

論文内容の要旨

申請者氏名 七里 吉彦

アフリカ南部のカラハリ砂漠に自生する野生種スイカ (*Citrullus lanatus* sp.) は強光・乾燥環境には適さないと考えられている。C₃型光合成代謝を営むが、強光や乾燥、高温といった厳しい環境に高度に適応している。このことは、野生種スイカに過剰な光エネルギーを安全に処理し得る優れた分子機構が備わっていることを示しているが、そのメカニズムの実体は不明であった。

野生種スイカの環境ストレス耐性を担う分子機構を解明する一環として、mRNA ディファレンシャルディスプレイ法を用いて、強光・乾燥ストレスにより葉組織において発現量が増加する遺伝子を探索した。その中にシトクロム *b₅₆₁* (*cyt b₅₆₁*) と相同性の高い遺伝子、CLb561A (*Citrullus lanatus* cytochrome *b₅₆₁*-A) が存在していた。*cyt b₅₆₁* は 6 回膜貫通型の 2 ヘム型電子伝達体で、膜の片方のアスコルビン酸 (Asc) の電子を、膜のもう片方に存在する 1 電子酸化型 Asc であるモノデヒドロ Asc (MDA) に伝達する機能を備えている。本研究は、野生種スイカ *cyt b₅₆₁* の、乾燥・強光環境下における葉組織での機能を解明することを目指した。

cDNA ライブラリーのスクリーニング及び degenerate PCR により、野生スイカより 2 種類の *cyt b₅₆₁* 遺伝子である CLb561A と CLb561B を単離した。双方のアイソザイムに特異的なペプチド抗体を用いた Western blot 解析の結果、CLb561A タンパク質は、強光下で生育させ、3 日間の乾燥ストレス処理を付与することによりのみ、葉において著しい蓄積が見られた。CLb561B タンパク質は葉では全く蓄積されなかった。強光・乾燥環境下の栽培種スイカの葉組織においては CLb561A は全く検出できず、CLb561A の誘導が野生種スイカに特有の分子応答であることが示された。

GFP 融合タンパク質の局在、細胞分画実験並びに免疫電子顕微鏡法により、CLb561A は細胞膜に局在していることが判明した。*cyt b₅₆₁* が介する電子伝達の方向は膜の両側の Asc の酸化還元電位の差に依存することから、ストレス環境下で CLb561A が蓄積することにより、細胞質から細胞外への電子伝達 (Trans-Plasma Membrane Electron Transport; TPMET) が促進されることが推測された。実際、野生種スイカの葉における TPMET を測定したところ、灌水時に比べて強光・乾燥ストレス下においてその量が顕著に増大していることが見出された。すなわち過剰光エネルギーが発生する条件下において、細胞外へのエネルギー伝達が促進されていることが示された。

CLb561A は細胞膜において細胞外面分で電子を伝達し、MDA から Asc への還元を触媒すると考えられる。この Asc を酸化するアスコルビン酸オキシダーゼ (AO) の酵素活性が、野生種スイカの葉組織において他植物に比べて 20 倍以上も高く、その大半は細胞外に存在することを見出した。これらの結果は、強光・乾燥ストレス下の野生種スイカの葉において CLb561A により細胞外に伝達された過剰な還元力が、高活性の AO により安全に処理されることを示唆する。

以上の結果から、この *cyt b₅₆₁*-AO 電子伝達経路は、葉緑体のリンゴ酸/オキサロ酢酸シャトルや細胞質の Asc-グルタチオンサイクル、細胞膜の MDA reductase と共役することで、葉緑体に吸収された過剰光エネルギーの一部を安全に散逸させ、野生種スイカの強光・乾燥ストレス耐性に貢献することを提唱した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 七里 吉彦

植物は自らの細胞構成成分を作り出すために、光合成によって光エネルギーを捕捉し大気中の CO₂ を有機物に変換する。しかし光エネルギーを過剰に吸収すると、細胞に深刻な傷害を及ぼす活性酸素の生成をもたらすために大変危険である。過剰な光エネルギーを処理するために、植物は様々な分子生理機構を進化の過程で獲得し発達させてきた。

本申請者の七里吉彦は、これまで植物において機能未知であった cyt *b*₅₆₁ について、乾燥・強光に耐性を持つ野生スイカを用いて研究し、その生理機能解明を目指して研究してきた。本論文はその結果をまとめたものである。

cyt *b*₅₆₁ は 6 回膜貫通型の 2 ヘム型電子伝達体で、膜の片方のアスコルビン酸 (Asc) の電子を、膜のもう片方に存在する 1 電子酸化型 Asc であるモノデヒドロ Asc (MDA) に伝達する機能を備えている。動物の cyt *b*₅₆₁ は、ホルモン合成器官の細胞内小器官であるクロム親和性顆粒の膜に局在し、ノルアドレナリン合成に必須の Asc を供給することが知られている。

野生種スイカの環境ストレスで発現している遺伝子を探索する目的で行われた mRNA ディファレンシャルディスプレイで cyt *b*₅₆₁ と相同性の高い遺伝子、CLb561A (*Citrullus lanatus* cytochrome *b*₅₆₁-A) の部分長がすでにクローニングされていた。この研究ではこの部分長をもとにこの全長 cDNA およびこのファミリーに属する CLb561B の全長を単離した。野生および栽培種スイカにおける発現解析から、CLb561A のみが乾燥・強光ストレスを施した野生スイカで機能していた。細胞膜分画、タバコでの cDNA 発現、免疫電子顕微鏡によって CLb561A は野生スイカ葉の細胞膜に局在することを見出した。野生スイカ葉の切片を用い、葉緑体から細胞外への電子伝達活性を測定した結果、CLb561A が誘導されている葉の切片でのみ強い電子伝達が観測された。この電子伝達は葉切片に高濃度の CO₂ を供給することで抑制されることから、葉緑体で使われない過剰光合成電子に由来していると考えられる。

一般に植物の細胞外にはある程度の Asc が存在することが知られている。従って野生スイカ葉では CLb561A は細胞外の MDA を還元していると考えられる。葉緑体の過剰電子が CLb561 によって MDA 還元によって Asc として捨てられるとすると、その部位には MDA を再生する Asc 酸化酵素 (AO) が存在しなくてはならない。この研究では、野生スイカの葉には他の植物葉の 20 倍以上の活性の AO が見出された。

これらの結果に基づき、野生スイカでは、乾燥・強光下で葉緑体に過剰電子が蓄積すると、その電子を CLb561A-AO 経路によって細胞外 Asc を介して水として無毒化するシステムの存在を提唱した。

以上のように、本論文は植物 cyt *b*₅₆₁ の生理機能を世界に先駆けて初めて明らかにしたもので、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。