

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

上妻 馨梨

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・形態形成学講座
(横田明穂教授)

2008年(平成20年)12月

本書は上妻馨梨の博士論文として書かれた
2008年12月

目次

ページ数

第1章 緒論

はじめに..... 8

1-1. 植物と強光ストレス

1-1-1. 強光ストレス

1-1-2. 強光ストレスと光合成

1-1-3. 野性種スイカ

1-2. 植物の強光ストレス応答

1-2-1. 植物の強光ストレスに対する形態的な適応

1-2-2. 光合成による光エネルギーの利用

1-2-3. 余剰光エネルギーの葉緑体外への輸送

1-2-4. 光化学系 II における余剰光エネルギーへの応答

1-2-5. 光化学系 I における余剰光エネルギーへの応答

1-2-6. チラコイド膜の電気化学ポテンシャルの調節

1-2-7. 光合成関連タンパク質のストレス応答

1-3. 研究の目的

第2章 野性種スイカの強光乾燥ストレス応答性タンパク質の同定とその生理学的解析

2-1. 序論..... 23

はじめに

2-1-1. 無傷葉を用いた生理学的解析

2-1-2. プロテオーム解析

2-1-3. 葉緑体 ATP 合成酵素

2-1-4. ϵ サブユニット

2-1-5. 膜の脱共役

2-1-6. 本章の研究目的

2-2. 材料と方法.....	29
2-2-1. 植物材料と栽培条件	
2-2-2. ガス交換測定	
2-2-3. PAM によるクロロフィル蛍光測定	
2-2-4. P700 の酸化レベルの測定	
2-2-5. クロロフィル定量	
2-2-6. SDS-PAGE に供するタンパク質の抽出と可溶化	
2-2-7. CF ₁ の精製	
2-2-8. NPQ 解消速度の測定	
2-2-9. 2D-PAM によるクロロフィル蛍光測定	
2-2-10. 大腸菌における組み換え ϵ サブユニットの発現と精製	
2-2-11. ウェスタンブロットティング	
2-2-12. 野性種スイカ葉緑体 ATP 合成酵素 ϵ サブユニット遺伝子の単離	
2-2-13. ノザンブロットティング	
2-2-14. チラコイド膜の単離	
2-2-15. ストレス付与チラコイド膜への組み換え ϵ サブユニット添加	
2-2-16. 単離チラコイド膜における非循環的電子伝達速度の測定	
2-2-17. 9-AA を用いた Δ pH の測定	
2-2-18. シングル・ターンオーバー・フラッシュを用いた ECS 解析	
2-2-19. 単離チラコイド膜を用いた ϵ サブユニットの分解条件の検討	
2-2-20. 組み換え体 ϵ サブユニットを用いた分解条件の検討	
2-3. 結果.....	37
2-3-1. 一日における野性種スイカの生理変化	
2-3-2. 強光乾燥ストレス下の野性種スイカの形態変化	
2-3-3. 強光乾燥ストレス下の野性種スイカの生理変化	
2-3-4. 低 CO ₂ 条件下における NPQ の挙動と解消速度	
2-3-5. ストレス前後における葉緑体 ATP 合成酵素のサブユニット構成の変化	
2-3-6. 強光乾燥ストレス下における ϵ サブユニット蓄積量の変化	
2-3-7. 野性種スイカ ϵ サブユニットのアミノ酸配列解析	
2-3-8. 強光乾燥ストレス下における ϵ サブユニット mRNA の挙動	
2-3-9. 単離チラコイド膜における非循環的電子伝達速度の測定と共役率	
2-3-10. 9-AA を用いたプロトン勾配の測定と蛍光回復速度	
2-3-11. プロトンのルーメンからストロマへの流れ	
2-3-12. ϵ サブユニット分解のメカニズムの探索	

2-4.考察.....	62
2-4-1. 野生種スイカの強光ストレスへの生理応答	
2-4-2. ATP 合成酵素の構造変化	
2-4-3. 葉緑体 ATP 合成酵素の構造変化から予想される機構	
2-4-4. チラコイド膜における電子伝達系とリン酸化系の脱共役	
2-4-5. 強光乾燥ストレス下で誘導されるチラコイド膜脱共役の生理的意義	
2-4-6. ϵ サブユニットが ATP 合成酵素から選択的に減少するメカニズム	

第3章 光合成プロトンフラックスの強光乾燥ストレスの長期応答とその生理機能

3-1.序論	
はじめに.....	68
3-1-1. 無傷葉を用いたカロテノイドの Electrochromic Shift 解析	
3-1-2. ATP 合成酵素が関与するプロトン透過性	
3-1-3. PSI cyclic の役割と生理的意義	
3-1-4. チラコイドルーメンにおけるプロトンフラックス	
3-1-5. 本研究の目的	
3-2.材料と方法.....	72
3-2-1. 植物材料と栽培条件	
3-2-2. 定常状態における ECS 解析	
3-2-3. タンパク質抽出法とウェスタンブロットティング	
3-2-4. リーフディスクへの薬剤浸透法	
3-2-5. シングル・ターンオーバー・フラッシュを用いた ECS 解析	
3-3.結果.....	75
3-3-1. 長期間の強光乾燥ストレスを付与した野生種スイカの表現型	
3-3-2. 長期型の強光乾燥ストレス下における qE の応答	
3-3-3. プロトン流量 (vH^+) から反映される PSI cyclic の測定	
3-3-4. ストレス下におけるプロトン透過性 (gH^+) の挙動	
3-3-5. ATP 合成酵素とシトクロム b_6/f は極度なストレス下で減少する	
3-3-6. 乾燥ストレス下においてプラストキノールは強く還元される	

3-4.考察.....	85
3-4-1. 野生種スイカの長期における強光ストレスへの生理応答	
3-4-2. チラコイド膜のプロトン勾配形成と qE の誘導	
3-4-3. ATP 合成酵素はその蓄積量を低下させることでストレスに適応する	
3-4-4. PSI cyclic は乾燥ストレス下において活性化される	
3-4-5. 長期に渡る強光乾燥ストレスへの光合成の生理応答	
第4章 結論.....	87
謝辞.....	90
参考文献.....	91
論文目録.....	104

第1章

緒論

はじめに

地球に存在する生命にとって太陽の光エネルギーは必要不可欠な因子である。特に、光エネルギーを直接利用することで光合成を行い生育する植物は地球上の生物の根底を支える重要な役割を持つ。しかし、植物はその体の一部である根を大地に張り、水分や養分を吸い上げ成長するため、移動することができない。地球は1回自転する1日の中に昼と夜を有し、地軸と太陽の振れの関係から季節をも有する。そのため、固定生活を行う植物は時々刻々と変化する天候のもと、常に何らかの環境ストレスに曝されている。本論文では環境ストレスの中でも太陽の光エネルギーと密接に関わる強光乾燥ストレス下において、植物がどのように応答しているのか、そのメカニズムを追う。その中でも、本研究では一週間以上という長期に渡るストレス条件下に注目し、植物の生理応答とその分子機構を明らかにする。

1-1. 植物と強光ストレス

1-1-2. 強光ストレス

植物に環境ストレスを与える要因としては、乾燥、強光、高温、低温、塩などが上げられる。その中でも、乾燥地は地球の陸地の約半分を占めることが知られている(UNEP, 1991)。植物は土壌中の含水量が低くなり水分を吸収できない場合や蒸散量が吸収量を上回る場合などにおいて、体内の水分量が低下すると考えられる。植物体の大部分は水が主要な構成成分であり、生体重の70~90%を占めているため、乾燥は植物にとって重要な問題である。植物細胞は、細胞壁の伸張と水の吸収とによって体積が不可逆的に増加し成長するため、水分量の低下は細胞に大きな浸透圧障害を与える。また、葉の水ポテンシャルが低下すると気孔の閉鎖が起り、葉内のCO₂濃度が減少する。このため、葉細胞の光合成活性が著しく低下する(平沢, 1999)。CO₂固定速度が減少すると、CO₂固定に利用されない光量子エネルギーが細胞内に蓄積する。植物は太陽から光エネルギーを利用して自ら糖を合成する光合成を行って生育している。植物の生体内においてCO₂固定速度低下などの障害が発生した場合でも、太陽からの

光エネルギーは常に植物へエネルギーを供給する。このようにエネルギー消費に対して、それを上回る光エネルギーが植物へ供給される状態を強光ストレスと呼ぶ。

一般に、強光ストレスとは光エネルギー供給と CO₂ 固定などの代謝系によるエネルギー消費のバランスが崩れることを意味する。そのため、乾燥下における CO₂ の取り込み抑制のみならず、高温による酵素の失活や低温による酵素の活性低下によるエネルギー消費減少においても、同様に強光ストレスは起こる。エネルギー過多になった植物細胞では、活性酸素の生成によるタンパク質の分解や遺伝子への傷害が予想される(Foyer et al., 1994)。これらを回避するために、植物はさまざまな回避機構や耐性機構を有している。

1-1-2. 強光ストレスと光合成

植物は太陽から光エネルギーを吸収することで光合成を行い、高エネルギー運搬体である ATP を合成し、生育に必須な糖を作り出す。しかし、許容量を超える光エネルギーに曝された時、植物はそれに対応しなくてはならない(Ort, 2001)。上述したように、植物は動物のように移動することができない。そのため、強光環境下に曝された植物は逃避という手段ではなく、適応することでストレスから身を守る。植物はその術を幾つか有している。特に水分が極端に少なくかつ強光が降り注ぐ砂漠地帯に生息する植物は、さまざまな生き延びる機構を獲得している。

その代表例として、サボテン類が挙げられる。乾燥地に生息するサボテンは水分保持のため葉の面積を最大限に抑えた形態を示す。サボテンは Crassulacean Acid Metabolism (CAM) 型の光合成代謝を行う植物である。光合成には大きく分類して 3 種類のメカニズムが存在し、CAM 植物は夜間に気孔を開けて二酸化炭素を取り込み、液胞内にリンゴ酸の形で貯蔵する。そして、蒸散が活発になる日中は気孔を閉じ自身の水分欠損を抑えつつ、リンゴ酸を葉緑体に運搬して光合成を行っている。サトウキビやトウモロコシなどの C₄ の光合成代謝を行う植物は、葉の形態的な構造をうまく利用して CO₂ を濃縮する機構を獲得し、高い光合成能力を有している。一方、高等植物の約 9 割を占める C₃ 植物は CAM 植物や C₄ 植物のように過酷な環境に適応した特別な機構を有していない。

そこで本研究には、余剰光ストレス条件下における光エネルギー代謝調節を解析するために、乾燥強光ストレスにおいて光傷害を受けにくく、水分保持能力にも優れ、実験の上で好適な植物である C₃ 植物の野性種スイカを用いた。

1-1-3. 野生種スイカ

野生種スイカ(*Citullus lanatus* L.)はウリ科・スイカ属に属する。また、アフリカ・ボツワナ共和国のカラハリ砂漠原産であり、強光による酸化、高温障害を引き起こす過酷な砂漠で生育している(Figure1-1)。野生種スイカは、一般に乾燥に弱いと考えられている C_3 型光合成代謝を営む(Miyake and Yokota, 2000)。

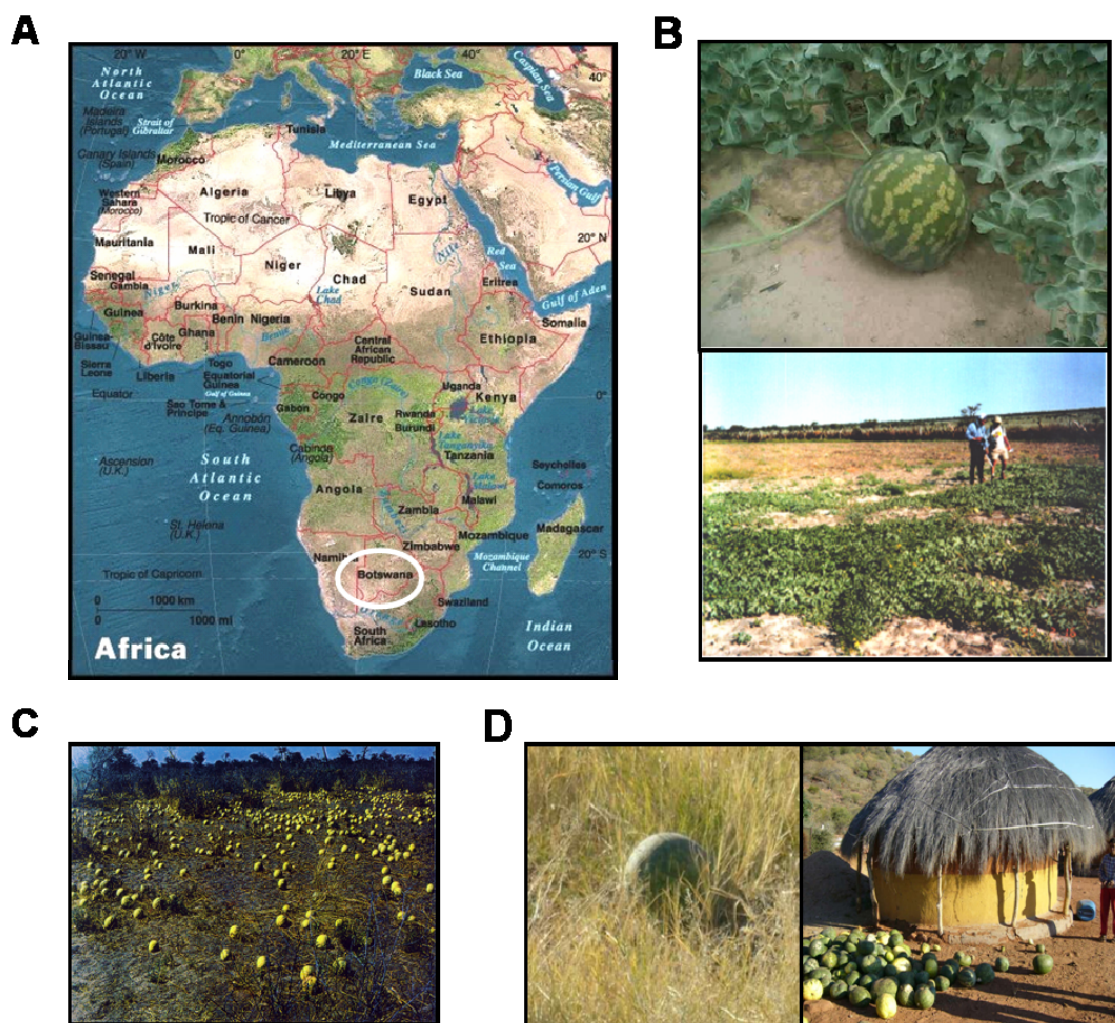


Figure 1-1. アフリカ・ボツワナ共和国・カラハリ砂漠に自生する野性種スイカ
A. アフリカ大陸。白円部分がカラハリ砂漠を有するボツワナ共和国を示す。ボツワナ共和国周辺の黄土色で示しているのがカラハリ砂漠。
B. 野性種スイカ。
C. カラハリ砂漠の雨季の野性種スイカ。
D. 乾季におけるカラハリ砂漠の野性種スイカ (吉田, 2005 より改変)。

しかし、その形態はウリ科の一般作物と変わらない。実験室レベルにおいて野生種スイカとキュウリおよびハツカダイコンの乾燥ストレスに対する経時的変化を観察したところ、野生種スイカは灌水停止後5日を経過しても、ほとんど黄化がみられず外観に変化が生じないという結果が得られている(Figure1-2)。また、野性種スイカと栽培種スイカの強光乾燥ストレス耐性能を比較した。その結果、野性種スイカは栽培種スイカよりも高い水分保持能力を持つことが観察されている(Figure1-3)。

当研究室では、これまでに野生種スイカに関するさまざまな知見が明らかになっている。その一つとして、適合溶質であるシトルリンの蓄積が上げられる(Yokota et al., 2002; Kawasaki et al., 2000)。このシトルリンはプロリンやマンニトール、グリシンベタインといった適合溶質のように活性酸素種除去能を持つことが明らかとなっており、その除去能は他の3つと比較して高いことが分かっている(Yokota et al., 2002)。また、乾燥時において栽培種スイカは細胞壁の折りたたみや原形質分離を起こし細胞膜の乱れが観察されたが、野生種スイカでは観察されなかった。さらに、野生種スイカは栽培種スイカと比較して、表皮細胞の細胞壁の厚さが1.2倍厚いことも明らかになっている。これらは、水分の蒸発を形態レベルで阻止するための手段であると考えられる(中村, 2000)。強光条件において葉緑体のチラコイド膜は過還元になるが、野性種スイカにはこの還元力を細胞外へ逃がすシステムが存在することが明らかになっている(Nanasato et al., 2005)。

しかし、過還元になるチラコイド膜自体の電気化学ポテンシャルがどのような生理応答を示すのかは観察されていない。本研究では、乾燥や強光によるストレスにおいて、もっとも傷害が発生しやすく、そのための防御機構が備わっていると考えられる葉緑体チラコイド膜に焦点を当てた。

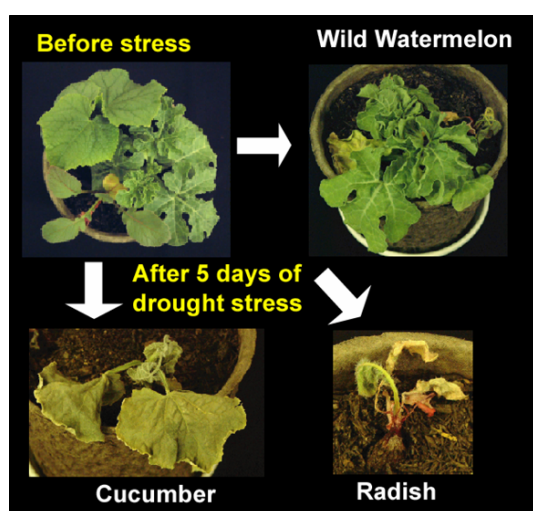


Figure 1-2. 野性種スイカの強光乾燥耐性

A. 野性種スイカ、キュウリそしてハツカダイコンの乾燥強光ストレスに伴う形態変化。生育条件は、明期16時間/暗期8時間、温度35/25℃、湿度50/60%、光強度1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ である。灌水停止により乾燥ストレスを5日間付与した(高原, 2006より改変)

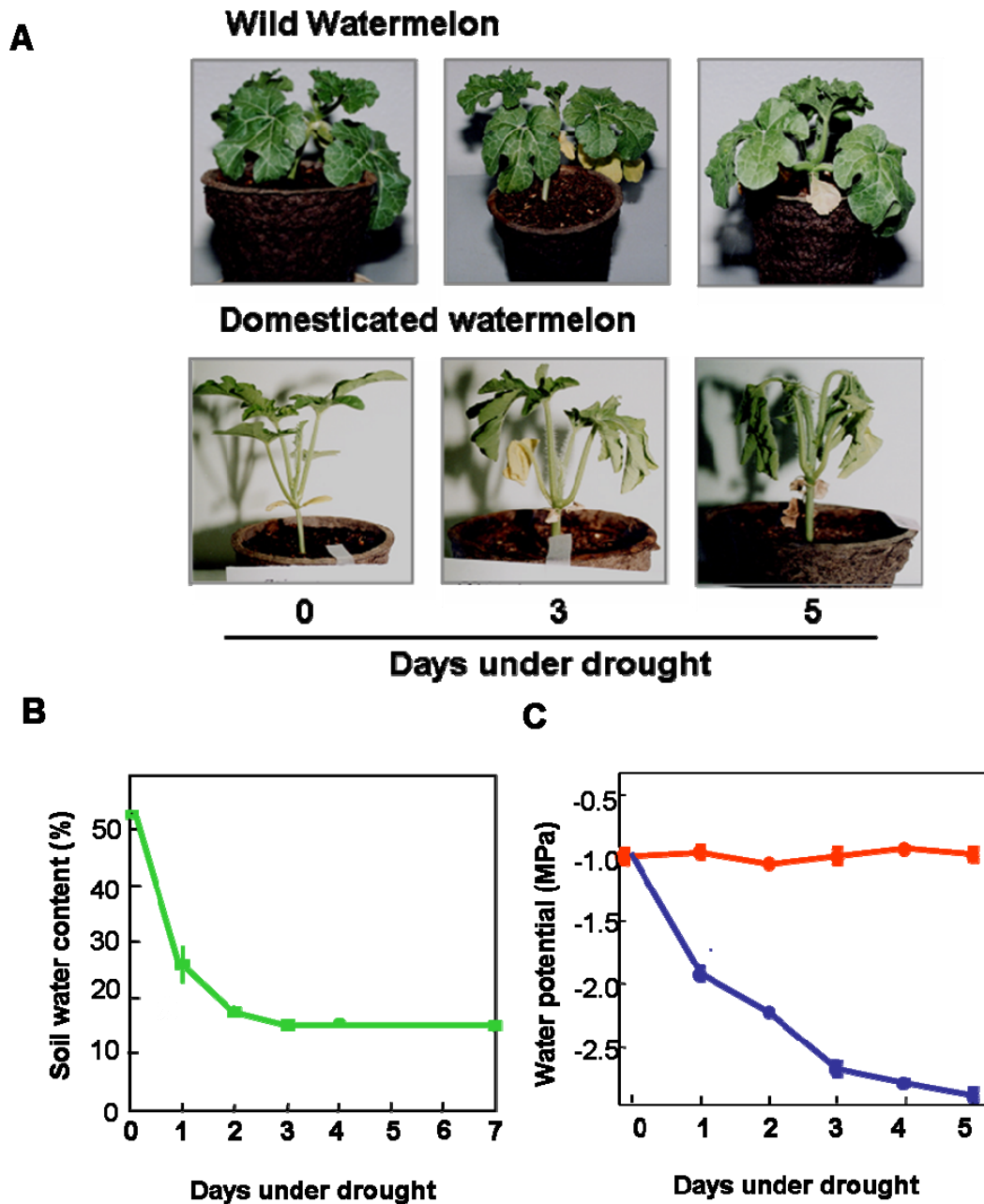


Figure 1-3. 野性種スイカと栽培種スイカの水分保持能

A.野性種スイカと栽培種スイカの乾燥強光ストレスに伴う形態変化。生育条件は、明期 16 時間/暗期 8 時間、温度 35/25℃、湿度 50/60 %、光強度 700 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ である。灌水停止により乾燥ストレスを付与した。

B. 乾燥強光に伴う野性種スイカと栽培種スイカの土壌水分量の変化。

C.乾燥強光に伴う野性種スイカと栽培種スイカの水ポテンシャルの変化。赤線は野性種スイカ、青線は栽培種スイカを示す。(中村, 2000 より改変)

1-2. 植物の強光ストレス応答

1-2-1. 植物の強光ストレスに対する形態的な適応

上述したように、多くの植物は強光ストレスに曝されている。一般的な植物は $200 \mu \text{ mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 以上の Photosynthetically active photon flux density (PPFD) では過剰光量子を吸収することになり(浅田, 1999)、 $500 \mu \text{ mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 以上の PPFD では光合成の CO_2 固定に使用されるエネルギーを上回り飽和状態となる。夏の晴天下では、 $2000 \mu \text{ mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の光量子が存在することからも考えて、植物はしばしば過剰光量子を吸収することが考えられる (Long and Humphries, 1994)。そのため、植物には過剰な光エネルギーを回避するための形態を示すものが多く存在する。

一般に、植物に降り注ぐ太陽光の約 2 割が葉面上で反射する(Figure1-4A)。もしくは、クロロフィルに吸収されず葉を透過する(Miyake et al., 2005)。酵素活性が低い低温環境下で生育する植物にはクチクラ層と呼ばれるワックス様の層が葉の表面を覆っているものがある(Figure1-4B-D)。クチクラは主に脂肪酸エステルの 3 次元ポリマーからなり、葉表面に厚さ 1mm ほどの層を形成している。このワックスは光を反射する役割を持ち、光エネルギーの過剰な吸収を抑制している。さらに、このクチクラ層は、葉水分の蒸散を抑制する働きもあり、乾燥地や海岸の植物でもよく発達している。また、葉面上における光の反射にはトライコームと呼ばれる毛状の器官が存在する。また、葉を内側に丸く折りたむことで光を回避する植物も存在する。さらに、強光環境下でアントシアニンが高蓄積することも知られている。アントシアニンは紫色の色素で、葉に蓄積することで過剰な光から細胞を守っていると考えられている。

1-2-2. 光合成による光エネルギーの利用

植物は葉緑体において光合成を行うことでエネルギーを生産し、生育している。光合成は、光エネルギーを化学エネルギーに変換する明反応(チラコイド膜で行われる)と、固定されたエネルギーを用いて有機化合物が合成される暗反応(ストロマで行われる)の 2 つの過程から成る(Blankenship and Hartman, 1998)。明反応が行われるチラコイド膜内には、光化学系 II、I、そして、両者を仲介するシトクロム *b₆f* 複合体が存在する(Albertsson, 2001)。まず、太陽からの光エネルギーは、光化学系の集光クロロフィルで集められ、光化学系 II の反応中心である P680 が励起される。その励起エネルギーを用いて電子が水から引き抜かれ、電子伝達系が駆動する(伊藤, 2002)。この電子はプラストキノール、シトクロム *b₆f* 複合体、プラストシアニンを経て、光化学系 II と同様に励起され酸化された光化学系 I の P700 に受け取られる。

光化学系Iのクロロフィルが吸収した光エネルギーにより励起したP700によって、電子はフェレドキシンに渡り、 NADP^+ を還元して NADPH となる。この NADPH は暗反応のカルビン回路を駆動させるエネルギーとなる。この一連の電子伝達系は非循環型電子伝達系という(Figure1-5)。

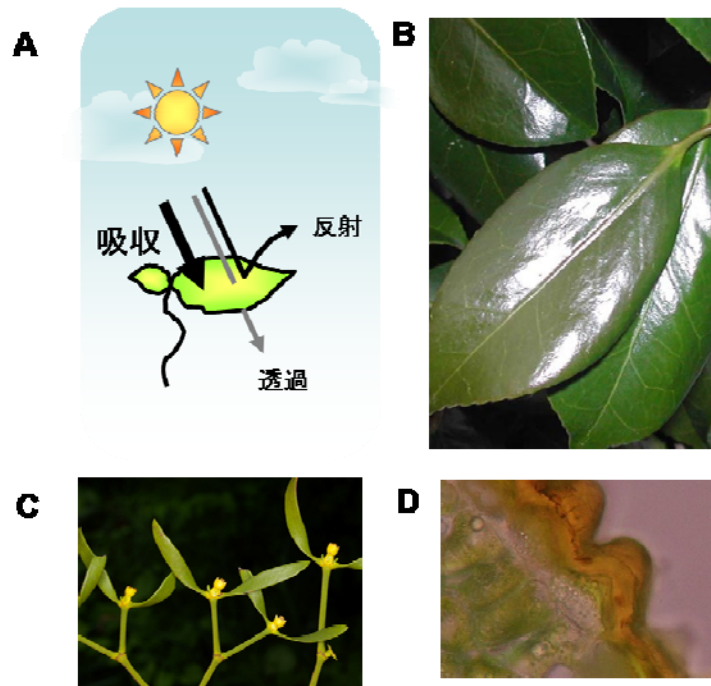


Figure 1-4 .植物における強光回避

- A.植物に降り注ぐ太陽光の一部は反射や透過のため、すべてクロロフィルに吸収されない。
- B.ツバキの葉は光をよく反射する。
- C.カタバミの葉。
- D.カタバミ葉の切片。表皮にはクチクラ層が発達している。

カルビン回路の駆動には ATP も必要であるが、この ATP の合成もチラコイド膜において行われる。葉緑体チラコイド膜における電子伝達の過程の中でストロマに存在しているプロトンはチラコイドルーメンに汲み入れられる。このようにして、チラコイド膜を介して形成されたプロトン勾配を利用して ATP は合成される。チラコイド膜での電子伝達には太陽の光エネルギーが必要であり、最終的にカルビン回路において 1 mol の CO_2 が固定されるのに必要な光量子は 8 mol である。当然、光エネルギーが少なければ光合成速度は低下する。しかし、

そのエネルギーが過剰な場合においても、植物は光合成に支障をきたす。クロロフィルに吸収された光エネルギーは大きく光合成に使用されるものと光合成に使用されないものの2種類に分けられる。植物にとって光合成に使われない余剰なエネルギーを如何に散逸させるかが大きな課題である。そこで植物は、チラコイド膜において吸収した余剰な光エネルギーをさまざまな機構で散逸させている。

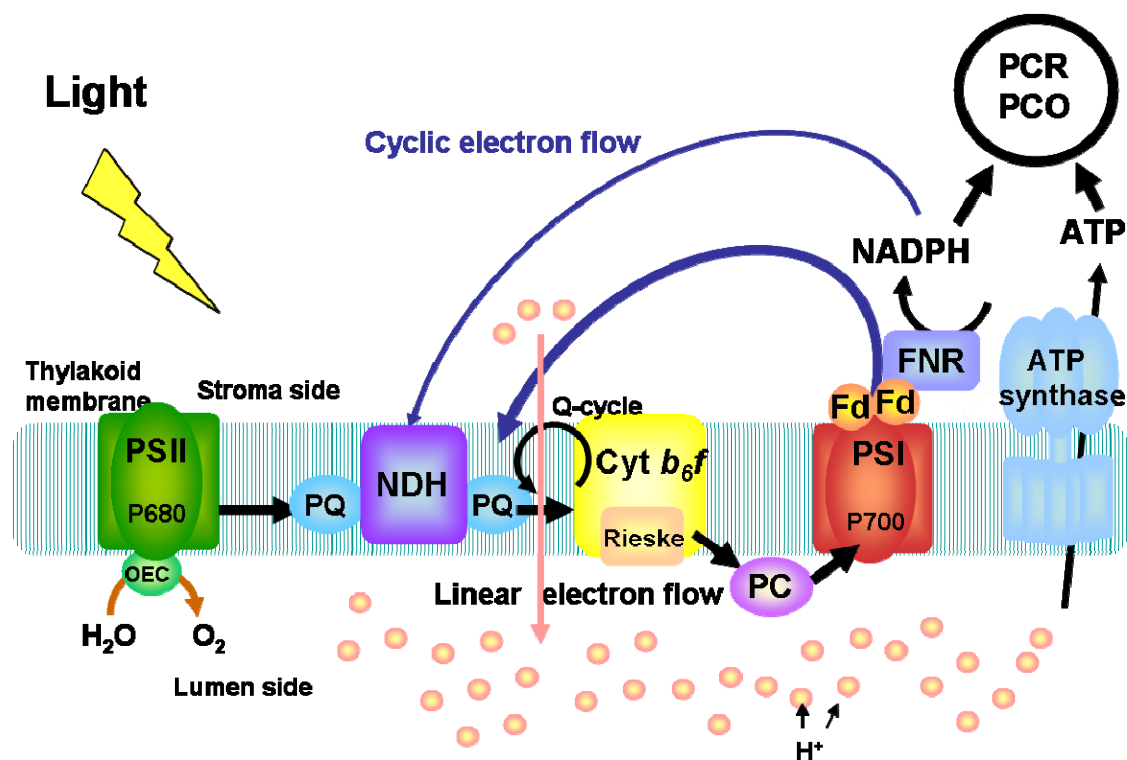


Figure 1-5. チラコイド膜における電子伝達

葉緑体チラコイド膜の光化学系 II (PSII)における P680 の励起によって発生した電子はプラストキノン(PQ)、シトクロム b_6/f 、光化学系 I (PSI)と伝達され NADPH を生成する。これを直鎖型電子伝達(Liner electron flow, LEF)という。一方、PSI まで伝達された電子が再び PQ へ戻される電子循環のことを循環的電子伝達 (Cyclic electron flow around PSI)、PSI cyclic と呼ぶ。PSI cyclic にはフェレドキシン (Fd)を介して PQ へ戻る経路とフェレドキシン-NADP⁺レダクターゼ (FNR) を介して NAD(P)H デヒドロゲナーゼ複合体 (NDH) 複合体へ戻る経路の2種類がある。さらに、電子伝達はプロトン(H⁺)をチラコイドルーメン内へ組み込みプロトン勾配を形成させる。このプロトン勾配(ΔpH)を利用して ATP 合成酵素(ATP synthase)は ATP を合成する。NADPH や ATP はカルビン回路(PCR cycle)や光呼吸経路(PCO cycle)を駆動するエネルギー源となる。

1-2-3. 余剰光エネルギーの葉緑体外への輸送

エネルギーを受け取るアンテナは葉緑体のチラコイド膜に存在するため、外部からの光エネルギーの大半はこの場で吸収される。余剰な光エネルギーはその場で除去するか安全に葉緑体外へ輸送される必要があり、植物は葉緑体外へエネルギーを輸送するいくつかの経路を持つ。代表的な機構に光呼吸(PCO cycle)がある(Tolbert, 1997; Houtz and Portis, 2003)。また、葉緑体のストロマが還元状態になるような条件下においてミトコンドリアのシアン耐性呼吸末端酸化酵素(AOX)が活性化し、還元力を熱として変換するという報告もある(Yoshida et al., 2007)。他にも、葉緑体内で過剰に合成された NADPH の還元力を Malate/OAA シャトルを用いて葉緑体外へ運び、ひいては細胞外へ輸送する機構も報告されている(Nanasato et al., 2005)。

1-2-4. 光化学系 II における余剰エネルギーへの応答

植物に降り注いだ光エネルギーは光合成を行うことで消費される。一方、光合成では完全に消費されないエネルギーを光合成以外の方法で消費することを nonphotochemical quenching (NPQ)と呼ぶ。NPQ の多くはチラコイド膜上で行われる。光化学系 II や光化学系 I はそれぞれの集光装置で光を直接受け取るため、余剰エネルギーによる損傷を受けやすい。そのため、それぞれに独自のエネルギー回避システムを持つ。光化学系 II における余剰エネルギー回避の代表的な機構は光阻害、ステート遷移、熱変換が知られている。

1、光阻害

光化学系 II の D1 タンパク質の分解があげられる (Aro et al., 1993)。光化学系 II は D1, D2 タンパク質を反応中心として、その周りを集光タンパク質が囲う形で存在する複合体である(Nelson and Yocum, 2006) (Figure1-7)。D1 タンパク質は光量子が過剰なときに活性酸素の発生に伴い、標的分子となり分解する (Figure1-7A)。この反応中心の一部の分解は過剰なエネルギーの流れを絶ちチラコイド膜電子伝達系の損傷を早い段階で保護する役割があると考えられている。D1 タンパク質の mRNA は非常に安定しており、半減期は 1 ~ 2 時間である (Zhang and Aro, 2002; Aro et al., 1994)。一方、光化学系 I が同様に活性酸素によって傷害を受けた場合、その回復には長い時間を要する(Sonoike and Terashima, 1994)。このことから光化学系 II 反応中心の分解は電子伝達系と併に光化学系 I を保護する機構といえる。

2、ステート遷移

光化学系 II は反応中心とそれを囲む集光タンパク質から構成されているが、

強光条件下において集光タンパク質の LhcII、PC26、PC36 などのアンテナタンパク質がリン酸化されることにより反応中心と解離し、反応中心へのエネルギー伝達を抑制する (Minagawa and Takahashi, 2004)。反応中心から解離した集光タンパク質は光化学系 I へ移動し、光化学系 I において働く。この集光タンパク質は脱リン酸化されると再び光化学系 II へ戻る (Figure1-7A)。この機構をステート遷移と呼ぶ (Allen, 1992)。この応答は数分程度で起こる比較的早い反応である (Bellafiore et al., 2005)。このステート遷移によって光化学系 II は余剰な光を受け取ることから回避されるため、下流の電子伝達系を過還元から防御することができる。

3、qE クエンチング

高等植物において NPQ の大部分を担っているのが、qE クエンチングと呼ばれる光エネルギーの熱変換システムである。qE クエンチングは主に 2 つの機構から成ると考えられている (Figure1-7)。弱光下と比較して強光下においては、チラコイド膜の電子伝達活性は高くなる。そのため、チラコイド膜を介したストロマとルーメン間で高いプロトン勾配が形成される。このような条件下において、光化学系 II 複合体のサブユニットであり、ルーメンに面して存在すると考えられている PsbS がプロトン化される (Li et al., 2000)。この構造変化によって、アンテナから反応中心への励起エネルギーの伝達の配向が乱され、うまく伝わらなくなる。この励起エネルギーは熱へと変換され放出されると考えられている。また、集光性クロロフィルタンパク質複合体(LHCII)に結合しているカロテノイド色素体の一種であるキサントフィルが熱散逸を行っている (Hieber et al., 2004)。キサントフィルはビオラキササンチン(Vx)、アンテラキササンチン(Ax)、ゼアキササンチン(Zx)の 3 つの色素からなる。プロトン勾配の形成によってルーメンの pH が 5 付近になると Vx がビオラキササンチン脱エポキシ化酵素(VDE)によってデポキシ化され Ax をへて Zx へ変化する (Figure1-7B)。Vx はアンテナとして吸収した光エネルギーをクロロフィルに渡すことができるが、Ax と Zx にはこの機能がない。そのため励起エネルギーを吸収し熱として放出する (Demmig, 1998)。光が消去され、プロトン勾配が解消されると Zx は再び Vx に戻る。これらの反応をキサントフィルサイクルと呼ぶ。これら PsbS の構造変化とキサントフィルサイクルの両者は共役しており、PsbS が構造変化できない変異体である *npq4-1* においてはキサントフィルサイクルが働かないことが報告されている。これら 2 つの反応は熱散逸として知られており、高等植物における余剰エネルギー散逸システムの大きな部分をしめる重要な働きを担っている (Sarvikas et al., 2006)。また、現在報告されている余剰エネルギー散逸機構の中では、数秒で起こるもっとも早い応答であると言われている。この系によって光化学系 II の量

子収率を半分にまで低下させることができる。そのため電子伝達系を過還元力による傷害から保護することができる。

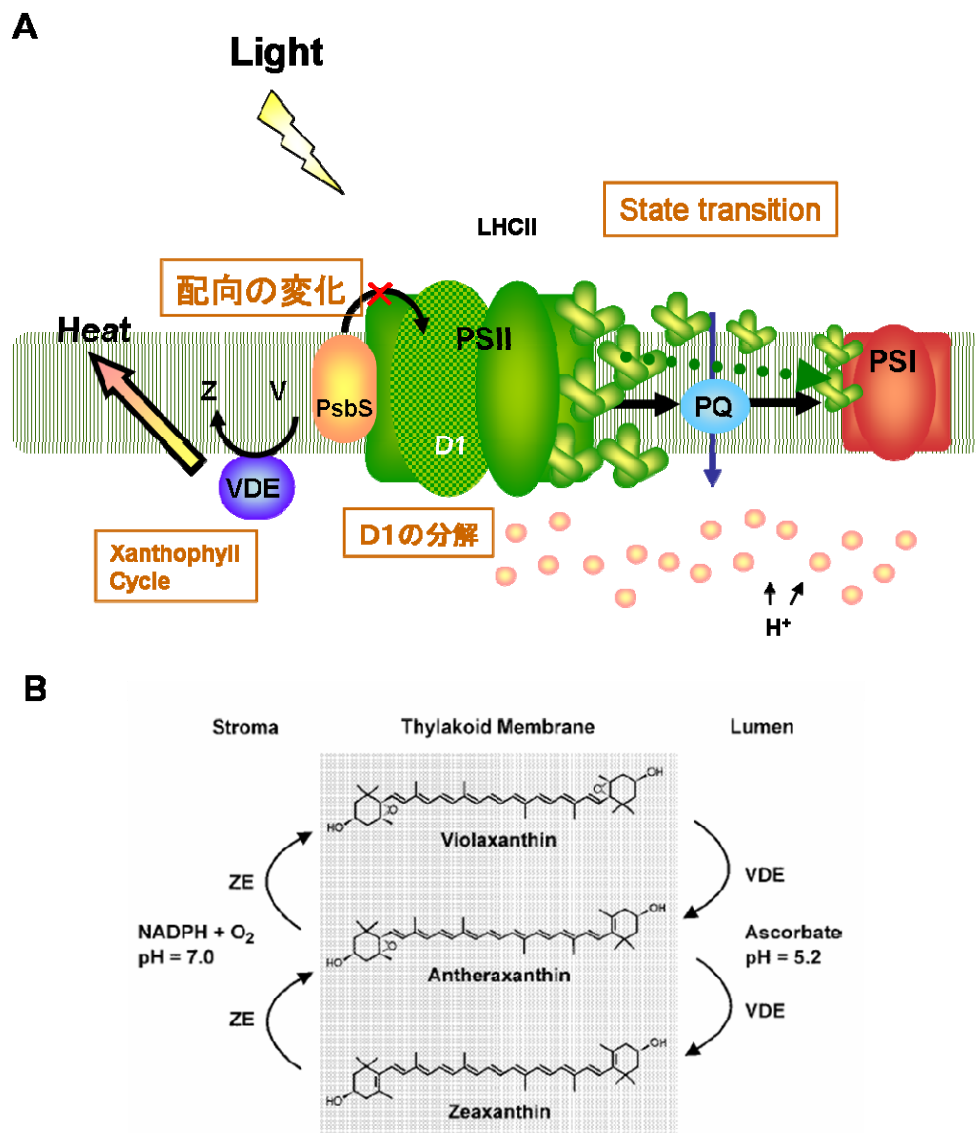


Figure 1-7. 光化学系 II における余剰光エネルギー散逸機構

A.光化学系 II で知られている余剰エネルギー散逸機構には、キサントフィルサイクル、PsbS のプロトン化による配向の変化、PSII アンテナタンパク質の PSI への移動、D1 タンパク質分解による光阻害がある。

B.キサントフィル色素の構造とそれぞれの構造変化に要する pH の値(Hieber et al., 2004)。

1-2-5. 光化学系 I における余剰エネルギーへの応答

光化学系 I も光化学系 II と同じように光エネルギーを直接受け取り、光化学系 II から伝達された電子のエネルギー準位を上げる役割を持つ。そのため光化学系 I においても独自のエネルギー散逸機構が存在する(Figure1-8)。

1、PSI cyclic

光化学系 I からの電子は NADP^+ に伝達され炭酸固定に使用される反応が主であるが、プラストキノンへ電子を戻す光化学系 I を中心にした循環型電子伝達系 (PSI cyclic) が存在する(Joliot and Joliot, 2006)。この PSI cyclic には 2 つの経路が存在する。一つは光化学系 I からフェレドキシン(Fd)が電子を受け取り、ferredoxin-plastoquinone reductase (FQR)を経てプラストキノンへ戻す経路である。しかし、この経路は FQR をはじめ、そこに関わる役者はほとんど明らかになっていない。PGR5 がこの経路に関与する因子であることが報告されている(Munekage et al., 2002)。もう一つは Fd から NADPH へ伝達され、NDH 複合体を経てプラストキノンへ戻す経路である。両者ともに光化学系 I から非循環型電子伝達へ電子を戻すことで光化学系 I において過剰な電子を蓄積しないようにしていると考えられている(Munekage et al., 2004)。しかし、この経路はプラストキノンを経ているため、プロトンのルーメンへの流入が起こる(Mitchell, 1976)。そのため、PSI cyclic の活性化は、ルーメンへのプロトン組み入れを促進させ、プロトン濃度増加に寄与する。また、環境ストレス下においては、しばしば CO_2 固定反応が低下するため ATP が消費されず、合成と消費のバランスが崩れることから、チラコイド膜の電気化学的ポテンシャルの間のバランスも崩れることが予想される。

2、光化学系 I における熱散逸

光化学系 I においても光化学系 II のような熱散逸系が存在する。光化学系 I は暗条件下では電子を有する還元状態として存在している。光照射によって光化学系 I 反応中心が励起され電子が光化学系 I から放出される。強光下においては電子が抜き取られ酸化状態になる。光化学系 I の P700 では、このような酸化状態になった際に、熱散逸が起こるという報告がある(Bukhov et al., 2002; Bukhov and Carpentier, 2003) (Figure1-8)。しかし、どのようなメカニズムで P700 が熱を発生させているのか、その詳細は明らかになっていない。

3、water-water cycle

チラコイド膜で発生した過剰な還元力をストロマへ運び、安全に処理する機構として、water-water cycle が知られている。非循環的電子伝達において最終的

に生成されるのは NADPH であることは先に述べた。しかし、NADPH が満足に消費されないような条件下においては光化学系 I からの還元力を受け取る NADP⁺ 量が低下することが考えられる。そのため光化学系 I からの電子は付近に存在する酸素へ渡りスーパーオキシドアニオン(O₂⁻)が生成する。O₂⁻はさらにスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)により過酸化水素(H₂O₂)になる。この H₂O₂ アスコルビン酸の働きで無毒な水へと循環する(Asada, 1999)。このサイクルは光化学系 II における電子伝達の初発段階で還元力が水から引き抜かれることで始まり、最終的に水へと戻ることから、water-water cycle と呼ばれる。この反応により余剰な還元力は安全に処理される。

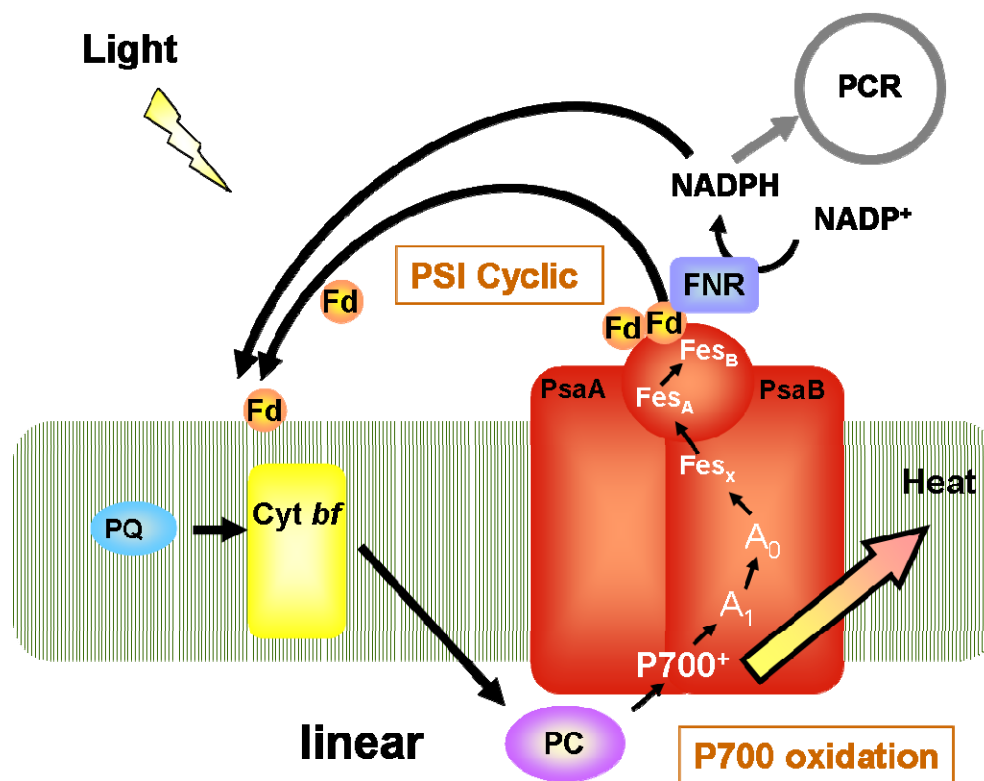


Figure 1-8. 光化学系 I における余剰光エネルギー散逸機構

光化学系 I で知られている余剰光エネルギー散逸機構には PSI cyclic, P700 酸化による熱散逸がある。

1-2-6. チラコイド膜の電気化学ポテンシャルの調節

これまで述べてきた余剰エネルギーの影響は電子伝達系の過還元の回避に関するものであった。過還元になると活性酸素が発生し、電子伝達系の構成分子を傷つける恐れがある。一方、余剰エネルギーによってもたらされる障害の一つにチラコイド膜ルーメンの酸性化が挙げられる。電子がプラストキノンからシトクロム *b₆f* 複合体へ伝達される過程に Q cycle が存在する。この Q cycle の反応の中でプロトンがストロマからルーメンへ組み込まれる(Cramer et al, 2004)。そのため、光化学系 II からの電子の流れによるプロトンの流入と、2つの PSI cyclic 由来のプロトン流入が考えられる。これまで述べてきた光化学系 II における電子伝達の抑制によって、強光条件下ではプロトンの流入も抑制されることが推測される。

チラコイド膜の主な機能は、カルビン回路を駆動するために必要な ATP や NADPH を生成することであると先に述べた。直鎖型の電子伝達系において NADPH が生成されるが、ATP はチラコイド膜内外に形成されたプロトン勾配を用いて ATP 合成酵素により生成される。チラコイド膜の電気化学ポテンシャルは、電子伝達系とそれに連動したプロトン勾配によって調節を受ける。PSI cyclic の活性化はプロトンの流入を促進し、高いプロトン勾配を導くと考えられる。強光ストレス下においては、電子伝達系とプロトン勾配のバランスが崩れることが考えられる。この問題を植物がどのように解決しているのかは、まだ明らかではなく、現在は大きく 2 つの論が展開されている。1つはルーメンからプロトンが漏れ出ているのではないか(Johnson, 2004)という論と、それに対して ATP の合成によるプロトンの消費がルーメンの pH を調節しているのではないか(Kramer et al., 2004)という論である。

1-2-7. 光合成関連タンパク質のストレス応答

これまで述べてきたように、吸収する光エネルギーと消費するエネルギーのバランスが崩れるような環境下は多く存在し、それらに応答する分子メカニズムも研究されている。このような環境下において、チラコイド膜で電子伝達を行うタンパク質がどのような挙動を示すかについてはいくつか知見がある。チラコイド膜で最も重要な巨大複合体である光化学系 II および光化学系 I は、環境変化によって光化学系 II / 光化学系 I の stoichiometry を大きく変化させることが知られている (Chow et al., 1990)。さらに、シトクロム *b₆f* 複合体の発現レベルは同じ個体でも葉によって異なることが報告されている(Schottler et al., 2007)。また、強光下で生育したオオムギ葉のプラストシアニン(PC)が低光環境下で生育されたものよりも 2-4 倍多いことが知られている(Burkey and Marthis, 1998)。このような PC 量の変化は LEF の速度を調節していると考えられてい

(Schottler et al., 2004)。また、強光や熱ストレス下で NDH 複合体の発現が上昇し、PSI cyclic 活性の増加を示唆する報告もある (Quiles, 2006; Streb et al., 2005)。

1-3. 研究の目的

植物は生息地の環境に適応して生きていかななくてはならない。一言に強光乾燥ストレスと言っても、その言葉の意味するところは広範囲に渡る。屋外に生育する植物は、しばしば十分な量の光量子を受け取ることが容易に想像できる。先に述べたように、植物は一瞬の強い光に対して、巧みに応答する術を持つ。本章で挙げた例のほとんどが、ストレスが発生してから数秒から数分、長くて 1-2 時間内に起こる応答である。強光ストレスという言葉の中には、さまざまな度合いの違い、時間的段階の違い、曝される植物個体の構造上の違いなどが含まれている。これまでの植物における強光応答の研究は、極初期段階におけるものが多かった。

では、光合成に利用できる光エネルギー量より多いエネルギーを長期間受け取った場合、植物はどのように、それらに応答するのだろうか？これまでの光合成の研究では、モデル植物として最も知られているシロイヌナズナを用いる例が多く報告されている。しかし、シロイヌナズナは低温を好む植物であるため強光乾燥ストレスに弱く、長期に渡るストレスへの応答メカニズムの解明はほとんどなされていなかった。長期ストレス下における応答メカニズムを解明することは、一年の中で一定期間の乾季に曝される作物の栽培や改良研究に大きな助けとなることが考えられる。

本研究では、野生種スイカの長期に渡るストレスへの耐性能を十分に活かして 3,4 日から一週間以上といった長期間のストレス処理を行った。そして、ストレス中期および後期における葉緑体のチラコイド膜がどのような生理応答をするのかを観察した。その上で特定の応答分子を同定し、どのようにストレスに応答しているのかを明らかにすることを目的として研究を行った。

第2章

強光乾燥ストレス下における野性種スイカの生理学的解析と

応答性タンパク質の同定

2-1. 序論

はじめに

前章でも述べたように、植物はさまざまな外的環境に順応するためのメカニズムを有する。第2章では、砂漠に生きる C₃ 植物である野性種スイカの環境応答メカニズムをタンパク質レベルで理解する。そのために、まず、無傷葉を用いて生理解析を行った。強光乾燥に曝された野性種スイカの生理解析を行うことで、光合成における CO₂ 固定速度などの大まかな挙動を観察した。次に、プロテオームの技術を用いることで、ストレスへの応答メカニズムに関わるタンパク質分子を探索した。本章では、ここで発見したストレス応答性タンパク質の挙動と、それによってもたらされる細胞内の変化を *in vitro* で詳細に解明することで、その生理的意義を考察する。

2-1-1. 無傷葉を用いた生理学的解析

1990年代前半にクロロフィル蛍光を測定することで光合成の効率を測定することが一般的になって以降、この解析方法は光合成研究になくてならないツールとなった。ここでいうクロロフィル蛍光とは光化学系 II に結合しているクロロフィル *a* から放出される蛍光のことである。非ストレス環境下において、葉緑体が吸収した光の多くは光合成を行うために消費される。このように光エネルギーが光化学反応によって消費されることを **photochemical quenching** という。しかし、光合成に必要な量以上の光エネルギーをクロロフィルが吸収したとき、クロロフィルは余剰なエネルギーを熱および光に変換して細胞外へ放出する。つまり、光合成消費に対して光エネルギーが高ければ高いほど、クロロフィルの蛍光は強く観察される。このように光エネルギーが光化学反応以外で消費、放出されることを **non-photochemical quenching (NPQ)** という。そのため、クロロフィル蛍光を測定することで光合成の効率を見積もることが可能である。実際の測定の際には、アクチニックライト照射下で、飽和光を短時間照射し光化学系を完全に **close** することで、**open** な状態と比較し、**photochemical quenching** を

見積もる。ここでいう **close** とは、光化学系を構成する各種分子が電子を十分に保有し、それ以上受け取れない状態を示す。**Open** とは、その逆の状態である。この測定法を用いることで、光、温度、水、CO₂ 濃度などの環境が変動した時、葉の細胞にある葉緑体が短時間にどのような対応をするかを調べることができる。

また、植物は光エネルギーを化学エネルギーに変換して CO₂ を固定し、有機物を生産する。その過程の中で二酸化炭素は消費され、酸素が産生されるが、この 2 種類のガスの濃度を測定することで光合成速度をモニターすることができる。あらゆる自然環境 (CO₂ 濃度、O₂ 濃度、光、湿度、温度) の組み合わせの下において、同時に蒸散を測定することで光合成に及ぼす環境要因の影響を解析することができる。

2-1-2. プロテオーム解析

プロテオームとはタンパク質の集合という意味を持ち、遺伝子の集合を意味する **genome** (gene+ome) から派生した造語である。そして、タンパク質の網羅的解析のことをプロテオーム解析、もしくはゲノミクスに対してプロテオミクスと呼ぶ。世界的なゲノムプロジェクトによって、ヒトをはじめとする多くの生物種においてゲノム配列の決定が進行している。現在、このゲノム配列の決定を背景に新規のタンパク質の同定、機能予測が可能となった。タンパク質の同定にあたっては、まず、2次元電気泳動によるタンパク質の分離を行う。2次元電気泳動はタンパク質を等電点と分子量の 2 つの性質で分離する。近年、質量分析機器 (MS) の大きな進歩によりプロテオミクスの技術も一段と飛躍している。植物においてもシロイヌナズナをはじめとする、さまざまな種で解析が行われている (Rossignol, 2001; Santoni et al., 1998; Schubert et al., 2003)。

このプロテオミクスの技術を用いて、野性スイカのチラコイド膜タンパク質のプロテオーム解析を行った (上妻, 2004)。その結果、強光乾燥ストレス下において葉緑体 ATP 合成酵素 ϵ サブユニットの蓄積量低下を確認した (Figure 2-1)。

2-1-3. 葉緑体 ATP 合成酵素

ATP 合成酵素とは、その名が示すように高エネルギー運搬体である ATP を合成する酵素である。各種の生体膜に存在し、膜内外に形成されるプロトン勾配を利用して、ADP と Pi から ATP を合成する (Ort and Oxbrough, 1992)。ATP 合成酵素は α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ サブユニットから構成される F₁ と、チラコイド膜に結合した I、II、III、IV-サブユニットから構成される F_o から成っている (Figure.2-2)。葉緑体 ATP 合成酵素の場合には葉緑体の意味を持つ C をつけて、CF₁、CF_o とあらわされる。CF₁ はチラコイド膜の表面に局在し、分子量は約 40 万、直径は

約 90 Å の球形である(Abrahams et al., 1994)。CFo は膜の内部に局在し、リング構造を取っているが、その詳細は明らかになっていない(Seelert et al., 2003)。CF₁ は α サブユニットと、触媒部位を持つ β サブユニットが 3 量体ずつの 6 量体で存在し、γ ユニットの中心で回転させることで、ATP、ADP への結合能力を変化させ、反応を行っている(Hisabori, 1999)。CFo はプロトンの輸送通路である。この ATP 合成酵素の働きは、γ サブユニットの回転が酸化還元によって制御されることで調節されており(Richter et al., 2005)、この機構のため、光合成が行われずチラコイド膜内腔にプロトン勾配が形成されない場合において ATP 合成の逆反応を抑制できる(Bald, 2001)。

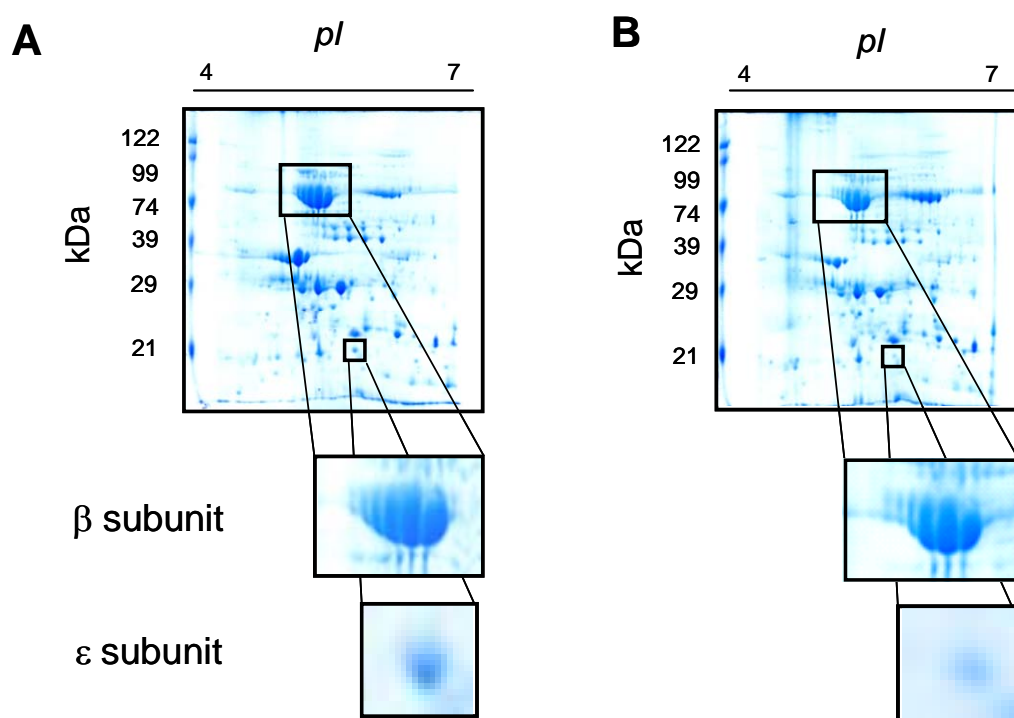


Figure 2-1. 非ストレス葉とストレス葉から抽出した膜タンパク質の 2 次元電気泳動像(上妻, 2004 より改変)。

A. 非ストレス葉から抽出した膜タンパク質の 2 次元電気泳動像。

B. ストレス 3 日目の葉から抽出した膜タンパク質の 2 次元電気泳動像。

ストレス葉の葉緑体 ATP 合成酵素 ε サブユニットのタンパク質蓄積量は大きく減少した。しかし、同じ複合体を形成する α、β サブユニットの蓄積量に大きな変化は見られなかった。

2-1-4. ϵ サブユニット

強光乾燥ストレス下に曝された野性種スイカにおいて、ATP合成酵素の ϵ サブユニットが選択的に減少するという報告をした(上妻, 2004)。ATP合成酵素 ϵ サブユニットは CF_1 と CF_o の間に存在している約14 kDaのタンパク質である。

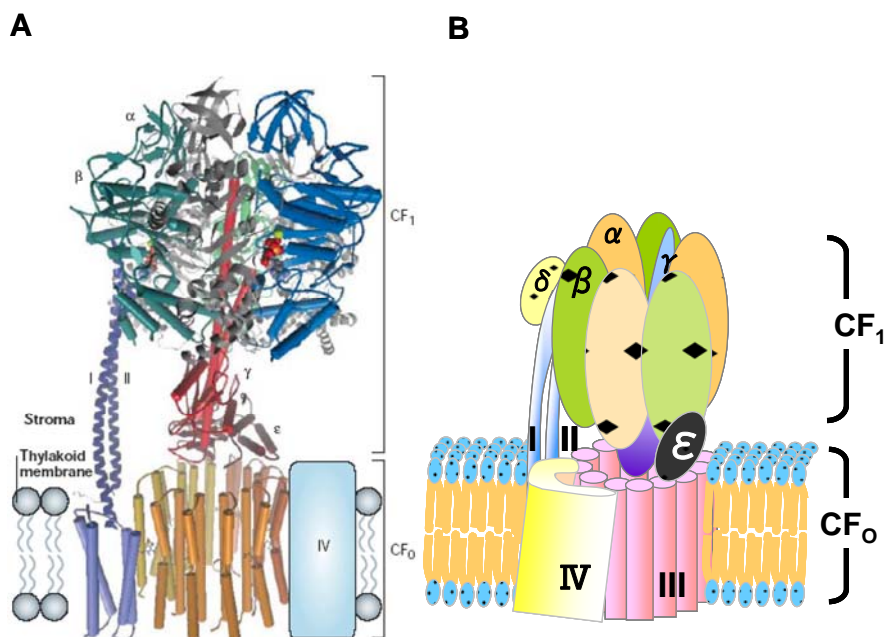


Figure 2-2. 葉緑体 ATP 合成酵素の構造

- A. 葉緑体 ATP 合成酵素の立体構造(Nelson and Ben-Shem, 2004 より改変)。
B. 葉緑体 ATP 合成酵素の模式図。葉緑体 ATP 合成酵素は CF_1 と CF_o の 2 つの複合体から形成されている。 CF_1 はチラコイド膜のストロマ側に表在しており、 CF_o は膜内に局在する。 CF_1 は α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ の 5 サブユニットからなり、 CF_o は I、II、III、IV から形成されている。

この ϵ サブユニットはATP合成の調節を行っており、 γ サブユニットと密接に関係している。上述したように γ サブユニットが回転することで CF_1 はATPを合成している(Cross, 2004)。この γ サブユニットの回転を調節しているのが ϵ サブユニットである。 ϵ サブユニットは γ サブユニットと結合しており、 γ サブユニットのジスルフィド結合が還元されると ϵ サブユニットが構造変化する(Schumann et al., 1985; Tsunoda, 2001)。光が照射されたチラコイド膜では γ サブユニットが分解されやすい(Moroney and McCarty, 1982)。 γ サブユニットの分解は ϵ

サブユニットの γ サブユニットからの分離を引き起こす。このため光照射下において精製した CF_1 には ϵ サブユニットが欠落する場合が多い。そして、この状況下においては ATP 加水分解の割合が高くなる。さらに、光照射後のチラコイド膜に ϵ サブユニットを添加すると ATPase 活性が抑制される(Richter, 1984)。これらの結果から、 ϵ サブユニットは CF_1 の ATP 合成逆反応である ATPase 活性の阻害タンパク質であることが示された。

このことから ϵ サブユニットは通常下の逆であるストロマからチラコイドルーメンへのプロトンの流入を抑制するタンパク質であることが示された(Patrie and McCarty, 1984)。このように ϵ サブユニットは ATP 合成を調節する働きを持ち、チラコイド膜の電子伝達とリン酸化系との共役においても重要な役割を持っている。野性種スイカにおいて、観察された ϵ サブユニットのストレス下における選択的減少はプロテオーム解析の中で発見された(Figure 2-1)。ストレスを3日与えた野生種スイカにおいて ϵ サブユニットは約 50%、その蓄積量は低下した。しかし、この解析の中で同時に同定された β サブユニットの減少は約 2 割に留まった (上妻, 2004)。

2-1-5. 膜の脱共役

生命は生きるためのエネルギーを ATP や NADPH のような高エネルギー運搬体の形で保持している。ATP 合成は主にミトコンドリアのクリステ膜で行われる。植物においてはミトコンドリアと共に、葉緑体のチラコイド膜において合成される。いずれの場合もプロトンを膜を介して移動させ、その電気化学的勾配によって ATP を合成する。しかし、ミトコンドリアには、ATP 合成酵素を介さないプロトン逆輸送システムが存在する。そのシステムに関与するのが、uncoupling protein (UCP)と呼ばれる 32 kDa の 6 回膜貫通型の膜タンパク質である(Vercesi et al., 2006; Krauss et al, 2005)。当初、UCP は動物の褐色脂肪細胞から同定されたが、その後 UCP (UCP1)と相同性のある UCP2 が全組織 (Fleury et al., 1997)で、UCP3 が骨格筋 (Vidal-Puig, 1997)で、UCP 4 が脳 (Mao,1999)で、それぞれ特異的に発現するのがわかっている。UCP のチャンネルは普通閉じているが、交感神経などの働きによって脂肪分解が起こると遊離した脂肪酸がチャンネルを開く。このように UCP は、プロトンをもう一度マトリックスに運び込むことにより電子伝達系で生じた膜電位形成のエネルギーポテンシャルを ATP 合成なしで熱エネルギーに変換させる役割をする。

UCP の存在は植物のミトコンドリアにおいても確認されている。1997年にジャガイモ(Laloi et al., 1997)で発見されて以来、シロイヌナズナ(Maia et al.,1998; Watanabe, 1999)、ザゼンソウ(Ito et al., 2003)、コムギ(Murayama and Handa, 2000)において、その遺伝子が単離されている。特にジャガイモとシロイヌナズナの

StUCP、AtPUMP の発現は低温環境下で誘導されることが明らかとなっている。このことから、植物 UCP の役割として、発熱を誘導することにより、低温ストレスによる障害を回避していることが考えられる。しかし、その詳細なメカニズムには不明な点も多い。

一方、葉緑体には、このような脱共役システムは確認されていない。そのため、光エネルギーと電子伝達によって形成されたプロトン勾配は ATP 合成のみでしか解消されないとされている。強光下において、高いプロトン勾配が形成され十分に ATP 合成が行われない場合、チラコイド膜は過度に酸性化され、膜の変性が起こり機能の消失が予想される。しかし、このような状況下において、チラコイド膜ルーメンの酸性化が解消されるとするならば、膜の失活は防がれ強光・乾燥下において生育が可能であると考えられる。

2-1-6. 本章の研究目的

前章でも述べたように、野生種のスイカは栽培種と比較して強光乾燥に対して優れた耐性を示す。そのため、野性種スイカを乾燥応答研究のモデル植物として用いることは、植物体内で繰る広げられる乾燥耐性機構の解明へのアプローチとして多に適していると思われる。しかし、これまで野生種スイカのストレスに対する生理応答は詳細に解析されていない。本研究では、野性種スイカという植物の光合成の強光乾燥ストレスへの生理・生化学応答と、その分子メカニズムを解明することを目指した。これらを解明することは、乾燥耐性植物や一般の C₃ 植物における強光乾燥ストレス耐性機構の解明に繋がることが期待される。

解析にあたり、まず野生種スイカが砂漠を模した環境の中でどのような光合成能力を有するのかを評価するためにクロロフィル蛍光解析などを用いて、*in vivo* での挙動を詳細に観察した。また、ストレスを与えたとき、再灌水を行ったときに、どのような生理応答を示すのかも解析した。次に、乾燥・強光下においてもっとも傷害が予想されるチラコイド膜に関わるタンパク質の挙動に注目した。以前に、生理応答に影響をおよぼす因子として ATP 合成酵素の存在が示唆されたことから(上妻, 2004)、本章では特に ATP 合成酵素に注目し、ストレス下における各サブユニットの蓄積量の変化を追跡した。さらに、 ϵ サブユニットが選択的に減少した際に起こりうると考えられるチラコイド膜の生理変化を、チラコイド膜を単離することで *in vitro* で詳細に解析した。これらの解析を行うところで、ストレス下におけるチラコイド膜の電気化学ポテンシャルの制御とチラコイド膜タンパク質の関係について考察することを目的とし、研究を行った。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 植物材料と栽培条件

アフリカ・ボツワナのカラハリ砂漠原産の野生種スイカ(*Citullus lanatus* sp. No101117-1) を用いた。500 ml サイズの紙ポットに園芸用の土(花と野菜の土., タケダ園芸, JAPAN)を入れ,種 1 個を播種した。これを明期(気温 35°C、湿度 45%、光強度 $700 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、16 時間)、暗期(気温 25°C、湿度 60%、8 時間)の人工気象器中で栽培した。毎日灌水し、第一葉展開後は 1000 倍希釈した液体肥料 HYPONex; N:P:K=6:10:5 (HYPONeX JAPAN CORP., Osaka, JAPAN)を与えた。なお、播種後約 2 週間目で完全展開した第 4 葉を実験に用いた(Figure2-3)。また、植物に乾燥ストレスを与える方法としては灌水停止による方法をとった。再灌水は灌水停止を 6 日間行った後 4 日間行った。



Figure 2-3. 野生スイカ

光強度 $700 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で約 14 日間生育し、播種後約 2 週間目で第 4 葉が完全展開した野生スイカ。

2-2-2. ガス交換測定

CO₂ 固定速度ならびに蒸散速度、気孔コンダクタンスは LI6400 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, U.S.A)で測定した。測定時の CO₂ 濃度を 350 ppm に設定し、変化した CO₂ の量と時間から CO₂ 固定速度を算出した。低 CO₂ 条件による測定では CO₂ 濃度を 50 ppm に設定した。

2-2-3. PAM によるクロロフィル蛍光測定

クロロフィル蛍光パラメータは LI6400 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, U.S.A)で測定した。測定光照射下(655 nm, 0.05-0.15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)の最小クロロフィル蛍光を F_0 と表す。光合成中の最大クロロフィル蛍光 (F_m')は、植物に飽和光 (800 ms, 3,000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を照射して測定した。さらに、測定後、暗馴化させ飽和光を照射することで最大クロロフィル蛍光 (F_m)を測定した。光合成中の定常状態でのクロロフィル蛍光 (F_s) は、actinic light (800 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 照射下で測定した。PSII の最大量子収率 (F_v/F_m) および光合成中の定常状態での量子収率 (Φ_{PSII}) はそれぞれ $(F_m - F_0) / F_m$, $(F_m - F_s) / F_m$ より算出した(Miyake et al., 2005)。また、NPQ は $(F_m - F_m') / F_m'$ より算出した。qE は $(F_m'' - F_m') / F_m'$ より算出した(Figure 2-4)。ETR (\doteq LEF) は $\text{light intensity} * \Phi_{\text{PSII}} * 0.5$ から算出した。

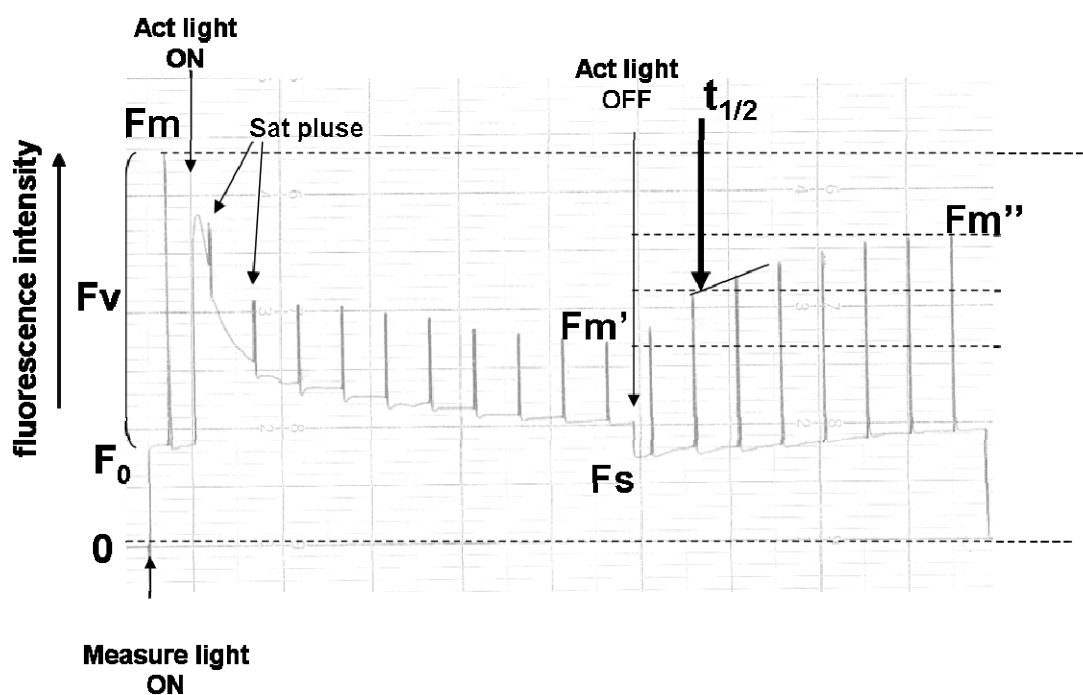


Figure 2-4. 野生種スイカのクロロフィル蛍光解析によって得られたトレースと各種パラメータ

F_0 、測定光を照射するとわずかに蛍光強度(Fluorescence Intensity)が増加する。 F_m 、飽和光照射によって、最大の蛍光強度を示した値。 F_v 、最大蛍光強度 (F_m) から F_0 を引いた値。 F_s 、アクチニックライトを照射したことによってベースアップした蛍光強度。 F_m' 、アクチニックライト処理下での飽和光照射 (Sat pluse) による蛍光強度。 F_m'' 、アクチニックライト(Act light)を消去 20 分後の飽和光照射による蛍光強度。 $t_{1/2}$ 、アクチニックライト消去後から F_m'' に達する値の半減期。

2-2-4. P700 の酸化レベルの測定

P700 の酸化レベルは 820 nm の吸光度変化を emitter-detector unit ED700DW (Walz PAM101) 付属の PAM chlorophyll fluorometer を用いて測定した。P700 の最大酸化レベル (ΔA_{max}) は PSI のみを励起させる FR (720nm, 0.66 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 照射下で xenon flash (50 ns, 1500 Ws^{-2}) を照射して測定した。光合成定常状態の P700 の酸化レベル (ΔA) は赤色光 (>650 nm, 700 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 照射下で測定した。

2-2-5. クロロフィル定量

クロロフィルは植物葉から 80%アセトンで抽出し、720nm, 663nm, 645nm の吸光度 (A_{720} , A_{663} , A_{645})から測定した(Porra, 1989)。アセトン溶液中のクロロフィルの濃度は次の式より算出した。クロロフィル($\mu\text{g Chl}$) = $8.02(A_{663}-A_{720}) + 10.02(A_{645}-A_{720})$ 。

2-2-6. SDS-PAGE に供するタンパク質の抽出と可溶化

-80°Cで保存した野性種スイカの第 4 葉の一部を乳鉢に入れ、液体窒素を適量加えた。その後、乳棒で葉を粉末になるまで破砕した。次に、葉 1 枚あたりに 1 ml の 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0, 2 mM MgCl_2 , 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF を加え乳棒で混ぜ合わせた。その後、マイクロチューブに移し氷上に置いた。5 μl 分をとりクロロフィル定量を行った。1 μg クロロフィル分を分注し、80%アセトンでタンパク質を沈殿させた。このタンパク質ペレットに 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, 10 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol and 1% BPB を加えて溶解させた。10 分間 80°C で煮沸した後、10000 $\times g$, 10 分間遠心し、その上清を SDS-PAGE に供した。

2-2-7. CF₁ の精製

チラコイド膜を単離し 25 μg クロロフィル / 100 μl に調整した。クロロホルムを 50 μl 加え、15 秒間穏やかに混ぜた。1000 $\times g$ で 1 分間遠心し、水層をとる。10000 $\times g$ で 5 分間遠心し、上清を回収した。上清をアセトン沈殿し、抽出したタンパク質 10-20%アクリルアミドのグラジエントゲルで SDS-PAGE を行った。ゲルはコロイダル CBB で染色した。

2-2-8. NPQ 解消速度の測定

NPQ の解消速度は低 CO_2 条件下において測定した。クロロフィル蛍光パラメータは PAM101 (Walz) を用いて測定した。作用光消去後の NPQ の値をモニターした。NPQ と qE が定常状態に達するまでの半減期を $t_{1/2}$ として示した。

2-2-9. 2D-PAM によるクロロフィル蛍光測定

2D-PAM によるクロロフィル蛍光は Open FluorCam 701MF (Photon Systems Instruments)で測定した。作用光は $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、飽和光は $4000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を用いて、室温、大気条件下で測定した。暗処理を行った植物体に 3 分間 actinic light を照射し、作用光消去後 0 分、1 分、2 分の NPQ の値を画像で取得した。

2-2-10. 大腸菌における組み換え ϵ サブユニットの発現と精製

野性種スイカ由来の ϵ サブユニット発現プラスミド DNA を作成し(Hisabori, 1997)、10% 2-mercaptoethanol 溶液 $3.5 \mu\text{l}$ にそれぞれ $1 \mu\text{l}$ 加えた。これらを $200 \mu\text{l}$ のコンピテントセル(大腸菌 BL21(DE3)を使用)の入ったマイクロチューブに加えて攪拌した。氷上で 30 分間放置した後、 40°C で 50 秒間のヒートショックを与えた。その後、氷上で 2 分間冷却し、SOC をそれぞれに $450 \mu\text{l}$ 加えた。アンピシリン耐性の LB プレート培地に植菌し 37°C で一晩培養した。増殖したコロニーをプレートからピックアップし前培養を行った。ampicillin ($50 \mu\text{g/ml}$)を添加した LB 液体培地 3 ml の入った試験管にプレートの大腸菌を植菌し 37°C で一晩振とうした。

次に、前培養液 $300 \mu\text{l}$ を新しい ampicillin 添加 LB 液体培地 2.7 ml に入れ、試験管を用いて 37°C で 1 時間、振とうした。OD が $0.4\sim 0.6$ になったのを確認し、 1 mM になるように IPTG を添加した。培養時間 0 時間、2 時間、4 時間(いずれも 37°C)でそれぞれ振とうした。それぞれを新しいマイクロチューブに $300 \mu\text{l}$ 移し、 5000 rpm 、1 分間遠心した。沈殿を $25 \mu\text{l}$ の PBST (137 mM NaCl , $8.1 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 8.1 mM KCl , $1.47 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, 0.5% TritonX-100)と $25 \mu\text{l}$ の SDS サンプルバッファーで可溶化した。SDS-PAGE でサンプルそれぞれの ϵ サブユニットの発現を確認した。

次に、 ϵ サブユニット発現プラスミドを導入した大腸菌を 1.6% Tryptone 1.0% yeast extract, 0.5% NaCl, ampicillin ($50 \mu\text{g/ml}$)の液体培地で前培養した。本培養は 2L の三角フラスコを用いて 500 ml の液体培地で 3 時間行った。OD が約 0.5 であることを確認し 1 mM IPTG を添加した。さらに、 37°C 、2 時間培養を行い、 $2000\times g$ で 10 分間、遠心した。上清を除去し約 5 ml の脱塩水でペレットを懸濁した。懸濁液を $2000\times g$ で 10 分間、遠心し、沈殿を 10 ml の 30 mM Tris-SO_4 , 30 mM NaCl を加えた。氷上に置き、超音波処理を間隔をとりながら 5 分間行った。 ϵ サブユニットは封入体として得られるため、その後、 $10000\times g$ 、5 分間遠心し、上清を除去した。その操作を上清にタンパク質が確認されなくなるまで続けた(タンパク質の有無は Bradford 溶液を用いて確認した)。さらに、沈殿となった封入体を 10 ml の 30 mM Tris-SO_4 , 30 mM NaCl , 1 M sucrose で洗浄した。次に、界面

活性剤を含む 30 mM Tris-SO₄, 30 mM NaCl, 1 M sucrose, 2 % TritonX-100, 10 mM EDTA, 10ml で沈殿を懸濁させ、4°Cで一晩反応させた。

その後、10000×g、5 分間遠心し、ε サブユニットが溶解した上清を DEAE-Toyopeal カラム(15 mm×100 mm, Tosoh)にアプライした。カラムは 8 M urea, 40 mM Tris-HCl, pH8.0, 0.8 mM EDTA で平衡化した。ε サブユニットはカラムに結合しないため、そのまま流出する。次に、pH が低下しないよう確認しながら、65%(w/v)になるように硫酸アンモニウムを加えた。白濁した溶液はマイクロチューブに分注し 4°Cで保管した。硫酸アンモニウムに懸濁したタンパク質溶液は 2000×g、10 分間、4°Cで遠心し、沈殿を回収した。4 M urea, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.25 mM EDTA-Na, に懸濁し後、3500MWCO の透析チューブ(Bio Design Inc) に入れ、50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.4 mM MgCl₂ とバッファー交換した。透析後のサンプルは 10,000×g で 10 分間、4°Cで遠心し、上清を濃縮した。1.2ml まで濃縮したサンプルは 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.4 mM MgCl₂ で置換した。

2-2-11. ウェスタンブロットティング

ブロットティング装置は日本エイドー社の平板型転写装置 NA-1512 型を使用した。SDS-PAGE および 2 次元電気泳動で展開した野性種スイカの膜タンパク質を PVDF membrane (BIO-RAD)に転写し、137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 8.1 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 5% Skimmilk, 0.1% Tween で 1 時間振とうした。次に、抗体を 137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 8.1 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 5% Skimmilk, 0.1% Tween で 2,500 倍希釈し、1 時間振とうし 1 次抗体反応を行った。次に、137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 8.1 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 5% Skimmilk 0.1% Tween でメンブレンを洗浄した後、2,500 倍に希釈した Anti-Rabbit IgG (FUNACOSI., JAPAN)で 2 次抗体反応を行った。その後、137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 8.1 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄ で洗浄し、ECL⁺(Amersham Pharmacia Biotech. Co., SWEDEN) で検出した。

2-2-12. 野性種スイカ葉緑体 ATP 合成酵素 ε サブユニット遺伝子の単離

野性種スイカの葉からゲノムを抽出し、既知 (キュウリ) のプラスチド DNA 配列において ATP 合成酵素 ε サブユニットの外側の配列をプライマーにして、必要箇所を増幅しシーケンスを行った。プライマーは以下の配列である。一つは *atpE* の上流である *atpB* の 5'-GAAGCTACTGCGAAGGCTACGAA-3'。一つは *atpE* の下流である *trnM* の 5' -CTTTCATACGGCGGGAGTCAT - 3' である。

2-2-13. ノザンプロットイング

Total RNA は野性種スイカの葉組織から TRIzol 試薬 (Invitrogen)を用いて抽出し、LiClにより多糖を除去し精製した。³²P 標識した 1 本鎖プローブは非対称 PCR により作成した (Sambrook and Russell, 2001)。*atpE* のプローブ作成には 5' – ATTCATTTCACTTGATTATTTAG – 3' のプライマーを用いた(Kappor et al., 1994)。ハイブリダイゼーションは常法に従って行った(Sambrook and Russell, 2001)。

2-2-14. チラコイド膜の単離

生葉の野性種スイカ第4葉を用いた。60 ml の 50 mM Tricine-KOH, pH7.5, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM chloramphenicol をミキサーに入れ、3 秒破碎し、1 秒間隔を置いて同様の操作を 2 回行った。破碎液は 4 重のガーゼとミラクロスでろ過した。ろ過後の溶液は 10000×g、1 分間で遠心して、上清を除去した。沈殿は 10 ml の 50 mM Tricine-KOH, pH 7.5, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM chloramphenicol で筆を用いて丁寧に懸濁した。さらにバッファーを加え、40 ml にし、1000×g で 1 分間、遠心を行って、沈殿した糖を除去した。糖を除去した上清は 10000×g で 1 分間、遠心し、沈殿は適量の 50 mM Tricine-KOH, pH7.5, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM chloramphenicol, 0.3 M sorbitol, 0.1% BSA に懸濁した。単離したチラコイド膜は遮光して氷上で保管し、2 時間以内に使用した。

2-2-15. ストレス付与チラコイド膜への組み換え ε サブユニット添加

単離チラコイド膜溶液へ野性種スイカ由来の組み換えの ε サブユニットを ATP 合成酵素存在量の約 10 倍量を添加し、遮光したチャンバー中で攪拌しながら 25°C で 3 分間インキュベートした(Zhang-Lin et al, 2005)。

2-2-16. 単離チラコイド膜における非循環的電子伝達速度の測定

単離チラコイド膜の機能評価には HANSATEC 社の酸素電極を使用した。長時間放置したサンプルは失活する恐れがあるため、氷上に保存した単離チラコイド膜溶液は出来るだけ素早く使用した。酸素電極のチャンバーに 50 mM potassium phosphate buffer, pH7.5, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.4 M sucrose, 10 μM KCN, 50 μM MV と適量の単離チラコイド膜溶液を加え、300 μmol photons m⁻² s⁻¹ の赤色光を照射した。メチルビオローゲン(MV) は電子受容体であるため電子伝達が行われると光化学系 I から電子を奪い酸素電子に渡す。電子と反応した酸素分子はスーパーオキシドとなり、系の酸素濃度は低下する。2-3 分間反応させた後、脱共役剤である 200 mM NH₄Cl を酸素の混入を防ぐためシリンジでチャンバーに注入した。

2-2-17. 9-AA を用いた Δ pH の測定

石英セルに測定バッファー (50 mM Tricine-KOH, pH7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM MV, 25 μ M 9-aminoacridine (9-AA)) を入れた。任意のチラコイドを加え、攪拌して 500 μ mol photons m⁻² s⁻¹ の測定光を照射し、蛍光の減少を測定した。値は Δ pH = $\log(q / (1-q)) + \log(V_0/V_i)$ の式を用いて算出した(Evron, and MaCarty, 2000b; Kalituho et al., 2006)、 q は光で誘導された 9-AA のクエンチングをあらわし、 V_0 はチラコイドルーメン外の体積、 V_i は チラコイドルーメンの体積をあらわす。サンプルはクロロフィル量で定量した。クロロフィル量あたりのチラコイドルーメンの体積は同等であると考えられる。そのため、 $\log(V_0/V_i)$ は定数であると考えられるため $q / (1-q)$ の値のみを使用し、その結果は割合で示した(Evron, and MaCarty, 2000b; Kalituho et al., 2006)。

2-2-18. シングル・ターンオーバー・フラッシュを用いた Electrochromic shift (ECS) 解析

他の代謝系を活性化せず、チラコイド膜のみの *pmf* の挙動を観察するために、無傷葉もしくは、薬剤を取り込ませたリーフディスクを用いて Flash induce relaxation kinetics (FIRK) 解析を行った。FIRK は nonfocusing optics spectrophotometer を用いて測定した。それぞれの植物サンプルは測定の前 1 時間前に温度 35°C、湿度 40% の薄暗い測定室で暗処理を行った。その後、測定器にセットし、~10 μ 秒間キセノンフラッシュを照射した(Takizawa et al., 2007b; Sacksteder et al., 2001)。暗処理を行ったコントロール植物では各酵素類の完全酸化により *pmf* は検出されない。さらに、飽和光強度のフラッシュを与えることで、個々の植物体が持つ光化学系 I と光化学系 II の電荷分離による ECS 強度の最大値を測定した(Kramer and Crofts, 1989)。第 3 章に詳しく述べるが、この値は定常状態における ECS 強度の絶対値を補正するために使用した。

2-2-19. 単離チラコイド膜を用いた ϵ サブユニットの分解条件の検討

ϵ サブユニットは高温で ATP 合成酵素から解離すること、DTT 添加による還元剤処理をすることで、共役機構を失うことが知られている。これらの背景から、温度感受実験と還元力感受実験の 2 種類を行った。

両者とも野性種スイカの葉からチラコイド膜を単離し、20 μ g chl ml⁻¹ になるように調製した。温度依存性実験においては、ヒートブロックを用い、4, 35, 42, 60°C の 4 種類の温度条件下でチラコイド膜溶液を 5, 15, 30 分間インキュベートした。1 μ g chl 分をとり、10000 \times g で 5 分間遠心し、チラコイド膜画分とその上清に分離した。両者を SDS-PAGE に供し、ウェスタンブロットで ϵ サブユニットの量を確認した。

還元力依存性実験においても、同様に単離チラコイド膜を $20 \mu\text{g chl ml}^{-1}$ になるように調製し、そのサンプルに 15 mM DTT , $50 \mu\text{M MV}$ を加えて $0, 15, 30, 60$ 分間攪拌しながら反応させた。 $500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の光照射したものとそうでないものの 2 種類の実験を行った。その後、 $1 \mu\text{g}$ クロロフィル分をとり、 $10000\times\text{g}$ で 5 分間遠心し、チラコイド膜画分とその上清に分離した。両者を SDS-PAGE に供し、ウェスタンブロットで ϵ サブユニットの量を確認した。両実験とも、同サブユニットを構成する α 、 β サブユニットの挙動は SDS-PAGE 後、CBB 染色を行うことで検出した。

2-2-20. 組み換え体 ϵ サブユニットを用いた分解条件の検討

非ストレス葉およびストレス 6 日目の葉に $0.1 \text{ M potassium phosphate buffer, pH } 7.0$, 2 mM MgCl_2 , 10 mM NaCl , 1 mM EDTA , $10 \text{ mM 2-mercaptoethanol}$, 1 mM PMSF を加え乳棒で混ぜ合わせた。このようにして調整した可溶性画分を組み換え ϵ サブユニットに添加して暗条件下のもと 37°C で $5, 10, 30$ 分間静置した。アセトンを加えることで反応をストップさせた。 ϵ サブユニットを抗体反応で検出した。その際の可溶性画分の挙動を Rubisco の挙動を見ることで ϵ サブユニットの挙動と比較した。

2-3. 結果

2-3-1. 一日における野生種スイカの生理変化

自然界の植物は日の出から日の入りといった太陽の動きや、天気、温度、湿度などによってその光合成活動が変化する。本実験において、野生種スイカは閉鎖系の人工気象機を用いて栽培した。毎日、同じ時間にライトが点灯し、光、温度、湿度環境が一定である中、植物の光合成がどのように変化するのか、もしくは変化しないのかをガス交換測定を行うことで検証した。野生種スイカは播種後 14 日で第 4 葉を展開した(Figure 2-3)。700 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強光条件下で生育させ、一日一回約 200 ml の液体肥料を与えた。

実験には乾燥ストレスを付与する前の植物体を用い、一日一回朝 10 時に水遣りを行った(Figure 2-5)。朝、一日一回の水遣りを行うと土壌の水分量は徐々に低下する(Figure 2-5F)。そこで、土壌の水分量の変化による光合成への影響を抑えるために、コントロールには 2 時間おきに 200 ml 液体肥料を供し、土壌水分を一定に保った植物体をおいた。この 2 種類の個体の CO_2 固定速度、蒸散速度、気孔コンダクタンス、PSII の量子収率、葉面温度、土壌および植物体の総量を、液体肥料を供する前の朝 10 時に測定し、その後 3 時間ごとにそれぞれを測定した(Figure 2-5)。 CO_2 固定速度はコントロール植物体と通常生育植物体の両者とも午前 11 時には約 15 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を示し、17 時には約 25 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と 1.7 倍の増加が見られた。通常生育植物体とコントロール植物体でその挙動に大きな差異は見られなかった(Figure 2-5A)。蒸散速度の挙動も CO_2 固定速度と似ており、17 時に約 8 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の最大値を示した。この値は、数値が最も低い値を示す光点灯直後と光消灯直後の値の約 2.7 倍である(Figure 2-5B)。気孔コンダクタンスも同様に 17 時に最大値を示した(Figure 2-5C)。本実験で使用した人工気象機は 9 時に点灯し、23 時に消灯する設定になっている。光合成系が最大活性を示すのはいずれも南中時間にあたる 16 時ごろであることが観察された。これらの結果から、植物体は日が昇ってから光合成能を徐々に活性化させ、南中時間を境に、それらを低下させていくことが分かった。さらに、通常生育植物体とコントロール植物体に光合成関連パラメータの大きな差がないことから、土壌水分量が約 5-15% の低下は光合成能には大きく影響しないことが示唆された(Figure 2-5F)。

次に PSII の量子収率を測定した。光合成能が大きく増加する南中時間においても大きな変化は認められなかった(Figure 2-5D)。葉面温度は蒸散速度が活発になるに従って低下した(Figure 2-5F)。これらの結果から、野生種スイカの光合成は一日のサイクルの中で大きく変化し、南中時間にそれが最大になること

が明らかになった。この結果を受け、本研究において野性種スイカの葉のサンプリングおよび生理実験はすべて16時前後に行った。

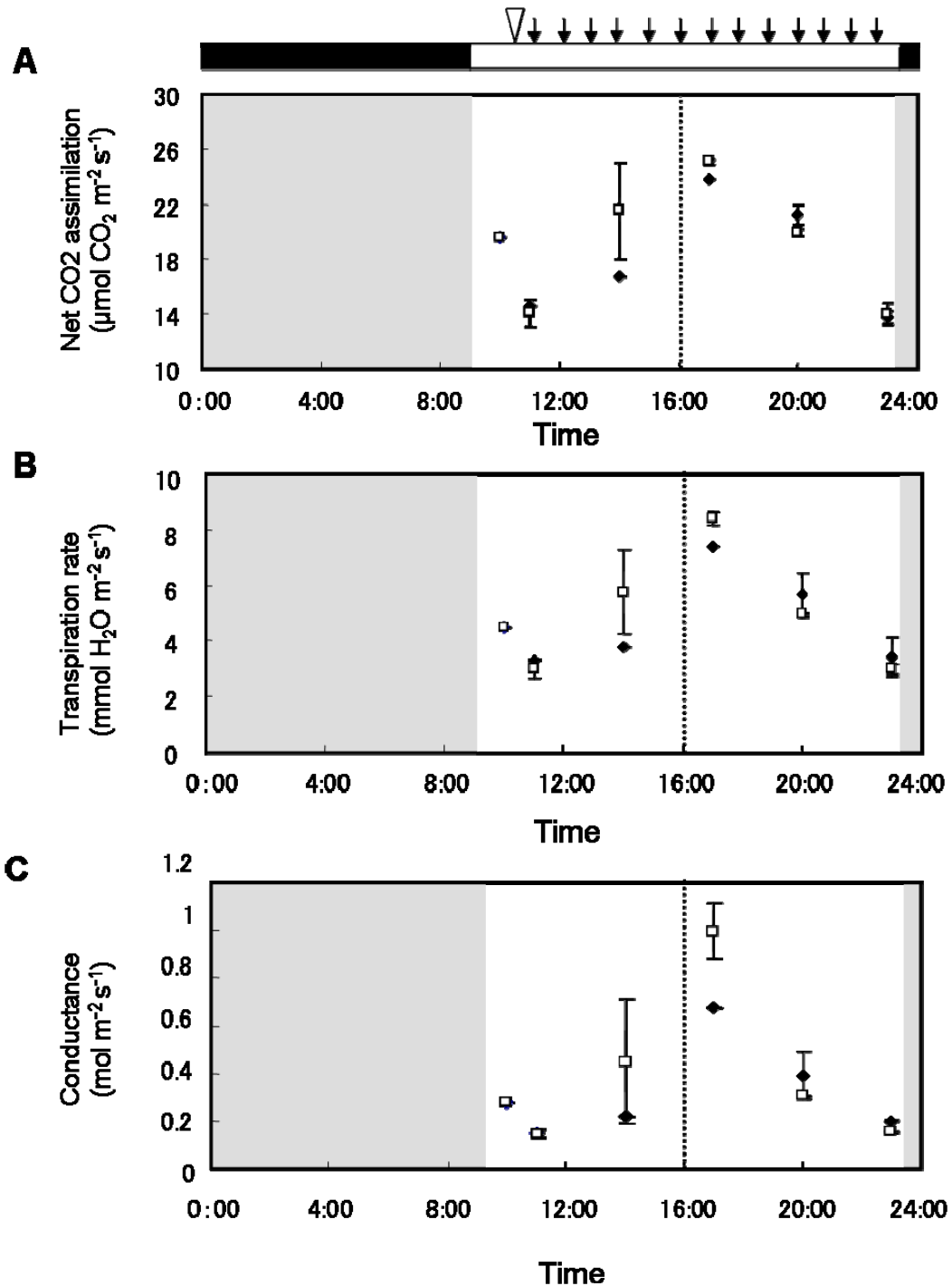
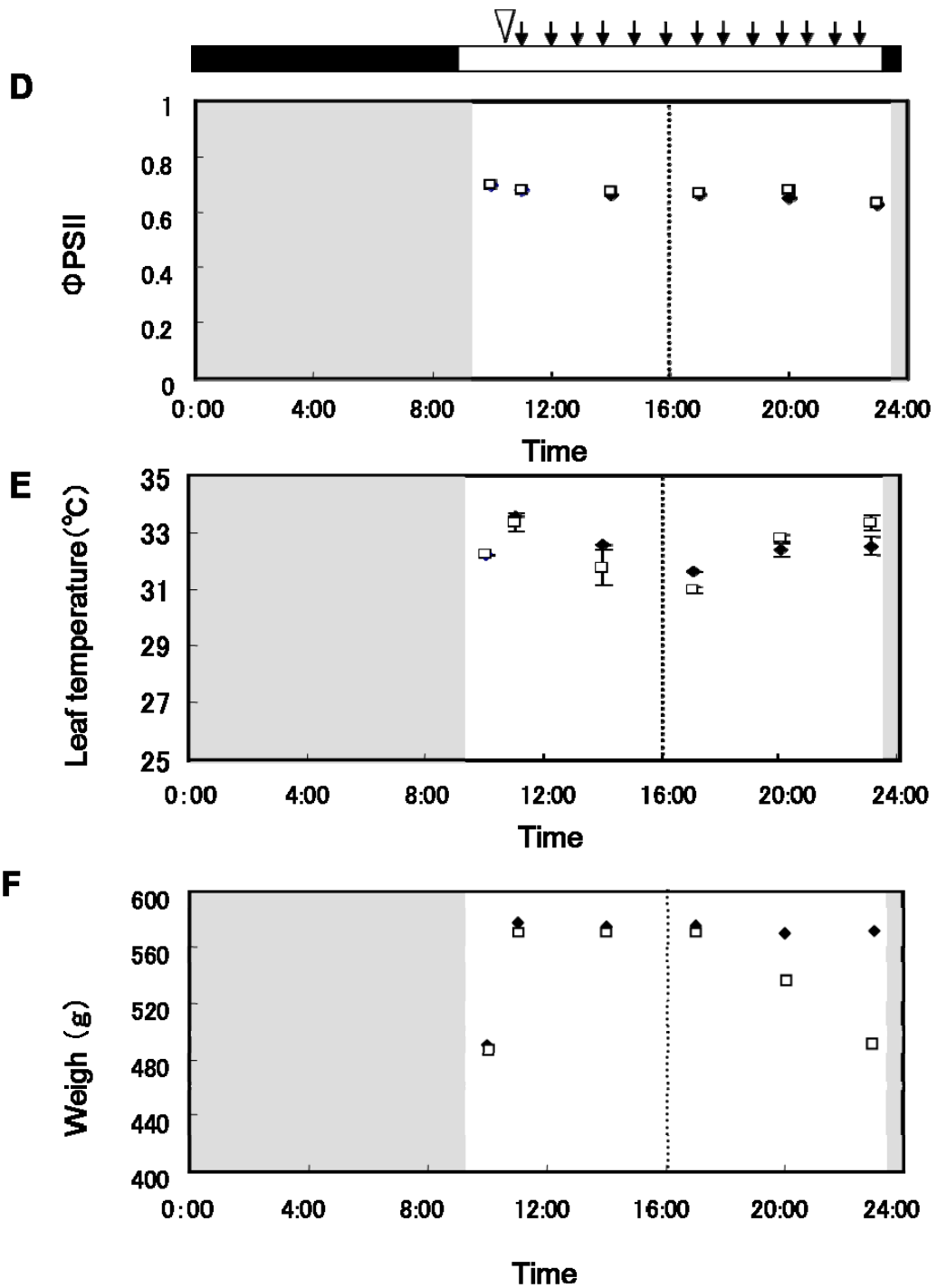


Figure 2-5. 野性種スイカの一日の生理変化

通常生育環境下の野性種スイカの一日内における光化学パラメータの変化および生理変化を観察した。□は10時に水遣りを行った植物体。■は2時間ごとに水遣りを行い土壌水分環境を一定にしたコントロール植物体。A, CO₂固定速度。



B、蒸散速度。C、気孔コンダクタンス。D、 ϕ PSII。E、葉面温度。F、土壌および植物体の総量。 ∇ は一日一回の灌水時に 200ml の水遣りを行った時間。 \downarrow はコントロール植物へ 2 時間ごとに水遣りを行った時間。

2-3-2. 強光乾燥ストレス下の野生種スイカの形態変化

野生種スイカは材料と方法で記載したように、閉鎖系の人工気象機で明期 14 時間、暗期 10 時間で $700 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強光条件で生育させ、播種後 14 日間で第 4 葉が展開した。灌水は毎日 10 時に 200 ml ずつ行い、第 4 葉展開後、灌水を停止することで乾燥ストレスを与えた。灌水を停止すると野生種スイカは成長を停止し、2 日目までは表現型に変化は見られなかった。灌水停止 3 日目から下位葉に黄化が見られ 4 日目から 6 日目にかけて黄化が徐々に進行した。しかし、上位葉の水分は保持される傾向にあり灌水停止 4 日目でも上位葉の表現型は変化しなかった。灌水停止 6 日目には上位葉の水分も失われつつあったが、再灌水すると直ちに葉は水分を蓄え、成長を始めた。下位葉は枯死し復活しなかった(Figure 2-6)。

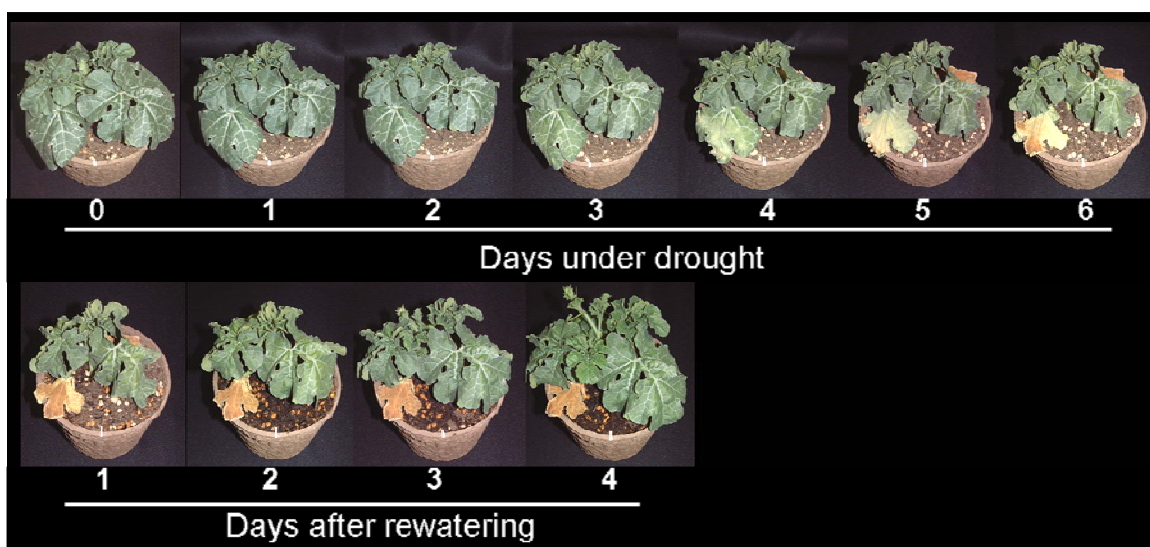


Figure 2-6. 強光乾燥ストレス下における野生種スイカ表現型

光強度 $700 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で約 14 日間生育させ、播種後約 2 週間目で第 4 葉が完全展開した日を強光乾燥ストレス 0 日目とし、灌水を停止することでストレスを与えた。灌水停止後 7 日目から再び灌水を行い (この日を灌水 1 日目とする)、4 日間灌水を行った。

2-3-3. 強光乾燥ストレス下の野生種スイカの生理変化

強光乾燥ストレス下における野生種スイカの生理変化を観察するために、ガス交換測定機を用いて、光合成能を測定した。今回測定に用いた Li-Cor 社の LI-6400 は同時にクロロフィル蛍光も測定することができる。測定は毎日 16 時に行った。ストレスを与えない通常状態において野生種スイカは約 $25 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の速度で CO_2 を固定した(Figure 2-7A)。また、蒸散速度は $8 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ と高い値を示した(Figure 2-7B)。同様に気孔コンダクタンスも $0.6 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ と高い値を示した(Figure 2-7C)。灌水を停止して約 30 時間後のストレス 1 日目において、 CO_2 固定速度は $18 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、蒸散速度は $5 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、気孔コンダクタンスは $0.3 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ とそれぞれの値は大きく低下した。さらに、灌水停止 54 時間後のストレス 2 日目においては、蒸散速度と気孔コンダクタンスが 0 の値を示した。その後、ストレス 6 日目まで 3 種の数値は底値を示し続けた。再灌水を行って、2 日目までは 3 つの値に回復は見られなかった。光合成能力の回復は再灌水 3 日目から観察され、再灌水 4 日目でストレスを与える前の値の約 80%まで回復した(Figure 2-7B-C)。

クロロフィル蛍光解析から光化学パラメータを算出した(Figure 2-7)。光化学パラメータは光化学系 II の失活の程度を表す F_v/F_m 、光化学系 II から放出される電子の速度を表す Φ_{PSII} 、および NPQ の 3 つを算出した。 F_v/F_m の値はストレス付与前と再灌水を行った後でも、大きな差や低下は見られず、約 0.8 を保持した(Figure 2-7D)。 Φ_{PSII} はストレス付与前後の 0 日目では約 0.7 の値を示した。すなわち、ストレスを与えない通常条件下において野生種スイカの $\text{ETR} (= \text{light intensity} \times \Phi_{\text{PSII}} \times 0.5)$ は約 $250 \mu\text{mol electron m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の速度で光化学系 II から電子を放出していた。ストレス 1 日目ではストレス 0 日目とほぼ同じ 0.7 の値を示した。ストレス 2 日目では大きく値は低下し 0.25 の値を示し、ストレス 6 日目までは 0.2 まで低下した。ストレス 6 日目以降の再灌水においては、光合成測定結果と同様に再灌水 2 日目までは大きな回復は見られず、3 日目、4 日目で Φ_{PSII} の値は回復した。もっとも値が低下したストレス 6 日目において、光化学系 II から電子放出速度は約 $70 \mu\text{mol electron m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ であった(Figure 2-7E)。NPQ の値は、 Φ_{PSII} の挙動と相関が見られた。ストレス 0 日目、1 日目では約 0.5 と NPQ はほとんど誘導されなかったが、ストレス 2 日目には約 2.0 と大きく上昇し、その値をストレス 6 日目まで保持した。再灌水 2 日目までは Φ_{PSII} 同様、値に大きな変化はなく、再灌水 3 日目には 1.0、4 日目には 0.5 と通常生育のものと同じ挙動を示した(Figure 2-7F)。

次に P700 の酸化レベルを測定した(Figure 2-8)。光化学系 I は暗色下において還元状態で安定である。ストレス下においては P700 の酸化レベルが高いことが予想される。そこで、WALZ 社の PAM101 を用いて光化学系 I のクロロフィル

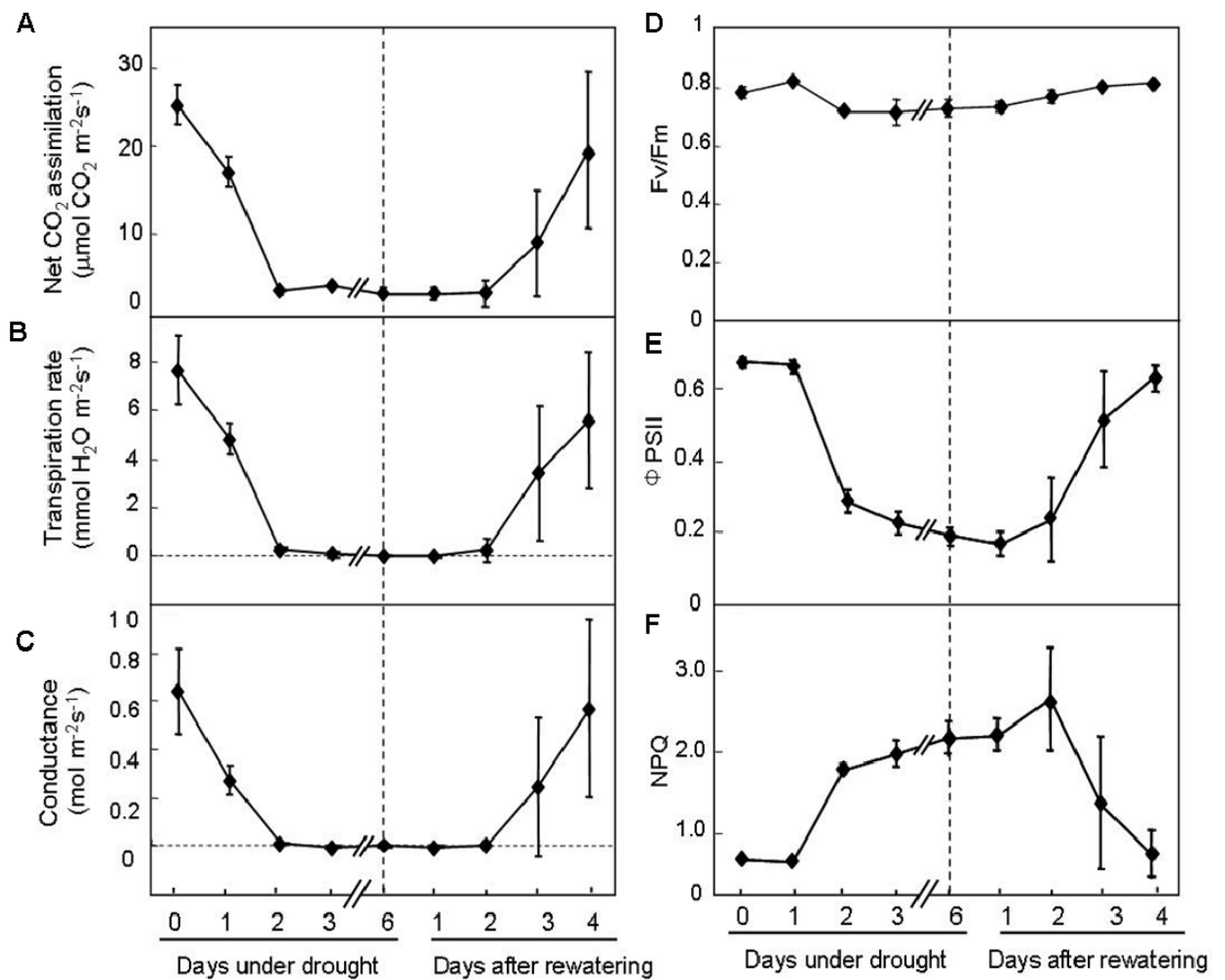


Figure 2-7. 野生スイカの強光乾燥ストレスに対する生理応答

A, CO₂固定速度。B, 蒸散速度。C, 気孔コンダクタンス。D, F_v/F_m 。E, Φ_{PSII} 。F, NPQ。灌水停止0日目から6日目、また7日目から4日間再灌水を行った葉を用いて、光合成能と光化学パラメータを測定した(n=6-10)。

カチオンの酸化レベルを 820 nm の吸光でモニターすることで、P700 の酸化レベルを測定した。その結果、非ストレス条件下の葉において P700 の約 8%のみが酸化状態であり、光化学系 I はほぼ還元状態であることが観察された。一方、強光乾燥ストレス 3 日目の葉においては約 48%が酸化型であり、非ストレス葉と比較して、酸化レベルが約 6 倍と大きく上昇した。

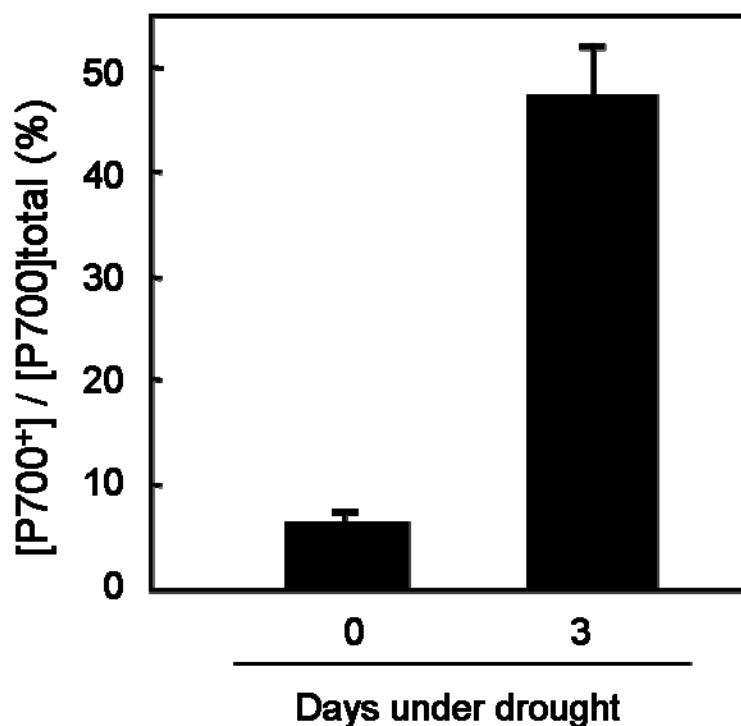


Figure 2-8. P700 の酸化レベル

ストレス 0 日目と 3 日目における P700 の酸化レベル(n=3)

2-3-4. NPQ と qE の挙動と解消速度

まず、NPQ の解消速度を大気条件においても測定した(Figure 2-9A)。測定には PSI 社の Imaging PAM を用い、非ストレス葉とストレス葉において約 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の弱い作用光を用いて同程度の NPQ を誘導させた(NPQ 0min)。作用光を消した後、1 分後と 2 分後に NPQ を測定した。その結果、ストレスを与えた葉では NPQ の値が 1 分後ですでに低下していたのに対して、非ストレス葉では、2 分後でも大きな低下は見られなかった(Figure 2-9A)。

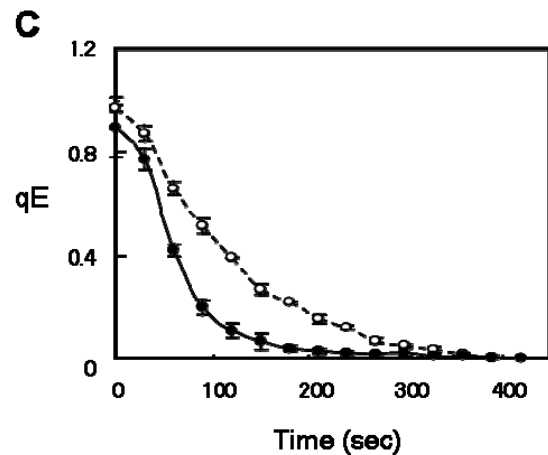
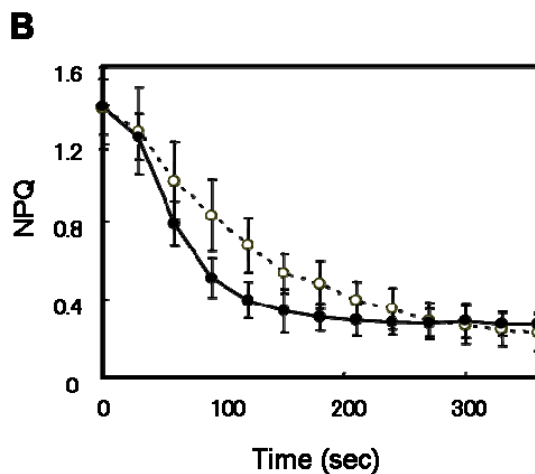
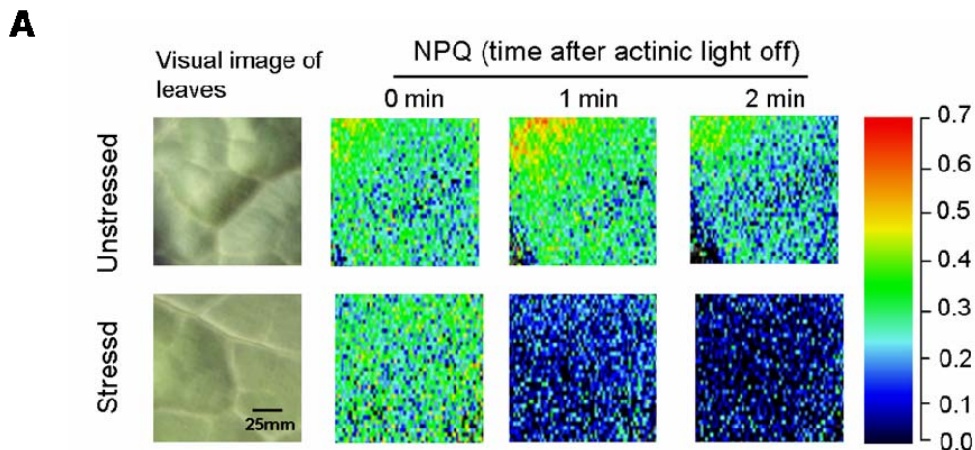


Figure 2-9. 大気条件下および低 CO₂ 条件下における NPQ と qE の解消速度

A. 大気条件下における NPQ 解消のイメージング解析。コントロール植物とストレス付与植物を用いて NPQ を誘導し、アクチニックライトを消去した後の解消速度の NPQ の値の変化を 1 分後と 2 分後で測定した。測定には 2D-PAM を用いた。左のバーは NPQ の値を示す。

B. 低 CO₂ 条件下における NPQ の解消速度。アクチニックライト消去後、定常状態に回復するまでの NPQ 値の減少を示す。ストレス 0 日目(○)。ストレス 3 日目(●)。(n=3)

C. 低 CO₂ 条件下における qE の解消速度。非ストレス葉、ストレス 3 日目の葉におけるアクチニックライト消去後の qE の解消。ストレス 0 日目(○)。ストレス 3 日目(●)。(n=3)

野生種スイカの生理解析は栽培条件である大気条件、光強度 $700 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、湿度 60%で行った。これらの測定条件から得られる結果は、この栽培条件を反映したものである。強光乾燥下の葉では気孔が閉鎖するため、葉内の CO_2 濃度は非ストレス葉と比較して極端に低い。そこで測定条件を低 CO_2 濃度に設定することで CO_2 固定経路を停止させた。このような条件下で NPQ および qE を測定することで、 CO_2 固定反応を考慮しないチラコイド膜とルーメンの状態を観察することが可能である。非ストレス下の葉における NPQ とストレス 3 日目の葉における NPQ の値はともに約 1.5 を示した(Figure 2-9.B)。次に、作用光によって誘導された NPQ の光消去後の挙動を追った。光を消去すると光によってもたらされたエネルギーは平衡状態へ向かって消失してゆくことから、NPQ の解消速度を非ストレス葉とストレス 3 日目で比較した。

作用光を消した後の NPQ の回復に要する時間($t_{1/2}$)は、ストレス 0 日目では約 120 秒に対し、ストレス 3 日目では約 80 秒と約 1.5 倍速くなった(Figure 2-9.B)。NPQ は qE, qT, qI の 3 つの構成要素から成る。中でも qE はプロトン勾配依存型の NPQ である。この qE の解消速度を測定したところ、NPQ と同様に、ストレス 0 日目のカーブは徐々に定常状態に達したのに対し、ストレス 3 日目では素早く定常状態に達した(Figure 2-9.C)。

この結果から、低 CO_2 条件下で CO_2 固定反応による影響を抑制した場合、ストレス植物において NPQ および qE の速い解消が観察され、プロトン勾配の速い解消が示唆された。

2-3-5. ストレス前後における葉緑体 ATP 合成酵素のサブユニット構成の変化

プロテオーム解析の結果、葉緑体 ATP 合成酵素の ϵ サブユニットの蓄積量が他の膜タンパク質と比較して減少することを観察した(Figure 2-1)。これまでに、強光ストレス下において ATP 合成酵素のサブユニット構成比が変化するという報告はなかった。この現象をより詳細に解析するために、 ϵ サブユニット特異的な抗体を作成し、その挙動を抗体反応によって追跡した。さらに、ATP 合成酵素の CF_1 を複合体で単離し、その構成要素変化を観察した。

まず、ATP 合成酵素の構成要素の一つが選択的に消失するという挙動を、 CF_1 複合体を単離することでより詳細に観察した(Figure 2-10)。単離したチラコイド膜をクロロフォルムで処理することにより、 CF_1 を含むチラコイド膜の表在タンパク質を抽出した。本方法では δ サブユニット以外の CF_1 複合体を得ることができる。すべてのバンドのタンパク質を質量分析器を用いることで同定した。その結果、 CF_1 の α 、 β 、 γ 、 ϵ サブユニットと光化学系 II の OEE サブユニット 3 種類を同定した。そして、ストレス 6 日目において ϵ サブユニットである 15 kDa 付近のバンドが特に減少していることが観察された。

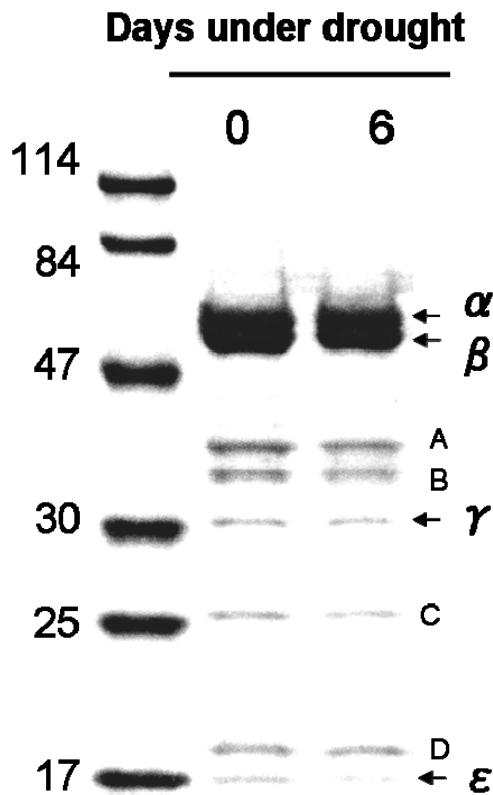


Figure 2-10. ストレス前後で見た葉緑体 ATP 合成酵素のサブユニット構成の変化

ストレス 0 日目と 6 日目の単離チラコイド膜から精製した葉緑体 ATP 合成酵素 CF_1 の SDS-PAGE 解析。一番左のレーンはタンパク質マーカー。葉緑体 ATP 合成酵素 CF_1 を構成する α 、 β 、 γ サブユニットの蓄積量はストレス前後で大きな変化はないが、 ϵ サブユニットの蓄積量が選択的に減少した。A、B、C、D はそれぞれ、 β サブユニット断片、OEE1 (36kDa)、OEE2 (25kDa)、OEE3 (18kDa)、である。oxygen evolving enhancer protein (OEE)。1 レーンには $20 \mu\text{g}$ のクロロフィルから抽出した CF_1 を SDS-PAGE に供した。

ウェスタンブロッティング解析においては、全タンパク質における ATP 合成酵素のコンポーネントである β 、 ϵ サブユニット蓄積量の変化と膜画分と可溶性のストロマ画分に分けたときの β 、 ϵ サブユニットの局在と蓄積量を観察した。ストレス 0、1、2、3、6 日目の全タンパク質に対して β 、 ϵ サブユニット抗体で

ウェスタンブロットを行った結果、3日目では0日目よりも ϵ サブユニットの蓄積量は約50%低下し、6日目では40%ほどしか検出されなかった。再灌水を行うと2日目までは低いレベルを示したが、3日目、4日目では蓄積量の増加が見られた(Figure 2-11A)。同時に、ATP合成酵素の β サブユニット抗体でウェスタンブロットを行った(Figure 2-11A)。 β サブユニットの蓄積量はストレス6日目にもかかわらずに15-20%の低下が見られたが、 ϵ サブユニットのような劇的な低下は見られなかった。

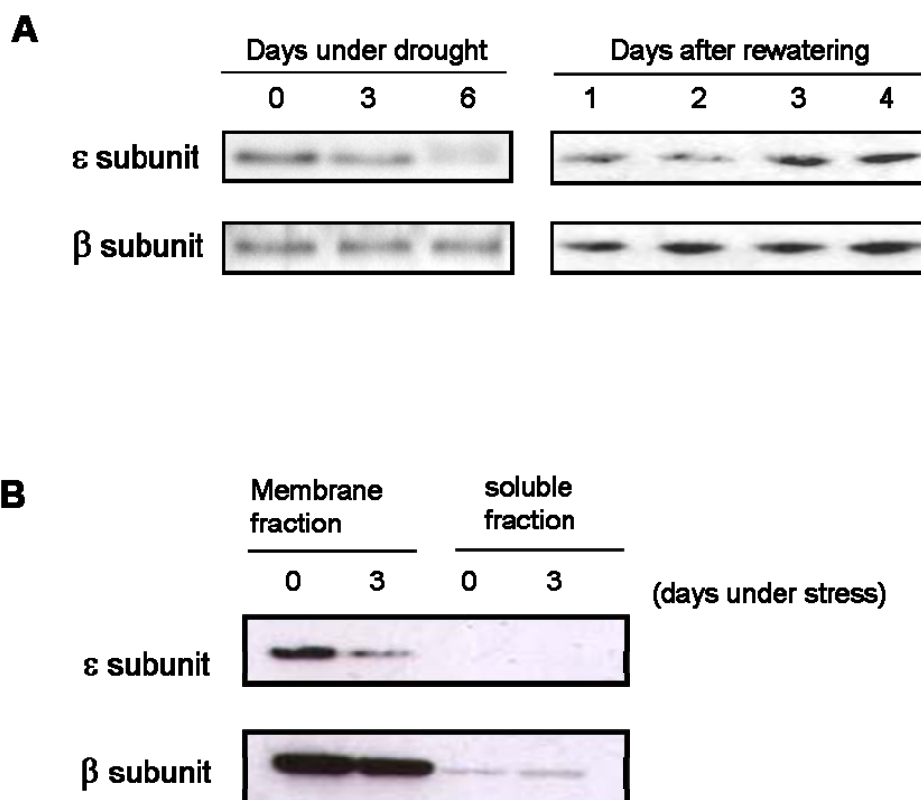


Figure 2-11. ϵ および β サブユニット抗体による野生種スイカタンパク質のウェスタンブロット

A, 全タンパク質を用いた ϵ および β サブユニットそれぞれの抗体を用いてストレス0, 3, 6日目と再灌水1, 2, 3, 4日目のウェスタンブロット。1レーンには1枚のリーフディスクから抽出した全タンパク質を供した。

B, 膜画分とストロマ画分のタンパク質を用いた ϵ および β サブユニット抗体による野種生スイカのウェスタンブロット。ストレス0, 3日目における膜画分と可溶性画分における ϵ 、 β サブユニットの蓄積量。1レーンには1枚のリーフディスクから抽出した可溶性と不溶性のタンパク質を供した。

さらに、ヒマワリとホウレンソウの葉を用いて、強光乾燥下における ϵ サブユニットの蓄積量の変化をウェスタンブロットで解析した。その結果、ヒマワリでは ϵ サブユニットの選択的な減少が観察された(Figure 2-12A)。一方、タバコの ϵ サブユニット蓄積量は変化しなかった(Figure 2-12B)。

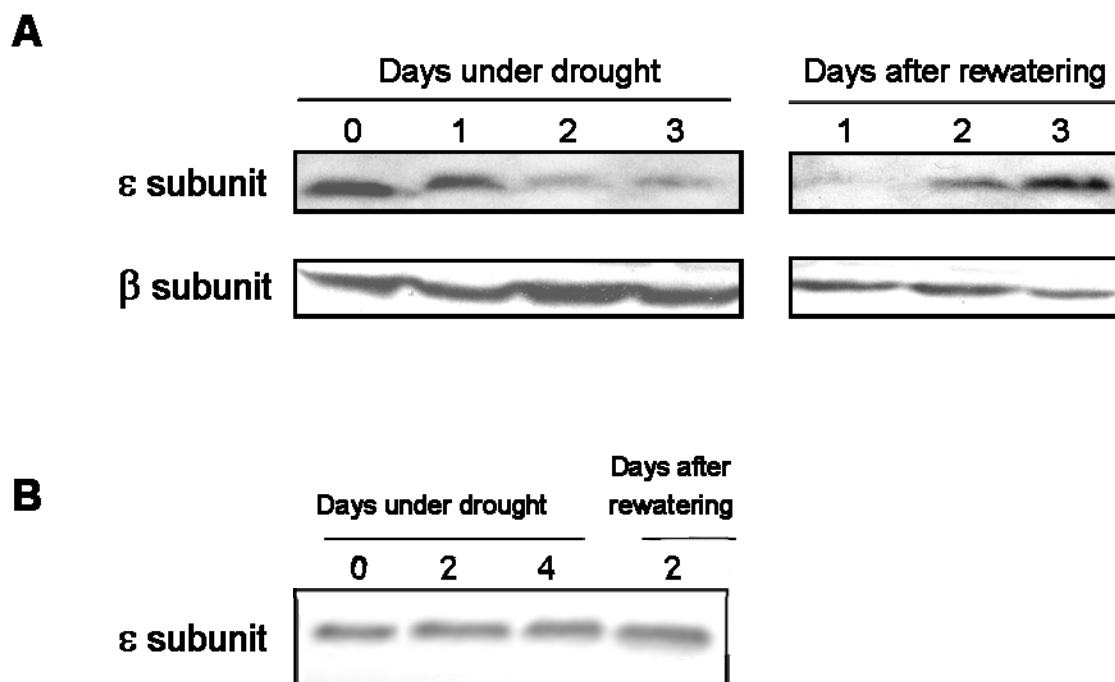


Figure 2-12. 強光乾燥ストレス下の他植物における ϵ サブユニットの挙動

A. ヒマワリ全タンパク質を用いた ϵ 、 β サブユニット抗体によるウェスタンブロット。1 レーンには1枚のリーフディスクから抽出した全タンパク質を供した。
 B. タバコ全タンパク質の ϵ 、 β サブユニット抗体によるウェスタンブロット。1 レーンには1枚のリーフディスクから抽出した全タンパク質を供した。

2-3-6. 強光乾燥ストレス下における ϵ サブユニット蓄積量の変化と局在

野性種スイカを膜画分と可溶性画分に分け、 ϵ 、 β サブユニット量の変化を観察した(Figure 2-11B)。ストレス0日目とストレス3日目について、それぞれを検出した結果、膜画分における ϵ サブユニット量はストレスによって減少した。しかし、可溶性画分に ϵ サブユニットのシグナルは検出されなかった。一方、 β サブユニットの蓄積量は膜画分において大きな変化は見られなかった。可溶性画分では少量検出されたが、バンド強度に違いは認められなかった。

2-3-7. 野性種スイカ ϵ サブユニットのアミノ酸配列解析

野生種スイカと他の植物間の ϵ サブユニットのアミノ酸配列の差異を明らかにするために、野性種スイカの ATP 合成酵素 ϵ サブユニットのアミノ酸配列を解読した。 ϵ サブユニットの遺伝子は葉緑体コードであり、葉緑体 DNA は保存性が高い。野性種スイカの ϵ サブユニットのアミノ酸配列は他植物と大きな差異はなく、約 85-88% の相同性があった (Figure 2-13)。

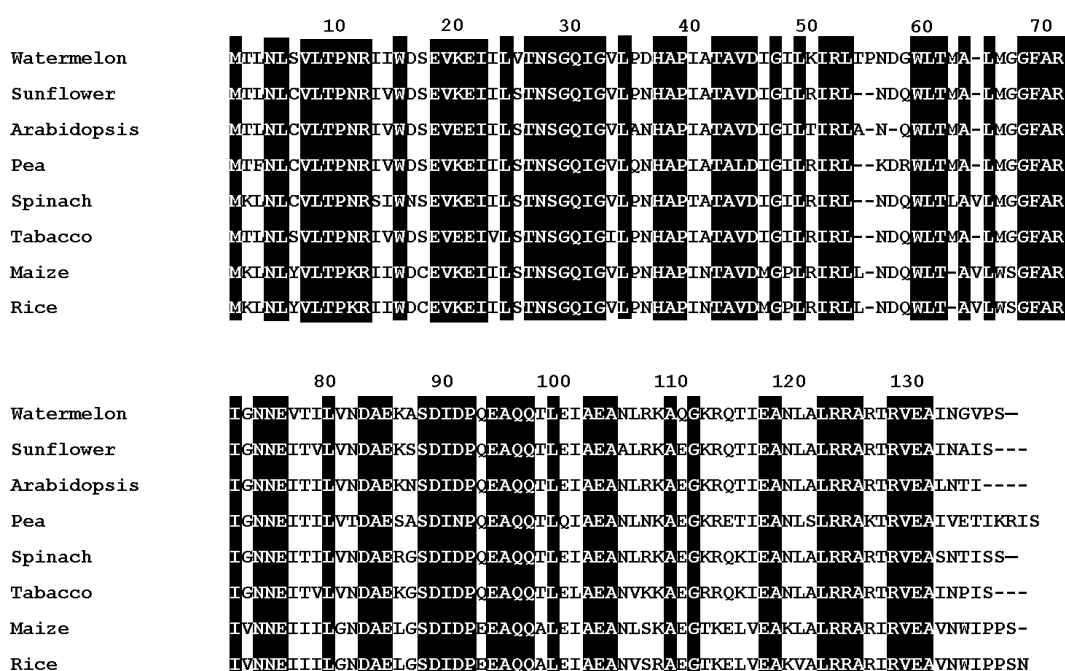


Figure 2-13. 野生スイカ ϵ サブユニットのアミノ酸配列と他植物の ϵ サブユニットアミノ酸配列の比較

すべての配列において、同一アミノ酸を白抜きであらわした。

2-3-8. 強光乾燥ストレス下における ϵ サブユニット mRNA の挙動

ストレス下における ϵ サブユニットの発現が、転写レベルでどのような挙動を示すかを明らかにするために、ノザンブロットィングを行った(Figure 2-14)。タバコにおける転写単位の解析から、2.7, 2.5, 2.3 kb のバンドは β サブユニットと ϵ サブユニット遺伝子との共転写産物であり、1.0 kb のバンドが ϵ サブユニット遺伝子が単独に転写されたものであることが示されている。今回の野生種スイカでのノザン解析により、野生種スイカにおいてもタバコと同様の転写単位を持つことが示された。そして、ストレス付与により mRNA 量が大きく減少することが観察された。しかし、 ϵ サブユニットとオペロンを組む β サブユニットの mRNA 量も大きく低下した。

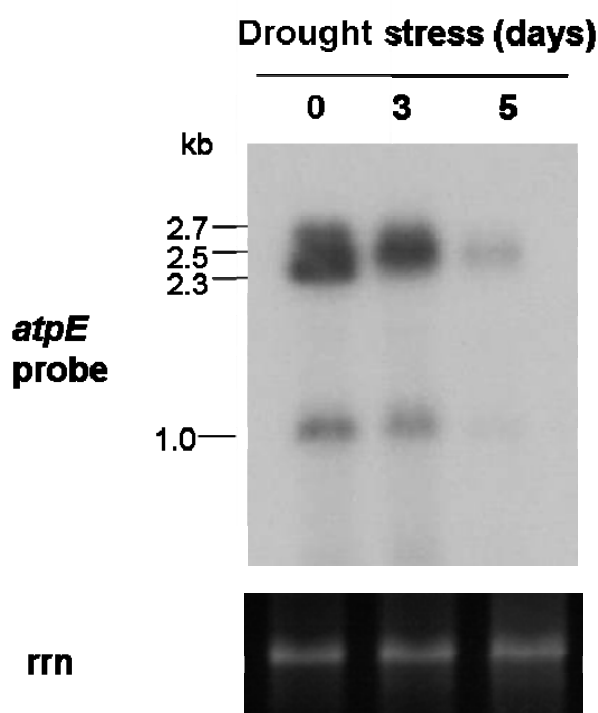


Figure 2-14. 強光乾燥ストレス下における ϵ サブユニット mRNA の挙動

2.7 から 2.3 kb のバンドは β サブユニットと ϵ サブユニット遺伝子との共転写産物であり、1.0 kb のバンドは ϵ サブユニット遺伝子が単独に転写されたものである(Kappor et al., 1994)。

2-3-9. 単離チラコイド膜における非循環的電子伝達速度の測定と共役率

強光乾燥ストレス 0、3、6 日目の葉から調製した単離チラコイド膜標品に、 $500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の赤色光を照射した、その時の電子伝達能力およびプロトン勾配を検証した。方法としては、脱共役剤添加前後における酸素発生を比較することで評価した。この実験では、メチルビオローゲン(MV)を電子受容体に用い光照射下の酸素消費速度から電子伝達速度を見積もった。次いで脱共役剤(塩化アンモニウム)を添加することによって膜を脱共役させた。その膜のもつ酸素濃度から観察される最大電子伝達速度を酸素電極を用いることで測定し、ストレス前、ストレス付与3日、6日における単離チラコイド膜の共役率を観察した(Figure 2-15)。

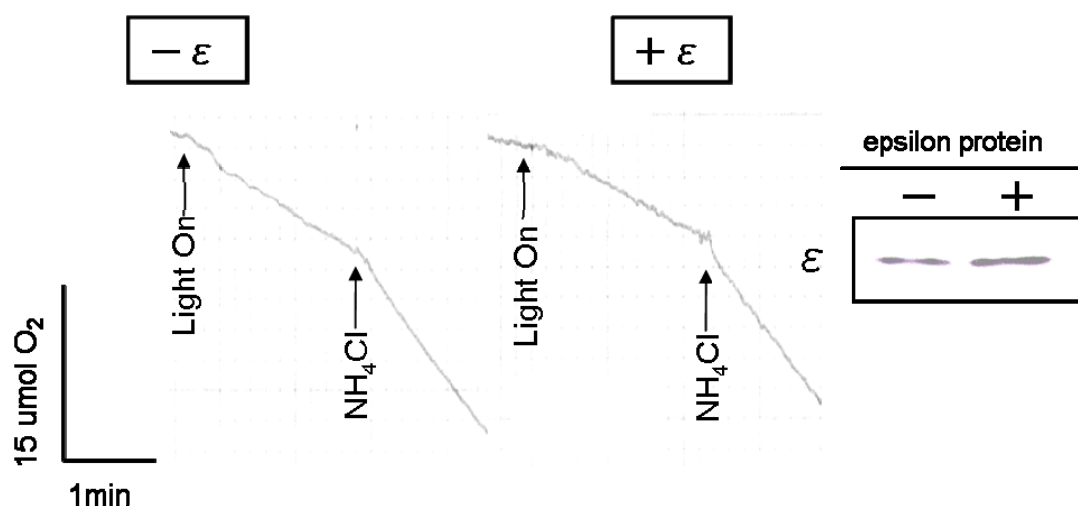


Figure 2-15. 酸素電極を用いた電子伝達速度測定のトレース。

酸素電極でモニターした酸素消費速度。ストレス 3 日目の葉から単離したチラコイド膜の ϵ サブユニットの蓄積量と、そのチラコイド膜に組換え ϵ サブユニットを添加し結合させた時のチラコイド膜における ϵ サブユニット量。

その結果、非ストレス葉由来のチラコイド膜における酸素消費速度は $33.2 \pm 0.6 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{mgchl}^{-1}$ であった。ストレス付与3日目ではそれぞれ、 $43.0 \pm 7.5 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{mgchl}^{-1}$ 、ストレス付与6日目では $47.6 \pm 6.6 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{mgchl}^{-1}$ と、非スト

レスのものと比較して酸素消費速度は、それぞれ 1.3 倍、1.5 倍に増加した。これらの単離チラコイド膜に脱共役剤である塩化アンモニウムを添加すると、酸素消費速度は非ストレスサンプルにおいて $125.3 \pm 14.0 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{mgchl}^{-1}$ 、ストレス付与 3 日目と 6 日目では、それぞれ 103.1 ± 4.4 および $102.0 \pm 18.8 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{mgchl}^{-1}$ であった(Figure 2-16. B)。

チラコイド膜の電子伝達速度は、チラコイドルーメンのプロトン勾配により抑制されることが知られている(Walker, 1994)。したがって、脱共役剤添加の前後における酸素消費速度の比から、膜の ΔpH を反映する共役率とみなすことができる(Figure 2-16A)。脱共役剤の添加前後の酸素消費速度の比は、非ストレスチラコイド膜において 3.8 であったのに対し、ストレス付与 3 日目、6 日目では、それぞれ 2.5、1.9 と減少した。一方、組換え ϵ サブユニットタンパク質を添加したチラコイド膜においては共役率の値は非ストレスサンプルでは 3.9、ストレス付与 3 日目では 3.8 と非ストレスサンプルと同じような値を示した。ストレス付与 6 日目でも 2.7 と共役率の上昇が見られた(Figure 2-16 A-B)。

さらに、各ストレス付与葉由来のチラコイドサンプルに野性種スイカ由来の ϵ サブユニット組換えタンパク質をチラコイド膜に存在する ATP 合成酵素存在量の 10 倍量を添加し、室温で反応させた(Zhang-Lin et al., 2005)。このような処理を施したチラコイドサンプルの酸素消費速度を測定した結果、 ϵ サブユニットが存在する非ストレスチラコイド膜では、添加していないサンプルとほぼ変わらない $32.7 \pm 2.0 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{mgchl}^{-1}$ であった。しかし、ストレス付与 3 日目と 6 日目に ϵ サブユニットタンパク質を添加すると添加前の速度よりも低く、それぞれ $25.9 \pm 1.3 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{mgchl}^{-1}$ 、 $33.0 \pm 7.6 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{mgchl}^{-1}$ であった。また、脱共役剤を加えると非ストレスチラコイド膜では $124.0 \pm 16.0 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{mgchl}^{-1}$ 、ストレス付与 3 日目、6 日目では、それぞれ $96.8 \pm 4.8 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{mgchl}^{-1}$ 、 $102.5 \pm 17.4 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{mgchl}^{-1}$ と ϵ サブユニット添加の有無では違いは見られなかった(Figure 2-16A-B)。

ストレス付与チラコイド膜は非ストレスチラコイド膜と比較して酸素消費速度は増加した(Figure 2-15)。ストレス付与 3 日目のチラコイド膜における消費速度は Figure 2-15 のような傾きが得られた。一方、組換え ϵ サブユニットタンパク質を添加すると、消費速度の傾きが緩やかになった。このチラコイド膜サンプルに存在する ϵ サブユニット量をウェスタンブロットにおいて見た結果、 ϵ サブユニットタンパク質添加チラコイド膜に ϵ サブユニットが結合していることが確認された(Figure 2-15)。

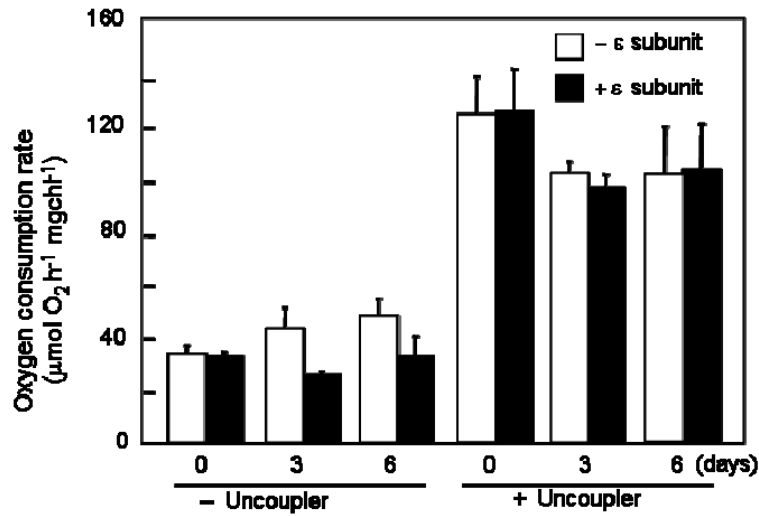
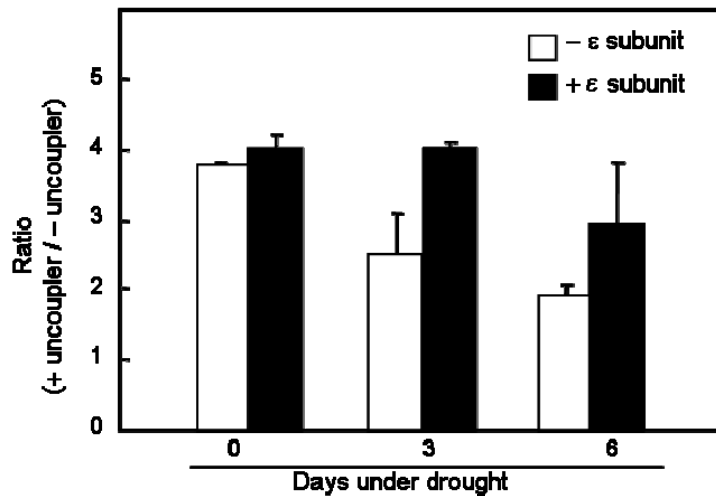
A**B**

Figure 2-16. 酸素電極を用いた電子伝達速度測定の変化とチラコイド膜の共役率

A. ストレス 0、3、6 日目から調製したチラコイド膜の酸素消費速度と組み換え ε サブユニットを添加した時の酸素消費速度の変化。それぞれにおいて脱共役剤である NH₄Cl₂ を添加したときの速度増加も測定した。

B. 脱共役剤添加前後で変化した酸素消費速度の増加倍率。白バーは組み換え ε サブユニットを添加していないチラコイド膜。黒バーは組み換え ε サブユニットを添加したチラコイド膜における電子伝達速度。

2-3-10. 9-AA を用いたプロトン勾配の測定と蛍光回復速度

ϵ サブユニットの減少がチラコイド膜のエネルギーレベルに及ぼす影響を評価するため、9-アミノアクリジン(9-AA)を用いて光照射下における単離チラコイド膜の Δ pH を測定した。その結果、ストレス 0 日目のアクリジンの蛍光消去能力を 100%としたとき、ストレス 3 日目では 65%、ストレス 6 日目では 52% に低下した(Figure 2-17A)。この結果はストレスが付与されることで、チラコイド膜の Δ pH が低下したことを示す。また、チラコイド膜に ϵ タンパク質を添加すると、ストレス 0 日目のチラコイド膜では影響を及ぼさないのに対し、蛍光消去能が 3 日目では 100%、6 日目でも約 50%回復した(Figure 2-17A)。

光照射を行い 9-AA 蛍光クエンチングを観察した後、光を消去すると 9-AA の蛍光は再び上昇する。この蛍光が定常状態に達するまでの速度を半減期を算出することで評価した。Figure 2-17B はストレス付与 3 日目の葉における組み換え ϵ サブユニット添加前後における挙動を示している。 ϵ サブユニットを添加すると 9-AA 蛍光が定常状態へ戻るまでの時間が増加することが観察された。Figure 2-17C は、非ストレスチラコイド膜、ストレス付与 3 日目および 6 日目における半減期を比較したものである。非ストレスチラコイド膜では半減期が 9.7 ± 0.3 秒であった。ストレス付与 3 日目、6 日目ではそれぞれ 8.7 ± 0.9 、 8.0 ± 0.9 秒と半減期は減少した。また、 ϵ サブユニットを添加したそれぞれのチラコイド膜では、非ストレスチラコイド膜で 10.8 ± 0.7 秒、ストレス付与 3 日目、6 日目で、それぞれ 12.2 ± 1.6 秒、 13.7 ± 0.5 秒であった。

2-3-11. プロトンのルーメンからストロマへの流れ

上述したように、強光乾燥ストレス下において ϵ サブユニットが減少するとチラコイドルーメンに形成されたプロトン勾配が緩和されることが *in vitro* で観察された。この現象を *in vivo* において検証するために、カロテノイド吸収の electrochromic shift (ECS) 測定を利用した。この実験は次章に詳述するように Washington State University の人工気象器で生育させた野生種スイカを用い、ストレス 4 日目と 7 日目の植物体の第 4 葉を実験に供した。

実験を行うにあたって、はじめに、ATP 合成酵素の ϵ サブユニットの蓄積量の挙動をウェスタンブロット解析によって追跡した。この解析には ATP 合成酵素の ϵ サブユニットと γ サブユニットの抗体を用いた。葉面積あたりで 2 つのサブユニットの量を非ストレス植物およびストレス植物で比較した結果、強光乾燥ストレスを 4 日間付与した植物体においては、 γ サブユニットの蓄積量はほぼ変化しなかったが、 ϵ サブユニットは約 50%と大きな低下が見られた。一方、強光乾燥ストレスを 7 日間付与した植物の γ サブユニットは約 40%へと、 ϵ サブユニットは約 10%へと共に大きく低下した値を示した。(Figure 2-18A-B)。

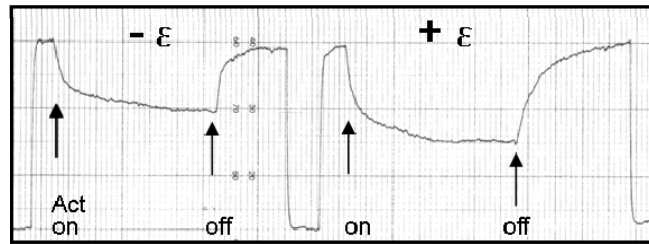
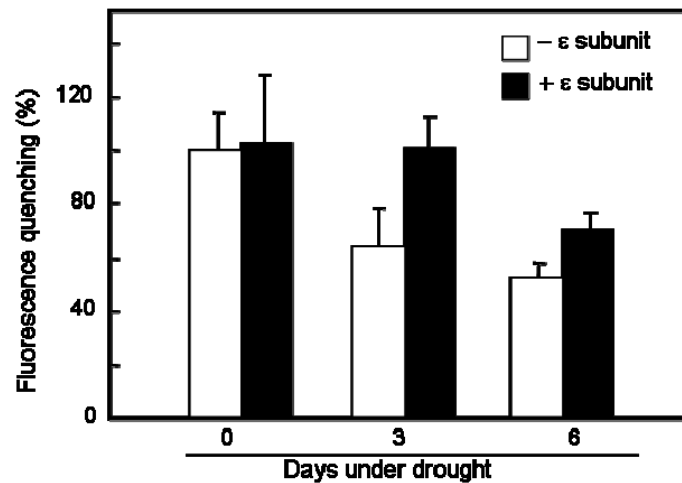
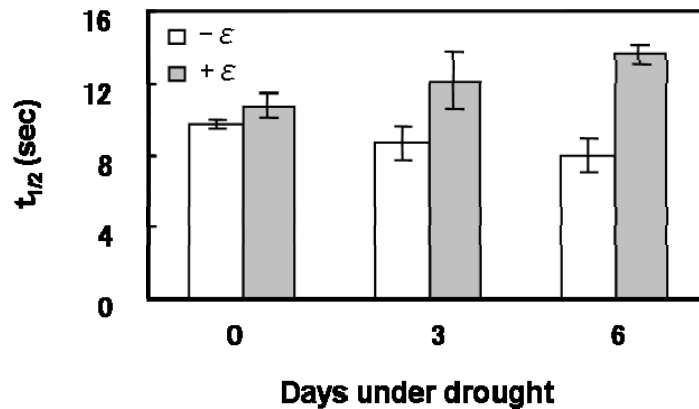
A**B****C**

Figure 2-17. 9-aminoacridine (9-AA) 蛍光減少による Δ pH の測定

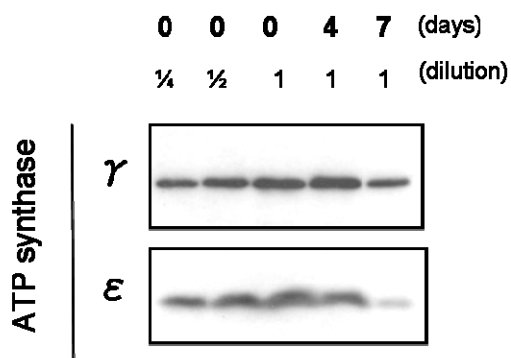
A, ストレス 6 日目の植物体から調製したチラコイド膜とそのサンプルに ϵ サブユニットを添加した際の蛍光クエンチングのトレース。

B, ストレス 0, 3, 6 日目の葉から調製したチラコイド膜を用いて測定した 9-AA の蛍光クエンチングの割合。白バーは組み換え ϵ サブユニットを添加していないチラコイド膜。黒バーはそれを添加したチラコイド膜。

C, アクチニクライトを off にした後の蛍光クエンチング回復の半減期。

これらの結果より、本研究で使用した植物から ϵ サブユニットが選択的に減少するという段階と、さらにその先の ATP 合成酵素全体の蓄積量が低下する段階を見ることができた。

A



B

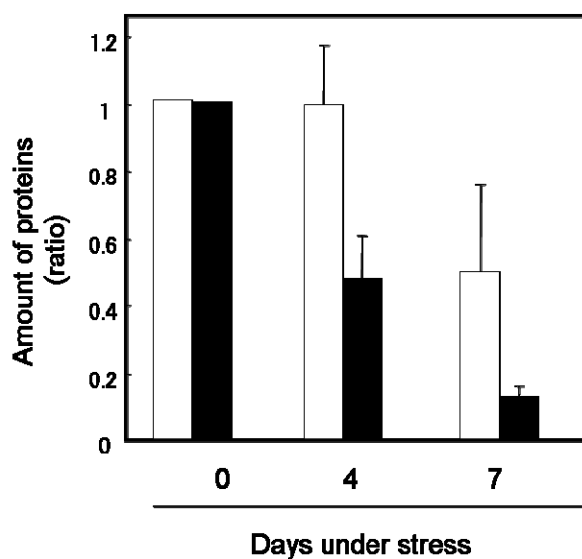


Figure 2-18. 長期間強光乾燥ストレスを付与した野生スイカの ATP 合成酵素の蓄積量

A. ATP 合成酵素の ϵ サブユニット と γ サブユニットのウェスタンブロッティング。ストレスは日数で 0 日、4 日、7 日で示し、0 日目は 1/2 倍、1/4 倍量を一緒に泳動し検量した。各レーンは葉面積あたりで定量し、SDS-PAGE に供した。

B. ϵ サブユニット と γ サブユニットのウェスタンブロッティング定量。それぞれのタンパク ϵ サブユニット質において 0 日目を 1 と示した。白が γ サブユニット、黒が ϵ サブユニットの蓄積量を示す。n=3-4。

これら2つの段階の植物体におけるプロトンのルーメンからストロマへの流れをシングル・ターンオーバー・フラッシュを用いた ECS 解析により観察した。本方法は、暗黒下の葉に微弱な閃光を照射しチラコイド膜に膜電位を発生させ、その解消速度を ECS により測定することで、膜からのプロトン透過速度を *in vivo* で観察する手法である。まず、Figure 2-19A の Inset では非ストレス植物とストレス植物に誘導された ECS 強度が同程度であることを示した。このことは、ストレスに関係なく同程度の膜電位がチラコイド膜に発生することを示している。さらに、実験の結果、非ストレス下の葉における ECS 解消速度の半減期が約 100 ミリ秒であったのに対し、ストレス葉では約 40 ミリ秒と顕著に速い解消速度を示した(Figure 2-19A)。この観察から、ストレス下の野生種スイカ葉において、チラコイド膜からプロトンが非ストレス下のチラコイド膜と比較してより早くストロマ側へ移動していることが *in vivo* で示された。一方、よりストレス状態に曝されていることが予想される7日目の植物を用いて同様の実験を行った結果、速度の増加が緩和され、非ストレス植物の挙動と類似していた(Figure 2-19B)。

本実験におけるストレス7日目の植物はストレス4日目と比較して、フラッシュを照射した後に緩やかな立ち上がりが見られた(Figure 2-19B)。これはストクロム *b₆f* 複合体における電荷分離と呼応している(Kramer and Crofts 1989)。この現象はストレスが長期になればなるほど、大きく観察される。この結果は、ATP 合成酵素プールやストロマ環境に関与するプラストキノンプールの還元状態を示唆する。

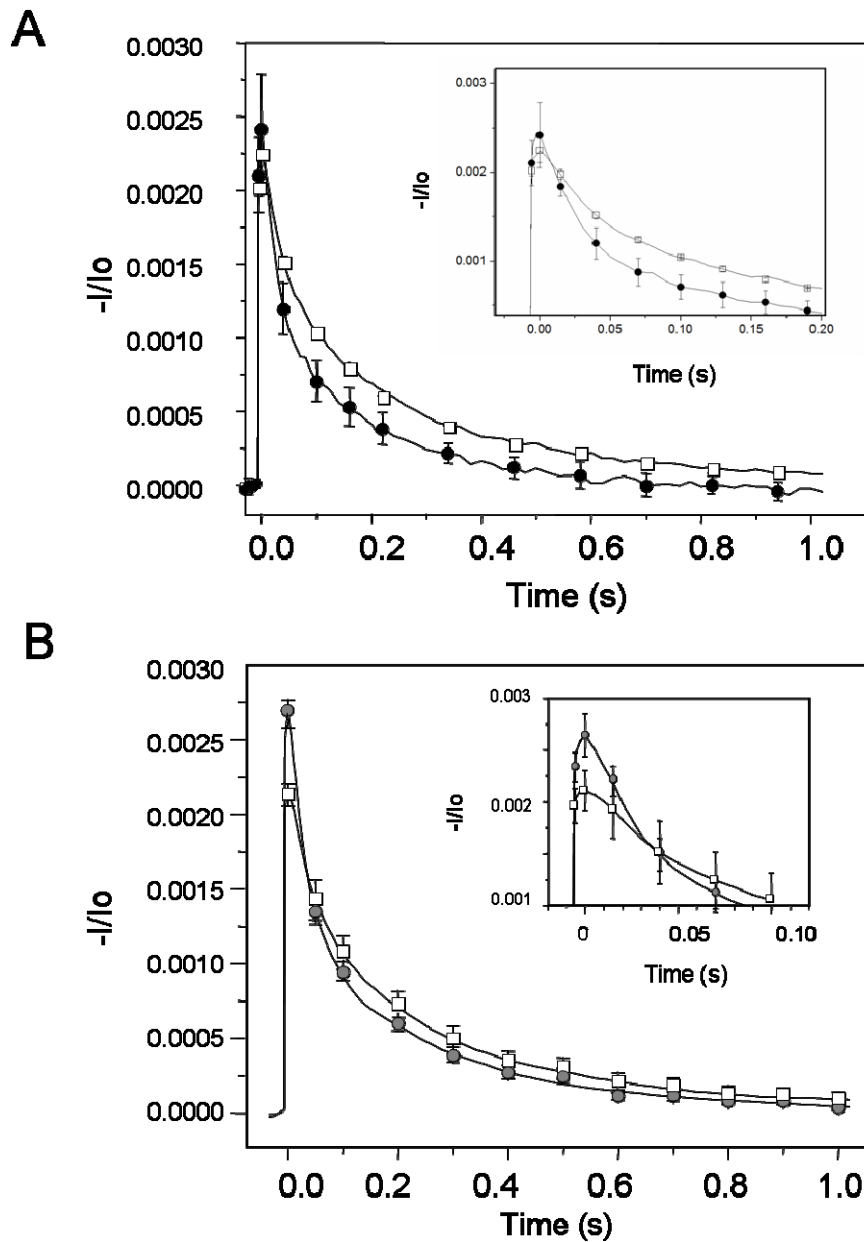


Figure 2-19. Electrochromic Shift を用いたプロトンのチラコイドルーメンからのリーク速度のトレース

アクチニック効果を持たないキセノンフラッシュを $\sim 10 \mu$ 秒間照射し、フラッシュによって形成された ECS 強度の解消速度を約 1 秒間トレースした。Inset はフラッシュ照射後 0.00-0.20 間の初期トレース。

A. ダーク処理を行った非ストレス植物とストレス 4 日目の植物を用いた FIRK のトレース。非ストレス植物(\square)とストレス 4 日目の植物(\bullet) ($n=3$)

B. ダーク処理を行った非ストレス植物とストレス 7 日目の植物を用いた FIRK のトレース。コントロール植物(\square)とストレス 7 日目の植物(\bullet) ($n=5$)

2-3-12. ϵ サブユニット分解のメカニズムの探索

これまでの研究結果から、ATP 合成酵素の ϵ サブユニットが強光乾燥ストレス下において選択的に消失することが明らかになった。さらに、その量的制御はタンパク質レベルで行われていることを示唆する実験結果を得た。また、ATP 合成酵素から解離した ϵ サブユニットはストロマ画分に存在しないことから、選択的な分解が起こっていることが予想される。

ϵ サブユニットは古くからよく研究されているサブユニットである。その主な役割は ATP 合成反応の逆回転によって引き起こされる ATPase 活性の抑制である。ATPase 活性の増加は ATP 分解を促進させるためプロトン勾配形成が困難な夜間では植物にとって死活問題である。これまでに、ATP 合成酵素に熱処理を行った場合、還元剤を処理した場合において ATPase 活性が増加することが報告されている(Vambutus and MaCarty, 1965)。これらの知見から、 ϵ サブユニットの分解を誘導する因子を探索するために、単離チラコイド膜および組換え ϵ サブユニットタンパク質を用いて、*in vitro* で各種の物理化学的ストレスを付与し、 ϵ サブユニットの変化を観察した。

はじめに、非ストレス条件下の単離チラコイド膜を用いて熱処理と還元処理を行い、その際の ϵ サブユニットの挙動を見た(Figure 2-19A)。熱処理は 4°C、25°C、37°C、42°C、60°C の 5 種で行い、反応時間は 5 分、15 分、30 分間とした。CF₁ は 60°C の熱処理を行うことで ATPase 活性を上昇させることが知られている(Vambutus and MaCarty, 1965)。4°C、25°C、37°C、42°C の処理においては ϵ サブユニットの選択的消失は起こらなかった(Figure 2-20A ; data not shown)。60°C において ϵ サブユニットの解離が観察されたが、 α 、 β サブユニットも同様に膜から解離していたことから、60°C の熱処理によって CF₁ 複合体が膜から解離することが示唆された。

また、 γ サブユニットのジスルフィド結合を還元するのに十分な濃度である 0.2 M DTT でチラコイド膜を処理し、光照射有無における ϵ サブユニットの挙動を観察した(Figure 2-20B)。その結果、チラコイド膜上において ϵ サブユニットに変化は認められなかった。さらに、その反応溶液画分においても ϵ サブユニットは観察されなかった。これらの結果から熱と還元力は、 ϵ サブユニットを選択的に分解する直接的な因子でないことが明らかになった(Figure 2-20A-B)。

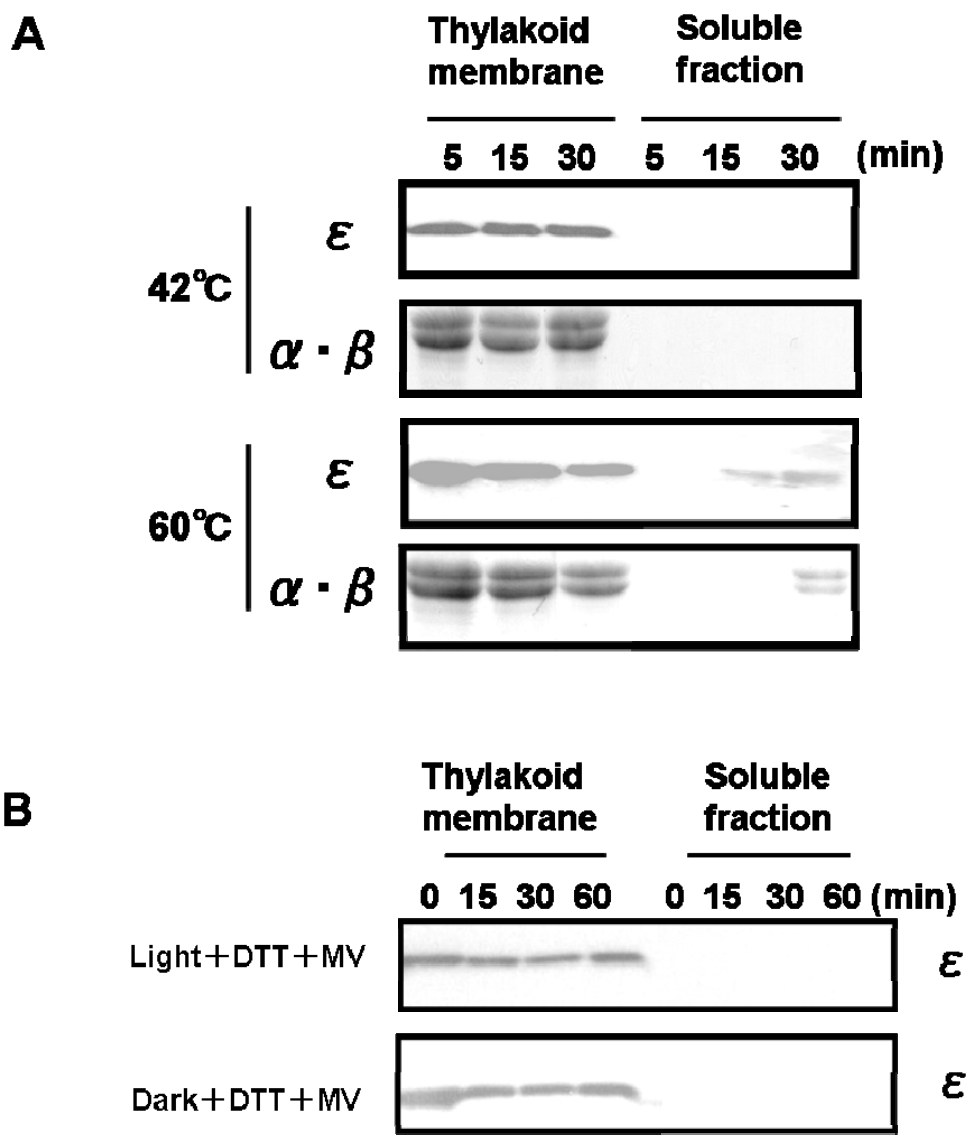


Figure 2-20. 外的ストレスを与えた単離チラコイド膜の ϵ サブユニットの挙動

A. 単離チラコイド膜に熱処理を施し際の ϵ サブユニットと α 、 β サブユニットの量および局在変化。 ϵ サブユニットはウェスタンブロットで確認した。 α 、 β サブユニットは CBB 染色で検出した。

B. 単離チラコイド膜に光照射あるなしで DTT を処理し、還元状態にした場合の ϵ サブユニットの量および局在変化。 ϵ サブユニットはウェスタンブロットで確認した。上清はチラコイド膜溶液をそれぞれの処理した後、チラコイド膜を除去した画分。

次に、組換え ϵ サブユニットを用いて、ストロマ画分に添加した時の ϵ サブユニットの挙動変化を追跡した(Figure 2-21)。非ストレス葉から調製したストロマ画分を含む可溶性画分と、ストレス植物の葉から調製した同様の画分を組み換え ϵ サブユニットに添加し、37°Cで5分、10分、30分間反応させた。その結果、非ストレスである0日目の葉のストロマ画分を添加しても ϵ サブユニットの量に変化は起こらなかったが、ストレスを付与した6日目の葉のストロマ画分を添加すると、反応時間に伴って ϵ サブユニット量が減少し、30分後にはそのほとんどが消失した。しかし、この時、ストロマ画分が含有する Rubisco の量は変化しなかった。この結果は、強光乾燥ストレスを受けた葉の可溶性画分に、 ϵ サブユニットを特異的に分解する因子が存在することを示唆している。

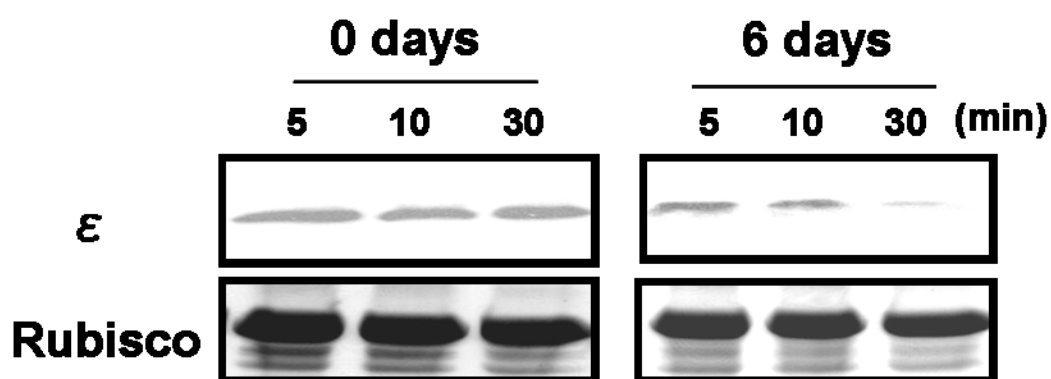


Figure 2-21. 野生スイカ粗抽出液への組み換え ϵ サブユニット添加実験
 ϵ サブユニットはウェスタンブロッティングにより検出した。Rubisco は CBB 染色で検出した。

2-4. 考察

2-4-1. 野生種スイカの強光ストレスへの生理応答

カラハリ砂漠原産の野生種スイカは強光乾燥ストレスに高い耐性を示すことは以前に報告されており、高い耐性を示す仕組みとして、適合溶質であるシトルリンの高蓄積やチラコイド膜で発生した還元力を細胞外へ輸送する経路などが明らかになっている(Takahara et al., 2005; Nanasato et al., 2005)。しかし、これまで光合成に関する生理応答の研究結果は少なかった。本研究において、野生種スイカは強光下で灌水を停止しても約 1 週間、枯死することなく生育し、再び灌水を行うと成長を開始することが観察された(Figure 2-5)。このような野生種スイカの生理応答を見ることは、この植物を理解するのに重要であると考えた。ストレス 0 日目から 6 日目、および再灌水 1 日目から 4 日目の 11 測定ポイントの条件における植物体を用いて、光合成能と光化学パラメータを測定した(Figure 2-7. A-F)。その結果、ストレスを与えることで蒸散が停止することが観察された。この現象は植物の水分損失から身を守るため気孔を閉鎖したことを示している。植物は一般に、水分低下の際に気孔を閉鎖するが、野生種スイカも同様であることが示唆された。さらに、気孔の閉鎖は葉内への CO₂ の取り込みを抑制するが、CO₂ 固定速度がストレス 2 日目において、極めて 0 に近いことから、ストレスによって光合成が停止していることが分かる。CO₂ 固定の停止はチラコイド膜の過還元を誘導することが知られている。本研究において、野生種スイカは 700 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強光で生育されている。このような強光下では、カルビン回路の代謝活性が低下することで、電子が利用されなくなり、活性酸素の発生による光化学系 II の D1 タンパク質の分解が起こる。これによって、電子伝達系の保護という機構が働く。光化学系 II において光エネルギーを受け取る能力が低下すると、open な光化学系 II の容量を表す Fv/Fm の大きな低下が予想される。一般的なモデル植物であるシロイヌナズナはこのような条件下において Fv/Fm は低下する(宗景, 2003)。しかし、野生種スイカにおいては、ストレス付与時、再灌水時、いずれにおいても Fv/Fm の値に大きな変化は見られなかった。この結果から、野生種スイカには光化学系 II の反応中心を保護するシステムが存在することが考えられる。

さらに、光化学系 II の量子収率を表す Φ_{PSII} はストレス 2 日目で大きく低下するが、完全に 0 になるわけではなく、70 $\mu\text{mol electrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の電子を流しても、それを受け取る何らかの仕組みが存在することを示す。ここで P700 の酸化割合を測定した結果を見ると、ストレス下における光化学系 I では非ストレス条件下に比べて P700 からより電子が放出されている。これらの結果から、光化学系 II

から直鎖型の電子伝達により光化学系 I へ電子が流れても、それ以上の速度で PSI から電子が放出されていることが示唆された。光化学系 I からの電子の受け取り手はカルビン回路、光呼吸経路、PSI cyclic などが考えられるが、葉内 CO₂ が極度に低下したストレス条件下において PCR であるとは考えにくい。このことから、PCO、PSI cyclic、または、その他のメカニズムが存在し、光化学系 I から電子を受け取ることが考えられる。PSI cyclic は強光や高温において高い活性を示唆することが報告されている。野性種スイカは強光乾燥ストレスで蒸散が停止することで、葉面温度が 42°C まで上昇することが報告されている (Takahara, 2005)。このことから、PSI cyclic の活性上昇が光化学系 I の高い酸化を誘導し、光化学系 I からの電子を受容していると考えられる。

2-4-2. ATP 合成酵素の構造変化

プロテオーム解析により、乾燥・強光ストレス下における ATP 合成酵素 ϵ サブユニットの減少が観察され、それらはウェスタンブロット解析など幾つかの実験で再度確認された (Figure 2-11; Figure 2-18)。これまでに ATP 合成酵素の 1 つのサブユニットが選択的に減少するという報告はなかった。しかし、生命にとってもっとも重要なエネルギー運搬体である ATP を作り出す ATP 合成酵素は、植物の環境ストレス研究においてしばしば登場している。

例えば、乾燥ストレスなどで *pmf* が光阻害によって高いレベルに達するような場合に、葉緑体 ATP 合成酵素量が低下することがヒマワリを用いた研究から報告されている (Tezara et al., 1999)。また、強い qE 応答が誘導されるような条件下のシロイヌナズナやクラミドモナスにおいては、LEF の強い抑制によるプロトンの流入低下が誘導され、ATP 合成酵素 γ サブユニットの不活性が起こることが報告されている (Bosco et al., 2004)。さらに、葉緑体 ATP 合成酵素 α サブユニット (Burkey and Mathis, 1998) と β サブユニット (Jiao et al., 2004) においては、強光下で異なったアイソフォームが検出された例もある。これはストレス下で異なった酵素制御が行われていることを示唆する。

そんな中、強光乾燥ストレス下における ϵ サブユニットの選択的減少はこれまで観察されていなかった。本章の後半で見られた極度な強光乾燥ストレス下における ATP 合成酵素複合体全体の減少とあわせて考えても、ATP 合成酵素はストレスの種類や段階でさまざまな挙動を示し、それぞれの環境に応答していることが予想される。特に強光乾燥下ではチラコイド膜の電気化学ポテンシャルに大きな変化が生じるため光合成関連因子にも影響が生じることが考えられる。

2-4-3. 葉緑体 ATP 合成酵素の構造変化から予想される機構

葉緑体 ATP 合成酵素 ϵ サブユニットは、同酵素の γ 及び III サブユニットと共に回転軸を形成し、これが触媒サブユニットである α_3 と β_3 の 6 量体中で回転することにより、ATP 合成反応が触媒されることが知られている(Richter et al., 2005)。葉緑体 ATP 合成酵素は、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ サブユニットから構成される CF_1 と、チラコイド膜に結合した I、II、III、IV サブユニットから構成される CF_o から成っている(Figure 3-1)。 α サブユニットは制御サブユニット、 β サブユニットは ATP 合成、 γ は ATP 合成酵素の回転軸に関わる。 ϵ タンパク質を *in vitro* で人工的に欠失させた実験から、 ϵ サブユニットはルーメンからストロマへのプロトン漏洩を抑制し、チラコイド膜の電気化学的ポテンシャルを ATP 合成に共役させる上で重要な機能をもつことが示されていた (Patrie, 1984; Cruz et al., 1995)。

そのため、ATP 合成酵素から ϵ サブユニットが選択的に欠損することはチラコイド膜の共役能力が低下することを意味する。ATP 合成酵素における ϵ サブユニットの役割は 1960 年代には明らかにされていた(MaCarty and Racker, 1968)。その後も多くの研究が行われ、構造と共に機能やさまざまな人工的な環境下における挙動も明らかになっている(Evron et al., 2000a; Richter et al., 2005)。しかし、自然環境下において ϵ サブユニットがどのように振舞うのか、それを観察した報告はまだない。

本研究で見られた、強光乾燥ストレス状況下での ϵ サブユニットの ATP 合成酵素からの選択的減少は、外的な自然環境に応じてチラコイド膜の共役を調節するメカニズムであると考えられる。

3-4-4. チラコイド膜における電子伝達系とリン酸化系の脱共役

本章では単離チラコイド膜を用いて膜の脱共役を検証する実験を幾つか行った。その結果、 ϵ サブユニットが選択的に減少するストレス中期の条件下においては、チラコイド膜の脱共役を示唆する結果や(Figure 2-16)、 ΔpH の低下(Figure 2-17) などが観察された。また ATPase 活性の増加も確認されている(Kohzuma et al., 2009)。そして、それらの現象は組み換え ϵ サブユニットを添加することによって、すべてコントロール植物の挙動に回復した。チラコイド膜において電子伝達系と ATP 合成酵素の脱共役が起こった場合、葉緑体チラコイド膜ではどのような現象が起こるのだろうか？

一つに、チラコイドルーメンからストロマへのプロトンの漏洩が考えられる。しかし、現段階において葉緑体内のプロトンの挙動を直接的にモニターする方法は確立されておらず、その真意の判断は困難である。本研究では qE や ECS などの間接的なパラメータを解析することで、プロトンの挙動を観察した。

qE は高いプロトン勾配によって誘導される。本研究において強光乾燥ストレ

スに曝された植物の qE の解消速度がコントロール植物よりも高い値を示した (Figure 2-9)。qE の誘導と解消に関わる因子は VDE であり、その酵素反応によるものである。そのため qE の解消が酵素活性の低下（もしくは活性化）によるものであるのか、または純粋にプロトン濃度の変化によるものであるかは定かではない。しかし、プロトン勾配が低下していることは単離チラコイド膜の実験から明らかであるため (Figure 2-16, Figure 2-17)、一度形成されたプロトン勾配がプロトンの膜からの漏洩による影響で解消されやすくなり qE の解消速度が高い値を示したことが考えられる。

また、シングルターンオーバー・フラッシュの実験の結果、コントロール植物と ϵ サブユニットが選択的に減少している植物体における ECS の解消速度は後者の方が高い値を示した (Figure 2-19)。一般的に、チラコイドルーメン内のプロトンは ATP 合成酵素を介して ATP を合成することでストロマへ流出すると考えられている。しかし、 ϵ サブユニットが欠損している ATP 合成酵素には ATP を合成する能力はない。このことから ECS の解消速度の増加は ATP 合成を介さないプロトンのストロマへの移動を示唆するものである。

2-4-5. 強光乾燥ストレス下で誘導されるチラコイド膜脱共役の生理的意義

葉緑体のチラコイド膜は ATP や NADPH を合成するエネルギー生産の場である。葉緑体と同様に電気化学ポテンシャルを利用して ATP 合成を行なう場合はミトコンドリアのクリステ膜にも存在する。しかし、ミトコンドリアにおいては、チラコイド膜における光エネルギーとは異なり、電子伝達の初期反応に必要なエネルギー供給を細胞内で賄う。また、電子伝達に伴うプロトン輸送と蓄積が外膜向きに行なわれる。このため、膜内外の ΔpH は pH 緩衝効果により軽減され、膜ポテンシャルは主に電位差として保存される。

一方、チラコイド膜は生体自身では調節できない太陽光という外部エネルギーで駆動しており、葉緑体チラコイド膜においては電子伝達に伴い内向き(ルーメン内)にプロトン輸送が行なわれ、その電気化学的ポテンシャルは主に pH 濃度勾配として、閉鎖された袋状をしているチラコイド膜ルーメン内腔の微小な空間に閉じ込められる。このような構造的要因や様式反応の違いからも、チラコイド膜にプロトン勾配が形成されると pH が極端に低下し、ルーメンの酸性化が予想される (Kramer et al., 1999)。チラコイド膜において電子伝達に関与するタンパク質のいくつかは pH の低下によって不安定になることが報告されている (Kramer et al., 1999)。しかし、qE 誘導に必要なキサントフィルサイクルは pH5.2 以下に低下することが必要であると言われていることから (Hieber et al., 2004)、チラコイド膜はルーメンの酸性化と隣り合わせで熱散逸を行っていることが推測される。これらの報告からも、チラコイドルーメンのプロトン勾配をルーメ

ン pH が極度に低下する恐れのある条件下において積極的にそれを解消する仕組みが存在していてもおかしくないと考え。ミトコンドリア内膜には電気化学的ポテンシャルを積極的に解消する UCP が存在するが(Fleury et al., 1997)、葉緑体には UCP 相同タンパク質の存在は確認されていない。本結果から、葉緑体 ATP 合成酵素 ϵ サブユニットの減少はチラコイドルーメンにおける pH 調節に関与しているのではないかと考えられる。

2-4-6. ϵ サブユニットが ATP 合成酵素から選択的に減少するメカニズム

本研究において、乾燥強光ストレス下の野生種スイカでは ATP 合成酵素の ϵ サブユニットが選択的に減少することを観察した (Figure 2-10; Figure 2-11; Figure 2-18)。また、幾つかの抗体反応を利用した局在解析から、 ϵ サブユニットは ATP 合成酵素から解離してストロマに存在する可能性は否定されている (Figure 2-11)。本研究は、 ϵ サブユニットの分解がチラコイド膜上で起こっているのか、一旦 ATP 合成酵素から解離した後、ストロマで起こっているのかは定かではないが、 ϵ サブユニットの減少は、その特異的分解によるものであることが示唆された。

強光乾燥下においてチラコイド膜の電子化学的ポテンシャルは大きく変化する。このような状況下において ϵ サブユニットの分解が観察されたことから、分解メカニズムには膜の電子化学的ポテンシャルに影響を与える因子が関与しているのではないかと予測した。本研究ではそれらを特定することは出来なかったが、単離チラコイド膜と組換え ϵ サブユニットを用いた実験から、 ϵ サブユニットの ATP 合成酵素からの選択的減少には、何らかのプロテアーゼが関与していることが示唆された (Figure 2-20 A-B; Figure 2-21)。光合成の機能制御にはタンパク質の分解が重要であることが知られている (Adam, 1996)。プロテアーゼは大きくセリンプロテアーゼ、金属プロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼの 4 種に分類される。葉緑体において光合成の機能発現を調節するプロテアーゼには SPP, CtpA, ClpP, FtsH, DSTP などが知られている (Adam and Clake, 2002)。野性種スイカの EST データベース解析より、強光乾燥ストレス下において ClpP や FtsH の mRNA の発現が上昇していることが確認されている (Akashi, 未発表)。さらに、FtsH は野性種スイカのプロテオーム解析において蓄積量の増加が報告されている (吉田, 2004)。ClpP は葉緑体コードで可溶性のセリンプロテアーゼでストロマに存在する (Shanklin et al., 1995)。ClpP は核コードの ClpC と複合体を形成し、ストロマにおける不要タンパク質の除去を行っていると考えられている。また、FtsH は光化学系 II の反応中心 D1 タンパク質の分解に関与する膜タンパク質である (Lindahl et al., 2000)。 ϵ サブユニットはチラコイド膜の表在タンパク質である。また、ストレスによってもストロ

マ画分に検出されないことから、 ϵ サブユニットは FtsH のようなプロテアーゼによって膜上で切断され、膜もしくはストロマで完全分解されるのではないかと予想される。これらの考察から、強光乾燥ストレス下の野性種スイカの葉緑体ではプロテアーゼが誘導されストレス応答に関与している可能性が考えられる。ATP 合成酵素の ϵ サブユニットが選択的に解離分解されるという現象から、ストレス下において ϵ サブユニットのみ標的とするプロテアーゼが誘導されるのではないかと考えられる。

第3章

光合成プロトンフラックスの強光乾燥ストレスの長期応答と

その生理機能

3-1. 序論

はじめに

これまでに野生種スイカが強光乾燥に対して優れた耐性を持っていることを多数紹介した。そして、耐性能を持つメカニズムを解明するために研究を行ってきた。その研究過程において、野生種スイカがさらに過酷なストレスを受けたときの生理応答および分子応答を見ることができた。そして、ATP 合成酵素を指標とした時、ストレス段階には、 ϵ サブユニットが選択的に減少するストレス中期と、ATP 合成酵素量全体が低下するストレス後期が存在することが明になった。

本章では、砂漠に生きる C_3 植物である野生種スイカを用いて、ストレスを付与していないコントロール植物体と、長期型の強光乾燥ストレスを受けた植物の生理応答変化をクロロフィル蛍光解析や Electrochromic Shift (ECS) 解析を用いて *in vivo* で比較した。そしてストレス条件下で生理変化を誘導する応答分子が何であるかを考察した。

3-1-1. 無傷葉を用いたカロテノイドの Electrochromic Shift 解析

高等植物の葉緑体に光を照射すると 475 nm 付近の吸光度が大きく減少し、515-520 nm 付近の吸光度が大きく増加した吸収スペクトルを示す。この 515 nm 付近の吸光度の増加は β -カロテンなどのカロテノイドに起因すると考えられている。そして、このカロテノイドは電場の変化によってその吸収帯が長波長側に移動することが知られている。そのため光エネルギーによってチラコイド膜内の電氣的性質が変化することでもカロテノイドの吸収波長が変化する。その場の電場が変化すると 515-520 nm 付近のカロテノイドシフトが起こる。光合成においては、チラコイド膜上で電子伝達が行われる時に電場変化が起こるため、カロテノイドシフトを観察することは同時にチラコイド膜のエネルギー変化を見ることに繋がる。このように電場の変化による分子の吸収変化をモニターする方法を Electrochromic Shift (ECS) 解析と呼ぶ。

3-1-2. ATP 合成酵素が関与するプロトン透過性

プロトンをルーメン内へ組み込む力を proton motive force (pmf) と呼び、 pmf は膜内外に形成された膜電位($\Delta\phi$)とプロトン勾配(ΔpH)によって形成される。チラコイド膜の電気化学ポテンシャルの変化は電子伝達とそれによって生じる pmf に依存しているといっても過言ではない。そして、 pmf と密接に関係する ΔpH もまたチラコイド膜の制御に関与している。チラコイドルーメンへ組み込まれたプロトンは主に ATP 合成酵素が ATP を合成する際に使うことで、ストロマへ流出される。このプロトン透過性を変化させる因子については、いくつか報告されている(Takizawa et al., 2007b)。ATP 合成酵素の γ サブユニットが酸化されるとジスルフィド結合を形成し不活性型になる(Bald et al., 2001)。この制御は、弱光下もしくは暗色下における ATP 合成酵素の回転を抑制し、プロトンの透過性を調節する(Kanazawa and Kramer, 2002; Avenson et al., 2005)。

チラコイド膜において ATP 合成酵素はプロトンのルーメンからストロマへ移動される主な因子である。そのため、ATP 合成酵素の活性化に伴ってプロトンの流出の度合いや pH 環境が変化することが *in vivo* 実験結果から明らかになっている(Kanazawa and Kramer, 2002; Avenson et al., 2005)。ATP 合成酵素の活性はストロマの無機リン酸量に依存するため、無機リン酸量が低下するとプロトンのルーメンからストロマへ流出も低下する。その他にも、ATP 合成酵素活性化には β サブユニットのリン酸化修飾が必要であることが示唆されている(Bunney, van Walraven et al. 2001)。

このように、チラコイド膜においてプロトン透過性と ATP 合成酵素は密接な関係を持ち、 pmf に大きな影響を与える。本研究では、チラコイド膜のカロテノイドの吸収変化が反映する電場変化をモニターすることで pmf を算出し、強光乾燥下での生理応答を観察した。

3-1-3. PSI cyclic の役割と生理的意義

循環型電子伝達系(PSI cyclic)は PSI から PQ プールへの電子伝達を戻し、再び、シトクロム b_6/f 、プラストシアニン、PSI と電子を伝達する(Figure1-8)。PSI cyclic はルーメン内のプロトン上昇を導き、シトクロム b_6/f の Q_i サイトと FQR の作用により PQ の還元を引き起こす。その後、シトクロム b_6/f の Q_o サイトからのプロトン放出によって、 PQH_2 は酸化される。PSI cyclic の働きによって、電子が PSI から PQ プールへ戻るため、NADPH や Fd は還元型にならない。また、PSI cyclic による pmf の上昇は ATP の生成や qE の活性化に貢献することが報告されている(Baker et al., 2004)。PSI cyclic は、その測定法が完全に確立されていないことから、その最大活性や葉緑体におけるエネルギー収支への役割など、

明らかになっていないことが多い。

緒論でも述べたが、明反応は暗反応に必要なエネルギー運搬体である ATP と NADPH 生産の場である(Allen et al., 2003)。そのため、ATP と NADPH の量と比が、その下流のカルビン回路の活性を左右する。*Chlamydomonas* のような緑藻においては LEF を抑制すると PSI cyclic が活性化することが観察されている。さらに、 C_4 植物において、PSI cyclic は維管束鞘細胞において CO_2 固定のために重要な働きを持つことも報告されている。 C_3 植物における役割はさまざまな方面で議論されているが、定常状態で PSI cyclic が光合成へ大きく寄与するという証拠は乏しい。そんな中、PSI cyclic はストレス環境下において ATP/NADPH 生産、および消費比が安定しない条件下で重要であることを示唆する報告がある(Cruz et al., 2005)。

3-1-4. チラコイドルーメンにおけるプロトンフラックス

チラコイド膜で実際に起こっている動きはプロトンの流入と流出という単純な挙動である。ストレスのない環境下において光合成系のバランスが取れている場合、この流入と流出は釣り合っていると考えられる。しかし、環境ストレス下ではプロトンの流出に対して流入量が増加するため、流入出のバランスが崩れ、チラコイド膜には高いプロトン勾配が形成される。このプロトンの流入のバランスが崩れた状況をストレスというのかもしれない。

上述したように、プロトン流出入のバランスが崩れるとチラコイドルーメンのプロトン勾配形成に影響が出る。高いプロトン勾配が形成され、qE が誘導される状況は主に 4 つの場合が考えられる(Avenson et al., 2004)。

一つはチラコイド膜において、プロトン流出量が流入量よりも低い場合である。ATP 合成酵素の活性低下などによってプロトンがストロマへ流出しにくい場合は *pmf* が増加し、チラコイドルーメンには高いプロトン勾配が形成される。

二つ目は LEF や PSI cyclic の活性によりプロトン流入量が増加する場合である。ATP の合成が一定の速度で行われると仮定すると、光によって誘導されるプロトンのルーメンへの流入が多ければ多いほど、ルーメン内のプロトン濃度は増加し、*pmf* の増加を導く。例えば、LEF や PSI cyclic の活性によりルーメンへのプロトン流入量が増加する場合、チラコイド膜ルーメンのプロトン量は増加する。

三つ目は *pmf* に占める ΔpH 画分の増加が考えられる。*pmf* は膜内外に形成された膜電位($\Delta\psi$)とプロトン勾配(ΔpH)から成る。その *pmf* の ΔpH 画分が増加することは高いプロトン勾配が形成されることを意味し、qE を誘導する。

四つ目は qE の pH 感受性の変化による影響が考えられる。qE 応答のキサント

フィルサイクルの構造変化を司る因子は VDE という酵素である。そのため、ストレスなどで酵素活性に変化が起こった場合、pH の感受性が変化することが予想される。

このように、チラコイド膜ではプロトンの流出入のバランスが非常に重要であることが分かる。そして、それらは環境の変化で容易に崩れるものであることも想像できる。

3-1-5. 本研究の目的

第 2 章では、強光乾燥下において ATP 合成酵素の ϵ サブユニットが選択的に減少し、この現象によってチラコイド膜が脱共役することを発見した。また、研究を行う過程で、さらに過酷なストレスに曝された野生種スイカを観察することができた。そのような野生スイカの ATP 合成酵素は ϵ サブユニットのみならず、全体の蓄積量が低下していることが明らかになった(Figure 2-18)。ATP 合成酵素はチラコイド膜においてプロトンの流出を調節する *in vivo* での重要な因子であることが知られている。厳しいストレスに暴露した植物体の生理的挙動を明らかにすることを目的とし、長期に渡る強光乾燥ストレスを付与した野生種スイカの生理解析を行った。

3-2. 材料と方法

3-2-1. 植物材料と栽培条件

野性種スイカ (*Citullus lanatus* sp.No101117-1) は第 2 章と同種の種を用い、米国の Washington State University において栽培した。500 ml サイズのプラスチックポットを用い、土を入れ播種した。これを気温 35°C、湿度 40%、光強度 550 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明期 16 時間の人工気象器中で栽培した。照明光源には蛍光灯 (CW/VHO, Sylvania, Frankfurt, Germany) と白熱灯を一緒に使用した。毎日灌水し、4000 倍希釈した液体肥料 Plant Food Plus (Schultz, USA) を 250 ml 与えた。なお、播種後約 2 週間目で第 4 葉が完全展開した植物体を実験に用いた。また、植物に乾燥ストレスを与える方法としては灌水量を調節することで行った。灌水量を 100 ml に減らし、ストレス 5 日目まで続けた。ストレス 6 日目には 50 ml、ストレス 7 日目には 0 ml とした。実験にはストレス 4 日目と 7 日目の第 4 葉を使用した。

3-2-2. 定常状態における ECS 解析

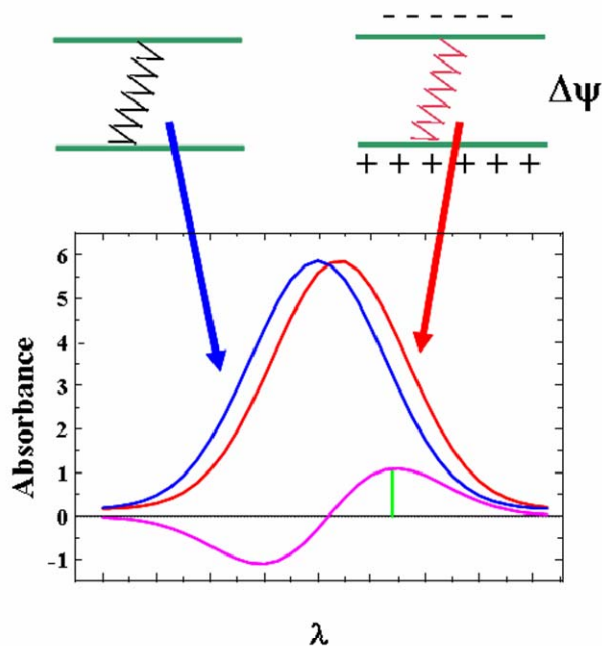
ECS 解析は野性種スイカの第 4 葉を使用し、気温 35°C、湿度 40% の環境下で測定を行った。葉を測定機に挟み、ECS とクロロフィル蛍光を同時に測定した (Sacksteder, Jacoby et al. 2001; Avenson, Cruz et al. 2005)。キネティックストレーヌを得るための光合成活性は、626 nm の赤色 LED (light emitting diodes) (HLMP EG15, Avago Technologies Inc., San Jose, CA) を 10 分以上照射することによって誘導した。クロロフィル蛍光測定において、測定光には 460nm の青色 LED (NSPB500AS, Nichia, Detroit, MI) を使用した。また、飽和光には平面レンズ (Fraen Corp., Reading MA) を用いて、635nm の赤色 Luxeon III LED (LXHL-PD09, Philips, San Jose, CA) を使用した。測定にあたって、作用光は 5 つの光強度 (76、151、288、517、697 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) を用いた。

クロロフィル蛍光は 720 nm 以上の赤外光を用いて測定した。測定は定常状態で行い、 $\sim 5,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の飽和光を用いて F_m と F_m' の値を得た。 F_m'' は作用光を消したあと 10 分間、 $\sim 5000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の 2 つの飽和光を用いて算出した。PSII の量子収率 (Φ_{PSII}) は $(F_m - F_s) / F_m$ から算出した (Takizawa et al., 2007a)。Linear electron flow (LEF) は $\text{PAR} \times \Phi_{\text{PSII}} \times 1/2$ から、 qE は $qE = F_m'' / F_m' - 1$ を用いて算出した。

Dark interval relaxation kinetics (DIRK) は定常状態下において 500 ms の暗色状態を与えることで測定した (Figure 3-1)。ESCt は定常状態から光を消去することで得られた最小の ECS 強度までの ECS の幅を示す。この ESCt は光で誘導

された pmf を表す。ATP 合成酵素を通るプロトンの透過性 (g_{H^+}) は光の消去によって ECS が解消するときの指数的解消速度の逆数から求めた。プロトンの流量 (v_{H^+}) は ECSt のキネティクストレースの初期スロープの傾きから算出した。

A



B

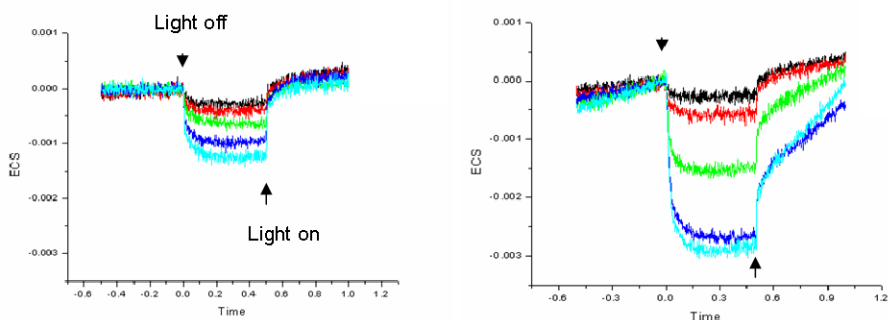


Figure 3-1. DIRK 測定の実験的データ

A, チラコイド膜に存在するカロテノイド類は電場の形成によって吸収波長を長波長側にシフトさせる

B, コントロール植物(左)とストレス植物(右)の ECS トレース。黒、赤、黄緑、青、水色のトレースはそれぞれ、76、151、288、517、697 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ のアクチニックライトの光強度を表す。

3-2-3. タンパク質抽出法とウェスタンブロッティング

タンパク質を抽出するための組織サンプルは完全展開した第4葉から直径12 mmのリーフディスクとして回収し、液体窒素で凍結した後 -60°C の冷凍庫で保存した。タンパク質抽出はリーフディスク1枚あたり、1 mlの抽出バッファー (100 mM Tricine-KOH, pH 7.5, 2 mM MgCl_2 , 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mM β -mercaptoethanol)で破碎し、13,000 rpm、5分間遠心してペレットを回収した。ペレットは80%アセトンで処理しクロロフィルを十分に除去した後、SDS-PAGE用のサンプルバッファー (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10 mM β -mercaptoethanol, 10% glycerol, 1% BPB) に懸濁した。このようにして調製したタンパク質サンプルは葉面積あたりで定量し、15% アクリルアミドを用いて、SDS-PAGEを行った。その後PVDF膜に転写し、ATP合成酵素の ϵ サブユニットおよび γ サブユニット、および光化学系IのDサブユニット、光化学系IIのPsbOサブユニットの抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。2次抗体にはペルオキシダーゼを付加したウサギの抗体を用い、ECL⁺ (Amersham Biosciences) によってX線フィルム(FUJIFILM)に感光させて検出した。検出バンドの定量にはLAS-3000(FUJIFILM)を用いた。

3-2-4. リーフディスクへの薬剤浸透法

測定のために人工気象器から取り出した植物体は、温度 35°C 、湿度40%の薄暗い測定室で1時間暗処理した。その後リーフディスクを切り出し、2 mlの薬剤溶液 (0.1% Tween20, 1 mM MV)を作成した12 mlのシリンジに入れて、減圧処理を行った。薬剤を浸透させたリーフディスクは薬剤溶液をしみ込ませたティッシュペーパーで包み、遮光して30分間静置した。コントロールとして作成した薬剤非添加溶液は0.1% Tween 20である。

3-3. 結果

3-3-1. 長期間の強光乾燥ストレスを付与した野生種スイカの表現型

ECS 測定を行うにあたって、野生種スイカの栽培は米国の Washington State University において行った。野生種スイカの栽培条件は第2章のそれと比較して、光質、光強度、温度、湿度が異なる。そのため、本実験に使用する野生種スイカの生育パラメータを測定した。野生種スイカを $550 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の光強度で生育させ、第4葉が展開した後、灌水量を5分の1に減らし、5日間生育した。その後、6日目にはさらに分量を灌水利、7日目には灌水を完全に停止し、計8日間の乾燥ストレスを与えた。

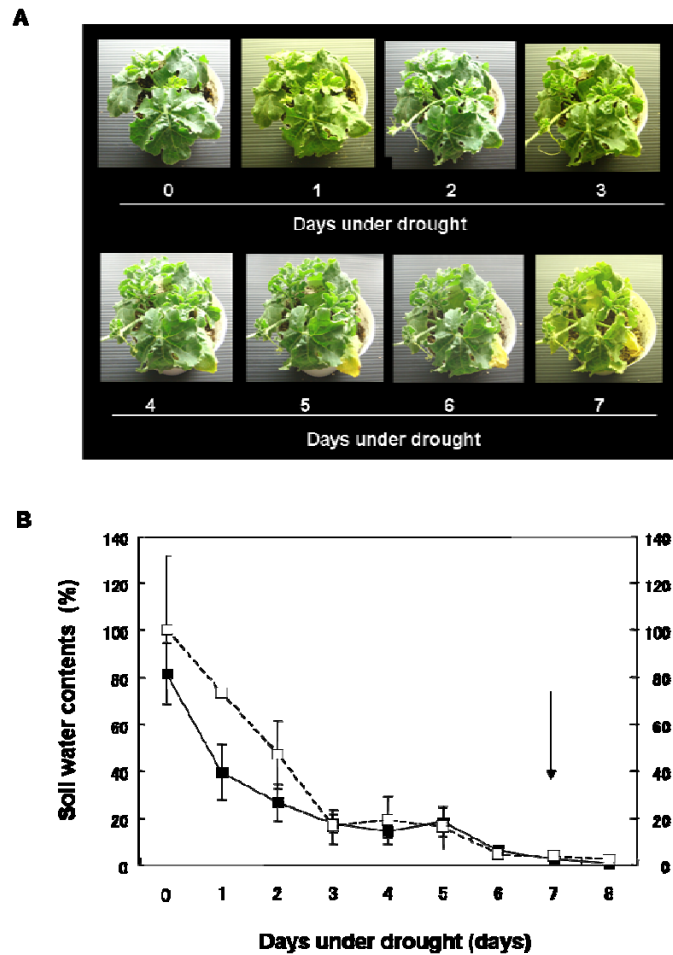


Figure 3-2. 長期間強光乾燥ストレスを付与した野生スイカの形態と生理応答

A. ストレス0日目からストレス7日目の野生スイカの表現型。

B. 乾燥ストレス下における土の水分含量(■)と、蒸散速度(□)の低下。↓は実験

に用いたストレス植物を意味する。

このように生育した野性種スイカの土壌の含有水分量を測定した(Figure 3-2B)。その結果、非ストレス状態を 100%とした時、ストレス 3 日目で約 20%まで低下した。その後、灌水を完全に停止した 6 日目以降は 5% 以下の水分しか保持しなかった。さらに、この際の蒸散速度を測定し、その減少を割合で表した(Figure 3-2B)。その結果、蒸散速度はストレス 1 日目で約 50% 低下した。その後、徐々に低下し、ストレス 3 日目には 20%まで低下した。灌水を停止したあとは、元の 10%以下とほぼ停止状態であった。これらの結果から、土壌の水分量の変化に伴って、蒸散速度が低下することが観察された。

3-3-2. 長期型の強光乾燥ストレス下におけるチラコイド膜の電子伝達

灌水停止する前のストレスを与えていない植物体(以下、コントロール植物)と蒸散がほぼ完全に停止したストレス 7 日目の植物体(以下、ストレス植物)の生理変化をクロロフィル蛍光解析と ECS 解析によって測定した。

まず、この 2 種類の植物体の最大量子収率(Fv/Fm)を測定した(Figure 3-3A)。この値は、種によらずストレス状態でなければ 0.83 付近の値を示す。両植物体は約 0.7 の値を示した。この値は、光化学系 II に若干の傷害があることを意味する。しかし、乾燥ストレスを付与してないコントロール植物においても低い値を示したことから、栽培条件に伴うストレスがあることが観察された。一方、ストレス植物においても同じ値を示したことから、乾燥ストレスによる光化学系 II への影響は認められなかった。

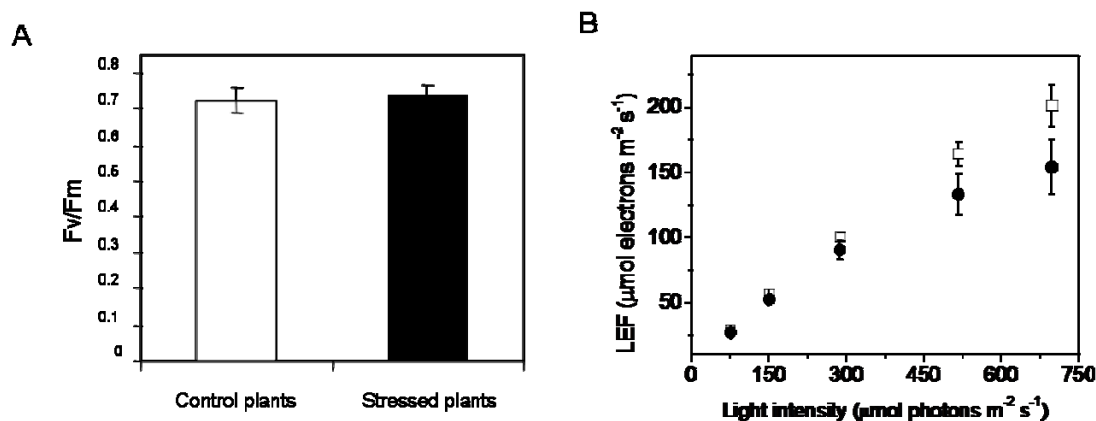


Figure 3-3. コントロール植物とストレス植物の最大量子収率と LEF

A, Fv/Fm : 左の白棒はコントロール植物体。右の黒棒はストレス 7 日目の植物体。

B, ETR : コントロール植物(□)とストレス植物(●) (n=5)

次に、コントロール植物とストレス植物において、定常状態でクロロフィル蛍光解析と ECS 解析を同時に行った。定常状態における作用光の光強度は 76、151、288、517、697 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ sec}^{-1}$ の 5 種を用いた。それぞれの光強度下における LEF をプロットした(Figure 3-3B)。その結果、両植物ともに光強度が増加するに従って LEF は増加し、最も光強度が高い 697 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ sec}^{-1}$ 下における値は、コントロール植物とストレス植物において、それぞれ約 200 $\mu\text{mol electron m}^{-2}\text{ sec}^{-1}$ と約 150 $\mu\text{mol electron m}^{-2}\text{ sec}^{-1}$ であり、大きな電子伝達の低下は見られなかった(Figure 3-3B)。

3-3-3. 長期型の強光乾燥ストレス下における qE の応答

LEF の変化に対して qE の値をプロットした(Figure 3-4.A)。その結果、コントロール植物およびストレス植物ともに、151 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ sec}^{-1}$ 以下の低い LEF 下では qE がコントロール植物とストレス植物で類似の挙動を示した。一方、高い光強度下で測定し高い LEF を示し時、qE の値はストレス植物で大きく増加した(Figure 3-4.A)。

また、同じ光強度下におけるコントロール植物とストレス植物の qE 値の差は 151 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ sec}^{-1}$ 以下では見られず、288 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ sec}^{-1}$ 以上では、強光になるに従って増加し、最も光強度が高い 697 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ sec}^{-1}$ 下での測定においては約 4 倍の qE 値を示した (Figure 3-4B)。

次に、*pmf* を反映する ECSt を 5 種の光強度においてそれぞれ測定した(Figure 3-5A)。さらに、ECSt (*pmf*) に対する qE の値をプロットした (Figure 3-5B)。このプロットを行うことで、ECSt (*pmf*) が変化するときのルーメン内におけるプロトン蓄積の挙動を観察することができる。その結果、コントロール植物では光強度の増加に伴う ECSt (*pmf*) の増加はストレス植物と比較して非常に低い値を示した。一方、ストレス植物では光強度の増加に伴って、大きな ECSt (*pmf*) の増加が観察された。さらに、ECSt (*pmf*) の増加に対する qE 値の変化はコントロール植物とストレス植物で大きく異なった。

ストレス植物においては ECSt (*pmf*) の大きな増加に伴って qE の増加が見られた。興味深いことに、コントロール植物ではある任意の ECSt (*pmf*) の値に対する qE 値がストレス植物と比較して高い値を示した。この結果は、コントロール植物とストレス植物で ECSt (*pmf*) に対する qE 感受性が異なることを意味する。

これらの結果から、ストレス植物はコントロール植物と比較して、強光下において qE が大きく増加し、この qE の増加は ECSt (*pmf*) に由来していることが示唆された。

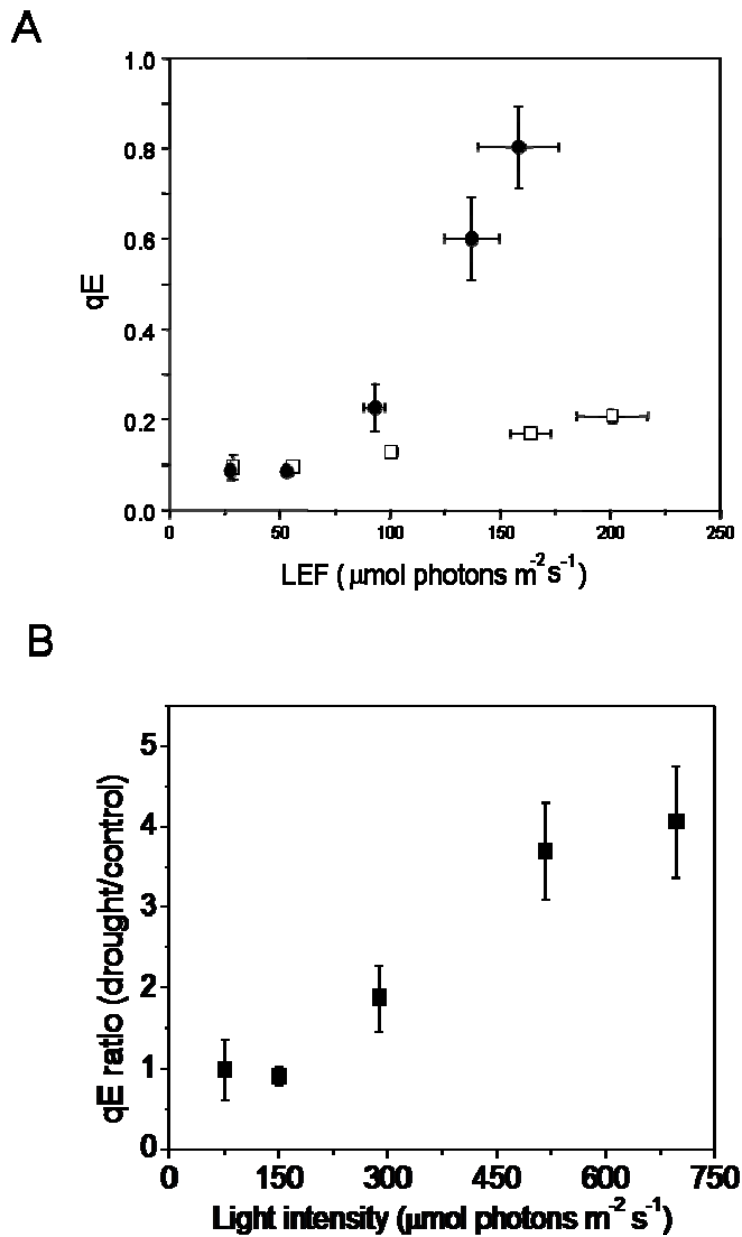


Figure 3-4. LEF 依存的な qE の変化

A, コントロール植物(\square)とストレス植物(\bullet)における LEF と qE との関係。

B, 5つの光強度下におけるコントロール植物とストレス植物の qE 値の差。
($n=5$)。

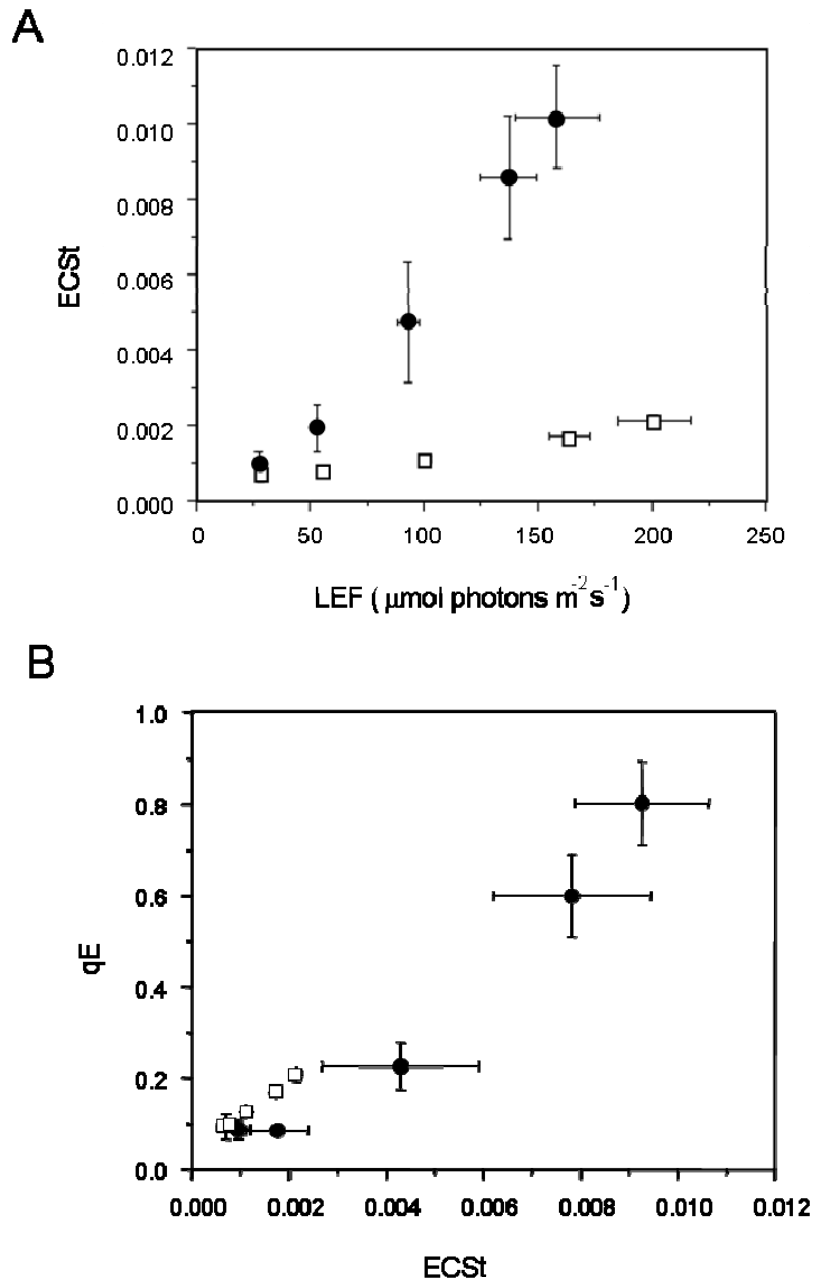


Figure 3-5. ECSt (pmf) と qE の関係

A, 5つの光強度下でのコントロール植物(□)とストレス植物(●)における ECSt を測定した。

B. ECSt (pmf)に対する qE 値のプロット。(n=5)。

3-3-4. プロトン流量 (νH^+) から反映される PSI cyclic の測定

コントロール植物とストレス植物の DIRK 解析の結果、同じ LEF の時の両者の *pmf* の値は大きく異なった(Figure 3-5.A)。LEF が一定である場合、ストレス植物のような高い *pmf* を示す理由には、LEF 以外の電子の流れが存在することが予想される。その候補として PSI cyclic の関与が考えられる。この *pmf* の違いが PSI cyclic によるものであるかどうかを見るためにプロトンの流入量(νH^+)を測定した。チラコイドルーメンを介したプロトン流入量は、ある光環境下において、その植物が示す *pmf* とプロトンの単位時間あたりの透過率 (gH^+)をかけた値である。

このようにして算出したプロトン流量の値を LEF に対してプロットした(Figure 3-6.A)。この関係を見ることでプロトンフラックスが関与するさまざまな変化を解釈することができる。コントロール植物およびストレス植物の両者とも、LEF の増加に従ってプロトン流量も増加した。コントロール植物における LEF に対するプロトン流量増加の傾きは $0.00239 \pm 2.7 \times 10^{-4}$ であり、ストレス植物においては $0.00319 \pm 1.6 \times 10^{-4}$ であった。この結果から、コントロール植物の LEF に伴うプロトン流量を 100%とした時、ストレス植物のプロトン流量は約 33.4%大きいことが示された (Figure 3-6.A)。プロトン流量の増加の主な要因が PSI cyclic であるとするならば、ストレス植物はコントロール植物よりも PSI cyclic 活性が高いことが示唆される。

さらに、PSI cyclic の活性化を評価するために、リーフディスクにメチルビオローゲン(MV)を浸透させて PSI cyclic 活性を抑制し、その時のプロトン流量を測定した(Figure 3-6.B)。MV は非常に強い電子受容体であり PSI から電子を引き抜き、酸素に電子を渡す性質がある。MV で処理された葉は PSI cyclic を停止させることが可能である。

このように MV で PSI cyclic を不活性化したリーフディスクを用いて、LEF とプロトン流量(νH^+)の関係を解析した。コントロール植物由来のリーフディスクに MV を浸透させ、プロトン流量を測定したところ、MV 処理を行っていない葉との間に違いは見られなかった(Figure 3-6. B)。一方、ストレス植物で同様の実験を行った場合、ストレス植物のプロトン流量はコントロール植物と比較して高い値を示したが、MV 処理を行うと、高いプロトン流量が消失することが観察された。この結果は、ストレス植物で誘導されていた PSI cyclic の高い活性が MV で抑制されたことを示す。MV 処理を行ったストレス植物の挙動とコントロール植物の挙動が類似していたことから、ストレス植物で観察されたプロトン流量増加の構成成分の多くの部分を PSI cyclic が占めていることが示唆された。

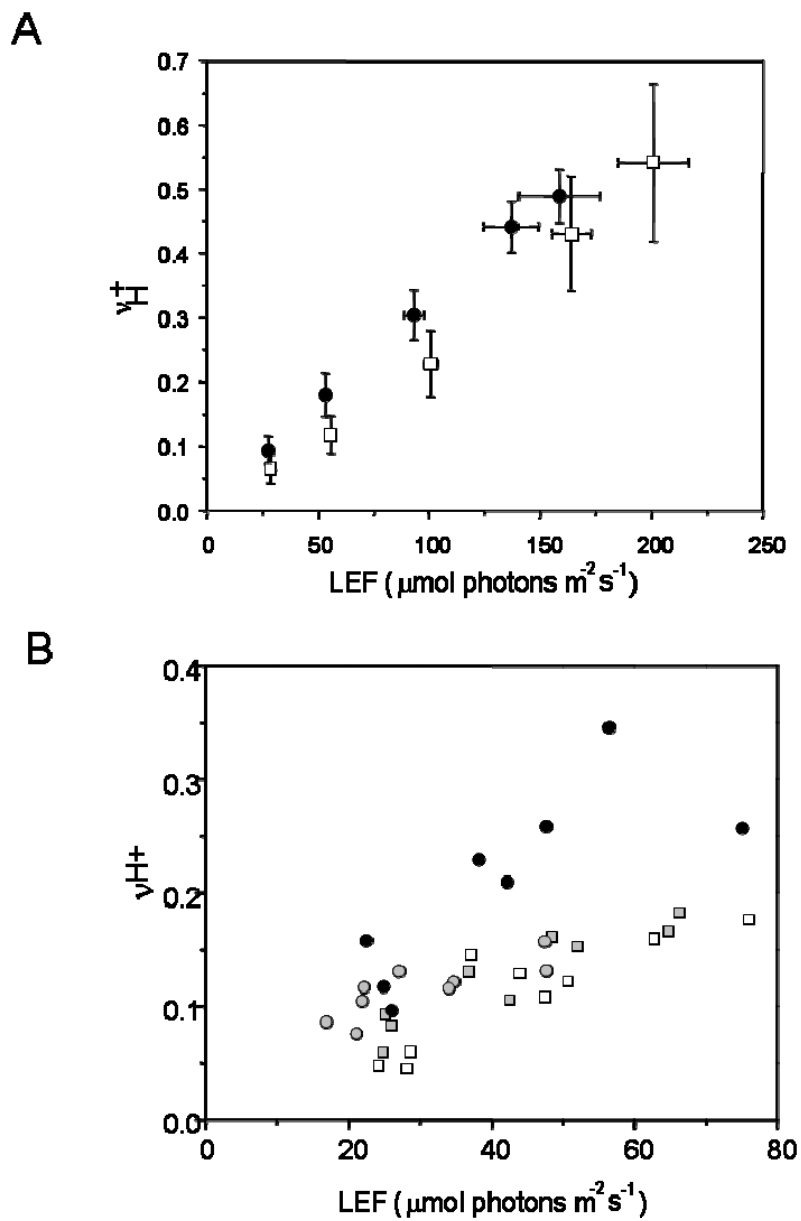


Figure 3-6. LEF と光誘導プロトン流量の変化

A, コントロール植物(\square)とストレス植物(\bullet)の LEF に対する v_{H^+} の応答性。(n=5)。
 B, リーフディスに MV を処理し、3 つの光強度で ECS を測定した際のプロトンの流入量(v_{H^+})の変化。ストレス植物を \bullet 、コントロール植物を \square で表し、MV で処理したストレス植物を \bullet 、コントロール植物を \blacksquare で表した。

3-3-5. ストレス下におけるプロトン透過性 (gH^+) の挙動

チラコイドルーメンに高いプロトン勾配が形成されるメカニズムは大別して2つ考えられる。一つはルーメン内へのプロトン流入量が増加すること、もう一つはチラコイド膜のプロトン透過性が低下することである。チラコイド膜においてプロトンルーメンからストロマへの透過させる主な分子はATP合成酵素である。そのため、プロトン透過性を観察することはATP合成酵素の分子挙動を間接的に観察すること可能である。プロトン透過性 (gH^+)はDIRK解析において、作用光を消去した際の解消速度から算出した。

はじめに、プロトン透過性 (gH^+) の値をLEFに対してプロットし、コントロール植物とストレス植物における挙動の違いを観察した(Figure3-7A)。コントロール植物におけるLEFに対するプロトン透過性 (gH^+)は、 $76 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の光強度下では約100の値を示し、 $697 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の光強度下では約280の値を示した。このように、コントロール植物のプロトン透過性はLEFの増加に伴って高い値を示した。ストレス植物においては $76 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の光強度下では約100を示しコントロール植物とほぼ同値を示した。しかし、 $697 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の光強度下では約60を示し、コントロール植物の挙動とは反して低い値が観察された。

また、同じ光強度下におけるコントロール植物とストレス植物のプロトン透過性 (gH^+) 能力の差は $76 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ では見られず、それ以上の光強度下では、強光になるに従って増加し、最も光強度が高い $697 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 下での測定においてはコントロール植物のプロトン透過性 (gH^+)能力はストレス植物のそれよりも約4倍高い値を示した。(Figure3-7B)。

これらの結果から、コントロール植物は光強度依存的にATP合成酵素のプロトン透過性 (gH^+) 能力が増加することを示唆すると共に、ストレス植物では強光下においてATP合成酵素のプロトン透過性 (gH^+) 能力が低下することを示唆している。

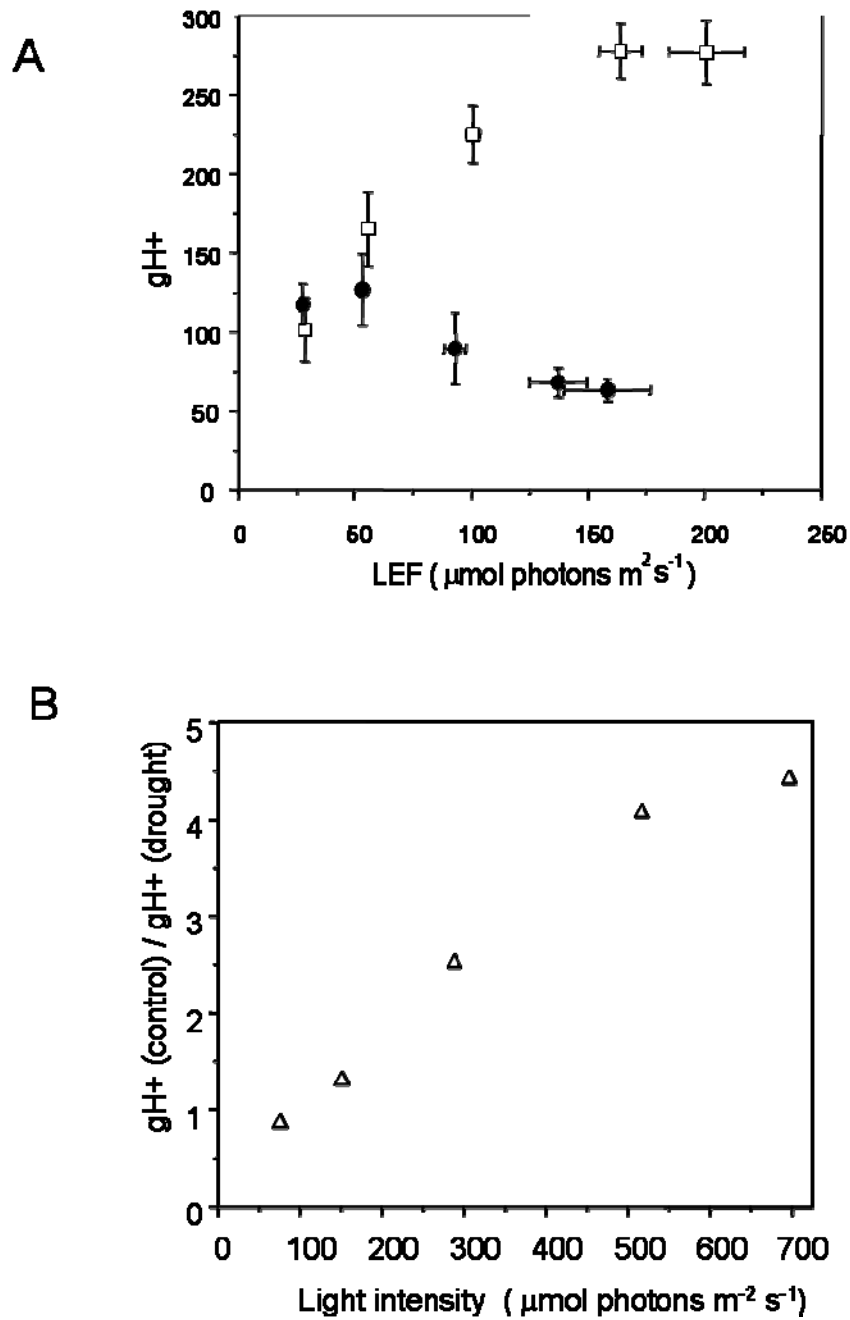


Figure 3-7. LEF と光誘導プロトン透過性 (gH+) の変化

A, コントロール植物(\square)とストレス植物(\bullet)の LEF に対する gH+ のプロット。

B, 5 つの光強度下におけるコントロール植物とストレス植物の gH+ 値の差。

($n=5$)。

3-3-6. ATP 合成酵素とシトクロム *b₆f* は極度なストレス下で減少する

植物が長期間の乾燥ストレスに曝されたとき、プロトン透過性を大きく左右する ATP 合成酵素の複合体の蓄積量がどのように変化するかを、ウェスタンブロットティングで解析した。この解析には ATP 合成酵素の ϵ サブユニット (AtpE) と γ サブユニット (AtpC) の抗体を用いた。同時にチラコイド膜タンパク質である光化学系 II の PsbO (PsbO)、光化学系 I の D サブユニット (PsaD)、およびシトクロム *b₆f* の IV サブユニット (PetD) の蓄積量もウェスタンブロットティングで観察した。コントロール植物とストレス植物において、それぞれのタンパク質の蓄積量を葉面積あたりで比較した結果、ストレス植物の γ サブユニット、 ϵ サブユニットは共にストレス前の約 50% に低下した (Figure 3-8.A-B)。この結果は、長期に渡る強光乾燥ストレス下では ATP 合成酵素の全体量がチラコイド膜上で大きく減少することを示唆する。同様にシトクロム *b₆f* の IV サブユニットの蓄積量もストレス前の 40% 以下に減少した。しかし、光化学系 II と光化学系 I を構成するサブユニットの減少は見られなかった (Figure 3-8.A-B)。これらの結果から、長期に渡る過度なストレス条件下では、ATP 合成酵素やシトクロム *b₆f* の蓄積量が減少し、光化学系は比較的安定していることが明らかになった。

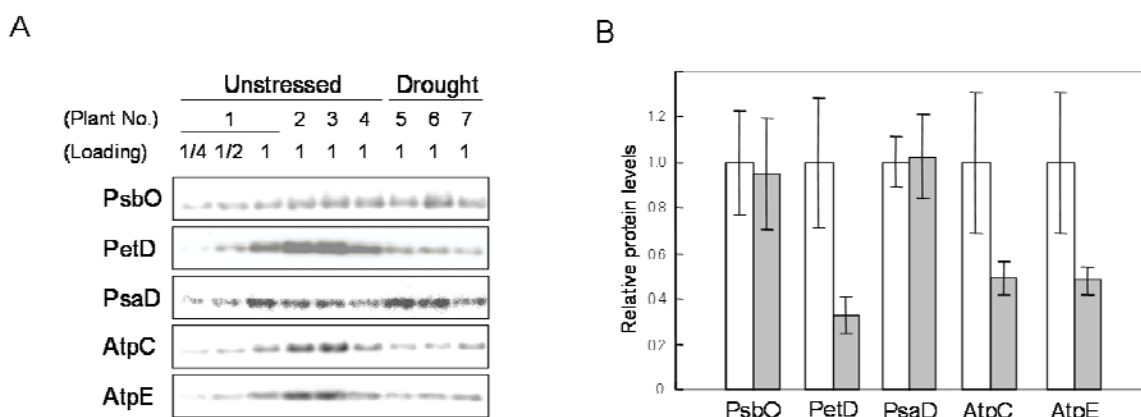


Figure 3-8. 長期間強光乾燥ストレスを付与したチラコイド膜タンパク質の蓄積量

A: チラコイド膜タンパク質のウェスタンブロットティング。0 日目は 1/2 倍、1/4 倍量を一緒に泳動し検量した。各レーンは葉面積あたりで定量し、SDS-PAGE に供した。

B: チラコイド膜タンパク質のウェスタンブロットティング定量。白棒はコントロール植物。灰色棒はストレス植物。(n=3-4)

3-4. 考察

3-4-1. 野生種スイカの長期における強光ストレスへの生理応答

コントロール植物とストレス植物の LEF を比較した結果、もともと光強度が高い測定光条件下においてもわずかな差しか見られなかった。これまで LEF の変化が光合成系の生理応答の指標であった。しかし、本研究において、LEF の大きな低下を観察することなく、ストレスで誘導されると考えられていた qE の高い値が確認された。また、劇的なプロトン透過性の低下や PSI cyclic の増加も観察され、光合成に関与するさまざまなパラメータに変化が見られた。

3-4-2. チラコイド膜のプロトン勾配形成と qE の誘導

チラコイド膜内外に高いプロトン勾配が形成されると qE が誘導され余剰な光エネルギーは熱に変換されて細胞外へ放出される。言い換えると qE の誘導には高いプロトン勾配が形成される必要がある。この高いプロトン勾配が形成されるメカニズムには前述したように 4 つ方法が考えられる。

一つはチラコイド膜のプロトン透過性の低下による高いプロトン勾配の形成。二つ目は LEF や PSI cyclic の活性によるプロトン流入の増加による高いプロトン勾配の形成。三つ目は、*pmf* の Δ pH 画分の増加。四つ目は、qE 誘導に必要なキサントフィルサイクルや PsbP の感受性が変化することである。

もし、強光乾燥ストレス下において、*pmf* の Δ pH 画分の増加や qE 誘導システムが変化しているのであれば、qE と *pmf* の関係はストレス前後で大きく変化する。この結果から、ストレス植物において高い qE が観察される原因としては、プロトン透過性の低下、あるいはプロトン流入の増加が考えられる。

本測定の結果、ストレス植物の ECSt の値はストレス植物と比較して 4~5 倍高いことが確認された(Figure3-4)。この結果から、ストレス植物の qE の増加は *pmf* 増加によって起こることが示された。また、同時にプロトン透過性は低下した(Figure3-7.A)。プロトン透過性は qE レスポンスに大きな影響を与える因子である。約 700 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の光強度下でのプロトン透過性のコントロール植物とストレス植物の比は弱光強度で測定した際の比の約 5 倍であった(Figure3-7.B)。また、同じ光強度で測定した qE のストレス植物とコントロール植物の差もほぼ同じ挙動を示した(Figure3-4.B)。これらの結果から、ATP 合成酵素の活性化状態が低下するような乾燥ストレス下においては、PSI cyclic の活性化が qE 誘導を担っていることが示唆された。

本研究で観察された野性種スイカのプロトン透過性の挙動は、他の植物には見られない。非ストレス下の野性種スイカでは、LEFが増加することによってプロトン透過性が増加する。一方、ストレス植物ではプロトン透過性の低下が観察された。強光下のコントロール植物では最大約 300 を示す値が得られた(Figure 3-7. A)。この値はシロイヌナズナやタバコで同様な実験を行った場合の約 3-4 倍の値である。このように、非常に大きな値を示した理由の一つに、高い生育温度が考えられる。実際、低温で生育した野性種スイカのプロトンコンダクティビティーを測定した際、35°Cで生育した値よりも 4 倍低い値を示した(data not shown)。また、コントロール植物のプロトン透過性が光依存的に増加したことや、乾燥処理によって低下することは、タバコやシロイヌナズナでは見られない現象である。これらの結果は、植物の生理状態に応じてプロトン透過性に変化が生じることを示唆する。

3-4-3. ATP 合成酵素はその蓄積量を低下させることでストレスに適応する

本研究の結果、極度なストレス環境下において、ATP 合成酵素の量が大きく低下することが観察された(Figure 3-8)。同時に、プロトン透過性が低下することも観察された。実際に、このようなストレス植物においては qE が強く誘導されることも明らかになった(Figure 3-4.A)。ストレス下において LEF が低下し、プロトン流入が減少しても、チラコイドルーメンからストロマへのプロトン透過性が低下すればプロトン勾配を保持できる。このように長期に渡る強光乾燥ストレスを受けた植物体では ATP 合成酵素量を低下させてチラコイド膜の密閉性を高めていると考えられる。そのため、ATP 合成酵素はチラコイド膜の電気化学ポテンシャルを調節する主な因子であり、環境順化に重要であると言えるかもしれない。

このような環境下ではチラコイド膜タンパク質である光化学系 II や光化学系 I などの光化学系は非常に安定しており、その蓄積量は変化しない(Figure 3-8)。一方、シトクロム *b₆f* の IV サブユニット(PetD)の蓄積量は ATP 合成酵素と同じように 40%以下に減少する。長期に渡る過度なストレス条件下では光化学系が比較的安定であるが、ATP 合成酵素やシトクロム *b₆f* の蓄積量が減少することで、ストレスから身を守るのかもしれない。

本研究の結果、ATP 合成酵素は強光乾燥ストレス下において、まず ϵ サブユニットの蓄積量が低下することで膜を脱共役しチラコイド膜の電気化学ポテンシャルを緩和させる。続いて、ストレス後期では ATP 合成酵素全体量を低下させチラコイド膜の密閉性を高めることで、qE を誘導することが示唆された。

3-4-4. PSI cyclic は乾燥ストレス下において活性化される

本章において、LEF とプロトン流量の関係をコントロール植物とストレス植物で観察した(Figure 3-6.A)。また、ストレス植物葉内に MV を浸透させ、PSI cyclic を抑制することで PSI cyclic 活性を観察した(Figure 3-6.B)。その結果、コントロール植物と比較してストレス植物の PSI cyclic 活性は高かった。PSI cyclic は光合成研究において、現在もっとも注目されている機構である(Shikanai , 2003)。しかし、PSI cyclic 活性の測定法は確立されておらず、その生理的意義は議論されている。そのため、強光乾燥ストレスにおいて PSI cyclic の活性が増加することを示唆する報告はあったが、実際に測定して確認された例は本研究がはじめてである。ストレス植物における PSI cyclic 活性はストレス植物と比較して約 30%高い値を示した (Figure3-6.A)。この結果から、qE を積極的に誘導するために、PSI cyclic がプロトン流入量を増加させることが考えられる。

3-4-5. 長期に渡る強光乾燥ストレスへの光合成の生理応答

本章では、ATP 合成酵素の蓄積量変化と PSI cyclic の活性化によって長期に渡る強光乾燥ストレスへ光合成を馴化させていることを観察した。ストレス下における ATP 合成酵素の蓄積量の低下はプロトン透過性の低下を導くと考えられる。同時に PSI cyclic の活性化によってプロトン流入も確保されていた。これら二つの働きにより、qE が強く誘導されることが示唆された。qE は余剰なエネルギーを熱に変換して細胞外へ放出する生理応答である。極度な強光乾燥ストレス下においては、qE の誘導は植物にとって必要不可欠なエネルギー散逸機構であると考えられる。そのため、一定値を超えるプロトン勾配の形成は植物をダメージから守るために重要なメカニズムであると言える。そして、本研究において ATP 合成酵素がそれを誘導するのに働いていることがはじめて明らかになった。

第4章

結論

植物は多くの環境ストレスにおいて余剰な光エネルギーに暴露される。特に、強光乾燥下では気孔閉鎖に伴い CO_2 固定反応が停止し、ATP や NADPH が消費されず電子伝達系は過還元状態となるが、このときチラコイド膜の電気化学ポテンシャルがどのように制御されているについては知見が少ない。また、膜へのプロトン流入に関与し、チラコイド膜ポテンシャルを調節しているのではないかと考えられている光化学系 I の循環型電子伝達系がストレス環境下でどのような挙動を示すかは明らかではない。

このような余剰光ストレスに対する植物の応答機構を理解するために、乾燥強光耐性の C_3 植物である野生スイカを用いて、チラコイド膜タンパク質の挙動をプロテオミクス技術により解析した。その結果、葉緑体 ATP 合成酵素 CF_1 の ϵ サブユニットの蓄積量が乾燥強光ストレス下で顕著に減少していた。一方、同複合体を形成する β サブユニットおよび γ サブユニットの蓄積量には大きな変動は見られなかった。 ϵ サブユニットはチラコイド膜ルーメンからストロマへのプロトンの流れと ATP 合成を共役させるのに重要な役割を担っていると考えられる。従って、 ϵ サブユニットの減少によりプロトンがストロマへ漏出することが予想された。

電子伝達によるプロトン勾配と ATP 合成酵素が共役して行う ATP 合成はミトコンドリア内膜においても見られる。ミトコンドリアには脱共役タンパク質が存在し、低温下でプロトン勾配が意図的に解消される。しかし、これまでに葉緑体においては光エネルギーによって形成されたプロトン勾配を意図的に脱共役させるという報告はない。

そこで、クロロフィル蛍光解析においてチラコイド膜のプロトン勾配形成の指標となる qE のアクチニクライト消去後の解消速度を測定した。その結果、ストレスを与えた葉での解消速度は非ストレス葉と比較して2倍に増加した。

次に光照射下の単離チラコイド膜における ΔpH を pH プロブであるアミノアクリジンを用いて *in vitro* で測定した。その結果、ストレス条件下のチラコイド膜の ΔpH はストレス前と比較して低下した。

さらに、酸素電極を用い、野生スイカ単離チラコイド膜に光照射した際の電子伝達活性を脱共役剤添加の前後で比較し、チラコイド膜の共役率を解析した。その結果、非ストレス下の野生スイカ葉に由来するチラコイド膜は高い共役率を示したのに対し、強光乾燥下の野生スイカ葉に由来するチラコイド膜では共

役率の低下が見られた。更に、ストレス葉から調整した単離チラコイド膜に ϵ タンパク質を添加したところ、 ΔpH と共役率の顕著な回復が見られた。これらの両結果は、チラコイド膜ルーメンからストロマへのプロトン流出促進に、 ϵ サブユニットの選択的分解が直接的に関与していることを示す。

このように ϵ サブユニットが ATP 合成酵素から選択的に減少するような条件下において、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、non-focusing optics を利用した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。

アクチニック効果を持たない微弱な single-flash を葉に照射し ECS を発生させ、その解消速度を測定することで、膜からの proton flux を観察した。その結果、非ストレス下における ECS の解消速度の半減期は 107ms であるのに対し、ストレス葉では 40ms と早い解消速度を示した。この観察から、 ϵ サブユニットが選択的に減少するようなストレス下の植物のプロトンの膜からの流出速度が速いことが in vivo で証明された。

さらに、 ϵ サブユニットのみならず ATP 合成酵素の他の構成要素の蓄積量も低下するようなストレス後期の植物体の ECS 挙動を測定した。光照射定常条件下の葉に 300 ms の暗処理を行なった際の ECS 強度変化と ECS 減衰の時定数から、チラコイド膜を介したプロトン透過流量を見積った。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、灌水下に比べて強光乾燥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、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、灌水下の葉では 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の野生種スイカ葉において、PSIcyclic が活性化していることを示唆している。一方、ストレス下においてはチラコイドルーメンからストロマへのプロトンの透過性が大きく低下することが明らかになり、この現象と qE 増加に相関があった。これらの結果は、ストレス下において ATP 合成酵素量の低下と PSIcyclic 活性の増加によって qE による熱散逸が誘導されることを示唆している。

本研究の結果、野生スイカは強光乾燥ストレス下において、ATP 合成酵素はストレス中期において選択的に ϵ サブユニットの蓄積量は低下し、チラコイド膜の電気化学ポテンシャルを調節していることが観察された。また、ATP 合成酵素複合体全体が大きく減少するストレス後期では PSIcyclic 活性が促進することが明らかになった。

謝辞

2002年に奈良先端科学技術大学院大学の博士前期過程に入学してから、多くの方々に支えられ、研究生生活を送ることができました。

バイオサイエンス研究科 分化・形態形成学講座の横田明穂 教授をはじめ、明石欣也 助教、蘆田弘樹 助教、宗景ゆり 助教からは研究に関する多くのことをアドバイスしていただきました。特に、明石欣也 助教には学位取得まで細やかな指導をしていただきました。厚く感謝申し上げます。

また、七里吉彦 博士 (現 福山大学)、高原健太郎 助教(現 東京大学)をはじめとする野性種スイカグループの皆さんは、日々の研究生生活になくてはならない大切な存在でした。彼らとのディスカッションによって研究力が育まれたと思っています。バイオサイエンス研究科、細胞内情報学講座の稲垣直之准教授からはプロテオーム解析についてアドバイスをいただきました。

博士前期過程では、河内孝之 教授 (現 京都大学)、竹村美穂 准教授 (現 石川県立大学)の両先生にも大変お世話になりました。

さらに本研究は、東京工業大学の久堀徹 准教授、Washington State University の Prof. David M Kramer と Dr. Jeff A Cruz および Kramer 研究室の皆さんとの共同研究によって成し遂げられたものです。深く御礼申し上げます。また本実験には、バイオサイエンス研究科の塚本潤子 技官、元地球環境産業技術研究機構の嶋岡泰世 博士、元 NAIST プロテオーム室の桑野昌善 氏のサポートによって得られたデータが少なくありませんでした。皆さまありがとうございました。

なお、本論文の研究は日本学術振興会 (1850712)、東洋紡 100 年記念バイオテクノロジー研究財団、グローバル COE プログラム、萩原農場の研究支援によって行われたものです。

参考文献

- Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., and Walker, J. E. (1994). Structure at 2.8Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* *370*.
- Adam, Z. (1996). Protein stability and degradation in chloroplasts. *Plant Mol Biol* *32*, 773-783.
- Adam, Z., and Clarke, A. K. (2002). Cutting edge of chloroplast proteolysis. *Trends Plant Sci* *7*, 451-456.
- Albertsson, P. A. (2001). A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. *Trends Plant Sci* *6*, 349-354.
- Allen, J. F. (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. *1098*, 275-335.
- Aro, E. M., McCaffery, S., and Anderson, J. M. (1993). Photoinhibition and D1 Protein Degradation in Peas Acclimated to Different Growth Irradiances. *Plant Physiol* *103*, 835-843.
- Aro, E. M., McCaffery, S., and Anderson, J. M. (1994). Recovery from Photoinhibition in Peas (*Pisum sativum* L.) Acclimated to Varying Growth Irradiances. *Plant Physiol* *104*, 1033-1041.
- Asada, K. (1999). THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* *50*, 601-639.
- Avenson, T. J., Cruz, J. A., Kanazawa, A., and Kramer, D. M. (2005). Regulating the proton budget of higher plant photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 9709-9713.
- Avenson, T. J., Cruz, J. A., and Kramer, D. M. (2004). Modulation of energy

dependent quenching of excitons (qE) in antenna of higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 5530-5535.

Avenson, T. J., Kanazawa, A., Cruz, J. A., Takizawa, K., Ettinger, W. E., and Kramer, D. M. (2005b). Integrating the proton circuit into photosynthesis: progress and challenges. *Plant Cell and Environment* *28*, 97-109.

Baker, N. R., Harbinson, J., and Kramer, D. M. (2007). Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves. *Plant Cell Environ* *30*, 1107-1125.

Bald, D., Noji, H., Yshida, M., Hara-Hirono, Y., and Hisabori, T. (2001). Redox Regulation of the Rotation of F1-ATP Synthase. *JBiolChem* *276*, 39505-39507.

Bellafiore, S., Barneche, F., Peltier, G., and Rochaix, J. D. (2005). State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature* *433*, 892-895.

Blankenship, R. E., and Hartman, H. (1998). The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. *Trends Biochem Sci* *23*, 94-97.

Bosco, C. D., Lezhneva, L., Biehl, A., Leister, D., Strotmann, H., Wanner, G., and Meurer, J. (2004). Inactivation of the chloroplast ATP synthase gamma subunit results in high non-photochemical fluorescence quenching and altered nuclear gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* *279*, 1060-1069.

Bukhov, N. G., and Carpentier, R. (2003). Measurement of photochemical quenching of absorbed quanta in photosystem I of intact leaves using simultaneous measurements of absorbance changes at 830 nm and thermal dissipation. *Planta* *216*, 630-638.

Bukhov, N. G., Rajagopal, S., and Carpentier, R. (2002). Characterization of P700 as a photochemical quencher in isolated Photosystem I particles using simultaneous measurements of absorbance changes at 830 nm and

photoacoustic signal. *Photosynth Res* *74*, 295-302.

Bunney, T. D., van Walraven, H. S., and Boer, A. H. (2001). 14-3-3 protein is a regulator of the mitochondrial and chloroplast ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 4249-4254.

Burkey, K. O., and Mathis, J. N. (1998). Identification of a novel isoform of the chloroplast-coupling factor alpha-subunit. *Plant Physiol* *116*, 703-708.

Chow, W. S., Melis, A., and Anderson, J. M. (1990). Adjustments of photosystem stoichiometry in chloroplasts improve the quantum efficiency of photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 7502-7506.

Cramer, W. A., Soriano, G. M., Ponomarev, M., Huang, D., Zhang, H., Martinez, S. E., and Smith, J. L. (1996). SOME NEW STRUCTURAL ASPECTS AND OLD CONTROVERSIES CONCERNING THE CYTOCHROME b6f COMPLEX OF OXYGENIC PHOTOSYNTHESIS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* *47*, 477-508.

Cramer, W. A., Zhang, H., Yan, J., Kurisu, G., and Smith, J. L. (2004). Evolution of photosynthesis: time-independent structure of the cytochrome b6f complex. *Biochemistry* *43*, 5921-5929.

Cross, R. L. (2004). Turning the ATP motor. *Nature* *429*, 407-408.

Cruz, J. A., Avenson, T. J., Kanazawa, A., Takizawa, K., Edwards, G. E., and Kramer, D. M. (2005). Plasticity in light reactions of photosynthesis for energy production and photoprotection. *J Exp Bot* *56*, 395-406.

Cruz, J. A., Harfe, B., Radkowski, C. A., Dann, M. S., and McCarty, R. E. (1995). Molecular Dissection of e Subunit of the Chloroplast ATP Synthase of Spinach. *Plant Physiol* *109*, 1379-1388.

Evron, Y., Johnson, E. A., and McCarty, R. E. (2000a). Regulation of proton flow and ATP synthesis in chloroplasts. *J Bioenerg Biomembr* *32*, 501-506.

Evron, Y., and McCarty, R. E. (2000b). Simultaneous measurement of ΔpH and electron transport in chloroplast thylakoids by 9-aminoacridine fluorescence. *Plant Physiol* *124*, 407-414.

Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M. F., Surwit, R. S., Ricquier, D., and Warden, C. H. (1997). Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* *15*, 269-272.

Foyer, C. H., Lescure, J. C., Lefebvre, C., Morot-Gaudry, J. F., Vincentz, M., and Vaucheret, H. (1994). Adaptations of Photosynthetic Electron Transport, Carbon Assimilation, and Carbon Partitioning in Transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* Plants to Changes in Nitrate Reductase Activity. *Plant Physiol* *104*, 171-178.

Hieber, A. D., Kawabata, O., and 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. (1999). The g subunit in chloroplast F1-ATPase can rotate in a unidirectional and counter-clockwise manner. *FEBS Letters* *463*.

Hisabori, T., Kato, Y., Motohashi, K., Kroth-Pancic, P., Strotmann, H., and Amano, T. (1997). The regulatory functions of the gamma and epsilon subunits from chloroplast CF1 are transferred to the core complex, $\alpha_3\beta_3$, from thermophilic bacterial F1. *Eur J Biochem* *247*, 1158-1165.

Houtz, R. L., Portis, A. R., Jr. (2003) The life of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase--posttranslational facts and mysteries *Arch Biochem Biophys.* *414*, 150-158.

Ito, K., Abe, Y., Johnson, S. D., and Seymour, R. S. (2003). Mitochondrial uncoupling protein 2 in the central nervous system: neuromodulator and neuroprotector. *Biochemical Pharmacology* *65*, 1071-1021.

Jiao, S., Hilaire, E., and 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.

Johnson, G. (2004). Controversy remains: regulation of pH gradient across the thylakoid membrane. *Trends Plant Sci* *9*, 570-571.

Joliot, P., and Joliot, A. (2005). Quantification of cyclic and linear flows in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 4913-4918.

Joliot, P., and Joliot, A. (2006). Cyclic electron flow in C3 plants. *Biochim Biophys Acta* *1757*, 362-368.

Kalituho, L., Grasses, T., Graf, M., Rech, J., and Jahns, P. (2006). Characterization of a nonphotochemical quenching-deficient *Arabidopsis* mutant possessing an intact PsbS protein, xanthophyll cycle and lumen acidification. *Planta* *223*, 532-541.

Kanazawa, A., and Kramer, D. M. (2002). In vivo modulation of nonphotochemical exciton quenching (NPQ) by regulation of the chloroplast ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 12789-12794.

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

Kohzuma, K., Cruze, J. A., Akashi, K., Hoshiyasu, S., Munekage, Y. N., Yokota, A., and Kramer, D. M., (2009). The long-term responses of the photosynthetic proton circuit to drought. *Plant Cell and Environment*.

Kapoor, S., Wakasugi, T., Deno, H., and Sugiura, M., (1994) An *atpE*-specific promoter within the coding region of the *atpB* gene in tobacco chloroplast DNA. *Curr Genet*. *26*, 263-268

Kramer, D. M., Avenson, T. J., and Edwards, G. E. (2004a). Dynamic

flexibility in the light reactions of photosynthesis governed by both electron and proton transfer reactions. *Trends Plant Sci* *9*, 349-357.

Kramer, D. M., Avenson, T. J., and Edwards, G. E. (2004b). Response to Johnson: Controversy remains: regulation of pH gradient across the thylakoid membrane. *Trends Plant Sci* *9*, 571-572.

Kramer, D. M., and Crofts, A. R. (1989). Activation of the chloroplast ATPase measured by the electrochromic change in leaves of intact plants. *Biochimica et biophysica acta : International journal of biochemistry and biophysics*, *976*, 28-41.

Kramer, D. M., Cruz, J. A., and Kanazawa, A. (2003). Balancing the central roles of the thylakoid proton gradient. *Trends Plant Sci* *8*, 27-32.

Kramer, D. M., Sacksteder, C. A., and Cruz, J. A. (1999). How acidic is the lumen? *Photosynth Res* *60*, 151-163.

Krauss, S., Zhang, C. Y., and Lowell, B. B. (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 248-261.

Laloi, M., Klein, M., Riesmeier, J. W., and Muller-Rober, B. (1997). A plant cold-induced uncoupling protein. *Nature* *389*, 135-136.

Li, X. P., Bjorkman, O., Shih, C., Grossman, A. R., Rosenquist, M., Jansson, S., and Niyogi, K. K. (2000). A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* *403*, 391-395.

Lindhahl, M., Spetea, C., Hundal, T., Oppenheim, A. B., Adam, Z., and Andersson, B. (2000). The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell* *12*, 419-431.

Long, S. P., Humphries, S., and Falkowski, P. G. (1994). *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* *45*, 633-622.

Maia, I. G., Benedetti, C. E., Leita, A., Turcinelli, S. R., Vercesi, A. E., and Arruda, P. (1998). AtPUMP: an Arabidopsis gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein. *FEBS Letters* *429*, 403-406.

Majeran, W., Olive, J., Drapier, D., Vallon, O., and Wollman, F. A. (2001). The light sensitivity of ATP synthase mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* *126*, 421-433.

Mao, W. (1999). UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Letters* *443*, 326-330.

McCarty, R. E., and Racker, E. (1968). Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. 3. Activation of adenosine triphosphatase and ³²P-labeled orthophosphate -adenosine triphosphate exchange in chloroplasts. *J Biol Chem* *243*, 129-137.

Minagawa, J., and Takahashi, Y. (2004). Structure, function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins. *Photosynth Res* *82*, 241-263.

Mitchell, P. (1976). Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J Theor Biol* *62*, 327-367.

Miyake, C., Horiguchi, S., Makino, A., Shinzaki, Y., Yamamoto, H., and Tomizawa, K. (2005). Effects of light intensity on cyclic electron flow around PSI and its relationship to non-photochemical quenching of Chl fluorescence in tobacco leaves. *Plant Cell Physiol* *46*, 1819-1830.

Miyake, C., and Yokota, A. (2000). Determination of the rate of photoreduction of O₂ in the water-water cycle in watermelon leaves and enhancement of the rate by limitation of photosynthesis. *Plant Cell Physiol* *41*, 335-343.

Moroney, J. V., and McCarty, R. E. (1982). Light-dependent Cleavage of the γ Subunit of Coupling Factor 1 by Trypsin Causes Activation of Mg²⁺-ATPase

Activity and Uncoupling of Photophosphorylation in Spinach Chloroplasts. *J Biol Chem* *257*, 5915-1920.

Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawan, K., Endo, T., Tasaka, M., and Shikanai, T. (2004). Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* *429*, 579-582.

Munekage, Y., Hojo, M., Meurer, J., Endo, T., Tasaka, M., and Shikanai, T. (2002). PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in Arabidopsis. *Cell* *110*, 361-371.

Murayama, S., and Handa, H. (2000). Isolation and characterization of cDNAs encoding mitochondrial uncoupling proteins in wheat: wheat UCP genes are not regulated by low temperature. *Mol Gen Genet* *264*, 112-118.

Nanasato, Y., Akashi, K., and Yokota, A. (2005). Co-expression of cytochrome b561 and ascorbate oxidase in leaves of wild watermelon under drought and high light conditions. *Plant Cell Physiol* *46*, 1515-1524.

Nelson, N., and Yocum, C. F. (2006). Structure and function of photosystems I and II. *Annu Rev Plant Biol* *57*, 521-565.

Ort, D. R. (2001). When there is too much light. *Plant Physiol* *125*, 29-32.

Ort, D. R., and Oxborough, K. (1992). In situ regulation of chloroplast coupling factor activity. *Annu Rev Plant Biol* *43*, 269-291.

Patrie, W. J., and McCarty, R. E. (1984). Specific binding of coupling factor 1 lacking the delta and epsilon subunits to thylakoids. *J Biol Chem* *259*, 1121-1128.

Porra (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards

by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* *975*, 384-394.

Quiles, M. J. (2006). Stimulation of chlororespiration by heat and high light intensity in oat plants. *Plant Cell Environ* *29*, 1463-1470.

Richter, M. L., Patrie, W., MaCarty, R. E., (1984) Preparation of the e Subunit and e Subunit-deficient Chloroplast Coupling Factor ! In Reconstitutively Active Forms. *J.Biol.Chem.* *259*, 7371-7373.

Richter, M. L., Samra, H. S., He, F., Giessel, A. J., and Kuczera, K. K. (2005). Coupling proton movement to ATP synthesis in the chloroplast ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* *37*, 467-473.

Rossibnol, M., (2001) Analysis of the plant proteome . *Current Opinion in Biotech.* *12*, 131-134.

Sacksteder, C. A., Jacoby, M. E., and Kramer, D. M. (2001). A portable, non-focusing optics spectrometer (NOFOSpec) for measurements of steady-state absorbance changes in intact plants. *Photosynthesis Research*, *70*, 231-240.

Santoni, V., Rouquie, D., Doumas, P., Mansion, M., Boutry, M., Degand, H., Dupree, P., Packman, L., Sherrier, J., Prime, T., *et al.* (1998). Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane. *Plant J* *16*, 633-641.

Sarvikas, P., Hakala, M., Patsikka, E., Tyystjarvi, T., and Tyystjarvi, 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.

Schottler, M. A., Flugel, C., Thiele, W., and Bock, R. (2007). Knock-out of the plastid-encoded PetL subunit results in reduced stability and accelerated leaf age-dependent loss of the cytochrome *b6f* complex. *J Biol Chem* *282*, 976-985.

Schottler, M. A., Kirchoff, H., and Weis, E. (2004). The role of plastocyanin in the adjustment of the photosynthetic electron transport to the carbon metabolism in tobacco. *Plant Physiol* *136*, 4265-4274.

Schubert, M., Petersson, U. A., Haas, B. J., Funk, C., Schroder, W. P., and Kieselbach, T. (2003). Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* *278*, 13590.

Schumann, J., Richter, M. L., and McCarty, R. E. (1985). Partial Proteolysis as a Probe of the Conformation of the g Subunit in Activated Soluble and Membrane-bound Chloroplast Coupling Factor 1. *J Biol Chem* *260*, 11817-11823.

Seelert, H., Dencher, N. A., and Muller, D. J. (2003). Fourteen Protomers Compose the Oligomer III of the Proton-rotor in Spinach Chloroplast ATP Synthase. *JMolBiol* *333*.

Sambrook and Russell (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Shanklin, J., DeWitt, N. D., and Flanagan, J. M. (1995). The stroma of higher plant plastids contain ClpP and ClpC, functional homologs of *Escherichia coli* ClpP and ClpA: an archetypal two-component ATP-dependent protease. *Plant Cell* *7*, 1713-1722.

Shikanai, T., and Munekage, Y. (2003). Photosynthetic electron transport: reconsideration. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* *48*, 1394-1400.

Sonoike, K., Terashima, I., Iwaki, M., and Itoh, S. (1995). Destruction of photosystem I iron-sulfur centers in leaves of *Cucumis sativus* L. by weak illumination at chilling temperatures. *FEBS Letters* *362*, 235-238.

Streb, P., Josse, E. M., Gallouet, E., Baptist, F., Kuntz, M., and Cornic, G. (2005). Evidence for alternative electron sinks to photosynthetic carbon assimilation in the high mountain plant species *Ranunculus glacialis*. *Plant*

Cell and Environment 28, 1123-1135.

Takahara, K., Akashi, K., and Yokota, A. (2005). Purification and characterization of glutamate N-acetyltransferase involved in citrulline accumulation in wild watermelon. *Febs J* 272, 5353-5364.

Takizawa, K., Cruz, J. A., Kanazawa, A., and Kramer, D. M. (2007b). The thylakoid proton motive force in vivo. Quantitative, non-invasive probes, energetics, and regulatory consequences of light-induced pmf. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767, 1233-1244.

Takizawa, K., Cruz, J. A., and Kramer, D. M. (2007a). Depletion of stromal inorganic phosphate induces high 'energy-dependent' antenna exciton quenching (qE) by decreasing proton conductivity at CFO-CF1 ATP synthase. *Plant Cell and Environment*.

Tezara, W., Mitchell, V. J., Driscoll, S. D., and Lawlor, D. W. (1999). Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* 401, 914-917.

Tolbert, N. E. (1997). The C2 Oxidative Photosynthetic Carbon Cycle. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48, 1-25.

Trombetta, E. S., and Helenius, A. (1998). Lectins as chaperones in glycoprotein folding. *Curr Opin Struct Biol* 8, 587-592.

Tsunoda, S., Rodgers, A. J. W., Aggeler, R., Wilce, M. C. J., Yoshida, M., and Capaldi, R. A., (2001) Large conformational changes of the e subunit in the bacterial F1F0 ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98, 6560-6564.

UNEP (1991). <http://www.unep.or.jp/>

Vambutus, V. K., and Racker, E. (1965). RTIAL RESOLUTION OF THE ENZYMES CATALYZINE PHOTOPHOSPHORYLATION. I. STIMULATION OF PHOTOPHOSPHORYLATION BY A PREPARATION OF A LATENT,

CA⁺⁺- DEPENDENT ADENOSINE TRIPHOSPHATASE FROM CHLOROPLASTS. *J Biol Chem* *240*, 2660.

Vercesi, A. E., Borecky, J., Maia-Ide, G., Arruda, P., Cuccovia, I. M., and Chaimovich, H. (2006). Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annu Rev Plant Biol* *57*, 383-404.

Vidal-Puig, A. (1997). UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* *235*, 79-82.

Watanabe, A. (1999). AtUCP2: a Novel Isoform of the Mitochondrial Uncoupling Protein of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* *40*, 1160-1166.

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

Yoshida, K., Terashima, I., and Noguchi, K. (2007). Up-regulation of mitochondrial alternative oxidase concomitant with chloroplast over-reduction by excess light. *Plant Cell Physiol* *48*, 606-614.

Zhang-Lin, N., Hui, D., and Jia-Mian, W. (2005). N-terminal deletion of the subunit affects the stabilization and activity of chloroplast ATP synthase. *FEBS J* *272*, 1379-.

Zhang, L., and Aro, E. M. (2002). synthesis, membrane insertion and assembly of the chloroplast-encoded D1 protein into photosystem II. *FEBS Letters* *512*, 13-18.

Walker D (2001) 光合成測定 旭光通商株式会社

上妻馨梨(2004) 葉緑体 ATP 合成酵素 ϵ -サブユニットの解離による電子伝達リン酸化脱共役の可能性 バイオサイエンス研究科 修士論文.

高原健太郎(2006) 乾燥強光下の野生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.

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.

伊藤 繁, (2002) 光合成(佐藤公行 編) pp32-58、朝倉書店

宗景ゆり (2003) 変動する光環境に応答した光合成電子伝達制御の分子遺伝学的研究 バイオサイエンス研究科 博士論文

浅田浩二(1999) 葉の光環境変動に対する迅速適応。渡辺昭、篠崎一雄、寺島一郎。植物の環境応答-生存戦略とその分子機構-. 秀潤社. Pp107-119

平沢 正(1999) 水環境と植物の生態生理。渡辺昭、篠崎一雄、寺島一郎。植物の環境応答-生存戦略とその分子機構-. 秀潤社. Pp107-119 植物の環境応答-生存戦略とその分子機構-. 秀潤社. Pp50-58

論文目録

The long-term responses of the photosynthetic proton circuit to drought

Kaori Kohzuma, Jeffrey A Cruze, Kinya Akashi, Saki Hoshiyasu, Yuri Munekage,
Akiho Yokota and David M Kramer (2008) Plant Cell and Environment, In print

Energy dissipation by thylakoid uncoupling in a drought-tolerant C₃ plant

Kaori Kohzuma, Kinya Akashi, Yuri Munekage, Naoyuki Inagaki, Tohru Hisabori,
Taise Shimaoka, Ken-ichi Tomizawa and Akiho Yokota (2008) Proceedings of the
National Academy of Sciences in submission