

Chlorophyll Biosynthesis: A Target of Oxidative Stress

(クロロフィル合成：酸化ストレスの標的)

学位論文内容の要旨

Due to sedimentary and stationary phase of life, plants have to face various biotic and abiotic stresses. Although each of the various stress conditions has distinctive characteristics and elicits its own specific responses when subjected on plants, they share a common feature: establishment of oxidative stress that resulted into further damage. Due to involvement of potent intermediates like porphyrin molecules and due to having certain enzymes which have shown to be redox regulated, chlorophyll biosynthesis pathway can be a one of the major targets of oxidative stress. In this study therefore, I have studied the effects of oxidative stress on chlorophyll biosynthesis pathway using the vascular plant *Cucumis sativus* as a model.

To generate reactive oxygen species (ROS), cucumber cotyledons both 14 h illuminated (green) and etiolated were treated with 100 μM methyl viologen (MV) and were subjected to dark (D) or low light (L) (40–45 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) condition. Upon MV treatment the cotyledons could not accumulate chlorophyll compared to control upon illumination and this observation was mainly attributed to significant inhibition of chlorophyll biosynthesis at precursor level i.e. at ALA synthesis. This suggested the inhibition at either Glutamyl tRNA reductase (GluTR/) and/or Glutamate-1-semialdehyde (GSA-AT). MV treatment also showed to exacerbate its effects on later stage of tetrapyrrole porphyrin molecule synthesis when cotyledons are provided with 5-aminolevulinic acid (ALA) and quantitatively analyzed by high performance liquid chromatography. It showed the accumulation of Proto IX, Mg-proto IX and Mg-proto IX ME and there was an increase in the accumulation of intermediates upon subjection of cotyledons from D to L. This increase in the accumulation of porphyrin molecules was always accompanied with decreased concentration of Protochlorophyllide (Pchlde),

the end product of chlorophyll biosynthesis in dark. This suggested that MV induced oxidative stress has inhibitory effects on intermediate tetrapyrrole synthesis also. The accumulation of Mg-proto IX ME might be due to inhibition at Mg-proto IX ME cyclase whereas the accumulation of Proto IX can be ascribed to inhibition of any or all of the following enzymes: Mg-chelatase, Fe-chelatase and Protoporphyrinogen IX oxidase. When effects of MV treatment on chlorophyll biosynthesis were compared with effect on PS II activity, former one was observed to be more susceptible.

As like MV treatment, I also checked the effects of high light (HL) induced oxidative stress on chlorophyll biosynthesis during which etiolated cotyledons failed to synthesize chlorophyll entirely unlike green cotyledons. When transfer to L conditions, the etiolated cotyledons could resume the chlorophyll biosynthesis and subsequent accumulation following an initial 2-12 h delay. This severe inhibition found in etiolated cotyledons was also mainly because of impairment at the step of ALA synthesis. However, it was not due to decrease in the protein level of respective enzymes i. e. GluTR and GSA-AT. The expression of *HEMA1* was also not found to be inhibited under HL treatment. This suggested that the inactivation of respective enzymes or the deformation of complex between GluTR and GSA-AT may be the reason behind this inhibition. However, neither heme nor flu protein was the responsible factors since heme level remain unchanged during HL and this effect we observed mainly under light where Pchl_{ide} was not accumulated to exert effect of flu. Like MV treatment, HL also showed to affect the intermediary steps of pyrrole biosynthesis in chlorophyll biosynthesis pathway. Upon feeding with 0.5 mg/ml ALA, HL treated cotyledons accumulated Proto IX with concomitant decrease in the Pchl_{ide} concentration. This again suggested that either single or in combination Mg-chelatase (Mg-che I) or Fe-chelatase or Protoporphyrinogen IX oxidase (PPX I) might be inhibiting under high light. Upon western blotting (W. B.) analysis, PPX I and Mg-che I did not show any decrease in their level which indicated that inactivation of enzymes is the probable cause behind the effect observed. From these results, I demonstrated that oxidative stress impedes key steps in chlorophyll biosynthesis by either directly or indirectly inhibiting the activity of these enzymes.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 歩

副 査 教 授 森 川 正 章

副 査 教 授 原 登志彦

学 位 論 文 題 名

Chlorophyll Biosynthesis: A Target of Oxidative Stress

(クロロフィル合成：酸化ストレスの標的)

クロロフィルは、光エネルギーを捕捉し、電子伝達の機能を担う、光合成に不可欠な分子である。しかし、クロロフィルとその代謝中間体は光を受けると活性酸素を生み出す危険な分子でもある。そのため、クロロフィル合成は極めて厳密な調節を受けなければならない。もし、このような調節機構を失い、クロロフィル代謝中間体やタンパク質に取り込まれないクロロフィル分子が蓄積すると、植物は直ちに枯死する。

植物は、低温、強光、乾燥、塩など様々なストレスを日常的に受けている。これらのストレスは、多くの場合、最終的には酸化ストレスとなって、活性酸素の発生を伴う。このような活性酸素を安全に除去できない場合、植物は傷害を受け、枯死に至る。酸化ストレスの標的は、光合成における二酸化炭素の固定酵素、活性酸素除去酵素、タンパク質合成系などいくつか報告されているが、クロロフィル合成が酸化ストレスの標的になっているかは不明であった。

本研究は、酸化ストレスがクロロフィル代謝にどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的に行われた。

酸化ストレスの影響を調べるため、キュウリ子葉に除草剤として知られているパラコート (Methyl viologen, MV) 処理をおこない活性酸素を発生させた。MV 処理した子葉では、黄化子葉、緑化子葉共に、クロロフィルの蓄積は完全に阻害された。そこで、MV 処理がクロロフィル合成のどの段階を阻害しているのかを調べるため、クロロフィル合成の律速段階と考えられている 5-アミノレブリン酸 (ALA) の合成活性を測定した。その結果、ALA 合成活性は MV 処理によって大きく阻害された。次に、クロロフィルの前駆体である ALA を子葉に与え、クロロフィル合成を促進した時に蓄積するクロロフィル代謝中間体を調べた。その結果、MV 処理した子葉で、プロトポリフィリン IX (ProtoIX)、Mg-プロトポリフィリン IX (Mg-ProtoIX)、Mg-プロトポリフィリン IX モノメチルエステル (Mg-ProtoIX ME) が蓄積した。このことは、クロロフィル合成経路の複数の段階が MV 処理によって阻害されていることを示唆している。次に、酸化ストレスを生み出す強光処理を行い、クロロフィルの合成活性を調べた。その結果、黄化葉では、強光処理がクロロフィル合成を完全に阻

害したのに対して、緑化子葉では、クロロフィル合成の阻害が観察されなかった。また、MV 処理と同様に強光が ALA 合成にあたえる影響を調べたところ、ALA 合成は黄化葉では阻害されたのに対して、緑化葉では阻害が見られなかった。また、強光処理した黄化葉では、ALA を与えると、クロロフィル中間体の ProtoIX が蓄積した。次に MV 処理や強光処理が実際に活性酸素の発生を伴っているかを染色法によって調べたところ、クロロフィルの合成阻害と H_2O_2 の発生が一致していることが確認された。さらに、酸化ストレスによるクロロフィル合成の阻害機構を調べるため、クロロフィル合成酵素の遺伝子発現や、抗体を用いた酵素タンパク質の定量を行った。その結果、酸化ストレスは、遺伝子発現や酵素タンパク質の合成には影響しないことが明らかになった。これらの結果から、酸化ストレスによるクロロフィル合成の阻害は、酵素活性の阻害と予想された。

本研究によって、クロロフィル合成が酸化ストレスによって調節されることが明らかになった。特に、緑化初期にその影響が大きく、これは活性酸素消去系が十分働かないためと予想される。これらの研究は、酸化ストレスの作用の一つを明らかにしたことに留まらず、植物の生態現象の解明にも重要な貢献をするものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（地球環境科学）の学位を授与される資格を有するものと判定した。