

強光乾燥ストレス下における
葉緑体 ATP 合成酵素 ϵ サブユニットの量的制御の解析

星安 紗希
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 分化・形態形成学研究室
(横田 明穂 教授)

平成 25 年 5 月 7 日提出

目次

	ページ数
第 1 章 諸論.....	3
第 2 章 葉緑体 ATP 合成酵素 ϵ サブユニットの翻訳後修飾の同定	
2-1. 序論.....	8
2-2. 材料と方法.....	10
2-3. 結果.....	13
2-3-1. 野生種スイカの 2 分子種 ϵ の精製	
2-3-2. 野生種スイカの ϵ の翻訳後修飾の同定	
2-3-3. 他の植物種における 2 分子種 ϵ の解析	
2-3-4. シロイヌナズナにおける ϵ の翻訳後修飾の同定	
2-4. 考察.....	20
第 3 章 2 分子種 ϵ サブユニットの量的制御メカニズムの解析	
3-1. 序論.....	24
3-2. 材料と方法.....	25
3-3. 結果.....	28
3-3-1. 乾燥ストレス下における野生種スイカの葉の蒸散速度	
3-3-2. 乾燥ストレス下における 2 分子種 ϵ タンパク質の蓄積量の解析	
3-3-3. 異なる発達段階の野生種スイカ葉における 2 分子種 ϵ の挙動	
3-3-4. 定量的 PCR による ϵ の遺伝子発現量の解析	
3-3-5. 各種プロテアーゼ阻害剤による ϵ タンパク質分解への影響	
3-3-6. メタロアミノペプチダーゼに対する 2 分子種 ϵ の感受性の比較解析	
3-3-7. 乾燥ストレス下におけるメタロアミノペプチダーゼ遺伝子発現量の解析	
3-4. 考察.....	36
第 4 章 結論.....	41
参考文献.....	43
謝辞.....	51

第1章

諸論

陸上植物は、光エネルギーを利用して、1年に100億トンの炭素を固定している(Field *et al.*, 1998)。この光合成システムは、地球上のバイオマスを生産し、私たちヒトを含む生物の生命活動を支えている。しかしながら、自然環境は非常に変動しやすいため、光合成システムに様々な影響を与える。そこで、移動手段のない植物は、環境に応答した光合成のエネルギー代謝の調節機構を発達させてきた。この応答機構は時間軸で異なり、数秒~数分にわたる短期の応答機構と、数時間~数週間にわたる長期の環境応答に大別される。短期の応答機構では、エネルギー依存性の qE クエンチングやステート遷移による余剰光エネルギーの回避機構(NPQ : nonphotochemical quenching) が例として挙げられる(Sarvikas *et al.* 2006)。qE クエンチングは光合成で消費されない余剰な光エネルギーを熱に変換して放出するシステムであり、NPQ の大部分を担っている。このシステムは強光条件下での光化学系 II (PSII : photosystem II) 複合体のサブユニット PsbS のプロトン化と、キサントフィルサイクルの2つのシステムから構成されていると考えられている(Demmig 1998; Li *et al.* 2000; Hieber *et al.* 2004; Sarvikas *et al.* 2006)。また、ステート遷移は、PSII と結合しているアンテナタンパ

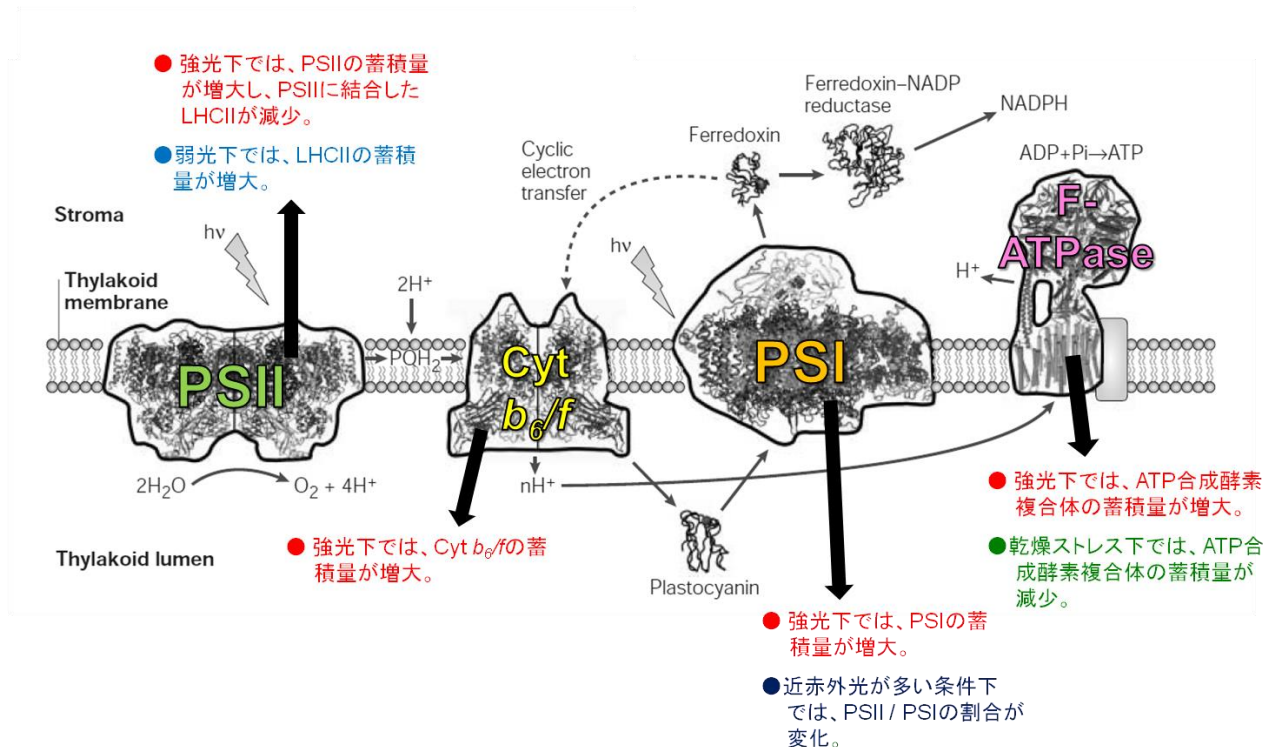


図 1-1 環境に応答した光合成タンパク質の蓄積量変化

Nelson & Ben 2004 より改変。

ク質が強光条件下で PSII と解離することで、PSII の反応中心へのエネルギー伝達を抑制するシステムのことであり、qE クエンチングと同様に、強光下でのタンパク質の損傷を防ぐための代表的な機構である(Allen 1992)。一方、長期の環境応答では、光合成タンパク質の構造変化や、植物体や葉の形態変化が挙げられる(Walters 2005)。さらに、個々の光合成タンパク質の蓄積量の変化も観察される(図 1-1、Walters & Horton 1994)。

光合成タンパク質の量的制御については多くの研究がなされている。例えば、弱光に比べ強光下では、PSII やシトクロム *b₆f*、ATP 合成酵素、カルビンサイクルに関与する酵素等の蓄積量が増加する(Walters 2005)。一方、PSII に付随する集光アンテナタンパク質(LHCII)は減少する。これらの結果、電子伝達活性や CO₂ 消費、クロロフィル a/b 比を増加させることができる。さらに、光の質も光合成タンパク質の構成比に影響を与えており、近赤外光が多い条件下では、PSII/PSI の割合が変化することが報告されている(Walters & Horton 1994)。このような量的制御は遺伝子発現レベルでの調節(Shimizu *et al.* 2010)や、特異的なタンパク質の分解(Yang *et al.* 1998)によって行われると示唆されているが、その分子メカニズムの詳細については判明していない。

翻訳後修飾は光合成の代謝制御に関与する重要な要因と考えられている。特にリン酸化は光や酸化還元によって誘導される翻訳後修飾の代表例である。リン酸化修飾は、PSII のサブユニットである D1、D2、CP43、PsbH や LHCII 等で同定されている。LHCII のリン酸化修飾は光や酸化還元誘導によるステート遷移に関与することが報告されている(Minagawa & Takahashi 2004)。ステート遷移とは、PSII と PSI の 2 つの光化学系をバランス良く駆動させるために、2 つの光化学系が光を集める能力を瞬時に最適化させる機構のことある。プラストキノンが酸化状態では、LHCII は PSII と結合している。一方、プラストキノンの還元化が進行すると、タンパク質キナーゼ STN7 が LHCII をリン酸化し、リン酸化された LHCII が PSI と結合する(Depège *et al.*, 2003; Bellafiore *et al.* 2005)。また、強光条件下では、LHCII のリン酸化修飾の割合が増大し、LHCII は光化学系から解離することで、熱散逸を誘導している。

PSII コア複合体のリン酸化は PSII 修復サイクルに関与していることが報告されている(Aro *et al.* 2005)。PSII 修復サイクルとは、

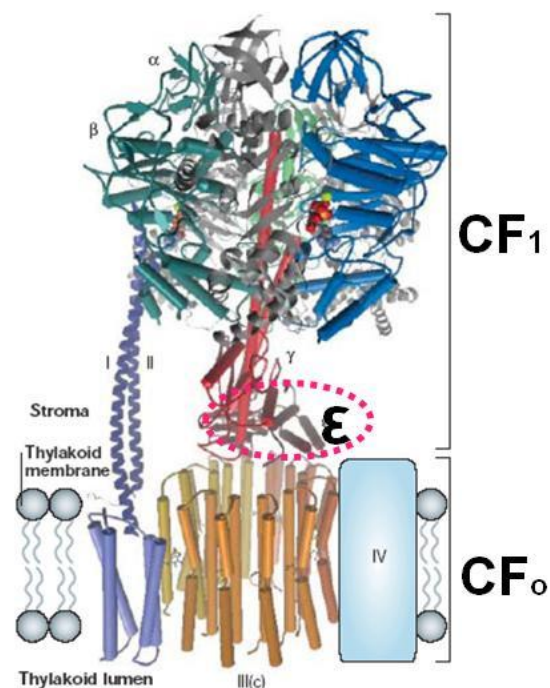


図 1-2 葉緑体 ATP 合成酵素の構造 (Nelson & Ben-Shem 2004 より改変)

D1 タンパク質のみを損傷させ、新規の D1 タンパク質と入れ替えることで、他の光合成タンパク質への損傷を防ぐことができる防御システムである。損傷した PSII はリン酸化を受けることで、グラナからストロマに移動し、ストロマに存在する FtsH というプロテアーゼにより、損傷した D1 タンパク質が分解される(Baena-Gonzalez & Aro 2002; Yokthongwattana & Melis 2006)。

リン酸化以外の翻訳後修飾としては、メチル化(Raunser *et al.* 2009)、糖鎖修飾(Nanjo *et al.* 2006)、アセチル化(Houtz *et al.* 1989; Zybailov *et al.* 2008)などが光合成タンパク質で同定されている。しかしながら、これらの翻訳後修飾の生化学的な機能や生理学的意義についてはほとんど明らかになっていない。

葉緑体 ATP 合成酵素は、光化学系により膜内外に形成されたプロトン濃度勾配を利用して、ADP から ATP への変換を触媒する酵素である。この酵素は膜に貫通し、プロトンチャネルとして機能する CF_o と、ストロマ側に突出し ATP の合成を触媒する CF₁ の 2 つの複合体から構成されている(図 1-2, Nelson & Ben-Shem 2004)。CF_o は I~IV サブユニット、CF₁ は $\alpha \sim \epsilon$ サブユニットで構成されており、それらのサブユニット量比は I:II:III:IV: α : β : γ : δ : ϵ = 1:1:14:1:3:3:1:1:1 である(Richter 2004)。プロトンの流入により、III サブユニットは回転し、それに伴い中心に存在する γ サブユニットが回転する。 γ サブユニットは

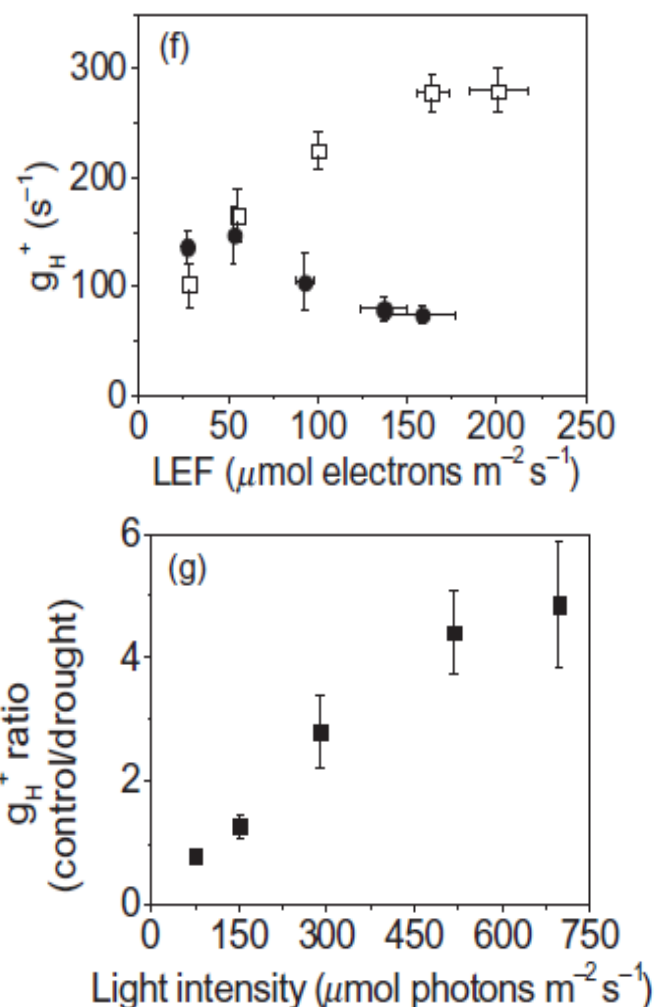


図 1-3 光誘導によるチラコイド膜のプロトン透過性(g_H^+)の変化

(A)乾燥ストレス前の植物($\square$)と長期的な乾燥ストレス下の植物($\bullet$)の Linear electron flow (LEF)に対する g_H^+ 値のプロット。乾燥ストレス前の植物のプロトン透過性は電子伝達の増加に伴って高い値を示し、乾燥ストレス後の植物においては、低い値を示した。(B)各光強度下における乾燥ストレス後の植物に対する乾燥ストレス前の植物の g_H^+ 値の比。強光になるに従って、乾燥ストレス後の植物のプロトン透過性が低下した。これらの結果から、強光下において、乾燥ストレス後の植物では、ATP 合成酵素のプロトン透過能力が低下し、その結果、チラコイド膜の密閉性が高くなることが明らかになった。(Kohzuma *et al.* 2009)

非対称であるため、回転に伴い β サブユニットとの相互作用様式が変化し、 β の立体構造が変化することで、ATP が合成される(Hisabori *et al.* 1999)。

CF₁ 複合体を構成するサブユニットの一つである ϵ サブユニットは、ATP 合成を制御する重要なサブユニットである。さらに、 ϵ サブユニットは ATP 合成の逆反応である ATP 加水分解を抑制する因子としても機能する(Richter *et al.* 1984)。特に、暗所では、 γ サブユニットの Cys199 と Cys205 間のジスルフィドの酸化により、 ϵ サブユニットと CF₁ の親和性が向上することで、ATP 加水分解活性が阻害されることが報告されている(Soteropoulos *et al.* 1994)。この制御機構により、光合成の行われない夜間では、ATP 加水分解反応を抑制することができる。

また、 ϵ はチラコイド膜ルーメンからのプロトン流出と ATP 合成を共役させる必須因子であり、 ϵ を脱離させた CF₁ では、ATP 合成を伴わずにプロトンが流出し、チラコイド膜は脱共役状態となることが過去の *in vitro* 実験により示されている(Richter *et al.* 1984)。また、これまでの研究により、光照射下で ϵ の構造が変化することが報告されている(Richter *et al.* 1987)。

さらに、当研究室での強光乾燥耐性の野生種スイカを用いた解析により、乾燥ストレス初期には葉緑体 ATP 合成酵素の ϵ サブユニットの蓄積量が優先的に減少し、後期では葉緑体 ATP 合成酵素複合体(CF₁)の蓄積量が、他の光合成タンパク質複合体に先駆けて減少することが見出された(上妻、2008)。また、この時、チラコイド膜ルーメンから排出されるプロトンの透過性が顕著に低下することが判明した(図 1-3)。葉緑体 ATP 合成酵素はチラコイド膜ルーメンからのプロトン排出に関与する唯一の複合体である。従ってこれらの結果は、ストレスによる ATP 合成酵素の蓄積量の低下がチラコイド膜の密閉性を高め、余剰な光エネルギーを熱により散逸する NPQ の誘導に貢献していることを示唆している。

野生種スイカのチラコイド膜タンパク質のプロテオーム解析において、葉緑体 ATP 合成酵素 ϵ サブユニットは等電点の差異により、2 分子種存在している可能性が示唆された(図 1-4, 吉田 2005)。 ϵ は単一コピーの遺伝子にコードされていることから、 ϵ サブユニットが、翻訳後修飾により 2 分子種存在している可能性が考

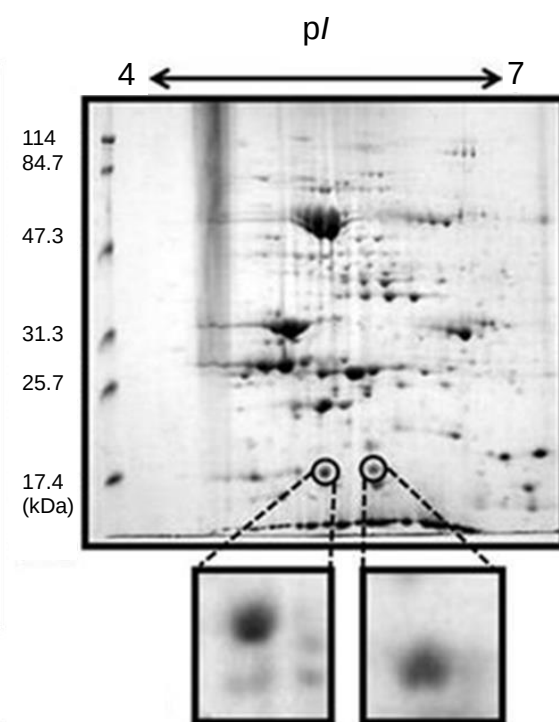


図 1-4 2 分子種の葉緑体 ATP 合成酵素 ϵ サブユニット

非ストレス時の葉における膜画分のタンパク質 2 次元電気泳動像を示す。図下部に、MS により検出された 2 分子種の ϵ スポットの拡大図を示す(吉田、2005)。

えられた。しかしながら、植物体内における 2 分子種 ϵ サブユニットの構造の詳細や、環境応答についてはほとんど報告がなく、その分子挙動に興味を持たれた。

そこで本研究では、葉緑体 ATP 合成酵素の 2 分子種の ϵ サブユニットの構造と、それらの量的制御機構に着目し、環境に応答した光合成タンパク質の蓄積量や光エネルギー制御メカニズムについて、新規な知見を得ることを目的とした。

本論文において、第 2 章では、野生種スイカ葉から 2 分子種の ϵ サブユニットを精製し、2 分子種出現の化学的根拠を明らかにした。さらに、3 章では、2 分子種 ϵ サブユニットの生体内挙動と量的制御に関与する因子についての解析を行うことで、乾燥ストレス下における光合成タンパク質の量的制御メカニズムについて考察した。

第2章

葉緑体 ATP 合成酵素 ϵ サブユニットの翻訳後修飾の同定

2-1. 序論

葉緑体 ATP 合成酵素を構成するサブユニットは、タンパク質レベルで様々な化学修飾を受けていることが知られている。例えば、 CF_1 を構成するサブユニットの一つである α サブユニットは分子量の差異により、2 分子種(α と α')の存在が報告されている(Burkey & Mathis 1998; Romanowska *et al*, 2008)。分子量 67 kDa の α' サブユニットは、弱光条件下では蓄積が見られないが、強光により誘導されることが明らかになっている。一方、分子量 64 kDa の α は、弱光・強光ともに同等の蓄積が見られた。また、アブラナ属の植物の葉において、強光ストレス下で、分子量が異なる 2 分子種の β サブユニットの存在が明らかになっている(Jiao *et al*, 2004)。光条件下で特異的に誘導される 54 kDa の β サブユニットの分子種は、チラコイド膜に比べ、子葉の緑化時期に強く発現していることが明らかになっている。この分子種は光ストレスによって誘導されることから、葉緑体の光馴化に機能している可能性が示唆されている。しかしながら、これらの分子種の翻訳後修飾の実体や、それら分子種の量的制御メカニズムについては明らかになっていない。

ATP 合成酵素はバクテリアの細胞膜、ミトコンドリアの内膜、葉緑体のチラコイド膜に存在している。この中でも、バクテリアと葉緑体間での ATP 合成酵素の構造・機能はよく保存されており、ATP 合成酵素の ϵ サブユニットによる酵素活性の抑制はバクテリアと葉緑体の本酵素のみが持つことが明らかになっている。(図 2-1, Shah *et al*. 2013)

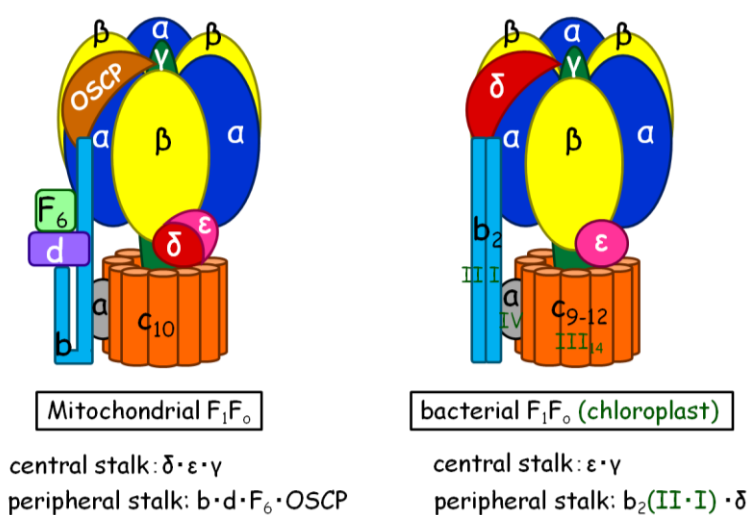


図 2-1 ミトコンドリア・バクテリア・葉緑体の ATP 合成酵素の構造モデル

緑字は葉緑体 ATP 合成酵素のサブユニット名を示す。

(参考資料 : <http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/part2/f1fo.htm>)

ϵ サブユニットは Fo(葉緑体の場合は CFo)でのプロトン輸送と ATP 合成を共役させる因子であり、Fo と F₁(葉緑体の場合は CFo と C F₁)の境界領域に存在する。また、 ϵ サブユニットは、 β サンドイッチからなる N 末端ドメインと 2 本の α ヘリックスのコイルドコイルからなる C 末端ドメインの 2 つのドメインを持つことが明らかになっている(図 2-2, Uhlin *et al.* 1997; Kato-Yamada 2009)。

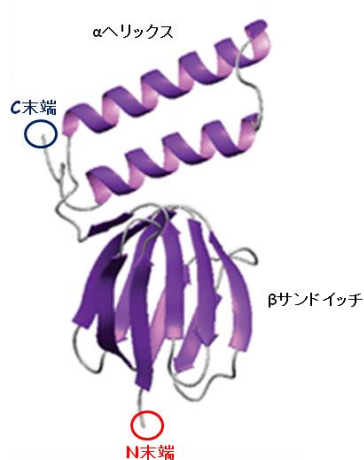


図 2-2 ϵ の立体構造

シアノバクテリアの ϵ の立体構造を示す。(Yagi *et al.* 2010)

翻訳後修飾を受け、どんな翻訳後修飾が関与しているのかは不明であった。

そこで、本章では、まず、2 分子種の構造差をもたらす要因について明らかにすることを目的とした。

これまでに当研究室で行われたプロテオーム解析から、乾燥強光耐性の C₃植物である野生種スイカにおいて、いくつかのチラコイド膜タンパク質がストレスに応答してユニークな挙動を示すことが判明した(吉田、2005; Sanda *et al.* 2011)。その挙動の一つとして、葉緑体 ATP 合成酵素 ϵ サブユニットは、分子量がほぼ等しく、等電点が異なる 2 分子種として存在することが示唆された。 ϵ サブユニットは単一コピーの遺伝子にコードされていることから(Shinozaki *et al.* 1983; Plader *et al.* 2007)、 ϵ が、翻訳後修飾により 2 分子種存在している可能性が考えられた(吉田、2005)。しかしながら、2 分子種のうちどちらの ϵ が

2-2. 材料と方法

1. 植物材料と栽培条件

野生種スイカ(*Citullus lanatus* L. sp. No. 101117-1)は、上妻(2008)の方法に従って、温度 35°C、湿度 50-60%、光強度 600 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で生育させた。また、メロン(*Cucumis melo* cv Summer-Festa)、タバコ(*Nicotiana tabacum* ecotype SR1)は野生種スイカと同様の生育条件で育てた。*Arabidopsis thaliana* は Ogawa *et al* (2009) の手法に従って生育させ、2-3 週間目の植物体を用いて解析を行った。

2. 2次元電気泳動およびイムノブロット解析

完全展開した野生種スイカの第4葉を乳鉢に入れ、液体窒素を適量加えた。乳鉢を用いて、葉を破砕し、0.1 M potassium phosphate (pH 7.0), 2 mM MgCl_2 , 10 mM NaCl, 1 mM ethylenediamine-tetraacetic acid, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM phenylmethanesulphonyl fluoride を含むタンパク質抽出バッファーを加え、乳棒で混ぜた。その溶液をマイクロチューブに入れ、2,300 g で3秒間遠心し、その上清を新しいチューブに入れた。この遠心の操作を3回繰り返した。その後、100,000 g で20分間遠心した。上清を取り除き、ペレットをタンパク質抽出バッファーで3回洗った。ペレットは80% アセトンで処理し、十分にクロロフィルを除去した後、0.5% (v/v) IPG buffer, pI 4-7 (GE Healthcare, Fairfield, CT, USA), 7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulphonate, 0.5% (v/v) Triton X-100, 0.00625% (w/v) sodium dodecyl sulphate (SDS), 100 mM dithiothreitol を含む2次元バッファーでペレットを溶かし、20,400 g で60分間遠心した。その上清を Immobiline DryStrip gels (pI 4-7, GE Healthcare)に添加し、1次元目の泳動を行った。以下の2次元目の電気泳動からイムノブロット解析までの手法は Akashi *et al* (2011)の手法に従った。

3. SDS-PAGE およびイムノブロット解析

完全展開後の第4葉から 114 mm² のリーフディスク2枚を回収し、液体窒素で凍結後、乳鉢に入れ、液体窒素を適量加えた。上述したタンパク質抽出バッファーを 800 μl 加え、乳棒で混ぜた。そのサンプルを 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.04% bromophenol blue (BPB)を含む SDS サンプルバッファーで1:1に混ぜた。そのサンプルを10分間80°Cで煮沸し、6 μl 分を15% アクリルアミドゲルに添加し、SDS-PAGE を行った。泳動後は Akashi *et al* (2011)の方法に従って、イムノブロット解析を行った。

4. CF₁の精製

CF₁の精製は Binder *et al* (1978)の手法を参考に行った。異なる点は、チラコイド膜抽

出バッファーが 20 mM Tricine-NaOH (pH7.8), 0.4 M sorbitol, 10 mM NaCl を含むバッファーであること、また、溶出した CF₁ を 80%になるようにアセトンを加えて、-30℃で保存したことである。

5. Reverse-phase HPLC

2 分子種の ϵ は、島津の HPLC システム(SCL-10A, Shimazu, Kyoto, Japan) に装着した逆相カラム(5C4-AR-300, COSMOSIL, 4.6 × 250 mm, Nacalai tesque, Kyoto, Japan)で精製した。0.05% trifluoroacetic acid (TFA)を含む脱気した脱イオン水である溶液 A と、0.05% TFA を含む脱気した acetonitrile である溶液 B を準備した。カラムは、溶液 B で 20% から 40%まで 10 分間グラジエント溶出した後、40%から 100%まで 60 分間グラジエントをかけた。80%アセトンで沈澱している CF₁ タンパク質は 50 μ l の 8 M Urea で溶かし、20,400 g で 30 分間、遠心後、その上清を HPLC システムに注入した。ペプチドの溶出パターンは、280 nm の波長でモニターした。

6. MALDI-TOF MS による分子量の測定

逆相 HPLC で精製したサンプルをエバポレーターで乾燥させ、50% acetonitrile に溶かした。エタノールに飽和になるように Sinapinic acid (SA)を溶かし、マトリックス溶液 A を作製した。また、acetonitrile:0.1%TFA=1:2 の溶液に、飽和になるように SA を溶かし、マトリックス B 溶液を作製した。ターゲットプレートにマトリックス溶液 A を数 μ l 添加し、風乾し、マトリックス薄層を作製した。サンプル:マトリックス溶液 B=1:4 を混ぜ、1 μ l を先ほどのターゲットプレートに添加し、風乾させた。その後、ターゲットプレートを MALDI-TOF MS (Autoflex-N, Bruker Daltonics, Billerica, MA)へ導入し、Akashi *et al.* (2004)の手法に従って測定した。

7. タンパク質の溶液内消化

トリプシンを用いたタンパク質の溶液内消化は Fujiwara *et al.* (2006)の手法に従って行った。

8. MALDI-TOF MS によるペプチドの検出

Acetonitrile:0.1%TFA=1:2 の溶液に、飽和になるように α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid を溶かしたマトリックス溶液を準備した。溶液内消化させたサンプル:マトリックス溶液=1:4 を混ぜ、1 μ L をターゲットプレートに添加し、風乾させた。その後、ターゲットプレートを MALDI-TOF MS (Autoflex-N, Bruker Daltonics, Billerica, MA)へ導入し、測定した。

2-3. 結果

2-3-1. 野生種スイカの2分子種 ϵ の精製

2分子種 ϵ サブユニットの構造の差異を明らかにするために、2分子種の ϵ の分離・精製を試みた。まず、Binder *et al* (1978)の手法を参考に、葉から $\text{CF}_1\text{-ATPase}$ を単離した。単離した $\text{CF}_1\text{-ATPase}$ をSDS-PAGEで分離させ、CBBで染色されたバンドをLC/MS/MSで確認した(図 2-3A)。その結果、 CF_1 の各サブユニットが同定された。さらに、逆相HPLCを用いて、 CF_1 複合体を構成する各サブユニットの分離を行った。その結果、いくつかのピークが検出された(図 2-3B)。検出されたピークをSDS-PAGEとLC/MS/MSで確認した結果、31.40 minと32.42 minに溶出された2と3のピークにおいて、 ϵ サブユニットが検出された(図 2-3C)。そして、ハウレンソウ由来の ϵ サブユニットの抗体を用いて、それぞれのピークを2次元イムノブロット解析した結果、31.40 minに溶出されたピーク2においては塩基性側の ϵ が検出され、一方、32.42 minで溶出されたピーク3においては酸性側の ϵ が検出された(図 2-3D)。これらの結果により、2分子種 ϵ サブユニットの分離・精製の手法の確立に成功したことを確認した。

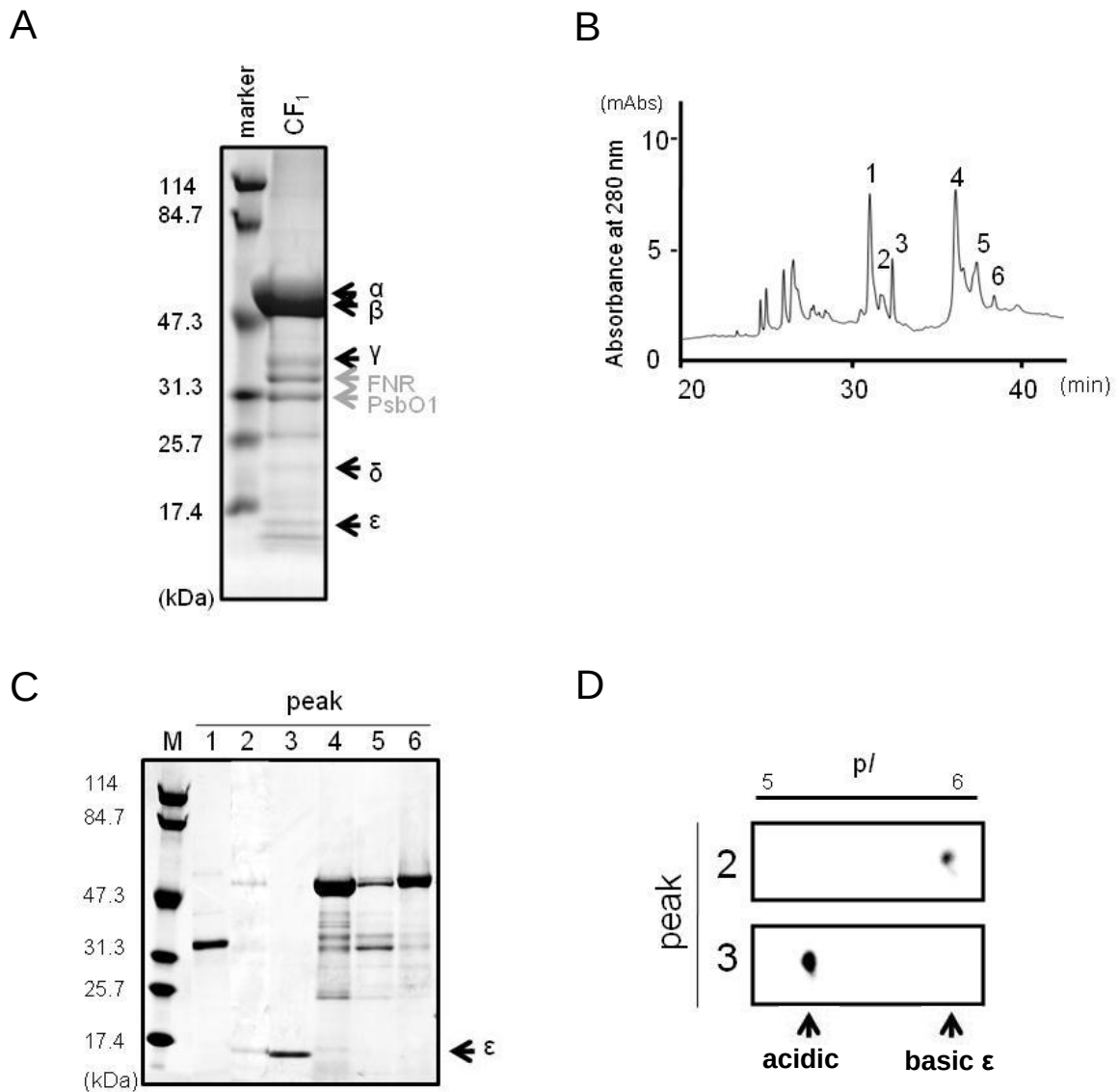


図 2-3 野生種スイカ葉の 2 分子種 ϵ サブユニットの精製

- (A) チラコイド膜画分を EDTA 処理し、精製した CF_1 -ATPase の SDS-PAGE 解析。
- (B) 精製した CF_1 -ATPase を逆相 HPLC に供した時のクロマトグラム。8 M の urea で溶かした CF_1 画分(345 μ g)を逆相 HPLC に供した。
- (C) 逆相 HPLC で検出されたピークの SDS-PAGE 解析。矢印は ϵ のバンドを示す。
- (D) 逆相 HPLC で検出されたピーク 2 と 3 の 2 次元イムノブロット解析。 ϵ が検出された範囲の 2 次元イムノブロット解析の結果を示す。矢印はそれぞれ酸性 ϵ と塩基性 ϵ を示す。

2-3-2. 野生種スイカの ϵ の翻訳後修飾の同定

2 分子種 ϵ の構造差を解明するために、MALDI-TOF MS を用いて、精製した 2 分子種の ϵ サブユニットの分子量を測定した(図 2-4)。塩基性側の分子量は、 $14,644 \pm 2$ Da であり、遺伝子配列から予想された分子量である 14,643Da とよく一致していた。一方、酸性側の ϵ の分子量は、 $14,689 \pm 2$ Da であった。さらに、酸性側と塩基性側の ϵ を混ぜたサンプルにおいては、 $14,646 \pm 1$ Da と $14,688 \pm 1$ Da のピークが検出された。これらの結果から、酸性側の ϵ の分子量は塩基性側の ϵ よりも約 42 Da 大きいことが明らかになり、よって、酸性側の ϵ に約 42Da の翻訳後修飾が付加していることが示された。

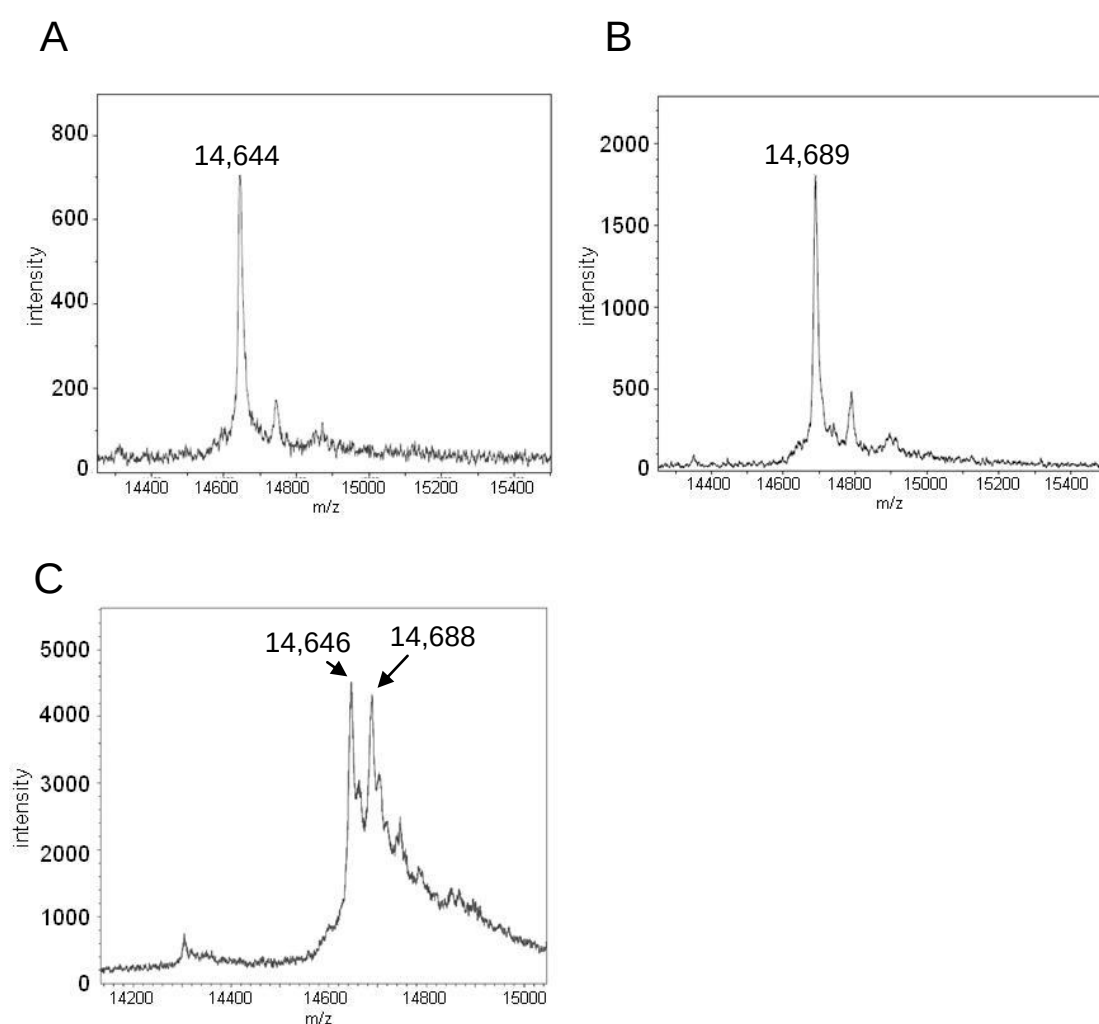


図 2-4 MALDI-TOF MS による 2 分子種 ϵ の分子量の測定

(A)は塩基性側 ϵ 、(B)は酸性側 ϵ 、(C)は酸性側 ϵ と塩基性側 ϵ のサンプルを混ぜたときの MALDI-TOF MS のクロマトグラムを示す。

また、構造差をもたらす部位を明らかにするために、精製した 2 分子種 ϵ をトリプシン消化し、MALDI-TOF MS で解析した(表 2-1)。その結果、塩基性側の ϵ のペプチド分子質量の測定値は理論値とよく一致していた。一方、酸性側の ϵ は 2 - 12 番目のアミノ酸までの N 末端のペプチドにおいて、約 42 Da 増加していた。このことから、この N 末端のペプチドに約 42 Da の翻訳後修飾が付加されていることが明らかになった。

表 2-1 MALDI-TOF MS によるトリプシン消化した 2 分子種 ϵ のペプチドの検出

Amino acid position	Peptide	Theoretical mass (Da)	Acidic isoform		Basic isoform	
			Exp. (Da)	Diff. (Da)	Exp. (Da)	Diff. (Da)
2-12	TLNLSVLTPNR	1227.7056	1269.802	42.0964	1227.735	0.0294
13-20	IIWDSEVK	989.5302	989.583	0.0528	989.592	0.0618
21-50	EIILVTNSGQIGVLPDHAPIATAVDIGILK	3067.7402	3067.702	0.0382	3068.734	0.992
53-70	LTPNDGWLTMALMGGFAR	1950.9565	1950.986	0.0295	1951.052	0.0955
71-85	IGNNEVTILVNDAEK	1628.849	1628.89	0.041	1628.883	0.034
86-106	ASDIDPQEAQQTLEIAEANLR	2312.1365	2312.248	0.1115	2312.203	0.0665
113-122	QTIEANLALR	1128.6371	1128.745	0.1079	1128.657	0.0199
126-136	TRVEAINGVPS	1142.6164	1143.666	1.0496	1143.735	1.1186

Exp.は実験測定値、Diff.は理論値と実験測定値の差を示す。

Delta Mass Database(<http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home>)によると、 ϵ の 2 - 12 番目のアミノ酸に 42Da を付加し、タンパク質の pI を酸性化できる翻訳後修飾の候補は N 末端の α -アミノ基に存在するアセチル基のみである。

この予想をもとに、2 分子種 ϵ の N 末端のペプチドについて LC-MS/MS 解析を行った(図 2-5)。その結果、塩基性側 ϵ 由来の N 末端のペプチドにおいては、C 末由来の y 系列である y_3 - y_{10} のフラグメント、N 末端由来の b 系列である b_4 、 b_6 、 b_7 、 b_8 のフラグメントが検出され、これらのフラグメントは遺伝子配列から予想されたアミノ酸配列と一致していた。一方、酸性側 ϵ の N 末端のペプチドにおいては、C 末由来の y 系列は y_3 - y_{10} のフラグメントが検出され、これら 5 つのフラグメントは遺伝子配列から予想されたアミノ酸配列と一致していた。一方、N 末端由来の b 系列は、 b_3 、 b_4 、 b_6 、 b_7 、 b_8 、 b_{10} の 6 つフラグメントが検出され、これらのフラグメントは 42Da の翻訳後修飾が付加されたアミノ酸配列と一致していた。特に、 b_3 のフラグメントの検出により、42Da の翻訳後修飾は酸性側 ϵ の 2-4 番目のアミノ酸に存在していることが明らかになった。Delta Mass Database により、2-4 番目のアミノ酸に存在する 42Da の翻訳後修飾の候補は N 末端のアミノ酸に存在するアセチル基のみであることから、酸性側 ϵ の N 末端のトレオニンの α -アミノ基がアセチル化修飾を受けていると結論した。

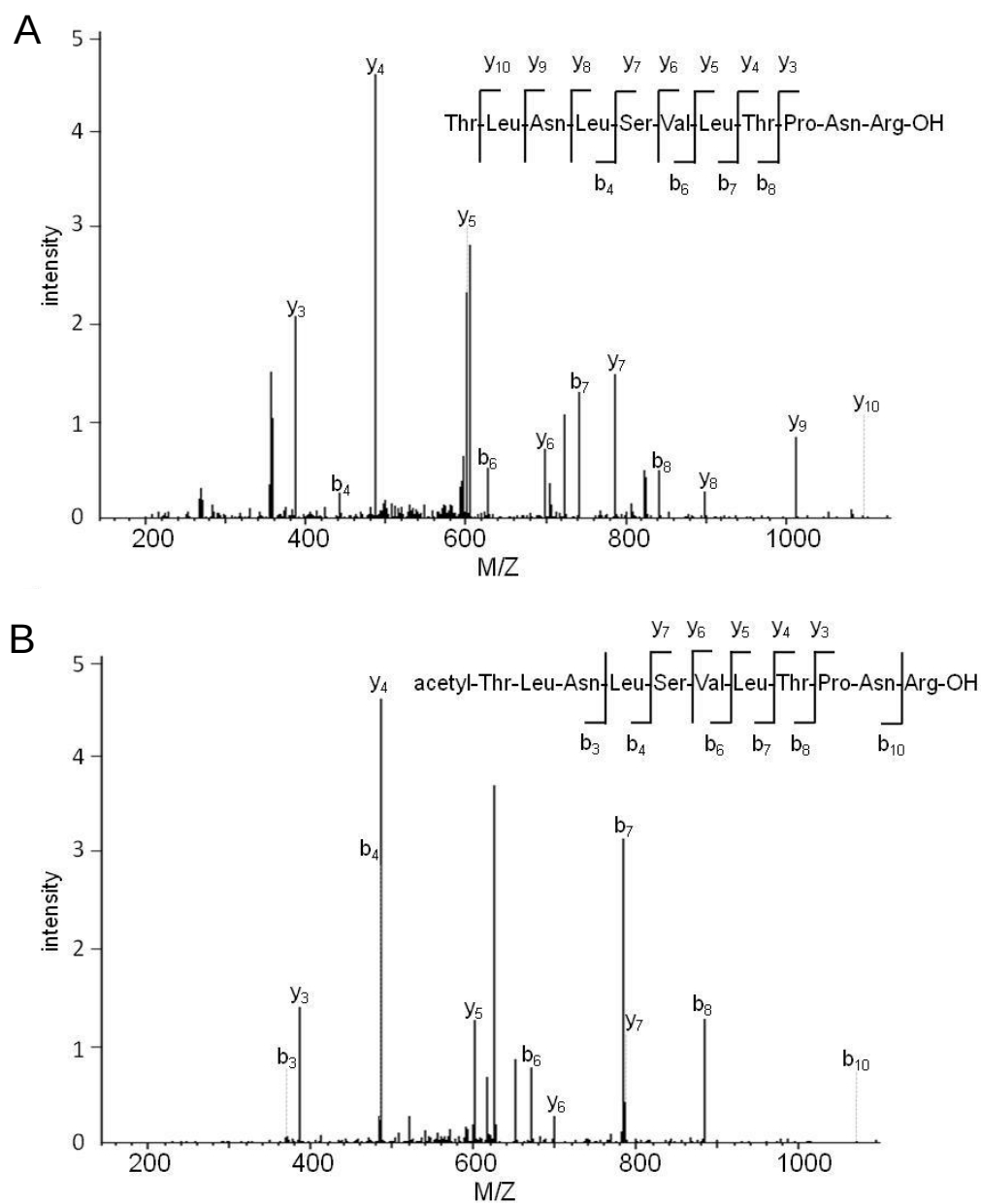


図 2-5 LC-MS/MS による酸性側 ϵ の N 末端のアセチル基の検出

酸性側 ϵ および塩基性側 ϵ の N 末端のペプチドを LC-MS/MS で解析した。(A)は塩基性側 ϵ の N 末端のペプチド、(B)は酸性側 ϵ の N 末端ペプチドの MS スペクトルを示す。

それぞれの図の右上部に、N 末端ペプチド配列と検出されたペプチド開裂断片を示す。

また、y は検出された C 末端からのペプチド配列、b は検出された N 末端からのペプチド配列をそれぞれ示している。

2-3-3. 他の植物種における 2 分子種 ϵ の解析

野生種スイカ以外の植物においても、 ϵ サブユニットが 2 分子種存在するのかを明らかにするために、メロン、タバコ、シロイヌナズナを用いて、2 次元イムノブロット解析を行った(図 2-6)。その結果、これら双子葉植物の全てにおいて、2 分子種 ϵ が検出された。また、メロンとタバコにおいては、野生種スイカの ϵ とほぼ同じ値の等電点をもつ ϵ が検出され、シロイヌナズナの ϵ は、野生種スイカよりも塩基性側で検出された。

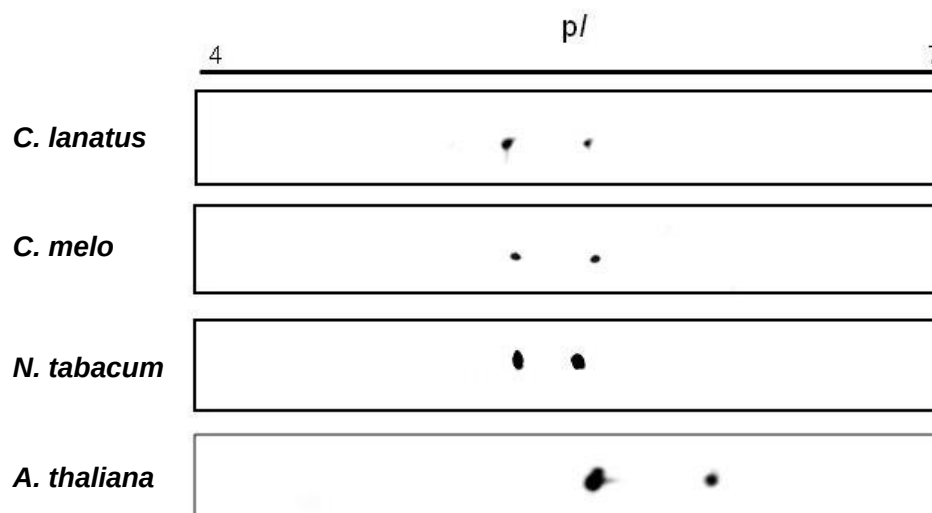


図 2-6 ϵ サブユニット抗体による野生種スイカ、メロン、タバコ、シロイヌナズナの膜タンパク質の 2 次元イムノブロット解析

2-3-4. シロイヌナズナにおける ϵ の翻訳後修飾の同定

シロイヌナズナの ϵ においても、野生種スイカと同様に N 末端アセチル化修飾を受けているのか調べるために、シロイヌナズナのロゼット葉から膜タンパク質を抽出し、2次元電気泳動およびCBB染色、 ϵ 抗体を用いたイムノブロット解析を行った(図2-7)。その結果、2分子の ϵ サブユニットが検出された。そして、2次元イムノブロット解析により、 ϵ サブユニットであると予測されたスポットを LC/MS/MS 解析に供した(図2-8)。その結果、酸性側の ϵ においてのみ、N末端のアセチル化修飾が検出された。

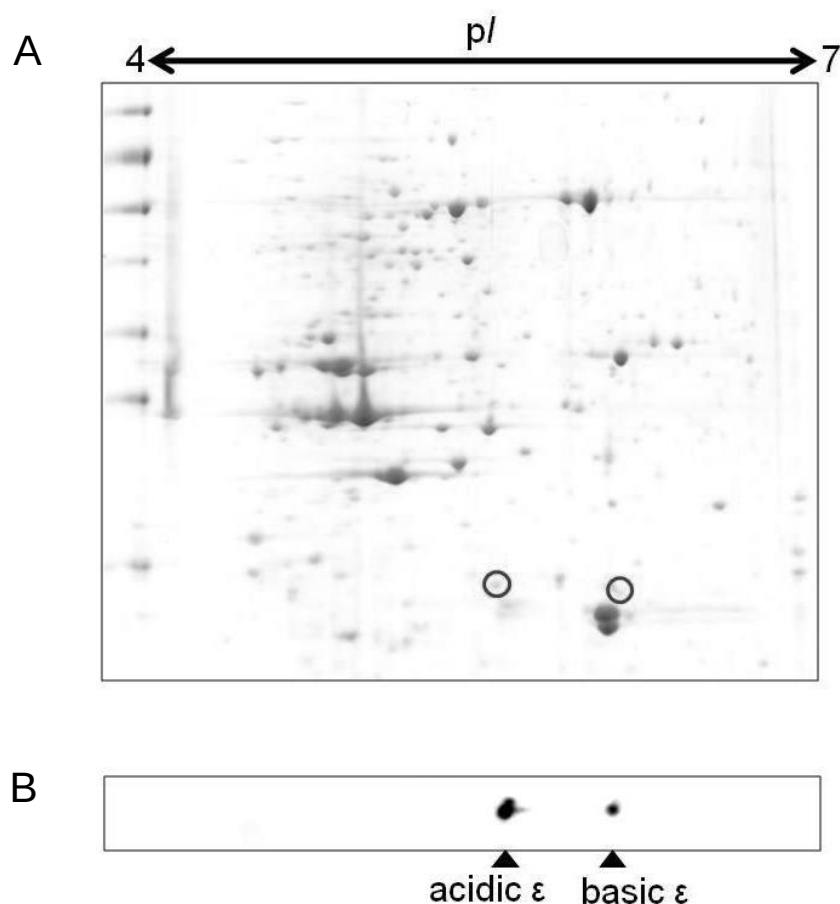


図 2-7 シロイヌナズナにおける葉緑体 ATP 合成酵素 ϵ サブユニット

シロイヌナズナの葉から抽出した膜画分のタンパク質の2次元電気泳動(A)と、 ϵ 抗体を用いた2次元イムノブロット解析(B)を行った。(A)において丸で囲ったスポットは、 ϵ 抗体で検出されたスポットを示す。

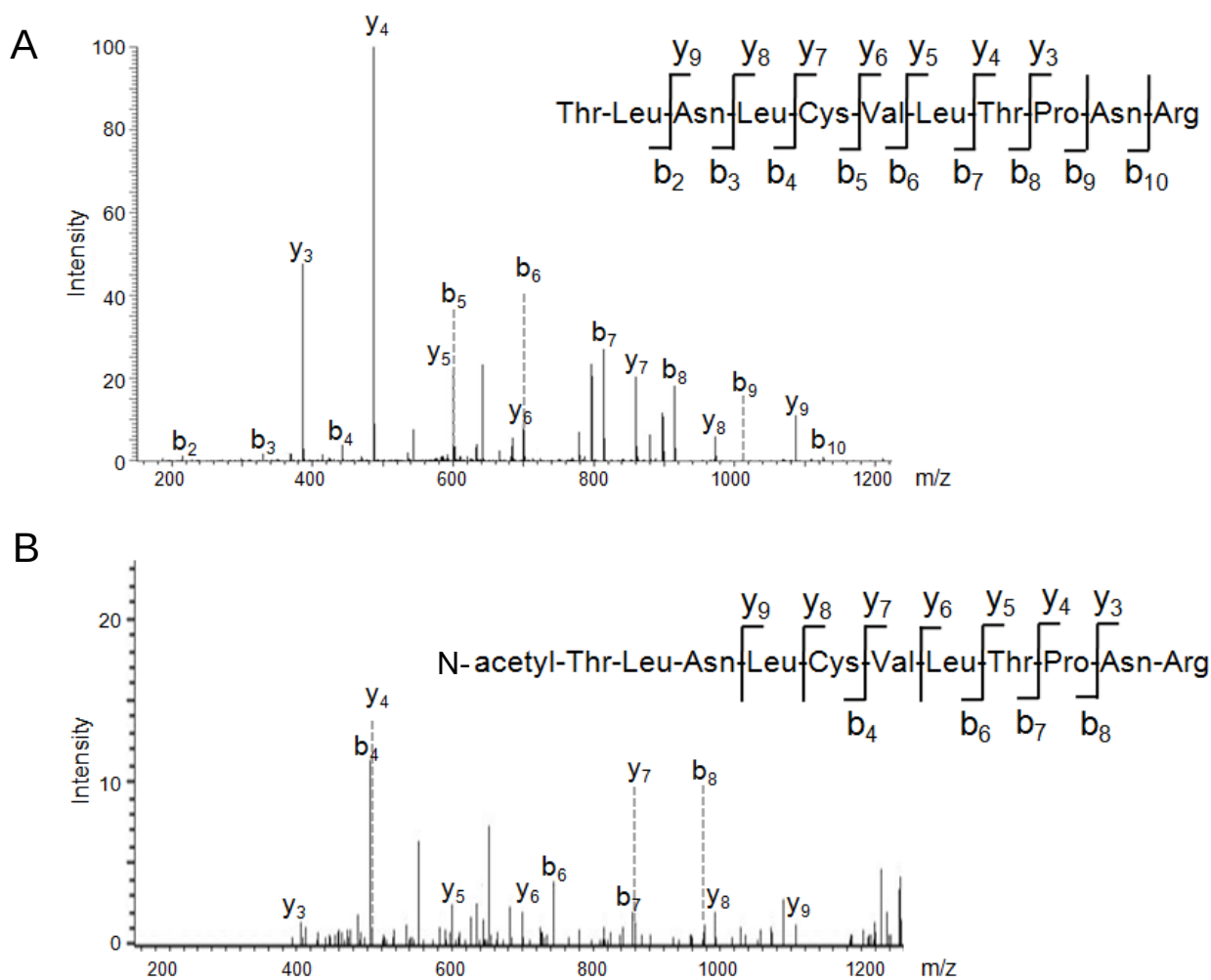


図 2-8 シロイヌナズナにおける酸性側 ϵ の N 末端のアセチル基の検出

酸性側 ϵ および塩基性側 ϵ の N 末端のペプチドを LC-MS/MS で解析した。(A)は塩基性側 ϵ の N 末端のペプチド、(B)は酸性側 ϵ の N 末端アセチル化修飾を受けたペプチドの MS スペクトルを示す。それぞれの図の右上部に、N 末端ペプチド配列と検出されたペプチド開裂断片を示す。また、y は検出された C 末端からのペプチド配列、b は検出された N 末端からのペプチド配列をそれぞれ示している。

2-3. 考察

野生種スイカの葉の膜タンパク質を用いたプロテオーム解析および2次元イムノブロット解析により、等電点が大きく異なる2分子種の葉緑体 ATP 合成酵素 ϵ サブユニットが生体内に存在することを明らかにした。 ϵ サブユニットは葉緑体ゲノム内の単一コピーの遺伝子にコードされていることから、2分子種の ϵ サブユニットの構造差の原因は翻訳後修飾であると予測した。

まず、野生種スイカの葉から精製した2分子種 ϵ を MALDI-TOF MS に供し、2分子種の構造差をもたらす因子の正確な分子量を測定した(図 2-4)。その結果、塩基性側 ϵ で検出されたピークは遺伝子配列から予想された分子量とよく一致していた。一方、酸性側で検出されたピークは遺伝子配列よりも予測された分子量よりも約 42Da 大きいことから、酸性側の ϵ に約 42 Da の翻訳後修飾が存在することが明らかになった。

さらに、この翻訳後修飾が付加されている部位を特定するために、精製した ϵ をトリプシン消化し、MALDI-TOF MS に供した。その結果、2-12 番目のアミノ酸を含む N 末端のペプチドに 42 Da の翻訳後修飾が存在することが明らかになった(表 2-1)。Delta Mass Database によると、42Da が付加される翻訳後修飾は N 末端のアミノ酸・セリン・リジンに付加するアセチル化、またはリジンに付加するトリメチル化である。この中で、酸性側に pI をシフトさせ、2-12 番目のアミノ酸内に存在する翻訳後修飾は N 末端に存在するアセチル基であると予想される。さらに、LC/MS/MS 解析した結果、酸性側 ϵ のペプチドにおいてのみ、2-4 番目のアミノ酸に 42Da の翻訳後修飾が存在することを示す開裂パターンが検出された。以上の結果から、2分子種 ϵ サブユニットの構造差をもたらす翻訳後修飾は、酸性側 ϵ の N 末端に存在するアセチル基であると結論した。

ϵ サブユニットの N 末端はトレオニンであると示されている。よって、 ϵ サブユニットのアセチル基は、トレオニンの N 末端のアミノ基に結合するアセチル基(N-アセチル基)、またはトレオニンの側鎖のヒドロキシル基に結合するアセチル基(O-アセチル基)のどちらかであることが考えられる。今回の場合、 ϵ サブユニットの等電点が大きく酸性側へ移動することから、O-アセチル基ではなく、N-アセチル基であると示唆される。

2次元イムノブロット解析により、2分子種の葉緑体 ATP 合成酵素 ϵ サブユニットは、野生種スイカ以外の他の植物においても存在することが明らかになった(図 2-6)。今回解析した *C. melo* と *N. tabacum* の2分子種 ϵ の pI は、野生種スイカの2分子種 ϵ とよく一致していた。*C. melo* と *N. tabacum* の遺伝子配列から予想された ϵ の pI は 5.39 と 5.18 であり、野生種スイカの ϵ ($pI = 5.39$) とほぼ近い値である。一方、*A. thaliana* の遺伝子配列から予想された ϵ の pI は 5.82 であり、野生種スイカよりもより塩基性側に2分子種 ϵ サブユニットが検出された。これらのことから、2分子種 ϵ サブユニットは少なくとも双子葉植物において普遍的に存在することが示唆された。

N 末端のアセチル化はアセチル CoA からタンパク質の α -アミノ基にアセチル基を転移させる反応である。この反応は、NAT (N-terminal acetyltransferase)によって触媒される。NAT は古細菌・原核生物・真核生物の全ての生物種に存在している。NAT については、酵母においてよく研究されており、現在までに、基質特異性の異なる NatA、NatB、NatC の 3 種の NAT が同定されている(Polevoda and Sherman 2003)。

植物においては、報告例は少ないものの、いくつかの NAT が同定されている。例えば、*A. thaliana* で見出された AtMAK3 は酵母の NatC の構成因子の一つである Mak3p の配列と相同性が高く、光合成タンパク質の蓄積量に影響を及ぼすことが報告されている(Pesaresi *et al.* 2003)。このことから、AtMAK3 による N 末端アセチル化修飾は、光合成タンパク質の安定性や光合成タンパク質前駆体の葉緑体への移行プロセスと関連する可能性が示唆されている。また、大腸菌のアセチル化酵素である RimL と配列の相同性の高い AtATF1 が細胞質で見出されており、この酵素は開花時期に影響を及ぼすことが報告されている(Hwang *et al.* 2009)。一方、本研究で同定した葉緑体中存在する ϵ サブユニットを始め、CO₂ 固定反応を触媒する RuBisCO のラージサブユニット(Houtz *et al.* 1989)や、PSII の D1 や D2 タンパク質(Michel *et al.* 1988)においても、N 末端のアセチル化修飾が検出されている。このことから、葉緑体においても NAT が存在することが予想されるが、これまで葉緑体中存在する NAT は同定されていない。

N 末端アセチル基は真核生物において最も普遍的に存在する修飾の一つであり、哺乳類や酵母のタンパク質の 60%以上が N 末端アセチル化修飾を受けていることが推定されている(Polevoda & Sherman 2000)。真核生物に比べ少ないが、原核生物のタンパク質においても、N 末端アセチル化修飾が検出されている(Flab *et al.* 2006)。また、これまでに、葉緑体においても、N 末端アセチル化修飾を受けている 47 個のタンパク質が同定されている(Zybailov *et al.* 2008)。さらに、葉緑体のシステインシンターゼは ϵ サブユニットと同様に N 末端のアセチル基の構造差により、2 種存在することが MS 解析により示唆されている(Zybailov *et al.* 2008)。

葉緑体の遺伝子発現やタンパク質発現等のメカニズムから考えると、葉緑体におけるアセチル化修飾の頻度は真核生物よりも原核生物に似ていることが予想されている。N 末端アセチル化修飾を受けている原核生物のタンパク質として、リボソームタンパク質がよく研究されている。リボソームタンパク質においては、N 末端がアラニン、メチオニンまたはセリンのアミノ酸はアセチル化修飾を受ける頻度が高く、一方、プロリン、トレオニン、グリシンまたはバリンのアミノ酸はアセチル化修飾を受ける頻度が低いことが報告されている。

また、N 末端から 2 番目のアミノ酸もアセチル化修飾の頻度に影響を与えており、真核生物においては、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸やグルタミン酸はアセチル化修飾を受けやすく、一方、塩基性アミノ酸であるリシンやアルギニンはアセチル化修飾を阻害することが報告されている(Polevoda *et al.* 2003)。

さらに、N 末端アセチル化修飾が同定された葉緑体タンパク質においては、N 末端のアミノ酸がアラニン、バリン、セリン、トレオニンまたはメチオニンである場合はアセチル化されやすいことが報告されている(Zybailov *et al.* 2008)。

dicot	<i>C. Lanatus</i>	MTLNLSVLTPNRIIWDSEVKEIILVTNSGQIGVLPDHAPIATAVDIGILKIRLTPNDGWL	60
	<i>C. Melo</i>	MTLNLSVLTPNRIIWDSEVKEIILVTNSGQIGVLPDHAPIATAVDIGILKIRLTPNDGWL	60
	<i>N. Tabacum</i>	MTLNLCVLTPNRIIWDSEVKEIILVTNSGQIGVLANHAPIATAVDIGILKIRL--ANQWL	58
	<i>A. Thaliana</i>	MTLNLSVLTPNRIIWDSEVKEIILVTNSGQIGVLPNHAPIATAVDIGILKIRL--NDQWL	58
	<i>S. Oleracea</i>	MTLNLCVLTPNRIIWDSEVKEIILVTNSGQIGVLPNHAPIATAVDIGILKIRL--NDQWL	58
monocot	<i>Z. Mays</i>	MKLNLYVLTPKRIIWDCEVKEIILVTNSGQIGVLPNHAPIATAVDMGPLRIRL-LNDQWL	59
	<i>B. Oldhamii</i>	MKLNLYVLTPKRIIWDCEVKEIILVTNSGQIGVLPNHAPIATAVDMGPLRIRL-LNDQWL	59
	<i>O. Sativa</i>	MKLNLYVLTPKRIIWDCEVKEIILVTNSGQIGVLPNHAPIATAVDMGPLRIRL-LNDQWL	59
	<i>P. Virgatum</i>	MKLNLYVLTPKRIIWDCEVKEIILVTNSGQIGVLPNHAPIATAVDMGPLRIRL-LDDQWL	59
	<i>R. subulata</i>	MKLNLYVLTPKRIIWDCEVKEIILVTNSGQIGVLPNHAPIATAVDMGPLRIRL-LNDQWL	59
	<i>C. Lanatus</i>	TMALMGGFARIGNNEVTILVNDAEKASDIDPQEAQQTLEIAEANLRKAQCKRQTIEANLA	120
	<i>C. Melo</i>	TMALMGGFARIGNNEVTILVNDAEKASDIDPQEAQQTLEIAEANLRKAQCKRQTIEANLA	120
	<i>N. Tabacum</i>	TMALMGGFARIGNNEVTILVNDAEKNSDIDPQEAQQTLEIAEANLRKAQCKRQTIEANLA	118
	<i>A. Thaliana</i>	TMALMGGFARIGNNEVTILVNDAEKGSIDIDPQEAQQTLEIAEANVKKAEGRQKIEANLA	118
	<i>S. Oleracea</i>	TLALMGGFARIGNNEVTILVNDAEKGSIDIDPQEAQQTLEIAEANLRKAQCKRQKIEANLA	118
	<i>Z. Mays</i>	TAVLWSGFARIVNNEIILGNDDELGSIDIDPEEAQQALETAEANLSRAEGTKELVEAKLA	119
	<i>B. Oldhamii</i>	TAVLWSGFARIVNNEIILGNDDELGSIDIDPEEAQQALETAEANLSRAEGTKELVEAKLA	119
	<i>O. Sativa</i>	TAVLWSGFARIVNNEIILGNDDELGSIDIDPEEAQQALETAEANVSRAGTKELVEAKVA	119
	<i>P. Virgatum</i>	TAVLWSGFARIVNNEIILGNDDELGSIDIDPEEAQQALETAEANLSRAEGTKELVEAKLA	119
	<i>R. subulata</i>	TAVLWSGFARIVNNEIILGNDDELGSIDIDPEEAQQALETAEANVSRAGTKELVEAKLA	119
	<i>C. Lanatus</i>	LRRARIRVEAINGVPS--	136
	<i>C. Melo</i>	LRRARIRVEAINGVPS--	136
	<i>N. Tabacum</i>	LRRARIRVEALNTI----	132
	<i>A. Thaliana</i>	LRRARIRVEAINGVPS--	133
	<i>S. Oleracea</i>	LRRARIRVEASNTISS--	134
	<i>Z. Mays</i>	LRRARIRVEAVNWIPPSN	137
	<i>B. Oldhamii</i>	LRRARIRVEAVNWIPPSN	137
	<i>O. Sativa</i>	LRRARIRVEAVNWIPPSN	137
	<i>P. Virgatum</i>	LRRARIRVEAVNWIPPSN	137
	<i>R. subulata</i>	LRRARIRVEAVNWIPPSN	137

図 2-9 双子葉類と単子葉類の ε サブユニットのアミノ酸配列の比較

すべての配列において、同一のアミノ酸を黒で示した。野生種スイカ以外の全ての配列は NCBI データベースから取得した。配列番号は以下の通りである。*A. thaliana* (NP_051065)、*O. sativa* (NP_039389)、*C. melo* (YP_004841789)、*S. Oleracea* (NP_054942)、*B. oldhamii* (YP_003029746)、*N. Tabacum* (NP_054505)、*P. virgatum* (YP_004841955)、*R. subulata* (AEO21350)、*Z. mays* (NP_043031)。

葉緑体 ATP 合成酵素 ε サブユニットのアミノ酸配列は、翻訳後に 1 番目のメチオニンが除去される。よって、野生種スイカにおける ε サブユニットの N 末端から 2 番目から 4 番目までのアミノ酸配列はトレオニン、ロイシン、アスパラギンであり、上述したアセチル化修飾を受けやすい傾向とほぼ一致している(図 2-9)。さらに、様々な植物種の ε サブユニットのアミノ酸配列を比較すると、N 末端のアミノ酸は比較的保存されている。しかしながら、N 末端のアミノ酸は野生種スイカを含む双子葉類においてはトレオニンであるのに対して、単子葉類ではリシンであった。真核生物において、リジンはアセチル化修飾を阻害する傾向が報告されていることから、単子葉類における ε サブユニットはアセチル化修飾を受けていない可能性が予測される。翻訳後修飾が単子葉類と双子葉類で相違することに関しては、他の先行例が知られている。例え

ば、CF₁を構成するサブユニットの一つである α サブユニットは単子葉植物においてのみ、強光条件下において 2 分子種(α と α')存在することが報告されている(Burkey & Mathis 1998 ; Romanowska *et al.* 2008)。これらのことから、単子葉類と双子葉類において、異なる葉緑体 ATP 合成酵素の制御が存在することが示唆される。

同定した 2 分子種 ϵ の生体内での機能を考える上で、2 分子種 ϵ が複合体の構成因子として存在するのかどうかは重要な鍵である。本研究では、膜タンパク質を用いた 2 次元イムノブロット解析により、2 分子種 ϵ が検出されたことから、2 分子種 ϵ はチラコイド膜に存在していることが示唆される。さらに、DEAE-クロマトグラフィーを用いて精製した CF₁においても、2 分子種 ϵ が検出された。よって、2 分子種 ϵ は、CF₁ の構成因子として生体内で機能していることが考えられる。すなわち、アセチル化 ϵ をもつ CF₁ と非アセチル化 ϵ をもつ CF₁ の 2 種類 CF₁ 複合体が存在することが示唆される。

本章では、野生種スイカ葉から 2 分子種 ϵ を精製し、MALDI-TOF MS により、酸性側の ϵ の N 末端領域に約 42 Da の翻訳後修飾が存在することを示した。さらに、LC/MS/MS により、2 分子種 ϵ の構造差をもたらす翻訳後修飾が酸性側 ϵ の N 末端に存在するアセチル基であることを示した。さらに、これらの 2 分子種 ϵ は双子葉植物に普遍的に存在することを明らかにした。

乾燥ストレス下で ϵ サブユニットの蓄積総量が減少することや(上妻、2008)、次章で述べるように N 末端アセチル化修飾がタンパク質の安定性に関与する可能性があることから、アセチル基が ϵ サブユニットの量的制御に関与している可能性も予想される。そこで、次章は、生体内における 2 分子種 ϵ の挙動や乾燥ストレス下の ϵ の量的制御に着目し、2 分子種 ϵ の構造差をもたらす N 末端アセチル化修飾の生理的意義について考察することにした。

第3章

2 分子種 ϵ サブユニットの量的制御メカニズムの解析

3-1. 序論

前章において、N 末端のアセチル化の有無の違いにより、 ϵ サブユニットが 2 分子種存在することが明らかになった。しかしながら、光合成タンパク質における N 末端アセチル化修飾の機能については、これまで明らかになっておらず、この修飾の生理的意義に興味をもたれる。また、この生理的意義について取り組むためには、2 分子種 ϵ の分子挙動を解析する必要があると考えられる。

そこで、第3章では、野生種スイカの 2 分子種 ϵ サブユニットの挙動を観察するとともに、乾燥ストレス下での ϵ サブユニットの蓄積量の制御メカニズムについて解析し、光合成タンパク質と N 末端アセチル化修飾との関係について考察することにした。

3-2. 材料と方法

1. 野生種スイカの乾燥ストレス条件および葉の蒸散速度の測定

野生種スイカへの乾燥ストレスの付与は上妻(2008)の手法に従って行った。葉の蒸散速度は、完全展開した野生種スイカの第 4 葉を用いて、porometer (AP4, Delta-T, Cambridge, UK)で測定した。

2. イムノブロット解析の定量およびリアルタイム PCR による遺伝子発現量の解析

イムノブロット解析の検出までの手法は第 2 章で記した通りである。検出後、Multi Gauge ソフトウェア (Fujifilm, Tokyo, Japan)を用いて、定量を行った。RNA 抽出および、cDNA の合成、リアルタイム PCR の手法は Akashi *et al* (2011)の手法に従って行った。リアルタイム PCR で用いたプライマーの配列は表 1 に記した。

表 1 リアルタイム PCR による遺伝子発現解析で用いた primer

	Target	Primer sequence (5'-3')
CL-atpE	Forward	AAATGATGCGGAGAAGGCTA
	Reverse	CTCAGGGCAAGAGACAAAC
CL-OEC33	Forward	AAGTTTGAGGAGAAAGATGG
	Reverse	TTTGATGGTGAAGAGG AAAG
CL-ACTIN2	Forward	CATTCTCCGTTTGGACCTTGCT
	Reverse	TCGTAGTTTTCTCAATGGAGGAACTG
CL-PETC	Forward	CAGTTTGCACTCACCTTGGATG
	Reverse	CTGCCTTGATCGTTGTATTGGG
CL-ATPC	Forward	GGCCAGTGAAGTTCAGCTAGA
	Reverse	CATTAGCACCAGCAACAATCTCCAA
CL-ATPG	Forward	TGCCAGAGCGGAGATTTTCGG
	Reverse	TTCTCCAAGTTCGCCAATGCTTC
CL-atpH	Forward	GTAGAAGGGATCGCGAGACA
	Reverse	GCTAATGCTACAACCAGTCCA
CL04293	Forward	ACGGAAACTGATGCTCCAAC
	Reverse	TCGCCAGGAAGAGTTATTGC
CL03999	Forward	TCAGCTTTTTCTTGCAATGCT
	Reverse	TCCATATCGTTTGCCATTTG
CL05081	Forward	ACGCGTGTTTTCTCCTGACT
	Reverse	CGGCATATGTGGCTGTAATG
CL07764	Forward	TAAAATGCCGAGGGAAGATG
	Reverse	GAGGCTTCGACAGATTTTGG
CL05684	Forward	GTCTTGACAGTAGTTAATGGACTTACA
	Reverse	CCTACCATCCATAAAAACCATTG
CL08212	Forward	GATGGCAGTCACCCTACTGTC
	Reverse	CTCGATGAGAAGATCACTGTCTG

	Target	Primer sequence (5'-3')
CL04767	Forward	ACCTGTTTCAGAAGGGGATG
	Reverse	CTGGCAACAAAGATCGAAGAC
CL00528	Forward	CAGCAAGAGAAAGCGTTGAA
	Reverse	AGCTGAAGCATAAAAGCATGG
CL04592	Forward	CTCGGGAGCTCAGTATTTGG
	Reverse	GTGCCATTTGGAAATCTTGC
CL03590	Forward	GATCCTCTCCCATTCGCATA
	Reverse	TGGTCTGGCCCTTGTAACCTC
CL07761	Forward	CATCTTGGGGCTGTTTTTCAT
	Reverse	TCCAAACCCTGCAAGTAACC
CL07915	Forward	GGCGAAGAGTTGGTGAAAAG
	Reverse	TGGGAAGAAAGCGATAATGG
CL01120	Forward	GTTGGACGTGTGTTTCATGC
	Reverse	GGCTCCCGTCCTCTGTTAC
CL01119	Forward	GTTGGACGTGTGTTTCATGC
	Reverse	TGTAAAGATCAAACCATGTTTCG
CL02696	Forward	TTGCTCCTTCGAGTTTCAT
	Reverse	CTGCTTTTGTTCCTCCAGAGC
CL02157	Forward	CTTTCCTCGTCGGACATCAT
	Reverse	GTCTCAGCCACTTTCCTTGC
CL05152	Forward	AATGAGCAGCAACCCAGTTC
	Reverse	AAGCCAGGGATGTTGATGAC
CL06904	Forward	TCAAAAAGGCCAAGGTGAAG
	Reverse	CCACTCCTAAAGCTGCGAAC
CL05330	Forward	TGTAGCCCTTCTTCCTCTGC
	Reverse	GCCATGAACCTCCCTCTACG
CL01685	Forward	CAGTTGCTGGTGCCTTTACA
	Reverse	TTTCTTCCAATGGCAACCTC

4. 各種プロテアーゼ阻害剤による ϵ タンパク質分解の阻害実験

乾燥ストレス 6 日目の野生スイカ葉(0.5g fresh weight) を乳鉢に入れ、液体窒素を適量加えた。0.1 M potassium phosphate (pH 7.0), 2 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol,を含む 2.5ml buffer を加え、乳棒で混ぜた。その溶液をマイクロチューブに入れ、 $20,400 \times g$ で 10 分間遠心し、その上清を 1/4 ずつ新しいチューブに入れた。そして、それぞれのチューブに 5.75 μ l serine protease inhibitor cocktail(Calbiochem)、1 mM 1,10-phenanthroline、10 μ M E64 と水(Control)を加え、20 分間氷上でインキュベートした。その後、組換え ϵ (60 μ g protein)を添加し、37°Cで各反応時間インキュベートした。

5. アミノペプチダーゼに対する 2 分子種 ϵ の感受性試験

野生種スイカの葉から単離したチラコイド膜に 10 mM Tricine-NaOH(pH 7.8), 0.3 M sucrose を加え、30 分間室温でインキュベートした。その後、 $20,000 \times g$ で 30 分間遠心し、チラコイド膜から解離した CF_1 が存在する上清を回収した。また、9 μ g のメタロアミノペプチダーゼ(Bernkop-Schnürch & Marschütz, 1997; Sigma, St.Louis, MO, USA)

に 2.1 ml TBS buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl)を加えて溶解させ、室温で 10 分間インキュベートさせた。その後、単離した 200 μ l の CF₁ 溶液 (1 μ g/ μ l)を添加し、37 °C でインキュベートさせた。10 分間ごとに 100 μ l を分取し、終濃度 80%(v/v)になるようにアセトンを加え、反応を停止させた。さらに、2 次元イムノブロット解析を用いて、反応液中に含まれる ϵ のタンパク質量を定量した。定量方法に関しては、3-2-2 で記載した通りである。

6. *A. thaliana* と野生種スイカのアミノペプチダーゼの系統樹解析

MEROPS データベース(<http://merops.sanger.ac.uk/>; Rawlings *et al.* 2004)より、*A. thaliana* のメタロアミノペプチダーゼの配列を入手し、この配列を用いて、BLAST 検索を行い、野生種スイカの EST 解析から野生種スイカのアミノペプチダーゼ候補遺伝子の配列を取得した。さらに、*A. thaliana* と野生種スイカのアミノ酸配列を用いて、EBI の ClustalW のソフトウェア(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)で系統樹を作成した。

3-3. 結果

3-3-1. 乾燥ストレス下における野生種スイカの葉の蒸散速度

乾燥ストレス下における ϵ の挙動についての解析にあたり、解析に用いる野生種スイカ葉の生理応答について理解するために、乾燥ストレス下における野生種スイカ葉の蒸散速度を調べた。約 2 週間目で第 4 葉完全展開後の植物体を灌水停止し、乾燥ストレスを与えた。その結果、乾燥ストレス前の第 4 葉の蒸散速度は約 $700 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ を示したのに対して、乾燥ストレス 1 日目において、蒸散速度は約 $80 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ を示し、大きく低下した(図 3-1)。2 日目以降も低い値を示し続けた。

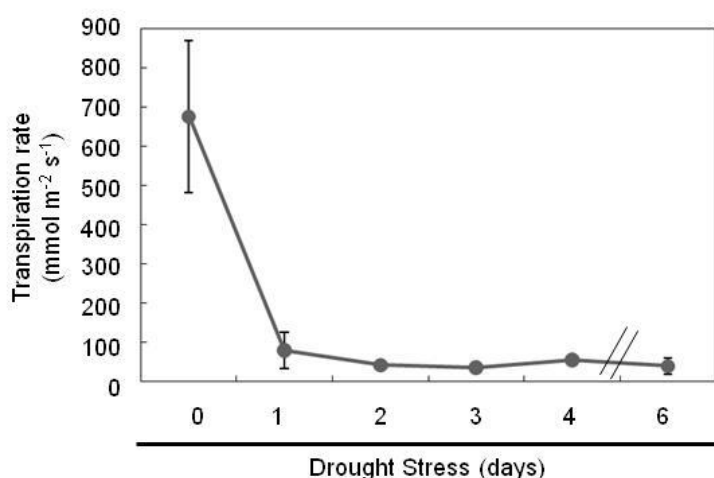


図 3-1
乾燥ストレス下における野生種スイカ第 4 葉の蒸散速度の変化
($n=2\sim4$)

3-3-2. 乾燥ストレス下における 2 分子種 ϵ の蓄積量の解析

乾燥ストレス下における ϵ の挙動について明らかにするために、乾燥ストレス 0、3、6 日目の第 4 葉から抽出した膜タンパク質を用いて、2 次元電気泳動およびウェスタンブロッティング(2 次元イムノブロット)で ϵ の蓄積量を定量的に解析した。2 つのスポット強度を測定し、酸性側の ϵ の蓄積量に対する塩基性の ϵ の蓄積量の割合を算出した。その結果、乾燥ストレス 3 日目には約 30%、6 日目には約 10%まで減少していた(図 3-2A,B)。また、2 分子種 ϵ を合わせた全量の ϵ の蓄積量を調べるために、SDS-PAGE およびウェスタンブロッティング(1 次元イムノブロット)で解析した。その結果、乾燥ストレス 3 日目には約 80%、6 日目には約 60%まで減少していた(図 3-2C,D)。一方、光合成タンパク質の一つである Cyt b_6/f 複合体の b_6 サブユニットの蓄積量は、乾燥ストレス前後で変化は見られなかった。さらに、1 次元イムノブロットおよび 2 次元イムノブロットにより得られた結果より、2 分子種の ϵ の蓄積量をそれぞれ算出した。その結果、酸性側の ϵ は乾燥ストレス前後においてほとんど変化が見られないが、塩基性側の ϵ は乾燥ストレス 3 日目に約 40%、6 日目には約 10%まで減

少していることが明らかになった(図 3-2E)。

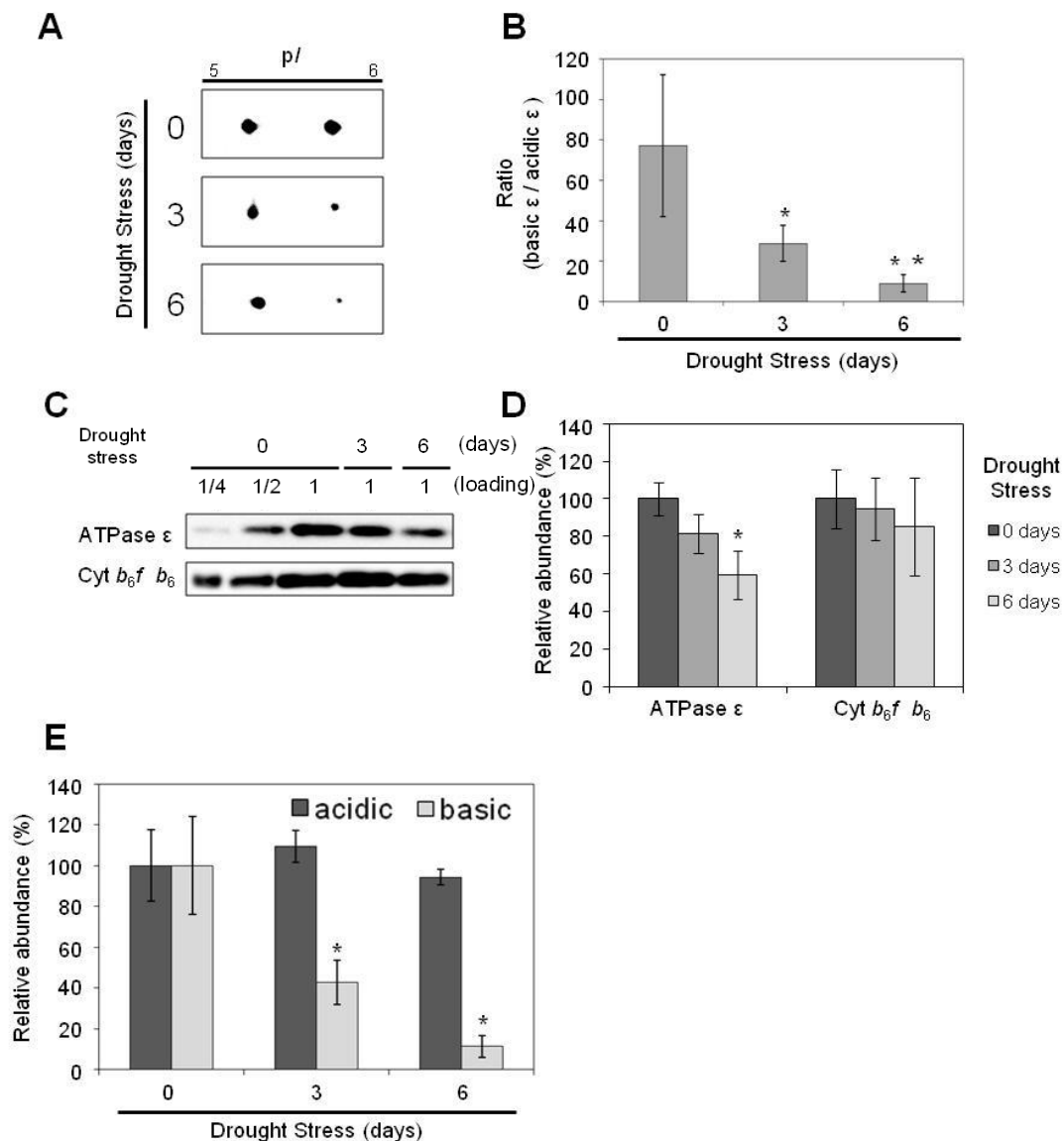


図 3-2 野生種スイカの 2 分子種の葉緑体 ATP 合成酵素 ϵ サブユニットの蓄積量の定量的解析

(A) 乾燥ストレス前後の野生種スイカ葉から抽出した膜タンパク質を用いた、 ϵ サブユニット抗体による 2 次元イムノブロット解析。50 μ g の膜タンパク質を用いて解析を行った。

(B) (A)の結果を用いて、酸性側の ϵ に対する塩基性側の ϵ のスポット強度の割合を算出したグラフ。n=4。*は有意差を示す: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

(C) 乾燥ストレス前後の野生種スイカ葉から抽出した膜タンパク質を用いた、 ϵ サブユニットおよび b_6 (Cyt b_6f のサブユニット)抗体による 1 次元イムノブロット解析。各レーンに一定葉面積あたりのタンパク質量をアプライし、1 次元イムノブロットに供した。

(D) (C)の結果を用いて定量した、 ϵ および b_6 サブユニットの蓄積総量。

*は有意差を示す: * $P < 0.05$

(E) 乾燥ストレス下における 2 分子種 ϵ の蓄積量の変化。1 次元イムノブロット定量と 2 次元イムノブロット定量の結果から算出した。*は有意差を示す: * $P < 0.05$

3-3-3. 異なる発達段階の野生種スイカ葉における 2 分子種 ϵ の挙動

第 4 葉以外の葉においても、2 分子種 ϵ が存在しているのかを調べるために、ストレスを付与していない野生種スイカの第 1 葉～第 5 葉から抽出した膜タンパク質を用いて、2 次元イムノブロット解析を行った。その結果、若い葉である第 2 葉～第 5 葉においては、2 分子種の ϵ の蓄積量はほぼ等しいものの、老化葉である第 1 葉においては、酸性側の ϵ に比べて塩基性側の ϵ の蓄積量が減少していた(図 3-3)。

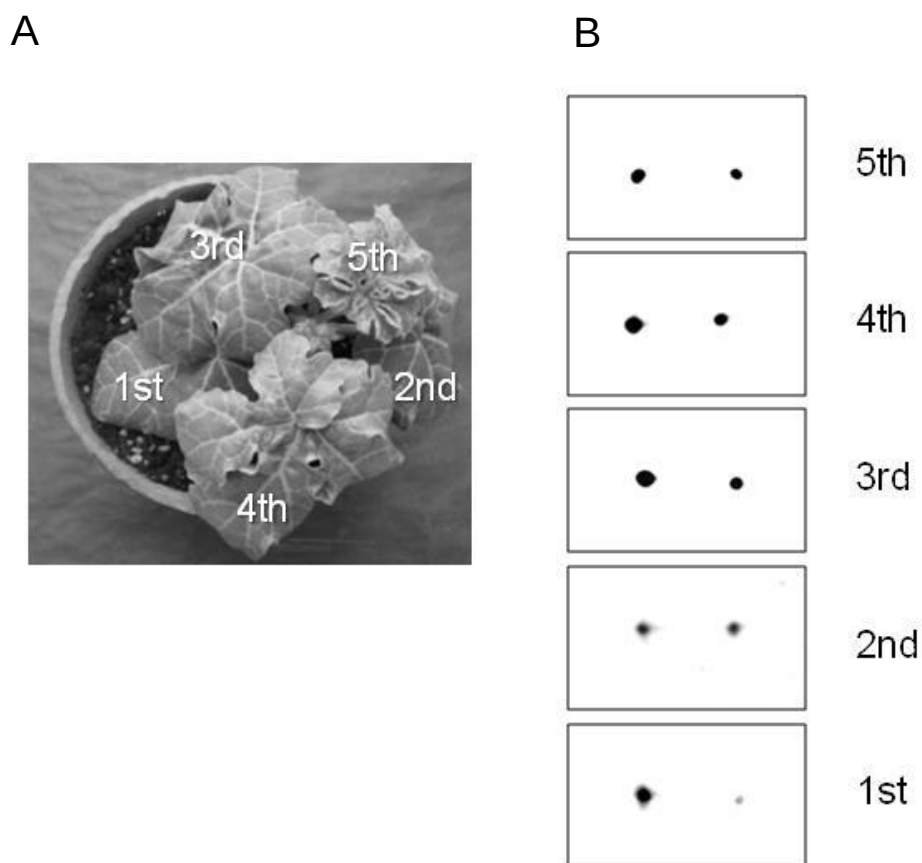


図 3-3 異なる発達段階の葉における 2 分子種 ϵ の蓄積量の変化

(A)野生種スイカの葉の位置を示す写真。

(B)乾燥ストレスを付与させていない野生種スイカのそれぞれの葉から、膜タンパク質を抽出し、50 μ g のタンパク質を用いて 2 次元イムノブロット解析を行った。

3-3-4. 定量的 PCR による ϵ の mRNA 蓄積量の解析

ϵ タンパク質の量的制御が転写レベルで行われているのか調べるために、リアルタイム PCR を用いて、乾燥ストレス下における ϵ サブユニット遺伝子(*atpE*)の転写量を解析した。その結果、乾燥ストレス前後において、 ϵ サブユニットの mRNA 蓄積量に差は見られなかった(図 3-4)。これらの結果から、転写レベルでは、 ϵ タンパク質の量的制御が行われていないことが示唆された。また、同複合体を構成する I サブユニット遺伝子(*atpF*)、II サブユニット遺伝子(*atpG*)、III サブユニット遺伝子(*atpH*)、 β サブユニット遺伝子(*atpB*)、 γ サブユニット遺伝子(*atpC*)と、PSII のサブユニットである PsbO 遺伝子(*psbO*)とシトクロム *b₆f* のサブユニットである Rieske 遺伝子(*petC*)についても同様の解析を行った。その結果、核にコードされている *atpG*、*atpC*、*psbO*、*petC* は乾燥ストレス後において、mRNA 蓄積量が低下していた。一方、*atpE* と同様に、葉緑体にコードされている *atpF*、*atpH*、*atpB* においては、乾燥ストレス前後で差が見られなかった。

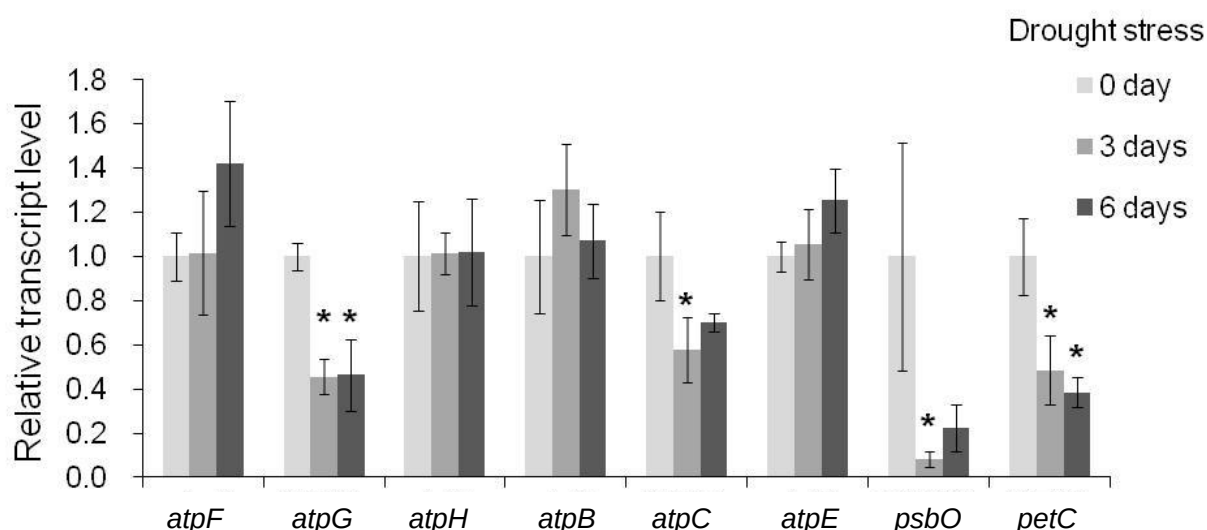


図 3-4 乾燥ストレス前後における光合成タンパク質の mRNA 蓄積量の解析

野生種スイカ葉から RNA を抽出した後、cDNA を合成し、リアルタイム PCR を用いて、mRNA 蓄積量を解析した。グラフの値は、ストレス前後におけるアクチンの mRNA 蓄積量により補正した光合成タンパク質の mRNA 蓄積量の相対値であり、ストレス 0 日目の各光合成タンパク質の mRNA 蓄積量の平均値を 1 とした。n=3。*は有意差を示す: * $P < 0.05$

3-3-5. 各種プロテアーゼ阻害剤による ϵ タンパク質分解への影響

これまでに当研究室で行われた解析により、乾燥ストレス後の野生種スイカ葉から抽出した可溶性画分に組換え ϵ を添加し、一定時間反応させると、 ϵ の蓄積量が減少することが見出されていた(上妻、2008)。このとき、非ストレス下の葉から抽出した可溶性画分では ϵ 蓄積量の減少が見られなかった。さらに、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、メタロプロテアーゼの 3 種類のプロテアーゼを阻害する inhibitor cocktail を用いて、同様の実験を行った結果、inhibitor cocktail により、 ϵ の蓄積量の減少が阻害されることが確認されていた(星安、2008)。これらの結果から、 ϵ 蓄積量の減少が、セリン・システイン・メタロタイプのいずれかのプロテアーゼ酵素により触媒されていることが示唆されていた。

そこで、このプロテアーゼの性質についてさらに検討することとした。上述した 3 種類のうち、どのプロテアーゼが ϵ の分解に関与しているのかを明らかにするために、各種プロテアーゼ阻害剤を用いて、同様の実験を行った(図 3-5)。その結果、Ser protease inhibitor cocktail、E64(Cys protease inhibitor)を添加したサンプルにおいては、プロテアーゼ阻害剤を入れていないコントロールサンプルと同様に、 ϵ の分解が見られた。一方、1,10-*o*-phenanthroline (Metalloprotease inhibitor)を添加したサンプルにおいては、 ϵ の分解が阻害された。これらの結果から、 ϵ の分解にはメタロプロテアーゼが関与していることが示唆された。

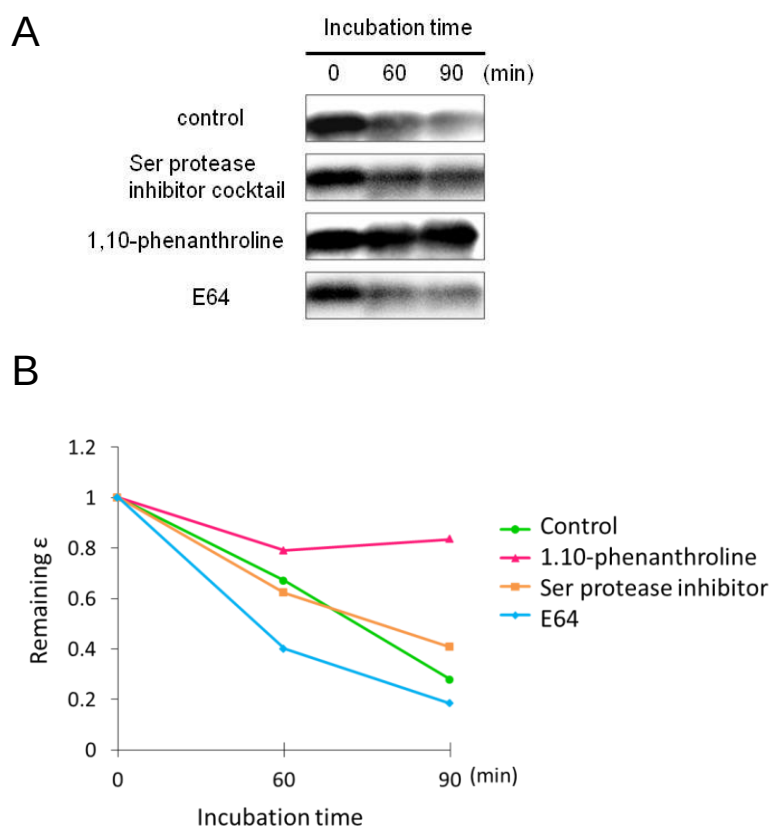


図 3-5 各種プロテアーゼ阻害剤による ϵ タンパク質分解の阻害実験

(A)乾燥ストレス後の野生種スイカ葉から抽出した可溶性画分に各種プロテアーゼ阻害剤を添加し、一定時間反応させた。その後、組換え ϵ を添加し、 ϵ の残存量を経時的に一次元イムノブロット解析した。プロテアーゼ阻害剤は、Ser protease inhibitor cocktail(セリンプロテアーゼ阻害剤)・1,10-*o*-phenanthroline (メタロプロテアーゼ阻害剤)・E64(システインプロテアーゼ阻害剤)を用いた。(B) (A)の結果を用いて定量した。

3-3-6. メタロアミノペプチダーゼに対する 2 分子種 ϵ の感受性の比較解析

本研究において、乾燥ストレス下で、2 分子種の ϵ うち非アセチル化 ϵ (塩基性側 ϵ) のみ減少することが明らかになった。この結果をもたらす要因の一つとして、アセチル基がメタロプロテアーゼに対する ϵ の感受性を変化させていることが予想された。プロテアーゼの一つであるアミノペプチダーゼは、N 末端からペプチド結合を切断していく酵素である。このアミノペプチダーゼの中で、活性に 2 価の金属イオンを必要とするメタロアミノペプチダーゼは、N 末端にアセチル基を持つペプチドに比べて、N 末端にアセチル基を持たないペプチドを特異的に分解することが報告されている (Driessen *et al.* 1983; Jayawardene & Dass 1999)。これらのことから、乾燥ストレス下で見られる非アセチル化 ϵ の優先的な減少に、メタロアミノペプチダーゼが関与している可能性を考えた。そこで、この仮説を検証するために、まず、*in vitro* 実験系を用いたメタロアミノペプチダーゼに対する 2 分子種 ϵ の感受性試験を行った(図 3-6)。野生種スイカ葉から単離した CF₁ に、上記の論文(Driessen *et al.* 1983; Jayawardene & Dass 1999)で使用されたモデル酵素である Leucine aminopeptidase 精製標品を添加し、反応させた後、 ϵ の残存量を 2 次元イムノブロット解析で定量した。その結果、非アセチル化 ϵ はアセチル化 ϵ よりもより早く分解されており、20 分反応させた後には、約 31 %まで減少していた。一方、アセチル化 ϵ の蓄積量は反応前の 77 %であった。これらの結果から、アセチル化 ϵ に比べ、非アセチル化 ϵ はメタロアミノペプチダーゼに対して感受性が高いことが示された。

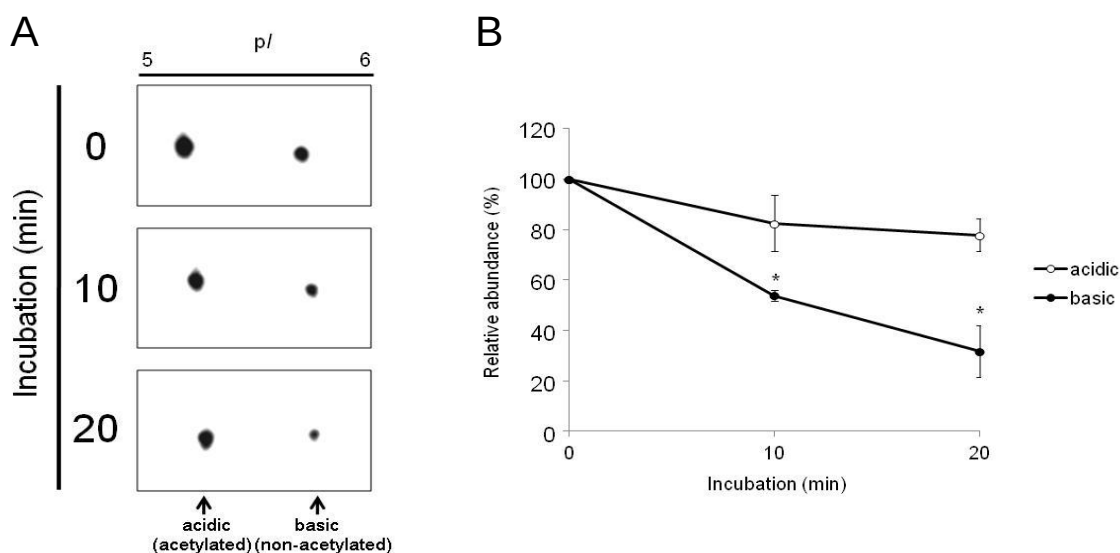


図 3-6 アミノペプチダーゼに対する 2 分子種 ϵ の感受性の違い

(A) 野生種スイカ第 4 葉から単離した CF₁ に Leucine aminopeptidase を添加し、37 °C で反応後、 ϵ の残存量を 2 次元イムノブロットで解析した。

(B) (A)の結果を用いて、反応前のそれぞれの ϵ 分子種のタンパク質を 100%として、各反応時間におけるタンパク質の残存量を算出した。n=3。*は 0h に対する有意差を示す: *P < 0.05

3-3-7. 乾燥ストレス下におけるメタロアミノペプチダーゼの遺伝子発現量の解析

上記の *in vitro* の解析により、乾燥ストレス下における非アセチル化 ε の特異的分解にメタロアミノペプチダーゼが関与している可能性が示唆された。さらに、この仮説を検証するために、乾燥ストレス下における野生種スイカのメタロアミノペプチダーゼの遺伝子発現量を解析した。まず、MEROPS データベースにより、*A.thaliana* のメタロアミノペプチダーゼのアミノ酸配列を入手した。そして、この *A.thaliana* のアミノ酸配列を用いて、57,168 個の遺伝子配列を持つ野生種スイカの EST データベースにより、BLAST 検索を行った。その結果、20 種の野生種スイカのメタロアミノペプチダーゼの候補遺伝子の配列を取得することができた。さらに、*A. thaliana* と野生種スイカのメタロアミノペプチダーゼのアミノ酸配列を用いて、系統樹を作成した(図 3-7)。MEROPS データベースにより、野生種スイカのメタロアミノペプチダーゼは 6 つのファミリー(M1・M17・M18・M20・M24・M28)に分類することができた。

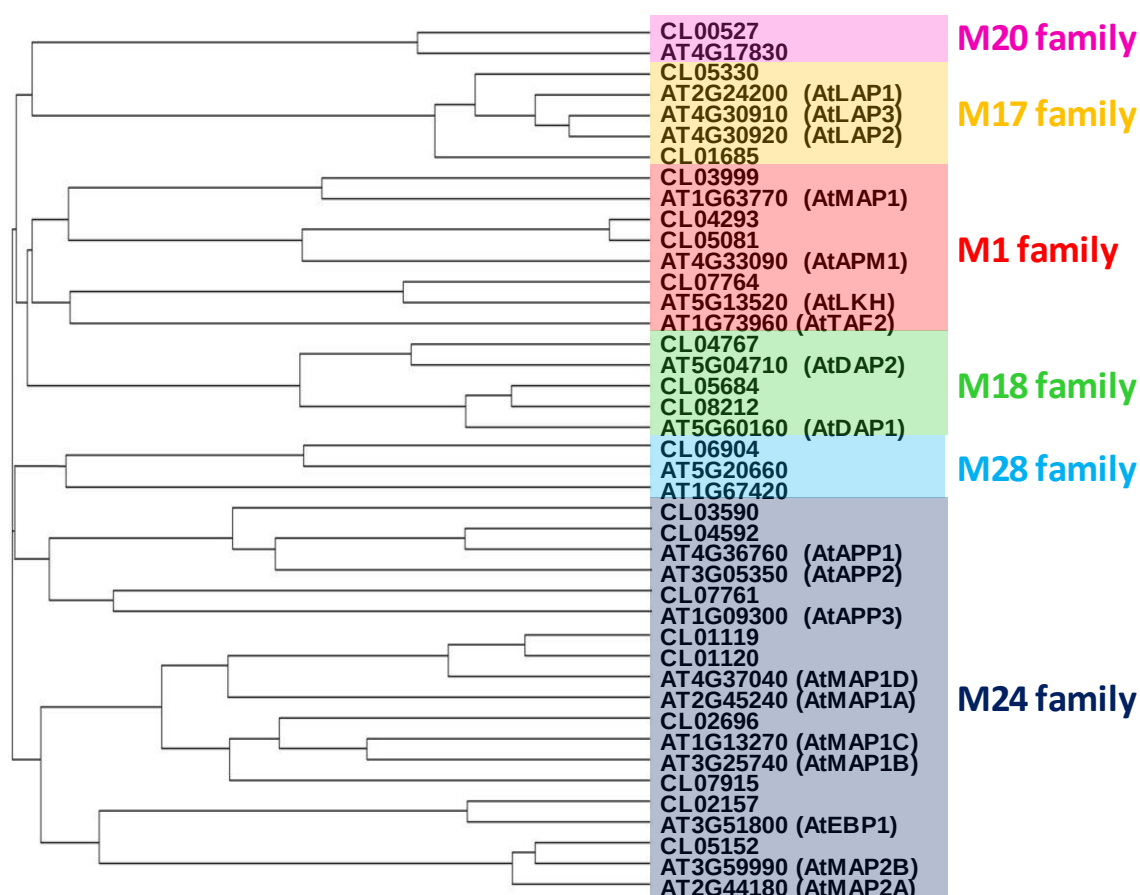


図 3-7 野生種スイカと *A.thaliana* のメタロアミノペプチダーゼ遺伝子の系統樹解析

さらに、定量的 PCR を用いて、乾燥ストレス下における野生種スイカのメタロアミノペプチダーゼ候補遺伝子の発現量を解析した。その結果、20 種のうち 17 種のメタロアミノペプチダーゼ遺伝子が乾燥ストレス下において有意に発現上昇していることが明らかになった (図 3-8)。これらのアミノペプチダーゼの中でも、CL03999、CL00527、CL01685、CL03590 は、乾燥ストレス下で 4 倍以上に遺伝子発現量が上昇していた。

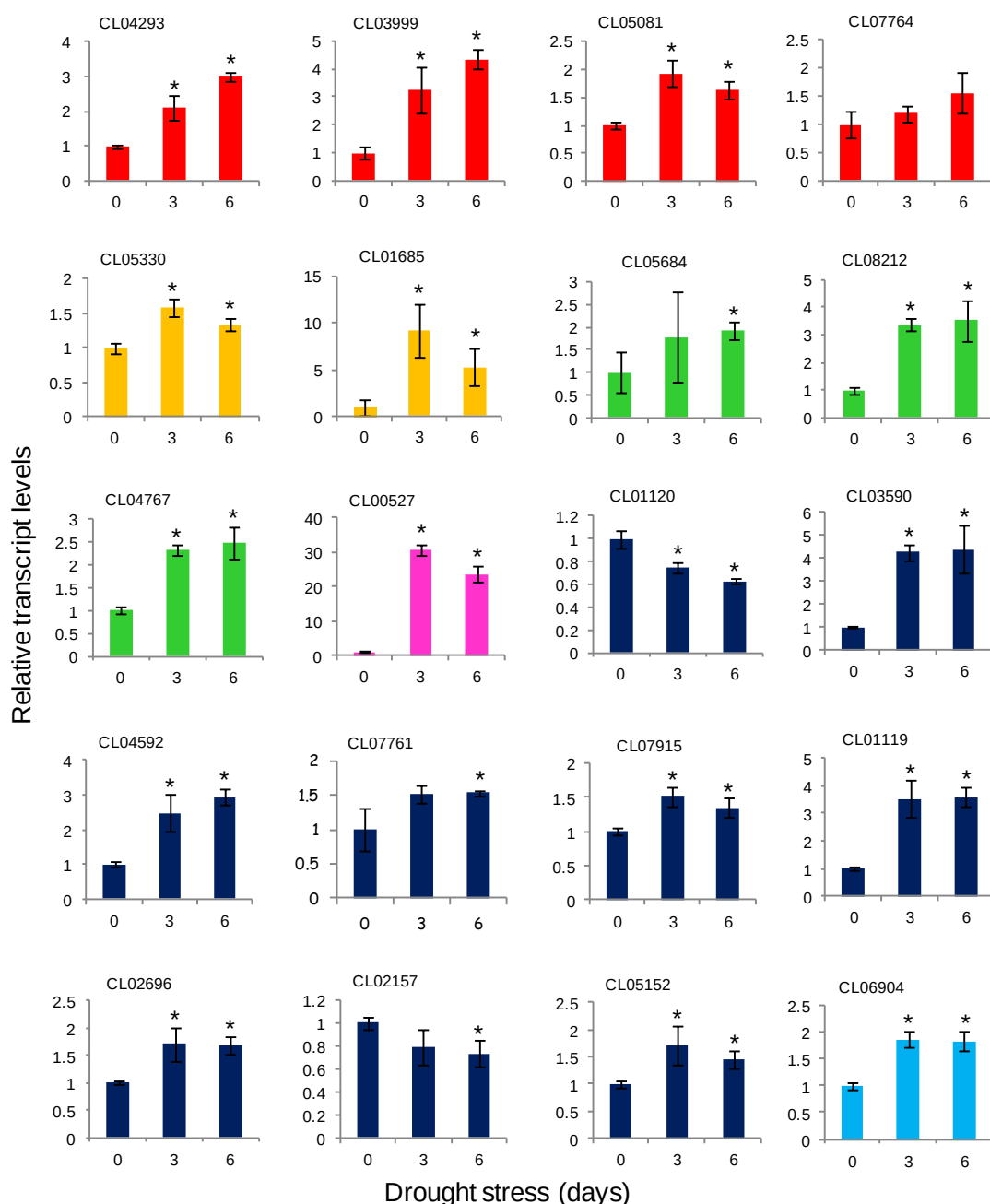


図 3-8 野生種スイカのメタロアミノペプチダーゼの遺伝子発現パターン

乾燥ストレス下における野生種スイカのメタロアミノペプチダーゼ遺伝子発現量のリアルタイム PCR 解析。グラフの値は、アクチンの遺伝子発現量により補正したメタロアミノペプチダーゼ遺伝子発現量の相対値であり、ストレス 0 日目の各メタロアミノペプチダーゼの遺伝子発現量の平均値を 1 とした。n=3。*は有意差を示す: *P < 0.05

3-4. 考察

現在までに、300 種類以上の翻訳後修飾が発見されている(Mann & Jensen 2003)。これらの翻訳後修飾は細胞内プロセスの制御因子として機能することが考えられているが、これらの生理学的意義についての詳細は明らかになっていない。

翻訳後修飾の一つであるアセチル化修飾は、前章でも述べたように、リジン残基の側鎖のアミノ基や N 末端のアミノ酸の α -アミノ基に付加することが知られている。リジンのアセチル化修飾はヒストンや転写因子等で発見されており、この修飾の生理学的意義についてもよく研究されている(Kim & Yang 2011)。例えば、ヒストンのアセチル基は染色体 DNA の構造変換を誘導し、遺伝子発現を大規模に制御することが知られている。また、がん抑制因子である p53 は、アセチル化されることにより、立体構造が変化し、特異的 DNA 配列への結合能が増強され、下流遺伝子である増殖（細胞周期）抑制遺伝子やアポトーシス関連遺伝子などの発現を誘導することが報告されている(Li et al. 2003)。さらに、近年では、解糖系・糖新生・クエン酸回路の代謝系酵素が包括的なアセチル化修飾を受け、生育環境に適応して、細胞代謝を制御していることが報告されている(Wang et al., 2010)。

一方、N 末端のアセチル化修飾の分子メカニズムや生理学的意義については不明な点が多い。これまで、N 末端のアセチル化修飾は、生体内においてタンパク質の N 末端を保護することで、プロテアーゼ等の分解から回避し、タンパク質の安定化に寄与することが提唱されていた(Jornvall 1975; Mischerikow & Heck 2011)。しかしながら多くの研究において、この仮説は実験的に証明されなかった。マウスの L 細胞を用いて、N 末端アセチル化と非アセチル化させたタンパク質のターンオーバーを解析した例では、N 末端のアセチル化はタンパク質の安定化に寄与していないことが示唆され、仮説とは反対の結果が報告されている(Brown 1979)。また近年では、酵母において、細胞のタンパク質のアセチル基が分解のシグナルの役割として機能することが報告された(Hwang et al., 2010)。このように、N 末端アセチル化修飾とタンパク質のターンオーバーとの関連性については依然として不明な点が多い。また、植物における N 末端アセチル化修飾の役割については全く報告例がない。

本研究は、乾燥ストレスや葉の発達段階の後期において、N 末端アセチル化修飾を受けている ϵ (アセチル化 ϵ) の蓄積量は変化しないものの、N 末端アセチル化修飾を受けていない ϵ (非アセチル化 ϵ) のみ減少することを明らかにした。また、乾燥ストレス下における ϵ サブユニットの遺伝子発現量を解析した結果、乾燥ストレス前後の ϵ サブユニットの遺伝子発現量に変動は見られなかった(図 3-4)。このことから、 ϵ サブユニットの蓄積量は転写後に制御されていることが示唆された。

さらに、これまで、乾燥ストレス後の野生種スイカ葉から抽出した可溶性画分に組換え ϵ を添加すると、 ϵ の蓄積量が減少することが明らかになっている(上妻 2008)。この時、乾燥ストレス前の葉に由来する可溶性画分においては、 ϵ の蓄積量の減少は

見られなかった。さらに、セリンプロテアーゼ・メタロプロテアーゼ・システインプロテアーゼの3種類のプロテアーゼを阻害するプロテアーゼ阻害剤を乾燥ストレス下の野生種スイカ葉の可溶性画分に添加し、上記と同様の解析を行った結果、 ϵ の蓄積量の減少が阻害された(星安 2008)。このことから、 ϵ の蓄積量の減少にはプロテアーゼが関与していることが示された。さらに、本研究において、同様の実験で 1,10-*o*-phenanthroline を添加すると、 ϵ の分解が阻害されたことから、メタロプロテアーゼが ϵ の分解に関与していることが明らかになった(図 3-5)。以上の結果をまとめると、 ϵ は生体内において N 末端アセチル化修飾を受けることで、メタロプロテアーゼによる分解から保護され、その結果、乾燥ストレス下において非アセチル化 ϵ のみが減少し、 ϵ 総蓄積量が減少することが予想される。

また、メタロアミノペプチダーゼが N 末端にアセチル基を持つペプチドよりも、N 末端にアセチル基を持たないペプチドを特異的に分解することが報告されている(Driessen *et al.* 1983; Jayawardene & Dass 1999)。これらのことから、乾燥ストレス下で見られる非アセチル化 ϵ の優先的な減少に関与する因子の一つとして、メタロアミノペプチダーゼの可能性が示唆された。この仮説を検証するために、メタロアミノペプチダーゼに対する 2 分子種 ϵ の感受性比較試験を行った。その結果、アセチル化 ϵ に比べて非アセチル化 ϵ の方が、メタロアミノペプチダーゼに対する感受性が高く、上述した仮説を支持した(図 3-6)。

さらに、この仮説を検討するために、野生種スイカの EST 解析によりメタロアミノペプチダーゼの遺伝子配列を取得し、乾燥ストレス下における野生種スイカのメタロアミノペプチダーゼの発現量を解析した(図 3-8)。その結果、20 種のうち 17 種のメタロアミノペプチダーゼの遺伝子発現量が有意に上昇していることが明らかになった。

高等植物におけるメタロアミノペプチダーゼは M1、M17、M18、M24 のファミリーに属している(Walling 2006)。これらのアミノペプチダーゼの中でも、M17 family に属する LAP2 は乾燥や塩ストレス、老化の応答に関与していることが報告されている(Sirisattha *et al.*, 2011)。また、AtLAP2、AtLAP3、AtMAP1、AtDAP2、AtAPP2、AtMAP1C、AtMAP1B は葉緑体移行シグナルを有していることが細胞内局在予測ソフトである TargetP により予測されている。

野生種スイカのメタロアミノペプチダーゼの中でも、CL00527 の遺伝子発現は他の遺伝子よりも著しく増大していた。しかしながら、CL00527 はアルギニン合成経路の第五段階を担う酵素である ArgE と相同性の高い DRIP-1 と同一であり、葉緑体ではなく、細胞質に局在していることが過去に報告されている(Kawasaki *et al.* 2000)。 ϵ サブユニットは葉緑体に局在しているため、CL00527 は ϵ サブユニットの分解に関与する因子ではないことが予想される。葉緑体移行シグナルを有していることが予測された *A. thaliana* のペプチダーゼと高い相同性を有している野生種スイカのペプチダーゼは、CL03999、CL01685、CL05330、CL04767、CL03590、CL07915、CL02696 であり、これらの中に葉緑体に局在する ϵ の分解に関与する候補因子が存在することが予想される。特に、CL01685 は、他の候補因子よりも乾燥ストレス下で発現上昇が顕著に高い

こと、また、乾燥や塩ストレスに関与する LAP2 と同じ M17 ファミリーに属していることから、 ϵ サブユニットの分解に関与する可能性が高いと予想される。

また、メタロアミノペプチダーゼ以外に、葉緑体のストロマ画分(可溶性画分)に存在するメタロプロテアーゼとしては、SPP、Prep1、Prep2、Oligopeptidase A が挙げられる。これらのプロテアーゼはシグナルペプチドを分解するプロテアーゼとして知られているが、 ϵ の分解に関与している可能性もあり、今後、これらの因子についても解析する必要があると考えられる。

タンパク質の蓄積量はタンパク質合成と分解のバランスにより決定される。よって、本研究で見出された乾燥ストレス下における非アセチル化 ϵ の蓄積の減少は、非アセチル化 ϵ の選択的分解だけではなく、NAT によるアセチル化 ϵ の増大による可能性も考えられる。これまでに、ストレスに応答して、マウスの松果体に存在する NAT の活性が上昇することが報告されている(Vaughan *et al.* 1978)。一方、植物における NAT については知見が少なく、ストレス誘導による NAT の上昇については報告されていない。今後、葉緑体に存在する野生種スイカの NAT を同定し、乾燥ストレス下における NAT 遺伝子の発現量・NAT 活性の解析、一過的に NAT をロックダウンさせた変異体の解析を行うことで、乾燥ストレス下における ϵ の量的制御についてさらに理解を深めることができると考えられる。

本研究において、乾燥ストレス下で見られた非アセチル化 ϵ の選択的減少は葉の発達段階後期においても見られた(図 3-3)。この結果から、葉の発達段階後期と乾燥ストレス条件下でみられた量的制御メカニズムは共通している可能性がある。また、これまでに、野生種スイカにおいて、老化葉で分解された RuBisCO が若葉のシトルリンの主要な窒素源を担っていることを示唆する報告(高原、2006)や、イネの穂を構成する窒素の半分は老化葉のタンパク質の窒素に由来しているという報告(Mae and Ohira 1981)がある。さらに、 C_3 植物では約 75%もの窒素が葉緑体に分配されている(Peoples and Dalling 1988; Makino 2003)ことや、葉緑体 ATP 合成酵素はチラコイド膜タンパク質の蓄積量の約 10%以上を占めていることから、野生種スイカ葉の発達段階後期において、 ϵ を始めとする CF_1 を分解することで、発達段階初期の葉の窒素源を担っていると予想される。葉の発達段階後期の量的制御のメカニズムや生理的意義については、今後、詳細な解析をする必要がある。

ATP 合成酵素 ϵ サブユニットは、膜の電気化学ポテンシャルと ATP 合成酵素の共役因子として、また逆反応である ATP 加水分解反応の抑制因子として、その構造活性相関が解析されている。例えば、 ϵ サブユニットによる酵素活性の抑制は、 ϵ サブユニットの C 末端の構造変化によるものであることが大腸菌や好熱菌の構造解析により報告されている(図 3-9, Gibbons *et al.* 2000; Rodgers *et al.* 2000; Kato-Yamada *et al.* 2009; Cingolani & Duncan 2011)。 ϵ サブユニットの C 末端が伸びることで、 ϵ サブユニットの C 末端の塩基性アミノ酸と β サブユニットのよく保存された領域である DELSEED 内の酸性アミノ酸が相互作用し、加水分解活性の抑制に寄与することが示唆されている(Hara *et al.* 2001)。また、 ϵ サブユニットの N 末端も機能的に重要な役割

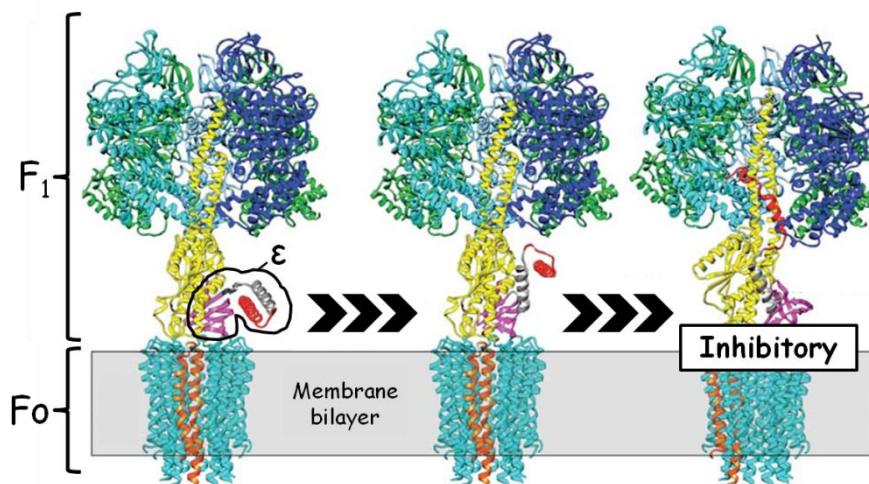


図 3-9 大腸菌の ATP 合成酵素の立体構造変化モデル

赤紫色は ϵ の N 末端、灰色($\epsilon 82-105$)および赤色($\epsilon 106-138$)は C 末端を示す。一番左の構造は ATP 加水分解活性が抑制状態の構造である(Cingolani & Duncan 2011)。

させた組換え ϵ では、プロトン透過性や γ サブユニットとの相互作用が低下することが報告されている。(Shi *et al.*, 2001)。また、最近では、シアノバクテリアの葉緑体 ATP 合成酵素の ϵ サブユニットの構造解析においても、 ϵ サブユニットの N 末端ドメインおよび C 末端ドメインの両方が γ サブユニットとの相互作用と関係していることが示されている。このように ϵ サブユニットの構造と生化学的機能は密接に関連している。特に、 ϵ サブユニットの N 末端は γ サブユニットおよび III サブユニットと相互作用していること(図 3-10, Cingolani *et al.* 2010)から、 ϵ サブユニットの N 末端のアセチル化は生化学的機能にも影響を及ぼしている可能性が考えられる。また、 ϵ サブユニットの N 末端のアセチル化はアミノペプチダーゼへの感受性を低下させることで、 ϵ の量的制御を担っていると考えられる。よって、N 末端のアセチル化は量的制御と生化学的機能の両面の重要な役割を担っていることが予想される。今後は、アセチル基が酵素反応に及ぼす影響を解析することで、 ϵ サブユニットのアセチル化修飾の生化学的意義を明らかにすることができると考えられる。

本研究は、N 末端のアセチル化修飾が ϵ

をもつことが報告されている (Cingolani & Duncan 2011)。例えば、ハウレンソウの ϵ サブユニットの N 末端から 3 つのアミノ酸を欠損させた組換え ϵ を用いて、ATP 合成酵素をそれぞれ再構成させた結果、ATP 加水分解の阻害活性が低下することが明らかになっている(Shi *et al.*, 2001)。さらに、N 末端から 5 つのアミノ酸を欠損

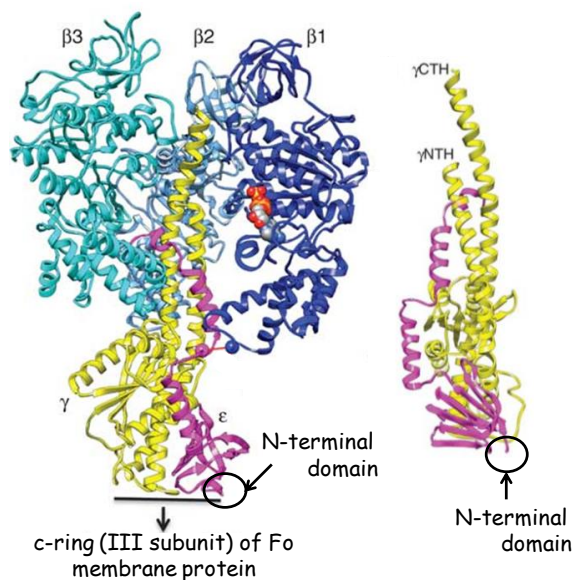


図 3-10 ϵ サブユニットの構造と N 末端部位
赤紫色は ϵ サブユニットを示す。

(Cingolani *et al.* 2010 より改変)

サブユニットの蓄積量を制御していることを示唆するデータを得た。初期のストレス応答では ϵ が優先的に分解され脱共役が起き(上妻、2008)、後期では CF_1 複合体が分解されるという過去の報告(Kohzuma *et al.* 2009)を合わせて考えると、 ϵ サブユニットのアセチル化修飾と選択的分解が CF_1 の蓄積量を調節していることが予想される。さらに、長期の乾燥ストレス下における CF_1 の蓄積量の低下は、チラコイド膜の密閉性を高め、余剰な光エネルギーを熱により散逸する NPQ の誘導に貢献していることを示唆している。このことから、乾燥ストレス下でみられる N 末端アセチル化修飾による蓄積量の調節には、光エネルギー制御に関与する新規な分子機構の存在が予想される。

第4章

結論

葉緑体チラコイド膜の光合成装置は環境に応答してその反応を制御している。葉緑体チラコイド膜において光化学反応を担うタンパク質複合体の相対的な蓄積量比は、環境条件に応答して厳密に制御されていると考えられているが、その分子メカニズムの解明は全く進んでなかった。この重要メカニズムを解明するためには、光化学装置の量的制御のプロセスを詳細に解析するとともに、この分子プロセスに関与する鍵因子を探索することが重要であると考えられた。

これまでに、環境ストレス下における光化学装置の量的制御について理解するために、乾燥強光耐性植物の C_3 植物である野生種スイカを用いて解析が行われていた。その結果、葉緑体 ATP 合成酵素 ϵ サブユニットの分解を引き金に、葉緑体 ATP 合成酵素複合体の蓄積量が、他の光合成タンパク質複合体に先駆けて減少することが見出されていた。さらに、野生種スイカのチラコイド膜タンパク質のプロテオーム解析により、葉緑体 ATP 合成酵素 ϵ サブユニットは等電点の差異により、2 分子種存在していることが示唆されていた。 ϵ は単一コピーの遺伝子にコードされていることから、 ϵ が、翻訳後修飾により 2 分子種存在していることが予想された。

そこで本研究では、この 2 分子種 ϵ の構造差をもたらす要因を明らかにするために、野生種スイカの葉から 2 分子種 ϵ を分離精製した。そして、精製した ϵ を MALDI TOF-MS に供し、構造差をもたらす因子の分子質量を測定した。その結果、2 分子種 ϵ の分子質量の差は約 42 Da であり、この翻訳後修飾が酸性側 ϵ に付加していることが示唆された。次に、トリプシン消化した ϵ を MALDI TOF-MS に供し、この翻訳後修飾が付加している部位の特定を行った。その結果、翻訳後修飾は 2-12 番目のアミノ酸内の N 末端のペプチドに存在していることが示唆された。さらに、トリプシン消化した ϵ を LC/MS/MS に供した結果、2 分子種 ϵ 構造差をもたらす翻訳後修飾は、N 末端に存在するアセチル基であることが明らかになった。また、植物における 2 分子種 ϵ の普遍性について明らかにするために、*C. melo*、*N. tabacum*、*A. thaliana* の膜タンパク質を用いて、2 次元イムノブロット解析を行った。その結果、解析した全ての双子葉植物種において、2 分子種 ϵ が検出された。これらのことから、2 分子種 ϵ は双子葉植物体内で普遍的に存在することが示唆された。

次に、生体内における 2 分子種 ϵ の挙動について解析した。その結果、乾燥ストレスや葉の発達段階後期において、N 末端にアセチル基を持たない ϵ (非アセチル化 ϵ) のみが多量的に減少していることが明らかになった。

上記で観察された 2 分子種 ϵ の量的制御に関与する因子の候補として、メタロ・アミノペプチダーゼの関与が考えられた。そこで、メタロアミノペプチダーゼに対する 2 分子種 ϵ の感受性を *in vitro* で比較した。その結果、アセチル化された ϵ よりも、非

アセチル化 ϵ が有意に速く分解することが確認された。さらに、メタロアミノペプチダーゼが非アセチル化 ϵ の特異的分解に関与している可能性を調べるために、定量的 RT-PCR 法により、乾燥ストレス下の野生種スイカ葉における遺伝子発現量を解析した。その結果、多くのメタロアミノペプチダーゼの遺伝子発現量が乾燥ストレス下で有意に増大していた。

以上の結果から、生体内において ϵ 分子の一部は N 末端にアセチル化修飾を受けることや、2 分子種 ϵ の量的バランスが外的環境や発達段階により変化することが示された。さらに、アセチル化修飾を受けた ϵ はプロテアーゼ耐性を獲得し、この性質が ϵ 総蓄積量を決定する重要な要因である可能性が示唆された。また、 ϵ の蓄積量のみ減少している初期の乾燥ストレス条件下では、ATP 加水分解活性が増大することや、チラコイド膜内外の Δ pH が低下するという先行研究の結果を合せて考えると、乾燥ストレス下で ϵ を持たない ATP 合成酵素が存在していることが示唆される。さらにストレス後期には CF_1 複合体が分解されるという結果と合わせて考えると、 ϵ のアセチル化修飾と選択的分解が CF_1 の蓄積量を調節していることが予想される。今後、乾燥ストレス下における ϵ のアセチル化修飾の効率や ϵ の選択的分解と CF_1 複合体の分解の関連性についても解析を行うことで、葉緑体 ATP 合成酵素の量的制御メカニズムの知見が得られると考えられる。

乾燥ストレス下では、 CO_2 固定反応が抑制されるため、ATP 消費量が減少する一方で、光呼吸やプロテアーゼの活性、タンパク質の合成等には ATP が必要不可欠である。よって、一つの仮説として、乾燥ストレス下で ATP を必要とするタンパク質の近くにプロテアーゼ耐性を有するアセチル化 ϵ をもつ ATP 合成酵素を存在させることで、環境ストレスへの応答を早め、耐性を獲得していることが予想される。これまでに、D1 タンパク質は、損傷を受けると脱リン酸化を受け、プロテアーゼの存在するストロマチラコイドへ移動することが報告されている (Vener 2007))。このように、光合成タンパク質の分布は、環境に適応するための重要な意味を持つことが考えられる。今後は、2 分子種の ϵ の局在や ϵ に関与するプロテアーゼや修飾酵素、 ϵ のアセチル化修飾による ATP 合成酵素活性への影響等について解析することで、2 分子種 ϵ の存在意義や乾燥ストレス耐性との関連性について明らし、光合成タンパク質の翻訳後修飾の機能について新しい知見が得られると考えられる。

参考文献

- Akashi K., Nishimura N., Ishida Y. & Yokota A. (2004) Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 72-78.
- Akashi K., Yoshida K., Kuwano M., Kajikawa M., Yoshimura K., Hoshiyasu S., Inagaki N. & Yokota A. (2011) Dynamic changes in the leaf proteome of a C₃ xerophyte, *Citrullus lanatus* (wild watermelon), in response to water deficit. *Planta* 233, 947-960.
- Allen J. F. (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1098, 275-335.
- Allen J.F. (2002) Photosynthesis of ATP-electrons, proton pumps, rotors, and poise. *Cell* 110, 273-276.
- Aro E.M., Suorsa M., Rokka A., Allahverdiyeva Y., Paakkarinen V., Saleem A., Battchikova N. & Rintamaki E. (2005) Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *J. Exp. Bot.* 56, 347-356.
- Andralojc P.J. & Harris D.A.(1990) Promotion and inhibition of catalytic cooperativity of the Ca²⁺-dependent ATPase activity of spinach chloroplast coupling factor 1 (CF₁). *Biochim Biophys. Acta.* 1016, 55-62.
- Baena-Gonzalez E. & Aro E.M. (2002) Biogenesis, assembly and turnover of photosystem II units. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 357, 1451–1460.
- Bellafiore S., Barneche F., Peltier G. & Rochaix J.D. (2005) State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature* 433, 892-895.
- Binder A., Jagendorf A. & Ngo E. (1978) Isolation and composition of the subunits of spinach chloroplast coupling factor protein. *J. Biol. Chem.* 253, 3094-3100.
- Brown J.L. (1979) A comparison of the turnover of α -N-acetylated and nonacetylated mouse L-cell proteins. *J. Biol. Chem.* 254, 1447-1449.
- Burkey K.O. & Mathis J.N. (1998) Identification of a novel isoform of the

chloroplast-coupling factor alpha-subunit. *Plant Physiol.* 116, 703-708.

Cingolani G & Duncan T.M. (2011) Structure of the ATP synthase catalytic complex (F₁) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 701-707.

Depège N., Bellafiore S. & Rochaix J.D. (2003) Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHCII phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science* 299, 1572-1575.

Duhe R.J. & Selman B.R. (1990) The dithiothreitol-stimulated dissociation of the chloroplast coupling factor 1 epsilon-subunit is reversible. *Biochim. Biophys. Acta.* 15, 70-78.

Field C.B., Behrenfeld M.J., Randerson J.T. & Falkowski P. (1998) Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281, 237-240.

Fujiwara M., Umemura K., Kawasaki T. & Shimamoto K. (2006) Proteomics of Rac GTPase signaling reveals its predominant role in elicitor-induced defense response of cultured rice cells. *Plant Physiol.* 140, 734-745.

Gibbons C., Montgomery M.G., Leslie A.G. & Walker J.E.(2000) The structure of the central stalk in bovine F(1)-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1055-1061.

Giglione C., Serero A., Pierre M., Boisson B. & Meinzel T. (2000) Identification of eukaryotic peptide deformylases reveals universality of N-terminal protein processing mechanisms. *EMBO J.* 19, 5916-5929.

Hieber A. D., Kawabata O. & Yamamoto H. Y. (2004) Significance of the lipid phase in the dynamics and functions of the xanthophyll cycle as revealed by PsbS overexpression in tobacco and in-vitro de-epoxidation in monogalactosyldiacylglycerol micelles. *Plant Cell Physiol.* 45, 92-102.

Hisabori T., Kondoh A. & Yoshida M. (1999) The gamma subunit in chloroplast F(1)-ATPase can rotate in a unidirectional and counter-clockwise manner. *FEBS Lett.* 63, 35-38.

Houtz R.L., Stults J.T., Mulligan R.M. & Tolbert N.E. (1989) Post-translational modifications in the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 1855-1859.

Hwang C.S., Shemorry A. & Varshavsky A. (2010) N-Terminal acetylation of cellular proteins

creates specific degradation signals. *Science* 327, 973-977.

Hwang S.M., Kim D.W., Lee B.H. & Bahk J.D. (2009) Arabidopsis cytoplasmic *N*-acetyltransferase, as the ortholog of RimL in *E. coli*, controls flowering time via the autonomous pathway. *Plant Sci.* 177, 593-600.

Iwai M., Yokono M., Inada N. & Minagawa J. (2010) Live-cell imaging of photosystem II antenna dissociation during state transitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 2337-2342.

Jiao S., Hilaire E. & Guikema J.A. (2004) Identification and differential accumulation of two isoforms of the CF₁-beta subunit under high light stress in *Brassica rapa*. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 883-890.

Jornvall H. (1975) Acetylation of protein *N*-terminal amino groups structural observations on alpha-amino acetylated proteins. *J. Theor. Biol.* 55, 1-12.

Johnson E.A. & McCarty R.E. (2002) The carboxyl terminus of the epsilon subunit of the chloroplast ATP synthase is exposed during illumination. *Biochemistry.* 41, 2446-2451.

Kato-Yamada Y. (2009) On the regulatory role of the epsilon subunit in ATP synthase. *Seikagaku* 81, 943-951.

Kawasaki S., Miyake C., Kouchi T. & Yokota A. (2000) Responses of wild watermelon to drought stress: accumulation of an ArgE homologue and citrulline in leaves during water deficit. *Plant Cell Physiol.* 41, 864-873.

Komatsu-Takaki M. (1989) Energy-dependent conformational changes in the epsilon subunit of the chloroplast ATP synthase (CF₀CF₁). *J. Biol. Chem.* 264, 17750-17753.

Kim G.W. & Yang X. J. (2011) Comprehensive lysine acetylomes emerging from bacteria to humans. *Trends Biochem. Sci.* 36, 211-220.

Kohzuma K., Cruz J.A., Akashi K., Hoshiyasu S., Munekage Y.N., Yokota A. & Kramer D.M. (2009) The long-term responses of the photosynthetic proton circuit to drought. *Plant Cell Environ.* 32, 209-219.

Li X. P., Bjorkman O., Shih C., Grossman A. R., Rosenquist M., Jansson S., & Niyogi K. K.

- (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* **403**, 391-395.
- Maione T.E. & Jagendorf A.T. (1984) Partial deglycosylation of chloroplast coupling factor 1 (CF₁) prevents the reconstitution of photophosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 3733-3736.
- Mann M. & Jensen O.N. (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.* **21**, 255-261.
- Mae T. & Ohira K. (1981) The remobilization of nitrogen related to leaf growth and senescence in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.* **22**, 1067-1074.
- Makino A. (2003) Rubisco and nitrogen relationships in rice. Leaf photosynthesis and plant growth. *Soil Sci. Plant Nutr.* **49**, 319-327.
- Michel H., Hunt D.F., Shabanowitz J. & Bennett J. (1988) Tandem mass spectrometry reveals that three photosystem II proteins of spinach chloroplasts contain *N*-acetyl-*O*-phosphothreonine at their NH₂ termini. *J. Biol. Chem.* **263**, 1123-1130.
- Minagawa J. & Takahashi Y. (2004) Structure, function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins. *Photosynth. Res.* **82**, 241-63.
- Mischerikow N. & Heck A.J.R. (2011) Targeted large-scale analysis of protein acetylation. *Proteomics* **11**, 571-589.
- Murphy A.S., Hoogner K.R., Peer W.A. & Taiz L. (2002) Identification, purification, and molecular cloning of *N*-1-naphthylphthalic acid-binding plasma membrane-associated aminopeptidases from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **128**, 935-950.
- Nanjo Y., Oka H., Ikarashi N., Kaneko K., Kitajima A., Mitsui T., Munoz F.J., Rodriguez-Lopez M., Baroja-Fernandez E. & Pozueta-Romero J. (2006) Rice plastidial *N*-glycosylated nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase is transported from the ER-golgi to the chloroplast through the secretory pathway. *Plant Cell* **18**, 2582-2592.
- Nelson N. & Ben-Shem A. (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 971-82.

Ogawa T., Nishimura K., Aoki T., Takase H., Tomizawa K., Ashida H. & Yokota A. (2009) A phosphofructokinase B-type carbohydrate kinase family protein, NARA5, for massive expressions of plastid-encoded photosynthetic genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 151, 114-128.

Plader W., Yukawa Y., Sugiura M. & Malepszy S. (2007) The complete structure of the cucumber (*Cucumis sativus* L.) chloroplast genome: its composition and comparative analysis. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 12, 584-594.

Polevoda B. & Sherman F. (2000) *N*- α -terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 36479-36482.

Pesaresi P., Gardner N.A., Masiero S., Dietzmann A., Eichacker L., Wickner R., Salamini F. & Leister D. (2003) Cytoplasmic *N*-terminal protein acetylation is required for efficient photosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 15, 1817-32.

Polevoda B. & Sherman F. (2003) *N*-terminal acetyltransferases and sequence requirements for *N*-terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J. Mol. Biol.* 325, 595-622.

Peoples, M.B. & M.J. Dalling (1988) The Interplay Between Proteolysis and Amino Acid Metabolism during Senescence and Nitrogen Reallocation. *In: Senescence and Aging in Plants*, Nooden, L.D. and A.C. Leopold (Eds.). Academic Press, New York, USA., pp: 181-217.

Raunser S., Magnani R., Huang Z., Houtz R.L., Trievel R.C., Penczek P.A. & Walz T. (2009) Rubisco in complex with Rubisco large subunit methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 3160-3165.

Richter M.L., Patrie W.J. & McCarty R.E. (1984) Preparation of the ϵ subunit and ϵ subunit-deficient chloroplast coupling factor 1 in reconstitutively active forms. *J. Biol. Chem.* 259, 7371-7373.

Richter M.L. & McCarty R.E. (1987) Energy-dependent changes in the conformation of the epsilon subunit of the chloroplast ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 262, 15037-40.

Romanowska E., Powikrowska M., Zienkiewicz M., Drozak A. & Pokorska B. (2008) High light induced accumulation of two isoforms of the CF₁ alpha-subunit in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of C₄ plants. *Acta. Biochim. Pol.* 55, 175-82.

Ross S., Giglione C., Pierre M., Espagne C. & Meinnel T. (2005) Functional and developmental impact of cytosolic protein *N*-terminal methionine excision in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *137*, 623-37.

Rawlings N.D., Tolle D.P. & Barrett A.J. (2004) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* *32*, D160-164.

Rodgers A.J. & Wilce M.C. (2000) Structure of the gamma-epsilon complex of ATP synthase. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 1051-1054.

Sarvikas P., Hakala M., Pätsikkä E., Tyystjärvi T. & Tyystjärvi E. (2006) Action spectrum of photoinhibition in leaves of wild type and npq1-2 and npq4-1 mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* *47*, 391-400.

Sanda S., Yoshida K., Kuwano M., Kawamura T., Munekage Y.N., Akashi K., Yokota A. (2011) Responses of the photosynthetic electron transport system to excess light energy caused by water deficit in wild watermelon. *Physiol. Plant.* *142*, 247-64.

Shimizu M., Kato H., Ogawa T., Kurachi A., Nakagawa Y. & Kobayashi H. (2010) Sigma factor phosphorylation in the photosynthetic control of photosystem stoichiometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 10760-10764.

Shinozaki K., Deno H., Kato A. & Sugiura M. (1983) Overlap and cotranscription of the genes for the beta and epsilon subunits of tobacco chloroplast ATPase. *Gene* *24*, 147-155.

Shi X.B., Wei J.M. & Shen Y.K. (2001) Effects of sequential deletions of residues from the *N*- or *C*-terminus on the functions of epsilon subunit of the chloroplast ATP synthase. *Biochemistry* *40*, 10825-10831.

Soteropoulos P., Ong A.M. & McCarty R.E. (1994) Alkylation of cysteine 89 of the gamma subunit of chloroplast coupling factor 1 with *N*-ethylmaleimide alters nucleotide interactions. *J. Biol. Chem.* *269*, 19810-19816.

Uhlin U., Cox G.B. & Guss J.M. (1997) Crystal structure of the epsilon subunit of the proton-translocating ATP synthase from *Escherichia coli*. *Structure* *5*, 1219-30.

Vaughan G.M., Allen J.P., Tullis W., Sackman J.W. & Vaughan M.K. (1978) Stress-induced increase of pineal N-acetyltransferase activity in intact rats. *Neurosci Lett.* 9, 83-87.

Vener A.V. (2007) Environmentally modulated phosphorylation and dynamics of proteins in photosynthetic membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 449-457.

Waditee-Sirisattha R., Shibato J., Rakwal R., Sirisattha S., Hattori A., Nakano T., Takabe T. & Tsujimoto M. (2011) The *Arabidopsis* aminopeptidase LAP2 regulates plant growth, leaf longevity and stress response. *New Phytol.* 191, 958-69.

Walling L.L. (2006) Recycling or regulation? The role of amino-terminal modifying enzymes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 227-233.

Walters R.G. & Horton P. (1994) Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: Changes in composition of the photosynthetic apparatus. *Planta* 195, 248-256.

Walters R.G. (2005) Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *J. Exp. Bot.* 56, 435-447.

Wang Q., Zhang Y., Yang C., Xiong H., Lin Y., Yao J., Li H., Xie L., Zhao W., Yao Y., Ning Z.B., Zeng R., Xiong Y., Guan K.L., Zhao S. & Zhao G.P. (2010) Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Science* 327, 1004-1007.

Yagi H., Konno H., Murakami-Fuse T., Isu A., Oroguchi T., Akutsu H., Ikeguchi M. & Hisabori T. (2009) Structural and functional analysis of the intrinsic inhibitor subunit epsilon of F₁-ATPase from photosynthetic organisms. *Biochem J.* 425, 85-94.

Hosein F.N., Bandyopadhyay A., Peer W.A. & Murphy A.S. (2010) The catalytic and protein-protein interaction domains are required for APM1 function. *Plant Physiol.* 152, 2158-2172.

Yang D.-H., Webster J., Adam Z., Lindahl M. & Andersson B. (1998) Induction of acclimative proteolysis of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein of photosystem II in response to elevated light intensities. *Plant Physiol.* 118, 827-834.

Yokthongwattana K. & Melis A. (2006) Photoinhibition and recovery in oxygenic photosynthesis: Mechanism of a photosystem II damage and repair cycle. *In* Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation and Environment, B. Demmig-Adams, W. Adams, and A.K.

Mattoo (eds), Dordrecht, The Netherlands, Springer, pp. 175–191.

Yokota A., Kawasaki S., Iwano M., Nakamura C., Miyake C. & Akashi, K. (2002) Citrulline and DRIP-1 protein (ArgE homologue) in drought tolerance of wild watermelon. *Ann. Bot.* 89, 825-832.

Zybailov B., Rutschow H., Friso G., Rudella A., Emanuelsson O., Sun Q, & van Wijk K.J. (2008) Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS One* 3, e1994.

上妻馨梨 (2008) 余剰光ストレス下における光合成チラコイド膜のプロトン勾配制御機構の解析. NAIST バイオサイエンス研究科. 博士論文.

高原健太郎 (2006) 乾燥強光下の野生種スイカにおけるシトルリン蓄積の制御機構の解明. NAIST バイオサイエンス研究科. 博士論文.

星安紗希 (2008) 強光乾燥ストレス下における葉緑体 ATP 合成酵素 ϵ サブユニット蓄積量の制御機構. NAIST バイオサイエンス研究科. 修士論文.

吉田和生(2005) 野生種スイカの葉における乾燥強光ストレス応答性タンパク質の網羅的解析. NAIST バイオサイエンス研究科. 修士論文.

謝辞

2007 年に奈良先端科学技術大学院大学に入学してから、多くの先生や先輩や後輩に支えられ、ここまで楽しく研究を行うことができました。

分化・形態形成学研究室の横田明穂 教授には、研究の指導や研究生活の面に関しまして、助けていただきました。さらに、明石欣也 助教には研究内容から文章の添削にいたるまで、非常に多くのことを熱心に教えていただきました。厚く感謝申し上げます。また、蘆田弘樹 助教、宗景ゆり 助教の先生方、上妻馨梨 博士、三田智子 博士、小川太郎 博士の先輩方にも、本研究に関するアドバイスを多く頂き、ありがとうございました。

本研究の MALDI-TOF MS の解析はバイオサイエンス研究科 塚本潤子 技官のサポートによって行われました。また、本研究は平成 21 年度 NAIST 植物科学研究教育推進事業「植物タンパク質ネットワーク」研究プロジェクトに採択され、研究費や技術面に関しまして、多くサポート頂きました。特に、深尾陽一郎 准教授、藤原正幸 助教、倉田理恵 技官には非常に多くサポートして頂きました。さらに、本研究は日本学術振興会、グローバル COE プログラムにより研究を支援していただきました。心から感謝を申し上げます。