

# 光合成研究

第 25 巻 第 1 号 (通巻 72 号) 2015 年 4 月  
NEWS LETTER Vol. 25 NO. 1 April 2015

THE JAPANESE SOCIETY OF PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

ご挨拶		
	高橋 裕一郎 (岡山大)	2
第 6 回日本光合成学会年会・公開シンポジウム開催のお知らせ		
	高橋 裕一郎 (岡山大) 松田 祐介 (関西学院大)	3
第 7 回日本光合成学会ワークショップ開催のお知らせ		
	高橋 裕一郎 (岡山大)	5
研究紹介 基礎放散、光化学過程、非光化学消光		
	笠島 一郎 (花き研究所)	6
研究紹介 シアノバクテリアの光合成における酸素利用		
	嶋川 銀河 (神戸大)	16
研究紹介 PsbA3-D1 タンパク質を発現する光化学系 II 複合体の結晶構造		
	鶴飼 奈津美 (岡山大) 菅 倫寛 (岡山大) 杉浦 美羽 (愛媛大) 岩井 雅子 (東大) 池内 昌彦 (東大) 沈 建仁 (岡山大)	22
研究紹介 新奇クロロフィルを持つシアノバクテリアのエネルギー移動機構の解析		
	篠田 稔行 (東京理科大) 秋本 誠志 (神戸大) 二井 大輔 (東京理科大) 太田 尚孝 (東京理科大) 鞆 達也 (東京理科大)	28
解説特集 「光合成の多様な世界について」		
序文	鞆 達也 (東京理科大) 園池 公毅 (早稲田大)	35
解説 クロロフィルの光エネルギー捕集にみられる多様性		
	秋本 誠志 (神戸大) 鞆 達也 (東京理科大)	36
解説 原形質流動による成長制御から考える植物の光戦略		
	富永 基樹 (早稲田大)	42
解説 自然界の多様性を生かした研究戦略：珪藻の世界		
	菓子野 康浩 (兵庫県立大)	48
解説 クロロフィルを制した者が光環境を征した？ 光合成生物を「食べる」生き様の舞台裏		
	柏山 祐一郎 (福井工業大) 横山 亜紀子 (筑波大) 民秋 均 (立命館大)	58
報告記事 若手の会活動報告～第 11 回セミナーの開催～		
	浅井 智広 (立命館大)	71
報告記事 「第 11 回 日本光合成学会若手の会セミナー」で経験した事		
	大山 克明 (立命館大)	72
報告記事 The German-Japanese Binational Seminar 2015 に参加して		
	鬼沢 あゆみ (埼玉大)	74
集会案内 第 23 回「光合成セミナー2015：反応中心と色素系の多様性」の開催案内		
		75
集会案内 「International Meeting "Photosynthesis Research for Sustainability 2015"」の開催案内		
		76
事務局からのお知らせ		
		76
日本光合成学会会員入会申込書		
		77
日本光合成学会会則		
		78
幹事会名簿		
		80
編集後記		
		81
記事募集		
		81
賛助法人会員広告		

## ご挨拶

日本光合成学会会長

高橋 裕一郎（岡山大学 大学院自然科学研究科）

2015年より2年間、北海道大学の田中歩会長の後任として、日本光合成学会の会長をお引き受けすることになりました。

日本光合成学会は、1979年に発足した日本光合成研究会から2009年6月1日に発展的に移行し、今年で36年もの歴史をもつ学会です。光合成研究会が発足した年に私は光合成の研究を卒業研究として始めましたので、研究者キャリアの始めから大変お世話になってきました。これからは学会の運営にも最善を尽くし、日本の光合成研究の発展や光合成研究者の交流の活性化に貢献したいと考えています。

日本光合成研究会から日本光合成学会への過程では、代表および会長を始め、事務局や多くの会員の献身的な貢献により、年会・シンポジウム、ワークショップおよび会報「光合成研究」の充実が進められてきました。その他にも、「光合成事典」や「光合成研究法」を刊行し、光合成やその周辺領域の研究者や学生の育成にも貢献してきました。現在は出版社の事情で絶版となった「光合成事典」を発展させ、Web版光合成事典を公開しています。このように日本光合成学会は日本の光合成研究の発展を牽引する役割を果たしてきたと言えます。

光合成研究はご存じの通り、植物科学にとっては基本となる分野で、その学際性が多くの研究者を引きつけています。また、応用範囲の広さも大きな特徴で、現代社会が直面する深刻な食糧、エネルギーおよび環境問題の解決にも重要な役割を果たすことが期待されています。このような状況において、日本光合成学会が研究者や社会の期待に応えられる組織であり続けるよう最善を尽くしていきたいと考えています。

今後の活動として特に重視したいと考えていることは、光合成の最先端の研究成果の紹介や多様な光合成の研究手法の普及、研究者間の情報交換を始めとするコミュニケーションの支援、そして次代を担う若手研究者の育成です。特に学際性の強い光合成研究では分野の異なる研究の相互理解は重要であると考えています。また、基礎から応用への光合成研究の有機的なつながりを支援できる組織でありたいと考えています。さらに、光合成研究の重要性を社会に発信することも重要な責務であると考えています。当面は、事務局の鹿内さんと常任幹事の方々の助けを借りながら、シンポジウムとワークショップを充実させつつ、若手研究者の育成に努めます。しかし、会員の皆様の様々なご提案やご協力なしでは日本光合成学会を更に発展させることは難しいと思っております。どうぞ宜しくご支援を賜りますようお願い致します。

## 集会案内

第 6 回日本光合成学会年会および公開シンポジウム  
**「若手光合成研究者による光合成研究の新展開」**  
**「光合成炭素代謝研究の新展開—CO<sub>2</sub> 取込から細胞・代謝工学まで」**

2015 年 5 月 22 日 (金) ~ 23 日 (土)

岡山国際交流センター

本年の第 6 回日本光合成学会年会では、シンポジウム、ポスター発表を行います。

日時：2015 年 5 月 22 日 (金) 13:00 ~ 23 日 (土) 12:30

場所：岡山国際交流センター (<http://www.opief.or.jp/oicenter/>)

参加費：一般 (会員) 2,000 円、一般 (非会員) 3,000 円、学生 1,000 円

懇親会費：一般 3,000 円、学生 2,000 円

5 月 22 日 (金)

◎ シンポジウム 1 13:00~15:00

### 「若手光合成研究者による光合成研究の新展開」

オーガナイザー 高橋 裕一郎 (岡山大学)

光合成は幅広い学問分野の知識や手法を駆使して研究を進める学際的な分野です。長い歴史と実績をもつ日本の光合成研究が今後も発展していくためには、若手研究者の新しく柔軟な発想と研究に邁進する活力が不可欠です。本シンポジウム 1 では、新しい発想と研究アプローチで光合成研究を進めている若手研究者 4 名に話題提供をして頂きます。大きく広がっている光合成研究の分野の一部しかカバーできていませんが、光合成研究の新展開を志す若手研究者から熟年研究者はエネルギーを受け取って、世代を超えた活発な議論を巻き起こせたらと期待しています。

1. ホモダイマー型光合成反応中心の分子生物学的な構造機能解析 浅井智広 (立命館大学)
2. 光化学系 I: 複合体リモデリングからサイクリック電子伝達へ 高橋拓子 (埼玉大学)
3. 多様な光環境における光合成タンパク質超複合体のダイナミクス 得津隆太郎 (基礎生物学研究所)
4. 油脂生産能の高い微細藻類の育種とゲノム解析 井出曜子 (中央大学)

◎ ポスター紹介 15:30~16:00

◎ ポスターセッション 16:00~18:30

◎ 懇親会 18:45~20:45

5 月 23 日 (土)

◎ シンポジウム 2 9:10~11:20

### 「光合成炭素代謝研究の新展開—CO<sub>2</sub> 取込から細胞・代謝工学まで」

オーガナイザー 松田 祐介 (関西学院大学)

二酸化炭素を光合成に獲得するプロセスは水生植物・陸上高等植物を問わず多くの段階を経ていることが最近明らかになってきています。また、植物にとって最大の光エネルギーシンクである CO<sub>2</sub> の効率的獲得機構は、光化

学系とも機能的に連携している重要なプロセスと考えられます。本シンポジウムでは植物が CO<sub>2</sub> を獲得し利用する仕組み、およびその仕組みを工学的に応用して食料やエネルギー問題等に応用する取り組みについて、最新の知見を幅広く紹介したいと考えています。

1. 植物の CO<sub>2</sub> コンダクタンス制御 Yin Wang (名古屋大学)
2. 藻類 C<sub>4</sub> 代謝の多様な機能 辻敬典 (関西学院大学)
3. 植物 C<sub>4</sub> 化の取り組み 宗景ゆり (関西学院大学)
4. シアノバクテリア工学、CCM から油脂生産まで 小俣達男 (名古屋大学)

◎ 総会・授賞式 11:40~12:30

◎ 閉会 12:30

5月22日(金)にポスター紹介の時間を設けます(パネルサイズ:W=90 cm、H=210 cm)。優秀発表賞を選出しますので、皆様ふるって研究成果をご発表下さい。

#### 参加登録(締め切り 平成 27 年 5 月 7 日)

光合成学会のホームページ (<http://photosyn.jp>) で登録してください。

申込締め切り日:5月7日(木)

問い合わせ先:

年会企画委員長:松田祐介(関学大) [yusuke@kwansei.ac.jp](mailto:yusuke@kwansei.ac.jp)

年会準備委員長:高橋裕一郎(岡山大) [taka@cc.okayama-u.ac.jp](mailto:taka@cc.okayama-u.ac.jp)

## 集会案内

### 第7回日本光合成学会ワークショップ 「ジョリオ型分光光度計で光合成のどんな活性を測定できるか」

2015年5月23日(土)～24日(日)

岡山大学理学部生物学科

本年の第6回日本光合成学会年会の終了後に、引き続き岡山大学へ場所を移して「ジョリオ型分光光度計」の原理および使用方法に関するワークショップを開催します。23日のみの参加も可能です。2006年以来の久しぶりのワークショップ開催となりますが、奮ってご参加下さい。

ジョリオ型分光光度計は細胞のまま分光測定および蛍光測定が可能な装置です。Dual-PAMが蛍光、P700、カロテノイドシフトの測定によく利用されていますが、異なる原理で動作するため、測定によってはDual-PAMと比べて優れた性能をもつことがあります。日本ではまだ普及していない装置ですが、欧米の光合成研究者はよく利用されています。本ワークショップではジョリオ型分光光度計の原理と応用について紹介すると共に、今後の光合成研究への応用について議論を深めたいと思います。

日時：2015年5月23日(土) 15:00～24日(土) 12:00

場所：岡山大学理学部生物学科 (<http://www.biol.okayama-u.ac.jp/index.html>)

参加費：1,000円(資料代)

懇親会：希望者は23日の夜に夕食を兼ねて懇親会を行います。

#### 5月23日(土)

15:00～17:00 レクチャー

1. ジョリオ型分光光度計の原理 高橋裕一郎(岡山大)
2. カロテノイドシフトの測定法 高橋拓子(埼玉大)
3. P700の測定法 小澤真一郎(岡山大)
4. 蛍光測定法 高橋拓子(埼玉大)

17:00～18:00 ワークショップ1

ジョリオ型分光光度計の操作の基本

19:00～21:00 夕食を兼ねた懇親会

#### 5月24日(日)

9:30～12:00 ワークショップ2

ジョリオ型分光光度計で光合成活性を測定してみよう

藻類の細胞および植物の葉のP700とカロテノイドシフトの測定

お問い合わせ・参加ご希望の方は、高橋裕一郎([taka@cc.okayama-u.ac.jp](mailto:taka@cc.okayama-u.ac.jp))までメールで申し込み下さい。希望者が多い場合は先着順としますのであらかじめご了承下さい。

ワークショップ参加者には、岡山大学・津島宿泊所(1泊2600円程度、食事なし)

([http://www.okayama-u.ac.jp/tp/profile/tsushima\\_c02.html](http://www.okayama-u.ac.jp/tp/profile/tsushima_c02.html))の紹介を致しますので、ご希望の方はお知らせ下さい。

メール件名：「第6回光合成学会ワークショップ申込」

申込締め切り日：5月7日(木)

## 研究紹介

## 基礎放散、光化学過程、非光化学消光

(独) 農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所  
笠島 一郎\*

パルス変調クロロフィル蛍光測定法は植物の光化学系 II 周辺のクロロフィル励起エネルギーの流れを測定する手法である。この手法は比較的容易かつ非破壊的にクロロフィル蛍光パラメーターを測定できるため広く利用されている。クロロフィル蛍光パラメーターはエネルギーの流れに関するモデルに基づき数理的に導かれるものであるが、その経緯を理解することは簡単ではない。本報告ではクロロフィル蛍光パラメーターの内容を理解して頂くと共に、クロロフィル蛍光収率の逆数式に基づくパラメーター導出の計算過程を体系立てて説明することを試みる。

## 1. はじめに

私事で恐縮だが、まず私がパルス変調クロロフィル蛍光測定法を研究する機会を得た経緯を紹介させていただく。7 年前に東京大学分子細胞生物学研究所の内宮・川合研究室(現・埼玉大学)でポスドクとして研究させて頂くこととなり、「パム」なぞという耳慣れない名前の機械を使って研究するのだと教えられた。私の大学院の専攻はシロイヌナズナの栄養欠乏応答であったので、光合成分野では有名な通称 PAM (パルス変調クロロフィル蛍光測定法) を知らなくても仕方のない話である。助教の高原健太郎さんに簡単な状況を教えて頂き先生方のホームページ<sup>1, 2)</sup>やら成書<sup>3, 4)</sup>やらを眺めては、これは一体どういった実験方法なのであろうかと首を捻ってみた。

様々な考察の末に得た結論は、クロロフィル蛍光によって与えられる数値データを従来以上に鮮明に説明しているように思えた。そして東大理学部で実際の測定を教えるうちに全体の話が見えてきた。また、論文掲載に際して先生方や雑誌の査読者の方に貴重なアドバイスを頂き一つの話としてうまく纏めることが出来たと思う<sup>5)</sup>。本雑誌に投稿してみてはどうかと背中を押して頂き、この機会を利用してパルス変調クロロフィル蛍光測定(以後、「PAM 測定」と略す)における脱励起プロセス、反応速度定数、クロロフィル蛍光パラメーターの数的関係性および呼称につい

て解説をしたいと思う。博学の方には基本的過ぎるかも知れないが、当時の自分のような初心者を想定しているのでご容赦願いたい。また、私自身はクロロフィル蛍光測定の原理を実験した訳ではなく、様々な基礎的知見を総合した光化学系 II の光化学的環境を前提として数値比較を行ったものである。私は専ら植物科学の応用的側面を研究させて頂いており、クロロフィル蛍光測定のそうした応用的事例もこの文章の最後に紹介したい。

## 2. 測定原理

植物の葉に光を照射するとクロロフィルが光を吸収し励起されるが、その励起エネルギーのごく一部(2%程度)が赤い蛍光として放出される。植物分野の研究者の方であれば、この現象を普段目にはしているかも知れない。私は以前シロイヌナズナの葉の GFP 蛍光を測定していたので、赤色光を通すフィルターを透過するクロロフィル蛍光を FluorImager や蛍光顕微鏡で観察した。こうした測定を行っていた当時はクロロフィル蛍光の強度は常に一定であるものとして扱っており、GFP 蛍光強度を標準化するためにクロロフィル蛍光強度を利用しさえもした<sup>6)</sup>。しかし、実はクロロフィル蛍光の強度は一定ではなく、照射光の強さやタイミング次第で蛍光の収率(照射光の強さに対する蛍光の強さの割合)が変化するのである。こうした蛍光収率の変化を決められた条件で測定し理論的に計算するプロセスこそ PAM 測定である。

\*連絡先 E-mail: kasajima@affrc.go.jp

PAM 測定について理解する為には、まず測定の原理を知る必要がある。「パルス変調」とはこの場合において、ごく短時間のパルス光を測定対象である植物の葉に照射し、その際に増加する分の蛍光強度（蛍光収率に相当する）を観察する手法のことを指している。

「蛍光収率」とは言っても収率の絶対値ではなく相対値しか分からない。単純に蛍光の絶対的な強度を測定すれば良いようにも思うが、パルス変調の優れた点は植物に一定強度の連続光を照射し既にクロロフィル蛍光が放出されている状態でも、光を照射しない時と同じ尺度で光化学系 II から放出されるクロロフィル蛍光の収率を測定できることにある。典型的な PAM 測定では測定パルス光 (measuring pulse)、アクチニク光 (actinic light: 励起光と表記することが多い)、飽和パルス光 (saturating pulse) という 3 種類の光を測定機器から照射する。「測定パルス光」はパルス変調測定の為の弱い光であり、測定中は常に照射される。測定パルス光だけが照射された状態は擬似的な暗黒下である。植物の葉は測定前に予め暗黒下に 30 分以上置き葉緑体を暗順応 (dark adaptation) させるのが望ましい。後で出てくる  $F_v/F_m$  というパラメーターにより暗順応の度合いを評価することが出来る。 $F_v/F_m$  の値が大きいほどよく暗順応している。健康な葉を完全に暗順応させた際の  $F_v/F_m$  値は私の経験上、シロイヌナズナで 0.85 程度、イネでは 0.82 程度である。ストレスや老化によりダメージを受けた葉では  $F_v/F_m$  が小さい値となる。「アクチニク光」は連続照射光であり、葉を光が照射された状態に変化させる。「飽和パルス」は 1 秒以下の短い時間に渡り時折照射する非常に強い光である。これは測定上の目的で照射する。とにかく、これらの光刺激を与えることで葉のクロロフィル蛍光収率がドラマチックに変化するのである<sup>7)</sup> (図 1)。

蛍光収率が変化するのであれば、それらを記述する記号をあてがう必要がある。蛍光測定は暗黒下から始める。この時の蛍光収率は  $F_0$  である。そこに飽和パルス光を照射すると蛍光収率が一過的にかなり大きくなる。この蛍光収率は  $F_m$  と呼ばれる。次にアクチニク光を点灯する。するとやはり蛍光収率が増加する。この時の蛍光収率は  $F_s$  だが、 $F_s$  の値は継時的に変化する。アクチニク光の強さによっても  $F_s$  は変化するので、同じ  $F_s$  でも測定条件により値は異なる。アクチニク光を照射している最中に飽和パルス光

を照射すると蛍光収率がさらに上がり、この値を  $F_m'$  と呼ぶ。ここまでの蛍光収率の基本セットだが、オプションでアクチニク光消灯後の蛍光収率を観察する場合がある。蛍光収率はここでは  $F_0''$  とし、飽和パルス照射時は  $F_m''$  としてはどうだろうか。 $F_0$ 、 $F_m$ 、 $F_s$ 、 $F_m'$  等の基本的な蛍光収率や後で出てくる蛍光パラメーターの主要なものの呼称は統一されているものの<sup>8)</sup>、困ったことにマイナーな測定条件での蛍光収率や頻繁に使わない蛍光パラメーターの呼称は文献により必ずしも同じではない。とりあえず名前を付ければ理解を次に進めることが出来る訳で、マイナーな呼称についてここでは私が論文で報告した命名法を採用すると共に<sup>5)</sup>、必要に応じてそれに対応する和名を提案する。

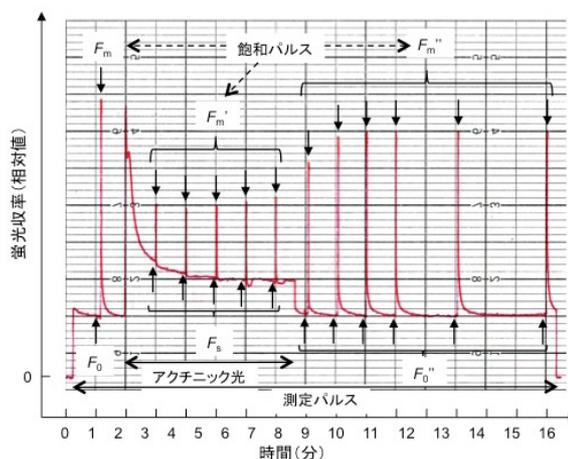


図 1 標準的なパルス変調クロロフィル蛍光測定

東大理学部・寺島研の皆様のご好意により測定した。文献 5 より改変。

### 3. 光化学系 II の脱励起プロセス

文献を紐解くと Kitajima&Butler が最初に  $F_v/F_m$  という一番有名なクロロフィル蛍光パラメーターを提案したらしい<sup>9)</sup>。最もこの時はパルス変調ではなくクロロフィル蛍光強度そのものを解析している。 $F_v/F_m$  は植物の葉の健康度合いを可視化できるツールとして農学分野でも広く利用されている。この数値は 0.2 から 0.85 程度の範囲の値を取り、数値の意味するところは「光合成の最大収率」である。

$$F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$$

この式の意味を理解する為には光化学系 II の脱励起プロセスについて知る必要がある。光化学系 II に結合したクロロフィル分子が励起されると、幾つかのプロセ

スによって「脱励起」(de-excitation)し基底状態に戻る。脱励起する際にエネルギーを放出する。脱励起プロセスは大きく3つのグループに分けられる。

「基礎放散」(basal dissipation)はクロロフィル分子単独の反応であり、この反応の反応速度定数は光照射によって変化しない。正確な言い方をすれば、基礎放散の値は定義上不変のものとして計算する。基礎放散にはクロロフィル蛍光、内部変換による熱放散、三重項クロロフィルへの変換が含まれると考えられる。

「光化学過程」(photochemistry)は光合成電子伝達系、特に励起された P680 クロロフィル二量体から電子を受け取るフェオフィチンやプラストキノンのことだと考えればよいだろう。光化学系 II 超複合体 (PSII supercomplex) にはクロロフィル分子が多数結合しており、クロロフィル分子間の励起エネルギー移動 (excitation energy transfer) により励起エネルギーは P680 に集められる。ただし、光化学系 II のどの部位に結合したクロロフィルからどれだけの割合で蛍光が発せられるのかは判然としない。クロロフィルから  $Mg^{2+}$  が抜けた化学構造を持つフェオフィチンもクロロフィルに似たスペクトルの蛍光を発する性質を持つようである<sup>10)</sup>。光化学過程の中心的な役割を果たす分子を特定する為には、生葉の光化学系 II に含まれるどのクロロフィル (フェオフィチン) が蛍光を発するのか知る必要がある。光化学過程は蛍光を発するクロロフィルから他の分子へエネルギーを受け渡す反応なので、化学的には消光 (quenching) の一種である (「消光」の一般的要件は、分子間相互作用により蛍光が弱まることである)。この場合は電子伝達系が消光剤 (quencher) である。光化学的な消光反応なので、光化学過程を光化学消光 (photochemical quenching) と言うことも可能である。一方で放散 (dissipation) は光化学過程以外へエネルギーを放出することを意味するので、光化学過程のことを光化学放散と言うことは出来ない。クロロフィルに起きる反応全てに対して利用できる表現は「脱励起」である。なので、「放散」や「消光」は「脱励起」の特殊な部分集合である。

「非光化学消光」(non-photochemical quenching) は、光化学過程以外の分子間相互作用により蛍光を弱める反応である。植物は実際にそうしたプロセスを備えている。非光化学消光は英語の頭文字を取って NPQ と呼ばれることが多い。尚、後述するクロロフィ

ル蛍光パラメーターのうち NPQ の大きさを示すものには NPQ と qN という2つがある。前者は非光化学消光の略称と同一の名称なので、文章中で「NPQ」という表記がある場合、それが非光化学消光を意味するのかそれともクロロフィル蛍光パラメーターの NPQ を意味するのかを文脈から区別しなければならない。

基礎放散の反応速度定数は光照射によらず変化しないと書いたが、光化学過程と NPQ の反応速度定数は光照射によって変化する。飽和パルス光が照射されると一過的に光合成電子伝達系 (プラストキノン) が完全に還元され、それ以上の電子を受け取れないので光化学過程の反応速度定数が近似的にゼロになると考えられる。また、アクチニク光が照射されると葉緑体のルーメンで化学反応が起き NPQ が誘導される<sup>11,12)</sup>。暗黒下では NPQ は次第に消失する。また、NPQ には2つ以上の成分があると考えられている。アクチニク光照射下では光合成電子伝達系が部分的に還元され光化学過程の反応速度定数が小さくなる。こうした光化学過程と NPQ の反応速度定数の大きさの変化によってクロロフィル蛍光収率が光環境により変化するのである。そこで、蛍光収率の値と反応速度定数の値の関係性を数理モデル化し比較すれば脱励起プロセスの大きさやその変化を知ることが出来る訳だ。

#### 4. Stern-Volmer (シュテルン-フォルマー) の式

蛍光強度 (あるいは蛍光収率) と脱励起プロセスの大きさを関連付けるのが Stern-Volmer の式である:

$$I_0/I = 1 + K \cdot [Q]$$

$I_0$  がもとの蛍光強度 (fluorescence intensity)、 $I$  が消光剤を加えた時の蛍光強度、 $K$  は定数で  $[Q]$  は消光剤の濃度である。この式から、消光プロセスの大きさによって蛍光強度がどのように変化するのか知ることが出来る。Stern-Volmer の式は脱励起プロセスの反応速度定数 (rate constant) と蛍光強度との間の以下のような式を仮定すると説明できる:

$$I_0 = k_f / (k_f + k_{nr})$$

$$I = k_f / (k_f + k_{nr} + k_q)$$

ここで  $k_f$  は蛍光の反応速度定数、 $k_{nr}$  はそれ以外の基礎放散の反応速度定数、 $k_q$  は消光の反応速度定数である。こうした考え方を PAM 測定に適用すると以下の式を

置くことが出来る :

$$F = S \cdot k_f / (k_{fd} + k_p + k_{NPQ}) \quad (\text{蛍光収率の標準式})$$

この式の  $F$  は蛍光収率 (fluorescence yield)、 $S$  は感度ファクター (sensitivity factor) と呼ばれる定数、 $k_f$  は蛍光の反応速度定数、 $k_{fd}$  は蛍光を含む基礎放散の反応速度定数、 $k_p$  は光化学過程の反応速度定数、 $k_{NPQ}$  は NPQ の反応速度定数である。この式では脱励起反応の 3 つのグループを分かり易くした手計算を行い易くするために  $k_f$  とそれ以外の基礎放散の和を一つの  $k_{fd}$  という記号で表記している。さらに、この式は光化学系 II の光化学的環境に関する「Lake model」の下でのみ成立することに留意せねばならない。光合成ユニット (photosynthetic unit、PSU) という概念がある。これは、光化学系 II 反応中心複合体とそれに連なるアンテナ複合体を 1 つのユニットとして考えるものである。各ユニットがチラコイド膜上で独立に存在するのか、それともユニット同士が連結し励起エネルギーがユニット間を移動出来るのかによって蛍光収率に関する式も変化する。ユニット同士が連結していればアクチニク光が照射され反応中心が閉じた時も、別のユニットの開いた反応中心に励起エネルギーが移動し光化学過程を励起出来るので光化学反応の効率が良い。各ユニットが完全に独立した状態を仮定するのが Puddle model (水たまりモデル)、ユニット同士が全て連結した状態を仮定するのが Lake model (湖モデル) である。光化学系 II 超複合体は 2 つのユニットが連結した状態なので Puddle model は現実に合致しないという議論がある。実際の測定では Lake model により光合成ユニットの状態を近似できるが、Lake model と Puddle model の中間的な状態がより正確らしい<sup>13)</sup>。Lake model で近似すると蛍光収率の式が単純で計算しやすいので実用に向いている。

普通の消光反応と異なるのは、植物の葉のクロロフィル蛍光の場合は消光過程が二つ (光化学過程および NPQ) 存在することである。さらに、これら消光過程の反応速度定数は消光剤濃度ではなく光照射等の環境条件により変化する。植物のクロロフィル蛍光は世の中で最も複雑な消光過程を伴っているのではないだろうか。しかもそれが生物の組織の中で繰り返られるのだから驚きである。 $S$  は測定上求めることが難しい値であるが、基本的に変化しない筈なので定数として扱う。ただし、 $S$  の値が変動する可能性 ( $S$

fluctuation) も場合によってはあるかも知れない。 $k_f$  と  $k_{fd}$  も定数として扱う。

$F_o$  と  $F_m$  は蛍光収率の標準式により以下のように記述できる :

$$F_o = S \cdot k_f / (k_{fd} + k_{pi})$$

$$F_m = S \cdot k_f / k_{fd}$$

$k_{pi}$  は完全に酸化され「開いた」状態の光化学過程の反応速度定数である。飽和パルス光を照射すると光化学過程が一過的に完全に閉じるので、 $k_p$  がゼロになる。

この二つの式を使って  $F_v/F_m$  を計算してみる :

$$\begin{aligned} F_v/F_m &= (F_m - F_o) / F_m \\ &= [S \cdot k_f \cdot (1/k_{fd} - 1/(k_{fd} + k_{pi}))] / [S \cdot k_f \cdot (1/k_{fd})] \\ &= (1/k_{fd} - 1/(k_{fd} + k_{pi})) / (1/k_{fd}) \\ &= k_{pi} / (k_{fd} + k_{pi}) \end{aligned}$$

蛍光収率の比率を計算することにより式の不要な部分が消去され、基礎放散と光化学過程の大きさを比較することが出来た。一番最後の式の分母は暗黒下の葉の脱励起プロセス全体の大きさ、分子はそのうちの光化学過程の大きさであるので、式全体は暗黒下における光化学過程の量子収率を示している。光化学過程の量子収率は暗黒下で最大となるので、 $F_v/F_m$  は「光合成の最大収率」である。

蛍光収率の標準式を変形するとこの手の計算を簡単に行うことが出来る。標準式の左辺と右辺の分母を交換してみる :

$$k_{fd} + k_p + k_{NPQ} = S \cdot k_f \cdot F^{-1} \quad (\text{蛍光収率の逆数式})$$

この式では、左辺が反応速度定数の和、右辺が実験により求まる数値  $F^{-1}$  (に未知の係数  $S \cdot k_f$  を掛けた値) である。脱励起プロセス全体の大きさの和は蛍光収率の逆数に比例することになる。各蛍光収率について蛍光収率の逆数式を書き下してみる :

$$k_{fd} + k_{pi} = S \cdot k_f \cdot F_o^{-1}$$

$$k_{fd} = S \cdot k_f \cdot F_m^{-1}$$

$$k_{fd} + k_p + k_{NPQ} = S \cdot k_f \cdot F_s^{-1}$$

$$k_{fd} + k_{NPQ} = S \cdot k_f \cdot F_m'^{-1}$$

蛍光収率の逆数式は図示できる (図 2)。

## 5. クロロフィル蛍光パラメーター

既出の  $F_v/F_m$  はクロロフィル蛍光パラメーターの代表格である。クロロフィル蛍光パラメーターは反応速度定数の比率を蛍光収率の値を基に評価する式のことであり、多種多様なものが提唱・利用されてきた。

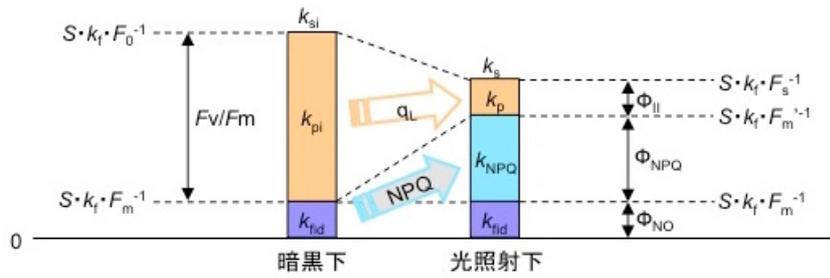


図2 反応速度定数、蛍光収率、クロロフィル蛍光パラメーターの図示  
文献5より改変。

さらに分かりにくいことに、全く同じパラメーターでも文献によって表記が異なる場合がある。また、例えば同じ光化学過程の大きさを評価するにも様々な方法があるから、似通った多くの式が存在する。パルス変調クロロフィル蛍光測定の一つの真実が図2に凝縮されている。図2の各ボックスの高さは反応速度定数の大きさを示している。暗黒下では  $k_{fid}$  と  $k_{pi}$  が存在し、 $k_{pi}$  は  $k_{fid}$  よりも大きい。尚、 $k_{si}$  は暗黒下における反応速度定数の和である：

$$k_{si} = k_{fid} + k_{pi}$$

反応速度定数は蛍光収率の逆数を使って示すこともできる訳で、これがボックス横に書かれた式の値である。たとえば一番左上に示された数値は以下の式に対応する：

$$S \cdot k_f \cdot F_0^{-1} = k_{si} = k_{fid} + k_{pi}$$

$F_0$  と  $F_m$  の値から今一度光合成の最大収率を求めてみよう。図2を利用して計算すると、

$$(\text{光合成の最大収率}) = k_{pi} / k_{si} = k_{pi} / (k_{fid} + k_{pi}) = (F_0^{-1} - F_m^{-1}) / F_0^{-1} = (F_m - F_0) / F_m$$

光合成の最大収率が何故  $F_v/F_m$  により求まるのか、こうして見れば一目瞭然ではなからうか。図2に示された他の蛍光パラメーターも同様の計算により求めることができる：

$$NPQ = k_{NPQ} / k_{fid} = (F_m'^{-1} - F_m^{-1}) / F_m^{-1} = F_m / F_m' - 1$$

(基礎放散を1とした時のNPQの大きさ)

$$qL = k_p / k_{pi} = (F_s^{-1} - F_m'^{-1}) / (F_0^{-1} - F_m^{-1})$$

(光化学過程の'開度')

$$\Phi_{II} = k_p / k_s = (F_s^{-1} - F_m'^{-1}) / F_s^{-1} = (F_m' - F_s) / F_m'$$

(光照射下の光合成収率)

$$\Phi_{NPQ} = k_{NPQ} / k_s = (F_m'^{-1} - F_m^{-1}) / F_s^{-1}$$

(NPQ 収率)

$$\Phi_{NO} = k_{fid} / k_s = F_m^{-1} / F_s^{-1} = F_s / F_m$$

(光照射下の基礎放散収率)

図2の大きな矢印 (qL および NPQ) は反応速度定数の比率を示している。また、小さな矢印 ( $F_v/F_m$ 、 $\Phi_{II}$ 、 $\Phi_{NPQ}$ 、 $\Phi_{NO}$ ) は各脱励起プロセスの量子収率を

示している。図には示していないが、暗黒下の  $\Phi_{NO}$  を計算することも出来る。暗黒下の  $\Phi_{II}$  は  $F_v/F_m$  である。これまでの測定例に基づく植物の葉では暗黒下よりも光照射下で反応速度定数の和が若干小さいことが多いので、 $\Phi_{NO}$  は光照射下では若干大きくなる。さらに、NPQ が大きく低下した *psbS* 変異株では光照射下での反応速度定数の和が大幅に減少し  $\Phi_{NO}$  がかなり大きくなる<sup>14)</sup>。このように、NPQ は光照射により低下した光化学過程の脱励起能力を補う役割を果たしている。

ここでは解説しないが、NPQ は緩和解析 (relaxation analysis) により近似的に「速い」NPQ (fast/rapid NPQ) と「遅い」NPQ (slow NPQ) に分けることが出来る<sup>15)</sup>。PsbS タンパク質やキサントフィル・サイクルが関与するのは速いNPQであり、qE クエンチングとも呼ばれる<sup>16,17)</sup>。光阻害による反応速度定数の変化も蛍光収率の逆数を利用して図解可能である<sup>5)</sup>。蛍光収率の逆数式を利用すると比較的容易にクロロフィル蛍光パラメーターを計算できるが、逆数式を利用しない計算方法も様々な工夫されてきた。これらの計算は互いに整合性があり計算方法の違いを比べると面白いし、Lake model ではなく Puddle model に基づいた計算体系も報告されている<sup>18-24,5)</sup>。Puddle model 条件下の光化学過程の開度は qP というパラメーターで表される。

駒場で行われた第1回日本光合成学会公開シンポジウムでクロロフィル蛍光解析の発表をさせて頂いた際に、上記の一連の計算を実験的に証明出来るかとお質問を頂いた。冒頭にも書いたが、そうした検証は行っていない。例えば NPQ という生理現象はクロロフィル蛍光解析法が存在するからこそ測定できるように思えるが、これら脱励起反応の反応速度定数とクロロフィル蛍光収率の関係を別の手法でより直接的に検証できたらどんなに素晴らしいだろう。ところで、仮に 'Lake model' が正しかったとしても、上記の一連の計算式に欠点が無い訳でもない。まず、感度ファクタ

— $S$  は本当に変化しないだろうか。強光に晒された植物の葉では葉緑体運動が起き葉の色が薄くなる<sup>25,26)</sup>。色が薄くなるとは、葉に照射された光のうち拡散反射 (diffuse reflection) で反射される光の割合が増えるということである。反射率が増えるならば葉 (クロロフィル) の光の吸収率は減少する。光吸収率は  $S$  の要素であるから、葉緑体運動により葉の色が大きく変わると定数であるべき  $S$  の値が変化することになってしまう。別の問題として、NPQ というパラメーターは基礎放散の反応速度定数を単位として NPQ の大きさを測っている。葉の生育状態により遅い NPQ が緩和せず「基礎放散」として測定される反応速度定数の大きさが実際よりも嵩増しされてしまったら、 $S$  とは別の部分で計測値が変化してしまう。これらの異常な状態では PAM 測定が誤った結論を導く恐れがあるので、実際にそうした問題が生じ得るのか検証する必要がある。葉緑体運動の問題は 1992 年には既に報告されている。カタバミの葉等で葉緑体運動によると思われる明確な光吸収率の減少が観察され、クロロフィル蛍光を測定する際に葉緑体運動の影響を考慮する必要があると指摘されていた<sup>27)</sup>。さらに最近になって興味深い報告があったと教えて頂いた<sup>28)</sup>。この論文では葉緑体運動を欠損したシロイヌナズナの *phot2* 変異株を使い NPQ を測定している。葉緑体運動の有無により NPQ の値が異なり、この違いは測定する葉の光透過率と相関があると報告されている。この論文のデータは以前から予測されていた葉緑体運動に起因する見かけ上の NPQ の増大という現象を明確に実証している。葉の光吸収率が葉緑体運動により変化するような植物材料や実験条件では葉緑体運動の影響を計算したり葉緑体運動を回避する測定方法を考案し利用したりする必要がありそうだ。*phot2* でも遅い NPQ が観察されているので、遅い NPQ の正体は葉緑体運動ではない。

## 6. PAM 測定を利用した農学研究

PAM 測定を利用した農学研究の取り組みも行われている。 $Fv/Fm$  等の測定はストレスを受けた葉に見かけ上の変化が現れるよりも早い段階で脱励起プロセスの異常を非破壊的に見つけることが出来る。この特性を利用して病原菌の感染やストレス耐性を二次元 PAM 等によりいち早くかつ簡便に検出する手法が提

案されている<sup>29-31)</sup>。興味深いことに、 $Fv/Fm$  の値はマグネシウム欠乏条件で栽培したオオムギでは減少せず、銅欠乏、硫黄欠乏、鉄欠乏条件で栽培したオオムギでもあまり減少しないのに対してマンガン欠乏条件で栽培したオオムギでは劇的に減少する<sup>32)</sup>。より直接的に  $\Phi_{II}$  (あるいは ETR) や NPQ の測定により光合成や NPQ の大きさを比較する実験も行われている<sup>33-35)</sup>。私の経験では生育速度が速いイネ品種ほど  $\Phi_{II}$  の値が大きくなる傾向があった。しかし、 $\Phi_{II}$  の値は誤差範囲が大きく遺伝型による違いをもとに光合成速度云々を論じるのは実際には難しいと感じた。例えば遺伝子をマッピングするためには掛け合わせ後代の数十から数百個体の光合成速度を誤差なく測定せねばならず、光合成速度でこれをやるのは至難の業である。個人的には、単純に乾物重ベースの生長解析を行った方が成果が出やすいと思っている。一方で、2013 年に多収インディカ品種のタカナリから葉面積あたりの光合成速度を上昇させる *GPS* (= *NALI*) 遺伝子が同定された。このマッピングでは光合成測定により多数の  $F_2$  個体の光合成速度の大小を直接判別し、また 10,000 個体以上の  $F_2$  植物の遺伝型を調査しており驚異的な規模の実験である<sup>36)</sup>。

ところで、十分に暗順応した葉を用いると NPQ 値の誤差範囲はある程度小さく抑えられた。幸運にもイネのインディカ品種とジャポニカ品種で NPQ 値に明確な違いが見られ、ジャポニカ品種一般で大きかった (図 3)。NPQ の大きさを制御する遺伝子座も同定した<sup>37)</sup>。ジャポニカ品種では上流に挿入されたトランスポゾンにより *PsbS* 遺伝子の発現が高まった結果速い NPQ が大きくなっているようだ<sup>38)</sup>。それではこの現象は農学的にどのような意味を持っているのだろうか。

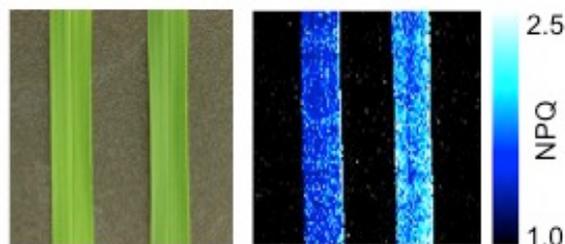


図 3 イネの葉の NPQ 測定例

内宮・川合研の皆様のご好意により測定した。ガラス温室で栽培したカサラス (左:インディカ品種) とニッポンバレ (右:ジャポニカ品種) の葉を暗順応後に強光条件下 (PPFD = 1,500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )、二次元 PAM 測定装置で測定。

NPQは強光ストレスへの防御機構の一つなので、イネが栽培される緯度の違いによる日照の強弱とNPQの大きさに正の相関があつて然るべきように思う。実際、強光による光阻害に対して若干ではあるがインディカ品種よりジャポニカ品種の方が強い傾向もある<sup>5)</sup>。しかし、アジア全体ではNPQの小さいインディカ品種はジャポニカ品種よりも低緯度の高日照地域で栽培される傾向があるのでこの仮説に反する。代替的な仮説として考えられるのは、低温環境下で光化学系IIがダメージを受けやすくより大きなNPQが必要とされる、といった事であろうか<sup>39)</sup>。NPQの大きさが通常より大きくなった組み換えイネは存在するが、実験は基本的に屋外(PPFD = 2,000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )よりも光強度が低い閉鎖系温室内(PPFD = 300~800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )に限られているし、組み換えイネを栽培できる低温環境を準備することすらそう簡単な話ではない。しかし少なくとも、*PsbS* 遺伝子の欠損により速いNPQを欠くイネの生育は野生型株よりも悪い<sup>14,37,40)</sup>。2013年の解説特集「光阻害」によれば、そもそもNPQの機能を単純に光阻害の緩和のみに帰すべきではない<sup>41)</sup>。将来、イネのNPQが持つ農学的意義が明らかになることが期待される。

## 7. おわりに

クロロフィル蛍光解析は植物の光合成の状態を簡単に測定できる優れた手法である。基礎研究に止まらず、この手法をうまく利用して光合成能力の高い作物が育種される日もそう遠くないのではないだろうか。本報告がその一助になれば幸いである。私自身は現在光合成研究から一線を画し花卉の遺伝子組換えを行っているが、いずれまた微力ながら光合成分野の研究にも貢献したいと思っている。最後に、一連の研究にアドバイスを頂いた方々やサポートして頂いた方々、論文の査読者の方々に感謝申し上げたい。

Received December 12, 2014; Accepted January 9, 2015

## 参考文献

1. 光合成の森 <http://www.photosynthesis.jp/>
2. クロロフィル蛍光  
<http://hostgk3.biology.tohoku.ac.jp/hikosaka/fluorescence.html>

3. 光合成 (佐藤公行 編) 朝倉書店  
ISBN978-4-254-17657-5
4. 杉森彰: 光化学豪華房 ISBN978-4-7853-3208-2
5. Kasajima, I., Takahara, K., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H. (2009) Estimation of the relative sizes of rate constants for chlorophyll de-excitation processes through comparison of inverse fluorescence intensities. *Plant Cell Physiol.* 50, 1600–1616.
6. Kasajima, I., Ohkama-Ohtsu, N., Ide, Y., Hayashi, H., Yoneyama, T., Suzuki, Y., Naito, S., Fujiwara, T. (2007) The *BIG* gene is involved in regulation of sulfur deficiency-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 129, 351–363.
7. Baker, N.R. (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 89–113.
8. van Kooten, O., Snel, J.F.H. (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* 25, 147–150.
9. Kitajima, M., Butler, W.L. (1975) Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim. Biophys. Acta* 376, 105–115.
10. French, C.S., Smith, J.H.C., Virgin, H.I., Airth, R.L. (1956) Fluorescence-spectrum curves of chlorophylls, pheophytins, phycoerythrins, phycocyanins and hypericin. *Plant Physiol.* 31, 369–374.
11. Niyogi, K.K., Li, X.P., Rosenberg, V., Jung, H.S. (2005) Is *PsbS* the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *J. Exp. Bot.* 56, 375–382.
12. Zaks, J., Amarnath, K., Kramer, D.M., Niyogi, K.K., Fleming, G.R. (2012) A kinetic model of rapidly reversible nonphotochemical quenching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 15757–15762.
13. Kramer, D.M., Johnson, G., Kiirats, O., Edwards, G.E. (2004) New fluorescence parameters for the determination of  $Q_A$  redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth. Res.* 79, 209–218.

14. Ishida, S., Morita K., Kishine, M., Takabayashi, A., Murakami, R., Takeda, S., Shimamoto, K., Sato, F., Endo, T. (2011) Allocation of absorbed light energy in PSII to thermal dissipations in the presence or absence of PsbS subunits of rice. *Plant Cell Physiol.* 52, 1822–1831.
15. Quick, W.P., Stitt, M. (1989) An examination of factors contributing to non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 977, 287–296.
16. Li, X.P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A.R., Rosenquist, M., Jansson, S., Niyogi, K.K. (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403, 391–395.
17. Niyogi, K.K., Grossman A.R., Björkman, O. (1998) Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* 10, 1121–1134.
18. Baker, N.R. (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 89–113.
19. Kramer, D.M., Johnson, G., Kiirats, O., Edwards, G.E. (2004) New fluorescence parameters for the determination of  $Q_A$  redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth. Res.* 79, 209–218.
20. Hendrickson, L., Furbank, R.T., Chow, W.S. (2004) A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.* 82, 73–81.
21. Laisk, A., Oja, V., Rasulov, B., Eichelmann, H., Sumberg, A. (1997) Quantum yields and rate constants of photochemical and nonphotochemical excitation quenching. *Plant Physiol.* 115, 803–815.
22. Oxborough, K., Baker, N.R. (1997) Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components-calculation of  $qP$  and  $F_v'/F_m'$  without measuring  $F_o'$ . *Photosynth. Res.* 54, 135–142.
23. Miyake, C., Amako, K., Shiraiishi, N., Sugimoto, T. (2009) Acclimation of tobacco leaves to high light intensity drives the plastoquinone oxidation system (POS)-relationship among the fraction of open PSII centers ( $q_L$ ), non-photochemical quenching (NPQ) of Chl fluorescence and the maximum quantum yield of PSII in the dark ( $F_v/F_m$ ). *Plant Cell Physiol.* 50, 730–743.
24. Sonoike, K. (1999) The different roles of chilling temperatures in the photoinhibition of photosystem I and photosystem II. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* 48, 136–141.
25. Kagawa, T., Sakai, T., Suetsugu, N., Oikawa, K., Ishiguro, S., Kato, T., Tabata, S., Okada, K., Wada, M. (2001) Arabidopsis NPL1: A phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* 291, 2138–2141.
26. Oikawa, K., Kasahara, M., Kiyosue, T., Kagawa, T., Suetsugu, N., Takahashi, F., Kanegae, T., Niwa, Y., Kadota, A., Wada, M. (2003) CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING1 is essential for proper chloroplast positioning. *Plant Cell* 15, 2805–2815.
27. Brugnoli, E., Björkman, O. (1992) Chloroplast movements in leaves: Influence on chlorophyll fluorescence and measurements of light-induced absorbance changes related to  $\Delta pH$  and zeaxanthin formation. *Photosynth. Res.* 32, 23–35.
28. Cazzaniga, S., Dall'Osto, L., Kong, S.G., Wada, M., Bassi, R. (2013) Interaction between avoidance of photon absorption, excess energy dissipation and zeaxanthin synthesis against photooxidative stress in Arabidopsis. *Plant J.* 76, 568–579.
29. Mishra, A., Heyer, A.G., Mishra, K.B. (2014) Chlorophyll fluorescence emission can screen cold tolerance of cold acclimated Arabidopsis thaliana accessions. *Plant Methods* 10, 38.
30. Rousseau, C., Belin, E., Bove, E., Rousseau, D., Fabre, F., Berruyer, R., Guillaumès, J., Manceau, C., Jacques, M.A., Boureau, T. (2013) High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. *Plant Methods* 9, 17.
31. Thalhammer, A., Hinch, D.K., Zuther, E. (2014) Measuring freezing tolerance: electrolyte leakage

- and chlorophyll fluorescence assays. *Methods Mol. Biol.* 1166, 15–24.
32. Schmidt, S.B., Pedas, P., Laursen, K.H., Schjoerring, J.K., Husted, S. (2013) Latent manganese deficiency in barley can be diagnosed and remediated on the basis of chlorophyll *a* fluorescence measurements. *Plant Soil* 372, 417–429.
33. Ishida, S., Uebayashi, N., Tazoe, Y., Ikeuchi, M., Homma, K., Sato, F., Endo, T. (2014) Diurnal and developmental changes in energy allocation of absorbed light as PSII in field-grown rice. *Plant Cell Physiol.* 55, 171–182.
34. Wu, X., Bao, W. (2011) Leaf growth, gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in response to different water deficits in wheat cultivars. *Plant Prod. Sci.* 14, 254–259.
35. Takahara, K., Kasajima, I., Takahashi, H., Hashida, S., Itami, T., Onodera, H., Toki, S., Yanagisawa, S., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H. (2010) Metabolome and photochemical analysis of rice plants overexpressing Arabidopsis NAD kinase gene. *Plant Physiol.* 152, 1863–1873.
36. Takai, T., Adachi, S., Taguchi-Shiobara, F., Sanoh-Arai, Y., Iwasawa, N., Yoshinaga, S., Hirose, S., Taniguchi, Y., Yamanouchi, U., Wu, J., Matsumoto, T., Sugimoto, K., Kondo, K., Ikka, T., Ando, T., Kono, I., Ito, S., Shomura, A., Ookawa, T., Hirasawa, T., Yano, M., Kondo, M., Yamamoto, T. (2013) A natural variant of *NAL1*, selected in high-yield rice breeding programs, pleiotropically increases photosynthesis rate. *Sci. Rep.* 3, 2149.
37. Kasajima, I., Ebana, K., Yamamoto, T., Takahara, K., Yano, M., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H. (2011) Molecular distinction in genetic regulation of nonphotochemical quenching in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108, 13835–13840.
38. Nuruzzaman, M., Kanno, T., Amada, R., Habu, Y., Kasajima, I., Ishikawa, T., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H. (2014) Does the upstream region possessing MULE-like sequence in rice upregulate *PsbSI* gene expression? *PLOS ONE* 9, e102742.
39. 笠島一郎 (2012) イネにおける光防御の遺伝学的制御機構, *化学と生物* 12, 702-704.
40. Ikeuchi, M., Uebayashi, N., Sato, F., Endo, T. (2014) Physiological functions of PsbS-dependent and PsbS-independent NPQ under naturally fluctuating light conditions. *Plant Cell Physiol.* 55, 1286–1295.
41. 西山佳孝 (2013) 序文, *光合成研究* 23, 49

## Basal Dissipation, Photochemistry and Non-Photochemical Quenching

Ichiro Kasajima\*

NARO Institute of Floricultural Science (NIFS), National Agricultural and Food Research Organization (NARO)



## 研究紹介

シアノバクテリアの光合成における酸素利用<sup>§</sup>

神戸大学 大学院農学研究科 生命機能科学専攻

嶋川 銀河\*

Flavodiiron タンパク (FLV) はシアノバクテリアに広く存在するフラビントタンパクであり、光合成の電子伝達制御に関与している。シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 は4つのFLVを持っており、FLV1とFLV3がPSIにおけるO<sub>2</sub>の光還元を触媒する事が知られている一方、FLV2とFLV4の詳細な機能は明らかになっていなかった。本研究では、このFLV2/4が低CO<sub>2</sub>下において誘導され、O<sub>2</sub>依存的な代替的電子伝達を駆動させる事でO<sub>2</sub>傷害を防いでいる事を明らかにした。ここでは私たちの研究成果を先行研究から得られる知見と織り交ぜて紹介する。

## 1. はじめに

酸素発生型光合成はその反応の進行にO<sub>2</sub>傷害の危険を伴う。光合成は化学エネルギーを生成する電子伝達系と化学エネルギーを消費するカルビン回路といった二つの反応系のバランスから成り立っているが、例えばカルビン回路の活性が低下して電子伝達が滞ってしまった場合、電子伝達系に蓄積した過剰電子は近傍に存在するO<sub>2</sub>に渡って活性酸素が生成する。生成した活性酸素は非常に酸化作用が強くPSIIやPSIの光阻害など様々な酸化傷害を引き起こしてしまう。大気組成の約20%がO<sub>2</sub>である現代と比べて、今から約30億年前の大気中のO<sub>2</sub>は極低濃度であったと推定されるが、それでも当時地球上で初めて酸素発生型光合成を行ったシアノバクテリア (ラン藻) は酸素発生型光合成が孕むO<sub>2</sub>傷害の危険に対していくつかの防御策を講じておく必要があった<sup>1)</sup>。その一つが、光合成電子伝達系に過剰蓄積した電子を安全な形でO<sub>2</sub>へと流すことによって活性酸素生成を防ぐ、O<sub>2</sub>依存的な代替的電子伝達反応 (Alternative electron flow, AEF) と呼ばれる機構である。

2. シアノバクテリアにおけるO<sub>2</sub>依存的 AEF

これまでの研究からシアノバクテリアではO<sub>2</sub>依存

的 AEF として3つの機構が報告されている<sup>2)</sup>。

1 つめは Flavodiiron タンパク 1/3 ヘテロダイマー (FLV1/3) であり、これは PSI において O<sub>2</sub> の 4 電子還元を触媒することで光合成誘導期や変動光環境下において電子伝達系の過剰電子の散逸に寄与していると考えられている<sup>3,4,5)</sup>。

2 つめは呼吸系末端酸化酵素 (Respiratory terminal oxidases, RTOs) でありシトクロムオキシダーゼやキノールオキシダーゼが知られている<sup>6,7)</sup>。これらは呼吸電子伝達系において O<sub>2</sub> の 4 電子還元に関与する酵素であるが、シアノバクテリアでは同一チラコイド膜上で光合成系と呼吸系の電子伝達鎖がシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体とプラストキノンとを共有しているため、光合成電子伝達系に過剰蓄積した電子が呼吸電子伝達系の RTOs へ流出して O<sub>2</sub> 還元に使われる事により光阻害が緩和されると考えられている<sup>6,7)</sup>。

3 つめに広義の O<sub>2</sub> 依存的 AEF として光呼吸が挙げられる。低 CO<sub>2</sub> 条件においてリブロース 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco) は O<sub>2</sub> と反応して 2-ホスホグリコール酸を生成する。この化合物を 3-ホスホグリセリン酸へ代謝する機構が光呼吸であるが、この過程では電子伝達系で生じる NADPH や ATP といった化学エネルギーが消費されるため、結果的に過剰電子の散逸に役立つと考えられる。シアノバクテリアは細胞内に独自の CO<sub>2</sub> 濃縮機構を備えているため<sup>8)</sup>、Rubisco 周辺の CO<sub>2</sub> 濃度が高く維持されており、光呼吸を行わないと考えられてきたが、近年の研

<sup>§</sup> 第 5 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: gshimakawa@stu.kobe-u.ac.jp

究からは低 CO<sub>2</sub> 条件下においてシアノバクテリアが光呼吸代謝を行い、またそれが O<sub>2</sub> 依存的 AEF として機能することが示唆されている<sup>9, 10</sup>。

しかしながら、これら報告されている O<sub>2</sub> 依存的 AEF について、生理レベルにおける定量的な活性評価はまだあまり行われていない。

### 3. 低 CO<sub>2</sub> 下で誘導される O<sub>2</sub> 依存的 AEF の発見

私たちはシアノバクテリアの持つ O<sub>2</sub> 依存的 AEF の活性を評価するために O<sub>2</sub> 発生およびクロロフィル蛍光の同時測定を行った<sup>11</sup>。高 CO<sub>2</sub> 下で生育させたシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (S. 7942) に光を照射し続けると、しばらくして反応溶液中の CO<sub>2</sub> が使い尽くされ、O<sub>2</sub> 発生と PSII の実効量子収率を示す Y(II) が低下する (図 1)。この測定系では酸素電極の反応容器を開放状態にしてスターラーで溶液を撹拌しているため、ここでの光合成は CO<sub>2</sub> の空気中から反応溶液中への拡散に律速されていると考えられる。また、私たちは一時的 (1~3 分間) に蓋を閉めて反応容器を密閉状態にする事でシアノバクテリア生細胞の O<sub>2</sub> 発生速度を測定できるが、低 CO<sub>2</sub> 下への移行によって S. 7942 の O<sub>2</sub> 発生速度が 10 分の 1 以下にまで低下している事がわかった (図 1)。この生理現象は 1996 年に Miller らによっても報告されており、S. 7942 では低 CO<sub>2</sub> 下への移行に伴って光合成が抑制される事で電子伝達系に過剰な電子が蓄積してしまう事を示している<sup>13</sup>。

一方、別の種類のシアノバクテリアである *Synechocystis* sp. PCC 6803 (S. 6803) では同様の測定系において S. 7942 とは全く異なる表現型がみられた。高 CO<sub>2</sub> 条件下で生育させた S. 6803 では低 CO<sub>2</sub> 下への移行に伴って O<sub>2</sub> 発生と Y(II) が急激に低下した後、O<sub>2</sub> 発生速度が低いまま Y(II) が徐々に回復した (図 2)。これは低 CO<sub>2</sub> 下において S. 6803 で O<sub>2</sub> 依存的 AEF が駆動している事、またそれが S. 7942 においては機能していない事を示している。さらに注目すべきはその電子伝達活性であり、O<sub>2</sub> 発生速度が 10 分の 1 以下に低下しているにもかかわらず Y(II) が CO<sub>2</sub> 十分条件と比較して 80% 以上に維持されている事から、ここでの O<sub>2</sub> 依存的 AEF は光合成におよそ匹敵する程の速度で駆動していると考えられた (図 2)。私たちは S. 6803 にと

ってこの O<sub>2</sub> 依存的 AEF が低 CO<sub>2</sub> 下で O<sub>2</sub> 傷害を防ぐのに必要不可欠な機構であると考え、一昨年末に *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* に報告した<sup>11</sup>。また昨年末にこれと同様の生理現象が NADPH 蛍光の挙動など新たな知見を含んだ形で Holland らによって *Biochimica et Biophysica Acta* に報告されている<sup>14</sup>。

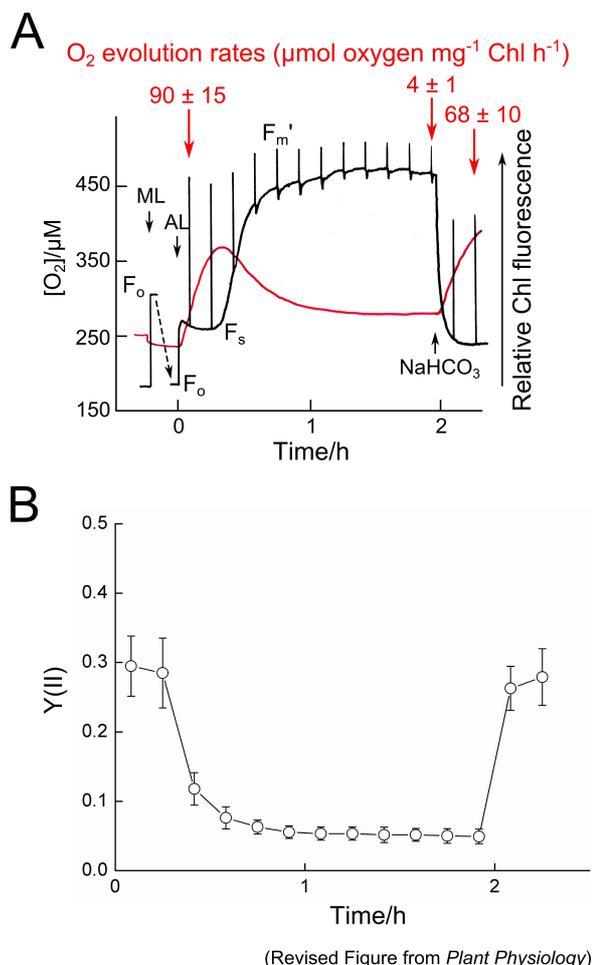


図 1 S. 7942 における低 CO<sub>2</sub> 環境への応答

(A) クロロフィル蛍光 (黒線) および反応溶液中の [O<sub>2</sub>] (赤線) の経時変化。赤矢印で示した箇所において一時的に反応系を密閉する事で O<sub>2</sub> 発生速度を測定している。(B) パルス照射を行った各点における Y(II)。(Shimakawa et al., 2015<sup>12</sup>)を改訂)測定装置で測定。

### 4. S. 6803 における O<sub>2</sub> 依存的 AEF の実体解明

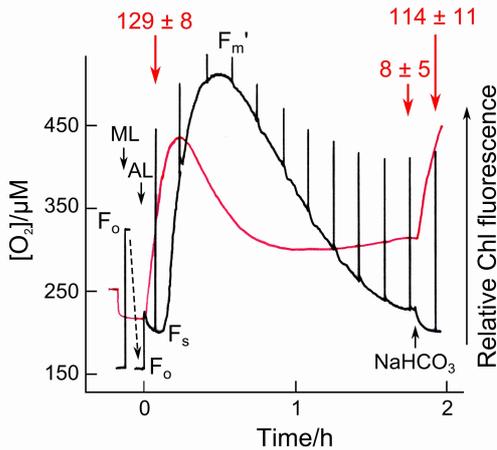
私たちは S. 6803 において見出された O<sub>2</sub> 依存的 AEF の分子メカニズムを解明するために、先行研究で報告されていた FLV1/3 および光呼吸代謝関連酵素 (ホスホグリコール酸ホスファターゼ、グリコール酸デヒドロゲナーゼ、グリシンデカルボキシラーゼ、グリセリ

ン酸キナーゼ) について欠損株を作成し、それら変異体の低 CO<sub>2</sub> 応答を調べたが、これら全ての変異体で野生株と同様に O<sub>2</sub> 依存的 AEF の誘導が確認された<sup>11,12)</sup>。また、私たちはこの O<sub>2</sub> 依存的 AEF の O<sub>2</sub> に対する親和性を調べたが、その K<sub>m</sub> が 30~50 μM であった事から<sup>11)</sup>、RTOs (O<sub>2</sub> に対する K<sub>m</sub> が約 0.1~1 μM<sup>6)</sup>) も光呼吸や FLV1/3 同様にこの O<sub>2</sub> 依存的 AEF に関与していないと考えられ、私たちは低 CO<sub>2</sub> 下で S. 6803 にみられる AEF の分子の実体がこれまで報告されていない新規の O<sub>2</sub> 依存的 AEF 経路であると結論づけた。

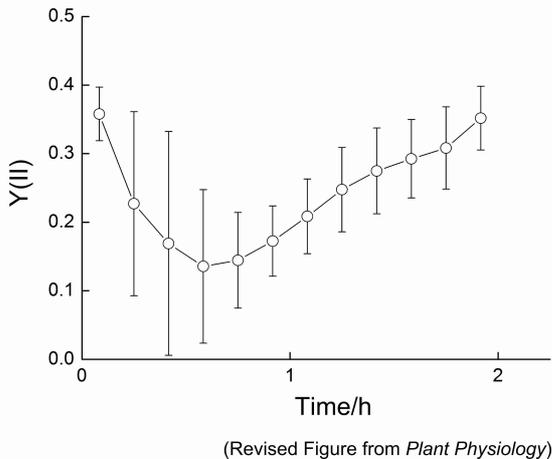
シアノバクテリア S. 6803 は FLV1/3 と非常に相同性の高いタンパクとして FLV2 と FLV4 を持っている。先行研究から FLV2 と FLV4 はヘテロダイマー (FLV2/4) を形成し、PSII において光防御に関与していると報告されていたが<sup>15)</sup>、この FLV2/4 は FLV1/3 と異

なり O<sub>2</sub> とは無関係なエネルギー散逸機構とされてきた<sup>15)</sup>。しかしながら、私たちは、1) *flv2/4* 遺伝子の発現が低 CO<sub>2</sub> 条件への移行で速やかに促進されること<sup>16)</sup>、2) S. 7942 が *flv2/4* 遺伝子を持っていないことに着目し、*flv2* および *flv4* の欠損株を作成して低 CO<sub>2</sub> 応答を調べた。結果、これらの変異株では O<sub>2</sub> 依存的 AEF の誘導がみられなかった事から (図 3)、S. 6803 において低 CO<sub>2</sub> 下で誘導される O<sub>2</sub> 依存的 AEF の実体が FLV2/4 である事がわかり、私たちはこの結果を昨年末 *Plant Physiology* に報告した<sup>12)</sup>。図 4 に、本研究で明らかにした S. 6803 における低 CO<sub>2</sub> 下での O<sub>2</sub> 依存的 AEF の誘導メカニズムを示す。先行研究において FLV2/4 は PSII に存在すると提唱されているが<sup>15)</sup>、本研究では電子伝達系における FLV2/4 への電子伝達部位を同定する事はできなかった。

**A** O<sub>2</sub> evolution rates (μmol oxygen mg<sup>-1</sup> Chl h<sup>-1</sup>)



**B**

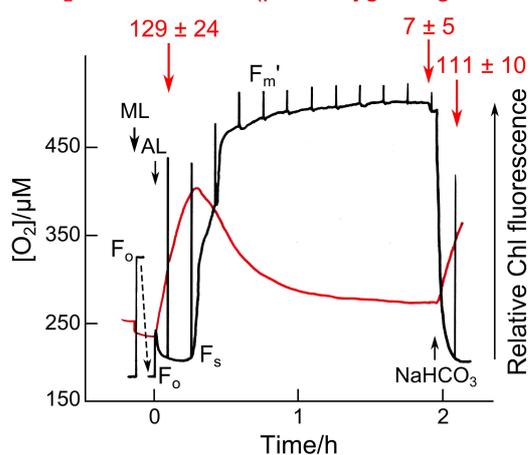


**5. 今後の展望**

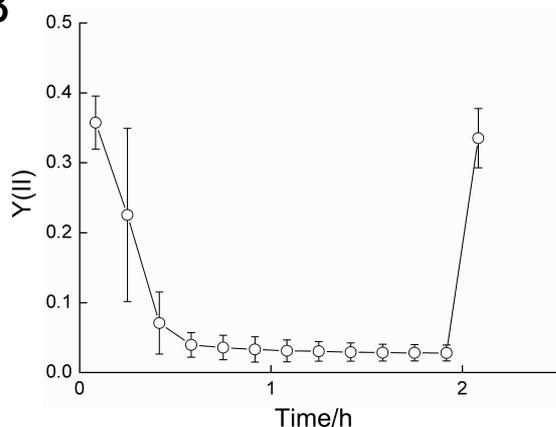
本研究で残された最も大きな課題はシアノバクテリア FLV の詳細な反応機構の解明である。先ほど述べたようにシアノバクテリア S. 6803 では CO<sub>2</sub> 十分条件から低 CO<sub>2</sub> 下への移行に伴って O<sub>2</sub> 発生速度が顕著に低下したにもかかわらず Y(II) は 80% ほど維持されていた (図 2)。同じ測定系の低 CO<sub>2</sub> 下において、*flv4* 欠損株が O<sub>2</sub> 発生速度と同程度の Y(II) 減少を示したことから、S. 6803 野生株で低 CO<sub>2</sub> 下に維持されている Y(II) は FLV2/4 によるものだと考えられるため、 $129 \times 0.8 - 8 = \text{約 } 95 \mu\text{mol O}_2 (\text{mg Chl})^{-1} \text{ h}^{-1}$  の速度で FLV2/4 による O<sub>2</sub> の光還元が生じていると見積もられる。一方、私たちが大腸菌で発現させた GST 融合 FLV4 の精製タンパクは NADH を基質として O<sub>2</sub> の 4 電子還元活性を示したが、その k<sub>cat</sub> はおよそ 20 min<sup>-1</sup> であった<sup>12)</sup>。S. 6803 生体内で FLV2/4 がこの k<sub>cat</sub> で働く場合、可溶性タンパクの半分以上が FLV2/4 でなければ成り立たない。このような *in vivo* における O<sub>2</sub> の光還元速度と *in vitro* における精製タンパクの NAD(P)H 依存的 O<sub>2</sub> 還元速度との矛盾は FLV1/3 においても同様にみられる<sup>3,4)</sup>。FLV はシアノバクテリアの他に嫌気性細菌などで多く見られ、これらの細菌が持つ FLV は有害な O<sub>2</sub> の消去に働いていると考えられているが、その精製タンパクは O<sub>2</sub> 還元反応に 2000~3000 min<sup>-1</sup> もの k<sub>cat</sub> を示す<sup>17,18)</sup>。

図 2 S. 6803 における低 CO<sub>2</sub> 環境への応答  
表記は図 1 と同様。(Shimakawa et al., 2015<sup>12)</sup>を改訂)

**A** O<sub>2</sub> evolution rates (μmol oxygen mg<sup>-1</sup> Chl h<sup>-1</sup>)



**B**



(Revised Figure from *Plant Physiology*)

図3 *flv4* 欠損株における低 CO<sub>2</sub> 環境への応答

表記は図1と同様。(Shimakawa et al., 2015<sup>(12)</sup>)を改訂

シアノバクテリア FLV の詳細な反応機構については電子伝達系におけるエレクトロドナーの同定を初めとして今後研究を進めていく必要があるだろう。

また、もう一つの課題として S. 7942 など FLV2/4 を持たないシアノバクテリアにおいて低 CO<sub>2</sub> 条件下で働く O<sub>2</sub> 傷害防御機構を解明する必要がある。図1より S. 7942 は低 CO<sub>2</sub> 条件下で光合成電子伝達系に過剰な電子が蓄積し、O<sub>2</sub> 傷害の危険にさらされていると考えられるが、実際に実験室において S. 7942 は低 CO<sub>2</sub> 条件下でも良好に生育する。そのため S. 7942 では低 CO<sub>2</sub> 下で FLV2/4 とは異なる O<sub>2</sub> 傷害の防御機構が働いていると考えられる。

本研究で得られた結果は、まさしく酸素発生型光合成のご先祖さまであるシアノバクテリアが、光合成電子伝達に潜む O<sub>2</sub> 傷害の危険を、O<sub>2</sub> を利用する形で克服する戦略を取っていた事を示している (図4)。しかしながら面白い事に、高等植物は FLV のアナログを持っていない<sup>16)</sup>。なぜ高等植物は FLV を捨てたのか。また、高等植物において FLV に代わって O<sub>2</sub> 傷害の防御機構として主要に働いているのは何か。進化的にシアノバクテリアと高等植物との間に位置すると考えられる緑藻やコケ、シダ植物などの O<sub>2</sub> 傷害防御機構を解明する事によって、酸素発生型光合成の誕生から今に至るまでに光合成生物がどのような戦略で O<sub>2</sub> を利用してきたのかが解明されると期待する。

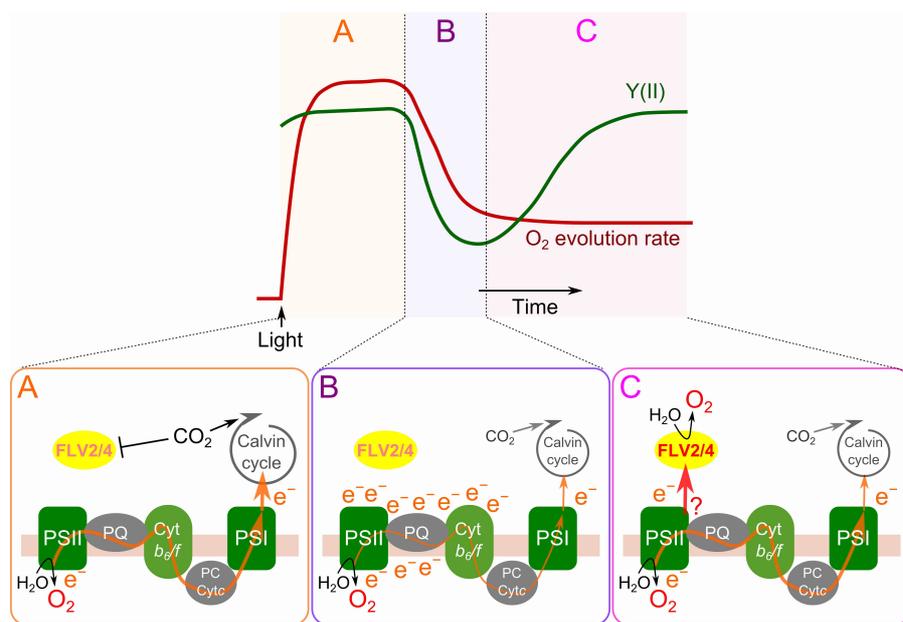


図4 S. 6803 における低 CO<sub>2</sub> 下での FLV2/4 の誘導と O<sub>2</sub> 依存的 AEF の発現

高 CO<sub>2</sub> 条件下で生育させた S. 6803 において CO<sub>2</sub> が十分量存在する時は光合成が駆動しているが (A) 細胞中の CO<sub>2</sub> が使い尽くされると光合成活性が低下し (B) FLV2/4 が誘導され O<sub>2</sub> 依存的 AEF が駆動する (C)。

## 謝辞

本研究をまとめるにあたって、ご指導をいただいた神戸大学大学院農学研究科 三宅親弘 准教授、S. 6803 における O<sub>2</sub> 依存的 AEF 活性を見出された林良祐さんに深く感謝の意を表す。また、執筆の場を与えてくださった日本光合成学会および編集委員の皆さまに対して心からお礼申し上げます。

Received February 9, 2015; Accepted February 24, 2015

## 参考文献

1. 浅田 浩二 (2009) シアノバクテリアの酸素適応と活性酸素適応. 光合成研究 19, 75–80.
2. Mullineaux, C.W. (2014) Electron transport and light-harvesting switches in cyanobacteria. *Front. Plant Sci.* 5, 7.
3. Helman, Y., Tchernov, D., Reinhold, L., Shibata, M., Ogawa, T., Schwarz, R., Ohad, I. and Kaplan, A. (2003) Genes encoding A-type flavoproteins are essential for photoreduction of O<sub>2</sub> in cyanobacteria. *Curr. Biol.* 13, 230–235.
4. Vicente, J.B., Gomes, C.M., Wasserfallen, A. and Teixeira, M. (2002) Module fusion in an A-type flavoprotein from the cyanobacterium *Synechocystis* condenses a multiple-component pathway in a single polypeptide chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 82–87.
5. Allahverdiyeva, Y., Mustila, H., Ermakova, M., Bersanini, L., Richaud, P., Ajlani, G., Battchikova, N., Cournac, L. and Aro, E.M. (2013) Flavodiiron proteins Flv1 and Flv3 enable cyanobacterial growth and photosynthesis under fluctuating light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 4111–4116.
6. Pils, D. and Schmetterer, G. (2001) Characterization of three bioenergetically active respiratory terminal oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 203, 217–222.
7. Lea-Smith, D.J., Ross, N., Zori, M., Bendall, D.S., Dennis, J.S., Scott, S.A., Smith, A.G. and Howe, C.J. (2013) Thylakoid terminal oxidases are essential for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to survive rapidly changing light intensities. *Plant Physiol.* 162, 484–495.
8. Badger, M.R. and Price, G.D. (1992) The CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in cyanobacteria and microalgae. *Physiol. Plant.* 84, 606–615.
9. Eisenhut, M., Ruth, W., Haimovich, M., Bauwe, H., Kaplan, A. and Hagemann, M. (2008) The photorespiratory glycolate metabolism is essential for cyanobacteria and might have been conveyed endosymbiotically to plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 17199–17204.
10. Allahverdiyeva, Y., Ermakova, M., Eisenhut, M., Zhang, P., Richaud, P., Hagemann, M., Cournac, L. and Aro, E.M. (2011) Interplay between flavodiiron proteins and photorespiration in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* 286, 24007–24014.
11. Hayashi, R., Shimakawa, G., Shaku, K., Shimizu, S., Akimoto, S., Yamamoto, H., Amako, K., Sugimoto, T., Tamoi, M., Makino, A. and Miyake, C. (2014) O<sub>2</sub>-dependent large electron flow functioned as an electron sink, replacing the steady-state electron flux in photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, but not in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 384–393.
12. Shimakawa, G., Shaku, K., Nishi, A., Hayashi, R., Yamamoto, H., Sakamoto, K., Makino, A. and Miyake, C. (2015) FLAVODIIRON2 and FLAVODIIRON4 proteins mediate an O<sub>2</sub>-dependent alternative electron flow in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under CO<sub>2</sub>-limited conditions. *Plant Physiol.* 167, 472–480.
13. Miller, A.G., Espie, G.S. and Bruce, D. (1996) Characterization of the non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence that occurs during the active accumulation of inorganic carbon in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Photosynth. Res.* 49, 251–262.
14. Holland, S.C., Kappell, A.D. and Burnap, R.L. (2015) Redox changes accompanying inorganic carbon limitation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1847, 355–363.

15. Zhang, P., Eisenhut, M., Brandt, A.M., Carmel, D., Silén, H.M., Vass, I., Allahverdiyeva, Y., Salminen, T.A. and Aro, E.M. (2012) Operon *flv4-flv2* provides cyanobacterial photosystem II with flexibility of electron transfer. *Plant Cell* 24, 1952–1971.
16. Zhang, P., Allahverdiyeva, Y., Eisenhut, M. and Aro, E.M. (2009) Flavodiiron proteins in oxygenic photosynthetic organisms: photoprotection of photosystem II by Flv2 and Flv4 in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One* 4, e5331.
17. Rodrigues, R., Vicente, J.B., Félix, R., Oliveira, S., Teixeira, M. and Rodrigues-Pousada, C. (2006) *Desulfovibrio gigas* flavodiiron protein affords protection against nitrosative stress *in vivo*. *J. Bacteriol.* 188, 2745–2751.
18. Di Matteo, A., Scandurra, F.M., Testa, F., Forte, E., Sarti, P., Brunori, M. and Giuffrè, A. (2008) The O<sub>2</sub>-scavenging flavodiiron protein in the human parasite *Giardia intestinalis*. *J. Biol. Chem.* 283, 4061–4068.

## O<sub>2</sub>-Dependent Alternative Electron Flow in Cyanobacteria

Ginga Shimakawa\*

Department of Biological and Environmental Science, Faculty of Agriculture, Graduate School of Agricultural Science, Kobe University

## 研究紹介

PsbA3-D1 タンパク質を発現する光化学系 II 複合体の結晶構造<sup>§</sup><sup>1</sup>岡山大学 大学院自然科学研究科 光合成研究センター<sup>2</sup>愛媛大学 プロテオサイエンスセンター<sup>3</sup>東京大学 大学院総合文化研究科鶴飼 奈津美<sup>1,\*</sup> 菅 倫寛<sup>1</sup> 杉浦 美羽<sup>2</sup> 岩井 雅子<sup>3</sup> 池内 昌彦<sup>3</sup> 沈 建仁<sup>1</sup>

好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* (*T. elongatus*)の Photosystem II (PSII)では D1 サブユニットを発現する遺伝子が 3 つ存在し、その発現は生育環境によって調節されている。通常の生育条件下では *psbA1* が発現されるが、強光条件下では主に *psbA3* が発現されることが分かっている。それぞれのタンパク質 PsbA1 と PsbA3 では計 21 個のアミノ酸が異なり、PSII の機能が僅かに異なっている。これまで PsbA1-PSII の構造は解明されたが、PsbA3-PSII の構造は未知である。本研究では PsbA3-PSII の構造を明らかにし、立体構造に基づいて PsbA3-PSII の機能を理解することを目的とした。遺伝子操作により作製された *psbA3* のみを発現する細胞から PsbA3-PSII 二量体を単離・精製・結晶化し、構造解析した。得られた PsbA3-PSII の構造をこれまで報告されている PsbA1-PSII の構造と比較した結果、 $Q_B$  やフェオフィチンの近傍で構造の差異が確認され、これまで報告された両者の機能的相違の一部を説明することができた。

## 1. はじめに

シアノバクテリアから高等植物までの酸素発生型光合成生物では、太陽の光エネルギーを生物に利用可能な化学エネルギーに変換すると同時に、水を分解し分子状酸素を放出している。水分解・酸素発生反応はチラコイド膜上に存在する光化学系 II 複合体 (Photosystem II、PSII)によって触媒されている。PSII のタンパク質組成は生物種によってわずかな違いがあるが、シアノバクテリアでは、17 個の膜貫通サブユニットと 3 個の膜表在性サブユニットを含み、単量体の分子量が 350 kDa にも及んでいる。PSII において、反応中心クロロフィルである  $P_{680}$  が光エネルギーによって励起され、励起された電子はフェオフィチン (Pheo)、プラストキノン  $Q_A$ 、プラストキノン  $Q_B$  へ渡されることになる。一方、酸化された  $P_{680}$  は近傍のチロシン残基  $Y_Z$  (D1-Tyr161)を経由して水から電子を引

き抜き、水をプロトンと分子状酸素に分解するようになる。PSII においてこれらの電子伝達成分を結合しているのが反応中心タンパク質と呼ばれる D1・D2 タンパク質であり、そのうちの D1 タンパク質は *psbA* 遺伝子にコードされている。シアノバクテリアでは *psbA* 遺伝子は複数種存在しており、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* (*T. elongatus*)では *psbA1*、*psbA2*、*psbA3* の 3 種があり、これらの遺伝子の発現は生育環境条件によって制御されている。通常の光条件下では主に *psbA1* が発現し他の *psbA* 遺伝子はほとんど発現していないが、強光もしくは紫外光条件下では *psbA1* 遺伝子の発現が抑制されて *psbA3* が主に発現されることが知られている<sup>1-4)</sup>。*psbA1* 遺伝子と *psbA3* 遺伝子にコードされる D1 タンパク質同士では 344 アミノ酸中 21 アミノ酸が異なっており、その結果、それぞれの D1 タンパク質を含む PSII である、PsbA1-PSII、PsbA3-PSII も異なる性質を持つことが報告されている。PsbA3-PSII は PsbA1-PSII と比べると僅かに酸素発生活性が高く<sup>5)</sup>、Pheo と  $Q_A$  の酸化還元電

<sup>§</sup> 第 5 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: sc422401@s.okayama-u.ac.jp

位がそれぞれ 17 mV、41 mV 高い<sup>6-9)</sup>。PsbA3-PSII と PsbA1-PSII との間で異なっているアミノ酸のいくつかはこれら電子伝達成分の近傍に存在しているため、これらアミノ酸の違いが2つのPSII間の差異の原因となっているのではないかと考えられている。しかしこれまで立体構造が明らかにされているのは通常条件下で培養された *Thermosynechococcus vulcanus* 株由来の PSII、すなわち PsbA1-PSII であり<sup>10)</sup>、PsbA3-PSII の結晶構造は未知である。このため、PsbA3-PSII の構造・機能研究はあくまで PsbA1-PSII の結晶構造に基づいた構造予測の域を出ず、PsbA3-PSII の構造情報が待ち望まれていた。そこで本研究では *psbA3* 遺伝子のみを発現する変異株から PsbA3-PSII を単離・精製し、結晶化・結晶構造解析を行い、得られた PsbA3-PSII の構造を PsbA1-PSII の構造と比較することで両者の構造的相違を明らかにし、アミノ酸の置換が機能へ及ぼす影響を明らかにして PSII の機能をより深く理解することを目的とした。

## 2. PsbA3-PSII の培養・精製・結晶化・X線結晶構造解析

高純度の PsbA3-PSII の結晶化試料を得るために遺伝子改変によって *psbA1*、*psbA2* 遺伝子を欠失させ、*psbA3* 遺伝子のみを発現する変異株を用いた。20 L スケールの *T. elongatus* 培養細胞から PsbA1-PSII とほぼ同様の方法を用いて最終的に約 5 mg Chl (50 mg 強の PSII タンパク質に相当) の PsbA3-PSII の二量体を得た。精製サンプルをクリアネーティブ電気泳動 (CN-PAGE) 法、SDS 電気泳動 (SDS-PAGE) 法を用いて分析したところ、これまでに良質な結晶が得られている PsbA1-PSII 二量体と同程度の純度であり、複合体を構成するサブユニットの欠落等も見られなかった。Oil Batch 法を用いて結晶化を行ったところ半日後には結晶が析出し、3日後には最大で 1000  $\mu\text{m}$   $\times$  100  $\mu\text{m}$   $\times$  50  $\mu\text{m}$  のサイズまで成長した (図 1)。

析出した結晶は低温回折実験に使用するため、結晶化溶液の組成に抗凍結剤として 20% の PEG3000 と 25% の DMSO を添加した溶液へ交換した。PSII 結晶は膜タンパク質の結晶であるため、非常に脆く急激な環境変化によって容易に劣化してしまうことが分かっていたので、凍結用溶液への置換操作は 10 以上のステップを経てゆっくり行った。抗凍結処理を施した結



図 1 PsbA3-PSII 二量体の結晶

Oil Batch 法で得られた PsbA3-PSII 二量体の結晶。結晶化後 3 日目に撮影したもの。

晶は窒素気流吹き付け冷却装置を用いて 100 K ですばやく凍結し、X 線回折実験まで液体窒素中に保管した。回折データは SPring-8 のビームライン BL41XU、BL44XU で収集した。得られた回折データを指数付け・積分・スケール合わせした後、PsbA1-PSII のモデルを用いた分子置換法によって初期位相を求め、精密化を行い最終的に 1.9 Å 分解能における PsbA3-PSII の構造を決定した。回折実験と結晶構造解析の統計値を表 1 に示す。

## 3. PsbA3-PSII の全体構造

決定した PsbA3-PSII の構造は PsbA1-PSII と非常に良く似ており、PSII 全体でのペプチド主鎖同士を比較した場合、温度因子の高い、各サブユニットの C 末端、N 末端部分を除けば、二乗平均平方根 (RMSD) は 0.21 Å で、その標準偏差は 0.19 Å であった。RMSD の値が 0.4 以上であるアミノ酸に注目すると PsbA3-Gly310 とその近隣の PsbE サブユニットと PsbV サブユニットの一部に集中して分布している。これは分子表面に存在する PsbA1-Lys310 が PsbA3-PSII では Gly310 へ変異したことにより、D1 タンパク質と PsbE、PsbV との相互作用の様式が変化したことによると考えられる。これらの結果から、PsbA3-PSII と PsbA1-PSII の間での 21 のアミノ酸の相違は D1 タンパク質の全体構造には殆ど影響を与えず、一部の膜外領域の相違がサブユニットの相対配置に影響を与えていることが言える。しかし、以下に述べるように電子伝達成分の近傍に存在する膜内領域のアミノ酸の相違により、それぞれの電子伝達成分の性質にも影響を与えることが明らかに

Data collection statistics	
Beamline	BL41XU,SPring-8,JAPAN
Wavelength(Å)	0.9000
Resolution(Å)	95.57-1.90 (2.01-1.90)
Measured reflection	4,275,972
Unique reflections	628,112
Rmerge(%)	8.6 (131.1)
<I>/<σ(I)>	15.81 (1.68)
Completeness(%)	99.60 (99.40)
Redundancy	6.80 (6.82)
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
unit cell(Å)	a=122.3, b=228.6, c=286.9
Structural refinement statistics	
R-free	0.1833
R-work	0.1540
R.m.s.d	
Bond (Å)	0.01
Angle (°)	1.441
Rmachandranplot	
Favored (%)	97.9
Allowed (%)	0.9
Outlier (%)	0.3

表1 PsbA3-PSII の X 線回折データと構造解析結果の統計値

なった。

#### 4. 電子伝達成分への影響

これまでの機能解析により PsbA1-PSI と比べて PsbA3-PSII では酸素発生活性が若干高く、電子伝達成分の Pheo と Q<sub>A</sub> の酸化還元電位がそれぞれ 17 mV、41 mV 高いことがわかっている。PsbA3-PSII と PsbA1-PSII の D1 タンパク質の構造を詳細に比較したところ、これら機能の差異を説明し得る構造的な違いが幾つか見つかった。

そのうちの 하나가二次電子受容体 Q<sub>B</sub> とその近傍に存在しているガラクト脂質のひとつである、スルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG)での構造変化である。この SQDG の周辺では PsbA1-S270、PsbA1-V281 がそれぞれ PsbA3-A270、PsbA3-I281 に変化している。PsbA1-Ser270 には水素結合した水分子があり、この水分子は 3.6 Å の平均距離 (A モノマー 3.5 Å、B モノマー 3.6 Å) で SQDG の頭部と相互作用しているが、S270A の変異により Ala270 と水分子との

水素結合が失われた。このため、PsbA3-Ala270 と SQDG との相互作用も失われることになるが、PsbA1-Ser270 と水素結合していた水分子は SQDG の頭部へ近寄り、3.2 Å (A モノマー 3.4 Å、B モノマー 3.0 Å) の平均距離で水素結合を形成し、SQDG の頭部を安定化させた。また、PsbA1-Val281 から PsbA3-Ile281 への変異により SQDG の炭化水素鎖が Q<sub>B</sub> のイソプレノイド鎖の方へ大きく押し出されるように構造変化し、SQDG と Q<sub>B</sub> の相互作用を強めさせた (図 2)。さらに、S270A 近傍に存在する Ser264 と Q<sub>B</sub> 頭部の水素結合距離は 2.7 Å (A モノマー 2.63 Å、B モノマー 2.7 Å) から 2.5 Å (A モノマー 2.5 Å、B モノマー 2.5 Å) へ短くなり、Q<sub>B</sub> の結合が PsbA3-PSII で安定化されたことが示唆された。Q<sub>B</sub> の温度因子に注目すると、Q<sub>B</sub> 分子全体の温度因子の平均は PsbA1-PSII では 72.7 Å<sup>2</sup> (A モノマー 68.6 Å<sup>2</sup>、B モノマー 76.8 Å<sup>2</sup>)、PsbA3-PSII では 75.2 Å<sup>2</sup> (A モノマー 70.2 Å<sup>2</sup>、B モノマー 80.2 Å<sup>2</sup>) であり、Q<sub>B</sub> 頭部のみの温度因子の平均は PsbA1-PSII では 75.2 Å<sup>2</sup> (A モノマー 69.2 Å<sup>2</sup>、B モノマー 81.3 Å<sup>2</sup>)、PsbA3-PSII では 66.4 Å<sup>2</sup> (A モノマー 64.9 Å<sup>2</sup>、B モノマー 67.8 Å<sup>2</sup>) であった。従って Q<sub>B</sub> 全体の温度因子は同程度であるが、Q<sub>B</sub> 頭部の温度因子は PsbA1-PSII よりも PsbA3-PSII の方が有意に低下しており、温度因子の比較においても Q<sub>B</sub> 頭部が安定化されたことが支持された。一方、酸化還元電位の違いが知られている Q<sub>A</sub> では顕著な構造変化が見られなかった。この結果の違いには 2 つの原因が考えられる。1 つは PsbA3-PSII の Q<sub>B</sub> 頭部の安定化が Q<sub>A</sub> に影響を及ぼし、Q<sub>A</sub> 頭部も安定化されるために酸化還元電位が PsbA1-PSII よりも 41 mV 上昇したためである。もう 1 つの可能性は、Q<sub>A</sub> とその配位子との結合距離に違いが生じ、Q<sub>A</sub> の安定性に影響を与えたためである。本構造解析において PsbA3-PSII の Q<sub>A</sub> と配位子の距離を PsbA1-PSII と比較すると 0.1 Å 程度の微細な変化は見られている。ただし、これらの違いが Q<sub>A</sub> の安定性の違いに寄与するか、それとも 1.9 Å の分解能による構造解析では誤差範囲になるかは判定できない。この点を明らかにするにはより精密な構造解析が必要である。

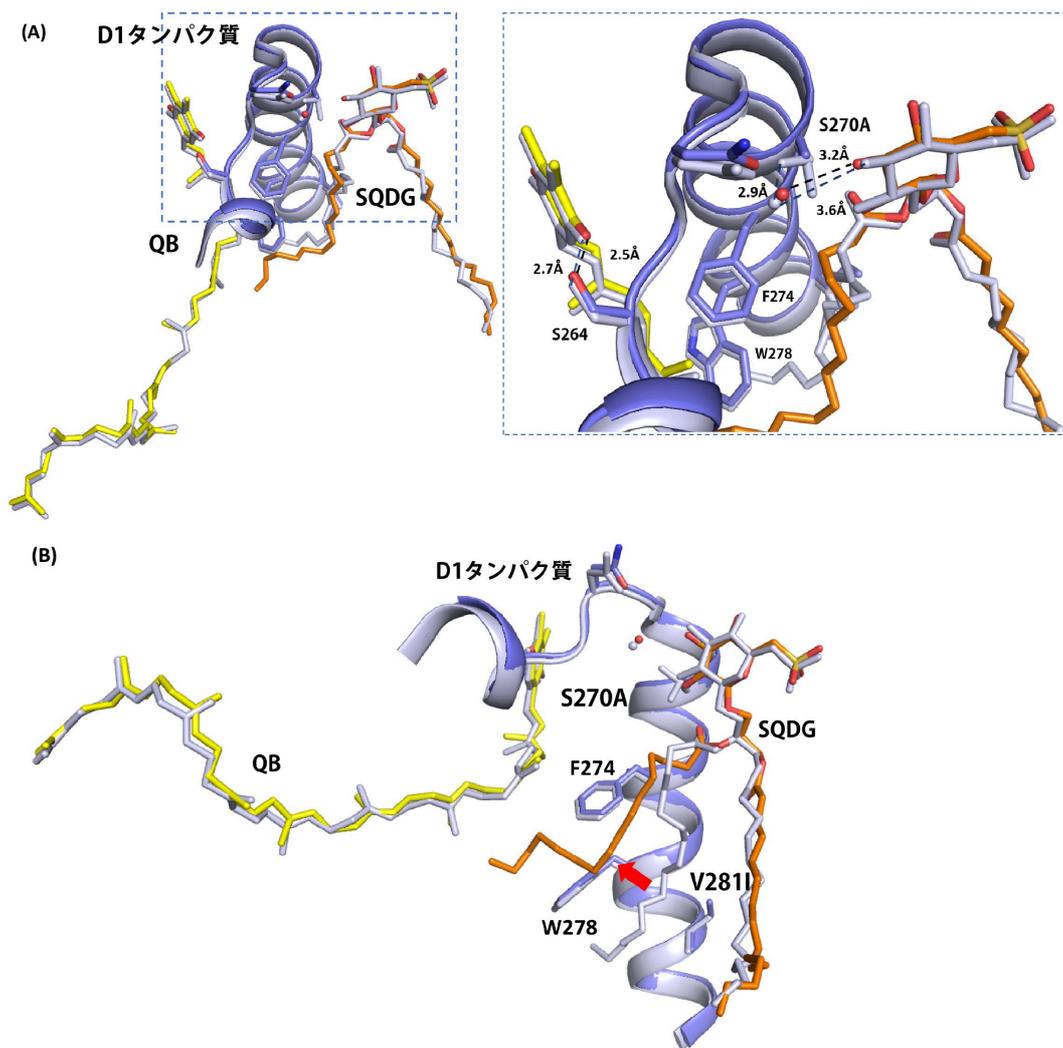


図 2  $Q_B$  及び SQDG 周辺の構造

電子伝達成分の  $Q_B$  とその近くに存在する SQDG の構造。(A) PsaA3-PSII の D1 タンパク質の N 末端から 4 番目の膜貫通ヘリックスを青紫色、 $Q_B$  を黄色、SQDG をオレンジ色、水分子を赤色で表した。PsaA3-PSII と PsaA1-PSII で配列が異なる、PsaA3-Ala270 (PsaA1-Ser270)、 $Q_B$  との水素結合の距離に変化が見られた Ser264 をスティック表示した。PsaA3-Ala270(PsaA1-Ser270)から SQDG、及び Ser264 と  $Q_B$  との水素結合の距離をÅ単位で示した。SQDG、 $Q_B$  近傍の疎水性アミノ酸である、Phe274、Trp278 をスティック表示した。構造比較のため PsaA3-PSII (今回解析した構造) と PsaA1-PSII (PDBID=3ARC) と重ね合わせて PsaA1-PSII を灰色で示した。(B)図 2A を D1 タンパク質の 4 番目の膜貫通ヘリックスに対して図 2A から水平方向に  $90^\circ$  回転させた。

Pheo は PSII において反応中心  $P_{680}$  から直接電子を受け取る電子受与体であり、これまで、Pheo の酸化還元電位が PsaA1-PSII に比べて PsaA3-PSII では 17 mV 増加することが報告されている<sup>6)</sup>。Pheo の周辺に位置する PsaA1- Gln130、PsaA3- Glu130 はそれぞれ Pheo の 13 ケト基と水素結合しているが、その結合距離に違いが見られた。PsaA1-PSII では結合距離は 2.9 Å であったが、PsaA3-PSII では 2.7 Å と 0.2 Å 短くなっており、PsaA3- Glu130 で Pheo への水素結合が強化されている (図 3)。一般に水素結合が 1 つ増加することによ

り酸化還元電位が 60-100 mV 程度増加することが報告されているので<sup>11)</sup>、PsaA3-PSII における Glu130 と Pheo の水素結合の安定化は Pheo の酸化還元電位の変化をよく説明している。

## 5. おわりに

これまで、PsaA3-PSII と PsaA1-PSII の機能に関する比較は行われてきたが、PsaA3-PSII の結晶構造が未知であったため、PsaA3-PSII の機能研究はあくまで PsaA1-PSII の結晶構造に基づいた構造予測の域を出な

かった。そこで本研究では *psbA3* 遺伝子のみを発現する変異株から PsbA3-PSII を単離・精製・結晶化・結晶構造解析し、得られた PsbA3-PSII の構造を PsbA1-PSII の構造と比較することで、両者のアミノ酸の置換が機能へ及ぼす影響を立体構造のレベルで明らかにした。

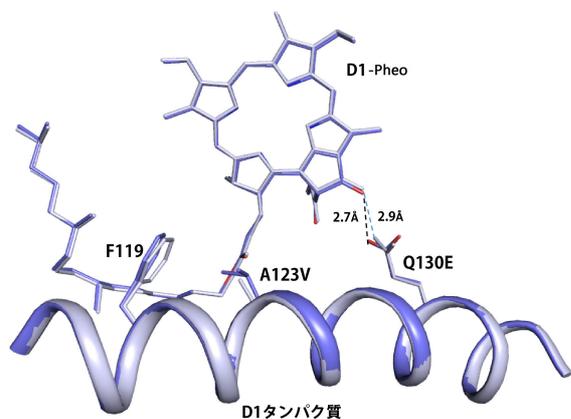


図 3 Pheo 周辺の構造

Pheo とその近くに存在する D1 タンパク質の 2 番目の膜貫通ヘリックスを示す。PsbA3-PSII、PsbA1-PSII を重ね合わせ、PsbA3-PSII を青紫色、PsbA1-PSII を灰色で表示した。PsbA3-PSII と PsbA1-PSII で配列が異なる、PsbA3-Glu130 (PsbA1-Gln130)、及び PsbA3-Val123 (PsbA1-Ala123)、Pheo との距離に変化が見られた Phe119 をスティック表示した。PsbA3-Glu130 (PsbA1-Gln130) から Pheo との水素結合の距離を Å 単位で示した。構造比較のため PsbA3-PSII (今回解析した構造) と PsbA1-PSII (PDBID=3ARC) と重ね合わせて PsbA1-PSII を灰色で示した。

立体構造の相違に基づき、これまでに蓄積された PsbA3-PSII と PsbA1-PSII の機能的相違をより詳細に理解できると期待される。

## 謝辞

本稿で紹介した研究において、PsbA3-PSII サンプルの精製・結晶化は岡山大学沈建仁研究室の秋田総理助教から多大な助力をいただいた。また、このような執筆の場を与えてくださった日本光合成学会および編集委員の皆様にお礼を申し上げる。

Received February 27, 2015; Accepted March 16, 2015

## 参考文献

1. Kos, P.B., Deak, Z., Cheregi, O. and Vass, I. (2008) Differential regulation of *psbA* and *psbD* gene

expression, and the role of the different D1 protein copies in the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 74–83.

2. Mulo, P., Sakurai, I. and Aro, E.-M. (2012) Strategies for *psbA* gene expression in cyanobacteria, green algae and higher plants: From transcription to PSII repair. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 247–257.
3. Sander, J., Nowaczyk, M., Buchta, J., Dau, H., Vass, I., Deak, Z., Dorogi, M., Iwai, M. and Rögner, M. (2010) Functional characterization and quantification of the alternative PsbA copies in *Thermosynechococcus elongatus* and their role in photoprotection, *J. Biol. Chem.* 285, 29851–29856.
4. Mulo, P., Sicora, C. and Aro, E.-M. (2009) Cyanobacterial *psbA* gene family: optimization of oxygenic photosynthesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 3697–3710.
5. Sugiura, M., Iwai, E., Hayashi, H. and Boussac, A. (2010) Differences in the interactions between the subunits of Photosystem II dependent on D1 protein variants in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. *J. Biol. Chem.* 285, 30008–30018.
6. Sugiura, M., Kato, Y., Takahashi, R., Suzuki, H., Watanabe, T., Noguchi, T., Rappaport, F. and Boussac, A. (2010) Energetics in Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* with a D1 protein encoded by either the *psbA1* or *psbA3* gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 1491–1499.
7. Sugiura, M., Boussac, A., Noguchi, T. and Rappaport, F. (2008) Influence of Histidine-198 of the D1 subunit on the properties of the primary electron donor, P680, of Photosystem II in *Thermosynechococcus elongatus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 331–342.
8. Sugiura, M., Azami, C., Koyama, K., Rutherford, A.W., Rappaport, F., Boussac, A. (2014) Modification of the pheophytin redox potential in *Thermosynechococcus elongatus* Photosystem II with PsbA3 as D1. *Biochim Biophys Acta* 1837, 139–48.

9. Sugiura, M. and Boussac, A. (2014) Some Photosystem II properties depending on the D1 protein variants in *Thermosynechococcus elongatus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 1427–1434.
10. Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.-R. and Kamiya, N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving Photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* 473, 55–60.

## Crystal Structure of Oxygen-Evolving Photosystem II from a Strain Expressing the *psbA3* Gene Only

Natsumi Ugai<sup>1\*</sup>, Michihiro Suga<sup>1</sup>, Miwa Sugiura<sup>2</sup>, Masako Iwai<sup>3</sup>, Masahiko Ikeuchi<sup>3</sup> and Jian-Ren Shen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Photosynthesis Research Center, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University,  
<sup>2</sup>Proteo-science Research Center, Ehime University, <sup>3</sup>Graduate School of Arts and Science, The University of  
Tokyo

## 研究紹介

新奇クロロフィルを持つシアノバクテリアのエネルギー移動機構の解析<sup>§</sup>

<sup>1</sup>東京理科大学大学院 科学教育研究科、<sup>2</sup>神戸大学分子フォト研究センター  
<sup>3</sup>JST CREST、<sup>4</sup>東京理科大学大学院 理学研究科、<sup>5</sup>東京理科大学 理学部、<sup>6</sup>JST さきがけ  
 篠田 稔行<sup>1,\*</sup> 秋本 誠志<sup>2,3</sup> 二井 大輔<sup>4</sup> 太田 尚孝<sup>5</sup> 鞆 達也<sup>5,6</sup>

クロロフィル(Chl)は光合成の光捕集・電荷分離反応に関わる可視域に吸収帯を持つ色素であるが、2010年に、既知の酸素発生型光合成生物において最も低エネルギー側に吸収極大を持つ新奇 Chl *f* を持つ海洋性シアノバクテリアの存在が報告された。このシアノバクテリアは白色光下では Chl *f* を蓄積せず、Far-red (FR) 光下で培養すると Chl *f* を蓄積する。白色光および FR 光下で培養した細胞の定常低温吸収スペクトルを測定すると FR 光下で培養した細胞において Chl *f* 由来の 745 nm に極大を持つ蛍光バンドがメインピークとして観測された。また時間分解蛍光スペクトルを測定した結果、励起後すぐに 77 K において Chl *a* から Chl *f* にエネルギー移動が生じていることが明らかとなった。これらの結果から得られた光化学系内における、Chl *f* の局在部位と機能について紹介する。

## 1. はじめに

光合成生物は、地球上に無尽蔵に降り注ぐ太陽光を用いてエネルギー変換を行い、特に高等植物・藻類およびシアノバクテリアが行う酸素発生型光合成においてクロロフィル(Chl)が光の捕集、エネルギー移動や電子伝達といった重要な役割を担っている。従来の酸素発生型光合成では可視光領域に吸収帯を持つ Chl *a*、*b*、*c* が光エネルギーを捕集し (*Prochlorococcus* では divinyl-Chl *a*、*b* 型)、Chl *a* を初期電子供与体として電荷分離を行い、化学エネルギーへと変換していると考えられていた。しかし Chl *a* よりも長波長側に吸収極大を持つ Chl *d* を主要光合成色素とするシアノバクテリア *Acaryochloris marina* が 1996 年に宮下らにより発見され<sup>1)</sup>、現在では地球上のあらゆる水圏に Chl *d* を持つシアノバクテリアが普遍的に分布していることが報告されている<sup>2-5)</sup>。Chl *d* は Chl *a* のクロリン環の C3 位がビニル基からフォルミル基へと変化しており、この構造の違いにより低エネルギー光を吸収することができる。*A. marina* の光化学系 I (PS I)、および光

化学系 II (PS II)における電荷分離を担う Chl 種は、Chl *a* を反応中心 Chl とする一般的なシアノバクテリアとは異なり、Chl *d* であることが報告された<sup>6,7)</sup>。Chl *d* は Chl *a* に比べエネルギーが約 100 mV 低い。この低エネルギー光の利用は、酸化側の電位は変わらず、還元側の初期電子受容体および第二次電子受容体の電位を正電位方向にシフトすることで補償している<sup>8)</sup>。

Chl *d* よりもさらに長波長側に吸収極大を持つ新奇 Chl *f* を持つシアノバクテリア *Halomicronema hongdechloris* がオーストラリアのハマリンプールに現生するストロマトライトから 2010 年に Chen らによって発見された<sup>9)</sup>。Chl *f* は Chl *a* のクロリン環の C2 位がメチル基からフォルミル基に変化することで、Chl *a* より吸収極大が約 40 nm 程度、低エネルギーシフトし、既知の酸素発生型 Chl 類の中で最も低エネルギー光を利用することができる(図 1)。またほぼ同時期に琵琶湖から Chl *f* を持つシアノバクテリアが大久保らにより単離された<sup>10)</sup>。他にも Chl *f* および Chl *d* の両方を合成・蓄積するシアノバクテリアが報告されている<sup>11)</sup>。Chl *f* の蓄積は Far-red (FR) 光下で培養されたシアノバクテリアにおいてのみ生じ、白色光下での培養では蓄積しないという特徴がある<sup>10-12)</sup>。*H. hongdechloris* にお

<sup>§</sup> 第 5 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: t.shinor@gmail.com

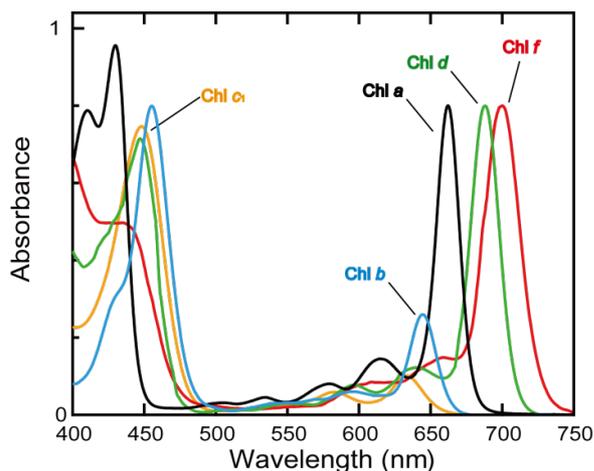


図1 有機溶媒中における Chl の吸収スペクトル  
 黒線: Chl a、青線: Chl b、橙線: Chl c<sub>1</sub>、緑線: Chl d、赤線: Chl f (Chl f 以外の溶媒はアセトン、Chl f はメタノールを主成分とする溶媒)

いても白色光下で培養すると Chl f を発現しないが、740 nm に発光極大を持つ LED 光 (以降、FR 光とする) 下で培養すると約 10% の Chl f を蓄積する。*H. hongdechloris* における Chl f の機能や結合部位については明らかになっていない<sup>12)</sup>。

本研究では Chl d よりも低エネルギー光を用いることができる Chl f を含む光化学系のエネルギー移動機構を明らかにするために、FR 光および白色光下で培養した *H. hongdechloris* 細胞における時間分解蛍光測定を行い、解析をすることで Chl f の機能や結合部位について明らかにしたので、その概要について紹介する。

## 2. 吸収スペクトルと蛍光スペクトル

図 2 に FR 光および白色光下で培養した *H. hongdechloris* 細胞の室温吸収スペクトルを示す。白色光下で培養した細胞では Chl a の Q<sub>y</sub> 帯の吸収極大が 676 nm に、フィコビリゾーム由来の吸収極大が 625 nm に存在し、一般的な Chl a 型シアノバクテリアの室温

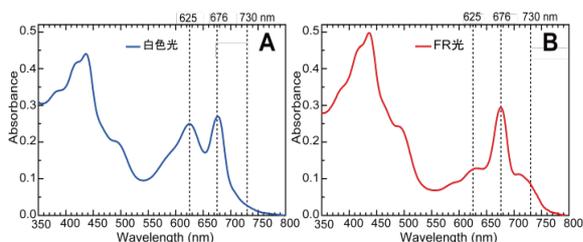


図2 *H. hongdechloris* 細胞の室温吸収スペクトル  
 (A)青線: 白色光培養、(B)赤線: FR 光培養

吸収スペクトルに類似している(図 2A)。一方、FR 光下で培養した細胞では 730 nm 付近に Chl f 由来と思われる吸収帯が存在し、フィコビリゾーム由来の吸収帯が減少した(図 2B)。この吸収スペクトルの違いにより図 3 に示すように細胞の色彩にも変化が生じた。また図 4 に示すようにメタノールで抽出した色素の吸収スペクトルからも Chl f は FR 光下でのみ発現し、全 Chl の約 10% が Chl f であった。この色素組成は HPLC による色素定量でも確認している。



図3 培養細胞の色彩  
 (左)白色光で培養した細胞。フィコビリゾーム由来の青みを帯びた色彩をしている。(右)FR 光で培養した細胞。フィコビリゾームが減少したことで黄緑色を呈している。

これらの色素組成の異なる *H. hongdechloris* 細胞の低温吸収スペクトルを図 5 に示す。両細胞において 670、678 nm に Chl a の Q<sub>y</sub> 帯の吸収極大が存在した。白色光培養の細胞において室温吸収スペクトルでは確認できなかった新たな吸収帯が 710 nm に存在した(図 5A)。細胞のメタノール抽出した色素の吸収スペクトルと HPLC から白色光培養時では Chl f を蓄積しないため、710 nm の長波長に位置する吸収極大は Chl a 由来であることが明らかになった。このような長波長領域に存

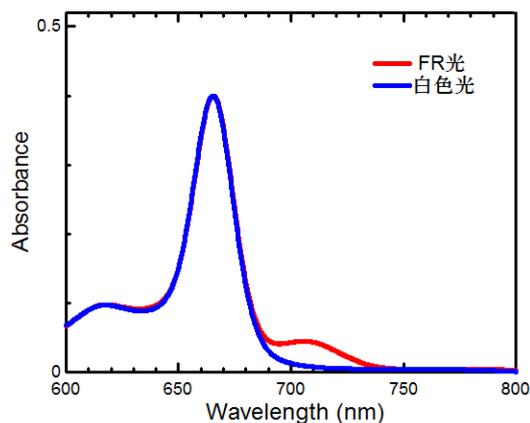


図4 *H. hongdechloris* 細胞からメタノールで抽出した色素の吸収スペクトル  
 青線: 白色光培養、赤線: FR 光培養

在する Chl *a* は red Chl と呼ばれ、*Arthrospira (Spirulina) platensis* においても報告されている<sup>13)</sup>。*A. platensis* は *H. hongdechloris* と同様に糸状性で非窒素固定型のシアノバクテリアである。red Chl の有無とシアノバクテリアの系統性に関連があるかは不明であり、系統的な解析が必要である。

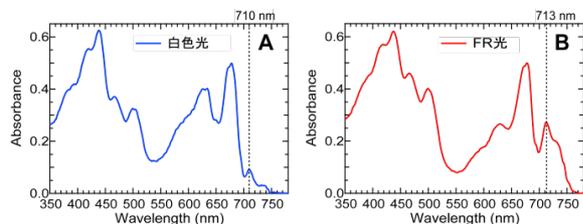


図5 *H. hongdechloris* 細胞の 77 K 吸収スペクトル (A)青線: 白色光培養、(B)赤線: FR 光培養

対してFR光培養の細胞では713 nmに吸収極大を持ち、白色光培養時よりも強度が2.5倍とより多くのred Chlの存在を観測できた(図5B)。この吸収極大が白色光におけるred Chlの極大よりも3 nm長波長側に位置すること、また強度が増加したこと、さらには吸収帯のバンド幅は白色光のものと比較して長波長側に広がっていることから、長波長側になるにつれてred Chl *a* よりもChl *f*の影響が大きくなると示唆された。

図6に425 nmで励起したときの細胞の低温蛍光スペクトルを示す。白色光培養細胞では651 nm、684 nm、727 nmにそれぞれフィコビリゾームPS II、PS I由来の蛍光帯が観測され、既知のChl *a*型のシアノバクテリアの低温蛍光スペクトルに類似していた(図6A)。一方、FR光下で培養した細胞では、それらの蛍光強度が減少し、745 nmにユニークな蛍光極大が存在した(図6B)。この745 nmに極大を持つ蛍光はChl *f*由来であると示唆された。

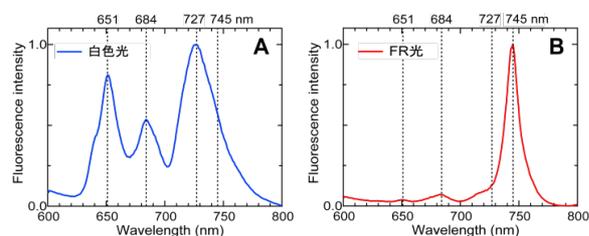


図6 *H. hongdechloris* 細胞の 425 nm 励起 77 K 蛍光スペクトル

(A)青線: 白色光培養、(B)赤線: FR 光培養

### 3. 時間分解蛍光スペクトル

図7に77 Kにおいてフェムト秒レーザーで励起後の *H. hongdechloris* 細胞の時間分解蛍光スペクトルを示す。白色光で培養した細胞のスペクトルは既知のシアノバクテリアの時間分解蛍光スペクトルとよく似ており<sup>14,15)</sup>、PS II由来の蛍光帯であるF685、F695および、PS I由来のF730が観測された(図7A)。励起後約1 ns弱から742 nmに極大を持つ蛍光帯が現れ、時間後期に消失した。このことから、F730の一部からF742へエネルギー移動があったことが示唆された。このF742は先の低温吸収スペクトルで現れた低エネルギー側のChl *a*由来であると推測された。

一方、FR光下で培養した細胞の時間分解蛍光スペクトルは大きく異なっていた(図7B)。励起後の時間初期ではPS IIおよびPS I由来の蛍光帯が観測されたが、すぐに消失した。これに対して長波長側にある蛍光シグナルは時間初期においてはややブロードであったが、時間後期にはシャープになり、748 nmに極大を持った。この蛍光シグナルはChl *f*由来であると推測される。Chl *a*のバンドが消失し、Chl *f*のシグナルが現れることは、低温においてChl *a*からChl *f*へのエネルギー移動が、励起後すぐに生じたことを示唆する。

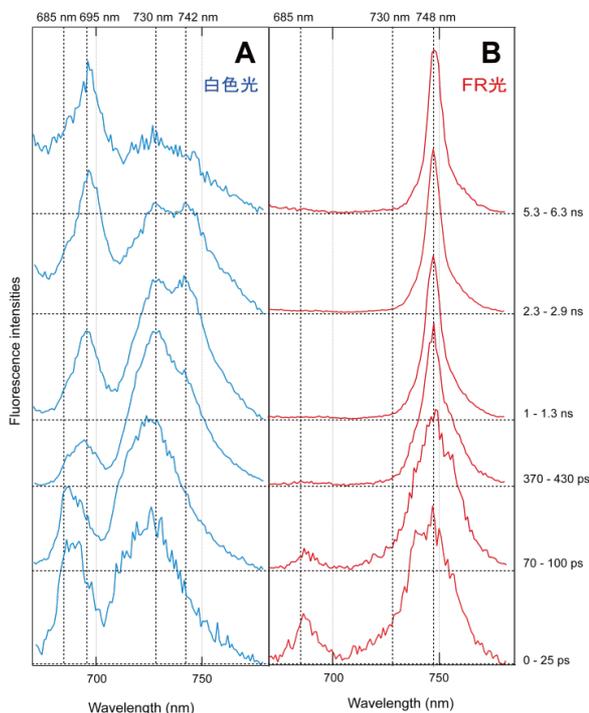


図7 *H. hongdechloris* 細胞の 425 nm 励起 77 K 時間分解蛍光スペクトル

(A)青線: 白色光培養、(B)赤線: FR 光培養

次に時間分解蛍光減衰曲線の 685 nm と 745 nm における寿命成分の解析を行った結果を表 1 に示す。685 nm における観測では FR 光下で培養した細胞は 10 ps 未満と 130 ps の時間初期で total amplitude の 97% を占めているのに対し、白色光下では 150 ps の成分が 70% を占めていることから、FR 光下の培養した細胞において、新しいエネルギー移動経路が確立したことが明らかとなった。また Chl *f* と帰属される 745 nm で観測した蛍光減衰曲線には 40 ps 未満の速い蛍光の立ち上がりが存在することから Chl *f* は Chl *a* の近傍に位置していることが示唆された<sup>16)</sup>。

表 1 励起波長 425 nm における蛍光寿命と amplitude

細胞	波長(nm)	蛍光寿命(amplitude)			
白色光	685	150 ps (0.702)	520 ps (0.191)	1.8 ns (0.096)	5.1 ns (0.011)
	745	70 ps (-0.959)	400 ps (0.731)	1.0 ns (0.255)	3.0 ns (0.014)
FR光	685	<10 ps (0.857)	130 ps (0.111)	1.1 ns (0.023)	4.4 ns (0.009)
	745	40 ps (-0.885)	360 ps (0.379)	1.5 ns (0.415)	3.2 ns (0.206)

さらに Chl *f* が電子伝達反応に関わっているかについて検討した。通常、PS II では 10-30 ns 領域において PS II の電荷再結合由来の遅延蛍光が観測でき、反応中心色素の Chl 種に応じた位置に遅延蛍光が現れる。本研究において、白色光、FR 光下で培養した細胞について 77 K で蛍光の減衰を観測しフィッティングを行った結果、685 nm で観測したときに Chl *a* 領域に 10-20 ns 程度の成分を仮定するとよく一致した(図 8A)。このことから、*H. hongdechloris* の PS II における反応中心 Chl は Chl *a* であることが示唆された。

#### 4. おわりに

*H. hongdechloris* 細胞における 77 K 時間分解蛍光スペクトルにおいて励起直後に Chl *a* から Chl *f* へのエネルギー移動が観測されたことから、これらは近傍関係にあり、生理温度では Chl *f* から Chl *a* への Up-hill なエネルギー移動が示唆された。このことから Chl *f* はアンテナ色素として機能していることが明らかとなった。本稿では紹介しなかったが、フェムト秒での蛍光分光法により、Chl *f* と Chl *a* の励起エネルギーが室温でシェアされていることを最近示した<sup>17)</sup>。

蛍光減衰曲線を解析した結果、*H. hongdechloris* の

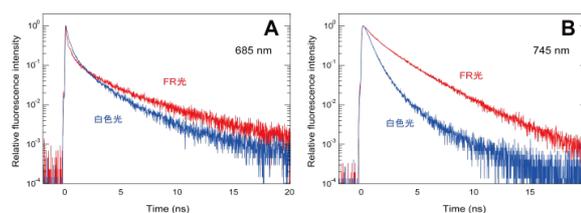


図 8 *H. hongdechloris* 細胞の 425 nm 励起 77 K 遅延蛍光減衰スペクトル

青線: 白色光培養、赤線: FR 光培養

(A)観測波長 685 nm、(B)観測波長 745 nm

PS II 反応中心 Chl は Chl *a* であると示唆されたが、amplitude が小さいことから、まだ確かではない。amplitude が小さい理由としては、測定対象を細胞としたためであり、これを改善するためには最小の電荷分離機能を持つ光化学系反応中心複合体を単離精製し再度測定を行うことが必須であり、さらなる実験が必要である。当研究グループは PS I および PS II を単離精製に成功したため *H. hongdechloris* の光化学系における Chl *f* のより詳細な機能や局在について明らかにしていく予定である。

#### 謝辞

本研究はオーストラリア、シドニー大学の Min Chen 博士とロシア科学アカデミーの Suleyman I. Allakhverdiev 教授との共同研究により得られたものであり、御礼申し上げたい。また、この内容は JST さきがけ研究の支援を受けて行われた。

Received February 27, 2015; Accepted March 28, 2015

#### 参考文献

- Miyashita, H., Ikemoto, H., Kurano, N., Adachi, K., Chihara, M. and Miyachi, S. (1996) Chlorophyll *d* as a major pigment. *Nature* 383, 402.
- Murakami, A., Miyashita, H., Iseki, M., Adachi, K. and Mimuro, M. (2004) Chlorophyll *d* in an epiphytic cyanobacterium of red algae. *Science* 303, 1633.
- Miller, S.R., Augustine, S., Olson, T.L., Blankenship, R.E., Selker, J. and Wood, A.M. (2005) Discovery of a free-living chlorophyll *d*-producing cyanobacterium with a hybrid proteobacterial/cyanobacterial small-subunit rRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 850–855.

4. Kühl, M., Chen, M., Ralph, P.J., Schreiber, U. and Larkum, A.W.D. (2005) A niche for cyanobacteria containing chlorophyll *d*. *Nature* 433, 820.
5. Kashiyama, Y., Miyashita, H., Ohkubo, S., Ogawa, N.O., Chikaraishi, Y., Takano, Y., Suga, H., Toyohuku, T., Nomaki, H., Kitazono, H., Nagata, T. and Ohkouchi, N. (2008) Evidence of Global Chlorophyll *d*. *Science* 321, 658.
6. Hu, Q., Miyashita, H., Iwasaki, I., Kurano, N., Miyachi, S., Iwaki, M. and Itoh, S. (1998) A photosystem I reaction center driven by chlorophyll *d* in oxygenic photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 13319–13323.
7. Tomo, T., Okubo, T., Akimoto, S., Yokono, M., Miyashita, H., Tsuchiya, T., Noguchi, T. and Mimuro, M. (2007) Identification of the special pair of photosystem II in a chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 7283–7288.
8. Allakhverdiev, S.I., Tomo, T., Shimada, Y., Kindo, H., Nagao, R., Klimov, V.V. and Mimuro, M. (2010) Redox potential of pheophytin *a* in photosystem II of two cyanobacteria having the different special pair chlorophylls. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 3924–3929.
9. Chen, M., Schliep, M., Willows, R.D., Cai, Z.-L., Neilan, B.A. and Scheer, H. (2010) A red-shifted chlorophyll. *Science* 329, 1318–1319.
10. 大久保智司 (2012) 新しく発見されたクロロフィル *f*. 光合成研究 22, 80-86.
11. Gan, F., Zhang, S., Rockwell, N.C., Martin, S.S., Lagarias, J.C. and Bryant, D.A. (2014) Extensive remodeling of a cyanobacterial photosynthetic apparatus in far-red light. *Science* 345, 1312–1317.
12. Chen, M., Li, Y., Birch, D. and Willows, R.D. (2012) A cyanobacterium that contains chlorophyll *f* – a red-absorbing photopigment. *FEBS Lett.* 586, 3249–3254.
13. Arba, M., Aikawa, S., Niki, K., Yokono, M., Kondo, A. and Akimoto, S. (2013) Differences in excitation energy transfer of *Arthrospira platensis* cells grown in seawater medium and freshwater medium, probed by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* 588, 231–236.
14. Akimoto, S., Yokono, M., Yokono, E., Aikawa, S. and Kondo, A. (2014) Short-term light adaptation of a cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803, probed by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Plant Physiol. Biochem.* 81, 149–154.
15. Shimada, Y., Tsuchiya, T., Akimoto, S., Tomo, T., Fukuya, M., Tanaka, K. and Mimuro, M. (2008) Spectral properties of the CP43-deletion mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.* 98, 303–314.
16. Tomo, T., Shinoda, T., Chen, M., Allakhverdiev, S.I. and Akimoto, S. (2014) Energy transfer processes in chlorophyll *f*-containing cyanobacteria using time-resolved fluorescence spectroscopy on intact cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 1484–1489.
17. Akimoto, S., Shinoda, T., Chen, M., Allakhverdiev, S.I. and Tomo, T. (2015) Energy transfer in the chlorophyll *f*-containing cyanobacterium, *Halomicronema hongdechloris*, analyzed by time-resolved fluorescence spectroscopies. *Photosynth. Res.* in press.

## Spectroscopic Analysis of New Chlorophyll-Containing Cyanobacterium

Toshiyuki Shinoda<sup>1,\*</sup>, Seiji Akimoto<sup>2,3</sup>, Daisuke Nii<sup>4</sup>, Hisataka Ohta<sup>5</sup> and Tatsuya Tomo<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Mathematics and Science Education, Tokyo University of Science, <sup>2</sup>Molecular Photoscience Research Center, Kobe University, <sup>3</sup>CREST, Japan Science and Technology Agency (JST), <sup>4</sup>Graduate School of Science, Tokyo University of Science, <sup>5</sup>Faculty of Science, Tokyo University of Science, <sup>6</sup>PRESTO, Japan Science and Technology Agency (JST)

解説特集

「光合成の多様な世界について」

Editors: 鞆 達也 (東京理科大学 理学部)  
園池公毅 (早稲田大学 教育・総合科学学術院)

序文	鞆 達也 (東京理科大) 園池 公毅 (早稲田大)	35
解説 クロロフィルの光エネルギー捕集にみられる多様性	秋本 誠志 (神戸大) 鞆 達也 (東京理科大)	36
解説 原形質流動による成長制御から考える植物の光戦略	富永 基樹 (早稲田大)	42
解説 自然界の多様性を生かした研究戦略：珪藻の世界	菓子野 康浩 (兵庫県立大)	48
解説 クロロフィルを制した者が光環境を征した？ 光合成生物を「食べる」生き様の舞台裏	柏山 祐一郎 (福井工業大) 横山 亜紀子 (筑波大) 民秋 均 (立命館大)	58

## 解説

序文<sup>‡</sup>

東京理科大学 理学部

鞆 達也<sup>1</sup>

早稲田大学 教育・総合科学学術院

園池 公毅<sup>2</sup>

日本光合成学会の会長を務められていた村田紀夫さんは、十二、三年前に「今はゲノムが決まったモデル生物がもてはやされているけれども、すぐに、面白い生物を見つけたから、ちょっとゲノムを決めて研究してみよう、という時代になりますよ」とおっしゃっていました。二十世紀の最後の数年に始まった生物のゲノム配列決定の流れを受けて、シロイヌナズナや *Synechocystis* sp. PCC 6803 などのモデル生物に研究資源を集中して投下すべきであるという議論がまだなされていた時代のことです。それまでも、光合成の生化学研究においては、ホウレンソウが事実上のモデル生物として扱われていた時代がありました。口の悪い人は、「最近の（1980年代の話です）光合成研究は、ホウレンソウ学に過ぎない」などと言っていたものです。

光合成に限らず、ほとんどすべての生物学研究は「普遍性の追求」と「多様性の認識」にその基礎を置いています。そして、まず、基本的なメカニズムを追求する上では、多様性をある程度犠牲にしても、普遍性（と信じられているもの）に集中することによって効率的に研究を進めることが重要であるという考え方は理解できます。事実、ホウレンソウにおいて調べられた光化学系の反応中心の構造と機能は、酸素発生源の光合成生物にきわめてよく保存されていることが明らかとなりました。陸上植物とシアノバクテリアの光化学系の電子伝達成分の配置を並べて見せられても、素人目にはほとんど区別が付きません。一方で、光エネルギーの捕集に働く集光装置に関しては、藻類を中心に、その多様性が際立っています。

今回、多様性をキーワードにして行なった日本光合成学会のシンポジウムの演者の方々に、解説特集としてそれぞれ解説記事を執筆していただきました。この背景には、普遍的な部分の理解が進んだことによって、多様性を、単なる事実の羅列としてではなく、共通の基盤の下に統一的に考えることができる時代になったという認識があります。また、シンポジウムでも議論になりましたように、そもそも、普遍性自体が、多様性と比較して初めて定義できるものであるという側面もあると考えます。今後は、その詳細が明らかになりつつある普遍性の基盤に立って、多様性を解析することこそが、どの分野の研究にも必要となってくるはずです。そのような認識に基づいて、光合成研究、あるいはその周辺分野の多様性をキーワードにした解説記事を今号と次号の二回に分けて掲載します。今号では、クロロフィルの多様性について秋本誠志さんに、原形質流動の速度を決めるミオシンの多様性について富永基樹さんに、珪藻の多様性について菓子野康浩さんに、クロロフィルと光合成生物の進化について柏山祐一郎さんに執筆をお願いいたしました。ご協力を頂いた方々に感謝いたします。また、本特集の編集に当たっては、編集長の西山佳孝さんに大変お世話になりました。心からお礼申し上げます。

<sup>‡</sup>解説特集「光合成の多様な世界について」

<sup>1</sup>連絡先 E-mail: tomo@rs.tus.ac.jp

<sup>2</sup>連絡先 E-mail: sonoike@waseda.jp

# 解説

## クロロフィルの光エネルギー捕集にみられる多様性<sup>†</sup>

<sup>1</sup>神戸大学 分子フォトサイエンス研究センター、<sup>2</sup>東京理科大学 理学部  
秋本 誠志<sup>1,\*</sup> 鞆 達也<sup>2</sup>

酸素発生型の光合成系では、様々なクロロフィル (Chl) が知られており<sup>1-6)</sup>、反応中心やアンテナ色素タンパク質複合体に存在し、それぞれ、光を吸収して電子の流れに変換をする機能や光を吸収し励起エネルギーを反応中心まで伝達する機能を担う。反応中心に存在する Chl としては、現在、Chl *a*、Chl *d*、DV-Chl *a* ([8-vinyl]-Chl *a*)のみが知られているのに対して、アンテナ色素タンパク質複合体にはすべての Chl が寄与する。本稿では、Chl が持つアンテナ機能に着目し、室温における Chl の吸収スペクトル、液体窒素温度 (77 K) 下における光合成生物細胞の吸収スペクトル、定常・時間分解蛍光スペクトルに関する最近のデータを基に、Chl による光エネルギー捕集に見られる多様性について検討する。

### 1. クロロフィルの分子構造と光吸収

色素分子の光吸収や発光など、分子と光の相互作用は、分子の共役構造に依存する。酸素発生型光合成における代表的な色素分子である Chl の共役構造は、大きく分けて、クロリン骨格を持つもの (図 1) とポルフィリン骨格を持つもの (図 2) の 2 つに分けられる<sup>7-9)</sup>。クロリン型の Chl として分子構造まで明らかになっているものとして、Chl *a*、Chl *b*、Chl *d*、Chl *f*、DV-Chl *a*、DV-Chl *b* ([8-vinyl]-Chl *b*)があげられる<sup>6-8)</sup> (ジアステレオマーが存在するものもある<sup>7,8)</sup> が、光化学系 I 反応中心にしか確認されておらず、光捕集機能を議論する本稿では取り扱わないこととする)。ポルフィリン型 Chl には Chl *c* があり、Chl *c*<sub>1</sub>、Chl *c*<sub>2</sub>、Chl *c*<sub>3</sub> の 3 つがよく知られている<sup>7,8)</sup>。この他にも、Chl *c* に類似した構造を持つ Chl 系分子 (Divinyl protochlorophyllide や Chl *c*<sub>CS-170</sub> など) が報告されている<sup>10)</sup>。

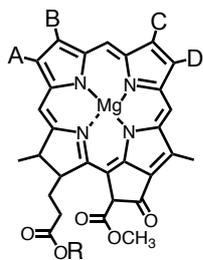


図 1 クロリン骨格を持つクロロフィルの構造  
R はフィチル基。

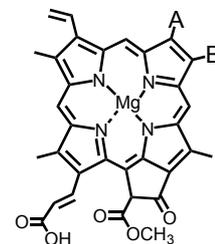


図 2 ポルフィリン骨格を持つクロロフィルの構造

Chl	A	B	C	D
Chl <i>a</i>	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>2</sub> =CH-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -
Chl <i>b</i>	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>2</sub> =CH-	O=CH-	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -
Chl <i>d</i>	CH <sub>3</sub> -	O=CH-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -
Chl <i>f</i>	O=CH-	CH <sub>2</sub> =CH-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -
DV-Chl <i>a</i>	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>2</sub> =CH-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>2</sub> =CH-
DV-Chl <i>b</i>	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>2</sub> =CH-	O=CH-	CH <sub>2</sub> =CH-

側鎖の影響を無視すれば、クロリン型 Chl は C<sub>2v</sub> 点群に属し、ポルフィリン型 Chl は D<sub>4h</sub> 点群に属している<sup>11,12)</sup>。クロリンやポルフィリンは、紫色から青色に及ぶ波長領域と赤色の波長領域に吸収帯を持ち、それぞれ、Soret 帯 (B 帯) と Q 帯と呼ばれる。クロリンでは Q 帯は Q<sub>x</sub> 帯と Q<sub>y</sub> 帯との 2 つに分離するが、ポルフィリンでは対称性がよいため区別されない<sup>9)</sup>。また、

Chl	A	B
Chl <i>c</i> <sub>1</sub>	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -
Chl <i>c</i> <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>2</sub> =CH-
Chl <i>c</i> <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> O-(C=O)-	CH <sub>2</sub> =CH-

<sup>†</sup>解説特集「光合成の多様な世界について」  
\*連絡先 E-mail: akimoto@hawk.kobe-u.ac.jp

クロリン型 Chl では Q 帯と Soret 帯が同程度のモル吸光係数を示すのに対して、ポルフィリン型 Chl では Q 帯のモル吸光係数が Soret 帯と比較して著しく小さい<sup>7,8,11)</sup>。例えば、クロリン型 Chl である Chl *a* では、Q 帯として 4 つのピークが確認でき、長波長側から順に  $Q_y(0,0)$ 、 $Q_y(1,0)$ 、 $Q_x(0,0)$ 、 $Q_x(1,0)$  と帰属され、 $Q_y(0,0)$  帯は Soret 帯と同程度のモル吸光係数を示す<sup>7,8)</sup>。一方、ポルフィリン型である Chl  $c_2$  の Q 帯は、Soret 帯よりモル吸光係数が著しく小さく、2 つのピークが観測される<sup>7,8)</sup>。ポルフィリンにおける吸収帯の帰属<sup>9)</sup>を基にし、2 つのピークの間隔が  $\sim 1300\text{ cm}^{-1}$  であることを考慮すれば、この 2 つのピークは長波長側から  $Q(0,0)$ 、 $Q(1,0)$  であるとも考えられるが、 $Q_y$  帯と  $Q_x$  帯に帰属する報告<sup>7)</sup>もある。エネルギー移動を理論的に考察するためには遷移双極子モーメントの向きに関する情報が必要不可欠<sup>13)</sup>であり、Chl *c* の Q 帯の電子状態や振動状態の正確な帰属について、今後の研究が待たれる。

図 3 は、文献から得られるデータを用いて、各 Chl の Soret 帯と Q 帯について、最も長波長に現れるピークのモル吸光係数を波長に対して図示したものである<sup>7,8,14,15)</sup>。ここで、モル吸光係数の測定は難しく、必ずしも決定されたものではないことに注意されたい。たとえば、Chl *a* と DV-Chl *a* の  $Q_y$  帯のモル吸光係数はほぼ同じであるという報告もある<sup>16)</sup>。Chl *d* と Chl *f* の Soret 帯については、最長波長ピーク（実線）の他に 390-395 nm のピークを点線で示した。溶媒に応じて両

者の相対強度が変化し、例えば、メタノール中の Chl *f* では短波長側のピークの方が強い<sup>15)</sup>。

Soret 帯に着目すると、最も短波長に位置するのは Chl *a* であり、最も長波長にあるのは DV-Chl *b* である。Chl *c* は Soret 帯のモル吸光係数が大きいことが特徴であり、450 nm 近辺の光エネルギーを捕集するのに有利である。

光吸収については Chl が持つすべての吸収帯（Soret 帯、Q 帯）を考慮する必要があるが、Soret 帯で励起された場合でも、100 フェムト秒程度で最低電子励起状態へと内部転換が起きる<sup>17,18)</sup>ため、励起エネルギー移動や電子移動など分子間で起こる現象は、最低電子励起状態の寄与が大きい。したがって、励起エネルギー移動や電子移動を考える場合には、各 Chl が持つ Q 帯のうち、最も長波長側に現れるピークの波長を検討することが多い。クロリン型の Chl では、側鎖の違いにより  $Q_y$  帯の波長は大きく変化する。現在発見されている Chl のうちで、ジエチルエーテル中で  $Q_y$  帯が最も長波長であるものは Chl *f* であり、Chl *a* と比較して、約 35 nm 長波長側に吸収ピークを持つ<sup>15)</sup>。一方、ジエチルエーテル中で  $Q_y$  帯が最も短波長であるものは Chl *b* であり、Chl *a* と比較して、約 19 nm 短波長側に吸収ピークを持つ<sup>8)</sup>。ポルフィリン型である Chl *c* では、側鎖の違いによる Q 帯の波長の違いは比較的小さい<sup>7, 8)</sup>。Q 帯の波長が短波長のものから順に並べると、Chl *c* > (DV-)Chl *b* > (DV-)Chl *a* > Chl *d* > Chl *f* となる。

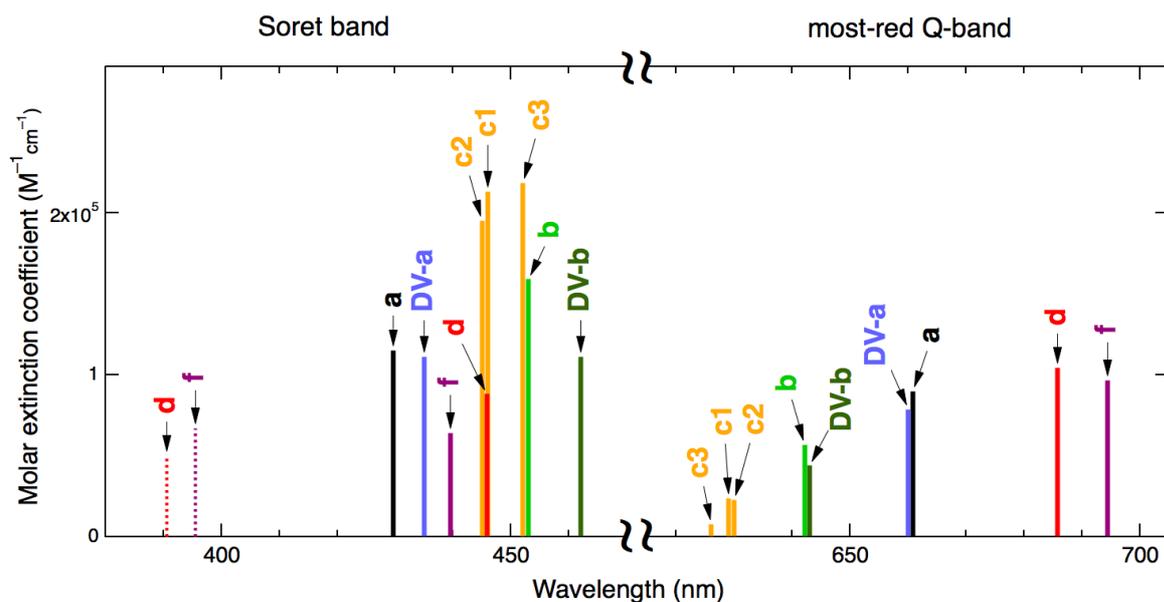


図 3 各クロフィルのモル吸光係数を波長に対して図示したもの

溶媒は、Chl *c* についてはアセトン-1%ピリジン<sup>7,8)</sup>、その他の Chl についてはジエチルエーテルを用いている<sup>7,8,14,15)</sup>。

## 2. 液体窒素温度における細胞中での吸収スペクトル

溶液中 (図 3) とは異なり、色素タンパク質複合体中では Chl の吸収スペクトルは様々な波長でピークを示し、Chl とタンパク質間の相互作用や、Chl 間の相互作用により、Chl の電子遷移エネルギーが幅広く変化することを意味している。液体窒素温度下で測定を行うことによってスペクトルは尖鋭化され、Chl の遷移エネルギーを詳細に調べることができる。Chl *a* の Q<sub>y</sub> 帯に着目する (図 4) と *Synechocystis* sp. PCC 6803、*Anabaena variabilis*、*Arthrospira platensis*、*Halomiconema hongdechloris* のいずれも、680 nm 近辺に大きなピークを示す。680 nm 近辺のピークはいくつかの細かいピークに分かれていることが確認され、エネルギーの異なる Chl *a* が存在することがわかる。これに加えて、700 nm よりも長波長側にも吸収が確認される。*Synechocystis* sp. PCC 6803 では明らかなピークとしては観測されないが、*A. variabilis*、*A. platensis*、白色光で培養された *H. hongdechloris* では 710 nm 近辺にピークが確認される。これは、光化学系 I に存在する低エネルギークロロフィル (PSI red Chl) に帰属される。*A. platensis*、白色光で培養された *H. hongdechloris* では、弱いながらもさらに長波長側に吸収が観測される。これらの Chl *a* による長波長光の吸収帯は、Chl *d* 型シアノバクテリア *Acaryochloris marina* の吸収帯 (ピーク波長を 711 nm とし、いくつかの細かいピークが存在) に匹敵する波長領域である。ただし、Chl *a* しか持たない *A. platensis* は、遠赤光 LED 下では細胞の増殖が極めて遅い<sup>19)</sup>。*H. hongdechloris* は、遠赤光 LED 下で培養すると 10% 程度の Chl *f* を持つことにより 700 nm より長波長側の吸収帯が強くなり、遠赤光を吸収し光合成に利用する<sup>9)</sup>。

Chl *b* や Chl *c* は、Chl *a* の Q<sub>y</sub>(1,0)帯や Q<sub>x</sub>(0,0)帯の影響で細かいピークの変化を議論することは多いが、DV-Chl *b* の相対含有量が大きい *Prochlorococcus* CCMP 2773 では、650.0 nm と 657.5 nm にピークを持つ、異なる遷移エネルギーを持った DV-Chl *b* が確認されている<sup>20)</sup>。

## 3. 液体窒素温度における細胞中での定常・時間分解蛍光スペクトル

液体窒素温度下で蛍光スペクトルを観測すること

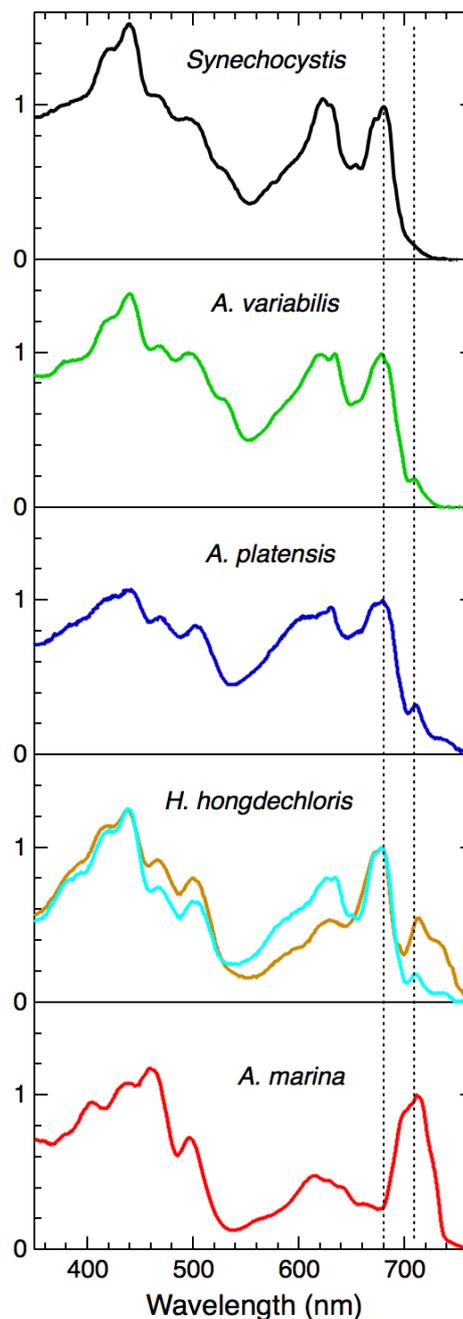


図 4 液体窒素温度 (77 K) におけるシアノバクテリア細胞の吸収スペクトル  
Chl Q<sub>y</sub> 帯で強度を規格化している。上から、*Synechocystis* sp. PCC 6803、*Anabaena variabilis*、*Arthrospira platensis*、*Halomiconema hongdechloris* (水色は白色光で培養した細胞、茶色は遠赤光で培養した細胞)、*Acaryochloris marina*。点線は左から、680 nm と 710nm を示している。

により、個々の色素タンパク質複合体が持つ最もエネルギーの低い Chl を検討することができる。したがって、吸収スペクトルでは検出できないような、わずかに存在する低エネルギー-Chl の検出が可能である。さらに、時間分解蛍光スペクトルでは、定常測定では観測されないような、短い時間だけ蛍光を発する Chl についても検出が可能である。

Chl *a* 由来で最も長波長の蛍光ピークを発するのは、シアノバクテリア *A. platensis* の光化学系 I 三量体に存在する red Chl であり (758 nm)、定常測定でも時間分解測定でも観測が可能である<sup>19,21)</sup>。Chl *d* を主要 Chl として持つ *Acaryochloris* では、光化学系 I からの蛍光が弱い。*A. marina* 細胞では、励起波長を変えて測定した定常蛍光の差スペクトルを求めることにより、光化学系 I の Chl *d* が 760 nm にピークを発することがわかる<sup>22)</sup>。また、*Acaryochloris* 淡路株では、パルスレーザー励起後 100 ピコ秒経過した時間帯に、778 nm 近辺に光化学系 I の Chl *d* からの蛍光が確認できる<sup>22)</sup>。Chl *a* や Chl *d* が発する長波長蛍光はいずれもスペクトルがブロードであり、Chl 分子間で強く相互作用をした Chl からの蛍光であると予想される。

遠赤光 LED で培養された *H. hongdechloris* の細胞では Chl *f* 由来の蛍光ピークが 748 nm に観測される<sup>23)</sup>。この Chl *f* 蛍光は、高エネルギーの Chl *a* や Chl *d* が発する蛍光のようにスペクトル形状が鋭く、Chl 間相互作用ではなく Chl *f* 分子が持つ性質 (図 3) をそのまま反映していると思われる。タンパク質中で Chl *f* 分子同士が強く相互作用したとき、どれくらい低い遷移エネルギーを持つことができるのか (どれくらい長波長の光と相互作用できるのか) 興味深い。

#### 4. エネルギー移動

現在発見されている酸素発生型光合成生物は、すべて、Chl *a* または DV-Chl *a* を持つ。したがって、(DV-)Chl *a* と他の Chl との間の励起エネルギー移動過程の観測は、光合成初期過程の解明において重要な意味を持つ。フェルスター型のエネルギー移動を考えると、エネルギー移動効率を上げるためには、エネルギードナーの蛍光スペクトルとエネルギーアクセプターの吸収スペクトルが十分に重なる必要がある<sup>13)</sup>。したがって、Chl *a* へのエネルギー移動の効率を考えると、Chl *a* よりも遷移エネルギーの高い Chl *b* や Chl *c* (図 3) が有

利である。実際、近接する Chl *b* から Chl *a* 間でのエネルギー移動<sup>17)</sup>や Chl *c* から Chl *a* 間エネルギー移動<sup>18)</sup> は 1 ピコ秒より短い時定数で起こり、エネルギー移動効率は極めて高い。DV-Chl *b* から DV-Chl *a* へのエネルギー移動についても、Chl *b* から Chl *a* へのエネルギー移動と同様、超高速過程である<sup>20)</sup>。

Chl *d* や Chl *f* は Chl *a* よりも遷移エネルギーが低い (図 3)。しかし、室温では、*A. marina* 中で Chl *d* から Chl *a* へのアップヒルエネルギー移動が起こること<sup>24)</sup>、遠赤光 LED で培養された *H. hongdechloris* 中で Chl *f* と Chl *a* との間でエネルギー分布の平衡が 5 ピコ秒程度で起こること<sup>25)</sup>が報告されており、生育環境温度下では、Chl *d* や Chl *f* で吸収された光エネルギーが Chl *a* へと伝達され利用することができることが示唆された。

#### 5. おわりに

反応中心で起こる光誘起電子移動に寄与する Chl は、Chl *a*、Chl *d*、DV-Chl *a* である。これらの Chl では吸収できない (しにくい) 波長の光を光合成に利用するためには、異なる Chl を利用することになる。光エネルギー捕集と励起エネルギー移動の観点から各 Chl の特徴を挙げると、次のようにまとめられる。(DV-)Chl *b* の Q<sub>y</sub> 帯は (DV-)Chl *a* の Q<sub>y</sub> 帯よりわずかにエネルギーが高く、(DV-)Chl *a* に対して良いエネルギードナーとなる。DV-Chl *b* は青色領域で最も長波長の光を吸収できる Chl である。Chl *c* は Q 帯のモル吸光係数が小さいが、Chl *a* へのエネルギー移動効率は、Chl *b* から Chl *a* へのエネルギー移動効率に匹敵する。また、Chl *c* の Soret 帯のモル吸光係数の値は Chl の中で最も大きく、青色を吸収するのに有利である。Chl *d* や Chl *f* の Q<sub>y</sub> 帯は Chl *a* の Q<sub>y</sub> 帯よりもエネルギーが低いが、色素タンパク質複合体中で Chl *a* と近接して存在することにより、Chl *d* と Chl *a* との間、Chl *f* と Chl *a* との間で励起エネルギーの平衡が成り立ち、生育温度では、Chl *d* や Chl *f* が捕集した光エネルギーを Chl *a* が利用できると思われる。

最近、遺伝子導入により *A. marina* に合成させた新奇な Chl ([7-formyl]-Chl *d*、すなわち、図 1 において、C の位置にフォルミル基 (O=CH-) が導入された Chl *d*) が、実際にアンテナ色素として機能していることが報告されている<sup>26,27)</sup>。[7-formyl]-Chl *d* の Soret 帯および Q<sub>y</sub> 帯の吸収ピークは、アセトン中で、それぞれ、470 nm

と 667 nm<sup>26)</sup>である。Chl により吸収する光の波長領域を人工的に拡張することができる可能性や、既知の Chl とは異なる波長領域の光を利用できる未知の Chl が存在する可能性があることを示している。

## 謝辞

本稿では、神戸大学近藤昭彦教授、神戸大学村上明男准教授、神戸大学藍川晋平博士、京都大学三室守教授、シドニー大学 Min Chen 教授、ロシア科学アカデミー Suleyman I. Allakhverdiev 教授との共同研究により得られた結果を用いた。御礼申し上げたい。

Received March 2, 2015; Accepted March 4, 2015

## 参考文献

1. Tswett, M. (1906) Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls. *Ber. Dtsch. Botan. Ges.* 24, 384–393.
2. Chisholm, S.W., Olson, R.J., Zettler, E.R., Goericke, R., Waterbury, J.B., and Welschmeyer, N.A. (1988) A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic zone. *Nature* 340–343.
3. Strain, H.H., and Manning, W.M. (1942) Chlorofucine (Chlorophyll g), a green pigment of diatoms and brown algae. *J. Biol. Chem.* 144, 625–636.
4. Miyashita, H., Ikemoto, H., Kurano, N., Adachi, K., Chilara, M., and Miyachi, S. (1996) Chlorophyll d as a major pigment. *Nature* 383, 402.
5. Murakami, A., Miyashita, H., Iseki, M., Adachi, K., and Mimuro, M. (2006) Chlorophyll d in an epiphytic cyanobacterium of red algae. *Science* 303, 1633.
6. Chen, M., Schliep, M., Willows, R.D., Cai, Z.-L., Neilan, B.A., and Scheer H. (2010) A red-shifted chlorophyll. *Science* 329, 1318–1319.
7. 垣谷俊昭, 三室守, 民秋均 (2011) クロロフィル, 裳華房.
8. 日本光合成研究会編 (2003) 光合成事典, 学会出版センター.
9. Blankenship, R. E. (2002) *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Blackwell Science, Oxford.
10. Zapata, M., Garrido, J.L., and Jeffrey, S.W. (2006) Chlorophyll c pigments: current status, in *Chlorophylls and bacteriochlorophylls* (Grim, B., Porra, R.J., Rüdiger, W., Scheer, H., Eds.) pp 39–53, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
11. Björn, L.O., Papageorgiou, G.C., Blankenship, R.E., and Govindjee (2009) A viewpoint: Why chlorophyll a? *Photosynth. Res.* 99, 85–98.
12. Senge, M.O., Ryan, A.A., Letchford, K.A., MacGowan, S.A., and Mielke, T. (2014) Chlorophylls, symmetry, chirality, and photosynthesis. *Symmetry* 6, 781–843.
13. Förster, T. (1948) Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Phys.* 437, 55–75.
14. Shedbalkar, V.B., and Rebeiz, C.A. (1992) Chloroplast biogenesis: determination of the molar extinction coefficients of divinyl chlorophyll a and b and their pheophytins. *Anal. Biochem.* 207, 261–266.
15. Li, Y., Scales, N., Blankenship, R.E., Willows, R.D., and Chen, M. (2012) Extinction coefficient for red-shifted chlorophylls: Chlorophyll d and chlorophyll f. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 1292–1298.
16. Tomo, T., Akimoto, S., Ito, H., Tsuchiya, T., Fukuya, M., Tanaka, A., and Mimuro, M. (2009) Replacement of chlorophyll with di-vinyl chlorophyll in the antenna and reaction center complexes of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: characterization of spectral and photochemical properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 191–200.
17. Akimoto, S., Yamazaki, I., Murakami, A., Takaichi, S., and Mimuro, M. (2004) Ultrafast excitation relaxation dynamics and energy transfer in the siphonaxanthin-containing green alga *Codium fragile*. *Chem. Phys. Lett.* 390, 45–49.
18. Akimoto, S., Teshigahara, A., Yokono, M., Mimuro, M., Nagao, R., and Tomo, T. (2014) Excitation relaxation dynamics and energy transfer in fucoxanthin–chlorophyll a/c-protein complexes, probed by time-resolved fluorescence. *Biochim.*

- Biophys. Acta*, 1837, 1514–1521.
19. Akimoto, S., Yokono, M., Hamada, F., Teshigahara, A., Aikawa, S., and Kondo, A. (2012) Adaptation of light-harvesting systems of *Arthrospira platensis* to light conditions, probed by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 1483–1489.
  20. Mimuro, M., Murakami, A., Tomo, T., Tsuchiya, T., Watabe, K., Yokono, M., and Akimoto, S. (2011) Molecular environments of divinyl chlorophylls in *Prochlorococcus* and *Synechocystis*: Differences in fluorescence properties with chlorophyll replacement. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 471–481.
  21. Shubin, V.V., Murthy, S.D.S., Karapetyan, N.V., and Mohanty, P. (1991) Origin of the 77 K variable fluorescence at 758 nm in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1060, 28–36.
  22. Akimoto, S., Murakami, A., Yokono, M., Koyama, K., Tsuchiya, T., Miyashita, H., Yamazaki, I., and Mimuro, M. (2006) Fluorescence properties of the chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium *Acaryochloris* sp. strain Awaji. *J. Photochem. Photobiol. A* 178, 122–129.
  23. Tomo, T., Shinoda, T., Chen, M., Allakhverdiev, S.I., and Akimoto, S. (2014) Energy transfer processes in chlorophyll *f*-containing cyanobacteria using time-resolved fluorescence spectroscopy on intact cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 1484–1489.
  24. Mimuro, M., Hirayama, K., Uezono, K., Miyashita, H., and Miyachi, S. (2000) Uphill energy transfer in a chlorophyll *d*-dominating oxygenic photosynthetic prokaryote. *Acaryochloris marina*. *Biochim Biophys Acta* 1456, 27–34.
  25. Akimoto, S., Shinoda, T., Chen, M., Allakhverdiev, S.I., and Tomo, T. (2014) Energy transfer in the chlorophyll *f*-containing cyanobacterium, *Halomicronema hongdechloris*, analyzed by time-resolved fluorescence spectroscopies. *Photosynth. Res.*, in press.
  26. Tsuchiya, T., Mizoguchi, T., Akimoto, S., Tomo, T., Tamiaki, H., and Mimuro, M. (2012) Metabolic engineering of the chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina*: production of a novel chlorophyll species by the introduction of the chlorophyllide *a* oxygenase gene. *Plant Cell Physiol.* 53, 518–527.
  27. Tsuchiya, T., Akimoto, S., Mizoguchi, T., Watabe, K., Kindo, H., Tomo, T., Tamiaki, H., and Mimuro, M. (2012) Artificially produced [7-formyl]-chlorophyll *d* functions as an antenna pigment in the photosystem II isolated from the chlorophyllide *a* oxygenase-expressing *Acaryochloris marina*. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 1285–1291.

## Diversity of Light Harvesting by Chlorophylls

Seiji Akimoto<sup>1</sup> and Tatsuya Tomo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Molecular Photoscience Research Center, Kobe University, <sup>2</sup>Faculty of Science, Tokyo University of Science

## 原形質流動による成長制御から考える植物の光戦略<sup>‡</sup>

<sup>1</sup>早稲田大学 教育・総合科学学術院 生物学専修, <sup>2</sup>JST さきがけ  
富永 基樹<sup>1,2,\*</sup>

藻類から高等植物に至るあらゆる植物の細胞内では、原形質流動とよばれる活発な細胞内輸送が発生している。原形質流動は、細胞小器官に結合したモータータンパク質ミオシン XI が、アクチン繊維上を運動することによって発生している。しかしながら植物における本質的な役割に関しては、200 年以上前の発見以来の大きな謎である。筆者らは、シロイヌナズナミオシン XI のモータードメインを、生物界最速のシャジクモミオシン XI あるいはヒトミオシン V と分子生物学的に置換することで、人工的な高速型あるいは低速型キメラミオシン XI を開発した。驚くべきことに、高速型・低速型キメラミオシン XI を発現させたシロイヌナズナでは、それぞれ原形質流動の高速化・低速化を伴い、植物が大型化・小型化することが明らかとなった。このことから原形質流動が、植物サイズの決定因子の一つであることが示された。本結果を踏まえ、これまで交わることの少なかった原形質流動と光合成の関係に関して想像を交えつつ議論したい。

### 1. はじめに

動物は、運動することによって自身の生存に適した環境へと随意に移動することができる。一方、陸上植物は基本的に一度根を下ろした場所から生涯動くことが出来ない。植物は、ソーラーパネルである葉を展開し、太陽光を光合成によって化学エネルギーへと変換し、最終的に子孫を残すために重要な花器官にエネルギーを送る、一つの装置だともいえる。根ざした環境下で装置を展開する植物にとって、周辺環境を検知し、それに見合った大きさや形に成長する仕組みは不可欠である。そのため植物は、動物にはない様々な環境応答機構を発達させてきた。一見動かない植物であるが、細胞の中を顕微鏡でのぞくと、“原形質流動”と呼ばれる動物に比べて非常に活発な細胞内輸送が行われている。原形質流動は、あらゆる植物（藻類から高等植物まで）の細胞でみられる現象であることから、植物にとって不可欠かつプリミティブなシステムだと考えられる。原形質流動は今から 200 年以上前、1774 年にイタリアの顕微鏡学者 Bonaventura Corti により、シャジクモの節間細胞において初めて見出された

<sup>1)</sup>。20 世紀に入って、神谷宣郎先生（筆者は孫弟子にあたる）らによって、原形質流動は原形質のゾル=ゲル界面での能動的な滑りによって発生すると考える“滑り説”が提唱された<sup>2)</sup>。その後、原形質流動は細胞小器官に結合した植物特異的なミオシン（クラス XI）がアクチン細胞骨格上を ATP の加水分解エネルギーを使って、方向性を持って滑り運動することにより発生することが明らかとなった<sup>3,4)</sup>。（図 1、実はどういった細胞小器官にミオシン XI が結合しているのかは今もって明らかになっていない）。

成長した植物細胞では液胞が細胞体積の 90%以上を占め、その中には様々なタンパク質分解酵素が含まれる。それ故、ミオシン XI のように、発現量が少なく、分子サイズの大きな機能性タンパク質（~170kDa）を、活性を保ったまま生化学的に単離精製することが非常に難しく、長らく分子レベルでの研究は進んでいなかった。近年筆者は、タバコ培養細胞から生化学的に単離精製したミオシン XI の研究によって、1 分子レベルでの形態や運動メカニズムを明らかにすることに成功した。ローターリーシャドウイングによる電子顕微鏡観察から、タバコミオシン XI は 2 量体で 2 つのモータードメインを持ち、さらに 6 つの IQ モチーフに軽鎖が結合した長いネック領域を持つことが明ら

<sup>‡</sup>解説特集「光合成の多様な世界について」

\*連絡先 E-mail: motominaga@waseda.jp

かとなった (図 1)。分子形態的には、動物で細胞内輸送を担っているミオシン V と類似していることが示された。さらに、ミオシン XI を結合させたビーズを光ピンセットで補足し、アクチン上を運動させることにより、ミオシン 1 分子の運動をナノメートルレベルで検出することに成功した。タバコミオシン XI は、2 つのモータードメインをアクチン上で交互に結合・解離させることによって、35 nm の歩幅であたかも人が歩くように長距離移動できる高速型 ( $\sim 7 \mu\text{m s}^{-1}$ ) のプロセシブモーターであることが明らかとなった。この高速運動は、モータードメイン (エンジン) における高い ATP 分解活性によって発生し、形態的に同タイプの動物ミオシン V よりも 10 倍速い速度を発生できることが分かった<sup>5-8)</sup>。分子レベルでの運動メカニズムはようやく明らかになってきたのだが、そもそも原形質流動の役割とは何か? 本質的な機能に関しては、200 年以上前の発見以来、今日に至るまで大きな謎として残っていた。

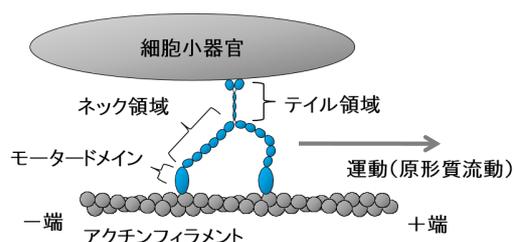


図 1 原形質流動の発生メカニズム

原形質流動は、アクチン繊維上を、細胞小器官に結合したモータータンパク質ミオシン XI が運動することによって発生している。

例えば、淡水産藻類シャジクモ (陸上植物の先祖) の原形質流動は  $50\sim 100 \mu\text{m s}^{-1}$  に達し、高等植物の原形質流動速度 ( $5\sim 20 \mu\text{m s}^{-1}$ ) のさらに 10 倍以上速い。シャジクモミオシン XI のモータードメインを昆虫細胞で発現・精製し、*In vitro motility assay* (ガラス表面にミオシンを結合させ、ATP 存在下で蛍光ラベルしたアクチンを滑り運動させる) により運動速度を測定したところ、シャジクモの原形質流動速度と一致する  $50\sim 70 \mu\text{m s}^{-1}$  を発生している事が見積もられ、生物界最速のモータータンパク質であることが明らかとなった<sup>9)</sup>。この超高速運動は、モータードメインにおける非常に高い ATP 分解活性と、アクチンミオシン複合体

からの速い ADP 解離に依存している<sup>10,11)</sup>。シャジクモの節間細胞は非常に大きく成長して 10 センチ以上に達することから、細胞内における、栄養や代謝産物、細胞壁前駆体、二酸化炭素あるいは植物ホルモンなどの拡散に速い原形質流動が不可欠だと推測されている<sup>12)</sup>。さらに、モデル植物シロイヌナズナにおいて、原形質流動の駆動力となっているミオシン XI を多重ノックアウトすると、原形質流動速度の低下に伴い、植物の成長が抑制される<sup>7)</sup>。以上のことから、原形質流動が植物の成長に密接に関係していることが推測される。近年、ミオシン XI の細胞内機能を解析するために、シロイヌナズナやタバコにおいて、ノックアウトや RNAi あるいはドミナントネガティブの過剰発現といった手法が盛んに用いられている。しかしながら従来の分子生物学的手法のみでは、原形質流動と植物成長との関係性を直接的に証明することはできなかった。原形質流動の本質的な機能に迫れる新しい解析システムはないのかと筆者らは考えた。

## 2. ミオシン XI の人工的速度改変

筆者らは、ミオシンの速度を規定しているモータードメインに、人工的速度改変 (高速化・低速化) を施し、植物で発現させ、植物高次レベルでの影響を見ることでミオシン速度 (原形質流動速度) の意義を明らかにしようと考えた。シロイヌナズナのミオシン XI には 13 種類ものアイソフォームが存在する (藻類やコケが数種類しか持たないことから、植物機能の高度化に伴いミオシン分子種も多様化したものと思われる)。この中で、原形質流動の主要な駆動力の一つと目されるミオシン XI-2 (運動速度約  $7 \mu\text{m s}^{-1}$ ) のモータードメインを、先ほど登場した生物界最速シャジクモミオシン XI (推定運動速度約  $50 \mu\text{m s}^{-1}$ )、あるいはヒトミオシン V (運動速度約  $0.2 \mu\text{m s}^{-1}$ ) のモータードメインと分子生物学的に置換することによって、人工的速度改変型キメラミオシン (高速型・低速型) を開発した (図 2)。ミオシンのボディに当たる部分はシロイヌナズナ由来で、モータードメイン (エンジン) のみを置換することで、ネック領域における軽鎖やテイル領域におけるオルガネラ結合能を保持したまま、アクチン上での運動速度のみを変化させることが期待できる。

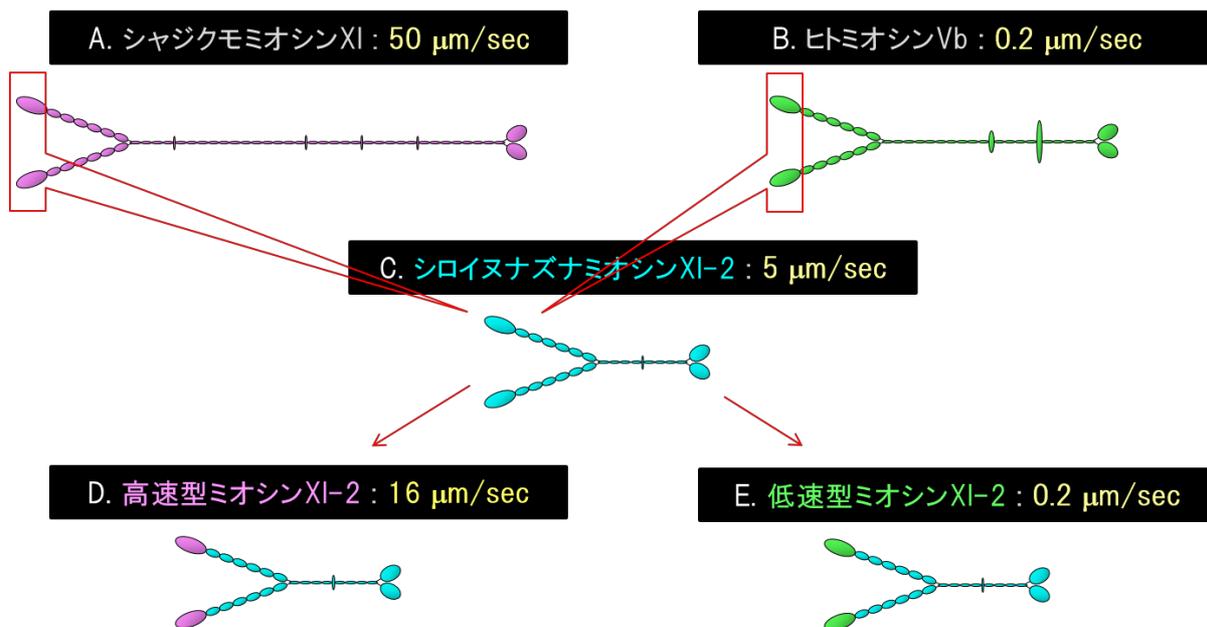


図2 速度改変型キメラミオシン XI

(A) シャジクモミオシン XI。 (B) ヒトミオシン Vb。 (C) 野生型ミオシン XI (シロイヌナズナミオシン XI-2)。 (D) 高速型ミオシン XI (シャジクモ-シロイヌナズナキメラミオシン XI-2)。 (E) 低速型ミオシン XI (ヒト-シロイヌナズナキメラミオシン XI-2) の模式図。ネックおよびテイル領域はシロイヌナズナミオシン XI-2 由来であるため、シロイヌナズナ内での軽鎖やオルガネラ結合能を保持したまま、運動速度のみを変化させることができる。

開発したキメラミオシンで期待された速度変化が得られているのか? *In vitro*、*In vivo* 両面からの検証を行った。まず、速度改変型ミオシン XI-2 を昆虫細胞で発現・精製し、*In vitro* motility assay により運動速度を評価した。その結果、野生型ミオシン XI-2 ( $7.2 \pm 0.5 \mu\text{m s}^{-1}$ ) に対して、高速型ミオシン XI-2 は約2倍の高速化 ( $16.0 \pm 0.9 \mu\text{m s}^{-1}$ )、低速型ミオシン XI-2 は1/35の低速化 ( $0.19 \pm 0.02 \mu\text{m s}^{-1}$ ) が明らかとなった。高速型キメラによる高速化が2倍程度で、本来のシャジクモミオシン XI が持つ運動速度に達していないのは、異種間ミオシンの融合による構造的不具合の可能性が考えられる。そのため現在、更なる高速化に向けた分子設計の見直しを行っている。次に、蛍光タンパク質 GFP を融合した野生型あるいは速度改変型ミオシン XI-2 を、シロイヌナズナ培養細胞で一過的に発現させ、*in vivo* における速度性能を評価した。野生型のみならず高速型・低速型ミオシン XI-2 共に、同様の膜状

のオルガネラに局在していたことから、特異的なオルガネラ結合能が保持されていることが示された。また、オルガネラの運動速度は、野生型に対し、高速型では増加、低速型では低下していることが明らかとなった。

### 3. 植物への影響

*In vitro*、*In vivo* 共に高速化・低速化が確認された速度改変型ミオシン XI-2 を、シロイヌナズナで発現させることによって植物の高次構造 (成長や形態形成) に及ぼす影響を解析した。速度改変型ミオシン XI-2 を、内在性の野生型ミオシン XI-2 をノックアウトしたシロイヌナズナ植物体 (ミオシン XI-2 シングルノックアウト株の成長や形態は野生株と変わらない) で native promoter により発現させた。その結果、高速型ミオシン XI-2 を発現させた株では植物が大型化、低速型ミオシン XI-2 を発現させた株では植物が小型化することが明らかとなった (図3)。



図3 速度改変型キメラミオシン発現株

(左) 野生株。(中央) 高速型発現株。(右) 低速型発現株。

この時、地上部における乾燥重量は、野生株に対し、高速型発現株では約 40%増加、低速型発現株では約 20%低下していた。植物サイズ変化の要因が“細胞数の変化”あるいは“細胞サイズの変化”によるのかを明らかにするため、葉肉細胞（第1本葉）のサイズ解析を行った。その結果、高速型発現株では、細胞面積が約 50%増大し、低速型発現株では約 30%減少していた。葉当たりの細胞数は変わらなかったことから、大型化・小型化の要因は、主に細胞サイズの増加・減少であることが示された。また、葉肉細胞と共に顕著なサイズ変化がみられた葉柄表皮細胞の原形質流動を観察することで、流動速度への影響を評価した。野生株（Columbia）では、方向性を持った活発な原形質流動（ $4.3 \pm 1.0 \mu\text{m s}^{-1}$ ）が観察された。一方、ミオシン XI-2 のノックアウト株では流速が阻害され、野生株の 1/4（ $1.0 \pm 0.3 \mu\text{m s}^{-1}$ ）であった。葉柄表皮細胞における原形質流動には、他の内在性ミオシン XI も関与するがミオシン XI-2 の寄与が大きいと考えられる。この XI-2 ノックアウト株に、野生型ミオシン XI-2 を発現させた植物では、原形質流動が野生株レベルまで回復した（ $4.5 \pm 1.0 \mu\text{m s}^{-1}$ ）。一方、低速型ミオシン XI-2 を発現する植物では、方向性を持った原形質流動はほとんど見られなかった。低速型がロードとなり、他の内在性ミオシン XI の運動も阻害していると考えられる。最後に、高速型ミオシン XI-2 を発現する植物では、野生株や野生型ミオシンを入れた植物に比べて、原形質流動速度が約 1.5~2 倍速くなっていた（ $7.5 \pm 1.2 \mu\text{m s}^{-1}$ ）。原形質流動は一般的に、小さい細胞よりも大きな細胞において流速が速くなることが知られている。これは、細胞の成長に伴い、ランダムだったアクチン繊維の配

向が細胞伸長方向に整列し、軌道が安定するためだと考えられる。今回の結果は、「細胞サイズが大きくなった結果、流速が上がった」という解釈も可能かもしれない。ただ、原形質流動速度はミオシン速度の  $V_{\text{max}}$  に規定されるため、ある程度細胞が成長すれば、流動速度も Plateau に達する（ミオシン速度以上の流速は出ない）。今回、1) 流速の測定は、発芽 20 日前後の成長した第 1 本葉の葉柄表皮細胞で行ったこと、2) 高速型発現株では野生株で観察される maximal velocity より速い流速が発生していたこと、3) サイズがそろった培養細胞においても、細胞内運動速度が野生型に対し高速型が増加していたこと、これらの点を考慮すると、「細胞サイズの増加に起因した流速の上昇」ではなく「ミオシン高速化による流速の上昇に起因した細胞サイズの増加」と考えるのが妥当ではないかと思われる。以上の結果より、原形質流動速度（ミオシン速度）と植物サイズ（細胞サイズ）に比例的な相関が示されたことから、原形質流動が植物サイズを規定する重要な因子であることが明らかとなった<sup>13)</sup>。

#### 4. 犯人は誰だ？

原形質流動が植物サイズを規定する因子であることは分かった。では、原形質流動は何を運ぶことによって植物の大きさを規定しているのか？原因物質（犯人）は特定できていない。原形質流動は文字通り、原形質全体の流動であることから、原形質中に含まれるあらゆる成長関連因子（栄養や代謝産物、植物ホルモン、細胞壁前駆体、二酸化炭素などなど）が容疑者として挙げられる。また、犯人は単独犯であるかもしれないし複数犯の可能性もある。捜査が難航する中、プレリミナルではあるが手がかりと思われる現象が見つかってきた。それは湿度 60%を境に、湿度が高いほどキメラの大型化・小型化が共に顕著に現れることである。どうやら犯人は湿度に関連した因子であることが示唆される。植物において一般的に湿度が高いほど、気孔の開度が大きくなる。気孔開度が大きい時、すなわち植物内の二酸化炭素濃度が高い時に、サイズ変化が顕著であるということから、細胞内あるいは細胞間の二酸化炭素輸送に原形質流動速度が効いている可能性が考えられる。光合成の専門誌で説明するのは恐縮であるが、気孔は、光合成に必要な唯一の二酸化炭素取り込み口である。したがって、気孔の抵抗値（開

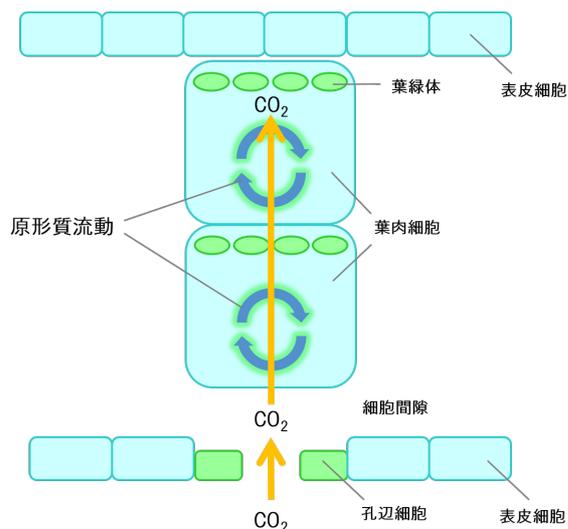


図4 葉肉内における原形質流動を介した二酸化炭素の輸送 (仮説)

度)は光合成速度にとって重要な因子であり二酸化炭素取り込みの第一の律速となっている。未発表データであるが、速度改変型ミオシン XI-2 発現株において、気孔の大きさや開度は野生株とほとんど差が見られなかった。従って、第一の律速である気孔抵抗への関与は少ないと考えられる。第二の律速である葉肉抵抗は、気孔以降葉緑体に至るまでのすべての組織体の抵抗を一括したものである。湿度に対する感受性および二酸化炭素が葉緑体に届くまでには必ずどこかでシンプラスト経路を通らなければならないという事から考えて、原形質流動が葉肉抵抗を規定する律速となっているのではないかと想像しつつ現在研究を進めている (図4)。

## 5. おわりに

生物界一速いミオシンを持つシャジクモ類は、分子系統学的解析から陸上植物の祖先だということが示唆されている。淡水産藻類であるシャジクモは、重力の影響の少ない水中で細胞を大きくすることによって高く成長した。大きく成長した細胞内における十分な物質循環を確保するために、シャジクモミオシン XI のような非常に速いミオシンを進化させる必要があったと予想される。おそらく、ミオシン XI の高速化に伴う ATP 消費よりも、細胞を大きくする選択のほうがエネルギー的に有利だったのだろう。一方、陸上に進出した植物は、小さい細胞を層状に積み重ねること

によって、高さを確保した。そうすることで、重力のみならず風、雨など、水中には無い物理的外力に対する剛性を獲得したのではないかと考えられる。この過程で、ミオシン XI の速度は小さい細胞サイズに最適化し遅くなったと考えられる。高速型ミオシン XI の発現は、いわば進化の逆行であり、それにより陸上でも植物が大型化することが明らかとなった。この人工的な大型化は、雨、風など物理的外圧の少ない実験室レベルでは有利かもしれないが、野生環境においては倒れやすくなるなど必ずしも有利に働くとは限らない。したがって逆の解釈も可能である。すなわち、陸上植物は本来のサイズよりも大きく育つポテンシャルがあるのだが、原形質流動速度によって、植物がそれぞれの生育環境に適した大きさに規定されているのではないかという仮説である。現状では想像の域を出ないが、植物は、原形質流動によって二酸化炭素の葉緑体への供給量を時間・空間的にコントロールすることで自身の大きさを制御しているという可能性は考えられないだろうか？また逆に、カナダモやオオセキショウモにおいて光合成が原形質流動に影響を与えるという知見が報告されている<sup>14,15)</sup>。おそらく、原形質流動と光合成には密接な関係があり、お互いの活性をうまくコントロール仕合うことで、植物の成長や形態形成を制御しているのではないかと想像している。本稿を機に、これまで接点が少なかった光合成の専門家の方々と議論いただける機会が持てれば幸いである。

## 謝辞

共同研究者の伊藤光二先生、中野明彦先生、新免輝男先生、山本啓一先生、横田悦男先生、原口武士博士、木村篤司さんにお礼を申し上げます。また、研究費を助成していただいた文部科学省および科学技術振興機構に深く感謝いたします。

最後に日本光合成学会のシンポジウム「多様な光合成の世界」での講演と本執筆の機会を与えてくださいました、梶達也先生 (東京理科大学)、園池公毅先生 (早稲田大学) に感謝いたします。

Received March 6, 2015; Accepted March 20, 2015

## 参考文献

1. Corti, B. (1774) Osservazioni microscopiche sulla tremella e sulla circolazione del fluido in una pianta acquajuola. Lucca.
2. Kamiya, N. and Kuroda, K. (1956) Velocity distribution of the protoplasmic streaming in *Nitella* cells. *Bot. Mag. Tokyo* 69, 544–554
3. Shimmen, T. and Yokota, E. (2004) Cytoplasmic streaming in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 68–72.
4. Yamamoto, K., Shimada, K., Ito, K., Hamada, S., Ishijima, A., Tsuchiya, T. and Tazawa, M. (2006) *Chara* myosin and the energy of cytoplasmic streaming. *Plant Cell Physiol.* 47, 1427–1431.
5. Tominaga, M., Kojima, H., Yokota, E., Orii, H., Nakamori, R., Katayama, E., Anson, M., Shimmen, T. and Oiwa K. (2003) Higher plant myosin XI moves processively on actin with 35 nm steps at high velocity. *EMBO J.* 22, 1263–1272.
6. Tominaga, M., Kojima, H., Yokota, E., Nakamori, R., Anson, M., Shimmen, T. and Oiwa, K. (2012) Calcium-induced mechanical change in the neck domain alters the activity of plant myosin XI. *J. Biol. Chem.* 287, 30711–30718.
7. Tominaga, M. and Nakano, A. (2012) Plant-Specific Myosin XI, a Molecular Perspective. *Front. Plant Sci.* 3, 211.
8. Diensthuber, R.P., Tominaga, M., Preller, M., Hartmann, F.K., Orii, H., Chizhov, I., Oiwa, K., Tsiavaliaris, G. (2015) Kinetic mechanism of *Nicotiana tabacum* myosin-11 defines a new type of a processive motor. *FASEB J.* 29, 81–94.
9. Ito, K., Kashiyama, T., Shimada, K., Yamaguchi, A., Awata, J., Hachikubo, Y., Manstein, D.J., and Yamamoto, K. (2003) Recombinant motor domain constructs of *Chara corallina* myosin display fast motility and high ATPase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 958–964.
10. Ito, K., Ikebe, M., Kashiyama, T., Mogami, T., Kon, T., and Yamamoto, K. (2007) Kinetic mechanism of the fastest motor protein, *Chara* myosin. *J Biol Chem.* 282, 19534–19545.
11. Ito, K., Yamaguchi, Y., Yanase, K., Ichikawa, Y., and Yamamoto, K. (2009) Unique charge distribution in surface loops confers high velocity on the fast motor protein *Chara* myosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 21585–21590.
12. Verchot-Lubicz, J. and Goldstein, R.E. (2010) Cytoplasmic streaming enables the distribution of molecules and vesicles in large plant cells. *Protoplasma* 240, 99–107.
13. Tominaga, M., Kimura, A., Yokota, E., Haraguchi, T., Shimmen, T., Yamamoto, K., Nakano, A., Ito, K., and Tominaga, M. (2013) Cytoplasmic streaming velocity as a plant size determinant. *Dev. Cell.* 27, 345–52.
14. Seitz, K. (1964) Das Wirkungsspektrum der Photodinese bei *Elodea Canadensis*. *Protoplasma* 58, 621–640.
15. Takagi, S., Yamamoto, K. T., Masaki, F. and Nagai, R. (1990) Cooperative regulation of cytoplasmic streaming and Ca<sup>2+</sup> fluxes by Pfr and photosynthesis in *Vallisneria* Mesophyll Cells. *Plant Physiol.* 94, 1702–1708.

## Cytoplasmic Streaming and Photosynthesis

Motoki Tominaga\*

Department of Biology, Faculty of Education and Integrated Arts and Science, Waseda University and JST,

PRESTO

## 自然界の多様性を生かした研究戦略：珪藻の世界<sup>‡</sup>

兵庫県立大学 大学院生命理学研究科

菓子野 康浩\*

珪藻が地球上に出現したのは中生代で、比較的最近の出来事である。しかし、すでに 10 万以上の種が存在すると見られ、現代の地球上の一次生産の約四分の一を珪藻が担っていると推測されており、藻類の中では最も多様化と繁栄を果たしてきたと言える。珪藻は、地球上の多様な環境下で見出され、それらの環境下では、光合成生物にとって最も重要な環境因子である光の質・強度の相異も多様である。そのため、珪藻の自然環境に対する適応・馴化の戦略も多様である可能性がある。本稿では、珪藻の生息する環境の多様性を概観し、10 万種以上もある中からほんの 2 例ではあるが、環境応答戦略の多様性の一端をうかがわせる事例を紹介する。

### 1. はじめに

言うまでもなく地球上には多種多様な環境が存在し、生物の存在および活動は環境との関わり抜きに考えることはできない。生物は、その生きている周りの環境との対話を通して生命活動を営んでいる。その環境には、物理化学的な環境、およびそのような環境と生物との長い関わりで形成された環境とがある。後者には、林床の光環境や生物活動によって形成された土壌、大気組成等がある。物理化学的環境は、温度、湿度、水、光など環境要素が多岐に亘り、さらにそれらの要素が複合して、ある環境が形成される。光合成生物にとって最も重要な環境要因は光である。解放域では光強度はいっぱんに強く、岩陰、洞窟、海の中などは光強度が小さくなる。また、海洋では海面からの深度が大きくなるにつれて光強度が小さくなるとともに、クロロフィルの Qy バンドが吸収する赤色域の光が減って相対的に青～緑の光が強くなる<sup>1, 2)</sup>という質の変化も起こる。光合成生物にとって光合成反応のために光は必須であるが、強すぎる光は光阻害に繋がる。また、同じ光強度でも、温度により各種の酵素反応の速度が異なることを反映し、温度が低いと光阻害を起こしやすくなる場合もある<sup>3)</sup>。このような各種環境要素の総合としての局所環境に適応し、光合成生物は光

合成を行いつつ生命活動を営んでいるわけである。局所環境への適応の結果、その局所環境と似た環境が広範囲に広がると、その生物の生育可能域も広がることになる。

光合成を行うための光を獲得するために、光合成生物は光環境に応じてその光環境に適した光捕集系を獲得してきたと考えられる。光化学系反応中心はシアノバクテリアから高等植物に至るまでほぼ同じ構造をしているとみられるが、反応中心複合体でも調節に関わると考えられるサブユニットや、光捕集色素タンパク質複合体にはバリエーションがある。そのバリエーションは、シアノバクテリア、紅藻、といった種類ごとにある程度のまとまりを見ることができる。光合成生物は、このように多様な種類の集合体である。光合成研究を進めるにあたって、光合成生物の多様性が環境の多様性と密接に関わっていることとあわせて考えることで、光合成反応にとって必須の事項や、環境に合わせて獲得され、光合成の効率を調節するための装置についての本質についての理解も深めることができるかと期待される。本稿では、地球上の多様な環境に生きる珪藻を事例に、自然界の多様性と光合成について概観する。

<sup>‡</sup>解説特集「光合成の多様な世界について」

\*連絡先 E-mail: kashino@sci.u-hyogo.ac.jp

## 2. 珪藻の特徴

珪藻は他の多くの酸素発生型光合成生物が緑色系の色を呈しているのとは異なり、褐色を呈する。いわゆる二次共生生物のひとつで、2 mm 程度の巨大珪藻もいるが、多くは数  $\mu\text{m}$ ~数十  $\mu\text{m}$  程度の大きさの単細胞性微細藻類である。その珪藻が地球上に出現したのは比較的最近で、約 2 億 5 千万年前の中生代である<sup>4)</sup> (菊谷ら<sup>5)</sup>に解説がある)。珪藻は中心目と羽状目とに分けられるが、まず中心目が出現し、中生代後期までに中心目から羽状目に分かれたと考えられている<sup>4)</sup>。比較的歴史の浅い生物群であるが、非常に多様化しており、現在では 1 万から 10 万の種が存在するとされる<sup>1,4)</sup>。被子植物の種数には及ばないものの、紅藻の約 6,000 種、褐藻の約 1,500 種、緑藻の約 2,500 種、シアノバクテリアの約 1,500 種<sup>1)</sup>に比べると、非常に多い。種数に加え光合成生産高も高く、現在の人類によって大量消費されている原油中のバイオマーカーの研究によると、原油の主要な生産者が珪藻であったと推定されている<sup>6-9)</sup>。また現在我々人類が多量に利用している珪藻土も珪藻の死骸の堆積物であり、おびただしい量の珪藻が生息していた時代があったことが分かる。そして現在では、一個体の大きさが 1mm にも満たない珪藻が、地球の年間光合成生産量の 20~25%を担っていると推計されている<sup>10)</sup>。これは、熱帯雨林の光合成量<sup>11)</sup>に匹敵するほどである。このようなことから、珪藻は藻類の中では最も多様化と繁栄を果たしてきたと言える。

珪藻が光合成を行うための光捕集色素タンパク質複合体は、フコキサンチン・クロロフィル結合タンパク質複合体 (FCP) である。アポタンパク質は、緑色植物の光捕集色素タンパク質と同じく Lhc ファミリーに属し<sup>12)</sup>、その遺伝子の数はゲノムの解読された中心目珪藻 *Thalassiosira pseudonana*<sup>13)</sup>で 33、羽状目珪藻 *Phaeodactylum tricornutum*<sup>14)</sup>で 40 である。これらは、クラシカルな光捕集色素タンパク質 Lhcf、紅藻の LHCI に相同の Lhcr、強光保護に関与する可能性が指摘されている Lhcx の 3 種類に分類される<sup>12)</sup>。光合成色素としては、他の酸素発生型光合成生物と同様のクロロフィル *a* に加え、クロロフィル *c* とフコキサンチンが結合しているという特徴がある (図 1-A)。ポルフィリン骨格のクロロフィル *c* は、クロリンである他のクロロフィルと異なり、Qy バンドの吸収が極めて小さい。光

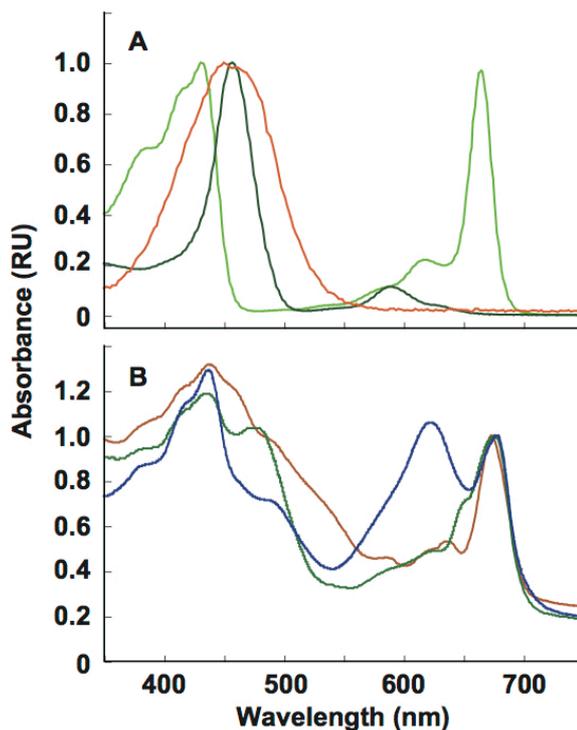


図 1 珪藻の光合成色素 (A) と微細藻類細胞 (B) の吸収スペクトル

A は溶媒中のクロロフィル *a* (薄い緑)、クロロフィル  $c_1+c_2$  (濃い緑)、フコキサンチンの吸収スペクトルを示し、それぞれの最大吸収波長で正規化してある。B は、培地中での中心目珪藻 *Chaetoceros gracilis* (茶)、緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (緑)、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 細胞の吸収スペクトルで、Qy バンドの最大吸収波長で正規化してある。

吸収特性に影響を与えないが、フィトールを持たない点でも他のクロロフィルと異なる。クロロフィル *c* は  $c_1$ 、 $c_2$ 、 $c_3$  が主要なものであるが、珪藻にはクロロフィル  $c_1$ 、 $c_2$  が含まれる。クロロフィル  $c_3$  は、ハプト藻に見出される色素である。クロロフィル  $c_1$  と  $c_2$  の構造上の相異はごくわずかで (8 位がエチル基かビニル基か)、吸収スペクトルはよく似ており、また HPLC での分離も容易ではない。細胞の色素分析等のために光合成色素を溶媒で抽出すると、これらの色素が混合した状態では緑色に見える。しかし、これらの光合成色素とタンパク質が結合した FCP 複合体は、色素とアポタンパク質との相互作用により褐色を呈する。しかも、反応中心複合体よりも多量に存在するため、反応中心複合体の緑色を覆い隠してしまい、珪藻の細胞は独特の茶褐色である。この特徴のため、シアノバクテリアや緑色植物に比較すると、緑色の領域の光を吸収する能力が格段に高い (図 1-B)。この特徴は、海洋での光

合成にとって好都合である。上述のように、水中ではクロロフィルの Qy バンド領域の光が少なく、緑色の領域の光が多い。緑色の光を吸収する特性を持つ珪藻は、そのような光環境で有効に光を吸収することが可能となる。クロロフィル *a* と補助色素の化学量論比は、中心目珪藻 *Chaetoceros gracilis* では Chl *a*:Chl *c*:fucoxanthin=100:45:130<sup>15)</sup>、羽状目珪藻 *P. tricornutum* では Chl *a*:Chl *c*:fucoxanthin = 100:38:127<sup>16)</sup> と相互に近い値が報告されているが、報告によって開きがある<sup>17-20)</sup>。この値のばらつきが種によるものか、生育光環境（強度や質）によるものかは、検証が必要である。ただし、中心目珪藻 *C. gracilis* および羽状目珪藻 *P. tricornutum* では、生育光強度による細胞内光合成色素組成の変化は非常に小さい<sup>21)</sup>（図 2）。実験室における単離株のみならず、オーストラリアと南極の間の南洋の自然環境下<sup>22)</sup>やサロマ湖の海水に付着したアイスアルジー<sup>23)</sup>でも同様に、環境中の光強度による変化が少ない傾向が観察されている。

FCP には、光捕集に関わる上記の光合成色素に加え、キサントフィルサイクル色素も結合している<sup>24-26)</sup>。緑色植物のキサントフィルサイクルは、ピオラキサニンが強光環境下で酵素により脱エポキシ化されて、アンテラキサニンへ、さらにゼアキサニンへと変換され、過剰な光を熱として放散し、過剰光環境下で光化学系を保護する<sup>27)</sup>（図 3-A）。脱エポキシ化により共役二重結合が増加するため、吸収スペクトルの長波長側がより長波長へと延びる。過剰光環境が緩和されると、エポキシ化が進行し、ピオラキサニンの形へと変換される。珪藻のキサントフィルサイクルは、機能的には相同であるが、よりシンプルにディアディノキサニン（エポキシ型）とディアトキサニン（脱エポキシ型）の二つのキサントフィルサイクルで構成され（図 3-B）、ディアディノキサニンサイクルとも呼ばれる。強光照射によりディアディノキサニンは酵素により迅速にディアトキサニンに変換され、非光化学的消光により過剰な光エネルギーを消散する<sup>24, 25)</sup>。これらの色素は、生育光強度が大きいと、プールサイズも大きくなる（図 2）<sup>21)</sup>。このような変化は、実験室における単離株のみならず、南洋の自然環境下<sup>22)</sup>でも同様の傾向が観察された。エポキシ基が一つのアンテラキサニンとディアディノキサニン、エポキシ基のないゼアキサニンとディアトキサニン

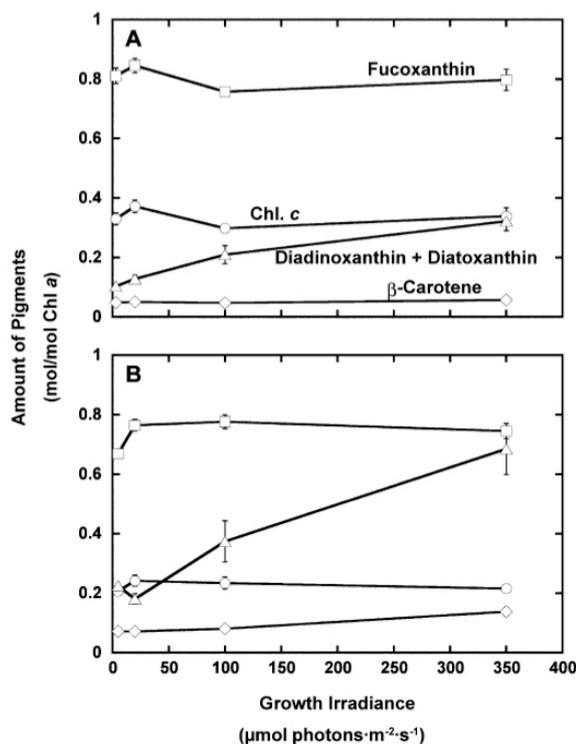


図2 生育光強度の変化に応じた光合成色素組成の変化

各色素の量をクロロフィル *a* に対するモル比で示してある。A; *Chaetoceros gracilis*, B; *Phaeodactylum tricornutum*。□フコキサニン、○クロロフィル *c*<sub>1</sub>+*c*<sub>2</sub>、△ディアディノキサニン+ディアトキサニン、◇β-カロテン。Ban ら<sup>21)</sup>より許可を得て転載。

の溶媒中での吸収スペクトルはほぼ一致する（図 3 の A、B を比較）。珪藻を含む黄色植物と緑色植物は進化上異なる系統と見られるが、過剰な光環境下で光化学系を保護するための仕組みとして異なるキサントフィル色素を進化の過程で採用したにもかかわらず、結果的によく似た吸収スペクトルを持つ色素による、ほぼ似た仕組みになったことは、興味深い。ただし、クロロフィル *c* を補助色素として有する光合成生物は、同じくディアディノキサニンサイクルを有するが、黄金色藻の *Ochromonas smithii*, *O. itoi*<sup>28)</sup>や *Giraudypsis stellifer*<sup>29)</sup>、褐藻の *Pelvetia canaliculata* や *Laminaria saccharina*<sup>30)</sup>ではピオラキサニンを軸としたキサントフィルサイクルが主として機能している。したがって、これら二つのキサントフィルサイクルの起源は密接に関連していると考えられており、さらにフコキサニンの生合成にも繋がっていると考えられている<sup>31)</sup>。

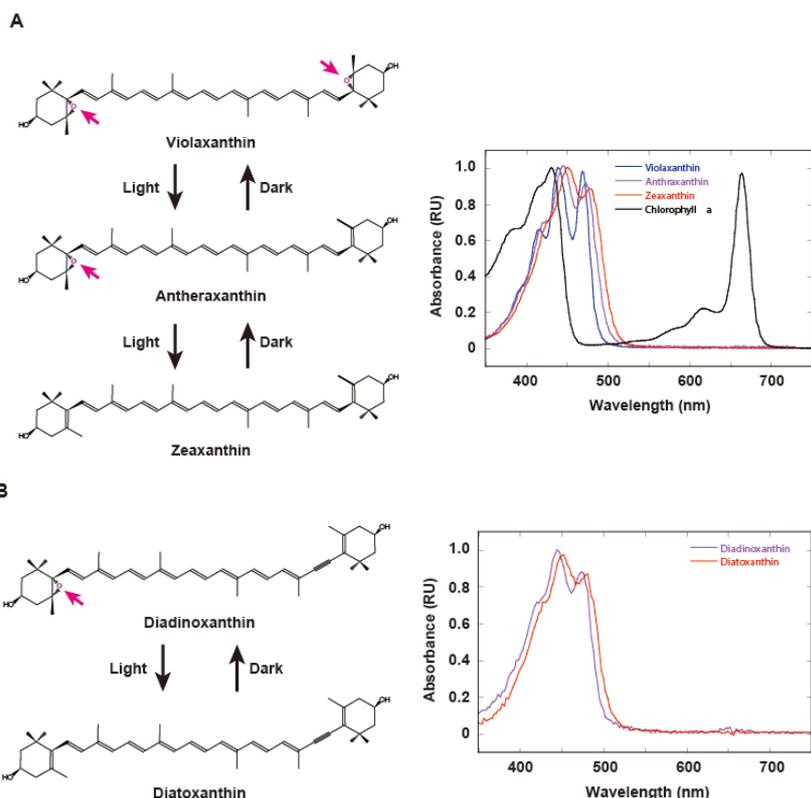


図3 キサントフィルサイクル  
 緑色植物のキサントフィルサイクル  
 (A) と黄色植物のディアディノキ  
 サンチンサイクル (B)。

珪藻は、光合成産物をトリアシルグリセロール (TAG) の形で細胞内に蓄積する種類が多い。TAGは通常、細胞内に油滴として蓄積される。珪藻の油脂蓄積量は比較的大きい<sup>9,32)</sup>。生育条件、生育ステージや種によって細胞内蓄積量は異なるが、細胞の乾燥重量当たり16~47%の油脂量が報告されている<sup>32)</sup>。緑藻 *Botryococcus braunii* の最大70~75%<sup>32,33)</sup>には及ばないものの、珪藻細胞重量の60%程度が珪酸の被殻<sup>34)</sup>であることを勘案すると、珪藻の細胞内油脂蓄積量は非常に大きいといえる。そのため、産業的利用可能性の面から注目される存在でもある。

上述のように珪藻は、珪酸質の殻に包まれている。種ごとにその文様が異なる。地球の炭素の循環に多大な貢献をしている珪藻であるが、同時に地球上の珪素の循環にも重要な役割を果たしている<sup>10)</sup>。珪酸質の堅牢な被殻であるため、細胞を保護する効果が期待されるが、東南アジアでは養殖エビの餌として利用され、日本でも稚貝・稚魚の餌として価値の高い珪藻も知られており、また、極洋の生態系を支える重要な一次生産者でもあることから、捕食者から細胞を守る効果は小さいのかもしれない。この固い珪酸質の殻が細胞の大きさを規定するため、細胞分裂に伴って細胞の大きさは小さくなって行かざるを得ない。細胞の大きさを

回復するために、有性生殖が行われる。この珪酸質の堅牢な被殻は、珪藻の光合成系の生化学的解析の妨げになってきたと考えられる。この被殻を破壊して健全なチラコイド膜を *Cylindrotheca fusiformis* から得るためにフレンチプレスが用いられ報告されたのは1998年<sup>35)</sup>のことである。我々の研究により *C. gracilis* から凍結・融解により容易に健全なチラコイド膜を調製することができ<sup>36)</sup>、珪藻の光化学系の詳細な解析が可能となったが<sup>15,37)</sup>、このような方法を適用することができる珪藻が一般的ではない。*P. tricornutum* や *T. pseudonana* からはガラスビーズを用いた手法によりチラコイド膜を健全に調製することができるようになったので (投稿準備中)、今後、各種の珪藻の光合成系の生化学的解析が進むものと期待される。

### 3. 多様な珪藻

珪藻の生息域は広く、76度で生育する好熱性の珪藻から、氷点下で生育する好冷性の珪藻も存在する。また、pH1.9の強酸性の湖沼、pH11の強アルカリ性のナクール湖 (ケニア)、塩分濃度が海水の3倍もあるグレートソルト湖 (アメリカ) のような環境で棲息する珪藻も存在する<sup>38)</sup>。もちろん、そのような環境要素

は複合的に構成されることが多く、日本の酸性温泉でも珪藻が見出されている<sup>39)</sup>。

珪藻は摂氏零度前後の環境から、温泉のような高温域まで存在するが、バイオマスとしては比較的温度の低い環境が多いとみられる。南洋で微細藻類の分布が調べられているが、南緯 45 度の中緯度域では珪藻の現存量は小さく ( $\sim 1 \times 10^4$  cells/L)、南緯 65 度の高緯度域に向かって現存量の増加 ( $\sim 8 \times 10^4$  cells/L) が報告されている<sup>40)</sup>。この傾向は渦鞭毛藻 ( $6 \times 10^4 \Rightarrow 0.5 \times 10^4$  cells/L) やシアノバクテリア ( $3 \times 10^7 \Rightarrow \sim 0$  cells/L) とは対照的である<sup>40)</sup>。近年、人工衛星による観測から、水圏のクロロフィルの現存量が測定されるようになった (SeaWiFS; <http://seawifs.gsfc.nasa.gov>)。それによると、北極海沿岸や南極大陸沿岸など寒冷な環境にクロロフィルの現存量の高い領域が集中している<sup>41-43)</sup>。珪藻はその主要な構成グループとみられ、生態系を支える基礎生産者である。このような寒冷海域では、冬季には季節海氷が発達し、その季節海氷の底部が茶褐色に呈色することが知られている (図 4)。これはアイスアルジーと呼ばれる微細藻類が多量に存在することによる。アイスアルジーとは、氷の結晶、あるいは氷の結晶の間隙にある水の中など、海氷と密接に関わり合っている微細藻類とされる<sup>44,45)</sup>。アイスアルジーには渦鞭毛藻も含まれるが、主要な構成生物は珪藻である<sup>46,47)</sup>。日本でも、近年結氷期間が短くなってきたが、結氷期のサロマ湖等でアイスアルジーが観察される<sup>23,48)</sup>。

珪藻は、海洋表層の光の 1% 程度の有光層下部や海氷下部でも光合成を行うため、弱光適応型である<sup>49)</sup>。また、常温性の珪藻の増殖速度 (世代時間) は、単離株の *Chaetoceros muelleri* で約 12 時間<sup>50)</sup>、*P. tricornutum* で 32 時間以上<sup>51)</sup>の報告がある。最近、このような珪藻の一般的に知られた性質を打ち破るものが日本の研究者により報告された。香川県高松市内の河口干潟で単離された中心目ツノケイソウ属の *Chaetoceros salsugineum* で、30°C、700  $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  の条件で増殖速度定数 0.54 h (世代時間約 1.3 時間) という驚異的な増殖特性を強光下で示している<sup>52)</sup>。しかし、このような増殖特性をもっても干潟が *C. salsugineum* で埋まることはなく、その生態系の仕組みの解明が待たれる。



図 4 海氷下部に付着しているアイスアルジー  
バフィン湾にて、砕氷船により割られた海氷が裏返り、アイスアルジーが付着している海氷下部が露出された場面 (画面中央の濃い茶色に見える部分)。

羽状目には付着性の種が数多く知られている。イカダケイソウ (図 5) はすだれのように細胞同士が接着し、接着面がスライドすることによって南京玉すだれのような運動をする。運動性があるため、その生育環境における光合成のための光獲得戦略は興味深い。

周知ではないが、珪藻に特異的なウイルスが存在することが日本の研究者から報告されている<sup>53,54)</sup>。珪藻はしばしば高密度に増殖するので (ブルーム、珪藻赤潮)、珪藻ウイルスは、結果的に生態系の維持に働いているのかもしれない。珪藻は、稚貝・稚魚やエビの養殖の餌としての利用価値が高い種類もあるが、自然

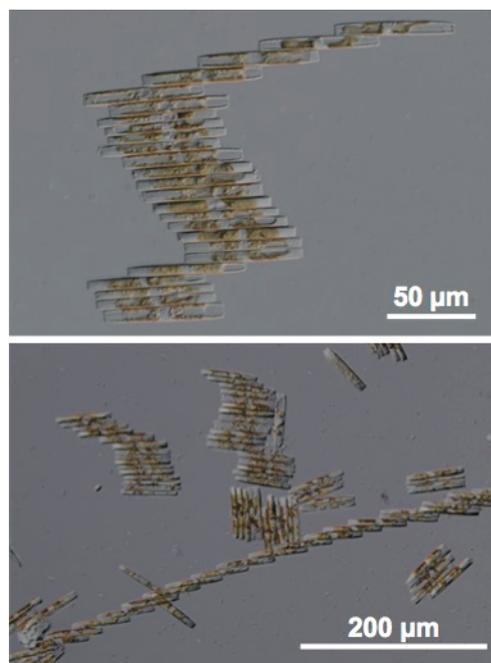


図 5 イカダケイソウ  
山岡望海氏撮影。

界で大増殖をすると、漁業の妨げになることもある。そのため、珪藻ウィルス天然の珪藻防除剤として利用することが考えられている。また、珪藻の形質転換のためのプロモータ開発にも利用されている。

#### 4. 多様な珪藻の環境応答戦略

一口に珪藻と言っても光強度変化への応答戦略が異なることを伺わせる現象をほんの一例であるが、紹介する。中心目の *C. gracilis* と羽状目の *P. tricornutum* を光強度を変えて培養すると、どちらの珪藻でも光捕集を担う補助色素（フコキサンチンとクロロフィル *c*）の生育光強度に応じた組成変化は小さかった（図 2）。一方、ディアディノキサントフェン色素は、*P. tricornutum* では強光下（300  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ）で培養すると弱光培養に比べて顕著に増加したが、*C. gracilis* では若干の増加が見られたのみであった（図 2）。さらに、両者の間では NPQ（非光化学的消光）の変化に、大きな相異が見られた。*C. gracilis* では、強光下培養でディアディノキサントフェン色素が増加してはいるものの、強光照射されても NPQ は小さく、培養光強度が大きくなるにつれ、NPQ は却って小さくなる傾向が見られた（図 6、左のカラム）。一方、*P. tricornutum* では培養時の光強度が高いほど NPQ が高く、また、同じ光強度で培養された細胞では、照射光強度が強いほど、NPQ 活性は高かった（図 6、右のカラム）。ただし、最も弱い光（3  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ）で培養した *P. tricornutum* の細胞では、ディアディノキサントフェン色素含量が少ないにもかかわらず、大きな NPQ が観測された。現在、この仕組みの解明を進めているところである。このように生育光強度に対する二つの珪藻の応答は大きく異なるが、キサントフィルサイクル活性の低い *C. gracilis* の方が強光下でも勢いよく増殖することができる。*P. tricornutum* は強光環境に対して主にキサントフィルサイクルに依存し、*C. gracilis* は光合成電子伝達系から下流への電子のフローを大きくして強光下での処理能力増強によって対処している可能性が考えられる。また、両珪藻は生育光強度に応じて光化学系 I、系 II への光エネルギーの配分を調節しているが、その配分の仕方は異なるようである（*P. tricornutum* は弱光環境下で光化学系 I により多くの光エネルギーを配分する。投稿準備中）。珪藻ではステート遷移は知られていないので<sup>55)</sup>、これら

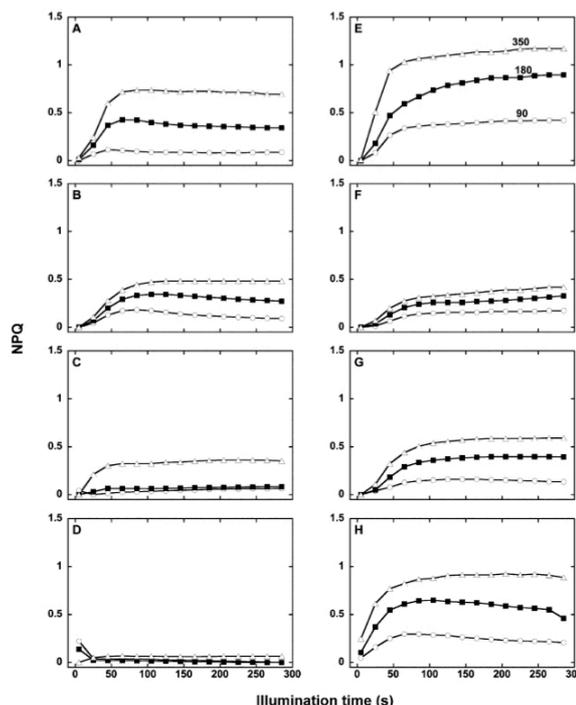


図6 生育光強度の変化に応じたキサントフィルサイクル活性 (NPQ) の変化

左; *Chaetoceros gracilis*, 右; *Phaeodactylum tricornutum*. 培養光強度は、上から 3、20、100、350  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . それぞれの培養細胞に 90 (○)、180 (■)、350 (△)  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  の光を照射して測定した。Ban ら<sup>21)</sup>より許可を得て転載。

の珪藻を材料にして強光応答機構について現在詳細な解析を進めているところである。

#### 5. おわりに

珪藻の環境適応戦略を理解し、珪藻がなぜ藻類の中で最も多様化と繁栄を果たしてきたかを解明するためには、光合成の生理学的特性を究明するとともに、その特性を実現している光合成電子伝達系・炭酸固定系の生化学的特性・構造生物学的特性と関連づけ、光合成機構の調節システムを細胞内の他の代謝系と合わせて理解することが重要であろう。このようなアプローチは、従来の単一の研究分野ではカバーできないため、個体レベルの生理学的現象をタンパク質の構造・機能およびゲノム情報や生理生態学的解析に基づいて総合的に捉える融合的研究が必要である。我々の研究グループではこのような取り組みをフィジオロミクスと名付け、珪藻の一つの種を対象に研究を進めている。しかし、一般的にはこのような取り組みはモデル生物以外では困難であり、上記のように、珪藻に

限っても種による多様性が大きいので、あらゆる種を網羅的に研究対象とすることは不可能である。昨今、再生可能エネルギー開発の機運と連動し、有用微細藻類を見出すためのスクリーニングが積極的に行われている。そのような取り組みの中で、産業的な有用性には適合しなくとも、特異な形質を有する株が見出されたときに、それを外部に発信し、研究対象として供するような仕組みがあると、多様性の理解に繋がり、ひいては有用形質利用系へと繋がることも期待される。また、生態系における珪藻の重要性は古くから認識され、生態学的研究の蓄積は非常に大きい。したがって、生態学との連携も重要であろう。一方、現代の生命科学研究では分子生物学的手法が欠かせない。モデル珪藻二種のゲノムが公開されており<sup>13,14</sup>、パーテイクルガンによる珪藻の形質転換系も開発され<sup>56-58</sup>、とくにモデル珪藻 *P. tricornutum* で成功裏に利用されている<sup>56</sup>。最近、エレクトロポレーションを用いた方法が開発され<sup>59,60</sup>、*P. tricornutum* では効率が格段に向上した<sup>60</sup>。種により適用可能性が異なる可能性が高いが<sup>59</sup>、これらの手法を応用して多様な珪藻に適用できるようになると、多様性の理解がより進展することが期待される。

## 謝辞

個々のデータ取得に関わった方の名前を挙げませんが、多くの院生、学生や共同研究者の力によるものであり、ここに感謝申し上げます。また、イカダケイソウの写真を提供くださった山岡望海氏、および本執筆の機会をいただきました輛達也、園池公毅両教授に感謝申し上げます。

Received March 18, 2015; Accepted March 22, 2015

## 参考文献

1. Falkowski, P.G. and Raven, J.A. (2007) *Aquatic Photosynthesis* 2nd Ed, Princeton University Press, Princeton, USA.
2. Kirk, J.T.O. (1994) *Light & Photosynthesis in Aquatic Ecosystems* 2nd Ed, Cambridge University Press, Cambridge.
3. Sonoike, K. (1998) Various aspects of inhibition of photosynthesis under light/chilling stress: "Photoinhibition at chilling temperatures" versus "chilling damage in the light". *J. Plant Res.* 111, 121-129.
4. Sims, P.A., Mann, D.G. and Medlin, L.K. (2006) Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data. *Phycologia* 4, 361-402.
5. 菊谷早絵, 中島健介 and 松田祐介 (2012) 細胞工学による海洋性珪藻無機炭素獲得系および<sup>13</sup>C CO<sub>2</sub>感知系の研究. *光合成研究* 22, 185-192.
6. Hunt, J.M. (1979) *Petroleum Geochemistry and Geology*, W. H. Freeman and Co., San Francisco, CA.
7. Levorsen, A.I. and Berry, F.A.F. (1967) *Geology of Petroleum* 2nd Ed, W. H. Freeman and Co., San Francisco, CA.
8. North, F.K. (1985) *Petroleum Geology*, Allen & Unwin, Boston.
9. Ramachandra, T.V., Mahapatra, D.M., Karthick, B. and Gordon, R. (2009) Milking diatoms for sustainable energy: biochemical engineering versus gasoline-secreting diatom solar panels. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 8769-8788.
10. Nelson, D.M., Tréguer, P., Brzezinski, M.A., Leynaert, A. and Quéguiner, B. (1995) Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic silica sedimentation. *Global Biogeochem. Cy.* 9, 359-372.
11. Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T. and Falkowski, P. (1998) Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281, 237-240.
12. Green, B.R. (2003) The Evolution of Light-harvesting Antennas, in *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis* (Green, B.R. and Parson, W.W. Eds), pp 129-168 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
13. Armbrust, E.V., Berges, J.A., Bowler, C., Green, B.R., Martinez, D., Putnam, N.H., Zhou, et al. (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* 306, 79-

- 86.
14. Bowler, C., Allen, A.E., Badger, J.H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., et al. (2008) The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456, 239–244.
  15. Ikeda, Y., Komura, M., Watanabe, M., Minami, C., Koike, H., Itoh, S., Kashino, Y. and Satoh, K. (2008) Photosystem I complexes associated with fucoxanthin-chlorophyll-binding proteins from a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 351–361.
  16. Berkaloff, C., Caron, L. and Rousseau, B. (1990) Subunit organization of PSI particles from brown algae and diatoms: polypeptide and pigment analysis. *Photosyn. Res.* 23, 181–193.
  17. Beer, A., Gundermann, K., Beckmann, J. and Büchel, C. (2006) Subunit composition and pigmentation of fucoxanthin-chlorophyll proteins in diatoms: evidence for a subunit involved in diadinoxanthin and diatoxanthin binding. *Biochemistry* 45, 13046–13053.
  18. Guglielmi, G., Lavaud, J., Rousseau, B., Etienne, A.L., Houmard, J. and Ruban, A.V. (2005) The light-harvesting antenna of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. Evidence for a diadinoxanthin-binding subcomplex. *FEBS J.* 272, 4339–4348.
  19. Papagiannakis, E., M., v.S.I.H., Fey, H., Büchel, C. and van Grondelle, R. (2005) Spectroscopic characterization of the excitation energy transfer in the fucoxanthin-chlorophyll protein of diatoms. *Photosynth. Res.* 86, 241–250.
  20. Veith, T. and Büchel, C. (2007) The monomeric photosystem I-complex of the diatom *Phaeodactylum tricorutum* binds specific fucoxanthin chlorophyll proteins (FCPs) as light-harvesting complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 1428–1435.
  21. Ban, A., Aikawa, S., Hattori, H., Sasaki, H., Sampei, M., Kudoh, S., Fukuchi, M., Satoh, K. and Kashino, Y. (2006) Comparative analysis of photosynthetic properties in ice algae and phytoplankton inhabiting Franklin Bay, the Canadian Arctic, with those in mesophilic diatoms during CASES 03-04. *Polar Biosci.* 19, 11–28.
  22. Hashihama, F., Umeda, H., Hamada, C., Kudoh, S., Hirawake, T., Satoh, K., Fukuchi, M. and Kashino, Y. (2010) Light acclimation states of phytoplankton in the Southern Ocean, determined using photosynthetic pigment distribution. *Mar. Biol.* 157, 2263–2278.
  23. Aikawa, S., Hattori, H., Gomi, Y., Watanabe, K., Kudoh, S., Kashino, Y. and Satoh, K. (2009) Diel tuning of photosynthetic systems in ice algae at Saroma-ko Lagoon, Hokkaido, Japan. *Polar Sci.* 3, 57–72.
  24. Arsalane, W., Rousseau, B. and Duval, J.-C. (1994) Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: Competition between photoprotection and photoinhibition. *Photochem. Photobiol.* 60, 237–243.
  25. Kashino, Y. and Kudoh, S. (2003) Concerted response of xanthophyll-cycle pigments in a marine diatom, *Chaetoceros gracilis*, to the shifts of light condition. *Phycol. Res.* 51, 168–172.
  26. Olaizola, M. and Yamamoto, H.Y. (1994) Short-term response of the diadinoxanthin cycle and fluorescence yield to high irradiance in *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 30, 606–612.
  27. Demmig-Adams, B. (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* 1020, 1–24.
  28. Tanabe, Y., Shitara, T., Kashino, Y., Hara, Y. and Kudoh, S. (2011) Utilizing the effective xanthophyll cycle for blooming of *Ochromonas smithii* and *O. itoi* (Chrysophyceae) on the snow surface. *PLoS One* 6, e14690.
  29. Lichtlé, C., Arsalane, W., Duval, J.C. and Passaquet, C. (1995) Characterization of the light-harvesting complex of *Giraudopsis stellifer* (Chrysophyceae) and effects of light stress. *J. Phycol.* 31, 380–387.
  30. Harker, M., Berkaloff, C., Lemoine, Y., Britton, G., Young, A., Duval, J.-C., Rmiki, N.-E. and Rousseau, B. (1999) Effects of high light and desiccation on the operation of the xanthophyll cycle in two marine brown algae. *Eur. J. Phycol.* 34, 35–42.
  31. Lohr, M. and Wilhelm, C. (1999) Algae displaying

- the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8784–8789.
32. Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306.
  33. Shifrin, N.S. and Chisholm, S.W. (1981) Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J. Phycol.* 17, 374–384.
  34. Sicko-Goad, L.M., Schelske, C.L. and Stoermer, E.F. (1984) Estimation of intracellular carbon and silica content of diatoms from natural assemblages using morphometric techniques. *Limnol. Oceanogr.* 29, 1170–1178.
  35. Martinson, T.A., Ikeuchi, M. and Plumley, F.G. (1998) Oxygen-evolving diatom thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1409, 72–86.
  36. Ikeda, Y., Satoh, K. and Kashino, Y. (2005) Characterization of photosystem I complexes purified from a diatom, *Chaetoceros gracilis*, in *Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives* (van der Est, A. and Bruce, D. Eds) Vol 1, pp 38-40 Alliance Communications Group, Kansas.
  37. Nagao, R., Ishii, A., Tada, O., Suzuki, T., Dohmae, N., Okumura, A., Iwai, M., Takahashi, T., Kashino, Y. and Enami, I. (2007) Isolation and characterization of oxygen-evolving thylakoid membranes and Photosystem II particles from a marine diatom *Chaetoceros gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 1353–1362.
  38. 千原光雄 (1997) 藻類多様性の生物学, 内田老鶴圃, 東京.
  39. 長島秀之 (2010) 温泉微生物と社会, 温泉科学 60, 278–286.
  40. Wright, S.W., Thomas, D.P., Marchant, H.J., Higgins, H.W., Mackey, M.D. and Mackey, D.J. (1996) Analysis of phytoplankton of the Australian sector of the Southern Ocean: comparisons of microscopy and size frequency data with interpretations of pigment HPLC data using the "CHEMTAX" matrix factorisation program. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 144, 285–298.
  41. Arrigo, K.R., Dieckmann, G., Gosselin, M., Robinson, D.H., Fritsen, C.H. and Sullivan, C.W. (1995) High resolution study of the platelet ice ecosystem in McMurdo Sound, Antarctica: biomass, nutrient, and production profiles within a dense microalgal bloom. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 127, 255–268.
  42. Arrigo, K.R., Robinson, D.H. and Sullivan, C.W. (1993) A high resolution study of the platelet ice ecosystem in McMurdo Sound, Antarctica: Photosynthetic and bio-optical characteristics of a dense microalgal bloom. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 98, 173–185.
  43. Arrigo, K.R. and van Dijken, G.L. (2004) Annual cycles of sea ice and phytoplankton in Cape Bathurst polynya, southeastern Beaufort Sea, Canadian Arctic. *Geophys. Res. Lett.* 31, L08304.
  44. Horner, R.A. (1976) Sea-ice organisms. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 14, 167–182.
  45. Horner, R.A. (1985) Ecology of sea ice microalgae, in *Sea Ice Biota* (Horner, R.A. Ed), pp 83–103 CRC Press, Boca Raton.
  46. Michel, C., Legendre, L., Demers, S. and Therriault, J.-C. (1988) Photoadaptation of sea-ice microalgae in springtime: photosynthesis and carboxylating enzymes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 50, 177–185.
  47. Michel, C., Legendre, L., Therriault, J.-C., Demers, S. and Vandavelde, T. (1993) Springtime coupling between ice algal and phytoplankton assemblages in southeastern Hudson Bay, Canadian Arctic. *Polar Biol.* 13, 441–449.
  48. Kashino, Y., Fujimoto, K., Akamatsu, A., Koike, H., Satoh, K. and Kudoh, S. (1998) Photosynthetic pigment composition of ice algal and phytoplankton assemblages in early spring in Saroma ko lagoon, Hokkaido, Japan. *Proc. NIPR Symp. Polar Biol.* 11, 22–32.
  49. Ikeya, T., Kashino, Y., Kudoh, S., Imura, S., Watanabe, K. and Fukuchi, M. (2000) Acclimation of photosynthetic properties in psychrophilic diatom isolates under different light intensities. *Polar Biosci.* 13, 43–54.

50. Chen, S.-Y., Pan, L.-Y., Hong, M.-J. and Lee, A.-C. (2012) The effects of temperature on the growth of and ammonia uptake by marine microalgae. *Bot. Studies* 53, 125–133.
51. Nelson, D.M., D'Elia, C.F. and Guillard, R.R.L. (1979) Growth and competition of the marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*. II. Light limitation. *Mar. Biol.* 50, 313–318.
52. Ichimi, K., Kawamura, T., Yamamoto, A., Tada, K. and Harrison, P.J. (2012) Extremely high growth rate of the small diatom *Chaetoceros salsugineum* isolated from an estuary in the eastern Seto Inland Sea, Japan. *J. Phycol.* 48, 1284–1288.
53. Nagasaki, K., Y., T., Katanozaka, N., Shirai, Y., Nishida, K., Itakura, S. and Yamaguchi, M. (2004) Isolation and characterization of a novel single-stranded RNA virus infecting the bloom-forming diatom *Rhizosolenia setigera*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 704–711.
54. Tomaru, Y., Toyoda, K., Kimura, K., Hata, N., Yoshida, M. and Nagasaki, K. (2012) First evidence for the existence of pennate diatom viruses. *ISME J.* 6, 1445–1448.
55. Owens, T.G. (1986) Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: II. Distribution of excitation energy between the photosystems. *Plant Physiol.* 80, 739–746.
56. Apt, K.E., Kroth-Pancic, P.G. and Grossman, A.R. (1996) Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mol. Gen. Genet.* 252, 572–579.
57. Dunahay, T.G., Jarvis, E.E. and Roessler, P.G. (1995) Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila*. *J. Phycol.* 31, 1004–1012.
58. Miyagawa-Yamaguchi, A., Okami, T., Kira, N., Yamaguchi, H., Ohnishi, K. and Adachi, M. (2011) Stable nuclear transformation of the diatom *Chaetoceros* sp. *Phycol. Res.* 59, 113–119.
59. Ifuku, K., Yan, D., Miyahara, M., Inoue-Kashino, N., Yamamoto, Y.Y. and Kashino, Y. (2015) A stable and efficient nuclear transformation system for the diatom *Chaetoceros gracilis*. *Photosynth. Res.* 123, 203–211.
60. Miyahara, M., Aoi, M., Inoue-Kashino, N., Kashino, Y. and Ifuku, K. (2013) Highly efficient transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by multi-pulse electroporation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 874–876.

## Understanding of the Adaptation/Acclimation Strategy to the Diversity in the Nature: in the World of Diatom

Yasuhiro Kashino\*

Graduate School of Life Science, University of Hyogo

## クロロフィルを制した者が光環境を征した？ 光合成生物を「食べる」生き様の舞台裏<sup>†</sup>

<sup>1</sup>福井工業大学大学院工学研究科, <sup>2</sup>JST さきがけ, <sup>3</sup>立命館大学大学院生命科学研究科  
<sup>4</sup>筑波大学生命環境系

柏山 祐一郎<sup>1,2,3,\*</sup> 横山 亜紀子<sup>4</sup> 民秋 均<sup>3</sup>

酸素発生型光合成が支える現在の地球生命圏では、クロロフィルの光毒性、すなわち光合成に不可欠なクロロフィルの光増感作用に起因する一重項酸素の生成は、生命にとって潜在的な脅威である。しかし、この光毒性が顕在化して生物が致命的なダメージを被るような現象が身の回りにはあふれている様子はない。実際には、クロロフィル光毒性の脅威は様々な形で巧みに回避されている。本稿では、クロロフィルの光増感作用について概説し、近年ようやく研究が進んできたクロロフィルの「解毒」機構、特に著者らが取り組んでいる微細藻類食プロティストによるクロロフィルの代謝について解説し、生命進化を駆動した要因としてのクロロフィルの光毒性について考える。

### 1. はじめに

クロロフィルは、地球生命の光合成の仕組みにとって不可欠な因子であるが故に、様々な生態系を成立せしめているエネルギーフローの基点を形成する、いわば地球生命圏の要（かなめ）分子である。しかし同時に、細胞レベルにおいて、クロロフィルは化学反応性の高い「危険な因子」の代表例でもある。すなわち、精密な制御がなされないフリーのモノマーとして存在する場合には、クロロフィルは光毒性を示す。しかも、このクロロフィルの「危険な」性質は、実は「光合成で不可欠である」性質と表裏を為すものである。したがって、この「危険な因子」のターンオーバープロセスでは、副反応によって代謝経路に阻害を生じたり、あるいは破壊的なダメージの連鎖が細胞全体に及んだりするような事態は回避せねばならず、そのため様々な仕組みが、進化の過程で自然選択され現存しているものと考えられる。

クロロフィルは光励起状態の寿命が比較的に長いので、他の分子へ効率よくエネルギー移動を起こしうる。この性質が光合成の光反応の過程を可能としている一方で、クロロフィルの励起エネルギーが酸素分子に

与えられると、一重項酸素と呼ばれる、強力な酸化力を有し細胞毒性の高い分子が生じてしまう。このため、クロロフィルの光毒性の制御は、植物細胞のダイナミクスにおいて、あるいは、後述する捕食-被食などの細胞間の相互作用において潜在的に極めて重要だと考えられる。この問題は、3つの基本的な因子全てが揃って初めて惹起される：すなわち、光増感剤（後述）であるクロロフィル分子と、適度なエネルギーを持つ光子（クロロフィルが吸収できる近紫外から可視光域の光）、それに最終的にエネルギーを受容する酸素分子である。なお、基底状態が三重項状態である酸素分子の直接的な光励起による一重項状態への遷移は禁制であり、光増感剤無しには起こらない。

特に、クロロフィルの光毒性は、クロロフィルを光受容アンテナとして光合成電子伝達を駆動し、水の酸化によって光合成タンパク質近傍に酸素分子が発生する酸素発生型光合成生物、すなわち、藻類や陸上植物において、クロロフィルの光毒性は本質的な問題である。現実には、光合成の仕組みにおいては、クロロフィルは光合成関連タンパク質中に正確に配置されることで「精密な制御」を受けていると考えられる<sup>1)</sup>。これにより、適度な光子フラックスの中で効率よく光合成電子伝達系にエネルギーを供給し、あるいは必要十分にカロテノイド等を経由して緩和されている。い

<sup>†</sup>解説特集「光合成の多様な世界について」

\*連絡先 E-mail: chiro@fukui-ut.ac.jp

ずれの場合にも、クロロフィル分子が受容したエネルギーは、遅くとも数ナノ秒以内に他の隣接する分子に移動することによって、速やかに基底状態に戻される。

つまりクロロフィルの光毒性は、健全な光合成の仕組みでみられるような速やかなエネルギー移動が起こらない場合において顕現化する。この状況において、クロロフィルの光増感作用こそが生命にとって戦略的に制御すべき因子になる（上述の光毒性に関する3つの因子のうち光と酸素は現在の地球表層環境の普遍的な要素であるため）。次章では、まず、クロロフィルの光化学を俯瞰し、特に「光毒性」と呼ばれる性質について解説する（この部分は、おおむね Kashiya and Tamiaki<sup>2)</sup>の部分的邦訳）。その上で、クロロフィルの光毒性を制御・無効化するための分解代謝プロセスについて最新の成果を紹介し、生命、特に真核生物の進化におけるクロロフィルの光毒性の関わりについて論じる。

## 2. クロロフィルの光毒性とその静的な制御機構

クロロフィルは、近紫外から可視光領域全域（種類によっては近赤外域まで）にわたる幅広い吸収帯を有する分子である<sup>3)</sup>。多くのπ共役系をもつ有機分子と同じく、基底状態にあるクロロフィルは一重項状態である(S<sub>0</sub>状態)。クロロフィルが1光子のエネルギーを吸収して励起されると、まず、エネルギー準位の最も低い一重項励起状態であるS<sub>1</sub>状態まで、熱エネルギーを放出して緩和される(図1)。クロロフィルとそ

の誘導体の特徴は、遊離状態においてS<sub>1</sub>状態の寿命(Φ<sub>S</sub>)が比較的長いことにある(3.5~6.0 ns程度<sup>4)</sup>)。S<sub>1</sub>状態にあるクロロフィルは、その後、大きく分けて3つの過程をたどってさらに緩和される。そのうちの2過程では、蛍光(fl)を発する(光エネルギーの放出)、あるいは内部転換(ic)によって熱エネルギーを放出することで、S<sub>0</sub>状態にまで緩和される(図1; それぞれの量子収率をΦ<sub>fl</sub>およびΦ<sub>ic</sub><sup>S</sup>と表す)。もう一つの過程では項間交差が起こり、より安定な三重項の励起状態(T<sub>1</sub>状態)に遷移する(図1; 項間交差の量子収率はΦ<sub>T</sub>と表す)。したがって、単量体のクロロフィルの近傍にエネルギー移動を受けうる他の分子が存在しない限りにおいて、1光子励起の緩和過程の量子収率は:

$$\Phi_{fl} + \Phi_{ic}^S + \Phi_T = 1$$

と表現される。重要なことに、クロロフィルやその脱金属誘導体であるフェオフィチンなどにおいてはS<sub>1</sub>状態の寿命が長いだけでなく、S<sub>1</sub>状態とT<sub>1</sub>状態間のエネルギー差が小さいため、Φ<sub>T</sub>の値が大きくてT<sub>1</sub>状態に高確率で遷移する(図1)。T<sub>1</sub>状態からは燐光(ph)を発する(光エネルギーの放出)か項間交差(isc)によって熱エネルギーを放出するかして、S<sub>0</sub>状態にまで緩和される(図1)。したがって、それぞれの量子収率をΦ<sub>ph</sub>ないしΦ<sub>isc</sub><sup>T</sup>とおくと、以下の関係

$$\Phi_T = \Phi_{ph} + \Phi_{isc}^T$$

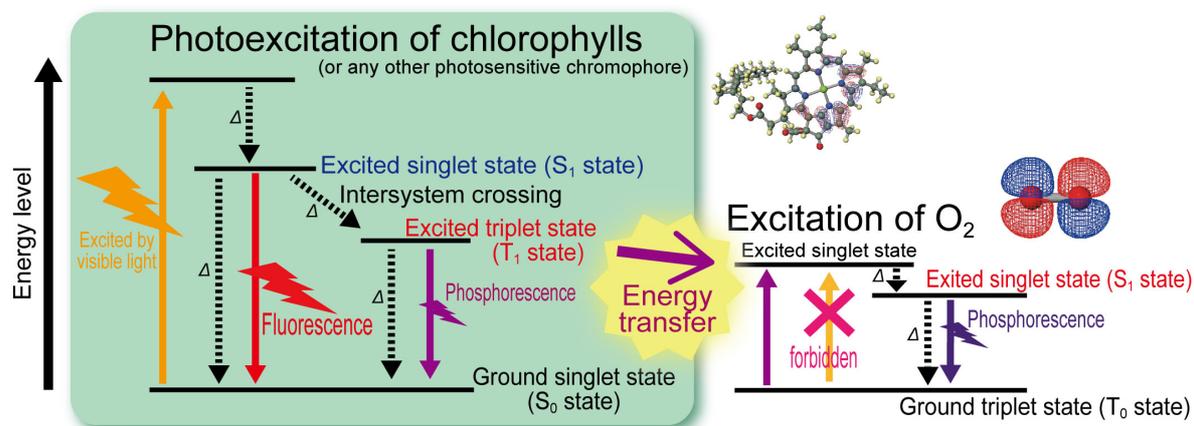


図1. 色素の光励起と光物理的過程、および光増感作用  
 柏山・横山<sup>35)</sup>より一部改変。

という関係が成り立つ。

さて、三重項状態にある分子が同じく三重項状態( $T_1$ 状態)にあるクロロフィルに対して相互作用しうる距離に存在する場合、分子間のエネルギー移動が起こる。例えば、我々が普段呼吸している大気中の酸素分子は、基底状態にあって三重項状態をとっている( $T_0$ 状態)。この三重項酸素( $^3O_2$ )が $T_1$ 状態にあるクロロフィルに近接すると、クロロフィルが $S_0$ 状態に緩和されると同時に一重項状態に励起された酸素分子、すなわち一重項酸素( $^1O_2$ )が生じる(図1)。この三重項エネルギー移動では、分子間で対電子の交換が起こる必要があるため(Dexterエネルギー移動)、分子軌道の交差が起こる程度に2分子がかなり接近する必要がある(ファンデルワールス半径以下;約4 Å以内)。この点で一般的に、アンテナタンパク質内部において、比較的離れたクロロフィル分子間で起こるような一重項エネルギー移動である Förster 共鳴エネルギー移動(FRET)と異なっている。このように、禁制である $T_0$ 状態から $S_1$ 状態への項間交差を伴う励起を促す作用を、光増感作用(クロロフィルは「光増感剤」と呼ぶ。

ところで、分子の衝突が要求される三重項エネルギー移動においては、 $T_1$ 状態の寿命が重要になる。クロロフィルは $T_1$ 状態の寿命が非常に長いため( $\phi_T = 0.8 \sim 1.5$  ms程度<sup>4)</sup>)、非常に高い確率で三重項酸素へエネルギーが移動しうる(この量子収率を $\phi_{\Delta}^T$ とおく)。実質的には、全ての $T_1$ 状態のクロロフィルは一重項酸

素の発生に寄与しうると考えられる(すなわち $\phi_{\Delta}^T \approx \phi_T$ )。

一重項酸素の化学的性質は通常三重項酸素のそれとは全く異なるものである。 $\Delta$ 状態にある一重項酸素( $^1\Delta_g$ 状態)にあっては、縮退した反結合性 $\pi$ 軌道のうちの1つが空軌道となるため(もう一つは2電子が占有)、この不安定な空軌道を埋めるべく強力な酸化力が生じる(図2)。このような不安定性にもかかわらず、 $^1\Delta_g$ 状態から基底状態である $^3\Sigma_g$ 状態への逆項間交差を伴う遷移は強い禁制であるため、一重項酸素の寿命は特異的に長く( $\phi_{\Delta} \approx 3.5 \mu\text{s}$  in cells<sup>7)</sup>)、細胞内でかなりの距離を拡散しうる。このように、クロロフィルの光増感作用によって、強力な酸化剤である一重項酸素が細胞内で発生しうるのである。

ところで、 $T_1$ 状態にあるクロロフィル(Chl)は他の分子への電子移動、すなわち光化学反応(pc)も引き起こしうる。特に、三重項酸素への電子移動により活性酸素種であるスーパーオキシドアニオン( $O_2^{\cdot-}$ )が発生し、同時に強力な酸化力を有するクロロフィルカチオンラジカル( $Chl^{\cdot+}$ )になる(この光化学反応の量子収率を $\phi_{pc}^T$ とおく)。一重項酸素を含め、これらは全て細胞に対して破壊的に作用しうる。

さて、ここでもう2つの過程、すなわち、クロロフィルの $S_1$ 状態からのFRET及び光化学反応を考慮し、それぞれの量子収率を $\phi_{FRET}^S$ および $\phi_{pc}^S$ とおく。すると、相互作用しうる分子の存在下における、クロロフィルの光励起の緩和過程の量子収率は、以下の関係式にま

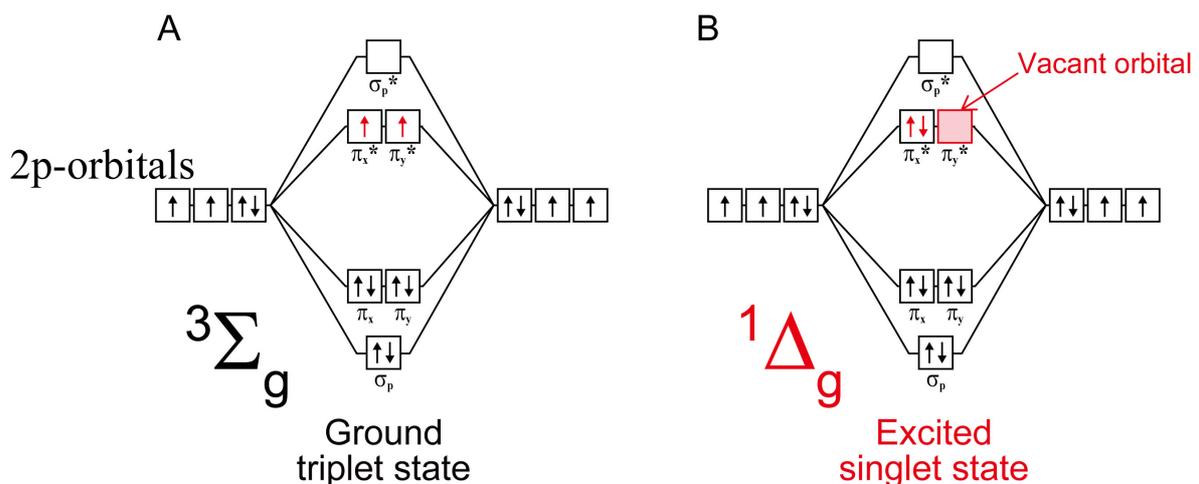


図2. A.三重項状態、およびB.一重項状態にある酸素分子の分子軌道ダイアグラム

柏山・横山<sup>35)</sup>より一部改変。一重項酸素( $^1\Delta_g$ )ではエネルギー準位の高い空の $\pi$ 電子軌道が存在し、これが電子を求めることにより強い酸化力を示す。なお、酸素分子の一重項酸素への励起は電子状態が異なるため禁制であり、通常は光増感作用が無ければ発生しない。

とめられる。

$$\Phi_n + \Phi_{ic}^S + \Phi_{FRET}^S + \Phi_{pc}^S + \Phi_T = 1$$

$$\Phi_T = \Phi_{ph} + \Phi_{isc}^T + \Phi_{\Delta}^T + \Phi_{pc}^T$$

このうち、 $\Phi_{\Delta}^T$ と $\Phi_{pc}^T$ の2項が光毒性に関連する。よって、 $\Phi_{FRET}^S$ と $\Phi_{pc}^S$ の項を相対的に大きくすることにより、生物はクロロフィルの光毒性を抑制しうることが分かる。興味深いことに、光合成の初期過程においてはこの2つの緩和過程、すなわちクロロフィル分子間のFRET過程（アンテナにおける集光過程）と $S_1$ 状態からの電子移動（反応中心における電荷分離）が寄与しており、光合成という仕組みの本質、特にそのはじまりを考える上で重要ではないだろうか。なお、 $\Phi_n$ 、 $\Phi_{ph}$ 、 $\Phi_{ic}^S$ 、および $\Phi_{isc}^T$ であらわされる緩和過程は基本的に生物により制御しうる性質のものではない。

健全な光合成器官においては、クロロフィルに加えてカロテノイドの光化学的な性質を利用した、いわば静的なクロロフィル光毒性の制御がなされている。すなわち、クロロフィルは $\Phi_{FRET}^S$ で表される $S_1$ 状態にあるクロロフィルからのFRET過程の緻密な調整と、さらに予備的な $T_1$ 状態にあるクロロフィルのエネルギーをカロテノイドに逃がす仕組みによって光毒性が回避されている。前者では、複数のクロロフィルがタンパク質複合体中に適切な空間配置（効率的なFRETを担保する分子の距離と配向）をとり<sup>8)</sup>、また、周辺アンテナから反応中心に向かって $S_1$ 状態励起エネルギーの勾配（タンパク質の溶媒効果による）<sup>9)</sup>が用意され、発熱を伴う効率的なエネルギー移動が可能となっている。さらに、余剰な $S_1$ 状態励起エネルギーは、同じく光合成器官に緻密に配向されたある種のカロテノイド分子にFRETにより受け渡され<sup>10)</sup>、そのカロテノイドにおいて熱的に緩和される仕組みが備わっている（カロテノイドは $\Phi_{ic}^S \approx 1$ ）。それでも過剰な励起エネルギーを処理しきれない場合、項間交差が起り、クロロフィルが $T_1$ 状態に遷移してしまうが、この $T_1$ 状態励起エネルギーも、ファンデルワールス半径内のごく近傍に配されたある種のカロテノイドに対して速やかに移動され<sup>11-14)</sup>、そこでやはり熱的に緩和される（カロテノイドは $\Phi_{\Delta}^T \approx 0$ ）。つまり、カロテノイドを含めた光合成器官の色素システム全体として、

$\Phi_{FRET}^S$ 、 $\Phi_{ic}^S$ および $\Phi_{isc}^T$ を増大させて $\Phi_{\Delta}^T + \Phi_{pc}^T$ を抑制しているとみなすことができる。それでもなお、一重項酸素が発生してしまった場合でも、カロテノイド類にはこれをエネルギー移動により緩和する能力が知られている。光合成器官におけるクロロフィル光毒性の問題については、Kashiyama and Tamiaki<sup>2)</sup>にもう少し詳しく解説したので参考にされたい。

### 3. クロロフィルの無毒化代謝と光毒性の動的な制御機構

さて、「クロロフィルの光毒性の制御に関わる3つの基本的なファクター」をもう一度考えてみる。根本的にこの問題を解消する手立てとして、そもそも単量体分子としてのクロロフィルの光増感作用を失わせるということも考え得る。これはすなわち、クロロフィルを光無毒性の分子に代謝することである。上述の量子収率の式で表現するならば、 $\Phi_{ic}^S$ あるいは $\Phi_{ic}^S + \Phi_{isc}^T$ を1にする（この場合 $\Phi_n + \Phi_{ph}$ は0になる）、あるいは $\Phi_T$ を0に近づける変化が要求される。この化学変化を伴う制御は、静的な機構である光合成タンパク質内での制御とは対照的な、動的な機構である。

現在までに、2種類のクロロフィルの光無毒化のプロセスが知られている。そのうちの 하나가、被子植物の紅葉や枯葉の際にクロロフィルの緑色が「消失」する現象であり、ここではクロロフィルが最終的に無色で可視光領域の蛍光を発しない直鎖テトラピロール化合物まで分解される（図3）<sup>15)</sup>。この変化では、 $\Phi_{ic}^S$ が大きくなると共に、 $\Phi_S$ 減少と $S_1$ 状態/ $T_1$ 状態間のエネルギー差の拡大により $\Phi_T$ も0に近づく。この代謝経路は、その特徴的なクロリン環の開環ステップを触媒するPheophorbide *a* oxygenaseから「PAO経路」と称される。重要なことに、PAO経路の全ての中間代謝産物は光毒性であり、野生株では基本的に中間代謝産物は蓄積されない。この精密に制御された代謝経路により、色素体内のクロロフィルは全て分解・搬出されて、最終産物は液胞内に蓄積される（最後の液胞内における自発的異性化反応により完全に無毒化される）。

この紅葉におけるクロロフィルの「消失」現象は長らく謎に包まれていたが、ここ20年ほどの研究で、モデル植物に関してはおおよそが解明された<sup>16,17)</sup>。PAO経路には10近くの酵素やトランスポーターが関与すると考えられ、多くの還元力や自由エネルギーが

消費される (図 3)。しかも、窒素原子を含む最終代謝産物は、植物自身により再利用されることなく環境中に捨て去られる。被子植物は、このような大きなコストを割いてまでもクロロフィルを無毒化し「制する」ことで、死にゆく細胞からクロロフィルを含んでいたタンパク質という栄養を回収することを可能としていると考えられる。PAO 経路の詳細に関しては、クロロフィルの光毒性の観点から Kashiya and Tamiaki<sup>2)</sup> の中にまとめた。さらに詳しくは、Tanaka *et al.*<sup>17)</sup>などを参考にされたい。以下では、著者らが中心となり発見されたもう一つの無毒化プロセスについて詳しく解説することにする。

#### 4. 微細藻類食プロティストによるクロロフィルの無毒化代謝

光合成器官の光化学的な制御システムが外力によって乱される場合、例えば細胞自体が捕食・消化されるような状況においては、制御を失ったクロロフィル

の光毒性が顕在化すると予想される。特に照射下では、単量体として遊離されたクロロフィルやその誘導体により一重項酸素が発生することで、捕食者の細胞が深刻なダメージを被る可能性が考えられる。大型生物の消化器官はクロロフィルに対して暗黒であるため (生体組織の光散乱やへムや水の吸収などにより生体深部にはほとんど届かない)、クロロフィルの光毒性は問題にならない。光が消化器を透過してしまうような小型の多細胞生物では、人為的な操作によってクロロフィルの光毒性が顕在化するケースが知られている<sup>18)</sup>。また、光線力学療法 (photodynamic therapy ; PDT) と呼ばれる医療技術では、クロロフィル誘導体やその他の光増感剤を疾患組織に作用させた上で光を照射し、発生する一重項酸素などにより組織を選択的に壊死させている<sup>19)</sup>。光毒素の副作用は重大であるため、この治療期間前後には患者は暗室での生活を強いられることになる。

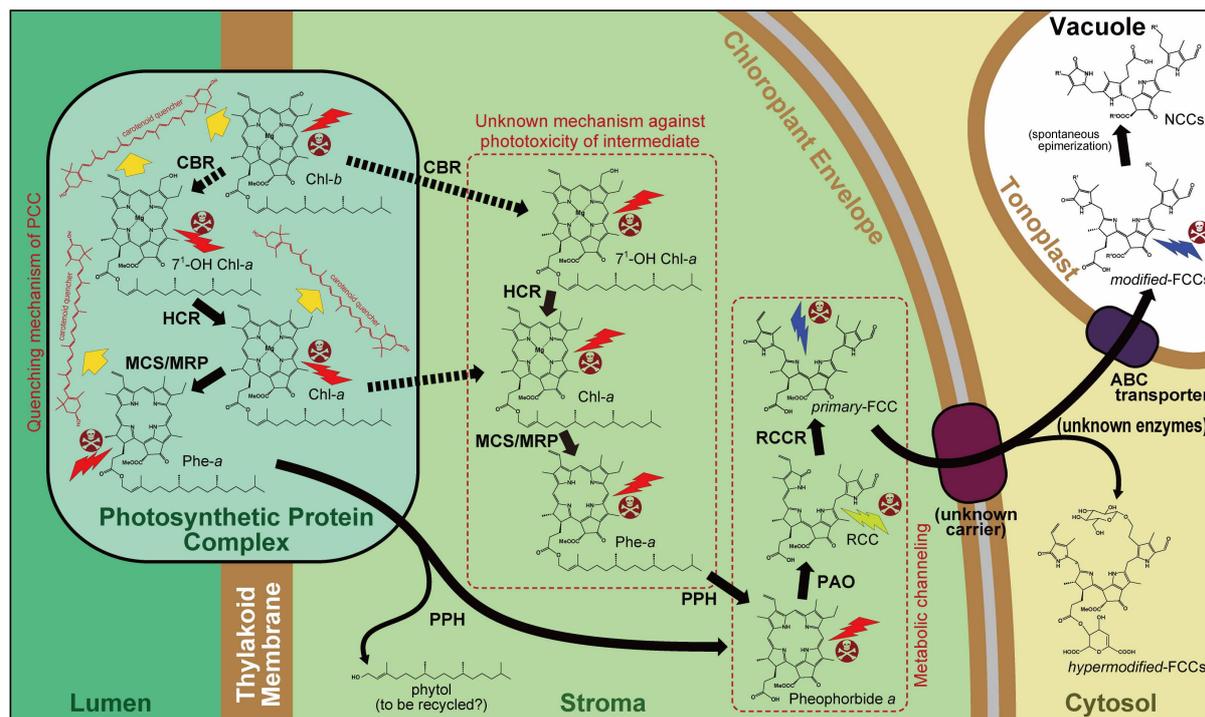


図 3 被子植物におけるクロロフィルの光毒性を回避する機構

光合成器官においては、カロテノイドへの効率的なエネルギー移動により過剰な励起エネルギーが緩和される。紅葉や枯葉の過程で進行するクロロフィルの分解では、まずチラコイド膜中で、Chl-a のマグネシウムが脱離されフェオフィチン a (Phe-a) になる。さらに、フェオフィチナーゼ (PPH) によりフィトールエステルが加水分解されて親水性のフェオフォルバイド a (PPB-a) がストロマ中に遊離する。PPB-a は PAO により酸化的に開環されて、直鎖状テトラピロールである赤色クロロフィル代謝物 (RCC) になるが、これは直ちに PAO に結合する RCC リダクターゼ (RCCR) により蛍光性クロロフィル代謝物 (p-FCC) が生じる。p-FCC は細胞質中に輸送され、ここでさらなる修飾を受けた後 (m-FCCs)、液胞内に輸送される。液胞内部で酸による異性化を受けて、無蛍光性クロロフィル代謝物 (NCC) になる。なお、クロロフィル b (Chl-b) は、最初に Chl-a に転換されてから分解される。詳細は Kashiya and Tamiaki<sup>2)</sup>を参照のこと。

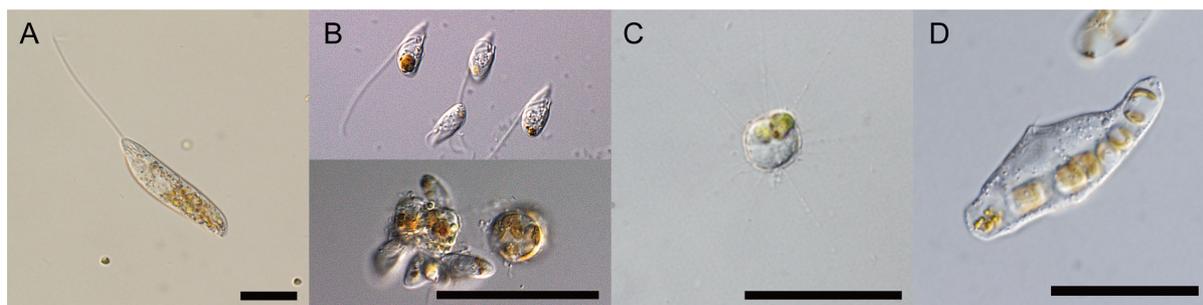


図4 さまざまな微細藻類食プロティストの光学顕微鏡像

A: 無色ユーグレノイド *Peranema* sp.; 基物表面を滑走し、微細藻 (真眼点藻 *Nannochloropsis* sp.) を次々に細胞内に取り込む。B: 珪藻食鞭毛虫 *Hemistasia phaeocysticola*; 集団で珪藻 *Thalassiosira* sp. を襲い、最終的に珪藻の殻内に侵入して細胞を食い破る<sup>36)</sup>。C: カラタイヨウチュウ *Marophrys* sp.; 放射状に伸びた軸糸で鞭毛藻などを絡め取り、細胞内に引きずり込む<sup>37)</sup>; 捕食された緑藻 *Pyramimonas* sp. の色素体が細胞内に見られる。D: 無色ケルコゾア鞭毛虫 *Abollifer globosa*<sup>25)</sup>; 珪藻 *Skeletonema costatum* の鎖状コロニーを飲み込んで食胞内に取り込んでいる。スケールバーは全て 20  $\mu\text{m}$ 。

一方、天然においては、植物 (微細藻類など) を餌として生活しているプロティスト (単細胞性の真核生物) にとって、クロロフィルの光毒性は極めて重大な問題となると想像される。捕食性的プロティストは、外部から餌生物やその組織を細胞内に取り込んで食胞を形成し、これに消化酵素などを小胞輸送 (二次リソソームの形成) して消化・分解することで栄養を摂取しているが、その細胞は基本的に光をよく透過する (図4)。従って、消化物に含まれるクロロフィルやその誘導体は光励起される状況にあり、直感的には光毒性の深刻な影響が示唆される。それに関わらず、光環境下における微細藻類食プロティストの活動は、実際には水圏環境において極めて普遍的かつ量的に重要なものである。ここに、もう一つのクロロフィルの無毒化プロセスが存在しているのである。

著者らは最近、様々な捕食性プロティストの捕食過程において、餌である微細藻類の含まれるクロロフィル (chlorophyll *a* 及び *b*) が、シクロフェオフォルバイドエノール類 (13<sup>2</sup>,17<sup>3</sup>-cyclophosphorbide *a/b* enols; cPPB-*aE/bE* あるいは総称して CPEs と略されるが、本稿では「シクロエノール類」と称す) に代謝されていることを発見した (図5)<sup>20,21)</sup>。すなわち、捕食性プロティストと微細藻類の二員培養系に対して有機溶媒

により抽出・分析すると、シクロエノール類が主要なクロロフィル誘導体として見いだされるのである。

シクロエノール類は、クロロフィルのポルフィリン骨格の13位と17位の二つのエステル間でクライゼン縮合的に形成されると考えられるエキソ7員環構造を有するクロリン化合物である<sup>22)</sup>。興味深いことに、この緑色を呈する色素は、溶液状態において蛍光を全く (もしくはほとんど) 発しない (cPPB-*aE* において  $\Phi_F < 0.002$ )。また、溶液中での光照射実験において、他のクロロフィル誘導体とは対照的に、cPPB-*aE* は一重項酸素を発生させる光増感作用が全くないことも示された (すなわち  $\Phi_{\Delta}^T \approx \Phi_T \approx 0$ )<sup>20)</sup>。つまり、クロリン環の共役系が完全な形で保存されるにもかかわらず、クロリン化合物に特徴的な蛍光性も光増感作用も示さず、励起エネルギーが全て熱的に緩和されると考えられる ( $\Phi_{ic}^S = 1$ )。その緩和機構については未解明であるが、この化合物にユニークな特徴である、クロリン環と共役したエノール構造の関与が可能性として考えられる<sup>22-24)</sup> (例えばケト-エノール体の互変異性に伴うプロトン移動消光)。このような性質を踏まえると、シクロエノール類は、プロティストの消化過程におけるクロロフィルの無毒化代謝の産物であると考えられる。

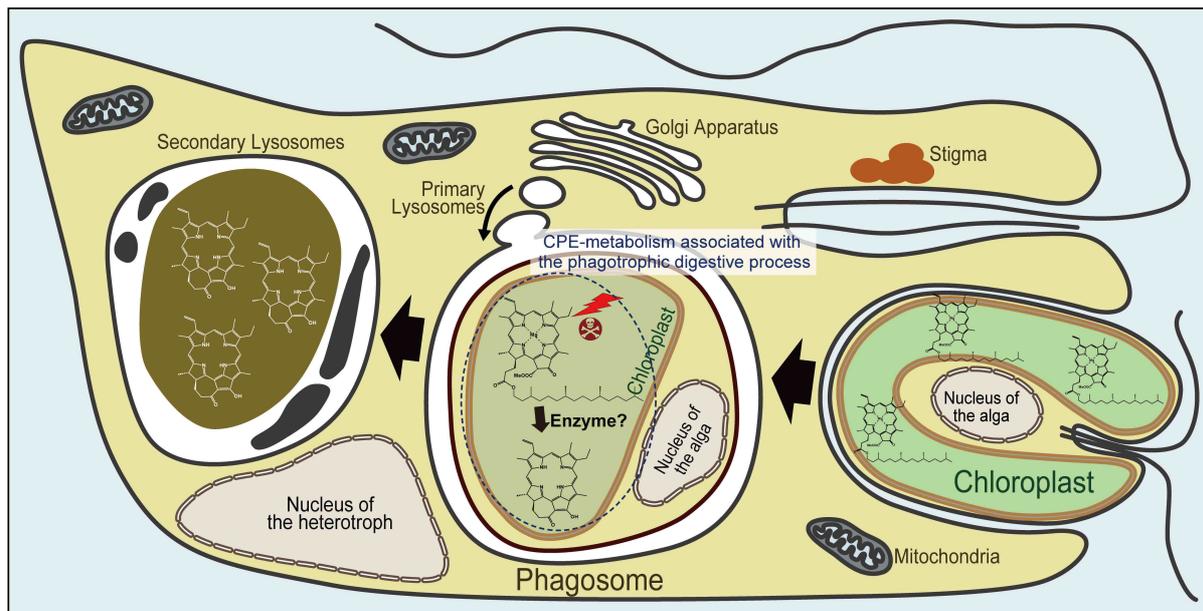


図5 微細藻類食プロティストによるシクロエノール代謝

微細藻類を餌とするプロティストには、図のように餌生物を丸呑みして食胞（ファゴソーム）を形成し消化する（ファゴサイトーシス）ものや、餌生物の細胞内容を吸い出して食胞に取り込む（ミゾサイトーシス）ものなどがみられる。ファゴサイトーシスにおいては、細胞膜由来の食胞膜で餌を包み込み、リソソームを融合させることで消化を行う。この過程で、クロロフィルの分解（シクロエノール代謝）に関わる酵素がファゴソーム内に輸送されて、色素体の消化の初期段階においてシクロエノールが産生されるものと考えられる。

シクロエノール類を生じる代謝過程（以下、便宜的に「シクロエノール代謝」と称する）の酵素については未報告であるが、その反応メカニズムは、PAO経路とは対照的に極めてシンプルであると考えられる。すなわち、マグネシウムイオンの脱離に続いて、 $13^2$ 位のメトキシカルボニル基の加水分解（この過程が酵素触媒を要する）後に迅速な脱炭酸が起こり、これにより生じるエノラートが $17^2$ 位のカルボニル基を攻撃して縮環するという、速やかな発エルゴン反応による可能性が考えられる（還元力も自由エネルギーも要求されない酵素反応）。実際、珪藻 *Skeletonema costatum* を餌とする鞭毛虫 *Abollifer globosa* の捕食過程を顕微鏡

で観察すると、捕食後10分以内の時点で、食胞内に取り込まれた珪藻の色素体から発するクロロフィル蛍光が急速に減衰する様子が観察された（図6）<sup>20,25</sup>。これ以降の段階で、色素体が徐々に萎縮する様子が観察され、珪藻の細胞組織の本格的な消化分解が進行しているものと考えられた。このような培養を経て色素分析を行なうと、珪藻が本来含有する chlorophyll *a* はほとんど検出されず、代わりに多量の cPPB-*aE*（chlorophyll *a* 起源のシクロエノール類）が検出された。このため、シクロエノール代謝は、消化の初期の段階で速やかに進行するものであると示唆された<sup>20</sup>。

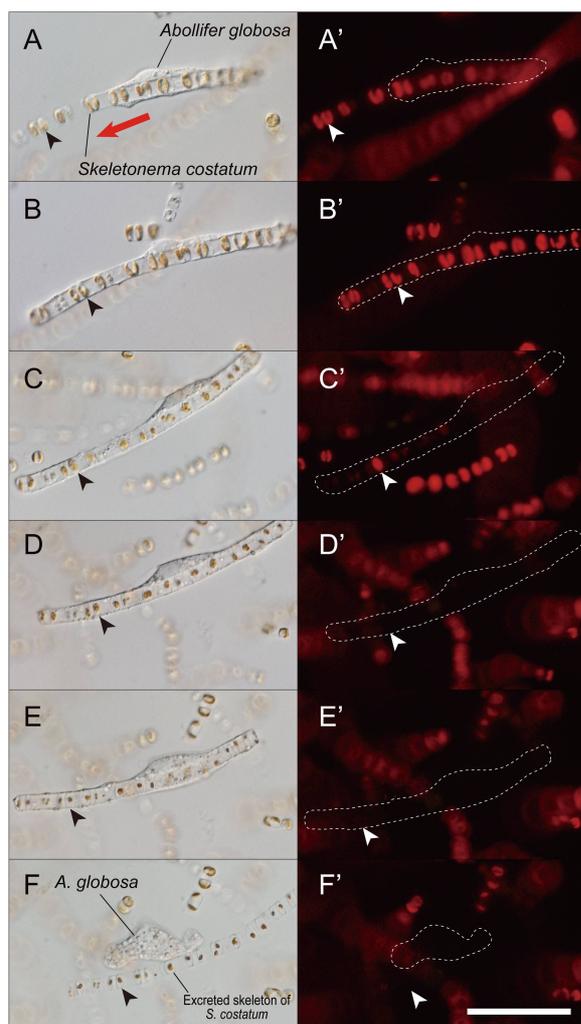


図 6 ケルコゾア生物 *Abollifer globosa* が珪藻 *Skeletonema costatum* を捕食しファゴサイトーシスにより消化する様子の顕微鏡明視野像 (左列) と、それに伴い *S. costatum* の色素体のクロロフィル蛍光 (励起光 400–440 nm) が減衰する様子のタイムラプス観察 (右列)

右列蛍光画像中の点線は、*A. globosa* 細胞輪郭をトレースしたもの。A および A' : 赤い矢印の方向に向かって、アメーバ状に変形した *A. globosa* が *S. costatum* のコロニー全体を包み込んで食胞を形成する過程 (0 分)。B および B' : 4 分後、*S. costatum* の鎖状コロニーが完全に *A. globosa* の食胞内に取まった状態。*A. globosa* はこの状態でお鞭毛遊泳する。C および C' : 13 分後、*A. globosa* の食胞内にある *S. costatum* コロニーのほとんどの色素体のクロロフィル蛍光が大きく減衰・消失した。この間、これら色素体の蛍光減衰は非同調的に進行し、例えばこの時点でも、矢頭で示した色素体では蛍光の減衰が未だ顕著でない。D および D' : 28 分後、*A. globosa* の食胞内にある *S. costatum* の色素体からのクロロフィル蛍光が完全に消失した。周囲の「生きた」*S. costatum* コロニーの蛍光と比べると、違いは顕著である。E および E' : 65 分後までに、*A. globosa* の食胞内にある *S. costatum* の色素体は萎縮し、無蛍光の暗褐色の顆粒状構造物へと変化した。F および F' : これら構造は、81 分において *A. globosa* が食胞の内容物を排出 (エキソサイトーシス) するに至ってなお、珪藻のガラスの被殻内に留められていた。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。Kashiyama *et al.*<sup>20</sup> の Supporting Figure 2 を一部改変して転載。

このように速やかな代謝は、食胞内での消化過程で遊離するクロロフィルに対処するための必要条件であると考えられる。一方、シクロエノール類は、分析条件下などでは酸素分子により容易に酸化され、再び蛍光性で光増感作用を示す誘導体 (ヒドロキシクロロフィロン類など) に変化してしまう<sup>20,26-28</sup>)。この光毒性の酸化物は、環境試料中 (海水や底泥) からもある程度検出され、天然でも多少なり生じてしまう化合物であると考えられる。さらには、微細藻類食プロティストの分析からは、パイロフェオフィチン類 (クロロフィルから中心マグネシウムと 13<sup>2</sup> 位のメトキシカルボニル基を失った化合物群) などの光毒性化合物も少なからず検出されることがある<sup>20,21</sup>)。このように、シクロエノール類への代謝は、被子植物の紅葉過程における PAO 経路とは異なり、光毒性の副産物を生じる多少のリスクを伴うと思われる。じっくりと時間をかけて細胞死を誘導できる紅葉などの過程と異なり、微

細藻類の消化においては、速やかに大量のクロロフィルを処理する必要があるため、多少のリスクを伴ってでもシクロエノール代謝のような迅速な反応が有利である<sup>2)</sup>。実際には、消化が進行した微細藻類の残骸は食胞内で典型的に消光しており (クロロフィル蛍光が無い状態)、この状態では光毒性の問題は回避できていると考えられる。ヒドロキシクロロフィロン類やパイロフェオフィチン類は、シクロエノール類と同様に低極性でかつ平面性が高いため、 $\pi$ - $\pi$ 相互作用によりスタッキング構造を形成することによりシクロエノール類へのエネルギー移動を経由した励起エネルギーを緩和が起こるか、あるいはアモルファスな凝集を起こすことで消光しているものと推測される<sup>2)</sup>。いずれにせよ、生物にとってはこの代謝によってクロロフィルの光毒性が現実には回避できている事実が重要であろう (プロティストは完璧なシクロエノール代謝

の設計図を志向して進化したのではなく、紆余曲折の帰結として「うまくいっている」のである)。

クロロフィルの光毒性を喪失させる分解代謝プロセスは、PAO 経路やシクロエノール代謝のほかにも存在するものと想像される。特に、光照射下で多様な微生物間の相互作用が起こる水圏の表層環境においては、多様な対クロロフィル光毒性戦略が存在しても不思議ではない。にもかかわらず、シクロエノール類があらゆる水圏環境から普遍的に検出される事実は、この代謝が水圏生態系において主要なプロセスであることを示唆する。より具体的には、シクロエノール代謝を行なう微細藻類食プロティストが、水圏の食物網の基底において量的に重要な役割を果たしていることを示すものである<sup>20)</sup>。

### 5. 真核生物の進化とクロロフィルの光毒性

さて著者らは、微細藻類食のプロティストのうちでシクロエノール代謝を行なう生物は、現在認識されている真核生物の 8 つのスーパーグループ (オピストコンタ、アメボゾア、リザリア、アルベオラータ、ストラメノパイル、クロミスタ、アーケプラスチダ、エクスカバータ) のうちの 4 つ (リザリア、アルベオラータ、ストラメノパイル、クロミスタ) にまたがって分布することを報告してきた<sup>20)</sup>。その後の研究で、エク

スカバータでも微細藻類の捕食に伴うシクロエノール代謝が確認され<sup>29)</sup>、未公表データではあるがオピストコンタに属するプロティストでもシクロエノール代謝を行なっている可能性が示されている。つまり、シクロエノール代謝は、真核生物うち、進化的関係を辿れないほど非常に広範なグループに共有されているのである (図 7)。

一方、同じ 2012 年の論文中<sup>20)</sup>で、藻類を捕食するオピストコンタに分類されるプロティストについて、シクロエノール代謝はおろか、クロロフィルの本質的な代謝分解の形跡すら確認できない事例も報告した。また、微細藻類食のアメボゾアに関しては、著者らはシクロエノール類の産生を未だに確認していない。アルベオラータに属する繊毛虫の一部でも、シクロエノールの産生が確認できていない。このように、シクロエノール代謝生物が確認される同一のスーパーグループ内でも、この代謝を行わない生物が存在している。従って、シクロエノール代謝の進化に関しては、次の二通りの仮説が立てられ得る。すなわち、(1) 真核生物の共通祖先においてシクロエノール代謝が獲得されたが、いくつかのグループでは二次的に失われた、あるいは (2) 複数の系統群で独立にシクロエノール代謝が成立した (収斂現象)、というものである。シクロエノール代謝は比較的シンプルな反応であるた

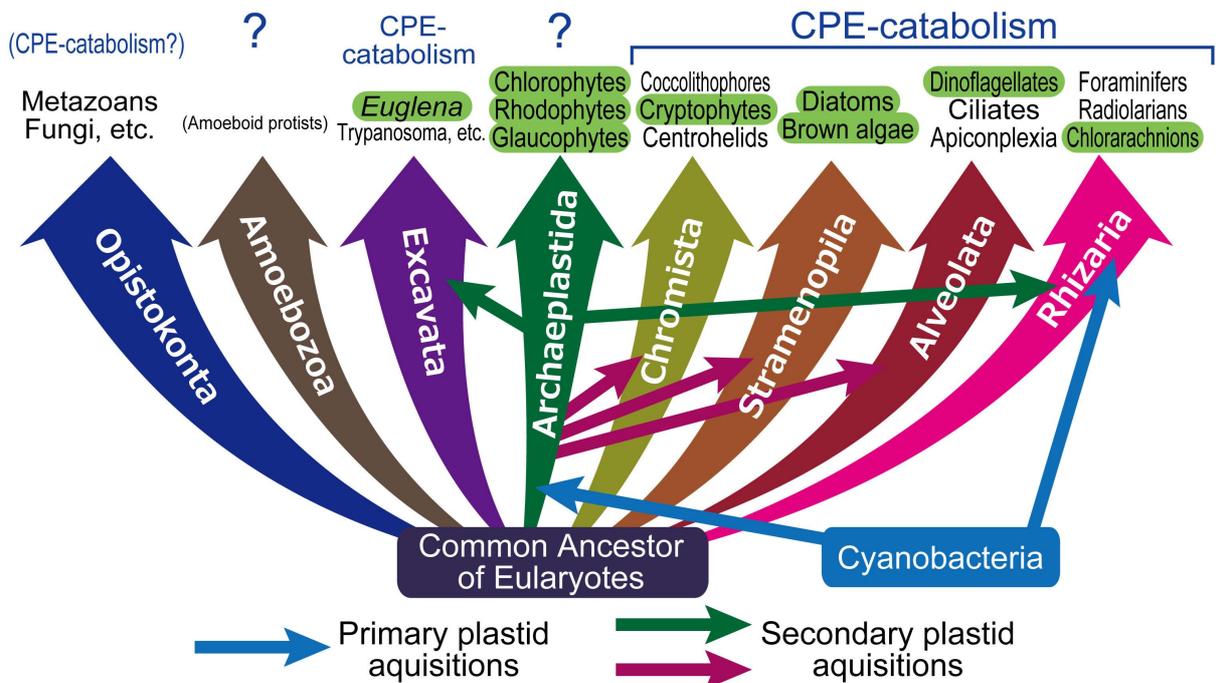


図 7 真核生物のスーパーグループとシクロエノール代謝の分布  
植物化したグループを緑色でハイライトした。

め後者の可能性は否定できないが、もし前者が真であれば、これは非常に興味深い。つまり、光が存在する環境、つまり微細藻類が増殖している現場での直接捕食によりエネルギーを獲得するという、非常に有利な生き方を可能にしたことが、真核生物のその後の成功を決定づけたのかもしれない。

仮に、原初の真核生物がシクロエノール代謝を武器として微細藻類の捕食をはじめたとすると、その微細藻類とはすなわち酸素発生の光合成原核生物であるシアノバクテリアであったに違いない。そうでなくとも、別な対クロロフィル光毒性戦略を獲得することで、シアノバクテリアを細胞内に取り込む生態が進化の早い段階で進化したはずである。その帰結として、光合成を営む真核生物である植物が成立した。厳密には「光栄養性の真核生物」と称されるべき生物の基本体制には、シアノバクテリア細胞に起源する色素体が存在する。そのうち緑色植物（陸上植物を含む）、紅色植物、灰色植物の3つのグループは「一次植物」と称され、真核生物のスーパーグループの一つであるアーケプラスチダを構成している（図7）<sup>30</sup>。アーケプラスチダの共通祖先で一度だけシアノバクテリアの細胞内共生から色素体が成立したと考えられているが、最近ではアーケプラスチダの単系統性に疑義を挟む意見もある<sup>31</sup>。

これらに対して、一次植物である緑色植物ないし紅色植物のいずれかを細胞内に取り込んで色素体化した生物は「二次植物」と称される。珪藻類、円石藻類、渦鞭毛藻類をはじめとして、現在の海洋における主な光合成基礎生産者の多くは二次植物である。いずれにせよ、ともすれば光毒性分子の詰まった「爆弾」たり得る微細藻類を細胞内に安全に維持する段階が、これら植物化の進化の途上で必須であったはずである。つまり、真核生物はその植物化に先んじて、クロロフィルの光毒性を制御する仕組み — おそらくは光合成生物を捕食するためのプロセス — を獲得しなければならなかったであろう。実際、興味深いことに、これまでにシクロエノール代謝が確認されたプロティストが属する分類群から、典型的に二次植物が進化していることが分かってきた（その逆もある程度しかり）。

さらに、二次植物化した渦鞭毛藻類や光栄養性のユーグレノイド類でも、細胞内でシクロエノールを産生

することが報告されている<sup>29,32,33</sup>。この自発的な産生現象の生理学的な意義は今後慎重に検証される必要があるが、少なくともユーグレノイドに関しては、色素体を獲得していない同一分類群の祖先的なグループが微細藻類の捕食に伴うシクロエノール代謝が確認されている（図7）。二次共生の進化過程で、これらの代謝に関わる酵素（群）を維持し続けたことが、クロロフィルによる光毒性を制御し、色素体獲得を導いたのかもしれない。

なお、アーケプラスチダの単系統性を認めれば、微細藻類食のアーケプラスチダ生物が存在しないためシクロエノール代謝など捕食に伴う対クロロフィル光毒性戦略との関連を論じることは、現状では困難である。しかし、例えば Kamikawa *et al.*<sup>31</sup>で示された系統樹を受け入れるとすれば、Kashiyama, Yokoyama *et al.*<sup>20</sup>でシクロエノール代謝を報告した *Centrohelida* (有中心粒類太陽虫) は紅色植物の姉妹群に属することになり、議論の余地が出てくる。今後、シクロエノール代謝に関わる酵素が特定され、そのタンパク質のアミノ酸配列や特徴的なモチーフなどの構造情報、あるいは遺伝子の塩基配列などの情報が揃えば、真核生物を繁栄せしめた進化の過程の、重要な一端を垣間見ることができるものと期待される。

## 6. おわりに

地球という、液体の水にあふれ適度な太陽光（その強度だけでなく有機分子の $\pi$ 軌道と相互作用しうるスペクトル領域範囲にあることが重要）を受ける、穏やかな惑星の表層を「征した」生命の仕組みは、まずはクロロフィルを用いた光合成であったであろう。さらに、水を電子供与体とした電子伝達を駆動する酸素発生の光合成の登場は、地球生命圏のエネルギーフラックスを激変させたに違いない。本稿では、これらの仕組みがクロロフィルの光毒性が回避される仕組みの裏打ちの元に成立していることを説明した。この「クロロフィル光毒性を制する」仕組みは、偶然の変異の積み重ねから進化・成立したものであろうが、その機構自体は偶然ではなく、物理化学的な必然に帰する。光合成の初期反応におけるクロロフィルの役割は、必然的にクロロフィルの光毒性回避の機構として機能する。クロロフィルの光毒性は、自然選択を制約する因子としては比較的重大な部類に入るのであろう。

「クロロフィルの光毒性を制御するための仕組みが既存の電子伝達系と接続することで光合成の初期過程が成立した」、これはずいぶんな妄想かもしれないが、光合成という仕組みに向かって自発的に進化したと考えるよりは合理的ではなかろうか。しかしこの場合、原初の生命において、クロロフィルはそもそもどのような機能を担っていたのだろうか？

原初、「クロロフィルを制した」酸素発生型の光合成生物は、地球表層環境においては無敵の支配者であったのではなかろうか。光毒素であるクロロフィルを大量に含有する以上、「クロロフィルを制する」すべを持たない他の生物にとっては有毒生物にほかならず、光合成の産物に与るためには、溶菌した光合成生物の内容物が十分にブリーチされるのを待つか、光の届かない海洋深部にまで沈降してくるのを待つかなかったであろう。そうであれば、リミネラリゼーション（無機化による栄養塩の再生）に律速を受ける生物生産のターンオーバーは抑制され、太陽光から生命システムに流入するエネルギーのフラックスもそう大きくはならなかったかもしれない。現実には地球史のどこかで、「クロロフィルを制する」仕組みを備えて、光合成生物を *in situ* で捕食・消化分解できる真核生物が、海洋表層の光環境の征服者として登場した。これにより光合成の産物は効率よくターンオーバーを受け、太陽光から生態系に流れるエネルギーフラックスは増大し、また、そうした捕食生物から連なる食物網が拡大したであろう。

一次植物や二次植物などの植物化した真核生物の登場は、地球生命圏に大きな変化をもたらしたのであろう。茫洋たる大海原ではほとんど有効な移動手段を持たないシアノバクテリアに代わって、基本的なデザインとして鞭毛遊泳性であるプロティストが植物化したことは、まずもって光合成生産の空間的制約を大きく解放した。細胞壁を発達させた緑藻の仲間は、さらに陸上環境にも光合成の仕組みを進出させた。シアノバクテリアを共生させた一次植物の進化と、一次植物を取り込んだ二次植物の進化では、何か本質的な違いが存在するのか。クロロフィルの制御に関してはどうなっていたのか。中生代以降の二次植物の進化が海洋生態系の構造や物質循環に与えた影響は相当なものであろうと考えられる。特に、無機塩からなる鱗片や骨格を有する浮遊性のプロティストの登場（円石藻

や珪藻、微細藻を共生させた浮遊性有孔虫など）により、海洋表層で産生された有機物の深海底への輸送効率は飛躍的に大きくなったと考えられる（バイオミネラルによるバラスト効果）<sup>34)</sup>。この大きな転換においても、細胞スケールでのクロロフィル制御機構の進化が関わっていたのであれば面白いものである。

## 謝辞

以下の文献に名前を記載させていただいた共同研究者に深い感謝の意を申し述べます。特に、顕微鏡写真を提供いただいた筑波大学の白鳥峻志さんにお礼申し上げます。また、今回、本稿の執筆の機会をいただいた園池公毅博士、鞆達也博士に感謝致します。

Received March 23, 2015; Accepted April 2, 2015

## 参考文献

1. Blankenship, R. E. (2014) *Molecular Mechanisms of Photosynthesis, 2nd Ed.*, Wiley Blackwell, Oxford, UK.
2. Kashiyama, Y., and Tamiaki, H. (2014) Risk management by organisms of the phototoxicity of chlorophylls, *Chem. Lett.* 43, 148–156.
3. Tamiaki, H., and Kunieda, M. (2011) Photochemistry of chlorophylls and their synthetic analogs, *Handbook of Porphyrin Science 11*, 223–290.
4. Montalti, M., Credi, A., Prodi, L., and Gandolfi, M. T. (2006) *Handbook of Photochemistry, 3rd Ed.*, CRC Press, Boca Raton, USA.
5. Springett, R., and Swartz, H. M. (2007) Measurements of oxygen in vivo: overview and perspectives on methods to measure oxygen within cells and tissues, *Antioxid. Redox Signal.* 9, 1295–1301.
6. Firey, P. A., Jones, T. W., Jori, G., and Rodgers, M. A. J. (1988) Photoexcitation of zinc phthalocyanine in mouse myeloma cells: the observation of triplet states but not of singlet oxygen, *Photochem. Photobiol.* 48, 357–360.
7. Skovsen, E., Snyder, J. W., and Lambert, J. D. C., and Ogilby, P. R. (2005) Lifetime and diffusion of

- singlet oxygen in a cell, *J. Phys. Chem. B Lett.* 109, 8570–8573.
8. Oba, T., and Tamiaki, H. (2005) Effects of peripheral substituents on diastereoselectivity of the fifth ligand binding to chlorophylls, and nomenclature of the asymmetric axial coordination sites, *Bioorg. Med. Chem.* 13, 5733–5739.
  9. Saito, K., Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.-R., Kamiya, N., and Ishikita, H. (2012) Deformation of chlorin rings in the photosystem II crystal structure, *Biochemistry* 51, 4290–4299.
  10. Demmig-Adams, B., Gilmore, A. M., and Adams III, W. W. (1996) In vivo functions of carotenoids in higher plants, *FASEB J.* 10, 403–412.
  11. Croce, R., Weiss, S., and Bassi, R. (1999) Carotenoid-binding sites of the major light-harvesting complex II of higher plants, *J. Biol. Chem.* 274, 29613–29623.
  12. Loll, B., Kern, J., Zouni, A., Saenger, W., Biesiadka, J., and Irrgang, K.-D. (2005) The antenna system of Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* at 3.2 Å resolution, *Photosynth. Res.* 86, 175–184.
  13. Mozzo, M., Dall'Osto, L., Hienerwadel, R., Bassi, R., and Croce, R. (2008) Photoprotection in the antenna complexes of photosystem II: role of individual xanthophylls in chlorophyll triplet quenching, *J. Biol. Chem.* 283, 6184–6192.
  14. Müh, F., Renger, T., and Zouni, A. (2008) Crystal structure of cyanobacterial photosystem II at 3.0 Å resolution: a closer look at the antenna system and the small membrane-intrinsic subunits, *Plant Physiol. Biochemistry* 46, 238–264.
  15. Kräutler, B., Jaun, B., Bortlik, K.-H., Schellenberg, M., and Matile, P. (1991) On the enigma of chlorophyll degradation: The constitution of a secoporphinoid catabolite, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30, 1315–1318.
  16. Hörtensteiner, S., and Kräutler, B. (2011) Chlorophyll breakdown in higher plants, *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 977–988.
  17. Tanaka, R., Kobayashi, K., and Masuda, T. (2011) Tetrapyrrole Metabolism in *Arabidopsis thaliana*, *The Arabidopsis Book* 9, e0145.
  18. Erzinger, G. S., Wohllebe, S., Vollrath, F., Souza, S. C., Richter, P., Lebert, M., and Häder, D.-P. (2011) Optimizing conditions for the use of chlorophyll derivatives for photodynamic control of parasites in aquatic ecosystems, *Parasitol. Res.* 109, 781–786.
  19. Yano, S., Hirohara, S., Obata, M., Hagiya, Y., Ogura, S., Ikeda, A., Kataoka, H., Tanaka, M., Joh, T. (2011) Current states and future views in photodynamic therapy, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* 12, 46–67.
  20. Kashiyama, Y., Yokoyama, A., Kinoshita, Y., Shoji, S., Miyashita, H., Shiratori, T., Suga, H., Ishikawa, K., Ishikawa, A., Inouye, I., Ishida, K., Fujinuma, D., Aoki, K., Kobayashi, M., Nomoto, S., Mizoguchi, T., and Tamiaki, H. (2012) Ubiquity and quantitative significance of detoxification catabolism of chlorophyll associated with protistan herbivory, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 17328–17335.
  21. Kashiyama, Y., Yokoyama, A., Shiratori, T., Inouye, I., Kinoshita, Y., Mizoguchi, T., and Tamiaki, H. (2013)  $13^2,17^3$ -Cyclophorbide *b* enol as a catabolite of chlorophyll *b* in phycophagy by protists, *FEBS Lett.* 587, 2578–2583.
  22. Falk, H., Hoornaert, G., Isenring, H. P., and Eschenmoser, A. (1975) Enol derivatives in the chlorophyll series. Preparation of  $13^2,17^3$ -cyclophorbide enols, *Helv. Chim. Acta* 58, 2347–2357.
  23. Isenring, H. P., Zass, E., Smith, K., Falk, H., Luisier, J. L., and Eschenmoser, A. (1975) Enol derivatives in the chlorophyll series.  $13^2$ -Desmethoxycarbonyl- $17^3$ -desoxy- $13^2,17^3$ -cyclochlorophyllide *a*-enol and a method for the introduction of magnesium into porphyrinoid ligands under mild conditions, *Helv. Chim. Acta* 58, 2357–2367.
  24. Scheer, H., and Katz, J. J. (1978) Peripheral metal complexes: chlorophyll "isomers" with magnesium bound to the ring E  $\beta$ -keto ester system, *J. Am. Chem. Soc.* 100, 561–571.

25. Shiratori, T., Yokoyama, A., and Ishida, S. (2014) Phylogeny, ultrastructure, and flagellar apparatus of a new marimonad flagellate *Abollifer globosa* sp. nov. (Imbricatea, Cercozoa), *Protist* 165, 808–824.
26. Louda, J. W., Loitz, J. W., Rudnick, D. T., and Baker, E. W. (2000) Early diagenetic alteration of chlorophyll-*a* and bacteriochlorophyll-*a* in a contemporaneous marl ecosystem; Florida Bay, *Org. Geochem.* 31, 1561–1580.
27. Goericke, R., Strom, S. L., and Bell, M. A. (2000) Distribution and sources of cyclic pheophorbides in the marine environment, *Limnol. Oceanogr.* 45, 200–211.
28. Khalesi, M., and Louda, J. W. (2011) Hemisynthesis of  $13^2,17^3$ -cyclomesopheophorbide-*a*-enol, *Tetrahedron Lett.* 52, 1078–1081.
29. Kashiyama, Y., Yokoyama, A., Shiratori, T., Kawaguchi, A., Nakazawa, M., Inouye, I., and Tamiaki, H. (2013) Chlorophyll detoxification catabolism of euglenoids that enabled acquisition of the secondary plastid, *International Congress of Protistology (ICOP XIV; 2013)*, Vancouver, Canada.
30. Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., et al. (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists, *J. Eukaryotic Microbiol.* 52, 399–451.
31. Kamikawa, R., Kolisko, M., Nishimura, Y., Yabuki, A., Brown, M. W., Ishikawa, S. A., Ishida, K., Roger, A. J., Hashimoto, T., and Inagaki, Y. (2014) Gene content evolution in discobid mitochondria deduced from the phylogenetic position and complete mitochondrial genome of *Tsukubamonas globosa*, *Genome Biol. Evol.* 6, 306–315.
32. Yamada, N., Tanaka, A., and Horiguchi, T. (2014) cPPB-*aE* is discovered from photosynthetic benthic dinoflagellates, *J. Phycol.* 50, 101–107.
33. Suzuki, T., Casareto, B. E., and Shioi Y. (2015) Finding of  $13^2,17^3$ -cyclophorbide *a* enol as a degradation product of chlorophyll in shrunk zooxanthellae of the coral *Montipora digitata*, *J. Phycol.* 51, 37–45.
34. Kashiyama, Y., Ozaki, K., and Tajika, E. (2011) Impact of the evolution of carbonate ballasts on marine biogeochemistry in the Mesozoic and associated changes in energy delivery to subsurface waters, *Paleontol. Res.* 15, 89–99.
35. 柏山祐一郎, 横山亜紀子 (2012) 光エネルギーと従属栄養プロティストクロロフィル光毒性に対する生化学的戦略, *生物の科学 遺伝* 2012年7月号, 425–431.
36. Yabuki, A., and Tame, A. (2014) Phylogeny and Reclassification of *Hemistasia phaeocysticola* (Scherffel) Elbrächter & Schnepf, 1996, *J. Eukaryot. Microbiol.*, in press.
37. 福田あずみ, 石田健一郎 (2014) 新奇 Heliozoa SRT127 株の分類学的研究, *Tsukuba J. Biol.* 13, 13.

## Successful Management of the Phototoxicity of Chlorophylls Had Led the Evolutionary Successes in Earth's Illuminated Surface Environments

Yuichiro Kashiyama<sup>1,2,3,\*</sup>, Akiko Yokoyama<sup>4</sup> and Hitoshi Tamiaki<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Fukui University of Technology, <sup>2</sup>Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), Japan Science and Technology Agency (JST), <sup>3</sup>Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University, <sup>4</sup>Faculty of Life and Environmental Sciences, Tsukuba University

## 報告記事

若手の会活動報告  
～第11回セミナーの開催～立命館大学 生命科学部 生命情報学科  
浅井 智広

いつもの4月号の会報では、本学会の後の次回セミナーの開催に向けた準備状況をご連絡しているところですが、今回は例年秋に開催している合宿形式のセミナーを12月号の会報発行後に開催したため、その若手の会セミナーの様子を報告させていただきます。

若手の会の中心的な活動である研究セミナーは今回で11回目を数えます。今回は、2014年12月6日と7日の二日間の日程で、立命館大学びわこ・くさつキャンパスの一面にあるセミナーハウス「エボック立命21」で開催しました。例年秋に開催しているセミナーは合宿形式で行い、講演や発表を通じたフォーマルな情報交換だけでなく、身分や立場に依らない若手研究者間のフランクでディープな交流を目指しています。今回は、恒例の全員参加の自己紹介と研究紹介に加え、夕食を兼ねた懇親会を参加者全員で網をつき合うBBQ形式で行いました。

招待講演では学生による特別講演を含めて4名の講師の方々をお招きし、最新の研究成果を中心に話題を提供していただきました。初日は立命館大学生命科学部の高橋文雄先生に藻類の青色光受容体についてお話しを伺いました。非モデル生物で新しい光受容体を発見していく過程を通じて、ポストゲノム時代にあっても生理現象とその責任分子の対応を丁寧に観察して調べていくことの大切さを学ぶことができました。二日目はまず、基礎生物学研究所の高橋俊一先生にサンゴと褐虫藻の光合成の関係についてお話しいただきました。光合成の研究を始めたばかりの若手研究者にはとっつきにくい印象もある光阻害について、ご自身の研究成果を交えながらわかりやすくご解説いただきました。また、サンゴと褐虫藻の共生関係が成立していくメカニズムについての最新の研究成果もご紹介いただき、大変興味深い話題を提供して下さいました。次に、大阪大学蛋白質研究所の山本治樹先生にクロロフィルの生合成系で働くニトロゲナーゼ類似酵素についてのお話しを伺いました。ニトロゲナーゼに似た構造をもつDPORやCORといった酵素の生化学的な研究から見てきた、ニトロゲナーゼ類似酵素の構造や機能の多様化についてご紹介いただきました。また、ご自身のこれまでの経験を題材に、若手研究者を対象としたキャリアパスについてもお話しいただき、学生が今後の研究生活について考える良い機会となりました。最後に、立命館大学大学院博士後期課程1回生の大山克明さんにご自身の研究について紹介していただきました。若手の会では昨年の秋のセミナーから「学生招待講演」と題して、将来光合成研究の最前線で活躍することが期待される学生が自身の研究内容を発表する場を設けています。大山さんはシアノバクテリアの生物時計を生化学的に研究されています。生物時計自体は光合成と直接関係しないにも関わらず、細胞全体の生理現象を通じて光合成と深く結びついており、光合成研究の別な側面を紹介して下さいました。参加した学生の刺激となっただけでなく、ポスドク以上の若手研究者にも光合成研究の新たな広がりを知る良い機会となったと思います。詳しいセミナーの様子は、大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。

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。現場の研究を推進している研究者が若い気持ちで交流することは、学際性の強い光合成研究では絶対不可欠だと思います。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若手の会への参加を是非お勧めいただきたいと思います。セミナーでの学生招待講演は今後も継続して企画していく予定ですので、こちらについても自薦他薦問わず、お気軽に候補者をご連絡いただければ幸いです。その他ご不明な点など、遠慮無く浅井(cazai@fc.ritsumei.ac.jp)までお問い合わせください。興味を持たれた方は、お気軽にご参加ください。

## 報告記事

### 「第 11 回 日本光合成学会若手の会セミナー」で経験した事

立命館大学院 生命科学研究科 D1

大山 克明

2014 年 12 月 6・7 日に立命館大学 びわこ・くさつキャンパスで第 11 回日本光合成学会若手の会が開催されました。私は学部 4 回生の時に初めて光合成学会若手の会に参加させて頂き、今回で 2 回目の参加になります。M1, M2 の時も参加させてもらいたかったのですが、機会に恵まれず、叶いませんでした。今回念願の参加が叶い、さらに、学生招待講演という形で自分の研究を紹介する機会も頂きました。当日の個人的な経験を含めて、出来事を紹介させて頂きたいと思います。

8 月初旬に浅井智広先生から講演依頼のお話がありました。第 9 回の若手の会で京都大学の横山諒さんが学生招待講演をされてから、学生に経験をつけてもらうことを目的に研究内容を紹介してもらっているそうです。名立たる先生方の前で長時間発表させてもらう減多にないチャンスだったので、是非と引受けさせて頂きました。

初日は浅井先生の挨拶に始まり、立命館大学の高橋文雄先生の「フシナシミドロの青色反応とその受容体について」から幕を開けました。普段から隣の研究室におられるにも関わらず、研究内容を存じ上げてなかったのが新鮮な気持ちでお話を伺いました。しかしながら、BBQ の準備や翌日のお弁当の手配等雑務に追われ、ゆっくりとお聞きする事ができませんでした。高橋先生の次に口頭発表で 1 人 20 分、質疑応答 10 分の一般研究発表がありました。残念ながらこの時もゆっくりとお聞きする事は出来ませんでした。皆さんの活発な質疑応答と自分の発表が近づいてくる事に徐々に緊張してきました。

一般研究の後、入念に準備をおこなった BBQ が始まりました。あいにく、気温は非常に寒く缶ビールも氷にいれなくても十分に冷える気温でした。寒い中でもみなさん火の近くに集まり暖をとりながら研究の事やご自身の経験を熱く語って下さいました。

BBQ の後は恒例の参加者全員による自己紹介が始まりました。研究の話やご自身の趣味のことなど個性的な紹介がたくさんありました。お酒が入っているにも関わらず、研究の話になると深いディスカッションになるあたりに、皆さんが優れた研究者であることを感じました。また、同じような実験をしている方々との情報交換も非常に有意義で、あっという間に時間が過ぎてしまいました。

翌日最初の講演は基礎生物学研究所の高橋俊一先生が「光阻害とサンゴの白化」についてお話して下さいました。サンゴは高温ストレスに曝れされる褐虫藻との共生関係が崩れ白色化します。サンゴの白化の前に褐虫藻の光阻害が起きることや光阻害感受性の高い褐虫藻をもつサンゴでは白化が起りやすいことに驚きを感じました。

次の講演は蛋白質研究所の山本治樹先生が「光合成色素合成に関わるニトロゲナーゼ類似酵素」についてお話して下さいました。プロトクロロフィリド還元酵素である DPOR や LPOR のお話は山本先生が名古屋大学におられた時にお聞きした事がありましたが、そこからさらにクロロフィリド還元酵素である COR の詳しいお話も聞け、とても面白かったです。阪大の栗栖研究室においてある嫌気チャンバーが横に連なっている写真がとても印象的でした。

最後に、学生招待講演という形でシアノバクテリアの KaiC タンパク質について最近分かってきた新たな性質について報告させて頂きました。シアノバクテリアは体内時計をもつ最も単純な生物として知られており、その体内時計は 3 つのタンパク質 KaiA, KaiB, KaiC によって構成されています。私は寺内先生と浅井先生の指導のもと、体内時計がどのようなメカニズムで動いているか解明したく研究しています。光合成分野から少し離れた話でしたが、質疑応答では、多くの方から非常に重要な質問をして頂き、とても有益な時間を過ごす事ができました。自分としても別分野の方の意見やアドバイスを聞いて大変楽しかったので、是非とも次回以降もこのような

企画を続けて頂き、学生に機会を与えて頂きたいです。

次回以降も若手の会に参加させて頂きたいと思っております。最後になりましたが、今回のセミナーを企画してくださり、私を招待してくださった浅井智広先生とはじめとする若手の会幹事の皆様はこの場をお借りして深く御礼申し上げます。」



## 報告記事

## The German-Japanese Binational Seminar 2015: Harvesting Light: from Light to Biotechnological Products に参加して

埼玉大学 大学院理工学研究科

鬼沢 あゆみ

静岡県熱海市で2015年3月21日から26日までの5日間、部屋からオーシャンビューが臨める高台にあるホテルで、日本人とドイツ人研究者による二国間セミナーが開催されました。今回、日原由香子先生がオーガナイザーだったため、私はポスターセッションに参加する以外にも会場の進行等のお手伝いもさせていただきました。

この日独二国間セミナーは2001年岡崎で第1回目が開催されてから今回で7回目のセミナーになります。今回セミナー中に第1回の発足に関わった村田紀夫先生のお話を聞く機会もあり、こんなにこの規模のセミナーが続くのは大変珍しいと喜んでおられたのが印象的でした。セミナー初日はディナーのみでしたが、ちょうどルフトハンザ航空でストライキが行われている時期だったため、ドイツ人の先生方が全員無事に到着してほっとしました。2日目は朝から夜までずっとオーラルの発表でした。1つのセッション内でもシアノバクテリアから真核藻類、高等植物まで様々な光合成生物を対象に研究する先生方の話を聞いていたので、光合成生物の中でどれだけメカニズムが保存され、どこからが違うのかがより明確に分かるような構成で、一つ一つの発表ごとに活発な議論が行われていました。これは終日言えることですが、クローズドの学会であるためアンパブリッシュなデータも多くあり、刺激的な一日となりました。3日目は午前のセミナーの後、午後から皆で箱根に excursion に行きました。個性的なガイドさんに連れられてバスで移動し、ロープウェイに乗り、芦ノ湖をクルーズ後に大涌谷、箱根関所に行くという、とても濃厚な半日でした。大涌谷ではドイツ人も日本人も皆で顔をしかめるほどの異臭と噴煙でしたが、少し曇りがちでも見えた富士山を背景に記念写真を撮っていたドイツ人もいて、皆満足そうな顔をしていて良かったです。4日目は光合成活性やストレス応答の制御などのベーシックなものから small RNA による制御、非モデル生物を扱う研究まで、ここでは書ききれないほどの多岐に渡る分野の発表を聞くことができました。この日はポスターセッションがあり、セッション前に1分間自分のポスターについて紹介する機会も頂けました。ポスターはオーラル発表をしている会議室内に貼っていたので、セッションタイム以外でもコーヒーを飲みながら気軽にディスカッションする機会が多くあったのは自分にとって、とても有益でした。5日目はバイオマスやバイオ燃料などの応用研究についてのセッションがメインであり、アプローチは元より、日本とドイツの研究施設の規模などの違いが写真を見ることで分かって興味深かったです。この日のセミナーは夕方になり、少し観光を楽しんだ後に、皆で熱海駅前の居酒屋さんで夕食を食べました。最終日は一部のドイツ人は朝方に熱海を発ちましたが、ドイツ人の多くは熱海を観光してから帰ることができたようで良かったです。最後になりましたが、今回会場進行等のお手伝いをする中で、日本人の先生方に随所でご協力いただきました。また本稿を執筆する機会を与えて頂きました西山佳孝先生、写真を提供頂きました田中寛先生にこの場をお借りして感謝申し上げます。



大涌谷にて

## 集会案内

### 第 23 回「光合成セミナー2015：反応中心と色素系の多様性」の開催案内

**期日：** 2015 年（平成 27 年）7 月 11 日（土）午後 2 時から 7 月 12 日（日）午後 4 時まで

**場所：** 龍谷大学大宮キャンパス（JR 京都駅より約 10 分）  
[http://www.ryukoku.ac.jp/about/campus\\_traffic/traffic/t\\_omiya.html](http://www.ryukoku.ac.jp/about/campus_traffic/traffic/t_omiya.html)

**開催の目的：** 光合成に関して、物理学、化学、生物学を融合した討論を行う。光合成の進化、物質変換、人工光合成などについても討論する。第一線の研究者に最新のトピックを解説していただくとともに、参加者の口頭・ポスター発表を行う。

**協賛** 日本光合成学会  
**共催** 龍谷大学革新的材料・プロセス研究センター

**内容：**

1. 講演会  
 梶 達也（東京理科大学 理学部） 「 （演題未定） 」  
 （講師 1 名は未定）
2. 口頭発表 （討論を含めて一人 10 分から 20 分を予定）
3. ポスター発表 （3 分程度のポスタープレビューも併せて行う）

**申込：**

発表申し込み締め切り 2015 年（平成 27 年）7 月 3 日（金）  
 参加申し込み締め切り 2015 年（平成 27 年）7 月 3 日（金）

**参加費：** （7 月 11 日の懇親会費、7 月 12 日の昼食代を含む）  
 一般 5,000 円（予定）  
 学生 3,000 円（予定）

**世話人：** 秋本誠志（神戸大学）、大岡宏造（大阪大学）、大友征宇（茨城大学）、出羽毅久（名古屋工業大学）、永島賢治（神奈川大学）、宮武智弘（龍谷大学）

**申し込み・問い合わせ先：**

龍谷大学理工学部物質化学科 宮武智弘  
 (e-mail: miyatake@rins.ryukoku.ac.jp, tel: 077-543-7467, fax: 077-543-7483)

プログラムおよび今後の案内は下記ホームページにて、更新情報を随時、掲載いたします。

[http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/~ohoka/photosyn\\_seminar\\_2015/top.html](http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/~ohoka/photosyn_seminar_2015/top.html)

**その他：** 光合成生物の進化も含めた光反応・色素系の基礎から応用まで幅広く議論し、異分野の学生・研究者が楽しく交流できる場を提供していきたいと考えています。また新しい研究テーマや方向性のヒントが得られることも期待しています。今後の運営・内容等に関してご意見等がありましたら、遠慮無くメール（上記メールアドレス宛）をいただければ幸いです。

## 集会案内

### 「International Meeting "Photosynthesis Research for Sustainability 2015"」の開催案内

期日： 2015年9月21-26日

場所： ギリシャ、クレタ島

2014年に、ロシア・モスクワ郊外の Pushchino で開催された前回の会議に引き続き、本年9月21-26日にギリシャのクレタ島にて上記会議が開催されます。本国際会議は2004年にカナダ、ケベック州 Trois-Rivières で“In honor of Norio Murata (村田先生の名誉を讃える記念)”として行われたのを原点としていることから毎回多数の日本からの参加者があり、近年は毎回 Young Talent 賞・Poster 賞を受賞しています。今回も多くの方々にご参加、ご発表いただき、活発なディスカッションができますようお願い申し上げます。

要旨〆切： 7月15日

セッション：

1. Primary Processes of Photosynthesis
2. Structure, Function and Biogenesis of the Photosynthetic Apparatus
3. Photosystem II and Water Oxidation Mechanism
4. Energy Transfer and Trapping in Photosystems
5. Photosystem I and Bacterial Photosynthesis
6. Carbon Fixation (C3 and C4) and Photorespiration
7. Artificial Photosynthesis for Hydrogen and Carbon-based Solar Fuels
8. Regulation of Photosynthesis and Environmental Stress
9. Systems Biology of Photosynthesis: Integration of Genomic, Proteomic, Metabolomic and Bioinformatic Studies
10. Applied aspects of Photosynthesis: BioH2 and Bioelectricity
11. Emerging Techniques for Studying Photosynthesis

詳しくはウェブサイト (<http://photosynthesis2015.cellreg.org/>) をご覧下さい。

梶 達也 (東京理科大)

## 事務局からのお知らせ

### ★入会案内

本会へ入会を希望される方は、会費（個人会員年会費：¥1,500、賛助法人会員年会費：¥50,000）を郵便振替（加入者名：日本光合成学会、口座番号：00140-3-730290）あるいは銀行振込（ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキューと入力)、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](mailto: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

〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

岡山大学 理学部生物学科

高橋裕一郎研究室内

日本光合成学会

TEL : 086-251-7861

FAX : 086-251-7876

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(ゼロイチキョウと入力)、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。

## 幹事会名簿

秋本誠志	神戸大学大学院理学研究科	園池公毅	早稲田大学教育学部
栗井光一郎*	静岡大学大学院理学領域	高市真一	日本医科大学生物学教室
池内昌彦	東京大学大学院総合文化研究科	高橋裕一郎	岡山大学大学院自然科学研究科
石北 央	東京大学大学院工学研究科	田中 歩	北海道大学低温科学研究所
泉井 桂	近畿大学生物理工学部生物工学科	田中 寛	東京工業大学資源化学研究所
伊藤 繁	名古屋大学	田中亮一	北海道大学低温科学研究所
井上和仁	神奈川大学理学部	民秋 均	立命館大学総合理工学院
伊福健太郎	京都大学大学院生命科学研究科	都筑幹夫	東京薬科大学生命科学部
白田秀明	帝京大学医学部	出羽毅久	名古屋工業大学大学院工学研究科
榎並 勲	東京理科大学	寺島一郎	東京大学大学院理学系研究科
得平茂樹*	首都大学東京大学院理工学研究科	徳富(宮尾)光恵	農業生物資源研究所
遠藤 剛	京都大学大学院生命科学研究科		光合成研究チーム
大岡宏造	大阪大学大学院理学研究科	鞆 達也	東京理科大学理学部
大杉 立	東京大学大学院農学生命科学研究科	仲本 準	埼玉大学大学院理工学研究科
太田啓之	東京工業大学	永島賢治	神奈川大学
	バイオ研究基盤支援総合センター	成川 礼*	静岡大学大学院理学研究科
大友征宇	茨城大学理学部	南後 守	大阪市立大学大学院理学研究科
大政謙次	東京大学大学院農学生命科学研究科	西田生郎	埼玉大学大学院理工学研究科
小川健一	岡山県農林水産総合センター	西山佳孝	埼玉大学大学院理工学研究科
	生物科学研究所	野口 航	東京大学大学院理学系研究科
小野高明	茨城大学工学部生体分子機能工学科	野口 巧	名古屋大学理学研究科
小保方潤一	京都府立大学・生命環境科学研究科	長谷俊治	大阪大学蛋白質研究所
小俣達男	名古屋大学大学院生命農学研究科	林 秀則	愛媛大学
垣谷俊昭	名古屋大学		無細胞生命科学工学研究センター
菓子野康浩	兵庫県立大学理工学部	原登志彦	北海道大学低温科学研究所
柏山佑一郎*	福井工業大学工学部	彦坂幸毅	東北大学大学院生命科学研究科
金井龍二	埼玉大学	久堀 徹	東京工業大学資源化学研究所
神谷信夫	大阪市立大学大学院理学研究科	日原由香子	埼玉大学大学院理工学研究科
熊崎茂一	京都大学大学院理学研究科	檜山哲夫	埼玉大学
栗栖源嗣	大阪大学蛋白質研究所	福澤秀哉	京都大学大学院生命科学研究科
小池裕幸	中央大学理工学部	藤田祐一	名古屋大学大学院生命農学研究科
小林正美	筑波大学大学院数理工学研究所	古本 強*	龍谷大学農学部
坂本 亘	岡山大学資源生物科学研究所	前 忠彦	東北大学
佐賀佳央	近畿大学理工学理学科	牧野 周	東北大学大学院農学研究科
櫻井英博	早稲田大学	増田真二	東京工業大学
佐藤公行	岡山大学		バイオ研究基盤支援総合センター
佐藤直樹	東京大学大学院総合文化研究科	増田 建	東京大学大学院総合文化研究科
佐藤文彦	京都大学大学院生命科学研究科	松浦克美	首都大学東京都市教養学部
鹿内利治	京都大学大学院理学研究科	松田祐介	関西学院大学理工学部
重岡 成	近畿大学農学部	真野純一	山口大学農学部
篠崎一雄	理化学研究所植物科学研究センター	皆川 純	基礎生物学研究所
島崎研一郎	九州大学大学院理学研究院	宮下英明	京都大学大学院地球環境学堂
嶋田敬三	首都大学東京	宮地重遠	海洋バイオテクノロジー研究所
白岩義博	筑波大学生物科学系	村田紀夫	基礎生物学研究所
沈 建仁	岡山大学大学院自然科学研究科	山谷知行	東北大学大学院農学研究科
杉浦昌弘	名古屋市立大学	横田明徳	奈良先端科学技術大学院大学
	大学院システム自然科学研究科		バイオサイエンス研究科
杉浦美羽	愛媛大学 プロテオサイエンスセンター	和田 元	東京大学大学院総合文化研究科
杉田 護	名古屋大学遺伝子実験施設		
杉山達夫	名古屋大学		
鈴木祥弘	神奈川大学理学部		

\*平成 26 年より新幹事

## 編集後記

前任者の野口航さんから引き継ぎ、今号から編集長を務めることになりました。どうぞよろしくお願いたします。昨今、日本語で書かれた科学専門誌が次々に姿を消していく中、「光合成研究」は貴重な国内雑誌になりました。光合成は、生物学だけではなく化学、物理学にまたがる異分野横断型の学問ですので、日本語で書かれたわかりやすい解説や研究紹介は、学生や若手研究者だけではなく、中堅・シニア層の研究者にとっても非常に価値のあるものだと思います。この雑誌をさらに素晴らしいものにするため鋭意努力する所存であります。

さて、今号は、2014年5月30日～31日に近畿大学農学部で開催された第5回日本光合成学会・公開シンポジウム「光合成の多様な世界について」でご講演していただいた方々、ポスター発表賞を受賞された方々、また笠島一郎さんに執筆していただきました。力作が多く、光合成研究の醍醐味が直に伝わってくるように思いましたが、いかがでしたでしょうか。今号に関するご意見や本誌に対するご要望がございましたら、ぜひ私までご連絡ください。

また、研究紹介や解説を随時受け付けておりますので、奮ってご投稿ください。表紙に適した写真もよろしくお願いたします。

編集長・西山 佳孝 (埼玉大学)

## 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、会誌編集長の西山佳孝 (nishiyama@molbiol.saitama-u.ac.jp) までご連絡ください。

「光合成研究」編集委員会

編集長 西山 佳孝 (埼玉大学)  
編集委員 田中 亮一 (北海道大学)  
編集委員 伊福 健太郎 (京都大学)  
編集委員 粟井 光一郎 (静岡大学)

---

日本光合成学会 2015年度役員

会長 高橋 裕一郎 (岡山大学)  
事務局長 鹿内 利治 (京都大学)

常任幹事 田中 歩 (北海道大学) 前会長  
常任幹事 池内 昌彦 (東京大学)  
常任幹事 野口 航 (東京大学) 前編集長  
常任幹事 西山 佳孝 (埼玉大学) 編集長  
常任幹事 園池 公毅 (早稲田大学)  
常任幹事 久堀 徹 (東京工業大学) 渉外  
常任幹事 皆川 純 (基礎生物学研究所)  
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  
常任幹事 柏山 佑一郎 (福井工業大学)  
常任幹事 杉浦 美羽 (愛媛大学)  
常任幹事 松田 祐介 (関西学院大学) 年会 2015年  
常任幹事 鞆 達也 (東京理科大学) 光生物学協会

会計監査 伊藤 繁 (名古屋大学)  
ホームページ 加藤 裕介 (岡山大学)

---

光合成研究 第25巻 第1号 (通巻72号) 2015年4月30日発行

日本光合成学会

〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

岡山大学 理学部生物学科

高橋裕一郎研究室内

TEL : 086-251-7861

FAX : 086-251-7876

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ッカイ

---