

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18687004

研究課題名 (和文) 乾燥ストレスに応答した光合成電子伝達機構の解明

研究課題名 (英文) Regulation of photosynthetic electron transport in response to drought stress.

研究代表者

宗景 ゆり (MUNEKAGE YURI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：30423247

研究成果の概要：強光乾燥ストレス条件下での光合成電子伝達制御機構の解明するために、カラハリ砂漠に自生し優れた乾燥強光耐性を持つ野生種スイカを材料に、タンパク質の網羅的解析および生理解析を行った。その結果、乾燥/強光ストレスに応答して光合成電子伝達を担うシトクロム  $b_6f$  複合体の Rieske サブユニットの  $pI$  が変動することを明らかにした。また乾燥ストレス下で循環的電子伝達活性が上昇することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	12,600,000	3,780,000	16,380,000
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	17,400,000	5,220,000	22,620,000

研究分野：

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：光合成, 乾燥ストレス, 電子伝達, プロテオミクス

## 1. 研究開始当初の背景

カラハリ砂漠に自生する野生種スイカは優れた乾燥強光耐性を示す。一般に乾燥ストレス環境下では植物は水分の損失を防ぐため、気孔を閉鎖する。しかし、気孔の閉鎖は同時に葉内への  $\text{CO}_2$  の流入を低下させ、 $\text{CO}_2$  固定反応を停止させてしまう。光合成反応では光エネルギーを ATP や NADPH に変換する電子伝達反応と、ATP, NADPH を使って行われる  $\text{CO}_2$  固定反応が協調して働く。ところが乾燥ストレス下では  $\text{CO}_2$  固定反応のみが停止するため、葉緑体に蓄積した過剰な光エネ

ルギーが光障害を引き起こし植物に害を与える。野生種スイカは  $\text{C}_3$  光合成を営み、 $\text{C}_4$  植物や CAM 植物のような高い水分利用効率をもたないが、強い乾燥耐性を持つ。このため葉緑体に光障害を防ぐ別の機能を備えていると考えられる。これまでに当研究グループでは、野生種スイカが乾燥ストレス下で抗酸化剤として重要な機能を果たすシトルリンを葉に蓄積することを明らかにしている。さらにプロテオーム解析により、乾燥ストレス下で、電子伝達を担うシトクロム  $b_6f$  複合体サブユニットや循環的電子伝達に関わる因子の発現が変動することが示唆された。

葉緑体のチラコイド膜上にあるシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体は光化学系 II と光化学系 I を結ぶ電子伝達系の間で機能する。シトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体は電子伝達を行うと共に、チラコイド膜の外から内側へプロトンを輸送することで、チラコイド膜内外にプロトン勾配を形成する。形成されたプロトン勾配は ATP 合成に使われる一方で、pH 勾配が高くなると熱散逸機構を誘導する。熱散逸機構はクロロフィルが吸収した光エネルギーを熱に変えて逃がす機能であり、過剰光下でこの機構が誘導されると活性酸素の生成を軽減することができる。シトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体はチラコイド膜内の pH によって電子伝達活性を制御し、老化葉では発現量を下げることによって電子伝達活性を抑えるなど、電子伝達全体活性を決める中心的な役割を担う。野生種スイカでは乾燥ストレス下で、シトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体による電子伝達制御機構が働くのではないかと考えられた。

光化学系 I 循環的電子伝達は、長い間その分子機構および生理機能が未知のままであったが、近年我々が行ったシロイヌナズナを用いた分子遺伝学的解析により分子の一端 (PGR5) が初めて同定された。C<sub>3</sub> 光合成を行う高等植物には、フェレドキシンを経由する FQR 経路と NDH 複合体を経由する NDH 経路の二つが働くことが明らかになっている。PGR5 は FQR 活性に関わるタンパク質であり、循環的電子伝達の種経路として働くことが明らかになっている。また、我々が行った両経路が働かない *ogr5 crr2* 二重変異株の解析から、循環的電子伝達は光合成に必要なエネルギーのバランス調節や光障害の防御に関与していることが明らかになった。プロテオーム解析の結果から野生種スイカでは乾燥強光条件下において、循環的電子伝達を活性化させる葉緑体電子伝達系の再編が起こっていることが推測され、この再編が優れた乾燥強光耐性を可能にする光障害防御システムであると考えられた。

そこで乾燥強光耐性を持つ野生種スイカを材料に葉緑体の電子伝達制御機能を明らかにする着想に至った。

## 2. 研究の目的

優れた乾燥耐性を示す野生種スイカは、乾燥ストレス条件下でも葉が萎れない。このため、乾燥条件下で葉の気孔が閉鎖することで葉内 CO<sub>2</sub> の流入が止まり、CO<sub>2</sub> 固定反応が完全に停止した時の葉緑体電子伝達制御機構を解析できる。電子伝達反応は、光合成の初発反応である光エネルギーを化学エネルギーに変換する役割を担うため、過剰光下では逆にこの反応が光障害の原因となる活性酸素の生成を招く。効率良い電子伝達反応から、

反応を空転させて光障害回避する電子伝達反応へ転換は、ストレスを未然に防ぐ有効な手段であると考えられる。本研究では、光合成電子伝達に関わるタンパク質を中心に乾燥ストレス条件下での分子挙動を解析し、電子伝達を制御する分子機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### 1) 乾燥ストレスに伴う野生種スイカ葉の光合成活性の変化

野生種スイカを強光条件下 (700  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で生育し、冠水停止により乾燥ストレスを与えた。乾燥ストレスに伴う、光合成速度の変化と電子伝達活性の変化を、ガス交換測定とクロロフィル蛍光の同時測定により解析した。ガス交換測定では CO<sub>2</sub> 固定速度および気孔コンダクタンスが測定できる。クロロフィル蛍光測定では光化学系 II の電子伝達活性および熱散逸量が測定できる。さらに光化学系 I の反応中心 P700 の酸化還元レベルを 820nm の吸光度変化より測定した。冠水停止後 3 日間と再冠水後 3 日間の光合成活性および電子伝達活性の推移をそれぞれ解析した。

### 2) 乾燥ストレス前後での葉から抽出した膜タンパク質のプロテオーム解析

乾燥ストレス前と冠水停止 3 日後の乾燥ストレスを受けた野生種スイカの葉から全膜面分を抽出し、二次元電気泳動により展開した。ストレス後に発現量に変動がみられたタンパク質スポットを抽出し質量分析により、同定した。

### 3) シトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体 Rieske サブユニットおよび循環的電子伝達に関わるタンパク質の解析

スポット強度に変化が見られた Rieske サブユニットの詳細な解析を行うために、抗体を作成した。EST から得られた Rieske 配列を基に、膜貫通部分を除いた可溶性ドメインを GST と融合させたタンパクを大腸菌で発現させた。Glutathione Sepharose カラム内で thrombin により GST を切断し、溶出された Rieske タンパク質をさらにゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。得られた溶液で SDS-PAGE を行い、単一バンドに精製されたことを確認して、このリコンビナントタンパク質を用いて抗体を作製した。得られた抗体を使ってスイカ葉の SDS-PAGE およびウエスタンを行い、予想分子量に相当する約 19kDa の位置にのみ単一バンドが見られることを確認した。作成した Rieske 抗体を用い、葉の全膜面分を用いたウエスタン解析を行い Rieske タンパク質量の増減を解析した。

また葉の全膜画分を二次元電気泳動で展開し、ウェスタン解析により、ストレス前後での  $pI$  変動が見られるかどうかを調べた。

循環的電子伝達経路に関わるタンパク質の発現に変化があるかどうか調べるために、PGR5 および NDH 複合体の発現量をそれぞれ抗 PGR5 抗体および抗 NDH-H 抗体により調べた。

#### 4) 光化学系 I 循環的電子伝達活性の解析

強光乾燥ストレス下におけるチラコイド膜のプロトン透過流量および電子伝達量との関係を、カロテノイド吸収の electrochromic shift (ECS) 測定とクロロフィル蛍光測定を併用することにより評価した。照射定常条件下の葉に 300 ms の暗処理を行ない、その際の ECS 強度の時間変化 (DIRK: dark-interval relaxation kinetics) から、チラコイド膜を介したプロトン透過流量を評価した。また、光化学系 I の電子受容体である methyl viologen (MV) を浸潤させたリーフディスクを用いて同様の測定を行った。

#### 4. 研究成果

##### 1) 乾燥ストレスに伴う野生種スイカ葉の光合成活性の変化

強光条件下で生育させた野生種スイカを冠水停止により乾燥ストレスを与えた。冠水停止 3 日後には土壤水分含量 20% に達したが、野生種スイカの葉は萎れず、葉の水分含量はストレス前と比較しほとんど変化しなかった (図 1 a, b)。その後再冠水を行った。CO<sub>2</sub> 固定速度は冠水停止 1 日後には急激に低下し、冠水停止 2 日後には呼吸活性が CO<sub>2</sub> 固定速度上回り純光合成速度はマイナスに転じた (図 1 c)。気孔コンダクタンスは冠水停止 1 日後に CO<sub>2</sub> 固定速度同様に急激に低下し、冠水停止 2 日後にはゼロを示した (図 1 d)。これらの結果から冠水停止 2 日以降は気孔が完全に閉鎖し CO<sub>2</sub> 固定が停止していることが明らかになった。再冠水により 1 日後には土壤水分含量は冠水停止前の値に戻ったが、純光合成速度や気孔コンダクタンスはゆっくりと回復し 3 日後にストレス前とほぼ同じ値になった (図 1 b-d)。

乾燥ストレス前および乾燥ストレス 3 日目の電子伝達活性を比較した結果、光化学系 II の最大活性を示す  $F_v/F_m$  が変化しないことから、光化学系 II は光障害を受けていないことが明らかになった。電子伝達活性を示す  $\Phi_{PSII}$  は低下したが、CO<sub>2</sub> 固定が完全に停止しているときにも低い電子伝達活性を維持していることが明らかになった。乾燥ストレス条件下では、non-photochemical quenching (NPQ) が増大しており、乾燥ストレス下で葉緑体チラコイド膜の酸性化が起こり、過剰な光エネルギー

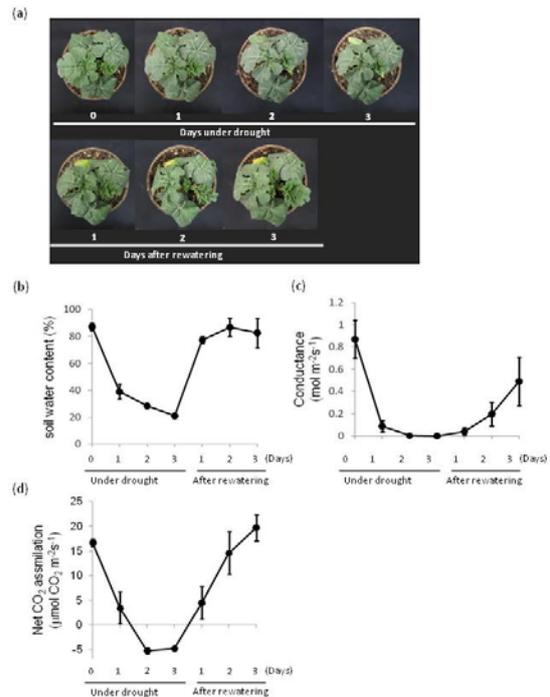


図 1 乾燥ストレスに伴う光合成活性の変化

(a)野生種スイカの写真、(b)土壤水分含量、(c)気孔コンダクタンス、(d)純光合成速度

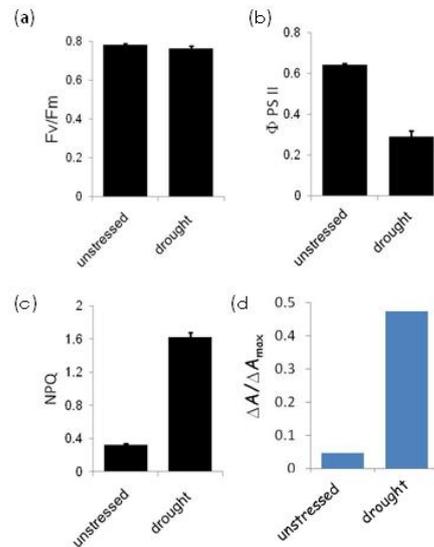


図 2 乾燥ストレスに伴う電子伝達活性の変化

(a)光化学系 II の最大量子収率、(b) 光化学系 II 量子収率、(c)non-photochemical quenching (NPQ)、(d)P700 の酸化還元レベル

ギーが熱として散逸する機構が働いていることが明らかになった。光化学系 I の反応中心 P700 の酸化還元レベルを測定したところ、乾燥ストレス下では酸化状態に偏っていた。これらの結果から乾燥ストレス条件下では電子の流れが光化学系 II と光化学系 I の間

で制限されていることが示唆された。

## 2) 乾燥ストレス前後での葉から抽出した膜タンパク質のプロテオーム解析

乾燥ストレス前と冠水停止3日後の乾燥ストレスを受けた野生種スイカの葉から全膜タンパク質を二次元電気泳動 ( $pI$  4-7) により展開した (図3)。約400個のスポットに分離されたタンパク質のうち、乾燥強光ストレス下で2倍以上増加しているスポットが38個、1/2以下に減少しているタンパク質が16個検出された。これらを質量分析により同定した結果、電子伝達に関わる因子として、シトクロム  $b_6f$  複合体の Rieske サブユニットや NDH 複合体の I, K サブユニットがデータベース検索によりヒットした。

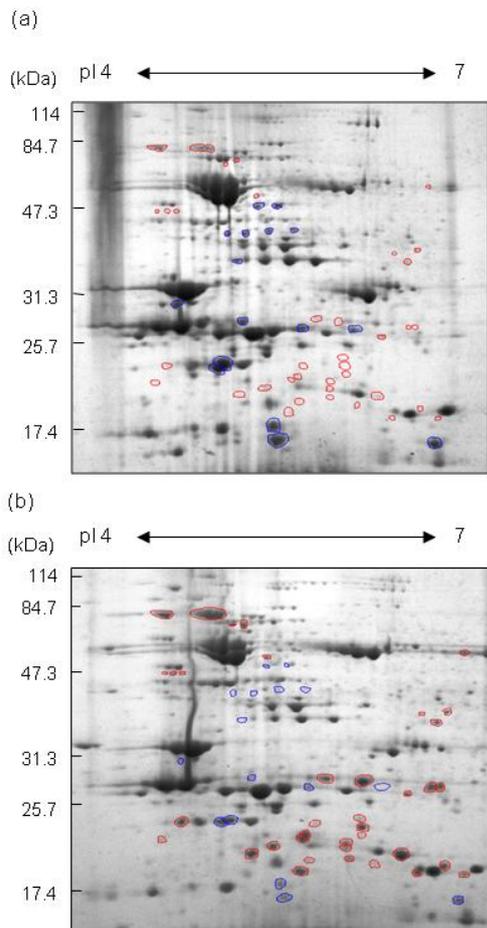


図3 野生種スイカの葉から抽出した全膜画分の2次元電気泳動 (a)乾燥ストレス前 (b)乾燥ストレス3日目。赤丸は発現が上昇したタンパク質スポット、青丸発現が低下したスポットを示す。

## 3) シトクロム $b_6f$ 複合体 Rieske サブユニットおよび循環的電子伝達に関わるタンパク質の解析

乾燥ストレス下でスポット強度に変動があったシトクロム  $b_6f$  複合体 Rieske サブユニットに着目して詳細な解析をおこなった。抗 Rieske 抗体を使って二次元電気泳動で展開した、葉の膜画分に対しウエスタンブロッティングを行った結果、ストレス前では  $pI$  の違う3つのスポットが検出された。乾燥ストレス3日後にはさらに酸性側に複数の Rieske スポットが出現することが明らかになった (図4)。より酸性側に出現した Rieske スポットは再冠水した植物の葉では検出されなかった。また、酸性側の Rieske スポットは、 $2000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の強光照射によっても誘導され、その後暗所に15分間置いた植物体では消失し始めていた。これらの結果から、乾燥強光ストレス下だけでなく、強光照射下でも可逆的に  $pI$  の異なる Rieske が出現することが明らかとなった。Rieske タンパク質の総量は乾燥ストレスや強光照射によって変動が見られなかった。また、 $pI$  の変動は15分と短い間にみられることからこの  $pI$  変動はタンパク質修飾により引き起こされることが示唆された。電子伝達活性解析より乾燥ストレス下では、光化学系IIと光化学系Iの間で電子の流量が制限されていることが予想されることから、シトクロム  $b_6f$  複合体の活性が電子の流量を制御していると考えられる。したがって、乾燥ストレス下で Rieske サブユニットが修飾を受けることで、シトクロム  $b_6f$  複合体による電子伝達活性を負に制御していることが示唆された。

環状電子伝達に関わる PGR5 および NDH-H の発現量を乾燥ストレス前と後で比較したところ、PGR5、NDH-H ともに発現量に変化は見られなかった。

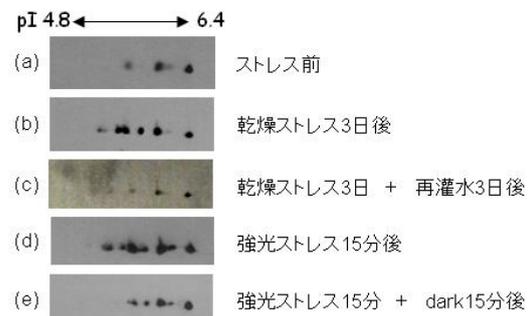


図4  $pI$  の異なるシトクロム  $b_6f$  複合体 Rieske サブユニットの挙動変化

## 4) 光化学系 I 循環的電子伝達活性の解析

強光乾燥ストレス下におけるチラコイド膜のプロトン透過流量および電子伝達量と

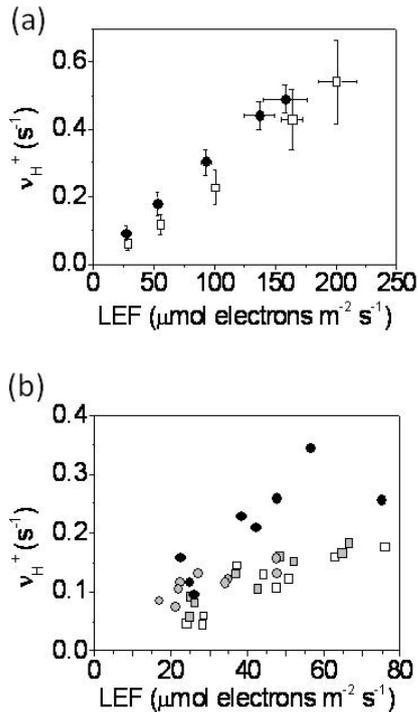


図5 直鎖電子伝達量(LEF)に対するプロトン透過流量 ( $v_H^+$ )の見積もり (a)乾燥ストレス前(□)と乾燥ストレス条件下(●)の葉。(b)蒸留水(白および黒)またはMV(灰色)を浸潤させたリーフディスク

の関係を、カロテノイド吸収の electrochromic shift (ECS)測定とクロロフィル蛍光測定を併用することにより評価した。その結果、直鎖型電子伝達量当たりのプロトン透過流量は、非ストレス下に比べて強光乾燥ストレス下の野生種スイカ葉において顕著に大きいことが見出された。また、光化学系 I の電子受容体である methyl viologen (MV)を浸潤させたリーフディスクを用いて同様の測定を行なったところ、非ストレス下の葉においてMV処理はプロトン透過流量に大きな影響を及ぼさないが、強光乾燥ストレス下の葉ではMV処理によりプロトン透過流量の顕著な低下が見られた。これらの実験結果は、強光乾燥ストレス下において光化学系 I の循環的電子伝達経路が活性化し、この電子伝達に依存したプロトン流入が増大することを示唆している。これらの結果を国際学術論文誌に投稿し、受理された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①KAORI KOHZUMA, JEFFREY A. CRUZ, KINYA AKASHI, SAKI HOSHIYASU, YURI NAKAJIMA MUNEKAGE, AKIHO YOKOTA & DAVID M. KRAMER

(5 番目), The long-term responses of the photosynthetic proton circuit to drought, *Plant, Cell and Environment* 誌, 32 巻 209-219, 2008, 査読有

[学会発表] (計 3 件)

①三田智子, 吉田和生, 宗景ゆり, 明石欣也, 横田明徳, 余剰光エネルギー存在下における光合成電子伝達制御の解析, 第 50 回日本植物生理学会年会, 2009. 3. 21-2, 名古屋

②三田智子, 吉田和生, 宗景ゆり, 明石欣也, 横田明徳, A novel molecular behavior of chloroplast Rieske FeS protein in response to excess light energy, 第 31 回分子生物学会年会, 2008. 12. 9-12, 神戸

③上妻馨梨, 明石欣也, Jeffrey A. Cruz, 宗景ゆり, 横田明徳, David M. Kramer, 強光乾燥ストレス下における葉緑体チラコイド膜を介したプロトン透過流量の解析 - Electrochromic shift (ECS)測定からの考察 -, 第 31 回分子生物学会年会, 2008. 12. 9-12, 神戸

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

宗景 ゆり (MUNEKAGE YURI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号: 30423247