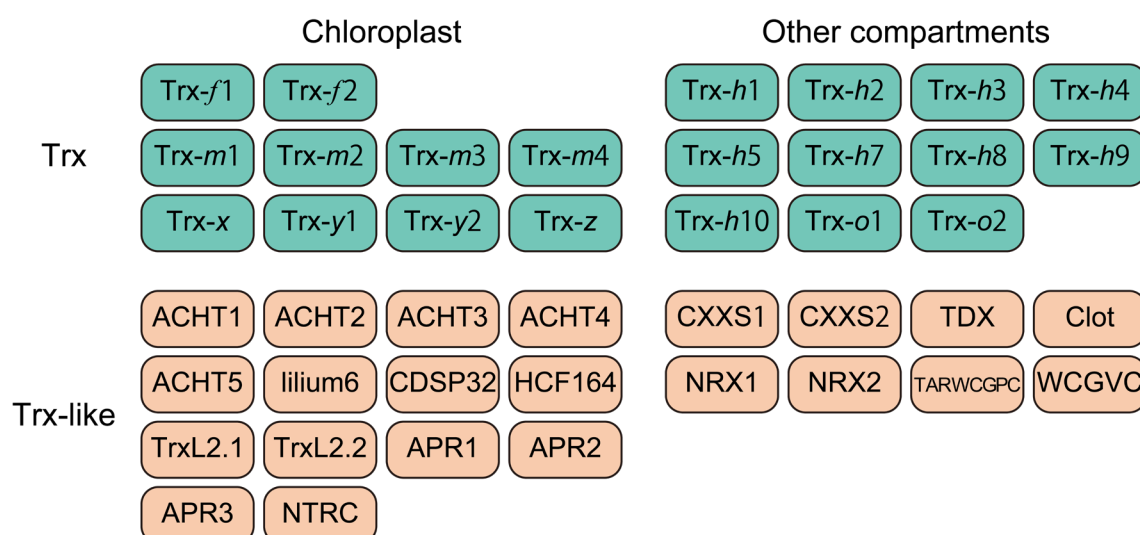


図 1-13. *A. thaliana* が持つ Trx および Trx-like タンパク質

左の列は葉緑体に局在することが知られているもの、右の列はその他のものを表している。Meyer et al. (2012) (5) を参考にしてこの図を作成した。以下に Trx-like タンパク質の略称の由来を示す。ACHT, atypical Cys His-rich Trx; CDSP32, chloroplastic drought-induced stress protein of 32 kDa; HCF164, high chlorophyll fluorescence 164; TrxL2, Trx-like 2; APR, adenosine 5' -phosphosulfate reductase; NTRC, NADPH-Trx reductase C; TDX, tetratricoredoxin; Clot, *Drosophila melanogaster* の clot 変異体; NRX, nucleoredoxin.

1-4-1. Trx-like 2

Trx-like 2 (TrxL2) は、Trx とほぼ同じ構造を持つが、活性部位には WCRKC という保存された配列を持つ (46)。 *A. thaliana* においては、TrxL2.1 および TrxL2.2 と呼ばれる

2つのアイソフォームが存在する。これまでは、TrxL2がPrxやインシュリンを還元できることはわかっていたが(48)、より詳細な生化学的解析や生理学的解析は行われていなかった。ごく最近、吉田らによって、TrxL2がTrxとは逆の反応、すなわち標的の酸化を担う酸化因子であることが生化学的に示された(50)。さらに、TrxL2が高い2-Cys Prx還元活性を示すことから、TrxL2が標的の還元力を受け取り、2-Cys Prxを介して最終的に過酸化水素に伝達していることが示唆された(図1-14)。このことは、2-Cys Prxをノックダウンした変異体植物では標的の酸化速度が低下する、という生理学的解析の結果からも支持されている(50, 51)。

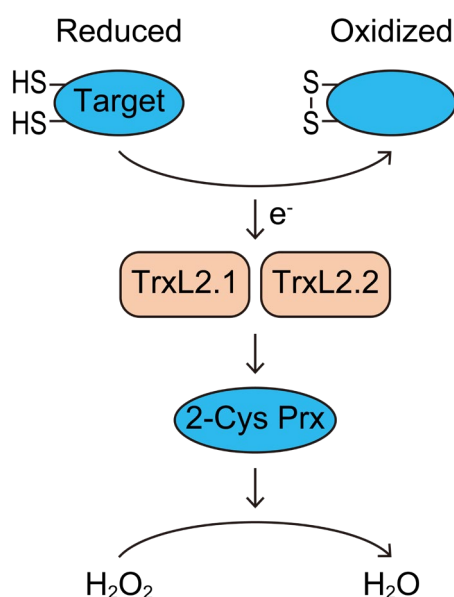


図1-14. TrxL2と2-Cys Prxを介した標的酸化における電子の流れ

*A. thaliana*には、TrxL2.1とTrxL2.2の2つのTrxL2アイソフォームが存在する。TrxL2は、標的から受け取った電子を2-Cys Prxに渡し、2-Cys Prxが H_2O_2 を還元することで、最終的には標的の還元力が H_2O_2 に渡される。Yoshida et al. (2018) (50)を参考にしてこの図を作成した。

1-4-2. Atypical Cys His-rich Trx

Atypical Cys His-rich Trx (ACHT)は、Trx-likeタンパク質の中でCysとHisを多く含むものの総称であり、*A. thaliana*には5つのアイソフォームが存在する(49)。また、インシュリンや2-Cys Prxを還元することも知られており、ACHT1とACHT4については、生体内においても2-Cys Prxとジチオール-ジスルフィド交換反応を行うことが示唆されている(52, 53)。さらに、ACHT4は、デンプン合成経路ではたらくTrx標的タンパク質のひとつであるADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase)の小サブユニットとも、ジチオール-ジスルフィド交換反応を行うことが示唆されている(53)。これらの結果から、ACHT4はAGPaseを酸化し、受け取った還元力を2-Cys Prxに渡すというモデルが提唱されている。しかし、ACHTが直接標的を酸化することを示したという報告はこれまで

に無い。

1-4-3. NADPH-Trx reductase C

NADPH-Trx reductase C (NTRC) は、NADPH を還元力として Trx を還元する NADPH-Trx reductase (NTR) ドメインと、Trx ドメイン (活性部位は TCGPC) が結合した、ハイブリットタンパク質である (54)。NTRC は、NTR ドメインによって、NADPH の還元力を利用して自身の Trx ドメインを還元することができる。NTRC は、Trx と同様にいくつかの標的タンパク質を還元することが報告されている他、2-Cys Prx の還元活性が Trx に比べて非常に高いことがわかっている (55)。

NTRC の欠損株では、非常に強い生育阻害の他、クロロフィル含量の低下や、非光学的消光 (non-photochemical quenching, NPQ) の上昇といった表現型が見られる (56)。NPQ とは、過剰な光のエネルギーを熱にして放散するしくみであり、NPQ が高くなると光化学系 II の量子収率が低下する。これまで、これらの NTRC 欠損株の表現型は、クロロフィル生合成系に関わる Mg-protoporphyrin IX methyltransferase や Mg-chelatase など、NTRC の標的が還元・活性化されなくなることによるものであると考えられていた (55, 57)。しかし、最近、NTRC の欠損株において 2-Cys Prx をノックダウンすると、生育阻害や低クロロフィル含量、高 NPQ といった NTRC 欠損株の表現型が、回復することがわかった。このことから、図 1-15 に示すように、NTRC 欠損株の表現型は、2-Cys Prx のレドックスバランスが崩れたことによるものであるというモデルが提唱された (58)。2-Cys Prx は Trx や NTRC によって還元されるが、上述のように NTRC の 2-Cys Prx 還元活性は Trx に比べて非常に高いため、野生型の植物では主に NTRC が 2-Cys Prx の還元を担っていると考えられる (図 1-15A)。一方、NTRC の欠損株では 2-Cys Prx が十分に還元されないため、酸化型の 2-Cys Prx が蓄積する。すると、Trx の還元力が 2-Cys Prx に奪われるため、Trx がその他の標的を還元できなくなり、結果的に多くの Trx 標的タンパク質の活性が低下して、生育阻害などの表現型が表れる (図 1-15B)。ここで、さらに 2-Cys Prx をノックダウンすると、Trx の還元力が 2-Cys Prx に奪われることがなくなるため、表現型が回復する (図 1-15C)。このように、NTRC は直接標的を還元するよりも、2-Cys Prx のレドックスバランスを介して、間接的に標的のレドックス状態を制御していると現在は考えられている。

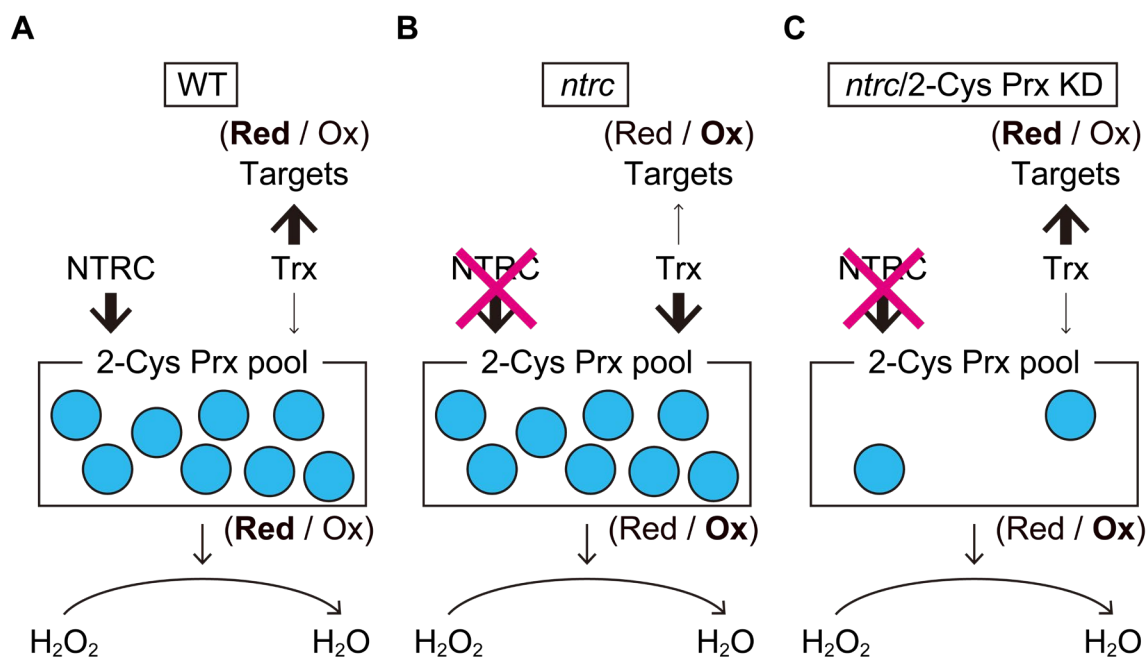


図 1-15. NTRC 欠損株における 2-Cys Prx と Trx 標的タンパク質のレドックスバランスの変化
 (A) 野生型 (WT) の植物では、2-Cys Prx は主に NTRC によって還元されている。(B) NTRC 欠損株 (*ntrc*) では、NTRC が 2-Cys Prx を還元できないため、代わりに Trx が 2-Cys Prx を還元する。その結果、その他の標的タンパク質が正常に還元されなくなる。(C) NTRC 欠損株において 2-Cys Prx をノックダウン (KD) すると、Trx から 2-Cys Prx への還元力伝達効率が低下する。その結果、Trx はその他の標的タンパク質を正常に還元することができるようになり、NTRC 欠損株で見られる生育阻害などの表現型が回復する。Pérez-Ruiz et al. (2017) (58) を参考にしてこの図を作成した。

1-5. 本研究の目的

葉緑体内の酵素が光依存的な活性化を受けることは 1960 年代には知られており、1970 年代にはその活性化を担う因子として Trx と FTR が同定された (7)。その後、上述のように葉緑体におけるレドックス制御システムの研究が活発に行われ、生化学、生理学、および構造生物学的手法を駆使してその詳細な分子機構が明らかにされつつある (44, 45, 59, 60)。さらに、ごく最近、これまでは大きな謎であった標的の不活性化を行う酸化因子が同定され (50)、レドックス制御の研究に新たな道が開かれた (61)。しかし、レドックス制御の研究分野には、未だに以下に示す謎が残されており、全貌の解明には至っていない。そこで、本研究ではその謎を、1 つもしくは複数のタンパク質を例に取って解明する事で、葉緑体におけるレドックス制御機構の全貌解明に向けた足掛かりを作ることを目指した。

1-5-1. 葉緑体型 Trx の標的選択性を決定する残基

1-3 で述べたように、5 つのタイプの葉緑体型 Trx は、それぞれ異なるタンパク質を標的とすることが知られている。特に、Trx-*f* と Trx-*m* については、1970 年代にはすでに標的選択性を持つことが知られていた (34)。この標的選択性を決める Trx のアミノ酸残基を明らかにするために、Trx 変異体の組換えタンパク質を用いた研究が盛んに行われてきた (38–42)。しかし、これらの研究は主にホウレンソウの Trx-*f* と Trx-*m*、大腸菌の Trx を研究対象としており、その他の植物の Trx についてはほとんど考慮されていない。また、Trx-*x*、Trx-*y*、Trx-*z* は、*A. thaliana* の全ゲノム解析が完了した 2000 年以降に発見されたため (62–65)、それ以前に行われた研究では、これらのタイプの Trx についても考慮されていない。このような問題点から、これまでの研究では、標的選択性を決定するアミノ酸残基を完全には解明できていない。そこで、本研究では、様々な植物が持つ 5 つのタイプの葉緑体型 Trx のアミノ酸配列情報を利用し、特によく研究されている *f* タイプの Trx について、標的選択性を決定するアミノ酸残基の解明を試みた。

1-5-2. 生体内における Trx 標的タンパク質の酸化因子

1-4 で述べたように、TrxL2 は、Trx 標的タンパク質を酸化し受け取った還元力を 2-Cys Prx に渡すことが、生化学的に示された (図 1-14) (50)。また、ACHT4 についても、同様の経路で Trx 標的タンパク質を酸化することが示唆されている (53)。しかし、これらの Trx-like タンパク質の欠損株はこれまでに得られておらず、生体内においてもこれらの Trx-like タンパク質が標的の酸化に関わっているかはわかっていない。そこで、本研究では、TrxL2 や ACHT を欠損した植物を作製し、生体内における Trx 標的タンパク質の酸化因子を明らかにすることを目的とした。

1-5-3. レドックス制御の生理的役割

上述のように、Trx の標的選択性や標的の構造解析を含め、レドックス制御の詳細なしくみを明らかにするための研究がこれまでに数多く行われてきた (44, 45, 59, 60)。それらすべての研究は、1-2 で述べたように、それぞれの酵素がレドックス制御を受ける（暗所で不活性化される）ことが、植物の生育にとって重要である、という仮説のもとで行われている。CF_Iγについては、レドックス制御を受けないタンパク質を過剰発現する植物が作製されているが (66, 67)、CF_Iγがレドックス制御を受けられなくなることで生育に悪影響を及ぼすという報告は無い。このように、当該分野の研究の重要性を示す仮説は、どの酵素についても実証されていない。そこで、本研究では、2つのレドックススイッチによって特に厳密に活性が制御されている MDH に注目し、レドックススイッチを失った（常に活性を持つ）MDH を発現する植物を作製・解析することで、MDH のレドックス制御の生理的役割を明らかにしようと考えた。

第 2 章

Trx-*f*の標的選択性を決定するアミノ酸残基の解明

2-1. 本章の概要

植物が持つ葉緑体型 Trx は、*f*、*m*、*x*、*y*、*z* の 5 つのタイプに分類される。葉緑体型 Trx は、各タイプごとに標的とするタンパク質が異なることはわかっているが、何が標的選択性を決めているのか、言い換えればどのアミノ酸残基の違いが標的選択性の違いを生み出しているのかは、完全にはわかっていない。本章では、葉緑体型 Trx の中で最もよく研究されている Trx-*f* について、標的選択性に関わる残基を調べた。Trx-*f* 特異的な標的として、よく研究されている FBPase と、以前我々が開発した人工的な Trx-*f* 特異的な標的である CROST1 を用いた。その結果、Trx-*f* に特異的に保存されている残基のほとんどが Trx-*f* の標的選択性に関わっていることを明らかにすることができた。さらに、それらの残基の一部が Trx-like タンパク質である ACHT1 および ACHT2a に保存されていることを見出し、ACHT1 および ACHT2a が Trx-*f* 特異的な標的を効率よく酸化することを明らかにした。これらの結果は、本研究で同定した Trx-*f* の標的認識残基が、Trx や Trx-like タンパク質による標的の還元・酸化のどちらの過程においても重要であることを示すものである。

2-2. 実験方法

2-2-1. In silico 解析

本研究で用いた Trx の略称、由来する生物名、アクセッション番号を、表 2-1 に示す。多重配列アライメント解析は、Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/>) を使用し、デフォルトのパラメータを用いて行った。多重配列アライメント解析で得られた結果を用いて、MEGA7 ソフトウェア (68) によって系統樹を作成した。その際、neighbor-joining 法を用い、500 回のブートストラップ抽出を行った。

Trx と標的、もしくは Trx と Trx reductase (TrxR) 間の相互作用に関わる残基は、Protein Interaction Calculator web server (69) を用いて推定した。その際、パラメータはデフォルトに設定し、Trx と標的、もしくは Trx と TrxR の複合体構造として、以下の構造データを用いた (PDBID : 1SKR、2IPA、2IWT、2O8V、3PIN、4DSS、4LL1、1CQG、2PU9、2PUK、1F6M、3QFA、4J56)。

A. thaliana の Trx-f1 と TrxL2.1 の立体構造は、それぞれホウレンソウの Trx-f (PDBID : 1F9M) とポプラの TrxL2.1 (PDBID : 5NYK) をテンプレートにし、SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) (70) を用いて予測した。立体構造は、UCSF Chimera (71) を用いて可視化した。

A. thaliana の Trx-f と FB Pase の複合体構造モデルは、東京工業大学・北尾研究室の北尾彰朗教授と竹村和浩特任講師との共同研究によって作成した。手法の概要を以下に示す。まず、ホウレンソウの Trx-f (PDBID : 1F9M) とエンドウの FB Pase (PDBID : 1D9Q) の立体構造を用いて、ZDOCK 3.0.2 (72, 73) によって剛体ドッキングシミュレーションを行い、540,000 個の複合体モデルを生成した。生成したモデルのうち、Trx-f の活性部位の Cys 残基 (Cys46 と Cys49) と FB Pase のレドックス制御部位の Cys 残基 (Cys153 と Cys173) の距離が近いものから、上位 3 つのモデルを抽出した。3 つのモデルそれぞれについて、Gromacs 2018.1 (74, 75) による 500 ns の分子動力学シミュレーションを実行し、構造のリファインメントを行った。得られたホウレンソウの Trx-f とエンドウの FB Pase の複合体構造モデルのうち、双方の Cys 残基間の距離が最も近かったものをテンプレートにし、SWISS-MODEL によって *A. thaliana* の Trx-f1 と FB Pase の複合体構造のモデルを作成した。さらに、作成したモデル構造を用いて 300 ns の分子動力学シミュレーションを行うことで、シミュレーション中における分子の動態、分子間の相互作用、代表的な立体構造を予測した。

表 2-1. 本研究で用いた Trx の由来する生物種とアクセッション番号

Organism	Name	Accession number
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtTrx- <i>f</i> 1	Q9XFH8 ^a
	AtTrx- <i>f</i> 2	Q9XFH9 ^a
	AtTrx- <i>m</i> 1	O48737 ^a
	AtTrx- <i>m</i> 2	Q9SEU8 ^a
	AtTrx- <i>m</i> 3	Q9SEU7 ^a
	AtTrx- <i>m</i> 4	Q9SEU6 ^a
	AtTrx- <i>x</i>	Q8LD49 ^a
	AtTrx- <i>y</i> 1	Q6NPF9 ^a
	AtTrx- <i>y</i> 2	Q8L7S9 ^a
	AtTrx- <i>z</i>	Q9M7X9 ^a
	AtNTRC	O22229 ^a
	ACHT1	AT4G26160.1 ^b
	ACHT2a	AT4G29670.1 ^b
	ACHT4a	AT1G08570.1 ^b
	TrxL2.1	AT5G06690.1 ^b
	TrxL2.2	AT5G04260.1 ^b
<i>Spinacia oleracea</i>	SoTrx- <i>f</i>	P09856 ^a
	SoTrx- <i>m</i>	P07591 ^a
<i>Pisum sativum</i>	PsTrx- <i>f</i>	P29450 ^a
	PsTrx- <i>m</i> 1	P48384 ^a
	PsTrx- <i>m</i> 2	Q95AH9 ^a
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CrTrx- <i>f</i> 1	Q84XR8 ^a
	CrTrx- <i>f</i> 2	A0A2K3DSC9 ^a
	CrTrx- <i>m</i>	P23400 ^a
	CrTrx- <i>x</i>	Q84XR9 ^a
	CrTrx- <i>y</i>	Q84XS2 ^a
	CrNTRC	A8HNP7 ^a
<i>Oryza sativa</i>	OsTrx- <i>f</i>	Q8S091 ^a
	OsTrx- <i>m</i> 1	Q6H7E4 ^a
	OsTrx- <i>m</i> 2	Q7X8R5 ^a
	OsTrx- <i>m</i> 3	Q7XQQ2 ^a
	OsTrx- <i>m</i> 5	Q9ZP20 ^a

表 2-1. (続き)

Organism	Name	Accession number
<i>Oryza sativa</i>	OsTrx-x	Q7XKD0 ^a
	OsTrx-y	Q5JMR9 ^a
	OsTrx-z	Q8H2V6 ^a
	OsNTRC	Q70G58 ^a
<i>Solanum lycopersicum</i>	SlTrx-z	Q9LKW0 ^a
<i>Solanum tuberosum</i>	StTrx-z	M1A3D5 ^a
<i>Nicotiana benthamiana</i>	NbTrx-z1	Q6JE38 ^a
	NbTrx-z2	Q6JE37 ^a
<i>Populus trichocarpa</i>	PtNTRC	A0A2K1ZWY7 ^a
<i>Vitis vinifera</i>	VvNTRC	A0A438C067 ^a
<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	OINTRC	A4S9J9 ^a
<i>Physcomitrella patens</i>	PpNTRC1	A0A2K1IU57 ^a
	PpNTRC2	A9U311 ^a
<i>Sorghum bicolor</i>	SbNTRC	A0A1W0W7T1 ^a
<i>Nostoc punctiforme</i>	NpNTRC	B2J9C5 ^a

^aUniProtKB (<https://www.uniprot.org/>) におけるアクセッション番号

^bThe Arabidopsis Information Resource database (<https://www.arabidopsis.org/>) におけるアクセッション番号

2-2-2. 発現プラスミドの作製

本研究で使用したタンパク質は、CROST1 以外は全て *A. thaliana* 由来のものである。組換えタンパク質の発現プラスミド作製に用いた cDNA は、*A. thaliana* の緑葉から TRIzol (Invitrogen) を用いて抽出した全 RNA をテンプレートとして、逆転写酵素を用いて合成した。

ACHT1、ACHT2a、ACHT4a 遺伝子の葉緑体移行シグナルを除いた領域 (49) を、C 末端に 6×His タグが融合されるように、pET-23c ベクター (Novagen) に組み込んだ。Trx-f1、Trx-m2、PrxQ、2-Cys PrxA、CROST1 の発現プラスミドは、先行研究 (21、33、55) で作製されたものを用いた。FBPase の発現プラスミドは、*E. coli* での発現量を増加させるため、先行研究 (33) で作製されたものを 31C-FO_H 法 (76) を用いて改変し、使用した。Trx-f1 と Trx-m2 の変異体の発現プラスミドは、それぞれの野生型 (WT) の発現プラスミドをテンプレートにし、PrimeSTAR mutagenesis basal kit (Takara) を用いて点変異を導入することで作製した。本研究で、クローニングまたは点変異導入時に使用したプライマーを、表 2-2 に示す。なお、ACHT2a と ACHT4a は、ACHT2 と ACHT4 の複数あるスプライシングバリエーションのうちのひとつ (49)、2-Cys PrxA は、2 つある *A. thaliana* の 2-Cys Prx アイソフォームのひとつである。

表 2-2. 第 2 章で用いたプライマー

Name	Sequence (5' to 3')
<i>f1</i> M94F F ^a	CTTGACT TTT TACACTCAATGGTGTGGT
<i>f1</i> M94F R ^a	AGTGTA AA AGTCAAGTACGACAAGCTT
<i>f1</i> T96A F ^a	ATGTAC GCT CAATGGTGTGGTCCATGT
<i>f1</i> T96A R ^a	CCATTGAG CGT ACATGTCAAGTACGAC
<i>f1</i> Q97A F ^a	TACACT GCT TGGTGTGGTCCATGTAAA
<i>f1</i> Q97A R ^a	ACACCA AGC AGTGTACATGTCAAGTAC
<i>f1</i> D118A F ^a	TACGAC GCT GTTGTGTTTCTAAAGCTT
<i>f1</i> D118A R ^a	CACAAC AGC GTCGTACTTCTCTGATAA
<i>f1</i> C126A F ^a	CTTGAC GCT AATCCAGATAACCGGCCA
<i>f1</i> C126A R ^a	TGGATT AGC GTCAAGCTTTAGAAACAC
<i>f1</i> C126S F ^a	CTTGACT CA AATCCAGATAACCGGCCA
<i>f1</i> C126S R ^a	TGGATT TG AGTCAAGCTTTAGAAACAC
<i>f1</i> N127D F ^a	GACTGC GAT CCAGATAACCGGCCATTG
<i>f1</i> N127D R ^a	ATCTGGAT CGC AGTCAAGCTTTAGAAA
<i>f1</i> R131A F ^a	GATAAC GCT CCATTGGCAAAAGAGCTA
<i>f1</i> R131A R ^a	CAATGG AGC GTTATCTGGATTGCAGTC
<i>f1</i> K135A F ^a	TTGGCA GCT GAGCTAGGAATAAGAGTG
<i>f1</i> K135A R ^a	TAGCTC AGC TGCCAATGGCCGTTATC
<i>f1</i> L137Y F ^a	AAAGAG TAT GGAATAAGAGTGGTTCCA
<i>f1</i> L137Y R ^a	TATTCC ATA CTCTTTTGCCAATGGCCG
<i>f1</i> V141S F ^a	ATAAGAT TC AGTTCCAACCTTTCAAGATT
<i>f1</i> V141S R ^a	TGGAAC TGA TCTTATTCCTAGCTCTTT
<i>f1</i> V142M F ^a	ATAAGAGTG ATG CCAACCTTTCAAGATT
<i>f1</i> V142M R ^a	TGGC ATC ACTCTTATTCCTAGCTCTTT
<i>f1</i> N151G F ^a	AAGGAT GGT AAGGTTGTCAAGGAAGTG
<i>f1</i> N151G R ^a	AACCTT ACC ATCCTTCAAAATCTTGAA
<i>f1</i> E156A F ^a	GTCAAGG CTG TGACCGGTGCAAAATAC
<i>f1</i> E156A R ^a	GGTCAC AGC CTTGACAACCTTGTTATC
<i>f1</i> T158A F ^a	GAAGTG GCT TGGTGCAAAATACGATGAT
<i>f1</i> T158A R ^a	TGCACC AGC CACTTCCTTGACAACCTT
<i>f1</i> K161A F ^a	GGTGCA GCT TACGATGATCTGGTTGCA
<i>f1</i> K161A R ^a	ATCGTA AGC TGCACCGGTCACTTCCTT

表 2-2. (続き)

Name	Sequence (5' to 3')
<i>m2</i> 104–105f F ^a	TTGG ACAC A ATGGTGTGGACCTTGCAAG
<i>m2</i> 104–105f R ^a	CACCAT TGTG T CCAAAAGTCGACAACACTAC
<i>m2</i> 135–139f F ^a	TGT A ATGAATCTC G TAATACTCCCGGCCAGTAC
<i>m2</i> 135–139f R ^a	ACGAGATT CAT T CA GTTTAATTTGTAGAACTTG
<i>m2</i> 152–153f F ^a	TAGAG TAG T CCAACGATCATGATCTTTG
<i>m2</i> 125–153f R ^a	GTTGG ACTACT CTAACTCCGTAAGTGGCC
<i>m2</i> 167–172f F ^a	AA ATC C AGGTGCA AAA CCAAAACCACACTCAC
<i>m2</i> 167–172f R ^a	T TGCACCT G TGATT T CATCCTTCTTCTCGCCACC
<i>m2</i> G143K F ^a	ACTCCC AAA CAGTACGGAGTTAGAAGC
<i>m2</i> -152–153f G143K F ^a	ACTCCC AAA CAGTACGGAGTTAGAGTAG
<i>m2</i> -135–139f G143K R ^a	GTACTG TTT GGGAGTATTACGAGATT
FBPase Codon Opt F ^b	AAAC AGCAGC ACG AAAA AAGAGTGGATACGAACCTT
FBPase Codon Opt R ^b	TTCGTGCTGCTG T GT TTT T GT TT C TGCTG CAT CTGCTG CTACT TGCC - ATATGTATATCTCCT
ACHT1 F ^c	CATCATATGGTCCAAGCGTTAGCTGCTG
ACHT1 R ^c	CATCTCGAGTTCACCTGAATCTTCAACTTTC
ACHT2 F ^c	CATCATATGGTCAAGGTAGATGAAAATGTAG
ACHT2 R ^c	CATCTCGAGACTTGATGCAGCTGGTTTGG
ACHT4 F ^c	CATCATATGTCATCAGCTATCACAGCTCAG
ACHT4 R ^c	CATCTCGAGTCTCCCTGCGGAGACC

^aTrx への点変異導入に用いたプライマー

^bFBPase の発現量を改善するための点変異導入に用いたプライマー

^cACHT のクローニングに用いたプライマー

太字の部分は変異導入箇所を、下線部は制限酵素認識部位を示している。

2-2-3. 組換えタンパク質の発現

Trx-*f1*、Trx-*m2* (変異体) または FBPase の発現プラスミドを用いて *E. coli* BL21(DE3) pLysS を、ACHT (ACHT1、ACHT2a、ACHT4a)、CROST1、PrxQ、2-Cys PrxA の発現プラスミドを用いて *E. coli* BL21(DE3) を形質転換した。その後、50 µg/mL のアンピシリンを含む 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 mL の LB+Amp 液体培地に植菌し、37°C で 5 h 程度培養した後、全量を Trx の場合は 1.5 L、標的の場合は 2 L の LB+Amp 液体培地に添加し、OD_{600 nm} が約 0.6 になるまで 37°C で培養した。その後、終濃度が 0.5 mM となるようにイソプロピル-β-チオガラクトピラノシドを添加し、21°C で約 16 h 培養した。培地を遠心分離によって除き、得ら

れた菌体を液体窒素で急速に冷凍した後、 -80°C で保存した。

2-2-4. 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。回収した目的タンパク質は、終濃度 20% (v/v) となるようにグリセロールを加えた後、液体窒素で急速に冷凍し、 -80°C で保存した。その後、ウシ血清アルブミンをスタンダードとして用い、BCA protein assay kit (Pierce) によってタンパク質濃度を測定した。

2-2-4-1. Trx-f1、Trx-m2 (変異体) の精製

菌体を TN バッファー1 (25 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl) で懸濁し、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 ($185,300 \times g$ 、40 min、 4°C) を行った。Ni-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) アフィニティークロマトグラフィーを行うため、回収した上清画分を 5 mL の Ni-NTA Superflow (QIAGEN) に添加し、転倒混和 (30 min、 4°C) した。50 mL の TN バッファー1 と、50 mL の 10 mM イミダゾールを含む TN バッファー1 でレジンを洗浄し、22.5 mL の 200 mM イミダゾールを含む TN バッファー1 で溶出を行った。溶出液に、終濃度 2 mM となるように還元型ジチオスレイトール (DTT_{red}) を添加し、氷上で 15 min インキュベートした。Cut off MW: 10,000 の Amicon Ultra-15 (Merck Milipore) を用いて限外濾過により 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 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) に添加し、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。SDS-PAGE によって、目的タンパク質が含まれる画分を確認、回収した。

2-2-4-2. ACHT1、ACHT2a、AHCT4a の精製

菌体を cOmplete protease inhibitor cocktail (ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) -free) (Roche) を含む TN バッファー1 で懸濁し、2-2-4-1 と同様に、超音波破碎、超遠心分離、Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーを行った。溶出液に終濃度 1 mM となるように EDTA を加えた後、Spectra/Por Dialysis Membrane (Cut off MW : 12,000–14,000) を用いて、2.5 L の MES バッファー (25 mM MES-NaOH (pH 6.1)、0.5 mM DTT_{red}、1 mM EDTA) に対して一晩透析を行った。タンパク質溶液を、30 mL の TOYOPEARL SP-650 M (Tosoh) に添加し、MES 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。SDS-PAGE によって、目的タンパク質が溶出した画分を確認、回収した後、2-2-4-1 と同様に濃縮、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、50 μM EDTA を含む TN バッファー2 を用いた。

2-2-4-3. FBPase、2-Cys PrxA、PrxQ の精製

菌体を 25 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA を含むバッファーで懸濁し、2-2-4-1 と同様に超音波破碎と超遠心分離を行った。FBPase と 2-Cys Prx の場合は、回収した上清画分を 30 mL の TOYOPEARL DEAE-650 M (Tosoh) に添加し、25 mM Tris-HCl (pH 7.5) 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。PrxQ の場合は、回収した上清画分を 30 mL の TOYOPEARL SP-650 M に添加し、25 mM Tris-HCl (pH 7.5) 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。SDS-PAGE によって、目的タンパク質が溶出した画分を確認、回収した後、飽和濃度の 30% の硫酸アンモニウムを添加した。白い沈殿が生じた場合は、遠心分離 (5,000 × g、10 min、4°C) によって沈殿を除いた。タンパク質溶液を、30 mL の TOYOPEARL Butyl-650 M (Tosoh) に添加し、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、疎水クロマトグラフィーを行った。SDS-PAGE によって、目的タンパク質が溶出した画分を確認、回収した後、FBPase 溶液には終濃度 1 mM の 1,1'-Azobis(N,N-dimethylformamide) (Diamide) を、2-Cys PrxA 溶液または PrxQ 溶液には終濃度 0.5 mM の H₂O₂ を加えて室温で 1 h インキュベートした。その後、Spectra/Por Dialysis Membrane (Cut off MW : 12,000–14,000) 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)。FBPase 溶液は Cut off MW : 100,000、2-Cys PrxA 溶液は Cut off MW : 30,000、PrxQ 溶液は Cut off MW : 10,000 の Amicon Ultra-15 を用いて濃縮した。

2-2-4-4. CROST1 の精製

2-2-4-1 と同様に、菌体の懸濁、超音波破碎、超遠心分離、Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーを行った。溶出液に、終濃度 10 mM となるように DTT_{red} を添加し、氷上で 15 min インキュベートした後、飽和濃度の 20% の硫酸アンモニウムを添加した。タンパク質溶液を、30 mL の TOYOPEARL Butyl-650 M に添加し、25 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中の硫酸アンモニウム濃度に 20–0% の直線逆濃度勾配をかけて、疎水クロマトグラフィーを行った。SDS-PAGE によって、目的タンパク質が溶出した画分を確認、回収した後、終濃度 0.5 mM になるように Diamide を加え、室温で 15 min インキュベートした。その後、2-2-4-3 の 2-Cys PrxA と同様に透析、濃縮を行った。

2-2-5. インシュリン還元活性測定

インシュリン還元活性測定により、Trx が持つジスルフィド還元活性を調べた。インシュリンは、親水性の A 鎖と疎水性の B 鎖から成り、これらのポリペプチド鎖はふたつのジスルフィド結合によって架橋されている。Trx によってこのジスルフィド結合が還元され開裂すると疎水性の B 鎖が沈殿するため、OD_{650 nm} の経時変化を測定することにより、Trx のジスルフィド還元活性を測定することができる (77)。反応溶液の組成は、

50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50 mM NaCl、1 mM EDTA、230 μ M ウシ膵臓由来インシュリン (Sigma)、5 μ M Trx、0.5 mM DTT_{red} であり、DTT_{red} を添加して反応を開始した。反応は 25°C で行い、OD_{650 nm} の経時変化を測定した。OD_{650 nm} が 0.2 から 0.8 の値を用いて直線近似を行い、インシュリン還元活性 (Δ OD_{650 nm} min⁻¹) を求めた。

2-2-6. FBPase 酸化・還元活性測定

FBPase の酸化・還元は、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50 mM NaCl を含むバッファーを用いて、25°C で行った。反応溶液中のタンパク質と DTT の濃度は、それぞれの図の説明文に示されている。FBPase の酸化実験に用いた Trx および ACHT は、0.6 μ M Trx または ACHT、25 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50 mM 酸化型 DTT (DTT_{ox})、1 μ M DTT_{red} を含む溶液中でインキュベート (25°C、3 h) することであらかじめ酸化し、ゲル濾過クロマトグラフィーによって DTT を除去した。FBPase の酸化実験に用いた FBPase は、50 μ M FBPase、25 μ M Trx-f1、5 mM DTT_{red}、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50 mM NaCl の反応溶液中でインキュベート (25°C、30 min) することであらかじめ還元し、ゲル濾過クロマトグラフィーによって DTT と Trx を除去した。

FBPase の酸化還元状態は、チオール基修飾法 (図 2-1) によってモニターした。まず、25°C で反応溶液をインキュベートし、一定時間ごとにその一部を 10 分の 1 量の 100% (w/v) トリクロロ酢酸と混和し、タンパク質を沈殿させた。その後、遠心分離 (20,400 $\times$ g、15 min、4°C) によって上清を除き、100%冷アセトンを用いて沈殿を 2 回洗浄した。沈殿を、1 mM 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonate (AMS) を含む非還元 SDS 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修飾した。サンプルを 95°C で 5 min インキュベートした後、SDS-PAGE を行った。この際、チオール基が AMS によって修飾された還元型のタンパク質は質量が大きくなるため、移動度の差によって酸化型と還元型のタンパク質を分離することができる。分離したそれぞれのバンドの強度を定量し、タンパク質の酸化還元状態を決定した。

Trx による FBPase の還元活性を求めるため、FBPase の酸化還元状態の経時変化のデータを以下の式にフィッティングした。

$$[\text{Target}_{\text{red}}]/[\text{Target}_{\text{total}}] = 1 - e^{-k[\text{Trx}]t} \quad (\text{式 1})$$

ただし、 $[\text{Target}_{\text{red}}]/[\text{Target}_{\text{total}}]$ は還元型の標的 (FBPase) の割合、 $[\text{Trx}]$ は Trx の濃度 (μ M)、 t は反応開始からの経過時間 (min) であり、 k はフィッティングから求められる反応速度定数 (μ M⁻¹ min⁻¹) である。本研究では、 k を Trx による標的還元活性の指標として用いた。

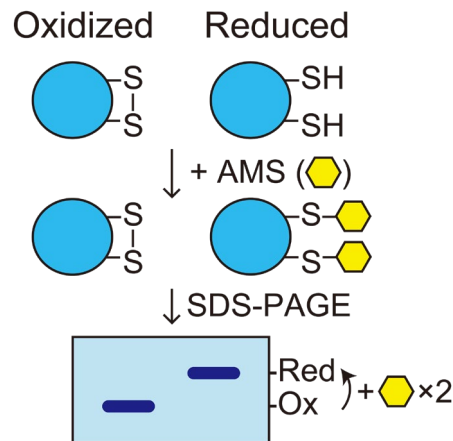


図 2-1. チオール基修飾法によるタンパク質酸化還元状態の可視化

還元型 (Reduced, Red) のタンパク質が持つチオール基を、4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonate (AMS) を用いて修飾する。AMS の分子質量は約 500 Da であり、還元型のタンパク質は酸化型 (Oxidized, Ox) に比べて 1 kDa 程大きくなる。そのため、SDS-PAGE を行うことで、還元型と酸化型のタンパク質を分離することができる。

2-2-7. CROST1 酸化・還元活性測定

CROST1 の酸化・還元は、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50 mM NaCl、1 mM EDTA を含むバッファーを用いて、25°C で行った。反応溶液中のタンパク質と DTT の濃度は、それぞれの図の説明文に示されている。CROST1 の酸化還元状態は、430 nm の光で励起した時の 480 nm と 530 nm の蛍光強度の比によってモニターした (第 1 章の図 1-6)。2-2-6 の FBPase と同様に、CROST1 の酸化還元状態の経時変化のデータを式 1 にフィッティングし、反応速度定数 k を求めた。なお、CROST1 の酸化実験に用いた CROST1 は、先行研究 (21) に従って、Trx-f1 を用いてあらかじめ還元した。

2-2-8. 中間酸化還元電位の測定

本研究で作成した Trx-f1 変異体については、中間酸化還元電位のとりうる範囲をおおまかに求めるため、-335 mV、-321 mV、-276 mV の酸化還元電位を持つ DTT バッファー ($[\text{DTT}_{\text{ox}}]/[\text{DTT}_{\text{red}}]$ はそれぞれ 50/9、50/3、50/0.03) を使用して測定を行った。その他の条件は、以下の ACHT の場合と同様である。

ACHT の中間酸化還元電位は、その他の Trx、Trx-like タンパク質の中間酸化還元電位と比較するため、先行研究 (33) と同様の方法で求めた。まず、0.6 μM の ACHT を、25 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50 mM DTT_{ox} 、0.0005–5 mM DTT_{red} を含むバッファー中でインキュベート (25°C、3 h) した。その後、2-2-6 の FBPase と同様に、チオール基修飾法によって各 DTT_{red} 濃度における ACHT の酸化還元状態を求めた。求めた値をネルンストの式にフィッティングし、ACHT の pH 7.5 における中間酸化還元電位を求めた。ただし、各 DTT 濃度におけるバッファーの酸化還元電位は、pH 7.5 における DTT の中間

酸化還元電位を-357 mV として算出した。

2-2-9. H₂O₂ 還元活性測定

Trx-f1 と ACHT の Prx 還元活性を調べるため、Prx による、Trx-f1 もしくは ACHT 依存的な H₂O₂ 還元を測定した。Trx-f1 または ACHT と、2-Cys PrxA または PrxQ を、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50 mM NaCl、0.5 mM DTT_{red}、100 μM H₂O₂ を含むバッファー中で、25°C でインキュベートした。一定時間ごとに反応溶液の一部を取り出し、反応溶液中の H₂O₂ 濃度をキシレノールオレンジ分析 (78) によって調べた。なお、キシレノールオレンジ分析では、FOX 試薬 (25 mM H₂SO₄、250 μM 硫酸アンモニウム鉄 (II)、100 mM ソルビトール、125 μM キシレノールオレンジ) (用時調製) 950 μl と反応溶液 50 μl を混合し、遮光して室温で 30 min インキュベートした後、200 μl をマイクロプレートに移して 570 nm における吸光度を測定した。標準曲線の作成に用いた H₂O₂ の濃度は、240 nm における吸光度を測定し、H₂O₂ のモル吸光係数 $\epsilon_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて決定した。

2-3. 結果と考察

2-3-1. 各タイプの葉緑体型 Trx 特異的に保存されている残基

A. thaliana は、2つの *f* タイプ、4つの *m* タイプ、1つの *x* タイプ、2つの *y* タイプ、1つの *z* タイプの、合計 10 個の葉緑体型 Trx のアイソフォームを持っている（第 1 章の図 1-13）。また、それらのオルソログは、アミノ酸配列の類似性をもとに他の植物でも見つかっている (79, 80)。本研究では、様々な植物の葉緑体型 Trx のアミノ酸配列を比較することで、5 つのタイプの葉緑体型 Trx それぞれに特異的に保存されている残基（例えば、Trx-*f* には保存されているがその他のタイプの Trx には保存されていないもの）を探索した。その結果、図 2-2A に示すようにそれぞれのタイプ特異的に保存されている残基を同定し、15 個の残基が Trx-*f* 特異的に保存されていることがわかった（図 2-2A-C のマゼンタで示された残基）。これらの残基は、立体構造上では活性部位近傍の分子表面に位置しており（図 2-2B、C）、標的との相互作用に関わっている可能性が高い。

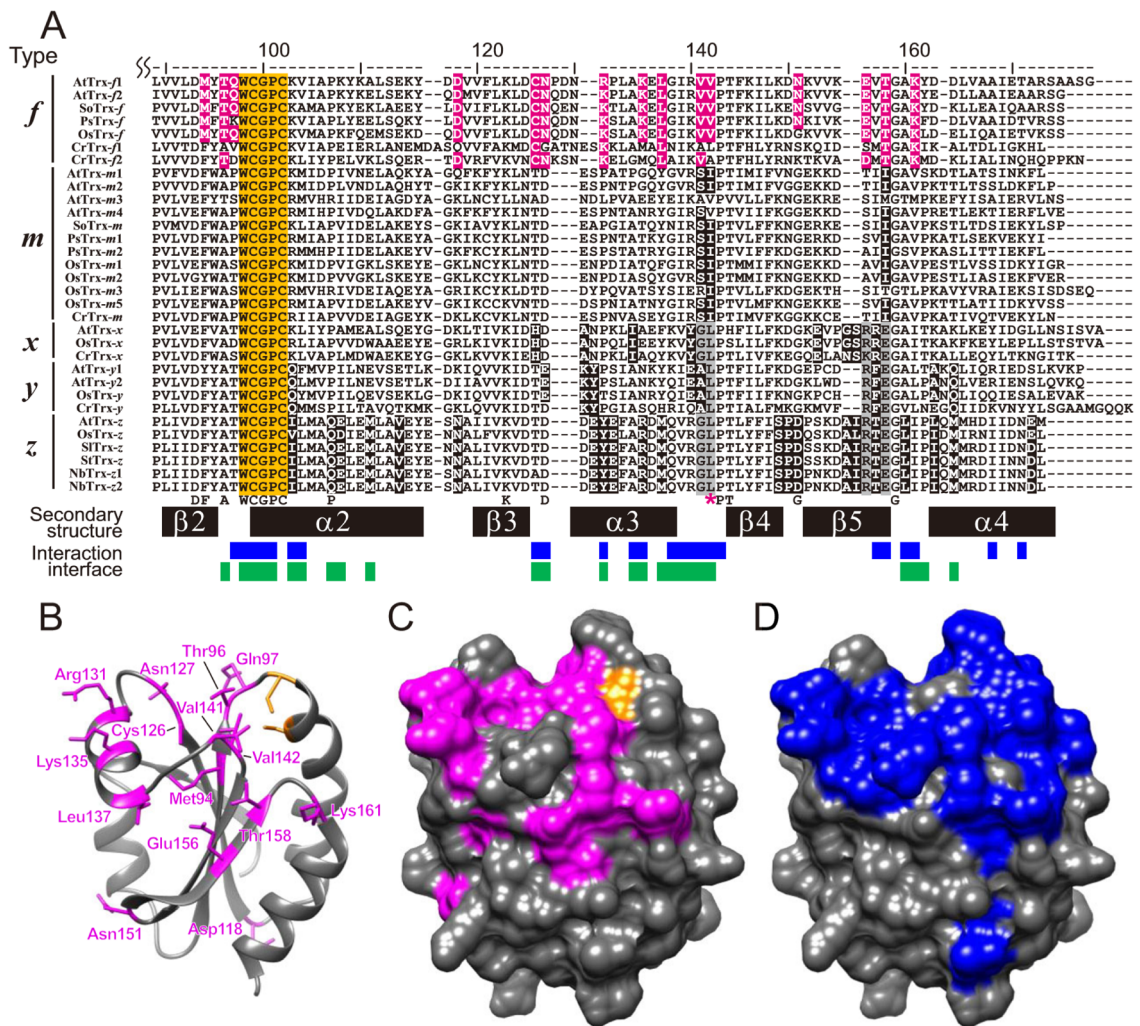


図 2-2. それぞれのタイプの葉緑体型 Trx 特異的に保存されている残基

図 2-2. (続き)

(A) 様々な植物が持つ葉緑体型 Trx のアミノ酸配列の比較。配列比較に用いた Trx のアクセッション番号と由来する生物種は、表 2-1 に示されている。配列の上の数字は、*A. thaliana* 由来の Trx-f1 (AtTrx-f1) の、翻訳開始点の Met から数えた残基番号を示している。活性部位はオレンジ、それぞれのタイプの Trx 特異的に保存されている残基はマゼンタ (*f*タイプ) もしくは黒 (その他)、Trx-x、Trx-y、Trx-z の間で特異的に保存されている残基は灰色で塗られている。アライメント結果の下に示されているアルファベットは Trx に広く保存されている残基 (2)、アスタリスクは *cisPro-1* の残基 (85) を示している。“Secondary structure” には、SoTrx-f の結晶構造 (PDBID: 1F9M) における二次構造が示されている。“Interaction interface” は、標的タンパク質 (青のバー) または TrxR (緑のバー) との推定相互作用部位を示している。(B-D) AtTrx-f1 の立体構造モデル。(B、C) 活性部位はオレンジ、Trx-f 特異的な残基はマゼンタで示されている。(D) 標的タンパク質との推定相互作用部位が青色で示されている。

葉緑体型の Trx と標的の複合体構造はまだわかっていないが、これまでに決定された葉緑体型以外の Trx と標的の複合体構造をもとに、Trx と標的の相互作用面を推定した。用いた構造やプログラムは、実験方法に示されている。その結果、図 2-2A の Interaction interface の青色のバーで示す残基が、標的との相互作用面であることが示唆された。これを、*A. thaliana* の Trx-f1 の立体構造上に表示したのが図 2-2D である。また、同様にして、Trx と Trx を還元する Trx reductase (TrxR) との相互作用面を推定した結果が、図 2-2A の Interaction interface に緑色のバーで示されている。これらの結果は、*f*タイプを含む、それぞれのタイプの Trx 特異的に保存されている残基の多くが、標的や TrxR と相互作用すると推定される領域に存在していることを示唆している。葉緑体内の TrxR である FTR による Trx の還元は、レドックス制御機構において律速になっておらず (37)、Trx と FTR の相互作用のしやすさの違いがレドックス制御機構全体に及ぼす影響は少ないと考えられるため、本研究では Trx と標的の相互作用にのみ注目した。

Trx-z 特異的な残基は、標的との相互作用面以外にも多数存在している。Trx-z は、葉緑体内の RNA ポリメラーゼのひとつである plastid-encoded RNA polymerase (PEP) の構成要素としてはたらくため (65, 81-84)、これらの Trx-z 特異的な残基は PEP 複合体中での相互作用に重要な役割を果たしている可能性がある。

2-3-2. Trx-f 特異的な残基への変異導入が標的選択性に及ぼす影響

2-3-1 で同定したそれぞれのタイプの Trx 特異的な残基が、標的選択性に関わっているかどうかを確かめるため、本研究では *A. thaliana* の Trx-f1 が持つ Trx-f 特異的な残基にそれぞれ点変異を導入し、それらの変異が標的選択性に及ぼす影響を調べた。Met94、Thr96、Asn127、Leu137、Asn151 は、それらに対応する残基がその他のタイプの Trx ではほぼ保存されているため、その他のタイプの Trx の対応する残基に置換した。また、7つの親水性残基 (Gln97、Asp118、Arg131、Lys135、Glu156、Thr158、Lys161) は Ala に、1つの疎水性残基 (Val141) は Ser に、Cys126 は Ala と Ser の両方に置換した。

さらに、Trx-*f* 特異的な残基のいくつかは、Trx に広く保存されていると言われている残基の位置（図 2-2A のアライメント結果の下のアルファベット）（2）にも存在している。特に興味深いのが、*cisPro*-1（図 2-2A のアライメント結果の下のアスタリスク）（85）に位置する、Val142 である。Trx では、*cisPro*-1 の位置には Ile が広く保存されていること、またこの位置の残基は Trx ファミリータンパク質の性質に大きく関わるということが知られている（85）。しかし、Trx-*f* では Val、Trx-*m* では Ile、Trx-*x*、Trx-*y*、Trx-*z* では Leu が保存されており（図 2-2A）、さらに TrxL2 では Met（80）、NTRC では Thr が保存されている（図 2-3）。このことから、*cisPro*-1 の残基が葉緑体型の Trx や Trx-like タンパク質の性質に大きく関わっている可能性があると考え、Trx-*f*1 の Val142 にも変異を導入した。これまでの研究によって、TrxL2 は FBPase などの Trx-*f* 特異的な標的を還元できないことがわかっている（50）、Trx-*f*1 の Val142 は TrxL2 の *cisPro*-1 残基である Met に置換した。以上の Trx-*f*1 変異体のうち、Met94、Asp118、Leu137 の変異体は不溶化しやすく精製が困難であったため、その他の変異体を用いて以降の実験を行った。



図 2-3. NTRC の Trx ドメインに保存された *cisPro*-1 残基

AtTrx-*f*1 と様々な植物が持つ NTRC の Trx ドメインのアミノ酸配列の比較。配列比較に用いた NTRC のアクセッション番号と由来する生物種は、表 2-1 に示されている。配列の上の数字は、*A. thaliana* 由来の NTRC (AtNTRC) の、翻訳開始点の Met から数えた残基番号を示している。活性部位はオレンジ、*cisPro*-1 残基はマゼンタで示されている。

本研究の目的は、Trx の活性そのものではなく、標的選択性に関わる残基を同定することである。そのため、まず 2 つの方法で、作製した Trx-*f*1 変異体の Trx としての活性が変わっていないことを確かめた。まず、Trx-*f*1 変異体の中間酸化還元電位 (E_m) を調べた。 E_m は、主に酸化還元反応が起こる方向（酸化もしくは還元）を決定する熱力学的パラメータであり（86）、Trx ファミリータンパク質の E_m と反応の方向性には相関があることが知られている（85）。また、葉緑体型 Trx の還元酵素である FTR による Trx の還元速度と E_m の間には、明確な相関が見られることがわかっている（87）。そのため、

もし Trx-f1 の E_m が変異導入によって大幅に変わると、Trx としての活性が変化してしまう可能性がある。そこで、Trx-f1 の変異体の E_m が葉緑体型 Trx の E_m の範囲 (-335 から -276 mV) (33, 87) に収まっているかどうかを調べた。その結果、酸化還元電位が -335 mV のバッファー中では全ての変異体が半分以上還元され、逆に酸化還元電位が -276 mV のバッファー中では全ての変異体が半分以上酸化されていた (図 2-4)。また、WT の Trx-f1 の中間酸化還元電位 (-321 mV) では、ほとんどの変異体が WT と同様に約半分還元されていた。このことから、導入した変異が E_m に及ぼす影響は小さく、Trx-f1 変異体の E_m が葉緑体型 Trx の E_m の範囲に収まっていることがわかった。

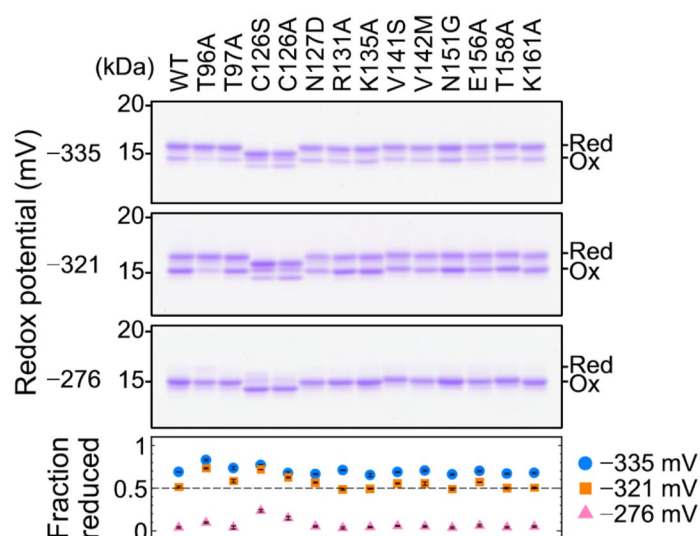


図 2-4. Trx-f1 変異体の中間酸化還元電位

それぞれの Trx-f1 変異体を、酸化還元電位が -335 、 -321 、 -276 mV の DTT バッファー (pH 7.5) 中でインキュベートした。その後、チオール基修飾法によって還元型 (Red) と酸化型 (Ox) のタンパク質を分離し、酸化還元状態を決定した。値は平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n = 3$) で示されている。

次に、インシュリンに対する還元活性を調べた。インシュリンは、葉緑体型 Trx の本来の標的ではないが、一般的にどの Trx にも還元されることが知られているため、Trx 活性の測定に広く用いられている (77)。Trx-f1 変異体のインシュリン還元活性は、WT に比べて多少増減していたものの、一番小さいものでも WT の 87%の活性を維持していた (図 2-5)。T96A 変異体は、WT の 210%の活性を示したため、Trx としての活性が上昇している可能性がある。しかし、これらの結果から、少なくとも変異導入による失活は起こっていないことがわかった。

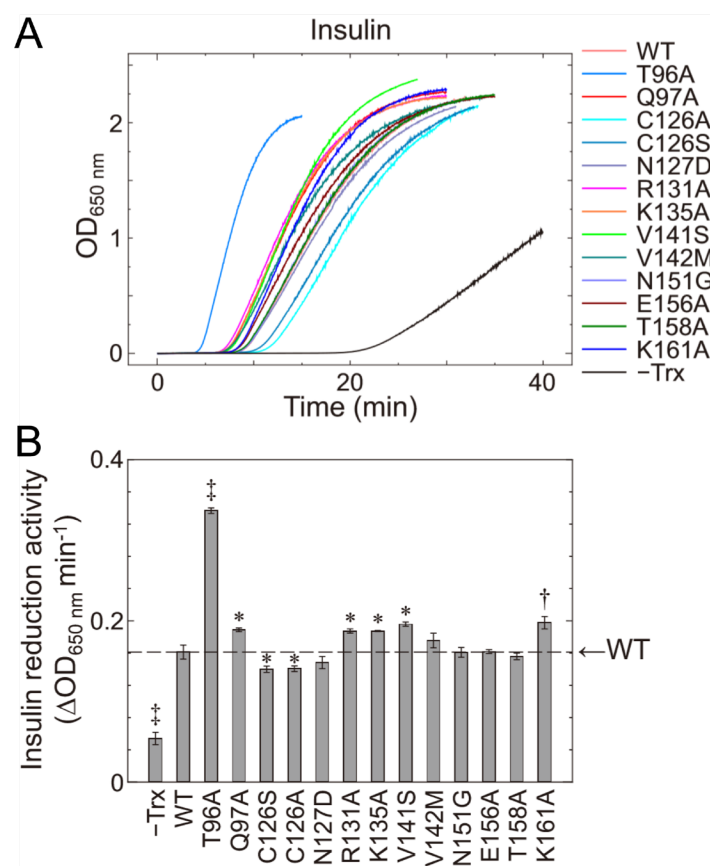


図 2-5. Trx-f1 変異体のインシュリン還元活性

(A) Trx-f1 変異体によるインシュリン還元。Trx によるインシュリンの還元によって生じる沈殿を、OD_{650 nm} で測定した。(B) Trx-f1 変異体のインシュリン還元活性の比較。A のデータの直線部分 (0.2 < OD_{650 nm} < 0.8) から傾きを算出し、インシュリン還元活性として用いた。値は平均値 ± 標準偏差 (n = 3) で示されている。記号は、WT とそれぞれの変異体の値の間の有意差 (Welch の *t* 検定、*: *P* < 0.05、†: *P* < 0.01、‡: *P* < 0.001) を示している。

そこで、Trx-*f* 特異的な標的である FBPase と CROST1 に対する還元活性を調べることで、Trx-*f* 特異的な標的の認識に必要な残基を特定することにした。図 2-6A は、FBPase の還元率をチオール基修飾法によって決定する際に得た電気泳動像、図 2-6B は、図 2-6A の泳動像から算出した FBPase の還元率の経時変化と、蛍光によって測定した CROST1 の還元率の経時変化、図 2-6C は、図 2-6B のデータを式 1 にフィッティングして得た Trx の標的還元活性の指標となる反応速度定数を、棒グラフで示したものである。図 2-6C から、ほとんどの Trx-f1 変異体において、標的還元活性が低下していることがわかる。また、変異が及ぼす影響は、FBPase の還元において特に顕著であった。N151G を除くすべての変異体で還元活性の低下が見られ、インシュリン還元活性が WT の 2 倍以上である T96A も、FBPase 還元活性は WT と比べて有意に低かった。N151G の変異を導入した Asn151 は、立体構造上では活性部位とは逆側の分子表面に位置しているため (図 2-2B)、標的の認識には関わっていないものと考えられる。これらの結果から、

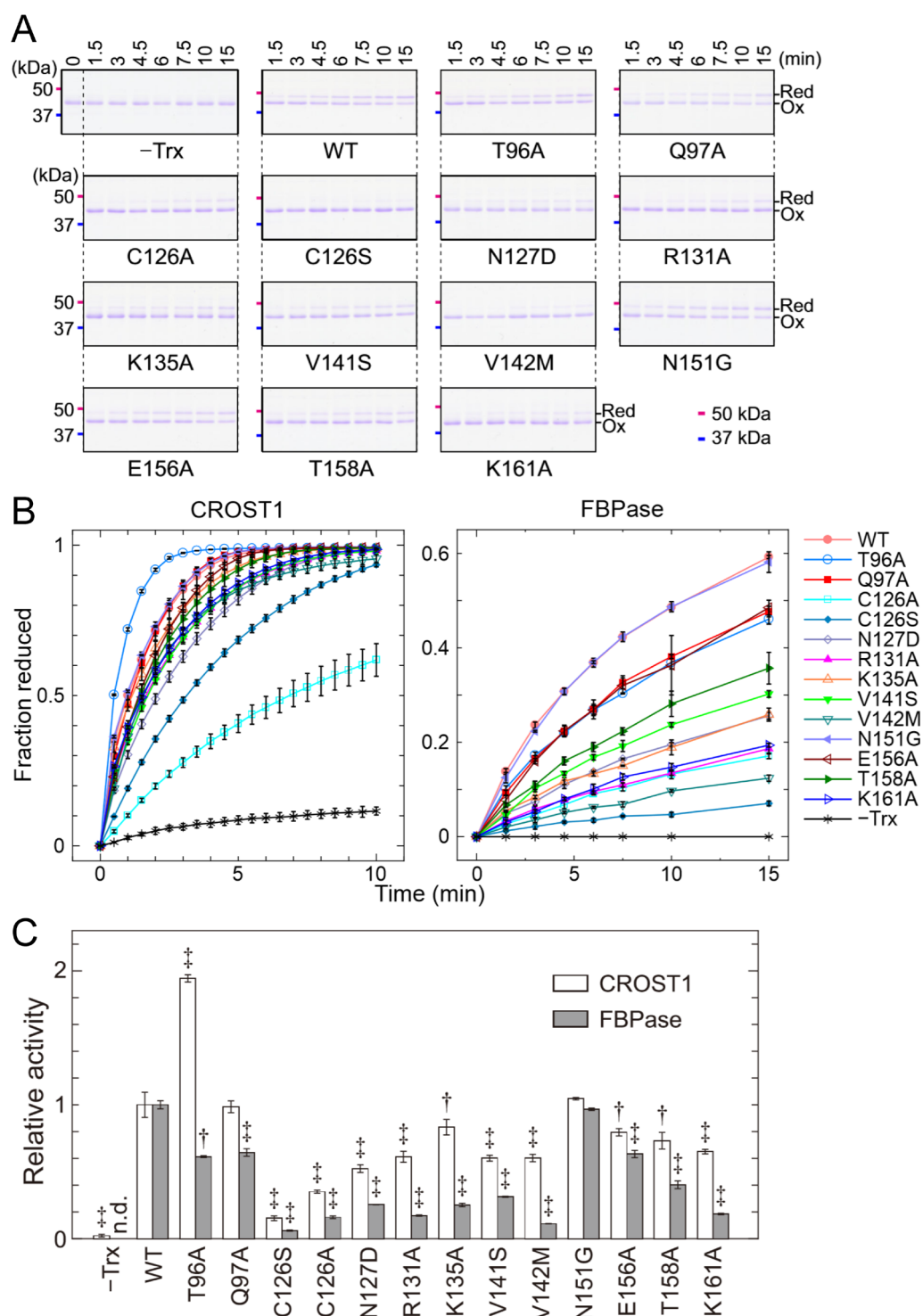


図 2-6. Trx-*fl* 変異体の CROST1・FBpase 還元活性

(A) FBpase の酸化還元状態の決定。FBpase (1 μ M) を、0.5 mM DTT_{red}、0.1 μ M Trx とともにインキュベートし、それぞれの反応時間における FBpase の還元率を、チオール基修飾法によって決定した。(B) CROST1 と FBpase の還元率の経時変化。CROST1 (0.1 μ M) を、0.1 mM DTT_{red}、0.03 μ M Trx とともにインキュベートし、それぞれの反応時間における CROST1 の還元率を実験方法 2-2-7 に従って求め、プロットした。FBpase については、A で求めた FBpase の還元率をプロット

図 2-6. (続き)

した。値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n \geq 3$) の形で示されている。(C) Trx-f1 (WT) と Trx-f1 変異体の CROST1 および FBPase 還元活性の比較。B のデータを、式 1 (実験方法 2-2-6) にフィッティングし、還元活性の指標となる反応速度定数 k ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$) を求めた。得られた値を、WT の値 (CROST1 : $23.8 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ 、FBPase : $0.862 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$) を用いてノーマライズし、平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n \geq 3$) の形で示した。記号は、WT とそれぞれの変異体の値の間の有意差 (Welch の t 検定、 $\dagger$: $P < 0.01$ 、 $\ddagger$: $P < 0.001$) を示している。n. d. : not detected。

Trx-f 特異的な残基のうち、変異体を作製できなかった 3 残基 (Met94、Asp118、Leu137) と Asn151 を除く全ての残基が、Trx-f の標的選択性に関わっていることがわかった。本論文では、以後、これらの残基を Trx-f の標的認識残基と呼ぶことにする。

2-3-3. 動的な複合体構造中での Trx-f1 と FBPase の相互作用

本研究で明らかにした残基が標的と相互作用し得るのかを確かめる方法としては、Trx-f と標的の複合体構造を調べるのが最も直接的である。しかし、上述のように、葉緑体型の Trx と標的の複合体構造はこれまでに明らかになっていない。そこで、ドッキングシミュレーションと分子動力学シミュレーション (MD) を用いて、Trx-f1/FBPase 複合体の動的構造モデルを構築した。300 ns の MD における代表構造を、図 2-7A に示す。得られた構造モデルから、Trx-f1 (灰色) の標的認識残基 (スティック表示されている残基) が、FBPase のレドックス制御部位を含む挿入配列 (ピンク) の方向に露出していることがわかる。このことから、2-3-2 で同定した Trx-f の標的認識残基が FBPase と相互作用し得るということを確認することができた。

さらに、MD 中の、Trx-f の標的認識残基と FBPase との距離 ($d_{\min}$) を調べた。その結果、Trx-f の標的認識残基のうち、Thr96、Arg131、Val141、Val142 はほぼ常時 FBPase と相互作用している ($d_{\min} < 4 \text{ \AA}$) ことがわかった (図 2-7B)。一方、その他の残基と FBPase との距離は変動が激しく、相互作用し続けてはいなかった。これは、FBPase を含む標的のレドックス制御部位が、主にフレキシブルなループ上に存在しているためであると考えられる (44)。また、それぞれの残基の、MD における FBPase との相互作用時間と、図 2-6C の生化学的解析結果から推測される FBPase 還元活性への影響の大きさには、相関が見られなかった。このことは、絶えず変化する複合体構造中である瞬間にのみ相互作用する残基も、酸化還元反応を行う上で重要であることを示唆している。以上の結果は、Trx と標的の相互作用を解析する上では、剛体ドッキングシミュレーションや結晶構造解析から得られる静的かつ限定的な構造よりも、MD や核磁気共鳴解析から得られる動的な構造の方がより有用であることを示唆している。

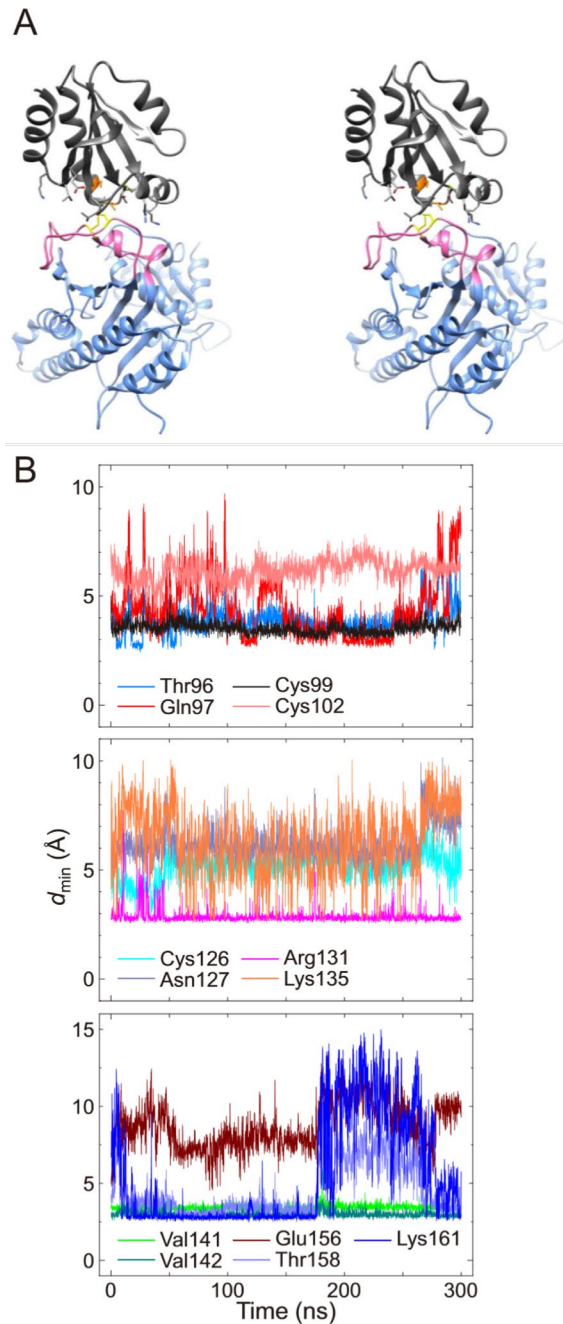


図 2-7. MD による Trx-f1 と FB Pase の複合体構造予測

実験方法 2-2-1 に従って得た Trx-f1 と FB Pase の複合体構造モデルを用いて、300 ns の MD を行った。(A) MD 中の代表構造 (stereo view)。灰色の分子は Trx-f1、シアン色の分子は FB Pase であり、FB Pase のレドックス制御部位を含む挿入配列はピンク色で示されている。また、Trx-f1 の活性部位の Cys (オレンジ色) と標的認識残基 (灰色)、FB Pase のレドックス制御部位の Cys (黄色) はスティック表示されている。(B) Trx-f1 の標的認識残基と FB Pase 間の距離の動態。Trx-f1 の活性部位の Cys (Cys99 と Cys102) と、それぞれの標的認識残基について、FB Pase との間で最も近い重原子間の距離 ($d_{\min}$) を求めてプロットした。

2-3-4. Trx-*m* への Trx-*f* の標的認識残基の導入

Trx-*m* は、本来、Trx-*f* 特異的な標的である CROST1 や FBPase を還元することはできない (21, 33)。その Trx-*m* に Trx-*f* の標的認識残基を導入し、CROST1 や FBPase を還元できるようにすれば、Trx-*f* の標的認識残基の重要性を裏付けることができるものと考えられる。そこで、Trx-*f* の標的認識残基をアミノ酸配列上で近傍に存在する 4 つの部分に分けて、それぞれを *A. thaliana* 由来の Trx-*m2* に導入した変異体を作製した (図 2-8A)。

Trx-*m2*_{T135C/D136N/P139R/G143K} (Trx-*m2*₁₃₅₋₁₄₃)、 Trx-*m2*_{S152V/I153V} (Trx-*m2*₁₅₂₋₁₅₃)、 Trx-*m2*_{T167E/I169T/V172K} (Trx-*m2*₁₆₇₋₁₇₂) の組換えタンパク質は、それぞれ安定に精製することができた。しかし、Trx-*m2*_{A104T/P105Q} (Trx-*m2*₁₀₄₋₁₀₅) は不溶化しやすく精製が困難で、測定に用いることができなかった。また、Ala104 と Pro105 に対応する残基以外の全ての Trx-*f* の標的認識残基の影響を調べるため、Trx-*m2*_{T135C/D136N/P139R/G143K/S152V/I153V/T167E/I169T/V172K} (Trx-*m2*₁₃₅₋₁₇₂) も作製して測定に用いた。その結果、WT ではほとんど活性を示さなかった Trx-*m2* が、Trx-*f* の標的認識残基の導入により CROST1 を還元できるようになった (図 2-8B、C)。FBPase の還元においても同様の傾向が見られ (図 2-8D)、Trx-*f* の標的認識残基が確かに Trx-*f* 特異的な標的の認識に関わっていることを確認することができた。また、Trx-*m2*₁₃₅₋₁₄₃ において比較的高い活性が確認されたことから (図 2-8C、D)、Trx の 3 番目のαヘリックスに存在するこれらの残基 (Trx-*f1* では Cys126、Asn127、Arg131、Lys135) が、特に標的選択性において重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし、導入可能な全ての変異を導入した変異体 (Trx-*m2*₁₃₅₋₁₇₂) も、Trx-*f1* ほど高い活性は示さなかったことから (図 2-8C、D)、変異体タンパク質を作製することができなかった Trx-*f* の標的認識残基 (Ala104 と Pro105) も、やはり標的選択性に寄与しているものと予想される。

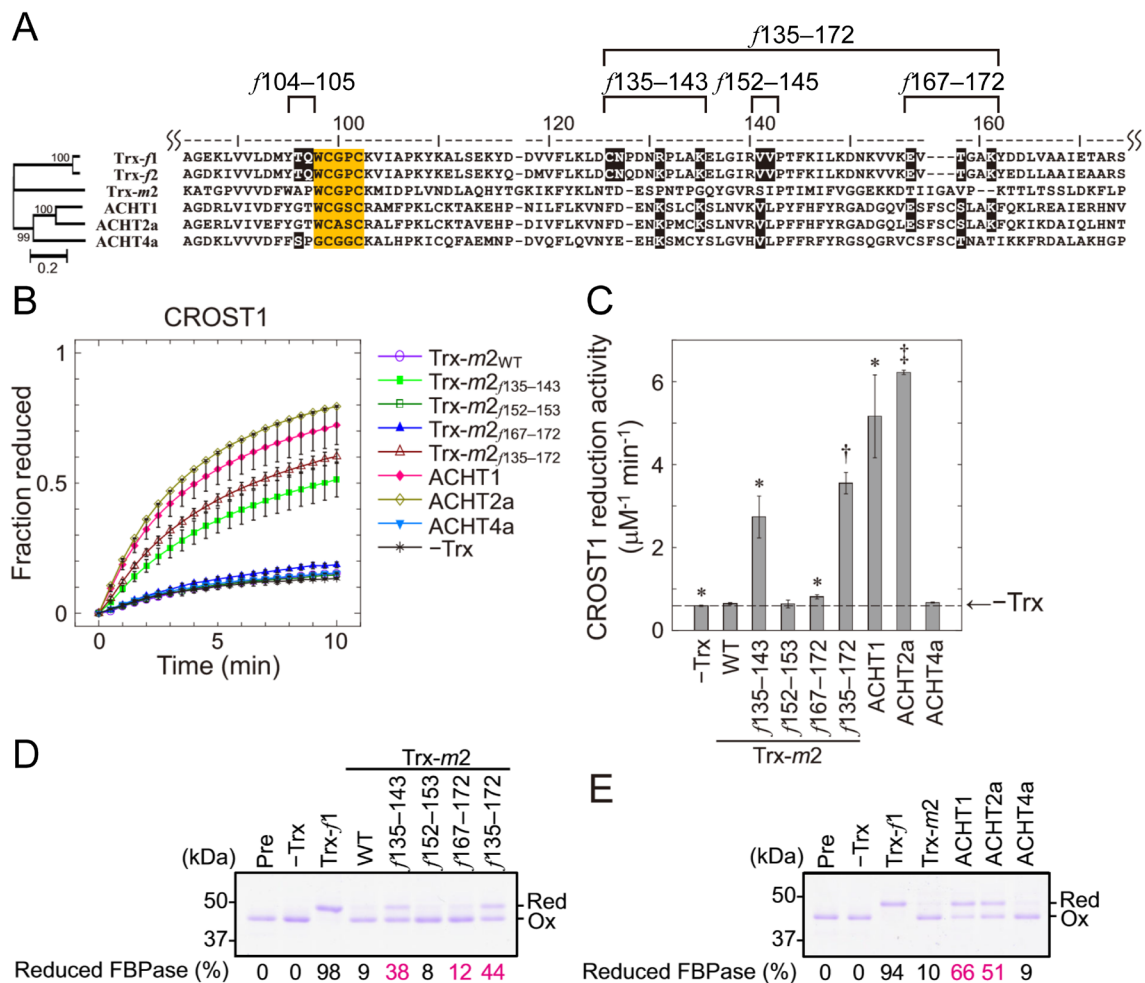


図 2-8. Trx-*m2* 変異体と ACHT による Trx-*f* 特異的な標的の還元

(A) シロイヌナズナが持つ Trx-*f*、Trx-*m* および ACHT の配列比較。活性部位はオレンジ、Trx-*f* の標的認識残基は黒塗りで示されている。配列の上には、それぞれの Trx-*m2* 変異体に導入した標的認識残基の領域と、Trx-*f* の翻訳開始点の Met から数えた残基番号が示されている。また、アライメント結果の左側には、系統樹とブートストラップによって得られた値 (%) が示されている。(B) CROST1 の還元率の経時変化。CROST1 (0.1 μ M) を、0.1 mM DTT_{red}、0.03 μ M Trx または ACHT とともにインキュベートし、それぞれの反応時間における CROST1 の還元率を実験方法 2-2-7 に従って求め、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。(C) Trx-*m2* 変異体と ACHT の CROST1 還元活性。B のデータを、式 1 (実験方法 2-2-6) にフィッティングし、反応速度定数 k (μ M⁻¹ min⁻¹) を求めた。値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n = 3$) の形で示されている。記号は、WT とそれぞれの変異体の値の間の有意差 (Welch の t 検定、* : $P < 0.05$ 、† : $P < 0.01$ 、‡ : $P < 0.001$) を示している。(D) Trx-*m2* 変異体および (E) ACHT による FBPase の還元。FBPase (1 μ M) を、0.5 mM DTT_{red}、2 μ M Trx または ACHT とともに 30 min インキュベートした後、チオール基修飾法によって FBPase の還元率を決定した。FBPase の還元率は、泳動図の各レーンの下に示されている。

2-3-5. ACHT1 および ACHT2a による Trx-*f* 特異的な標的の還元

Trx-*f* の標的認識残基の普遍性をさらに考察するため、Trx-like タンパク質に注目して研究を行った。Trx-like タンパク質は、Trx と比べて研究が遅れており、どのようなタンパク質を標的として、生体内でどのように機能するのかがこれまでほとんど明らかにされていない。そこで、本研究で同定した Trx-*f* の標的認識残基の情報を用いることで、Trx-like タンパク質の標的や標的選択性を推測しようと考えた。具体的には、Trx-*f* と同様の標的認識残基をもつ Trx-like タンパク質が、Trx-*f* 特異的な標的を還元できるかどうかを調べた。*A. thaliana* の Trx-like タンパク質のアミノ酸配列を調べたところ、ACHT1 および ACHT2a が多くの Trx-*f* の標的認識残基を持つことがわかった (図 2-8A)。一方、同じ ACHT に分類される ACHT4a は、ACHT1 や ACHT2a に比べて持っている Trx-*f* の標的認識残基が少ないこともわかった。

そこで、CROST1 と FBPase に対する ACHT1、ACHT2a、および ACHT4a の還元活性を調べたところ、ACHT1 と ACHT2a はどちらの標的も還元することができたが、ACHT4a はどちらの標的も還元することができなかった (図 2-8B、C、E)。以上の結果から、標的選択性における Trx-*f* の標的認識残基の重要性がさらに裏付けられ、また Trx-like タンパク質でも Trx と同様の残基が標的選択性に関わっていることが示唆された。

2-3-6. ACHT1 および ACHT2a による Trx-*f* 特異的な標的の酸化

第 1 章で述べたように、ごく最近、Trx-like タンパク質が酸化因子としてはたらくことを示唆する結果が複数報告された (50, 53, 88)。そこで、ACHT1、ACHT2a、および ACHT4a が酸化因子としてはたらし得るのかを調べるため、これらのタンパク質の E_m を調べた。 E_m は、先述したように、酸化還元反応の方向性を決めるパラメータである。その結果、ACHT1 および ACHT2a の pH 7.5 における E_m は、それぞれ -252、-247 mV であることがわかった (図 2-9A)。ACHT4a については、複数のジスルフィド結合に由来すると思われる複雑なバンドシフトパターンが現れたため、 E_m を求めることができなかったが、電気泳動像に見られる傾向は ACHT1 や ACHT2a と同様であった (図 2-9B)。本研究で決定した ACHT1 と ACHT2a の E_m を、先行研究 (33, 50, 87) で得られた他の Trx や Trx-like タンパク質の E_m と比較したところ、ACHT1 および ACHT2a の E_m は葉緑体型 Trx よりも高く、酸化因子としてはたらく TrxL2 と同程度であることがわかった (図 2-9C)。すなわち、ACHT も酸化因子として機能すると推測された。

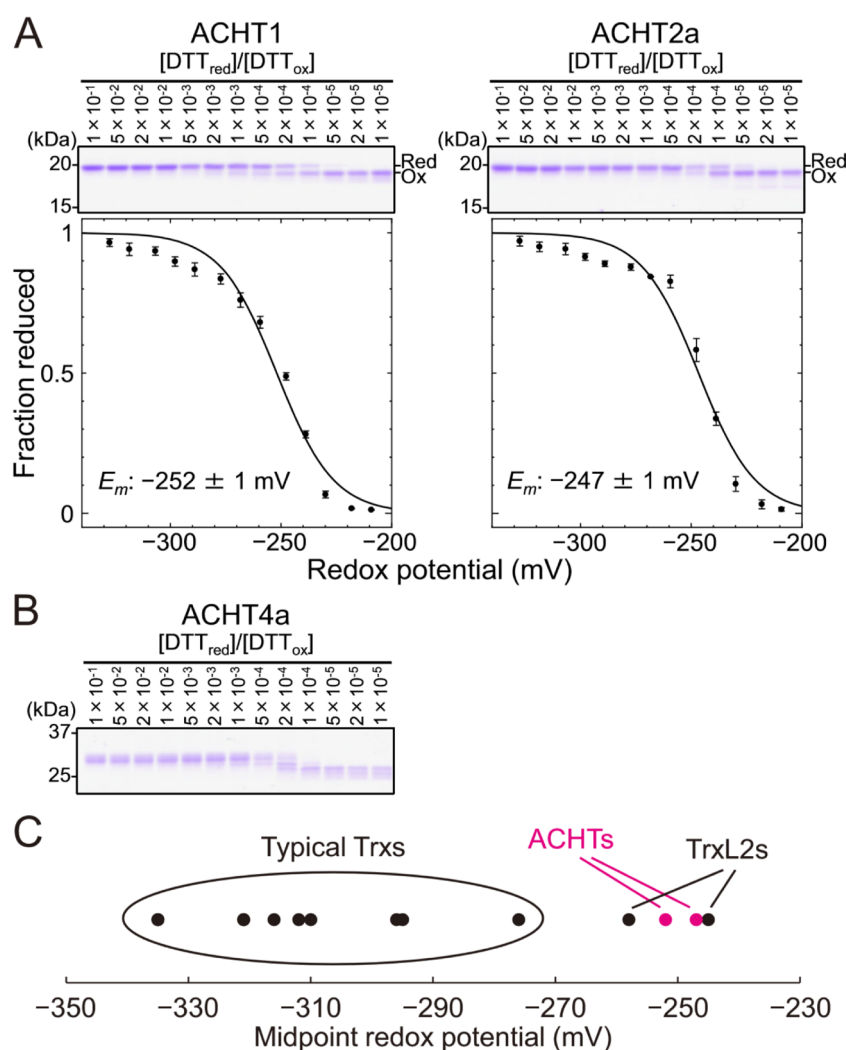


図 2-9. ACHT の E_m

(A) ACHT1、ACHT2a、および (B) ACHT4a の E_m 測定。実験方法 2-2-8 に従って、各酸化還元電位における ACHT の還元率を求め、ネルンストの式にフィッティングした。フィッティングによって得られた E_m の値は、各グラフ中に示されている。グラフの各点および E_m の値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n = 3$) の形で示されている。ACHT4 については、SDS-PAGE によって複数のバンドシフトパターンが確認され、活性部位の Cys ペアの還元率を決定できなかったため、 E_m を求めることはできなかった。(C) ACHT の E_m と葉緑体型 Trx や TrxL2 の E_m の比較。本研究で得られた ACHT1 および ACHT2a の E_m と、先行研究 (33, 50, 87) において本研究と同様に決定された葉緑体型 Trx および TrxL2 の E_m の値をプロットした。

これまでの結果から、ACHT1 および ACHT2a が、Trx-*f* 特異的な標的と物理的に相互作用してジスルフィド交換反応を行うこと、また酸化因子としてはたらく TrxL2 と同程度の E_m を持つことがわかった。これらの結果から、ACHT1 および ACHT2a は、Trx-*f* 特異的な標的を効率よく酸化することが予想された。実際に CROST1 の酸化実験を行ったところ、ACHT1 および ACHT2a による CROST1 の酸化速度は、Trx-*f*1 や ACHT4a に比べてかなり速かった (図 2-10A)。10 分の 1 量 (0.1 μ M) の ACHT1 または ACHT2a

を用いた場合も、Trx-*f*1 や ACHT4a に比べて酸化速度が速かったことから、ACHT1 や ACHT2a による酸化は 10 倍以上速いと考えられる。

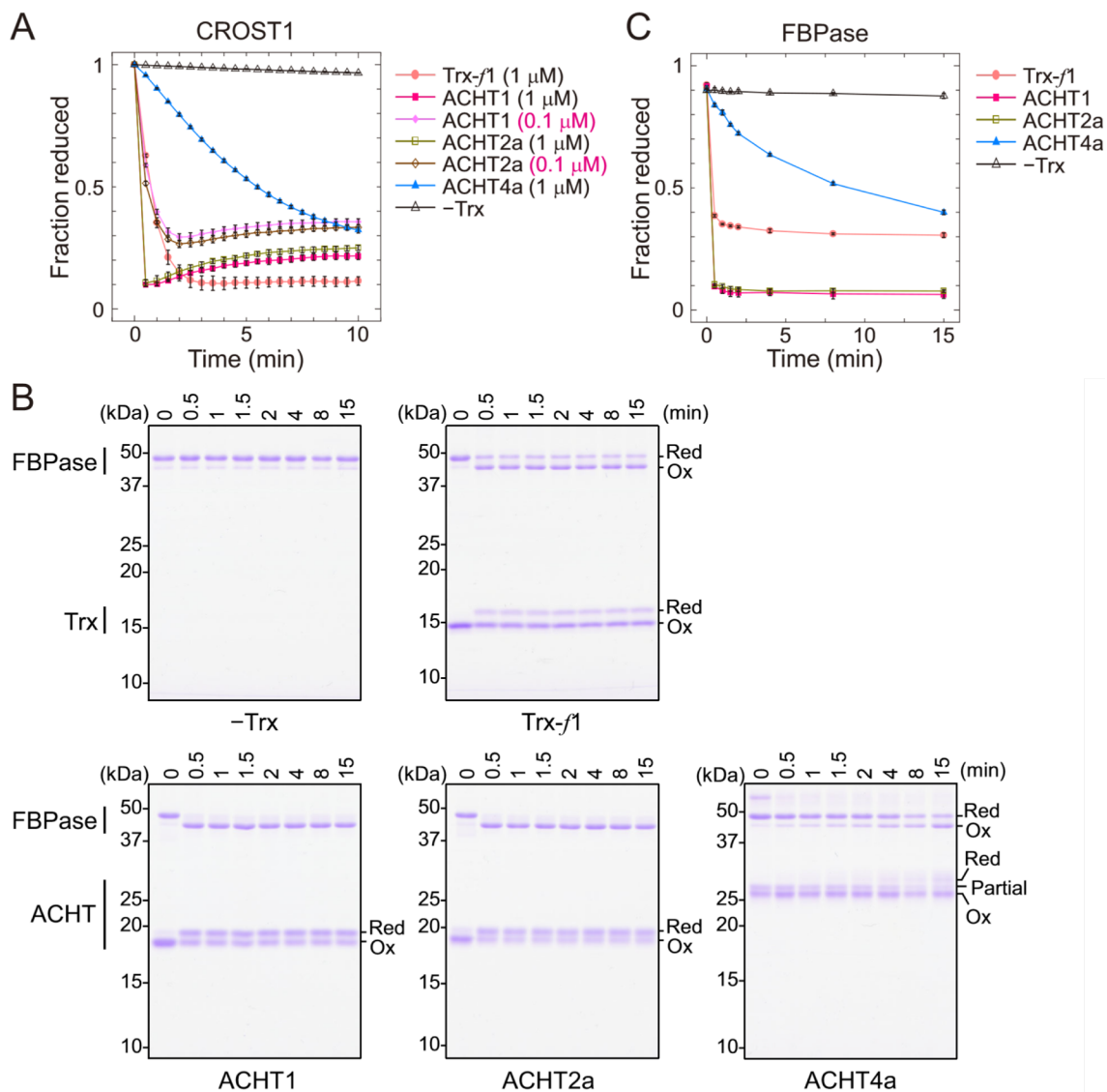


図 2-10. Trx-*f*1 および ACHT による Trx-*f* 特異的標的の酸化

(A) Trx-*f*1 および ACHT 依存的な酸化による CROST1 還元率の経時変化。あらかじめ還元した CROST1 (0.1 μ M) を、50 mM DTT_{ox}を含む溶液中で、1 μ M の Trx-*f*1 または ACHT、または 0.1 μ M の ACHT1 または ACHT2a とともにインキュベートした。それぞれの反応時間における CROST1 の還元率を、実験方法 2-2-7 に従って求め、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。(B) FBPase の酸化還元状態の決定。あらかじめ還元した FBPase (2 μ M) を、2 μ M の酸化型 Trx-*f*1 または ACHT とともにインキュベートし、それぞれの反応時間における FBPase の還元率を、チオール基修飾法によって決定した。(C) Trx-*f*1 および ACHT 依存的な酸化による FBPase 還元率の経時変化。B で求めた FBPase の還元率をプロットした。値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n = 3$) の形で示されている。

FBPase の酸化については、Trx-f1 と ACHT1、ACHT2a のいずれを用いた場合も、30 sec でほぼ平衡状態に達した (図 2-10B、C)。しかし、平衡点における FBPase の還元率は、Trx-f1 を用いた場合は 60–70%であったのに対し、ACHT1 や ACHT2a を用いた場合は 90%以上であった。この差は、Trx-f1 と ACHT1 や ACHT2a との E_m の差を反映しているものと思われる。

ある酸化還元電位 E (mV) の溶液中における、中間酸化還元電位 E_m (mV) のタンパク質の酸化型と還元型の濃度比 $[\text{Protein}_{\text{Ox}}]/[\text{Protein}_{\text{Red}}]$ は、ネルンストの式

$$E \cdot 10^{-3} = E_m \cdot 10^{-3} + \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{Protein}_{\text{Ox}}]}{[\text{Protein}_{\text{Red}}]}$$

から算出することができる。ただし、 R は気体定数 ($\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$)、 T は温度 (K)、 z は移動電子数、 F はファラデー定数 (C mol^{-1}) を示している。従って、同じ溶液中で平衡状態にある FBPase と Trx の酸化還元状態の関係は、

$$\begin{aligned} E_{m\text{FBPase}} \cdot 10^{-3} + \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{FBPase}_{\text{Ox}}]}{[\text{FBPase}_{\text{Red}}]} &= E_{m\text{Trx}} \cdot 10^{-3} + \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{Trx}_{\text{Ox}}]}{[\text{Trx}_{\text{Red}}]} \\ \ln \left(\frac{[\text{FBPase}_{\text{Ox}}]}{[\text{FBPase}_{\text{Red}}]} \cdot \frac{[\text{Trx}_{\text{Red}}]}{[\text{Trx}_{\text{Ox}}]} \right) &= \frac{zF}{RT} (E_{m\text{Trx}} - E_{m\text{FBPase}}) \cdot 10^{-3} \\ \frac{[\text{FBPase}_{\text{Ox}}]}{[\text{FBPase}_{\text{Red}}]} \cdot \frac{[\text{Trx}_{\text{Red}}]}{[\text{Trx}_{\text{Ox}}]} &= e^{\frac{zF}{RT} (E_{m\text{Trx}} - E_{m\text{FBPase}}) \cdot 10^{-3}} \\ \frac{[\text{FBPase}_{\text{Total}}] - [\text{FBPase}_{\text{Red}}]}{[\text{FBPase}_{\text{Red}}]} &= \frac{[\text{Trx}_{\text{Total}}] - [\text{Trx}_{\text{Red}}]}{[\text{Trx}_{\text{Red}}]} e^{\frac{zF}{RT} (E_{m\text{Trx}} - E_{m\text{FBPase}}) \cdot 10^{-3}} \\ \frac{[\text{FBPase}_{\text{Red}}]}{[\text{FBPase}_{\text{Total}}]} &= \frac{1}{1 + \left(\frac{1}{\frac{[\text{Trx}_{\text{Red}}]}{[\text{Trx}_{\text{Total}}]}} - 1 \right) e^{\frac{zF}{RT} (E_{m\text{Trx}} - E_{m\text{FBPase}}) \cdot 10^{-3}}} \quad (\text{式 2}) \end{aligned}$$

と表すことができる。図 2-10B の実験では、 $R = 8.31$ 、 $T = 298$ 、 $z = 2$ 、 $F = 9.65 \times 10^4$ である。FBPase (ハウレンソウ由来) の E_m は、pH 8.0 において -350 mV である事がわかっており (89)、また pH が 1 増加すると E_m は 59 mV 低下することから (90)、pH 7.5 における FBPase の E_m は約 -321 mV であると推定される。Trx-f1 の pH 7.5 における E_m は -321 mV であり (33)、ACHT1 と ACHT2a の E_m はそれぞれ -252 mV と -247 mV であることがわかっている (図 2-9)。以上の値と式 2 に加え、図 2-10B の 15 min の点における Trx の還元率 ($[\text{Trx}_{\text{Red}}]/[\text{Trx}_{\text{Total}}]$) を用いて FBPase の還元率 ($[\text{FBPase}_{\text{Red}}]/[\text{FBPase}_{\text{Total}}]$) を推定し、FBPase の還元率の実測値と比較した (表 2-3)。その結果、Trx-f1 の場合は、実測値と推定値がほぼ一致した。ACHT1 や ACHT2a の場合は、実測値と測定値が 10 倍以上異なっていたが、絶対値では 6 から 7%の違いであった。これは、還元型の FBPase が極端に少ないために、測定誤差が大きくなったことが原因であると考えられる。いず

れにせよ、ACHT1 や ACHT2a は高い E_m を持つために、FBPase を効率よく酸化できることがわかった。

表 2-3. 平衡状態における FBPase の還元率の実測値と推定値の比較

Trx	Measured value ^a		Estimated value ^b
	[TrxRed]/[TrxTotal]	[FBPaseRed]/[FBPaseTotal]	[FBPaseRed]/[FBPaseTotal]
Trx- <i>f</i> 1	0.30	0.31	0.30
ACHT1	0.56	0.064	0.0059
ACHT2a	0.61	0.078	0.0049

^a 図 2-10B の 15 min の点における実測値

^b 式 2 と [TrxRed]/[TrxTotal] の実測値を用いて推定した FBPase の還元率

以上のように、ACHT1 や ACHT2a が CROST1 や FBPase を効率よく酸化できることがわかったが、これは先行研究 (50) で行われた同様の実験で TrxL2 を用いた場合と比べても高効率である。TrxL2 は、ACHT1 や ACHT2a に比べて持っている Trx-*f* の標的認識残基の数が少ないため (図 2-11)、CROST1 や FBPase とうまく相互作用できなかったものと考えられる。すなわち、以上の結果は、ACHT1 と ACHT2a が Trx-*f* 特異的な標的の効率のよい酸化因子であること、また、標的酸化の過程においても標的選択性が存在することを示唆している。

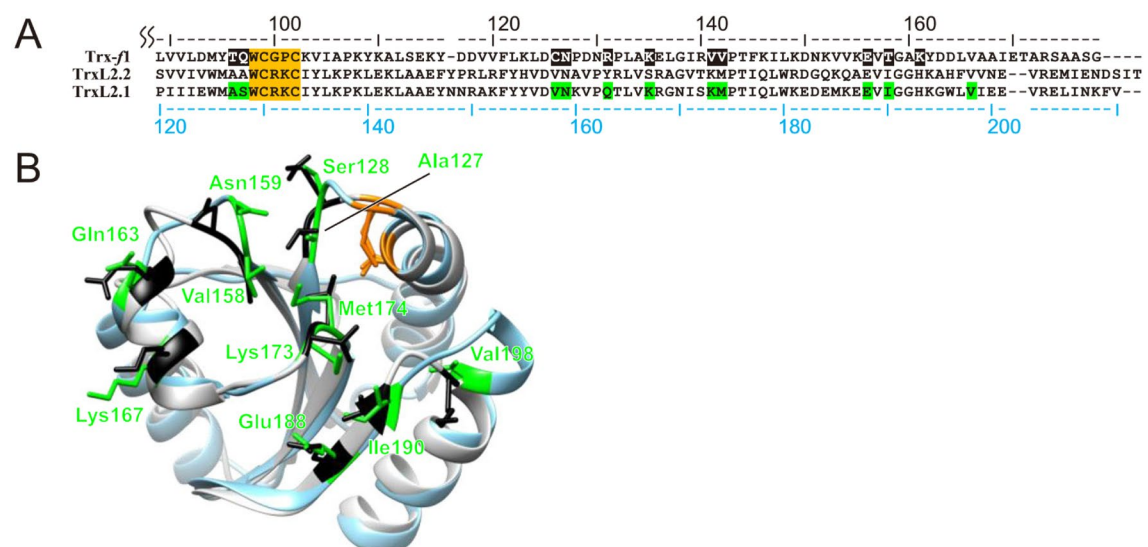


図 2-11. TrxL2 が持つ Trx-*f* の標的認識残基

(A) Trx-*f*1 と TrxL2. 1、TrxL2. 2 のアミノ酸配列比較。配列の上と下の数字は、それぞれ Trx-*f*1 と TrxL2. 1 の翻訳開始点の Met から数えた残基番号を示している。(B) Trx-*f*1 と TrxL2. 1 の立体構造モデルの比較。(A、B) 活性部位はオレンジ、Trx-*f*1 が持つ Trx-*f* の標的認識残基は黒、Trx-*f* の標的認識残基に対応する TrxL2. 1 の残基は緑色で示されている。

酸化因子として機能するタンパク質は、標的から受け取った還元力を、別のアクセプターに渡さなければならない。TrxL2 の場合は、2-Cys Prx を介して、最終的に H_2O_2 に還元力を渡すということが、先行研究から示唆されている（第 1 章の図 1-14）（50）。そこで、次に、ACHT1 や ACHT2a が 2-Cys Prx や PrxQ を介して H_2O_2 に還元力を渡し、 H_2O_2 を消去できるかどうかを調べた。本研究では、*A. thaliana* が持つ 2 つの 2-Cys Prx アイソフォームのうちのひとつである、2-Cys PrxA を用いた。その結果、ACHT1 や ACHT2a を用いた場合は 2-Cys PrxA による H_2O_2 の消去が速く、ACHT1 や ACHT2a の 2-Cys PrxA 還元活性が Trx-f1 と比べて高いことが示唆された（図 2-12）。2-Cys Prx は、生体内でも ACHT1 や ACHT2 と相互作用することが報告されているため（52, 53, 91）、生体内でも ACHT1 や ACHT2 の還元力アクセプターとしてはたらく可能性は十分にある。一方、アクセプターとして PrxQ を用いた場合は、ほとんど H_2O_2 を消去できなかった（図 2-12）。これまでの研究で、葉緑体内の Trx 標的タンパク質の酸化における、還元力の主要なアクセプターは 2-Cys Prx であることがわかっており（50, 51）、本研究で得られた結果はこれらの先行研究の結果と一致する。以上の結果は、ACHT1 および ACHT2a は Trx-f 特異的な標的の効率の良い酸化因子であり、標的から受け取った還元力を 2-Cys Prx を介して H_2O_2 に渡すことを示している（図 2-13）。

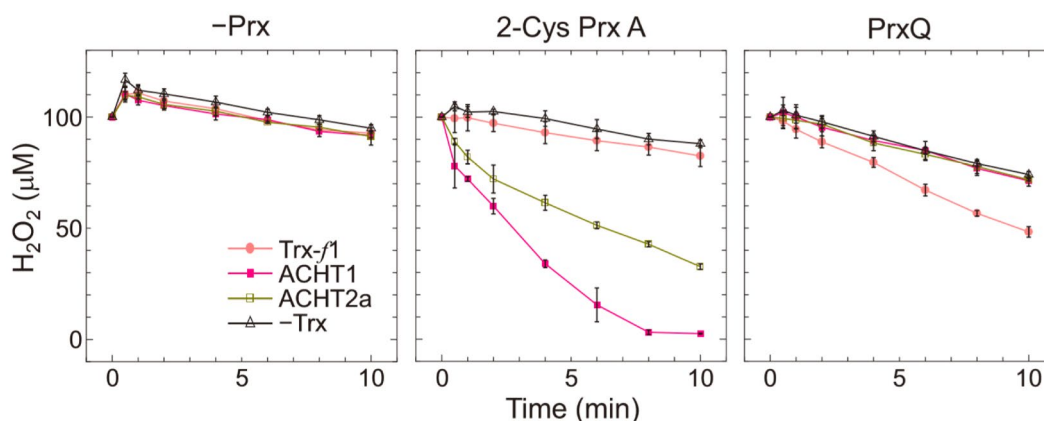


図 2-12. Prx による ACHT 依存的な H_2O_2 の消去

DTT_{red} (0.5 mM) と 100 μM H_2O_2 の存在下で、2 μM の Prx と 1 μM の Trx-f1 または ACHT をインキュベートした。それぞれの反応時間における溶液中の H_2O_2 を、キシレノールオレンジ分析によって定量し、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。

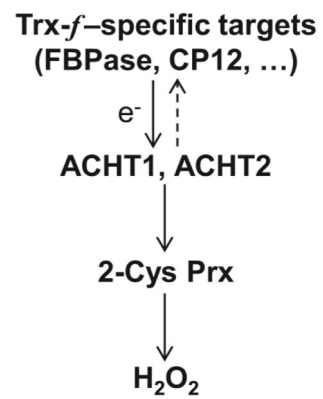


図 2-13. ACHT1 および ACHT2 を介したレドックスカスケードのモデル
実線の矢印は主要な電子の流れを、破線の矢印は低効率な電子の流れを示している。

2-4. 結論

まず、5つのタイプの葉緑体型 Trx それぞれに、特異的に保存されている残基を同定した (図 2-2A)。このうち、Trx-*f* 特異的に保存されている残基のほとんどが標的選択性に関わっていることを明らかにした (図 2-6-8)。このことから、*f* タイプ以外の Trx の標的選択性に関わる残基も、同様の方法で推測できる可能性がある。例えば、Trx-*y* は他のタイプの Trx に比べて、PrxQ や monodehydroascorbate reductase の還元活性が高いことがわかっているが (33, 92)、そのような Trx-*y* の標的選択性に関わる残基も、本研究で得られた知見をもとに今後調べていく必要がある。

また、本研究によって、Trx-*f* の標的認識残基を持つ Trx-like タンパク質である ACHT1 および ACHT2a (図 2-8A) が、Trx-*f* 特異的な標的 (CROST1 と FBPase) を効率よく酸化することが明らかになった (図 2-10)。酸化因子の標的選択性を直接的に示した例はこれまでなかったが、もし Trx-like タンパク質の多くが酸化因子としてはたらくならば、Trx よりも多くの種類が存在する Trx-like タンパク質 (図 1-13) の標的選択性は、より複雑であると予想される。そこで、本研究で Trx-*f* の標的認識残基から ACHT の標的選択性を推測したように、5つのタイプの Trx それぞれの標的認識残基を解明することで、Trx-like タンパク質の標的 (選択性) をアミノ酸配列から推測できるようになるものと期待している。

第 3 章

植物生体内における酸化因子と Trx-like タンパク質の役割

3-1. 本章の概要

葉緑体に存在する Trx 標的タンパク質は、明条件下では Trx に還元され、暗条件下では再び酸化型に戻る。標的の酸化を行う酸化因子については、長年議論がなされてきたが、最近の研究と本論文の第 2 章の生化学的解析により、TrxL2 や ACHT などの Trx-like タンパク質が標的を酸化することが示された。しかし、これらの Trx-like タンパク質が生体内においても酸化因子としてはたらくかどうかは、いまだにわかっていない。そこで、本研究では、ゲノム編集技術を用いてこれらの Trx-like タンパク質の欠損株を作製し、これらの Trx-like タンパク質が酸化因子としてはたらくことを示した。また、それぞれの Trx-like タンパク質が、葉緑体内の様々な生理機能の制御に関わることを示唆する結果を得た。

第 4 章

NADP-MDH のレドックス制御の生理的役割の解明

4-1. 本章の概要

葉緑体に存在する光合成関連タンパク質には、レドックス制御を受けるものが多く存在する。これらのタンパク質は、主に、暗条件下では不活性化されており、明条件下において Trx によって還元されることで活性化される。このような制御が行われる理由は、第 1 章の 1-2 で述べたように、それらの光合成関連タンパク質が暗条件下で活性を持つと、植物の生育に不利な反応を触媒してしまうからであると考えられている。しかし、このレドックス制御の役割についての仮説はどの酵素についても実証されておらず、生理的意義があいまいなまま当該分野の研究は 40 年以上も続けられてきた。そこで、本研究では、特に厳密に活性が制御されている MDH に注目し、ゲノム編集によって MDH のレドックススイッチを削除した変異体植物を作製した。この植物を用いて、生化学的解析、生理学的解析、メタボローム解析、およびクロロフィル蛍光解析を行い、MDH のレドックス制御が特定の生育条件下で特に重要な役割を担っていることを明らかにした。

第 5 章

総括

5-1. 本章の概要

本章は、本研究で得られた結果を総括し、葉緑体レドックス制御機構の全体像の理解に向けた今後の研究課題を示している。

参考文献

1. Martin JL (1995) Thioredoxin—a fold for all reasons. *Structure* 3(3):245–250.
2. Collet JF, Messens J (2010) Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid Redox Signal* 13(8):1205–1216.
3. Ingles-Prieto A, Ibarra-Molero B, Delgado-Delgado A, Perez-Jimenez R, Fernandez JM, Gaucher EA, Sanchez-Ruiz JM, Gavira JA (2013) Conservation of protein structure over four billion years. *Structure* 21(9):1690–1697.
4. Buchanan BB, Balmer Y (2005) Redox regulation: a broadening horizon. *Annu Rev Plant Biol* 56:187–220.
5. Meyer Y, Belin C, Delorme-Hinoux V, Reichheld JP, Riondet C (2012) Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxid Redox Signal* 17(8):1124–1160.
6. Wolosiuk RA, Buchanan BB (1977) Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. *Nature* 266(7):565–567.
7. Buchanan BB (1980) Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annu Rev Plant Physiol* 31:341–374.
8. Hisabori T, Motohashi K, Hosoya-Matsuda N, Ueoka-Nakanishi H, Romano PG (2007) Towards a functional dissection of thioredoxin networks in plant cells. *Photochem Photobiol* 83(1):145–151.
9. 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.
10. Yano H, Wong JH, Lee YM, Cho MJ, Buchanan BB (2001) A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(8):4794–4799.
11. Motohashi K, Kondoh A, Stumpp MT, Hisabori T (2001) Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(20):11224–11229.
12. Lindahl M, Kieselbach T (2009) Disulphide proteomes and interactions with thioredoxin on the track towards understanding redox regulation in chloroplasts and cyanobacteria. *J Proteomics* 72(3):416–438.
13. Montrichard F, Alkhalifioui F, Yano H, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB (2009) Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *J Proteomics* 72(3):452–474.
14. Vandereyken K, Van Leene J, De Coninck B, Cammue BPA (2018) Hub Protein Controversy: Taking a Closer Look at Plant Stress Response Hubs. *Front Plant Sci* 9:694.

15. Michelet L, Zaffagnini M, Morisse S, Sparla F, Pérez-Pérez ME, Francia F, Danon A, Marchand CH, Fermani S, Trost P, Lemaire SD (2013) Redox regulation of the Calvin-Benson cycle: something old, something new. *Front Plant Sci* 4:470.
16. Marri L, Pesaresi A, Valerio C, Lamba D, Pupillo P, Trost P, Sparla F (2010) *In vitro* characterization of *Arabidopsis* CP12 isoforms reveals common biochemical and molecular properties. *J Plant Physiol* 167(12):939–950.
17. Zhang N, Portis AR 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.
18. Rojas-González JA, Soto-Suárez M, García-Díaz Á, Romero-Puertas MC, Sandalio LM, Mérida Á, Thormählen I, Geigenberger P, Serrato AJ, Sahrawy M (2015) Disruption of both chloroplastic and cytosolic FBPase genes results in a dwarf phenotype and important starch and metabolite changes in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 66(9):2673–2689.
19. Dennis DT, Coultate TP. (1966) Phosphofructokinase, a regulatory enzyme in plants. *Biochem Biophys Res Commun* 25(2):187–191.
20. Kelly GJ, Zimmermann G, Latzko E (1982) Fructose-bisphosphatase from spinach leaf chloroplast and cytoplasm. *Methods Enzymol* 90:371–378.
21. Sugiura K, Yokochi Y, Fu N, Fukaya Y, Yoshida K, Mihara S, Hisabori T (2019) The thioredoxin (Trx) redox state sensor protein can visualize Trx activities in the light/dark response in chloroplasts. *J Biol Chem* 294(32):12091–12098.
22. Hisabori T, Konno H, Ichimura H, Strotmann H, Bald D (2002) Molecular devices of chloroplast F₁-ATP synthase for the regulation. *Biochim Biophys Acta* 1555(1–3):140–146.
23. 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.
24. Mills JD, Mitchell P, Schürmann P (1980) Modulation of coupling factor ATPase activity in intact chloroplasts. The role of the thioredoxin system. *FEBS Lett* 112(2):173–177.
25. Wolosiuk RA, Buchanan BB, Crawford NA (1977) Regulation of NADP-malate dehydrogenase by the light-activated ferredoxin/thioredoxin system of chloroplasts. *FEBS Lett* 81(2):253–258.
26. Selinski J, Scheibe R (2018) Malate valves: old shuttles with new perspectives. *Plant Biol* 21(S1):21–30.
27. Miginiac-Maslow M, Johansson K, Ruelland E, Issakidis-Bourguet E, Schepens I, Goyer A, Lemaire-Chamley M, Jacquot JP, Le Maréchal P, Decottignies P (2000) Light - activation of NADP - malate dehydrogenase: A highly controlled process for an optimized function. *Physiol Plantarum* 110(3):322–329.

28. Ruelland E, Lemaire-Chamley M, Le Maréchal P, Issakidis-Bourguet E, Djukic N, Miginiac-Maslow M (1997) An internal cysteine is involved in the thioredoxin-dependent activation of sorghum leaf NADP-malate dehydrogenase. *J Biol Chem* 272(32):19851–19857.
29. Ruelland E, Johansson K, Decottignies P, Djukic N, Miginiac-Maslow M (1998) The autoinhibition of sorghum NADP malate dehydrogenase is mediated by a C-terminal negative charge. *J Biol Chem* 273(50):33482–8.
30. Johansson K, Ramaswamy S, Saarinen M, Lemaire-Chamley M, Issakidis-Bourguet E, Miginiac-Maslow M, Eklund H (1999) Structural basis for light activation of a chloroplast enzyme: the structure of sorghum NADP-malate dehydrogenase in its oxidized form. *Biochemistry* 38(14):4319–4326.
31. Carr PD, Verger D, Ashton AR, Ollis DL (1999) Chloroplast NADP-malate dehydrogenase: structural basis of light-dependent regulation of activity by thiol oxidation and reduction. *Structure* 7(4):461–475.
32. Dietz KJ, Jacob S, Oelze ML, Laxa M, Tognetti V, de Miranda SM, Baier M, Finkemeier I (2006) The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *J Exp Bot* 57(8):1697–1709.
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. Wolosiuk RA, Crawford NA, Yee BC, Buchanan BB (1979) Isolation of three thioredoxins from spinach leaves. *J Biol Chem* 254(5):1627–1632.
35. Schwarz O, Schürmann P, Strotmann H (1997) Kinetics and thioredoxin specificity of thiol modulation of the chloroplast H⁺-ATPase. *J Biol Chem* 272(27):16924–16927.
36. Stumpp MT, Motohashi K, Hisabori T (1999) Chloroplast thioredoxin mutants without active-site cysteines facilitate the reduction of the regulatory disulphide bridge on the γ -subunit of chloroplast ATP synthase. *Biochem J* 341 (1):157–163.
37. Yoshida K, Hisabori T (2018) Determining the Rate-Limiting Step for Light-Responsive Redox Regulation in Chloroplasts. *Antioxidants* 7(11):153.
38. de Lamotte-Guery F, Miginiac-Maslow M, Decottignies P, Stein M, Minard P, Jacquot JP (1991) Mutation of a negatively charged amino acid in thioredoxin modifies its reactivity with chloroplastic enzymes. *Eur J Biochem* 196(2):287–294.
39. Geck MK, Larimer FW, Hartman FC (1996) Identification of residues of spinach thioredoxin *f* that influence interactions with target enzymes. *J Biol Chem* 271(40):24736–24740.
40. Mora-García S, Rodríguez-Suárez R, Wolosiuk RA (1998) Role of electrostatic interactions on the affinity of thioredoxin for target proteins. Recognition of chloroplast fructose-1, 6-

- bisphosphatase by mutant *Escherichia coli* thioredoxins. *J Biol Chem* 273(26):16273–16280.
41. Geck MK, Hartman FC (2000) Kinetic and mutational analyses of the regulation of phosphoribulokinase by thioredoxins. *J Biol Chem* 275(24):18034–18039.
 42. Wangenstein OS, Chueca A, Hirasawa M, Sahrawy M, Knaff DB, López Gorgé J (2001) Binding features of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase-thioredoxin interaction. *Biochim Biophys Acta* 1547(1):156–166.
 43. Buchanan BB (2016) The Path to Thioredoxin and Redox Regulation in Chloroplasts. *Annu Rev Plant Biol* 67:1–24.
 44. Gütle DD, Roret T, Hecker A, Reski R, Jacquot JP (2017) Dithiol disulphide exchange in redox regulation of chloroplast enzymes in response to evolutionary and structural constraints. *Plant Sci* 255:1–11.
 45. Geigenberger P, Thormählen I, Daloso DM, Fernie AR (2017) The Unprecedented Versatility of the Plant Thioredoxin System. *Trends Plant Sci* 22(3):249–262.
 46. Chibani K, Saul F, Didierjean C, Rouhier N, Haouz A (2018) Structural snapshots along the reaction mechanism of the atypical poplar thioredoxin-like2.1. *FEBS Lett* 592(6):1030–1041.
 47. Lundström J, Krause G, Holmgren A (1992) A Pro to His mutation in active site of thioredoxin increases its disulfide-isomerase activity 10-fold. New refolding systems for reduced or randomly oxidized ribonuclease. *J Biol Chem* 267(13):9047–9052.
 48. Chibani K, Tarrago L, Gualberto JM, Wingsle G, Rey P, Jacquot JP, 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(2):592–605.
 49. 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.
 50. 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.
 51. Ojeda V, Pérez-Ruiz JM, Cejudo FJ (2018) 2-Cys Peroxiredoxins Participate in the Oxidation of Chloroplast Enzymes in the Dark. *Mol Plant* 11(11):1377–1388.
 52. Dangoor I, Peled-Zehavi H, Wittenberg G, Danon A (2012) A chloroplast light-regulated oxidative sensor for moderate light intensity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24(5):1894–1906.
 53. Eliyahu E, Rog I, Inbal D, Danon A (2015) ACHT4-driven oxidation of APS1 attenuates starch synthesis under low light intensity in *Arabidopsis* plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(41):12876–12881.

54. Serrato AJ, Pérez-Ruiz JM, Spínola MC, Cejudo FJ (2004) A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 279(42):43821–43827.
55. Yoshida K, Hisabori T (2016) Two distinct redox cascades cooperatively regulate chloroplast functions and sustain plant viability. *Proc Natl Acad Sci USA* 113(27):E3967–3976.
56. Naranjo B, Mignée C, Krieger-Liszkay A, Hornero-Méndez D, Gallardo-Guerrero L, Cejudo FJ, 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(4):804–822.
57. Da Q, Wang P, Wang M, Sun T, Jin H, Liu B, Wang J, Grimm B, Wang HB (2017) Thioredoxin and NADPH-Dependent Thioredoxin Reductase C Regulation of Tetrapyrrole Biosynthesis. *Plant Physiol* 175(2):652–666.
58. Pérez-Ruiz JM, Naranjo B, Ojeda V, Guinea M, Cejudo FJ (2017) NTRC-dependent redox balance of 2-Cys peroxiredoxins is needed for optimal function of the photosynthetic apparatus. *Proc Natl Acad Sci USA* 114(45):12069–12074.
59. Nikkanen L, Rintamäki E (2019) Chloroplast thioredoxin systems dynamically regulate photosynthesis in plants. *Biochem J* 476(7):1159–1172.
60. Zaffagnini M, Fermani S, Marchand CH, Costa A, Sparla F, Rouhier N, Geigenberger P, Lemaire SD, Trost P (2019) Redox Homeostasis in Photosynthetic Organisms: Novel and Established Thiol-Based Molecular Mechanisms. *Antioxid Redox Signal* 31(3):155–210.
61. Jacquot JP (2018) Dark deactivation of chloroplast enzymes finally comes to light. *Proc Natl Acad Sci USA* 115(38):9334–9335.
62. The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408(6814):796–815.
63. Collin V, Issakidis-Bourguet E, Marchand C, Hirasawa M, Lancelin JM, Knaff DB, Miginiac-Maslow M (2003) The *Arabidopsis* plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity. *J Biol Chem* 278(26):23747–23752.
64. Collin V, Lamkemeyer P, Miginiac-Maslow M, Hirasawa M, Knaff DB, Dietz KJ, Issakidis-Bourguet E (2004) Characterization of plastidial thioredoxins from *Arabidopsis* belonging to the new γ -type. *Plant Physiol* 136(4):4088–4095.
65. Arsova B, Hoja U, Wimmelbacher M, Greiner E, Ustün S, Melzer M, Petersen K, Lein W, 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(5):1498–1515.
66. Wu G, Ort DR (2008) Mutation in the cysteine bridge domain of the γ -subunit affects light

- regulation of the ATP synthase but not photosynthesis or growth in *Arabidopsis*. *Photosynth Res* 97(2):185–93.
67. Kohzuma K, Dal Bosco C, Kanazawa A, Dhingra A, Nitschke W, Meurer J, Kramer DM (2012) Thioredoxin-insensitive plastid ATP synthase that performs moonlighting functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(9):3293–3298.
 68. Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33(7):1870–1874.
 69. Tina KG, Bhadra R, Srinivasan N (2007) PIC: Protein Interactions Calculator. *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue):W473–476.
 70. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 46(Web Server issue):W296–W303.
 71. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25(13):1605–1612.
 72. Chen R, Weng Z (2002) Docking unbound proteins using shape complementarity, desolvation, and electrostatics. *Proteins* 47(3):281–94.
 73. Pierce BG, Hourai Y, Weng Z (2011) Accelerating protein docking in ZDOCK using an advanced 3D convolution library. *PLoS One* 6(9):e24657.
 74. Berendsen HJC, van der Spoel D, van Drunen R (1995) GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput Phys Commun* 91(1–3):43–56.
 75. Mark James Abraham, Teemu Murtola, Roland Schulz, Szilárd Páll, Jeremy C. Smith, Berk Hess, Erik Lindahl" (2015) GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2:19–25.
 76. Boël G, Letso R, Neely H, Price WN, Wong KH, Su M, Luff J, Valecha M, Everett JK, Acton TB, Xiao R, Montelione GT, Aalberts DP, Hunt JF (2016) Codon influence on protein expression in *E. coli* correlates with mRNA levels. *Nature* 529(7586):358–363.
 77. Holmgren A (1979) Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J Biol Chem* 254(19):9627–9632.
 78. Simon P. Wolff (1994) Ferrous Ion Oxidation in Presence of Ferric Ion Indicator Xylenol Orange for Measurement of Hydroperoxides. *Method Enzymol* 233:182–189.
 79. Meyer Y, Reichheld JP, Vignols F (2005) Thioredoxins in *Arabidopsis* and other plants. *Photosynth Res* 86(3):419–433.

80. Chibani K, Wingsle G, Jacquot JP, Gelhaye E, Rouhier N (2009) Comparative genomic study of the thioredoxin family in photosynthetic organisms with emphasis on *Populus trichocarpa*. *Mol Plant* 2(2):308–322.
81. Schröter Y, Steiner S, Matthäi K, Pfannschmidt T (2010) Analysis of oligomeric protein complexes in the chloroplast sub-proteome of nucleic acid-binding proteins from mustard reveals potential redox regulators of plastid gene expression. *Proteomics* 10(11):2191–2204.
82. Steiner S, Schröter Y, Pfalz J, Pfannschmidt T (2011) Identification of essential subunits in the plastid-encoded RNA polymerase complex reveals building blocks for proper plastid development. *Plant Physiol* 157(3):1043–1055.
83. Wimmelbacher M, Börnke F (2014) Redox activity of thioredoxin z and fructokinase-like protein 1 is dispensable for autotrophic growth of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 65(9):2405–2413.
84. Díaz MG, Hernández-Verdeja T, Kremnev D, Crawford T, Dubreuil C, Strand Å (2018) Redox regulation of PEP activity during seedling establishment in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun* 9(1):50.
85. Ren G, Stephan D, Xu Z, Zheng Y, Tang D, Harrison RS, Kurz M, Jarrott R, Shouldice SR, Hiniker A, Martin JL, Heras B, Bardwell JC (2009) Properties of the thioredoxin fold superfamily are modulated by a single amino acid residue. *J Biol Chem* 284(15):10150–10159.
86. Berndt C, Lillig CH, Flohé L (2014) Redox regulation by glutathione needs enzymes. *Front Pharmacol* 5:168.
87. Yoshida K, Hisabori T (2017) Distinct electron transfer from ferredoxin-thioredoxin reductase to multiple thioredoxin isoforms in chloroplasts. *Biochem J* 474(8):1347–1360.
88. Vaseghi MJ, Chibani K, Telman W, Liebthal MF, Gerken M, Schnitzer H, Mueller SM, Dietz KJ (2018) The chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin functions as thioredoxin oxidase in redox regulation of chloroplast metabolism. *eLife* 7:e38194.
89. Hirasawa M, Brandes HK, Hartman FC, Knaff DB (1998) Oxidation-reduction properties of the regulatory site of spinach phosphoribulokinase. *Arch Biochem Biophys* 350(1):127–131.
90. Hirasawa M, Ruelland E, Schepens I, Issakidis-Bourguet E, Miginiac-Maslow M, Knaff DB (2000) Oxidation-reduction properties of the regulatory disulfides of sorghum chloroplast nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-malate dehydrogenase. *Biochemistry* 39(12):3344–3350.
91. Cerveau D, Kraut A, Stotz HU, Mueller MJ, Couté Y, Rey P (2016) Characterization of the *Arabidopsis thaliana* 2-Cys peroxiredoxin interactome. *Plant Sci* 252:30–41.

92. Vanacker H, Guichard M, Bohrer AS, Issakidis-Bourguet E (2018) Redox Regulation of Monodehydroascorbate Reductase by Thioredoxin γ in Plastids Revealed in the Context of Water Stress. *Antioxidants* 7(12):183.

発表論文

(1) 学位論文

第 2 章

Yokochi Y, Sugiura K, Takemura K, Yoshida K, Hara S, Wakabayashi K, 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.

(2) 学位論文に含まれない論文

Sugiura K, Yokochi Y, Fu N, Fukaya Y, Yoshida K, Mihara S, Hisabori T (2019) The thioredoxin (Trx) redox state sensor protein can visualize Trx activities in the light/dark response in chloroplasts. *J Biol Chem* 294(32):12091–12098.

Yoshida K, Yokochi Y, Hisabori T (2019) New Light on Chloroplast Redox Regulation: Molecular Mechanism of Protein Thiol Oxidation. *Front Plant Sci* 10:1534.

謝辞

本研究を行う上での全般的な指導や、研究室での生活における様々なお心遣いをしてくださった、東京工業大学 化学生命科学研究所 久堀徹教授に、心より御礼申し上げます。久堀教授には、自由に研究ができる環境と、多くの研究発表の機会、さらに外部に知識や技術を学びに行く機会を与えていただきました。そのおかげで、6年間充実した研究生活を送ることができました。また、研究や研究室での生活に関するアドバイスをいただき、研究者としての考え方も教えていただいた、東京工業大学 化学生命科学研究所 若林憲一准教授には、感謝の念が絶えません。さらに、研究に必要な試料の提供、研究に関する直接の指導をしていただいた、東京工業大学 化学生命科学研究所 吉田啓亮助教、野亦次郎助教、原怜特任助教（現 東京工業大学 生命理工学院）、肥後明佳特任助教（現 公益財団法人地球環境産業技術研究機構）、杉浦一徳博士（現 大阪大学）に、深く感謝申し上げます。

分子動力学シミュレーション解析は、東京工業大学 生命理工学院 北尾彰朗教授、竹村和浩特任講師との共同研究によって行いました。CRISPR/Cas9 システムを用いた植物のゲノム編集技術は、ハインリッヒハイネ大学（ドイツ）の Andreas Weber 研究室に滞在させていただき、Andreas Weber 教授と Florian Hahn 氏（現 Rothamsted Research（イギリス））のご指導の下、学ばせていただきました。メタボローム解析は、埼玉大学 川合真紀教授、宮城敦子助教との共同研究によって行いました。また、埼玉大学 川合研究室の石川優真氏に、NAD(P)(H)の定量法を教えてくださいました。本研究は、これらの方々のご協力がなければ行うことができませんでした。誠にありがとうございました。

さらに、文部科学省の博士課程教育リーディングプログラムのひとつである、東京工業大学の情報生命博士教育院 (ACLS) には、授業や留学などスキルアップのための様々な機会を与えていただきました。特に、本研究で用いたプログラミングや分子動力学シミュレーションなどの知識、英語を用いたコミュニケーション能力は ACLS の授業や活動を通して身につけたものであり、ドイツへの留学資金も ACLS に援助していただきました。ACLS の立ち上げと運営に関わられた全ての方々に、深く感謝申し上げます。

最後に、本研究は、久堀・若林研究室の学生や研究員、多くのアドバイスを下さった研究室外の先生方など、多くの方々のサポートのもと行われました。特に、博士進学を認め、長い学生生活を支えてくれた家族なしには達成できませんでした。心より感謝申し上げます。