

論文内容の要旨

申請者氏名 三田 智子

乾燥環境下では、植物は水分の損失を防ぐために気孔を閉鎖するが、これは同時に葉内への CO₂ の取り込みも低下させてしまう。このため、CO₂ 固定反応による還元力の消費量が低下し、吸収した過剰の光エネルギーが活性酸素の生成を招き、光合成器官に損傷を与える。乾性植物に分類される野生種スイカ *Citrullus lanatus* sp. は、アフリカ・カラハリ砂漠に自生しており、地球上の多くの植物と同じ C₃ 型の光合成代謝反応を営むが、強い乾燥耐性を示す。本論文では、野生種スイカを用いて、乾燥条件下での葉緑体電子伝達制御機構および電子伝達系に関わるタンパク質の解析を行った。

野生種スイカは、冠水停止後 3 日目において、CO₂ 固定反応が完全に停止する乾燥ストレス条件下でも葉の萎れが観察されない。この葉において光条件下での光合成電子伝達反応は、大きく低下していたが、暗条件下での光化学系 II (PSII) および光化学系 I (PSI) の最大活性は低下しておらず、光化学系が光損傷を受けていないことが明らかとなった。光条件下での PSI の反応中心 P700 の酸化レベルは、冠水停止前と比較して上昇しており、PSI より上流で電子伝達が抑制されている可能性が示唆された。また、単離チラコイド膜を用いた、 Δ pH を解消する脱共役剤存在下で電子伝達活性測定により、乾燥条件下では、pH に依存しない電子伝達抑制が、PSII と PSI の間で起こっていることが明らかとなった。

電子伝達に関与するタンパク質の量をウエスタン解析により調べたところ、PSI の電子受容側で働く FNR の量に少し低下がみられたが、PSII、PSI、シトクロム *b₆f* 複合体、ATP 合成酵素のサブユニットの量の低下は見られなかった。一方、プロテオーム解析により乾燥条件下ではシトクロム *b₆f* 複合体の構成因子である Rieske タンパク質の *pI* の異なるものが現れることが明らかとなった。ウエスタン解析の結果、分子量は同じであるが酸性側に *pI* の異なる Rieske タンパク質が、乾燥ストレス条件下で出現し、再冠水後には消失すると事が明らかとなった。また、この分子は短時間の強光照射によっても現れた。EST 解析およびサザンブロット解析より、Rieske タンパク質をコードする遺伝子が 1 つであると推定されること、総タンパク質量が変化しないことから、乾燥ストレス下で Rieske タンパク質が翻訳後修飾を受けている可能性が示唆された。

また、乾燥ストレス条件は異なるが、分光学的手法により、乾燥ストレス下でシトクロム *f* の再還元速度が低下することが示された。これら一連の結果から、野生種スイカでは、乾燥条件下でシトクロム *b₆f* 複合体の Rieske サブユニットが翻訳後修飾され、電子伝達を抑制すると考えられた。この電子伝達の抑制により PSI に流入する電子の量を抑え、PSI が光損傷を受けるのを防いでいると考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 三田 智子

高等植物が持つ乾燥ストレス耐性は、水分の獲得効率を向上させる、水分の損失を防ぐ、過剰光の受容を回避する、過剰光によって生じた活性酸素を消去する、光損傷を受けたタンパク質を修復する等、さまざまな機能の複合的な要素によって達成される。本論文では、アフリカ・カラハリ砂漠に自生し、強い乾燥耐性を示す野生種スイカ *Citrullus lanatus* sp. を材料に、特に乾燥ストレス条件下での葉緑体の電子伝達系の光傷害防御メカニズムに着目して解析を行った。葉緑体の電子伝達系はすべての植物が共通して持ち、光合成反応によって、光エネルギーを化学エネルギーへと高い効率で変換する場であるが、同時に過剰光によって有害な活性酸素種の生成を招く、リスクの大きな場でもあり、その電子伝達制御機構を明らかにすることは植物のストレス防御機構を理解する上で重要である。これまで電子伝達制御機構の解明は、生化学的な解析が容易であるホウレンソウ等や、分子遺伝学的解析が容易なシロイヌナズナを中心に進められてきたが、それらは乾燥耐性を持たない種であるため乾燥条件下での電子伝達系の制御機構を調べるのは困難であった。しかし、乾燥耐性をもつ野生種スイカを用いることで CO₂ 固定反応が停止する乾燥条件下での電子伝達系の解析が可能となった。乾燥ストレスを模倣した、人工的な浸透圧ストレス、低 CO₂ 条件下での解析はされているが、実際の乾燥ストレスによる応答をタンパク質レベルで詳細に調べた例はこれまでない。本論文では、プロテオーム解析および個々のタンパク質の詳細なウエスタン解析により電子伝達系の中で、光化学系 II から光化学系 I への電子伝達を担い、同時に葉緑体のストロマからチラコイド膜内腔へのプロトン輸送を行う、シトクロム *b₆f* 複合体サブユニット Rieske の pI の異なる分子が、乾燥ストレス条件下で出現することを明らかにした。Rieske タンパク質は野生種スイカでは、一つの遺伝子にコードされること、また Rieske の総タンパク質量に変化がないこと、さらに短時間の強光照射によっても可逆的に出現することから、翻訳後のタンパク質修飾が起きている可能性が示された。また、生葉および単離チラコイド膜を使った電子伝達活性解析から、乾燥ストレス条件下ではシトクロム *b₆f* 複合体で、 Δ pH の形成に依存しない、電子伝達抑制が起こることが明らかとなった。これらの結果から、Rieske タンパク質の翻訳後修飾により、シトクロム *b₆f* 複合体で電子伝達が抑制されるモデルが提唱された。

以上のように、本論文は乾燥ストレス下での高等植物の電子伝達制御機構に新しい知見および見解を与えるもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。