

氏名	PENPORN SAE-TANG
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 1027 号
学位授与年月日	平成 28 年 9 月 23 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Improvements in the Tolerance of Photosystem II to Photo-Oxidative Stress in Cyanobacteria (シアノバクテリアにおける光化学系 II の抗酸化耐性の向上)
論文審査委員	委員長 教授 西山 佳孝 委員 准教授 日原由香子 委員 教授 西田 生郎 委員 教授 戸澤 讓

論文の内容の要旨

Photosynthesis is sensitive to various environmental stresses and, in particular, strong light, which induces the generation of reactive oxygen species (ROS), such as singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), superoxide radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), and the hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$). ROS are highly toxic to cells and cause oxidative damage to various components, such as proteins, lipids, and DNA. Oxidative damage is often associated with photoinhibition of photosystem II (PSII), due to the particular sensitivity of the repair of PSII to ROS. ROS inhibit the repair of PSII by suppressing the synthesis *de novo* of proteins that are required for the repair of PSII, such as the D1 protein, which constitutes the reaction center of PSII.

In cyanobacteria, as well as in other photosynthetic organisms, superoxide dismutase (SOD) and catalase are considered as the first line of the antioxidative systems that can effectively scavenge O_2^- and H_2O_2 , respectively. In the present study, I generated transformants that overexpressed an iron superoxide dismutase (Fe-SOD) from *Synechocystis* sp. PCC 6803; a highly active catalase (VktA) from *Vibrio rumoiensis*; and both enzymes together. Then, the sensitivity of PSII to photoinhibition was examined in these transformant stains and wild-type cells. In cells that overexpressed either Fe-SOD or VktA, PSII was more tolerant to strong light than it was in wild-type cells. Moreover, in cells that overexpressed both Fe-SOD and VktA, PSII was even more tolerant to strong light. However, the rate of photodamage to PSII, as monitored in the presence of chloramphenicol, was similar in all three transformant stains and in wild-type cells, suggesting that the overexpression of these ROS-scavenging enzymes might not protect PSII from photodamage but might protect the repair of PSII. Under strong light, intracellular levels of ROS fell significantly, and the synthesis *de novo* of proteins that are required for the repair of PSII, such as the D1 protein, was enhanced. These observations suggest that overexpressed Fe-SOD and VktA might act synergistically to alleviate the photoinhibition of PSII by reducing intracellular levels of ROS, with resultant protection of the repair of PSII from oxidative inhibition. Thus, the improvements of antioxidative systems successfully enhanced the protection of PSII from photo-oxidative stress.

論文の審査結果の要旨

当学位論文審査委員会は、論文発表会を平成 28 年 8 月 2 日に開催し、論文内容の審査を行った。審査結果を以下に要約する。

光合成の光化学系 II は強光に対する感受性が高く、強光下では容易に失活する。この現象は光阻害と呼ばれ、強光下における光合成生物の成長抑制の要因となっている。これまでに強光下で発生する活性酸素が、光化学系 II の修復を阻害し、光阻害を促進させることが明らかになっている。しかし、光合成生物は様々な抗酸化機構を発達させており、抗酸化機構と光化学系 II の光防御の関係は未解明な点が多い。本論文では、抗酸化機構で重要な役割を担う活性酸素消去系酵素を光合成微生物シアノバクテリアで過剰発現させると、光化学系 II の強光耐性が增大することを示しており、抗酸化機構が光化学系 II の光防御に重要な働きを担っていることを明らかにしている。以上の発見を踏まえ、本論文では抗酸化機構と光合成の光防御の関係について最新の知見をまとめている。

第 1 章では、本論文の研究背景を述べている。光化学系 II の環境ストレス応答について概説し、強光による光阻害のメカニズムに関して詳しくレビューしている。従来、光化学系 II の光阻害は、活性酸素による光化学系 II 反応中心の損傷によると考えられてきた。特に一重項酸素による反応中心 D1 タンパク質の損傷は、アクセプターサイド説と呼ばれ、植物生理学の教科書にも記載されるなど光阻害メカニズムの定説となっていた。しかし近年、光阻害における活性酸素の作用機構に関して新たな仮説が西山らにより提唱された (2001 年)。この説では、強光下で発生する活性酸素は、光化学系 II に直接損傷を与えるのではなく、光化学系 II を修復するプロセスを阻害すると考えられている。またこの仮説を受けて、光化学系 II の光損傷にメカニズムに関して、活性酸素に依存しない新たな仮説 “Two-step 説” が大西らにより提唱された (2005 年)。この仮説では、光化学系 II の一部である酸素発生複合体マンガクラーが、UV 光や青色光を吸収して崩壊し、それが引き金となって反応中心が可視光によって損傷を受けると考えられている。しかしながら、光化学系 II の光損傷に関しては依然として議論が続いている。

光合成生物は、活性酸素による傷害を回避するため様々な抗酸化機構を発達させている。まず、光合成電子伝達で生じたスーパーオキシドに対して、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) が働き、過酸化水素と酸素に分解する。過酸化水素はカタラーゼやペルオキシダーゼによって水と酸素に分解される。一方、光合成の励起エネルギー伝達で生じた一重項酸素は、カロテノイドや α -トコフェロールなどの抗酸化物質によって基底状態へと消光される。本論文では、SOD とカタラーゼに着目して、これらの活性酸素消去系酵素をシアノバクテリアで過剰発現させ、光化学系 II の光阻害への影響を調べ、光合成の光防御における抗酸化機構の役割を解明することを目的とした。

第 2 章では、光化学系 II の光防御における活性酸素消去系酵素の役割に関して記述している。過剰発現させる活性酸素消去系酵素として、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 由来の Fe-SOD、およびビブリオ菌 *Vibrio rumoiensis* 由来の高活性カタラーゼ VktA を選び、これらの酵素をシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 で過剰発現させた。Fe-SOD 過剰発現株および VktA 過剰発現株では、野生株に比べ光化学系 II の光阻害が緩和しており、これらの活性酸素消去系酵素を過剰発現させることによって、光化学系 II の強光耐性が增大することがわかった。Fe-SOD と VktA を共発現させることによって、光

化学系 II の強光耐性はさらに増大した。しかし、クロラムフェニコールの存在下で光化学系 II の修復を止めた状態で光阻害を観察すると、いずれの過剰発現株も野生株と同じ速度で光損傷が進行したため、これらの酵素の過剰発現は光化学系 II の光損傷を保護するのではなく、光化学系 II の修復を促進することが示唆された。これらの結果は同時に、スーパーオキシドや過酸化水素が光化学系 II の光損傷を促進するのではなく、その修復を阻害することを示している。さらに、これらの過剰発現株では、光化学系 II の修復に必要な D1 タンパク質の合成が強光下で著しく促進していることがわかり、Fe-SOD および VktA の過剰発現が強光下でタンパク質合成を保護していることが示唆された。これらの過剰発現株で活性酸素の発生量を定量したところ、過酸化水素の発生が Fe-SOD・VktA の二重過剰発現で著しく抑制されていることがわかった。

第 3 章では、本研究の総括および今後の展望が述べられている。本研究によって、SOD およびカタラーゼを過剰発現することによって抗酸化機能が高まり、光合成の光防御機能が強化されることが示され、光合成の抗酸化耐性を向上させることに成功したと結論している。今後の課題として、光合成の機能強化が生育のストレス耐性にどのように関与するか解明する必要がある。また、抗酸化機能の向上によるタンパク質合成の促進メカニズムも解明する必要がある。さらに、本研究で確立した光合成機能強化の手法を高等植物に応用することも期待される。

このように、本研究は光合成の光防御における抗酸化機構の役割を解明したものであり、光合成を機能強化することに成功した点でも画期的だと思われる。これらの研究成果は、植物生理学の分野で国際的に著名な学術誌 *Plant and Cell Physiology* (5-year impact factor: 4.847) に筆頭著者として論文が受理されており、また共著者として一報の論文が *Plant and Cell Physiology* に受理されている。以上のことから、当学位論文審査委員会は本論文が博士（理学）の学位授与に十分値するものとし、学位論文として合格と判定した。