

# 大気汚染による樹木光合成抑制の分子的事実の解明

## The study on molecular architectures of photosynthesis hindrance in woody plants by air-pollution

高橋美佐

広島大学大学院理学研究科 助教

Misa Takahashi

Assistant Professor, Graduate School of Sciences, Hiroshima University

### 研究の概要

樹木は二酸化炭素の大きな吸収体である。特に都市部においては街路樹が主要な吸収体である。しかし、大気汚染物質によってその炭酸ガス固定および酸素発生など光合成作用は、大きく抑制されている。街路樹の大気汚染物質耐性を高めることは都市部における二酸化炭素削減の促進につながるものである。そのためには、街路樹の大気汚染物質による阻害機構の解明が必須である。しかし、その詳細の理解は立ち遅れている。申請者はモデル植物シロイヌナズナを用い、二酸化窒素(都市大気の主大気汚染物質)による光合成抑制の分子的事実を把握しつつある。本研究では、これらの実績を基礎として、二酸化窒素による樹木光合成抑制の分子的事実の解明を直接の目的とし、以て、樹木の大気汚染耐性能力を高め、樹木の光合成促進すなわち二酸化炭素削減効率の飛躍的向上をめざすものである。

### Abstract

Woody plants are a powerful sink for carbon dioxide (CO<sub>2</sub>). However, the photosynthesis activities of plants such as CO<sub>2</sub> fixation and oxygen evolution are hindered by atmospheric nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>), a major pollutant in the urban air. This is also the case for roadside trees in the urban area. The investigation on the molecular mechanism of hindrance of photosynthesis by NO<sub>2</sub> is vital to improve the capability of roadside trees as a CO<sub>2</sub> sink. Recently, we have discovered proteomic evidence for hindrance of photosynthesis by NO<sub>2</sub> in *Arabidopsis thaliana*, a model plant. The present study focuses on the proteomic analysis of woody plants to investigate molecular architectures of photosynthesis hindrance by NO<sub>2</sub> in these plants.

## 1. 研究目的

大気汚染物質である二酸化窒素 ( $\text{NO}_2$ ) は強力なニトロ化剤で、タンパク質をニトロ化して活性を阻害することが知られている。申請者はモデル植物であるシロイヌナズナを用いて、高濃度の  $\text{NO}_2$  (4~40 ppm) で曝露すると、タンパク質チロシンがニトロ化されるが、タンパク質チロシンのニトロ化は PsbO/PsbP に特異的に生じることをプロテオミクス解析(antibody-based proteomics)により明らかにした。PsbO/PsbP は、光化学系 II の酸素発生複合体 (OEC) を構成するタンパク質である。そこで、本研究ではシロイヌナズナ葉の単離チラコイドを調整して、PsbO/PsbP のニトロ化と酸素発生の関係を調査した。

他方、申請者はこれまでに、200 種以上の植物種について、 $\text{NO}_2$  の吸収・同化能について調査し、植物種間の  $\text{NO}_2$  同化能には最大 600 倍以上の差異があることを見いだした。さらに、樹木について、4 ppm  $\text{NO}_2$  と 0.1 ppm  $\text{NO}_2$  で曝露した場合、どちらの条件下でも高い  $\text{NO}_2$  同化能を示す樹木 ( $\text{NO}_2$  に強い樹木) と低濃度  $\text{NO}_2$  では高い  $\text{NO}_2$  同化能を示すが、高濃度  $\text{NO}_2$  では低い  $\text{NO}_2$  同化能を示す樹木 ( $\text{NO}_2$  に弱い樹木) に分かれることを報告した。樹木の炭酸ガス固定、酸素発生など光合成作用は、大気汚染物質により大きく抑制されるが、その詳細の理解は立ち遅れている。そこで、本研究では  $\text{NO}_2$  に強い樹木と  $\text{NO}_2$  に弱い樹木のタンパク質チロ

シンのニトロ化を比較解析して、大気汚染物質による光合成抑制の分子実体を解明し、樹木の大气汚染耐性能力を高めることにより、樹木の光合成促進を目指した。

## 2. 研究経過

単離チラコイドにおけるニトロ化と酸素発生 播種後 4 週間目のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 葉から単離チラコイドを調整して、 $\text{NO}_2$  を溶解したバッファーに懸濁 60 分後に PsbO/PsbP タンパク質ニトロ化と酸素発生量を測定した。バッファーの  $\text{NO}_2^-$  と  $\text{NO}_3^-$  濃度をキャピラリー電気泳動装置で測定し、数値計算によりバッファー中の  $\text{NO}_2$  濃度を求めた。PsbO タンパク質のニトロ化レベルは、ウェスタンブロットおよびデンシメトリーによる定量によって調べた。酸素発生量はクラーク型酸素電極を用いて定量した。

樹木におけるタンパク質ニトロ化解析 樹木として、 $\text{NO}_2$  に弱い樹木であるクスノキ (*Cinnamomum camphora*)、ユズリハ (*Daphniphyllum macropodum*)、オオイタビ (*Ficus pumila*) と  $\text{NO}_2$  に強い樹木であるクチナシ (*Gardenia jasminoides*)、ギンヨウアカシア (*Acacia baileyana*)、フサアカシア (*Acacia dealbata*) を用いた。樹木は園芸店で購入した後、温室で 1 週間以上順化して実験に用いた。曝露チャンバー内で 40 ppm  $\text{NO}_2$  で 8 時間曝露した後、葉を採取して粗タンパク質溶液を調整した。粗タ

ンパク質を SDS PAGE で分離、PVDF 膜 (Millipore) にタンパク質を転写した後、抗ニトロチロシン抗体 (Sigma) を用いた免疫学的手法によりタンパク質チロシンのニトロ化の解析を行った。ニトロ化タンパク質の同定は、LC M/MS 解析により行った。

### 3. 研究成果

#### 単離チラコイドにおけるニトロ化と酸素発生

NO<sub>2</sub> による PsbO タンパク質チロシンのニトロ化と酸素発生量との間には負の相関関係が認められた(図 1)。従って、光化学系 II を取り囲む表在タンパク質のニトロ化が NO<sub>2</sub> による光合成阻害の分子の実体の一つであると考えられる(後述参照)が示された。さらに、PsbO タンパク質ニトロ化に及ぼす因子に関する解析から、光および活性酸素は、この反応を促進する因子であることが分かった。

#### 樹木におけるタンパク質ニトロ化解析

調べた全ての樹木で抗ニトロチロシン抗体と反応するバンドが観察された(図 2)。ギンヨウアカシアで最も多くのバンドが観察された。次いでフサアカシアであった。クスノキ、ユズリハ、オオイタビ、クチナシでは 1~2 本のバンドが観察された。33 kD と 23 kD のバンドに着目すると、クスノキ、ユズリハ、オオイタビ、クチナシ、ギンヨウアカシア、フサアカシアで 33 kD バンドが、ユズリ

ハ、オオイタビ、クチナシ、ギンヨウアカシア、フサアカシアで 23 kD バンド観察された。特にユズリハとギンヨウアカシアで強いシグナルが検出された。LC MS/MS 解析により 23 kD および 33 kD バンドは、それぞれ PsbP および PsbO に由来することが

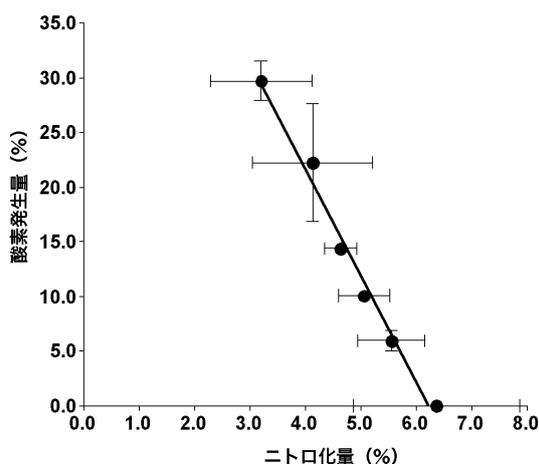


図 1 シロイヌナズナ PsbO タンパク質のニトロ化と酸素発生量の関係

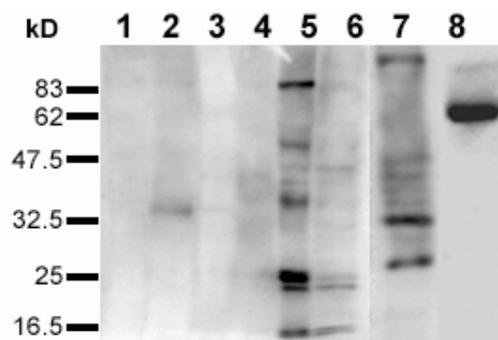


図 2 NO<sub>2</sub> 曝露した樹木タンパク質のウェスタンブロット解析。

40 ppm NO<sub>2</sub> で 8 時間曝露した樹木などから抽出した粗タンパク質について、抗ニトロチロシン抗体を用いて解析した。レーン 1: クスノキ、2: ユズリハ、3: オオイタビ、4: クチナシ、5: ギンヨウアカシア、6: フサアカシア、7: シロイヌナズナ、8: ニトロ化 BSA。

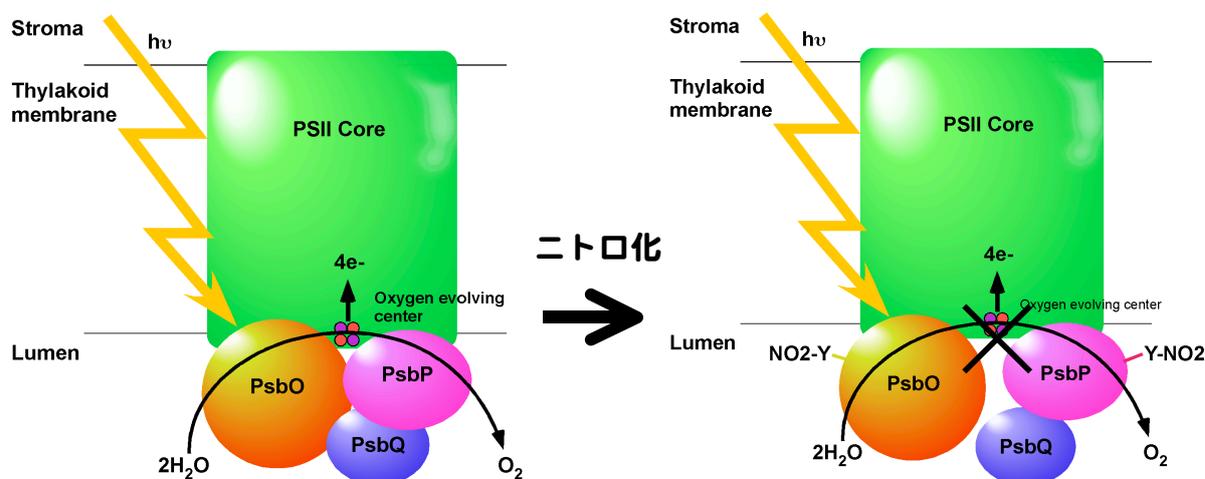


図3 NO<sub>2</sub>によるPsbO/PsbPのニトロ化による酸素発生阻害.

分かった。すなわち、これら樹木においても NO<sub>2</sub> 曝露により、PsbO/PsbP タンパク質がニトロ化されることを示すものである。樹木におけるニトロ化と酸素発生の関係の調査するため、樹木葉からのチラコイドの単離を数種の樹木について試みたが、再現性の良い結果が得られなかった。

図3に我々の考えている NO<sub>2</sub> による酸素発生阻害モデルを示す。高濃度 NO<sub>2</sub> に植物を曝すと、葉緑体光化学系 II の酸素発生中心(OEC)を取り囲む表在性膜タンパク質である PsbO/PsbP がニトロ化され、タンパク質複合体のパッキングに何らかの不具合が生じ、その結果酸素発生の阻害が生じると考えている。

#### 4. 今後の課題と発展

NO<sub>2</sub> によるニトロ化に敏感なチロシン残基を欠失させることにより、NO<sub>2</sub> によるニトロ化攻撃に耐性な PsbO タンパク質(遺伝子)をデザインできるのではないかと考え、目下研

究中である。このような耐大気汚染酸素発生複合体タンパク質遺伝子を樹木に遺伝子導入して、大気汚染耐性樹木が作出できると考えている。

#### 5. 発表論文リスト (印刷中も含む)

Takahashi Misa, Shigeto Jun, Asada Kozi, Sakamoto Atsushi and Morikawa Hiromichi. Nitration of peripheral proteins of photosystem II by atmospheric nitrogen dioxide suppresses oxygen evolution in plants. *NISSAN SCIENCE FOUNDATION Woody Plants Biotechnology Symposium*, Tokyo, 26th February, 2009

Takahashi Misa, Shigeto Jun, Asada Kozi, Sakamoto Atsushi and Morikawa Hiromichi. Preferential nitration of chloroplast oxygen evolving complex proteins in *Arabidopsis thaliana* shoots by atmospheric nitrogen dioxide (投稿準備中).