

## 論文内容の要旨

申請者氏名 星安 紗希

葉緑体チラコイド膜の光合成タンパク質においては、過剰な光エネルギーによる傷害を回避するために、環境に応答してその構成因子の蓄積量が調節されているが、その分子機構については不明な点が多い。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  $\epsilon$  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(CF<sub>1</sub>)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。その結果、チラコイド膜のプロトン透過性が低下してルーメン内のプロトン濃度が上昇し、余剰な光エネルギーの熱散逸に貢献することが報告されていた。さらに、 $\epsilon$  をコードする遺伝子は 1 コピーであるのにも関わらず、分子質量がほぼ等しく等電点が異なる 2 分子種の  $\epsilon$  タンパク質が存在していることが見出されていた。そこで本研究では、2 分子種  $\epsilon$  の構造差を解明し、その構造要因が  $\epsilon$  の量的制御に及ぼす影響を明らかにすることで、 $\epsilon$  の量的制御とその生理学的意義について理解することを目的とした。

2 分子種  $\epsilon$  の構造の差異を解明するために、2 分子種  $\epsilon$  の分離精製の手法を確立した。そして、精製した  $\epsilon$  の全長を MALDI-TOF MS に供した結果、塩基性側  $\epsilon$  の分子質量は遺伝子配列から予想された理論値と一致するのに対して、酸性側  $\epsilon$  は理論値よりも約 42 Da 大きいことが判明した。さらに、トリプシン消化した  $\epsilon$  を LC/MS/MS に供した結果、酸性側  $\epsilon$  の 2-4 番目のアミノ酸に 42Da の翻訳後修飾が存在することが判明した。Delta Mass Database により、上記の特徴を有する翻訳後修飾の候補は N 末端に存在するアセチル基のみであることから、2 分子種  $\epsilon$  の構造差をもたらす翻訳後修飾は酸性側  $\epsilon$  の N 末端のアセチル化修飾であると結論した。次に、乾燥ストレス下における 2 分子種  $\epsilon$  の蓄積量の変化を解析した。その結果、アセチル化  $\epsilon$  の蓄積量はほとんど変化が見られないのに対し、非アセチル化  $\epsilon$  は乾燥ストレス下において著しく減少することが明らかになった。また、上記で観察された 2 分子種  $\epsilon$  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  $\epsilon$  の感受性試験を行った。その結果、アセチル化  $\epsilon$  よりも非アセチル化  $\epsilon$  が有意に速く分解することが確認された。さらに、定量的 RT-PCR 法により、ストレス下において、野生種スイカのいくつかのメタロアミノペプチダーゼの遺伝子発現量が有意に増大していた。

本研究の結果、生体内において  $\epsilon$  分子の一部は N 末端にアセチル化修飾を受けること、また 2 分子種  $\epsilon$  の量的バランスが外的環境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  $\epsilon$  はプロテアーゼ耐性を獲得し、この性質が  $\epsilon$  総蓄積量を決定する重要な要因であることが示唆された。また、初期のストレス応答では  $\epsilon$  が優先的に分解され、後期では CF<sub>1</sub> 複合体が分解されるという報告を合わせて考えると、 $\epsilon$  のアセチル化修飾と選択的分解が CF<sub>1</sub> の蓄積量を調節し、光エネルギー制御に関与する新規な分子機構の存在が示唆される。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 星安 紗希

申請者は、環境に応答した光合成エネルギー代謝の調節機構について、特に強光・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の解析を中心に研究遂行してきた。その過程で、野生種スイカ葉には等電点が異なる2種類の葉緑体 ATP 合成酵素  $\epsilon$  サブユニットが存在し、これら2分子種のうち塩基性側の  $\epsilon$  サブユニットの蓄積量が優先的にストレス下で減少することを見出した。また、2分子種  $\epsilon$  の分離精製の手法を確立し、野生種スイカ葉から分離精製した2分子種  $\epsilon$  を各種 MS 解析に供することで、2分子種  $\epsilon$  の構造差は酸性側  $\epsilon$  の N 末端に存在するアセチル化修飾であることを明らかにした。さらに、*in vitro* 実験系を用いたプロテアーゼ活性試験や遺伝子発現量の解析により、強光・乾燥ストレス下で見られる非アセチル化  $\epsilon$  (塩基性側  $\epsilon$ ) の優先的な減少にはメタロアミノペプチダーゼが関与していることを明らかにした。

これまでに、光化学系 II の D1 タンパク質や  $\text{CO}_2$  固定を担うルビスコ大サブユニットなど、いくつかの光合成タンパク質において、N 末端のアセチル化修飾が見出されていたが、その生理的意義についてはほとんど判明していなかった。申請者の本論文は、 $\epsilon$  サブユニットが N 末端アセチル化修飾されることにより、メタロアミノペプチダーゼに対して耐性を示す、すなわち、アセチル化修飾が  $\epsilon$  サブユニットの量的制御を担っていることを初めて示したもので、光合成タンパク質における N 末端のアセチル化修飾の生理的意義を理解する上で重要な知見を報告した。

また、初期のストレス応答では  $\epsilon$  が優先的に分解され脱共役が起き、後期では  $\text{CF}_1$  複合体が分解されるという過去の報告を合わせて考えると、 $\epsilon$  サブユニットのアセチル化修飾と選択的分解が  $\text{CF}_1$  の蓄積量を調節していることが示唆される。また、長期の乾燥ストレス下における  $\text{CF}_1$  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示唆される。本研究において、2分子種  $\epsilon$  サブユニットの存在は広く双子葉植物に見出されており、本研究の知見が双子葉植物の環境応答を含めた生理機能にかかわっていることも考えられ、今後の植物科学研究の進展に貢献すると期待される。

以上のように、本論文は、環境ストレス下における植物光合成エネルギー代謝を理解する上で基礎的知見を提供するもので、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。