

解説

光合成電子伝達反応におけるオルタナティブ・エレクトロン・フロー (The Water-Water CycleおよびCyclic Electron Flow around PSI) を整理してみる

～ クロロフィル蛍光パラメーターの統一的理解を通して ～

神戸大学大学院・農学研究科
久保智史、杉本敏男、三宅親弘*

1. はじめに

高等植物が、太陽光のもとで光合成炭素還元回路 (Photosynthetic Carbon Reduction Cycle) および光合成炭素酸化回路 (Photosynthetically Carbon Oxidation Cycle) を駆動させ、光合成として二酸化炭素を生葉に取り込み有機物へ同化しているとき (C₄植物では光合成炭素酸化回路はかなり抑制されている)、光エネルギーはこれら回路以外でも利用あるいは消費されている。光合成系以外への光エネルギーの流れの必然性は植物の生育に無機栄養が必須であることを考えると少なくともその同化系への光エネルギー供給に認めることができる。それでは、それ以外の光エネルギーの流れの存在意義は何であろうか？

光合成系以外への光エネルギーの流れを葉緑体チラコイド膜光合成電子伝達系での電子の流れとしてみたときに、それは光合成に代わる電子伝達反応と定義され、オルタナティブ・エレクトロン・フローと呼ばれる。現在、オルタナティブ・エレクトロン・フローとして提唱されている電子の流れには、少なくとも以下のものが列挙される。第1に、葉緑体チラコイド膜光化学系 I での The Water-Water Cycle、第2に、葉緑体チラコイド膜光化学系 I での循環的電子伝達反応 (CEF-PSI)、第3に、葉緑体チラコイド膜光化学系 II での循環的電子伝達反応 (CEF-PSII)、第4に、葉緑体チラコイド膜光合成電子伝達系プラスチド・ターミナル・オキシダーゼ (PTOX) によるクロロレスピレーション、第5に、ミトコンドリア呼吸系への電子の流れ、第6に、無機栄養同化のための還元力供給である。

これらオルタナティブ・エレクトロン・フローの存在意義を明らかにするには、各フローでの電子伝達活性を評価し、生理的役割を議論する必要がある。本稿では、主に、筆者らのこれまでの研究において携わった The Water-Water Cycle および CEF-PSI について、それらの分子メカニズム、電子伝達活性の検出法の確立を述べ、最後に世界で初めてクロロフィル蛍光パラメーターの統一的理解に成功し、最近提唱できたqLモデルを通して、オルタナティブ・エレクトロン・フローの役割に言及する。このモデルを用いれば、葉緑体チラコイド膜光合成リニア電子伝達反応のシンク能 (チラコイド膜光化学系 II 量子収率 (ϕ (PSII)) あるいはルビスコに依存した電子伝達反応) を基準としたクロロフィル蛍光パラメーター、熱散逸能 (NPQ, non-photochemical quenching)、チラコイド膜光化学系 II 最大量子収率 (Fv/Fm)、チラコイド膜プラスチキノン酸化還元レベル (qL) の評価が可能となる。

2. The Water-Water Cycle

The Water-Water Cycleは、世間一般には、高等植物葉緑体での活性酸素代謝として認識されている。植物が生育不良にいたる環境ストレス下のみならず通常の光合成条件においても、光合成電子伝達反応に伴い、葉緑体チラコイド膜光化学系 I で不可避免的に酸素が一電子還元され、スーパーオキシドラジカル(O₂)およびその不均化物である過酸化水素(H₂O₂)が生成する。O₂およびH₂O₂これら活性酸素の無毒化のメカニズムがこれまで主な研究対象とされ、浅田浩二先生のグループ

* 連絡先 E-mail: cmiyake@hawk.kobe-u.ac.jp

により明らかにされた (The Water-Water Cycleのメカニズム; 参考文献1を参照)。また、光合成生物の進化に伴う The Water-Water Cycle の分子メカニズムの変遷は文献2を参照のこと。葉緑体チラコイド膜光化学系 I にて O_2 が一電子還元され、 O_2^- が生成する。 O_2 光還元反応を担う分子の実体の候補としていくつかの候補がこれまで明らかにされている。第1に、光化学系 I 複合体に存在するFe/S-センター、第2に、光化学系I電子受容体であるフェレドキシン、第3に、三宅ら³⁾が明らかにした葉緑体に存在するフラビン・タンパク質群である。フラビン・タンパク質が反応中心にもつ補酵素フラビン(FAD)は光化学系 I で還元され、その後 O_2 に速やかに電子を渡す。フラビン・タンパク質に依存した光合成電子伝達反応は、単離された葉緑体チラコイド膜を用いて簡単に測定できる。葉緑体チラコイド膜のクロロフィル蛍光収率を Walz 社の PAM Chl Fluorometer (ナモト貿易) を用いて、Quenching analysisする際、作用光照射時にフラビン・タンパク質を葉緑体に存在する量添加すると迅速なクロロフィル蛍光のクエンチングを観測することができ、 O_2 への速やかな電子の流れを確認することができる³⁾。この反応は、葉緑体に存在する多くのフラビン酵素により触媒される事実を考えると、光合成に利用されない過剰な光エネルギーの結果、葉緑体チラコイド膜光合成電子伝達系に蓄積する電子を排出することがいかに大切であるかをうかがい知ることができる。光合成電子伝達系での電子の蓄積が葉緑体にとって非常に危険であることは後述する。これら O_2 還元の前駆体により生成する O_2^- は、葉緑体チラコイド膜上あるいはストロマに存在するスーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase, SOD) により H_2O_2 へと不均化される。これらの結果は、葉緑体での活性酸素の生成は光合成生物にとって避けられないことを示す。

植物は、生成した活性酸素を速やかに消去するシステムをもっている。葉緑体チラコイド膜光化学系 I で生成した H_2O_2 は、チラコイド膜に結合あるいはストロマに存在するアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (ascorbate peroxidase, APX)により速やかに H_2O へ還元無毒化される。葉緑体に存在するAPXは、その不安定さゆえに長い間見いだされなかった酵素であり、中野・浅田⁴⁾によりAPXの基質であるアスコルビン酸(Asc)が共存する条件下でAPXが安定に単離できることを見出されて初めてAPXの存在が認知された。そし

て、このことが三宅・浅田⁵⁾によるチラコイド膜結合APXの発見・単離に至った。その後の研究で、大気 O_2 下での単離の際に自動酸化で生成する H_2O_2 がAPXとCompound-Iを形成し、さらに H_2O_2 によりCompound-Iが酸化的攻撃を受けることがAPXを失活・分解させ、これまで見いだされなかった理由であることが明らかになった⁶⁾。

葉緑体において光生成する H_2O_2 が継続的に消去されるためには、APXの基質であるAscは再生され続けなければならない。単離葉緑体で測定される光化学系 I での H_2O_2 の最大生成速度は約 $200 \mu M/s$ に達し、Ascが再生されなければ、葉緑体に10 mM存在するAscは1分以内に消費つくされてしまう。The Water-Water CycleでのAsc再生反応は、中野・浅田⁷⁾によるエレガントな実験により提唱された。彼らは、単離葉緑体を用いて、光照射下、 H_2O_2 に依存してチラコイド膜光化学系 II から O_2 が発生することを見出したのである。これは、APX反応によって、Hill oxidant が生成することを意味しており、Ascの再生反応が葉緑体電子伝達反応とカップルして進行していることを示していた。これを契機に、APXによるAscの一電子酸化物であるモノデヒドロアスコルビン酸 (MDA) ラジカルを Asc に再生するMDA還元酵素、さらにMDAの不均化反応により生成するAscの二電子酸化物デヒドロアスコルビン酸 (DHA) を Asc に再生するDHA還元酵素、そしてグルタチオン (GSH) 還元酵素が相次いで見いだされた⁸⁾。これらのAsc再生反応系は葉緑体ストロマ画分で進行するが、その後の研究で、MDAラジカルが光化学系 I でフェレドキシンにより直接還元されAscが再生する反応が見出され、ここではMDAラジカルがHill oxidantであることが発見されている⁸⁾。つまり、チラコイド膜上で光生成した H_2O_2 が速やかにチラコイド膜に結合したAPXにより消去されたのち、Ascがチラコイド膜上で素早く再生されるチラコイド H_2O_2 消去システムが確立された⁸⁾。

ここまで、チラコイド膜光化学系Iで光生成した O_2^- および H_2O_2 の消去システムを見てきたが、そもそも O_2^- を一電子還元する電子はチラコイド膜光化学系IIでの水の光酸化により生成したものであり、上記のシステムは光で生成した活性酸素を光エネルギーを用いて消去する系として認識できる。そして、光化学系IIでの水の光酸化に始まり、APX反応での H_2O_2 の水への還元

に終わるということで、一連の電子伝達反応はThe Water-Water Cycleと名付けられた³⁾。

The Water-Water Cycleが確立された後、いくつか疑問が残された。第1に、生葉では、どれだけの速度で機能しているのか？第2に、The Water-Water Cycleはどのような時に機能するのか？第3に、生葉における機能は、活性酸素生成のみか？以下に、これらの疑問に対して現段階で明らかになっている答えを順追って記述する。

The Water-Water Cycleでの電子伝達反応の測定は、これまで主に2つの方法で行われてきた。1つは、クロロフィル蛍光解析とガス交換解析を合わせた同時測定法による電子伝達反応速度の評価である⁹⁾。評価原理は非常に単純なものである。The Water-Water Cycleの律速反応であるO₂の一電子還元反応およびAsc再生反応に光合成電子伝達系で電子が流れていけば、チラコイド膜光化学系 II で水の光酸化の結果、生成する電子の流れの大きさは、光合成でのCO₂固定で消費される電子の流れの大きさを上回る。そこで、光合成電子伝達反応速度はクロロフィル蛍光解析におけるチラコイド膜光化学系 II 量子収率(ϕ (PSII))解析により評価、そして光合成CO₂固定で消費される電子の流れの大きさはルビスコのキネティクスを用いてガス交換速度から評価された。実際、生葉に照射する光強度が増大し、光合成によるCO₂固定が光飽和しても、 ϕ (PSII)は増加し続け、光合成以外への電子の流れの存在が明らかとなった。その後の研究により、その電子の流れの酸素依存性からThe Water-Water Cycleの活性が評価されていることが確認され、光合成による光飽和⁹⁾、また光合成の誘導期にThe Water-Water CycleでのO₂還元、つまり活性酸素の生成が促進されていることが示され、第2の疑問に対する答えが得られた¹⁰⁾。これらのThe Water-Water Cycleの生葉での知見は、安定同位元素でラベルした質量数18のO₂を用いた光依存の生葉への¹⁸O₂取り込み実験からも支持された。この方法がThe Water-Water Cycleを評価する第2の方法である。The Water-Water Cycleの第3の機能は、Ulrich Schreiber先生のグループにより提唱されたものである¹¹⁾。The Water-Water Cycleが機能すれば、ATPが生成しない電子伝達反応のみが葉緑体で進行する。これは、チラコイド膜において積極的なプロトン勾配形成を促すものであり、NPQ誘導に貢献する。三宅は、このアイデアに1993~1995年、ドイツ・ビュルツブル

グにて触れる機会があった。彼らのアイデアは、非常にわかりやすく、実験もスマートに行われていた。葉緑体を用いた実験において、O₂が存在しないと全くプロトン勾配形成が観測されず、NPQ形成が阻害される。この事実は、しかしながら生葉では再現性がなく、いまだに解決がなされていない問題であり、後述するCEF-PSIでも説明がつかない(三宅・未公表)。まだ多くの未知の生理現象が眠っていると思われる。

Ulrich Schreiber先生により提唱されたThe Water-Water Cycleの役割に関して、2009年、園池公毅先生のグループが、The Water-Water Cycleに依存した電子伝達反応が低下したシロイヌナズナ変異体ではNPQ形成が抑制されており、The Water-Water Cycleによるプロトン勾配形成、そしてこれによるNPQ誘導が証明された¹²⁾。

3. Cyclic Electron Flow around PSI

Cyclic Electron Flow around PSI (CEF-PSI)は、1963年、田川ら¹³⁾によって、葉緑体チラコイド膜光化学系 I において電子伝達体タンパク質であるフェレドキシン(Fd)が、光合成リニア電子伝達反応に依存せず、光照射下ATPを産生する事実によりその存在が示された。ここでは、光化学系 I により一電子還元されたFdが、チラコイド膜電子伝達体プラストキノン(PQ)を還元する光化学系 I 周囲の電子伝達反応が機能している(CEF-PSIメカニズム；参考文献14を参照)。これに伴い、チラコイド膜間プロトン勾配が形成され、ATPが生成する。

CEF-PSIの生理機能が初めて提唱されたのは1992年、Heber・Walkerによるものであった¹⁵⁾。ここでは、CEF-PSIが駆動するプロトン勾配形成がATP生成とNPQ誘導をもたらすものであった。CEF-PSIにより生成されるATPの役割は以下のように考えられている。C₃植物において、光合成炭素還元および光合成炭素酸化回路が機能するときに要求されるATPは、光合成リニア電子伝達反応のみによっては供給されえず、付加的なATP供給系が存在しなければこれらの回路は機能しないというものである。この理解は、葉緑体チラコイド膜光合成電子伝達反応でのプロトン/電子の比、プロトン/ATPの値に依存する。これに基づき、理論的なCEF-PSI活性の要求度を評価すると、C₃植物の場合、CO₂飽和条件では、CEF-PSIの機能は要求されず、葉内CO₂分圧が低下し、光合成炭素酸化回

路が機能し始めるとCEF-PSIの機能が要求され、CO₂補償点で最高に達する^{16,17)}。実際、CEF-PSI活性の葉内CO₂分圧依存性を評価すると、CO₂補償点でその要求度が最も大きく、葉内CO₂分圧が飽和するにつれて、その要求度は低下していく。この事実は、CEF-PSIのATP供給の役割をよく説明する。しかしながら、実際は、CO₂飽和下でも、CEF-PSIの活性は、光合成の光飽和に伴い、機能することが明らかになった¹⁸⁾。このことは、CEF-PSI活性の生葉での検出と合わせて後述する。また、C₃植物と異なり、C₄植物では葉緑体チラコイド膜光化学系IIの機能が低下あるいは欠損した維管束鞘細胞において、CEF-PSIがメインの役者としてATP供給を担って光合成を駆動することが提唱され、実際に、遠藤剛先生のグループがCEF-PSIのC₄植物での役割をMaizeにおいて示された¹⁹⁾。C₄植物では、葉肉細胞でCO₂を炭酸イオンで固定し、維管束鞘細胞においてCO₂を濃縮しており、そのためC₃植物と比べてCO₂固定に対するATP要求度が大きい。このため、CEF-PSI機能は、高等植物の進化においてC₄植物に保持されていたものと考えられる。

これまで述べたCEF-PSIの機能を評価し生理機能に言及するためには、その活性を、**定常光下、光合成が機能しているときに**評価しなければならない。定常光下でのCEF-PSI活性の評価法にはこれまで2つの方法が提唱されている。第1は、Ulrich Schreiber先生のグループが提唱したものである²⁰⁾。これは、定常光下、光合成電子伝達反応に関わり、光励起され得るP700の存在割合を評価する方法であり非常にシンプルな方法である。彼らがこの方法を公表したとき、高等植物においてはCEF-PSIの活性は非常に小さいものであることが記載されていた。しかし、その後、我々は、CEF-PSI活性は植物の生育条件、測定時の温度条件など環境条件で大きく変動することを示し、その存在を確かめるものにすることができた¹⁶⁻¹⁸⁾。我々が用いたCEF-PSI活性の存在を裏付けるアイデアもまた非常にシンプルなものであった。生葉で葉緑体光合成リニア電子伝達反応の光強度依存性を評価すると、必ず、光合成リニア電子伝達反応が光飽和するに伴いNPQが増大してくる。ここで、NPQ誘導には、キサントフィル・サイクルでのビオラキサナンチン・デエポキシダーゼがチラコイド膜ルーメンの酸性化、つまりチラコイド膜間プロトン勾配形成により、活性化され、ゼアキサナンチンが蓄積する必要があることを思い出してほしい。つ

まり、光合成リニア電子伝達反応の光飽和後、NPQがドラマティックに誘導されるという事実は、光飽和した後では、プロトン勾配形成を誘導することができない光合成リニア電子伝達反応ではNPQ誘導を説明できないことを示している。したがって、我々は、CEF-PSIがこの役割を担っているという仮説のもとで、光合成リニア電子伝達反応の光飽和との相関関係を調べた。その結果、見事に、光合成リニア電子伝達反応が光飽和するにつれて、CEF-PSI活性が増大していることを認めることができた¹⁸⁾。光合成リニア電子伝達反応が光飽和後、つまりCO₂固定反応速度が光飽和したのち誘導されるCEF-PSIの活性は、生葉の温度が増大し、光合成が促進されるとCEF-PSI活性は低下する。また逆に、低温にさらされ、光合成が低下するとCEF-PSI活性は増大する。そして、CEF-PSI活性の大きさとNPQの誘導が正の相関をもつことが示された¹⁶⁾。

定常光下でのCEF-PSI活性を評価する第2の方法は、一時的かつ瞬間的に定常光を遮断した後の、光生成したP700+の基底状態への戻り速度を評価するものである。この方法は、Giles Johnson先生のグループにより多く活用された²¹⁾。そこで得られた結論は、我々のものと一致するものであった。この方法の難点は、P700+が生成・観測されなければならないということである。したがって、弱光領域でのCEF-PSI活性の正確な評価ができにくい点が挙げられる。また、P700+の基底状態への減衰が多成分より成立していることである。これは、プラストシアニン、シトクロム*b₆/f*複合体そしてプラストキノンからの電子伝達速度の速度定数をそれぞれ反映している可能性があること、また光化学系Iのヘテロ性を反映する可能性があることなどがその原因と考えられ、CEF-PSI活性評価を悩ましい困難なものにしている。

ここで、CEF-PSI活性の発現メカニズムを考えてみる。これまでの研究で、CEF-PSI活性が検出される主な条件として、光合成リニア電子伝達反応が光飽和し始めるときが挙げられる。これは、光合成炭素還元回路および光合成炭素酸化回路に見られる光合成によるCO₂固定系への電子の流れが抑制されるとき、つまり葉緑体チラコイド膜光化学系Iの還元側に電子が蓄積するときにCEF-PSIの活性が発現していることを示す。この条件は、The Water-Water Cycleの機能発現と一致する。つまり、葉緑体で活性酸素生成の危険性が

生じるような時に、積極的にCEF-PSIが機能していると考えられる。光化学系I還元側での電子蓄積とCEF-PSI活性の正の相関は、The Water-Water Cycle を抑制させ、さらに還元状況を増大させた時CEF-PSI活性が促進される事実にも認められる¹⁰⁾。CEF-PSIが機能するには、還元型のフェレドキシンとフェレドキシンから電子を受け取る酸化型のプラストキノンが必要であるために、光合成リニア電子伝達反応が抑制され、プラストキノンの還元が促進される低い葉内CO₂分圧下では、CEF-PSIは機能するがその活性そのものは低く抑えられてしまう¹⁶⁾。低CO₂条件、あるいは乾燥ストレス下、気孔が閉じるような条件で、ストレス緩和のためにCEF-PSI活性が増大するという事は、誤った認識である。これに対して、The Water-Water Cycle は、強光および低CO₂分圧下、光合成電子伝達反応においてエレクトロン・シンクとして働くため、いずれの状況下でも、その活性は増大することをここに付け加えておく⁹⁾。

これまで、CEF-PSIの生理機能および活性発現の様式を見てきた。その一方で、CEF-PSIの分子メカニズムについては、コンセンサスが得られていない。順を追ってそのメカニズムについて以下に見ていく。CEF-PSIにおいて、光化学系Iで光生成した電子は、2つの運命をたどることが提唱されている¹⁴⁾。第1は、還元型フェレドキシンが、プラストキノンへ電子を与えるために、この反応を触媒する酵素フェレドキシン-プラストキノン酸化還元酵素 (FQR) によってCEF-PSIが駆動するというものである。第2は、光化学系Iで光生成したNAD(P)Hが、NAD(P)H脱水素酵素 (NDH) によってプラストキノンへ電子を渡すCEF-PSI経路である。FQRの実体については、主に2つの候補が挙げられている。まず、鹿内利治先生のグループによるPGR5 タンパク質の関与が指摘されている。ただし、このタンパク質を欠損したシロイヌナズナ変異体において、定常光下でのCEF-PSI活性が見出され、CEF-PSIが機能していることが示されている (ワシントン州立大学の David Kramer 先生のグループ、参考文献 22; Giles Johnson 先生のグループ、参考文献 21)。したがって、決着にはまだ多くの議論と検証が必要とされる。次に候補として挙げられているのが、チラコイド膜シトクロム b_6/f 複合体に存在する heme C_n である。この heme が、フェレドキシンから直接電子を受け取り、Q-cycleへ電子を入れ、プラストキノンを

還元するというものである²⁴⁾。この説も、まだ検証が必要である。これらFQRの候補に対して、NDHのタンパク質としての実体解明は、遠藤剛先生および鹿内利治先生の両グループにより精力的に現在もなされている状況である²⁷⁾。NDHのCEF-PSIへの関与に関しても同様に、定常光下での活性評価が必要であり、いまだなされていない。今後の解析結果とその解釈を待ちたい。

ここで、世界で初めて、CEF-PSI活性強化そしてNPQ増強植物の作成に成功した事例を紹介する。一般に、ある代謝系を強化する場合、律速過程にある反応の活性を増大させる必要がある。CEF-PSIの場合、これまでに活性発現に関する以下の状況証拠が出そろっていた。第1に、還元型のフェレドキシンがプラストキノンを還元すること;第2に、遠赤外光によるチラコイド膜光化学系Iの励起において、チラコイド膜を介するプロトン勾配形成はフェレドキシン存在下のみ生じること;第3に、光合成が光飽和するにつれて*in vivo*の生葉でCEF-PSI活性が増大すること、である。これらはいずれも、葉緑体チラコイド膜上で還元型フェレドキシンの量が増えることがCEF-PSI活性の増大をもたらすことを示す。そこで、我々は、葉緑体でのフェレドキシンの量を増やすことにより、電子をフェレドキシンに蓄積する機会を増やし、CEF-PSI活性強化を狙った。タバコ葉緑体に、シロイヌナズナ・フェレドキシンを葉緑体形質転換により導入し、過剰発現させた²⁵⁾。この植物は、非組換え体と比べて、高いCEF-PSI活性とそれにより引き起こされる大きなNPQの値を示す形質を獲得していた。これらの結果は、我々のアイディアが正しいことを示すものであった。

上記のCEF-PSI活性強化植物作成例は、1992年に Heber・Walker が提唱したCEF-PSIの生理機能の1つであるチラコイド膜を介するプロトン勾配形成の役割を実証するものであった。しかしながら、フェレドキシンを過剰発現させたタバコでは、非組換え体と比べて光合成の能力の増強は見られなかった²⁵⁾。この結果は、CEF-PSIによる光合成炭素還元回路および炭素酸化回路へのATP供給の能力は、非組換え体において既に飽和していることを示唆するものである。

4. クロロフィル蛍光パラメーターの統一的理解

我々は、これまで述べたように、オルタナティブ・エレクトロン・フローの役割解明のための武器として PAM Chl Fluorometer を中心としたクロロフィル蛍光解析を行ってきた。この解析で主に得られる情報は、葉緑体チラコイド膜光化学系IIの最大量子収率(Fv/Fm)、光化学系IIの熱散逸能(NPQ)、プラストキノンの酸化還元を示すqP (photochemical quenching)、それに光照射時の光化学系IIの量子収率(φ(PSII))である。これらのパラメーターは、これまで、単独に議論され、評価されることが多かった。たとえ、相関づけられたとしても2つのパラメーター間での議論で止まっていた。そこで生じる悪弊として、特に顕著に見られるのが、ある植物種での野生型および変異体間でのクロロフィル蛍光パラメーターの比較である。例えば、野生型と変異体間で φ(PSII) の値に差があったでしょう。それは一体、何が原因であろうか？純粋に electron sinkとしての光合成炭素還元回路および光合成炭素酸化回路が駆動する光合成能力の差？あるいはNPQの差？あるいはQpの差？実は、これらパラメーターは全てφ(PSII)に影響を与えるのである。逆に、NPQの値の比較でもその大小は、φ(PSII)そして他のパラメーターの値に大きく影響される。つまり、これは単独のパラメーターの記載に基づく議論には全く意味がないことを示す。クロロフィル蛍光解析により光合成を理解するためには、他のパラメーターの状況証拠を合わせて記載する必要がある。

我々は、これらパラメーターを統合した1つのモデル式を提唱することを試みていた。その間、2004年、ワシントン州立大学 David Kramer 先生は、光化学系IIでの光吸収およびその反応中心P680への光エネルギーの伝達様式が、特に高等植物において、Lake modelに従うことを示し、葉緑体チラコイド膜プラストキノンの酸化還元レベルを示すクロロフィル蛍光パラメーター、qL、を導入した^{22, 23)}。qL算出のポイントは、光化学系II励起クロロフィル Chl a がもつ光エネルギーが反応中心P680により光化学反応で消費される時、その効率が酸化型PQの比率に左右されるという発想である。我々は、独自に、この効率が基底状態のP680の比率に依存するというアイデアをもっていたので、彼らの概念と我々のものが同値であるという結論に速やかに至った。彼らのqLのモデル式を以下に示す。

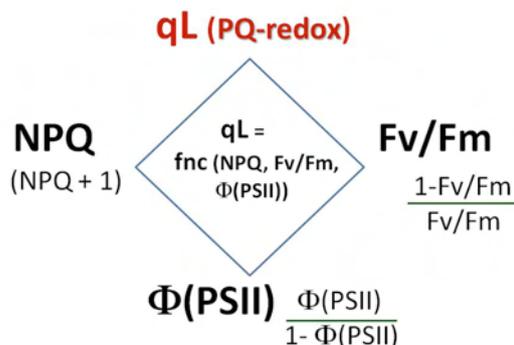


図1. クロロフィル蛍光パラメーターの相関関係

クロロフィル蛍光パラメーター (qL, the fraction of open PSII center reflecting the redox level of the plastoquinone (PS) pool; NPQ, non-photochemical quenching of Chl fluorescence; Fv/Fm, maximum quantum yield of PSII in the dark; φ(PSII), quantum yield of PSII in the light) は、相互に相関づけられ、その関係式は、
 $qL = fnc(NPQ, Fv/Fm, \phi(PSII))$
 $= (\phi(PSII) / (1 - \phi(PSII))) * ((1 - Fv/Fm) / (Fv/Fm)) * (NPQ + 1)$
 として示される。

$$qL = \frac{[(Fm' - Fs) / (Fm' - Fo')] * (Fo' / Fs)}{qP * (Fo' / Fs)} \quad (1)$$

それぞれの略号は、クロロフィル蛍光解析で得られる相対的なクロロフィル蛍光強度であり、以下のとおりである。

Fm', 光照射下での最大蛍光強度

Fs, 光照射下での蛍光強度

Fo', 光照射下での最小蛍光強度

ここで、qLは、0～1の間の値をとる。

式(1)から明らかなように、qPとqLは別物である。qPは、Lake modelと違いPuddle modelより導かれるクロロフィル蛍光パラメーターである。Puddle modelでは、個々の反応中心からなる光化学系IIが、それぞれ単独で存在し、相互の光エネルギーのやり取りがないとするモデルである。それは、光合成電子伝達反応に関与できる反応中心とそうでないものが光照射中が存在すると仮定するモデルである。そして、qPは、光合成電子伝達反応に関与しないものの割合が高くなると、その値が小さくなる性質をもち、qLと同様に0～1の間の値をとる。そして、このPuddle modelは藻類などで成立すると考えられている²²⁾。

我々は、NPQ、Fv/Fmおよびφ(PSII)がPQの酸化還元レベルを支配するものとし、式(1)の導出過程で、これらのパラメーターを含ませることに成功した(式(2))²⁶⁾。

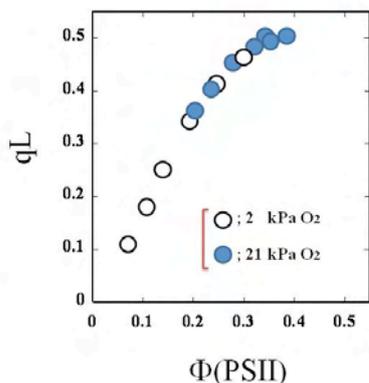


図2. qLの $\phi(\text{PSII})$ 依存性

イネ生葉を用いて、一定の光強度下、生葉周りのガス組成として2種類の酸素分圧下(2 kPaおよび21 kPa)、CO₂分圧を変化させることで、クロロフィル蛍光パラメーターがモニターされた。 $\phi(\text{PSII})$ の増大とともにqLの増大を認めることができる。これは、葉緑体チラコイド膜光合成リニア電子伝達活性の促進が、プラストキノンの酸化をもたらしていることを示している。酸素分圧を2から21 kPaへ増大させると、 $\phi(\text{PSII})$ の増大が認められる。これは、光合成炭素酸化回路およびThe Water-Water cycleの促進を示している。つまり、オルタナティブ・エレクトロン・フローによる光合成リニア電子伝達活性の促進はプラストキノンを酸化する役割をもつ。プラストキノン(PQ)の還元レベルが高いとき、つまりqLの値が小さい条件下では、チラコイド膜光化学系IIは顕著な光障害を被る²⁶⁾。したがって、光合成におけるエレクトロン・シンクが高く維持されていること(大きな $\phi(\text{PSII})$ を維持すること)は光障害緩和に大きく貢献する。

$$qL = (\phi(\text{PSII}) / (1 - \phi(\text{PSII}))) * ((1 - Fv/Fm) / (Fv/Fm)) * (NPQ + 1) \quad (2)$$

この式は、前述のクロロフィル蛍光パラメーターをすべて取り入れたものである。これにより、個々のパラメーターの値の変動が、相互に関係づけられるようになった(図1)。

qLのモデル式(2)を解釈する。葉緑体チラコイド膜光合成リニア電子伝達反応が促進すると、 $\phi(\text{PSII})$ が増大する。これは、qLの増大をもたらす、予想されるように、プラストキノンが酸化されることを示す(図2²⁶⁾)。このとき、NPQの増大を伴うと、さらにプラストキノンは酸化される。そして、Fv/Fmの低下もまたqLを増大させる。我々は、高等植物であるタバコが強光条件に順化するとき、光合成活性を低下させることなくFv/Fmを低下させ、プラストキノンを酸化させることを見出した²⁶⁾。しかも、このFv/Fmの低下は、強光下、光化学系IIの光障害緩和に大きく貢献してい

ることを見出し、この強光順化応答による光障害緩和機構を「プラストキノン酸化システム(Plastoquinone Oxidation System (POS))」と名付けた²⁶⁾。

qLのモデル式(2)および図2から、オルタナティブ・エレクトロン・フローである The Water-Water Cycle の役割を考えてみる。生葉周りの大気酸素分圧を2から21 kPaへ増大させ、The Water-Water Cycleを促進させると葉緑体チラコイド膜光合成リニア電子伝達反応が促進され、 $\phi(\text{PSII})$ が増大する。この結果は、The Water-Water CycleがqLの増大をもたらす、プラストキノンの酸化に貢献することを示す。つまり、The Water-Water Cycleはelectron sinkとして機能していることが分かる。この機能は、qLが低下した植物が光障害を被りやすい事実を考えると²⁶⁾、The Water-Water Cycleにおいて積極的に過剰な光エネルギーを電子の流れとして散逸することの重要性を示すものである。一方、CEF-PSIは、qLの増加には貢献しない(data not shown、このことはqPに影響しないことにも一致する¹⁷⁾)。また、CEF-PSIが強化されNPQが増大した場合もプラストキノンの酸化に貢献は認められなかった²⁵⁾。したがって、高等植物では、光合成リニア電子伝達反応を促進するelectron sinkの能力およびFv/Fmにより、プラストキノンの酸化還元レベルは、光照射下、主に、制御されている。

5. おわりに

以上、光合成電子伝達反応に伴うオルタナティブ・エレクトロン・フロー、特にThe Water-Water CycleおよびCyclic Electron flow around PSIの現状を生葉における生理機能の側面から整理してみた。そこでは、クロロフィル蛍光パラメーターを統合したモデル式が有効活用された。今後、このモデルに基づいたクロロフィル蛍光パラメーター間の変動の相関解析が、種々の植物間での比較、特に変異体解析に適用されることが期待される。

謝辞

本研究では、クロロフィル蛍光解析、特にPAM (Pulse-Amplitude Modulation) クロロフィル蛍光光度計を用いた解析が主な研究手法となっています。PAMは、現在、ナモト貿易が輸入、販売、メンテナンスを担っています。ナモト貿易・岡本淳さんには、私どもの多くの無理を通して、機器のパフォーマンスを完璧

に維持していただいております、彼の協力なくてはクロロフィル蛍光解析の研究は滞ってしまいます。ここに厚く感謝の意を表するものであります。また、三宅は、京都大学大学院・修士課程1年の時に、PAMと巡り合わせていただいた京都大学名誉教授・浅田浩二先生に深く感謝します。この機器1台あれば、多くの未知の生理現象に出会えるとの教えに、興味を覚え触り始めて20数年、いまだに興味尽きぬ新事実に出会えることを喜んでおります。また、学位取得まで、光合成はThe Water-Water CycleおよびCyclic Electron flow around PSIが機能する明反応のみしか理解していなかった私に、ガス交換を中心とする暗反応と明反応を融合した光合成研究の世界に入るチャンスをいただいた東北大学大学院・牧野周先生に心よりお礼を申し上げます。さらに、目の前に見える観測事実に真摯に向き合い、その現象を徹底的に説明していくスタイルを教えてくださいました東京大学大学院・寺島一郎先生に感謝の意を厚く表すものであります。

Received July 14, 2009, Accepted July 16, 2009, Published August 31, 2009

参考文献

- Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601-639.
- Miyake, C. and Asada, K. (2003) The water-water cycle in algae, in *Photosynthesis in Algae* (Larkum, A.W.D., Douglas, S.E. and Raven, J.A. Eds.) pp 183-204, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Miyake, C., Schreiber, U., Hormann, H., Sano, S. and Asada, K. (1998) The FAD-enzyme monodehydroascorbate radical reductase mediates photoreduction of superoxide radicals in spinach thylakoid membranes. *Plant Cell Physiol.* 39, 821-829.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.* 28, 131-140.
- Miyake, C. and Asada, K. (1992) Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiol.* 33, 541-553.
- Miyake, C. and Asada, K. (1996) Inactivation mechanism of ascorbate peroxidase at low concentrations of ascorbate; Hydrogen peroxide decomposes compound-I of ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 37, 423-430.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1980) Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination, *Plant Cell Physiol.* 21, 1295-1307.
- Miyake, C. and Asada, K. (1994) Ferredoxin-dependent photoreduction of monodehydroascorbate radicals in spinach thylakoids. *Plant Cell Physiol.* 35, 539-549.
- Miyake, C. and Yokota, A. (2000) Determination of the rate of photoreduction of O₂ in the water-water cycle in watermelon leaves and enhancement of the rate by limitation of photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 41, 335-343.
- Makino, A., Miyake, C. and Yokota, A. (2002) Physiological functions of the water-water cycle (Mehler reaction) and the cyclic electron flow around PSI in rice leaves. *Plant Cell Physiol.* 43, 1017-1026.
- Schreiber, U. and Neubauer, C. (1990) O₂-dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching, *Photosynth. Res.* 25, 279-293.
- Higuchi, M., Ozaki, H., Matsui, M. and Sonoike, K. (2009) A T-DNA insertion mutant of *AtHMA1* gene encoding a Cu transporting ATPase in *Arabidopsis thaliana* has a defect in the water-water cycle of photosynthesis, *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 94, 205-213.
- Tagawa, K., Tsujimoto, H.Y. and Arnon, D.I. (1963) Role of chloroplast ferredoxin in the energy conversion process of photosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 16898-16903.
- Endo, T. and Asada, K. (2003) Photosystem I and Photoprotection: Cyclic Electron Flow and Water-Water Cycle, in *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment* (Demmig-Adams., Adams III, W.W. and Mattoo, A., Eds.) pp 205-221, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Heber, U. and Walker, D.A. (1992) Concerning a dual function of coupled cyclic electron transport in leaves, *Plant Physiol.* 100, 1621-1626.
- Miyake, C., Miyata, M., Shinzaki, Y. and Tomizawa, K. (2005) CO₂ response of cyclic electron flow around PSI (CEF-PSI) in tobacco leaves – Relative electron fluxes through PSI and PSII determine the magnitude of non-photochemical quenching (NPQ) of Chl fluorescence. *Plant Cell Physiol.* 46, 629-637.
- Miyake, C., Horiguchi, S., Makino, A., Shinzaki, Y., Yamamoto, H. and Tomizawa, K. (2005) Effects of light intensity on cyclic electron flow around PSI and its relationship to non-photochemical quenching of Chl fluorescence in tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.* 46, 1819-1830.
- Miyake, C., Shinzaki, Y., Miyata, M. and Tomizawa, K. (2004) Enhancement of cyclic electron flow around PSI at high light and its contribution to the induction of non-photochemical quenching of Chl fluorescence in intact

- leaves of tobacco plants. *Plant Cell Physiol.* 45, 1426-1433.
19. Takabayashi, A., Kishine, M., Asada, K., Endo, T., Sato, F. (2005) Differential usage of two cyclic electron flows in C4 photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 16898-16903.
20. Klughammer, C. and Schreiber, U. (1994) An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700⁺-absorbance change at 830 nm, *Planta* 192, 261-268.
21. Nandha, B., Finazzi, G., Joliot, P., Hald, S. and Johnson, G. (2007) The role of prg5 in the redox poisoning of photosynthetic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 1252-1259.
22. Avenson, T.J., Cruz, J.A., Kanazawa, A. and Kramer, D.M. (2004) Regulating the proton budget of higher plant photosynthesis. *Proc. Acad. Sci. USA* 102, 9709-9713.
23. Kramer, D.M., Johnson, G., Kiirats, O. and Edwards, G.E. (2004) New fluorescence parameters for determination of QA redox state and excitation energy fluxes, *Photosynth. Res.* 79, 209-218.
24. Kurisu, G., Zhang, H., Smith, J.L. and Cramer, W.A. (2003) Structure of the cytochrome *b6f* complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science* 302, 109-1014.
25. Yamamoto, H., Kato, H., Shinzaki, Y., Horiguchi, S., Shikanai, T., Hase, T., Endo, T., Nishioka, M., Makino, A., Tomizawa, K. and Miyake, C. (2006) Ferredoxin limits cyclic electron flow around PSI (CEF-PSI) in higher plants – Stimulation of CEF-PSI enhances non-photochemical quenching of Chl fluorescence in transplastomic tobacco. *Plant Cell Physiol.* 47, 1355-1371.
26. Miyake, C., Amako, K., Shiraishi, S. and Sugimoto, S. (2008) Acclimation of tobacco leaves to high light intensity drives the plastoquinone oxidation system – Relationship among the fraction of open PSII centers, non-photochemical quenching of chl fluorescence and the maximum quantum yield of PSII in the dark. *Plant Cell Physiol.* 50, 730-743.
27. Takabayashi, A., Ishikawa, N., Obayashi, T., Ishida, S., Obokata, J., Endo, T., Sato, F. (2009) Three novel subunits of Arabidopsis chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase identified by bioinformatic and reverse genetic approaches, *Plant J.* 57, 207-219.

Understanding the Alternative Electron Flow in Photosynthesis: The Water-Water Cycle and Cyclic Electron Flow around PSI through qL Model unifying the Parameters of Chl Fluorescence

Satoshi Kubo, Toshio Sugimoto, Chikahiro Miyake*

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