

## 阻害剤を用いた光化学系Iサイクリック電子伝達の研究<sup>§</sup>

京都大学 大学院 理学研究科  
平 純考\*、鹿内 利治

### 1. はじめに

葉緑体における光合成電子伝達にはリニア電子伝達 (LET) と光化学系I (PSI) サイクリック電子伝達 (CET) の二つの経路があり、CETでは電子がPSIからプラストキノン (PQ) に輸送されることで更なるプロトン濃度勾配が形成される<sup>1)</sup>。CETの発見は50年以上遡り、Arnonのグループがチラコイド膜で光のエネルギーを用いてATPを生産する反応として報告している<sup>2)</sup>。このような光合成 (生命と言っても過言ではない) の基本反応がいまだ完全に解明されていないことは、驚くべきことである。我々のグループは、2002年にこの経路に異常を示すシロイヌナズナの *pgr5* (*proton gradient regulation 5*) 変異体を単離し、この経路が強光下でのNPQの誘導、PSIの光阻害からの回避、さらには二酸化炭素固定あるいは光呼吸にATPを供給することを明らかにした<sup>3)</sup>。高等植物では、PGR5タンパク質に依存するCETの主経路に加え、NDH複合体依存の経路も機能する (図1)<sup>4,5)</sup>。Arnonの見つけたPGR5依存経路は、しばしばフェレドキシン依存経路と呼ばれるが、それを触媒するフェレドキシン・キノン酸化還元酵素 (FQR) の実体は未知である。これまでにPGR5やPGRL1 (PGR5-like photosynthetic phenotype) の二つの

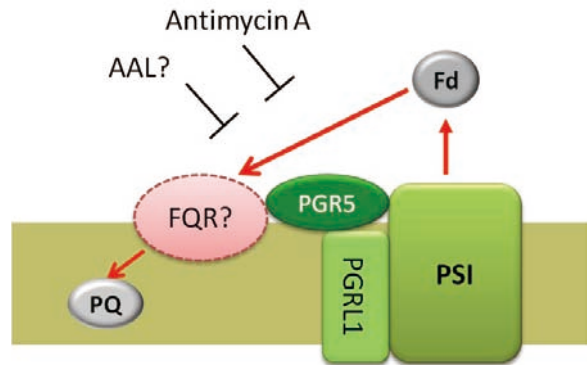


図2 PGR5依存経路の詳細。FQRの存在はこれまで明らかになっていないため疑問符をつけている。

タンパク質がこの経路に必須であることがわかっている<sup>3,6)</sup> (図2)。クラミドモナスでは、PSI、シトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体、FNRさらにPGRL1を含む超複合体がCETを行うことが報告された<sup>7)</sup>。クラミドモナスのCETはstate transitionに依存する点が高等植物とは異なり<sup>8)</sup>、また高等植物ではこのような超複合体の報告はない。CETの装置は、高等植物とクラミドモナスで異なっているのかもしれない。また最近我々のグループは、NDH複合体がPSIと超複合体を作り<sup>9)</sup>、フェレドキシンを電子供与体とすることを報告した<sup>10)</sup>。したがって、両経路ともフェレドキシンに依存する。

本稿では、我々の行っているPGR5依存CETを特異的に阻害する薬剤からのアプローチを紹介する。

### 2. アンチマイシン Aについて

フェレドキシンに依存す

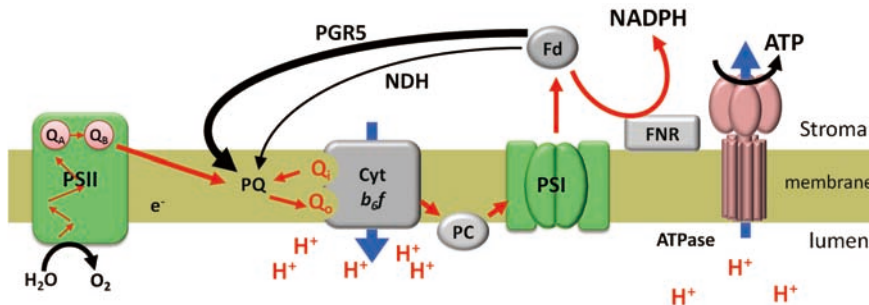


図1 葉緑体チラコイド膜上での電子伝達。CETにはPGR5依存の経路とNDH依存の二つの経路が存在する。LETを赤線、CETを黒線で示した。

<sup>§</sup> 第2回日本光合成学会シンポジウム ポスター賞受賞論文

\* 連絡先 E-mail: y.taira@pmg.bot.kyoto-u.ac.jp

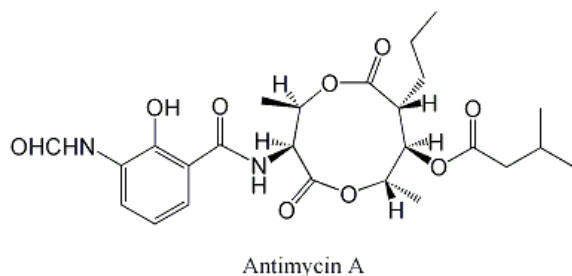


図4 アンチマイシンAの構造。

る二つのCETは遺伝学により明確に分けることができる。もう一つ、両者を区別するのはアンチマイシンA (図3) に対する感受性である<sup>5)</sup>。PGR5依存経路はアンチマイシンAに感受性であるが、NDH依存経路は阻害を受けない。アンチマイシンAによるCETの阻害は、古くにArnonのグループにより発見されており<sup>11)</sup>、ArnonのサイクリックとPGR5依存のサイクリックを結ぶ一つの根拠になっている<sup>11)</sup>。アンチマイシンAはもともとミトコンドリアにおける呼吸鎖電子伝達の阻害剤として見つかった化合物である<sup>12)</sup>。シトクロム $bc_1$ 複合体のQiサイトに結合し、Q<sub>i</sub>サイクルを阻害する。葉緑体のシトクロム $b_6f$ 複合体はシトクロム $bc_1$ 複合体と構造的に類似しており、アンチマイシンAが葉緑体のシトクロム $b_6f$ 複合体のQi部位に結合するという漠然とした考えが広がっている。このことがまちがいであることはしばしば指摘されているが<sup>13)</sup>、アンチマイシンAの結合部位をきちんと調べた研究は少ない。我々は、アンチマイシンAがFQRのキノン結合部位を塞ぐ可能性が低いことを示唆する結果を得ている。

作用機作が不明なこと以外にも、アンチマイシンAをCETの研究に用いるには大きな問題がある。PGR5依存経路の阻害にはミトコンドリア電子伝達を阻害する濃度の200倍程度の高い濃度のアンチマイシンAを必要とする点である (チラコイド膜での使用で10  $\mu$ M)<sup>3,14)</sup>。このような高濃度の阻害剤の使用は、様々な問題を引き起こす。葉や細胞を用いる際には、呼吸鎖の阻害がもちろん深刻であるが、葉緑体においてもNPQの誘導を阻害することが知られている<sup>15)</sup>。さらに高濃度では、我々のアッセイ系で、LETも阻害するようである。光合成研究におけるアンチマイシンAの使用に際しては、濃度を注意して最適化する必要がある。このような問題を解決するため、我々は、PGR5依存CETを低濃度で特異的に阻害する薬剤の選抜を

行った。この薬剤が、FQRの核心部に結合するならば、それを指標にFQRの実体を解明することができるかもしれない。

### 3. CET活性の測定

阻害剤の活性測定にはCETの正確な評価が必要となってくる。しかしCETは、入口と出口のない循環的な反応の宿命で、その速度の測定は困難である。現在でも、その新しい測定法についてしばしば報告がなされ、測定方法によって異なる結果が混乱の原因になっている。それぞれの測定法の問題については、総説にまとめられている<sup>16)</sup>。我々は、最も直接的な方法として、破壊葉緑体におけるフェレドキシン依存プラストキノ還元活性をモニターしている<sup>3)</sup>。この方法は、クロロフィル蛍光測定に依存するため、超弱光下で測定しており、明らかにCETにとって最適ではない。しかし、シロイヌナズナの変異株では、この活性が明瞭に低下しており、またCETを完全に欠く*crr2 pgr5*二重変異体では全く活性が見られない<sup>5)</sup>。またこのフェレドキシン依存プラストキノ還元活性は、アンチマイシンAで明瞭に阻害を受ける<sup>5)</sup>。したがって、定量性はないものの、CET活性の有無を反映していると考えられる。

我々の研究室で行っているCET測定は、しばしばその速度の遅さで批判を受ける。問題は超弱光下で測定を行っているところにある。そこで、弱光下で、LETの存在下でCET活性を測定する技術を開発した<sup>17)</sup>。この系では、PSIからの電子受容を制限することで、明瞭にCETがLETと競合することを示すことができた。残念ながら、この方法も定量性はないが、CET活性の有無を照射射下で評価することが可能になった。この方法を用いて、PGR5依存CETがLETと競合可能で、特にPSIからの電子受容体が充分でないときに多くの電子が分配されることが明らかになった<sup>17)</sup>。

NDH依存CETは、変異株の表現型から考えても、PGR5依存CETよりかなり速度が遅いことが考えられる。しかしながら、我々の破碎葉緑体を用いたCET測定法では、NDH複合体依存CETとPGR5依存CETは同程度に見積もられ<sup>5)</sup>、明らかに超弱光下では、PGR5依存CETが十分に機能していない。しかし弱光下での改良法では、NDH依存CETはほとんど検出されず、*in vivo*での速度をより反映していると考えられる<sup>17)</sup>。二つのCETがいかにかに制御されているか理解が乏しいが、

NDH依存CETを特異的に検出できるのは、光照射後の一過的クロロフィル蛍光の上昇である<sup>4)</sup>。この方法も定量性はないが、この蛍光変化を指標にスクリーニングを行うと、NDH複合体に異常を持つ変異株に行き着く<sup>18)</sup>。NDH複合体異常の明瞭な表現型として遺伝学に利用可能である。

我々の研究室で行われているCET測定の特徴と問題点を整理した。いずれの方法もクロロフィル蛍光測定に依存し、PSII周辺CETの評価のためにPSII活性に依存するクロロフィル蛍光を測定するのは、いかにも間接的である。薬剤のスクリーニングにはこのクロロフィル蛍光を測定する方法で行ったが、この問題を解決するために、我々はpmf形成に依存するECS (electrochromic shift)を測定することを試みた。これまで*pgr5*変異株で明瞭な表現型を得ることに成功しており、今回見つけたAALについてもこの方法で更に評価を進めていく予定である。これらの成果については、別の機会に報告したい。

#### 4. アンチマイシンAに代わる阻害剤の探索

我々は、以下の二つの理由からアンチマイシンA以外にPGR5依存CETを特異的に阻害する化合物の選抜を行った。一つ目の理由は、生理学実験に用いる際に、アンチマイシンAがCET以外に様々な反応を阻害する問題の回避である。これは、CETの阻害に高濃度のアンチマイシンAを必要とすることに起因する。より低濃度で特異的にCETを阻害する薬剤が得られれば、生理学解析に極めて有効である。もう一つの理由は、もしアンチマイシンAと異なる作用機作を持つ薬剤が得られれば、いまだ明らかになっていないフェレドキシン依存プラストキノン還元活性に関わるタンパク質を同定できると考えたからである。

京都大学農学研究科の三芳秀人先生との共同研究で、PGR5依存CETを阻害する化合物のスクリーニングを行った。方法は、前述の破裂葉緑体においてフェレドキシン依存プラストキノン還元をモニターするものである。その結果、アンチマイシンAに比べ10~20分の1の低濃度でCETを阻害する化合物を発見した。この化合物は*pgr5*変異株では阻害効果がなく、NDH依存のCETを欠く*crr2*変異株でCETを完全に阻害したことから、PGR5依存経路を特異的に阻害すると考えられる。現在論文を準備中であり、ここで化合物の構造等詳細を記述することはできないが、アンチマイシンA

と同様の活性を示すことからこの化合物をAAL (Antimycin A-like)と名付け、さらに詳細な解析を行った。細胞への浸透性など、まだ解決しない問題があるものの、今後アンチマイシンAに代わるPGR5依存CETの阻害剤として期待される化合物である。

#### 5. おわりに

生理学実験において特異的な阻害剤の利用は大きな威力を発揮する。しかし、阻害剤利用の宿命として、阻害の特異性が問題となってくる。このような場合、変異株の利用が有力となる。しかしながら、*pgr5*変異株のように、異常を持つ遺伝子の産物の機能が生化学的に明確になっていない場合、結果の判断が難しい場合がある。この研究の場合、アンチマイシンAが、*pgr5*変異株で観察される表現型と半世紀以上に発見されたArnonのCETとを結ぶ橋となった。阻害剤と遺伝学の併用により、生命についての理解は大きく進むことが考えられ、今後、AALがCET研究に貢献することを期待している。

#### 謝辞

AALの探索は、京都大学農学研究科三芳秀人先生、安部真人先生との共同研究です。化合物の分与から、合成のご指導まで、お世話になりました。また、本研究の一部の内容は論文として投稿予定であり、せっかく執筆の機会を与えていただきながら、研究結果の詳細を記載できなかったことをお詫びいたします。

Received November 15, 2011, Accepted November 21, 2011, Published December 31, 2011

#### 参考文献

1. Shikanai, T. (2007) Cyclic electron transport around photosystem I; genetic approaches, *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 199-217.
2. Arnon, D. I., Allen, M. B., and Whatley, F. R. (1954) Photosynthesis by isolated chloroplasts, *Nature* 174, 394-396.
3. Munekage, Y., Hojo, M., Meurer, J., Endo, T., Tasaka, M., and Shikanai, T. (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in Arabidopsis, *Cell* 110, 361-371.
4. Shikanai, T., Endo, T., Hashimoto, T., Yamada, Y., Asada, K., and Yokota, A. (1998) Directed disruption of

- the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9705-9709.
5. Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K., Endo, T., Tasaka, M., and Shikanai, T. (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis, *Nature* 429, 579-582.
  6. DalCorso, G., Pesaresi, P., Masiero, S., Aseeva, E., Schünemann, D., Finazzi, G., Joliot, P., Barbato, R., and Leister, D. (2008) A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*, *Cell* 132, 2, 273-285.
  7. Iwai, M., Takizawa, K., Tokutsu, R., Okamuro, A., Takahashi Y., and Minagawa, J. (2010) Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis, *Nature* 464, 1210-1213.
  8. Finazzi, G., Rappaport, F., Furia, A., Fleischmann, M., Rochaix, J.-D., Zito, F., and Forti, G. (2002) Involvement of state transitions in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*, *EMBO Report* 3, 280-285.
  9. Peng, L., Fukao, Y., Fujiwara, M., Takami, T., and Shikanai, T. (2009) Efficient operation of NAD(P)H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCI in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 21, 3623-3640.
  10. Yamamoto, H., Peng, L., Fukao, Y., and Shikanai, T. (2011) An Src homology 3 domain-like fold protein forms a ferredoxin-binding site for the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 23, 1480-1493.
  11. 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* 49, 567-572.
  12. Trumpower, B.L. (1990) The proton motive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex, *J. Biol. Chem.* 265, 11409-11412.
  13. Bendall, D. S., and Manasse, R. S. (1995) Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochim. Biophys. Acta*, 1229, 23-38.
  14. Miyoshi, H., Kondo, H., Oritani, T., Saitoh, I., and Iwamura, H. (1991) Inhibition of electron transport of rat liver mitochondria by unnatural(-)-antimycin A<sub>3</sub>, *FEBS Lett.* 292, 61-63.
  15. Horton, P., Ruban, A. V., and Walters, R.G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 655-684.
  16. Johnson, G. N. (2005) Cyclic electron transport in C<sub>3</sub> plants: fact or artifact?, *J. Exp. Bot.* 56, 407-416.
  17. Okegawa, Y., Kagawa, Y., Kobayashi, Y., and Shikanai, T. (2008) Characterization of factors affecting the activity of photosystem I cyclic electron transport in chloroplasts, *Plant Cell Physiol.* 49, 825-834.
  18. Hashimoto, M., Endo, T., Peltier, G., Tasaka, M., and Shikanai, T. (2003) A nucleus-encoded factor, CRR2, is essential for the expression of chloroplast *ndhB* in *Arabidopsis*, *Plant J.* 36, 541-549.

## Inhibitors of Photosystem I Cyclic Electron Transport

Yoshichika Taira\*, Toshiharu Shikanai  
 Graduate School of Science, Kyoto University