

博士論文番号：0781008

野生種スイカ(*Citrullus lanatus* sp.)における

余剰エネルギーに対する光合成電子伝達系の制御機構の解析

三田 智子

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)

平成 23 年 1 月 25 日提出

所属 (主指導教員)	分化・形態形成学講座 (横田 明穂 教授)		
氏名	三田 智子	提出	平成 21 年 12 月 21 日
題目	野生種スイカ( <i>Citrullus lanatus</i> sp.)における 余剰エネルギーに対する光合成電子伝達系の制御機構の解析		

## 要旨

光エネルギーは光合成に必須の要素であるが、吸収する光エネルギーの量が消費エネルギーの量を超えるような場合、光は葉緑体に損傷をもたらす。乾燥ストレスに曝された植物は、気孔を閉じることによって蒸発による水分の損失を防ごうとする。気孔の閉鎖は葉内への CO<sub>2</sub> の流入を妨げるため、CO<sub>2</sub> 固定反応が停止し、CO<sub>2</sub> 固定反応における還元力の利用が制限される。しかし、光照射下では光エネルギーの吸収が継続されるので、光合成電子伝達系やストロマが過還元状態に陥る。その結果、生成される活性酸素種により、光阻害として知られる光化学反応効率の低下が引き起こされる。葉緑体の光合成電子伝達系は、光合成に必須の光エネルギーを吸収して化学エネルギーを生み出す場であり、また、植物に害をもたらす活性酸素種が発生する場でもある。それゆえ、植物にとって光合成電子伝達系を制御することは必須の課題である。

アフリカ・カラハリ砂漠に自生する野生種スイカは、一般的に乾燥に弱いとされている C3 型の光合成を行うにも関わらず、優れた乾燥ストレス耐性を示す。この野生種スイカ葉の膜画分を用いたプロテオーム解析の結果、多くの乾燥ストレス応答性タンパク質が同定された。その中で、光合成電子伝達系に関わる因子として、cytochrome (cyt) *b<sub>6</sub>f* 複合体の Rieske サブユニット、[ferredoxin-NADPH oxidoreductase \(FNR\)](#)、NAD(P)H-Plastoquinone-oxidoreductase (NDH) 複合体の I、K サブユニットが乾燥ストレスに応答して変化することが明らかになった。本研究では、乾燥ストレス時にそのタンパク質スポット数を増加させるというユニークな挙動を示した Rieske タンパク質に注目した解析を行い、ストレス条件下における Rieske タンパク質の機能や、ストレス条件下における光合成電子伝達系の制御機構を調べることを目的とした。

電子は光化学系 II(PS II)から PQ プール、cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体を経て光化学系 I(PS I)へと流れる。クロロフィル蛍光を用いた生葉における光合成電子伝達活性の測定から、乾燥ストレス 3 日目の葉では、電子伝達活性がおおよそ半分に低下しており、電子の流れが PS II と PS I の間で抑制されていることが示唆された。さらに、驚くべきことに、乾燥ストレス 3 日目では CO<sub>2</sub> 固定が完全に停止していたにも関わらず、PS II、PS I は乾燥ストレスによって損傷を受けていなかった。単離チラコイド膜を用いて電子伝達活性を測定したところ、乾燥や強光を受けた葉から抽出したチラコイド膜では PS II から PS I への電子伝達活性が低下していたが、PS II、PS I の電子伝達活性はストレス前の葉から抽出したチラコイド膜と乾燥や強光に曝された葉から抽出したチラコイド膜で違いが見られなかった。これらの結果は、PS II と PS I

の間で電子伝達活性が抑制されていることを示唆する生葉での結果を支持するものである。また、主要な光合成複合体である PS II、cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体、PS I、ATP 合成酵素を構成するサブユニットの蓄積量を Immunoblot により解析したところ、FNR の可溶性画分が乾燥ストレスによってわずかに減少した以外、他のタンパク質の蓄積量は乾燥ストレスの前後で変化していなかった。このことは、乾燥ストレスは光合成電子伝達系の量的な構成に影響を及ぼさなかったことを示している。

プロテオーム解析から、PS II と PS I の間の電子伝達を担う cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体のサブユニットである Rieske のタンパク質スポット数が乾燥ストレスに応答して増加することが示唆されている。そこで、野生種スイカの葉緑体 Rieske タンパク質に特異的な抗体を作製し、二次元電気泳動と抗 Rieske 抗体を用いた Immunoblot 解析を行うことによって、乾燥ストレス前後における Rieske タンパク質スポットの挙動変化を詳細に調べた。その結果、非ストレス下において分子量はほぼ同じで等電点の異なる複数の Rieske スポットが確認された。乾燥ストレス下ではそれらのスポットに加え、より酸性側に新たに複数の Rieske スポットが出現した。これらの増加スポットは、再灌水によって消失した。このようなスポット数の増加・回復は、強光ストレスに曝された葉でも観察された。シロイヌナズナの葉緑体 Rieske タンパク質の塩基配列を鋳型にして野生種スイカの EST (expressed sequence tag) database (7,000 independent clones; K. Akashi and A. Yokota, 2007, unpublished data) を検索したところ、20 個の EST 配列が得られた。それら 20 個の EST 配列が重複領域において同じ配列を有していたことから、少なくとも発現している Rieske の転写産物は 1 種類であると考えられた。また、Southern Blot 解析の結果、野生種スイカでは葉緑体 Rieske タンパク質は単一の遺伝子にコードされていることが予想された。これらの結果と、乾燥ストレスの前後で Rieske タンパク質の蓄積量に変化が見られなかったことから、Rieske タンパク質は、乾燥や強光といった葉緑体に過剰なエネルギーが蓄積するようなストレス条件下において、翻訳後修飾を受けていると考えられた。ストレス条件下で新たに出現する Rieske タンパク質スポットは、非ストレス下で見られるスポットと分子量がほぼ同じでより酸性側に観察されることから、ストレス条件下で Rieske タンパク質に誘導される修飾は、リン酸化ではないかと予想した。そこで、抗リン酸化抗体を用いた Immunoblot 解析や質量分析によって Rieske タンパク質に起こる修飾の種類の決定を試みたが、その同定には至っていない。

Electrochromic Shift(ECS)の手法によって、ストレス条件下で cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性が低下しているかどうかを直接的に調べた。単離チラコイド膜を用いた *in vitro* での cyt *f* の再還元キネティクスの解析を行ったところ、乾燥ストレスに曝した葉から単離したチラコイド膜では、ストレスを受けていない葉から単離したチラコイド膜に比べ、cyt *f* の再還元速度が有意に低下していた。cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性は周辺 pH の低下に伴って低下することが知られており、今回の結果を見ても、ストレス前後のチラコイド膜の両方で pH の低下に伴って cyt *f* の再還元速度は低下した。しかし、解析に用いた pH5.5~8.0 全ての buffer において、乾燥ストレス後のチラコイド膜で cyt *f* の再還元速度が有意に低下していた。このことから、乾燥ストレス条件下では、ルーメン pH に依存しない cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性低下機構が働いていると考えられる。

以上の結果から、余剰光ストレスに曝された野生種スイカ葉において、電子伝達活性を cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体で抑制する新規な分子メカニズムが存在すること、また cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体のサブユニットである Rieske タンパク質が翻訳後修飾を受けることが示唆された。ストレス条件下では、翻訳後修飾を受けた Rieske タンパク質が cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体で電子伝達活性を抑制することで、PS I に過剰量の電子が流れることを阻止し、光阻害に弱いとされる PS I を保護していると考えられる。



## 目次

第 1 章 緒論

第 2 章 序論

第 3 章 材料と方法

第 4 章 結果

4-1. 乾燥・強光条件下における野生種スイカの生理的な応答

4-2. 乾燥・強光条件下における葉緑体 Rieske 鉄-硫黄タンパク質の挙動変化

4-3. 分光学的手法による Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性の評価

第 5 章 考察

謝辞

参考文献

論文目録

# 第 1 章

## 緒論

近年、自然的・人為的な環境要因による土壌の劣化が進行しており、地球の全陸地面積の約 40%、農耕地の約 70%が乾燥地となっている(Edward, 1992)。穀物の生産量の減少を引き起こす最も大きな要因は乾燥ストレスである。従って、植物の乾燥応答機構を研究し、乾燥ストレス耐性能を付加した穀物を作出することは、人類にとって急務の課題である。

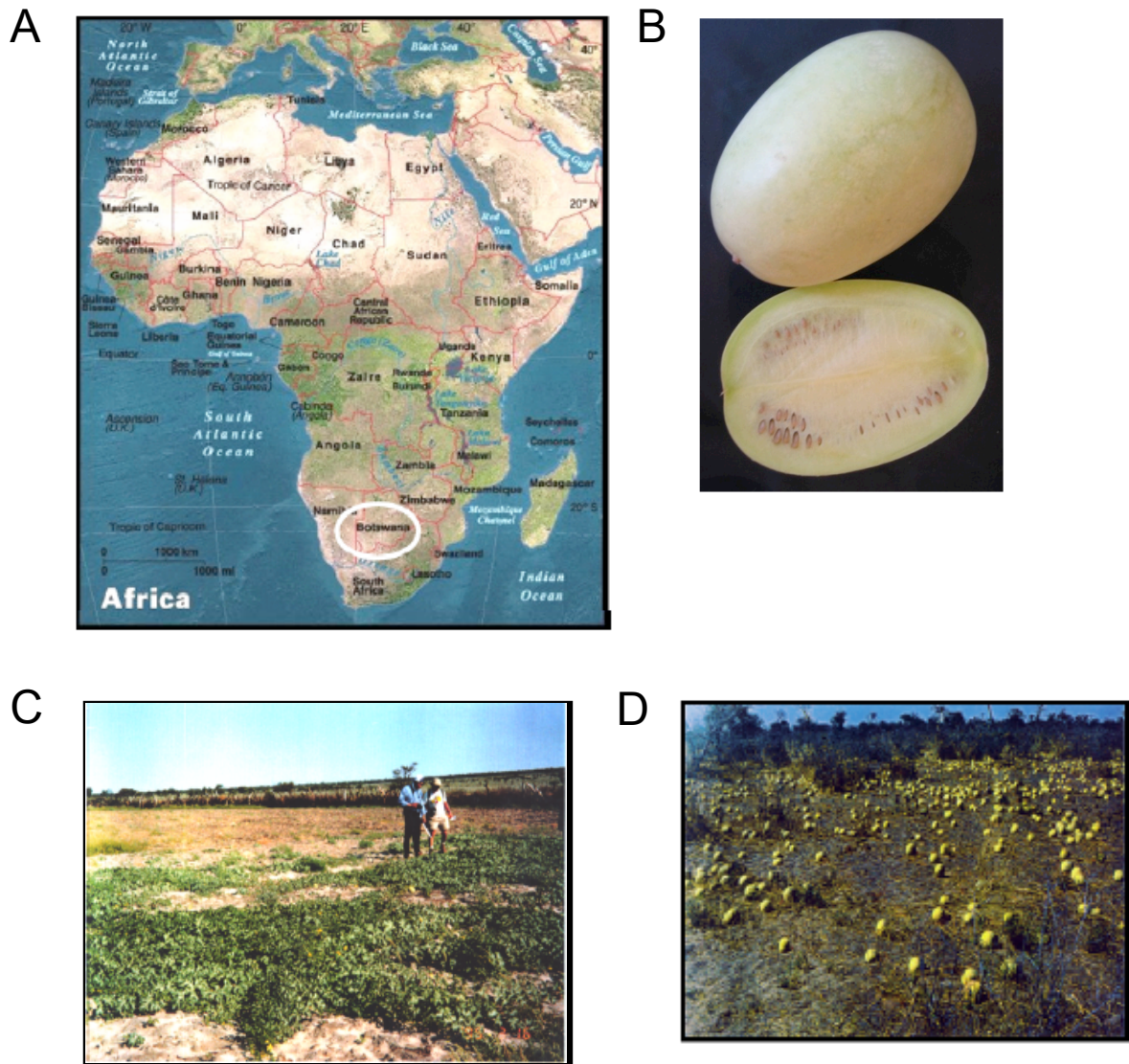
我々動物とは異なり、植物は移動という手段を持たないため、乾燥や強光、高温・低温、塩などの環境ストレスに容易に曝されてしまう。こうしたさまざまな環境ストレスの中で、植物の生産性に最も大きな影響を与えるのが光存在下での乾燥である(Boyer, 1982)。植物の葉は、その重量のうち 70-90%を水が占めている。多くの植物の葉では水分の約 10%を失っただけでも細胞の膨圧が 0 付近まで低下してしまい、細胞成長やタンパク質合成、CO<sub>2</sub> 同化などの生理的過程が影響を受ける(Hsaio, 1973)。

砂漠に生息する植物は、乾燥や強光といった厳しい環境条件の下で生き延びるため、環境に適応している(Wickens, 1998)。砂漠などの給水が困難な地域に生息する植物は乾性植物と呼ばれ、乾燥耐性を持たない Drought-sensitive type と、乾燥耐性を有する Drought-resistant type が存在する(Larcher, 1995)。

Drought-sensitive type の植物は、水分が得られる時期に合わせて生育する。

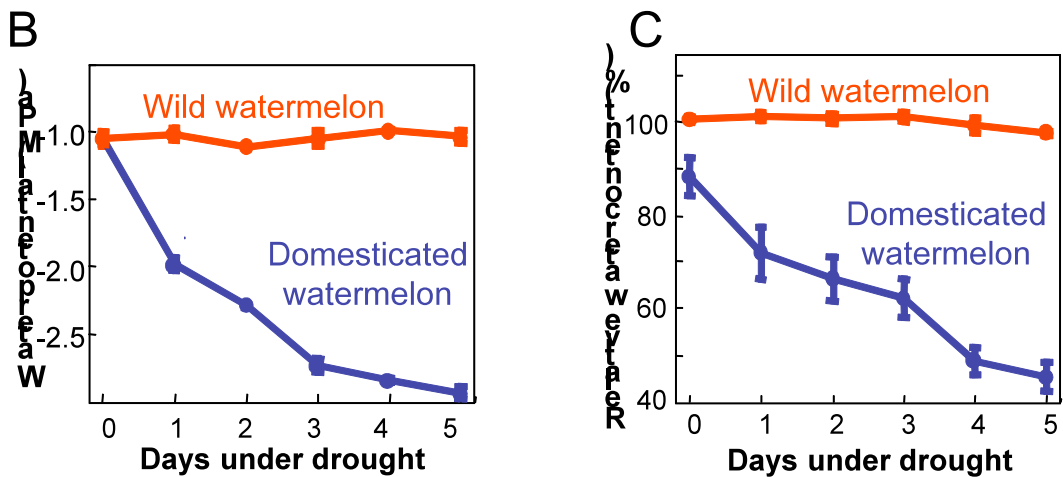
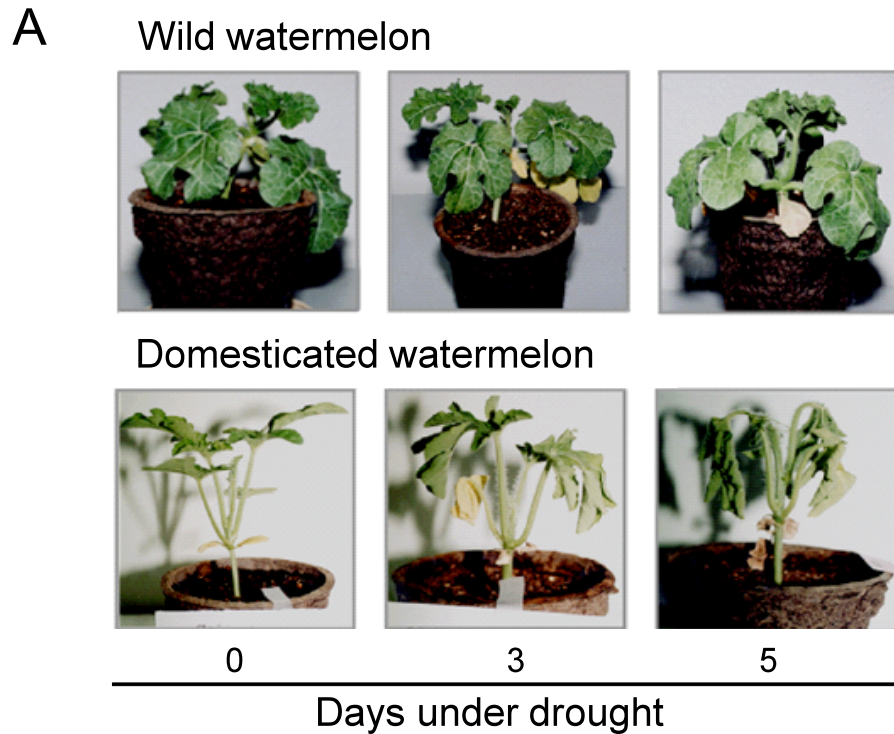
Drought-resistant type の植物はさらに、乾燥に曝されると体内の水分のほとんどを失ったままで耐え、水分を獲得すると再び代謝活性を取り戻す乾燥耐性型と、水分の取り込み効率の上昇や蒸散の抑制などによって体内の水分量を保つ乾燥回避型の 2 つに分類される(Larcher, 1995)。乾燥回避型の植物として、サボテンやリュウゼツランなどがよく知られている。これらの植物は、昼間は水分の損失を防ぐために気孔を閉鎖し、夜間になると気孔を開いて CO<sub>2</sub> を取り込むという、CAM 型の光合成を行う(Novel, 1988)。しかし、乾燥回避型の植物の中には、一般的に乾燥ストレスに弱いとされている C<sub>3</sub> 型の光合成を行う種が存在する。

野生種スイカ(*Citrullus lanatus*)は、アフリカのカラハリ砂漠に自生する乾性植物であり(van Wick & Gericke, 2000)、ほとんどの作物と同じ C<sub>3</sub> 型の光合成を行う(Miyake and Yokota, 2000)。乾燥ストレスに対する野生種スイカと栽培種スイカ



**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。白線で囲まれた辺りがボツワナ共和国を示す。ボツワナ共和国周辺の黄土色の部分がカラハリ砂漠 B. 本研究に用いた野性種スイカ 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



**Figure 1-2.** 野生種スイカと栽培種スイカの水分保持能

A. 野生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°C、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付与した。 B. 乾燥強光に伴う野生種スイカと栽培種スイカの水分ポテンシャルの変化。 C. 乾燥強光に伴う野生種スイカと栽培種スイカの葉の水分含量の変化。  
(中村, 2000 より改変)



の形態的な応答を調べたところ、栽培種スイカでは乾燥が進むに従って葉の萎れが見られたが、野生種スイカでは葉の萎れは観察されなかった(Fig. 1-2)。また Fig. 1-2 に示されるように、栽培種スイカでは乾燥に伴って葉の水分ポテンシャルや葉の水分含量が大きく減少したが、野生種スイカではそのような大幅な減少は見られなかった(中村, 2000)。さらに、野生種スイカと同じウリ科の植物であるキュウリおよびハツカダイコンを同一のポットに植え、灌水停止によって乾燥ストレスを与えたところ、キュウリとハツカダイコンは枯死してしまったのに対し、野生種スイカではほとんど葉の黄化が見られず、形態的に大きな変化は観察されなかった(Fig. 1-3)。一般的に、乾燥ストレス条件下では、葉の水分が失われるにつれて葉の組織の膨圧が減少するため、葉は萎れる。乾燥下での葉の萎れや湾曲には、太陽光に相対する葉面積を減少させることで葉に吸収される光エネルギーの量を軽減し、直射日光から光合成機能を守るという働きがある(Larcher, 1995)。また、葉の萎れには水分損失を防ぐ役割もある。野生種スイカの葉は乾燥下でも萎れや黄化が見られなかったことから、乾燥を受けた野生種スイカは、水分損失を防ぎながら直射日光の照射に耐えることが出来る特殊化したシステムを持っていると考えられている(Kawasaki et al., 2000; Yokota et al., 2002)。



**Figure 1-3.** 野生種スイカの乾燥強光耐性

野生種スイカ、キュウリ、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。(Yokota et al., 2002 より改変)

これまでに、当研究室において行われたディファレンシャルディスプレイ法やプロテオーム解析によって、乾燥ストレスに対する野生種スイカの適応機構あるいは防御機構に関与すると考えられる遺伝子やタンパク質が単離・同定されている(Akashi et al., 2004; 吉田, 2006)。それらの因子に関する詳細な解析の結果、乾燥ストレス条件下の野生種スイカにおいて、活性酸素消去能の高い適合溶質であるシトルリンが葉に高蓄積すること(Kawasaki et al., 2000; Akashi et al., 2001; Yokota et al., 2002; Takahara et al., 2005)、ヒドロキシラジカルを消去するメタロチオネインが誘導されること(Akashi et al., 2004)、葉緑体に溜まった過剰な還元力を細胞外へ散逸する機構が働くこと(Nanasato et al., 2005)、根を伸ばすこと(Yoshimura et al., 2008)、ATP 合成酵素の蓄積量の減少によってチラコイド膜の電気化学ポテンシャルが調節されること(Kohzuma et al., 2009)などが示されている。

乾燥ストレスが植物にもたらす危険は、水分損失だけではない。光合成は光エネルギーが駆動するが、吸収する光エネルギーの量が消費エネルギーの量を超える場合、光は葉緑体に損傷をもたらす。光照射を伴う乾燥ストレスに曝された植物は、気孔を閉鎖することで蒸散による水分の損失を防ごうとする。気孔の閉鎖は葉内への  $\text{CO}_2$  の流入を妨げるため、 $\text{CO}_2$  固定反応が停止し、 $\text{CO}_2$  固定反応における還元力の利用が大幅に低下する。しかし、光照射下では光エネルギーの吸収が継続されるので、光合成電子伝達系や葉緑体ストロマが過還元状態に陥る。その結果、植物に害を与える活性酸素種が生成される(Foyer et al., 1994)。活性酸素種は、光阻害として知られる光化学反応効率の低下を引き起こす(Aro et al., 1993)。このように、葉緑体の光合成電子伝達系は、植物に必須の光エネルギーを吸収する場であり、また同時に、植物に害をもたらす活性酸素種が発生する場でもある。それゆえ、植物にとって光合成電子伝達系を制御することは必須の課題である。

そこで、本研究では野生種スイカを用い、葉緑体に過剰なエネルギーが蓄積されるようなストレス条件下において、葉緑体の光合成電子伝達系がどのように制御されているのかを明らかにすることを目的とした。まず、乾燥ストレスや強光ストレスに曝された野生種スイカの生理的な応答について解析し、ストレス条件下における光合成電子伝達活性の制御ポイントを推察した。次に、以前に当研究室で行われたプロテオーム解析から得られた、乾燥ストレス応答性の光合成関連因子について解析し、電子伝達活性制御はタンパク質の量的な変化によるものではないことを明らかにした。また、ストレスに応答して興味深い挙動を見せた葉緑体 Rieske 鉄-硫黄タンパク質を詳細に解析し、ストレス条件下で Rieske タンパク質が翻訳後修飾を受けるであろうこと明らかにした。さらに、分光学的手法によって、ストレス下における電子伝達の制御ポイントであ

ると考えられる cytochrome (Cyt) *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性を測定し、ストレス条件下では Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性が低下していることを直接的に示した。以上のことから、葉緑体内に過剰なエネルギーが蓄積するようなストレス条件下の野生種スイカにおける光合成電子伝達制御についてさまざまな側面から解析することによって、ストレス条件下における光合成電子伝達の制御機構について考察した。

## 第 2 章

### 序論

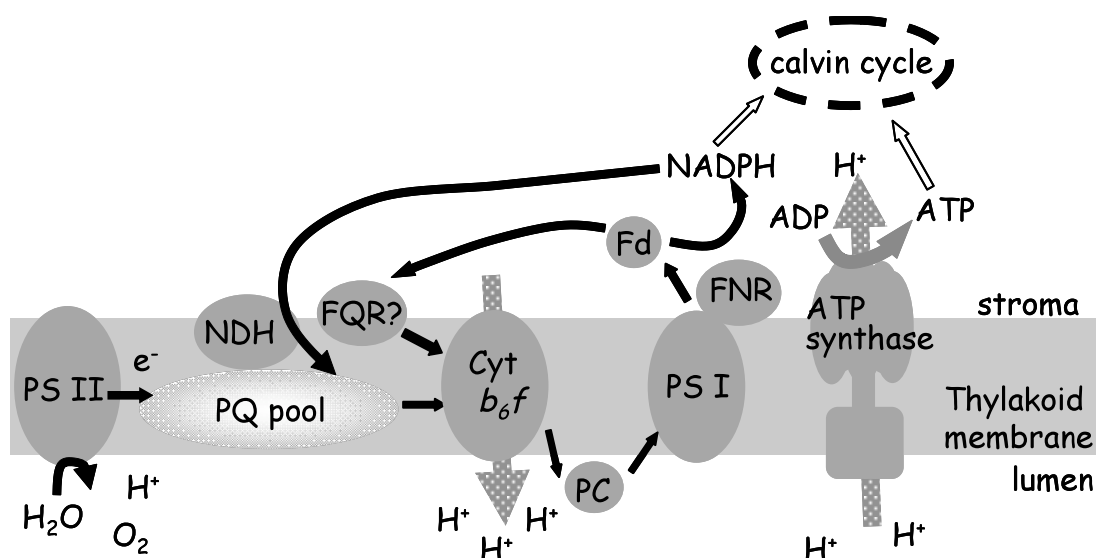
光エネルギーは植物の光合成に必須の要素である。一般的な植物において、光合成の  $\text{CO}_2$  固定に必要な光エネルギーは光合成有効光量子束密度(PPFD; Photosynthetically active photon flux density)でおよそ  $500 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  であるとされている(寺島, 1999)。それに対して、真夏の晴天時にはおよそ  $2,000 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の光が地表に降り注ぐため、植物はしばしば過剰量の光エネルギーをその体内に吸収していると考えられる。また上述のように、乾燥に曝された植物においては、消費エネルギー量が低下するため、通常時よりも弱い光強度でも光合成が飽和した状態に陥ってしまう。

葉に当たった太陽光の一部は反射したり透過したりするため、植物は地表に降り注ぐ太陽光の全てを吸収しているわけではない。また、植物は葉の構造(Weston et al., 2000; Terashima et al., 2001)や光を吸収するアンテナサイズ(Escoubas et al., 1995)を変化させ、葉の表皮にアントシアニンを蓄積すること(Gould et al., 1995)によって、葉で吸収する光の量を減らし、葉緑体内への過剰なエネルギーの蓄積を防ぎ、過還元状態を回避しようとする。しかし、これらの手段を用いても、植物には過剰な光エネルギーが吸収されてしまう。

吸収された光エネルギーは、葉緑体にあるチラコイド膜上の光合成電子伝達鎖上において化学エネルギーへと変換される。この過程を光合成明反応という。光エネルギーは、光化学系 II(PS II)、光化学系 I(PS I)という 2 つの光化学系に結合している集光クロロフィルによって吸収される。吸収された光エネルギーによって PS II で水の分解が起こり、引き抜かれた電子が光合成電子伝達鎖状を流れる。Fig. 2-1 に示されるように、電子は PS II からプラストキノン(PQ)プール、Cyt  $b_6f$  複合体、プラストシアニン(PC)、PS I へと流れ、最終的に還元力である NADPH が生成される。また、2 つの光化学系を結ぶ Cyt  $b_6f$  複合体では、電子伝達が行われると同時にストロマからチラコイドルーメンへのプロトンの輸送も行われている。PS II における水分解と Cyt  $b_6f$  複合体におけるプラストキノール(還元型 PQ)の酸化に伴うプロトン輸送によって、チラコイド膜内外のプロトン濃度勾配が形成される。こうして形成されるチラコイド膜を介したプロトン濃度勾配によって ATP 合成酵素が駆動し、ATP が合成される。このようにして明反応によって作られた NADPH と ATP を利用して  $\text{CO}_2$  固定が行われる過程を光

合成暗反応という。

また、上述したような PS II から PS I へ流れて NADPH を生成する一連の電子の流れは直鎖型電子伝達(Linear electron flow)と呼ばれている。この直鎖型の電子伝達経路に加えて、PS I 環状電子伝達(Cyclic electron flow around PS I)という経路が知られている(Arnon et al., 1954; Arnon, 1956)。環状電子伝達には PGR5 依存の FQR 経路(Munekage et al., 2002)と NAD(P)H-Plastoquinone-oxidoreductase (NDH) 依存の経路(Burrows et al., 1998; Shikanai et al, 1998; Horváth, 2000)という 2 種類の経路が知られている。循環的電子伝達においては、PS I から PQ プールへと電子が戻されるため、NADPH の生成を伴わずにルーメンへのプロトン流入が起こる。



**Figure 2-1.** チラコイド膜における電子伝達

PS II の励起によって発生した電子が、PS II から PQ プール、Cyt  $b_6f$  複合体、プラストシアニン、PS I へと流れることで、最終的に還元力である NADPH が生成される。また、PS II における水分解と Cyt  $b_6f$  複合体におけるプラストキノールの酸化に伴うプロトン輸送によって、形成されるチラコイド膜内外のプロトン濃度勾配が ATP 合成を駆動する。

高等植物は、光阻害を最小にするために電子伝達活性を制御するさまざまなプロセスを備えていることが報告されている。乾燥に伴う暗反応活性の低下や強光照射により吸収される光エネルギーの量が過剰になると、光合成電子伝達が飽和し、チラコイド膜ルーメンの酸性化が進む。ルーメン pH が 6 を下回ると、

余分なエネルギーを熱として捨てる熱散逸が誘導される(Horton et al., 1996; Niyogi, 1999; Mullaer et al., 2001; Munekage et al., 2001)。この機構によって、植物は最大で吸収した光エネルギーの約 8 割を放散することができる(Demmig-Adams et al., 1996)。熱散逸の誘導に必要なルーメン pH の低下には、電子伝達に伴う Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体でのプロトン輸送(Munekage et al., 2001)、NAD(P)H などの還元力を生み出さずに膜内外のプロトン濃度勾配を形成することが出来る環状電子伝達の駆動(Munekage et al., 2002; Cardol et al., 2009)が必要不可欠とされている。また環状電子伝達に加え、ルーメンからストロマへのプロトン流出の抑制もルーメン pH の低下に寄与することが示されている(Kramer et al., 2004; Kohzuma et al., 2009)。

光合成明反応系においては、光エネルギーを受容する 2 つの光化学系が直列につながっている。それゆえ 2 つの光化学系の励起状態のバランスの崩れは光障害を引き起こす要因となる。片方の光化学系のみが強く励起する条件下に置かれた植物は、光化学系の集光アンテナ(Light harvesting complex; LHC)の大きさを調節するステートトランジションによって、2 つの光化学系間の吸収エネルギー量を調節する(Allen, 1992; Rochaix, 2007; Wollman, 2001)。PS II がより励起される条件下では、PQ プールの還元が起こり、LHC II のリン酸化に必要なキナーゼが活性化され、ステートトランジションが誘導される(Vener et al., 1997; Zito et al., 1999)。リン酸化された LHC II は PS II から PS I へと移動し、それゆえ両光化学系間の励起エネルギーのバランスが保たれる。この過程は可逆的であり、PS I が優先的に励起される条件では恒常的に active な脱リン酸化酵素によって LHC II が脱リン酸化され、PS II へと戻る。

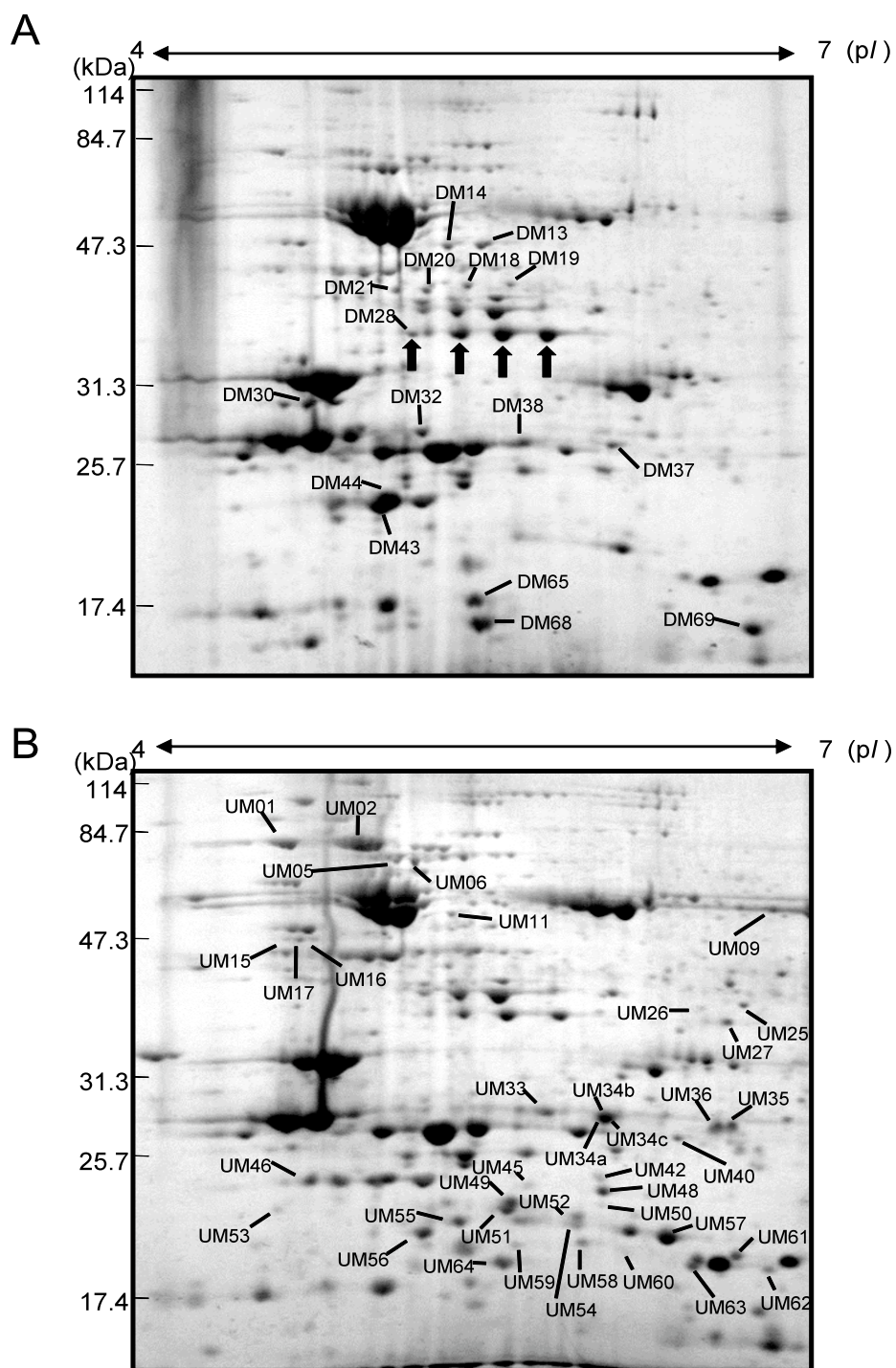
明反応が行われるチラコイド膜の光合成電子伝達系は、植物に害をもたらす活性酸素種が発生する場でもある。それゆえ、葉緑体内に過剰なエネルギーが蓄積するようなストレスに曝された植物は、光合成電子伝達自体を制御し、活性酸素種の発生を回避していると考えられる。しかし、電子伝達系の過還元が引き起こされる乾燥ストレス条件下において、電子伝達活性がどのように制御されているのかは知られていない。

ストレスに応答してその蓄積量や質が変動する因子をタンパク質レベルで網羅的に解析するには、プロテオーム解析は非常に有効な手段である。これまでに、高等植物で乾燥ストレスに応答するタンパク質を調べる目的でプロテオーム解析を行った研究がいくつも報告されている(Bonhomme et al., 2009; Hajheidai et al., 2005; Plomion et al., 2006; Riccardi et al., 1998, 2004)。しかし、それらは葉中における存在比が高い可溶性のタンパク質を含む全ての葉タンパク質を用いており、乾燥ストレス下の葉緑体チラコイド膜タンパク質に焦点を当てた研究は知られていない。

本研究室において、乾燥ストレス応答性タンパク質を調べるために、野生種スイカ葉の膜画分を用いたプロテオーム解析が行われた(吉田, 2005)。その結果、乾燥ストレスに応答して非常に多くのタンパク質の蓄積量に変動することが示された。Fig. 2-2 は、ストレス前、乾燥ストレス 3 日後の葉から抽出した膜画分のタンパク質を二次元電気泳動によって展開したものである(吉田, 2005 より改変)。それぞれのゲルは、*pI* が 4 から 7、分子質量がおおよそ 10 から 120kDa のレンジから成っている。それぞれのサンプルにおいて約 400 個のタンパク質スポットが検出され、乾燥ストレス前後のゲル間における定量的な解析が行われた結果、55 個の乾燥ストレス応答性タンパク質スポットが検出された。そのうち、39 個(71 %)で蓄積量が 2 倍以上に増加しており、16 個(29 %)で蓄積量が 1/2 以下に低下していた。それらの 55 個のタンパク質スポットについて質量分析・データベース解析が行われ、乾燥ストレス応答性タンパク質が同定された(吉田, 2005)。

同定された乾燥ストレス応答性タンパク質の中で、光合成電子伝達反応に関わる因子として、Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の Rieske サブユニットと ferredoxin-NADPH oxidoreductase (FNR)、NAD(P)H-Plastoquinone-oxidoreductase (NDH) 複合体の I、K サブユニット(以下、NDH-I、NDH-K とする)が検出された(Table I、吉田, 2005 より改変)。Rieske サブユニット(UM49, UM45, UM55)と NDH-K (UM36, UM35)については、乾燥ストレスによって複数の新たなタンパク質スポットが出現することが明らかになった。また乾燥ストレス条件下で、NDH-I (UM42)のスポット強度は増加し、NDH-K (DM37)と FNR(DM28, DM32)のスポット強度は減少していた(吉田, 2005)。

以上のことから、電子伝達系の過還元が引き起こされる乾燥ストレス条件下では、上記の乾燥ストレス応答性の電子伝達系タンパク質が光合成電子伝達系を制御し、活性酸素種の生成を回避しているのではないかと考えた。そこで、本研究ではストレス条件下における電子伝達活性の変化やプロテオームで検出された乾燥ストレス応答性電子伝達タンパク質の挙動変化について調べた。



**Figure 2-1.** 非ストレス葉と乾燥ストレス葉から抽出した膜タンパク質の二次元電気泳動像

非ストレス下の葉(A)と3日間の灌水停止による乾燥ストレスに曝された葉(B)から抽出した膜タンパク質を二次元電子泳動によって分離し、Colloidal Coomassie Blue によって染色した。ゲルの左側と上側の数字はそれぞれ分子質量と等電点を表す。



Table I. Identification of drought stress-responsive proteins in insoluble fraction of wild watermelon leaves

Spot No.	Fold	Accession No.	Protein ID	Species	Theoretical/ Theoretical/ Experimental Experimental NMP	
					Mass (kDa)	pI
UM42	33	gj 39653273	ADP-ribosylation factor	<i>Medicago sativa</i>	20.7/25.0	6.43/6.07
UM49	14	gj 7525089	NADH dehydrogenase subunit I	<i>Arabidopsis thaliana</i>	20.1/25.0	7.51/6.07
		gj 123545	HSP16.9	<i>Triticum aestivum</i>	16.9/22.9	5.83/5.66
UM36	13	gj 4586598	chloroplast Rieske iron-sulfur protein	<i>Cicer arietinum</i>	16.9/22.9	6.45/5.66
		gj 22530880	small HSP	<i>Solanum lycopersicum</i>	25.7/29.7	9.31/6.58
UM45	12	gj 7525037	NADH dehydrogenase subunit K	<i>Arabidopsis thaliana</i>	25.4/29.7	9.17/6.58
UM35	6.5	gj 7430481	chloroplast Rieske iron-sulfur protein	<i>Hordeum vulgare</i>	9.7/24.4	5.81/5.74
UM55	4.5	gj 7525037	NADH dehydrogenase subunit K	<i>Arabidopsis thaliana</i>	25.4/29.9	9.17/6.65
		gj 22530880	small HSP	<i>Solanum lycopersicum</i>	25.7/29.9	9.31/6.65
		gj 136707	chloroplast Rieske iron-sulfur protein	<i>Pisum sativum</i>	24.2/21.4	8.63/5.43
DM28	0.1	gj 13518336	ATP synthase alpha chain	<i>Oenothera elata subsp. hookeri</i>	55.2/41.2	5.36/5.24
		gj 15239282	ferredoxin-NADP <sup>+</sup> -oxidoreductase 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	40.3/41.2	8.32/5.24
		gj 5708095	ATP synthase gamma chain	<i>Arabidopsis thaliana</i>	33.3/41.2	6.13/5.24
DM37	0.4	gj 13518424	NADH dehydrogenase subunit K	<i>Lotus japonicus</i>	26.1/27.8	7.63/6.13
DM32	0.5	gj 28261702	ATP synthase alpha chain	<i>Atropa belladonna</i>	55.5/27.8	5.26/6.13
		gj 6561891	ferredoxin-NADP(H)-oxidoreductase	<i>Zea mays</i>	40.9/28.9	7.55/5.28

UM, Up-regulated membrane protein; DM, Down-regulated membrane protein; NMP, Number of matched peptides.

Spot No., Fig 3-1 中のスポットナンバーに相当。Fold, 非ストレス時のサンプルに対する乾燥ストレス3日目のサンプルにおけるタンパク質スポット強度の上昇度合いの平均値。Accession No., NCBIのデータベースで相当する accession number。Protein ID, タンパク質の名称。Species, 植物種。Mass, 分子量(kDa)。Theoretical, データベース検索の結果から予想される値。Experimental, ゲルから得られた値。pI, 等電点。NMP, データベース検索によってヒットしたペプチドの数。(P<0.05)。 (吉田、2005より抜粋)

## 第 3 章

### 材料と方法

本研究は、本学バイオサイエンス研究科及び米国 Washington State University, Pullman (D.M. Kramer 教授研究室) にて行った。両研究室での実験条件が異なる場合、使用した器具や条件などの詳細を、本学で行った実験の材料と方法欄の後に併記した。

#### 3-1. 植物材料と栽培条件

野生種スイカ(*Citullus lanatus* sp. No101117-1) を800 ml サイズの紙ポット、園芸用の土(花と野菜の土., タケダ園芸, 日本)を用いて栽培した。栽培条件は、人工気象器中で明期(気温35 °C、湿度50%、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)に設定した。毎朝、明期開始1時間後に灌水し、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。灌水を停止することで乾燥ストレスを与えた。強光ストレスは、2000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度を15分間照射した。乾燥ストレスに伴う土壌水分含量の変化は、ポットや土、植物体を80 °Cのオーブンで72時間乾燥し、土壌水分含量を次のように計算することで求めた。土壌水分含量 = (サンプルの重量 - 乾燥重量) / (十分に灌水した重量 - 乾燥重量)  $\times 100$  (%)。

一方、Pullmanにおいて次のように行った。本学での実験に用いた野性種スイカ (*Citullus lanatus* sp.No101117-1)と同種の種を用い、米国のWashington State University において栽培した。700 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。乾燥ストレスは灌水を停止することで行い、実験にはストレス前とストレス1 日目の葉を用いた。乾燥ストレスに伴う土壌水分含量の変化は、上記の方法によって計算した。

#### 3-2. ガス交換測定

LI-6400 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, U.S.A)によって、野生種スイカの生葉を用い、

CO<sub>2</sub>固定速度ならびに蒸散速度、気孔コンダクタンスは同時に測定した。測定条件は、CO<sub>2</sub>濃度350 ppm、光合成誘導光の光強度700  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、35 °C (室温は30 °C)、50 %に設定した。

### 3-3. PAMによるクロロフィル蛍光測定

ガス交換の測定と同時に、LI-6400-40 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, U.S.A)を用い、クロロフィル蛍光を測定することで光合成電子伝達活性の測定を行った。measuring light (630 nm, 0.05-0.15  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )照射下の最小クロロフィル蛍光を $F_0$ とし、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。測定終了後、植物体を一時間暗所に置いた後、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、光合成誘導光(700  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )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 PS II の量子収率 ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) はそれぞれ  $(F_m - F_0) / F_m$ ,  $(F_m' - F_s) / F_m'$ より算出した(Genty et al., 1989)。また、非光化学的消光(Non-photochemical quenching; NPQ)は  $(F_m - F_m') / F_m'$ より算出した。PS II を通る相対電子伝達速度を表す ETR は  $\text{light intensity} \times \Phi_{\text{PSII}}$  から算出した。QA の還元レベルを表す 1-qP は $(F_s - F_0') / (F_m' - F_0')$ より算出した(Dietz et al., 1985)。

### 3-4. P700の酸化レベルの測定

非ストレス下および乾燥ストレス 3 日目の野生種スイカの第 4 葉を用い、P700 の酸化レベルは810 nm の吸光度変化をWalz PAM101付属のemitter-detector unit ED-P700DW を用いて測定した(Klughammer and Schreiber, 1998、Jahns and Junge, 1992)。P700 の最大酸化レベル( $\Delta A_{\text{max}}$ )はPS Iのみを励起させるFR (720 nm, 36  $\text{Wm}^{-2}$ )照射下でxenon flash (50 ns, 1500  $\text{Wm}^{-2}$ ) を照射して測定した。光合成定常状態のP700 の酸化レベル( $\Delta A$ )は赤色光 (>650 nm, 700  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )を10分間照射した後、赤色光下で測定した。また、PS Iの光障害の程度を評価するために、暗条件下でリーフディスクを10  $\mu\text{M}$  methyl viologen に10分間浸した後に $\Delta A_{\text{max}}$ を測定した。

### 3-5. チラコイド膜の単離

全ての作業は氷上において行った。野生種スイカ第4葉をハサミで小さく切り、約80 mlチラコイド単離バッファー(50 mM Tricine-KOH, pH7.5, 10 mM NaCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ )と共にミキサーに入れ、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(Calbiochem, USA)でろ過した。ろ過後の溶液は10000 g、1 分間遠心して、上清を除去した。沈殿に少量のチラコイド単離バッファーを加え、筆を用いて丁寧に懸濁した。さらにバッファーを加えて40 mlにし、500 gで1分間遠心し、沈殿として現れる夾雑物を除去した。上清は10000 g で1分間遠心し、得ら

れた沈殿を少量のチラコイド単離バッファーに0.3 M sorbitolを加えたものに懸濁した。

Washington State University においても同様の手順でチラコイド膜の単離を行った。

### 3-6. クロロフィル定量

単離したチラコイド膜溶液を 80%アセトンに加え、720nm, 663nm, 645nm の吸光度 ( $A_{720}$ ,  $A_{663}$ ,  $A_{645}$ )から測定した(Arnon, 1949)。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( $\mu\text{g Chl}$ ) =  $20.2(A_{645}-A_{720}) + 8.02(A_{663}-A_{720})$ 。

Washington State University においても同様の方法でクロロフィル量の計算を行った。

### 3-7. 単離チラコイド膜を用いた *in vitro* 直線的電子伝達活性測定

HANSATEC 社の酸素電極を使用し、野生種スイカ葉から単離したチラコイド膜を用いて*in vitro*における電子伝達活性を測定した。酸素電極のチャンバーに測定バッファー(50 mM potassium phosphate buffer, pH7.5, 10 mM NaCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.3 M sucrose)、10  $\mu\text{g chl}$ の単離チラコイド膜溶液を加え、500  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の赤色光を照射した。全ての測定において、単離チラコイド膜を含めた全ての溶液・薬剤を系に加え、溶液中の酸素レベルが安定しているのを確認した後に、光照射を開始した。光照射下で3分間反応させた後、シリンジを用いて脱共役剤である200 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を測定チャンバーに注入した。PS IIからPS Iへの直線的な電子伝達活性は、測定バッファーに電子受容体として50  $\mu\text{M}$  methyl viologen (MV)、10  $\mu\text{M}$  KCNを用いて酸素消費速度を測定することで評価した。MVはPS 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。そのため、この系ではPS IIにおける水分解からPS Iまでの直線的な電子伝達活性を評価することが出来る。PS IIの電子伝達活性は、測定バッファーに電子受容体である1 mM *p*-benzoquinone (*p*-BQ)、Cyt  $b_6/f$ 複合体の電子伝達阻害剤である1 mM 2,5-Dibromo-3-isopropyl-6-methyl-*p*-benzoquinone (DBMIB) を加え、酸素発生速度を測定することで評価した。*p*-BQはPS IIから電子を受容するため、この系ではPS IIにおける電子伝達に伴う水分解による酸素発生をモニターすることでPS IIの電子伝達活性を評価出来る。PS Iの電子伝達活性は、測定バッファーに100 U/ml superoxide dismutase (SOD), 100  $\mu\text{M}$  KCN, 電子受容体として50  $\mu\text{M}$  MV, PS IIの電子伝達阻害剤として1  $\mu\text{M}$  3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU), 1 mM Na-ascorbate, 電子供与体として0.5 mM N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-phenyldiamine (TMPD)を加え、酸素消費速度を測定することで評価した(Meierhoff and Westhoff, 1993)。この系では、PS IIで電子の流れを阻害しておき、TMPDからPS Iへと供与された電子がPS Iの後ろでMVによって酸

素に渡されることで起こる系の酸素濃度の低下を観察することで、PS Iの電子伝達活性を評価している。

### 3-8. P700 の還元キネティクス

PS I の反応中心である P700 の一過的な酸化還元変化を測定した(Jahns et al., 2002)。野生種スイカ葉からリーフディスクを作成し、Walz PAM101 付属の emitter-detector unit ED-P700DW で 810 nm の吸光度変化をモニタリングすることで測定を行った。リーフディスクに FR (720 nm, 36 Wm<sup>-2</sup>)を 3 分間照射し、FR 照射下において飽和光の single turnover pulse (a half peak width, 14 μs, 1500 Wm<sup>-2</sup>)によって誘導される P700 の還元キネティクスをモニターした。

### 3-9. 抗Rieske抗体の作成

野生種スイカ葉のcDNA libraryから、Rieske1 (5'-GCGAATTCCCCTCCTGGTACTGGAGGTG -3') Rieske2 (5'-TCTTAGGTACCCGAATTGAGCTCGCG -3')という2つのプライマーを用い、PCRによって葉緑体Rieske遺伝子の後半部分を増幅した。PCR産物を制限酵素 *Eco*RI、*Xho*Iで切断し、発現ベクターであるpGEX-4T-3に挿入した。作成したプラスミドは大腸菌DH5αに形質転換した。この形質転換大腸菌を50 μg/mlの Ampicilinを含むLB培地において、生育温度37°Cで前培養を行った後、同じく37°Cで600 nmの吸光度が0.6になるまで培養した。プラスミドを回収し、シーケンスによって目的の配列が正しく挿入されていることを確認した。その後、大腸菌 BL21に形質転換した。この形質転換大腸菌を50 μg/mlのAmpicilinを含むLB培地において、生育温度37°Cで前培養を行った後、18°C で600 nmの吸光度が0.6になるまで培養した。その後、0.1 mM IPTGを加えることでRieskeタンパク質の発現を誘導し、8時間~9時間の培養を行った。大腸菌懸濁液を7700 gで10分間遠心した後、上清を除去し、PBS (10mM phosphate buffer, 120 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.6)で沈殿を懸濁した。懸濁液を6000 gで10分間遠心し、沈殿にPBSを加えて懸濁した。氷上で、超音波処理を行って大腸菌を破碎した。6000 gで10分間遠心した後、上清をGlutathione Sepharose 4Bカラムにアプライし、精製した。精製産物を濃縮した後、thrombin処理によってGSTタグを切断し、ゲルろ過にかけた。SDS-PAGE、銀染色によって精製産物が単一バンドであることを確認した後、精製産物に対するポリクローナル抗体をウサギで作成して頂いた。

### 3-10. タンパク質抽出

以下の操作において手袋は常時着用し、アセトン沈殿を行うまでは常に氷上で操作した。液体窒素で凍らせた後に-80°Cで保存してある野生スイカの葉一

枚 (2.5 g 前後) を、液体窒素の入った乳鉢で入念に磨り潰した。リン酸バッファー (61.5 mM  $K_2HPO_4$ , 38.5 mM  $MgH_2PO_4$  pH7.0, 2 mM  $MgCl_2$ , 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 mM PMSF) を加え再度磨り潰した。1.5 ml 遠心管に分注し、6000 g、4 °Cの遠心を3秒行い、その上清を新たな1.5 ml 遠心管に移す。沈殿はデンプンや未破碎の細胞がほとんどなので捨てた。これを3 回繰り返した。続いて、18,000 g、4 °Cの遠心を20 分間行い、上清を可溶性画分とし、沈殿を膜画分とした。膜画分はリン酸バッファーに再懸濁した後、18000 g、4°Cの遠心を10 分間行い、上清を除いた。これを2 回繰り返すことで膜画分の洗浄を行った。可溶性画分、膜画分共に80 %アセトンに懸濁し、18000 g、4°Cの遠心を10 分間行い、上清を除いた。この操作はクロロフィルの緑色が抜け、ペレットが白っぽくなるまで繰り返した。

### 3-11. サンプル調整

アセトン沈殿後のペレットに2-DE sample buffer (可溶性画分用; 7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS, 0.5% Triton X-100, 0.5%(v/v) Immobiline pH Gradient buffer: pH4-7 (Amarham Pharmacia Science 社), 100 mM DTT。膜画分用; 可溶性画分用に0.0628%のSDS を加えたもの) を加えた。膜画分のペレットは氷上で超音波処理を行い良く溶かした。室温で30 分間攪拌、その後30 分間静置、室温で18000 g で1時間遠心し、上清を2-DE のサンプルとした (保存は-30°C)。2-DE sample buffer に溶けたタンパク質をBradford 法で定量した(Bradford, 1976)。スタンダードは、1  $\mu$ g/ $\mu$ l のBSA (溶媒は可溶性画分用もしくは膜画分用2-DE sample buffer) を用いた。サンプル、スタンダード、ブランク液全てにおいてCBB に加える2-DE sample buffer の量をtotal で10 $\mu$ l となるように調整した。

### 3-12. 二次元電気泳動

**膨潤:** 膨潤トレイを水平になるように置き、1 レーンにつき240  $\mu$ l の2-DE sample buffer を膨潤トレイに塗りこんだ。Immobiline Dry strip: 11 cm、pH 4-7 (Amarham PharmaciaScience)をgel 面を下にして空気が入らないようにトレイに置き、乾燥防止のため1 レーンにつき3 ml のシリコンオイル:KF-96-1.5CS (信越化学工業株式会社)を入れて14~20 時間静置 (室温) してゲルを膨潤させた。

**一次元目 (等電点) 電気泳動:** サンプルは解凍した後に、5 分間攪拌して静置し、18,000 gで10分以上遠心を行った。膨潤済みのstrip gel を泳動層にセットし、サンプルカップにサンプル (可溶性タンパク質は200  $\mu$ g、膜タンパク質は350  $\mu$ g) を供した。ゲルの乾燥を防ぐために、シリコンオイルをサンプルカップと泳動トレイに充填した。一次元目の泳動槽はAmershamPharmacia Biotech 社のMultiphorTM IIを使用した。泳動冷却槽は15°Cで、電気泳動の設定は、step 1: 500

V gradient, 2 mA, 5 W, 1min、step 2: 500 V, 2 mA, 5 W, 2 hr、step 3: 3,500 V gradient, 2 mA, 5 W, 6 hr、step 4: 3500 V, 2 mA, 5 W, 16 hr で行った。

**平衡化：** 等電点電気泳動終了後、strip gel 一本につき約10 ml の一次平衡化buffer [50 mM Tris-HCl (pH8.8), 6 M Urea, 30% (w/v) Glycerol, 2% (v/v) SDS, 65 mM DTT] 中で15 分振とうした。次に一次平衡化buffer を除去し、10 ml の二次平衡化buffer [50 mM Tris-HCl (pH8.8), 6 M Urea, 30% (w/v) Glycerol, 2% (v/v) SDS, 135 mM Idoasetamide] を入れてアルミホイルで遮光して15 分振とうした。これらの平衡化は室温で行った。平衡化終了後、試験管から取り出したstrip gel にelectrode buffer (25 mM Tris, 190 mM glycine, 3.5 mM SDS)でstrip gelを洗浄し、平衡化バッファを洗い流した。

**二次元目電気泳動 (SDS-PAGE)：** 二次元目電気泳動のSDS-PAGE にはATTO の泳動槽を使用した。12.5 %のアクリルアミドゲルを使用した。平衡化を行った strip gel をSDS-PAGE 用ゲルの上部に置き、100℃でボイルして溶かしておいた封入用アガロールゲル (electrode buffer に0.5%アガロースと適量のBlomophenol Blueを加えたもの) を70℃くらいまで冷やしてから流し込み、strip gel を固定した。電気泳動の設定は500 V、25 mA/gelで行った。

**ゲル染色：** 二次元電気泳動の染色にはInvitrogen 社のColloidal Blue Staining Kit を使用した。染色は40時間以上行い、脱色はMilliQ水で6時間以上行った。

### 3-13. ウェスタンブロッティング

ブロッ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葉のタンパク質をPVDF membrane (BIO-RAD)に転写し、TTBS (137 mM Tris-HCl, pH7.5, 8.1 mM NaCl, 2 mM  $\text{NgCl}_2$ , 0.1% Tween20) + 2% Skim milkに浸し、1 時間振とうした。次に、一次抗体である抗Rieske抗体、抗ATPase  $\gamma$  抗体(東京工業大学の久堀先生から頂いた)、抗FNR抗体(大阪大学の長谷先生から頂いた)、抗Cyt f 抗体(阪大の中井先生から頂いた)、NDH subunit H 抗体(フランス、CNRS-CEA のDr. Dominique Rumeauから頂いた)、抗PGR5抗体(京都大学の鹿内先生から頂いた)、抗PsbO抗体(東京大学の故渡辺先生から頂いた)、抗PsaA抗体(Agrisera社)、PhosphoSerin 抗体(QIAGEN 社)はBlotting buffer に適当な倍率で希釈し、TTBS + 0.1% Bovine Serum Albumin (BSA)で1 時間振とうした。次に、TTBSでメンブレンを洗浄した後、20000倍に希釈したAnti-Rabbit IgG (H+L), Goat, Po, HRP(フナコシ社)を用い、TTBS + 0.1% BSAで50分間振とうした。その後、TTBSで洗浄し、 $\text{ECL}^+$ (Amersham Pharmacia Biotech社) で検出した。

### 3-14. In-gel digestion (ゲル内消化)

ゲル内消化は以前に報告された手順(Shevchenko et al., 1996)に少し変更を加えて行った。目的のタンパク質スポットを切り取ってTPX 遠心管 (ハイテック社)に移し、超純水で洗浄した後、100 %アセトニトリルによる脱色、脱水を行った。全ての操作においてチップはTPX Tip (家田貿易社)を用いた。遠心エバポレーターを30 分間処理し、ゲルを完全に乾燥させた後、10 mM DTT、100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  を加えて45 分間56°Cでインキュベートし、ジスルフィド結合をSH 基に還元した。溶液を除去後、室温に戻して55 mM Iodoacetamide、100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ を加え、暗所で30 分間インキュベートしてアルキルを行った。100 %アセトニトリルでゲルを脱水した後、遠心エバポレーターで30 分間ゲルを乾燥させ、12.5 ng/ $\mu\text{l}$ トリプシン(MS グレード、プロメガ社) / 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ を加え4°Cで45 分間インキュベートし、酵素反応を起こさずにゲル内にトリプシンを吸収させた。その後、50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ でゲル片を洗浄し、50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ を加えて37°Cで16 時間反応させ、トリプシン消化を行った。トリプシン消化後の溶液を新たな回収用のTPX 遠心管に移した。25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ をゲル片に加えて10 分間振とうし、100 %アセトニトリルを加えてさらに10 分間振とうし、上清を回収用遠心管に移した。次に、ゲル片に5%ギ酸(Wako)を加えて10 分間振とうし、100 %アセトニトリルを加え、さらに10 分間振とうし回収用遠心管に移した。この操作を2 回繰り返した。回収用遠心管の溶液が約20  $\mu\text{l}$  になるまで遠心エバポレーターで蒸発させ、最後に5  $\mu\text{l}$  の5%ギ酸を加えた。

### 3-15. 質量分析

トリプシン消化したペプチド断片は、本プロテオーム解析室の桑野氏によってliquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS / MS : LCQ-Advantage、Thermo Electron社) による質量分析に供試された。MS解析によって得られたMS ピークはMSCOT (Matrix Science社)によってNCBIのデータベース(Greenplants)から相同性検索を行った。

### 3-16. サザンブロッティング

ゲノム DNA は、以前報告されている方法(Akashi et al., 2004)に従い、野生種スイカの葉から調整した。ゲノム DNA 10  $\mu\text{g}$  を制限酵素 *Bam*HI、*Eco*RI、*Eco*RV、*Hind*III、*Xho*I で切断した。その DNA 溶液を 0.8%のアガロースゲルを用いて電気泳動し、展開した DNA を Hybond N<sup>+</sup> membranes (Amersham Bioscience)に転写した。Probe は、Rieske1 (5'- GCGAATTCCTCCTGGTACTGGAGGTG -3') Rieske2 (5'-TCTTAGGTACCCGAATTGAGCTCGCG -3')を用いた PCR で得られた、葉緑体 Rieske 遺伝子の後半の 408 bp の断片を用いた。増幅した PCR 産物は、



MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN, Valencia, CA)により精製し、probe の放射ラベリングは Prime-It II Random primer Labeling Kit (Stratagene)により行った。ハイブリダイゼーションは低法に従って行った(Sambrook et al., 1989)。

### 3-17. フラッシュ光によるCyt *f* の再還元キネティクスの測定

キュベットに測定 buffer(10 mM HEPES, 10 mM MES, 0.3 M Sorbitol, pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0)、1 µg/ml gramicidin D(脱共役剤)、100 µM Ascorbate、50 µg chl の単離チラコイド膜を加え、全量を 2 ml とした。キュベットに actinic light を 4 秒間照射して電子伝達鎖を還元状態にしておき、4 秒間 dark にした後、短いフラッシュ光を照射した。フラッシュ光によって Cyt *f* は一時的に酸化され、その後すぐに再還元される。この再還元キネティクスを差スペクトルの変化としてモニターした。ノイズの影響を軽減するため、一連の測定を 9 回繰り返し、それらを平均した。

### 3-18. デュロキノンを用いたCyt *f* の再還元キネティクスの測定

キュベットに測定 buffer(10 mM HEPES, 10 mM MES, 0.3 M Sorbitol, pH 7.5)、1 µg/ml gramicidin D(脱共役剤)、100 µM Ascorbate、50 µM duroquinone、50 µg chl の単離チラコイド膜を加え、全量を 2 ml とした。測定は 4-2-4 と同じように行った。

### 3-19. タンパク質抽出と免疫ブロット

Cyt *f* の再還元速度の測定用に単離したチラコイド膜の一部を取り、80%アセトンを加えて十分に懸濁した後、18000 g, 4°Cの遠心を10 分間行い、上清を除いた。この操作はクロロフィルの緑色が抜け、ペレットが白っぽくなるまで繰り返した。二次元電気泳動用のsample buffer (7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS, 0.5% Triton X-100, 0.5%(v/v) Immobiline pH Gradient buffer: pH4-7 (Amarham Pharmacia Science 社), 100 mM DTT, 0.0628 % SDS)に溶かし、ブラッドフォード法にてタンパク定量を行った後、SDS-PAGE 用のsample buffer (500 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1.6 % SDS, 4 % β- mercaptoethanol, 0.2 M sucrose, 1% BPB) を加え、15% アクリルアミドを用いて、SDS-PAGE を行った。そのあとPVDF 膜に転写し、抗Rieske抗体を用いて免疫ブロットを行った。2 次抗体にはAnti-Rabbit IgG (H+L), Goat, Po, HRP(フナコシ社)を用い、ECL<sup>+</sup>(Amersham Biosciences)を用いて LAS-4000mini (FUJIFILM)で検出を行った。

### 3-20. 分光学的な手法を用いたCyt *f* 、P700の量の測定

キュベットに測定 buffer(10 mM HEPES, 10 mM MES, 0.3 M Sorbitol, pH 7.5)、1

$\mu\text{g/ml}$  gramicidin D(脱共役剤)、10 mM Ascorbate、10  $\mu\text{M}$  DCMU、50  $\mu\text{M}$  MV、50  $\mu\text{g}$  chl の単離チラコイド膜を加え、全量を 2 ml とした。Ascorbate の添加によって電子伝達系を還元状態にした。暗条件下に置いたキューベットの actinic light を照射した。PS I の後ろで電子は受容体である MV へと渡されるが、DCMU によって PS II の電子伝達が阻害されているため、actinic light の照射によって電子伝達系は酸化状態になる。actinic light 照射の前後における Cyt *f* の吸光度変化を測定し、Cyt *f* と P700 の量を見積もった。ノイズの影響を軽減するため、一連の測定を 9 回繰り返し、それらを平均した。

## 第 4 章

### 結果

#### 4-1. 乾燥・強光条件下における

##### 野生種スイカの生理的な応答

##### 4-1-1. 一日における野生種スイカの生理変化

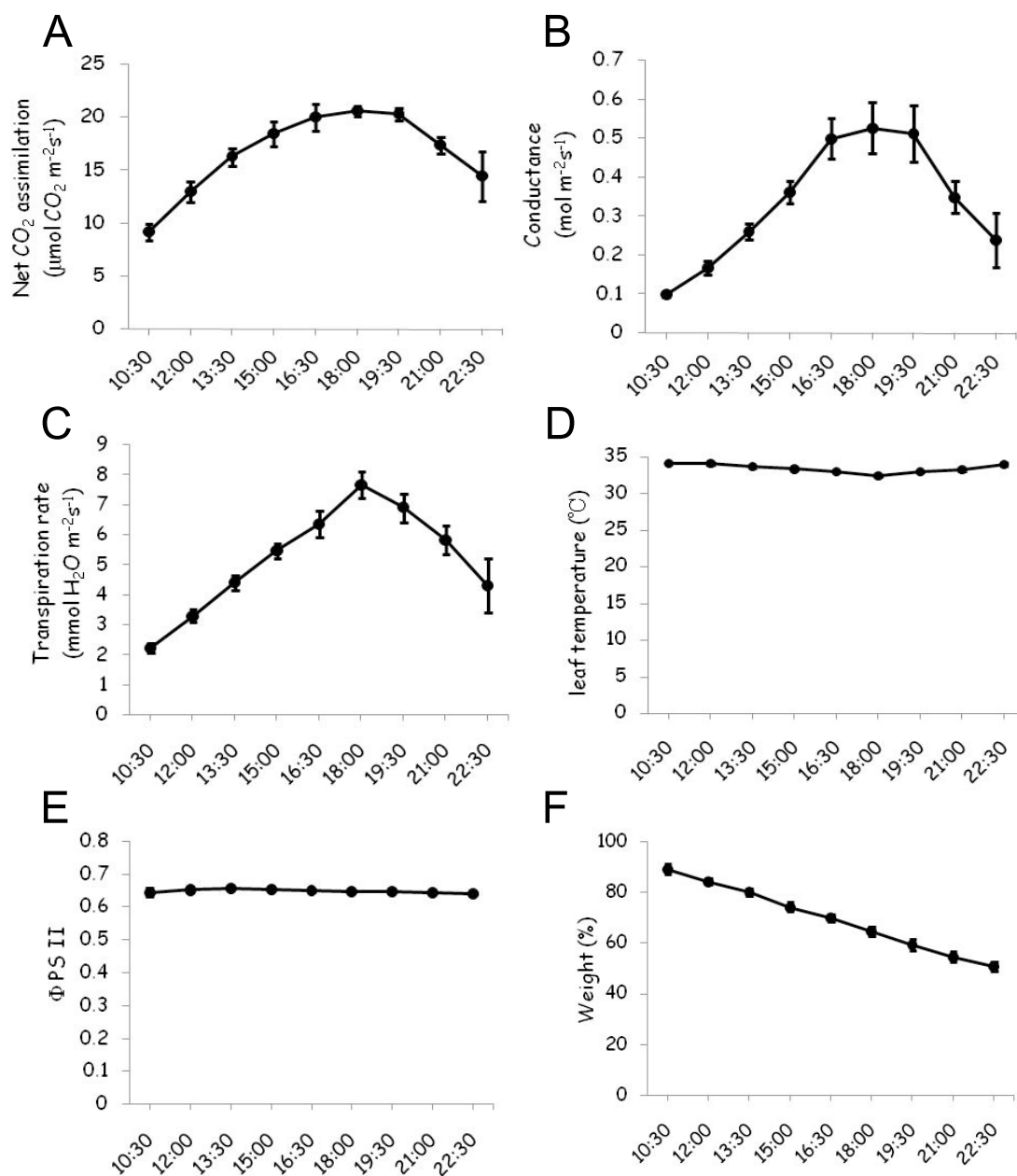
明期(気温 35 °C、湿度 50%、光強度 700  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、16 時間)、暗期(気温 25 °C、湿度 60%、8 時間)に設定された人工気象器中で生育した野生種スイカが、一日の中において生理応答がどのように変化しているのかを調べた。毎朝灌水を行ったストレスを受けていない植物体を用い、光合成速度( $\text{CO}_2$  固定速度)、気孔コンダクタンス、蒸散速度、PS II を通る相対的な電子伝達速度を表す  $\Phi_{\text{PS II}}$ 、葉面温度、土壤水分含量の一日における変化を測定した。人工気象器の明期開始は午前 10 時、明期終了は午前 2 時に設定されている。明期開始 30 分後、午前 10 時 30 分に水遣りを行った後、一時間半毎に全ての測定を行った。

$\text{CO}_2$  固定速度は午前 10 時 30 分には  $9.2 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$  であったが、午後 6 時に最大となり、およそ 2 倍の  $20.6 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$  という値を示した(Fig. 4-1-1A)。その後、 $\text{CO}_2$  固定速度は低下した。 $\text{CO}_2$  固定速度と同様に、気孔コンダクタンス、蒸散速度も明期開始後から徐々に値が上昇し、午後 6 時に最大値を示した後、値は低下した(Fig. 4-1-1B, C)。これらの結果から、明期開始後から徐々に気孔が開き、 $\text{CO}_2$  固定速度が上昇し、およそ 8 時間で気孔が最も開き、蒸散や  $\text{CO}_2$  固定が活発に行われている、ということが明らかになった。その後は、気孔が徐々に閉鎖し、それに伴って  $\text{CO}_2$  固定速度も低下する。対照的に、葉面温度は明期開始後からわずかながら値が少しずつ低下し、午後 6 時に最も低い値を示した。これは、気孔の開度が大きくなり蒸散が活発になるに従って、蒸散水の気化熱によって葉表面の温度が低下したためであると考えられる(Fig. 4-1-1D)。

PS II の量子収率を表す  $\Phi_{\text{PS II}}$  は一日の中で変化せず、ほぼ同じ値を保っていた(Fig. 4-1-1E)。このことから、 $\text{CO}_2$  固定速度とは対照的に、光合成電子伝達活性は光照射を受けるとすぐに最大活性を示すことが明らかになった。

驚くべきことに、土壤水分含量は灌水直後の 89.1%から直線的に低下し続け、午後 22 時 30 分には 50.8%にまで低下していた(Fig. 4-1-1F)。

これらの結果から、野生種スイカ葉を用いた活性測定やタンパク質抽出のための葉のサンプリングは、一日のうちで光合成活性が最大になる午後6時前後に行うことに決定した。

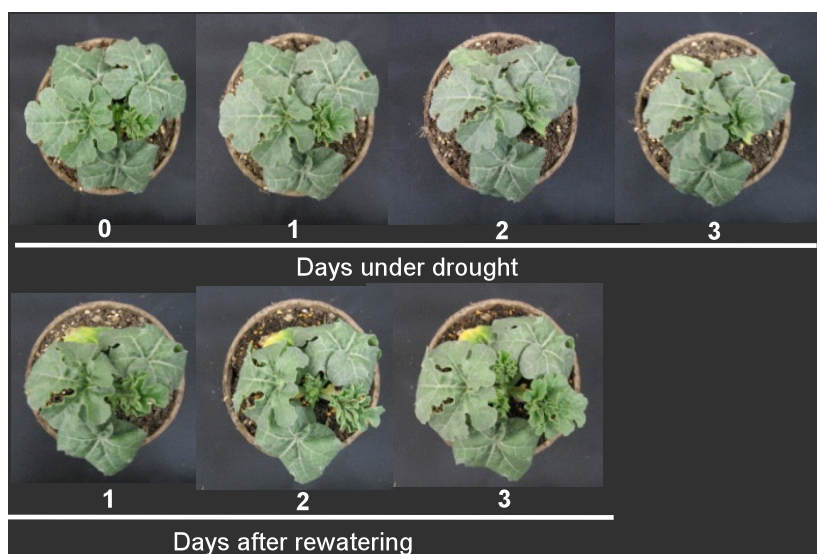


**Figure 4-1-1.** 一日における野生種スイカの生理変化

非ストレス条件下の野生種スイカ葉における一日の生理応答変化を測定した。明期開始は午前10時、明期終了は午前2時である。明期開始30分後、午前10時30分に水遣りを行った。A. 蒸散速度。 B. 光合成速度(CO<sub>2</sub>固定速度)。 C. 気孔コンダクタンス。 D. 葉面温度。 E. ΦPSII。 F. 土壌水分含量。 (n=3)

#### 4-1-2. 乾燥ストレス条件下における野生種スイカの形態変化

700  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の光強度下で第4葉が完全展開するまで野生種スイカを生育し、3日間灌水を停止することで、乾燥ストレスを与えた。3日間の灌水停止後、3日間の再灌水を行った。乾燥ストレスによって黄色く変色したのは下位葉(第一葉)のみであり、葉の萎れは見受けられなかった(Fig. 4-1-2)。乾燥ストレスを受けている間は植物体の成長が停止し、再灌水が始まると再び成長が始まった(Fig. 4-1-2)。



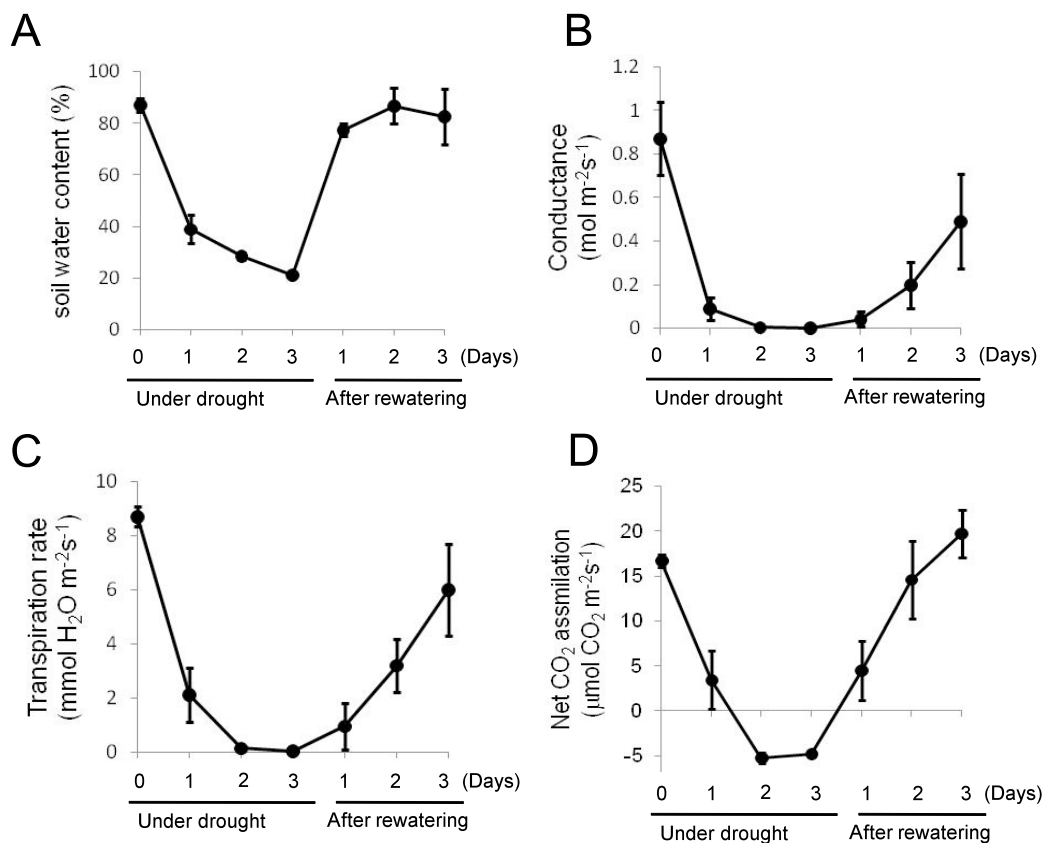
**Figure 4-1-2.** 乾燥ストレス条件下における野生種スイカの形態変化

700  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の光強度下で第4葉が完全展開するまで野生種スイカを生育し、そこから3日間灌水を停止することで、乾燥ストレスを与えた。3日間の灌水停止後、3日間の再灌水を行った。

#### 4-1-2. 乾燥ストレス条件下における野生種スイカの生理変化

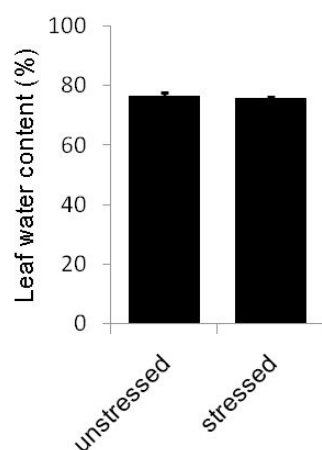
3日間の乾燥ストレスとその後3日間の再灌水を行った時の野生種スイカの生理応答を調べた。3日間の乾燥ストレスによって、土の水分含量はストレス前の約85%から約20%にまで低下した(Fig. 4-1-3A)。気孔コンダクタンスは乾燥ストレス1日目ですべて急激に低下し、2日目にはほぼゼロの値を示した(Fig. 4-1-3B)。気孔コンダクタンスと同様に、蒸散速度、 $\text{CO}_2$  固定速度も乾燥ストレス1日目で大きく低下し、乾燥ストレス2日目には $\text{CO}_2$  固定が停止した(Fig. 4-1-3C, D)。これらの結果は、乾燥ストレス2日目以降には気孔が完全に閉鎖し、 $\text{CO}_2$  固定

が停止していることを示している。土壌水分含量は一日の再灌水でストレス前の値近くまで回復したが、気孔コンダクタンスや蒸散速度、CO<sub>2</sub> 固定速度は 3 日間の再灌水によってストレス前の値にまで回復した(Fig. 4-1-3B, C, D)。また、葉の水分含量は乾燥ストレスの前後で変化しておらず(Fig. 4-1-4)、このことは過去の報告(Kawasaki et al., 2000)とも一致する。



**Figure 4-1-3.** 乾燥ストレスに対する野生種スイカの生理応答

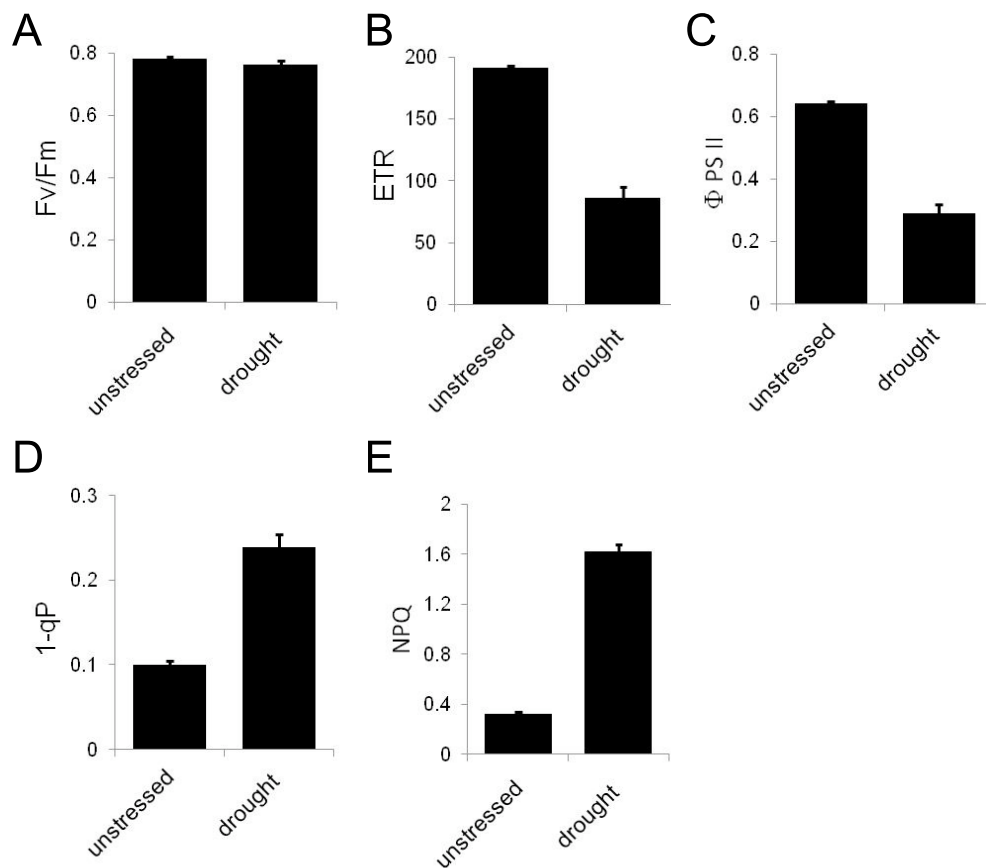
A. 土壌水分含量。 B. 気孔コンダクタンス。 C. 蒸散速度。 D. 光合成速度 (CO<sub>2</sub> 固定速度)。(n=3-5)



**Figure 4-1-4.** 野生種スイカ葉の水分含量

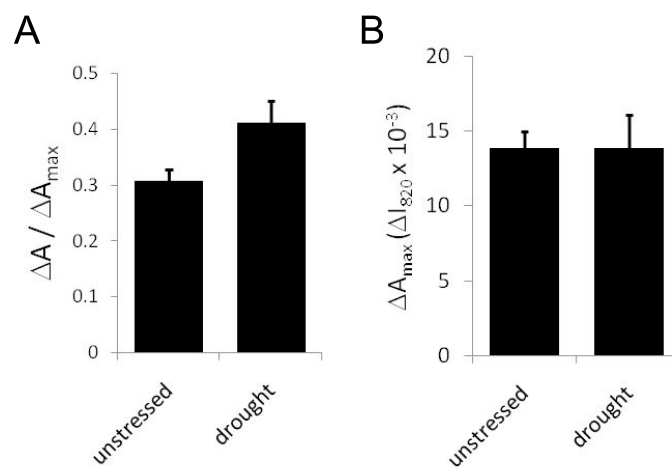
ストレス前と乾燥ストレス 3 日目の野生種スイカ葉における葉の水分含量。(n=3)

クロロフィル蛍光を用いて生葉における光合成電子伝達活性測定を行った。PS II の最大量子収率を表す  $F_v/F_m$  が乾燥ストレスの前後で変化しなかったことから、PS II は 3 日間の乾燥ストレスによって損傷を受けていないことが明らかになった(Fig. 4-1-5A)。乾燥ストレス下では、電子伝達速度を表す ETR や PS II の量子収率を表す  $\Phi_{PSII}$  が半分以下に減少したが、低いながらも活性を保っていた(Fig. 4-1-5B, C)。このことは、乾燥ストレス条件下で  $CO_2$  固定が完全に停止しているにも関わらず、電子伝達活性は低レベルでありながらも維持されていたことを示唆している。また、乾燥ストレス条件下では PQ プールの還元状態を反映する値である 1-qP が上昇し、NPQ も増大していた(Fig. 4-1-5D, E)。PS I の反応中心である P700 の酸化レベルを測定したところ、ストレス前に比べて乾燥ストレス条件下では P700 はより酸化状態にあることがわかった(Fig. 4-1-6A)。また、P700 の最大酸化レベルはストレスの前後で変化しておらず、このことは PS I は乾燥ストレスでも光障害を受けていないことを表している(Fig. 4-1-6B)。これらの結果から、乾燥ストレス条件下では直線的な電子伝達活性が低下しており、PS II と PS I の間で電子の流れが抑制されている、ということが示唆された。



**Figure 4-1-5.** 乾燥ストレス下における野生種スイカの光合成電子伝達活性

A. PS II の最大量子収率。 B. 電子伝達速度。 C. PS II の量子収率。 D. PS II の  $Q_A$  の還元状態。 E. NPQ 。 (n=3)



**Figure 4-1-6.** P700 の酸化レベル

ストレス前と乾燥ストレス3日目の野生種スイカ葉を用い、PS I の反応中心である P700 の酸化状態を測定した。 A. 光照射下における P700 の酸化レベル。 B. P700 の最大酸化レベル。 (n=3)

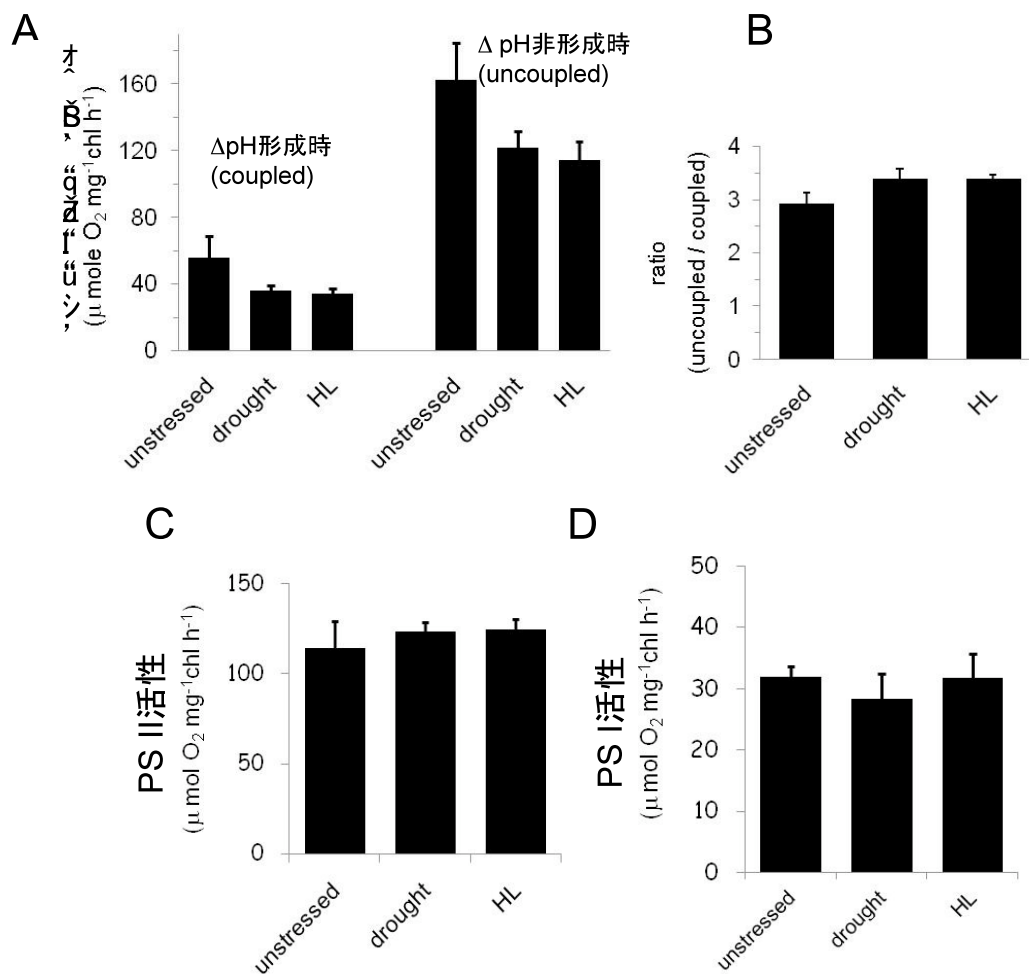


#### 4-1-3. 単離チラコイド膜を用いた *in vitro* 直線的電子伝達活性測定

*in vivo* における電子伝達活性測定(Fig. 4-1-5, 4-1-6)から、乾燥ストレス条件下でも PS II、PS I は光障害を受けておらず、またストレス条件下では PS II と PS I の間で電子の流れが抑制されていることを示唆する結果が得られた。そこで、ストレス前後における PS II、PS I の電子伝達活性を評価するために、ストレス前の野生種スイカ葉と乾燥ストレスあるいは強光ストレスに曝した野生種スイカ葉から単離したチラコイド膜を用い、*in vitro* における酸素消費速度あるいは酸素発生速度の測定を行った。

PS II から PS I (electron donor;  $\text{H}_2\text{O}$ , electron acceptor; MV) への電子伝達活性は、ストレス前の葉から抽出したチラコイド膜に比べて乾燥ストレス後、強光ストレス後の葉から抽出したチラコイド膜において低下していた(Fig. 4-1-7A)。この低下は、脱共役剤の添加によって電子伝達と ATP 合成を脱共役させ、電子伝達は行われるが ATP の合成は行われない、という状態にした場合でも観察された(Fig. 4-1-7A)。低下の度合いは、共役時には約 40%、脱共役時には約 30%であった。脱共役剤添加時は、光照射下でもチラコイド膜を介したプロトン勾配が形成されないため、ルーメンの pH は反応バッファの pH である 7.5 に同調しているとみなすことが出来る。また、脱共役剤添加時に対する共役時の PS II から PS I への直線的な電子伝達活性は、ストレスの前後ではほとんど変化しなかった(Fig. 4-1-7B)。このことは、ストレスの前後でチラコイド膜におけるプロトンの透過度は変化していない、ということを示している。

PS II から PS I への直線的な電子伝達活性が乾燥、強光ストレスを受けた葉から抽出したチラコイド膜において低下していたのに対し、PS II 活性、PS I 活性は乾燥ストレス・強光ストレスの前後で変化していなかった(Fig. 4-1-7C, D)。このことは、*in vivo* で得られた結果(Fig. 4-1-5, 4-1-6)と同様に、ストレス条件下でも PS II と PS I はダメージを受けていないということを示している。またこれらの結果は、乾燥や強光条件下では PS II と PS I の間で電子伝達活性が抑制されていることを示唆する *in vivo* の結果(Fig. 4-1-5)を支持するものである。さらに、脱共役剤によってチラコイド膜を介したプロトン濃度勾配の形成を阻害した場合でも、PS II から PS I への電子伝達活性がストレスを受けた葉から抽出したチラコイド膜で低下していた(Fig. 4-1-7A, 脱共役時)。このことは、ストレス条件下ではチラコイド膜内外のプロトン濃度勾配には非依存の方法によって、PS II と PS I の間で電子伝達活性を抑制するメカニズムが存在することを示している。



**Figure 4-1-7.** 単離チラコイド膜を用いた *in vitro* 直線的電子伝達活性測定

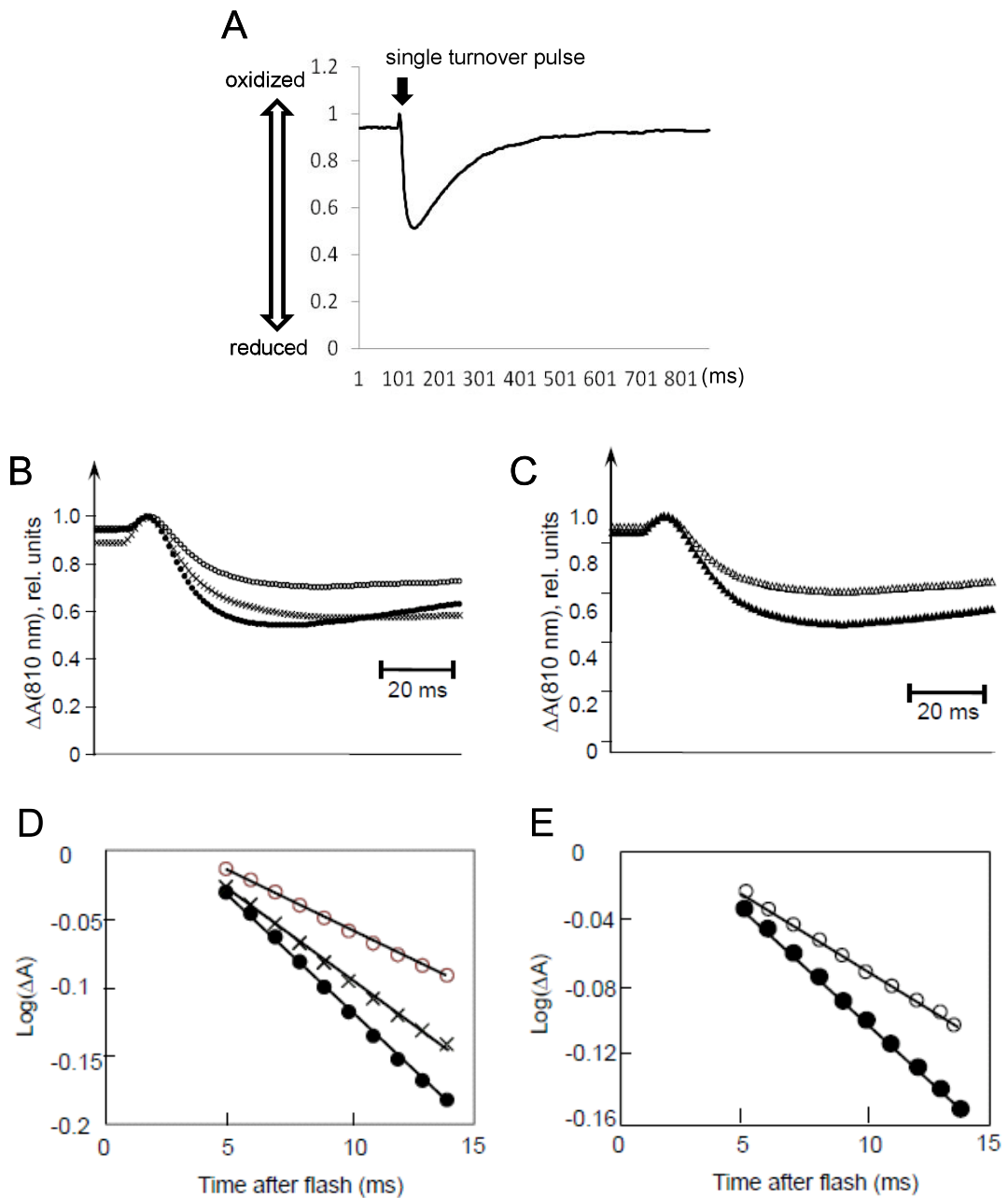
ストレス前の野生種スイカ(unstressed)と乾燥ストレス(drought)あるいは強光ストレス(HL)をかけた野生種スイカ葉から単離したチラコイド膜を用い、光照射下で *in vitro* における光合成電子伝達活性の測定を行った。A. PS II から PS I への直線的な電子伝達活性。B. A における、脱共役剤添加時に対する共役時の電子伝達活性。C. PS II の電子伝達活性。D. PS I の電子伝達活性。PS II から PS I (electron donor;  $\text{H}_2\text{O}$ , electron acceptor; MV) への直線的な電子伝達活性と、PS I の電子伝達活性(electron donor; TMPD, electron acceptor; MV) は飽和光照射下における酸素消費速度の測定から計算した。PS II 活性(electron donor;  $\text{H}_2\text{O}$ , electron acceptor; *p*-benzoquinone) は飽和光照射下における酸素発生速度の測定から計算した。B においては、t 検定によって有意差がないことを確かめた( $P < 0.05$ )。 (n = 3).

#### 4-1-4. P700 の還元キネティクスの測定

クロロフィル蛍光を用いた *in vivo* における光合成電子伝達の測定(Fig. 4-1-5)や、酸素発生あるいは酸素消費速度の測定から計算した *in vitro* における光合成電子伝達速度の解析(Fig. 4-1-7)から、非ストレス時と比較して、乾燥ストレスや強光ストレス条件下では直線的な電子伝達活性が PS II と PS I の間で抑制されていると考えられた。この考えが正しければ、ストレスを受けていない葉に比べ、ストレスを受けた葉では PS II から PS I に電子が届くまでの時間が長いはずである。このことを実証するために、一励起エネルギーを与える single turnover pulse 照射による P700 酸化還元変化を測定した(Jahns et al., 2002)。リーフディスクに PS I のみを励起させる FR 光を照射し、PS I を酸化状態にさせておく。その後、FR 照射下において飽和光の single turnover pulse を照射する。この single turnover pulse は両方の光化学系を励起するため、PS II から PS I への電子の流れが起こる。この電子の流れによる PS I の一過的な還元キネティクスを測定した(Fig. 4-1-8A)。この後、PS I は FR が照射されているため、すぐに酸化状態に戻る。

予想した通り、single turnover pulse による P700 の一過的な還元は、非ストレス下の葉よりも乾燥ストレスを受けた葉の方が遅いという結果が得られた(Fig. 4-1-8B)。また、3 日間の乾燥ストレスの後に 3 日間の再灌水を行った葉では、この P700 の一過的な還元の速度は元に戻っていた(Fig. 4-1-8B)。さらに、PS I の電子受容体である MV をリーフディスクに infiltration することで PS I よりも下流の影響を省き、同時に CEF を阻害した状態にして測定した場合でも、P700 の一過的な還元は、非ストレス下の葉よりも乾燥ストレスを受けた葉の方が遅いという、MV なしの場合と同様の結果が得られた (Fig. 4-1-8B)。

これらの結果は、非ストレス時と比較してストレス条件下の葉では、Cyt *b6f* 複合体から PS I への電子伝達活性が低下している、ということを示している。



**Figure 4-1-8. P700 の酸化還元変化**

ストレス前の野生種スイカと乾燥ストレスをかけた野生種スイカ葉から作成したリーフディスクを用い、P700の一過的な還元キネティクスの測定を行った。まずリーフディスクにFRを照射することでP700を酸化状態にして置き、single turnover pulseを照射することで誘導されるP700の一過的な還元速度を調べた。A. FR照射下でsingle turnover pulseを照射した時のP700の酸化還元変化の様子を示したもの。B. single turnover pulseによるP700

の一過的な還元。非ストレス下の葉(●)、3 日間の乾燥ストレスを受けた葉(○)、3 日間の乾燥ストレスの後に 3 日間の再灌水を行った葉(×)。 C. 非ストレス下の葉(▲)、3 日間の乾燥ストレスを受けた葉(△)から採取したリーフディスクに MV を infiltration させて測定した P700 の一過的な還元キネティクス。 D. A の linear phase を片対数プロットしたもの。速度定数と再還元の half time は、非ストレス下の葉で  $17.3\text{ s}^{-1}$  and 40 ms (●)、3 日間の乾燥ストレスを受けた葉で  $8.9\text{ s}^{-1}$  and 78 ms (○)、3 日間の乾燥ストレスの後に 3 日間の再灌水を行った葉  $13\text{ s}^{-1}$  and 53 ms (×)であった。 E. B の linear phase を片対数プロットしたもの。速度定数と再還元の half time は、非ストレス下の葉で  $13.1\text{ s}^{-1}$  and 53 ms (▲)、3 日間の乾燥ストレスを受けた葉で  $8.8\text{ s}^{-1}$  and 78 ms (△)であった。 B、C における 1 点は 1ms を示す。それぞれのポイントは 3 回の測定結果の平均を表す。 C、D の片対数プロットのスロープは、マイクロソフト・エクセルの線形外挿法を用いて計算した。(n = 3).

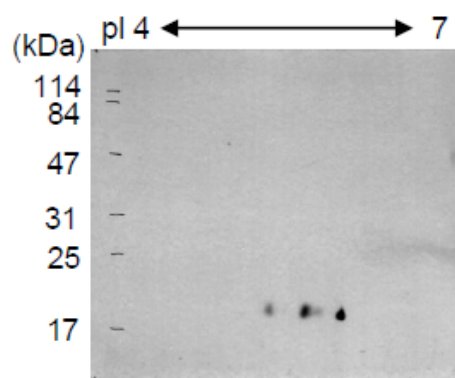
## 4-2. 乾燥・強光条件下における

### 葉緑体 Rieske 鉄-硫黄タンパク質の挙動変化

#### 4-2-1. 光合成系タンパク質の蓄積量

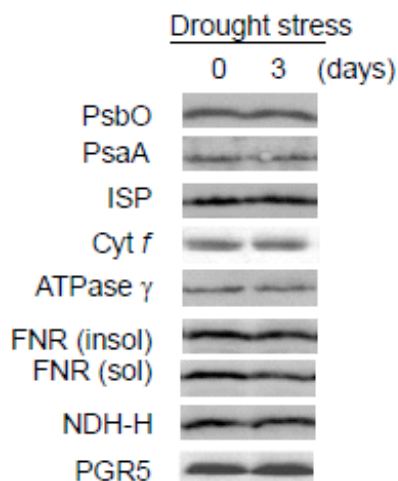
野生種スイカ葉の膜画分を用いたプロテオーム解析の結果、光合成電子伝達系に関与する Rieske タンパク質、FNR、NDH-I、NDH-K が乾燥ストレスに応答して変化していることが明らかになった(吉田、2005)。本研究における生理学的な解析から、乾燥や強光といったストレス条件下において、直線的な電子伝達活性が PS II と PS I の間で低下していることを示唆する結果が得られている。このことから、ストレス条件下では上述の乾燥ストレス応答性の電子伝達系に関わるタンパク質が、光合成電子伝達活性の制御に関与しているのではないかと考えられた。光合成系のタンパク質の蓄積量の低下は、光合成電子伝達活性の低下を引き起こす原因となる。そこで、野生種スイカにおいて、光合成電子伝達に関与する因子、及び、主要な光合成タンパク質がストレスによって量的に変化したかどうかを調べるために、乾燥ストレス前後の野生種スイカ葉から抽出したタンパク質を用いてウエスタン解析を行った。

まず、葉緑体 Rieske タンパク質を特異的に検出する抗体を作製した。得られた抗 Rieske 抗体の能力を評価するために、野生種スイカ葉の膜画分タンパク質を二次元電気泳動によって分離し、免疫ブロット解析を行った。その結果、Rieske タンパク質の予想分子量に相当する約 19kDa の位置にのみタンパク質スポットが見られ、非特異的なタンパク質スポットは観察されないことを確認した(Fig. 4-2-1)。また、シロイヌナズナやタバコ、ホウレンソウでも同様の結果が得られた。



**Figure 4-2-1.** 葉緑体 Rieske タンパク質スポットの局在  
非ストレス下の野生種スイカ葉から抽出した膜タンパク質を二次元電気泳動に供し、抗 Rieske 抗体を用いて免疫ブロットを行った。(n≥3)

主要な光合成系のタンパク質の蓄積量を調べるために、PS II の PsbO、PS I の PsaA、ATP 合成酵素の $\gamma$ サブユニットに特異的な抗体を用いて免疫検出を行ったが、乾燥ストレスの前後でそれらのタンパク質の蓄積量に変化は見られなかった(Fig. 4-2-2)。また、プロテオーム解析で乾燥ストレス応答性を示した Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の Rieske と Cyt *f*、FNR、NDH 複合体の H サブユニットに特異的な抗体を用いて解析を行ったところ、FNR の可溶性画分の蓄積量が乾燥ストレスによってわずかに低下したが、それ以外のタンパク質の蓄積量は乾燥ストレスの前後で変化していなかった(Fig. 4-2-2)。また、環状電子伝達の FQR 経路に必要な不可欠である PGR5 タンパク質 (Munekage et al., 2002) の蓄積量も乾燥ストレスの前後で変化していなかった(Fig. 4-2-2)。これらの結果は、乾燥ストレスは光合成電子伝達系の量的な構成に影響を及ぼさなかったことを示している。



**Figure 4-2-2.** 乾燥ストレス前後における光合成系タンパク質の蓄積量  
 ストレス前の葉と乾燥ストレス 3 日目の葉から抽出した膜タンパク質を等量ずつ SDS-PAGE に供し、それぞれ示した抗体を用いて免疫ブロットを行った。Cyt *f* については、吉田(2005)から引用した。

#### 4-2-2. 葉緑体 Rieske タンパク質のストレス応答性

PS II と PS I の間の電子伝達を担う Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体のサブユニットである Rieske タンパク質が、プロテオーム解析によって興味深い挙動を示していた。そこで、葉緑体 Rieske サブユニットのストレス応答性について、詳細に調べた。野生種スイカ葉から抽出したタンパク質を二次元電気泳動によって分離し、その後、

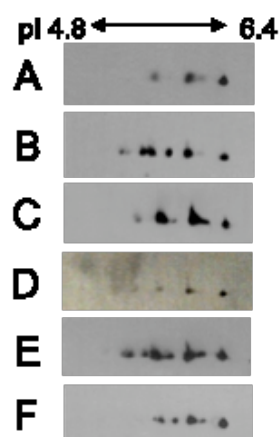
抗 Rieske 抗体によって特異的に検出した。その結果、まずストレスを受ける前の時点で、Rieske タンパク質スポットは複数存在していることが明らかになった(Fig. 4-2-3A)。そして、乾燥ストレス 3 日後にはストレス前に見られたスポットに加え、新たに  $pI$  の異なる複数のスポットが出現した(Fig. 4-2-3B)。この乾燥ストレス条件下で新たに出現したスポットは、暗条件下では消失していた(Fig. 4-2-3C)。このことから、Rieske タンパク質スポットの  $pI$  の変動は、乾燥ストレスそのものによって誘導されるのではなく、乾燥ストレス時に光照射を受けることによって誘導されると考えられた。また、3 日間の乾燥ストレス後に 3 日間の再灌水を行うと、乾燥ストレス条件下で出現したスポットが消失した(Fig. 4-2-3D)。

乾燥ストレス条件下におけるスポットの変動が、光強度の変化によっても見られるかどうかを調べた。野生種スイカは  $700 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の光強度下で生育させているが、一般的な植物にとっては  $700 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  は強光となる。そこでまず、光強度を通常の  $700 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ではなく、弱光下( $100 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )で野生種スイカを成育させた。弱光条件で育てた葉では、通常の光強度で生育した時(Fig. 4-2-3A)と同様に複数の Rieske スポットが確認された(data not shown)。このことから、野生種スイカ葉には、非ストレス時から Fig. 4-2-3A のように複数種の Rieske タンパク質が存在すると考えられる。弱光で生育させた後、通常の光強度条件下へ移動させて 30 分および 1 日後の変化を調べたが、Rieske タンパク質スポットの挙動変化は見られなかった(data not shown)。

次に、強光に対する応答を見るために、通常生育条件で育てた葉に  $2000 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の光を 15 分間照射したところ、乾燥ストレス時と同様に  $pI$  の異なる複数の Rieske タンパク質スポットの増加が見られた(Fig. 4-2-3E)。また、強光処理後に植物体を 15 分間 dark 条件下に置くと、それらの増加スポットは消滅していた(Fig. 4-2-3F)。このように、Rieske タンパク質スポットは、乾燥ストレスだけでなく強光ストレスにも応答してその数を変化させることが明らかになった。

なお、抗 Rieske 抗体を用いた Immunoblot 解析によって検出されたタンパク質スポットは、質量分析によってその全てが葉緑体 Rieske タンパク質であることを確認した。





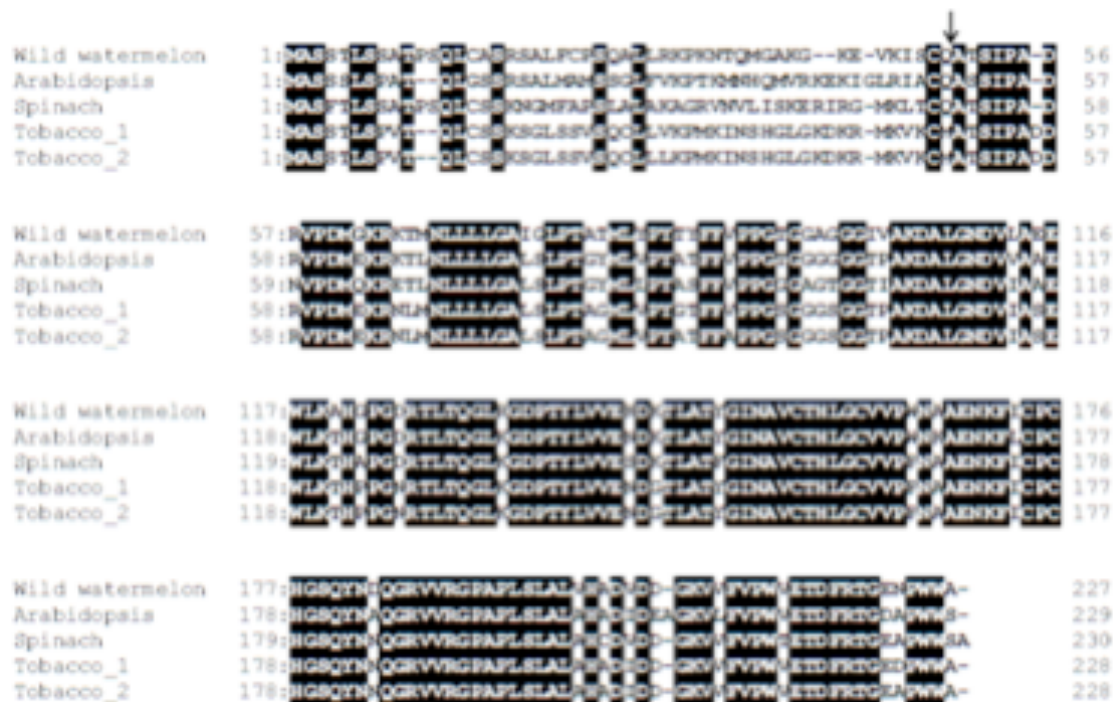
**Figure 4-2-3.** 葉緑体 Rieske タンパク質スポットの局在

以下に示すさまざまな条件下の野生種スイカ葉から抽出した膜タンパク質を二次元電気泳動に供し、抗 Rieske 抗体を用いて免疫ブロットを行った。A. 非ストレス条件。B. 乾燥ストレス 3 日目。C. 乾燥ストレス 3 日目、暗条件。D. 3 日間の乾燥ストレス後、3 日間の再灌水を行ったもの。E. 強光ストレス 15 分。F. 15 分間の強光ストレス後、15 分間暗処理を行ったもの。A-F 全てにおいて、葉緑体 Rieske タンパク質スポットが出現する領域のみ(pI;4.8-6.4, molecular mass;18-21kDa)を示している。(n≥3)

#### 4-2-3. 植物種間における葉緑体 Rieske タンパク質のアミノ酸配列の保存性

EST ライブラリから得られた情報を基に、野生種スイカの葉緑体 Rieske タンパク質のアミノ酸配列を調べ、いくつかの高等植物の葉緑体 Rieske タンパク質のアミノ酸配列と比較した。Fig. 4-2-4 に示すように、野生種スイカの葉緑体 Rieske タンパク質のアミノ酸配列は、ここで比較した高等植物種と高い相同性を示すことが明らかになった。特に、葉緑体移行シグナル配列を除いた mature な Rieske タンパク質のアミノ酸配列は、野生種スイカとここで示した植物種間で比較すると、80%以上の相同性を示した。

ハウレンソウの葉緑体の Rieske タンパク質をコードする遺伝子は 1 つで、その mature なアミノ酸配列の 2 番目のスレオニンと 3 番目のセリンがそれぞれリン酸化されるということが報告されている(Rinalducci et al., 2006)。ハウレンソウにおいては、N 末端配列(CQATSIPAD)のグルタミンとアラニンの間のペプチド結合が切断されて mature になる。この N 末端領域は、野生種スイカはもちろん、Fig. 4-2-4 に示した高等植物種においても高く保存されている。このことから、野生種スイカを含むこれらの高等植物においても、ハウレンソウで報告されているようなリン酸化が起こっている可能性がある。



**Figure 4-2-4.** 高等植物における葉緑体 Rieske タンパク質のアミノ酸アライメント  
Wild watermelon (*Citrullus lanatus*, this paper), Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*, CAC03598), Spinach (*Spinacia oleracea*, P08980) and Tobacco (*Nicotiana tabacum*, Tobacco\_1: P30361, Tobacco\_2: Q02585)の高等植物のアミノ酸配列をアライメントした。タバコに関しては、2種類の cDNA が報告されているため、2 種類の配列を示している。シグナル配列と mature なタンパク質の間の予想切断部位を矢印で示している。Gap(-)はアライメント精度を上げるために挿入してある。相同のアミノ酸は白黒反転して示している。

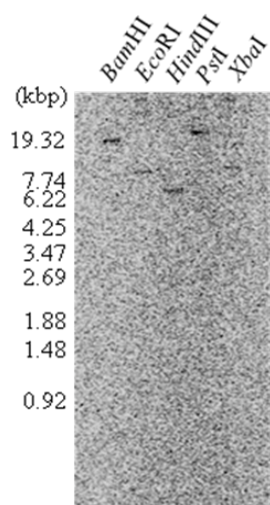
#### 4-2-4. 葉緑体 Rieske タンパク質の翻訳後修飾

Fig. 4-2-3 の結果から、ストレス条件下において葉緑体 Rieske タンパク質スポット数が増加することが明らかになった。この原因として、次のような 2 つの仮定が考えられる。まず一つ目は、野生種スイカには葉緑体 Rieske タンパク質をコードする複数の遺伝子が存在しており、ストレス時には通常時とは異なる Rieske 遺伝子からもタンパク質が作られるため、ストレス条件下で Rieske タンパク質スポット数が増加する、というものである。2つ目の仮定は、野生種スイカには葉緑体 Rieske 遺伝子は 1 つしかないが、ストレス時には Rieske タンパク質に修飾が起こるために、ストレスの状態によって Rieske タンパク質スポット数に変動する、というものである。そこで、野生種スイカ葉における葉緑体 Rieske 遺伝子配列および genome コピー数について調べた。

シロイヌナズナの葉緑体 Rieske タンパク質の塩基配列を鋳型にして野生種スイカの EST (expressed sequence tag) database (7,000 independent clones; K. Akashi and A. Yokota, unpublished data) を検索したところ、ストレス前で4つ、乾燥ストレス3日目で7つの EST 配列がヒットした。それらの配列の中に、Rieske 塩基配列の全長を示す長さのものは見られなかったが、それらをアライメントしたところ、重なった部分は全て同じ配列を有していた。このことから、少なくとも発現している Rieske の転写産物は1種類であると考えることが出来る。

さらに、野生種スイカ葉から抽出したゲノム DNA を用いて Southern Blot 解析を行ったところ、それぞれ異なる制限酵素で処理した野生種スイカ DNA を流した5つのレーンにおいて、検出されたバンドは各レーンで1つのみであった(Fig. 4-2-5)。このことから、野生種スイカでは葉緑体 Rieske タンパク質は単一の遺伝子にコードされていることが予想された。

乾燥ストレスの前後で Rieske タンパク質の蓄積量に変化は見られないにも関わらず(Fig. 4-2-2)、ストレス条件下で Rieske タンパク質スポットの変動が見られた(Fig. 4-2-3)。以上のことから、Rieske タンパク質は、乾燥や強光といったストレス条件下において、翻訳後修飾を受けていると考えられた。



**Figure 4-2-5.** Southern Blot 解析

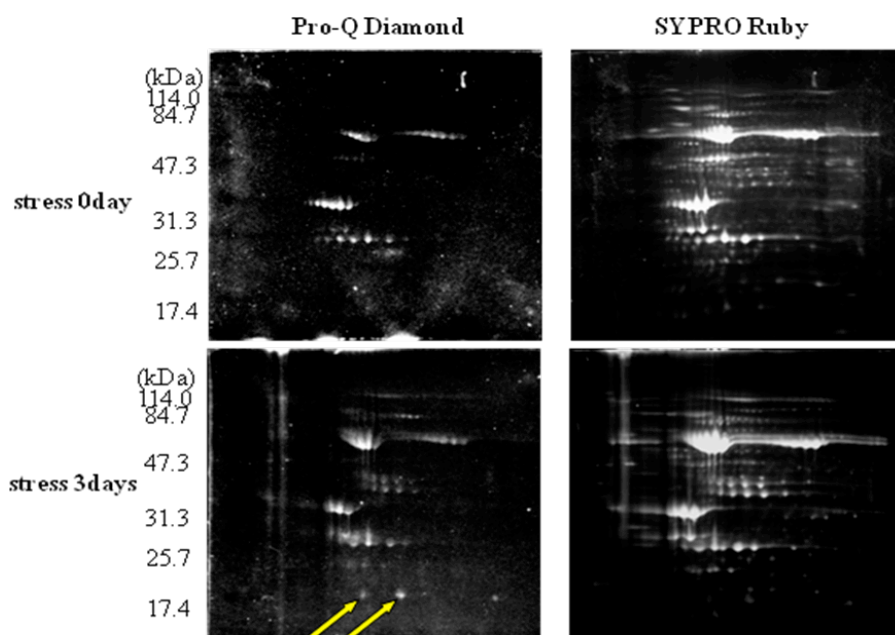
DNA は野生種スイカ葉から抽出した。EST 解析によって得られた Rieske 塩基配列を基にプローブを作成した。

#### 4-2-5. 葉緑体 Rieske タンパク質に誘導される翻訳後修飾の検出

ストレス条件下で増加する Rieske タンパク質スポットは、分子量がほぼ同じでより酸性側に見られた(Fig. 4-2-3)。このことから、Rieske タンパク質に起こる修飾はリン酸化ではないかと予想された。そこでまず二次元電気泳動を行い、リン酸化タンパク質を特異的に染色する ProQ ダイアモンドという染色液を用い

てゲルを染色した。その後、同じゲルを用いて Ruby 染色を行うことで全タンパク質を検出し、タンパク質スポットの比較を行った。ProQ ダイヤモンド染色によって、乾燥ストレス 3 日目のサンプルにおいて、ストレスで誘導される酸性側の Rieske スポットに相当する 2 つのスポットが確認できた(Fig. 4-2-6)。そこで次に、抗リン酸化抗体(P-Ser、P-Thr)を用いた二次元電気泳動および免疫ブロットを行った。まず抗リン酸化抗体を用いて免疫ブロットを行い、同じメンブレンを deprobe した後に抗 Rieske 抗体を用いて免疫ブロットを行った。両メンブレンのスポットの照合を行ったところ、抗リン酸化抗体を用いた解析においては、Rieske タンパク質に相当するスポットは検出されなかった(data not shown)。

Rieske タンパク質に起こる修飾の種類と位置を決定するために、二次元電気泳動によりそれぞれの Rieske 分子種を単離し、質量分析を行った。その結果、リジン残基のメチル化とスレオニン残基の脱水が検出されたが、それらは、乾燥ストレス前後の両方のサンプルにおいて非ストレス時から見られる塩基性側のスポットで見られた(data not shown)。そのため、検出されたメチル化と脱水はストレス前後で見られた Rieske タンパク質の変動とは無関係であると考えられた。



**Figure 4-2-6.** Pro-Q Diamond によるリン酸化タンパク質の検出

乾燥ストレス前後の葉から抽出した膜タンパク質を二次元電気泳動によって展開し、リン酸化タンパク質の染色剤である Pro-Q Diamond によってリン酸化タンパク質のみを染色した。同じゲルを用いて Ruby 染色を行うことで全タンパク質を染色し、比較した。矢印は Rieske タンパク質と思われるスポットを示している。

### 4-3. 分光学的手法による

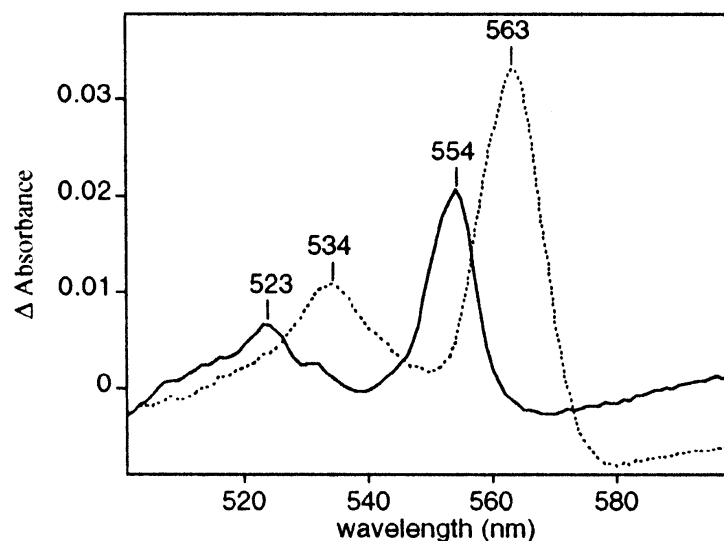
#### Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性の評価

##### 4-3-1. 乾燥ストレス条件下における野生種スイカの形態・生理変化

本研究におけるこれまでの結果から、光合成電子伝達系が過還元になるようなストレス条件下において、電子伝達活性が PS II と PS I の間で抑制されることが示された。また同じストレス条件下において、PS II と PS I の間で電子の伝達を行う Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の Rieske サブユニットが翻訳後修飾を受けていることを示唆する結果が得られている。これらのことから、ストレス条件下では修飾を受けた Rieske タンパク質が Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体で電子伝達活性を抑制しているのではないか、と考えられた。そこで、ストレス条件下における Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性を評価した。

Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達反応は PS II や PS I とは異なり、酸素発生・酸素吸収を伴わない。そこで、分光学的な手法によって Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性を直接的に調べることにした。ワシントン州立大学の D. M. Kramer 教授の研究室で共同研究を行い、Electrochromic Shift (ECS) の手法を用いた Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の直接的な電子伝達活性を測定した。

プラストキノンプールから来た電子は、Cyt *b<sub>6</sub>f* 複体内では Cyt *b*、Rieske、Cyt *f* の順に流れ、Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体から出てプラストシアニンへと受け渡される。それぞれのサブユニットは電子を受け取った時は還元状態に、電子を受け渡した後は酸化状態になる。Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体のサブユニットの中では、ヘムを有する Cyt *b*、Cyt *f* について、それぞれのサブユニットに特有の波長で酸化還元差スペクトルの測定を行うことが出来る。そのうち、用いた手法においては Cyt *f* の方が検出できるスペクトルの強度がより強いため、Cyt *f* の酸化還元差スペクトルを測定した。Fig. 4-3-1 は、Cyt *f* の差スペクトル(還元型 Cyt *f* の吸収スペクトル－酸化型 Cyt *f* の吸収スペクトル)を示しており、Cyt *f* の差スペクトルは 554nm にピークを持つ(Dietrich and Kuhibrandt, 1999)。電子伝達に伴う Cyt *f* の差スペクトルの変化を追うことで、ストレス条件下で Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性が低下しているのかどうかを評価した。






**Figure 4-3-1.** Cyt *f* の酸化還元差スペクトル

ハウレンソウ葉から精製した Cyt *b<sub>6</sub>f* を用いて Cyt *f* の酸化還元差スペクトルを測定したもの。実線が Cyt *f* の差スペクトルを表す。(Dietrich, 1999)

Cyt *f* の再還元キネティクスの測定を行うために、アメリカ・Washington State University において野生種スイカを栽培した。本学で行った実験とは栽培条件が少し異なるため、本実験に用いた野生種スイカ葉の乾燥ストレスに対する形態的・生理的変化を調べた。野生種スイカの第4葉が完全展開した時点をストレス0日目と定義し、その後灌水停止によって乾燥ストレスを与えた。

Fig. 4-3-2 は、乾燥ストレス下における野生種スイカの形態的・生理的な変化を示している。灌水停止後1日で葉に萎れが見られ、2日目には葉が完全に萎れてしまった。土壌水分含量はストレス前でも約40%と低い値を示し、灌水停止後1日目で約10%、2日目には約0.5%まで低下した。また、気孔コンダクタンスは灌水停止後1日で急激に低下し、ゼロに近い値を示したことから、乾燥ストレス1日目で気孔はほぼ完全に閉鎖していると考えられた。これらの結果から、Washington State University で生育させた野生種スイカは、灌水停止によって非常に強い乾燥ストレスを受けたと考えられる。これは、用いた生育土の水分保持能力が非常に低かったためであると思われる。乾燥ストレス2日目には植物体が萎れてしまっていたので、Washington State University で行った以下の実験に関しては、乾燥ストレスを与えた葉として、気孔がほぼ完全に閉鎖していると考えられる乾燥ストレス1日目の葉を用いた。



	Unstressed	Drought 1 day	Drought 2 day
			
soil water contents (%)	40.4 ± 8.4	9.2 ± 2.0	0.5 ± 0.3
conductance (mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	0.45 ± 0.06	0.01 ± 0.01	not detectable

**Figure 4-3-2.** 乾燥ストレス条件下における野生種スイカの形態的・生理的变化

550  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の光強度下で第4葉が完全展開するまで野生種スイカを生育し、灌水を停止することで、乾燥ストレスを与えた。 (n=3)

#### 4-3-2. フラッシュ光による Cyt *f* の再還元キネティクスの測定原理

actinic light の照射によって電子伝達鎖を還元状態にしておき、dark 条件下で短いフラッシュ光を照射し、それに伴う Cyt *f* の一過的な酸化に続く再還元キネティクスを調べた。

Fig. 4-3-3 は Cyt *f* の再還元キネティクス測定トレースの例を示している。actinic light の照射によって還元状態にあった Cyt *f* がフラッシュ光によって酸化され、その後再還元される様子を示している。この再還元のキネティクスを観察した。

酸化型の Cyt *f* は電子を受け取ることによって還元される。



フラッシュ照射時(Cyt *f* が完全に酸化された状態)の酸化型 Cyt *f* の量を[Cyt *f*<sub>ox</sub>]<sub>0</sub>、電子の量を[e<sub>0</sub>]とし、時間 *t* において反応した酸化型 Cyt *f* の量を[Cyt *f*<sub>ox</sub>]<sub>*t*</sub>、電子の量を[e<sub>*t*</sub>]とする。そして、還元型 Cyt *f* の生成速度を *v* とすると、*v* は酸化型 Cyt *f* の濃度と電子の濃度に比例するので、

$$v = k [\text{Cyt } f_{\text{ox}}]_t [e^-]_t \quad \dots(i)$$

という式で表される。*k* は2次反応速度定数を表す。

フラッシュ光の強さは十分に強いので、電子は十分量存在すると考えられる。

$$[\text{Cyt } f_{\text{ox}}] \ll [e^-]$$

そのため、(i)は

$$v = k' [\text{Cyt } f_{\text{oxo}} - \text{Cyt } f_{\text{ox}}] \cdots \text{(ii)}$$

と表せる。ここで  $k'$  は偽 1 次反応速度定数を表す。

還元型  $\text{Cyt } f$  の生成速度は、酸化型  $\text{Cyt } f$  の量に比例することから、ある時間  $t$  における酸化型  $\text{Cyt } f$  の量を求めると、還元型  $\text{Cyt } f$  の生成速度を知ることが出来る。

$$v = \frac{d[\text{Cyt } f_{\text{ox}}]}{dt}$$

式(ii)より、

$$\frac{d[\text{Cyt } f_{\text{ox}}]}{dt} = k' [\text{Cyt } f_{\text{oxo}} - \text{Cyt } f_{\text{ox}}]$$

$$[\text{Cyt } f_{\text{ox}}] = [\text{Cyt } f_{\text{oxo}}] \times e^{-k't}$$

よって、この反応においては酸化型  $\text{Cyt } f$  の量は初期濃度から指数関数的に減少する。またその速度は、速度定数  $k'$  のみによって決定される。

ここで、 $\tau$ =速度定数の逆数と定義すると、

$$[\text{Cyt } f_{\text{ox}}] = [\text{Cyt } f_{\text{oxo}}] \times e^{-t/\tau} \cdots \text{(iii)}$$

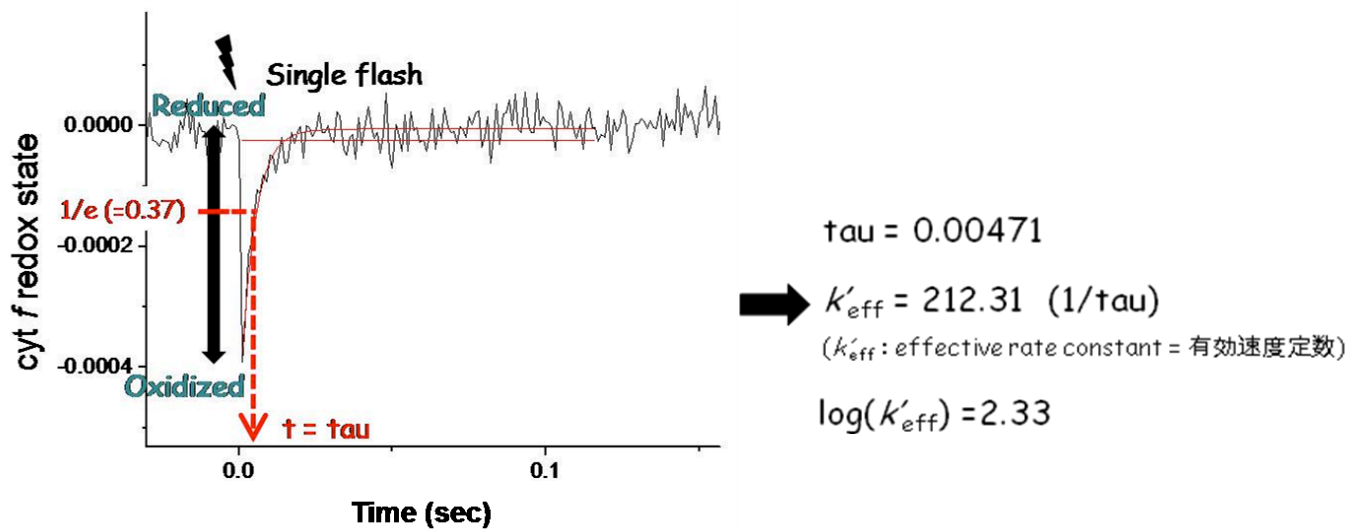
$\tau$  は時定数とも呼ばれ、酸化型  $\text{Cyt } f$  の量が初期値( $[\text{Cyt } f_{\text{oxo}}]$ )の  $1/e$  ( $\approx 0.37$ 、 $e=2.71828\cdots$ )になるまでの時間を表す。

測定して得られた再還元キネティクスのトレースに数式(iii)をフィットさせて  $\tau$  の値を求め、その逆数をとることで速度定数  $k'$  を算出した。

なお、測定値は 3 つの波長の値を次のように deconvolute することで求めた。

$$\Delta A_{554} - \Delta A_{545} - ((\Delta A_{572} - \Delta A_{545})/3)$$





**Figure 4-3-3.** Cyt *f* の再還元キネティクス測定トレースの例

野生種スイカ葉から単離したチラコイド膜を還元状態にしておき、短いフラッシュ光を照射して Cyt *f* が酸化され、その後の還元キネティクスをモニターした。再還元キネティクスに数式をフィットさせ、その数式から tau(酸化型 Cyt *f* の量が初期値の 1/e になるまでの時間)の値を求めた。得られた tau の値を用いて、右上のように  $k'_{\text{eff}}$  (有効速度定数) の対数を計算した。

#### 4-3-3. フラッシュ光による Cyt *f* の再還元キネティクスの測定

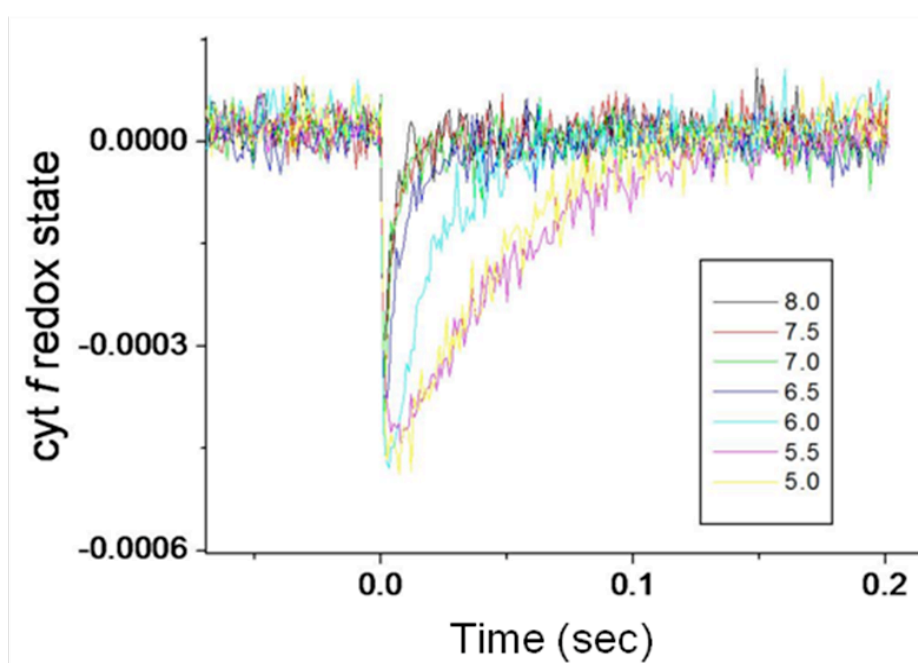
ストレス前、乾燥ストレス 1 日目の葉から単離したチラコイド膜を用いて、Cyt *f* の再還元キネティクスの測定を行った。膜を介したプロトン濃度勾配の影響を排除するため、測定系に脱共役剤を添加して実験を行った。それゆえ、チラコイド膜内外の pH は用いた buffer の pH に同調しているとみなすことが出来る。

Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性はルーメン pH の低下に伴って低下することが報告されている(Hope et al., 1994; Nishio and Whitmarsh, 1993; Finazzi and Rappaport, 1998)。Fig. 4-3-4 に示したように、本研究においても、非ストレス下の葉から単離したチラコイド膜で、buffer pH の低下に伴う Cyt *f* の再還元速度の低下が見られた。この pH の低下に伴った Cyt *f* の再還元速度の低下は、乾燥ストレスを受けた葉から単離したチラコイド膜でも観察された(Fig. 4-3-5)。

Cyt *f* の再還元速度は、調べた全ての pH(5.0–8.0)において、乾燥ストレスを受けた葉から単離したチラコイド膜において有意に低下していた(Fig. 4-3-5)。Fig.

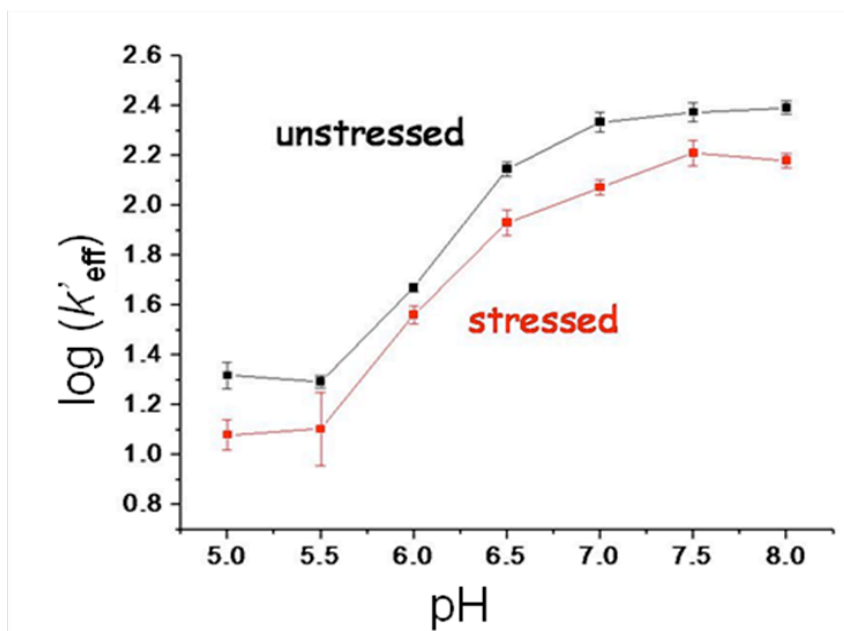
4-1-7 など他の実験にも用いた条件である pH7.5 では、Cyt *f* の再還元速度は、ストレス前の葉から単離したチラコイド膜( $k' = 238.7$ )に比べ、乾燥ストレスに曝した葉から単離したチラコイド膜( $k' = 165.0$ )では、31 %低下していた(Fig. 4-3-5、対数をとる前の値)。

以上の結果から、乾燥ストレス条件下の野生種スイカでは、非ストレス時に比べてルーメン pH が低いために Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性が低下しているのではなく、乾燥ストレス条件下では Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体そのものの活性が低下していると考えられた。



**Figure 4-3-4.** Cyt *f* の再還元キネティクスの pH 依存性

非ストレス下の野生種スイカ葉から単離したチラコイド膜を用いて Cyt *f* の再還元キネティクスを調べた。buffer の pH を 5.0 から 8.0 まで 0.5 刻みで変化させて測定した。



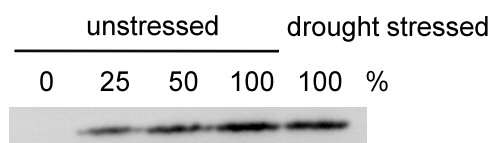
**Figure 4-3-5.** 乾燥ストレス前後の Cyt *f* の再還元速度

乾燥ストレス前後の野生種スイカ葉から単離したチラコイド膜を用い、Cyt *f* の再還元速度を調べた。buffer の pH を 5.0 から 8.0 まで 0.5 刻みで変化させて測定した。(n=3)

#### 4-3-4. 乾燥ストレス前後における Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の蓄積量

Fig. 4-3-5 の結果から、乾燥ストレス下では Cyt *f* の再還元速度が低下していることが示された。この低下の理由として、次の 4 つの可能性が考えられる。①乾燥ストレスによって Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性が低下した。②乾燥ストレスによって Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の蓄積量が低下した。③乾燥ストレスによって Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体への PQ の近づきやすさが変化した。④乾燥ストレスによって機能的な Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の量が低下した。

まず、②の可能性について検証した。Fig. 4-3-5 で用いた単離チラコイド膜からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE によって分離した後、抗 Rieske 抗体を用いて免疫ブロットを行った。その結果、Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体のサブユニットである Rieske タンパク質の蓄積量は乾燥ストレスの前後で変化していないことが明らかになった(Fig. 4-3-6)。このことから、乾燥ストレスの前後で Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の蓄積量は変化していないと考えられた。



**Figure 4-3-6.** 乾燥ストレス前後における Rieske タンパク質の蓄積量

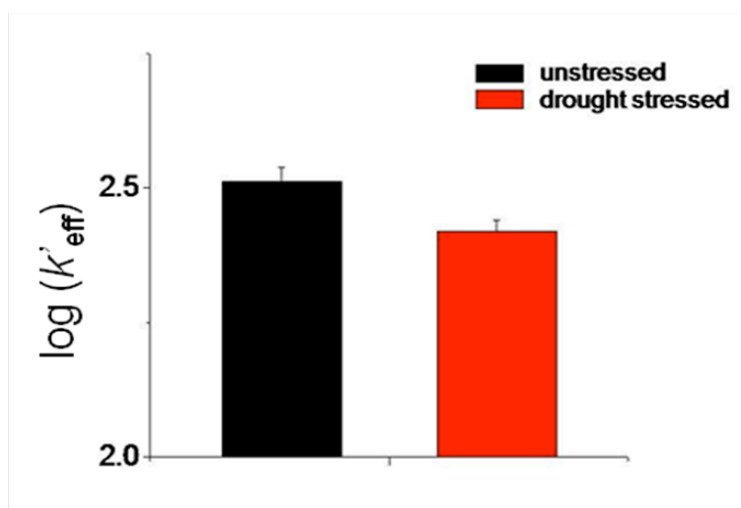
Fig. 4-3-5 で用いた単離チラコイド膜からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE によって分離した後、抗 Rieske 抗体を用いて免疫ブロットを行った。

#### 4-3-5. duroquinone を用いた Cyt *f* の再還元速度の測定

乾燥ストレスの影響によって膜の組成や構造が変化し、PS II から Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体へと電子の受け渡しを行うプラストキノンの流動性が悪くなるとすると、結果として Cyt *f* の再還元速度は低下すると考えられる。そこで次に、③の可能性について検証した。

電子伝達鎖において PS II から Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体へと電子を受け渡すプラストキノンのアナログであるデュロキノンを用いて Cyt *f* の再還元速度を測定した。長い側鎖を持つプラストキノンとは異なり、デュロキノンはベンゼン環を主構造とするため、構造的にコンパクトな物質である。そのため、プラストキノンよりも膜中を自由に移動できる。前もって還元しておいたデュロキノンを測定系に過剰量加えることによって、Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体への電子の受け渡しに律速が起こらない系を作り出した。

測定の結果、デュロキノンを用いた系でも Fig. 4-3-5 のように、乾燥ストレスに曝した葉から単離したチラコイド膜では、ストレスを受けていない葉から単離したチラコイド膜に比べ、Cyt *f* の再還元速度が有意に低下していた(Fig. 4-3-7)。このことから、乾燥ストレス下における Cyt *f* の再還元速度の低下は PS II から Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体への電子の近づきやすさが変化したことによるのではないと考えられた。以上の結果から、ストレス条件下では Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性が抑制されていると考えられた。



**Figure 4-3-7.** デュロキノンを用いた Cyt *f* の再還元速度の測定

乾燥ストレス前後の野生種スイカ葉から単離したチラコイド膜を用い、プラストキノンのアナログであるデュロキノンを加えて Cyt *f* の再還元速度を調べた。用いた buffer の pH は 7.5。 (n=3)

#### 4-3-6. 分光学的手法を用いた機能的な Cyt *f* の定量

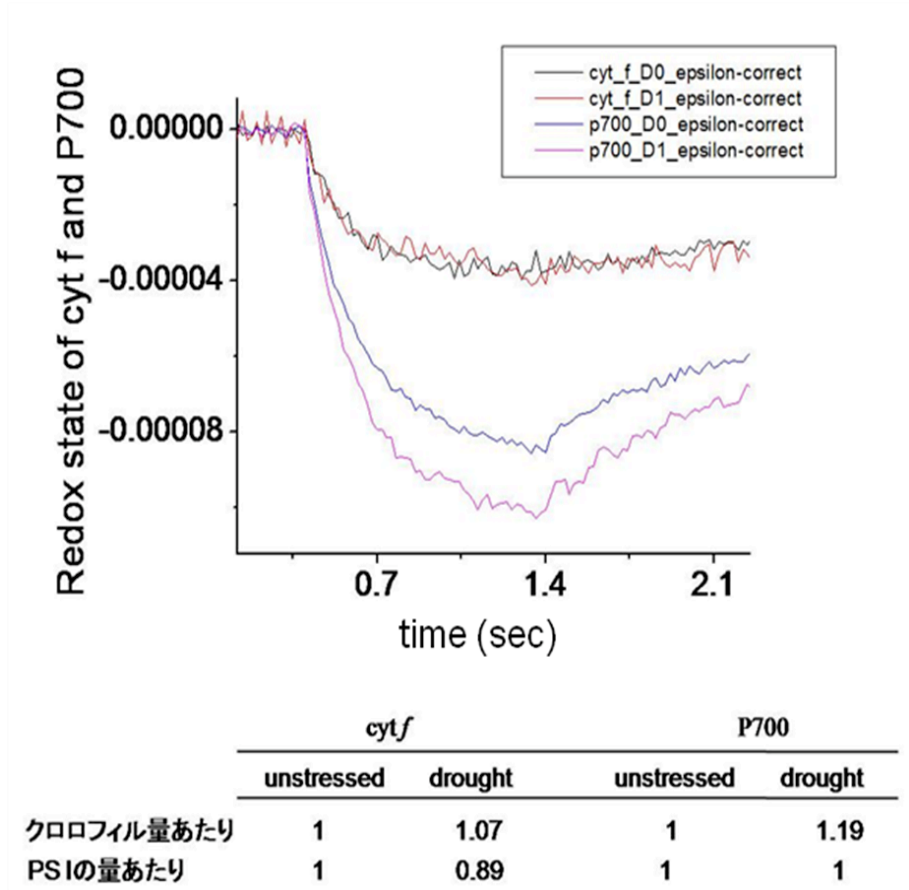
Fig. 4-3-6 の結果から、Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の蓄積量は乾燥ストレスの前後で変化していなかったと考えられた。しかし、乾燥ストレス下では何らかの変化が起こったために機能を失った Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体が存在しているかもしれない。もしそうであるならば、Cyt *f* の再還元速度は低下すると考えられる。そこで次に、④の可能性について検証した。

免疫ブロット法とは異なり、分光学的な手法を用いることで、Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の蓄積量ではなく、機能している Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の量を知ることが出来る。

暗条件下で単離チラコイド膜にアスコルビン酸を加えることで電子伝達系を還元状態にしておき、連続光を照射した。PS II の電子伝達阻害剤として DCMU を系に加えているため、連続光が照射されても PS II からの電子伝達は起こらない。PS I からの電子受容体として MV を用いたので、連続光照射によって系に蓄えられていた電子が全て MV へと渡され、Cyt *f* を含む電子伝達系は完全に酸化状態になる。このような実験系を用い、Cyt *f* が還元状態であった時と酸化状態になった時の吸光度の差を求めた。

乾燥ストレス前後のサンプルを、クロロフィル量を一定にして測定を行った。その結果、Cyt *f* の量は乾燥ストレスの前後でほとんど変化しなかったが、PS I の量が乾燥ストレスによって少し増加していた(Fig. 4-3-8)。この実験においては

クロロフィル量を一定にして測定したが、クロロフィル濃度が乾燥ストレスによって変化したという可能性もある。ストレスの前後で PS I の量は変化しないとして考えると、この結果は乾燥ストレス下で Cyt *f* の量が少し減少していることを示している(Fig. 4-3-8)。しかし、この実験に関しては一度しか行っていないため、更なる追試が必要である。



**Figure 4-3-8.** 分光学的手法による Cyt *f*、P700 の量の測定

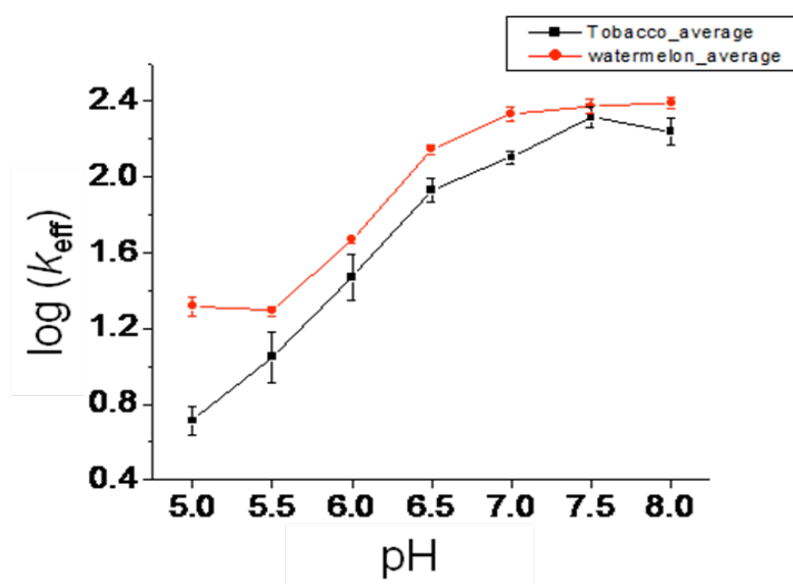
乾燥ストレス前後の野生種スイカ葉から単離したチラコイド膜を用い、連続光を照射する前後での吸光度変化を調べることで Cyt *f*、P700 の量を評価した。測定値はそれぞれの吸光係数を用いて補正した。図で示してあるのはクロロフィルあたりの測定結果。下に示した表は、Cyt *f*、P700 それぞれにおける相対値である。測定 buffer の pH は 7.5 で行った。(n=1)

#### 4-3-7. 野生種スイカに特異的な Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の特徴

分光学的な手法を用いた Cyt *f* の再還元速度の測定を行った中で、次のような興味深い現象を見出した。

非ストレス下の野生種スイカとタバコにおける Cyt *f* の再還元速度を比較したところ、野生種スイカの方が高い Cyt *f* 再還元速度を示すことが明らかになった (Fig. 4-3-9)。また、過去に報告されているシロイヌナズナでの測定値 (Takizawa, 2007) よりも野生種スイカの方が高い Cyt *f* 再還元速度を有していた。

さらに、タバコでは測定 buffer の pH 低下に伴って Cyt *f* の再還元速度が直線的に低下したが、野生種スイカでは低 pH (pH 5.5-5.0) での活性の低下が見られなかった (Fig. 4-3-9)。



**Figure 4-3-9.** 野生種スイカ、タバコにおける Cyt *f* の再還元速度の pH 依存性

非ストレス下の野生種スイカ葉とタバコ葉から単離したチラコイド膜を用い、Cyt *f* の再還元速度を調べた。buffer の pH を 5.0 から 8.0 まで 0.5 刻みで変化させて測定した。 (n=3)

## 第 5 章

### 考察

#### 5-1. ストレス条件下における光合成電子伝達の制御

乾燥強光ストレスに強い耐性を示す野生種スイカを用いて、ストレス条件下における生理応答や光合成活性などを調べた。3 日間の灌水停止によって、野生種スイカは完全に気孔を閉鎖していた(Fig. 4-1-3)。野生種スイカにおいても、一般的な植物と同様に、乾燥ストレスを受けると気孔を閉じることが明らかになった(上妻, 2008)。気孔の閉鎖は蒸散を防いで植物体の水分量を保持する役割があるが、同時に葉への  $\text{CO}_2$  の流入を妨げる。乾燥ストレスに曝された野生種スイカでは、光合成速度( $\text{CO}_2$  固定速度)が停止していた(Fig. 4-1-3)。このような状態においては、 $\text{CO}_2$  固定反応による消費エネルギーの量が激減するが、光照射に伴う光エネルギーの吸収は継続される。それゆえ、葉緑体のチラコイド膜には行き場を失った電子(還元力)が多く蓄積されることとなる。この過剰なエネルギーはやがて酸素と反応し、植物体に光阻害として知られる光化学反応効率の低下をもたらす活性酸素種を発生させる原因となる(Foyer et al., 1994、Aro et al., 1993)。実際に、クロロフィル蛍光を用いた解析から、乾燥ストレス下の野生種スイカにおいて、PQ pool が強い還元状態にあることが示された(Fig. 4-1-5)。しかし興味深いことに、PQ pool よりも下流に位置する PS I は、乾燥ストレス下においてより酸化状態にあった(Fig. 4-1-6)。これらの結果から、乾燥ストレス条件下では、直線的な電子伝達活性が PS II (PQ pool) と PS I の間で抑制されていると考えられた。PS I の反応中心である P700 の酸化還元キネティクスの測定結果(Fig. 4-1-8)も、この考えを支持するものである、

さらに、単離チラコイド膜を用いた電子伝達活性の測定(Fig. 4-1-7)から、乾燥ストレスだけでなく強光ストレスに曝された葉でも直線的な電子伝達活性が PS II と PS I の間で抑制されていることを示唆する結果が得られた。一般的に、植物の光合成速度( $\text{CO}_2$  固定速度)は光強度が強くなるに従って増加するが、ある程度の光強度に達すると飽和状態となり、光合成速度はそれ以上増加しなくなる。ちなみに野生種スイカでは、 $1000 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  くらいの光強度で光合成速度が飽和する(Miyake and Yokota, 2000)。本研究では強光ストレス処理を行う場合、 $2000 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の強光を用いた。それゆえ、強光ストレスに曝された野生種スイカでは、自身の光合成能力を上回るほどの光エネルギーが吸収されるため、葉緑体には過剰なエネルギーが蓄積されることとなる。これらを総



合すると、ストレス条件下における直線的な電子伝達活性の抑制は、乾燥や強光といった葉緑体に過剰な還元力が蓄積される条件下において起こると考えられる。

Washington State University において、乾燥ストレス前後の野生種スイカ葉から単離したチラコイド膜を用いた Cyt *f* の再還元速度の測定を行った結果、ストレス前後のチラコイド膜の両方で、pH の低下に伴う Cyt *f* の再還元速度の低下が見られた(Fig. 4-3-4、4-3-5)。PS II から Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体への電子伝達を担うプラストキノンのアナログであるデュロキノンを用いた場合でも同様の結果が得られた(Fig. 4-3-7)。また、乾燥ストレスの前後で Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の Rieske タンパク質の蓄積量に変化していなかったことから、Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の蓄積量は乾燥ストレスによる影響を受けなかったと考えられる(Fig. 4-3-6)。それに対して、分光学的に Cyt *f* の量を測定した結果、乾燥ストレス下において、Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の量は変わらないが PS I の量が少し増えている(クロロフィル量一定)、あるいは、PS I の量は変わらないが Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の量が少し減少している(クロロフィル量減少)、ということを示唆する結果が得られた。後者の場合、Cyt *f* の再還元速度は低下すると考えられる。しかし、この測定に用いたチラコイド膜サンプルのクロロフィル量を定量していないので、現時点ではどちらかという結論は出せない。また、この測定は一度しか行われていないため、結論を出すためには複数回の実験を行う必要がある。ただ、もし後者の仮説が正しいとすると、乾燥ストレス下で機能的な Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の量はストレス前の約 89%に低下していた(Fig. 4-3-8)。しかし、同じ測定条件(pH7.5)における反応速度定数( $k'$ )はストレス前の 238.7 に比べ、乾燥ストレス後の値は 165.0(ストレス前の約 69%)であった(Fig. 4-3-5、対数をとる前の値)。Cyt *f* の再還元速度は反応速度定数によって決定される。乾燥ストレスによる反応速度定数の値の低下から考えられる Cyt *f* の再還元速度の低下の度合いは機能的な Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の量の減少の度合いよりも十分に大きかった。このことから、後者の仮説の通りに乾燥ストレス下で Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の量が低下していたとしても、それを上回る Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性の低下が起こっていたと考えられる。

Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体内で電子の授受に関与するのは Cyt *b*、Rieske タンパク質、Cyt *f* の 3 つのサブユニットである。Cyt *f* は 3 つのサブユニットの中で最も下流に位置するので、Cyt *f* を含むこれら 3 つのサブユニットのうちのどのサブユニットで電子伝達活性が低下しても Cyt *f* の再還元速度が低下する。これらのことから、乾燥ストレス下では、Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体内のどこかで電子伝達活性が低下していると考えられる。

乾燥ストレス下の野生種スイカ葉では NPQ が増大していた(Fig. 4-1-5)。このことは、乾燥下でルーメンが酸性化されていたことを意味している。これまで

に、ルーメンの酸性化は Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体での PQH<sub>2</sub> の酸化速度を低下させる、と報告されていることから(Hope et al., 1994; Nishio and Whimmarsh, 1993; Finazzi and Rappaport, 1998)、ストレス条件下の野生種スイカにおいてもルーメン pH の低下に伴って Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性が低下していると考えられる。この考えは、Cyt *f* の再還元速度が pH に依存して低下したという結果(Fig. 4-3-5)と一致する。

しかし、単離チラコイド膜を用いた電子伝達活性の測定から、ストレス条件下で、ルーメン pH に影響を受けずに直線的な電子伝達活性が PS II と PS I の間で抑制される、という結果が得られている(Fig. 4-1-7)。また、pH5.0-8.0 の全ての条件において乾燥ストレスを受けたチラコイド膜で Cyt *f* の再還元速度が有意に低下していた(Fig. 4-3-5)。これらのことから、ストレス条件下では、ルーメン pH(あるいは膜内外のプロトン勾配)に依存しない様式で Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性を低下させる変化が起こっていると考えられる。

光阻害は、主に PS II の不活性化が原因である。光合成系の中で PS II が最も光エネルギーによる損傷を受けやすい(Powles, 1984)。葉が受けた光エネルギーのうち光合成や熱放散などで消費しきれない過剰な光エネルギーがダメージを引き起こす(Ogren and Oquist, 1984; Vass and Styring, 1992)。光阻害の程度を評価する指標としてよく用いられるのが、PS II の最大量子収率である  $F_v/F_m$  である。本研究において、クロロフィル蛍光を用いて乾燥ストレスを受けた葉における  $F_v/F_m$  を調べたところ、乾燥ストレスの前後で変化していなかった。このことは、CO<sub>2</sub> 固定反応が完全に停止するような過酷な乾燥ストレス条件下においても、PS II が光阻害を受けていなかったことを意味している。

低温などの条件下では PS I も光阻害を受けることが知られている(Sonoike and Terashima, 1994)。これは、低温での CO<sub>2</sub> 固定反応の低下によって PS I からの電子の受け手である NADP<sup>+</sup>が枯渇することが原因であり、PS I に蓄積された電子によって生成される活性酸素種によって PS I が損傷を受ける(Sonoike, 1996)。また、PS I からの電子の受け手である環状電子伝達の主要な経路が機能しないシロイヌナズナの *pgr5* 変異体では、強光条件下で PS I に電子が蓄積し、PS I が光阻害を受ける(Munekage et al., 2002)。本研究において、乾燥ストレス下の野生種スイカでは CO<sub>2</sub> 固定が停止していたことから、PS I が強く還元状態にあると予想されたが、驚くことに PS I は非ストレス時よりも酸化状態にあり、光阻害も受けていなかった(Fig. 4-1-6)。

PS II の主要なサブユニットである D1 タンパク質の半減期は弱光下で数時間、強光下で数十分程度であるとされている(Prášil et al., 1992)。それに対して、PS I が失活すると回復するまでに数日を要する。言い換えると、PS I の失活は植物の生育に必要とされる ATP や NADPH の供給が長期間に渡って途絶えることを

意味している。さらに、光合成電子伝達系が強い還元状態となるため、PS II が非常に光阻害を受けやすくなる。このような危機を回避するため、ストレス条件下の植物は積極的に PS II を壊して失活させることで過剰なエネルギーの流れを断ち、光合成系、特に PS I を光阻害から守っているのではないかと考えられている(Aro et al., 1993, Sonoike, 1996)。しかし、本研究で用いた野生種スイカでは、ストレス条件下において、PS II も PS I も光阻害を受けておらず、ストレス前の活性を保っていた。このことから、葉緑体に過剰なエネルギーが蓄積するようなストレス条件下の野生種スイカは、PS II と PS I の間で電子伝達活性を抑制することによって PS I へ流れ込む電子の量を制限し、障害に弱い PS I を光阻害から保護していると考えられる。光化学系を壊さずに保ったままでストレス状態をやりすごすことは、ストレス状態を脱した時にすぐ最大限の効率で光合成が行えるため、刻々と移り変わる自然環境にうまく対応できる方法であると思われる。

PS II より下流で電子伝達が抑制されると、PS II は強い過還元状態に陥ると考えられる。それにも関わらず、ストレス条件下の野生種スイカでは PS II が光阻害を受けていなかった。ストレス条件下では、NPQ の増大による PS II への光エネルギーの流入量の減少や、oxygen-evolving enhancer protein 2 の蓄積量減少(吉田、2005)による PS II への電子の流入速度の低下などが起こることによって、PS II は過還元状態に陥らず、光阻害を受けなかったと考えられる。

## 5-2. ストレス条件下における光合成電子伝達系タンパク質

当研究室において野生種スイカ葉の膜画分を用いて行われたプロテオーム解析の結果、光合成電子伝達に関わる因子として葉緑体 Rieske タンパク質、FNR、NDH-I、NDH-K が乾燥ストレスに応答して変化していることが明らかになった(吉田、2005)。これまでに、乾燥や強光に曝された植物において、光化学系のタンパク質の蓄積量が低下することがいくつも報告されている(Ingle et al., 2007; Kottapalli et al., 2009; Quiles, 2006; Salekdeh et al., 2002; Scafaro et al., 2009; Teraza et al., 1999; Xiao et al., 2009;). それに対して、乾燥ストレス条件下の野生種スイカ葉に含まれる主要な光合成複合体の蓄積量は、FNR の可溶性画分を除き、ストレス前と比べて変化していなかった(Fig. 4-2-2)。また本研究において、乾燥ストレスに曝された野生種スイカ葉では、CO<sub>2</sub> 固定反応が完全に停止していたにも関わらず、PS II、PS I は損傷を受けずに電子伝達活性を保っていたことを示す結果が得られている(Fig. 4-1-5、4-1-7)。これらの事実は、3 日間の乾燥ストレスに曝された野生種スイカの葉緑体は、光合成器官を量的に保ったまま、2 つの光化学系に損傷を与えることなく、過還元状態に対処しているということを示

している。

(i) ferredoxin-NADPH oxidoreductase (FNR)

FNR は、直線的な電子伝達経路に必要な不可欠な因子であり (Ceccaarelli et al., 2004)、環状電子伝達にも関与するとされる。乾燥ストレスに曝された野生種スイカの葉において、FNR の可溶性の画分の蓄積量が少し減少していた (Fig. 4-2-2)。また、FNR の膜画分の蓄積量は乾燥ストレスの前後で変化しなかったが、プロテオーム解析において FNR であるとアノテートされた 2 つのスポットのタンパク質蓄積量は、乾燥ストレスによって大幅に減少していた (Table I)。FNR であるとアノテートされた 2 つのスポットのうち、DM32 は FNR の予想分子量 (およそ 35kDa) よりもかなり小さいため、分解産物であると考えられる (Fig. 2-1, Table I)。Fig. 2-1 において、矢印で示した 4 つのタンパク質スポットは、二次元電気泳動と抗 FNR 抗体を用いた免疫ブロットで検出された FNR タンパク質を表している。このことは、プロテオームで検出された FNR タンパク質 (DM28) が FNR の膜画分の中に占める割合は非常に小さいことを示している。そのため、FNR の膜画分においては、存在量が少ない FNR タンパク質スポットの蓄積量のみが乾燥ストレスによって減少したと考えられる。

シロイヌナズナでは 2 つ、トウモロコシでは 3 つの FNR アイソフォームが存在する、ということが報告されており (Hanke et al., 2004; Okutani et al., 2005)、野生種スイカにおいても複数の FNR アイソフォームが存在することが推測される。二次元電気泳動と抗 FNR 抗体を用いたウェスタン解析の結果、シロイヌナズナにおける過去の報告 (Lintala et al., 2007) と同様に複数の FNR スポットが検出されており、それらは異なる FNR アイソフォームであると考えられる (Fig. 2-1, indicated by arrows)。葉において、FNR は膜とストロマの両方に存在することが示されている (Hanke et al., 2005; Okutani et al., 2005)。シロイヌナズナにおいて、FNR は二量体を形成しており、AtFNR1 が欠損すると AtFNR2 はストロマにしか局在出来ないことが報告されている (Lintala et al., 2007)。このことから、シロイヌナズナでは、AtFNR1 が膜に存在し、AtFNR2 は AtFNR1 に結合していると考えられる。トウモロコシにおいて、膜とストロマの両方に局在する FNR アイソザイムが報告されていることから (Okutani et al., 2005)、膜局在のアイソザイムに結合する FNR アイソザイムは、結合・解離を繰り返すことで膜とストロマの両方に存在していると考えられる。乾燥ストレス条件下の野生種スイカにおいて蓄積量が減少した FNR の可溶性の画分は、ストロマ画分・チラコイド膜の両方に局在する dual location の性質を持つアイソザイムであると考えられる。実際、プロテオーム解析において、膜画分の FNR スポットの蓄積量も乾燥ストレス条件下において大きく減少することが示されている (Fig. 2-1, Table I, DM28, DM32)。

乾燥ストレス下の野生種スイカでは、*dual location* の性質を持つ FNR アイソザイムの蓄積量が減少しており、その影響によって直線的な電子伝達活性が抑制されているのかもしれない。また、FNR は Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体(Zhang et al., 2001; Zhang and Cramer, 2004, Okutani et al., 2005)や PS I(Andersen et al., 1992)に局在するという報告がある。乾燥ストレスに曝された野生種スイカにおいて、直線的な電子伝達活性が低下し、プロテオーム解析によって膜画分の一部の FNR アイソザイムの蓄積量が減少していた。乾燥ストレス条件下では PS I に局在するアイソザイムの蓄積量が減少することで、直線的な電子伝達活性の抑制に寄与しているのかもしれない。

#### (ii) NAD(P)H-Plastoquinone-oxidoreductase (NDH) 複合体

プロテオーム解析により、乾燥ストレス条件下において、葉緑体の NDH-I の蓄積量の増加(UM42)、NDH-K の蓄積量の減少(DM37)、NDH-K の新たな複数のアイソフォームの出現(UM36, UM35)が同定された(Fig. 2-1, Table I)。NDH 複合体は、PGR5 依存の経路(Munekage et al., 2002)とは別の経路によって環状電子伝達に関与している(Joët et al., 2001)。強光条件下では WT よりも強い光障害を受け(Endo et al., 1999)、CO<sub>2</sub> が制限される条件下では生育が遅延するため(Horvath et al., 2000)、NDH 依存の環状電子伝達は環境の変化が起こる条件下において重要な役割を果たすと考えられている。葉緑体の NDH 複合体は、ミトコンドリアの complex I や eubacterial NADH dehydrogenase のサブユニットのホモログをコードする遺伝子産物から成る(Matsubayashi et al., 1987)。最近の研究によって、葉緑体の NDH 複合体は 25 のサブユニットによって構成され、Membrane subcomplex、Subcomplex A、Subcomplex B、Lumen subcomplex という 4 つの subcomplex から成っていると考えられている(Peng et al., 2009)。葉緑体において、NdhI、NdhK を含む親水性のサブユニットは、membrane subcomplex とストロマ側の subcomplex とを連結する connecting domain を形成するとされている(Darie et al., 2005; Burrows et al., 1998)。また、NDH 複合体は PS I と巨大な supercomplex を形成するとされている(Peng et al., 2008)。さらに、光条件下において NDH-F がリン酸化され、そのリン酸化レベルと NDH 活性には相関があることが報告されている(Lascano et al., 2003)。NDH-H に特異的な抗体を用いたウェスタンを行った結果、乾燥ストレスの前後で野生種スイカの葉に含まれる NDH-H の蓄積量が変化しなかったことから、NDH 複合体の量は乾燥ストレスによって低下していないと考えられる。これらを考え合わせると、乾燥ストレス条件下の野生種スイカでは、NDH の構造的な変化あるいは質的な変化が起こり、環状電子伝達の NDH 経路が活性化されるのかもしれない。

### (iii) 葉緑体 Rieske 鉄-硫黄タンパク質

葉緑体 Rieske 鉄-硫黄タンパク質は、PS II から PS I への電子伝達を行う Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体を構成する主要なサブユニットの一つであり、N 末端側の膜貫通領域と C 末端側の鉄-硫黄中心を有する活性ドメインから成る。ミトコンドリアの Cyt *bc<sub>1</sub>* 複合体と葉緑体 Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の構造学的な研究から、Qo サイトにプラストキノールが結合している時は Riekse タンパク質の C 末端側のドメインが proximal position で電子を受け取り、電子を受け取った Rieske タンパク質はその C 末ドメインを distal position へと動かすことによって、シトクロム *f* へと電子を受け渡す (Zhang et al., 1998; Breyton, 2000)。この葉緑体 Rieske タンパク質を欠失したシロイヌナズナの変異体は、PS I に電子を伝達することが出来ず光合成が行えないため、栄養培地上でしか生育出来ない (Maiwald et al., 2003)。このように、葉緑体 Rieske タンパク質は Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達反応に必要な不可欠な因子である。

プロテオーム解析において、乾燥ストレス条件下で分子量・*pI* の異なる複数の Rieske タンパク質スポットが見られた (Fig. 2-1, Table I)。それに対して、抗 Rieske 抗体を用いた Immunoblot 解析では、複数の Rieske タンパク質スポットは異なる *pI* を有するがほぼ同じ分子量を示した (Fig. 4-2-3)。二次元電気泳動後のゲル上において、タンパク質はスポットとして検出されるが、厳密にはそのタンパク質はスポットを中心としてその周囲にも微量ながら存在する。質量分析は、その感度の高さ故に、その微量なタンパク質さえも検出する。そのため、プロテオーム解析において、本来 Rieske タンパク質ではないスポットにも Rieske タンパク質が検出されたと考えられる。以上の理由によって、本研究では抗 Rieske 抗体を用いた Immunoblot 解析で検出されたスポットを Rieske タンパク質スポットとして扱った。また、それらのタンパク質スポットは、改めて質量分析を行うことで、葉緑体 Rieske タンパク質であることを確認している。

ストレス前の葉において、複数の Rieske タンパク質スポットが検出された (Fig. 4-2-3A)。この結果は、ハウレンソウのチラコイド膜タンパク質 (Yu et al., 1994)、イネの葉タンパク質 (Salekdeh et al., 2002) を用いた二次元電気泳動において、2 つの Rieske タンパク質スポットが検出されたという報告と一致する。野生種スイカで発現している葉緑体 Rieske タンパク質の転写産物は一つであると考えられることから、Rieske タンパク質は非ストレス時から修飾を受けている可能性がある。Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体は、ストロマチラコイド、グラナチラコイドの両方に局在することが知られている (Albertsson, 2001)。PS II-LHC II 複合体の多くはグラナチラコイドに局在するが、PS I や ATP 合成酵素はストロマチラコイドに局在し (Albertsson, 2001)、環状電子伝達に関わる NDH 複合体や PGR5 はストロマチラコイドに多く局在している (Rumeau et al., 2005; Munekage et al., 2010)。これらの事実から、グラナチラコイドでは主に直線的な電子伝達が、ストロマチラコイ

ドでは主に環状電子伝達が働いていると考えられる。非ストレス条件下の野生種スイカで見られた複数の Rieske タンパク質の isoelectric variants (Fig. 4-2-3A) は、それぞれ、ストロマチラコイド、グラナチラコイドなどの膜の異なる部位に局在するのかもしれない。そして、それらを擁する Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体は、ストロマチラコイド、グラナチラコイドにおいてそれぞれ環状電子伝達、直線的な電子伝達に特化した機能を果たしている可能性が考えられる。

ストレス条件下における Rieske タンパク質の挙動変化について詳細な解析を行った結果、Rieske タンパク質スポット数がストレスに応じて増減することが明らかになった(Fig. 4-2-3)。葉に含まれる Rieske タンパク質の蓄積量は乾燥ストレスによって変化せず(Fig. 4-2-2)、EST 解析から野生種スイカで発現している葉緑体 Rieske タンパク質の転写産物は一つであると考えられる。これらの事実は、ストレスに応じて Rieske タンパク質に翻訳後修飾が誘導されていることを示唆している。またその修飾は、乾燥や強光といった葉緑体内に過剰なエネルギーが蓄積するようなストレスに曝された場合に誘導された。Fig. 4-2-3E で見られたように、15 分間の強光処理によって Rieske タンパク質に修飾が誘導されたことは、この修飾は短時間で誘導されるものであることを示している。さらに、ストレス条件下において新たに出現した Rieske タンパク質スポットは、ストレス前のものと比較してその分子量は変化しておらず、*pI* のみを変動していた。このことから、ストレス条件下で Rieske タンパク質に誘導される修飾の候補としてリン酸化、システイン残基の酸化(Chevallet et al. 2003)を想定した。リン酸化抗体(anti-P-Ser, anti-P-Thr)を用いた免疫ラベリングや MS 解析によって野生種スイカの膜画分中でリン酸化された Rieske タンパク質を見つけようとしたが、その試みは今のところ成功していない。

ストレス条件下で修飾を受けた Rieske タンパク質の機能として、次の 2 つが挙げられる(de Vitry et al. 2004); (i) Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の活性を低下させる。(ii) ストレス状態を感知してシグナル因子として働く。

まず一つ目の可能性について考察する。本研究における生理学的な解析において、ストレス条件下では直線的な電子伝達活性が Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体で抑制されていることが示唆された。また、同じストレス条件下において葉緑体 Rieske タンパク質に翻訳後修飾が誘導されることを示す結果が得られた。これらの事実は、ストレス条件下では、修飾を受けた Rieske タンパク質が Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の活性を低下させている、という考えを呼び起こす。ストレス条件下において Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体で電子伝達活性を抑制することは、ルーメン pH が過度に低下することを防ぎ、PS II の酸素発生複合体(OEC) (Krieger and Weis, 1993)やプラストシアニン(Gross et al., 1994)などの低 pH に感受性の高いルーメン側のタンパク質を損傷から保護するのに有効である。本研究において、Rieske タンパク質は強光ストレ

ス下ではストレスに応答して 15 分で修飾を受け、ストレス状態から解放されるとすぐに修飾を解除することが示されている(Fig. 4-2-3)。それゆえ、Rieske タンパク質はストレスの状態によって可逆的に修飾を受けることで Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性を制御し、ルーメン pH を制御することに貢献しているのかもしれない。Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体における電子伝達活性の変化は、ルーメン pH だけではなく、光合成電子伝達系全体に影響を及ぼし得る。ストレス条件下での Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体での電子伝達活性の抑制は、PS I に過剰量の電子が流れ込むのを防ぐことで PS I の電子受容体が過度に還元状態になることを阻止し、活性酸素の生成とそれによって引き起こされる光障害から PS I を保護する役割を果たすと考えられる。ストレス条件下では、PS I を光損傷から守るために、修飾を受けた Rieske タンパク質が Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性を抑制しているのかもしれない。また、Fig. 4-1-7、4-3-5 の結果は、ストレス条件下の野生種スイカ葉において、ルーメン pH に影響を受けない Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性の低下が起きていることを示している。このことから、ストレス条件下で修飾を受けた Rieske タンパク質はルーメン pH に依存せずに Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体の電子伝達活性を制御するメカニズムに関与するという可能性がある。また、このストレス条件下での Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体での電子伝達活性の抑制は、NPQ の増大による PS II への光エネルギーの流入量の減少や、oxygen-evolving enhancer protein 2 の蓄積量減少(吉田、2005)による PS II への電子の流入速度の低下などによる PS II の過還元防止メカニズムと協調的に機能するのかもしれない。

次に、2 つ目の可能性について考える。ストレス条件下で修飾を受けた Rieske タンパク質は、電子伝達活性ではなく、ストレス状態を感知してシグナルとして働くのかもしれない。クラミドモナスにおいて、ステートトランジションの誘導に必要とされる STT7 キナーゼの N 末端が、チラコイドルーメン側で Rieske タンパク質の C 末端ドメインと相互作用するということが報告されている(Lemeille et al., 2009)。また、Rieske タンパク質のルーメン側のドメインの躍動的な動きが STT7 キナーゼの活性化と共役しているという報告もある(Gal et al., 1997; Finazzi et al., 2001)。高等植物においてもステートトランジションに必要なキナーゼが同定されており、シロイヌナズナではクラミドモナスの STT7 のオルソログとして STN7 キナーゼが同定されている(Bellaflore et al., 2005; Bonardi et al., 2005)。ステートトランジションは 10 分ほどで誘導されることが知られている。同じようなタイムスケールで、強光ストレス条件下において、Rieske タンパク質に修飾が見られた。これらを考え合わせると、PQ プールが還元状態になるようなストレス条件下において、修飾を受けた Rieske がキナーゼに作用することが、ステートトランジションを誘導するきっかけになるのかもしれない。ストレス条件下の野生種スイカにおける、Rieske タンパク質の修飾とステート



トランジションの誘導の関連性については、さらなる解析が必要であろう。

Fig. 4-2-4 に示すように、葉緑体の **Rieske** タンパク質のアミノ酸配列は、ここで比べた高等植物種間において高く保存されている。特に、葉緑体移行シグナル配列を除いた **mature** な **Rieske** タンパク質のアミノ酸配列は、示した植物種間で非常に高い相同性を示す。このことは、野生種スイカで見られたストレス条件下における **Rieske** タンパク質の翻訳後修飾が他の高等植物においても普遍的に起こるという可能性を示唆している。

葉緑体に過剰なエネルギーが蓄積するようなストレス条件下において、どんな役者がストレス状態であることをどのように察知し、**Rieske** タンパク質に修飾を誘導するのか、ということに関してはさらなる解析が必要であろう。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、熱心に御指導して頂きました横田明穂教授に心から感謝の気持ちと御礼を申し上げます。また、研究に関して多くの有益な助言を頂いた明石欣也助教、宗景ゆり助教、蘆田弘樹助教に深く感謝申し上げます。質量分析を行って頂いた、元ベンチャービジネスラボラトリー、プロテオーム解析室の桑野昌喜氏、横田直彦氏に感謝致します。共同研究者の Washington State University の Prof. David M. Kramer と Dr. Jeff A. Cruz、および Kramer 研究室の皆様にも深く御礼申し上げます。素晴らしい研究成果を出すことが出来た Washington State University での共同研究を支援して下さいました、本学の GCOE に心からの感謝を申し上げます。

七里吉彦博士、高原健太郎博士、上妻馨梨博士、吉村和也博士をはじめとする野生種スイカチームの皆様には、研究に関することだけでなく多くの素晴らしいアドバイスを頂きました。深く感謝致します。また、後輩の星安紗希さんには本当にお世話になりました。ここに感謝を申し上げます。

最後に、楽しく充実した研究生生活を送ることが出来たのは分化・形態形成学講座の先輩・同期・後輩、技術補佐、秘書の皆様方のおかげだと思っています。心から感謝を申し上げます。

## 参考文献

- Akashi K., Miyake C. and Yokota A. (2001). Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. *FEBS Lett.* **508**, 438-442.
- Akashi K., Nishimura N., Ishida Y. and Yokota A. (2004). Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 72-78.
- Albertsson P.Å. (2001). A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. *TRENDS in Plant Science* **6**, 349-354.
- Allen J.F. (1992). Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1098**, 275-335.
- Andersen B., Scheller H.V., Moller B.L. (1992). The PSI E subunit of photosystem I binds ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase. *FEBS Lett.* **311**, 169-173.
- Arnon D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**, 1-15.
- Arnon D.I., Allen M.B. and Whatley F.R. (1954). Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Nature* **174**, 394-396.
- Arnon D.I. (1956). Phosphorus metabolism and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **7**, 325-354.
- Aro E. M., Virgin I. and Andersson B. (1993). Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* **1143**, 113-134.
- 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.

Bonardi V., Pesaresi P., Becker T., Schleiff E., Wagner R., Pfannschmidt T. (2005). Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases. *Nature* **437**, 1179–1182.

Bonhomme L., Monclus R., Vincent D., Carpin S., Lomenech A.M., Plomion C., et al. (2009). Leaf proteome analysis of eight *Populus* × *euramericana* genotypes: Genetic variation in drought response and in water-use efficiency involves photosynthesis-related proteins. *Proteomics* **9**, 4121–4142.

Boyer J. S. (1982). Plant productivity and environment. *Science* **218**, 443-448.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Breyton C. (2000). Conformational changes in the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex induced by inhibitor binding. *J Biol. Chem.* **275**, 13195–13201.

Burrows P.A., Sazanov L.A., Svab Z., Maliga P. and Nixon P.J. (1998). Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *EMBO J.* **17**, 868–876.

Cardol P., De Paepe R., Franck F., Forti G. and Finazzi G. (2009). The onset of NPQ and  $\Delta\mu_{\text{H}}^{+}$  upon illumination of tobacco plants studied through the influence of mitochondrial electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 177-188.

Carrell C. J., Zhang H., Cramer W.A. and Smith J.L. (1997). Biological identity and diversity in photosynthesis and respiration: structure of the lumen-side domain of the chloroplast Rieske protein. *Structure* **5**, 1613-1625.

Ceccarelli E.A., Arakaki A.K., Cortez N. and Carrillo N. (2004). Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases. *Biochim. Biophys. Acta* **6**, 155-65.

- Chevallet M, Wagner E, Luche S, van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Rabilloud T (2003). Regeneration of peroxiredoxins can be reduced during recovery after oxidative stress. *J Biol. Chem.* **278**: 37146-37153.
- Darie C.C., Binossek M.L., Winter V., Mutschler B. and Haehnel W. (2005). Isolation and structural characterization of the Ndh complex from mesophyll and bundle sheath chloroplasts of *Zea mays*. *FEBS Journal* **272**, 2705–2716.
- Demmig-Adams B., Adams III W.W., Baker D.H., Logan B.A., Bowling D.R. and Verhoeven A.S. (1996). Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiol. Plant.* **98**, 253-264.
- de Vitry C, Ouyang Y, Finazzi G, Wollman FA, Kallas T (2004). The chloroplast Rieske iron-sulfur protein. At the crossroad of electron transport and signal transduction. *J Biol. Chem.* **279**: 44621–44627.
- Dietrich J. and Kuhlbrandt W. (1999). Purification and two-dimensional crystallization of highly active cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex from spinach. *FEBS Lett.* **463**, 97-102.
- Dietz K-J, Schreiber U, Heber U (1985). The relationship between the redox state of QA and photosynthesis in leaves at various carbon dioxide, oxygen and light regimes. *Planta* **166**: 219–226.
- Edward A. (1992). World atlas of desertification, UNEP
- Endo T., Shikanai T., Takabayashi A., Asada K. and Sato F. (1999). The role of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in photoprotection. *FEBS Lett.* **457**, 5-8.
- Escoubas J.M., Lomas M., LaRoche J. and Falkowski P.G. (1995). Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 10237–10241.
- Finazzi G. and Rappaport F. (1998). In vivo characterization of the electrochemical proton gradient generated in darkness in green algae and its kinetic effects on cytochrome *b<sub>6</sub>f* turnover. *Biochemistry* **37**, 9999-10005.

Finazzi G., Zito F., Barbagallo R.P., Wollman F.A. (2001). Contrasted effects of inhibitors of cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex on state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*: the role of Qo site occupancy in LHCII kinase activation. *J Biol. Chem.* **276**, 9770–9774.

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.

Gal A., Zer H., Ohad I. (1997). Redox-controlled thylakoid protein phosphorylation. News and views. *Plant Physiol.* **100**, 869–885.

Genty B, Briantais J-M, Baker N (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* **990**: 87–92.

Gould K.S., Kuhn D.N., Lee D.W. and Oberbauer M. (1995). Why leaves are sometimes red. *Nature* **378**, 241-242.

Gross E.L., Pan B., Li B. and Brown L. (1994). Stability of plastocyanin to acid pH. *Biophys. J.* **66**, 272.

Hajheidari M., Noghabi A.M., Askari H., Heidari M., Sadeghian S. Y., Ober E.S. et al. (2005). Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics* **5**, 950-960.

Hanke G.T., Kurisu, G., Kusunoki M. and Hase T. (2004). Fd : FNR electron transfer complexes: evolutionary refinement of structural interactions. *Photosynth. Res.* **81**, 317–327.

Hanke G.T., Okutani S., Satomi Y., Takao T., Suzuki A., Hase T. (2005). Multiple iso-proteins of FNR in *Arabidopsis*: evidence for different contributions to chloroplast function and nitrogen assimilation. *Plant Cell Environ.* **28**, 1146–1157.

Hope, A.B., Valente, P. and Matthews, D.B. (1994). Effects of pH on the kinetics of redox reactions in and around the cytochrome *b<sub>f</sub>* complex in an isolated system.

*Photosynth. Res.* **42**, 110-120.

Horton P., Ruban A.V. and Walters R.G (1996). Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 655–84.

Horváth E.M., Peter S.O., Joët T., Rumeau D., Cournac L., Horváth G.V., et al. (2000). Targeted inactivation of the plastid *ndhB* gene in tobacco results in an enhanced sensitivity of photosynthesis to moderate stomatal closure. *Plant Physiol.* **123**, 1337–1349.

Hsaio Th.C. (1973). Plant response to water stress. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **24**, 519-570.

Ingle R.A., Schmidt U.G., Farrant J.M., Thomson J.A. and Mundree S.G. (2007). Proteomic analysis of leaf proteins during dehydration of the resurrection plant *Xerophyta viscose*. *Plant, Cell and Environment* **30**, 435–446.

Jahns P, Junge W (1992). Thylakoids from pea seedling grown under intermittent light: Biochemical and flash-spectrophotometric properties. *Biochemistry* **31**: 7390–9397.

Jahns P., Graf M., Munekage Y. and Shikanai T. (2002). Single point mutation in the Rieske iron-sulfur subunit of cytochrome *b<sub>6</sub>/f* leads to an altered pH dependence of plastoquinol oxidation in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* **519**, 99-102.

Joët T., Cournac L., Horváth E.M., Medgyesy P. and Peltier G. (2001). Increased sensitivity of photosynthesis to antimycin A induced by inactivation of the chloroplast *ndhB* gene. Evidence for a participation of the NADH-dehydrogenase complex to cyclic electron flow around photosystem I. *Plant Physiol.* **125**, 1919–1929.

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.

Klughammer C, Schreiber U (1994). An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700<sup>+</sup>-absorbance changes at 830 nm. *Planta* **192**: 261–268.

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

Kottapalli K.R., Rakwak R., Shibata J., Burow G., Tissue D., Burke J. et al. (2009). Physiology and proteomics of the water-deficit stress response in three contrasting peanut genotypes. *Plant, Cell and Environment* **32**, 380-407.

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

Krieger A. and Weis E. (1993). The role of calcium in the pH-dependent control of photosystem II. *Photosynth Res.* **37**, 117-130.

Larcher W. (1995). *Plant under stress. Physiological plant ecology*, Third edition. pp. 321-448. Springer-Verlag, New York.

Lascano H.R., Casano L.M., Martín M. and Sabater B. (2003). The activity of the chloroplastic Ndh complex is regulated by phosphorylation of the NDH-F subunit. *Plant Physiology*, **132**, 256–262.

Lemeille S., Willig A., Depége-Fargeix N., Delessert C., Bassi R. and Rochaix J.D. (2009). Analysis of the chloroplast protein kinase Stt7 during state transitions. *PLoS Biology* **7**, 664-675.

Lintala M., Allahverdiyeva Y., Kidron H., Piippo M., Battchikova N., Suorsa M., et al. (2007). Structural and functional characterization of ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-oxidoreductase using knock-out mutants of Arabidopsis. *Plant J.* **49**, 1041–1052.



Maiwald D., Dietzmann A., Jahns P., Pesaresi P., Joliot P., Joliot A. et al., (2003) Knock-out of the genes coding for the Rieske protein and the ATP-synthase delta-subunit of Arabidopsis. Effects on photosynthesis, thylakoid protein composition, and nuclear chloroplast gene expression. *Plant Physiol.* **133**, 191-202.

Matsubayashi T., Wakasugi T., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Zaita N., Hidaka T., et al. (1987). Six chloroplast genes (ndhA-F) homologous to human mitochondrial genes encoding components of the respiratory chain NADH dehydrogenase are actively expressed: determination of the splice sites in ndhA and ndhB pre-mRNAs. *Mol. Gen. Genet.* **210**, 385–393.

Meierhoff K, Westhoff P (1993). Differential biogenesis of photosystem II in mesophyll and bundle-sheath cells of monocotyledonous NADP-malic enzyme-type C<sub>4</sub> plants: the non-stoichiometric abundance of the subunits of photosystem II in the bundle-sheath chloroplasts and the translational activity of the plastome-encoded genes. *Planta* **191**:23–33

Miyake C. and Yokota A. (2000). Determination of the rate of photoreduction of O<sub>2</sub> in the water-water cycle in watermelon leaves and enhancement of the rate by limitation of photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **41**, 335–343.

Muller P., Li X.P. and Niyogi K.K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* **125**, 1558-66.

Munekage Y., Takeda S., Endo T., Jahns P., Hashimoto T. and Shikanai T. (2001). Cytochrome *b<sub>6</sub>f* mutation specifically affects thermal dissipation of absorbed light energy in Arabidopsis. *The Plant Journal* **28**, 351-359.

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.

Munekage, Y.N., Eymery, F., Rumeau, D., Cuiné, S., Oguri, M., Nakamura, N., Yokota, A., Genty, B., Peltier, G. (2010). Elevated expression of PGR5 and NDH-H in bundle sheath chloroplasts in C<sub>4</sub> *Flaveria* species. *Plant Cell Physiol.* **51**, 664-668

Nanasato Y., Akashi K. and Yokota A. (2005). Co-expression of cytochrome *b<sub>561</sub>* and ascorbate oxidase in leaves of wild watermelon under drought and high light conditions. *Plant Cell Physiol.* **46**, 1515-1524.

Nishio J.N. and Whitmarsh J (1993). Dissipation of the proton electrochemical potential in intact chloroplasts. *Plant Physiol.* **101**, 89-96.

Niyogi K.K. (1999). Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **50**, 333-359.

Novel P.S. (1988). Environmental biology of agaves and cacti. Cambridge University Press, Cambridge

Ogren, E. and Oquist, G. (1984) Photoinhibition of photosynthesis in *Lemna gibba* as induced by the interaction between light and temperature. II. Photosynthetic electron transport. *Physiol. Plant.* **62**, 187-192.

Okutani S., Hanke G.T., Satomi Y., Takao T., Kurisu G., Suzuki A. et al. (2005). Three maize leaf ferredoxin:NADPH oxidoreductases vary in subchloroplast location, expression, and interaction with ferredoxin. *Plant Physiol.* **139**, 1451-1459.

Peng, L., Shimizu, H., and Shikanai, T. (2008). The chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex interacts with photosystem I in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **283**, 34873–34879.

Peng L., Fukao Y., Fujiwara M., Takami T. and Shikanai T. (2009). Efficient operation of NAD(P)H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCI in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 3623-3640.

Plomion C., Lalanne C., Claverol S., Meddour H., Kohler A., Triboulot M.B.B., et al. (2006). Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. *Proteomics* **6**, 6509-6527.

Powles S.B. (1984). Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 15-44.

Prášil O., et al. (1992) In the photosystem: Structure, Function and Molecular Biology (Ed. Barber, J) pp. 295-348, Elsevier, Amsterdam

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

Riccardi F., Gazeau P., Vienne D. and Zivy M. (1998). Protein Changes in Response to Progressive Water Deficit in Maize. *Plant Physiol.* **117**, 1253-1263.

Riccardi F., Gazeau P., Jacquemot M.P., Vincent D., Zivy M. (2004). Deciphering genetic variations of proteome responses to water deficit in maize leaves. *Plant Physiol. and Biochem.* **42**, 1003-1011.

Rinalducci S., Larsen M.R., Mohammed S., Zolla L. (2006) Novel protein phosphorylation site identification in spinach stroma membranes by titanium dioxide microcolumns and tandem mass spectrometry. *J Proteome Res.* **5**, 973-982.

Rochaix J.D. (2007). Role of thylakoid protein kinases in photosynthetic acclimation. *FEBS Lett.* **581**, 2768–2775.

Rumeau D., Bécuwe-Linka N., Beyly A., Louwagie M., Garin J. and Peltier G. (2005). New subunits NDH-M, -N, and -O, encoded by nuclear genes, are essential for plastid Ndh complex functioning in higher plants. *Plant Cell* **17**, 219–232.

Salekdeh G.H., Siopongco J., Wade L.J., Ghareyazie B. and Bennett J. (2002). Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* **2**, 1131-1145.

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Scafaro A.P., Haynes P.A. and Atwell B.J. (2009). Physiological and molecular changes in *Oryza meridionalis* Ng., a heat-tolerant species of wild rice. *J Exp. Bot.* **61**, 191-202.

Schuldiner U., Klughammer C. and Neubauer C. (1988). Measuring P700 absorbance changes around 830 nm with an new type of pulse modulation system. *Z. Naturforsch.* **43c**, 686-698.

Shikanai T., Endo T., Hashimoto T., Yamada Y., Asada K. and Yokota A. (1998). Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 9705–9709.

Shevchenko A., Jensen O.N., Podtelejnikov A.V., Sagliocco F., Wilm M., Vorm O., Mortensen P., Shevchenko, A., Boucherie, H. and Mann M. (1996). Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**: 14440–14445.

Sonoike, K. and Terashima, I. (1994). Mechanism of the Photosystem I Photoinhibition in Leaves of *Cucumis sativus* L. *Planta* **194**, 287-293.

Sonoike, K. (1996). Degradation of *psaB* Gene Product, the ReactionCenter Subunit of Photosystem I, Is Caused during Photoinhibition of PhotosystemI: Possible Involvement of Active Oxygen Species. *Plant Sci.* **115**, 157-164.

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

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

Terashima I., Miyazawa S. and Hanba Y.T. (2001). Why are sun leaves thicker than shade leaves ? *Jourunal of Plant Research* **114**, 93-105.

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.

Vass I. and Styring S. (1992) Spectroscopic characterization of triplet forming states in photosystem II. *Biochemistry* **26**, 5957-5963.

Vener AV, van Kan PJ, Rich PR, Ohad II, Andersson B (1997). Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome *bf* mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: Thylakoid protein kinase deactivation by a single-turnover flash. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 1585–1590.

Weston E., Thorogood K., Vinti G. and Lopez-Juez E (2000). Light quantity controls leaf-cell and chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* wild type and blue-light-perception mutants. *Planta* **211**, 807-815.

van Wick B. E. and Gericke N. (2000). *People's Plants: A Guide to Useful Plants of Southern Africa*. Briza Publications, Pretoria, South Africa.

Wickens G.E. (1998) *Ecophysiology of Economic Plants in Arid and Semi-arid Lands*. Springer, Berlin, Germany.

Wollman FA (2001). State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO J.* **20**, 3623–3630.

Xiao X., Yang F., Zhang S. Korpelainen H. and Li C. (2009). Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress. *Physiologia Plantarum* **136**, 150-168.

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. *Annals of Botany* **89**, 825–832.

Yoshimura K., Masuda A., Kuwano M., Yokota A. and Akashi K. (2008). Programmed Proteome Response for Drought Avoidance/Tolerance in the Root of a C3 Xerophyte (Wild Watermelon) Under Water Deficits. *Plant Cell Physiol.* **49**, 226–241.

Yu S.G., Romanowska E., Xue Z.T. and Albertsson P.A. (1994). Evidence for two different Rieske iron-sulfur proteins in the cytochrome *bf* complex of spinach chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta* **1185**, 239–242.

Zhang Z., Huang L., Shulmeister V.M., Chi Y.I., Kim K.K., Hung L.W., et al. (1998). Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc<sub>1</sub>*. *Nature* **392**, 677–684.

Zhang H., Whitelegge J.P., Cramer W.A. (2001). Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase is a subunit of the chloroplast cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex. *J Biol Chem.* **276**, 38159–38165.

Zhang H. and Cramer W.A. (2004). Purification and crystallization of the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex in oxygenic photosynthesis. *Methods Mol Biol.* **274**, 67–78.

Zito F, Finazzi G, Delosme R, Nitschke W, Picot D, et al. (1999). The Qo site of cytochrome *b<sub>6</sub>f* complexes controls the activation of the LHCII kinase. *EMBO J* **18**, 2961–2969.

上妻 馨梨 (2008) 余剰光ストレス下における光合成チラコイド膜のプロトン勾配制御機構の解析 奈良先端科学技術大学院大学 博士論文

寺島一郎 (1999) 光環境と葉の光合成. 植物の環境応答より. 渡邊昭、篠崎一雄、寺島一郎 監修 (秀潤社) pp. 92-101

中村智恵 (2000) 野生種スイカ(*Citrullus lanatus* sp.)の乾燥ストレス耐性機構の形態学的解明 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文

吉田和生 (2005) 野生種スイカの葉における乾燥強光ストレス応答性タンパク質の網羅的解析 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文

## 論文目録

Sanda S., Yoshida K., Kuwano M., Kawamura T., Munekage Y., Akashi K., Yokota A.  
Responses of the photosynthetic electron transport system to excess light energy caused  
by water deficit in wild watermelon. (2011) *Physiologia Plantarum*, In print