

# 光合成研究

第23巻 第3号 (通巻68号) 2013年12月

NEWS LETTER Vol. 23 NO. 3 December 2013

THE JAPANESE SOCIETY OF PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

---

次期会長選挙のお知らせ		106
研究紹介 ChIP法を用いた葉緑体光合成遺伝子の転写制御解析		107
	華岡 光正 (千葉大)	107
研究紹介 植生分布で偏りが見られるルビスコ内アミノ酸置換の同定		111
	中里 拓也 (メンフィス大) 小笠原 智也 増田 真二 (東工大)	111
解説特集 「30年後の光合成研究」		116
序文 2013年公開シンポジウム「30年後の光合成研究」開催によせて		117
	佐藤 直樹 (東京大)	117
解説 クロロフィル蛍光解析における時空間軸のギャップ		118
	岩井 優和 (理研 JSTさきがけ)	118
解説 恩師のノーベル化学賞受賞に寄せて		125
	石北 央 (大阪大)	125
解説 フィールド・トランスクリプトミクスから30年後の生物学を考える		129
	永野 惇 (京都大 JSTさきがけ)	129
解説 人工光合成への期待		136
	民秋 均 (立命館大)	136
解説 光合成生物の生き様の理解とそれに基づく合目的な改変・制御の展望		141
	成川 礼 (東京大 JSTさきがけ)	141
解説 作物の光合成能力の改善は可能か? これからの挑戦		147
	牧野 周 (東北大学)	147
解説 フラスコの中から見る30年後の光合成研究		152
	佐藤 文彦 (京都大)	152
解説 過去30年間の光化学系1複合体の研究から30年後の研究展開を読む		157
	高橋 裕一郎 (岡山大学)	157
解説 科学の進歩と未来		162
	伊藤 繁 (名古屋大)	162
報告記事 若手の会活動報告～第九回セミナーの開催、サイエンスアゴラ2013への出展～		168
	浅井 智広 (立命館大)	168
報告記事 第9回光合成若手の会セミナーで講演して		169
	横山 諒 (京都大)	169
報告記事 サイエンスアゴラ2013 –サイエンスカフェ地球を支える緑の不思議– 光合成博士にきいてみよう! – 出展報告		171
	溝上 祐介 (東京大) 浅井 智広 (立命館大) 大西 紀和 (基生研) 岡島 公司 (大阪府大)	171
	川上 恵典 (大阪市立大) 辻 敬典 (筑波大) 成川 礼 (東京大) 渡辺 麻衣 (東京大)	171
事務局からのお知らせ		174
日本光合成学会会員入会申込書		176
日本光合成学会会則		177
幹事会名簿		179
会員名簿		180
編集後記		191
記事募集		191
賛助法人会員広告		

## 日本光合成学会 次期会長選挙のお知らせ

「日本光合成学会会則 (平成21年6月1日施行) 第5条」に基づき、次期会長選挙(任期:平成27年1月1日~平成28年12月31日の2年間)を行ないます。本会では任期一年前に新会長を選出し、会の円滑、継続的な運営をはかることになっています。

この会報の末尾に添付されている投票用紙に会員の中から会長候補者1名の氏名を明記し、同封した返信用封筒に入れて選挙管理委員会宛に1月31日までにご返送下さい(消印有効)。会員名簿は本号の巻末をご覧ください。

これまでの本会会長は、宮地重遠、西村光雄、佐藤公行、金井龍二、井上頼直、高宮建一郎、村田紀夫(二期)、伊藤繁(二期)、池内昌彦(二期)、田中歩の諸氏です。「会則5条の1では会長は二期を超えて再任されないこと」となっておりますので、今回の選挙では村田紀夫、伊藤繁、池内昌彦の三氏に被選挙権はありません。

日本光合成学会 選挙管理委員会

久堀 徹(東京工業大学資源化学研究所)

太田 啓之(東京工業大学バイオ基盤支援センター)

---

投票用紙の送付先

〒226-8503

横浜市緑区長津田4259 R1-8

東京工業大学資源化学研究所

久堀 徹研究室内

日本光合成学会選挙管理委員会 行き

## 研究紹介

ChIP法を用いた葉緑体光合成遺伝子の転写制御解析<sup>§</sup>

千葉大学 大学院園芸学研究科 応用生命化学領域

華岡 光正\*

葉緑体には、独自のゲノムDNAとその遺伝子発現系が存在している。我々は葉緑体分化や環境応答に際した光合成遺伝子の転写制御機構の解明を目指しており、本稿では筆者らが最近確立したクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法を用いて行った研究の一例について紹介する。分化後期に発現が誘導されるシグマ因子SIG1に着目し、ChIP法を用いて通常条件と強光ストレス条件下における標的プロモーターへの結合変化を調べた結果、両条件でのSIG1の発現挙動と相関が見られなかったことから、SIG1の翻訳 (後) 制御やストレス応答シグマ因子SIG5との役割分担の可能性が示唆された。

## 1. はじめに

葉緑体は、原始シアノバクテリアの細胞内共生により誕生したと考えられている。従って、葉緑体には、共生に由来する独自のゲノムDNAとその転写翻訳システムが残されている。光合成機能に関わる遺伝子はシアノバクテリアから継承され、その多くは今なお葉緑体ゲノム上に残されている。一方で、植物の長い進化を経て、シアノバクテリア由来の多くの遺伝情報は葉緑体ゲノムから消失したか、核ゲノムに移行した。その結果、現在の植物では、光合成などの葉緑体機能に必要な遺伝子群は、核ゲノムと葉緑体ゲノムに分かれて存在している。そのため、発達や環境変化に応じて、両ゲノム上の遺伝子の発現を協調させることが、植物の生存戦略において特に重要であると考えられる。

両ゲノムにおける遺伝子発現の協調には、核と葉緑体間の双方向のシグナル伝達が重要な役割を果たす。現在までに、核からのシグナル (アンテログレード (順方向の) シグナル) による葉緑体遺伝子の発現調節に関する知見が蓄積しているが、葉緑体からのシグナル (レトログレード (逆方向の) シグナル) による核遺伝子の発現制御についても、最近になって非常に注目されている<sup>2)</sup>。我々は、葉緑体分化や環境応答に際した遺伝子発現の協調メカニズム、中でも光合成遺伝子の転写制御に関わる核と葉緑体間の情報伝達機構の解明を目指して研究を行っている。

本研究では、核コードのシグマ因子による葉緑体遺伝子の転写制御の理解に向けて、筆者らが最近確立したクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法をベースとした解析を行ったので、その概要について紹介する。

## 2. 葉緑体シグマ因子SIG1の発現量変化

葉緑体には、遺伝子の転写に関わるRNAポリメラーゼが2種類存在しており、それぞれNEP (Nuclear-encoded plastid RNA polymerase)、PEP (Plastid-encoded plastid RNA polymerase) と呼ばれる。これらのうち、光合成遺伝子の転写には、主にPEPが関わりとされている。PEPは、シアノバクテリア由来の複数のサブユニットからなる酵素であり、転写伸長を司る

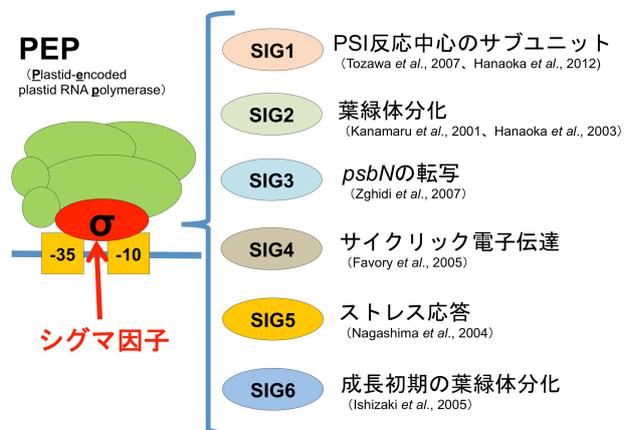


図1 シロイヌナズナの葉緑体シグマ因子

<sup>§</sup> 第4回日本光合成学会シンポジウム ポスター発表賞受賞論文

\* 連絡先 E-mail: mhanaoka@faculty.chiba-u.jp

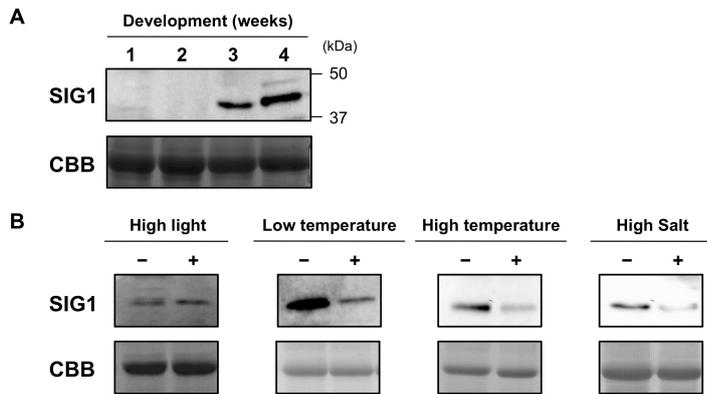


図2 様々な発達段階・ストレス条件下におけるSIG1の発現解析  
 (A) 通常条件 (22°C、連続光) で生育させて1~4週目のシロイヌナズナ (Col-0) におけるSIG1タンパク質の蓄積量の変化。  
 (B) 播種後4週目の植物体に強光 (1200  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 1時間)・低温 (4°C, 2時間)・高温 (30°C, 2時間)・塩 (250 mM NaCl, 2時間) ストレスを与えた際のSIG1タンパク質の蓄積量の変化。

コアサブユニットの遺伝子群は葉緑体ゲノムにコードされている。一方で、プロモーター配列の認識と転写の開始に必要なシグマ因子は、核ゲノムにコードされており複数種存在している。すなわち、植物の発達段階や環境条件に応じて、複数のシグマ因子を選択的に発現させることで、核による葉緑体遺伝子群の特異的な転写制御を可能にしていると言える。シロイヌナズナには6種類のシグマ因子が存在し<sup>3)</sup>、それぞれのシグマ因子の欠損株等を用いたこれまでの解析を通じて、個々の機能が徐々に明らかにされつつある (図1) が、その全体像の理解には至っていない。中でも、シロイヌナズナにおけるSIG1の機能についてはこれまであまり明らかにされていなかった。

本研究では、SIG1のタンパク質レベルでの挙動を明らかにするため、イムノブロット解析を行った。まず、発達段階に伴ったSIG1の蓄積量の変化を調べたところ、播種後1週目、2週目ではほとんど発現が見られなかったのに対して、3週目、4週目と週

を追うごとにSIG1の蓄積が見られた (図2)。このことから、SIG1は発達段階の後期で機能するシグマ因子であり、葉緑体分化・発達の初期過程において光合成装置の構築に関わるとされるSIG2<sup>4,5)</sup>やSIG6<sup>6)</sup>との機能分担の可能性が示唆された。

続いて、様々なストレス条件下におけるSIG1の蓄積量の変化を調べた。強光・低温・高温・塩ストレスを付与

した植物体におけるSIG1の発現を調べた結果、強光ストレスによりわずかに増加した一方で、低温・高温・塩ストレス下では蓄積量が減少する傾向が見られた (図2)。転写レベルではこれらのストレスにตอบสนองしないことが示されている<sup>7)</sup>ことから、各種ストレス条件下におけるSIG1の発現は、主に翻訳 (後) の段階で調節される可能性が示唆された。

### 3. SIG1による葉緑体遺伝子の発現制御

従来の葉緑体転写制御の研究は、目的因子の欠損株などを用いた分子遺伝学的手法、あるいは*in vitro*転写やゲルシフト法を利用した生化学的手法を中心に進められてきた。しかしながら、生化学的手法では一般

に*in vivo*の生理条件下における役割を説明することはできない。また、分子遺伝学的手法では遺伝子欠損による間接的な影響が同時に観察されるため、目的とする制御因子の直接的・特異的な制御を理解することが困難である。さらに、必須遺伝子であれば欠損させることはできず、また重複機能を持つパラログが存在する場合は機能相補により欠損の影響が見えなかったりと、解析が困難なケースも実際に多く見られた。そのため、従来のアプローチのみでは葉緑体遺伝子の転写制御系の全体像の理解に到達することは困難であると考えられた。以上の問題点を解決する技術として、近年この分野の研究で盛んに利用されているクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法が挙げられる。ChIP法は、転写因子をはじめとしたDNA結合タンパク質のターゲットへの結合状態を*in vivo*でリアルタイムにモニターすることのできる画期的な解析手法であり (図3)、生物種を問わず転写制御研究の最有力なツールの一つと

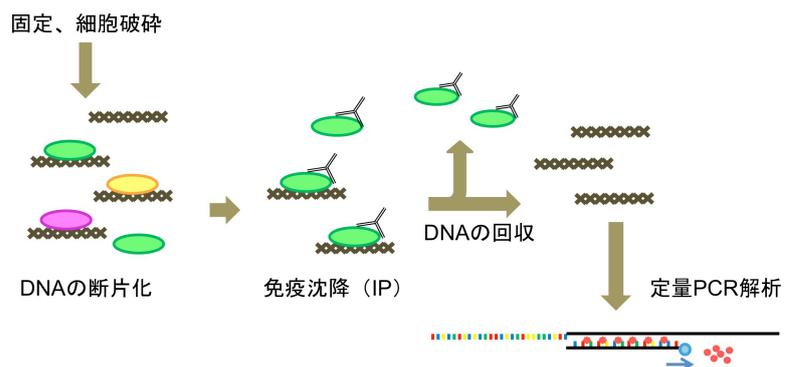


図3 クロマチン免疫沈降法の概略

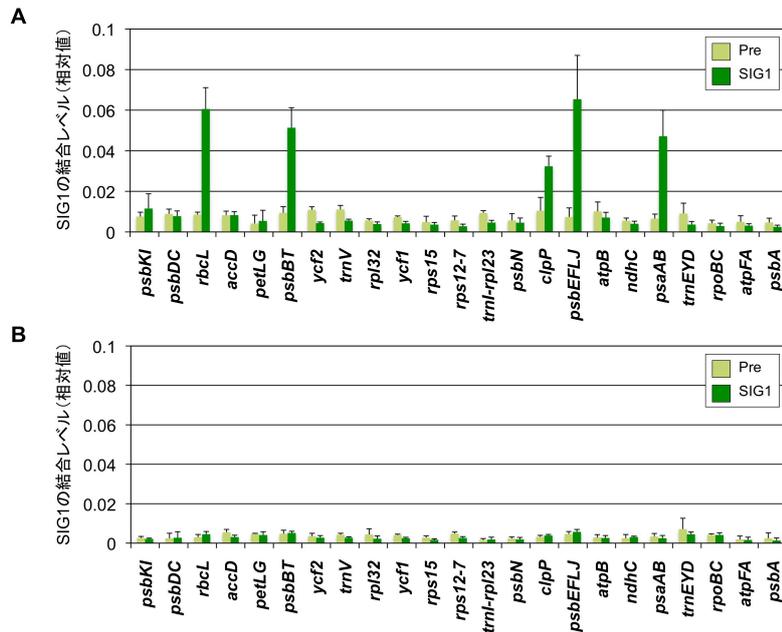


図4 SIG1のターゲットプロモーターへの*in vivo*における結合変化

様々な葉緑体遺伝子のプロモーター領域へのSIG1タンパク質の結合レベルを、(A) 通常生育条件 (22°C、連続光)、(B) 強光ストレス条件 (1200  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、1時間) のそれぞれについてChIP-qPCR解析によって調べた。

して広く利用されている。しかし、シロイヌナズナの葉緑体研究にChIP法を導入した事例はこれまで報告されていなかった。そこで本研究では、葉緑体遺伝子の転写制御機構についてさらに理解を深めるため、酵母における実験系<sup>8)</sup>をモデルに葉緑体のChIP解析系を構築し、シグマ因子SIG1とそのターゲット遺伝子の関係を調べることで実験系の評価を行った。

SIG1の蓄積が見られる4週目の植物体をホルムアルデヒドによって固定し、DNA-タンパク質複合体を抽出し、SIG1が結合しているターゲットDNAの量を定量PCRによって測定した。その結果、イネでSIG1の標的として報告されている*psaAB*プロモーターなど<sup>9)</sup>への特異的な結合が確認されたことに加えて、*clpP*などこれまで情報のない新たなプロモーターへの結合も検出することができた (図4)。さらに、強光ストレスを与えた植物体から回収したサンプルを用いて同様の実験を行ったところ、SIG1の標的プロモーターへの結合は強光ストレスに依存して一様に弱まる傾向が見られた (図4)。上述のイムノブロット解析において、SIG1の蓄積量は強光ストレスにより減少しないことが示されている。このことから、強光ストレス下においてSIG1は分解されるのではなく一過的にプロモーターから離れて、ストレスから解放された際に迅速に

元の転写を行うため待機していると予想された。ストレス条件下では別のシグマ因子であるSIG5が機能することが見出されており、環境変化によるSIG1との役割分担やシグマ因子の使い分けについても、今後のChIP法を用いた解析を通じてさらに明らかにできるものと期待される。

#### 4. 今後の展望

本研究では、葉緑体遺伝子の転写制御システムを解明する上での有力ツールとしてのChIP法に基づいた解析系を立ち上げ、SIG1のターゲットプロモーターへの結合と、ストレスの有無によるパターンの変化を示すことができた<sup>10)</sup>。ChIP法は、*in vivo*における転写調節因子の役割を知る上で重要な手がかりとなるものであり、他の解析手法と組み合わせること

で、葉緑体の遺伝子発現制御機構の詳細とその生理的意義についてさらに理解が深まるものと期待される。筆者の研究グループでは、光合成生物における遺伝子発現制御系の普遍性と特異性、さらにそのシステムの進化に興味を持って研究を進めており、本稿で紹介したシロイヌナズナの葉緑体研究に加え、シアノバクテリアにおける強光ストレス応答や概日時計に依存した転写制御についても、ChIP法を用いた解析を通じてその実体に迫ることに成功している<sup>11,12)</sup>。最近、単細胞紅藻*Cyanidioschyzon merolae* (シズン) の葉緑体転写制御系の研究にもChIP法の導入を試みており、新たな展開が見えつつある。ChIP法の利用により*in vivo*での遺伝子発現の動態を捉えることで、光合成生物に特有の転写制御システムの全体像を明らかにしていきたいと考えている。

#### 謝辞

本研究の遂行にあたり、東京工業大学の田中寛教授のご協力・ご助言を賜りました。また、千葉大学の大学院生・学生の皆さん、特に加藤麻衣子氏、木山貴史氏、安間美里氏には、一連の実験において多大な協力を頂きました。深く感謝申し上げます。

Received November 15, 2013, Accepted November 26, 2013, Published December 31, 2013

## 参考文献

1. Goldschmidt-Clermont, M. (1998) Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 177, 115-180.
2. Woodson, J.D. and Chory, J. (2008) Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat. Rev. Genet.* 9, 383-395.
3. Schweer, J., Türkeri, H., Kolpack, A. and Link, G. (2010) Role and regulation of plastid sigma factors and their functional interactors during chloroplast transcription - recent lessons from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Cell Biol.* 89, 940-946.
4. Kanamaru, K., Nagashima, A., Fujiwara, M., Shimada, H., Shirano, Y., Nakabayashi, K., Shibata, D., Tanaka, K. and Takahashi, H. (2001) An *Arabidopsis* sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 42, 1034-1043.
5. Hanaoka, M., Kanamaru, K., Takahashi, H. and Tanaka, K. (2003) Molecular genetic analysis of chloroplast gene promoters dependent on SIG2, a nucleus-encoded sigma factor for the plastid-encoded RNA polymerase, in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 31, 7090-7098.
6. Ishizaki, Y., Tsunoyama, Y., Hatano, K., Ando, K., Kato, K., Shinmyo, A., Kobori, M., Takeba, G., Nakahira, Y. and Shiina, T. (2005) A nuclear encoded sigma factor, *Arabidopsis* SIG6, recognizes sigma-70 type chloroplast promoters and regulates early chloroplast development in cotyledons. *Plant J.* 42, 133-144.
7. Nagashima, A., Hanaoka, M., Fujiwara, M., Shikanai, T., Kanamaru, K., Takahashi, H. and Tanaka, K. (2004) The multi-stress responsive plastid sigma factor, SIG5, directs activation of the *psbD* light responsive promoter (LRP) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45, 357-368.
8. Kuo, M.H. and Allis, C.D. (1999) In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods.* 19, 425-433.
9. Tozawa, Y., Teraishi, M., Sasaki, T., Sonoike, K., Nishiyama, Y., Itaya, M., Miyao, A. and Hirochika, H. (2007) The plastid sigma factor SIG1 maintains photosystem I activity via regulated expression of the *psaA* operon in rice chloroplasts. *Plant J.* 52, 124-132.
10. Hanaoka, M., Kato, M., Anma, M. and Tanaka, K. (2012) SIG1, a sigma factor for the chloroplast RNA polymerase, differently associates with multiple DNA regions in the chloroplast chromosomes *in vivo*. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 12182-12194.
11. Hanaoka, M. and Tanaka, K. (2008) Dynamics of RpaB-promoter interaction during high light stress, revealed by chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant J.* 56, 327-335.
12. Hanaoka, M., Takai, N., Hosokawa, N., Fujiwara, M., Akimoto, Y., Kobori, N., Iwasaki, H., Kondo, T. and Tanaka, K. (2012) RpaB, another response regulator operating circadian clock-dependent transcriptional regulation in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J. Biol. Chem.* 287, 26321-26327.

## Analysis of Chloroplast Transcriptional Regulation by Chromatin Immunoprecipitation

Mitsumasa Hanaoka\*

Division of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Horticulture, Chiba University

## 植生分布で偏りが見られるルビスコ内アミノ酸置換の同定<sup>§</sup>

<sup>1</sup>メンフィス大学 生物科学科

<sup>2</sup>東京工業大学 バイオ研究基盤支援総合センター

<sup>3</sup>東京工業大学 地球生命研究所

中里 拓也<sup>1</sup> 小笠原 智也<sup>2</sup> 増田 真二<sup>2,3,\*</sup>

ルビスコは、光合成の暗反応において、二酸化炭素を固定するきわめて重要な酵素である。私たちは、地理情報システム (GIS) と GenBank に登録されている数千種の植物種のデータを組み合わせ、植生分布とルビスコ内のアミノ酸置換の相関を解析した。その結果、高度・緯度・気温・降水量の違いによって変異が偏るアミノ酸置換を複数同定した。これは、ルビスコの収斂進化を具体的に示した最初の例であると共に、光合成効率を高めた植物の開発に利用できる。

### 1. はじめに

ルビスコ (リブローズ1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ) は、光合成のカルビン - ベンソン回路において二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) 固定反応の中核となる重要な酵素である。そのため、ルビスコの反応速度が光合成そのものの効率に大きく影響を及ぼす。その反応速度は、環境、特に温度やCO<sub>2</sub>濃度に影響されやすく<sup>1,2)</sup>、生息環境の異なる種の間で反応速度に大きな幅があることが確認されている<sup>3)</sup>。ルビスコ大サブユニット (RbcL) のアミノ酸配列は、系統学上の種分類に頻繁に利用され、一般的にその進化はほぼ中立であると仮定されている。しかし、多数の被子植物のアミノ酸配列を比較した近年の研究により、ルビスコ分子の進化は自然選択に大きく影響を受けることが確認された<sup>4)</sup>。これらのことから、ルビスコのアミノ酸の分布と、それによって形成される分子構造は、自然選択によって進化し、種の生息環境への適応に関与している可能性が高いと考えられる。

私達は、ルビスコ分子構造の進化が、アミノ酸レベルで、生息環境への適応にどのような影響を与えているのかに注目した。具体的には、多数の被子植物種の生息環境と、ルビスコ大サブユニットのアミノ酸分布の関連を調べることによって、環境適応に関わるアミノ酸の特定を試みた。更に、環境適応に関わると考え

られるアミノ酸置換が、どのように酵素の働きに影響しているのかを生理的、三次元構造的な視点から調査した。

### 2. 生息環境の適応に関与するアミノ酸置換の同定

仮に、あるアミノ酸配列位置において、低温環境に生息する種と高温環境に生息する種が、異なる性質のアミノ酸を持つ傾向があるとすれば、そのアミノ酸置換が自然選択によって環境温度の適応に関わっている可能性が高い。ただし、系統樹上で近接する種は、同じ形質を共有する傾向があるので、環境適応ではなく、歴史的な理由のみによりアミノ酸分布と生息環境に関連が生まれる可能性もある。そうした種間の系統的依存性を取り除くためにPhylogenetic Independent Contrast (PIC)<sup>5)</sup>などの方法を介して、アミノ酸分布と生息環境の関連を分析する必要がある。私達は3078科に属する6446種の被子植物において、アミノ酸分布と生息環境の関連を調べた。まず、それぞれの種の生息環境に関係する4つの変数 (緯度、標高、年間平均気温、年間平均降雨量) を、種の確認されている生息地点の地理座標を基に、Geographic Information System (GIS) のデータを使って特定した。次に、それぞれの種のルビスコ大サブユニットのアミノ酸配列から、それぞれのアミノ酸の極性を特定した。そして、それぞ

<sup>§</sup> 第4回日本光合成学会シンポジウム ポスター発表賞受賞論文

\* 連絡先 E-mail: shmasuda@bio.titech.ac.jp

れのアミノ酸の配列位置における生息環境とアミノ酸の極性の関連を、PICを使って調べた(図1)。その結果、8つのアミノ酸の配列位置で、1つ以上の環境変数との有意な (family-wise  $p < 0.05$ ) 関連が確認された。特にアミノ酸配列位置aa97とaa328で関連が特に強く(図1)、これらのアミノ酸位置における置換が、何らかの形で種の生息環境への適応に関与していると思われる。環境変数は、お互いに関連しあっているため、要因となる環境要素は特定できない。しかしながら、この二つのアミノ酸配列位置において年間平均気温と特に関連が強いため、温度が環境適応の主要素である可能性が高い。一方で、これはあくまで被子植物全般を見るとこうした傾向があるということで、例外は多数あるということを書いておきたい。

aa97とaa328におけるアミノ酸分布を詳しくみると、aa328では非極性のアラニンが64%、極性のセリンが35%の種を占めていた。この位置は、4つすべての環境変数と有意に関連していて、アラニンをもつ種がセリンを持つ種に比べて、標高が低く高温の環境に生息する傾向にある。一方aa97は、緯度と年間平

均気温と有意に関連しているが、aa328に比べると関連は全般的に弱い(図1)。この位置では、極性のチロシンが66%で、非極性のフェニルアラニンが34%の種を占めており、チロシンを持つ種がフェニルアラニンを持つ種に比べて低緯度で高温の環境に生息する傾向にある。これら二つの配列位置において、極性と生息環境の関係が逆であることから、極性の変化がもたらす環境適応への影響がこれらの位置で異なると考えられる。この2つのアミノ酸は、KapralovとFilatov(2007)の研究結果でも、自然選択に大きく影響されていることが示されている<sup>4)</sup>。ただしこの研究では、他のアミノ酸配列位置(例えばaa142やaa470など)も多様性が高く、自然選択に大きく影響されていると示されたが、我々の解析では有意な関連は見られなかった。従って、これら多様性の高いアミノ酸配列位置は、今回調査した以外の環境要素に適応して置換している可能性が考えられる。

### 3. ルビスコ分子におけるaa97とaa328の分布

aa97とaa328がルビスコ分子の三次元構造のどこに

位置しているかを分析することによって、それらのアミノ酸の機能について考察することができる。aa97とaa328および、基質となるリブローズ1,5-ビスリン酸が結合する活性部位の物理的位置関係を見てみると、aa328は活性部位近傍に位置しているのに対し、aa97は離れた場所に位置していることが分かる(図2)。また、これらのアミノ酸配列位置における溶媒への接触度を示す solvent-accessible surface area (SASA)は、aa97で0.027Å<sup>2</sup>、aa328で0.001Å<sup>2</sup>と比較的小さいことから、これらのアミノ酸がルビスコ分子の内側に位置し、周辺の溶媒との接触が少ないことがわかる。これらのことから、aa328はアミノ酸置換によって基質との親和力を変え環境適応を誘導している可能性が高い。一方、aa97は、その基質結合部位との遠さ

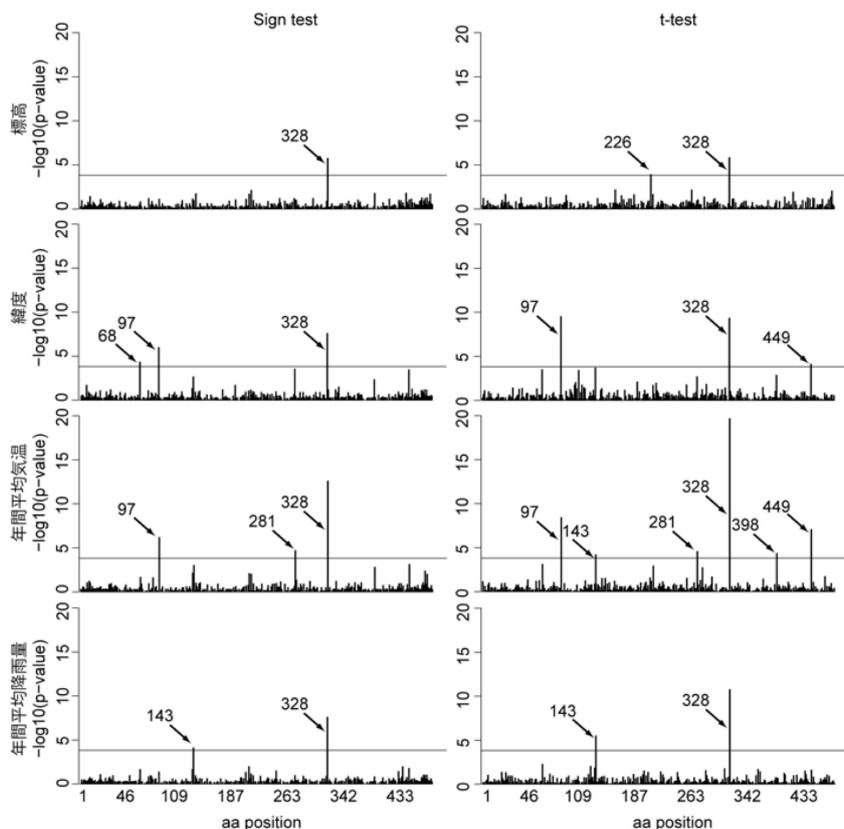


図1 ルビスコ大サブユニットのアミノ酸配列位置の極性と4つの環境変数の関連 PICを使ってsign test とt-testを基に関連の有意値 (logに変換) を特定。灰色の横線は family-wise  $p = 0.05$ を示す。

から、直接基質親和性に影響を及ぼしているとは考え難い。他の要因、例えば異なる温度下における分子の構造的安定性を、アミノ酸置換によって環境適応を促している可能性などが考えられる。

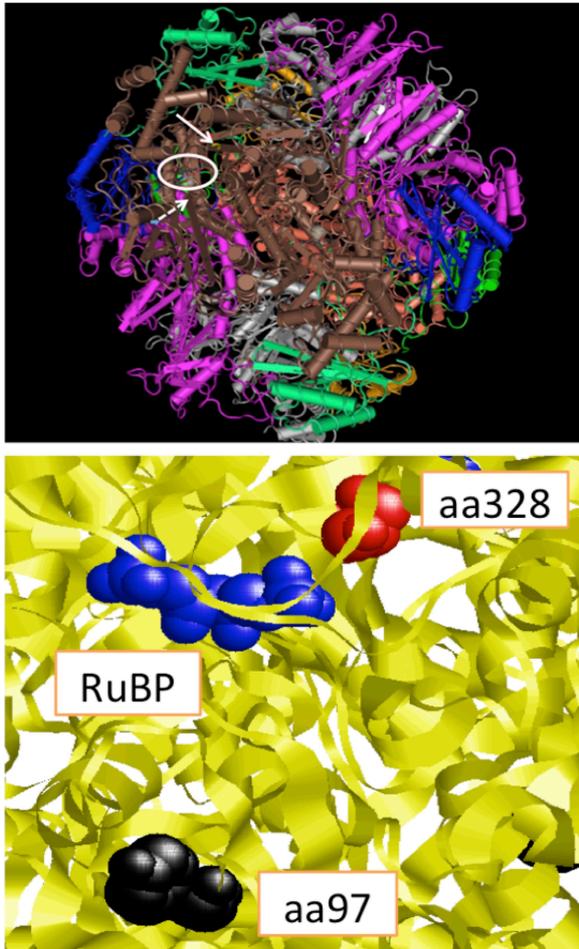


図2 ルビスコの複合体 (L<sub>8</sub>S<sub>8</sub>) の三次元構造  
 (上) aa97とaa328の位置をそれぞれ実線および破線矢印で、リブロース1,5-ビスリン酸結合部位を丸で示す。  
 (下) リブロース1,5-ビスリン酸結合部位の拡大図。PDB ID: 4HHHを基に作成。

#### 4. aa97とaa328におけるアミノ酸置換の酵素反応に対する影響

今回の解析で同定されたaa97とaa328に位置するアミノ酸置換が、ルビスコの酵素反応にどのような影響を与えるのかを生化学的に調べた。他の変異箇所の影響をさけるために、シアノバクテリアのルビスコに対し、部位特異的な変異導入を行い、それら変異型ルビスコの酵素活性を、野生型のそれと比較することにした。

RbcLのアミノ酸配列のアライメントから、植物のaa97およびaa328に対応するアミノ酸は、シアノバクテリアにおいてはaa92およびaa323であり、*Synecho-*

*cystis* sp. PCC6803の野生型RbcLでは、それぞれがチロシン、セリンとなっている。*Synechocystis*のゲノム上には、ルビスコ大サブユニットRbcL、ルビスコ特異的シャペロンタンパク質RbcX、ルビスコ小サブユニットRbcSをコードする遺伝子がオペロンを構成している。RbcXは活性型ルビスコ (L<sub>8</sub>S<sub>8</sub>のヘテロ16量体) の正しい会合状態の形成に必要な因子であることがわかっている<sup>6,7)</sup>。このオペロンを直接大腸菌発現プラスミドにクローニングし、*rbcL/X/S*の共発現系を構築した。この共発現プラスミドに対し、Y92F (aa92のチロシンをフェニルアラニンに変えた) およびS323A (aa323のセリンをアラニンに変えた) 変異を個別に導入し、空ベクターを含めて計4つのプラスミドをそれぞれ大腸菌に導入した。

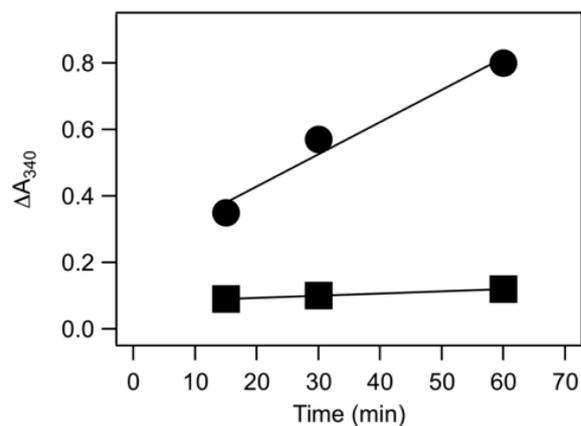


図3 大腸菌内で発現させたルビスコのカルボキシラーゼ活性空ベクター保持大腸菌 (■) もしくは、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803の*rbcL/X/S*遺伝子をベクター上で発現させた大腸菌 (●) 粗抽出液を用いたカルボキシラーゼ活性測定結果。測定は、反応液中のNADHの酸化 (ΔA<sub>340</sub>) をモニターすることでカルボキシラーゼ活性を測定するRackerの方法<sup>10)</sup>により行った。

RbcL/X/Sの発現を誘導した大腸菌の粗抽出液は、ルビスコ特異的なカルボキシラーゼ活性を示した (図3)。この活性を指標に、CO<sub>2</sub>への親和性 (K<sub>m</sub>) を調べたところ、WT, Y92F, S323AのK<sub>m</sub>値はそれぞれ、191 ± 17, 126 ± 14, 206 ± 10 μM (±SE) となった (図4)。WTの値は、過去に報告された結果 (~200 μM) と一致する<sup>8,9)</sup>。Y92Fのみ若干CO<sub>2</sub>への親和性が上がったが、全体として大きな変化はなかった。最大反応速度を見ると、S323AがWTに比べ3倍ほど高い。しかし、これは大腸菌内での発現量の違いに起因する可能性もあり、アミノ酸置換の影響かどうかは現時点では判断できていない。

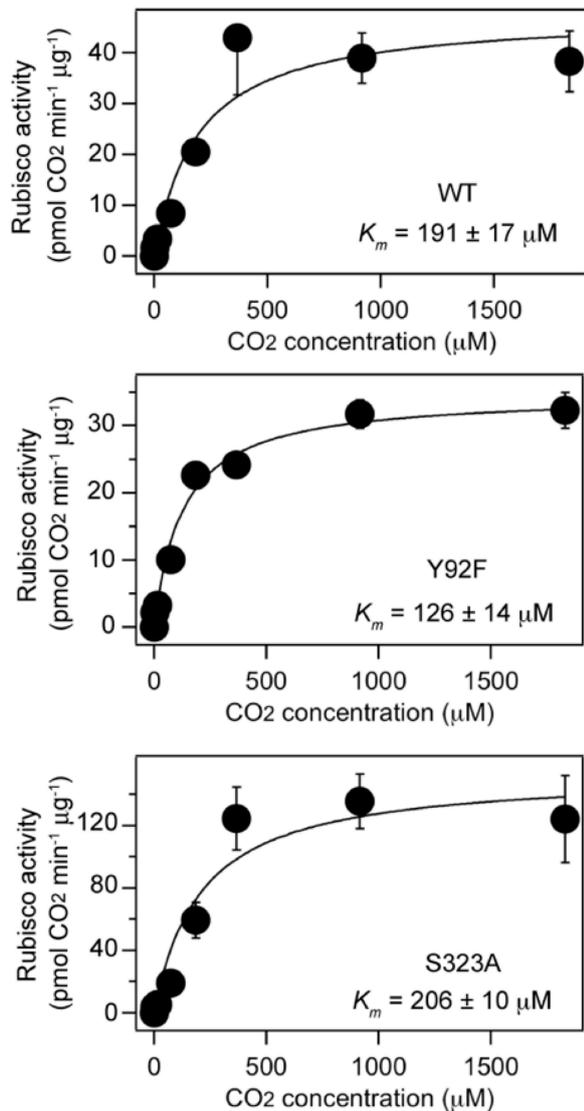


図4 大腸菌内で発現させたルビスコのCO<sub>2</sub>濃度依存性

図3と同様にルビスコを発現させた大腸菌粗抽出液のカルボキシラーゼ活性を、異なったCO<sub>2</sub>濃度下で測定した。上からWT, Y92F, S323A変異ルビスコ発現株の測定結果を示す。反応は窒素置換条件、且つ異なるNaHCO<sub>3</sub>濃度下で行い、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>とCO<sub>2</sub>間のpK<sub>a</sub>を6.15として<sup>8)</sup>、個々の反応液中のCO<sub>2</sub>濃度を算出した。K<sub>m</sub>値(±SE)は、3回の実験値をミカエリスメンテン式にフィッティングさせることで算出した。

## 5. おわりに

今回、ゲノム情報とGISデータを組み合わせ、高度・緯度・気温・降水量の違いによって偏りが見られるルビスコ大サブユニット内のアミノ酸置換を同定した。シアノバクテリアのルビスコの生化学的解析により、これらアミノ酸残基の違いは、CO<sub>2</sub>への親和性に大きな影響を与えないことがわかった。しかし、高等植物型ルビスコのCO<sub>2</sub>に対する基質親和性は、シアノバクテリアのそれに比して一桁以上高いことが知られており、

シアノバクテリア型ルビスコの生化学的性質がそのまま高等植物型ルビスコに当てはまらない可能性もある。ルビスコアクチベース等、高等植物特異的なルビスコ制御因子との相互作用が、これらアミノ酸置換により影響を受けている可能性を踏まえ、高等植物型ルビスコの生化学的/遺伝学的解析が今後期待される。

分析機器の進歩とデータベースの整備に伴い、GenBankとGISには日々膨大な量のデータが蓄積されている。今後、如何にこれらのデータを生物学的研究に利用するかが重要となる。本研究はその指針を与えるものと考えられる。

## 謝辞

ルビスコの活性測定法に関しまして貴重なアドバイスをいただいた奈良先端科学技術大学院大学の横田明穂教授、蘆田弘樹助教に感謝いたします。

Received October 30, 2013, Accepted November 12, 2013,

Published December 31, 2013

## 参考文献

1. Steven, J., Crafts-Brandner, S. and Michael E.S. (2000) Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO<sub>2</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13430-13435.
2. Galmés, J., Flexas, J., Keys, A.J., Cifre, J., Mitchell, R.A.C., Madgwick, P.J., Haslam, R.P., Medrano, H. and Parry, M.A.J. (2005) Rubisco specificity factor tends to be larger in plant species from drier habitats and in species with persistent leaves. *Plant Cell Environ.* 28, 571-579.
3. Jordan, D.B. and Ogren, W.L. (1981) Species variation in the specificity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. *Nature* 291, 513-515.
4. Kapralov, M.V. and Filatov, D.A. (2007) Widespread positive selection in the photosynthetic Rubisco enzyme. *BMC Evol. Biol.* 7, 73.
5. Felsenstein, J. (1985) Phylogenies and the comparative method. *Am. Nat.* 125, 1-15.
6. Onizuka, T., Endo, S., Akiyama, H., Kanai, S., Hirano, M., Yokota, A., Tanaka, S. and Miyasaka, H. (2004) The *rbcX* gene product promotes the production and assembly of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase of *Synechococcus* sp. PCC7002 in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* 45, 1390-1395.
7. Saschenbrecker, A., Bracher, A., Rao, K. V., Rao, B.V., Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M. (2007) Structure and function of RbcX, an assembly chaperone for hexadecameric Rubisco. *Cell* 129, 1189-1200.
8. Marcus, Y. and Gurevitz, M. (2000) Activation of

- cyanobacterial RuBP-carboxylase/oxygenase is facilitated by inorganic phosphate via two independent mechanisms. *Eur. J. Biochem.* 267, 5995-6003.
9. Marcus, Y., Altman-Gueta, H., Wolff, Y. and Gurevitz, M. (2011) Rubisco mutagenesis provides new insight into limitations on photosynthesis and growth in *Synechocystis* PCC6803. *J. Exp. Bot.* 62, 4173-4182.
10. Racker, E. (1962) Ribulose diphosphate carboxylase from spinach leaves. *Methods Enzymol.* 5, 266-270.

## Determination of RubisCO amino acid residues that are associated with species' habitat environments

Takuya Nakazato<sup>1</sup>, Tomoya Ogasawara<sup>2</sup>, Shinji Masuda<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>University of Memphis, <sup>2</sup>Tokyo Institute of Technology

## 解説特集

# 「30年後の光合成研究」

Editor: 田中 歩 (北海道大学 低温科学研究所)

鹿内 利治 (京都大学 大学院理学研究科)

佐藤 直樹 (東京大学 大学院総合文化研究科)

序文 2013年公開シンポジウム「30年後の光合成研究」開催によせて

佐藤 直樹 (東京大学 大学院総合文化研究科)

P. 117

クロロフィル蛍光解析における時空間軸のギャップ

岩井 優和 (理化学研究所 ライブセル分子イメージングチーム/JSTさきがけ)

P. 118 ~ 124

恩師のノーベル化学賞受賞に寄せて

石北 央 (大阪大学 大学院理学研究科)

P. 125 ~ 128

フィールド・トランスクリプトミクスから30年後の生物学を考える

永野 惇 (京都大学 生態学研究センター/JSTさきがけ)

P. 129 ~ 135

人工光合成への期待

民秋 均 (立命館大学 大学院生命科学研究科)

P. 136 ~ 140

光合成生物の生き様の理解とそれに基づく合目的な改変・制御の展望

成川 礼 (東京大学 大学院総合文化研究科/JSTさきがけ)

P. 141 ~ 146

作物の光合成能力の改善は可能か？ これからの挑戦

牧野 周 (東北大学 大学院農学研究科)

P. 147 ~ 151

フラスコの中から見ると30年後の光合成研究

佐藤 文彦 (京都大学 大学院生命科学研究科)

P. 152 ~ 156

過去30年間の光化学系1複合体の研究から30年後の研究展開を読む

高橋 裕一郎 (岡山大学 大学院自然科学研究科)

P. 157 ~ 161

科学の進歩と未来

伊藤 繁 (名古屋大学 遺伝子実験施設)

P. 162 ~ 167

## 解説

## 序文 2013年公開シンポジウム「30年後の光合成研究」開催によせて\*

東京大学 大学院総合文化研究科

佐藤 直樹\*

第4回年会に伴う公開シンポジウムは、表記のタイトルで行われた。オーガナイザーは、会長の田中歩氏と事務局長の鹿内利治氏に加えて私となっていたが、実質的なアレンジは会長がして下さり、私の方は所用で一日目も欠席ということで、二日目の司会をつとめることになった。

シンポジウムの最初に、このタイトルは、ひょっとしたら私が昨年刊行した『40年後の「偶然と必然」』という本のタイトルに関係するのかもしれないという話をさせていただいた。40年前にモノーが書いた『偶然と必然』は、多くの人が読んだのだが、本当に著者が書きたかったことを、どれだけの人が受け取っただろうか。分子生物学を実存主義に結びつけ、人類の新しい社会像を提案した著者の想いは、少なくとも大部分の日本人読者には届かなかった。しかし、社会の問題は、当時も今も変わらない。どうしたら、次の時代を少しでもよりよく生きていけるのだろうか、という重たい課題を私たちも背負っている。こんなことを私は拙著の中で書きつづった。そこで、これから先の光合成は、学術的にはどのように発展し、社会の期待にどのように応えて行くことができるのだろうかということを、過去を振り返りながら考えるのが、今回のシンポジウムである。

多くの研究者のキャリアーは、20歳過ぎから始まり60歳か65歳くらいまで続くので、あるテーマの研究がどのように進められたのかという「ことの顛末」を、一人の人間が経験として知ることのできる期間は、40年間くらいに限られている。大学院を終えて一人前の研究者となる時期から数えると、おそらく30年間の歴史を担ってきたということかもしれない。現在のシニア研究者たちは、自分たちが学生として研究をはじめた頃の知識状況や問題意識や研究機材がどんなもので、それが、この30年間にどの程度変容したのかということ、経験として把握している。途中で研究テーマや分野が変わった方も多いため、必ずしも、このことはあてはまらないのかもしれないが、特に光合成という分野に限ると、かなり同じ顔ぶれがいつまでもいるようにも思える（悪口ではありません）。

そもそも今回、会長がこのような企画を考えられたのも、シニアの研究者として、これまでを振り返ることで、今研究をスタートしたばかりの若い研究者に、自らの30年後の姿を思い描いてもらいたいと考えたからであろう。今の日本の社会は先が不透明で、一時的に景気回復の幻想をもつかもしいないが、地球資源は限られていて、日本だけが抜け駆けするわけにもいかないことを考えれば、「脱成長」が現実のものになってきており、少なくとも大発展するような未来はありえない。そうした社会にあって、決して豊かであったとはいえない時代に、日本の科学がどのように構築されてきたのか、その中で、個人個人の科学者は、どんな目標を掲げ、それをどのように実現しようとしてきたのかということに、若い研究者が少しだけ関心を持ってくれることを望む。どんな厳しい社会のなかでも、個人個人は、それぞれの人生の目的を達成すべく努力し続けて来たし、これからもそうであるに違いないからである。『偶然と必然』の冒頭に引用されているカミュの『シジフォスの神話』の一節は、そうしたことを訴えている。過去を少しだけ見据えると、おぼろげであっても、未来の自分像を想像することもできるだろう。そうして初めて、自分の研究人生の設計ができ、意欲をもってこれからの研究に臨むことができると期待したい。「少しだけ」と書いたのは、あくまでも、未来を志向するための触媒としてという意味である。

さて、みなさんはどんな未来を描くであろうか。もっとも、私にも未来を描く資格は残っている。田中会長はいかがですか！

\* 解説特集「30年後の光合成研究」

\* 連絡先 E-mail: naokisat@bio.c.u-tokyo.ac.jp

## クロロフィル蛍光解析における時空間軸のギャップ\*

理化学研究所 光量子工学研究領域 ライブセル分子イメージング研究チーム/JST さきがけ  
岩井 優和\*

クロロフィル蛍光解析によって、エネルギー伝達過程や光合成電子伝達に関する多くの現象がこれまで明らかにされてきた。しかし、異なる時間軸と空間スケールを有する異なる解析で得られた情報から、どのようにして相互認識が可能な共通の結論を導きだすことができるだろうか。この問いに関して、本稿では、共焦点レーザー顕微鏡を用いたクロロフィル蛍光解析における時間軸と空間スケールについて考察し、その問題点をこれまでの研究の紹介を交えて議論したい。

### 1. はじめに

葉緑体に存在するチラコイド膜には、クロロフィル分子を結合したタンパク質が数多く存在している。クロロフィル分子は太陽光に含まれる光エネルギーを吸収し、そのエネルギーを隣接する同分子に一瞬で受け渡すことができる。その一瞬の出来事が複数の分子間で繰り返り起こることで、光エネルギーはやがて光合成反応中心タンパク質へ伝達され、そこで電気化学エネルギーに変換される。

数多くの研究成果を省いて言葉で記述するとなんだか教科書的であっけない気がするが、秒速約30万キロメートルで移動する光を捕捉し、そのエネルギーを目的の場所まで運ぶ過程には数えきれない経路と障壁があるに違いない。実際すべてが目的地まで難なく到達するわけではなく、そのエネルギー伝達過程でクロロフィル分子から蛍光として再び放出されることがある。このクロロフィル蛍光は光合成反応を研究する上で最も重要な情報の一つであり、その現象は幅広い時間軸と空間スケールで解析されている。しかし、光エネルギーが蛍光として放出される瞬間のクロロフィル分子の振動状態や周辺場の応答については、まだ未解明な部分が多いため、クロロフィル蛍光の解析においては、個々の問題に本質的な時間軸と空間スケールを選択し理解する必要がある。最も重要なことは、異なる時間軸と空間スケールを有する異なる解析で得られた情報から、いかに相互認識の可能な共通の結論を導きだすかである。その判断基

準は、個々の研究者に委ねて良い問題ではない。なぜなら、専門分野の異なる研究者は、それぞれが異なる“想像力”を持っているため、その想像を超えた領域での現象を考察する際、その想像力の差が少なからず影響するからである。もちろん想像と科学は全く別物であるが、専門分野が異なる場合、上記の光合成初期反応過程について想像できる深みは様々であり、その違いによって解釈の本質も異なってくる。

本稿では、共焦点レーザー顕微鏡を用いたクロロフィル蛍光解析における時間軸と空間スケールについて考察し、観察された結果がどこまで共通の現象として識別できるのか、その問題点をこれまでの研究の紹介を交えて議論したい。

### 2. 異なる時間軸と空間スケールから導き出される情報

1674年、Anthony van Leeuwenhoekは自ら設計した光学顕微鏡を用いて葉緑体を初めて観察した<sup>1)</sup>。この時、アオミドロ属 *Spirogyra* の葉緑体を“small green globules”とし、緑色の正体が葉緑体であることを記した。無論この時点ではチラコイド膜や光化学系タンパク質などについては知る術がなかった。19世紀に入り、光学顕微鏡の空間分解能が上がり、葉緑体内にドット状の構造があることをHugo von Mohlらは発見し、Arthur Meyerは、その構造を“Grana”と記述した<sup>1)</sup>。それから約1世紀半経過した現在では、“グラナ”は教科書で紹介されるよく知られた構造だが、緑

\* 解説特集「30年後の光合成研究」

\* 連絡先 E-mail: miwai@riken.jp

色をしたオルガネラの中に見出した小さなドット状の構造物について、それ以上のことを知る術は当時なかった。20世紀に入り、電子顕微鏡を用いた観察が可能となり、そのドット状構造物を目印に、葉緑体を識別し、その中に存在するグラナが平らな袋状構造物の積み重なったものであることが示された<sup>2,3)</sup>。電子顕微鏡によって、空間分解能が上がり、トモグラフィー解析によって立体構造まで明らかとなった<sup>4-6)</sup>。現在では、チラコイド膜に存在するタンパク質の配列の様子までも観察されている<sup>7)</sup>。

最初は緑色のドット状にしか見えなかったグラナが、電子顕微鏡が持つ空間分解能によって幾層にも重なったチラコイド膜の構造物であることが明らかとなった。グラナ構造の他に、膜が重ならない“ストロマメラ”の構造も電子顕微鏡によって観察されており、それぞれの膜構造の違いには、2種類の光化学系タンパク質 (PSIIとPSI) が別々に局在しているという生化学的解析結果と関連づけられている<sup>8)</sup>。電子顕微鏡技術によって、見えなかったものが見えるようになり、チラコイド膜の微細構造情報が明らかとなったが、解析の都合上 (固定サンプルの超薄切片を真空中にて観察するため)、生命現象における時間軸情報を犠牲にしなければならない。ここで当然考えるべき問題点は、ある一瞬における微細構造情報をもとに、どこまで想像を広げることが可能だろうかということである。

光合成研究では、クロロフィル蛍光を観察することで、クロロフィル結合タンパク質の状態について知ることができる<sup>9)</sup>。上述したように、クロロフィル分子によって吸収された光エネルギーが光化学系反応中心へ伝達される過程で、励起エネルギーが再び分子から放出されるものがクロロフィル蛍光である<sup>10)</sup>。PSII反応中心、もしくはPSI反応中心まで伝達された励起エネルギーが、その場で消費されず蛍光として放出される際、各反応中心でのエネルギー量が異なっているため、それぞれの波長に応じた分光測定をすることで蛍光の発信源を識別できる。これに基づき、光エネルギーの吸収様式 (励起方法) を工夫することで、クロロフィル結合タンパク質の配置や相互作用状態について情報を得ることができる<sup>11)</sup>。例えば、PSIIを効率良く励起する光を葉緑体に照射すると、PSIIからの蛍光強度が減少 (もしくは、PSIからのクロロフィル蛍光強度が増加) する。これは、片方の光化学

系の励起状態が変化することで、各光化学系タンパク質への励起エネルギー伝達効率が、何らかの機構によって変化している結果と考えられる<sup>12)</sup>。また、パルス変調時間分解蛍光法に基づくクロロフィル蛍光解析<sup>13)</sup>によって、同様の変化を生きた細胞を用いて測定することも可能である<sup>14)</sup>。

タンパク質に結合するクロロフィル分子から放出される蛍光を詳細に解析することで、タンパク質間における分子配置や相互作用についての情報が得られる。これは光合成研究の根幹を担う最も重要な知見である。しかし、クロロフィル分子から放出される微量な蛍光を検出する技術には制限があり、十分な強度を検出するためには、サンプル量を増やすか検出時間を延ばす必要がある。サンプル量 (例えば、細胞数) を増やした場合、異なる個性を持つ可能性のある複数の蛍光の発信源のバルクでの解析となるため、得られる情報は全体の平均値となる。そのため、個別の蛍光について検出することが難しくなり、同時に空間分解能も低くなる。また、検出時間を長くした場合、その時間内で生じる変化を識別することができなくなるため、複数の状態変化を含んだ平均値となる。ここで当然考えるべき問題点は、細胞 (葉緑体) 内で起こる多種多様な物質状態を反映する複雑な (蛍光) 情報をもとに、どこまで想像を広げることが可能だろうかということである。

### 3. 時間軸と空間スケールはどこまで同時に極限まで近づけられるか

上述した電子顕微鏡観察とクロロフィル蛍光解析は、どちらも光の特性を巧みに利用し、検出方法を工夫することで、それぞれ異なる次元の情報を導きだす。では、顕微鏡による微細領域の特定とその領域における蛍光検出を同時解析することで、異なる時間軸と空間スケールにおける現象をどこまで共通認識することができるだろうか。この問いに関して、共焦点レーザー顕微鏡を基本解析技術として、本稿では考察する。共焦点レーザー顕微鏡を用いることで、レーザー光によるクロロフィル分子の励起とその蛍光の検出を連動させ、更にレンズとピンホールによる光学的断層効果を利用することで、サンプル内のある一点の深度を限定して検出することが可能である<sup>15)</sup>。サンプル上を走査しながら同様に蛍光を検出することで、ある平面のクロロフィル蛍光強度分布を得ること

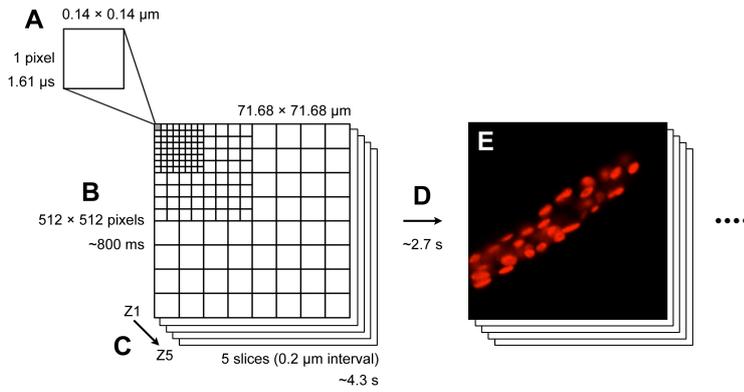


図1 共焦点レーザー顕微鏡を用いたクロロフィル蛍光観察における時空間スケール  
一般的な観察条件のある一例を本稿における観察条件とする。A. 一画素。B. 一平面。C. 異なる深度の平面を5枚連続取得することで三次元画像を構築する。D. 次の三次元画像に移る際にZ5からZ1平面に移動するのに要する時間。E. コケ植物ヒメツリガネゴケの原糸体細胞内に存在する葉緑体のクロロフィル蛍光画像。

ができる。ここでは市販されている共焦点レーザー顕微鏡における一般的な観察条件を例に考える (図1)。検出器の性能とここでの観察条件から、1画素 (0.14×0.14マイクロメートル) における検出時間は1.61マイクロ秒を費やし、512×512画素 (71.68×71.68マイクロメートル) の視野を走査するのに422ミリ秒の時間が必要である。実際には、顕微鏡装置が走査に費やす時間が各画素間に含まれるため、一平面を検出するのに約800ミリ秒を費やす。

まず、1画素の情報を得るのにかかる1.61マイクロ秒の時間について考える (図1A)。この時間スケールは、光エネルギー伝達概念<sup>16)</sup>からすると、1画素に含まれる全てのクロロフィル結合タンパク質間を励起エネルギーが移動するのに十分な時間である。更に、一平面の情報取得に費やす約800ミリ秒の時間 (図1B) があれば、PSIIに到達した励起エネルギーが光誘起電荷分離・電荷移動反応を起こし、チラコイド膜中のキノンプールの酸化還元状態の均衡を崩しだすのに十分な時間である<sup>17)</sup>。レーザー光による励起効率が高いと仮定すると、一平面に含まれる多くのクロロフィル結合タンパク質が約800ミリ秒の間に全て励起されていることになる。このような状況下では、様々な反応が進行し、一平面におけるエネルギー伝達過程の概念を見出すことは困難である。従って、1画素から得られる確かな情報は、その画素に含まれるクロロフィル分子の存在量のみであり、それ以上のことを証明するにはこの観察条件では難しい。

次に空間スケールについて考える。あくまでも数値

上だが、1画素 (0.14×0.14マイクロメートル) には、数十個のタンパク質が存在していると考えられる (図2)。すなわち、必要なタンパク質が存在していれば、一連の光合成反応が円滑に完了できる空間領域である。例えば、1画素内にPSIIとPSI、そしてそれぞれの集光アンテナタンパク質 (LHCIIとLHCI) が存在し、吸収した光エネルギーが各光化学系へと伝達される状況が充分にあり得る。また、それに基づく光合成電子伝達系も起こっていても不思議ではない。したがって、数十個のタンパク質が存在し得る1画素から検出されるクロロフィル蛍光のある一つの強度数値には、複数のタ

ンパク質の異なる光エネルギー状態の情報が含まれており、反応中心と集光アンテナタンパク質との結合様式や励起エネルギーの方向性など<sup>17)</sup>を分析するには極めて困難な空間スケールである。

葉緑体の長辺は約10マイクロメートル以下なので、一平面 (71.68×71.68マイクロメートル) の視野となると、数十個の葉緑体が存在し得る (図1E)。一つの葉緑体には、膨大な数のタンパク質が協調しながら存在しており、クロロフィル分子を結合しないタンパク質やストロマ領域に存在するタンパク質も含まれる。電子顕微鏡で観察されるグラナとストロマラメラのよう

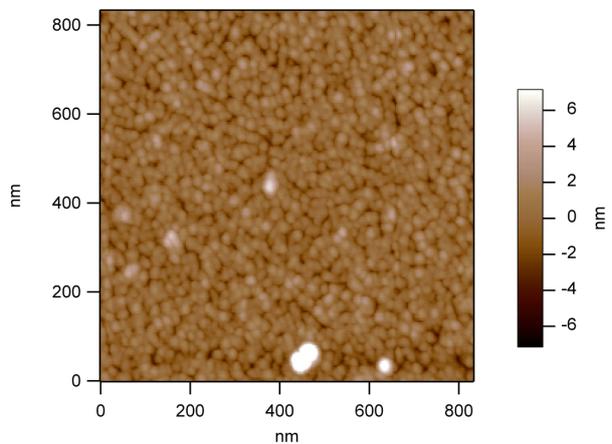


図2 一画素中に存在し得るタンパク質の数

精製した葉緑体チラコイド膜を、マイカ表面に吸着させ、原子間力顕微鏡を用いて、その表面の凹凸をナノスケールで観察した。観察は大気中で行った。個々の粒子がタンパク質を示しており、一画素 (140 × 140 nm) 中に少なくとも数十個のタンパク質が存在できることが分かる。カラーバーは高さ (相対値) を示す。

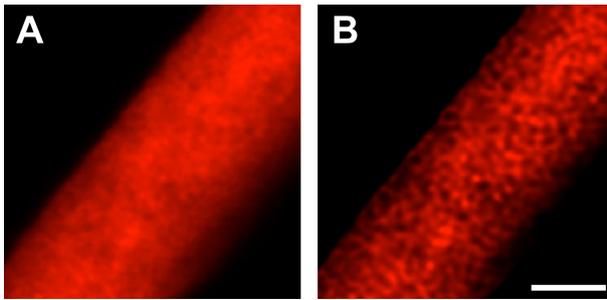


図3 画像解析による非焦点ボケの除去

共焦点レーザー顕微鏡を用いて、寒天培地上に育つコケ植物ヒメツリガネゴケ原系細胞内のクロロフィル蛍光の三次元画像を取得した。観察条件は本文中に示した通りである(図1)。寒天培地にアンピシリンを添加し育成することで、葉緑体の分裂を阻害する。その結果、一つの前系細胞に一つの巨大な葉緑体を形成する。巨大になった葉緑体は細胞内で動かなくなるので、葉緑体内のチラコイド膜の動態変化を解析するのに適した観察方法である。(A) 画像解析前は非焦点ボケが含まれるため構造が見えにくい、(B) 非焦点ボケを除去することで、葉緑体内の構造が鮮明に確認することができる。スケールバーは5マイクロメートル。

な膜構造の違いも存在する。一個体のオルガネラと言えども極めて複雑な構造を持つ葉緑体には無数のクロロフィル分子が含まれており、その存在する空間を $10 \times 10$ マイクロメートルと仮定すると、20ミリ秒以内にそのほとんど全てが均一に励起される。このような状況下で検出されるクロロフィル蛍光から、様々な反応機構に関連する仮説を正しく導き出すことは可能だろうか。不可能とは言わないが、得られた情報を検証するにはこの観察条件だけでは難しい。したがって、この空間スケールで得られる確かな情報は、クロロフィル分子の存在量とその分布のみとなる。

#### 4. 生命現象における時空間軸とその情報取得における時空間軸

共焦点レーザー顕微鏡を用いることで、生きた細胞の微細領域を観察することが可能である。生体内で常に変動する現象を解析する場合、平面だけでなく立体的な追跡が必要となるため、複数の平面情報を連続取得することで立体情報を導き出す。ここでは、上述した平面の画像取得を0.2マイクロメートル毎に5回繰り返し、高さ1マイクロメートル分の三次元画像を取得した(図1C)。この時、各平面間の移動にかかる時間(約1秒)を含めて約4.3秒の取得時間を要する。三次元画像として蛍光を取得した場合、それぞれの平面には、上下に隣接する平面からの情報(いわゆる非焦点ボケ)が混入することが多い。これは光を扱う顕微

鏡装置の特性上、避けられない問題である。しかし、光が顕微鏡装置を通過する時に起こる方向性の変化や広がり度合いを蛍光ビーズ(0.1マイクロメートル)などを用いて、その特性をあらかじめ測定することで、三次元的な情報の混入を画像処理によって除くことができる<sup>19,20)</sup>。この方法を用いることで、葉緑体に存在するクロロフィル分子の空間分布をより詳細に特定することができる(図3)。次にこの観察条件における時間軸と空間スケールの問題について考察する。

上述した画像処理によって、三次元画像に含まれる非焦点ボケを除去する際、最低でも3枚の異なる深度の平面情報が必要である。ここでは5枚の平面情報を画像処理で用いるが、これらは同時に取得されたものではなく、平面毎に約1秒間のずれが生じている。すなわち、5つの異なる位置の平面情報を用いて得られた三次元画像には、5つの異なる時間の空間情報が混在していることになる。また、葉緑体に存在するクロロフィル分子が約4.3秒間、レーザー光によって連続励起されており、この間に起こりうるエネルギー伝達機構に関する問題はあまりにも複雑すぎる。何度も述べたが、クロロフィル蛍光が検出された空間にクロロフィル分子が存在していたことは確かだと言える。しかし、一つの三次元空間分布を(特に生きた細胞を用いて)解析する場合、時間経過による局在変化を考慮する必要があり、その変化にかかる時間が短く、方向性がランダムであった場合、再構築した三次元空間分布で観察される構造は不確かな情報となる。

ここでの画像取得における時間軸と空間スケールが、どれだけ生命現象による三次元空間分布の変化に対応できるか判断するため、三次元タイムラプス解析を行った。すなわち、クロロフィル蛍光の三次元的空間分布が大きく変化していなければ、画像を連続取得しても検出される強度分布は大きく変化しないはずである。上述した観察条件で三次元画像を連続取得する場合、基準となる深度に戻る(5番目のZ平面から1番目のZ平面までの)時間(約2.7秒)を含めると画像取得間隔は約7秒となる(図1D)。三次元タイムラプス解析の結果、クロロフィル蛍光の空間分布がほとんど変化しないドット状の領域が確認された(図4、黒色領域)。同様な領域は視野に複数存在しており、大きさを見積もると直径(長軸)が平均して約500ナノメートルであることが分かった。このドット状を示すクロロフィル蛍光は、この観察での時間軸と

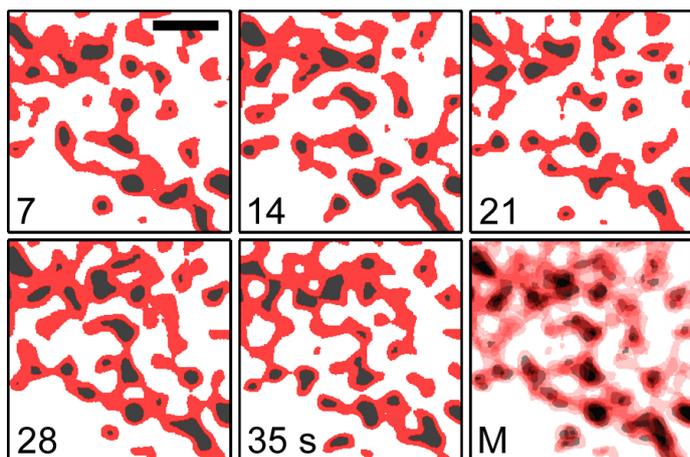


図4 ドット状領域（黒色）と細長い領域（赤色）の経時的局在変化  
 三次元タイムラプス解析から、二つの異なる蛍光強度領域を抽出すると、経時的に局在が大きく変わらない領域（黒色）と少なくとも7秒以内で局在を変える領域（赤色）を確認することができた。細長い領域がドット状領域を繋ぐような形状をしている様子が複数確認できる。数字は、経過時間を示し、Mはそれぞれを重ね合わせた図。スケールバーは2マイクロメートル。

空間スケールにおいて経時的に安定しており、その構造情報には時空間軸におけるずれがほとんど含まれていないと考えられる。これまでの電子顕微鏡観察で得られている情報<sup>4-6)</sup>を考慮すると、ドット状に観察された領域はグラナである可能性が高い。

一方、三次元タイムラプス解析でクロロフィル蛍光の空間分布が大きく変化する細長い領域を確認することもできた（図4、赤色領域）。ここでの観察条件を考慮すると、少なくとも7秒以内にこの細長い領域の空間分布は変化している。特徴的な点は、細長い領域が二つのドット状領域を結ぶように存在している点である。電子顕微鏡で観察されているストロマラメラが同様の構造的特徴を示しており<sup>3-6)</sup>、時間軸と空間スケールの問題点を敢えて無視した場合、この細長い領域はストロマラメラであると考えられる。しかし、一般的にグラナとストロマラメラには、PSIIとPSIがそれぞれ別々に局在すると考えられており<sup>8)</sup>、また室温におけるPSIからのクロロフィル蛍光の寄与が数%である<sup>21)</sup>ことが知られている。従って、この観察条件では、この細長い領域がストロマラメラであると断定することが困難であるとも考えられる。ここで重要なことは、異なる時間軸と空間スケールを有する異なる解析で得られた知見を、いかに相互認識が可能な共通の結論として導きだせるかである。では、経時的に形状を変化させる細長い領域は一体何か。ここで考えられる仮説は3つある：1) 室温でのクロロフィル蛍

光のほとんどはPSIIとLHCIIに含まれるクロロフィル分子からだと考えられているので、これらのタンパク質が経時的に激しく動く環境下（状態）にある；2) 室温では蛍光検出が難しいPSIへの励起エネルギー移動効率に変化することで、細長い領域における蛍光強度が経時的に変化している；そして、3) チラコイド膜自体が分裂と結合を繰り返している<sup>22,23)</sup>。ここでの観察条件では、これら3つの可能性について、これ以上言及することが難しい。しかし、三次元タイムラプス解析によって、生体内でのクロロフィル分子の局在領域が少なくとも二種類あることが分かった。最低7秒間は安定している領域とそうでない領域である。

## 5. 可視化された事象を不可視化しないために

本稿で紹介した共焦点レーザー顕微鏡の観察条件では、上述した時間軸と空間スケールの問題点を完全に解決することは難しい。しかし、これまでに様々な現象が分光学的クロロフィル蛍光解析によって証明されており、それらを顕微鏡で観察される現象と関連づけることは重要である。一方、共焦点レーザー顕微鏡を用いることによって、生体内の微細な空間におけるクロロフィル蛍光の観察が可能となり、上述した時空間的動態変化の情報（図4）を得ることができる。そのような情報は必ずしも通常の生化学的解析によってその実体が解明できるとは限らない<sup>24)</sup>。したがって、クロロフィル蛍光の解析方法やその原理が異なる場合、それぞれに応じた時間軸と空間スケールでの情報解釈をするべきである。また、光合成研究は蛍光解析の先駆的分野であり、一つの手法にのみ偏った解釈はもはやできないため、次元の異なる解析結果を相互に理解していくことも重要である。

本稿では一般的な共焦点レーザー顕微鏡に関して述べたが、クロロフィル分子の励起に用いる光源やクロロフィル蛍光を検出する方法を改良することで、得られる情報の範囲は大幅に広がる。例えば、パルスレーザー光による時間分解蛍光測定を各画素毎で行えば、クロロフィル蛍光寿命を微細領域で解析することができ、タンパク質のエネルギー状態の平面分布図を取得することができる<sup>25)</sup>。また、ニポウディスク方式を用いることで多焦点走査が可能となり、一平面を極めて

短い時間（5ミリ秒以下）で走査することができ<sup>26)</sup>、これを利用することで、本稿で述べた時間軸と空間スケールの問題を大幅に解消することができる。また周波数領域測定法に基づく蛍光寿命解析とニポウディスク方式による検出を融合することで、生体内チラコイド膜の微細な（グラナ・ストロマメラ）構造におけるエネルギー伝達過程（クロロフィル蛍光寿命分布）の三次元タイムラプス解析も可能である。最近では、空間分解能が極めて高い電子顕微鏡観察と光学顕微鏡による蛍光観察を同時に行う電子光子同軸顕微鏡<sup>27)</sup>の開発がされており、クロロフィル蛍光を放出するタンパク質を実際にチラコイド膜上で確認することもいずれ可能となる。将来的に検出器の感度が向上することで、顕微鏡を用いたラマン分光解析<sup>28)</sup>が実用化され、生体内でのチラコイド膜やその他の物質の挙動変化を直接追跡観察することも可能になるだろう。

20世紀に入り電子顕微鏡観察によって見えなかったものが見えるようになり、観察された構造をもとに多くの現象に関わる仮説が提唱されたことは先に述べた。その後も様々な手法による解析が進み、理論と計算で全てシミュレーションすることが可能と言われるほどの膨大な情報が存在する現代において、これまで見えなかった事象が見えるようになった時、その事象をどれだけ本質的で正しく解釈することができるだろうか。見えなかったものが見えるようにする際、検出技術が制限となるが、今後も新しい検出技術が開発され、検出感度が桁違いに向上し、これまで見えなかった生命現象が見えた瞬間、その未知なる事象とどれだけ正しく向き合えるだろうか。専門分野が異なり、想像力が異なれば、見えてくる情報の深みは様々となり、解釈の本質に違いが生じる。想像力の乏しさによって、可視化された事象が再び不可視化されないように、複数の時空間軸において広い視野を持つことを常に心がけたい。

## 6. おわりに

雑木林の間伐の仕事をするある人の言葉がとても印象的だった。「私たちは、樹木の成長のため、森林の光環境の調整のため、そして100年後の木材のため、雑木林の間伐を行っています。」めまぐるしく変動する地球環境と向き合い、長い年月がかかる樹木の成長を考えた場合、それだけの時間軸を想定しなければ、すぐに対策が後手となるそうだ。職業としては異なる

が、その言葉は光合成研究に通ずるものがある。100年後を見据えた長い時間軸と多くの樹木と対峙する広大な空間スケールでの光環境の調整は、もはや想像を絶する環境変化に立ち向かう大実験である。

第4回日本光合成学会での公開シンポジウム「30年後の光合成研究」の開催にともない、自分自身の30年後の研究について考える機会を与えていただいた。そのようなことをこれまで一度も考えたことがなかっただけに、それだけの時間軸を見据えて自分自身の研究と向き合うと、それまで見えなかった何かが見えた気がする。想像が広がることで、不可視が可視化されたのかもしれない。100年後を見据えた雑木林の間伐のような壮大な時空間スケールでの大実験とはならないかもしれないが、100年後の自分自身の研究について想像を広げることで、目の前の直近の課題の中にも、新しく見出す何かがあるかもしれない。そんな探究心を忘れず持ち続けているかどうか、30年後の自分自身にここで問いかけてみたい。

## 謝辞

本稿で紹介した筆者の研究の一部は、JSTさきがけ「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化と生産物活用のための基盤技術の創出」領域の支援のもと、理化学研究所光量子工学研究領域ライブセル分子イメージング研究チーム（中野明彦チームリーダー）において行われたもので、横野牧生博士（北海道大学）との共同研究による成果です。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。最後に、第4回日本光合成学会公開シンポジウムでの講演（2013年5月31日）と本執筆の機会を与えていただきました田中歩先生（北海道大学）、鹿内利治先生（京都大学）、佐藤直樹先生（東京大学）に感謝いたします。

*Received November 20, 2013, Accepted November 29, 2013, Published December 31, 2013*

## 参考文献

1. Gunning, B., Koenig, F. and Govindjee. (2007) A dedication to pioneers of research on chloroplast structure, in *The Structure and Function of Plastids* (Wise, R.R., and Hooper, J.K., Eds.) pp xxiii-xxxi, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
2. Wehrmeyer, W. (1964) Zur klärung der strukturellen variabilität der chloroplastengrana des spinats in profil

- und aufsicht. *Planta*. 62, 272-293.
3. Paolillo, D.J. (1970) The tree-dimensional arrangement of intergranular lamellae in chloroplasts. *J. Cell Sci.* 6, 243-255.
  4. Shimoni, E., Rav-Hon, O., Ohad, I., Brumfeld, V. and Reich, Z. (2005) Three-dimensional organization of higher-plant chloroplast thylakoid membranes revealed by electron tomography. *Plant Cell* 17, 2580-2586.
  5. Mustárdy, L., Buttle, K., Steinbach, G. and Garab, G. (2008) The three-dimensional network of the thylakoid membranes in plants: Quasihelical model of the granum-stroma assembly. *Plant Cell* 20, 2552-2559.
  6. Austin, J.R., 2nd and Staehelin, L.A. (2011) Three-dimensional architecture of grana and stroma thylakoids of higher plants as determined by electron tomography. *Plant Physiol.* 155, 1601-1611.
  7. Daum, B., Nicastro, D., Austin II, J., McIntosh, J.R. and Kühlbrandt, W. (2010) Arrangement of photosystem II and ATP synthase in chloroplast membranes of spinach and pea. *Plant Cell* 22, 1299-1312.
  8. Anderson, J.M., Insights into the consequences of grana stacking of thylakoid membranes in vascular plants: a personal perspective. (1999) *Aust. J. Plant Physiol.* 26, 625-639.
  9. Vredenberg, W.J. and Duysens, L.M. (1963) Transfer of energy from bacteriochlorophyll to a reaction centre during bacterial photosynthesis. *Nature* 197, 355-357.
  10. Mimuro, M., Nozawa, T., Tamai, N., Shimada, K., Yamazaki, I., Lin, S., Knox, R.S., Wittmershaus, B.P., Brune, D. and Blankenship, R.E. (1989) Excitation energy flow in chlorosome antennas of green photosynthetic bacteria. *J. Phys. Chem.* 93, 7503-7509.
  11. Krause, G.H. and Weiss, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 313-349.
  12. Murata, N. (1969) Control of excitation transfer in photosynthesis I. Light-induced change of chlorophyll a fluorescence in *Porphyridium cruentum*. *Biochim. Biophys. Acta* 172, 242-251.
  13. Schreiber, U., Schliwa, U. and Bilger, W. (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10, 51-62.
  14. 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.
  15. Inoué, S. (2006) Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy, in *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (Pawley, J.B., Ed.) pp 1-19, Springer Science+Business Media, LLC, New York, USA.
  16. 三室守、秋本誠志、山崎巖 (2003) 「光合成アンテナ系での励起エネルギー転移過程と転移機構 -フェムト秒、ピコ秒領域時間分解蛍光スペクトル法による解析-」 *レーザー研究*, 31, 212-218.
  17. Strasser, R.J., Srivastava, A. and Govindjee. (1995) Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.* 61, 32-42.
  18. Bernhardt, K. and Trissl, H.-W. (1999) Theories for kinetics and yields of fluorescence and photochemistry: how, if at all, can different models of antenna organization be distinguished experimentally? *Biochim. Biophys. Acta* 1409, 125-142.
  19. Agard, D.A. and Sedat, J.. (1983) Three-dimensional architecture of a polytene nucleus. *Nature* 302, 676-681.
  20. Agard, D.A., Hiraoka, Y., Shaw, P. and Sedat, J.W. (1989) Fluorescence microscopy in three dimensions. *Method. Cell Biol.* 30, 353-377.
  21. Owens, T.G., Webb, S.P., Mets, L., Alberte, R.S. and Fleming, G.R. (1987) Antenna size dependence of fluorescence decay in the core antenna of photosystem I: Estimates of charge separation and energy transfer rates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1532-1536.
  22. Cevc, G. and Richardsen, H. (1999) Lipid vesicles and membrane fusion. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 38, 207-232.
  23. Chuartzman, S.G., Nevo, R., Shimoni, E., Charuvi, D., Kiss, V., Ohad, I., Brumfeld, V. and Reich, Z. (2008) Thylakoid membrane remodeling during state transitions in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 1029-1039.
  24. Miyawaki, A. (2011) Proteins on the move: insights gained from fluorescent protein technologies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 656-668.
  25. Iwai, M., Yokono, M., Inada, N. and Minagawa, J. (2010) Live-cell imaging of photosystem II antenna dissociation during state transitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 2337-2342.
  26. Matsuura-Tokita, K., Takeuchi, M., Ichihara, A., Mikuriya, K. and Nakano, A. (2006) Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature* 441, 1007-1010.
  27. Iijima, H., Fukuda, Y., Arai, Y., Terakawa, S., Yamamoto, N. and Nagayama, K. (2013) Hybrid fluorescence and electron cryo-microscopy for simultaneous electron and photon imaging. *J. Struct. Biol.* in press.
  28. Schie, I.W. and Huser, T. (2013) Methods and applications of Raman microspectroscopy to single-cell analysis. *Appl. Spectrosc.* 67, 813-828.

## Imaging Chlorophyll Fluorescence at Multiple Spatiotemporal Scales

Masakazu Iwai\*

Live Cell Molecular Imaging Research Team, RIKEN Center for Advanced Photonics / JST PRESTO

## 恩師のノーベル化学賞受賞に寄せて<sup>‡</sup>

大阪大学 大学院理学研究科 生物科学専攻  
石北 央\*

2013年のノーベル化学賞受賞者の一人Arieh Warshel教授（南カリフォルニア大学）は、蛋白質の理論化学研究分野の発展、特に計算化学手法の開発に多大な貢献をした。一方で、数多くの理論化学研究者を差し置いて彼がノーベル賞を受賞した理由は、計算化学の枠にとどまらない、蛋白質科学における重要な基本概念をいくつも明らかにしてきたことであろう。例えば、誰もが本来「知っている」はずの水素結合の概念を基本から見直すことで、多くの研究者の「低障壁水素結合」への誤った理解に警鐘を鳴らした。群れをなさず、権威に媚びず、そして子供のように好奇心旺盛。それがArieh Warshelであり、科学者とは本来そうあるべきである。

### 1. はじめに

2013年のノーベル化学賞は、蛋白質の理論計算化学分野の発展に大きく貢献した3名に贈られた。光合成とは関係ないだろうと思うかもしれないが、そのうちの一人、Arieh Warshel教授（University of Southern California : USC、南カリフォルニア大学）は、私の恩師である。さぞかし多くの日本人がWarshelのラボで研究していたのではと思うかも知れないが、南カリフォルニア大学の彼のラボにポスドク研究員として研究していた日本人は、現状では私が最初で最後であるのは摩訶不思議である。もっとも、いったんノーベル賞を受賞すると、人は手のひらを返したようにぞろぞろ行くのかもしれない。そういう意味では、ポスドク時の私には、表層的なことにとらわれずに人を見る目があったのかも知れない、と思うことにしておきたい。ここではWarshelと関連ある研究について取り上げてみる。

### 2. 蛋白質中における水素結合の解析手法

蛋白質中の水素結合の様子を調べるにはどうすればよいだろうか？ 例えば、FTIR（Fourier transform infrared spectroscopy）分光法や核磁気共鳴分光法（Nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR）を利用すると、蛋白質中の水素結合の強度を調べることができる。特に水分子がドナーとして関与する水素結合では、重水置換の場合、O-D伸縮振動の大きさによって水素結合

の状態を知ることができる。水分子間の理想的な水素結合におけるO-O結合距離は2.8 Å付近を中心に分布し、O-D伸縮振動数は2500 cm<sup>-1</sup>程度となる<sup>1)</sup>。強い水素結合では、ドナーO-DのDがより強くアクセプターのOに引かれるため、O-D…OのO-Oは短くなり、逆にO-Dは伸びる。強い水素結合におけるこのO-Dの伸びは、<sup>1</sup>H-NMRで大きな化学シフト値となって観測される<sup>2)</sup>。またFTIRでは、O-D伸縮振動数の低下（例 2200 cm<sup>-1</sup>）となって現れる<sup>1)</sup>。

### 3. 水素結合とドナー・アクセプターのpK<sub>a</sub>

二つの酸素原子間に形成される水素結合O-H…Oを例として説明する。水素結合には、水素結合ドナー（H-bond donor）とアクセプター（acceptor）の両者が必要である。ここで、ドナーとはプロトンがより強く結びついている側、つまり（結合距離が短い）O-H側、アクセプターとは（距離が長い）H…O側である。しかし、結合距離にはいろいろな要素が含まれるため、pK<sub>a</sub>が高い部位（＝プロトン・アフィニティーが高い部位）が水素結合ドナー、低い部位が水素結合アクセプターと理解するのがよい（pK<sub>a</sub>をプロトン・アフィニティーと言い換えてもよいが、溶媒和を含んでいるのでpK<sub>a</sub>と呼ぶほうが適切。）例えばアルコール-OH（pK<sub>a</sub>~16）とカルボン酸-COO<sup>-</sup>（~4）間に生じる水素結合-OH…OOC<sup>-</sup>では、（pK<sub>a</sub>より）ドナーはアルコール側、アクセプターはカルボキシル基側である。

<sup>‡</sup> 解説特集「30年後の光合成研究」

\* 連絡先 E-mail: hiro@bio.sci.osaka-u.ac.jp

以上の話は水素結合のポテンシャルをみるとわかりやすい。プロトンは $pK_a$ が高い側を好むので、ドナー側ならエネルギーは低くてすむ。従って、通常の水素結合 (standard H-bond) のポテンシャルでは、(アクセプターに比べて $pK_a$ が高い) ドナー側に深い谷が存在し、左右非対称の形となる。つまり、通常の水素結合ではアクセプター側にプロトン移動するには大きなエネルギーが要ることがわかる (図1左)。

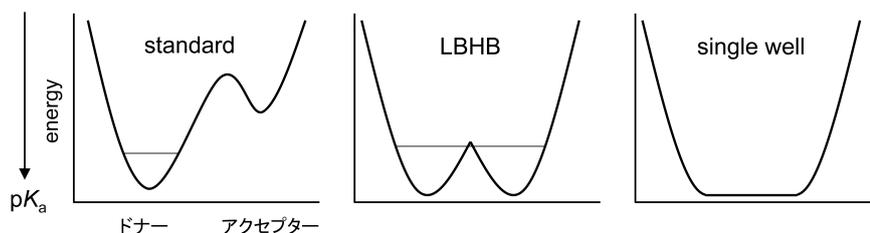


図1 典型的な水素結合ポテンシャル

(左) standard H-bond (通常の水素結合)、(中) low-barrier H-bond (LBHB、低障壁水素結合)、(右) single-well H-bond。縦軸: energyが下がる向きは部位の $pK_a$ が上がる向きに対応する。LBHB、single wellではドナーとアクセプターの明確な差はもはやない。

#### 4. 低障壁水素結合とは？

さて、もしドナーとアクセプターの $pK_a$ 値がほぼ一致すると水素結合はどうなるだろうか？当然ポテンシャルは左右対称の形となり、一般的にlow-barrier H-bond (LBHB、低障壁水素結合、図1中)、あるいはsingle-well H-bond (図1右) と呼ばれる水素結合となる (両者を対称性水素結合と呼ぶ)。両者の区別は必ずしも絶対的ではないが、対称性水素結合の条件「 $pK_a$ 一致」はどの研究者も認める事項である<sup>3,4)</sup>。なお誤解されやすいが、single-well H-bondでも、通常はHがドナー・アクセプターOの midpoint に位置するわけではない。真ん中に存在するならばプロトン移動中の過渡的で不安定な状態である。(1分子にカルボキシル基2個を持つ) マレイン酸の分子内single-well H-bondですら、Hは結合の真ん中には存在せず(実際のポテンシャルは完全に水平ではない)、O原子に近い部位により分布しやすい<sup>5)</sup>。

「LBHB」の概念や定義はしばしば曖昧であった<sup>4,6)</sup>。酵素活性部位でのLBHBの存在を論じたCleland<sup>7)</sup>やFrey<sup>3)</sup>の論文がScience誌に発表された後は、蛋白質内の短い水素結合に対し慎重な検証もなく安易にLBHBと結論づける風潮も見られた。ここでは、蛋白質におけるLBHBの特徴を改めて整理してみたい。

蛋白質内におけるLBHBの特徴に関しては、結晶構造解析、プロトン核磁気共鳴 (<sup>1</sup>H-NMR)、理論化学等を中心とした研究手法の立場からそれぞれの主張がなされてきた。

(NMRケミカルシフト( $\delta H$ )と水素結合長) 「強い水素

結合」においては、H原子はアクセプター側のO原子に引かれる傾向にあるため、電子の遮蔽効果が少なく、NMRでは低磁場側にシフトし大きな $\delta H$ 値を示す。Jeffrey<sup>8)</sup>やFrey<sup>9)</sup>によると、水素結合は $\delta H$ 値やO-O結合長のサイズにより以下のように分類できる。①ionic (single-well) H bond ( $\delta H = 20-22$  ppm, O-O結合長 = 2.4-2.5 Å)、②LBHB ( $\delta H = 17-19$  ppm, O-O結合長 = 2.5-2.6 Å)、③weak H bond ( $\delta H = 10-12$  ppm, O-O結合長 > 2.6 Å)。O-O結合長は、ionic H bondが最も短く、LBHBはそこまでは短くない (図1)。

( $pK_a$ 値) Warshelよれば、結合長だけによるLBHBの判断は適切でなく、水素結合のポテンシャルエネルギー曲線が左右対称であることが必要である<sup>4)</sup> (図1)。ポテンシャルエネルギー曲線は、蛋白質環境内でのドナー・アクセプターの $pK_a$ 値を知ることができれば、ある程度予測がつく。通常の水素結合 (= asymmetric double well potential) では、ドナー側の $pK_a$ 値が、アクセプター側の $pK_a$ 値より高い (= H原子がドナー側に引きつけられている)。なお、 $pK_a$ の大・小関係は、ポテンシャルエネルギーの低・高に対応する (図1)。一方、ionic (single-well) H bondやLBHB形成においては、ドナー側とアクセプター側の $pK_a$ 値がほぼ一致することが必須である。この条件は、Cleland<sup>7)</sup>やFrey<sup>3)</sup>の論文にも明記されており、多くの研究者が同意する特徴である。

(共有結合性) 通常の水素結合は $H^{\delta+}$ と $O^{\delta-}$ のような分極をもつ結合である。一方、LBHBでは、H原子が二つのO原子間を行き来できるため、電荷がドナーからアクセプター領域において非局在化して共有結合性をもつ<sup>3,7)</sup>。しかし、「LBHBの共有結合性」に関しては、これを唱え始めたClelandらの主張<sup>7)</sup>を慎重に検証

する必要がある。Clelandによると、蛋白質内部は「無極性溶媒」のようなものであるため、電荷が非局在化したLBHBは容易に形成され得る、とのことである。しかし、「疎水的環境＝無極性溶媒」は正しい理解ではない。

蛋白質内部には、蛋白質構成原子のvan der Waals半径（体積）により、水分子は入り込みにくい。その結果、蛋白質内部では、水分子によるsolvation energyが得られにくい。これこそが「蛋白質内部の疎水性」である。一方、蛋白質内部には無極性溶媒とは異なり、多くのdipoleが存在する。極性アミノ酸側鎖だけでなく、主鎖カルボニル基 $C^{δ+}=O^{δ-}$ は強く分極しており、蛋白質内での電荷の安定に大きく貢献する<sup>10,11</sup>。さらに、蛋白質中での静電相互作用は、バルク水中のように遮蔽されず、強い。このような場では、分極している通常の水素結合なら安定化効果を得られるが、電荷が非局在化しているLBHBでは小さい。

## 5. プロトン移動が起こる際の水素結合の様子

ドナーとアクセプターの $pK_a$ 一致は対称性水素結合の条件<sup>3,4</sup>であるが、同時にプロトン移動が最も起こりやすい条件でもある<sup>12</sup>。 $pK_a$ の一致でカップリングは最大となるため<sup>13</sup>、対称性水素結合は2つの分子種が取り得る最短の水素結合である。このような議論から、アクセプター側の $pK_a$ が上昇し、ドナー側の $pK_a$ とほぼ同じになった際、水素結合は最短となることが理解できる。それは両部位のカップリングが最大となるからであり、水素結合内でのプロトン移動が最も容易となる<sup>12,13</sup>。このように、対称性水素結合はプロトン移動と関係が深い。例えば、蛋白質中の水分子クラスターでは、プロトンが外部から来ると、ドナーもアクセプターも水分子なので $pK_a$ の一致が容易に行え（＝ドナー $H_3O^+$ の脱プロトン化とアクセプター $H_2O$ のプロトン化）、対称性水素結合（ $H_2O \cdots H-OH_2^+$ ）が生じプロトン移動経路になりやすい。

一方で、水素結合内（ $pK_a$ : ドナー>アクセプター）のプロトンがアクセプター側へ移動するためには、 $pK_a$ を変えるのに十分な構造変化、酸化状態変化等が必要である。例えばバクテリオロドプシンではシッフ塩基からプロトン移動が開始することが知られているが、そのトリガーは、レチナルのtrans-cis光異性化に由来する $pK_a$ 変化である<sup>14</sup>。

酸素発生を行う光合成蛋白質Photosystem II (PSII) のキノン分子 $Q_B$ は、反応中心部位にあるクロロフィル分子の光励起によって開始される2回の電子移動と、それに伴って起こる2回のプロトン移動により $Q_B^{\bullet-}$ 、 $Q_BH^{\bullet}$  状態を経て最終的に $Q_BH_2$ となる。ここでのプロトン移動のきっかけは、電子移動による $Q_B$ の還元（負電荷）による $Q_B$ カルボニル基の $pK_a$ 変化である<sup>15</sup>。プロトン移動が起こる際は、水素結合ドナーのアミノ酸と $Q_B$ 間に非常に短い対称性水素結合が生じる<sup>16</sup>。水素結合内でプロトン移動が起こる過渡的な状況で、短い対称性水素結合が生じる。ドナー・アクセプター間で $pK_a$ が等しい対称性水素結合ではドナー・アクセプターの性格の差を薄めることになるので、（通常起こりにくい）ドナーからプロトンを放出しやすくするのは都合がよい。逆に、（本来の $pK_a$ が大きく異なる部位同士の場合は特に）対称性水素結合を初期・定常状態等で維持し続けることはエネルギー的には得策ではない<sup>5</sup>。多くの場合、対称性水素結合は励起や電子移動のエネルギーを用いることで初めて過渡的に作り出せる。それが証拠に、対称性水素結合の出現・プロトン移動後には、PSIIでも水素結合崩壊と $Q_BH_2$ の蛋白質結合サイトからの遊離といった構造変化に絡んだ大きなイベントが待ち受けている。

## 6. “The LBHB proposal revisited”

LBHBは i) 「短い水素結合」である。また、水素の移動においてバリアが小さいため、水素はドナー・アクセプター間に ii) 「非局在化」する。「短い結合ほど強い」「（本来分極しているはずの水素結合が）非局在化することは共有結合性を持つことを意味している」という都合のいい解釈を著名な人たちが権威ある雑誌上で言い出すと、多くの研究者たちは簡単に引きずられてしまうのは、今も昔も同じである。周囲の顔をうかがわずにものごとの「中身」を自ら判断して、堂々と意見を述べることができる研究者はいったいどれほどいるだろうか。

そこに、堂々と自分の意見を述べたのがWarshelである<sup>4,17</sup>。Warshelは蛋白質の計算化学の手法開発にも多大な貢献をしたが、（他の同業者ではなく）彼がノーベル賞を受賞した理由は、それだけにとどまらず、計算化学の枠を超越した蛋白質科学における重要ないくつかの基本概念を、たとえ他の著名な研究者らが自分と逆の意見であろうが、他人の顔をうか

がわず主張したことにあると私は思う。

この件に関してWarshelが誰にでもわかりやすい形でまとめてあげたことは、次の点につきる。「ドナー・アクセプターの $pK_a$ が一致した水素結合がLBHBであり、それ故、salt-bridgeのように ( $pK_a$ 差が大きいため) 分極がはっきりしている水素結合とは相反した性質を持つ。だから、溶媒和安定効果を得ることができず、極性環境ではエネルギー的に安定ではなく、決して強い結合ではない<sup>4,17)</sup>。」科学としてはごくあたりまえなことをWarshelは述べただけに過ぎないが、大多数が狂信的に権威を支持する中で、当たり前のことを言うことはとても難しいことだと思う。この「当たり前のこと」を多くの人ができないからこそ、実行できる人は偉人であり、ノーベル化学賞を受賞する人とはそういう人なのかも知れない (図2)。

### 謝辞

共に研究を行った斉藤圭亮博士 (大阪大学) に感謝申し上げます。

Received November 10, 2013, Accepted November 26, 2013, Published December 31, 2013

### 参考文献

1. Mikenda, W. (1986) Stretching frequency versus bond distance correlation of O-D(H)...Y (Y = N, O, S, Se, Cl, Br, I) hydrogen bonds in solid hydrates. *J. Mol. Struct.* 147, 1-15.
2. Saito, K. and Ishikita, H. (2012) H atom positions and nuclear magnetic resonance chemical shifts of short H bonds in photoactive yellow protein. *Biochemistry* 51, 1171-1177.
3. Frey, P.A., Whitt, S.A. and Tobin, J.B. (1994) A low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine proteases. *Science* 264, 1927-1930.
4. Schutz, C.N. and Warshel, A. (2004) The low barrier hydrogen bond (LBHB) proposal revisited: the case of the Asp...His pair in serine proteases. *Proteins* 55, 711-723.
5. Perrin, C.L. (2010) Are short, low-barrier hydrogen bonds unusually strong? *Acc. Chem. Res.* 43, 1550-1557.
6. Perrin, C.L. and Nielson, J.B. (1997) "Strong" hydrogen bonds in chemistry and biology. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 48, 511-544.



図2 Arieh Warshel教授とそのpostdocであった筆者 (2008年頃、Los Angelesにて)。

7. Cleland, W.W. and Kreevoy, M.M. (1994) Low-barrier hydrogen bonds and enzymic catalysis. *Science* 264, 1887-1890.
8. Jeffrey, G.A. (1997) *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press, Oxford, UK.
9. Frey, P. A. (2006) in *Isotope Effects in Chemistry and Biology* (Kohen, A. and Limbach, H.-H., Eds.), pp 975-993, CRC press, Boca Raton, FL, USA.
10. Ishikita, H. Saenger, W., Biesiadka, J., Loll, B. and Knapp, E.-W. (2006) How photosynthetic reaction centers control oxidation power in chlorophyll pairs P680, P700 and P870. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 9855-9860.
11. Ishikita, H. (2007) Contributions of protein environment to redox potentials of quinones in flavodoxins from *Clostridium beijerinckii*. *J. Biol. Chem.* 282, 25240-25246.
12. Eigen, M. (1964) Proton transfer, acid-base catalysis, and enzymatic hydrolysis. Part I: Elementary processes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 3, 1-19.
13. Hammes-Schiffer, S. (2001) Theoretical perspectives on proton-coupled electron transfer reactions. *Acc. Chem. Res.* 34, 273-281.
14. Saito, K., Kandori, H. and Ishikita, H. (2012) Factors that differentiate the H-bond strengths of water near the Schiff bases in bacteriorhodopsin and Anabaena sensory rhodopsin. *J. Biol. Chem.* 287, 34009-34018.
15. Ishikita, H. and Knapp, E.-W. (2005) Control of quinone redox potentials in photosystem II: electron transfer and photoprotection. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 14714-14720.
16. Saito, K., Rutherford, A.W. and Ishikita, H. (2013) Mechanism of proton-coupled quinone reduction in Photosystem II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 954-959.
17. Warshel, A., Papazyan, A. and Kollman, P.A. (1995) On low-barrier hydrogen bonds and enzyme catalysis. *Science* 269, 102-106.

Dear Arieh, a laureate of the Nobel Prize in Chemistry 2013

Hiroshi Ishikita\*

Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University

## 解説

フィールド・トランスクリプトミクスから30年後の生物学を考える<sup>‡</sup>京都大学 生態学研究センター/JST さきがけ  
永野 惇\*

植物の本来の生育環境である野外では、温度や光などが刻一刻と複雑に変化する。単純にコントロールされた実験室環境における研究のみから、複雑に変化する野外環境に対して植物がどのように応答しているのかを類推することは難しい。我々は、野外圃場における大量のイネのトランスクリプトームデータと気象データを統計モデリングによって解析することでこの問題に答えた。同時に、葉で発現の見られる大半の遺伝子に関して発現のシミュレーションが可能となった。最後にフィールド・トランスクリプトミクスの立場から、「予測」・「設計」・「制御」へ向けた展望をのべる。

## 1. はじめに

近年の植物の分子生物学的研究は、そのほとんどが実験室内で行われている。栽培環境・実験環境を可能な限りコントロールし、研究対象としている要因以外を極力そろえた条件で実験を行う、というのが基本姿勢である。このようなアプローチによって、植物の様々な側面に関する詳細な分子機構が明らかにされてきた。もちろん、今後もさらに精緻な実験によって、多くのことが明らかにされていくことだろう。

一方で植物の本来の生育環境は実験室ではなく野外であることは言うまでもない。野生植物であれば自然環境下で生育し、作物であれば圃場で栽培される。となれば、実際に野外環境下で起こっていることを理解する必要があるだろう。ここで問題になるのが、野外環境の複雑さである。先にふれたように、実験室では気温・光を一定にするなど、比較的単純な条件にコントロールして植物を栽培する。一方、野外では激しく変動する(図1)。兵庫県における気温を例に見ると、まず日周変動がある(図1A)。ほとんどの日では、1日の中で昼は暖かく夜は涼しい。季節にもよるが昼夜の気温差は10°C以上になることも多い。より長いスパンでみると年周変動を見ることが出来るし(図1B)、より短いスパンでみると分オーダーの変動も存在する。このように複雑に変動する野外環境に対して、生物はどのように応答しているのだろうか。単純な環境にコントロールされた実験室で得られた知見から、野外で

起こっていることを想像するのは容易ではない。例えば、ある実験で高温に対する応答を、25°Cのインキュベーターから35°Cのインキュベーターに移すことで調べたとしよう。温度変化に対する応答の分子機構を明らかにするためには十分なセッティングかもしれない。しかしながら、野外での気温は細かい変動を繰り返しながら徐々に変わっていく。仮に明け方の最低気温が25°C、昼過ぎの最高気温が35°Cだったとすると、

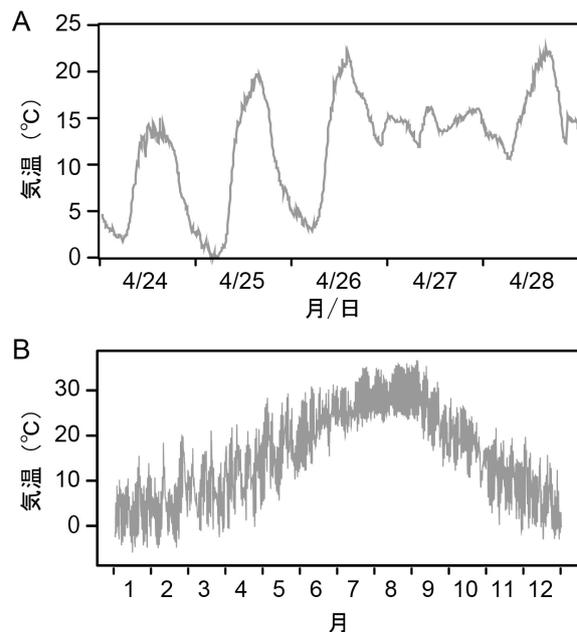


図1 (A) 2010年4月24日から28日の兵庫県西脇のアメダス気温データ。4月27日は雨天のため日中の気温上昇がみられない。(B) 2010年の兵庫県西脇のアメダス気温時別平均データ。

<sup>‡</sup> 解説特集「30年後の光合成研究」

\* 連絡先 E-mail: anagano@gr.bot.kyoto-u.ac.jp

数時間かけて変化が起こることになる。数分で25°Cから35°Cになる場合と、数時間かけて25°Cから35°Cになる場合で植物の応答が根本的に異なっているかもしれない。そう考えると、一口に高温応答といっても実験の条件設定はいくらでもありうる事が分かる。それならばいつそのこと、実際の野外環境で植物の応答を調べてみるのが、手取り早い方法の一つだろう。

では、何を測定するべきか。野外での栽培や研究は一般に実験室で行う場合より労力がかかる。また、環境条件は自然任せになるため栽培シーズンが限られ、多くの場合、年に1回きりのチャンスで可能な限りのことをすることになる。そのため、なるべく沢山の項目をまとめて測れて、定量性が良いものが良いと考えられる。そのような条件を満たすもののひとつが、トランスクリプトームである。DNAマイクロアレイやRNA-Seqによるトランスクリプトミクスは網羅性・定量性ともに高い。その網羅性ゆえに、トランスクリプトームデータは直接的・間接的に様々な生物現象を反映していると期待できるだろう。また、遺伝子発現は数分から数時間で変動しうること、その変化の幅はときに100倍以上になることが明らかになっている<sup>1,2)</sup>。このように短時間で大きく変動しうる性質からも、トランスクリプトームは野外環境下における植物の環境応答を知るための測定対象として適していると考えられる。

## 2. フィールド・トランスクリプトミクス：野外環境下での遺伝子発現研究

これまでに、野外環境下での遺伝子発現研究はいくつか行われている。トランスクリプトームレベルのデータがとられているものに限っても、イネ<sup>3-5)</sup>、シロイヌナズナ<sup>6)</sup>、トウモロコシ<sup>7)</sup>、*Andropogon gerardii*<sup>8)</sup>、*Populus tremula*<sup>9)</sup>、*Shorea beccariana*<sup>10)</sup>、変わったところではサンゴと共生藻<sup>11)</sup>などがある。また、最近では海洋のメタトランスクリプトームの日周変動解析<sup>12)</sup>も報告されている。もちろん、これらのすべてが気象データなどとの関係を解析しているわけではない。目的とする特定の現象を解析するためのデザインで行われた実験においては、野外環境下における気象条件の変動はむしろ背景のノイズとみなされている。イネでは、通常の栽培期間を通じた変化<sup>3)</sup>や、FACEにおける応答<sup>4)</sup>、野生型と概日時計関連遺伝子の変異体 (*osgi*) に

おける日周変動の比較<sup>5)</sup>を行った研究があるが、気温など気象条件の変動の影響は評価されていない。シロイヌナズナ<sup>6)</sup>、*Andropogon gerardii*<sup>8)</sup>、*Populus tremula*<sup>9)</sup>を用いた研究では気象データとの関係を解析している。なかなか直観的な解釈は難しいものの、いずれも何らかのパターンは見出しており、一定の成果が得られている。例えば、いずれの研究でも温度の影響が検出されている。しかしながら一方で、サンプリング時点数(日数)が少ないことなど様々な原因から、それ以上の踏み込んだ議論が難しい結果になっている。

ここでトランスクリプトーム解析ではないものの、結果が比較的明瞭で解釈しやすい研究をひとつ紹介したい。相川らは、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に近縁な多年草のハクサンハタザオ (*Arabidopsis halleri*) の兵庫県の自生集団を用いて、週に1回、正午の葉のサンプリングを2年間行い、*FLC* オーソログ (*AhgFLC*) の発現を定量PCRによって測定した<sup>13)</sup>。*FLC*は花成の抑制因子であり、シロイヌナズナでは低温処理によって発現が抑制され、その結果、花成が誘導されることが良く知られている<sup>14)</sup>。先述の定量PCRの結果から、野生のハクサンハタザオ集団において、*AhgFLC*の発現は晩秋から冬にかけて徐々に低下していくことが明らかになった(図2)。春になると再び発現が上昇し始め、夏前にはピーク

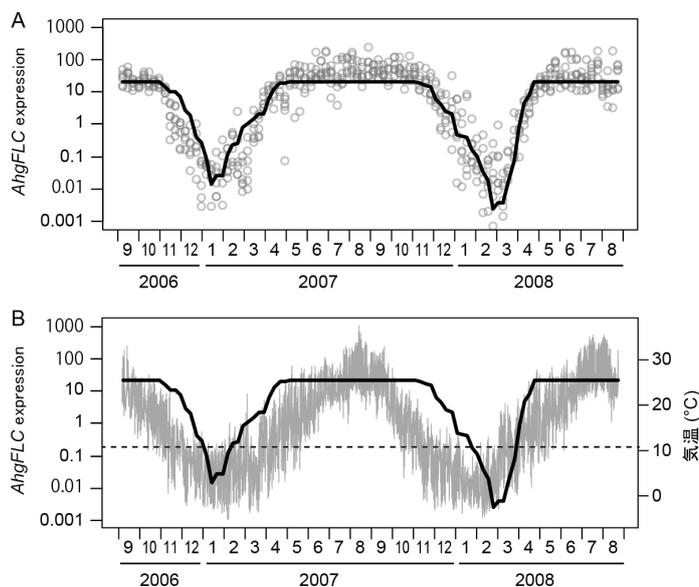


図2 (A) 兵庫の自生集団におけるハクサンハタザオ *AhgFLC* 遺伝子の発現量変動。週に1回、正午に6個体からの葉のサンプリングを行った。定量PCRによる実測値(灰色の円)とモデルから期待される予測量(黒線)。(B) 気温の実測値(灰色線)とモデルから期待される *AhgFLC* 遺伝子の予測量(黒線)。

レベルまで戻る。ハクサンハタザオのこの集団では2月末～3月初旬に抽台、4月末ごろに開花、5～6月にかけてリバージョン（花茎先端からロゼット葉、根が形成され、花茎が倒れて接地し新しい個体として定着する）がおこる。これらのイベントは、*AhgFLC*の発現の変動と密接に関係していると考えられる。

では、このような*AhgFLC*の発現パターンは気温によって説明されるのだろうか。気温の影響を受けるとした場合、ある時点のmRNAの蓄積量はその時点の気温だけで決まるわけではなく、その時点に至るまでの気温の影響も受けると考えられる。これを表現する一つの方法として、積算温度という考え方がある。“過去一定期間に温度がどのくらい閾値を超えた（あるいは下回った）か”が積算温度である。閾値を超えるかどうかが重要でどのくらい超えたかが関係ない場合は“閾値以上の温度に曝された時間の積算”と言いかえることができ、閾値を大きく超えた場合は大きな効果があると考えられる場合は“閾値以上の温度の過去一定期間における積分”となる。このような考え方は生態学におけるフェノロジーのモデリングや植生予測、農業における収穫タイミングの予測などに広く用いられている<sup>15,16)</sup>。*AhgFLC*の発現は低温の影響を受けると予想されるので、過去一定期間において閾値以下の温度に曝された時間の積算が発現量を説明すると仮定したモデルによる解析が行われた。その結果、*AhgFLC*の発現の変動を最もよく説明したのは、過去42日間の10.5°C以下の温度の積算であった。驚くべきことにこの温度の情報のみで、2年間の発現変動のうち83%が説明された。さらに、このモデルはグロースチャンバーを用いて人工的に気温をコントロールした場合の応答も高い精度で予測することが出来た。これらの結果から、積算温度を用いたモデルは、遺伝子発現変動のモデリングにおいても役立つことが分かる。

### 3. イネを用いたフィールド・トランスクリプトミクス

話をトランスクリプトームに戻し、著者が関わったプロジェクトを紹介する<sup>17)</sup>。2008年から、イネの圃場でのトランスクリプトーム解析を通じて、複雑に

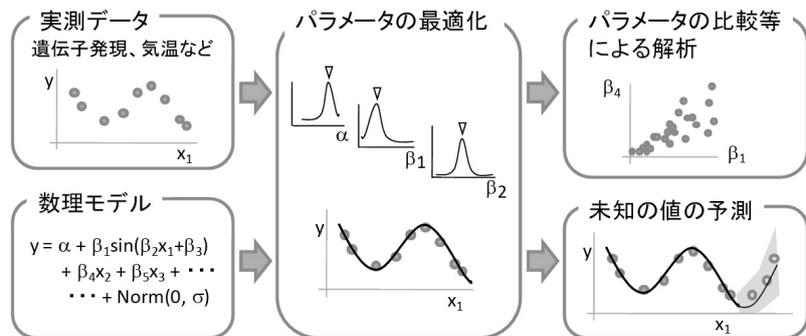


図3 統計モデリングのイメージ

変動する野外環境への応答を探る試みがスタートした。まず、6月から9月にかけて461サンプルの葉を収集した。の中には、9セットの2時間おき48時間サンプル（豪雨が観測された日を含む）や、毎週火曜の12時と24時のサンプルなど様々な時刻・気象条件のサンプルが含まれている。これらのサンプルから、DNAマイクロアレイによってトランスクリプトームデータを得た。次に気象データは気象庁が測定・提供しているものを利用することとした。トランスクリプトーム解析用のイネを栽培していたつくばの農業生物資源研究所実験圃場から3kmほどの距離に気象庁の地上気象観測地点があり、1分ごとの気温、相対湿度、気圧、風向・風速、全天日射量、降水量などのデータが利用可能となっている。

500枚近いマイクロアレイデータと20万分以上の気象データが手元に集まった。次はそれらを、どのように解析すれば変動する野外環境とトランスクリプトームの関係性を明らかにできるか、というのが問題になる。解析の切り口は幾通りもありうる。それらの中から最終的に得たい情報にあわせた手法を選ぶことが肝要である。いくつかの解析手法を検討した結果、統計モデリングと呼ばれるアプローチを採用した（図3）。統計モデリングでは最終的に解釈したい切り口を仮定として与えて解析できるため、結果を生物学者が解釈しやすいというメリットがある。統計モデリングにおいては説明される側のデータ（例えば遺伝子発現量）と説明する側のデータ（気温やサンプリング時刻など）の間の関係を数式で表す必要がある。例えば、概日時計に由来するサンプリング時刻に依存した発現変動は正弦関数を用いた。また、気温などの環境要因からの影響は、前節で説明したような積算温度のモデルを拡張して用いた。積算“温度”のみではなく、相対湿度、気圧、風速、全天日射量、降水量も含めた

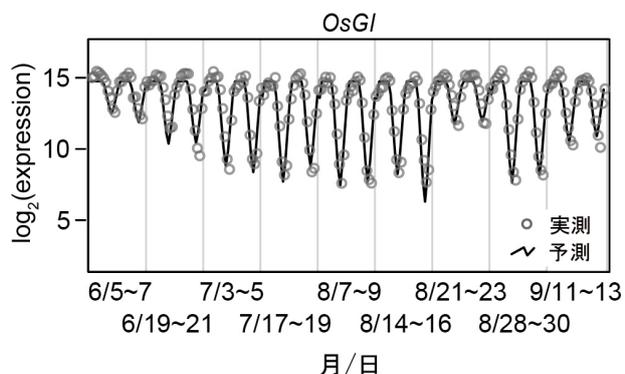


図4 9セットの2時間おき48時間サンプルにおけるイネ*OsGI*遺伝子の発現量。マイクロアレイによる実測値（灰色の円）とモデルから期待される予測量（黒線）。

6通りの気象データから、最もよく発現を説明するデータを各遺伝子について選ぶこととした。さらに、一日のうち特定の時間帯のみ環境応答を示す現象（ゲート効果）を表現できるようにした。モデルの詳細や計算上の工夫などは省くが、遺伝子ごとに最大17パラメータを最適化する計算を行った。大型計算機を用いた2カ月の計算の結果、葉での遺伝子発現を発現が見られた遺伝子のうち96.7%について予測可能なモデル・パラメータを得ることができた。このことは、パラメータの最適化に用いたのは別の年（2009年、2010年）の野外サンプルのデータや、実験室で温度条件・光条件を変えて栽培した際のデータ149サンプル分を用いて検証済みである。なお、個々の遺伝子のモデリング結果はデータベース（FIT-DB : <http://fitdb.dna.affrc.go.jp/>）として公開している。

例として*OsGI*遺伝子の結果を示した（図4）。*OsGI*はシロイヌナズナの*GI*遺伝子のオーソログであり、概日時計に関わる遺伝子であることが変異体の解析から示されている<sup>5)</sup>。そのことから予想される通り、明瞭な日周期の変動がみられた。加えて、日によって大きく振幅が異なっていることもわかった。モデリングの結果、*OsGI*の発現変動は、過去約6時間の14.8°C以上の気温の積算で、かつ21時すぎから5時前の間のみ気温に感受性と考えた場合最もよく説明できた。すなわち、振幅の違いは夜間の気温の違いによって説明でき、夜間の気温が高いほど振幅が大きくなるということが明らかになった。さらにトランスクリプトームワイドな結果の解析から、例えば、野外環境下でのトランスクリプトームの変動には、概日時計の影響が最も大きく、次に温度・光などへの環境応答が大きく、植物の日齢はそれほど影響しないことが

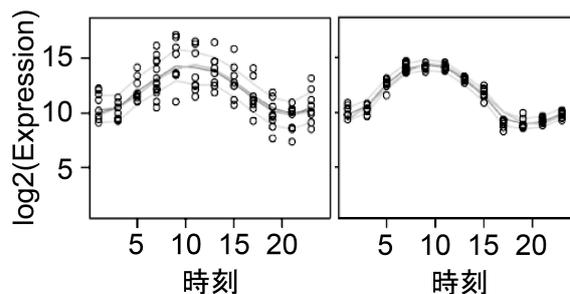


図5 良く似た日周の発現変動を示すが個体間の確率的な“ゆらぎ”の大きさが異なる遺伝子の例。(A) ゆらぎの大きい遺伝子、(B) ゆらぎの小さい遺伝子。

分かった。また、環境応答の中では温度の影響が特に大きいこと（環境応答を示す遺伝子の約8割が温度に対して応答）や、一日のうち特定の時間帯のみ環境応答を示す現象（ゲート効果）が多くの遺伝子で見られること（環境応答を示す遺伝子の約3割）を明らかにした。さらに、概日時計や環境応答などの決定論的な変動では説明できない個体間の確率的な“ゆらぎ”の大きさが遺伝子ごとに異なっており（図5）、リボソームやヒストンなど基本的な細胞機能に関わる遺伝子では小さく、病害応答などの外的な刺激に関わる遺伝子では大きいことを発見した。また、得られたモデルを用いて、任意の環境下でのトランスクリプトームを予測することも可能である。仮に、つくばの気温に対して平均気温が5°C上昇した場合、どのような遺伝子の発現に影響が出るかをシミュレーションした。その結果、light harvesting complexの遺伝子やセルロース合成酵素の遺伝子に特に大きな影響が出るという予測が得られた。もちろん、予測の精度に関しては今後慎重な検討が必要である。

#### 4. 30年後への展望、「予測」・「設計」・「制御」へむけて

30年度の光合成研究、あるいは生物学研究を正確に予測することは、言うまでもなく極めて困難だろう。しかしながら、このような方向に進んでいきたい、という展望を述べることはできる。僭越ながら、特にフィールド・トランスクリプトミクスの立場から、30年後に向けた展望を述べさせていただきたい。キーワードは、「予測」・「設計」・「制御」である。

前節で紹介した研究によって、野外環境下におけるトランスクリプトームの予測はある程度は可能になった。となれば、次は遺伝子発現をもとに形質の予測を

行いたいと考えるのが自然だろう。ほとんどの場合、最終的に興味があるのは遺伝子発現そのものではなく、その帰結として生じる形質だからだ。遺伝子発現から何らかの形質を予測する場合、2つのアプローチがありうる。ひとつ目はあらかじめその形質を制御する遺伝子を特定しておき、それらの発現の予測から形質の予測を行うアプローチ。この場合、対象とする形質の背後にある分子機構の詳細な理解が重要になる。このようなアプローチが可能で形質の一つに花成がある。実験室で低温処理を施したハクサンハタザオにおける*FLC*、*FT*オーソログの発現量データを元にモデル化し、北海道（札幌）と滋賀（大津）の圃場での発現量、抽台、リバージョンを予測した研究が最近発表された<sup>18)</sup>。ポイントは*FT*オーソログの発現量から抽台、リバージョンのタイミングを上手く説明できる点だ。このため、気温と日長から*FLC*、*FT*オーソログの発現を予測し、それらをもとにさらに抽台、リバージョンのタイミングを予測することが可能となった。もうひとつは形質のデータとトランスクリプトーム（の予測値）を解析することで、形質と強い相関を示す遺伝子の発現（あるいは複数遺伝子の発現を組み合わせた指標）を見つけ出すアプローチである。手法としては癌のバイオマーカーの探索に近い。植物における近い研究としてトウモロコシの窒素栄養状態を示す発現マーカーをトランスクリプトームデータから得た研究がある<sup>19)</sup>。低窒素条件、高窒素条件、それぞれ30枚のマイクロアレイデータをもとに、84遺伝子の発現量から計算される指標を作成した。この指標は様々な発生ステージのサンプルを用いても頑健に窒素条件を反映しただけでなく、窒素欠乏状態からの窒素施肥にも鋭敏に応答し数時間オーダーでの変化も反映していた。

予測が可能になると、次の目標としてそれをもとにした遺伝学的な設計が考えられる。これまでの我々の研究はイネの標準系統である日本晴のみを用いて得られた結果であり、各遺伝子の各パラメータを支配する遺伝的基盤は未知であった。そこで次のステップとして、QTL解析用の集団を用いた同様の解析が進行中である。これによって、各遺伝子の各パラメータを量的形質としてゲノムにマッピングすることが可能になる。さらに、その結果を逆に用いることで、任意の遺伝子型の個体の任意の環境条件におけるトランスクリプトームをシミュレーションできる。これは、野外で望んだ遺伝子発現パターンを示す系統を設計すること

が可能になるということの意味する。しかしながら、このアプローチを正攻法で実現するためには、「系統数（100程度）」×「モデリングに必要なサンプル数（500程度）」=50000サンプルという膨大なトランスクリプトームデータが必要なことが問題となる。そこで、実験側・解析側の両面からの対策を進めている。実験側では、低コスト・ハイスループットなRNA-Seq用ライブラリ調整システムを確立している。解析側では、いくつかの工夫により必要なサンプル数、RNA-Seqのリード数を大幅に減らすことが出来る見込みである。QTL解析では利用可能なのは両親間の多型のみであるが、将来的にはGWASやゲノミックセレクションといった手法と組み合わせて行くことでより広い範囲の設計が可能となるだろう。さらには、TALENやCRISPR/Casなどを活用したより柔軟な設計も考えられる<sup>20)</sup>。

さらに先の目標としては、システムとしての制御がある。システムを制御するために必要なことは、システムの状態のモニタリングとそれに入力を加える手法である。また、前提として、システムの時間変化と入力による応答を表現するモデルが必要となる。実験室レベルであれば、薬剤誘導性プロモーターを用いた形質転換体などを用いることで、任意のタイミングで特定の遺伝子の発現を変化させるという入力が増えられる<sup>21)</sup>。現状、特に日本国内では野外でそのような実験を行うことは難しい。ましてや、実際の農業現場で使える技術になるまではいくつものハードルがあることだろう。しかしながら、海外で研究レベルでは薬剤誘導性プロモーターを導入した形質転換植物を野外で栽培し、生態学的研究を行おうというプロジェクトも行われつつある<sup>22)</sup>。また、特定のタンパク質間相互作用やタンパク質-DNA相互作用を阻害する化学物質をスクリーニング、あるいはデザインすることによって取得する技術が大きく発展すれば、組換え体を用いることなく入力を加えることが可能になるかもしれない。

以上で述べた「予測」・「設計」・「制御」はシステムのモデリングを軸に互いに深くかかわっており、それぞれが有機的に影響を及ぼしながら発達していくべきものだ。同時に、個々の生物学的現象の背後にある分子機構の理解も、より良い「予測」・「設計」・「制御」に不可欠である。詳細な分子機構を明らかにする研究の重要性は、今後も下がることはない。今後

は、実験室、実験圃場、さらには自然集団や農業現場における研究や知見が、今まで以上に相互に理解・活用されることで、以上で述べたような技術が30年後よりずっと早期に実現されることを期待したい。

Received October 9, 2013, Accepted November 26, 2013,  
Published December 31, 2013

## 参考文献

- Goda, H., Sasaki, E., Akiyama, K., Maruyama-Nakashita, A., Nakabayashi, K., Li, W., Ogawa, M., Yamauchi, Y., Preston, J., Aoki, K., Kiba, T., Takatsuto, S., Fujioka, S., Asami, T., Nakano, T., Kato, H., Mizuno, T., Sakakibara, H., Yamaguchi, S., Nambara, E., Kamiya, Y., Takahashi, H., Hirai, M.Y., Sakurai, T., Shinozaki, K., Saito, K., Yoshida, S. and Shimada, Y. (2008) The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *Plant J.* 55, 526-542.
- Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., D'Angelo, C., Bornberg-Bauer, E., Kudla, J. and Harter, K. (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* 50, 347-363.
- Sato, Y., Antonio, B., Namiki, N., Motoyama, R., Sugimoto, K., Takehisa, H., Minami, H., Kamatsuki, K., Kusaba, M., Hirochika, H. and Nagamura, Y. (2011) Field transcriptome revealed critical developmental and physiological transitions involved in the expression of growth potential in japonica rice. *BMC Plant Biol.* 11:10.
- Fukayama, H., Sugino, M., Fukuda, T., Masumoto, C., Taniguchi, Y., Okada, M., Sameshima, R., Hatanaka, T., Misoo, S., Hasegawa, T. and Miyao, M. (2010) Gene expression profiling of rice grown in free air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE) and elevated soil temperature. *Field Crop. Res.* 121, 195-199.
- Izawa, T., Mihara, M., Suzuki, Y., Gupta, M., Itoh, H., Nagano, A.J., Motoyama, R., Sawada, Y., Yano, M., Hirai, M.Y., Makino, A. and Nagamura, Y. (2011) Os-GIGANTEA confers robust diurnal rhythms on the global transcriptome of rice in the field. *Plant Cell* 23, 1741-1755.
- Richards, C.L., Rosas, U., Banta, J., Bhambhra, N. and Purugganan, M.D. (2012) Genome-wide patterns of Arabidopsis gene expression in nature. *PLoS Genet.* 8, e1002662.
- Hayes, K.R., Beatty, M., Meng, X., Simmons, C.R., Habben, J.E. and Danilevskaya, O.N. (2010) Maize global transcriptomics reveals pervasive leaf diurnal rhythms but rhythms in developing ears are largely limited to the core oscillator. *PLoS One* 5, e12887.
- Travers, S.E., Tang, Z., Caragea, D., Garrett, K.A., Hulbert, S.H., Leach, J.E., Bai, J., Saleh, A., Knapp, A.K., Fay, P.A., Nippert, J., Schnable, P.S. and Smith, M.D. (2010) Variation in gene expression of *Andropogon gerardii* in response to altered environmental conditions associated with climate change. *J. Ecol.* 98, 374-383.
- Sjödin, A., Wissel, K., Bylesjö, M., Trygg, J. and Jansson, S. (2008) Global expression profiling in leaves of free-growing aspen. *BMC Plant Biol.* 8:61.
- Kobayashi, M.J., Takeuchi, Y., Kenta, T., Kume, T., Diway, B. and Shimizu, K.K. (2013) Mass flowering of the tropical tree *Shorea beccariana* was preceded by expression changes in flowering and drought-responsive genes. *Mol. Ecol.* 22, 4767-4782.
- Levy, O., Kaniewska, P., Alon, S., Eisenberg, E., Karako-Lampert, S., Bay, L.K., Reef, R., Rodriguez-Lanetty, M., Miller, D.J. and Hoegh-Guldberg, O. Complex diel cycles of gene expression in coral-algal symbiosis. *Science* 331, 175.
- Ottesen, E.A., Young, C.R., Eppley, J.M., Ryan, J.P., Chavez, F.P., Scholin, C.A. and DeLong, E.F. Pattern and synchrony of gene expression among sympatric marine microbial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, E488-97.
- Aikawa, S., Kobayashi, M.J., Satake, A., Shimizu, K.K. and Kudoh, H. (2010) Robust control of the seasonal expression of the Arabidopsis FLC gene in a fluctuating environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 11632-11637.
- Sheldon, C.C., Rouse, D.T., Finnegan, E.J., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. (2000) The molecular basis of vernalization: The central role of FLOWERING LOCUS C (FLC). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3753-3758.
- Schwartz, M.D. (2003) *Phenology: An Integrative Environmental Science*. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, USA.
- Kira, T. (1948) On the altitudinal arrangement of climatic zones in Japan. *Kanti-Nogaku* 2, 143-173.
- Nagano, A.J., Sato, Y., Mihara, M., Antonio, B.A., Motoyama, R., Itoh, H., Nagamura, Y. and Izawa, T. (2012) Deciphering and prediction of transcriptome dynamics under fluctuating field conditions. *Cell* 151, 1358-1369.
- Satake, A., Kawagoe, T., Saburi, Y., Chiba, Y., Sakurai, G. and Kudoh, H. (2013) Forecasting flowering phenology under climate warming by modelling the regulatory dynamics of flowering-time genes. *Nature. Commun.* 4, 2303.
- Yang, X.S., Wu, J., Ziegler, T.E., Yang, X., Zayed, A., Rajani, M.S., Zhou, D., Basra, A.S., Schachtman, D.P., Peng, M., Armstrong, C.L., Caldo, R.A., Morrell, J.A., Lacy, M. and Staub, J.M. (2011) Gene expression biomarkers provide sensitive indicators of in planta nitrogen status in maize. *Plant Physiol.* 157, 1841-1852.
- Gaj, T., Gersbach, C.A. and Barbas, C.F. 3rd. (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for

- genome engineering. *Trends Biotechnol.* 31, 397-405.
21. Borghi, L. (2010) Inducible gene expression systems for plants. *Methods Mol. Biol.* 655, 65-75.
22. Schafer, M., Brutting, C., Gase, K., Reichelt, M., Baldwin, I. and Meldau, S. (2013) "Real time" genetic manipulation: a new tool for ecological field studies. *Plant J.* 76, 506-518.

## Field Transcriptomics and a Future Perspective

Atsushi J. Nagano\*

Center for Ecological Research, Kyoto University / JST PRESTO

人工光合成への期待<sup>‡</sup>立命館大学 大学院生命科学研究科  
民秋 均\*

天然の光合成では、二酸化炭素と水と可視光を利用して、高エネルギー化合物（糖類など）を合成している。このような過程を模倣して、二酸化炭素と水を原料とした光化学反応によって、人工的に高エネルギー化合物（水素や炭化水素類）を合成しようとするのが、人工光合成である。エネルギーや食糧問題だけでなく、環境問題の切り札として、人類がどうしても達成しなければならない技術であり、様々な分野の研究者が連携して一日でも早い「人工光合成」の達成が望まれている。

## 1. はじめに

光合成は光エネルギーの変換システムであり、天然では化学エネルギーへの変換が光合成生物によって行われている。天然における光エネルギーの供給源は、太陽からの地球に降り注ぐ光であり、地表や水中に届く太陽光が利用されている（後の7で詳述）。地球自身の活動に伴う熱源近辺での輻射光を利用することも天然では可能であるが、ごく希である（海底の熱水鉱床など）。光がエネルギーであることは、通常の生活でも感じ取ることができる（例えば、日焼けや赤外線ストーブなど）。一方、食事を摂ることで生命活動を維持していることや石油を燃やして暖が取れることから、化学エネルギーの存在も判ってもらえると思う。分子の中の原子と原子の間の結合に化学エネルギーが貯えられており、分子変換（分子を形成している原子と原子の組み換え）を通して、取り込まれたり／放出されたりすることが可能である。このような化学変換（反応）では、構成原子に変化はなく、結合の仕方が変化するだけであり、原子自身が変化する核反応とは区別される（原子力エネルギー）。

光合成では、低エネルギー化合物である二酸化炭素（ $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}=\text{C}=\text{O}$ ）に、水（ $\text{H}_2\text{O}$ ）などを利用しつつ光エネルギー注入することで、貯蔵可能な高エネルギー化合物である炭水化物（糖類）が合成される（図1左）。水を利用すると、その構成酸素原子が酸素分子（ $\text{O}_2$ ）に変換され、酸素ガス発生を伴うことになる。二酸化炭素を構成している炭素と酸素原子の間の二重

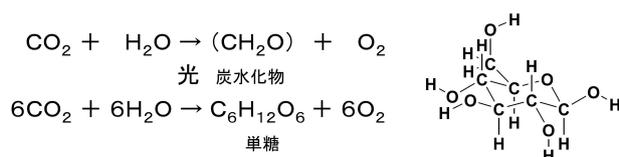


図1 光合成の反応式（左）と単糖の一つであるβ-D-グルコースの構造式（右）

結合に含まれる化学エネルギーは、糖類を構成する炭素と炭素原子／炭素と酸素原子／炭素と水素原子ならびに酸素と水素原子の間の単結合（図1右）に含まれる化学エネルギーよりも小さく、糖類の構成原子間に化学エネルギーが貯えられることになる。

光エネルギーのエネルギー変換システムには、化学エネルギーへの変換だけではなく、他のエネルギー形態への変換システムもある。例えば、電気エネルギーへの変換系である太陽電池や、熱エネルギーへの変換系である太陽光温水器などがあげられる。ここでは太陽光の化学エネルギー変換系に注目して、人工的な変換系である「人工光合成」について述べることにする。

## 2. 人工光合成へ

光合成生物を改変していくことは古くから行われており（品種改良）、食糧増産や嗜好適応を通して人類の発展に寄与している。最近では、遺伝子改変による品種改良が行われるようになってきている。また、光合成研究の発展に伴い、人工的に光合成を模倣しよ

<sup>‡</sup> 解説特集「30年後の光合成研究」

\* 連絡先 E-mail: tamiaki@fc.ritsumei.ac.jp

うとする人工光合成研究が活発になってきている。特に、何度か繰り返されてきたエネルギー危機（原油の価格高騰や供給不足）のたびに、エネルギー問題解決の切り札として脚光を浴びているが、危機の回避に伴って毎度下火になっている。20世紀末からは、環境問題（大気中の二酸化炭素濃度の上昇など）の解決のためにも、有機物（特に石油や天然ガスに代表される炭化水素類）の燃焼（火力発電）を避けようとする気運が高まっているし、さらに原子力発電は廃棄物処理や事故が起こった場合のリスクも考えて、なるべく避けたいという方向に地球規模で向かいつつある。原子力発電所が全て停止している現在の日本では、節電と火力発電のフル稼働で何とか電力をまかなっているが、以前にもましての二酸化炭素の大気中への放出との引き替えて成り立っていることを忘れてはならない（地球環境への負荷の増大）。

光合成生物は、自身の生命活動を行うために光合成を行っており、貯蔵される化学エネルギーはさほど多くなく、太陽光から人類が利用可能な化学エネルギーへの変換効率はあまり高くない（せいぜい数%程度）。人工的に光合成システムを構築して、光エネルギーを化学エネルギーに変換できれば、変換効率の増大が期待できる。以前は、夢のエネルギー変換系としてもはやされたが、今や実現しなければならないシステムになっており、エネルギーや環境問題の解決ばかりでなく、食糧問題や紛争問題の解決ももたらすこととなるであろう。「人工光合成が地球を救う！」である。しかし、効率ばかりでなく、乗り越えるべき問題（コスト／安全性／耐久性など）をまだまだ多数抱えており、多くの研究者がそれぞれの立場で連携して、一日でも早く実現を見なければならぬ。

### 3. 二酸化炭素の利用へ

天然の光合成では、二酸化炭素から糖類が作られるが、糖が人間も含めた生物にとって取り扱いやすい（その代謝系を既に確立している）ためである。二酸化炭素から人工的に糖類を合成するのは結構面倒であり、糖を最終的な高エネルギー化合物として生産（つまり食糧生産）するのは、天然の光合成生物に任せるのに限る。過去の光合成生産物を起源として、長い年月を掛けて地球内部で作られてきた石油や石炭や天然ガス（最近ではシェールオイルも）が短時間で手に入れば、現在のインフラを利用できるので好都合であ

る。大気中の二酸化炭素を利用しているのだから、炭素排出量はオフセットされ、太陽光が潤沢で未利用地が広大な地域（海洋を含む）から、消費地（もしくはその近接発電所）までの高エネルギー化合物の運搬も容易である。石油や石炭や天然ガスの主成分は、炭化水素類やその酸化物（アルコール類など）であり、そのような高エネルギー化合物を、低エネルギー化合物である二酸化炭素から直接合成するのは、やはりかなり面倒である。そこで、ワンクッションをおいて二酸化炭素を化学的に変換するのが望ましい。そのポイントになるのが、「水素」である。二酸化炭素分子に水素を作用させることで、炭化水素やアルコール類を合成するのが、人工光合成の切り札になる。この際の水素は、水素分子でもいいし、水素原子を与えることができる化合物でもいい（天然ではNADPHがよく使われる）。しかも、この水素（H）は、水（H<sub>2</sub>O）から作りたい。現在、水素ガス製造のほとんどが、安価なメタンを原料としているが、それでは光合成にならない（図2）。メタンから水素を合成し、二酸化炭素と水素からメタンを光合成しても、意味がないからである。水からの水素ガス発生について、以下で述べる。

#### 水素製造

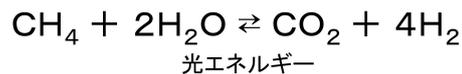


図2 メタン改質による水素ガス合成（右へ）と二酸化炭素と水素によるメタン合成（人工光合成：左へ）

### 4. 水の光分解による水素発生

水の電気分解は、中学校（あるいは高校）の教科書でも出てくるのでよく御存知だと思う。電解水溶液に電気を流すと、陽極から酸素／陰極から水素ガス発生するというものである。しかし、水の光分解となると、ちょっと世間での認知度が落ちる。本多-藤嶋効果という日本が世界に誇れる大発見なのですけど。水の電気分解で用いた陽極に二酸化チタン（半導体）電極を用い、その二酸化チタンに紫外線の光を照射すると、電気分解と同じように二酸化チタン表面から酸素／対極から水素ガス発生する。ご興味のある方は、光触媒に関する実験キットが市販されているし、川崎市のかながわサイエンスパークにある光触媒ミュージアムに行けば、水の光分解を実際に試すこともでき

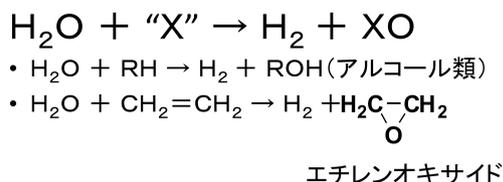


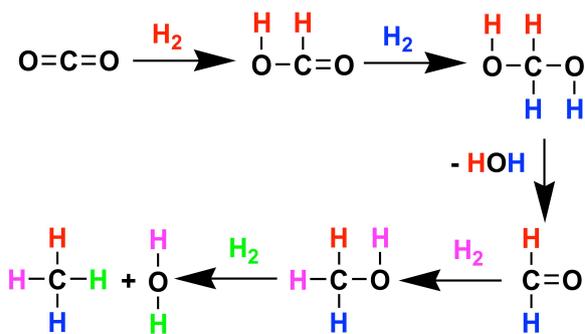
図3 水による酸化反応とそれに伴う水素ガス発生

る。一段階で水の光分解を行うためには大きなエネルギーが必要なために、この反応は紫外光でしか進行しない。天然の光合成では、Zスキームという二段階の光励起で進行させているので、可視光でも水から酸素分子と水素（化合物）を作ることができる。そこで現在、可視光で駆動する水分解に伴う水素発生用の光触媒の開発が精力的に行われている<sup>2)</sup>。また、光化学系IIの酸素発生型マンガクラーを模倣した水の分解系の開発も急がれているが、まだうまくいっていない。酸素ガスが同時発生することを嫌って、水による酸化反応との組み合わせによる水素発生系も検討されている（図3）。炭化水素を用いれば、アルコールやエポキシドなどの有用な酸化生成物が副成るので、利用価値が高い。但し、有用物質の副生成物としての水素発生とも言えるので、今のところ大量の水素ガス合成にはあまり向いていない。図3のXとして未利用物質の酸化受容体（犠牲剤）を用いた系の開発が期待されている。

水素分子は高エネルギー化合物であり、酸素と化合すると水になり、その際にエネルギーを放出する。燃焼によって熱エネルギーになるし（例えば水素自動車）、電気エネルギーとして取り出すことも可能である（燃料電池）。

### 5. 二酸化炭素のメタンへの還元

二酸化炭素を水素化していくと、図4上のスキームに従ってメタンにまで還元される。二酸化炭素の一方の炭素酸素二重結合（カルボニル基）に水素分子1分子を付加すると、ギ酸（HCOOH）となる。ギ酸のカルボニル基にさらに水素分子が付加すると、ホルムアルデヒド一水和物（CH<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>、メタンジオールやメチレングリコールともいう）になる。気相中では水和していた水分子が直ちに脱離して、ホルムアルデヒド（HCHO）が生成する。ホルムアルデヒドは水素分子によって還元（カルボニル基への水素付加）されて、メタノール（CH<sub>3</sub>OH）となり、生成したメタノール



- $\text{CO}_2 + \text{H}_2 \rightarrow \text{HCOOH}$  (ギ酸)
- $\text{CO}_2 + 2\text{H}_2 \rightarrow \text{HCHO}$  (ホルムアルデヒド) +  $\text{H}_2\text{O}$
- $\text{CO}_2 + 3\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{OH}$  (メタノール) +  $\text{H}_2\text{O}$
- $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4$  (メタン) +  $2\text{H}_2\text{O}$

図4 二酸化炭素の水素化

ルの炭素酸素単結合に水素分子が挿入されて、最終的にメタン（CH<sub>4</sub>）と水が出来ることになる。つまり、二酸化炭素1分子に水素を1/2/3/4分子付加すると、ギ酸/ホルムアルデヒド/メタノール/メタンが生成することになる（図4下）。この反応は、自発的に進行するのではなく、触媒が必要である（天然では酵素がその役割を果たしている）。効率が良く/安価で/耐久性のある触媒探索が急務となっている。また、二酸化炭素の濃度が高いほうが反応は進行しやすい。鉄鉱所や火力発電所などから排出される高濃度の二酸化炭素を含むガスや水溶液などが有望視されている。あわせて、大気中の低濃度の二酸化炭素と平衡にある水溶液を利用している天然光合成系を見習うことが、今後重要になってくるであろう。なるべくエネルギーを投入せずに二酸化炭素を濃縮する技術開発も期待されている（例えば二酸化炭素に対する選択分離吸着能の高い多孔性物質など）。

生成したメタンガスは、二量化によってエタンガスにしたり、さらにそのエタンガスをエチレンガスに改変（脱水素化）したりすることも可能であり（図5）、エネルギー源ばかりでなく、各種素材の原料にもなっていく。

- $2\text{CH}_4$  (メタン)  $\rightarrow$   $\text{CH}_3-\text{CH}_3$  (エタン) +  $\text{H}_2$
- $\text{CH}_3\text{CH}_3$  (エタン)  $\rightarrow$   $\text{CH}_2=\text{CH}_2$  (エチレン) +  $\text{H}_2$

図5 メタン (C1) からエタン・エチレン (C2) へ

### 6. 二酸化炭素の一酸化炭素への還元

上記のような水を発生源とした水素による二酸化炭素のメタンへの還元ばかりでなく、一酸化炭素合成も検討されている。二酸化炭素のカルボニル基に水素が付加すると、上述のとおりギ酸が発生するが、二酸化炭素の一方の酸素原子に形式的に水素が添加すると、一酸化炭素 (CO) と水が生成することになる (図6上)。ギ酸を一酸化炭素と水に分解したと考えてもよい (図6下)。二酸化炭素への水素添加ではなく、二電子注入 (還元) と二プロトン (水素イオン) 付加によって、一酸化炭素を合成しようとする試みも行われている。二光子 (できれば可視領域の光) による二電子還元に伴う二酸化炭素から一酸化炭素への変換が、既に金属錯体を利用して成功している<sup>3)</sup>。今後の発展が期待されている分野である。

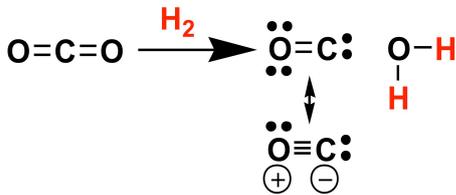


図6 二酸化炭素の一酸化炭素への還元

生成した一酸化炭素は、水素と反応することで種々の炭化水素に変換できる (フィッシャー・トロブシュ反応、図7)。石油代替品 (人造石油や合成石油ともいう) の合成法として既に工業的にも行われており、原油等の価格次第では、いつでも大量生産できる状態にある。

- $\text{CO} + 3\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4$  (メタン) +  $\text{H}_2\text{O}$
- $2\text{CO} + 5\text{H}_2 \rightarrow \text{C}_2\text{H}_6$  (エタン) +  $2\text{H}_2\text{O}$
- $3\text{CO} + 7\text{H}_2 \rightarrow \text{C}_3\text{H}_8$  (プロパン) +  $3\text{H}_2\text{O}$
- $4\text{CO} + 9\text{H}_2 \rightarrow \text{C}_4\text{H}_{10}$  (ブタン) +  $4\text{H}_2\text{O}$
- .....
- $n\text{CO} + (2n+1)\text{H}_2 \rightarrow \text{C}_n\text{H}_{2n+2}$  (アルカン) +  $n\text{H}_2\text{O}$

図7 フィッシャー・トロブシュ反応

### 7. 太陽光の効率的な吸収

光合成は、光の吸収によって開始される光化学反応であるので、太陽光の吸収は重要である。光化学反応には、絶対的な法則が二つある。第一法則が、「入射した光のうち、吸収された光だけが反応に関

与する。」であり、第二法則が、「光の吸収は、光量子単位で起こる。」である。第一法則は当たり前のことであるが、学会でも時々これを無視した光化学反応が報告されることがある。照射光に含まれる赤外線光による溶媒の加熱に伴う熱反応が、その反応の主原因であるような場合である (特に光化学反応の効率が低いときに、加熱効果が顕在化する)。可視部に吸収のある色素分子を用いていても、分子の励起状態からの電子や励起エネルギー移動や化学反応が、注目している反応の主原因でないこともある。例えば、励起分子が基底状態に熱放出で失活して、その際に発生した熱によって反応が進行している場合があるからである。

太陽からの光エネルギーは黒体放射に基づいているので、そのスペクトルがエネルギー単位を縦軸にして物理量で表されることが多いし、教科書にも地球外と地表面での太陽スペクトルがそのように示されていることが一般的である (図8上)。しかし、光化学反応第二法則にあるように、光子数が反応には重要であるので、光化学反応を基盤としている光合成を研究する上では、縦軸を光子数で示すことが重要である (図8下)<sup>4)</sup>。光子数を縦軸にした地表面での太陽スペクトルでは、680nm付近を極大としたものになり、450

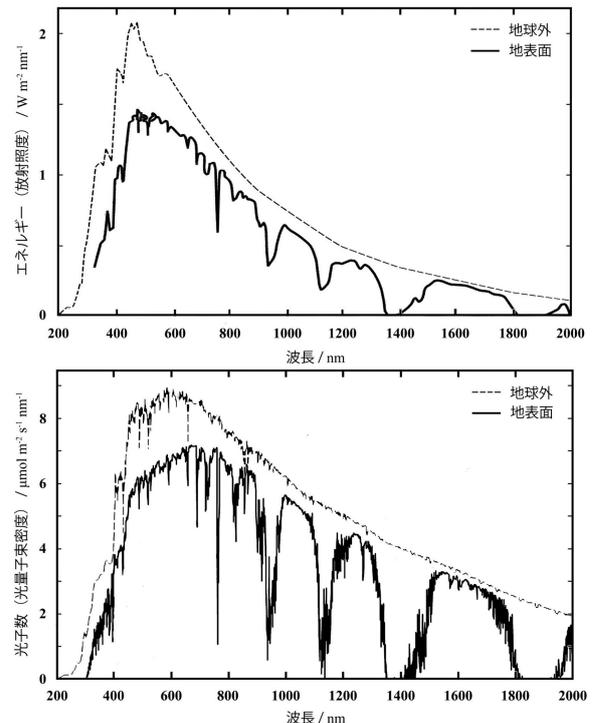


図8 太陽スペクトル：縦軸がエネルギー単位 (上) と光子数単位 (下)

から900nmまでの領域で光子の数が多ことが判る。680nmはクロロフィルaの長波長領域における強い吸収帯であるQy帯の吸収極大とほぼ一致しており、光合成生物がクロロフィルaを利用している理由の一端とも考えられる。一方、クロロフィルの短波長領域における強い吸収帯であるソーレー帯は、通常450nmよりも短波長側にあるので<sup>5)</sup>、このソーレー帯での光吸収に伴う光化学反応は、あまり有効でないことが判る。従来のエネルギー量を単位にした太陽スペクトルでは、短波長の光ほどエネルギー量が大きいため過剰評価されていたきらいがある。光合成研究では、光子数を縦軸にした太陽スペクトルを用いることを薦めたい(特に教科書で)。

光子数を縦軸にした地表面での太陽スペクトルを眺めると、光合成生物の光吸収戦略がよく見えてくる。バクテリオクロロフィルaを構成色素としている紅色細菌では、900nm領域までの光を利用しているが、その波長までは光子数がかなり多いので、そのような紅色細菌が生育するのに有利である。大気中の水の吸収によって950nmと1100nm近辺の光がほとんど届かないが、その間隙の1000nm付近の光(光子数は最大値の高々3割減)を、バクテリオクロロフィルbを構成色素としている紅色細菌が効率的に吸収することができ、やはり生育にとって有利に働く。1200nmや1600nm付近にも未利用な光が結構あるので、これを利用した人工光合成(あるいは光合成生物の変異体)の開発が待たれている。

450nm以上の波長領域の光は、通常カロテノイドやピリン類(フィコビリソーム)が吸収できるので、そのような化合物が効率的な光吸収色素となる。一方、クロロフィルの中にも、450nm以上の光を効率よく吸収できるものがある。その一つが、バクテリオクロロフィルeを構成色素としている緑色細菌である。この色素分子はJ型の自己会合体を形成して、500nm付近に大きな吸収帯を有しており、太陽からの光を効率よく吸収することが可能である。最近そのような緑色細菌の遺伝子改変が可能になっており<sup>6,7)</sup>、太陽光をより効

率的に光吸収することができる光合成細菌がお目見えする日が近いかもしれない。

## 8. おわりに

「人工光合成」は数年後に実現できるわけではなく、30年後には実現していなくてはならないシステムである。異分野の研究者もどんどん参加して、なるべく早く目処をつけなければならない。微力ながら、そのお手伝いをしたいと考えている(<http://artificial-photosynthesis.net/>参照)。その恩恵を私は受けることがなさそうであるが、子孫のためにも負の遺産ではなく、明るい未来を提供することが、私たちの年代の研究者の義務である。30年後も研究を続けている若い方々の参入を切に願っている。

Received November 7, 2013, Accepted November 26, 2013,  
Published December 31, 2013

## 参考文献

1. Fujishima, A. and Honda, K. (1972) Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. *Nature* 238, 37–38.
2. Kato, H., Sasaki, Y., Shirakura, N. and Kudo, A. (2013) Synthesis of highly active rhodium-doped SrTiO<sub>3</sub> powders in Z-scheme systems for visible-light-driven photocatalytic overall water splitting. *J. Mater. Chem. A* 1, 12327–12333.
3. Morimoto, T., Nishiura, C., Tanaka, M., Rohacova, J., Nakagawa, Y., Funada, Y., Koike, K., Yamamoto, Y., Shishido, S., Kojima, T., Saeki, T., Ozeki, T. and Ishitani, O. (2013) Ring-shaped Re(I) multinuclear complexes with unique photofunctional properties. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 13266–13269.
4. Chen, M. and Scheer, H. (2013) Extending the limits of natural photosynthesis and implications of technical light harvesting. *J. Porphyrins Phthalocyanines* 17, 1–15.
5. 民秋 均 (2011) クロロフィル—構造・反応・機能— (三室守 編集) pp 282–292, 裳華房, 東京.
6. 原田二朗、民秋 均 (2013) ついに発見! 幻のクロロフィル. *化学* 68(3), 48–53.
7. Harada, J., Mizoguchi, T., Tsukatani, Y., Noguchi, M. and Tamiaki, H. (2012) A seventh bacterial chlorophyll driving a large light-harvesting antenna. *Sci. Rep.* 2, 671; DOI:10.1038/srep00671.

## Artificial Photosynthesis and Movement toward Its Realization

Hitoshi Tamiaki\*

Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University

## 光合成生物の生き様の理解とそれに基づく合目的的な改変・制御の展望<sup>‡</sup>

東京大学 大学院総合文化研究科/JST さきがけ  
成川 礼<sup>\*</sup>

光合成生物にとって、光はエネルギー源であるが故に、最重要な情報ともいえ、光合成生物は高度な光応答システムを備えている。光応答システムは、光感知、シグナル伝達、細胞・個体レベルの光応答で構成されており、その各段階を詳細に解析することで、光応答システムを理解することができる。本稿では、光合成生物の中でも、ゲノム情報や遺伝学的ツールが充実しているシアノバクテリアに着目し、その光応答システムを分子から細胞レベルまで簡単に概説し、基礎研究としての今後の展望、更には、理解したシステムを基にした応用研究の展望を記す。

### 1. はじめに

光合成生物は地球上のほぼ全ての生命にエネルギー源を供給しているという観点で、現在の生態系において最も重要な生物群の一つと捉えることができる。近年では、我々人間の生活で使用するエネルギーに関しても、光合成を利用する試みがなされており、基礎的側面に加えて、応用的側面でもますますその重要性が増している。また、光合成研究といっても、光合成の素過程を原子・分子レベルで解明する研究から、細胞から個体・生態レベルのマクロな視点で光合成を捉える研究まで非常に幅広い。さらに、光合成そのものを研究対象とするだけでなく、光合成の制御、光合成生物の代謝や環境応答などの研究も光合成研究と捉えることができる。実際、私自身も卒業研究からこれまで一貫して、光合成生物であるシアノバクテリアを材料に研究を行っているが、“光合成”そのものではなく、シアノバクテリアの環境応答、特に光応答を研究対象としている。このように、非常に多岐に渡る研究領域に跨がっている“光合成研究”の30年後を展望するのは非常に挑戦的なテーマであるが、本稿では私がこれまで従事してきたシアノバクテリアの光応答システムについて、私も含めた様々な研究グループによる研究を簡単に概説し、基礎研究としての今後の展望、更には、理解したシステムを基にした応用研究の展望を記したい。

### 2. シアノバクテリアの光応答システム

光合成生物にとって光はエネルギーであり、それ故に最重要な情報といえ、変動する光環境下で効率良く光合成するために、光合成生物は高度な光応答機構を備えている。光合成生物が光に応答する仕組みは大きく二つに分けられると私は考えている。一つは、光合成装置自身が応答するもので、ステート遷移やキサントフィルサイクルなどがその代表例である。もう一つは、光合成装置とは別の光応答システムが光を感知し、転写制御やタンパク質の活性制御を通じて光合成を制御するものである。この場合、わざわざ光応答システムを別個に構築しなければならないが、その分、精緻なシステムが構築可能であり、実際に、そのような光応答が多く同定されている。陸上植物では、フォトトロピンを介した葉緑体定位運動、屈光性制御、フィトクロムを介した避陰応答、芽生え制御などがよく知られ、シアノバクテリアでは、走光性制御、補色順化などが挙げられる<sup>1-3)</sup>。このような光応答システムのモデルを図1に示す。色素を結合した光受容体が光を感知すると、色素とその周辺のタンパク質ドメインの構造が変化し、その後、ドメイン間・タンパク質間のシグナル伝達を経て、最終的に細胞レベルや個体レベルの光応答現象が発現される。つまり、これら各段階を詳細に解析することで、光応答システムを分子レベルから細胞・個体レベルまで理解することができる。私はその中でも、最初の光受容体が光を感知する仕組みを分子レベルで詳細に解析してきた。

<sup>‡</sup> 解説特集「30年後の光合成研究」

<sup>\*</sup> 連絡先 E-mail: narikawa@bio.c.u-tokyo.ac.jp

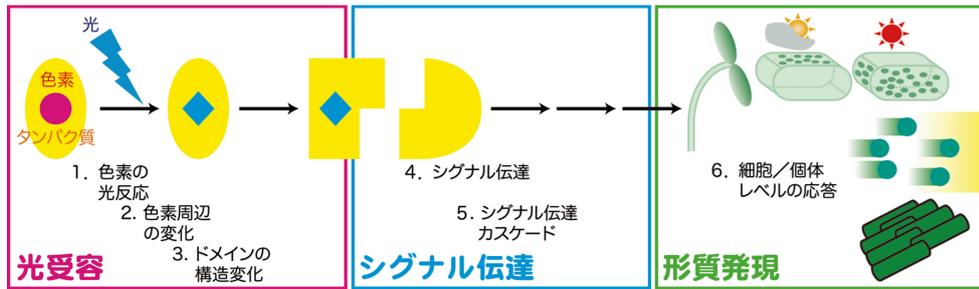


図1 光合成生物の光応答システムのモデル

陸上植物にはフラビンを結合して青色光を感知するクリプトクロムとフォトトロピンという光受容体と開環テトラピロールを結合して赤色光と遠赤色光を感知するフィトクロムという光受容体が存在する<sup>2,3)</sup>。陸上の光合成生物のほとんどがクロロフィル以外の補助色素をカロテノイド以外に持たない緑色植物であるため、均一な集団の中でクロロフィル同士が光を奪い合っているといえる。その意味で、クロロフィルが主に吸収する青色光と赤色光を感知するシステムを陸上植物が持っているのは、適応的であると捉えられる。一方、シアノバクテリアには、フラビン結合型青色光受容体とフィトクロムに加えて、シアノバクテリオクロムという光受容体群が存在する<sup>1)</sup>。その色素結合領域はフィトクロムと同様であるが、紫/緑色光、青/緑色光、緑/赤色光、赤/緑色光など、多様な光質に応答する様々な光受容体が同定されている<sup>4-9)</sup>。シアノバクテリアは水圏に存在することが多く、水圏では補助色素の組成が異なるヘテロな光合成生物の集団の中で光の奪い合いが起きていると推察される。そのため、シアノバクテリアはこのような多様な光質を感知しているのかもしれない。

近年の国内外の精力的な研究により、これらの多様な分光特性は結合する色素の違いや光変換機構の違いによって確立されていることが明らかとなりつつある<sup>4-8,10-18)</sup>。中でも、シアノバクテリオクロムの光受容ドメインの立体構造が複数報告されたことで、分子レベルでの光応答機構解明により近づくことができた<sup>19,20)</sup>。現在は光受容ドメイン内部で、シグナル伝達がどのように進むかが解明されつつあるが、ドメイン・タンパク質間のシグナル伝達の分子機構解明が今後の課題である。そのためには、光受容タンパク質全長やタンパク質複合体での生物物理学的解析や立体構造の決定が重要になるだろう。

ドメイン・タンパク質間では、リン酸の受け渡し、

タンパク質間相互作用、セカンドメッセンジャーなどを介してシグナルが伝達され、最終的に、転写制御やタンパク質の活性制御を介して、光応答現象が発現

される。具体的な光応答現象としては、特に、走光性、光合成アンテナ色素の補色順化、光依存的細胞凝集などの現象について、その制御機構が詳細に解明されてきている<sup>5,8,13,21-27)</sup>。中でも興味深いのは、走光性や光依存的細胞凝集の解析から、紫～青色光がシアノバクテリアにとって、逃避すべき光であると示唆されていることである。陸上植物においても、葉緑体定位運動の解析から、特に強い青色光は逃避すべき光となっている。陸上植物ではフラビンを結合するLOVドメイン、シアノバクテリアでは、フラビンを結合するBLUFドメインとシアノバクテリオクロムのGAFドメイ

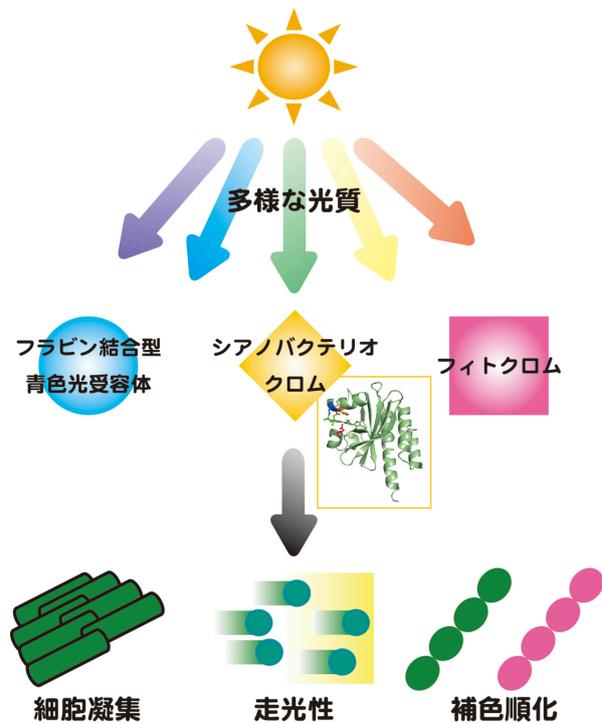


図2 シアノバクテリアの光応答システムの概要

シアノバクテリアの光応答システムについて、模式的に示した。淡水や陸生のシアノバクテリアは多様な光質を感知して、走光性、細胞凝集、補色順化などを制御している。最近、多様な光質を感知するシアノバクテリオクロムの結晶構造が決定され、感知機構が分子レベルで解明されつつある。

ンが青色光を感知する光受容体である。つまり、“青色光”を感知する分子は進化的に全く異なるにも関わらず、同様に青色光から逃避するシステムを構築しているのである。これに関連して、興味深い知見がある。酸素を発生する光化学系反応中心II複合体は強光下で光阻害を受けるが、その光阻害は二段階で進行し、最初の段階は紫外～青色光で誘導される<sup>28)</sup>。これは、酸素発生中心のマンガンが紫外～青色光を吸収し、それにより酸素発生中心が壊れるからであると示唆されている。つまり、酸素発生型光合成は青色光によって損傷を受けやすく、そのために、これらの種において共通して青色光を避けるシステムが構築されたと考えられる。

これまでに記述してきたシアノバクテリアの光応答現象は、主に*Synechocystis* sp. PCC 6803, *Thermosynechococcus vulcanus* RKN, *Nostoc punctiforme* など、淡水や陸上に生息しているシアノバクテリアで観察される現象である。近年のゲノム解析技術の急速な進展により、シアノバクテリアに関しても40種以上のゲノム配列が利用可能となっている。これらのシアノバクテリアから、光受容ドメインなどのシグナル伝達系のドメインを探索すると、興味深いことに、淡水・陸生のシアノバクテリアではそれらのドメインが豊富に存在するのに対し、海洋性シアノバクテリアでは非常に少ない傾向がある<sup>29,30)</sup>。海洋においては、環境変動はあまり激しくなく、海の深度に沿ったニッチの形成と光合成集光装置の多様化により、生育環境に適応していると考えられる<sup>31-33)</sup>。一方、淡水や陸上においては、多様な光受容体の変動する光環境を感知し、転写制御やタンパク質の活性制御を介して、その光環境に順化していると考えられる。また、光環境そのものは大きく変動せずとも、光を奪い合う競合相手の動態が変動しているのかもしれない。とにかく、結果的に変動した光環境に応じて、淡水・陸生のシアノバクテリアは走光性、細胞凝集、集光装置の色素組成などを制御していると考えられる。

これまで、試験管の中で個々のモデル生物の光応答現象が詳細に解析されてきたが、実際の生育環境では、他の生物との相互作用の中で生育している。光合成生物が持つ本来の光応答システムを理解するには、野外での生態学的な研究が必須であろう。また、単なる生態学的解析に留まらず、近年急速に発達したゲノム解析技術を利用したメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析と各種環境因子（メタデータ）とを統合し、光環境変動にตอบสนองして、ヘテロな光合成生物群の動態がどのように変動するかを解析することで、光応答システムを生態レベルで詳細に理解できると期待される。そして、メタゲノム解析などの結果の解釈には、これまでに分子レベルの詳細研究により解明された知見が役立つだろう。最終的には、試験管の中で複数の光合成生物を培養し、光環境を変動させることで、野外での生物間相互作用を再構築する研究へと着地するかもしれない。

リプトーム解析と各種環境因子（メタデータ）とを統合し、光環境変動にตอบสนองして、ヘテロな光合成生物群の動態がどのように変動するかを解析することで、光応答システムを生態レベルで詳細に理解できると期待される。そして、メタゲノム解析などの結果の解釈には、これまでに分子レベルの詳細研究により解明された知見が役立つだろう。最終的には、試験管の中で複数の光合成生物を培養し、光環境を変動させることで、野外での生物間相互作用を再構築する研究へと着地するかもしれない。

### 3. 多様な真核藻類の光応答システム

緑色植物とシアノバクテリアに関しては、モデル生物を用いた精力的な解析から、光応答システムの詳細が明らかとなりつつある。酸素発生型光合成を行う多様な真核藻類（灰色植物、紅色植物、黄色植物、クリプト植物など）に関しても、それぞれ独自の光応答システムを保持していることが期待されるが、光受容体や光応答システムに関する知見は限定的である。これらの生物において、分子から個体レベルまでよく分かっている光応答システムは、黄色植物であるフシナシミドロにおける、オーレオクロムによる青色光依存的な分枝形成くらいである<sup>34,35)</sup>。ゲノム配列が決定されている種が少なく、形質転換系が確立されている種も少ないことが、これらの生物における知見の蓄積を遅らせているといえる。シアノバクテリアの場合、淡水や陸生のシアノバクテリアが光応答系を発達させ、海洋性シアノバクテリアは光応答系をあまり持たない代わりに海の深度に沿ったニッチを形成していると前項で述べた。これらの生物群においても、収斂進化で同様の傾向が観察される可能性がある。淡水性の真核藻類について網羅的に光受容体や光応答現象を探索することで、多様な光応答システムが見つかるかもしれない。特に、緑色光集光システムを持つ紅色植物やクリプト植物から、多様な光質にตอบสนองするものが発見されると期待している。

### 4. 応用研究に向けて

これまでの解析で、シアノバクテリアの光応答システムが詳細に理解できたといえる。そこで、この理解したシステムを応用利用できないか、検討している。光は可逆的で時間・空間分解能が非常に高いツールであり、光質と強度という二つのパラメーターで細か

く制御可能である。また、光受容体は二つの光質の間で光変換を示すものや、暗反転を示すものが多いため、多くの光受容体では光の効果は可逆的である。これらの利点から、光を用いて細胞を制御するオプトジェネティクスや分子の局在を細胞レベルで可視化する分子イメージング技術が、フラビン結合タンパク質、ロドプシン、GFP系蛍光タンパク質などを活用することで、近年、急速な発展を遂げている<sup>36-39)</sup>。しかしながら、光合成生物を対象にしたオプトジェネティクスや分子イメージングを行う場合、利用するタンパク質が吸収する光や発する蛍光が、光合成装置が吸収する光や発する蛍光と被らない必要がある。その意味で、遠赤色光～近赤外光はクロロフィルの吸収する赤色光より長波長であり、それらの光を吸収するタンパク質は、非常に有用であると考えられる。また、これらの長波長の光は、光合成生物だけでなく、動物の個体レベルでのオプトジェネティクス・分子イメージングにも適した光である。これらの光は、細胞に豊富に存在するヘモグロビン、メラニン、水などによって、あまり吸収されたいため、組織の奥深くの細胞や分子まで浸透しやすい。しかしながら、上記のタンパク質群に関しては、650 nmより長波長の光を吸収するタンパク質の開発は進んでいない。

そのような状況の中で、長波長の光を吸収する色素・ビリベルジンを結合したバクテリオフィトクロムという光受容体に注目が集まっている。バクテリオフィトクロムはビリベルジンを共有結合し、700 nm と 750 nm の間で可逆的に光変換する光受容体である<sup>40)</sup>。このタンパク質を土台として、変異導入により、蛍光の量子収率が改善された蛍光プローブがこれまでに二つの研究グループから報告されている<sup>41-43)</sup>。これらはともに700 nm付近の光を吸収し、725 nm付近の蛍光を出す。これらの蛍光特性は、光合成生物や動物の個体への適用に適しているが、いくつかの改善すべき点が残っている。一つ目は、色素を結合するタンパク質領域が大きい点、二つ目はタンパク質が二量体以上の多量体を形成する点である。一方、シアノバクテリオクロムにおいては、色素の結合には25 kDa 程度のGAFドメインが必要十分であり<sup>1)</sup>、また、GAFドメインの結晶構造解析等から、単量体で存在することも分かっている<sup>20)</sup>。これらの特徴から、シアノバクテリオクロムはバクテリオフィトクロムで改善すべき点を既に克服していることが分かる。しかしながら、天然のシアノバ

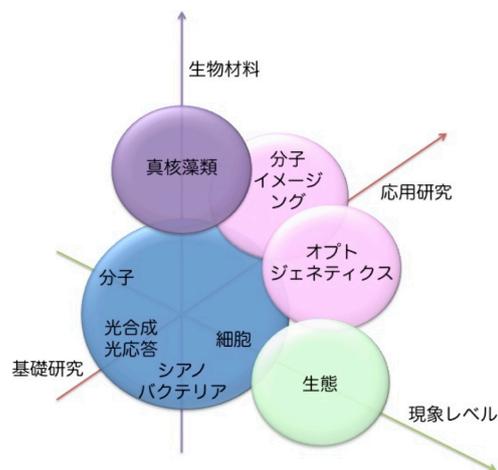


図3 今後の研究展望

クテリオクロムにおいては、最も長波長でも、赤色光を吸収するタンパク質が知られているのみである。そこで、結合色素の改変や色素近傍アミノ酸の変異導入により、吸収波長を長波長にシフトさせることができれば、好ましい。現在、実際に赤色光と緑色光の間で可逆的光変換を行うシアノバクテリオクロムに対し、本来結合する色素よりも長波長を吸収する色素を結合させることで、両方の吸収型を50-60 nmほど長波長にシフトさせることに成功している (Narikawa et al. in preparation)。また、シアノバクテリオクロムは光受容ドメインと酵素活性ドメインとの組み合わせが多様であるため、キメラタンパク質を作製することで、新規の組み合わせを創出する。このように、吸収する光の波長や制御ターゲットを変えることで、目的に合った多様な光制御系を構築可能であると期待される。蛍光プローブとしては、安定的に高い蛍光量子収率を実現するために、変異導入による光変換を示さないタンパク質の取得が求められる。最終的には、光スイッチや蛍光プローブを植物細胞や動物細胞に導入することでその性能を評価し、実用可能なレベルまで開発したいと考えている。

### 5. おわりに

私はこれまで、シアノバクテリアの光応答に着目し、分子から細胞レベルまでの基礎研究を行ってきた。今後は、真核藻類なども用いて生態レベルまで解析の枠を拡げ、また、基礎研究だけでなく応用研究にもアプローチしていきたい (図3)。多岐に渡った領域での展望を記載したので、全体の統一感があまりなく、発散した内容になってしまったが、読者の

方々の今後の研究展開への一助に少しでもなれば幸いです。

Received November 13, 2013, Accepted November 26, 2013, Published December 31, 2013

## 参考文献

- Ikeuchi, M. and Ishizuka, T. (2008) Cyanobacteriochromes: a new superfamily of tetrapyrrole-binding photoreceptors in cyanobacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1159-1167.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P. and Fankhauser, C. (2010) Light-regulated plant growth and development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 91, 29-66.
- Chen, M. and Chory, J. (2011) Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends Cell. Biol.* 21, 664-671.
- Yoshihara, S., Katayama, M., Geng, X. and Ikeuchi, M. (2004) Cyanobacterial phytochrome-like PixJ1 holoprotein shows novel reversible photoconversion between blue- and green-absorbing forms *Plant Cell Physiol.* 45, 1729-1737.
- Hirose, Y., Shimada, T., Narikawa, R., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2008) Cyanobacteriochrome CcaS is the green light receptor that induces the expression of phycobilisome linker protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 9528-9533.
- Narikawa, R., Fukushima, Y., Ishizuka, T., Itoh, S. and Ikeuchi, M. (2008) A novel photoactive GAF domain of cyanobacteriochrome AnPixJ that shows reversible green/red photoconversion, *J. Mol. Biol.* 380, 844-855.
- Narikawa, R., Kohchi, T. and Ikeuchi, M. (2008) Characterization of the photoactive GAF domain of the CikA homolog (SyCikA, Slr1969) of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1253-1259.
- Narikawa, R., Suzuki, F., Yoshihara, S., Higashi, S., Watanabe, M. and Ikeuchi, M. (2011) Novel photosensory two-component system (PixA-NixB-NixC) involved in the regulation of positive and negative phototaxis of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 52, 2214-2224.
- Enomoto, G., Hirose, Y., Narikawa, R. and Ikeuchi, M. (2012) Thiol-based photocycle of the blue and teal light-sensing cyanobacteriochrome Tlr1999. *Biochemistry* 51, 3050-3058.
- Ishizuka, T., Narikawa, R., Kohchi, T., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2007) Cyanobacteriochrome TePixJ of *Thermosynechococcus elongatus* harbors phycoviolobin as a chromophore. *Plant Cell Physiol.* 48, 1385-1390.
- Rockwell, N.C., Njuguna, S.L., Roberts, L., Castillo, E., Parson, V.L., Dwojak, S., Lagarias, J.C. and Spiller, S.C. (2008) A second conserved GAF domain cysteine is required for the blue/green photoreversibility of cyanobacteriochrome Tlr0924 from *Thermosynechococcus elongatus*. *Biochemistry* 47, 7304-7316.
- Rockwell, N.C., Martin, S.S., Feoktistova, K. and Lagarias, J.C. (2011) Diverse two-cysteine photocycles in phytochromes and cyanobacteriochromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 11854-11859.
- Song, J.Y., Cho, H.S., Cho, J.I., Jeon, J.S., Lagarias, J.C. and Park, Y.I. (2011) Near-UV cyanobacteriochrome signaling system elicits negative phototaxis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 10780-10785.
- Rockwell, N.C., Martin, S.S., Gulevich, A.G. and Lagarias, J.C. (2012) Phycoviolobin formation and spectral tuning in the DXCF cyanobacteriochrome subfamily. *Biochemistry* 51, 1449-1463.
- Rockwell, N.C., Martin, S.S. and Lagarias, J.C. (2012) Mechanistic insight into the photosensory versatility of DXCF cyanobacteriochromes. *Biochemistry* 51, 3576-3585.
- Rockwell, N.C., Martin, S.S. and Lagarias, J.C. (2012) Red/Green cyanobacteriochromes: sensors of color and power. *Biochemistry* 51, 9667-9677.
- Velazquez Escobar, F., Utesch, T., Narikawa, R., Ikeuchi, M., Mroginski, M.A., Gartner, W. and Hildebrandt, P. (2013) Photoconversion mechanism of the second GAF domain of cyanobacteriochrome AnPixJ and the cofactor structure of its green-absorbing state. *Biochemistry* 52, 4871-4880.
- Hirose, Y., Rockwell, N.C., Nishiyama, K., Narikawa, R., Ukaji, Y., Inomata, K., Lagarias, J.C. and Ikeuchi, M. (2013) Green/red cyanobacteriochromes regulate complementary chromatic acclimation via a protochromic photocycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 4974-4979.
- Burgie, E.S., Walker, J.M., Phillips, G.N., Jr. and Vierstra, R.D. (2013) A photo-labile thioether linkage to phycoviolobin provides the foundation for the blue/green photocycles in DXCF-cyanobacteriochromes. *Structure* 21, 88-97.
- Narikawa, R., Ishizuka, T., Muraki, N., Shiba, T., Kurisu, G. and Ikeuchi, M. (2013) Structures of cyanobacteriochromes from phototaxis regulators AnPixJ and TePixJ reveal general and specific photoconversion mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 918-923.
- Kehoe, D.M. and Grossman, A.R. (1996) Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* 273, 1409-1412.
- Yoshihara, S., Suzuki, F., Fujita, H., Geng, X.X. and Ikeuchi, M. (2000) Novel putative photoreceptor and regulatory genes required for the positive phototactic movement of the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 41, 1299-1304.
- Bhaya, D., Takahashi, A. and Grossman, A.R. (2001) Light regulation of type IV pilus-dependent motility by

- chemosensor-like elements in *Synechocystis* PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7540-7545.
24. Terauchi, K., Montgomery, B.L., Grossman, A.R., Lagarias, J.C. and Kehoe, D.M. (2004) RcaE is a complementary chromatic adaptation photoreceptor required for green and red light responsiveness. *Mol. Microbiol.* 51, 567-577.
  25. Okajima, K., Yoshihara, S., Fukushima, Y., Geng, X., Katayama, M., Higashi, S., Watanabe, M., Sato, S., Tabata, S., Shibata, Y., Itoh, S. and Ikeuchi, M. (2005) Biochemical and functional characterization of BLUF-type flavin-binding proteins of two species of cyanobacteria. *J. Biochem. (Tokyo)* 137, 741-750.
  26. Hirose, Y., Narikawa, R., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2010) Cyanobacteriochrome CcaS regulates phycoerythrin accumulation in *Nostoc punctiforme*, a group II chromatic adapter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 8854-8859.
  27. Kawano, Y., Saotome, T., Ochiai, Y., Katayama, M., Narikawa, R. and Ikeuchi, M. (2011) Cellulose accumulation and a cellulose synthase gene are responsible for cell aggregation in the cyanobacterium *Thermosynechococcus vulcanus* RKN. *Plant Cell Physiol.* 52, 957-966.
  28. Ohnishi, N., Allakhverdiev, S.I., Takahashi, S., Higashi, S., Watanabe, M., Nishiyama, Y. and Murata, N. (2005) Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. *Biochemistry* 44, 8494-8499.
  29. Okamoto, S. and Ohmori, M. (2003) Distribution of chromophore-binding GAF domain in genome sequence. *Genome Inform.* 14, 442-443.
  30. Ashby, M.K. and Houmar, J. (2006) Cyanobacterial two-component proteins: structure, diversity, distribution, and evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 472-509.
  31. Roca, G., Larimer, F.W., Lamerdin, J., Malfatti, S., Chain, P., Ahlgren, N.A., Arellano, A., Coleman, M., Hauser, L., Hess, W. R., Johnson, Z.I., Land, M., Lindell, D., Post, A.F., Regala, W., Shah, M., Shaw, S. L., Steglich, C., Sullivan, M.B., Ting, C. S., Tolonen, A., Webb, E.A., Zinser, E.R. and Chisholm, S.W. (2003) Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* 424, 1042-1047.
  32. Six, C., Thomas, J.C., Garczarek, L., Ostrowski, M., Dufresne, A., Blot, N., Scanlan, D.J. and Partensky, F. (2007) Diversity and evolution of phycobilisomes in marine *Synechococcus* spp.: a comparative genomics study. *Genome Biol.* 8, R259.
  33. Stomp, M., Huisman, J., De Jongh, F., Veraart, A.J., Gerla, D., Rijkeboer, M., Ibelings, B.W., Wollenzien, U.I. and Stal, L.J. (2004) Adaptive divergence in pigment composition promotes phytoplankton biodiversity. *Nature* 432, 104-107.
  34. Takahashi, F., Yamagata, D., Ishikawa, M., Fukamatsu, Y., Ogura, Y., Kasahara, M., Kiyosue, T., Kikuyama, M., Wada, M. and Kataoka, H. (2007) AUREOCHROME, a photoreceptor required for photomorphogenesis in stramenopiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 19625-19630.
  35. Ishikawa, M., Takahashi, F., Nozaki, H., Nagasato, C., Motomura, T. and Kataoka, H. (2009) Distribution and phylogeny of the blue light receptors aureochromes in eukaryotes. *Planta* 230, 543-552.
  36. Stepanenko, O.V., Stepanenko, O.V., Kuznetsova, I. M., Verkhusha, V.V. and Turoverov, K.K. (2013) Beta-barrel scaffold of fluorescent proteins: folding, stability and role in chromophore formation. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 302, 221-278.
  37. Sato, M. (2014) Genetically encoded fluorescent biosensors for live cell imaging of lipid dynamics. *Methods Mol. Biol.* 1071, 73-81.
  38. Moglich, A. and Moffat, K. (2010) Engineered photoreceptors as novel optogenetic tools. *Photochem. Photobiol. Sci.* 9, 1286-1300.
  39. Shcherbakova, D.M., Subach, O.M. and Verkhusha, V.V. (2012) Red fluorescent proteins: advanced imaging applications and future design. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 51, 10724-10738.
  40. Davis, S.J., Vener, A.V. and Vierstra, R.D. (1999) Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* 286, 2517-2520.
  41. Shu, X., Royant, A., Lin, M. Z., Aguilera, T.A., Lev-Ram, V., Steinbach, P.A. and Tsien, R.Y. (2009) Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science* 324, 804-807.
  42. Filonov, G.S., Piatkevich, K.D., Ting, L.M., Zhang, J., Kim, K. and Verkhusha, V.V. (2011) Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging. *Nat. Biotechnol.* 29, 757-761.
  43. Filonov, G.S. and Verkhusha, V.V. (2013) A near-infrared BiFC reporter for in vivo imaging of protein-protein interactions. *Chem. Biol.* 20, 1078-1086.

## Perspectives for Object-Oriented Modification and Regulation Based on the Understandings of Life Systems within Phototrophic Organisms

Rei Narikawa\*

Department of Life Sciences (Biology), The University of Tokyo / JST PRESTO

## 解説

作物の光合成能力の改善は可能か？ これからの挑戦<sup>‡</sup>

東北大学 大学院農学研究科 応用生物科学専攻  
牧野 周<sup>\*</sup>

人類の食糧の半分を占めるイネとコムギを題材に、人類は、どのような戦略でそれらの食糧増産を実現したのか、そして、その延長上にどのような戦略が考えられ、その方向性はどのようなものなのかを述べた。ポイントは、いかに窒素施肥をおさえて、高い光合成能を維持あるいは実現し、穀粒数を確保、稔実させるかである。前者（ソース）に関しては、様々な自然生態系に適応した種の多様性を理解し、有用な遺伝子資源を光合成の生理学から見出し、主要作物に導入するかであろう。後者（シンク）に関しては、すでに、現在展開されている穂の形成に関する分子遺伝学によって見出される有用遺伝子導入を積み重ね、どのようにシンク拡大を計るかであろう。そして、両者（ソース能向上とシンク拡大）を組み合わせることで、画期的な第2の緑の革命は可能となる。

## 1. はじめに

図1に、重量ベースで換算された人類の食糧の由来について示した<sup>1)</sup>。人類は84%までの食糧を植物に依存している。しかも、2種の作物、イネとコムギにその半分以上、全食糧に対しても44%を依存している。家畜の飼料分も考慮すると、人類の食糧は、たった2種の植物におおよそ半分量を依存していることになる。この地球上には約30万から40万種の植物が存在することを考えれば、恐るべき数字である。

人類がこのイネとコムギを栽培化したのは、1万年以上前と推定されているが、おおよそ50年前に、この2種の作物が、大きく増産される口火となる画期的な品種改良が行われた。緑の革命と呼ばれた短稈育種である。亜熱帯の水生植物であるイネと寒冷地の畑作物であるコムギで、まったく同じ方向での革命的な育種がなされたのは興味深い。短稈育種は、コムギで先行して行われ、その業績によって、国際トウモロコシ・コムギ研究所に勤務していたノーマンボーロック（デュボンの植物育種研究者）が1970年にノーベル平和賞を受賞した。しかしながら、その栄光の陰で1935年岩手農業試験場において稲塚権次郎氏が育種した半矮性コムギ農林10号が、ボーロックらのコムギの短稈化に使われたことは、ボーロックのノーベル賞受賞後まで、まったく知られていなかった。

短稈種は、耐倒伏性を持つことから、多量の窒素

施肥を可能として、多肥に依存した増収を成功させた。多量の窒素施肥は、葉の窒素含量を増加させ、その窒素含量の増加によって光合成能力を増大にさせる効果があり、同時にシンク面では、穂数増加や籽数増加効果もあるため、イネやコムギの増産に直接結びつくものであった。しかし、窒素の多量施肥は、肥料コストの増大のみならず、地下水の汚染や生態系への影響など、多くの問題を生むことになった。今後、緑の革命の成功を踏まえた上で、第2に緑の革命を起すとするならば、窒素施肥に依存しない、作物改良がどこまで可能かという課題に尽きる

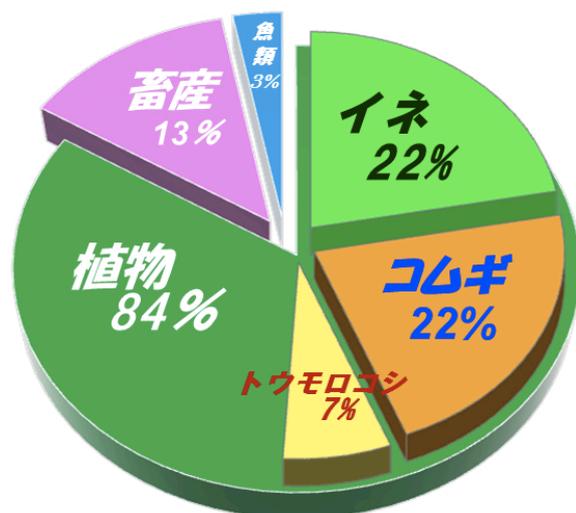


図1 人類の食糧生産割合(重量ベース)<sup>1)</sup>

<sup>‡</sup> 解説特集「30年後の光合成研究」

<sup>\*</sup> 連絡先 E-mail: makino@biochem.tohoku.ac.jp

と言える。ここでは、イネを中心にその方向性について議論したい。

## 2. イネの生産性は吸収窒素量で決まる

穀類作物の収量は、単位栽培土地面積あたりの穀粒数と一粒あたりの穀粒重と登熟（稔実）歩合の積で決まる。イネの場合、一粒あたりの穀粒重（粒重）は、栽培環境によらず遺伝的に固定されていて<sup>2)</sup>、登熟歩合も正常に生育する限り、70~90%の範囲で落ち着くので、増収のターゲットは、いかに土地面積あたりの穀粒数（粒数）を増やすかと言う問題になる<sup>2,3)</sup>。一方、コムギの場合は、生育環境条件の違いによって、穀粒重と穀粒数がともに影響を受け<sup>4,5)</sup>、さらに両者の間には負の相関関係が存在する<sup>4)</sup>ので、増収のターゲットはイネより複雑となる。

和田と松島（1962）は、増収のターゲットを単位栽培土地面積あたりの粒数に絞り、異なる産地における異なる品種のデータを集め、イネの粒数がどのような要因によって決定されているかを調べた<sup>6)</sup>。その結果、粒数は、産地、品種、栽培年にかかわらず、出穂期までに吸収した窒素量で決まることを見出した。このことは、増収を狙うには、単純に出穂期までに、いかにイネを倒伏させないで、多くの窒素を吸収させるか、が課題であることを意味した。まさに、短稈育種がその問題をクリアし、さらにそれぞれの短稈品種に合わせた肥料施肥設計が、増収を実現させる鍵となった。

現在の日本のおコメの平均玄米収量は1000 m<sup>2</sup> (10 a)あたり530 kgぐらいである。多収の目標値を仮に900 kgと置き、玄米一粒重を平均値22 mg、登熟歩合を80%とすると、900 kgの玄米収量を実現するためには、単位土地面積m<sup>2</sup>あたり、51100粒の粒数が必要と計算される。この51100粒/m<sup>2</sup>を和田と松島のデータに基づき計算すると、出穂期までにイネに1000 m<sup>2</sup>あたり22 kgの窒素を吸収させる必要があることがわかる。現在の稲作では、基肥と追肥を合わせても10 kg以上の窒素の施肥をすることは稀なので、土壌由来の窒素供給を考慮しても、非常に困難な数値であ

ることがわかる。したがって、これを実現するためには、同じ窒素を吸収してもさらに粒数が増やすようなイネを作出することが求められる。一部の多収インディカタイプのイネでは、窒素吸収量当たりの粒数が多いものが選抜されてきていることも指摘されており<sup>3)</sup>、芦刈ら（2005）によって、粒数を決定する遺伝子 *Gn1*などが同定されている<sup>7)</sup>。インディカ由来の *Gn1*形質がジャポニカタイプのコシヒカリの一穂粒数を40%増加させたことも報告されており、これらの有用形質の主要栽培品種への導入は、この問題をブレークスルーする可能性があることを示している。しかしながら、これらの粒数増加が、必ず登熟歩合の低下する2次枝梗と3次枝梗の粒数の増加<sup>3)</sup>である点が限界点となるかも知れない。

## 3. 光合成能力と葉の窒素含量の関係

次に葉の窒素と光合成能力との関係に注目してみよう。葉の窒素含量と光合成速度とは間には高い正の相関関係が認められる。この関係は、葉に分配される窒素の約75%が葉緑体の構成窒素となることで説明される<sup>8)</sup>。特にCO<sub>2</sub>を固定する酵素Rubiscoに葉身全窒素量の約25%が、また、光を捕集するクロロフィルタンパク質複合体に約20%が使われている<sup>9)</sup>。植物は、CO<sub>2</sub>と光を獲得する機能タンパク質のみで約50%もの窒素を使っているのである。したがって、ここでも、大きなターゲットは、これらのタンパク質の機能向上を計るなど、いかに窒素含量当たりの光合成能力を

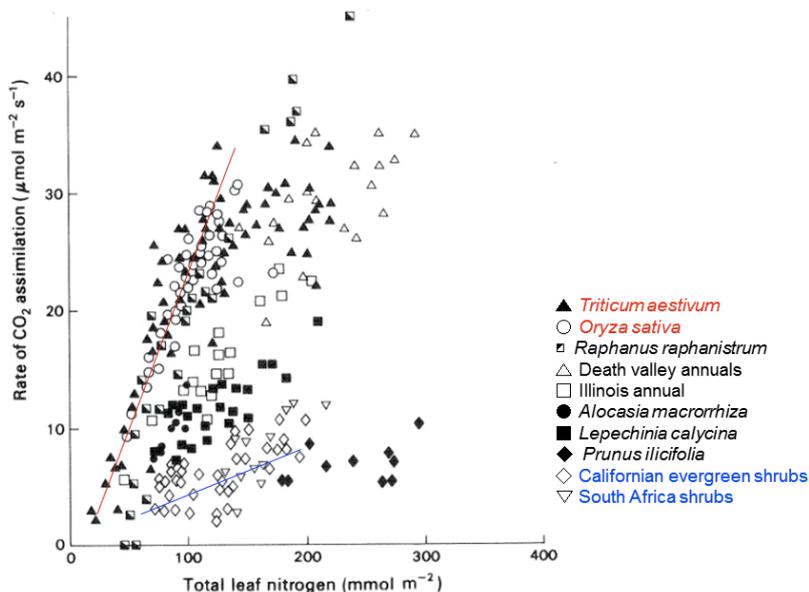


図2 C3植物の光飽和条件での葉面積当たりの光合成速度と葉身窒素含量との関係<sup>10)</sup>

向上させることが可能かと言う問題となる。

オーストラリア国立大学のEvans (1989)は、C3型光合成を行う植物の窒素含量当たりの光合成速度には大きな植物種間差が存在することを報告した(図2)<sup>10)</sup>。さらに、彼は、種に依存して、葉の窒素含量と光合成速度との間に正の相関関係があること、そして、窒素含量当たりの光合成速度は、主要作物のイネやコムギにおいて最も高く、カルフォルニアや南アフリカの半乾燥地帯に自生する低木で最も低く、その差は5倍以上に及ぶことを指摘している。人類、農耕1万年の歴史中で、イネとコムギに人類が食料としてもっとも多くを依存してきたことに、必然性を感じさせる報告でもあった。

彦坂と重野(2009)は、東北大学のキャンパス構内に自生する草本、落葉樹、常緑樹群の葉の窒素含量と光合成速度の関係を調べ、やはり、窒素含量当たりの光合成速度に大きな差があることを見出した<sup>11)</sup>。葉の窒素含量当たりの光合成速度は草本で最も高く、常緑樹で最も低かった。そして、細胞壁画分に分配される窒素量と葉の窒素含量当たりの光合成速度との関係に負の相関関係が存在し、Rubisco量と葉の窒素含量当たりの光合成速度には種に依存しないほぼ同一の正の相関関係を認められることを報告した。彼らの結果は、草本に比べ葉の寿命が長い樹木、とりわけ、常緑樹などでは、葉の細胞の骨格を担う細胞壁などに窒素のコストが余分にかかり、結果として光合成速度が低いと言う結果であること示唆している。また、Evansの結果は、例えばカルフォルニアや南アフリカの半乾燥地帯に自生する植物種では、それらの環境に適応するための窒素のコストがかかり光合成速度が低い、またストレスのない良好な農耕地で栽培されるイネやコムギは、目いっぱい窒素を光合成器官に投資できるので、結果的に高い光合成を發揮できる、したがって、特別に、彼らが優れた光合成機能を有しているのではないことを示唆している。また、このことは、同時に、主要作物への不良環境ストレスへの耐性付与は、光合成能

力の低下を伴うものであることを意味している。

以上のように、これらのことは、イネやコムギなどの主要作物の窒素含量当たりの光合成能力をさらに向上させることは非常に難しいとも示唆している。なお、C4光合成を行うトウモロコシの葉の窒素含量当たりの光合成速度はイネやコムギより2倍ほど高い<sup>9)</sup>。しかし、C4光合成における光合成器官に対する窒素投資はC3光合成のそれと本質的に異なる<sup>9)</sup>ので、ここでは触れない。あくまで、C4植物の高い光合成速度は、光と温度が十分確保されている時に發揮されるものである。

#### 4. イネのシンク能拡大は光合成能力の向上につながるのか？

シンク能の拡大が葉の光合成を促進する要因の一つであるとの見解をよく耳にする。しかしながら、いわゆるシンクとソースの相互関係を科学的に証明したケースを私は見たことはない。少なからずとも、私たちが行った大粒イネ(秋田63号)の解析の結果からは、シンク拡大による光合成促進の効果を見出すことはなかった。

図3は、私たちが数年間にわたって行ってきた圃場試験での多収解析の結果をまとめたものである<sup>12)</sup>。図3Aに示すように、籾数は品種や栽培年の違いに関わ

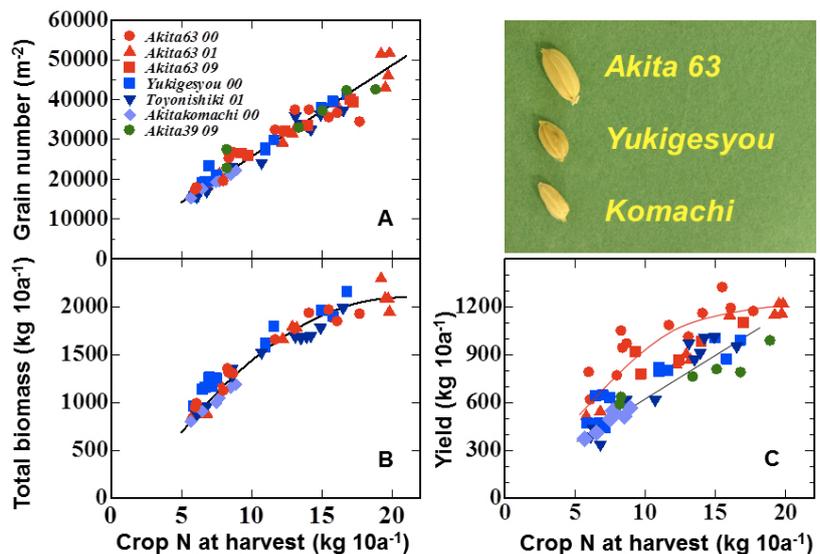


図3 イネの籾数(A)、バイオマス生産量(B)および収量(C)と収穫期の単位土地面積当たりの吸収窒素量<sup>12)</sup>

00は2000年、01は2001年、09は2009年の記録。いずれも秋田農業試験場圃場において行った。収量は、玄米収量ではなく、国際規格である籾収量で表示している。右上図は、秋田63号、雪化粧およびあきたこまちの籾の写真。秋田63号は他の一般品種に比べ35%ほど籾重が重い。

らず、収穫期までに吸収した窒素量によって決まっている。上で述べた、和田と松島の報告通りの結果である。図3Bは、地上部バイオマス量（乾物量）であるが、これも品種・栽培年に関わらず、吸収した窒素量で決まっている。ただし、籾数が直線相関であるのに対して、地上部バイオマス量は曲線相関となっている。後者の曲線相関は、高窒素条件による土地面積当たりの光の利用制限が生じたためと思われる（葉面積拡大による相互遮蔽発生）。大粒である秋田63号は、他の品種に比べ35%ほど一粒重が重いので、結果として、20から30%増収となった（図3C）。これらの結果から、増収によるシンク拡大は明確に認められているのにもかかわらず、地上部バイオマス生産量には差を与えていないことがわかる。すなわち、イネで見ると限りにおいては、必ずしもシンク拡大が地上部全体のバイオマス増産には繋がらず、シンクの改良が本当に光合成機能向上の戦略になり得るものかどうか疑わしい。

蛇足ではあるが、この図3Cにおいて、秋田63号の収量は同じ窒素を吸収しても収量が20から30%と増収となっている。この結果は、「2. イネの生産性は吸収窒素量で決まる」で述べた、窒素と収量の関係をブレイクスルーした結果であることがわかる。ある意味、第2に緑の革命の実現例でもある。

### 5. おわりに

イネとコムギの事例をいくつか取り上げ、作物の光合成機能改善の方向性を見出すことの困難さを述べてきた。図4にイネとコムギの光合成の温度応答を示した<sup>13)</sup>。同じC3型の光合成を行う両種であるが、光合成速度が最高速となる至適温度は異なっている。夏作物であるイネは、冬作物であるコムギより至適温度は高い。また、Rubiscoのキネティクスを見ても、イネのRubiscoは高温環境向きで、コムギは低温環境向きと解釈できる。イネのRubiscoはLow  $K_m(\text{CO}_2)$ /Low  $V_{\text{cmax}}$ 型で、コムギのRubiscoはHigh  $K_m(\text{CO}_2)$ /High  $V_{\text{cmax}}$ 型である<sup>14)</sup>。高温に適応したイネは、高温で溶解度の低い $\text{CO}_2$ を有効利用するために $\text{CO}_2$ との親和性を高める方向で進化し、冷涼気候に適応したコムギのRubiscoは $\text{CO}_2$ の親和性より、比活性向上に特化した進化をとげたとみられる。また、高温で促進される光呼吸ロスを抑えるため、イネにおいてはミトコンドリアを有効的に葉緑体が覆う形態を取り、光呼吸による放出 $\text{CO}_2$

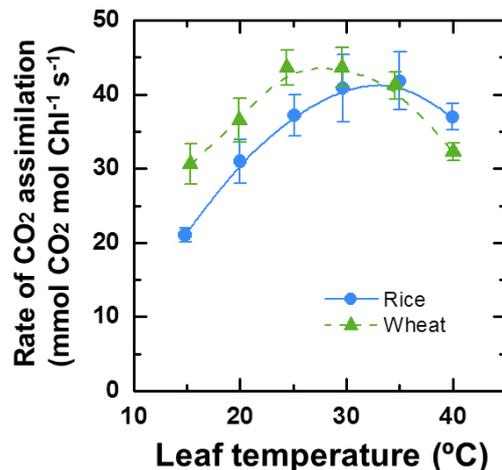


図4 イネとコムギの光飽和条件で測定された光合成速度の温度応答<sup>13)</sup> 単位はクロロフィル含量あたりで表示。

を効率よく回収している様子が観察されている<sup>15)</sup>。コムギでは、そのような形態は観察されていない。このように、イネとコムギの比較においても、自然生態系における種の起源としても特性を見出すことができる。そして、食糧増産のための作物の栽培地拡大は少なくとも光合成の環境不適應を生じている。例えば、イネの栽培地の北上である。亜熱帯起源のイネは、品種改良により、今や北海道や中国東北地方でも主要作物となっている。しかしながら、イネの栽培北上化の成功は、低温耐性付与育種<sup>16)</sup>や短日性の消失<sup>17)</sup>によってもたらされており、光合成不適應は解消されていない。北海道や東北地方のイネの現在の収量限界要因は、春先から初夏にかけて十分なバイオマス生産ができないことにある。北国の春から初夏にかけて、もしイネが、コムギなみに光合成をすることができれば、更なる大きな増収も期待できる。このように、地球上に存在する様々な光合成の遺伝子資源を有効利用し、主要作物に積極的に導入することによって、光合成機能改善の方向性は充分あるものと考えられる。

Received November 29, 2013, Accepted November 29, 2013, Published December 31, 2013

### 参考文献

1. Evans, L.T. (1998) *Feeding the Ten Billion. Plants and Population Growth*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
2. Yoshida, S. (1981) Physiological analysis of rice yield. in *Fundamentals of Rice Crop Science*, (Yoshida, S. Ed.) pp. 231-251, International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.

3. Yoshida, H., Horie, T. and Shiraiwa, T. (2006) A model explaining genotypic and environmental variation of rice spikelet number per unit area measured by cross-localational experiments in Asia. *Field Crops Res.* 97, 337-343.
4. Fisher, R.A., Aguilar, I. and Laing, D.R. (1977) Post-anthesis sink size in a high-yielding dwarf wheat: yield response to grain number. *Aust. J. Agric. Res.* 28, 165-175.
5. Jamieson, P.D., Martin, R.J. and Francis, G.S. (1995) Drought influences on grain yield of barley, wheat and maize. *NZ J. Crop Hort. Sci.* 23, 55-66.
6. Wada, G. and Matsushima, S. (1962) Analyses of yield-determining process and the application to yield-prediction and culture improvement of lowland rice. Mechanisms of determining the number of spikelets. *Proc. Crop Sci. Soc. Jpn.* 31, 23-25.
7. Ashikari, M., Sakakibara, H., Lin, S., Yamamoto, T., Takashi, T., Nishimura, A., Angeles, E.R., Qian, Q., Kitano, H. and Matsuoka, M. (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* 309, 741-745.
8. Makino, A. and Osmond, B. (1991) Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. *Plant Physiol.* 96, 355-362.
9. Makino, A., Sakuma, H., Sudo, E. and Mae, T. (2003) Differences between maize and rice in N-use efficiency for photosynthesis and protein allocation. *Plant Cell Physiol.* 44, 952-956.
10. Evans, J.R. (1989) Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia* 78, 9-19.
11. Hikosaka, K. and Shigeno, A. (2009) The role of Rubisco and cell walls in the interspecific variation in photosynthetic capacity. *Oecologia* 160, 443-451.
12. Makino, A. (2011) Photosynthesis, grain yield, and nitrogen utilization in rice and wheat. *Plant Physiol.* 155, 125-129.
13. Nagai, T. and Makino, A. (2009) Differences between rice and wheat in temperature responses of photosynthesis and plant growth. *Plant Cell Physiol.* 50, 744-755.
14. Makino, A., Mae, T. and Ohira, K. (1988) Differences between wheat and rice in the enzymic properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the relationship to photosynthetic gas exchange. *Planta* 174, 30-38.
15. Sage, T.L. and Sage, R.F. (2009) The functional anatomy of rice leaves: Implications for refixation of photorespiratory CO<sub>2</sub> and efforts to engineer C4 photosynthesis into rice. *Plant Cell Physiol.* 50, 756-772.
16. Nishiyama, I. (1993) Type of damage due to cool weather and the relevant research. In *Science of the Rice Plant, Vol 2. Physiology*, pp. 769-776 (Matsuo, T., Ishii, R., Ishihara, K. and Hirata, H. Eds), Nobunkyo, Tokyo, Japan.
17. Izawa, T. (2007) Adaptation of flowering-time by natural and artificial selection in Arabidopsis and rice. *J. Exp. Bot.* 58: 3091-3097.

## Photosynthesis Improvement in Crops is Feasible?

Amane Makino\*

Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

## フラスコの中から見ると30年後の光合成研究<sup>‡</sup>

京都大学 大学院生命科学研究所

佐藤 文彦<sup>\*</sup>

過去30年の急激な分子生物学の進展は、培養細胞を用いたモデル研究を過去の遺物に追いやった。しかし、培養細胞系は、単離葉緑体（オルガネラ）や植物個体では実験できないような植物化学調節物質／除草剤の*in vitro*スクリーニングや除草剤・環境ストレス耐性株の単離と解析を可能としてきた。また、個体レベルでは見落とされる現象、例えば、葉緑体の機能分化の制御に関わる因子（CND41）の同定も可能にしてきた。次の30年は、分子から生態系にいたる俯瞰的な視点での科学が必要である。培養細胞における機能分化制御機構の解明とともに、培養細胞を用いた解析が、両者のハブとして、生物学の深化と応用に貢献できると期待している。

### 1. はじめに

田中歩会長から、2013年の年会で30年後の光合成研究について話をしてほしいという依頼があったのは、2月の初めのころである。そのころ、磯貝彰奈良先端科学大学院大学前学長（当時、学長）が総括をしておられるJSTのCREST研究「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化と生産物活用のための基盤技術の創出」の評価会で、少し嫌みな質問ばかりしていたので、そうした意見を学会講演会でも発言してほしいのかと考えた。しかし、プログラムをみると、かならずしも、そうではなく、もっと科学的な展望が期待されているように思われた。ということで、講演会では、「フラスコの中からは光合成研究の未来をみる」として、私が専門としている植物細胞培養／細胞分子生物学の立場から、光合成研究への貢献の可能性について、紹介した。今回、再度、記事を執筆してほしいとの依頼があり、講演の内容とともに、当初予定していた「光合成研究に対する危機感と期待」をもう少し率直に述べることにしたい。

### 2. 植物細胞培養・細胞分子生物学の30年

現在の植物科学、あるいは、生命科学研究では、分子生物学／遺伝子組換え技術を抜きにして研究を考えるとできない。30年後を予測するにあたり、まず30年にわたる過去の研究の進展を振り返ってみることにしたい。

では、30年前（1983年）とはどういう年であろうか？さらにさかのぼる60年前、すなわち、1953年のWatsonとCrickによるDNAの二重らせん構造の発見からの分子生物学の大きな進展の結果、植物でも形質転換体の作成が報告された年である<sup>1)</sup>。一方、植物細胞培養研究においても、1957年SkoogとMillerによるオーキシンとサイトカイニンの量比による個体再生制御の確立、メリクロンを利用したウイルスフリー苗の育成、プロトプラストの単離と融合によるトマトとポテトの体細胞雑種「ポマト」の作成、有用物質高産生培養細胞の育成など、細胞培養工学の大きな進展があり、非常に熱気にあふれていた時代である。特に、1982年日本で国際植物細胞培養学会が開催され、我が国における植物細胞培養・細胞分子生物学研究は一気に加熱したといえる（細胞培養から遺伝子組換え作物の開発の歴史については、Vasilの総説<sup>2)</sup>を参照）。

植物細胞培養研究者の駆け出しとしては、分子生物学の潮流を感じてはいたものの、その技術は、まだ、ごく一部の研究者が使うことのできる先端技術であり、一般の研究への普及は遠いと感じていた。もちろん、我々の研究室でも、1980年代半ばから、分子生物学を取り入れ、いくつかの遺伝子の単離を開始したが、一つの遺伝子を単離して解析をするというのが大仕事であった。大山莞爾博士、ならびに杉浦昌弘博士らにより1986年、葉緑体ゲノムの解読が報告されたが、それらはとてつもない大事業と感じられた<sup>3,4)</sup>。一方、

<sup>‡</sup> 解説特集「30年後の光合成研究」

<sup>\*</sup> 連絡先 E-mail: fsato@lif.kyoto-u.ac.jp

その後のゲノム解読技術の進展により、アラビドプシスゲノムが2000年に解読<sup>5)</sup>され、さらに、その後、イネを初めとする多数の植物種において大規模なゲノム解読が進展し、様々なビッグサイエンスが展開されていることは、まさに時代の進展を感じるばかりである。

当然、当時の科学研究の雰囲気は、ある意味、牧歌的、非常に単純であり、ドラエモンの歌のように「こんなことができたらいいな」という楽観的発想に満ちあふれていた。例えば、先にあげた「ポマト」は、研究者の真の目的は別にあつたにしても、一般的には、地上部にはトマト、地下部にはジャガイモが収穫できる夢の作物として語られていた。すなわち、科学の進歩によって、なんでもできるのではないかという非常な楽観があり、現在の知識からして困難と思われる二律背反を平気で期待していたといえる。

### 3. 培養細胞と光合成研究

実際に私が研究を開始した1970年代中頃では、分子生物学の適用範囲はさらに狭く、大腸菌など一部の微生物やウイルスでのみ研究可能であつた。従って、圃場レベルでの植物科学研究と生化学／分子生物学との狭間で、植物細胞培養は、最も解析的であり、かつ、実用化への展開が可能な材料と考えられた。当時の課題は、一般的な植物培養細胞は光合成をしないということであり、如何にして、光合成をする培養細胞系を確立するかということにあつた。培養細胞は、ホルモン制御により器官再生ができるとはいえ、動物細胞のように分化した表現形質を持続的に維持することは困難であり、容易に脱分化／再分化できるという特性ゆえに、光合成をする葉肉細胞も、培養に伴い容易に光合成活性を失った。幸いなことに、より緑化したタバコ培養細胞を入手し、実際にこの細胞が、糖存在下でも光合成をしていることを確かめるとともに、さらに、糖無添加条件でも光合成に不可欠なCO<sub>2</sub>濃度を富化することにより、光独立栄養的に生育できることを実証したのが、その後の研究の出発である<sup>6)</sup>。こうした研究の多くでありがちなことであるが、この研究は、ほぼ同時期に行われていたHuesemann & Barzら(1977)の*Chenopodium*の系<sup>7)</sup>に次いで、2例目の安定した光独立栄養培養細胞系の成功例となり、現在まで維持されている。

光合成だけで生育する培養細胞の作成においては、先にも述べたように、二律背反を期待する過酷

な課題が与えられていた。それは、光独立栄養細胞系において、有用物質生産を行うという課題であつた。従って、通常の光合成研究では使わない特殊な薬用植物を用いて緑色培養細胞／光独立栄養培養細胞を作成し、その有用二次代謝物産生を検討した。しかし、既に述べたように、これは明らかに二律背反を期待するものであり、光独立栄養培養細胞における有用物質生産の試みは頓挫した。現在、微細藻類を用いたバイオ燃料生産の試みをみると、その多くは細胞生育と物質生産を追求するものであり、我々が過去に試みたように、できないことを追い求めているように感じられる。すなわち、生育するためには、余剰エネルギー蓄積／二次代謝にかかるエネルギーの余裕はなく、二次代謝を追求すると生育が低下するという二律背反があると考えられる。

光合成だけで生育する緑色細胞確立の一つの要因は、生育の遅い細胞を選ぶことであつた。すなわち、糖存在下における生育を優先すると葉緑体形成そのものが生育にとっては余分のコストとなり、葉緑体が未発達な状態、つまり、白色の培養細胞が選抜される。同様なことは、二次代謝産物産生においても同様である。陸上化にともない、余分の光合成産物を蓄積できる組織を形成するようになるとともに、二次代謝産物の合成と蓄積が可能となったというのが、私の理解である。ある種の分化した組織、例えば、シュート形成したジギタリスが強心配糖体であるジギトキシンを産生するが、このような組織分化が二律背反を達成するために必要と思われる。

一方、光合成だけで生育する光独立栄養培養細胞の光合成研究への利用であるが、いくつかの解析の結果、光合成研究のモデル植物ほどではないが、それなりの光合成活性を持つことが明らかになり、多くの共同研究者の協力により、様々な植物生長調節物質の評価や耐性株のスクリーニングに応用することが可能であつた。特に、重松由夫博士の努力により光化学系II阻害剤であるアトラジン耐性株のスクリーニングに成功するとともに、同株が通常の抵抗性雑草が示さないDCMU耐性を示すとともに、葉緑体遺伝子*psbA*においてSer264Thrという初めての葉緑体ゲノム変異を示すことにも成功した<sup>8,9)</sup>。緑藻類を用いた葉緑体変異体の単離研究はよく行われているが、高等植物でも同様の選抜が可能であることを示す初めての成果となつた（詳しくは、総説<sup>10)</sup>を参照）。

#### 4. 光独立栄養細胞と葉肉細胞との違い

このように、光独立栄養培養細胞は光合成研究のモデルとなりうるものではあったが、一方、葉肉細胞との明らかな違いもあった。すなわち、培養細胞は、遅いとはいえ、継続的に増殖する細胞であり、特に、活発に生育する時期には、C<sub>4</sub>光合成の初発炭酸固定酵素であるphosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) の高い活性が見られた。もちろん、PEPCには解糖系におけるアナプレロティックな役割が知られていたが、<sup>14</sup>C<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用いた炭酸同化の解析から、C<sub>4</sub>有機酸への取り込みが認められた。そこで、さらなるC代謝への期待を持ち、多くの共同研究者、特に、小泉望博士が精力的に解析し、初めてのC<sub>3</sub>型PEPC遺伝子の単離、形質転換植物体の作製を行ったが、C<sub>3</sub>植物におけるPEPCの役割の解明には最終的に至らなかった。

一方、培養細胞の遺伝子発現をタンパク質レベルで、緑葉の葉肉細胞と直接比較すること（今でいうプロテオミックス）により、培養細胞特有の遺伝子発現、すなわち、培養細胞は無菌で生育しているにもかかわらず、病害菌感染誘導タンパク質を著量蓄積していることが明らかになった<sup>11)</sup>。竹田恵美博士の一連の研究により、培養細胞には、明らかに葉肉細胞とは異なる遺伝子発現があり、かつ、その光合成的生育には、通常の大気濃度を大きく上回るCO<sub>2</sub>濃度が必要であること形態の違いが明らかとなった。すなわち、通常、細胞膜に張り付いている葉緑体が細胞膜から脱落し、核膜の近くに局在していることが、細胞質におけるCO<sub>2</sub>の拡散抵抗を大きくしていると考えられた（図1参照）<sup>12,13)</sup>。このことは、葉緑体の運動を制御するアクチンフィラメントの不全とも考えられるが、一方、培養細胞では、細胞内で活発に呼吸が起きていることを考えると、むしろ、原始的な真核細胞に捕らえられた植物細胞の初期の状況を反映しているとも思われる。培養細胞は、植物細胞の通常観察されない特性を明らかにする良い実験系と考えられる。

#### 5. 培養細胞と葉緑体遺伝子発現

光独立栄養細胞の解析から明らかになった、もう一つ重要な成果は、葉緑体の遺伝子発現を制御するタンパク質CND41の同定である<sup>14,15)</sup>。我々が、この研究を始めた当時、黒岩常祥博士のグループが精力的に、葉緑体核様体タンパク質を観察しておられた。ま

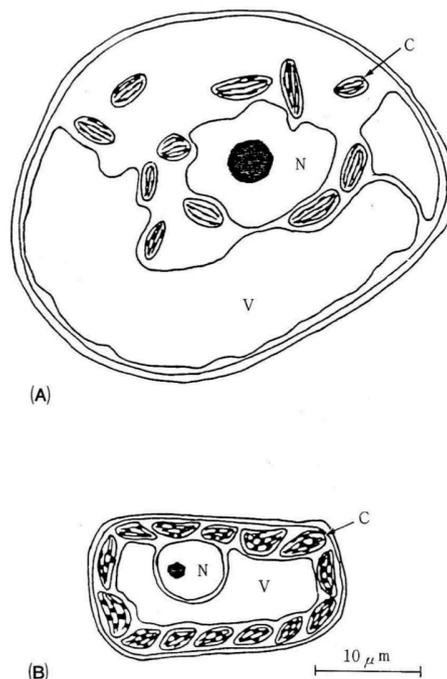


図1 光mixotrophic (混合) 培養細胞(A)ならびに、緑葉葉肉細胞(B)の模式図  
C:葉緑体、N:核、V:液胞、文献12より許可をえて引用（竹田恵美博士原図）

た、葉緑体の祖先と考えられる原核細胞では、ヒストンは存在しないもののHUなどのDNA結合タンパク質が存在し、その遺伝子発現の制御に関わっていることが明らかになりつつあった。我々も光独立栄養培養細胞を用いることにより、葉緑体核様体構成タンパク質の単離同定ができるのではないかと考えた。中野雄司博士の努力により、培養細胞から、CND41という新規な葉緑体DNA結合性タンパク質を単離・同定することができた。また、村上真也博士の努力により、同タンパク質がプロテアーゼ活性を有することが明らかになり<sup>16)</sup>、さらに、現在、加藤裕介博士の努力により、同タンパク質が老化時におけるRubiscoの分解と転流に関わっていること<sup>17,18)</sup>、また、中野博士の努力によりCND41の発現抑制によりプロプラスチドから葉緑体への分化が進行するとともに、プロプラスチドにおけるジベレリン合成の抑制と植物生長の抑制が起こるという全く予想していなかった色素体のバイオジェネシスと個体の生長制御における機能が明らかになってきた<sup>19)</sup>。我々が最初にタバコで同定したCND41に存在するN末端の塩基性配列は、タバコやトマトなど、ナス科の植物に限定されており、そのため、CND41の普遍的生理作用については、一部

の研究者の興味を引くにとどまっているが、タバコ植物体において明らかになった老化制御機能は、植物の生長制御のひとつの糸口になると期待している。

## 6. 培養細胞から見た光合成研究の可能性

以上の自己総括を踏まえて述べたいことは、分子生物学研究が全盛の現代において、古びたように見える培養細胞研究の中にも、未来が詰まっているのではないかということである。例えば、光独立栄養培養細胞系は、植物体よりも単純化したシステムとして、光合成のメカニズム解析、特に、細胞選抜系としての利点は既に述べた通りである。例えば、大気中のCO<sub>2</sub>だけで生育できる光独立栄養培養の確立は、高等植物におけるCO<sub>2</sub>濃縮機構の存在の理解に繋がると期待される。また、完全に制御した環境での培養という利点から、培地交換によるC/Nバランスの解析等、様々な解析が可能である。例えば、個体を用いたCND41の機能解析は、器官分化を伴うために複雑であるが、培養細胞系をもちいることにより大幅に簡略化できると考えている。また、未解明に終わっている培養細胞におけるPEPCの高発現はC3植物からのC4植物の進化の理解につながると期待できる。また、培養細胞における継続的な増殖は、葉緑体の分裂・分化の理解に有用な素材を提供している<sup>13)</sup>。さらに、耐塩性光独立栄養培養細胞の単離と、その光化学系IIの耐塩性の解明<sup>20)</sup>は、さらなる耐塩性植物の開発、あるいは、構造解析に耐える安定した光化学系IIの単離と解析に有用と期待される。意外とフラスコの中は、個体を用いた研究よりも自在の材料を提供してくれる可能性がある。

## 7. おわりに

以上、30年におよぶ光独立栄養培養細胞を用いた研究を総括していえることは、培養細胞系も意外と使えるのではないかということである。もちろん、遺伝子組換え技術／分子生物学の発展により、個体レベルで、遺伝子機能を直接解析できるようになり、培養細胞のように個体での機能評価に反映しにくい系を使う必要がないことも事実ではある。しかし、個体を使っているからといって、個体の生産機能評価につながっているかという点、それは、意外と見落とされていると感じることがしばしばある。培養細胞で研究したことが、個体の機能改変にもっと繋がること、例えば、より高い光合成機能を持つとして選抜

した細胞から、自在に植物個体を再生し、その機能を強化できること、あるいは、植物体の特定の時期の特定の細胞の遺伝子発現を任意に制御できることなど、期待する夢はたくさんある。まだまだ、我々が知らない遺伝子機能が埋蔵されており、そうした遺伝子機能の発掘は、環境変化とともに進化してきた植物の多様性を考えると無限であると言える。

このように、夢は無限であるが、我々の日常は有限である。夢だけで生活することはできない。何処かで、実用化を考える必要もある。残念ながら、我々の研究も、現時点では、圃場における作物生産性の向上につなげることはできていない。しかし、常に、研究成果を作物生産／物質生産につなげたいという意識をもって解析している。そのために、使える技術／目標を掲げて、研究してきたといえる。例えば、除草剤による耐性株のスクリーニング、除草剤機能の評価、新規な生長調整物質の探索や耐塩性細胞の選抜、環境制御による光合成機能の改変の可能性や、抗菌性タンパク質の解析など<sup>21)</sup>、広い意味での光合成機能の最適化のために、よくいえば、多面的に、悪く言えば、底浅く、解析し続けてきたといえる。

一方、近年の大型研究プロジェクトを拝見すると、より深掘した提案が多いと感じる。当然、内容は精密になっている。しかし、目標が絞り込まれるとともに、解析対象がマイクロ化し、部分現象の解明に終わり、個体、あるいは、自然環境下での評価という、現場の必要とする目標に向かっていないように感じる。このように書くと、研究に対する考えが、応用に縛られすぎていると感じる方も多いかと思う。研究が好奇心で動いていることは事実であり、かつ、重要である。しかし、予算の大型化に伴い、好奇心を満足させる多くの研究成果とともに、納税者の期待を、より考える必要があるように思われる。自分自身、もし、予算がなく、自分のお金でしないといけないとすれば、どれだけの予算を自分で支払うのだろうと考えることがある。実用化ができるに越したことはないが、それができなくとも、できるだけ、わくわくする研究で、より多くの社会的インパクトを与え続けることを続けたいと念願している。それは、何も光合成研究に限ることではなく、全ての科学に共通すると考える。同時に、「光合成研究という縛り」をつくることは、自らの道を狭めているのではないかと危惧している。30年後、光合成研究が

無限の広がりをもって、人類の未来に貢献していることを念願している。

## 謝辞

本文に名前を挙げた方々以外にも多くの共同研究者のご協力、ご支援、ならびに、科学研究費補助金を始めとする多くの研究助成金により、ここに記載しました研究を推進することができましたことを感謝申し上げます。

Received November 18, 2013, Accepted November 26, 2013, Published December 31, 2013

## 参考文献

1. Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montague, M. and Schell, J. (1983) Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303, 209-213.
2. Vasil, I.K. (2008) A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Rep.* 27, 1423-1440.
3. Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi M., Chang, Z., Aota, S-I, Inokuchi, H. and Ozeki, H. (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322, 572-574.
4. Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hyashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B.Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T, Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H. and Sugiura, M. (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* 5, 2043-2049.
5. The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.
6. Yamada, Y., Sato, F. (1978) The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. *Plant Cell Physiol.* 19, 691-697.
7. Huesemann, W. and Barz, W. (1977) Photoautotrophic growth and photosynthesis in cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Physiol. Plant.* 40, 77-81.
8. Sato, F., Shigematsu, Y. and Yamada, Y. (1988) The mechanism of herbicide resistance in tobacco cells with a new mutation in the Qb protein. *Mol. Gen. Genet.* 214, 358-360.
9. Shigematsu, Y., Sato, F. and Yamada, Y. (1989) The mechanism of herbicide resistance in tobacco cells with a new mutation in the Qb protein. *Plant Physiol.* 89, 986-992.
10. Sato, F. (2013) Characterization of plant functions using cultured plant cells, and biotechnological applications. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 1-9.
11. Takeda, S., Sato, F., Ida, K. and Yamada, Y. (1990) Characterization of polypeptides that accumulate in cultured *Nicotiana tabacum* cells. *Plant Cell Physiol.* 31, 215-221.
12. 佐藤文彦、竹田恵美、山田康之 (1989) 緑色培養細胞における機能分化. 組織培養 15, 7-11.
13. Takeda, S., Kaneko, Y., Matsushima, H., Yamada, Y. and Sato, F. (1999) Cultured green cells of tobacco as a useful material for the study of chloroplast replication. *Methods Cell Sciences* 21, 149-154.
14. Nakano, T., Sato, F. and Yamada Y. (1993) Cultured green cells of tobacco as a useful material for the study of chloroplast replication. *Plant Cell Physiol.* 34, 873-880.
15. Nakano, T., Murakami, S., Shoji, T., Yoshida, S., Yamada, Y. and Sato, F. (1997) A novel protein with DNA binding activity from tobacco chloroplast nucleoids. *Plant Cell* 9, 1673-1682.
16. Murakami, S., Kondo, Y., Nakano, T. and Sato, F. (2000) Protease activity of CND41, a chloroplast nucleoid DNA-binding protein, isolated from cultured tobacco cells. *FEBS Lett.* 468, 15-18.
17. Kato, Y., Murakami, S., Yamamoto, Y., Chatani, H., Kondo, Y., Nakano, T., Yokota, A. and Sato, F. (2004) The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta* 220, 97-104.
18. Kato, Y., Yamamoto, Y., Murakami, S. and Sato (2005) Post-translational regulation of protease activity of CND41 in senescent tobacco leaves. *Planta* 222, 643-651.
19. Nakano, T., Nagata, N., Kimura, T., Sekimoto, M., Kawaide, H., Murakami, S., Kaneko, Y., Matsushima, H., Kamiya, Y, Sato, F. and Yoshida, S. (2003) CND41, a chloroplast nucleoid protein, regulated plastid development and dwarfism related to gibberellin biosynthesis. *Physiol. Plant.* 117, 130-136.
20. Murota, K., Sato, F., Ohshita, Y., Watanae, A., Aso, S. and Yamada, Y. (1994) Changes related to salt tolerance in thylakoid membranes of photoautotrophically cultured green tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* 35, 107-113.
21. 佐藤文彦 (2000) 光独立栄養培養細胞株を用いた植物機能の分子細胞生物学的解析とその応用. 植物の化学調節 35, 8-16.

## Perspectives in Photosynthetic Research; View Through In-Vitro Culture Systems of Higher Plants

Fumihiko Sato\*

Division of Integrated Life Science, Graduate School of Biostudies, Kyoto University

## 過去30年間の光化学系1複合体の研究から30年後の研究展開を読む<sup>‡</sup>

岡山大学 大学院自然科学研究科  
高橋 裕一郎\*

光化学系1は光捕集、光化学反応、電子伝達反応に関与するコファクターが一体となった複合体を形成するため、多くの光合成研究者の興味を引きつけてきた。生化学と物理化学の分野の研究者が研究を牽引してきたが、最近では分子生物学の手法も多用されるようになり、研究手法が広がりつつある。長年にわたる研究の結果、光化学系1の静的な構造と機能の研究は大きく進展した。そして、光合成生物が変動する自然環境に応答して、光化学系1複合体の構造と機能をフレキシブルに変化させる分子機構を解明する研究はこれから大きく展開していくだろう。本稿では光化学系1研究の過去と現在を振り返りながら、今後の研究の方向を議論したい。

### 1. はじめに

光化学系は、光捕集、光化学反応、電荷分離の安定化を担う。酸素発生型光合成電子伝達系には2つの光化学系が直列に機能し、光エネルギーを利用してH<sub>2</sub>OからNADP<sup>+</sup>への電子伝達反応を駆動する。光化学系2はH<sub>2</sub>Oから電子を引き抜く高い酸化力を生成し、プラストキノンおよびシトクロム $b_6f$ を経てプラストシアニンもしくはシトクロム $c$ を還元する。一方、光化学系1はプラストシアニンもしくはシトクロム $c$ を酸化し、フェレドキシンを還元する反応を触媒し、NADP<sup>+</sup>を還元する強い還元力を生成する。光化学系2やシトクロム $b_6f$ と同様に、光化学系1は多数のコファクターとサブユニットから構成される大きな複合体を形成し、チラコイド膜に埋め込まれて存在する。光化学系1は、分子量が大きく、構造が複雑な膜タンパク質複合体であるため、解析が容易でなかった。しかし、新しい界面活性剤の導入、タンパク質精製法および微量タンパク質解析法の発展、構成サブユニットの遺伝子の解析および改変法の開発、コファクターの分析法や活性の分光学的解析法の高度化、結晶構造解析の成功などにより、光化学系1複合体の構造と機能の解明は大きく進展した。

光化学系1の還元側では、電子の行き先が多方面に分かれるため、光合成研究者にとって魅力的な研究対象の一つである。ここでは光化学系1複合体の生化学的解析の経緯と今後の展開の大きな流れについて、

著者の主観を交えて概観し、それを基にして今後の研究の展開を考えてみたい。

### 2. 光化学系1の研究の流れを振り返る：サブユニット組成を中心に

光化学系1複合体を単離する研究は50年ほど前から本格的に行われるようになった。1960年代に、2つの光化学系を物理的に分離することに成功した<sup>1)</sup>。植物のチラコイド膜を温和な界面活性剤であるジギトニンで処理した後、分画遠心法によりチラコイド膜断片を分画したところ、重い膜画分はクロロフィル $b$ が多く光化学系2活性が高いこと、軽い膜画分はクロロフィル $a$ が多く光化学系1活性が高いことが示された。植物ではチラコイド膜のグラナ構造が発達しており、グラナチラコイドには光化学系2が、ストロマチラコイドには光化学系1がそれぞれ局在していることが現在では明らかにされている。ジギトニンによりグラナチラコイドとストロマチラコイドの接続部分が切断された結果、グラナチラコイドが重い画分に分画され、ストロマチラコイドが軽い画分に分画されたのである。当時は既に酸素発生型光合成電子伝達系には2つの光化学系が直列に機能することが提唱されていたが、2つの光化学系を分離できることを示した実験は、その後の光化学系複合体の精製につながる重要な成果である。

一方、チラコイド膜を強い界面活性剤であるSDSで

<sup>‡</sup> 解説特集「30年後の光合成研究」

\* 連絡先 E-mail: taka@cc.okayama-u.ac.jp

可溶化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけると、緑のバンドが3本分離された。先端に泳動されたバンドは遊離色素であったが、泳動度の小さい2本のバンドは泳動度の低い順番に、クロロフィルaを主に含むCPIとクロロフィルbを多く含むCPIIと名前がつけられ、クロロフィルa/b比から前者が光化学系1、後者が光化学系2であると結論された<sup>2)</sup>。その後、クロロフィルb欠損株には光化学系2の活性があるにもかかわらずCPIIが分離されなかったことから、CPIIはアンテナ複合体 (LHCII) であることが示された<sup>3)</sup>。SDSを用いた電気泳動の研究により、光化学系1とLHCIIがクロロフィルを結合するタンパク質 (クロロフィルタンパク質複合体) として生化学的に分離できることが証明された。

呼吸鎖やATP合成酵素の研究の分野でも大きな構造をもつ複合体が重要な機能を果たすことが注目されるようになってきた。そして、1970年代には光化学系1複合体の生化学的研究も新しい段階に発展し、複合体を構成する成分に着目した研究が報告されるようになった。光化学系1は膜タンパク質であるため活性を保持したまま可溶化するためには適切な界面活性剤を使用しなければならないこと、そしてサイズが非常に大きいことなどから精製法を工夫する必要があった。そして、1975年にはポリペプチド組成を議論できるレベルまで純化された標品が報告された<sup>4)</sup>。温和な界面活性剤で可溶化して、光化学系1複合体を単離・精製し、それを今度はSDSで解離しポリペプチド組成をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で調べた。すると、80kDa程度の大きなサブユニットと、20kDa以下の多数の小さなサブユニットが光化学系1複合体に存在することが示された。複合体に含まれる多数のサブユニットの機能の解析も進められ、80kDaの大きなサブユニットに光化学反応の成分とアンテナクロロフィルが存在することが明らかにされた。さらに、小型のサブユニットの機能解析も進められ、電子受容体の鉄硫黄中心の結合とプラストシアニンの酸化の効率化に関与するサブユニットの同定に成功した。より強い条件での可溶化と精製法を用いて、光化学系1の機能をもつ最小単位の構造を明らかにすることが、当時の研究の主要な目標の一つであった (図1)。

光化学系1複合体の無傷な構造を明らかにするという逆の方向性の研究も進められた (図1)。この場合、より温和な界面活性剤を用いてチラコイド膜を可

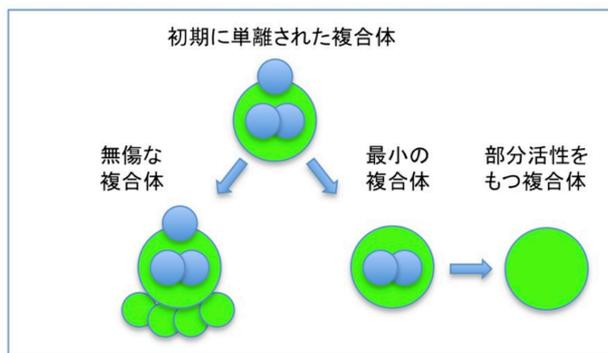


図1 光化学系1複合体の生化学的解析の展開

緑の丸は反応中心を示し、いわゆるコア複合体である。ここにはコアアンテナ色素 (クロロフィルaとβ-カロテン) と主要な電子伝達成分 (P700、A<sub>0</sub>、A<sub>1</sub>、F<sub>X</sub>) が結合する。小さな青の丸はその他の小型サブユニットを示し、電子受容体F<sub>A</sub>とF<sub>B</sub>を結合するPsaCはそのうちの一つである。4つ連なった小さな緑の丸はアンテナ複合体 (LHCI) を示す。研究の流れとして、光化学系1活性を保持する最小単位を解明する方向 (右矢印) と無傷な複合体を解明する方向 (左矢印) があった。

溶化するのである。その結果、植物の光化学系1複合体には、シアノバクテリアの光化学系1複合体と共通する構造をもつコア複合体 (PSI core) にアンテナ複合体 (LHCI) が結合していることが分かった<sup>5)</sup>。現在ではこの標品はPSI-LHCI超複合体と呼ばれている。また、葉緑体ゲノムの全塩基配列が決定され、N末端のアミノ酸配列の決定法が大きく進歩し、これまでに知られていなかった10kDa以下の膜を一回貫通するヘリックスをもつ疎水性サブユニットが存在することが見いだされた<sup>6)</sup>。このような疎水性小型サブユニットはシアノバクテリアから植物の光化学系2およびシトクロムb<sub>6/f</sub>複合体にも存在する。葉緑体ゲノムの全塩基配列の情報、小型のサブユニットの発見に重要な貢献をした<sup>7,8)</sup>。興味深いことに、疎水性小型サブユニットは光合成細菌の反応中心標品や呼吸鎖のシトクロムb<sub>c<sub>1</sub></sub>複合体には見いだされない。したがって、光化学系1複合体のサブユニット構造は当初考えられていたよりもかなり複雑であることが分かった。

分子生物学の進展に伴い、1980年代にはシアノバクテリアの光合成遺伝子の形質転換が可能になった。1990年代には緑藻クラミドモナスを中心に葉緑体形質転換系が開発され、光合成の葉緑体遺伝子の特異的形質転換が可能となった。その結果、小型サブユニットの機能の一部が明らかにされた。また、いくつかのサブユニットは、欠損させると複合体の安定性が損なわれる多面効果があることも示された。これまでの生化学的解析と新たな分子生物学的解析により光化学系1

表 植物の光化学系1複合体のサブユニット

サブユニット	遺伝子	機能
PsaA	C	反応中心
PsaB	C	反応中心
PsaC	C	Fe-S中心、F <sub>A</sub> とF <sub>B</sub>
PsaD	N	フェレドキシン結合
PsaE	N	フェレドキシン結合
PsaF	N	プラストシアニン結合
PsaG	N	アンテナ複合体と相互作用
PsaH	N	ステート遷移
PsaI	C/N	
PsaJ	C	
PsaK	N	アンテナ複合体と相互作用
PsaL	N	ステート遷移
PsaN	N	アンテナ複合体と相互作用
PsaO	N	ステート遷移
PsaP	N	リン酸化タンパク

Cは葉緑体コード、Nは核コードの遺伝子を示す。

複合体のサブユニット組成の全貌が明らかにされた(表)。また、シアノバクテリアそしてそれに続く植物の光化学系1複合体の結晶構造解析により、各サブユニットの複体内での配置が明確になり、サブユニットの構造と機能の解明も大きく進展することとなった。

### 3. 光化学系1の研究の流れを振り返る：コファクター組成を中心に

光化学系1複合体のサブユニット構造は当初考えられていた以上に複雑であることが明らかになってきたが、コファクター組成の解明も大きく進展した。シアノバクテリアと植物に共通する構造であるコア複合体にはおよそ100分子のクロロフィルaが結合し、その一部は初期電子供与体(P700)と初期電子受容体(A<sub>0</sub>)として機能する。また、主要なカロテノイドはβカロテンで、クロロフィルbやキサントフィルは存在しない。また、鉄硫黄中心が3種存在し、中間電子受容体の4Fe-4SであるF<sub>X</sub>が2つの相同な反応中心サブユニット(PsaAとPsaB)間に結合し、最終電子受容体のF<sub>A</sub>とF<sub>B</sub>がストロマ側に結合するPsaCサブユニットに結合する。PsaCは4Fe-4Sクラスターを2つ結合し、バクテリア型フェレドキシンの構造とよく似ている。A<sub>0</sub>とF<sub>X</sub>の間に機能する電子受容体A<sub>1</sub>の化学種はナフトキノンは植物とシアノバクテリアで光化学系1複合体

に2分子のフィロキノン(ビタミンK<sub>1</sub>)が存在することが生化学的に明らかにされ<sup>9)</sup>、結晶構造解析が行われたた標品もフィロキノンをもっていたため、光化学系1のナフトキノンはフィロキノンのみであると考えがちである。しかし、様々なシアノバクテリアや藻類のナフトキノンを分析すると、フィロキノン、メナキノン、ヒドロキシフィロキノンの3種類のナフトキノンが存在することが明らかになった。光合成のモデル生物として多用される緑藻クラミドモナスも最近までナフトキノンの組成が明確でなかったが、2種のフィロキノンが存在し、ヒドロキシフィロキノンが90%でフィロキノンが10%存在することが分かった<sup>10)</sup>。光化学系1のコア複合体の構造と機能はシアノバクテリアから植物までよく保存されているが、重要な電子伝達成分であるナフトキノンの化学種が異なることは意外な結果である。種により3種のナフトキノンがどのように使い分けられているのかは分かっていない。

光化学系1と光化学系2では、反応中心サブユニットのアミノ酸配列が大きく異なるため、両者はそれぞれタイプIおよびタイプIIの先祖型反応中心から進化してきたと考えられている。しかし、結晶構造解析により明らかにされた膜貫通ヘリックスの配置が光化学系1と2でよく保存されていることから、両者は共通の先祖型反応中心から進化したとみなされている。また、光化学系1と光化学系2には1対の電子伝達体(光化学系1ではクロロフィルa二量体の電子供与体P700、クロロフィルaの電子受容体A<sub>0</sub>、ナフトキノンの電子受容体A<sub>1</sub>、光化学系2ではクロロフィルa二量体の電子供与体P680、クロロフィルaの電子受容体A<sub>0</sub>、フェオフィチン電子受容体、プラストキノン電子受容体Q<sub>A</sub>、Q<sub>B</sub>)が複体内で対称的に配置されている。電子伝達成分の酸化還元反応のキネティクス解析によると、光化学系2では一方の電子伝達鎖しか機能していないが、光化学系1では両方の電子伝達鎖が機能している。ここでは、光化学系1複合体の構造の解明というブレークスルーが想定していなかった新しい研究課題を生み出すことを示すよい例である。タンパク質の構造解析や生化学、機能上重要なアミノ酸を改変するタンパク質工学、電子伝達系の活性を測定する分光学的な測定法、などの異分野の知識・技術を駆使して研究を進めるといふ光合成研究の特徴である学際性が光化学系1複合体の解析に大きな力を発揮している。

#### 4. 光化学系1の構造と機能のダイナミクス：最近の研究の進展と今後の展開

これまでの研究では、光化学系1はその構造や機能が不変で安定した複合体として解析されてきた。シアノバクテリアの光化学系1の3量体<sup>11)</sup>と植物のPSI-LHCI超複合体<sup>12)</sup>の結晶構造解析によりサブユニット構造とコファクターの配置の解明も大きく進展した。その結果、筆者が大学院生として光化学系1の研究を始めた30年程前からすると構造と機能に関する基本的な謎は解けてしまったと思われる。しかし、残された未解明の重要な課題に注目すべき時期がきている。最近の研究手法の進展によりこの未解明な課題を本格的に取り組める段階にようやく達したと言えるのである。

今後解決すべき課題の一つは、複雑で巧みな構造をもつ光化学系1複合体がどのように合成されるかである(図2)。コア複合体のサブユニット数は14前後で、その多くは膜貫通ヘリックスをもつ疎水性タンパク質である。さらにコファクターとしてクロロフィル、カロテノイド、ナフトキノン、Fe-Sクラスターをもち、それらの総数は百数十分子にも達する。真核生物の場合、サブユニットの一部は葉緑体にコードされ、残りは核にコードされている。また、クロロフィルは合成されたとほぼ同時に光化学系複合体のクロロフィル結合サブユニットに結合されないと光照射下では有害な活性酸素を発生して葉緑体や細胞に有害である。つまり、光化学系複合体の合成には異なる部位で合成されたサブユニットとコファクターが効率的に分子集合されなければならないのである。その仕組みはどのようなものなのだろうか。これまでに分子集合に必要なタンパク質因子がいくつか報告されているが、それらの因子がどのような分子機構で光化学系成分の分子集合を介添えているのかはほとんど明らかにされていない。

もう一つの興味深い課題は、光化学系1複合体の構造と機能が生育環境変化にตอบสนองして部分的に変化する動的な性質を解明することである(図2)。光化学系1複合体の構造と機能のダイナミクスの分子機構の解明は今後大きく進展することが期待される。例えば、光環境変化にตอบสนองした2つの光化学系間の光エネルギーの分配機構として知られるステート遷移がある。光化学系2が光化学系1よりもより励起される条件下では、2つの光化学系の間にあるシトクロム $b_{6f}$ が還元型になる。その状態を感知すると光化学系2に結合するアンテナ複合体(LHCII)がリン酸化され、

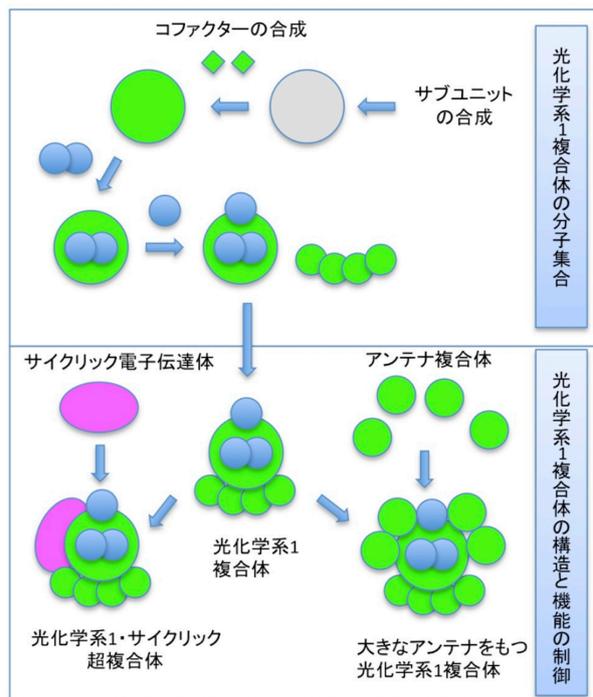


図2 光化学系1複合体の動的構造の解明

光化学系1複合体の分子集合(上)と完成された光化学系1複合体が生育条件にตอบสนองしてその機能を変化させる様子(下)を模式的に示した。複合体の分子集合は段階的に行われると考えられている。サブユニットの翻訳とコファクターの生合成は協調的に行われているはずである。周辺部のサブユニットは順番に付加されていくと考えられる。分子集合が完了しても複合体の構造は静的ではなく生育環境にตอบสนองして、アンテナ複合体が付加されたり、循環型電子伝達体と結合したりすると考えられている。

その一部が光化学系2から光化学系1複合体へ移動し、光化学系1のアンテナサイズを大きくする<sup>13)</sup>。植物の光化学系1コア複合体の一方側(PsaFとPsaJが存在する側)にLHCIが4つ結合し(クラミドモナスでは9つ結合する)、その反対側(PsaH, PsaI, PsaL, PsaOが存在する側)にLHCIIが結合すると考えられている。しかし、正確な結合部位は不明で、どのくらいLHCIIが結合するかも明らかにしなければならない。もう一つの具体例は、直鎖型と循環型電子伝達系の制御機構である。酸素発生型光合成電子伝達系には、2つの光化学系が直列に機能する直鎖型電子伝達系が存在することはよく知られており、この反応とATP合成が共役し、さらにNADPHが生成される。また、光化学系1だけが関与する循環型電子伝達系も機能し、フェレドキシンからシトクロム $b_{6f}$ へ電子が還流し、電子は再び光化学系1へ戻ってくる。この反応はATP合成と共役し、NADPHは生成されない。光化学系1の還元側が直鎖型と循環型電子伝達への電子の

分岐点となるが、電子の分配の制御機構を明らかにすることは重要である。

## 5. まとめ

光化学系1複合体は巨大な構造をもち、光捕集・光化学反応・電子伝達反応という複雑な機能を効率的に果たしている。微細な構造が明らかにされてきたが、分子集合や機能調節といったダイナミクスは今後の魅力的な研究対象である。この課題が解明されるには30年かかるのかどうかは議論が分かれるところであろう。しかし、解決したと思った研究課題から、新しい研究手法が導入されると再び脚光を浴びるような新しい研究成果が生まれてくることはよくあることである。新しい研究対象に取り組むだけでなく、新しい視点でこれまでの研究対象を見直すことも大切ではないだろうか。

Received December 5, 2013, Accepted December 7, 2013,  
Published December 31, 2013

## 参考文献

- Boardman, J.K. and Anderson, J.M. (1964) Isolation from spinach chloroplasts of particles containing different proportions of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* and their possible role in the light reactions of photosynthesis. *Nature* 203, 166-167.
- Ogawa, T., Obata, F. and Shibata, K. (1966) Two pigment proteins in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 112, 223-234.
- Thornber, J.P. and Highkin, H.R. (1974) Composition of the photosynthetic apparatus of normal barley leaves and a mutant lacking chlorophyll *b*. *Eur. J. Biochem.* 41, 109-116.
- Bengis, C. and Nelson, N. (1975) Purification and properties of the photosystem I reaction center from chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 250, 2783-2788.
- Mullet, J.E., Burke, J.J. and Arntzen, C.J. (1980) Chlorophyll proteins of photosystem I. *Plant Physiol.* 65, 814-822.
- Ikeuchi, M. and Inoue, Y. (1988) A new 4.8-kDa polypeptide intrinsic to the PSII reaction center, as revealed by modified SDS-PAGE with improved resolution of low-molecular-weight proteins. *Plant Cell Physiol.* 29, 1233-1239.
- Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H. and Ozeki, H. (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322, 572-574.
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B. Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H. and Sugiura, M. (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* 5, 2043-2049.
- Takahashi, Y., Hirota, K. and Katoh, S. (1985) Multiple forms of P700-chlorophyll *a*-protein complexes from *Synechococcus* sp.: The iron, quinone and carotenoid contents. *Photosyn. Res.* 6, 183-192.
- Ozawa, S., Kosugi, M., Kashino, Y., Sugimura, T. and Takahashi, Y. (2012) 5'-monohydroxyphyloquinone is the dominant naphthoquinone of PSI in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 53, 237-243.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W. and Krauss, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* 411, 909-917.
- Amunts, A., Toporik, H., Borovikova, A. and Nelson, N. (2010) Structure determination and improved model of plant photosystem I. *J. Biol. Chem.* 285, 3478-3486.
- Rochaix, J.D. (2011) Regulation of photosynthetic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 375-383.

## Perspective Research on Photosystem 1 Based on the Past and Present Achievements

Yuichiro Takahashi\*

Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

科学の進歩と未来<sup>‡</sup>

名古屋大学 遺伝子実験施設

伊藤 繁\*

光合成研究の未来を、科学研究の発展段階についての考え方と、光合成研究の歴史への感想、研究と科学者個人の関係から論じる。

## 1. 科学の発展段階

「伊藤君、光合成の進化とか言っているなら、行って自分で見てきたまえ。」と熊沢さんにいわれて、私は太古のシアノバクテリアの堆積物（20億年前のストロマトライト化石）を調べに、1998年夏カナダ北極圏のオーロラで有名な人口1万人の町イエローナイフへと飛び、そこからチャーター飛行艇で100 km、グレートスレーブ湖中の島につきました。北極圏の夏は最高、ヒトのいない熊のテリトリー（本当に熊さんに遭遇）にテントをはり、見渡す限り続くストロマトライト上で、呆然（図1）。昼はボートで別の島に行き何万年間堆積した化石を切り取る。夜は、ボートで大きなマスやパイクを釣り、大部分はリリースし、オーロラ（イエローナイフはオーロラ見物で有名）を見る。ストロマトライトの一部は今私の足の下にある。地球物理の熊沢峰男さん（当時名大理）、川上紳



図1 20億年前のシアノバクテリア堆積物（ストロマトライト）化石探索。カナダイエローナイフのグレートスレーブ湖（伊藤撮影）

一さん（岐阜大）、地質学の磯崎さん（東大）らは、広い視点から地球史を考える科研特定領域研究「全地球史解読」を立ち上げ、分野内での縦縞研究だけでなく、広い視点からのヨコシマな「シマシマ学・科学運動」を目指していました。

一方私は「光合成反応中心」を研究するうちに、「こんな完璧なものがどうして出来たのか？」と「進化」に興味をもち、たまたま（加藤哲也さんの紹介で）研究班に入れてもらった所でした。でも、「無知な私が化石調査にいいのですか？」「君でも、困った学生さんを助けるくらい出来るでしょう」といわれ、途中で飛び入りしました。「見渡す限りのストロマトライト」、「多細胞生物がはびこる前の、捕食者のいない世界」は「細菌ワールド」、シアノバクテリアが延々と何万年にもわたって堆積した時代だったのです。「すごい、きてよかった。」「光合成が地球を変えた」。

それまで、レーザで光合成を研究していた私は「君のやっているのは生物ではない」「役に立つのですか？」といわれ、生物分野の大型研究にはお呼びでなく、疲れてもいました。

化石探索に出かける前、熊沢さんが若手地球物理学者たちに話しました。科学の発展には段階がある。科学研究は、段階を追って進む（図2）。

①「狂いと天才の時代」；だれも思いつかない事、全く新しい概念を提出する天才は気狂い扱いされる。時には火あぶりにあう（それでも太陽はまわっている）。誰も信じてくれない。

②「ロマンスの時代」；やがて少しはわかってもらえる。そうかも知れない。科学研究の対象になる。研

<sup>‡</sup> 解説特集「30年後の光合成研究」

\* 連絡先 E-mail: Itoh2nd@gmail.com



図2 科学の発展段階

究者も増える。

③「科学の時代」；学説が市民権を得て、科学として定説となる。正統が出来る。するとこれに合わないものは異端となり、子殺し（＝異説、違う考えの排除）が始まる。

④「ビジネスの時代」；やがて実際に使われ、お金を生み出すビジネスへと発展する。ビジネスとしての科学が始まる。でもこれも悪くはない。きれいな研究所が出来て、役に立つ、お金がもうかる。

熊沢さんのオリジナルか、受け売りかは、聞いていませんが、これを聞きながら、私は何かがあったような気がしました。私はそれまで「ビジネスのように研究をする」ことを嫌っていました。でも、農学や工学ではこれ④が大事、しかし理学では③科学が大事。同じ分野にいても私の先生たちは③科学や④ビジネスが強く、私は②ロマンスや③科学が好き、①に憧れている。私は、一人の研究者の中にもこれらの要素が混じっていると気がつきました。それぞれの研究者はこれらの比がちがいが、違うスペクトルをもって研究を進めている。そんな風に考えて周りを見ると、「工学部の先生でも自分の給料分を稼げる人はほとんどいない！」、役に立っているわけでもない。私は、「理学だからここで終わり！」などと言わないで、どこまでも応用も含めて、考えてみたらどうだろうか？自分の出来る事には限界はあるが、考えには限界をつくらないでいいのではないかと考えつきました。

実は研究費を使うという事自体が「ビジネス」なのです。だって、ダーウィンさんやダビンチさんやメンデルさん達の時代には、研究分野も、専門も未分化で、科学も職業とはいえなかったようです。近代になり、給料もらって研究する「職業的学者」が

生まれました。自分は「職業」として、「もらったお金の研究をしている！」ようでもあります。では、これらのスペクトルを意識的にとらえ、自分の研究やテーマも考えたらどうだろう。自分の研究全体を職業的研究ゲームと考え、①-④のゲームを自分の好みに合わせて、適宜配分する。ビジネスゲームや、科学ゲームを意識してやる。自分の専門として期待されていることは100%やり、そして、すこし、給料分からはみだしても、自分自身や、みんなのための科学も、別にやってもいいような気がしてきました。これが化石堀りに行く自分について考えた事でした。

## 2.30年前：「見えない物をみる人との出会い」

さて、未来のことは誰にもわからない。それが良いともいえますね。でも30年後くらいといわれれば、考えられなくもないかもしれませんね。40年前、光合成の研究では「反応中心」という概念が生まれ、探索が始まりました。しかしタンパク質の構造はミオグロビン(1958年)くらいしかなく、膜タンパク質は膜表面についていると考えられていました。その中で1966年P. Mitchellさんが光合成や呼吸系のタンパク質は膜を貫いて方向をもって、並んでいる。その中を電子やH<sup>+</sup>イオンが一定方向に動き、膜内外溶液層間にΔpHと膜電位差を作り出す。そして、これが膜上の別部分にあるATP合成酵素の中でH<sup>+</sup>を動かし、ATPを作るエネルギーを与えるという「膜浸透圧説」を主張しました。彼はpHメータと酸素電極で、細胞やミトコンドリア膜の外側の変化を見ただけなのに、膜中を横切って電流が流れ、H<sup>+</sup>イオンが動く、予言しました。

「見えない物をみる」この提言は、溶液中での酵素反応しか知らない当時の大先生たちの大きな反対にさらされました。でも、今になってみれば、当たり前！細胞内外での物質や、イオン、電子の動きはお互いに関係し合い、生物そのものを生み出した原理でもある。しかし、私も習った当時の先生方は「P. Mitchellは気狂いだ、間違っている」と大合唱でした。その中で、私の英国でのポストドク時代の先生Croftsさんを含む多くの若手が、この説で自分の目の前の生物現象がうまく説明されることを理解して、「実際に見てみよう」と、膜中の分子やイオンや、電子の動きを見る為の技術を発展させました。この時代に英国でお会いしたMitchellさんは恐ろしいくらいに、戦っていました。そして、膜タンパク質としては初めて決定された

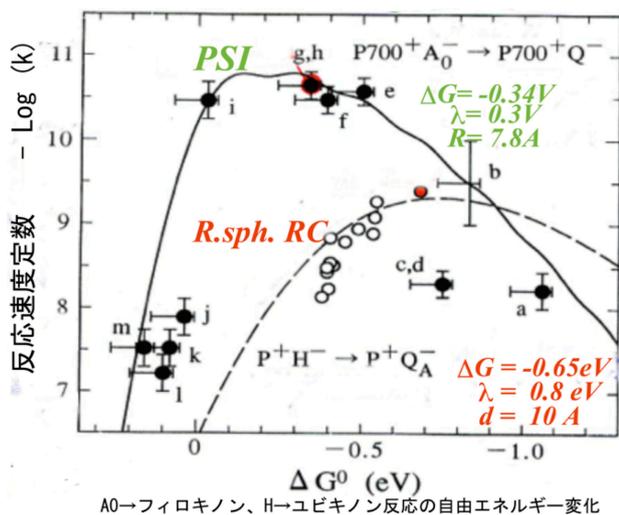


図3 光化学系IのA<sub>0</sub>→フィロキノン、紅色光合成細菌*Rb. sphaeroides*反応中心でのフェオフィチン→ユビキノン反応で、キノンを抽出後、酸化還元電位の異なる人工キノンと入れ替えることで反応の-ΔG<sup>0</sup>を変えた際の、反応速度定数kの変化。2つの反応中心は異なった-ΔG<sup>0</sup>とλで本来のキノン（赤丸）に最適化されていた<sup>2)</sup>より改変

「紅色細菌反応中心の構造 (1984)」<sup>2)</sup>が「化学浸透圧説」を実像にしました。その後、さらに多くの実験がATPaseの構造や一分子の動きまでを見せてくれました。反応中心の構造は見事にそれまでの分光実験や生化学実験を説明し、このタンパク質内にほぼ対称に配置されたクロロフィルやキノンの位置関係は美しくさえありました。

反応中心構造の話ドイツから帰られた三木邦夫さん(京大)に光合成研究会の公開講演会(今年の年会の始まり)で初めて聞いたとき(1985年)、最後まで聞くのには勇気がいりました。「自分の知りたかったことが全部そこにある、しかし、自分の研究は何もそれに貢献していない」。何度聞いても発見があり、勇気がいりました。やがて、「なんでこんな構造が出来たのだろう」と考えるようになりました。構造はそのままでは、「絵に描いた餅」でしかない。しかし、その中に自分の知りたいことが隠れている。

やがて自分のやっている、まだ構造未解明の光化学系I反応中心も、似た構造をもつにもかかわらず、異なった出力を生み出すように内部の電子移動反応系が最適化されていることが、レーザ実験からわかり出しました(1996)<sup>3)</sup>。PSI反応中心内の電子受容体フィロキノンの役割を初めて決め、さらに人工分子と取り替えて、超高速ピコ秒の電子移動反応やESRへの影響を見ることで、これわかりました。フィロキノンを人工

キノンに入れ替えても反応は進み、電子の移動速度はMarcusの電子移動理論がいうように、反応で生まれる自由エネルギー差(-ΔG<sup>0</sup>)が、分子配置や構造の再配置に必要なエネルギー(λ)と釣りあう(-ΔG<sup>0</sup>=λ)時に、トンネル効果で最速で進み、これ以下でも以上でも遅くなることがわかりました。この時点では構造未解明でしたが、キノン入れ替え実験から分子間距離と自由エネルギー差を図3に示すように予測しました。そして、その後解明されたPSIの構造はこれを実証しました。2種の反応中心は、作り出す還元力も、使うクロロフィルも、吸収する光の波長も大きく違うが、どちらも高度に最適化されていることがわかった。自然は高度に最適化されているが、変化も許し異なった反応中心を作り出した。改めて「どのようにしてこんな構造ができてきたのだろう」と考え、「進化」を知りたくなりました。

### 3. 科学研究の進め方「新しい概念、対象、技術、需要」

熊沢さんの受け売りに戻ります。科学研究で一番大事なのは、「a. 新しい概念」である。科学者はこれを夢見る。しかし、新しい概念は「①気狂いと天才」のもの!

実際の研究は、「a. 新概念」、「b. 新対象」、「c. 新技術」、そして「d. 新需要」で推進される(図4)。凡人研究者は、「a. 新概念」を夢見つつ、実際にはb-dを進めて「論文」をだし、「研究ビジネス」をする。先にあげたP. Mitchellさんの新概念も、当時の新技術(電子顕微鏡、遠心分離、反応測定などの進歩など)による細胞や膜構造観察の革新の上に出てきました。私はbとcが好きで、新しい対象(新色素Chl d, Chl f,



図4 科学研究の進め方

Zn-BChl *a*などをもつ光合成系、絶対嫌気の光合成系等)に、(超高速レーザ分光や、極低温ESR、顕微分光などの)新装置を使いながら、自分の自然観察能力をひろげ、さらに共同研究で視野を大きく広げることが出来ました。さらに時代の変化で、新しいneedsである「人工光合成」が社会から出てきました。私もたまたまこの課題でトヨタ自動車との共同研究(2006-2010)を行っており、ビジネスとしての研究の機会ができました。私のそれまでやっていた「学者間科学ゲーム」と違う「会社科学ゲーム」は、ともに、いいゲームではあるのですが、部分的であることも否めません。会社ゲーム中では評価されないことも、価値観を切り替えると科学ゲームとしては価値があり、楽しいゲームに出きる事を「学生諸君」が教えてくれました。

#### 4. マルチリンガルな研究者：「君は生物ではない→君は生物です！」

私は生物系から名大理・物理学科の教授(2000-2010)になりました。いい体験をしました。物理学科は生物物理が4研究室、残り16研究室は素粒子・物性・宇宙物理。トランプゲームに例えれば、一緒になった時は物理学科ゲームをやり、個々の研究分野ではババ抜きやったり、七並べやったりしているような感じです。この中では、他のグループの人たちが自分達のことをわかってくれないとこぼしても仕方がない。評価も価値観もちがう。「生物の人はどう思いますか」と「宇宙の人」に聞かれ、50名連名の論文が博士論文として出てきます。理論物理などに比べれば私の研究は役に立つ、でも底深い面白さではとてもかなわない。一方、こちらのやっている別のゲームの相手の超巨大会社は、純粋理論のような営利につながらないゲームはどう転んでもやらないし、やれない。大学とはとても豊かな、お金だけでは決まらない贅沢な組織だと実感しました。皆がそれぞれ自分のゲームを自分の価値観でやっている。

研究費も、物理系、化学系、生物系、皆さんそれぞれ違うゲームをやっている、そこでは、とりあえずそのゲームをしないとイケない。いっしょに遊ぶには、相手の言葉もわかったほうが面白い。マルチリンガルになると楽しいのがこの研究ゲームだと思うと、楽しんで。相手を尊重し、科学を楽しむ。外国語を話せるほうが話せないより楽しみが多いように、分野もマルチはいい。

ただし、ゲーム等といわずに「気狂いと天才の時代」をひたすら脇目もふらずに、生きるのもいい科学者ゲームですね。一方、科学は我々のすべてではない。我々の職業もまた、自分の科学の全てではない。

長い間、自分が生物分野にいた間は「君の研究は生物ではない」といわれました、しかし物理分野にきたら「生物」のことを何でも知っていると思われました。実際は小さなゲームしかやらないのが自分ですね。

#### 5. 未来の技術、対象、概念

ゲノム、分子構造、解析技術、遺伝子操作、シミュレーション。いろいろな新技術がありますね。物理と生物の研究のもっとも大きな違いは、理論家の存在の有無でした。物理では、実験と理論が両輪となって研究を進めます。先端技術での実験がデータを出し、それを理論が検証し理解を深め、さらなる実験技術の提案や予測もする。それを新たな実験が実証、反証し、さらに理論がこれに対応する。一方、我々の生物研究ではまだ、自分で思いつき、実験をして、自分で解析して、運がよければ、思い通りの結果がでる。運が悪いと。。。実験の前にsimulationなどはしない。でもこれだけ情報が多くなると、一つの研究課題も一人の研究者の能力をこえていて、否応無しに共同研究が必要となります。理論が必要なのでしょう。でも物理学者の作った理論は一般論が多く、生物個別の現象にはなかなか対応しきれない。今後の生物学では研究者個々のゲームをこえた共通ゲームを意識して、理論と実験の協力できる研究体制を作る必要がありますね。その為には、すでに現在進みつつあるような、若手同士の共同研究や、中堅学者間の協力関係がますます重要になってくるでしょう。一つの言葉、分野だけのゲームだけでなく、マルチリンガルな展開が必要です。

実は、全く新しい概念はめずらしく、すでに感じていた疑問、皆が疑問におもっていた当たり前のことの中に、新しい展開がありそうです。組み合わせを変えると、新しい解決法がみえてくる。見えないものが見えてくる。

#### 6. 職業としての研究と自分の科学

私はいつの間にか、論文を書ける、学生さんが解く事が出来る、研究費をもらえる、といったうまいいきそうな研究テーマを選ぶのがうまくなりました。で

も、頭の中のどこかが、「ムズムズ」。「私はこんなことを本当にしたかったのだろうか?」。

そんなときに、「化石掘りにいって進化を見てきたまえ」といわれ、役に立たない生物物理学者が地質・地球物理の集団に加わりました。でも、たしかに「見ると聞くとは大違い」。真核生物がいなかった地球を実感することができました。これは簡単には、論文にはできない。(できればすばらしい!)。しかし、この集団中の最若の院生よりも物を知らないフル人間にも、価値があることを実感しました。私にとっては、「かれら地球物理学者の常識」は常識ではない。いつも基本を聞かざるをえません。私の存在はグループ内にほどほどの余裕と軽い緊張を与えたようです。私に説明することで、全員が課題を再確認し、優越感も得て和む。私は私として、自分がレーザ実験で標的としてきた、ガラス容器内の光合成反応中心タンパク質が生まれた環境を初めて実感しました。これがあって、現在がある、生物間の生存競争を超えた大きな地球環境の変化の中で、シアノバクテリアは太陽光と切り結び、物理法則を自在に利用して光合成装置を完成してきた。私は、もっと早く、これを見て、感じておけばよかったのに。いつもとりやすい研究費におおきり、金にならない研究はしなかった。自腹でストロマトライトを見にきててもよかったのに。結局、やれる範囲の仕事として、科学をやっていた。(見事に熊沢流、「科学運動」に巻き込まれました!)

地質学研究的の昔話を大自然の中のテントで毎晩聞きました。プレートテクニクスを異端視し、自腹での研究が当たり前で、おらが裏山を縄張りにするかつての地質学の話は、それなりに身につまされるものでした。

## 7. ビジネスとビジネスでない科学

たしかに私がやってきた研究は、立派な仕事。年に10近い論文も出る。でも、何か「ムズムズ」。他のこともやりたい。で、わかってきました。趣味でもいいから、自分の好きな科学もやればいい。自分の専門ゲームは仕事としてしっかりやる。そして、他にもやればいい。そんな気分になりかけているときに、2005年愛知万博への協力依頼がありました。地球のどこかで植物を採り、生かしたまま運び、展示したい。昔コーヒーの苗を大陸を超えて運んだように。そこで、企画に参加。偉い人たちは皆さん色々アイデア出すけ

ど、動かない。結局、私たちが2004年夏にアラスカ最北端ポイントバローにいき、大阪の「此花さくや館」と高知の「牧野植物園」の採集チームといっしょに採集と実験をする事になりました。私たちは本来は実験室内だけの科学者で、寒冷生物の専門家は他に沢山いらっしやるので、論文とかは無理そう。だけど、行くことにしました。

夏の極地は、やはり最高。森林限界をこえた大陸最北端には、冬期の積雪20 cmに埋まって冬の寒気をやりすごせる、たけの低い植物だけしかいませんでした。しかし、草本、木本、コケ、地衣と沢山の種が地をはい、堆積し、その上にまた生えて短い夏に成長する。どうも植物や光合成は大きな適応能力と隠れた力を持つらしい。夏とはいえ、強い日差しの下で雪が舞う。冷害の条件そのものの極地で、植物達は花さえつけない。日本に帰ってから、だんだんとわかってきました。極地のコケや地衣類は光合成がほとんど働かない低温でも、強光、紫外線をうける。でも死なない。十年後の今、私は一生懸命乾燥下でのコケや地衣類の光障害回避機構をピコ秒蛍光寿命測定で研究しています。お地蔵さんや樹幹についた地衣類は、いつもは乾いていて、霧や雨でぬれた時だけ、光合成する。乾いていて反応が出来ない状態で、光が当たっても死なない。物質生産にも関係ない生物である地衣類やコケの光合成は、ビジネスにはなりそうにもない。でも高等植物では機動的に光障害回避に働くNPQ機構やステートシフト機構などと似た現象を、低温でさらに強力にやっているのが興味深い。というわけで、今は、無給で、この課題をピコ秒蛍光寿命の測定をしながら調べています。新しいことはおもしろい。

## 8. 人工光合成ビジネス

今現在は、好きな研究と、物理・化学系のJST若手さきかけ研究光関連の2テーマや、科研人工光合成研究のアドバイザーとしてお手伝いしています。これは仕事。世の中では、人工光合成や、藻類による油の生産など、エネルギーがらみの大きな研究費がいくつも進んでおり、光合成研究者も大勢はいつています。工学や化学の先生たちは、しっかりと協力して運動し、次の大きな研究課題を作られます。必要とあれば、生物光合成も多数いれて研究ビジネスをこなす。すごいですね。研究費をとるのはビジネスと割り切って、考え、やりたいことをやる。悪くない。科学もますます

ビジネスになってきた。で、あなたのスペクトルはいかがでしょうか？①気狂いと天才？それとも、②ロマンス？③科学でしょうか？あるいはやはり④ビジネス？

### 9. 30年後はどうなるの？

そして、30年後にはどうしているのでしょうか？この40年、私にとっては光合成研究は予想を超えるドラマでした。昔は想像しなかったことがいっぱい実現しました。何よりも技術の発展がすばらしい。でも、同時にそんなに変わったことも起こっていないともいえない。精一杯、背伸びして、跳んでみても、まじめな自分は決して跳べないから、安心といえれば安心。自然はみな繋がっていて、どこからやろうと、大丈夫！一生懸命考えれば、いつの間にか、希望はかなえられている。世界中で、手をつないで進めているのが研究ゲームですから。

でも、こうやって書いてみると、私は「①気狂いと天才ゲーム」は全くやらなかったようです。皆さんはがんばってみるのもいいかもしれませんね。まだ十分時間もある。温暖化で世界も今の延長ではなくなっていくかもしれないし。

「光合成」は偉大です。私たちは小さくとも、この地球さえ変えた偉大な生物機能は、すばらしい研究課題を我々に与えつづけてくれるでしょう。

**熊沢；ヨコシマなことをやりましょう。 シマシマを見よう！**

伊藤；ありがとうございます。おかげで、みたかった太古の化石も、北極圏の生物も、実際に、行って、みて、考えました。

専門はゲームの一つ、やりたいゲームがいっぱい。

精一杯イメージーションを膨らませて、現実は想像を超えて進む。

ビジネスもロマンスもやりたい。自分の生活の中にも科学がある。

自然はつながっている。安心して縦横も横縦もできる。

物理も化学も生物も生活も理論も実験も、つながっている。

**この惑星の上で、進化する生き物たちともつながっている！**

**ビジネスを100%軽くやり、後30%はヨコシマも。**

**生活も家庭も、地球環境も、友達も皆大事！**

### 図5 未来

Received December 2, 2013, Accepted December 2, 2013,  
Published December 31, 2013

### 参考文献

1. Mitchell, P. (1966) Cherniosnotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Cambridge Phil Soc.* 41, 445-502.
2. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. and Michel, H. (1984) X-ray structure analysis of a membrane protein complex. Electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*. *J. Mol. Biol.* 180, 385-98.
3. Iwaki, M., Kumazaki, S., Yoshihara, K., Erabi, T. and Itoh, S. (1996)  $\Delta G^0$  dependence of the electron transfer rate in the photosynthetic reaction center of plant photosystem I: Natural optimization of reaction between chlorophyll *a* ( $A_0$ ) and Quinone. *J. Phys. Chem.* 100, 10802-10809.

## Progress and Future of Our Science

Shigeru Itoh\*

Center for Gene Research, Nagoya University

## 報告記事

### 若手の会活動報告 ～第九回セミナーの開催、サイエンスアゴラ2013への出展～

立命館大学 生命科学部 生命情報学科  
浅井 智広

8月号と12月号の会報が発行される間の期間である秋は、毎年、予定しているイベントが最も多く、若手の会の活動が活発な時期です。まず、通算9回目を数える若手の会の秋のセミナーを、去る10月26日と27日に東京大学本郷キャンパスの理学部の講義室を一部屋お借りして開催しました。その2週間後の11月9日と10日には、日本科学技術振興機構 (JST) が主催する「サイエンスアゴラ2013」に出展者として参加しました。

例年、秋のセミナーは合宿形式で行っており、講演や発表での情報交換だけでなく、寝食を共にすることで若手研究者間の活発な交流を目指しています。今回も、初日の自己紹介と研究紹介に始まり、合宿場所である旅館「太栄館」では時間無制限の自由な議論、二日目の招待講演では活発な意見交換ができました。招待講演では3名の講師の方にご講演いただき、南極での生態学的な研究から、比較ゲノム解析、顕微分光法による分子科学的な研究と、若手の会のセミナーの特徴である幅広いテーマのお話を聞くことができました。また、今回新たな試みとして大学院の学生の招待講演を企画し、京都大学鹿内研究室の横山さんにご自身の研究内容を発表していただきました。結果として多くの参加者にご好評をいただき、ポスドク以上の若手研究者にも良い刺激になりました。今後もこの企画を続けていきたいと思っておりますので、自薦他薦問わず、お気軽に候補者を私 (cazai@fc.ritsumei.ac.jp) までご連絡ください。詳しいセミナーの様子は、横山さんに執筆していただいた参加報告記事をご覧ください。

サイエンスアゴラへの出展は、若手研究者のアウトリーチ能力の向上を目指して参加しています。科学研究の成果の積極的な社会への還元が求められる昨今、私たち若手研究者がアウトリーチ能力を伸ばしていくことは、研究内容や成果が興味深いものであればあるほど大切なものになってきています。若手の会では2011年からサイエンスアゴラに出展しており、今回で通算3回目となりました。今回は「地球を支える緑の不思議～光合成博士にきいてみよう!～」と題し、光合成の解説や最新の研究内容の紹介、光合成生物の展示やデモ実験を通して、一般の方に光合成に興味を持ってもらえるような出展を企画しました。特に今回は、一般の方とのコミュニケーションに重きをおき、直接的な対話やソーシャルネットワークサービス (SNS) を通じた疑問の募集と回答を行いました。実際に聞いてみると、一般の方の何気ない質問には考えさせられるようなものも多く、それに本気で回答することは私たち自身の能力の向上にも繋がると感じました。SNSでの質疑応答は今後も若手の会で運営を続けていきたいと思っております。詳しい活動内容は、後の報告記事をご覧くださいと思います。

光合成学会若手の会では、実年齢や身分、所属を問わず、多くの研究者の方々の積極的な参加を歓迎します。若手の会の活動内容や最新情報は、ホームページ (<https://sites.google.com/site/photosynwakate/home>) で紹介していますので、ご覧ください。また興味のある方は、若手の会のメーリングリストから随時、最新情報をお知らせしますので、cazai@fc.ritsumei.ac.jpにご連絡下さい。若い気持ちで現場の研究を推進している研究者が交流することは、学際性の強い光合成研究では絶対不可欠であると、私は考えています。この記事を読んでいただいた先生方には、ご自身の参加はもちろんのこと、ご指導されている学生さんやポスドクの方に、是非、若手の会への参加をお勧めいただきたいと思っております。

最後になりましたが、今回の秋のセミナーの開催とサイエンスアゴラ2013への出展には、活動に掛かる費用の一部を本会からご援助いただきました。この場をお借りして、深くお礼申し上げます。

## 報告記事

## 第9回光合成若手の会セミナーで講演して

京都大学 大学院理学研究科 修士課程2年生

横山 諒

平成25年10月26-27日に東京大学本郷キャンパスで光合成若手の会の第9回セミナーが行われました。前日から台風27号が日本列島に接近していましたが、当日は新幹線などの交通機関が大幅に遅れることもなく、無事に開催されました。私にとって若手の会への参加は今回で2回目でしたが、この度は学生招待講演という形で私の研究を発表する機会を与えていただきました。講演での個人的な経験も含め、若手の会での出来事を紹介したいと思います。

「今秋の若手の会には参加できるかなあ。」とぼんやり考えていた9月中旬、突然若手の会の幹事の方から講演依頼のメールが届きました。今までの若手の会ではポストドク以上の方の講演のみでしたが、学会発表とはまた違う緊張感のある場で発表を行うことで学生に経験を付けてもらうという目的で、第9回若手の会から学生に研究内容を紹介してもらうことになったようです。1人あたり20分くらいで複数の学生さんが喋るのだらうと当初思っており、お引き受けさせてもらいました。その結果、名だたる先生方の講演の後にトリとして、質疑応答を含め1時間の講演をするということの後からお聞きし、「大変なことを引き受けてしまった。」と発表直前まで思い続けることとなります。

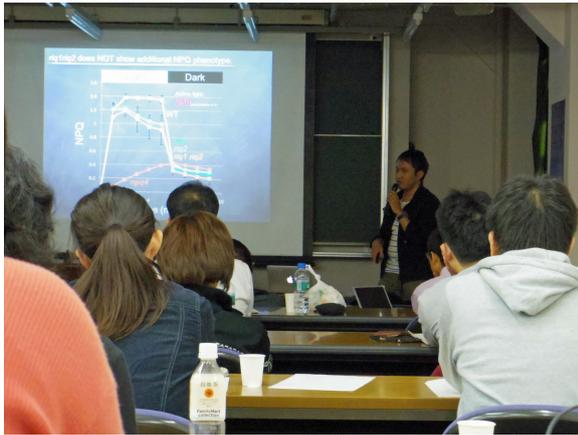
若手の会1日目は、毎回恒例の参加者全員による自己紹介でした。研究の話はもちろん、自身の趣味の話など個性的な紹介が数多くありました。特に、研究の話になると必ず参加者から数多くの質問や提案が飛んでくるあたり、非常に若手の会らしいと思わされます。

夜の長い長い宴の翌日は、国立極地研究所・小杉真貴子先生によるセミナーで始まりました。南極大陸という極限環境に生育する光合成生物の環境適応戦略を明らかにするべく、自ら南極観測船「しらせ」で南極へと赴き、しらせでの船内生活や1ヶ月半南極で野外調査を行った際の様子をたくさん写真で紹介していただきました。南極といえば水や雪に閉ざされた白い大地をまず思い浮かべますが、意外に

も雪に覆われていない陸地も多いことが写真でもわかりました。しかし、その陸地は地球上で最も低温で乾燥した環境だそうで、そこに生息する地衣類（菌類と藻類の共生体）などの光合成生物の生理特性を通年でモニターし続け、外部環境の変化との関連付けを試みられていました。半年間の観測では外部の乾燥状態に応じて光合成活性が変化する傾向があることを説明していただき、今後の観測ではどうなるのかに非常に興味を持ちました。

2人目の講師は京都大学の熊崎茂一先生で、葉緑体とシアノバクテリアにおける顕微分光測定について講演していただきました。まず驚かされたのが、発表スライドに映しだされた光化学系Iから発せられた蛍光の写真でした。常温下では蛍光量子収率が高い光化学系IIに比べ、光化学系Iからの蛍光が非常に低いことが知られており、光化学系Iからの蛍光を解析する場合は液体窒素で低温にするのが一般的です。しかし近赤外レーザーを用いることで、光化学系Iからの蛍光を見ることが可能になるようです。熊崎先生は、系統立った物理化学的考察をもとに仮説を立ててそれを実験的に検証していくことで多くの興味深い成果を挙げられていました。一方で、限られた予算内でいかに実験装置を工夫するかを大切にされており、自分も是非とも見習わなければと思われました。

昼食を挟んだ3人目の講演では、東京工業大学の堀孝一先生が車軸藻植物門クレブソルミディウムのゲノム解析の結果と植物の陸上化に関するお話をしていただきました。現存する陸上植物は車軸藻植物門から進化してきたことが支持されており、特に水中および陸上の乾燥・貧栄養環境でも生育が可能なクレブソルミディウムは藻類から陸上植物への進化を解き明かす上で重要な生物とされています。ゲノム解析の結果、クラミドモナスなどの他の藻類には存在せず、陸上植物に特有な遺伝子を既に多く獲得していることが明らかとなったということに驚かされました。陸上植物において循環的電子伝達に関わっていると言われ



ているNDH複合体関連遺伝子もその1つであり、クレブソルミEDIUMは陸上植物と同じようなNDH活性を持っている、などの機能解析例も紹介していただきました。植物の陸上化は私も非常に興味を持っている研究課題であり、是非ともデータベースが公開された際には自分が解析している遺伝子について調べてみたいと思いました。

最後は学生招待講演という形で、私がシロイヌナズナにおけるNPQ（非光化学消光）の研究を紹介してもらいました。NPQとは吸収してしまった過剰な光エネルギーを光化学系IIから熱として安全に捨てる反応です。発表では、近年研究されてきた陸上植物のNPQ誘導機構を紹介しつつ、私が新規に同定したシロイヌ

ナズナのNPQ変異体に関する表現型解析結果について報告しました。質疑応答では、同じような研究をしている方や、逆に異なる分野の方からも多くの質問をいただき大変有難かったです。この若手の会では「光合成」というキーワードの下に様々なバックグラウンドの方が集まっているため、質問の内容は多岐にわたりながらも非常に的を射るものが多く、とても有意義なディスカッションをさせてもらいました。結果的には予定の時間を大幅に超過して質疑応答をさせてもらいましたが、このようなフレキシブルなところも若手の会の良さだと感じました。M2というこの時期に1時間も発表するという事で準備は大変でしたが、多くの方から助言を頂き、非常に有益な経験をさせていただきました。また、子供のような感想ではありますが、人生の中で一番「楽しい」と感じた発表でもありました。来年以降もぜひこのような企画を継続していただければと思います。

今回ここには書けませんでした。多くの知り合いとの交流やディスカッションも非常に有意義なものでした。来年以降も定期的に若手の会に参加できればと思います。最後になりましたが、今回のセミナーを運営してくださり、また私をセミナーに招待してくださった立命館大学・浅井先生を始めとする若手の会幹事の皆様にこの場をお借りして感謝申し上げます。



## 報告記事

## サイエンスアゴラ2013 –サイエンスカフェ 地球を支える緑の不思議 – 光合成博士にきいてみよう！ – 出展報告

<sup>1</sup>東京大学 大学院理学系研究科

<sup>2</sup>立命館大学 生命科学部

<sup>3</sup>自然科学研究機構 基礎生物学研究所

<sup>4</sup>大阪府立大学 大学院理学系研究科

<sup>5</sup>大阪市立大学 複合先端研究機構

<sup>6</sup>筑波大学 生命環境系

<sup>7</sup>東京大学 大学院総合文化研究科

<sup>1</sup>溝上 祐介 <sup>2</sup>浅井 智広 <sup>3</sup>大西 紀和 <sup>4</sup>岡島 公司 <sup>5</sup>川上 恵典 <sup>6</sup>辻 敬典 <sup>7</sup>成川 礼 <sup>7</sup>渡辺 麻衣

### サイエンスアゴラ出展の概要

今年のサイエンスアゴラは、東京・お台場の日本科学未来館を中心とした6施設で2013年11月9日、10日の二日間開催された。「科学と社会をつなぐ科学コミュニケーション実践のための広場“アゴラ”」として8回目の開催となり、光合成学会若手の会としては3回目の出展となった。サイエンスアゴラは「伝える」から「つくる」へというテーマで、人と人とが交わることで、思いもよらないアイデアが生まれるような場を作ろうというものである。今回は昨年よりも1,800人も多い、5,800人の入場者があった。

光合成学会若手の会では、「地球を支える緑の不思議～光合成博士にきいてみよう！～」という企画で出展した。昨年度は、出展を評価していただき、サイエンスアゴラ賞を受賞した。そんなこともあったためか、光合成学会若手の会の前会長である成川礼さんは、オープニングセッションにも招待され、「つくるコミュニケーション『最上の問い』」というトークテーマで登壇された。残念ながら、筆者はセッションに赴く時間はなかったが、予約制であるこのセッションが数日前から予約締め切りであったことから、盛況であったことが伺える。また、サイエンスアゴラのHP上では成川さんのインタビュー記事がしおりとして掲載されている。( <http://www.jst.go.jp/csc/scienceagora/pdf/29oct2013/shiori.pdf> )  
このように、昨年の実績から光合成学会若手の会として、光合成についてより知ってもらうためのアピールもできた。

さて、今回のサイエンスアゴラで実施したことについて、いくつか具体的に報告する。

### 実験と新しい試み

展示した実験や活動は、昨年のを基礎とした。詳しくは、2012年光合成研究65号の196-198ページを参照していただきたい。新たに試みた実験や活動は以下である。

#### 1) パネル展示

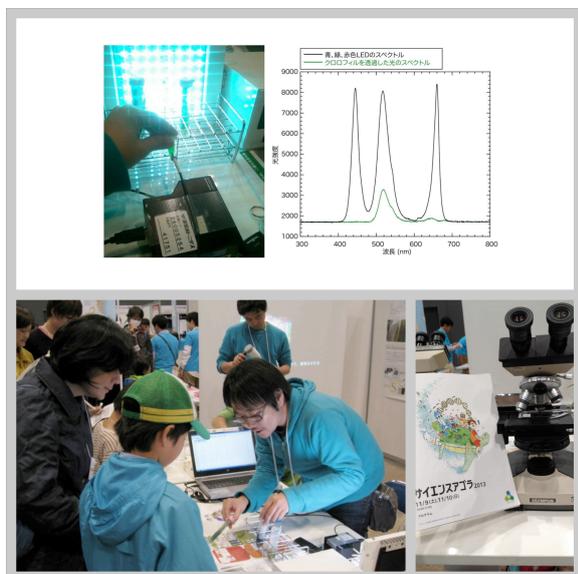
昨年は小冊子「光合成ってなんだろう？～光と植物の不思議～」をポスターで展示したが、小冊子は持ち帰っていただくこととし、今年はより簡略化したポスターを掲示した。このポスターはトピックスとして、



参加者の方々の興味を引きそうなこと、例えば、光が植物を傷つけてしまう「光障害」、酸素を出さない光合成をする「光合成細菌」などについても解説した。これらの参加者の意外性をつくトピックスは、参加者からの積極的な質問を生み出し、参加者と私たちがコミュニケーションする上で、よい話題となった。私たち出展者と参加者、相互の光合成に対する理解を深めるには、まず参加者に積極的に質問してもらえ環境づくりが大切であることを認識した。

## 2) 分光器による光吸収実験

ミニ分光器を用いて、三原色LEDのスペクトルとクロロフィル溶液を通った光のスペクトルを測定することで、植物の利用する光を感じてもらった。教科書などで知っている知識であっても、目の前で見てもらい感動を追体験していただけたと感じている。



## 3) 何でも質問コーナー

サイエンスアゴラのテーマである、人と人とのつながりをつくるという目的に基づき、光合成若手の会のSNS (FacebookやTwitter) を利用した光合成に関する質問コーナーを事前に設けた。事前に受け付けた質問には、SNSと当日の会場で回答を公開した。また、サイエンスアゴラ当日にはその場で質問を募集し、後日SNSで回答するという企画にした。こうすることで、SNSで多くの方と繋がりをもてると考えた。「何でも質問コーナー」では事前に10個の質問が集まり、当日発表した回答を見た参加者の方々からは、質問も回答もユニークで分かりやすいとの感想をいただいた。これも、当日の1つのコミュニケー

ションツールとなった。さらに、当日は14個の質問が集まったため、今後、SNSで回答する予定である。サイエンスアゴラ終了後に、光合成若手の会のSNSアカウントへメッセージなどをいただいております。新たな繋がりを作ることができた。今後は、このような新たな繋がりをもっと発展させていきたいと思っている。

## アンケート結果から見えてくること

昨年に引き続き、今年もアンケート調査を行い、66名の方々にご協力いただいた。アンケート結果は、昨年のもと同様の傾向であったが、いくつかについて言及したい。まず、光合成のイメージが、イベント前後でどのように変化したかについての回答結果を紹介する。イベント前は教科書に書いてあるような、「植物」「酸素」「光」「二酸化炭素」などのキーワードや、近年のトピックである「人工光合成」というイメージが多かった。しかし、イベント後のイメージは光合成の複雑さや、光合成の解明に対する期待が多かった。これは、光合成により深く触れていただいた結果だととらえることができる。光合成は「分かっている」現象で、どのように応用できるのかといった質問が多かったが、基礎研究の重要性を理解していただく上で、「分かっている」ことと同時に「分かっていない」ことを知っていただき、解明することの重要性を伝えることがとても大切であると実感した。研究者たちが直接参加者の方々とふれあい、意見交換する事で、一方的な情報発信でなく、双方向のやりとりを実践する「場」は、人々の光合成に対するイメージをより具体的なものへと変えたといえる。

次に、良かったこと、悪かったことをあげていただいた。良かったこととして、スタッフの分かりやすい説明や研究に対する熱意、また、普段見られないようなものを見られたといった点で評価していただいた。悪かった点は、ブースのレイアウトであり、「混み合っていてブースの中へ入りにくい」や「ポスターが見にくい」などであった。来年以降、改善する予定である。他のアンケート結果は以下に記載する。

## これからのアウトリーチ活動

アウトリーチ活動といっても様々な様式があるが、研究者からの一方的な情報発信だけでは一般の人々が何を知りたいかも分からない。今回の新たな試みである、「なんでも質問コーナー」では、相互理解を深めるとても良い機会になった。また、サイエ

ンスアゴラは研究者とそれ以外の人々が直接対話できる場である。このような場では、テンポ良くコミュニケーションをとることができ、双方の距離を短時間で縮めることが可能である。このようにテンポ良くコミュニケーションをとれる手段として、SNSが有効であると感じている。SNSでの繋がりから、新しいことが生み出されると期待できる。今後もSNSを通じて持続的に、コミュニケーションをとり続けていきたいと思う。

地道ではあるが、こうした「場」を持ち続け、双方向のテンポ良いコミュニケーションをとることで、一般社会との相互理解、ひいては光合成研究が発展することを信じている。

**謝辞**

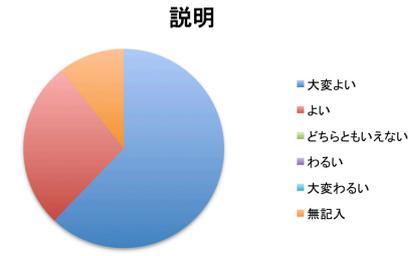
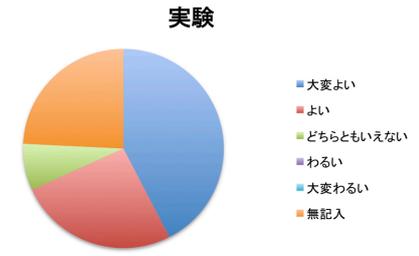
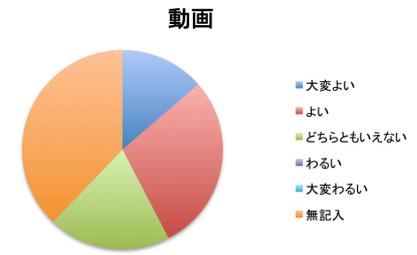
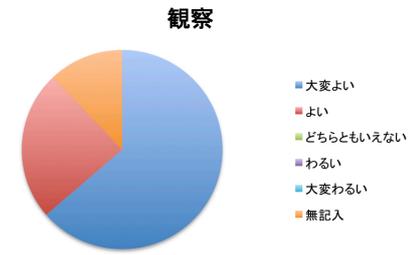
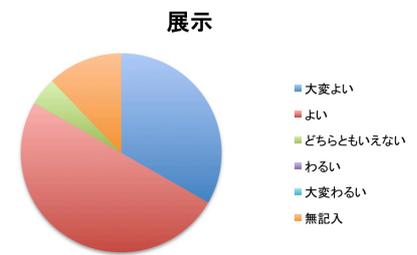
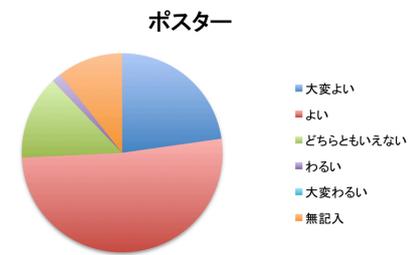
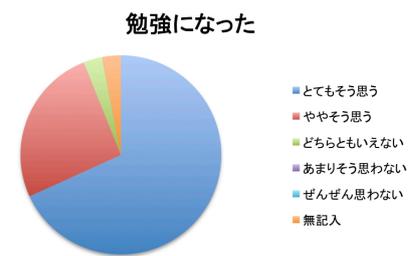
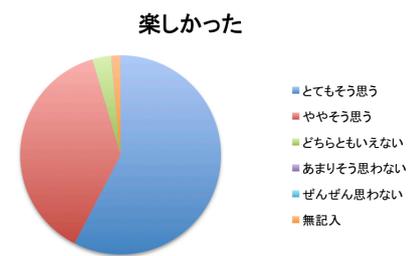
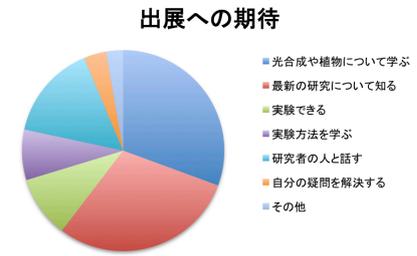
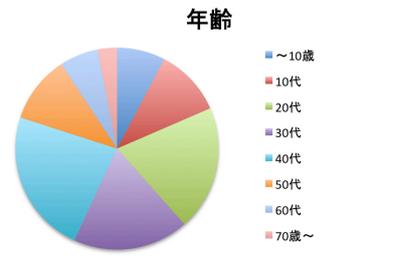
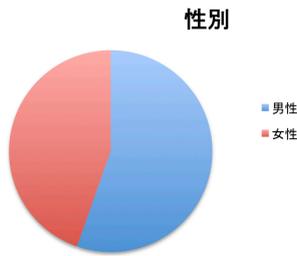
今回の出展にあたり、多くの方々々に支援していただきました。この場を借りて、厚く御礼申し上げます。

国立環境研究所 志村遥平博士 (展示用の株および珪藻アートプレパラートの提供)

筑波大学 伊藤史紘 (当日の運営)

東京大学 榎本元、前田海成、吉野宏明、藤田貴志、宮田一範 (事前準備事前準備、当日の運営)

以上、敬称略



## 事務局からのお知らせ

2013年6月1日総会において報告しました会員数の動向および承認を受けました2012年度決算と2013年度予算です。

## 1. 会員数動向

2012年12月末日の会員数

個人会員	358 (364)
賛助会員	7 (7)
計	365 (371)

( )内は2011年12月末の会員数

入退会者数

入会	個人会員	36
	賛助会委員	0
	計	36
退会	個人会員	42
	賛助会委員	0
	計	42

## 2. 2012年度決算報告

収入の部

	予算	決算	差異
会費収入	900,000	862,200	-37,800
年会黒字分	0	32,376	32,376
計	900,000	894,576	-5,424

支出の部

	予算	決算	差異
会報印刷費	900,000	875,427	24,573
通信運搬費	80,000	89,640	-9,640
若手の会補助金	30,000	0	30,000
学協会費	10,000	10,000	0
振り込み手数料	10,000	5,880	4,120
その他印刷費	50,000	10,500	39,500
雑費	0	4,995	-4,995
学会賞副賞	120,000	118,230	1,770
年会シンポジウム準備金	23,000	0	23,000
計	1,223,000	1,114,672	108,323

第3回年会シンポジウム収支決算

	予算	決算	差異
年会シンポジウム準備金	23,000	0	-23,000
シンポジウム出展料	100,000	150,000	50,000
懇親会会費	0	236,050	236,050
収入合計	123,000	386,050	263,050
シンポジウム要旨集	45,000	46,200	-1,200
ポスター賞副賞	18,000	15,735	2,265
会場使用料	60,000	54,248	5,752
ポスターパネル使用料	0	0	0
一般会計への戻入	0	32,376	-32,376
懇親会支出	0	237,491	-237,491
支出合計	123,000	386,050	-263,050
収支	0	0	0

2012年日本光合成学会収支決算

収入の部 合計	894,576
支出の部 合計	1,114,672
差額 (次年度繰り越し金)	-220,096

**3. 2013年度収支予算**

## 収入の部

	本年度予算	前年度決算	差異
会費収入	900,000	862,200	37,800
シンポジウム出展料	200,000	150,000	50,000
年会参加費	170,000	0	170,000
懇親会会費	240,000	236,050	3,950
収入合計	1,510,000	1,248,250	261,750

## 支出の部

	本年度予算	前年度決算	差異
会報印刷費	600,000	875,427	-275,427
通信運搬費	110,000	89,640	20,360
若手の会補助金	30,000	0	30,000
学協会費	10,000	10,000	0
振り込み手数料	10,000	5,880	4,120
その他印刷費	30,000	10,500	19,500
シンポジウム要旨集	0	46,200	-46,200
学会賞副賞	0	118,230	-118,230
ポスター賞副賞	15,000	15,735	-735
会場使用料	256,020	54,248	201,772
ポスターパネル使用料	0	0	0
懇親会支出	240,000	237,491	2,509
雑費	5,000	4,995	5
支出合計	1,306,020	1,468,346	-162,326

## 2013年日本光合成学会予算収支

収入の部 合計	1,510,000
支出の部 合計	1,306,020
差額 (次年度繰り越し金)	203,980

## ★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：日本光合成学会、口座番号：00140-3-730290）あるいは銀行振込（ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキョウと入力)、当座、0730290 名前：ニホンコウゴウセイガクカイ）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。

## ★会費納入のお願い

学会の運営は、皆様に納めていただいております年会費によりまかなわれております。当該年度の会費が未納の場合、光合成研究が送られてくる封筒に、会費未納が印字されています。ご都合のつくときに、会費を納入ください。1年間会費を滞納された場合、次年度よりお名前が会員名簿から削除され、光合成研究は届かなくなります。再入会される場合は、未納の分もあわせてお支払いいただきます。会費納入状況などにつきましては、ご遠慮なく事務局（shikanai@pmg.bot.kyoto-u.ac.jp）までお問い合わせください。会員の皆様のご理解とご協力をお願い申し上げます

## 日本光合成学会会員入会申込書

平成 年 月 日

日本光合成学会御中

私は日本光合成学会の趣旨に賛同し、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（自宅の方または会誌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（会誌、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（上記と会誌への広告料を含む）

（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

〒060-0819 札幌市北区北19条西8丁目

北海道大学 低温科学研究所

生物適応機構学（田中歩）研究室内

日本光合成学会

TEL:011-706-5493 / FAX:011-706-5493

ホームページ: <http://photosyn.jp>

郵便振替口座 加入者名：日本光合成学会 口座番号：00140-3-730290

銀行振込の場合 ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキュウと入力)、当座、0730290

名前：ニホンコウゴウセイガッカイ

## 日本光合成学会会則

### 第1条 名称

本会は日本光合成学会（The Japanese Society of 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。役員の任期は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。幹事の任期は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。
- 第4 本会則の改正を平成21年6月1日から施行する。

## 日本光合成学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。

## 編集後記

今号は、5月末に名古屋で開かれた光合成学会の公開シンポジウム「30年後の光合成研究」の特集です。シンポジウムで講演された若手研究者4名とベテラン研究者5名の方に、30年後の光合成研究を見据えた記事を書いていただきました。現在の光合成研究の各分野を代表する方や若手のホープの方の記事で、大変ボリュームのある特集になったと思っております。お忙しい中、原稿を書いていただいた著者の方々、序論を書いていただいた佐藤直樹さん、とりまとめをしていただいた鹿内利治さん、田中歩会長に厚くお礼申し上げます。私は、今回記事を書いていただいた若手研究者とベテラン研究者の中間に位置する中堅（中年？）研究者です。特集の記事を拝見いたしますと、日々、雑多なことに追われ、無為な時間を過ごさないようにすべきだと思いました。今号に対するご意見や本誌に対するご要望がございましたら、knoguchi@biol.s.u-tokyo.ac.jpまで是非お知らせください。

＜東京大学 野口 航＞

## 記事募集

日本光合成学会では、会誌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、博士研究員の方からの投稿を期待しています。
- 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。書評も歓迎します。

記事の掲載を希望される方は、会誌編集長、野口（knoguchi@biol.s.u-tokyo.ac.jp）までご連絡ください。

## 「光合成研究」編集委員会

編集長 野口 航 (東京大学)  
編集委員 西山 佳孝 (埼玉大学)  
編集委員 園池 公毅 (早稲田大学)  
編集委員 田中 亮一 (北海道大学)

---

## 日本光合成学会 2013-2014年役員

会長	田中 歩 (北海道大学)	
事務局長	鹿内 利治 (京都大学)	
常任幹事	池内 昌彦 (東京大学)	前会長
常任幹事	野口 航 (東京大学)	編集長
常任幹事	西山 佳孝 (埼玉大学)	編集委員
常任幹事	園池 公毅 (早稲田大学)	編集委員
常任幹事	久堀 徹 (東京工業大学)	渉外
常任幹事	太田 啓之 (東京工業大学)	渉外
常任幹事	皆川 純 (基礎生物学研究所)	光生物協会
常任幹事	日原 由香子 (埼玉大学)	年会 2013年
常任幹事	熊崎 茂一 (京都大学)	年会 2014年
会計監査	大岡 宏造 (大阪大学)	
編集委員	田中 亮一 (北海道大学)	
ホームページ	高林 厚史 (北海道大学)	

---

光合成研究 第23巻 第3号 (通巻68号) 2013年12月31日発行

## 日本光合成学会

〒060-0819 札幌市北区北19条西8丁目

北海道大学低温科学研究所

生物適応研究室内

TEL & FAX : 011-706-5493

e-mail : jspr@photosyn.jp

ホームページ : <http://photosyn.jp/>

郵便振替口座 加入者名 : 日本光合成学会 口座番号 : 00140-3-730290

銀行振込の場合 ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキュウと入力)、当座、0730290

名前 : ニホンコウゴウセイガツカイ

---