

シロイヌナズナ変異体 *cfa1* は酸素依存的な光合成経路に欠損を示す

2008年3月修了 先端生命科学専攻 生命応答システム分野

学生証番号：66542 氏名：花野井和弘 指導教員：園池公毅 准教授

キーワード：water-water cycle、光合成電子伝達、シロイヌナズナ、クロロフィル蛍光

序論

植物にとって光は必要不可欠な要因でもあり、危険因子でもある。光化学系II (PSIIと略す) アンテナタンパク質に吸収された光エネルギーによって、PSIIで水分子から引き抜かれた電子は、電子伝達鎖を經由してNADPHという還元力の形で貯えられる。NADPHは、主に二酸化炭素固定によって消費される(図1)。しかし強光などの、二酸化炭素固定が必要とする以上の電子が流入する条件下では、電子伝達鎖は過還元状態となり、過剰な電子が酸素と反応することで活性酸素種が生成され、光障害を引き起こす。

しかし、植物は電子伝達鎖の過還元状態を解消する機構を持っている。それが光呼吸、water-water cycle、光化学系I (PSIと略す) 循環的電子伝達である(図1)。これらの代替的な光合成経路は過還元状態を緩和すると共に、熱放散という過剰な光エネルギーを安全な熱として放出する機構も誘導する。そのため代替的な光合成経路は、非常に重要であると考えられている。

代替的な光合成経路のうち、光呼吸はルビスコのおキシゲナーゼ反応によって制御される。一方、water-water cycleやPSI循環的電子伝達の制御機構に関しては明らかになっていないことが少ない。

本研究室では、WTとクロロフィル蛍光挙動の異なるシロイヌナズナ変異体はいくつか単離されている。PSIIアンテナタンパク質によって吸収された光エネルギーは、1) 光合成を駆動するために使われる、2) 熱放散によって放出される、のどちらかの反応によって消費される。そしてどちらの反応によっても消費されなかったエネルギーがクロロフィル蛍光として放出されることを考えると、これらの変異体は1) 又は2) の反応に何らかの欠損を示すと考えられる。このような変異体の一つである *cfa1* 変異体は、暗条件から明条件に移した後約20-60秒でのみWTよりクロロフィル蛍光が高いという表現型を示す。このような条件下では、water-water cycleやPSI循環的電子伝達が光合成を駆動するためのスターターとして機能することが示唆されていること、またルビスコなどの二酸化炭素固定に関わる酵素の光活性化に時間を要することを考え合わせると、*cfa1* 変異体はwater-water cycleかPSI循環的電子伝達のどちらかに欠損があると予想される。そこで本研究では、この *cfa1* 変異体を詳細に解析した。

結果と考察

30分間の暗順応処理を行なったWTと *cfa1* 変異体のqPとNPQを生育条件と同じ光強度(80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)で測定したところ、*cfa1* 変異体のqPとNPQは光照射開始後1分以内でのみWTより低かった。qPは、電子伝達鎖の因子であるプラストキノンの酸化状態を反映している。また、NPQは熱放散の程度を表している。従って、この結果から *cfa1* 変異体では電子伝達鎖がより還元的になり、熱放散が抑制されたということが示唆された。この結果はクロロフィル蛍光挙動の結果と同様に、*cfa1* 変異体はwater-water cycleかPSI循環的電子伝達のどちらかの代替的な光合成経路に欠損があるという仮説を支持した。

PSI循環的電子伝達には、NDH経路とFQR経路が存在する。そこでまず *cfa1* 変異体がNDH経路に欠損を持つかを調べた。NDH経路の因子であるNDH複合体に欠損がある変異体は、光照射を中止するとWTでは見られるクロロフィル蛍光の一過の上昇が見られなくなることが知られている。

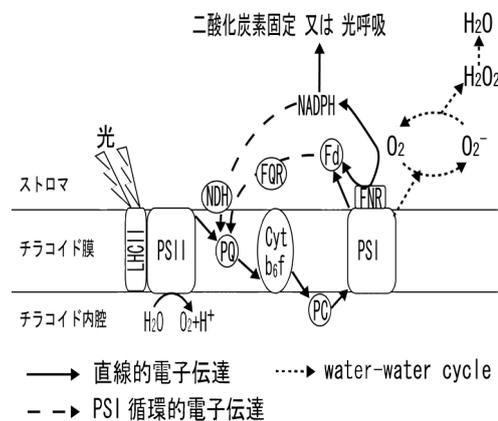


図1 様々な光合成経路の概略図

そこでこの一過的上昇が *cfa1* 変異体で見られるかを調べたところ、WT も *cfa1* 変異体も光照射を中止した直後にこの一過的上昇が見られた。このことから *cfa1* 変異体は NDH 経路には欠損がないことが示された。次に FQR 経路に欠損があるかを調べた。FQR 経路の因子である PGR5 タンパク質が欠損している変異体は、*in vitro* の PS I 循環的電子伝達活性が大きく損なわれることが知られている。そこで、同様の実験法を用いて *cfa1* 変異株が FQR 経路に欠損を持つのかを調べた結果、*cfa1* 変異体の活性は WT と変わらなかった。このことから *cfa1* 変異体は FQR 経路にも欠損がないことが示唆された。

上記の結果から、*cfa1* 変異体は water-water cycle に欠損を持つのではないかと考えた。そこで、二酸化炭素固定による電子の消費の影響を取り除くため、二酸化炭素濃度を 0% にして qP と NPQ の測定を行なった。酸素依存的な光合成経路には、water-water cycle の他に光呼吸がある。そのため光呼吸が十分に働く酸素濃度条件下では、多くの電子が光呼吸を駆動するために消費され、water-water cycle 依存的な電子の消費がほとんど起こらない可能性も十分に考えられる。しかし光呼吸の酸素に対する親和性は、water-water cycle の酸素に対する親和性よりも数倍低いことが知られている。また二酸化炭素濃度が 0% かつ酸素濃度が 2% の気相条件下では光呼吸がほとんど働かないことも、光呼吸の変異体の解析から示唆されている。

そこで酸素濃度を 0、2、5、10、21% と振って、30 分間の暗順応処理を行なった WT と *cfa1* 変異体の qP と NPQ を $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光強度下で測定した (図 2)。光照射開始 10 分後において、0% 条件下においては差が見えなかった。しかし低酸素濃度(2% 又は 5%) では、*cfa1* 変異体は qP と NPQ が WT より低かった。これらの結果により、*cfa1* 変異体は酸素依存的な光合成経路に欠損があることが示唆された。この WT と *cfa1* 変異体の差は酸素濃度が上がるにつれて小さくなり、10% 以上の酸素濃度では差が見られなくなった。これらの結果により、*cfa1* 変異体は光呼吸がほとんど働かないような条件下でのみ、qP と NPQ が低くなることが示された。従って *cfa1* 変異体は water-water cycle に欠損があるために、低酸素条件下では酸素への電子の流れが減少し、電子伝達鎖はより還元的になり熱放散の誘導が抑制されることが示唆された。

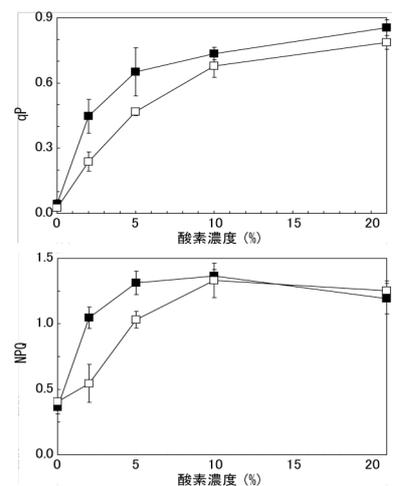


図 2. qP と NPQ の酸素濃度依存的な変化
二酸化炭素濃度は 0%。黒四角が WT、白四角が *cfa1* 変異体を表す。

CFA1 遺伝子の機能欠損が生理学的にどのような意義を持つのかを明らかにするため、弱光条件 ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 又は強光条件 ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) において WT と *cfa1* 変異体の生育を比較した。弱光条件においては、*cfa1* 変異体は WT よりわずかに生育阻害を示した。一方、強光条件においては、*cfa1* 変異体は明らかな生育阻害を示し、いくつかの葉では著しい退色を示した。これらの結果から、*cfa1* 変異体は強光に順化できず、光ストレスに対する感受性が高くなったということが示された。

結論

cfa1 変異体を詳細に解析した結果から、*cfa1* 変異体は water-water cycle に欠損があることが示された。water-water cycle はいくつかの反応を経て、活性酸素種を急速にかつ効率的に消去する機構であるが、律速段階は O_2 を還元して O_2^- を生成する段階であると考えられている (図 1)。*in vitro* の実験において、いくつかの FAD 酵素がこの反応を促進することが示唆されている。しかしながら実際、生体内でどのような因子によって反応が促進されるのかは明らかになっていない。*cfa1* 変異体では、このような因子が欠損することで O_2 に対する親和性が下がり、そのために 0% CO_2 /2% O_2 条件下や暗条件から明条件に移した直後といった water-water cycle の機能が電子伝達に大きな影響を及ぼす条件下で異常を示すと考えられる。なぜ *cfa1* 変異体では光ストレスに対する感受性が高くなったのかは明らかになっていないが、*CFA1* 遺伝子の機能は光ストレスにおいても重要な役割を果たすと思われる。今後、マップベースクローニング法により *cfa1* 変異体の原因遺伝子が明らかになることで、water-water cycle の制御メカニズムが明らかになっていくだろう。