



Title	レドックス制御系による葉緑体の機能調節
Author(s)	吉田, 啓亮; 久堀, 徹
Citation	低温科学, 83, 109-117
Issue Date	2025-03-29
DOI	https://doi.org/10.14943/lowtemsci.83.109
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94813
Type	departmental bulletin paper
File Information	11_p109-117_LT83.pdf



レドックス制御系による葉緑体の機能調節

吉田 啓亮¹⁾, 久堀 徹^{2,3)}

2024 年 12 月 2 日受付, 2024 年 12 月 31 日受理

酸化・還元を基盤とした翻訳後修飾であるレドックス制御は、光合成システムの制御に重要な役割を果たしている。この制御系は従来、鍵因子であるチオレドキシンの電子伝達系によって生じる還元力を特定の標的酵素に伝達し、その酵素を活性化するというシンプルなものとして考えられていた。ところが近年、植物葉緑体のレドックス制御系は、数多くの制御因子および標的酵素が関わる複雑な還元力伝達ネットワークによって構成されていることが明らかになってきた。本稿では、最近の研究成果から見てきたレドックス制御系の実体について、今後の研究展望を交えながら概説する。

The redox regulation system for controlling chloroplast functions

Keisuke Yoshida¹, Toru Hisabori^{2,3}

The redox regulation system is one of the post-translational mechanisms, which is important for photosynthesis. In recent years, many regulatory factors and target enzymes have been identified in plant chloroplasts, raising a possibility that the redox regulation system is composed of highly divergent redox pathways. We discuss a current understanding of the molecular basis and physiological importance of this regulatory network, with future perspectives of this research field.

キーワード：レドックス制御・チオレドキシン
Redox regulation, Thioredoxin

1. はじめに

レドックス制御とは、酸化還元状態に応じて標的酵素のチオール基の状態（ジスルフィド結合の形成・開裂など）を制御することで、その酵素の分子機能を調節する翻訳後修飾機構である。葉緑体のレドックス制御系は、光合成電子伝達系の駆動によって得られる還元力を用いることにより、光照射に応じた葉緑体酵素の機能調節（多

くの場合は活性化）を可能にしている。その制御システムの基盤は、電子伝達系の構成成分であるフェレドキシン（Ferredoxin; Fd）からレドックス制御の鍵因子であるチオレドキシン（Thioredoxin; Trx）を介して特定の標的酵素へと至る単純な還元力伝達経路（Fd/Trx経路）である（図 1 A）。この経路は1970年代にアメリカのブキャナン（Bob. B. Buchanan）らによって発見され、それ以来教科書にも記載される知見として一般に受け入れられてきた（Buchanan,

連絡先

吉田 啓亮

東京科学大学・総合研究院・化学生命科学研究所

〒 226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259-R1-30

Tel: 045-924-5859

Email: kyoshida@res.titech.ac.jp

1) 東京科学大学・総合研究院・化学生命科学研究所

Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Integrated Research, Institute of Science Tokyo, Yokohama, Japan

2) 総合研究大学院大学

The Graduate University for Advanced Studies, SOKENDAI, Hayama, Japan

3) 神奈川大学・総合理学研究所

Research Institute of Integrated Science, Kanagawa University, Yokohama, Japan

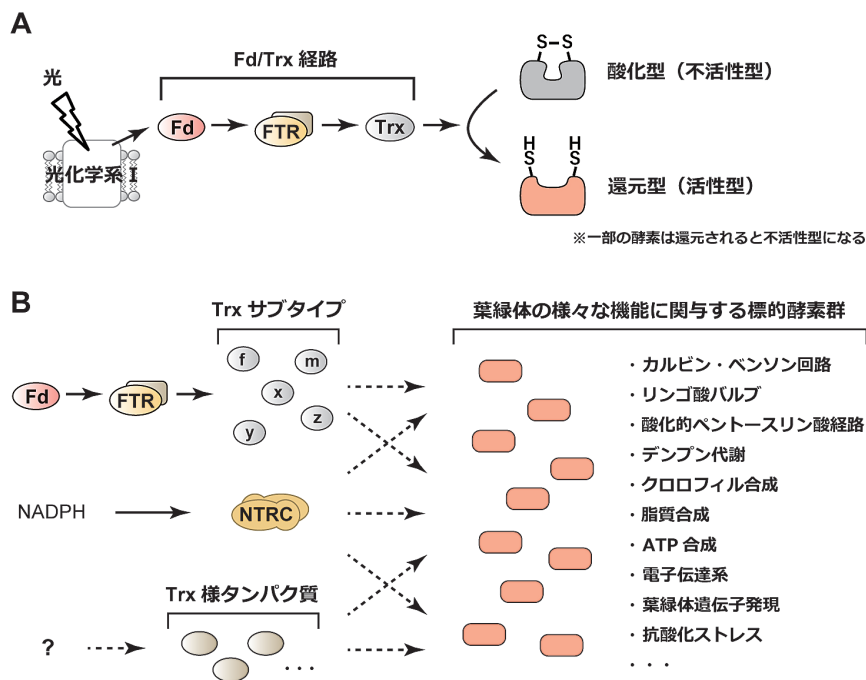


図1:葉緑体のレドックス制御系の概観. 古典的なモデル(A)と多くの因子が関わるネットワーク状の新たなモデル(B)を示す.

2016). ところが近年, 網羅的研究(ゲノム解析・プロテオーム解析)の進展により, 葉緑体のレドックス制御系が, 従来は知られていなかった数多くの制御因子群および標的酵素群によって構成されていることが明らかになってきた(図1B). 例えば, 後で詳述するように, 古くから知られる制御因子のTrxには, 活性部位以外のアミノ酸配列によって分類される5つの分子種(サブタイプ)が存在する. すべての生物は普遍的にTrxを持つが, Trxにこのような多様性が見られるのは植物葉緑体のみである. これらの知見から, 「葉緑体レドックス制御系は, 還元力伝達経路をネットワーク状に複雑に張り巡らせ, 様々な葉緑体機能を環境の変化に応じて巧みに操っているのでは?」という可能性が示唆される. レドックス制御系は葉緑体内でどのように構成され, 環境の変化にどのように応答し, そして植物の生存戦略においてどのような役割を果たしているのだろうか. 半世紀以上の歴史を持つレドックス制御系の研究は, 今まさに新たな局面を迎えている.

2. レドックス制御の標的酵素

「どのような葉緑体酵素がTrxの標的としてレドックス制御を受けるのか」を理解することは, 葉緑体のレドックス制御系の研究における重要課題の1つである. ブキャナ

ンらがFd/Trx経路をレドックス制御系の基本経路として確立した当初(1980年頃), Trxの標的として提案されていた酵素は, カルビン・ベンソン回路の4つの酵素[グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH); フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ(FBPase); セドヘプツロース-1,7-ビスホスファターゼ(SBPase); ホスホリブプロキナーゼ(PRK)], ATP合成酵素(ATP synthase), リンゴ酸バルブで働くNADP-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(NADP-MDH), 酸化的ペントースリン酸経路のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PDH)の7つのみであった(これらの酵素のほとんどが還元されると活性化されるが, G6PDHだけは還元によって不活性化される). この認識に転機が訪れたのは, Trxと相互作用を示す酵素のスクリーニング法が複数考案された2000年以降のことである(Motohashi et al., 2001; Hisabori et al., 2005; Montrichard et al., 2009). 同時期に質量分析を用いたプロテオミクス研究が急速に発展したこともあり, レドックス制御の標的酵素に関する情報は飛躍的に増加した. 例えば, デンプン代謝やクロロフィル合成などに関与する酵素がTrxによってレドックス制御を受ける可能性が指摘され, また抗酸化システムで働く酵素が触媒反応に用いる還元力をTrxから供給されることも新たに明らかになってきた(図1B). 本稿では個々の標的酵素の記述は省略するが, それらはそれぞれの原著論

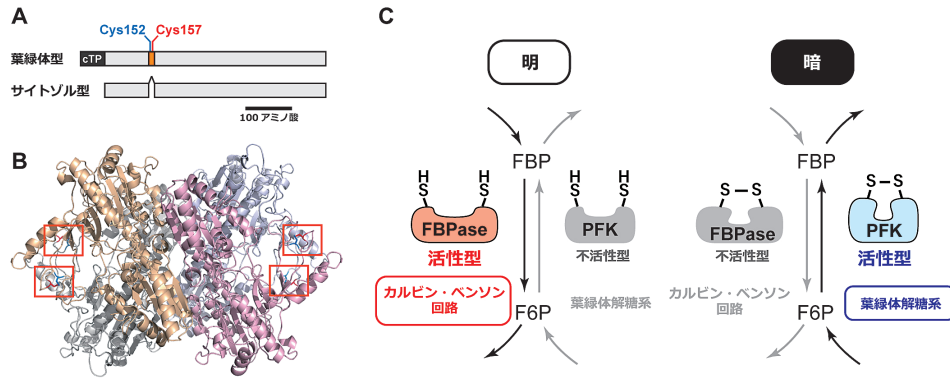


図2：レドックス制御の標的酵素の一例（PFK）。（A）葉緑体型PFKとサイトゾル型PFKのタンパク質の一次構造の簡略図。葉緑体型のオレンジの領域は、2つのシステイン残基 [Cys152とCys157（シロイヌナズナ）] を含む挿入領域を示す。cTP、葉緑体移行ペプチド。（B）AlphaFold3で予測した葉緑体PFK（テトラマー）の立体構造。オレンジのボックスは、挿入領域の2つのシステイン間での分子内ジスルフィド結合を示す。（C）FBPaseとPFKのレドックス制御による明／暗の代謝切替えの可能性。明所では、FBPaseとPFKはともに還元されるが、FBPaseは活性化されPFKは不活性化される。その結果、カルビン・ベンソン回路が促進される。暗所では、FBPaseとPFKはともに酸化されるが、FBPaseは不活性化されPFKは活性化される。その結果、葉緑体解糖系が促進される。Yoshida and Hisabori (2023) より改変。

文に加えて複数の総説でもまとめてリスト化されている (Lindahl and Kieselbach, 2009; Montrichard et al., 2009)。

ただし、このような網羅的解析からTrxとの相互作用の可能性が示唆された酵素は、あくまでレドックス制御の標的の候補であることに注意しなければならない。プロテオミクス技術の高感度化に伴う偽標的の非特異的な検出を避けるのは難しいし、少なくとも「酸化還元状態の変化は機能変化につながるのか?」、「その場合どのように?」、「その変化は可逆的なのか?」などといった重要な問いに対する答えは、この方法では得ることができない。それぞれの酵素のレドックス制御の可否を結論づけ、その分子機構を明らかにするためには、個々の酵素に注目した詳細な解析が必要になる。

そのような視点に基づいて、私たちはこれまで精製タンパク質を用いた生化学解析を進めてきた。ここでは、葉緑体局在型のホスホフルクトキナーゼ (Phosphofructokinase; PFK) のレドックス制御について検証した最近の例について紹介する (Yoshida and Hisabori, 2021)。PFKは、一般的にサイトゾルでの解糖系の律速段階を触媒する酵素として知られるが、植物の場合は葉緑体局在型のアイソフォームが存在する。実はこの酵素は、私たちの知る限り、上記のプロテオミクススペースの標的の探索方法では同定されていない。しかし、エンドウマメの単離葉緑体を用いた古い論文に、葉緑体PFKの酵素活性は明暗処理によって変化し、さらにDCMUによる電子伝達阻害やDTTによる還元処理によっても影響を受けるという興味深い記述があっ

た (Heuer et al., 1982)。これらの結果は、葉緑体PFKがレドックス制御下にあることを示唆するものと言えるのだが、その裏づけとなる十分な生化学データがなかったために、これまでレドックス制御の標的酵素として認識されてこなかった。そこで私たちは、大腸菌で発現させた葉緑体PFKを精製し、一連のin vitro解析を行って、(1) 葉緑体PFKは還元によって可逆的な不活性化を受けること、(2) その還元には、複数のTrxサブタイプのうちf型Trxが有効であること (Trxサブタイプについては後述)、(3) 葉緑体PFKはサイトゾル型にはない挿入アミノ酸配列を持っており、その配列上のシステインペアが酸化還元スイッチとして分子内ジスルフィド結合を形成すること (図2A, B) などを明らかにした。特に、還元によって不活性化され、酸化によって活性化されるという制御様式は、他の多くの標的酵素とは逆であり、興味深い発見と言える。PFKがよく知られたレドックス制御の標的酵素であるFBPaseの逆反応を触媒することを考えると、両酵素のレドックス制御が明／暗の葉緑体代謝の切替えに重要な役目を果たしているのかもしれない (図2C)。このような可能性に迫るにはin vitroの生化学解析だけでは不十分であり、in vivoレベルの生理学的な解析が必要になる。

3. レドックス制御系のin vivo動態

各酵素のレドックス制御の分子機構の理解だけでなく、それが光変動のような環境刺激に対して植物体内でどの

ように応答しているのかを明らかにすることも重要な課題である。古くから、分析対象とする酵素の活性が酸化還元状態によって規定されるという前提の下、一定時間光照射などの処理を施した葉緑体や葉から酵素を抽出し、分光測定などに基づいてその活性を調べるといった方法が用いられてきた。しかし実際には、葉緑体内pHやマグネシウム濃度といった他の要因も葉緑体酵素の活性に影響することが分かっているため、酸化還元状態の変化のみを反映しているとは限らない。酵素の抽出開始から活性測定に到るまでの間、酵素の酸化還元状態が維持できているのか疑わしいということも、排除しきれなかった問題である。

私たちは、葉から酵素を抽出して即座にチオール基をマレイミド試薬で修飾し、非還元SDS-PAGE後にウェスタンブロット解析を行うことで、目的酵素の*in vivo*の酸化還元状態をバンドシフトの形で識別する手法を用いている (Yoshida and Hisabori, 2019)。これによって、複数の酵素は光に応答して酸化型から還元型へとシフトすることを観測し、レドックス制御系の*in vivo*での駆動をはっきりとした形で示すことができた (Yoshida et al., 2014)。興味深いことに、光依存的に還元される効率は、酵素間で大きく異なっていた。例えばATP合成酵素は弱い光の下でも迅速に還元され、一方でカルビン・ベンソン回路の酵素であるFBPaseやSBPaseなどは光照射開始後にゆっくりと還元される。この還元効率の違いを生み出している要因はまだ明らかになっていない。単純に酵素ごとの酸化還元電位の違いでは説明がつかない。1つの可能性として葉緑体内の局在の違い (チラコイド膜局在かストロマ局在かの違い) が考えられるが、その可能性はまだ実験的に支持されていない (Fukushi et al., 2022)。早い応答を示すATP合成酵素とゆっくりとした応答を示すFBPaseやSBPaseでは、制御に用いる還元力伝達経路そのものが異なる可能性もある。すなわち、FBPaseやSBPaseの還元は絶対的にFd/Trx経路に依存する一方、ATP合成酵素の還元は未同定の還元力伝達経路が関与しているかもしれない (後述)。還元効率の違いの根底にある分子メカニズムの解明は、今後の研究の大きな課題である。また、その生理的な意義に迫ろうとする研究も必要である。

ごく最近、チオール基修飾に基づいた解析をプロテオミクスレベルで応用した研究が複数報告され、これまでレドックス制御の標的 (候補) として知られていなかった酵素が光に応じて酸化還元状態を変化させることが見出された (Zimmer et al., 2021; Huang et al., 2023; Hou et al., 2024)。これらの報告は、レドックス制御系が支配する葉

緑体機能の理解をさらに拡張する重要な発見であると言える。今後、上述したような個別の生化学解析をこれらの新規に見出された標的酵素候補に対して行い、レドックス制御系の分子基盤の全体像を明らかにしていくことが重要である。

4. レドックス制御因子群の機能分担

標的酵素の多様性だけでなく、制御因子の多様性も葉緑体レドックス制御系の大きな特徴である。前述したように、葉緑体には典型的なTrxだけで5つのサブタイプが存在し、また特徴的なハイブリッド構造を持つNTRC (NADPH-Trx reductase C)、さらにはTrxの活性部位のアミノ酸配列WCGPCと似た配列を持つ複数のTrx様タンパク質なども存在することが分かっている。これらの制御因子群がレドックス制御系においてどのように使い分けられてシステム全体を支えているのかの解明は、当該分野の重要課題である。

4.1 5つのTrxサブタイプ

Fd/Trx経路が発見されて間もない頃、葉緑体のTrxとしてはf型とm型の2種類のみが同定されていた。この2つはTrxサブタイプの中で比較的発現量が多いことが (Okegawa and Motohashi, 2015; Yoshida et al., 2015)、植物のゲノム情報が明らかにされる前に見つかっていた理由ではないかと考えられる。その後、2001年のシロイヌナズナの全ゲノム解読を契機として、x型、y型、z型が葉緑体に局在することが報告された。まだ完全ではないものの、これら計5つのTrxサブタイプの機能の違いについてはある程度の知見が蓄積している。f型とm型はそれぞれFBPaseとNADP-MDHの効率的な活性化因子という特性に基づいて命名された。その後の研究から、f型とm型は他3つのサブタイプと比較して、カルビン・ベンソン回路酵素やATP合成酵素など光合成反応に直接関わる酵素の還元・活性化に効率的であることが示されている (e.g., Yoshida et al., 2015; Sekiguchi et al., 2020)。加えてm型は、チラコイド膜ルーメンへの還元力供給 (Motohashi and Hisabori, 2006) やサイクリック電子伝達制御 (Okegawa and Motohashi, 2020) など、特別な機能を担っている可能性がある。シロイヌナズナにおいて、f型の変異株では顕著な生育阻害は観測されない一方、m型の変異株は生育阻害を示すという事実は、そのようなm型の特異的機能を反映しているのかもしれない。一方で、x型とy型は抗酸化系酵素への還元力供給に効率的に機能する (e.g., Collin et al., 2004)。

この機能と直接関係しているのかはまだはっきりしていないが、最近、x型とy型が変動光下で協調的に光化学系Iのアクセプター側の還元を抑制していることが示された (Okegawa et al, 2023). z型は、細菌型RNAポリメラーゼ (Plastid-encoded RNA polymerase; PEP) 複合体による葉緑体の遺伝子発現に関わると報告されている (Arsova et al., 2010). 実際、z型のノックアウト株はアルビノの表現型を示す。ただし、この表現型の原因は、単にPEP複合体の構成因子としての機能が重要で、レドックス制御機能は必須ではない可能性がある (Wimmelbacher and Bornke, 2014). 一方で、z型の別の形での葉緑体遺伝子発現やRNA編集への関与も示唆されており (Diaz et al., 2018; Wang et al., 2021), まだ謎が多いTrxと言える。

4.2 NTRC

NTRCは、同一ポリペプチド内にNADPH-Trx reductase ドメインとTrxドメインを持つハイブリッドタンパク質として2004年に同定された (Serrato et al., 2004). NTRCは還元力源としてNADPHを用いるため、Fd/Trx経路とは独立して働くことができる。シロイヌナズナのNTRC欠損株は葉の黄化を伴う生育障害を示すので、Fd/Trx経路では補完できない重要な機能があると予想されるが、それに関する統一的な見解はまだ得られていない。最初に提案されたNTRCの機能が、葉緑体の主要な抗酸化系酵素である2-Cys peroxiredoxin (2-Cys Prx) への還元力供給である (Moon et al., 2006; Perez-Ruiz et al., 2006). その後、デンプン合成 (Michalska et al., 2009), クロロフィル合成 (Richter et al., 2013; Perez-Ruiz et al., 2014), カルビン・ベンソン回路 (Nikkanen et al., 2016), ATP合成 (Carrillo et al., 2016), サイクリック電子伝達 (Nikkanen et al., 2018) などの制御が相次いで報告され、NTRCの機能に関する議論は依然として混沌とした状況が続いている。

これに関する現在最も有力な説は、2-Cys Prxへ還元力を供給してこの酵素の酸化還元バランスを保ち、Fd/Trx経路を正常に働かせるということであろう (Perez-Ruiz et al., 2017). この説は、NTRC欠損株の表現型が、2-Cys Prxを同時に欠損させることで回復したことに基づいている。NTRC欠損株では2-Cys Prxに還元力を供給することができないために、2-Cys PrxがTrxから還元力を奪ってしまうことで、他の光合成関連酵素の光依存的な還元・活性化に支障をきたしているというシナリオが提案された。さらに、NTRCが2-Cys Prxの酸化還元バランスを保つという機能は、次に述べるタンパク質酸化経路の還元力伝達の調節においても決定的な役割を果たす可能性がある。

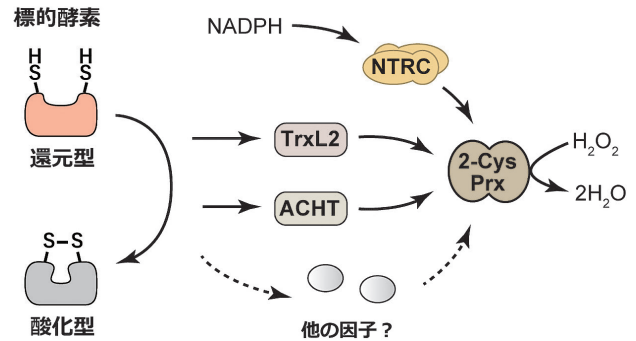


図3：レドックス制御系の酸化側。Trx様タンパク質であるTrxL2とACHTが標的酵素を酸化し、受け取った還元力を2-Cys Prxを介して過酸化水素へと伝達して消去する。NTRCは、2-Cys Prxの酸化還元バランスを調節することで、タンパク質酸化経路の還元力伝達の調節にも関わる可能性がある。また、他の因子もタンパク質酸化に関わる可能性がある。

4.3 Trx様タンパク質

葉緑体は複数のTrx様タンパク質を持つが、データベース解析および局在・発現解析にとどまる報告が多く、その機能についてはほとんど明らかになっていなかった。私たちは、2018年にそのうちの1つであるTrx-like 2 (TrxL2) がタンパク質酸化因子として機能することを見出した (Yoshida et al., 2018). その酸化還元電位は典型的なTrxと比べてかなり高く、それがおそらくTrxL2に酸化機能をもたらす理由の1つである。また、TrxL2のもう1つの特徴として、ほとんどの酵素に対して還元活性を示さない一方で、2-Cys Prxに対してだけは非常に高い還元活性を示す。この結果から、TrxL2が酸化の標的となる酵素から還元力を奪い、それを2-Cys Prxを介して過酸化水素へと流して消去しているという経路が考えられた (図3)。実際、この経路はin vitro構成系実験で完全に再現され、また2-Cys Prxの変異株を用いたin vivoでの解析によっても支持されている。この研究は、レドックス制御系の長年のブラックボックスであったタンパク質酸化経路を同定し、光が途切れた際に光合成を抑制するという新たな光合成制御メカニズムを提示する成果となった (Jacquot, 2018)。

この発見を端緒として、私たちはさらにタンパク質酸化のメカニズムの解析を進めている。これまでに、TrxL2とは別のTrx様タンパク質であるACHT (Atypical Cys His-rich Trx) がもう1つのタンパク質酸化因子として働くこと (図3; Yokochi et al., 2019), TrxL2とACHTが異なる酵素を酸化の標的としていること (Yokochi et al., 2021a) などを明らかにしてきた。興味深いことに、NTRC欠損の表現型は、TrxL2やACHTの同時欠損によっても回復する。この

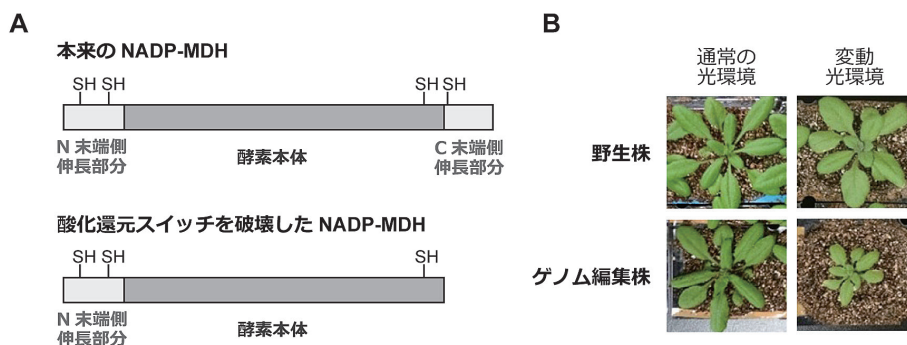


図4：シロイヌナズナのNADP-MDHの酸化還元スイッチ破壊。(A) NADP-MDHの一次構造の簡略図。N末端側とC末端側のシステインペアのうち、C末端側のペアをゲノム編集により破壊した。(B) 生育の表現型。ゲノム編集株では、変動光環境下での生育が阻害される。Yokochi et al. (2021b)より改変。

表現型回復は、2-Cys Prxへの酸化還元バランスを保つことがレドックス制御系全体の機能を支えるために重要というモデルで説明できるように思えるが、それを支持する実験的な証拠はまだ乏しい。レドックス制御系の酸化側に関する研究は始まったばかりであり、その実体解明のためにはさらなる研究が必要とされる。

5. レドックス制御系の生理的重要性

あるタンパク質の植物内での生理的役割や重要性に迫るには、そのタンパク質の機能欠損植物を用いた解析、すなわち遺伝学的な解析が有効であり、レドックス制御系の研究分野でも例外ではない。2020年頃までは、シロイヌナズナのT-DNA挿入株を用いた解析がほとんどであり、Trx各サブタイプやNTRCなどのT-DNA挿入変異株、あるいはそれらを交配して得られた多重欠損株の表現型が多数報告されてきた (e.g., Yoshida and Hisabori, 2016)。これらの表現型については、2018年の日本光合成学会誌「光合成研究」に要約されている (吉田 2018)。

ゲノム編集技術CRISPR/Cas9によって自在に植物の遺伝子改変ができるようになってきたことで、私たちはその特性を活用して新たな変異株作成を試みた。標的酵素の酸化還元スイッチ部位をピンポイントで機能不全にしようという試みである。代表的な標的酵素であり、葉緑体からの過剰還元力の排出に重要なリンゴ酸バルブの鍵酵素であるNADP-MDHを改変のターゲットとして設定した (Yokochi et al., 2021b)。具体的には、シロイヌナズナを用いて、NADP-MDHのC末端側に保存されている酸化還元スイッチ部位のシステイン残基1つを欠失させた (図4 A)。この変異型NADP-MDHは、欠失させたスイッチ部位

でのジスルフィド結合の形成ができなくなり、暗所でも活性を抑えることができない。この変異株の表現型を解析した結果、NADP-MDHのレドックス制御 (暗所～弱光下での不活性化) は、変動する光環境において、葉緑体のNADPH恒常性を維持し植物の生育を維持するために重要であることが分かった (図4 B)。この研究は、酸化還元スイッチ部位のみを欠失させているため本来のNADP-MDHの蓄積量に影響を与えず、この酵素のレドックス制御の影響のみを評価できた点に価値がある。当該研究分野に新たな方向性を示した研究と言えるだろう。今後、同様の戦略を他の酵素に適用することで、個々の酵素のレドックス制御の生理的な役割を次々に明らかにできるものと期待される。

ゲノム編集技術は、レドックス制御系の古典的な経路であるFd/Trx経路の重要性の解決にも大きく貢献した。Fd/Trx経路の存在そのものは古くから認識されていたものの、この経路がいかに植物にとって重要なのかは意外なくらいに明らかになっていなかった。その理由の1つが、この経路の完全な機能抑制に関する報告がなかったことにある。我々は、シロイヌナズナを用いて、CRISPR/Cas9によってFdとTrxの間で還元力伝達のハブとして働くFd-Trx reductase (FTR) のノックアウト株を作製した (Yoshida et al., 2022)。このノックアウト株は極めて強い生育阻害を示し (図5)、またストロマに局在するレドックス制御の標的酵素の還元が完全に阻害されていた。これらの結果は、1) ストロマ酵素の光に応じた還元・活性化は絶対的にFd/Trx経路に依存し、他の経路では代替できないこと、2) それが植物の生育に決定的なインパクトをもたらすことを示している。興味深いことに、調べた酵素のうちATP合成酵素だけは例外的に変異株でも還元されていた。同



図5：シロイヌナズナのFd/Trx経路の機能を抑制したゲノム編集株の生育の表現型。Yoshida et al. (2022)より改変。

時にNTRCを欠損させた場合でも、まだ部分的にその還元能は保持されていた。これらの事実、ATP合成酵素の還元・活性化の過程にはまだ私たちが知らないメカニズムが潜んでいることを示唆しており、今後の実体解明が待たれる。

6. おわりに

葉緑体のレドックス制御系は、ネットワーク状に高度に組織化され、環境変動に対してダイナミックに応答し、そして光合成の調節や植物の生育に決定的な役割を果たしているということが少しずつ明らかになってきた。とはいえ、おそらく現在の私たちの理解はまだ部分的かつ断片的であり、その全貌を統合的に解明するための研究を今後も続けていかなければならない。ゲノム編集の利点を生かした生理学的解析、酸化還元状態の変化をプロテオームレベルで捉える技術開発、細胞内酸化還元状態を可視化するバイオセンサーの活用など、新たな研究戦略が積極的に組み込まれていくべきである。そして、レドックス制御系を多くの因子が関与するネットワークとして俯瞰的に捉えつつ、様々な階層から詳細に調べていくことが重要であろう。

謝辞

本研究は、日本学術振興会・科学研究費助成事業の支援を受けて行われています(22K19130; 23H02498; 23H04961)。

参考文献

Arsova B, Hoja U, Wimmelbacher M, Greiner E, Ustun S, Melzer M, Petersen K, Lein W, Bornke 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

Buchanan BB (2016) The path to thioredoxin and redox regulation in chloroplasts. *Annu Rev Plant Biol* 67: 1-24

Carrillo LR, Froehlich JE, Cruz JA, Savage L, Kramer DM (2016) Multi-level regulation of the chloroplast ATP synthase: the chloroplast NADPH thioredoxin reductase C (NTRC) is required for redox modulation specifically under low irradiance. *Plant J* 87: 654-663

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: 4088-4095

Diaz MG, Hernandez-Verdeja T, Kremnev D, Crawford T, Dubreuil C, Strand A (2018) Redox regulation of PEP activity during seedling establishment in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun* 9: 50

Fukushi Y, Yokochi Y, Wakabayashi KI, Yoshida K, Hisabori T (2022) Verification of the relationship between redox regulation of thioredoxin target proteins and their proximity to thylakoid membranes. *Antioxidants (Basel)* 11: 773

Heuer B, Hansen MJ, Anderson LE (1982) Light modulation of phosphofructokinase in pea leaf chloroplasts. *Plant Physiol* 69: 1404-1406

Hisabori T, Hara S, Fujii T, Yamazaki D, Hosoya-Matsuda N, Motohashi K (2005) Thioredoxin affinity chromatography: a useful method for further understanding the thioredoxin network. *J Exp Bot* 56: 1463-1468

Hou LY, Sommer F, Poeker L, Dziubek D, Schroda M, Gengenberger P (2024) The impact of light and thioredoxins on the plant thiol-disulfide proteome. *Plant Physiol* 195: 1536-1560

Huang J, Staes A, Impens F, Demichev V, Van Breusegem F, Gevaert K, Willems P (2023) CysQuant: simultaneous quantification of cysteine oxidation and protein abundance using data dependent or independent acquisition mass spectrometry. *Redox Biol* 67: 102908

Jacquot JP (2018) Dark deactivation of chloroplast enzymes finally comes to light. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: 9334-9335

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: 416-438
- Michalska J, Zauber H, Buchanan BB, Cejudo FJ, 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
- Montrichard F, Alkhalfoui F, Yano H, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB (2009) Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *J Proteomics* 72: 452-474
- Moon JC, Jang HH, Chae HB, Lee JR, Lee SY, Jung YJ, Shin MR, Lim HS, Chung WS, Yun DJ, Lee KO (2006) The C-type Arabidopsis thioredoxin reductase ANTR-C acts as an electron donor to 2-Cys peroxiredoxins in chloroplasts. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 478-484
- Motohashi K, Hisabori T (2006) HCF164 receives reducing equivalents from stromal thioredoxin across the thylakoid membrane and mediates reduction of target proteins in the thylakoid lumen. *J Biol Chem* 281: 35039-35047
- Motohashi K, Kondoh A, Stumpp MT, Hisabori T (2001) Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11224-11229
- Nikkanen L, Toivola J, Rintamaki E (2016) Crosstalk between chloroplast thioredoxin systems in regulation of photosynthesis. *Plant Cell Environ* 39: 1691-1705
- Nikkanen L, Toivola J, Trotta A, Diaz MG, Tikkanen M, Aro EM, Rintamaki E (2018) Regulation of cyclic electron flow by chloroplast NADPH-dependent thioredoxin system. *Plant Direct* 2: 1-24
- Okegawa Y, 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, 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
- Okegawa Y, Sato N, Nakakura R, Murai R, Sakamoto W, Motohashi K (2023) x- and y-type thioredoxins maintain redox homeostasis on photosystem I acceptor side under fluctuating light. *Plant Physiol* 193: 2498-2512
- Perez-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 U S A* 114: 12069-12074
- Perez-Ruiz JM, Spinola MC, Kirchsteiger K, Moreno J, Sahrawy M, Cejudo FJ (2006) Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. *Plant Cell* 18: 2356-2368
- Perez-Ruiz JM, Guinea M, Puerto-Galan L, Cejudo FJ (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
- Richter AS, Peter E, Rothbart M, Schlicke H, Toivola J, Rintamaki E, Grimm B (2013) Posttranslational influence of NADPH-dependent thioredoxin reductase C on enzymes in tetrapyrrole synthesis. *Plant Physiol* 162: 63-73
- Sekiguchi T, Yoshida K, Okegawa Y, Motohashi K, Wakabayashi KI, Hisabori T (2020) Chloroplast ATP synthase is reduced by both f-type and m-type thioredoxins. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1861: 148261
- Serrato AJ, Perez-Ruiz JM, Spinola 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: 43821-43827
- Wang Y, Wang Y, Ren Y, Duan E, Zhu X, Hao Y, Zhu J, Chen R, Lei J, Teng X, Zhang Y, Wang D, Zhang X, Guo X, Jiang L, Liu S, Tian Y, Liu X, Chen L, Wang H, Wan J (2021) white panicle2 encoding thioredoxin z, regulates plastid RNA editing by interacting with multiple organellar RNA editing factors in rice. *New Phytol* 229: 2693-2706
- Wimmelbacher M, 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
- Yokochi Y, Fukushi Y, Wakabayashi KI, Yoshida K, Hisabori T (2021a) 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, 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 APM, Hisabori T (2021b) 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, 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 U S A* 115: E8296-E8304
- Yoshida K, Hara S, Hisabori T (2015) Thioredoxin selectivity for thiol-based redox regulation of target proteins in chloroplasts. *J Biol Chem* 290: 14278-14288
- Yoshida K, Hisabori T (2016) Two distinct redox cascades cooperatively regulate chloroplast functions and sustain plant viability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E3967-E3976
- Yoshida K, Hisabori T (2019) Simple method to determine protein redox state in *Arabidopsis thaliana*. *Bio Protoc* 9: e3250
- Yoshida K, Hisabori T (2021) Biochemical basis for redox regulation of chloroplast-localized phosphofructokinase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 62: 401-410
- Yoshida K, Hisabori T (2023) Current insights into the redox regulation network in plant chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 64: 704-715
- 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: 1415-1425
- Yoshida K, Yokochi Y, Tanaka K, Hisabori T (2022) The ferredoxin/thioredoxin pathway constitutes an indispensable redox-signaling cascade for light-dependent reduction of chloroplast stromal proteins. *J Biol Chem* 298: 102650
- 吉田啓亮. (2018) レドックスを基盤とした葉緑体の機能統御ネットワーク. *光合成研究* 28: 39-50
- Zimmer D, Swart C, Graf A, Arrivault S, Tillich M, Proost S, Nikoloski Z, Stitt M, Bock R, Muhlhaus T, Boulouis A (2021) Topology of the redox network during induction of photosynthesis as revealed by time-resolved proteomics in tobacco. *Sci Adv* 7: eabi8307