

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	シロイヌナズナの強光順化に関する因子の機能解析
Title(English)	
著者(和文)	佐藤諒一
Author(English)	Ryouichi Satou
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10293号, 授与年月日:2016年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:増田 真二,太田 啓之,久堀 徹,田中 寛,若林 憲一,増田 建
Citation(English)	Degree:., Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10293号, Conferred date:2016/9/20, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

# 高等植物の強光順化に関わる因子の機能解析

佐藤 諒一

指導教員：増田 真二 准教授

副指導教員：太田 啓之 教授

## 背景

光合成を行う生物にとって吸収した光エネルギーの効率的な利用は重要である。得られる光エネルギーが少なすぎれば十分な光合成を行えないが、多すぎても消費しきれない光エネルギーが細胞にダメージを与えてしまう。特に強光等のストレス条件では吸収した光エネルギーにより生成される還元力が炭酸固定等の代謝反応に必要な還元力を大きく上回り、活性酸素種の生成につながることで細胞に損傷を与える。そのため、光合成反応においては光エネルギーの吸収とその後の代謝反応のバランスが取れていることが重要である。特に自然環境においては光の強さは周囲の環境に応じて非常に変動しやすく、炭酸固定等の代謝反応も温度等の影響を受けるために一定ではない。そのため、多くの光合成生物では光エネルギーの吸収量を光強度に依存して調節することで、その後の代謝反応とのバランスを取る様々な機構を保持している。高等植物に見られるそのような機構の一つとして、光強度の変化に応答して一分未満で誘導され、過剰に吸収した光エネルギーを熱として安全に消去する熱放散と呼ばれる機構がある。この機構は葉緑体チラコイド膜上の光化学系 II 複合体 (Photosystem II: PSII) に光エネルギーを供給する光捕集アンテナタンパク質 (Light harvesting complex II: LHCII) 内で誘導され、LHCII が PSII へ供給するはずの光エネルギーを熱として放散するシステムである。熱放散の制御機構に関しては、光合成電子伝達によってチラコイド膜内外のプロトン濃度差 ( $\Delta\text{pH}$ ) が形成されることにより、チラコイド膜内腔の酸性化を通じて、ゼアキサンチンと呼ばれるカロテノイド色素の合成、PSII のサブユニットである PsbS のプロトン化、LHCII の凝集が起こることで熱放散が誘導されると現在考えられている (図 1)。

熱放散は吸収した光エネルギーを迅速に、かつ直接的に消去できる優れた機構であるが、過剰に誘導されてしまえば光合成に必要な光エネルギーをも消去してしまう。そのためこのような機構は、必要以上に光エネルギーを消去しないように環境に応じて適切に制御されることが重要である。しかし、その制御機構の詳細は分かっていない部分も多い。特に、熱放散誘導の中心的な役割を担う  $\Delta\text{pH}$  の制御機構に関する知見は少ない。本博士論文では、熱放散制御に関与する  $\Delta\text{pH}$  の制御機構に関して新たな知見を得る目的で、 $\Delta\text{pH}$  を介した熱放散誘導に関与する主要な光合成電子伝達経路の推定と新規な  $\Delta\text{pH}$  制御因子の探索を行った。

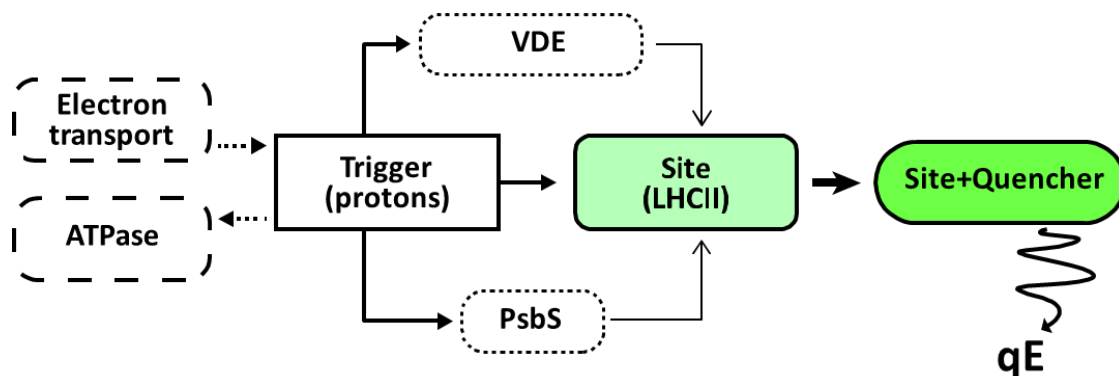


図1、現在の熱放散制御機構に関するモデル (Ruban *et al.*, 2016 より一部改編)

光合成電子伝達によって形成された $\Delta\text{pH}$ はチラコイド膜内腔の酸性化を通じてゼアキサンチン合成酵素 (Violaxanthin de-epoxidase: VDE)、PsbS、LHCIIに作用する事で、LHCII内で熱放散が誘導され、蛍光の消光 (qE) が起こる。形成された $\Delta\text{pH}$ はチラコイド膜上のATP合成酵素により解消される。

## 結果と考察

### ・FQR経路のqE誘導における寄与率の推定

光合成電子伝達反応には直線的電子伝達 (Linear electron flow: LEF) や、循環的電子伝達 (Cyclic electron flow: CEF)、Water-Water cycleなどの複数の電子伝達経路が存在する事が知られている。これらの電子伝達経路はどれも $\Delta\text{pH}$ 形成に関与しており、 $\Delta\text{pH}$ を介した熱放散制御に関与するのがどの電子伝達経路であるかは明確にはなっていなかった。先行研究の結果から、LEFと、CEFにおけるFQR経路とよばれる電子伝達経路が主要な電子伝達経路である可能性が示唆されており、 $\Delta\text{pH}$ を介した熱放散制御にもLEFとFQR経路が主に関わっていると考えられた。しかし、FQR経路の電子伝達活性に関する報告は測定法によってその値が大きく異なっており、FQR経路が実際にどの程度熱放散の誘導を担っているのかは不明瞭であった。その原因として、従来のFQR経路の活性測定法には阻害剤を用いる等いくつかの問題があり、活性測定法が確立されていない事が挙げられる。そこで本研究では、*In silico*による解析手法を併用する事で従来の活性測定法の問題を解消する様な新規のFQR経路の活性測定法を構築し、それによりFQR経路の熱放散誘導における寄与率の推定を行った。具体的にはシロイヌナズナの野生型 (WT) とFQR経路電子伝達を欠損している変異体 (*pgr5*変異体) を用いて、PAMクロロフィル蛍光測定法により各植物体間の熱放散誘導の違いを詳細に調査した。その結果を元に、コンピュータシミュレーションを用いてFQR経路がどの程度 $\Delta\text{pH}$ 形成を担っているのかを算出した。その結果、FQR経路は熱放散誘導に必要な $\Delta\text{pH}$ のおよそ50~70%を形成していることが示唆された。

### ・熱放散制御機構に関与する新規因子の探索

熱放散は $\Delta\text{pH}$ に依存して誘導されることから、環境中の光強度に対して適切な $\Delta\text{pH}$ を維

持することで、熱放散を過度に誘導しないような熱放散抑制機構が必要であると考えられる。 $\Delta\text{pH}$ の解消に関してはチラコイド膜上の ATP 合成酵素が担っているものの、熱放散の抑制機構にも関与しているのかは不明である。また、熱放散の誘導は負のフィードバック的に光エネルギーの吸収を制御しており、 $\Delta\text{pH}$ の形成にも同様の制御が働く可能性が示唆されている。しかし、熱放散を全く誘導出来ない変異体においても  $\Delta\text{pH}$ の形成は WT とほとんど差が見られない事が知られている。そのため、熱放散の誘導が  $\Delta\text{pH}$ の形成に対して負のフィードバック制御機構を持っているかは疑問である。これらの事から、熱放散の抑制機構に関してはほとんど明らかになっていないと言える。

そこで本研究では、熱放散の抑制機構に関わる新規因子の探索を行った。本研究では、熱放散が様々なストレスに応答して誘導されてしまう事から、様々な変異を持つライブラリーからスクリーニングを行う順遺伝学的手法では無く、逆遺伝学的手法により新規因子の探索を行った。未だ報告されたことのない機能未知遺伝子を 1 つ候補として得たため、Light Acclimation Protein 1 : LAPI と命名し機能解析を行った。GFP および FLAG タグを融合させた LAPI タンパク質の局在解析の結果から LAPI タンパク質は葉緑体のチラコイド膜および包膜に局在する事が示唆された。また、シロイヌナズナ LAPI 遺伝子欠損変異体 (*lap1*) を用いた解析の結果から *lap1* では熱放散が過剰に誘導されていることが示された。また、Electrochromic shift 等を用いた解析の結果から、*lap1* においては WT と同程度の  $\Delta\text{pH}$  しか形成されていない事も示唆された。LAPI に関するいくつかの解析の結果から、*lap1* で見られた熱放散の過剰誘導は葉緑体全体のプロトン濃度が上昇し、チラコイド膜内腔のプロトン濃度が上昇したことが原因となっている可能性が示唆された。以上の結果から LAPI タンパク質は  $\Delta\text{pH}$  を介した熱放散の抑制機構に関与する新規因子であると考えられた。

## まとめ

本博士論文では熱放散および  $\Delta\text{pH}$ の制御機構に関して誘導メカニズムと解消メカニズムの2つの視点から研究を行い、それぞれについて新たな知見を得ることが出来た。具体的には、シロイヌナズナにおける熱放散の制御機構は CEF の一つである FQR 経路が熱放散の誘導に必要な  $\Delta\text{pH}$  を形成し、LAPI タンパク質が光強度依存的に適切な  $\Delta\text{pH}$  になるように調節していると考えられた。