

# 光合成研究

第18卷 第1号(通卷51号) 2008年4月

**Vol. 18 No. 1 April 2008**

THE JAPANESE ASSOCIATION FOR PHOTOSYNTHESIS RESEARCH



日本光合成研究会

光合成研究  
第18巻 第1号 (通巻51号) 2008年 4月  
NEWS LETTER Vol. 18 No. 1 April 2008  
THE JAPANESE ASSOCIATION FOR PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

CONTENTS

\*\*\*\*\*

第8回日本光合成研究会公開シンポジウム	
光合成を支える多様な分子システム	.....1
トピックス 植物の葉に起こる斑入り ~分子遺伝学的アプローチ~	
三浦栄子・加藤裕介・坂本 亘	....3
集光性色素タンパク質CP29は光合成ステート遷移に必須である	
得津隆太郎	....8
北海道サロマ湖に生息するアイスアルジーにおける明反応の日周	
変動	藍川晋平 ....12
解説 植物の光情報受容体フィトクロムの細胞内シグナル伝達機構	
松下智直	....16
研究紹介 バクテリオクロロフィル生合成系のニトロゲナーゼ類似酵素の	
生化学的解析	野亦次郎 ....24
集会案内	.....30
新刊図書	.....31
事務局からのお知らせ	.....32
日本光合成研究会会員入会申込書	.....33
日本光合成研究会会則	.....34
幹事会名簿	.....36

賛助法人会員広告

# 光合成研究

第 18 卷 第 1 号 (通巻 51 号) 2008 年 4 月

NEWS LETTER Vol. 18 NO. 1 April 2008

THE JAPANESE ASSOCIATION FOR PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

\*\*\*\*\*

## 第 8 回日本光合成研究会公開シンポジウム

光合成を支える多様な分子システム	1
トピックス 植物の葉に起こる斑入り ~分子遺伝学的アプローチ~ 三浦栄子・加藤裕介・坂本 亘	3
集光性色素タンパク質 CP29 は光合成ステート遷移に必須である 得津隆太郎	8
北海道サロマ湖に生息するアイスアルジーにおける明反応の日周変動 藍川晋平	12
解説 植物の光情報受容体フィトクロムの細胞内シグナル伝達機構 松下智直	16
研究紹介 バクテリオクロロフィル生合成系のニトロゲナーゼ類似酵素の生化学的解析 野亦次郎	24
集会案内	30
新刊図書	31
事務局からのお知らせ	32
日本光合成研究会会員入会申込書	33
日本光合成研究会会則	34
幹事会名簿	36

賛助法人会員広告

---

---

第8回日本光合成研究会公開シンポジウム

大学院教育改革支援プログラム「ものから生体をつなぐ物質科学者養成」共催

光合成を支える多様な分子システム

2008年5月30日～31日(名古屋大学 野依記念学術交流館)

---

---

5月30日(金)

13:00-13:10 伊藤繁(日本光合成研究会会長)はじめに

セッション1:光を情報として使う!

13:10-13:35 岡島公司(大阪府大)「フォトリポピンはどのようにして青色光を生体内シグナルに変えるのか?-LOVドメインによるキナーゼ活性制御機構-

13:35-14:00 吉原静恵(大阪府大)「赤・遠赤色光可逆反応を青・緑色光可逆反応に作りかえるフィトクロム;シアノバクテリアクロム」

14:00-14:25 福島佳優、伊藤繁(名大理)、成川令、池内昌彦(東大、総合文化)「BLUFタンパク質と赤-緑シアノバクテリアクロム:構造と反応-何を知りたいのか?」

休憩

14:45-15:10 松下智直(九大)「植物の主要な光情報受容体フィトクロムBの細胞内シグナル伝達機構の解析」

15:10-15:50 木下俊則(名大)「気孔孔辺細胞における青色光シグナル伝達系の解析」

休憩

16:20-17:20 ポスタートーク

休憩

18:00-18:30 総会

18:45-21:00 懇親会

5月31日(土)

9:00-9:15 ポスター表彰

セッション2:クロロフィル代謝系

9:15-9:40 小池裕幸(兵庫県立大)「ラン藻のクロロフィル8位ビニル基還元に必要なタンパク質」

9:40-10:05 草場信(東大)「メンデルとクロロフィル分解を制御する遺伝子ネットワーク」

10:05-10:30 栗栖源嗣(東大)「光非依存型(暗所作動型)プロトクロロフィリド還元酵素の構造解析」

休憩

**セッション3：光合成を支える生理機能**

11:00 – 11:25 榊原均（理研）「サイトカニン代謝経路の解明と無機栄養による制御機構」

11:25 – 11:50 高橋秀樹（理研）「植物における硫黄代謝制御の分子機構」

11:50 – 12:15 中西啓仁（東大）「鉄の取り込みと体内移行」

12:15 – 12:45 大岡宏造（阪大）・藤田祐一（名大）「光合成細菌から見る植物型光合成：いま、なぜ光合成細菌か？」

**12:45 – 13:00 総合討論 これからの光合成研究**

閉会

オーガナイザー：鹿内利治（京大）・藤田祐一（名大）・大岡宏造（阪大）

昨年同様、優秀ポスター賞を互選します。沢山のポスター発表申し込みをお待ちします。

参加ご希望の方は、事前登録をお願いします（当日参加も受け付けます）。ポスター発表申し込みは、電子メールで発表者・演題をご連絡ください（締切り5月16日）。ポスター発表は、会員に限らせていただきます（その時点でご登録いただければ可能です）。

参加費は無料。懇親会費は、一般 3000円、学生 2000円を予定しています。

参加・ポスター申込先：藤田祐一（[fujita@agr.nagoya-u.ac.jp](mailto:fujita@agr.nagoya-u.ac.jp)）

<参加申し込み票>

\*\*\*\*\*

氏名：

所属：

連絡先：

懇親会参加希望： 有 無

ポスター発表希望： 有 無

ポスター発表者（所属）：

ポスタータイトル：

\*\*\*\*\*

## TOPICS

## 植物の葉に起こる斑入り ～分子遺伝学的アプローチ～

岡山大学 資源生物科学研究所

三浦栄子・加藤裕介・坂本 亘

## 1. 葉の斑入りについて

「斑入り」とは、観葉植物に見られるような緑色組織に縞や斑点などの様々な模様が入ることを指す。斑入り植物は人為的に園芸品種として選抜されてきたものだけではなく、自然界にもしばしば見つけることができる。しかし、メンデルの遺伝法則が再発見された20世紀初めに遺伝形質として報告されているにも関わらず、原因となる遺伝子の同定や詳しい解析がなされ始めたのは最近になってからである<sup>1)</sup>。また、今現在においても、どのように斑入りが形成されるのかについては不明の点が多い。斑入り植物は、全ての細胞が同じ遺伝的背景を持つにも関わらず葉緑体への分化レベルが異なる細胞を同一の葉に共存させており、葉緑体分化を研究するための有効な解析ツールともなりうる。本稿では、私たちの研究室で扱うシロイヌナズナ斑入り変異体 *var* (*yellow variegated1* (*var1*) および2 (*var2*)) の原因遺伝子とその働きを概説し、三浦が中心に行っている斑入り抑制変異体 *fu-gaeri1* (*fug1*) の解析を通じた植物が斑入りを形成するメカニズムやその意義についての考察を紹介してみたい。

2. 斑入り変異体 *var* の原因遺伝子 *FtsH*

*var1* および *var2* は単一劣性の斑入り突然変異で、その緑色セクターではプラスチド（葉緑体発達前の構造物をこう呼ぶ）が正常に葉緑体へと発達している一方、白色セクターのプラスチドは発達が途中で停止した未分化の状態であることが最近の私たちの研究から示唆されている<sup>2)</sup>。これまでの研究から、原因遺伝子 *VARI* と *VAR2* はそれぞれ、チラコイド膜上で異なる *FtsH* メタプロテアーゼ (*FtsH2* と *FtsH5*) をコードしていることが明らかとなっている<sup>3-5)</sup>。シロイヌナズナは12個の *FtsH* ホモログを持っており、*FtsH2* と *FtsH5* を含

む9個が葉緑体局在する<sup>6)</sup>。斑入り表現型は *FtsH2* と *FtsH5* の欠損に特異的で、他の *FtsH* 遺伝子のノックダウンでは何も表現型は現れない<sup>6)</sup>。これは、*FtsH2* と *FtsH5* が葉緑体型 *FtsH* の中でも最も多く、かつ恒常的に発現しているためだと考えられる。*FtsH2* と *FtsH5* は～400kDa の主要な *FtsH* ヘテロ複合体を形成しており、*FtsH1/FtsH5* と *FtsH2/FtsH8* のペアに代表されるように、葉緑体型 *FtsH* にはよく似ているが2つのタイプが存在し、ペア内では高発現による機能の相互置換が可能と考えられ、Adamらによりタイプ A/B モデルとして提唱されている<sup>6-8)</sup>。現在 *FtsH* は、葉緑体におけるプロテアーゼとしての役割である光化学系の品質管理（主に PSII 反応中心である光障害を受けた D1 タンパク質の分解）と、まだ定義されていない機能を通じたチラコイド膜の形成・発達に関与していると推測されている<sup>2,3,4,9)</sup>。

3. *var2* の斑入り抑制変異体 *fug1 var2* の単離<sup>11)</sup>

葉緑体分化に関わる因子およびメカニズムを解明する目的で、*var2* の斑入りを抑制することが可能なセカンドサイトミュレーションの発見を試みた。*var2* 抑制変異体のスクリーニングは実は他のグループによって成功しており<sup>10)</sup>、いくつかの劣性変異で斑入りは回復することは予想されていた。

まず私たちは T-DNA 挿入変異体である *var2-6* に EMS で突然変異処理した M2 世代を作成し、その M2 種子を MS 培地のプレートに播種し、斑入りが抑制された個体をスクリーニングした。約 10,000 個体の M2 個体を試験した中で、約 20 個体の推定の斑入りが抑制された植物を単離した (図1参照)。単離した変異体は *fu-gaeri* (斑返り) と名づけ、その1系統 (以下、変異体名を *fug1 var2* と表記する) に焦点を当てて解析を進

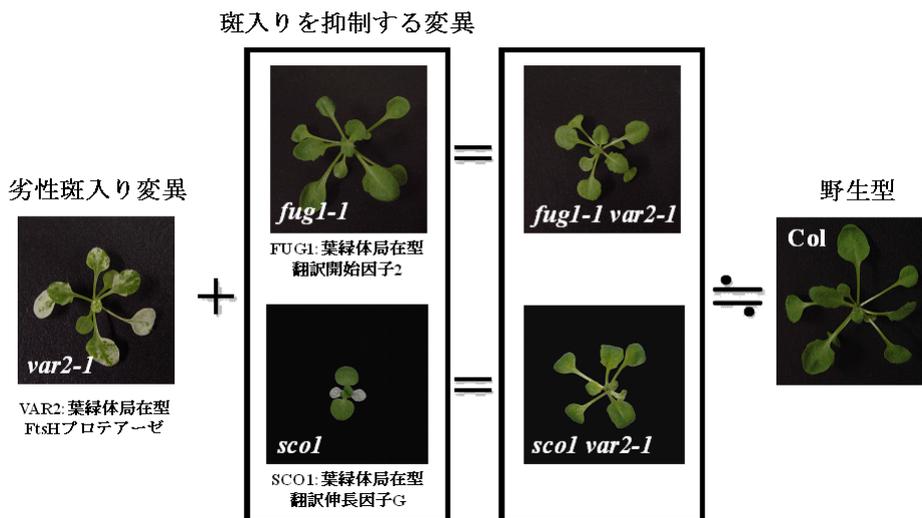


図1 シロイヌナズナ斑入り変異*var2*の斑入りを抑制する劣性変異*fug1*と*scol*  
葉緑体タンパク質の分解を担うプロテアーゼであるVAR2の欠損により引き起こされる斑入り表現型は、葉緑体タンパク質の合成に関わる因子の機能低下によって抑制される。

めた。葉の組織の縦断切片からは、*fug1 var2* は野生型に比べて成長が遅いため個々の細胞は小さく見えるが、表皮や葉肉細胞は正常に組織化されていた。透過型電子顕微鏡を用いた観察では、*fug1 var2* のグラナスタックの発達を伴う葉緑体の構造は野生型と同等であると思われた<sup>11)</sup>。

#### 4. *fug1* の原因遺伝子は cpIF2 をコードしていた

*fug1* は遺伝解析の結果、核の単一劣性変異であったためマップベースクローニングを行ったところ、原核生物型翻訳開始因子 2 (IF2) をコードする遺伝子に単一のアミノ酸置換を発見した<sup>11)</sup>。葉緑体やミトコンドリアが持つ独自のゲノムの翻訳には、細胞質で行われる核ゲノムの真核生物型翻訳機構とは異なり、原核生物型の翻訳機構が用いられており、IF2 は、30S リボソームと fMet-tRNA<sup>met</sup>、mRNA からなる開始複合体にリボソーム大サブユニットを GTP 依存的に呼び込む役割を持つ<sup>12-14)</sup>。シロイヌナズナゲノムには原核生物型 IF2 ホモログをコードする遺伝子が 2 つ存在し、GFP を用いた局在解析の結果、一つはミトコンドリアに、もう一つ (FUG1) は葉緑体に移行することが示唆された (以下、FUG1 を指す IF2 を cpIF2 と表記する)。また T-DNA 挿入変異体の解析によって、cpIF2 タンパク質が生存に必須であり、完全欠損すると胚性致死となることも明らかにした。さらに、cpIF2 の RNAi による

*var2* の斑入り抑制実験や、IF2 欠損大腸菌株による相補性検定により、*fug1* の原因遺伝子が実際に cpIF2 であることを証明した<sup>11)</sup>。

#### 5. *fug1* では葉緑体タンパク質合成能が低下する

cpIF2 タンパク質は翻訳開始因子であるため、*fug1* における葉緑体タンパク質の合成量が低下しているかを調べる目的で、<sup>35</sup>S 標識したメチオニンに葉に直接取り込ませ、光照射開始から一定時間ごとにチラコイド画分を抽出し、SDS-PAGE により分離し、BAS1000 により検出した。確認できたバンドの中から D1 と LHCII を同定して、その輝度を数値化シグナグラフを作成した結果、核コードの遺伝子である LHCII の合成量には差がみられなかった。一方、葉緑体ゲノムにコードされた D1 の蓄積量は異なっており、最も差が現れたのは 5、10 分後のサンプルで、野生型に対し *fug1* では約 30% の合成量の減少を示した。この結果から *fug1* における cpIF2 の発現量低下は葉緑体タンパク質合成 (特に初期段階) に影響することが示唆された<sup>11)</sup>。

#### 6. *var2* の強光感受性も *fug1 var2* では抑制される

FtsH は PSII 修復サイクルにおける主要なプロテアーゼであると考えられており、*var2* における FtsH2 の欠損は光障害を受けた光化学系タンパク質 (特に D1) の蓄積を引き起こすと予想される。このような修復サ

イクルの異常が、結果的に光化学系の電子伝達に影響を及ぼすため、*var2* の緑色組織は強光ストレスに順化できず、強光条件で系 II における光化学収率（クロロフィル蛍光による *Fv/Fm* 値）が著しく低下する。また、このような強光障害後の光化学収率の回復も野生型に比べて遅く、かつ完全に回復しないことが知られている<sup>5,15)</sup>。しかし、*var2* と *fug1* が共存した抑制変異体の PSII 活性の低下は野生型と同レベルであった<sup>11)</sup>。また、MS 寒天培地で生育させた *fug1* は定常状態ですでに *Fv/Fm* を指標とした PSII 活性の低下を示したが、土植えた成熟葉を使用したときの PSII レベルは Col に匹敵していた。この結果は、葉緑体における翻訳は比較的若い葉の最初の生合成に重要な影響を及ぼすことを意味するのかもしれない。対照的に、成熟葉では、翻訳は PSII の修復といったむしろ葉緑体のメンテナンスに重要な役割を持つのかもしれない。

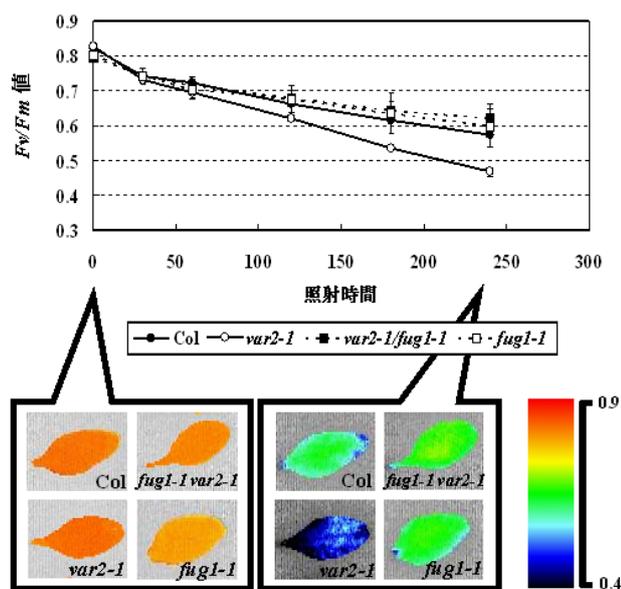


図2 斑入り変異*var2*の強光感受性も*fug1 var2*では抑制される

土植えた成熟葉に  $800 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  の強光を 2 時間照射した。各 *Fv/Fm* 値は 10 分間の暗順化後に測定した。グラフの下には葉の *Fv/Fm* 値を擬似カラーで示した。

### 7. *fug1* の斑入り抑制効果

交配実験の結果、*fug1* は *var2* とは別の FtsH ホモログが欠損した *var1* 変異体 (弱い斑入り表現型) や *var1 var2* 二重変異体 (アルビノに近い斑入り表現型) の斑

入りも回復させることがわかった<sup>11)</sup>。これらの結果は *fug1* が特異的な FtsH においてではなく、FtsHs の欠損全体に影響することを示唆している。*var1 var2* 二重変異体では白色組織の割合が高く、個体が弱勢で、種子を得ることができないが、*fug1* を導入した三重変異体 *fug1 var1 var2* ではごく弱い斑は見られるものの、植物の生育も回復し種子が得られるようになる。ここで用いた変異は全て劣性で、それぞれが少なからず光合成の活性低下を引き起こす変異であるにも関わらず、それらの組み合わせによって斑入りが変化し、植物の成長にも大きな影響を与えることは、自然界にある多様な斑入りとその進化を考えると興味深い知見といえる。

### 8. *var2* の斑入りは別の翻訳変異体 *sco1* でも抑制される

私たちは、*var2* に見られる斑入り抑制が cpIF2 に特化したものではなく、葉緑体の翻訳活性が低下した結果、起こったのではないかと仮説を立てた。そこで cpIF2 と同様に、葉緑体の翻訳に関与する遺伝子に変異を持った *snowy cotyledon 1 (sco1)* 変異体に *var2* を交配し二重変異体 *sco1 var2* の作製を試みた。*sco1* は名前が示すように子葉のみが白くなる変異体として単離され、葉緑体で唯一の翻訳伸長因子 (cpEF-G) にアミノ酸置換を持つことが Albrecht らにより明らかにされている。葉緑体翻訳伸長時における cpEF-G の実際の役割にはまだ不明の点が多いが、*sco1* におけるアミノ酸置換は cpEF-G とリボソーム複合体との結合機能に影響すると予測されている<sup>16)</sup>。交配の結果、*sco1 var2* 二重変異体では子葉が白い表現型を示すが、本葉での斑入りを抑制することが明らかとなった。これらの結果により、当初予想したように、葉緑体タンパク質の翻訳活性低下が斑入りと関係していることが強く示唆された。

### 9. 正常な葉緑体への分化には葉緑体内タンパク質の合成と分解のバランスが重要

FtsH は様々な葉緑体タンパク質 (Rieske FeS<sup>17)</sup>, LHCII<sup>18)</sup>, D1<sup>15,19,20)</sup> を含む) の ATP 依存的分解に関与する。それらと私たちが遺伝学的に明らかにした結果から、葉緑体タンパク質の合成と分解のバランスは、少なくとも *var* 変異体のケースにおいては、斑入りを引き起こす決定因子の一つであると現在のところ考えら

れている。一般化できるかどうかはわからないが、斑入りがおこる分子メカニズムを明らかにできた最初の例といえる。

バランスには閾値が存在すると仮定すると、閾値以上をバランスがとれた状態と考えることができる。閾値以上では細胞は正常に見える葉緑体への分化を運命づけられるが、閾値以下である細胞は葉緑体分化が不可逆的に抑制され、白色セクターを形成すると考えられる。一枚の斑入り葉における白色セクターの面積は後期葉ほど減少していくことから、この閾値はおそらく植物個体の生育や環境条件に依存して変化していくのであろう。完全な葉緑体の機能を阻害するように働く *fug1* におけるタンパク質合成の減少は、おそらく閾値のラインを下げ、多くの細胞が正常な葉緑体に発達するようにさせているのではないかと予想される。

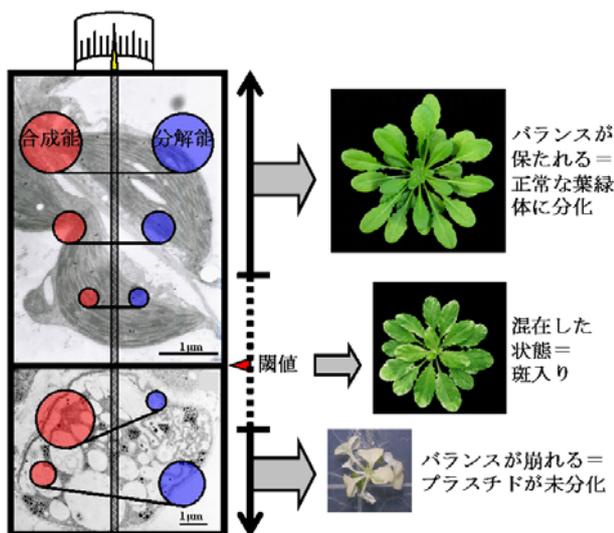


図3 植物の葉に斑入りを起こす閾値モデル

左側には葉緑体タンパク質の合成能力と分解能力が釣り合った正常な葉緑体（上）と不釣り合いな *var2* 白色セクターの異常なプラスチド（下）の電子顕微鏡写真を示した。

## 10. おわりに

本研究を通して、斑入り形成に関わる新規の制御因子や経路を同定することはできなかったが、抑制変異体候補を多数単離できたことからわかるように、*var* における葉の斑入り抑制は種々の要因で起こるのであろう。また、劣性変異体を用いた最近の研究からも、葉の斑入りは様々な原因を通して起こりうる事が明

らかになりつつある。自然界において私たちは、遺伝学的な変異だけではなく、病原菌の感染や除草剤散布などの外的要因によっても葉の斑入りを観察することもあるので、斑入りという表現型は植物にとって厳しい環境条件下で生き残る生存戦略の一つなのかもしれない。そのような観点からも今後研究を進めたいと考えている。

最後に本稿は、2007年5月に開催された第7回光合成研究会シンポジウムにおいて三浦が発表し、ポスター賞を頂いた発表内容を中心に紹介したもので、受賞とこのような話題提供の機会を下さった伊藤会長と編集幹事の野口先生にこの場を借りてお礼申し上げます。

## 参考文献

1. Sakamoto, W. (2003) Leaf-variegated mutations and their responsible genes in *Arabidopsis thaliana*, *Genes Genet. Syst.* 78, 1–9.
2. Kato, Y., Miura, E., Matsushima, R., and Sakamoto, W. (2007) White leaf sectors in *yellow variegated 2* are formed by viable cells with undifferentiated plastids, *Plant Physiology* 144, 952–960.
3. Chen, M., Choi, Y., Voytas, D. F., and Rodermel, S. (2000) Mutations in the *Arabidopsis VAR2* locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplast FtsH protease, *Plant J.* 22, 303–313.
4. Takechi, K., Sodmergen, Murata, M., Motoyoshi, F., and Sakamoto, W. (2000) The *YELLOW VARIEGATED (VAR2)* locus encodes a homologue of FtsH, an ATP-dependent protease in *Arabidopsis*, *Plant Cell Physiol.* 41, 1334–1346.
5. Sakamoto, W., Tamura, T., Hanba-Tomita, Y., and Murata, M. (2002) The *VARI* locus of *Arabidopsis* encodes a chloroplastic FtsH and is responsible for leaf variegation in the mutant alleles, *Genes Cells* 7, 769–780.
6. Sakamoto, W., Zaltsman, A., Adam, Z., and Takahashi, Y. (2003) Coordinated regulation and complex formation of *YELLOW VARIEGATED1* and *YELLOW VARIEGATED2*, chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in *Arabidopsis* thylakoid membranes, *Plant Cell* 15, 2843–2855.
7. Yu, F., Park, S., and Rodermel, S. R. (2004) The

- Arabidopsis* FtsH metalloprotease gene family: Interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes, *Plant J.* 37, 864–876.
8. Zaltsman, A., Ori, N., and Adam, Z. (2005) Two types of FtsH protease subunits are required for chloroplast biogenesis and Photosystem II repair in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 17, 2782–2790.
  9. Sakamoto, W. (2006) Protein degradation machineries in plastids, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 599–621.
  10. Park, S., and Rodermel, S. R. (2004) Mutations in ClpC2/Hsp100 suppress the requirement for FtsH in thylakoid membrane biogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 12765–12770.
  11. Miura, E., Kato, Y., Matsushima, R., Albrecht, V., Laalami, S., and Sakamoto, W. (2007) The balance between protein synthesis and degradation in chloroplasts determines leaf variegation in *Arabidopsis yellow variegated* mutants, *Plant Cell* 19, 1313–1328.
  12. Ramakrishnan, V. (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation, *Cell* 108, 557–572.
  13. Manuell, A., Beligni, M. V., Yamaguchi, K., and Mayfield, S. P. (2004) Regulation of chloroplast translation: Interactions of RNA elements, RNA-binding proteins and the plastid ribosome, *Biochem. Soc. Trans.* 32, 601–605.
  14. Laursen, B. S., Sorensen, H. P., Mortensen, K. K., and Sperling-Petersen, H. U. (2005) Initiation of protein synthesis in bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 101–123.
  15. Bailey, S., Thompson, E., Nixon, P. J., Horton, P., Mullineaux, C. W., Robinson, C., and Mann, N. H. (2002) A critical role for the Var2 FtsH homologue of *Arabidopsis thaliana* in the photosystem II repair cycle *in vivo*, *J. Biol. Chem.* 277, 2006–2011.
  16. Albrecht, V., Ingenfeld, A., and Apel, K. (2006) Characterization of the *snowy cotyledon 1* mutant of *Arabidopsis thaliana*: The impact of chloroplast elongation factor G on chloroplast development and plant vitality, *Plant Mol. Biol.* 60, 507–518.
  17. Ostersetzer, O., and Adam, Z. (1997) Light-stimulated degradation of an unassembled Rieske FeS protein by a thylakoid-bound protease: The possible role of the FtsH protease, *Plant Cell* 9, 957–965.
  18. Želisko, A., Garcia-Lorenzo, M., Jackowski, G., Jansson, S., and Funk, C. (2005) AtFtsH6 is involved in the degradation of the lightharvesting complex II during high-light acclimation and senescence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 13699–13704.
  19. Lindahl, M., Spetea, C., Hundal, T., Oppenheim, A. B., Adam, Z., and Andersson, B. (2000) The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein, *Plant Cell* 12, 419–431.
  20. Komenda, J., Barker, M., Kuviková, S., de Vries, R., Mullineaux, C. W., Tichy, M., and Nixon, P. J. (2006) The FtsH protease, slr0228, is important for quality control of photosystemtwo in the thylakoid membrane of *Synechocystis* PCC 6803, *J. Biol. Chem.* 281, 1145–1151.

## TOPICS

## 集光性色素タンパク質 CP29 は光合成ステート遷移に必須である

北海道大学 低温科学研究所 生物適応機構学講座

得津隆太郎

## 1. はじめに

植物が光合成を行うにあたり、2つの光化学系 (PSI、PSII) 及び、その光化学系周辺集光アンテナ (LHC) は、光エネルギーを捕集し、化学エネルギーへの変換を行っている。最適な光合成効率を保つためには、生育する環境条件に応じて光化学系間の励起状態のバランスが維持される必要がある。どちらかの光化学系が優先的に励起される状態が長期間続いた場合、光化学系タンパク質の発現量比を調整することで光環境適応することが知られている。しかし、このようなタンパク質の発現制御が間に合わないような急激な光環境の変化が起きた場合、光化学系間の励起状態のバランスが崩れてしまう危険性がある。そこで、植物は、ステート遷移と呼ばれる光化学系超複合体の再構成機構により、短期間での光環境適応を行う。ステート遷移 (ステート1から2への遷移) では、次のような段階的な反応が起きることが知られている<sup>1)</sup>。1) 光環境の変化などに伴い PSII が優先的 (または過剰) に励起されると、2) プラストキノールの酸化還元状態の変化をシグナルとして、LHCII リン酸化酵素が活性化される。3) この LHCII リン酸化酵素は、PSII に結合する集光性色素タンパク質である LHCII をリン酸化し、PSII から解離させる。4) PSII から解離した LHCII は、チラコイド膜中を移動し、PSI に再結合する。5) これにより、PSI の励起状態が上昇し、各光化学系間の励起割合のバランスが維持される。これまで、長い間、ステート2で形成される PSI-LHCI/II 超複合体の素性は明らかにされていなかった。しかし、最近、Kouřil ら<sup>2)</sup>はシングルパーティクル解析を行い、PSI に3量体 LHCII が結合している可能性を示唆した。また Takahashi ら<sup>3)</sup>が、この PSI-LHCI/II 超複合体にはモノマー LHCII である CP29 と CP26 が結合していることを示した。しかし、これらのモノマー LHCII がステート遷移により実際に

光化学系間を移動しているのか、また PSI-LHCI/II 超複合体の形成において、どのような役割を担っているのかは、明らかではない。そこで、本研究では、単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* において、モノマー LHCII である CP29 及び CP26 がステート遷移にどのような影響を及ぼすか検討した。

## 2. ステート遷移と集光性色素タンパク質

*C. reinhardtii* には、4種類の三量体 LHCII (Type I~IV)、2種類の単量体 LHCII (CP26, CP29) の6タイプの LHCII タンパク質が存在する。これら中での LHCII Type II、CP26 及び CP29 が、ステート2において PSI に結合することがわかっている<sup>3)</sup>。このうち、特に CP29 は、他の LHCII に比べてリン酸化部位が多いことや<sup>4)</sup>、シングルパーティクル解析でも PSI に結合することが示唆されているため<sup>5)</sup>、ステート遷移においてより中心的な役割をもつことが予想される。本研究では、ステート遷移における単量体 LHCII の役割を明らかにするため、RNAi を用いて CP29 及び CP26 それぞれの発現を抑制した変異株 (b4i, b5i) を作成した。

## 3. RNAi 変異株のステート遷移能力

得られた RNAi 株 (b4i, b5i) のチラコイド膜を単離してタンパク質組成を調べたところ、標的タンパク質以外の光化学系タンパク質に、影響は見られなかった。このことから、RNAi によるタンパク質の発現抑制が効率的かつ特異的に行われていることが確認できた。そこで、これら RNAi 株のステート遷移能力を以下の方法で解析した。

まず、ウェスタンブロッティング法により、ステート遷移に必須である LHCII のリン酸化状態の変化を調べた。各変異株では、野生株と同様に、ステート遷移

によるリン酸化の進行が観察された (data not shown)。したがって、2つの RNAi 株では、LHCII リン酸化酵素による LHCII のリン酸化は起きており、プラストキノンプール還元シグナル伝達は正常に行われていることがわかった。さらに、LHCII が PSII から解離しているか調べるために、蛍光クエンチング解析<sup>6)</sup>を行ったところ、ステート遷移に伴う PSII からの蛍光の減少 (qT クエンチング) が確認された (data not shown)。また、同時に FIRE 法を用いて PSII のアンテナの吸収断面積を測定した結果、ステート遷移に伴い PSII のアンテナサイズがいずれも小さくなっていることが明らかとなった (data not shown)。これらの結果は、各変異株において、ステート遷移での PSII 側での反応 (PSII-LHCII 超複合体からの LHCII の解離) は正常に機能していることを示している。

ステート遷移では、光化学系間で励起エネルギーの再分配が行われる。そこで、励起エネルギー分配の変化を観察するために、ステート1からステート2に誘導し蛍光発光スペクトルを測定した。この結果、野生株 (WT) では、PSII 由来の 690nm 付近の蛍光ピークの低下が観察された (図 1 (A))。これは PSII へのエネルギー分配の減少を反映しており、PSII から LHCII が

解離したことを示唆する。さらに、2つの RNAi 株では、どちらにおいても LHCII が PSII から解離することがわかった (図 1 (A))。一方、WT において同時に観察される 720nm 付近の PSI 由来の蛍光ピーク上昇は、PSI への LHCII の再結合を示す。この蛍光ピークの上昇は WT と b5i 株において見られたが、b4i 株では見られなかった。このことから、b4i 株では、PSII から解離した LHCII が、PSI に再結合しない可能性が示唆された。この可能性をより直接的に明らかにするため、各ステートにおける蛍光励起スペクトルを測定し<sup>2)</sup>、その差スペクトルを求めることでステート2特異的に PSI へのエネルギー伝達を行っている成分を観察した。WT では、650nm 及び 675nm 付近での蛍光のピークが検出されたことから、LHCII が PSI へ再結合していることが示された (図 1 (B))。2つの RNAi 株のうち、b5i 株においては、WT と同様の蛍光ピークが観察された。ところが、b4i 株ではステート遷移欠損コントロール株である *DLSΔ* 変異株<sup>7)</sup>と同様、蛍光の変化が観察されなかった。このことから、b4i 株では、ステート遷移に伴う LHCII-PSI 間のエネルギー伝達が起きておきっていないことが明らかになった。

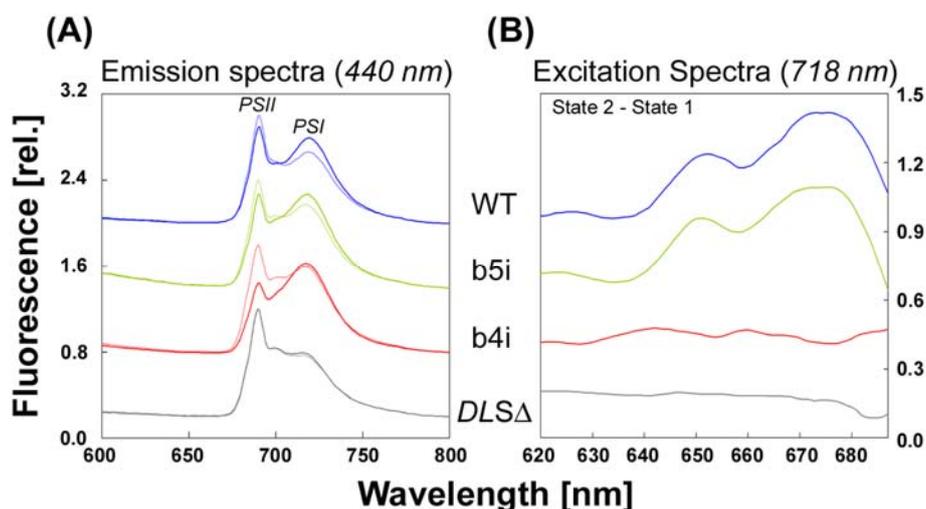


図 1 ステート遷移誘導による蛍光発光及び励起スペクトル変化

(A) 77 K における蛍光発光スペクトルの測定を行った。細線:ステート1、太線:ステート2。PSII の蛍光ピーク<sup>6)</sup>で規格化後、クエンチング解析から得られた PSII 蛍光値 ( $F_m'$ ) の減少率でスペクトル補正を行った。*DLSΔ*は、シトクロム *b<sub>6</sub>f* の変異株で、ステート遷移欠損コントロールとして用いた<sup>7)</sup>。

(B) 77 K における蛍光励起スペクトルの測定を行った。ステート1及びステート2での蛍光励起スペクトル (718 nm 励起) を測定し、697 nm (PSI 吸収帯) で規格化を行った。図の線は、ステート2からステート1の測定値を差し引いた、差スペクトルを表している。

#### 4. ステート遷移と PSI-LHCI/II 超複合体

前項までの光学的解析から、PSII から解離した LHCII が b4i 株では PSI に再結合していない可能性が明らかとなった。さらに、生化学的な解析を行い、ステート 2 の変異株において、PSI-LHCI/II 超複合体が形成されているか検証した。シヨ糖密度勾配超遠心法により、チラコイド膜中に存在するクロロフィルタンパク質の分離を行ったところ、b5i 株では WT と同様に PSI-LHCI/II 超複合体の存在を示す結果 (A3'バンドの検出) が得られた (図 2 (WT, b5i))。しかし、CP29 発現抑制株では A3'バンドは検出されず、PSI-LHCI/II 超複合体が形成されていないことがわかった (図 2 (b4i))。

本研究の結果は、ステート遷移は 2 つの反応；

- (1) LHCII がリン酸化を経て PSII から解離する。
- (2) 解離した LHCII が PSI へ再結合する。

を経て進行することを示している。b4i 株では、この反応のうち、PSII から LHCII が解離する部分に関しては正常に機能していた。しかし、PSI-LHCI/II 超複合体の形成されないことから、LHCII の中でも CP29 を欠損すると、解離 LHCII の全てが PSI に再結合できないことが明らかとなった (図 3)。このことから、CP29 は PSI と LHCII の間のリンカーとして機能していると考えられる。これまでの報告から、PSI のサブユニットである PSI-H を欠損した高等植物 *Arabidopsis thaliana* において、ステート遷移の欠損がわかってお

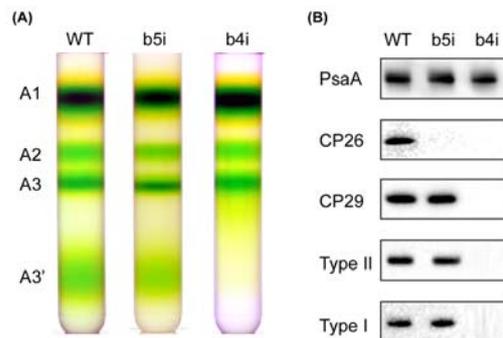


図 2 シヨ糖密度勾配超遠心によるクロロフィルタンパク質複合体の分離

(A) ステート 2 に固定したチラコイド膜を可溶化し、シヨ糖密度勾配超遠心を行った。A1-A3'の 4 つのバンドは、それぞれ A1: Free LHCII、A2: PSII core、A3: PSI-LHCI supercomplex、A3': PSI-LHCI/II supercomplex を示す<sup>3)</sup>。

(B) A3'画分に含まれる LHCII。PSI のサブユニットの一つである PsaA の量で規格化し、各抗 LHCII 抗体を用いて検出を行った。Type III 及び Type IV は検出されなかった (data not shown)。

り、PSI-H は、LHCII が PSI に再結合するためのドッキングサイトとして考えられている<sup>8)</sup>。今回の結果と併せ考えると、ステート遷移に伴う PSI と LHCII の結合には、CP29 および PSI-H が必須であり、それぞれ PSI-LHCI/II 超複合体の形成において、リンカーおよびドッキングサイトとして働いていると考えられる。

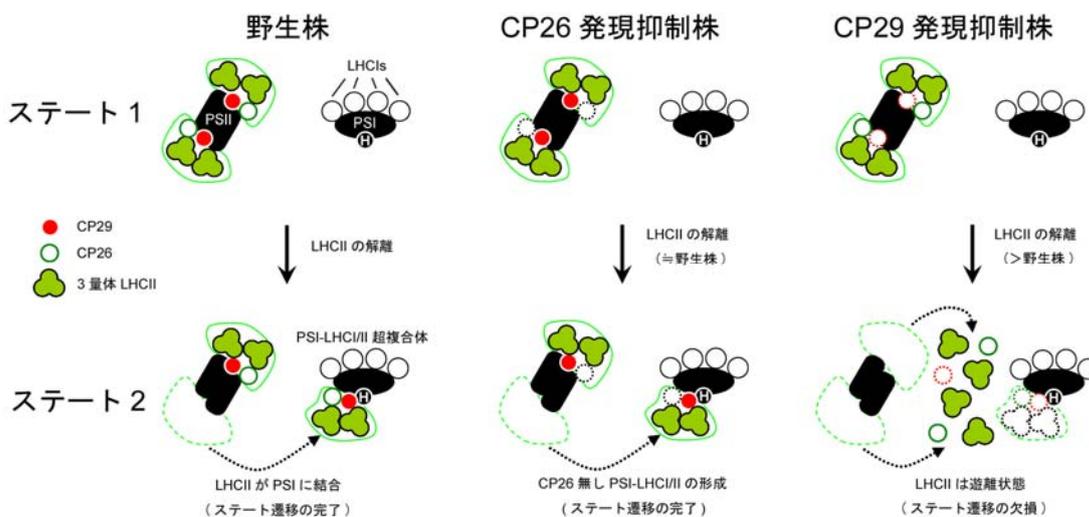


図 3 野生株と比較した各変異株におけるステート遷移モデル

PSI に含まれる『H』は、CP29 ドッキングサイトと考えられる PSI-H<sup>8)</sup>を示している。

## 5. まとめ

本研究により、単量体集光アンテナ分子である CP29 が *C. reinhardtii* のステート遷移に必要な不可欠であることが明らかとなった。CP29 は三量体 LHCII と PSI を繋ぐリンカーとして働いていると考えられる。今後は、今回報告した LHCII 以外に、4 種類の 3 量体 LHCII の変異体を作成し、全 6 種の LHCII がステート遷移において担う役割を明らかにしたい。

## 参考文献

1. Wollman, F. A. (2001) State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus, *EMBO J.* 20, 3623–3630.
2. Kouřil, R., Zygadlo, A., Arteni, A. A., Wit, C. D., Dekker, J. P., Jensen, P. E., Scheller, H. V., and Boekema, E. J. (2005) Structural characterization of a complex of photosystem I and light-harvesting complex II of *Arabidopsis thaliana*, *Biochemistry* 44, 10935–10940.
3. Takahashi, H., Iwai, M., Takahashi, Y., and Minagawa, J. (2006) Identification of the mobile light-harvesting complex II polypeptides for state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 477–482.
4. Turkina, M. V., Kargul, J., Rivero, A. B., Villarejo, A., Barber, J., and Vener, A. V. (2006) Environmentally modulated phosphoproteome of photosynthetic membranes in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Mol. Cell. Proteomics* 5, 1412–1425.
5. Kargul, J., Turkina, M. V., Nield, J., Benson, S., Vener, A. V., and Barber, J. (2005) Light-harvesting complex II protein CP29 binds to photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii* under State 2 conditions, *FEBS J.* 272, 4797–4806.
6. Iwai, M., Kato, N., and Minagawa, J. (2007) Distinct physiological responses to a high light and low CO<sub>2</sub> environment revealed by fluorescence quenching in photoautotrophically grown *Chlamydomonas reinhardtii*, *Photosynth. Res.* 94, 307–314.
7. Zito, F., Vinh, J., Popot, J. -L., and Finazzi, G. (2002) Chimeric fusions of subunit IV and PetL in the *b<sub>6</sub>f* complex of *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biol. Chem.* 277, 12446–12455.
8. Lunde, C., Jensen, P. E., Haldrup, A., Knoetzel, J., and Scheller, H. K. (2000) The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis, *Nature* 408, 613–615.

TOPICS

北海道サロマ湖に生息するアイスアルジーにおける明反応の日周変動

兵庫県立大学大学院 生命理学研究科 生命科学専攻

藍川晋平

1. アイスアルジーについて

1-1 アイスアルジー

アイスアルジーは海氷底部で光合成を行い繁殖する微細藻類群であり、ケイ藻や渦鞭毛藻がその主たる構成種である<sup>1)</sup>。アイスアルジーは北極海、南極海などの高緯度の海氷域から日本のサロマ湖(図1)のような低緯度の季節海氷域にまで生息しており、海氷生態系を支える重要な光合成生物である<sup>2,3)</sup>。アイスアルジーが生育する海氷底部の光強度は、海氷面よりも格段に小さく、海氷の厚さにも拠るが、10%程度から1%程度以下しか届かない弱光環境である<sup>4)</sup>。このような弱光環境にも関わらずアイスアルジーはほぼ一日に一回分裂し<sup>5)</sup>、海氷底部を褐色に染めるほど増殖する<sup>6,7)</sup>(図2a)。

1-2 これまでにわかっているアイスアルジーの光合成特性

アイスアルジーは弱光環境に適した光合成を行っており、炭素固定速度は光エネルギーの量に律速されている<sup>8,9)</sup>。より効率的な光合成のため、海水下の弱光環境とはいえ、刻々と変化する光強度に合わせ光合成系を調節していると予想される。これまでもアイスアルジーの光合成の一日の中での変化が調べられている<sup>10-12)</sup>。しかし、天候の影響や測定例が少ない事もあり、光強度の変化に対するアイスアルジーの光合成特性の変化との間に明瞭な相関関係を見いだされていない。

1-3 本研究について

そこで本研究では自然環境において一日を単位とした光強度の周期的な変化の下、アイスアルジーが効率的な光合成のために光合成系をどのように調節しているのか、北海道サロマ湖に棲息するアイスアルジーを対象として調べた。サロマ湖は2カ所でオホーツク海

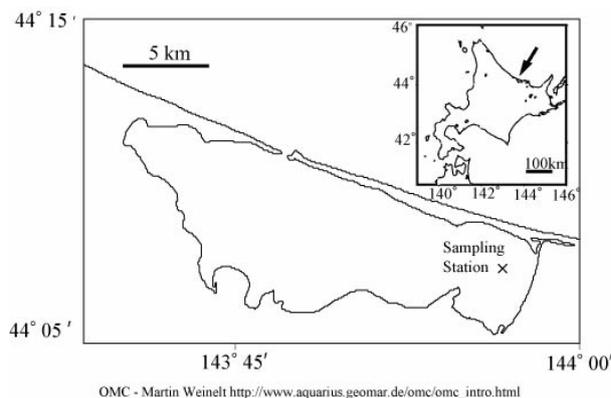


図1 北海道とサロマ湖およびアイスアルジー採集地点の地図

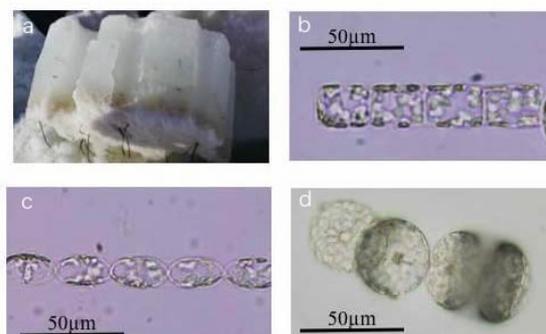


図2 サロマ湖における海水下のアイスアルジー (a) とその主な優先種 *Detonula confervacea* (b)、*Thalassiosira* spp. (c) および *Melosira arctica* (d)

とつながる潟湖であり、冬期は50cm程度の海氷に覆われる。3月初めのサロマ湖の海水下では0から35  $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の光強度の日周的变化が観測されている<sup>12)</sup>。2005年3月3日および4日の連続した2日間に亘り、湖岸から2 km沖合の氷上で、午前9時、11時、午後2時、5時にアイスアルジーを採集した。合計8回の採集は、半径2 m以内の地点で行った。直径7 cmのアイスコアドリルで氷柱を切り出し、底部の茶色に染まった部分(図2a)を切り取り、測定用試料とした。採集後一時間以内にPulse Amplitude Modulation (PAM)により光合成の能力を示す最大電子伝達活性(ETR<sub>max</sub>)

および過剰な光エネルギーの消散の程度を示す非光化学的消光 ( $NPQ = [Fm - Fm'] / Fm$ ) の測定を行った。また光エネルギー捕集や過剰な光エネルギーの消散機構に関わる光合成色素の日周変化を色素分析によって調べた。

## 2. 基礎データ

### 2-1 光強度の日周変化

サロマ湖に近い網走気象台における日照量 ( $MJ \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$ ) のデータ<sup>13)</sup>や氷上で計測した光量子数 (PAR;  $\mu mol \text{ photons} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ) のデータによると、2005年3月2、3、4日の光環境は三日ともほぼ同じ変化を示した。このことから、3月3日と3月4日に採集したアイスアルジーは共に同じような光環境の変化を経験しており、受光履歴の類似した試料であると言える。

### 2-2 採集試料による種構成の違い

2005年3月3日および4日に午前9時、11時、午後2時、5時に採集したそれぞれの試料の種構成を顕微鏡により分析した。その結果、本研究で採集したアイスアルジーは主にケイ藻で構成されていた。また、いずれの試料においても *Detonula confervacea* (図 2 b)、*Thalassiosira* spp. (図 2 c) および *Melosira arctica* (図 2 d) が細胞数全体のおよそ80%を占めており、特に *Detonula confervacea* が全体の50%近くを占めていた。このことから採集時間の異なる試料間の光合成特性の違いに対して、種構成の相違を考慮する必要は小さいといえる。

## 3. PAMによる測定結果

### 3-1 光合成活性

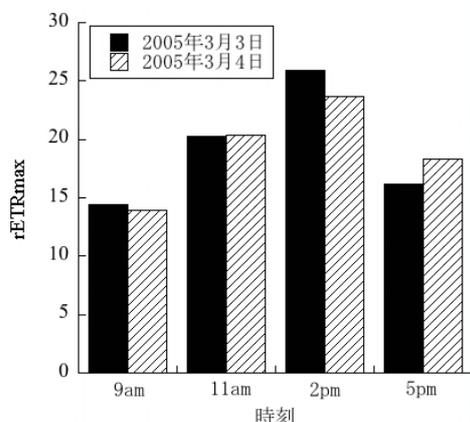


図3 rETRmax の日周変動 (2005年3月3日および4日)

PAM蛍光法により光合成活性の測定を行った。低温下で暗順応 (20–60分) を行ったアイスアルジーに対し、一定強度 (64, 120, 240 あるいは  $350 \mu mol \text{ photons} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ) の連続光を五分間照射し、蛍光および照射した連続光の強度から相対的な電子伝達速度 (rETR) を算出した。このrETRの最大値rETRmaxの時刻による変化を図3に示した。rETRmaxは正午頃に高くなるベル型の変化を示した。この変化は光強度の変化とよく対応していた。このことから、アイスアルジーは刻々と変化する光強度に合わせて光合成機構を調節し、より効率よく光合成を行っていると考えられる。これらの結果は他の光合成生物で得られている炭酸固定の日周変化とよく一致している<sup>14)</sup>。

### 3-2 NPQ

低温で暗順応した (>30分) アイスアルジーを使い各種光強度 (64と  $350 \mu mol \text{ photons} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ) の連続光照射下で5分間、過剰な光エネルギーの消散の程度を示すNPQを測定した。いずれの連続光強度においても、約5分間の励起光照射によりNPQは定常状態に達した。この定常状態に達したNPQの値 (NPQss) の日周変化を図4に示した。64  $\mu mol \text{ photons} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$  の励起光を照射した場合、2005年3月3日、3月4日のNPQssは午前9時から正午頃 (午前11時、午後2時) にかけて減少し、再び午後5時に増加した。350  $\mu mol \text{ photons} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$  の励起光を照射した場合、NPQssは午前9時から正午頃 (午前11時、午後2時) にかけて増加し、午後2時から午後5時にかけて減少した。これらの変化は光強度の変化とよく対応しており、アイスアルジーが光強度の変化に合わせて過剰な光エネルギーの消散機構を調節していると考えられる。

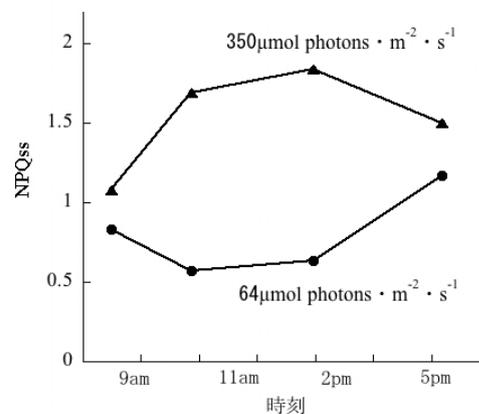


図4 NPQの日周変動 (2005年3月3日)

### 3-3 色素分析(HPLC)

光エネルギー捕集や過剰な光エネルギーの消散機構には、補助色素が深く関わっている。本研究で採集したアイスアルジーを主に構成するケイ藻はFucoxanthin chlorophyll binding protein (FCP)によって光捕集を行っており、FCPは主にChl *a*、Chl *c1+c2*、fucoxanthinなどの光合成色素を含んでいる<sup>15)</sup>。また、ケイ藻の過剰な光エネルギーの消散機構にはdiadinoxanthin (DD)、diatoxanthin (DT) が関わっていることが報告されている<sup>16-18)</sup>。

上述のように、日中の光強度の変化に応じてrETR<sub>max</sub>およびNPQが変化した。そこで2005年3月3日と3月4日に採集したアイスアルジーにおいて、これらの光合成色素がどのような日周変動を示すのかHPLCによる色素分析を行い調べた(図5 a)。本研究で採集したアイスアルジーに含まれる主な光合成色素はChl *a*、Chl *c1+c2*、fucoxanthin、diadinoxanthin、diatoxanthin、 $\beta$ -caroteneであった。相対値は、上記の主な色素のChl *a*量 (mol) に対するそれぞれの色素のモル比で表した。図5 a に示した結果から、fucoxanthin、Chl *c1+c2*はChl *a*に対しての65%、30%をそれぞれ占め、時刻による有意な変化はなかった。このことからアンテナタンパク質の量は変化していないと考えられる。

次に本研究で採集したアイスアルジーにおけるDDとDTの合計量はChl *a*量の約4%程度と少量であったので、 $\beta$ -carotene (Chl *a*量の約1%) と共にそれらの色素の各時間における相対値を図5 b に拡大し、示した。 $\beta$ -caroteneの含量は時刻による顕著な変化は確認できなかったが、DD+DTの量は日照時間の経過とともに増加し、明朝には再びもとの値程度まで減少していた。午後5時におけるDD+DTの量は午前中(午前9時あるいは午前11時)のおよそ1.25倍に増加していたが、図4に示したNPQの日周変化と一致しなかった。

### 4. まとめ

本研究により、サロマ湖のアイスアルジーが刻々と変化する光強度に応じて光合成電子伝達系やその保護機構をダイナミックに調節している事を示す結果を得ることができた。時刻によってアイスアルジーの光合成特性は二つタイプに大別できる。Aタイプは午前9時、午後5時にみられたタイプで弱光を効率的に光合成

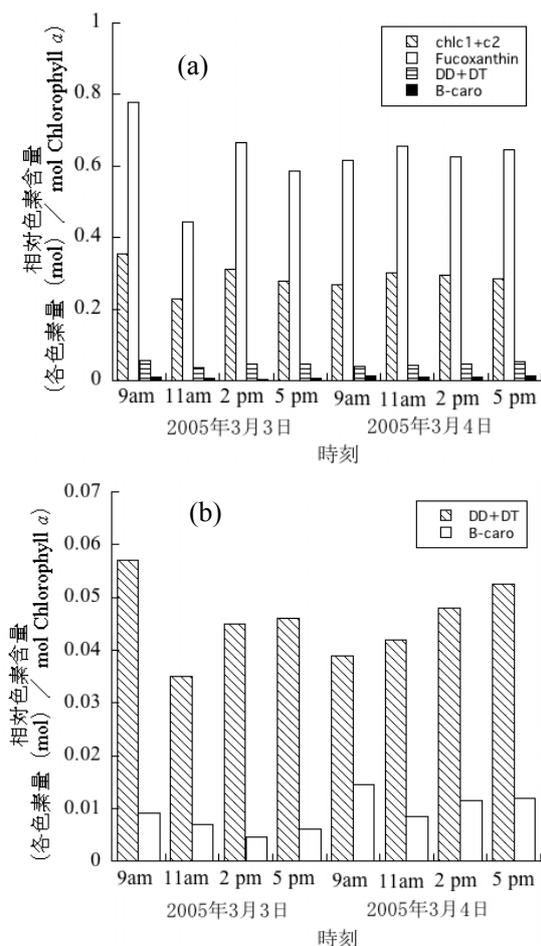


図5 Chl *a*に対する光合成色素の相対含有量 (a) と含有量の少ないDD+DTおよび $\beta$ -caroteneを拡大し表した (b)

に利用する事が出来るが、強光に対する防御機構は比較的低い光合成タイプ、Bタイプは午前11時、午後2時にみられたタイプでより強い光強度でも光合成を行う事ができ、強光に対する防御機構も比較的高い光合成タイプである。AタイプはBタイプよりも弱光をより効率的に利用できる。このようなAタイプとBタイプ間のシフトが光強度に応じて起こっていると考えられる。つまり、光エネルギー電子伝達活性および過剰な光エネルギーの消散機構は日の出から正午ごろにむけて光強度の増加と共にAタイプからBタイプにシフトしていき、さらに正午ごろから夕暮れにむけて光強度の減少と共にBタイプからAタイプにシフトしていくといった変化が起こっているのではないだろうか。そして、光強度に応じ、AタイプとBタイプの相対的な量比が絶妙に調整されているのではないだろうか。さらに、本研究により過剰な光エネルギーの消散機構、つまりその最大活性が、光強度に合わせてごく短時間の内に変わる事が明らかになった。この変化はDD+DTの日周変

化と一致しない事から、これまで室内実験などで明らかになっているキサントフィルサイクルの調節機構だけで単純に理解する事はできない。過剰な光エネルギーの消散は、DD+DTの量だけではなく、その他の要因によっても調節されているという事を示唆するものである。この点については今後さらなる研究が必要であろう。

自然界において光合成生物はそれぞれに生存戦略があると考えられるが、海氷下の限られた環境ではより低コストで生活しつつも、より多くの光エネルギーを集める事が重要であろう。そのために、タンパク質や色素などの物質の代謝をなるべく抑え、限られた光エネルギーを効率的に光合成に利用する方法をアイスアルジーは備えていると言えるのではないだろうか。

#### 参考文献

- Gosselin, M., Levasseur, M., Wheeler, P. A., Horner, R. A., and Booth, B. C. (1997) New measurements of phytoplankton and ice algal production in the Arctic Ocean, *Deep Sea Res. II* 44, 1623–25.
- Hoshiai, T., and Fukuchi, M. (1981) Sea ice colored by ice algae in a lagoon, Lake Saroma, Hokkaido, Japan, *南極資料 (Antarct. Rec.)* 71, 113–120.
- Gosselin, M., Levasseur, M., Wheeler, P. A., Horner, R. A., and Booth, B. C. (1997) New measurements of phytoplankton and ice algal production in the Arctic Ocean, *Deep sea Res. II* 44, 1623–1625.
- 岸野 元彰 (2002) 海氷と光環境: 月刊海洋 海氷生態系 号外No. 30, pp 84–93, 海洋出版株式会社.
- Kudoh, S. (1993) Response of microalgal primary productivity to the reduction of sea ice coverage in Lake Saroma during winter, *Bull. Plankt. Soc. Japan* 39, 155–156.
- Suzuki, Y., Kudoh, S., and Takahashi, M. (1995) Photosynthetic characteristics of ice algae with special emphases on temperature and light conditions, *Proc. NIPR Symp. Polar Biol.* 8, 57–59.
- Suzuki, Y., Kudoh, S., and Takahashi, M. (1997) Photosynthetic characteristics of ice algae with special emphases on temperature and light conditions, *J. Mar. Syst.* 11, 111–122.
- Kudoh, S. (1995) Characteristics of ice algal community and the primary production in Saroma Ko lagoon and Resolute Passage, 1992, *Proc. NIPR Symp. Polar Biol.* 8, 54–56.
- Kudoh, S., Imura, S., and Kashino, Y. (2003) Xanthophyll cycle of ice algae on the sea ice bottom in Saroma Ko lagoon, Hokkaido, Japan, *Polar Biosci.* 16, 86–97.
- Macminn, A., Ryan, K., and Gademann, R. (2003) Diurnal changes in photosynthesis of Antarctic fast ice algal communities determined by pulse amplitude modulation fluorometry, *Mar. Biol.* 143, 359–367.
- Macminn, A., and Hattori, H. (2006) Effect of time of day on the recovery from light exposure in ice algae from Saroma Ko lagoon, Hokkaido, *Polar Biosci.* 20, 30–36.
- Kudoh, S., Robineau, B., Suzuki, Y., Fujiyoshi, Y., and Takahashi, M. (1997) Photosynthetic acclimation and the estimation of temperate ice algal primary production in Saroma-ko lagoon, Japan, *J. Mar. Syst.* 11, 93–109.
- Japan Meteorology Agency, Abashiri Meteorological Observatory, <http://www.sapporo-jma.go.jp/abashiri.html>.
- Kark, J. T. O. (1994) Rapid adaptation of the photosynthetic system: Light & Photosynthesis in Aquatic Ecosystems, pp 416–427, Cambridge University Press.
- Gugliemelli, L. A., Dutton, H. J., Jurisic, P. A., and Siegelman, H. W. (1981) Energy transfer in a light-harvesting carotenoid-Chlorophyll-Chlorophyll-a-protein of *Phaeodactylum tricorutum*, *Photochemistry and Photobiology* 33, 903–907.
- Olaizola, M., Bienfang, P. K., and Ziemann, D. A. (1992) Pigment analysis of phytoplankton during a subarctic spring bloom: xanthophylls cycling, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 158, 59–74.
- Olaizola, M., and Yamamoto, H. Y. (1994) Short-term response of the diadinoxanthin cycle and fluorescence yield to high irradiance in *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae), *J. Phyco.* 30, 606–612.
- Kashino, Y., and Kudoh, S. (2003) Concerted response of xanthophylls-cycle pigments in a marine diatom, *Chaetoceros gracilis*, to the shifts of light condition, *Phycol. Res.* 51, 168–172.

解説

植物の光情報受容体フィトクロムの細胞内シグナル伝達機構

九州大学 農学研究院

松下智直

1. はじめに

地に根を下ろし、基本的に機動性を欠く植物にとって、自らのおかれた環境にうまく適応していくことは、生存のために必須である。その際植物は、周囲の環境を把握するために、光を主な情報源として利用しており、その情報に応じて様々な生理反応を巧みに調節することにより、適応を図っている。つまり、植物にとって光は、「光合成の駆動力」の他に、周囲を知るための「情報」としての意味を持つわけだが、植物はこの「情報としての光」を捉えるための受容体を3種類、光合成色素とは別に進化させてきた。それが、赤色光・遠赤色光を受容するフィトクロムと、青色光を受容するクリプトクロム、フォトトロピンであり、それぞれがさらに分子ファミリーを形成している(図1)。

本稿では中でも、1959年の発見以来精力的に研究が続けられてきたが、最近になってもその作用機構についての定説が二転三転するという、長くて「複雑な」研究の歴史を持つフィトクロムについて、これまでの研究の流れを振り返ると共に、今後の課題についても

触れてみたい。また本稿では、研究の流れを把握することに重点を置いたため、ポイントとなる研究のみの紹介にとどめ、またその実験内容の詳細についても割愛した点、ご容赦願いたい。

2. フィトクロムとは

フィトクロムは植物界に広く認められる主要な光情報受容体であり、その分子は単量体分子量約12万の水溶性色素蛋白質で、タンパク質部分と、それに共有結合する発色団と呼ばれる、光を吸収するための色素分子から成る<sup>1)</sup>。フィトクロム分子の最大の特徴は、活性型である遠赤色光吸収型(Pfr型)と不活性型である赤色光吸収型(Pr型)の二つの立体構造の間を相互変換し、赤色光と遠赤色光によって分子機能が可逆的にオン・オフされるという点である(図2)。つまり、赤色光を吸収したフィトクロム分子は不活性型のPr型から活性型のPfr型に変換され、様々な光応答を引き起こす。逆に、遠赤色光を吸収すると、Pfr型はPr型に戻され、活性を失う。このようにして、フィトクロ



図1 植物の3つの光情報受容体

それぞれが分子ファミリーを形成し、植物は目的に応じてこれらを巧みに使い分けることによって、様々な生理反応を制御する。そしてこれら様々な光応答を通して、最終的に植物は自らの置かれた環境に置いて最大限の光合成量を獲得している。ここでは、シロイヌナズナでの例を示す。

ムは光に応答する分子スイッチとして働く。

植物はその生活環を通して、実に様々な光応答を示すが、その殆ど全てにフィトクロムは中心的な役割を果たしており、中でも、種子の光発芽、芽生えの緑化、避陰反応（他の植物の陰から抜け出ようとする反応）、花成における日長感受などは、典型的なフィトクロム反応として知られている<sup>2)</sup>。フィトクロムにより制御される光応答の多くでは、赤色光・遠赤色光がそれぞれ促進的・阻害的に働き、さらにその効果が可逆的であるが、それはフィトクロム分子が持つ上記の光可逆的立体構造変換という性質に基づいている。

このような非常にユニークな分光学的性質に加えて、黄化芽生え（暗所で育った芽生えのこと。いわゆる「もやし」）において蛋白質が非常に高レベルで蓄積することなどが幸いして、フィトクロムは赤・遠赤色光可逆的反応の光受容体として、1959年という植物の制御因子としては例外的に早い時期に発見された。そしてそこから、1980年代になって分子生物学的、分子遺伝学的手法が取り入れられるようになるまでは、黄化芽生えから大量に得られるフィトクロム蛋白質試料を用いて、分光学的解析と生化学的解析が精力的に行われ、興味深い知見が豊富に蓄積された。しかしながら、実は黄化芽生えにおいて高レベルに蓄積するのは、フィトクロム分子種の中でも極めて特殊な働きをするフィトクロム A (phyA) のみであり（後述）、したがってフィトクロム研究の初期に蓄積された知見の殆どは phyA に関するものであると考えられる。そしてこのことが、その後のフィトクロム研究の方向性を少なからず惑わすこととなる。

1980年代に入り、分子生物学や分子遺伝学の手法が導入されると、フィトクロム研究は一気に加速する。まずモデル植物であるシロイヌナズナにおいて、異なる遺伝子にコードされた phyA から phyE までの5つのフィトクロム分子種が存在することが示され、さらにそれぞれの分子種の変異体が単離され、その表現型解析から、分子種ごとの生理的な役割が明らかにされていった<sup>3)</sup>。その結果、phyA は他の分子種とは大きく異なる性質を持ち、フィトクロムとしては極めて特殊な働きをすることがわかった。

phyA 以外の全ての分子種 (phyB から phyE) が明暗にかかわらず一定のレベルで少量存在するのに対して、phyA だけは暗所で高レベルに蓄積し、ひとたび光を受

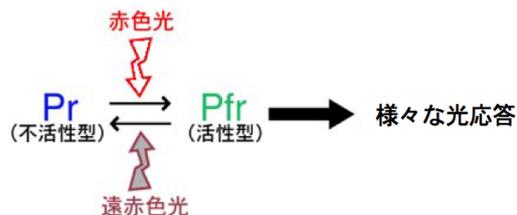


図2 フィトクロムは光に応答する分子スイッチとして働く

不活性型である Pr 型が赤色光を吸収することにより、活性型の Pfr 型に変換され、様々な光応答を引き起こす。逆に、Pfr 型が遠赤色光を吸収すると、Pr 型に戻され、活性を失う。

容して Pfr 型に変換されると速やかに分解される<sup>1)</sup>。したがって、phyA は明所での生育にはほとんど関わらず、実際に phyA を完全に欠く変異体は明所で異常を示さず、正常に生育する。また、phyB から phyE が典型的なフィトクロム反応である赤色光・遠赤色光可逆的な反応を制御するのに対して、phyA が制御する反応には赤色光・遠赤色光可逆性は見られない<sup>4)</sup>。黄化芽生えにおいて高レベルに蓄積した phyA は、極めて微弱な光に対する非常に感度の高い応答を担っており、この光応答は紫外光から遠赤色光までの全ての波長域の光によって誘導される。さらに黄化芽生えにおいて phyA は、連続遠赤色光に応じて擬似的な緑化を引き起こすことが知られているが、この現象の生理学的意義は不明である。このように phyA は、教科書的なフィトクロム応答からかけ離れた、非常に特殊な反応様式を持つことから、そのシグナル伝達機構は、それ以外の典型的なフィトクロム分子種 (phyB~phyE) のものとは大きく異なっていると考えられ、両者を決して混同せぬよう注意を払う必要がある。

### 3. フィトクロムの細胞内局在とシグナル伝達機構

フィトクロムの発見以来、そのシグナル伝達機構の解明はフィトクロム研究者の最大の目標であり、これまでの研究の歴史の中で様々な説が提唱・支持されてきたが、その定説は二転三転とし、いまだに解決されるに至っていない。とくに研究の初期において、フィトクロムのシグナル伝達研究が迷走することとなった大きな理由の一つが、生化学的研究に用いた試料が、フィトクロムとしては非常に特殊な phyA 蛋白質であったためだと考えられる (2 参照)。

このようにフィトクロムの作用機構についての統一像が得られず、混沌とした中で、その本質を捉えるためには、フィトクロムが細胞内のどこで働くかを理解することがとても重要である。フィトクロムの細胞内分布を調べる試みは、古くから数々行われてきたが、生化学的手法に頼らざるを得ない初期の研究において、研究者達はここでもやはり phyA 蛋白試料により惑わされることとなる。そしてそれら生化学的解析の結果や、フィトクロムが緩衝溶液中に容易に抽出されることなどから判断して、フィトクロムはもっぱら細胞質に存在するという考えが定説となった。

このような中、1994年に Sakamoto らによって、分子生物学的手法によるフィトクロムの細胞内分布の見直しが行われ、フィトクロムの最も主要な分子種である phyB 分子の C 末端側断片が、形質転換シロイヌナズナにおいて核移行活性を示すことが報告された<sup>5)</sup>。当初この結果は、従来の定説に囚われていた当時のフィトクロム研究者達の間では、なかなか受け入れられなかったが、その5年後に複数のグループから、形質転換植物にて発現させた全長 phyB と緑色蛍光蛋白質との融合蛋白質が、光依存的に細胞質から核内へと移行することが示され<sup>6,7)</sup>、一気にフィトクロムの核内での働きに注目が集まることとなった。その後、phyB に核移行シグナルもしくは核外移行シグナルを融合し、強制的に核内もしくは細胞質に局在させたときの生理活性を比較することにより、核内の phyB の方がより多くシグナルを伝達することが示され(筆者ら、未発表)、phyB がシグナルを伝達する主要な場は核内であることが確かめられた。

#### 4. フィトクロムの分子内構造と機能

あるシグナル伝達因子の作用機構を調べる際、そのポリペプチドのどの部分がシグナル伝達機能に直接関わっているのかを突き止め、その部分のアミノ酸配列から既知の機能モチーフを探すといった手法も大いに有効であると考えられる。

フィトクロムは生理的条件下ではホモ二量体として存在することが知られており、図3は二量体化したフィトクロム分子の模式図を示したものである。フィトクロム分子は、N 末端側領域と C 末端側領域の二つのドメインから成り、それぞれが独立に立体構造を保持して固有の機能を持つという点が大きな特徴である。N

末端側領域は、光を吸収するための発色団を結合し、光受容とそれに伴う立体構造変化に働く一方、C 末端側領域は二量体化に働く。さらに、C 末端側領域のアミノ酸配列上には、キナーゼドメインや PAS ドメインなどの、シグナル伝達に関与するモチーフが見出されるために、従来、フィトクロムはC末端側領域のキナーゼ活性によりシグナルを下流の因子に伝達すると考えられてきた。

さらに、フィトクロム分子の光受容能や二量体化能に影響を与えることなく、シグナル伝達力を低下させるようなミスセンス変異が、これまでの遺伝学的解析から数多く同定・報告されており、それらがC末端側領域内の小領域に集中することから<sup>8)</sup>、シグナル伝達において重要な役割を果たすのはC末端側領域であると、一層強く信じられてきた。

そしてこの考えに基づき、研究者達は挙ってフィトクロムの C 末端側領域断片を bait とした yeast two-hybrid スクリーニングを行い、C 末端側領域と直接相互作用する因子の単離を行った。そしてその結果、数々の新奇因子が同定されたが、なかでも bHLH 型の転写因子である PIF3 が同定されたことは<sup>9)</sup>、ほぼ同時に報告されたフィトクロムの核局在と相まって、ひととき大きな脚光を浴びることとなった。ここで、フィトクロムの C 末端側領域内の上記ミスセンス変異が PIF3 との結合を低下させることから<sup>9,10)</sup>、フィトクロム C 末端側領域をシグナル伝達ドメインとする説は更に支持され、定説となるに至った。PIF3 に関しては、後の 6 にて再び詳しく取り上げることとする。

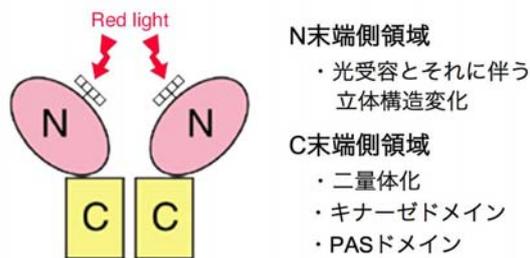


図3 二量体化したフィトクロム分子の模式図  
フィトクロムは生理的条件下にてホモ二量体として存在する。フィトクロム分子は、発色団を結合して光受容に働く N 末端側領域 (N) と、二量体化に働く C 末端側領域 (C) の、2つのドメインから成る。C にはさらに、キナーゼドメインや PAS ドメインといったシグナル伝達に関与するであろうモチーフが存在する。

この定説を誰もが信じて疑わないといった状況にあって、フィトクロムの分子内構造と機能についての最大の謎は、フィトクロムポリペプチドの中でシグナル伝達に十分な領域がまだ一つも見つかっていないということであった。形質転換植物にてC末端側領域を単独で発現させても、その植物は目立った表現型を何一つ示さない<sup>11)</sup>。

このような背景にあって、筆者らは偶然にも、最も主要なフィトクロム分子種である phyB の N 末端側領域断片を発現する形質転換植物にて、僅かながらも光シグナル伝達活性が観察されるという、非常に意外な結果を得た。そしてこの僅かなシグナル伝達活性を足がかりに、半信半疑でさらに解析を進めた結果、驚くべきことに、phyB の N 末端側領域を人工的に二量体化し、核移行シグナルの働きで強制的に核内に蓄積させると、C 末端側領域を完全に欠損しているにもかかわらず、phyB としての完全な機能を果たし、しかも全長 phyB 分子よりも 100 倍以上高い光感受性を示すことが判明した<sup>12)</sup>。

この結果から、フィトクロムはC末端側領域からではなく、N末端側領域からシグナルを伝達すること、そして、C末端側領域はシグナル伝達の過程に必要なばかりか、むしろそれに対して阻害的に働くことなどが示された(図4)。

それでは一体、上述のC末端側領域内のミスセンス変異は、どのようにしてフィトクロムのシグナル伝達に影響を及ぼしているのだろうか?そこでこの変異を全長 phyB に導入し、その細胞内局在とシグナル伝達活性の関係を形質転換植物を用いて解析したところ、変異を導入された phyB は核移行活性を失うこと、ここで核移行活性を外来の核移行シグナルを融合させることで補えば、変異型分子は核に移行し全く正常にシグナルを伝達できることなどが分かった<sup>12)</sup>。

以上の結果から、このC末端側領域内の変異は phyB の核移行能を低下させるが、シグナル伝達の過程には直接関与しないということが示され、phyB は N 末端側領域からシグナルを発するというモデルがさらに確かめられた。ではフィトクロムは核内にて N 末端側領域から、どのようなメカニズムでシグナルを発しているのだろうか?N末端側領域のアミノ酸配列上には、シグナル伝達や遺伝子発現制御に関与するような目立ったモチーフは見つからず、そのシグナル伝達機構は

不明である。

そこで筆者らは、遺伝学的手法を用いて、フィトクロムのN末端側領域内でシグナル発信に直接関与するアミノ酸残基を8個同定したところ、それらは興味深いことに、N末端側領域内の比較的小さな領域にホットスポットを形成した(筆者ら、未発表)。この小領域に相当する部分が、最近結晶構造の解かれたバクテリオフィトクロム DrBphP(細菌におけるフィトクロムの原型分子)のN末端側領域内断片において、タンパク質間相互作用に関与しうるPASドメインの構造を取ることが示されている<sup>13)</sup>。このことはフィトクロム分子がN末端側領域内のこの小領域を介して下流因子と相互作用し、シグナルを伝達する可能性を示唆する。今後、この小領域を bait とした yeast two-hybrid スクリーニングなどにより、フィトクロムのN末端側領域から発せられたシグナルを直接受け取るシグナル伝達因子の同定が期待される。

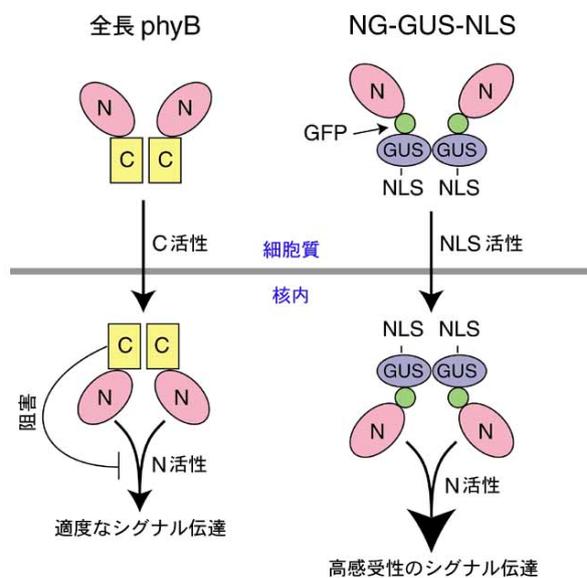


図4 文献12)によって明らかとなった phyB 分子の細胞内シグナル伝達のモデル図

NG-GUS-NLS とは、phyB の N 末端側領域 (N) に、マーカー蛋白質である GFP、二量体化に働く GUS、核移行シグナル (NLS) をこの順に融合させた人工蛋白質である。全長 phyB と NG-GUS-NLS は、それぞれ、C 末端側領域 (C) と NLS の活性により核内へ移行する。C もしくは GUS の働きにより二量体化された N は、核内で効率良くシグナルを伝達できる。全長 phyB では、核内の N によるシグナル伝達活性を C が阻害している。

## 5. フィトクロムのキナーゼ活性

以上の発見により、フィトクロムはC末端側領域のキナーゼ活性によりシグナルを伝達するという従来の常識が誤りであることが証明され、そのシグナル伝達機構について一から考え直す必要が生じた。ここでは、以前から議論の絶えないフィトクロムのキナーゼ活性について、見つめ直してみることにする。

実はフィトクロムのアミノ酸配列が解明される以前から、フィトクロムがキナーゼ活性をもつという考えは存在した。その根拠は、生化学的に精製したフィトクロム標品が蛋白質キナーゼ活性を持つという報告によるが<sup>14)</sup>、標品の純度に問題があり、他のキナーゼが精製過程で混入した可能性を排除できず、定説となるには至らなかった。その後、様々な植物種からフィトクロム遺伝子が単離され、そこから推定されるアミノ酸配列が比較・解析された結果、フィトクロムのC末端側領域に弱いながらもヒスチジンキナーゼドメインと相同性のあるアミノ酸配列が存在することが指摘された<sup>15)</sup>。さらに、酵母で発現させたオートムギ由来の組換え phyA 標品が試験管内にてキナーゼ活性を示すこと<sup>16)</sup>、その同じ標品が PKS1 などの他の蛋白質を試験管内でリン酸化することなどが報告され<sup>17)</sup>、フィトクロムがキナーゼ活性を持つと認められるようになった。しかしながら、この phyA 標品による PKS1 などのリン酸化の生理学的意義は不明である。また、少し違った見方をすると、フィトクロムのキナーゼ活性は、特定のごく限られた研究室においてのみ検出され、その際、常に同じオートムギ由来の phyA 標品が用いられていることから、この現象の再現性ならびに普遍性・一般性について、多少の疑問が残ることは否めない。また、どんなフィトクロム標品を使うにしても、他のキナーゼが精製過程で混入する可能性は排除しきれない点にも、留意する必要があるだろう。

そのような中、上記のように phyB がC末端側領域からではなくN末端側領域からシグナルを伝達することが実証され、これまでフィトクロムのシグナル伝達の实体であると信じられてきたC末端側領域のキナーゼ活性は、phyB のシグナル伝達に必要ないことが明確なかたちで示された。ここで、(1) phyA においてN末端側領域内にあるいくつかのセリン残基のリン酸化が、Pfr 型のシグナル伝達活性を脱感作させるのに働くことが示唆されている<sup>18,19)</sup>、(2) 筆者らの研究により

phyB のC末端側領域がN末端側領域のシグナル伝達活性を阻害することが示されている<sup>12)</sup>、以上2つの知見を考え合わせると、C末端側領域のキナーゼ活性は、自己リン酸化を通してフィトクロムのシグナル伝達をむしろ抑制し、脱感作させるために働くのではないかという可能性が考えられる。この点についての今後の解析が待たれる。

## 6. フィトクロムの核内でのシグナル伝達機構

フィトクロムが、核内に移行することと、転写因子である PIF3 と光依存的に結合することが、並行してほぼ同時期に報告されて以来、フィトクロムの核内での働きに関心が集まり、さらにちょうどその頃マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析が可能になったことも手伝って、フィトクロムによる核内での転写制御に焦点を当てた解析が精力的に進められた。そして、マイクロアレイ解析の結果、シロイヌナズナゲノム中の約1割もの遺伝子が、フィトクロムによる制御を直接ないし間接的に受けることが明らかとなった<sup>20,21)</sup>。

そこで次に問題となるのが、フィトクロムがこれらの遺伝子の発現をどのような分子機構で制御するのかという点であるが、この点を考える上で、やはりフィトクロムの相互作用因子である bHLH 型の転写因子 PIF3 の存在は、非常に興味深く、そのホモログの解析も含めて、この分野の研究者達の興味が一挙に集中することとなる。

既に上述の通り、PIF3 は当初、フィトクロムのC末端側領域に相互作用する因子として yeast two-hybrid スクリーニングによって単離されたが<sup>9)</sup>、のちにフィトクロムの全長もしくはN末端側領域と光依存的に結合することが示された<sup>10)</sup>。そして PIF3 を過剰発現する植物では赤色光に対する応答が強まり、逆に PIF3 の発現を抑えた植物では光応答が抑制されることから<sup>9)</sup>、PIF3 はフィトクロムのシグナル伝達経路において中心的な役割を果たす正のマスターレギュレーターであると考えられた(モデル1)。さらに、PIF3 がいくつかの光応答性遺伝子のプロモーター配列内に見出される G-box と呼ばれるコンセンサス配列に結合することや<sup>22)</sup>、G-box に結合した PIF3 に対してフィトクロムが光依存的に結合すること<sup>22)</sup>などが次々と明らかにされた。それらの知見から、フィトクロムは核内で PIF3 やそのホモログの転写因子を介して直接ターゲット遺

伝子に働きかけ、遺伝子の発現パターンを変化させることによって、その結果として最終的に様々な光応答を引き起こすというモデルが提唱された (モデル 2)。

しかし、その後の報告によって、当初の報告に間違いがあったことが指摘され、PIF3 はフィトクロムのシグナル伝達に対して抑制的に働く負の因子であることが判明した<sup>23)</sup>。またここで、PIF3 の機能を完全に欠損する変異体が暗所で光応答を引き起こすことはないため<sup>23)</sup>、PIF3 がフィトクロムの信号伝達経路において中心的な働きをするという上記のモデル 1 は否定された。

PIF3 ならびにそのホモログたち (これらを PIF と総称する) が、フィトクロムの信号経路上で負の因子として働くことが判明したことを受けて、上記のモデル 2 についても修正を施す必要が生じた。ここでさらに、PIF はフィトクロムとの相互作用により直接的にリン酸化され、それが目印となってユビキチン化され、最終的に 26S プロテアソームによる蛋白質分解を受けることが示された<sup>24)</sup>。以上の結果からモデル 2 を修正して、PIF は暗所にてターゲット遺伝子の発現を制御しているが、明所では活性化されたフィトクロムが PIF を蛋白分解に導き、その結果遺伝子の発現パターンが変化するという新たなモデルが考えられた (モデル 2-2)<sup>25)</sup>。ここで注意すべき点は、モデル 2 から 2-2 へ多少の変更点はあるものの、(1) フィトクロムは PIF を介して遺伝子発現を制御しているという点、(2) PIF はフィトクロムによる遺伝子発現制御を仲介することによって、光生理応答抑制に関与するという点、以上 2 点に関する主張は一切変わらないということである。

しかしながら最近、この 2 点のいずれをも真っ向から否定する新たな報告があり、フィトクロムのシグナル伝達における PIF の役割の重要性に疑問符がつけられることとなった。まず、PIF のポリペプチド上には、フィトクロムとの結合を担うドメインと、DNA との結合を担うドメインが、別々に存在しており、それらに変異を入れて、フィトクロムもしくは DNA との結合能を失わせ、植物で発現させたときの、光に応じた遺伝子発現制御能と、光生理応答を抑制する能力の変化をそれぞれ調べた。その結果、驚くべきことに、DNA に結合できない PIF は、遺伝子発現制御能を完全に失っていたが、光生理応答を抑制する能力に関しては全く正常であった<sup>26)</sup>。逆に、フィトクロムと結合できな

い PIF は、光応答を制御する能力を完全に失っていたが、ターゲット遺伝子の光依存的な遺伝子発現は全く正常であった<sup>26)</sup>。この結果は、PIF はフィトクロムによる光依存的な遺伝子発現制御には関与していないこと、そして PIF は遺伝子発現制御を介することなく光応答を阻害していることを意味している。では、PIF は一体どのようにしてフィトクロムによる光応答を阻害しているのだろうか？そこで光応答を観察する発生段階の植物において、フィトクロムの蛋白蓄積レベルが調べられ、光応答が抑制できたラインでのみフィトクロム蛋白量が減少していることが分かった<sup>26,27)</sup>。つまり PIF は、遺伝子発現制御を一切介さずに、フィトクロムと結合することによってその蛋白量を減少させ、光応答を低下させていることが明らかとなった。

## 7. 今後の課題

上記の研究の結果により、「フィトクロムがターゲット遺伝子の発現をどのような分子機構で光依存的に制御するのか」という問題は、白紙に戻ってしまった。まずこの現象に関わる新奇因子を同定することが今後の課題の一つであろう。もう一つ、フィトクロムのシグナル伝達機構における大きなブラックボックスは、フィトクロムによる遺伝子発現制御というイベントから、最終的な光応答に至るまでの間の経路である。ここに存在するのは、最も単純に考えれば、転写制御カスケードによる遺伝子ネットワークであろうが、もちろんこれだけでは説明が付かない可能性も十分に考えられる。いずれにせよ、こういった混沌とした状況を打開するためには、確かな足固めと、そこを基盤とした地道な努力が必要だろう。ようやく突き止められたフィトクロムの真のシグナル発信ドメインを手がかりに、光生理応答を丁寧に観察しながら、順遺伝学的解析をこつこつと進めていくのが、案外近道かもしれない。

## 参考文献

1. Furuya, M. (1993) Phytochromes: their molecular species, gene families, and functions, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 617-645.
2. Smith, H. (2000) Phytochromes and light signal perception by plants—an emerging synthesis, *Nature* 407, 585-591.

3. Whitelam, G. C., and Devlin, P. F. (1997) Roles of different phytochromes in *Arabidopsis* photomorphogenesis, *Plant Cell Environ.* 20, 752–758.
4. Shinomura, T., Nagatani, A., Hanzawa, H., Kubota, M., Watanabe, M., and Furuya, M. (1996) Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8129–8133.
5. Sakamoto, K., and Nagatani, A. (1996) Nuclear localization activity of phytochrome B, *Plant J.* 10, 859–868.
6. Yamaguchi, R., Nakamura, M., Mochizuki, N., Kay, S. A., and Nagatani, A. (1999) Light-dependent translocation of a phytochrome B:GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis*, *J. Cell Biol.* 145, 437–445.
7. Kircher, S., Kozma-Bognar, L., Kim, L., Adam, E., Harter, K., Schäfer, E., and Nagy, F. (1999) Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B, *Plant Cell* 11, 1445–1456.
8. Quail, P. H., Boylan, M. T., Parks, B. M., Short, T. W., Xu, Y., and Wagner, D. (1995) Phytochromes: photosensory perception and signal transduction, *Science* 268, 675–680.
9. Ni, M., Tepperman, J. M., and Quail, P. H. (1998) PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein, *Cell* 95, 657–667.
10. Ni, M., Tepperman, J. M., and Quail, P. H. (1999) Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light, *Nature* 400, 781–784.
11. Wagner, D., Koloszvari, M., and Quail, P. H. (1996) Two small spatially distinct regions of Phytochrome B are required for efficient signaling rates, *Plant Cell* 8, 859–871.
12. Matsushita, T., Mochizuki, N., and Nagatani, A. (2003) Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus, *Nature* 424, 571–574.
13. Wagner, J. R., Brunzelle, J. S., Forest, K. T., and Vierstra, R. D. (2005) A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome, *Nature* 438, 325–331.
14. Wong, Y. S., McMichael, R. W., and Lagarias, J. C. (1989) Properties of a Polyclonal-Stimulated Protein Kinase Associated with Purified Avena Phytochrome, *Plant Physiol.* 91, 709–718.
15. Schneider-Poetsch, H. A., Braun, B., Marx, S., and Schaumburg, A. (1991) Phytochromes and bacterial sensor proteins are related by structural and functional homologies. Hypothesis on phytochrome-mediated signal-transduction, *FEBS Lett.* 281, 245–249.
16. Yeh, K. C., and Lagarias, J. C. (1998) Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13976–13981.
17. Fankhauser, C., Yeh, K. C., Lagarias, J. C., Zhang, H., Elich, T. D., and Chory, J. (1999) PKS1, a substrate phosphorylated by phytochromes that modulates light signaling in *Arabidopsis*, *Science* 284, 1539–1541.
18. Stockhaus, J., Nagatani, A., Halfter, U., Kay, S., Furuya, M., and Chua, N. H. (1992) Serine-to-alanine substitutions at the amino-terminal region of phytochrome A result in an increase in biological activity, *Genes Dev.* 6, 2364–2372.
19. Park, C.-M., Bhoo, S.-H., and Song, P.-S. (2000) Inter-domain crosstalk in the phytochrome molecules, *Semin. Cell Dev. Biol.* 11, 449–456.
20. Quail, P. H. (2007) Phytochrome-regulated Gene Expression, *J. Integrative Plant Biol.* 49, 11–20.
21. Tepperman, J. M., Hwang, Y.-S., and Quail, P. H. (2006) phyA dominates in transduction of red-light signals to rapidly-responding genes at the initiation of *Arabidopsis* seedling deetiolation, *Plant J.* 48, 728–742.
22. Martinez-Garcia, J. F., Huq, E., and Quail, P. H. (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor, *Science* 288, 859–863.
23. Kim, J. Y., Yi, H. K., Choi, G., Shin, B., Song, P. S., and Choi, G. S. (2003) Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction, *Plant Cell* 15, 2399–2407.

24. Al-Sady, B., Ni, W., Kircher, S., Schafer, E., and Quail, P. H. (2006) Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation as a prelude to proteasome-mediated degradation, *Mol. Cell* 23, 439–446.
25. Huq, E. (2007) Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks, *Trends Plant Sci.* 12, 514–521.
26. Al-Sady, B., Kikis, E. A., Monte, E., and Quail, P. H. (2008) Mechanistic duality of transcription factor function in phytochrome signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 2232–2237.
27. Leivar, P., Monte, E., Al-Sady, B., Carle, C., Storer, A., Alonso, J. M., Ecker, J. R., and Quail, P. H. (2008) The Arabidopsis Phytochrome-Interacting Factor PIF7, Together with PIF3 and PIF4, Regulates Responses to Prolonged Red Light by Modulating phyB Levels, *Plant Cell* 20, 337–352.

## 研究紹介

### バクテリオクロロフィル生合成系のニトロゲナーゼ類似酵素の生化学的解析

名古屋大学 大学院生命農学研究科

野亦次郎

#### はじめに

クロロフィル、バクテリオクロロフィルは光合成に必須の色素であり、光化学系や光捕集系を形成し、光の吸収や電子の移動を引き起こすなど、光エネルギーを化学エネルギーに変換する上で重要な役割を担う。これまでに、クロロフィル、バクテリオクロロフィルは合わせて 100 種類以上が知られている<sup>1)</sup>。クロロフィルおよびバクテリオクロロフィルの光吸収特性は、閉環状テトラピロールからなる主要環構造により大きく影響される(図1)。これまでに発見されたクロロフィルとバクテリオクロロフィルの環構造は、ポルフィリン環、クロリン環、バクテリオクロリン環のいずれかに分類される。ポルフィリン環と比較すると、クロリン環は D 環の炭素間二重結合が還元されており、バクテリオクロリン環は D 環と B 環の両方が還元されている。各環構造を持った代表的な光合成色素として、プロトクロロフィリド (Pchl<sub>id</sub>e)、クロロフィル a (Chl a)、バクテリオクロロフィル a (BChl a) が、それぞれ挙げられる。アセトン中での Q<sub>y</sub> ピークの位置を比較すると、Pchl<sub>id</sub>e は 627nm、Chl a は 665nm、BChl a

は 779nm に各々吸収極大を示し、環構造の還元が進むにつれて、より長波長の光を吸収することがわかる。これら光合成色素の光吸収特性は、光合成生物が生育できる光環境や、酸素発生型/非発生型という光合成のタイプを決定づけている。したがって、ポルフィリン環からのクロリン環、バクテリオクロリン環への変換は、生物学的にも生化学的にも非常に重要な反応である。

#### 2つのニトロゲナーゼ類似酵素

これまでの紅色非硫黄細菌 *Rhodobacter capsulatus* を用いた研究から、BChl a の生合成経路において2つのニトロゲナーゼ類似酵素がこれらの環構造の変換を触媒することが明らかとなった。1つは光非依存型プロトクロロフィリド還元酵素(DPOR; Dark-operative Pchl<sub>id</sub>e oxidoreductase)であり、Pchl<sub>id</sub>e の D 環の炭素間二重結合を立体特異的に還元し、クロリン環化合物であるクロロフィリド a (Chl<sub>id</sub>e a) を生成する<sup>2)</sup>。Chl<sub>id</sub>e a は引き続き、もう1つのニトロゲナーゼ類似酵素、クロロフィリド a 還元酵素 (COR; Chl<sub>id</sub>e a

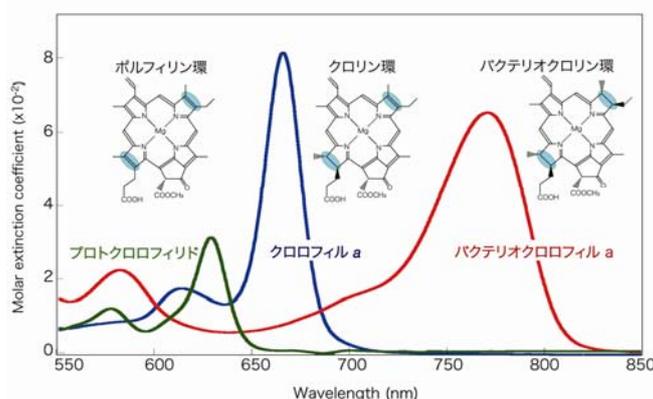


図1 クロロフィルおよびバクテリオクロロフィルの環構造は、ポルフィリン環、クロリン環、バクテリオクロリン環の3種類に分類される。各環構造を持つ代表的な光合成色素、プロトクロロフィリド (Pchl<sub>id</sub>e)、クロロフィル a (Chl a)、バクテリオクロロフィル a (BChl a)、Q<sub>y</sub> ピーク周辺の吸収スペクトルを示す。環構造の還元が進むにつれ、より長波長の光を吸収するようになることがわかる。

oxidoreductase) によって B 環が還元され、バクテリオクロリン環 (3-ビニルバクテリオクロロフィリド *a*) に変換される<sup>3)</sup>。DPOR の3つのサブユニット BchL、BchN および BchB と、COR の3つのサブユニット BchX、BchY および BchZ は、ニトロゲナーゼの NifH、NifD および NifK と各々、有意な相同性を示すことから<sup>2,4)</sup>、ポルフィリン環の D 環とクロリン環の B 環はニトロゲナーゼと共通した反応機構で還元されることが示唆されていた。

ニトロゲナーゼは、分子状窒素(N<sub>2</sub>)をアンモニアに還元する反応を触媒する複雑な金属酵素であり、Fe-蛋白質と MoFe-蛋白質と呼ばれる容易に分離可能な2つのコンポーネントにより構成される。Fe-蛋白質は NifH 蛋白質の二量体からなり、各々の NifH 蛋白質から2つずつ提供されるシステイン残基によって [4Fe-4S]型の鉄硫黄クラスターを保持している。窒素は MoFe-蛋白質上でアンモニアへと還元されるが、Fe-蛋白質はこの還元反応に必要な電子を、ATP 依存的に MoFe-蛋白質へ供給する。電子を MoFe-蛋白質に渡して酸化された Fe-蛋白質は、フェレドキシンやフラボドキシニンによって再び還元される<sup>5)</sup>。BchL および BchX 蛋白質は NifH 蛋白質とおおよそ30%の同一性を示し、ATP 結合モチーフや、[4Fe-4S]型の鉄硫黄クラス

ターの保持に関わる2つのシステイン残基を保存している。それゆえ、BchL は、Pchlide 還元反応を行う BchN-BchB へと電子を渡す、また同様に BchX も Chlide *a* 還元反応を行なう BchY-BchZ へ電子を供給する、各々特異的な ATP 依存型還元酵素として機能する、という仮説が立てられていた<sup>2,6,7)</sup>。

DPOR および COR を構成するもう2つのサブユニット蛋白質、BchN と BchB および BchY と BchZ はニトロゲナーゼの NifD、NifK 蛋白質のどちらとも20~25%の相同性を示す。BchL や BchX と NifH との間での類似性と比べると低い値ではあるが、金属中心の保持に関わる NifD の3個のシステインと NifK の1個のシステインが保存されている<sup>2,6)</sup>。NifD、NifK 蛋白質からなるヘテロ四量体は、対をなした2種類の(合計4個)複雑な金属中心を持った、ニトロゲナーゼの触媒コンポーネント、MoFe-蛋白質を形成する。金属中心の1つは、[8Fe-7S]から構成される“P-cluster”であり、もう1つは[1Mo-7Fe-9S-X-ホモクエン酸]から構成される(X=未同定の元素,7)“FeMo-cofactor”である<sup>8)</sup>。P-cluster は、Fe-蛋白質から窒素の還元が行われる FeMo-cofactor へと電子を仲介する役割を担うと考えられている(図2)。

以前の研究では、*R. capsulatus* からの DPOR の構成

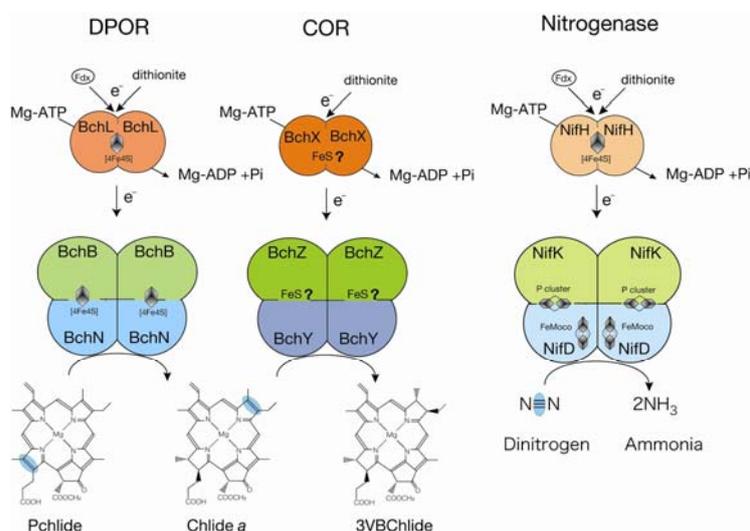


図2 ニトロゲナーゼ、DPOR、COR の構造モデル。ニトロゲナーゼの還元コンポーネントである Fe-蛋白質 ((NifH)<sub>2</sub> ホモ二量体)は[4Fe-4S]型の鉄硫黄クラスターを保持し、触媒コンポーネントである MoFe-蛋白質 ((NifD)<sub>2</sub>(NifK)<sub>2</sub> ヘテロ四量体)はP-cluster([8Fe-7S])および FeMo-cofactor (FeMoco;[Mo-7Fe-9S-X-homocitrate])と呼ばれるユニークな金属中心を持つ。ニトロゲナーゼは分子状窒素(N<sub>2</sub>)の三重結合を還元し、アンモニアを生成する反応を触媒する。DPOR は Pchlide の D 環の炭素間二重結合を還元し、Chlide を生成する。COR は Chlide の B 環の炭素間二重結合を還元し、3VBChlide を生成する。本研究では DPOR の還元コンポーネントである L-蛋白質((BchL)<sub>2</sub> ホモ二量体)と触媒コンポーネントである NB-蛋白質((BchN)<sub>2</sub>(BchB)<sub>2</sub> ヘテロ四量体)がいずれも[4Fe-4S]型の鉄硫黄クラスターを保持することを明らかにした。

コンポーネントの精製とそれらによる DPOR 活性の再構成系について報告がなされていた<sup>9)</sup>。それによると、DPOR は 2 つのコンポーネント、L-蛋白質(BchL)と NB-蛋白質(BchN-BchB 複合体)から構成され、DPOR 活性は両コンポーネントに加え ATP と還元剤(ジチオナイト)に依存することが示されていた。ニトロゲナーゼとのアミノ酸配列の相同性および機能モチーフの保存に基づいて、L-蛋白質は ATP に依存した還元コンポーネントとして機能し、Pchlide 還元触媒部位を提供する触媒コンポーネント NB-蛋白質へと電子を供給することが示唆されていた。しかし、更なる生化学的解析に十分な量を精製することは困難であり、新たな大量発現系と迅速な蛋白質の精製が求められた。そこで私は、*R. capsulatus* において、解析に必要な充分量の精製蛋白質を簡便かつ効率よく得るために、新たなアフィニータグ(6xHN タグ、または Strep タグ)を付加した L-蛋白質および NB-蛋白質の大量発現系を構築した<sup>10,11)</sup>。また、ニトロゲナーゼは著しく酸素感受性であることから、DPOR も酸素によって容易に不活化されることが推測された。そこで、各蛋白質を嫌気状態に保つため、嫌気チャンパー(図 3)を用いることで、さらなる DPOR コンポーネントの生化学的解析を行なった。

### L-蛋白質の生化学的解析

嫌気条件下、ジチオナイト存在下で精製した L-蛋白質の吸収スペクトルを測定したところ、390 nm から 650 nm にかけてなだらかなピークを示し、際立ったピークは見られなかった(図 4 A trace a)。しかし短時間



図 3 嫌気チャンパー。この中は窒素、水素(1%)、二酸化炭素(5%)で充填されており、O<sub>2</sub> レベルが 1ppm 以下という嫌気状態が保たれている。DPOR、COR はニトロゲナーゼ同様、酸素感受性の酵素であるため、粗抽出液の調製、蛋白質の精製、活性測定など全ての操作をこの中で行なう。

空気に曝すと、およそ 410 nm を頂点とする吸収スペクトルの盛り上がりが見られた。(図 4 A trace b)。これらのスペクトルの特徴と変化は、様々な生物のニトロゲナーゼの Fe-蛋白質と酷似しており、L-蛋白質が Fe-蛋白質と同様の金属中心を持つことが示唆される<sup>12,13)</sup>。さらに、この金属中心の性質を調べるため、還元型の L-蛋白質の EPR 測定を行った(図 4 B)。L-蛋白質は、[4Fe-4S]型の鉄硫黄クラスターに特有のシグナル  $g=2.03, 1.94, 1.92$  を示した。これらの  $g$  値は、様々なニトロゲナーゼの Fe-蛋白質とよく一致した。さらに、L-蛋白質の金属および硫黄定量を行った(表 1)ところ、Fe のみが有意な量検出された。L-蛋白質の酸素感受性を調べたところ、半減期約 20 秒で失活することがわかった(図 4 C)。ゲルろ過の挙動から BchL が二量体であることが確認されている<sup>10)</sup>ので、以上の

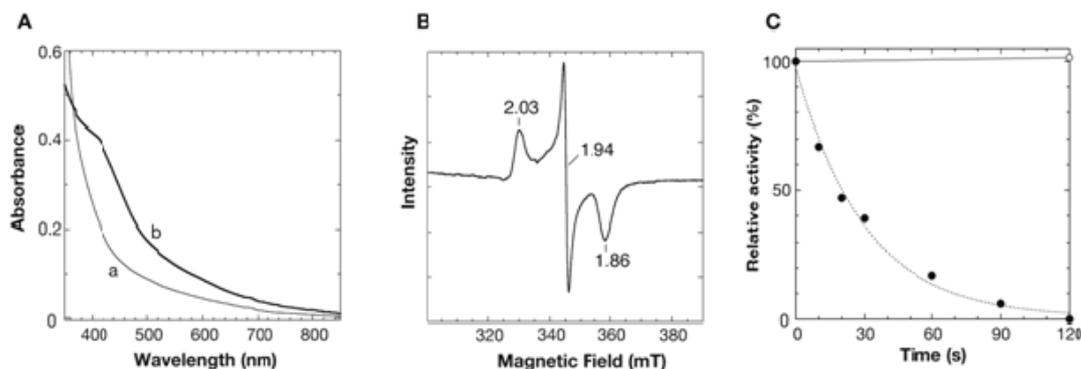


図 4 (A) 還元型 (trace a) および酸化型 (trace b) の L-蛋白質の吸収スペクトル。(B) 還元型 L-蛋白質の EPR スペクトル。グラフ中の数値は  $g$  値を表す。(C) L-蛋白質の酸素感受性の検討(黒丸)。白い丸は対照実験として空気に曝していない L-蛋白質の活性を測定した。

結果から、L-蛋白質はニトロゲナーゼの Fe-蛋白質と同様に、酸素感受性の[4Fe-4S]型の鉄硫黄クラスターを一つ持つと結論した<sup>11)</sup>。

**NB-蛋白質の生化学的解析**

*R. capsulatus* の大量発現株から精製した NB-蛋白質は明るい緑色を呈しており、その特徴的な吸収スペクトルから Pchl<sub>id</sub>e を結合していると考えられる。遊離の Pchl<sub>id</sub>e と吸収スペクトルを比較すると、NB-蛋白質と結合した Pchl<sub>id</sub>e では、Soret、Qx、Qy ピークの吸収極大がいずれも長波長側へとシフトしていた。とくに Soret 吸収極大が 10 nm と大きく長波長にシフトしていた。これは、別の Pchl<sub>id</sub>e 結合蛋白質である光依存型 Pchl<sub>id</sub>e 還元酵素に結合した Pchl<sub>id</sub>e では顕著な長波長シフトが Qy ピークに認められることと、対照的である。NB-蛋白質の Pchl<sub>id</sub>e 結合容量を調べたところ、NB-蛋白質 1 分子あたり 1 分子の Pchl<sub>id</sub>e を結合していることが明らかとなった。NB-蛋白質に結合している

Pchl<sub>id</sub>e は L-蛋白質と Mg<sup>2+</sup>、ATP、還元力の供給で速やかに (3 秒以内) Chl<sub>id</sub>e a へと変換された。これらの性質は、NB-蛋白質が DPOR の触媒コンポーネントであるという考えと矛盾しない。次に、NB-蛋白質の持つ金属中心の種類を調べるため EPR スペクトルの測定を行なった。ジチオナイトによる還元条件下で、EPR シグナルは検出されなかった (図 5 B 青)。そこで、ジチオナイト存在下で、微量の L-蛋白質と Mg-ATP を添加しターンオーバー条件におくことにより、g=1.94 と 1.92 の弱いシグナルを観測することができた (図 5 B 赤)。この EPR スペクトルは、2 つの [4Fe-4S] 型の鉄硫黄クラスターを持つ典型的なフェレドキシン (例えば *R. capsulatus* の Fdx I)<sup>14,15)</sup> の EPR スペクトルと類似している。NB-蛋白質に含まれる金属の定量を行ったところ、Fe のみが有意な量検出された (表 1)。また、酸遊離性の硫黄含量は Fe とほぼ同じレベルであった。別にゲルろ過での挙動から NB-蛋白質が (BchN)<sub>2</sub>(BchB)<sub>2</sub>-ヘテロ四量体から成ることが確認され

表 1 L-蛋白質、NB-蛋白質の金属および硫黄の定量。数値は各蛋白質 (L-蛋白質は(BchL)<sub>2</sub>-二量体、NB-蛋白質は(BchN)<sub>2</sub>(BchB)<sub>2</sub>-ヘテロ四量体) 1 mol あたりに含まれる個数(mol)を表す。  
 ND: not detected.  
 \*酸遊離性硫黄の定量は Timcenko らの方法に従って行なった<sup>17)</sup>。

	Co	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	V	Zn	S*
L-protein	ND	0.244	2.53	0.131	ND	0.067	0.209	0.031	3.1
NB-protein	ND	ND	7.23	0.116	ND	0.235	ND	0.023	7.2

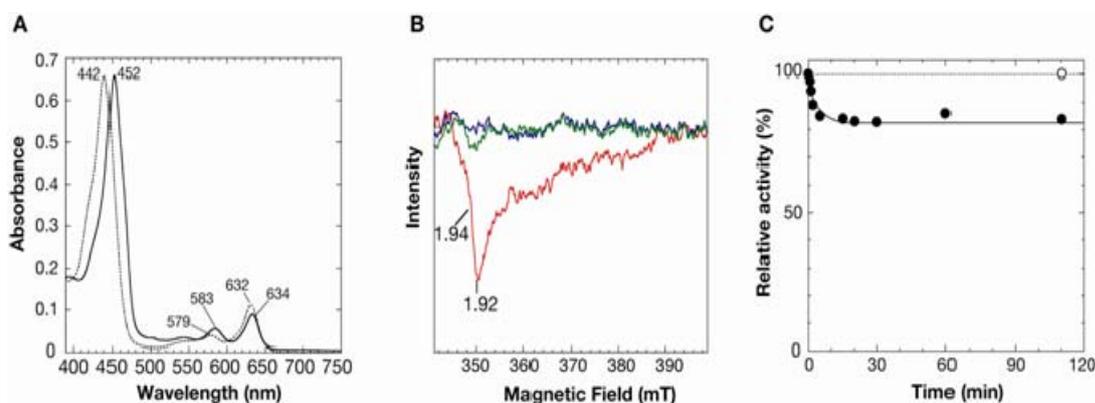


図 5 (A) NB-蛋白質(実線)と遊離の Pchl<sub>id</sub>e(点線)の吸収スペクトル。(B) NB-蛋白質の EPR スペクトル。グラフ中の数値は g 値を表す。ジチオナイト存在下(青)と L-蛋白質、Mg、ATP 添加後(赤)および L-蛋白質のみ(緑)のスペクトル。(C) NB-蛋白質の酸素感受性の検討 (黒丸)。白い丸は対照実験として空気に曝していない NB-蛋白質の活性を測定した。

ている<sup>10)</sup>。従ってこれらの結果は、NB-蛋白質当たり2つの[4Fe-4S]型鉄硫黄クラスターが存在することを示唆している。NB-蛋白質の酸素感受性を調べたところ、空気に曝したNB-蛋白質はわずかに活性が低下したものの、2時間経っても80%の活性を維持しており、NB-蛋白質は酸素に対し安定であることが明らかとなった(図5C)。以上から、DPORのNB-蛋白質はニトロゲナーゼのMoFe-蛋白質と同様に基質の還元を行なう触媒コンポーネントと言う点で共通しているが、P-clusterやFeMo-co factorといった複雑な金属中心ではなく、酸素に耐性のある[4Fe-4S]型の鉄硫黄クラスターを保持しており、ニトロゲナーゼのMoFe-蛋白質とは異なる性質を持つことが明らかになった<sup>16)</sup>。

以上のように、DPORはニトロゲナーゼと、ある部分では共通した複合体構造と反応機構をもつが、特に触媒コンポーネントには独自の構造と金属中心をもつことが明らかとなった。還元コンポーネントであるL-蛋白質は、金属中心、酸素感受性など、多くの点でFe-蛋白質とよく似ていた。一方、NB-蛋白質は金属中心、酸素感受性においてMoFe-蛋白質とは異なる性質を示した。一次構造の類似性から、DPOR、COR、ニトロゲナーゼは進化的起源を同じくしており、共通の祖先酵素から分岐したと考えられている<sup>2)</sup>。NB-蛋白質がMoFe-蛋白質に比ベシンプルな金属中心を持つことから、DPORは共通祖先酵素の性質を直接引き継いでいるのかもしれない。MoFe-蛋白質はその進化の過程でN<sub>2</sub>還元を行なうためにP-clusterとFeMo-co factorという独自の金属中心を持つように独自の進化を遂げてきたと考えられる。NB-蛋白質の系統ではポルフィリンD環とクロリンB環を区別するような基質特異性を獲得し、各々NB-蛋白質とYZ-蛋白質となり、現在のBChl *a*の生合成系の最終段階を担うようになったと考えられる。今後はDPOR、COR、ニトロゲナーゼの比較生化学を行ない、MoFe-蛋白質との共通点、相違点の構造的基盤に迫りたい。

#### 謝辞

本研究は名古屋大学生命農学研究科の藤田祐一准教授のもとで行なわれました。EPRスペクトルの測定は神奈川大学理学部の井上和仁教授、北島正治さん、小川拓郎さんとの共同研究により行なわれました。COR

の反応生成物3-ビニルバクテリオクロロフィリド *a*の同定は立命館大学の民秋均教授、溝口正講師との共同研究により行なわれました。また、金属定量は名古屋大学大学院生命農学研究科の渡辺彰准教授と宮本悦子さんの御協力を頂きました。本研究は、日本学術振興会のサポートを得て行なわれたものです。皆様に、深く感謝を致します。

#### 参考文献

1. Scheer, H. (2006) An overview of chlorophylls and Bacteriochlorophylls: biochemistry, biophysics, functions and applications, in *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications* (Grimm, B., Porra, R. J., Rüdiger, W., and Scheer, H., Eds.) pp 1–26, Springer, Dordrecht.
2. Fujita, Y., and Bauer, C. E. (2003) The light-independent protochlorophyllide reductase: a nitrogenase-like enzyme catalyzing a key reaction for greening in the dark, in *Chlorophylls and Bilins: Biosynthesis, Synthesis, and Degradation* (Kadish, K. M., Smith, K. M., and Guilard, R., Eds.), *Porphyrim Handbook*, vol. 13, pp 109–156, Academic Press, San Diego.
3. Nomata, J., Mizoguchi, T., Tamiaki, H., and Fujita, Y. (2006) A second nitrogenase-like enzyme for bacteriochlorophyll biosynthesis: Reconstitution of chlorophyllide *a* reductase with purified X-protein (BchX) and YZ-protein (BchY-BchZ) from *Rhodobacter capsulatus*, *J. Biol. Chem.* 281, 15021–15028.
4. Burke, D. H., Alberti, M., and Hearst, J. E. (1993) The *Rhodobacter capsulatus* chlorin reductase-encoding locus, *bchA*, consists of three genes, *bchX*, *bchY*, and *bchZ*, *J. Bacteriol.* 175, 2407–2413.
5. Thorneley, R. N. F., and Lowe, D. J. (1985) Kinetics and mechanism of the nitrogenase enzyme system, in *Molybdenum Enzymes* (Spiro, T. G. Ed.) pp 221–284, Wiley-Intersciences, New York.
6. Fujita, Y. (1996) Protochlorophyllide reduction: a key step in the greening of plants, *Plant Cell Physiol.* 37, 411–421.
7. Armstrong, G. A. (1998) Greening in the dark: light-independent chlorophyll biosynthesis from

- anoxygenic photosynthetic bacteria to gymnosperms, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 43, 87–100.
8. Igarashi, R. Y., and Seefeldt, L. C. (2003) Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38, 351–384.
  9. Fujita, Y., and Bauer, C. E. (2000) Reconstitution of light-independent protochlorophyllide reductase from purified BchL and BchN-BchB subunits. In vitro confirmation of nitrogenase-like features of a bacteriochlorophyll biosynthetic enzyme, *J. Biol. Chem.* 275, 23583–23588.
  10. Nomata, J., Swem, L. R., Bauer, C. E., and Fujita, Y. (2005) Overexpression and characterization of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus*, *Biochim. Biophys. Acta* 1708, 229–237.
  11. Nomata, J., Kitashima, M., Inoue, K., and Fujita, Y. (2006) Nitrogenase Fe protein-like Fe-S cluster is conserved in L-protein (BchL) of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus*, *FEBS Lett.* 580, 6151–6154.
  12. Eady, R. R., Smith, B. E., Cook, K. A., and Postgate, J. R. (1972) Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*: Purification and properties of the component proteins, *Biochem. J.* 128, 655–675.
  13. Shah, V. K., and Brill, W. J. (1973) Nitrogenase IV. Simple method of purification to homogeneity of nitrogenase components from *Azotobacter vinelandii*, *Biochim. Biophys. Acta* 305, 445–454.
  14. Saeki, K., Suetsugu, Y., Tokuda, K., Miyatake, Y., Young, D. A., Marrs, B. L., and Matsubara, H. (1991) Genetic analysis of functional differences among distinct ferredoxins in *Rhodobacter capsulatus*, *J. Biol. Chem.* 266, 12889–12895.
  15. Naud, I., Meyer, C., David, L., Breton, J., Gaillard, J., and Jouanneau, Y. (1996) Identification of residues of *Rhodobacter capsulatus* ferredoxin I important for its interaction with nitrogenase, *Eur. J. Biochem.* 237, 399–405.
  16. Nomata, J., Ogawa, T., Kitashima, M., Inoue, K., and Fujita, Y. (2008) NB-protein (BchN-BchB) of dark-operative protochlorophyllide reductase is the catalytic component containing oxygen-tolerant Fe-S clusters, *FEBS Lett.* 582, 1346–1350.
  17. Timcenko, L., and Kimura, T. (1979) Liberation of labile sulfur from ferredoxins by alkaline zinc reagent: an appraisal of the methylene blue method, *Anal. Biochem.* 95, 452–457.

## 集会案内

---

# 光合成の色素系と反応中心に関するセミナーXVI

光合成の光反応系に関して、物理学、化学、生物学を融合した討論を行います。また、光合成生物、光化学反応系の進化に関する事項についても討論いたします。

### 内容：

1. 初習者のための基礎講座（講義）
2. 討論
3. 口頭発表（討論を含めて一人15分を予定）
4. ポスター発表（各自、図1枚を使い3分間以内の口頭発表を行う）

今年度は、地球温暖化が叫ばれている状況下において、現状把握、問題点の整理と対応策、光合成研究者が果たすべき役割など、について講義や討論を企画しています。

**日時：** 平成20年6月14日（土）午後1時から6月15日（日）午後4時まで

**場所：** 京都大学 人間・環境学研究科 地下講義室 (23A、23B 室)

**発表申し込み締め切り（予定）：** 平成20年6月5日（木）

**参加申し込み締め切り（予定）：** 平成20年6月10日（火）

**参加費：** (6月14日の懇親会費、6月15日の昼食代を含む)

一般 5,000 円（予定）

学生 3,000 円（予定）

**問い合わせ先：** 京都大学大学院地球環境学堂

三室 守

e-mail address: [mamo-mi@mm1.mbox.media.kyoto-u.ac.jp](mailto:mamo-mi@mm1.mbox.media.kyoto-u.ac.jp)

---

---

## 新刊図書

---

### **Biophysical Techniques in Photosynthesis**

#### **Volume II**

#### **Series: Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol. 26**

Aartsma, Thijs J.; Matysik, Jorg (Eds.)

Springer, 2008, 520 p., Hardcover

ISBN: 978-1-4020-8249-8

<http://www.springer.com/life+sci/plant+sciences/book/978-1-4020-8249-8>

### **Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms**

#### **Series: Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol. 27**

Hell, R.; Dahl, C.; Knaff, D.; Leustek, Th. (Eds.)

Springer, 2008, Approx. 550 p., Hardcover

ISBN: 978-1-4020-6862-1

<http://www.springer.com/life+sci/plant+sciences/book/978-1-4020-6862-1>

### **Photobiology: The Science of Life and Light**

Bjorn, Lars Olof (Ed.)

Springer-Verlag

2nd ed., 2008, 684 p., Hardcover

ISBN: 978-0-387-72654-0

<http://www.springer.com/life+sci/plant+sciences/book/978-0-387-72654-0>

\*\*\* Information \*\*\*

事務局からのお知らせ

★入会案内

本会へ入会を希望される方は、会費（個人会員年会費：¥1,500、賛助法人会員年会費：¥50,000）を郵便振替（加入者名：日本光合成研究会、口座番号：00140-3-730290）にて送金の上、次ページの申し込み用紙、または電子メールにて、氏名、所属、住所、電話番号、ファックス番号、電子メールアドレス、入会希望年を事務局までお知らせください。

## 記事募集

日本光合成研究会では、会報に掲載する記事を会員の皆様より募集しています。募集する記事の項目は以下の通りです。

- トピックス：光合成及び関連分野での纏まりのよいトピックス的な記事。
- 解説：光合成に関連するテーマでの解説記事。
- 研究紹介：最近の研究結果の紹介。特に、若手、博士研究員の方々からの投稿を期待しています。
- 会議報告：国際会議、シンポジウムなどの簡単な報告記事。
- 集会案内：研究会、セミナー等の案内。
- 求人：博士研究員、専門技術員等の募集記事。
- 新刊図書：光合成関係、または会員が執筆・編集した新刊図書の紹介。書評も歓迎いたします。

記事の掲載を希望される方は、会報編集担当、野口（[tnoguchi@ims.tsukuba.ac.jp](mailto:tnoguchi@ims.tsukuba.ac.jp)）まで御連絡下さい。

## 日本光合成研究会会員入会申込書

平成 年 月 日

日本光合成研究会御中

私は日本光合成研究会の趣旨に賛同し、平成 年より会員として入会を申し込みます。

[ ]内に会員名簿上での公開承諾項目に○印をつけてください

[ ] 氏名 (漢字) (必須)

氏名 (ひらがな)

氏名 (ローマ字)

[ ] 所属

[ ] 住所 1

〒

[ ] 住所 2 (自宅の方または会報送付先が所属と異なる場合にのみ記入)

〒

[ ] TEL1

[ ] TEL2 (必要な方のみ記入)

[ ] FAX

[ ] E-mail

個人会員年会費 1,500 円 (会報、研究会、ワークショップなどの案内を含む)

賛助法人会員年会費 50,000 円 (上記と会報への広告料を含む)

(振込予定日:平成 年 月 日) (会員資格は1月1日~12月31日を単位とします)

\* 複数年分の会費を先払いで振り込むことも可能です。その場合、通信欄に (何年度~何年度分)とお書き下さい。

### 連絡先

〒464-8602 名古屋市千種区不老町

名古屋大学理学部物理教室 光生体エネルギー研内

日本光合成研究会

TEL/FAX: 052-789-2883

E-mail: photosyn@bio.phys.nagoya-u.ac.jp

郵便振替口座 00140-3-730290

## 日本光合成研究会会則

### 第1条 名称

本会は日本光合成研究会（The Japanese Association for Photosynthesis Research）と称する。

### 第2条 目的

本会は光合成の基礎および応用分野の研究発展を促進し、研究者相互の交流を深めることを目的とする。

### 第3条 事業

本会は前条の目的を達成するために、シンポジウム開催などの事業を行う。

### 第4条 会員

#### 1. 定義

本会の目的に賛同する個人は、登録手続を経て会員になることができる。また、団体、機関は、賛助会員になることができる。

#### 2. 権利

会員および賛助会員は、本会の通信および刊行物の配布を受けること、本会の主催する行事に参加することができる。会員は、会長を選挙すること、役員に選出されることができる。

#### 3. 会費

会員および賛助会員は本会の定めた年会費を納めなければならない。

### 第5条 組織および運営

#### 1. 役員

本会の運営のため、役員として会長1名、事務局長1名、会計監査1名、常任幹事若干名をおく。役員任期は2年とする。会長、常任幹事は連続して二期を越えて再任されない。事務局長は五期を越えて再任されない。会計監査は再任されない。

#### 2. 幹事

幹事数名をおく。幹事任期は4年とする。幹事の再任は妨げない。

#### 3. 常任幹事会

常任幹事会は会長と常任幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。常任幹事会は本会の運営に係わる事項を審議し、これを幹事会に提案する。事務局長と会計監査は、オブザーバーとして常任幹事会に出席することができる。

#### 4. 幹事会

幹事会は役員と幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。幹事会は、常任幹事会が提案した本会の運営に係わる事項等を審議し、これを決定する。

#### 5. 事務局

事務局をおき、事務局長がこれを運営する。事務局は、本会の会計事務および名簿管理を行う。

#### 6. 役員および幹事の選出

会長は会員の直接選挙により会員から選出される。事務局長、会計監査、常任幹事は会長

が幹事の中から指名し、委嘱する。幹事は常任幹事会によって推薦され、幹事会で決定される。会員は幹事を常任幹事会に推薦することができる。

#### 第6条 総会

1. 総会は会長が招集し、出席会員をもって構成する。議長は出席会員から選出される。
2. 幹事会は総会において次の事項を報告する。
  - 1) 前回の総会以後に幹事会で議決した事項
  - 2) 前年度の事業経過
  - 3) 当年度および来年度の事業計画
3. 幹事会は総会において次の事項を報告あるいは提案し、承認を受ける。
  - 1) 会計に係わる事項
  - 2) 会則の変更
  - 3) その他の重要事項

#### 第7条 会計

本会の会計年度は1月1日から12月31日までとする。当該年度の経理状況は、総会に報告され、その承認を受ける。経理は、会計監査によって監査される。本会の経費は、会費および寄付金による。

#### 付則

第1 年会費は個人会員 1,500 円、賛助会員一口 50,000 円とする。

第2 本会則は、平成14年6月1日から施行する。

第3 本会則施行後第一期の会長、事務局長、常任幹事にはそれぞれ、第5条に定める規定にかかわらず、平成14年5月31日現在の会長、事務局担当幹事、幹事が再任する。本会則施行後第一期の役員および幹事の任期は、平成14年12月31日までとする。

#### 日本光合成研究会の運営に関する申し合わせ

##### 1. 幹事会：

幹事は光合成及びその関連分野の研究を行うグループの主催者である等、日本の光合成研究の発展に顕著な貢献をしている研究者とする。任期は4年とするが、原則として再任されるものとする。

##### 2. 事務局：

事務局長の任期は2年とするが、本会の運営を円滑に行うため、約5期(10年)を目途に再任されることが望ましい。

##### 3. 次期会長：

会長の引き継ぎを円滑に行うため、次期会長の選挙は任期の1年前に行う。

##### 4. 常任幹事会：

常任幹事会の運営を円滑におこなうため、次期会長は常任幹事となる。

## 幹事会名簿

- 浅田浩二 福山大学生命工学部  
池内昌彦 東京大学大学院総合文化研究科  
池上 勇 帝京大学薬学部  
泉井 桂 近畿大学生物理工学部生物工学科  
伊藤 繁 名古屋大学大学院理学系研究科  
井上和仁 神奈川大学理学部  
臼田秀明 帝京大学医学部  
榎並 勲 東京理科大学理学部  
大岡宏造 大阪大学大学院理学研究科  
大杉 立 東京大学大学院農学生命科学研究科  
大政謙次 東京大学大学院農学生命科学研究科  
小川健一 岡山県生物科学総合研究所  
小野高明 茨城大学工学部生体分子機能工学科  
小俣達男 名古屋大学大学院生命農学研究科  
垣谷俊昭 名城大学理工学部教養教育/  
総合学術研究科  
金井龍二 埼玉大学 (名誉教授)  
坂本 亘 岡山大学資源生物科学研究所  
櫻井英博 早稲田大学 (名誉教授)  
佐藤和彦 兵庫県立大学大学院生命理学研究科  
佐藤公行 岡山大学 (名誉教授)  
佐藤直樹 東京大学大学院総合文化研究科  
佐藤文彦 京都大学大学院生命科学研究科  
鹿内利治 京都大学大学院理学研究科  
重岡 成 近畿大学農学部  
島崎研一郎 九州大学大学院理学研究院  
嶋田敬三 首都大学東京都市教養学部  
沈 建仁 岡山大学大学院自然科学研究科  
杉浦昌弘 名古屋市立大学  
大学院システム自然科学研究科  
杉田 護 名古屋大学遺伝子実験施設  
杉山達夫 中部大学生命健康科学研究所  
鈴木祥弘 神奈川大学理学部  
園池公毅 東京大学大学院新領域創成科学研究科  
高市真一 日本医科大学生物学教室  
高橋裕一郎 岡山大学大学院自然科学研究科  
田中 歩 北海道大学低温科学研究所  
都筑幹夫 東京薬科大学生命科学部  
寺島一郎 東京大学大学院理学系研究科  
徳富(宮尾)光恵 農業生物資源研究所  
光合成研究チーム  
豊島喜則 関西学院大学理工学部  
南後 守 名古屋工業大学応用化学科  
野口 巧 筑波大学大学院数理物質科学研究科  
長谷俊治 大阪大学蛋白質研究所  
林 秀則 愛媛大学  
無細胞生命科学工学研究センター  
原登志彦 北海道大学低温科学研究所  
彦坂幸毅 東北大学大学院生命科学研究科  
久堀 徹 東京工業大学資源化学研究所  
檜山哲夫 埼玉大学理学部 (名誉教授)  
福澤秀哉 京都大学大学院生命科学研究科  
藤田祐一 名古屋大学大学院生命農学研究科  
前 忠彦 東北大学大学院農学研究科  
牧野 周 東北大学大学院農学研究科  
松浦克美 首都大学東京都市教養学部  
三室 守 京都大学大学院地球環境学堂  
宮地重遠 海洋バイオテクノロジー研究所  
村田紀夫 基礎生物科学研究所  
山本 泰 岡山大学大学院自然科学研究科  
山谷知行 東北大学大学院農学研究科  
横田明徳 奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科

**編集後記**

日本光合成研究会シンポジウムでのポスター賞受賞者の方々に記事をお願いするようになってから、大学院生の方々にご執筆いただくことが多くなりました。指導教員の先生方のご尽力の賜物とは推測するものの、どなたもとてもよく書いており感心しきりです。無理に記事をお願いして申し訳なく思うと同時に、プロの研究者を目指す若い方々にとって、とてもよい経験になっているのではないかと感じています。3年間編集担当を続け、今年が最後のお勤めとなりますが、「光合成研究」がこの分野を担う次の世代の良きサポーターとなればと思います。

＜筑波大学 野口 巧＞

\*\*\*\*\*

**日本光合成研究会 2007-2008 年役員**

会長	伊藤 繁 (名古屋大学)	
事務局	田中 歩 (北海道大学)	
常任幹事	大岡宏造 (大阪大学)	(日本光生物学協会)
常任幹事	藤田祐一 (名古屋大学)	(会報担当)
常任幹事	野口 巧 (筑波大学)	(会報担当)
常任幹事	鹿内利治 (京都大学)	(会報担当)
常任幹事	鈴木祥弘 (神奈川大学)	(ホームページ担当)
常任幹事	高橋裕一郎 (岡山大学)	(企画担当)
常任幹事	高市真一 (日本医科大学)	(企画担当)
常任幹事	小川健一 (岡山県生物科学総合研究所)	(企画担当)
会計監査	小保方潤一 (名古屋大学)	
庶務	中村洋子 (名古屋大学)	

\*\*\*\*\*

光合成研究 第18巻 第1号 (通巻51号) 2008年4月25日発行

**日本光合成研究会**

名古屋大学理学部物理教室

光生体エネルギー研内

〒464-8602 名古屋市千種区不老町

FAX: 052-789-2883

E-mail: photosyn@bio.phys.nagoya-u.ac.jp

<http://wwwsoc.nii.ac.jp/photosyn/index.html>

郵便振替口座 加入者名：日本光合成研究会 口座番号：00140-3-730290