

光合成研究

第19巻 第2号（通巻55号）2009年8月

NEWS LETTER Vol. 19 NO. 2 August 2009
THE JAPANESE SOCIETY OF PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

会長挨拶	池内昌彦	46
トピックス 光化学系II複合体は界面活性剤により二量体化する！？	渡邊麻衣	48
トピックス 高等植物におけるガラクト脂質の合成とその役割	小林康一	52
解説 光照射下の葉の呼吸系の働き	野口航	59
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～ 久保智史、杉本敏男、三宅親弘		66
解説 シアノバクテリアの酸素適応と活性酸素適応	浅田浩二	75
報告記事 第9回日本光合成研究会シンポジウム報告	小川健一	81
第9回日本光合成研究会シンポジウムポスター賞受賞者 光合成学会「若手の会企画会」の報告ならびに 若手の会セミナー開催のお知らせ	成川礼	82 83
集会案内		84
新刊図書		84
事務局からのお知らせ		85
日本光合成学会会員入会申込書		86
日本光合成学会会則		87
幹事会名簿		89
「光合成研究」の著作権委譲に関するお願い		90
会員名簿		91
賛助法人会員広告		

会長挨拶

2009年7月23日

日本光合成学会会長 池内昌彦

1979年に発足し、長年活動してきました「日本光合成研究会」は、さる2009年6月1日をもって「日本光合成学会」に発展的に移行しました。この移行は昨年の幹事会、総会で提案され、1年間の審議を経て、今年の幹事会、総会で承認されました。その間、賛成の意見が徐々に増加し、今回の総会において賛成多数で承認されました。なお、学会の名称については異論もありましたが、最終的に、現行の名称に落ち着きました。なお、昨年の幹事会、総会での審議では、研究会としての居心地のよさと学会としての活動を幅広くするべきであるという正反対のご意見がありました。このようなご意見は常にあり、その両立は容易ではありませんが、ともに積極的に推進していきたいと考えています。

光合成研究会の歴史を振り返ってみますと、初代の宮地重遠先生（会長1979～1991）の後を受けて、西村光雄先生(1991～1992)が会誌「光合成研究」を発刊され、佐藤公行先生(1993～1994)、金井龍二先生(1995～1996)、井上頼直先生(1997～1998)、高宮建一郎先生(1999～2000)と受け継がれてきました。村田紀夫先生(2001～2004)は幹事会、事務局と執行部の体制を刷新し、シンポジウムやワークショップを充実させ、伊藤繁先生(2005～2008)は会誌「光合成研究」を大幅に充実されました。このような長い歴史を持つ日本光合成研究会を引継ぎ、さらに「日本光合成学会」として発展させていくことが責務と考えています。

現在の学会運営体制は、日本光合成研究会として名大・伊藤会長から2009年1月に引き継いだそのままであり、鹿内事務局長とともに進める活動計画はすぐに大きく変更できません。しかしそのなかで、会誌「光合成研究」のさらなる充実を図っていきたいと考えています。2006年から伊藤前会長と野口前編集長の尽力で、会誌をカラー化し、内容も研究を指向したすぐれた記事が集まるようになってきました。光合成学会の取り組みとしては、この会誌の内容をさらに充実させ、執筆者にとっても会員にとってもより魅力的な学術雑誌にすることを目指します。そのため、原稿の審査システムを導入し、幅の広い内容をレビュー論文、テクニカル論文として充実させる取り組みを進めています。また、光合成研究の全内容の学会ホームページでの公開と学術情報センターなどへ寄託してデータベース化する準備を進めています。そのため、今後の論文、記事だけでなく過去のものも含めて著作権の

委譲を皆様をお願いしています。また、このような改革は、「光合成研究」の編集に大きな負担を強いるため、増田編集長をはじめとして複数の編集委員体制を発足する予定です。まだ十分ではないかもしれませんが、「光合成研究」の充実を光合成学会の発展につなげていきたいと考えていますので、会員の方々の今後の積極的な貢献を期待しています。

2つ目としては、人材の育成につとめます。光合成は熟成した分野であるとともに、分野横断的に研究が進み、さまざまな人の流れが重要です。そのためには、次世代を担う人材として、若手や女性研究者の育成が鍵です。これまで、方法論を中心としたワークショップが開催されてきましたが、さらに若手を結集したり、分野横断的に若手の交流を進められるようにしていきます。

3つ目としては、日本の光合成研究の幅を拓けていく努力を続けていきます。光合成研究法は田中歩先生のご尽力により立派な冊子体として完成しました。これはひとえに光合成研究に携わる先生方のご協力によって完成したものです。今後は、光合成事典、光合成研究法のバージョンアップとともにさらなる活動を続けていきます。また、シンポジウムやワークショップを拡充し、幅広い分野からより多くの人々が参加できるようにしていきます。さらに光合成分野を代表して、分野を横断して提携したり、社会へ発信するなどの責務も果たしていく予定です。そのためには、会員の皆様のご支援を賜りますよう、お願い申し上げます。

光化学系II複合体は界面活性剤により二量体化する！？§

東京大学・大学院総合文化研究科
渡邊麻衣

1. はじめに

光化学系II複合体（系II複合体）は、チラコイド膜に存在する超分子複合体であり、少なくとも20のサブユニットと多数の色素や脂質分子からなり、シアノバクテリアから高等植物までよく保存されている。これまでに、さまざまな生物から単離されており、単量体と二量体の2つの状態が報告されている¹⁻⁴⁾。好熱性シアノバクテリアでは、二量体を用いた結晶構造解析が行われており、3.8~2.9 Åの分解能の結晶構造が報告されている⁵⁻⁹⁾。高等植物では、単粒子解析や集光性アンテナタンパク質複合体である、LHCII (light-harvesting chlorophyll complex) と系IIの超分子複合体が精製されているが、これらも系II複合体は二量体である¹⁰⁻¹²⁾。また、酸素発生活性やタンパク質、色素結合量は単量体よりも二量体の方が高いことが報告されてきた。これらのことから、系II複合体は生体内で二量体として機能しており、単量体はアセンブリーや修復過程の中間体であると考えられてきた^{3, 13)}。しかし近年、二量体と同等の酸素発生活性やタンパク質、色素組成を示す単量体の存在も報告されている¹⁴⁾。このように、系II複合体は二量体と単量体の間で変換することが知られているが^{15, 16)}、二量体形成の生理的意義やその分子機構には不明な点が多い。

シアノバクテリアや緑藻において、系II複合体の二量体化に関与するサブユニットがいくつか報告されている¹⁷⁻²²⁾。我々のグループも、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (*T. elongatus*) の変異体解析により、PsbMやPsbTcといった二量体の安定化に関与するサブユニットを報告している^{19, 20)}。また、phosphatidylglycerolなどの脂質が二量体化に関与していることも知られている²³⁾。

本研究では、系IIサブユニットの遺伝子破壊が系IIの二量体形成へ及ぼす影響を再評価する目的で、blue-native PAGE (BN-PAGE) による解析を行った。BN-PAGEはnativeなタンパク質複合体を簡便に分離する方法として広く用いられており、系II複合体の解析にも使われている^{16, 24)}。しかし、実験法が簡便な割には詳しい条件や標品の検討はあまりされていない。今回我々は、チラコイド膜を可溶化する際の界面活性剤濃度に着目し、検討した。可溶化は、膜タンパク質複合体の精製の第一段階であり、濃度を検討することは、系II複合体の安定性を調べる上で重要である。膜タンパク質複合体は、高濃度の界面活性剤処理により、複合体が解離することが知られている。しかし我々は、可溶化濃度の検討により、以下に述べる予想外の結果を得た。

2. 結果

2-1. 系II複合体の安定性

マイルドな条件で単離した *T. elongatus* のチラコイド膜を0.5%から5.0%までのさまざまな濃度の *n*-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DM) で可溶化し、DMを含まないゲルを用いたBN-PAGEによって分離した (図1A)。それぞれのバンドは、分子量と二次元SDS-PAGEの解析から、系I三量体、フィコビリソームコア、系II二量体、単量体、フィコシアニンであった。

系IIの単量体と二量体の比は、可溶化時のDM濃度に依存して、変化していた。しかし驚いたことに、低濃度DMでは単量体が多く、高濃度DMでは二量体が増加するという、これまでの常識に反する結果であった。単量体の減少が高濃度DMにより引き起こされたサブユニットの解離ではないことを確かめるため、ゲルをスキャンし、それぞれのバンドのクロロフィル量

§ 第9回日本光合成研究会シンポジウム ポスター賞受賞論文

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

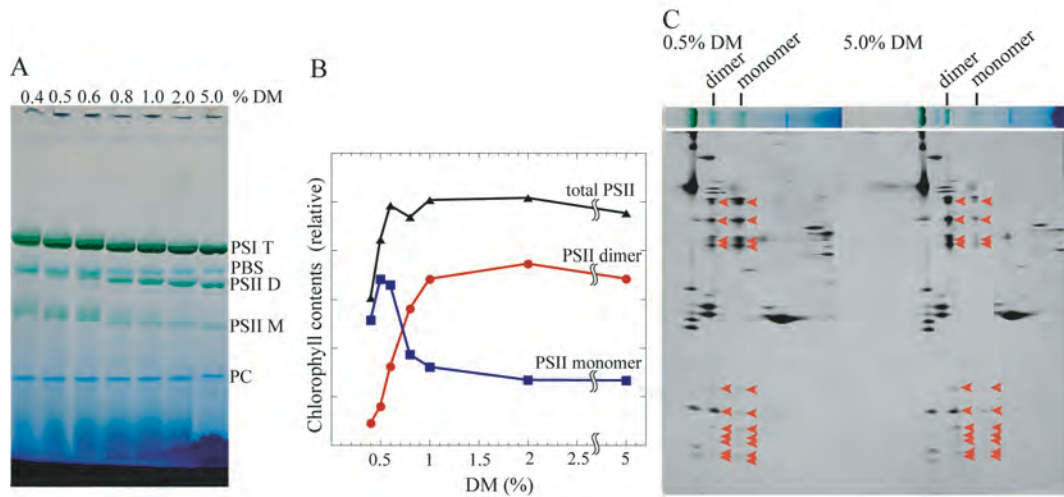


図1 WTのBN-PAGE

A、BN-PAGE; チラコイド膜を0.4から5.0%の各濃度のDMで可溶化し、遠心後の上清を泳動した。それぞれのバンドは、系II三量体 (PSI T)、フィコピリソームコア (PBS)、系II二量体 (PSII D)、系II単量体 (PSII M)、フィコシアニン (PC)。B、系II複合体のクロロフィル含量; BN-PAGEのゲルをスキャンしたときの670 nmの吸収面積。C、二次元SDS-PAGE; 一次元目のBN-PAGEの0.5%または5% DMのレーンを変性し、二次元SDS-PAGEを行った。赤矢尻は、系II複合体のサブユニットを示す。ゲルは銀染色した。

を求めた (図1B)。その結果、単量体の減少に対応して二量体が増加していた。二次元SDS-PAGEの結果から、タンパク質としても単量体の減少と二量体の増加が確認できた。また、CP43-less単量体などのこわれた系II複合体は見つからなかった (図1C)。これらの結果は、可溶化時のDM濃度により、系II複合体の単量体と二量体の回収比が変化することを明確に示している。

2-2. 段階的DM処理

可溶化時のDM濃度に依存した系II複合体の変化が、単量体から二量体への変換であるのかを調べるため、段階的なDM処理を行った。

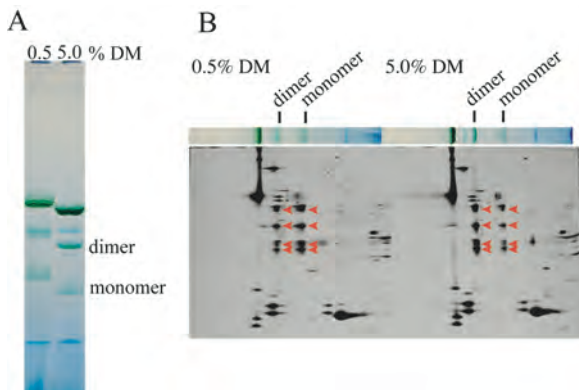


図2 段階的DM処理

A、BN-PAGE; 0.5% DMでチラコイド膜を可溶化後、遠心した上清 (レーン1) に、さらにDMを加えて処理したもの (レーン2, 終濃度5.0%)。B、二次元SDS-PAGE; 赤矢尻は系II複合体のサブユニットを示す。

0.5% DMでチラコイド膜を可溶化後、遠心により不溶性画分を除き、その上清に終濃度が5.0%になるようにさらにDMを加えて処理した後でBN-PAGEで分離した。このDMの追加によって明らかに単量体の減少と二量体の増加が見られた (図2)。このことは、高濃度のDM処理による系II複合体の単量体から二量体への変換を示している。

2-3. PsbTc, PsbM破壊株

結晶構造においてこれらのサブユニットは二量体を形成する境界面に存在し、さらに、その近くには4分子のDMも存在していた⁹⁾。また、PsbM同士でロインジッパー様の相互作用がみられ、二量体を安定化することが提案されている⁹⁾。一方、我々は遺伝子を破壊した変異株の系II複合体のクロマトグラフィーにおける挙動からPsbTc、PsbMが系II複合体の二量体化に関与することを報告している^{19, 20)}。今回は、さらにマイルドな手法であるBN-PAGEによって、これらのサブユニットと二量体化の関係を再検討した。

*psbTc*欠損株では、低濃度のDMで可溶化すると、ほとんどが単量体であった (図3A)。また、1.0% DMで可溶化しても二量体の増加は見られなかった。しかし、2.0%以上のDMで可溶化すると、単量体の減少と二量体の増加が見られた。一方、*psbM*欠損株では、すべての濃度で単量体のわずかな増加が見られたが、野生株と同様にDM濃度に依存した単量体の減少と二

量体の増加が起こった (図3B)。このことは、PsbMの二量体化への寄与はほとんどないことを示している。結晶構造から、PsbMはロイシンジッパー様の相互作用により二量体を安定化していることが示唆されているが、生体内ではこれによる二量体の安定はごく僅かであると考えられる。

3. おわりに

これまでの結果から、系II複合体の二量体化には、(1) PsbTcに依存した二量体化、(2) DMにより引き起こされる二量体化、の少なくとも2つのプロセスがあると考えている。結晶構造において、PsbTcは二量体の境界面に存在し、他方の単量体のCP47の膜貫通部と接しており、この相互作用が二量体の安定化に関与していると考えられる。また、この境界面のルーメン側にはDM分子が挿入されている。疎水性の短鎖脂肪酸を1本だけもつDM分子は、長い脂肪酸を2本もつ本来の脂質に比べ小さい。つまり、境界面に脂質分子を含む二量体においてその脂質がDM分子に置き換わることで、単量体間の距離が縮み、より強固な二量体が形成されることが考えられる。本来のチラコイド膜内では系II複合体は複数の脂質分子を含んだ緩やかな二量体構造をとっていると考えている。この緩やかな二量体構造は、系IIのダイナミックなふるまいなどに関わっているかもしれない。今後は、D1タンパク質の素早いターンオーバーなどとの関連を検証する予定である。

Received July 22, 2009, Accepted July 23, 2009, Published August 31, 2009

参考文献

- Rogner, M., Dekker, J. P., Boekema, E. J. and Witt, H. T. (1987) Size, shape and mass of the oxygen-evolving photosystem II complex from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp, *FEBS Lett.* 219, 207-211.
- Bald, D., Kruij, J. and Rogner, M. (1996) Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes: How is the phycobilisome connected with the photosystems?, *Photosynth. Res.* 49, 103-118.
- Hankamer, B., Nield, J., Zheleva, D., Boekema, E., Jansson, S. and Barber, J. (1997) Isolation and biochemical characterisation of monomeric and dimeric photosystem II complexes from spinach and their relevance to the organisation of photosystem II *in vivo*, *Eur. J. Biochem.* 243, 422-429.
- Adachi, H., Umena, Y., Enami, I., Henmi, T., Kamiya, N. and Shen, J. R. (2009) Towards structural elucidation of eukaryotic photosystem II: Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of photosystem II from a red alga, *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 121-128.
- Zouni, A., Witt, H. T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W. and Orth, P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution, *Nature* 409, 739-743.
- Kamiya, N. and Shen, J. R. (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 98-103.
- Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J. and Iwata, S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Science* 303, 1831-1838.
- Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A. and Biesiadka, J. (2005) Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II, *Nature* 438, 1040-1044.
- Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A. and Saenger, W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 334-342.
- Hankamer, B., Morris, E. P. and Barber, J. (1999) Revealing the structure of the oxygen-evolving core dimer of photosystem II by cryoelectron crystallography, *Nat. Struct. Biol.* 6, 560-564.
- Dekker, J. P. and Boekema, E. J. (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants, *Biochim. Biophys. Acta* 1706, 12-39.
- Nield, J. and Barber, J. (2006) Refinement of the structural model for the Photosystem II supercomplex of higher plants, *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 353-361.
- Barbato, R., Friso, G., Rigoni, F., Dalla Vecchia, F. and Giacometti, G. M. (1992) Structural changes and lateral redistribution of photosystem II during donor side photoinhibition of thylakoids, *J. Cell. Biol.* 119, 325-335.
- Kern, J., Loll, B., Luneberg, C., DiFiore, D., Biesiadka, J., Irrgang, K. D. and Zouni, A. (2005) Purification, characterisation and crystallisation of photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* cultivated in a new type of photobioreactor, *Biochim. Biophys. Acta* 1706, 147-157.
- Meunier, P. C., Colon-Lopez, M. S. and Sherman, L. A. (1997) Temporal changes in state transitions and photosystem organization in the unicellular, diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142, *Plant Physiol.* 115, 991-1000.

16. Aro, E. M., Suorsa, M., Rokka, A., Allahverdiyeva, Y., Paakkarinen, V., Saleem, A., Battchikova, N. and Rintamaki, E. (2005) Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes, *J. Exp. Bot.* *56*, 347-356.
17. Iwai, M., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2006) Absence of the *psbH* gene product destabilizes the Photosystem II complex and prevents association of the Photosystem II-X protein in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Photosynth. Res.* *87*, 313-322.
18. Katoh, H. and Ikeuchi, M. (2001) Characterization of PSII-I or PSII-K protein-depleted photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* strain BP-1. PSII-I protein plays an essential role in dimerization of photosystem II, *In PS2001 Proceedings: 12th International Congress on Photosynthesis*. pp. S5-50. CSIRO PUBLISHING, Collingwood.
19. Aoyama, C. (2003) Studies on PsbM of photosystem II in a thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Master thesis*.
20. Iwai, M., Katoh, H., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2004) PSII-Tc protein plays an important role in dimerization of photosystem II, *Plant Cell Physiol.* *45*, 1809-1816.
21. Iwai, M., Suzuki, T., Dohmae, N., Inoue, Y. and Ikeuchi, M. (2007) Absence of the PsbZ subunit prevents association of PsbK and Ycf12 with the PSII complex in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Plant Cell Physiol.* *48*, 1758-1763.
22. Bentley, F. K., Luo, H., Dilbeck, P., Burnap, R. L. and Eaton-Rye, J. J. (2008) Effects of inactivating *psbM* and *psbT* on photodamage and assembly of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Biochemistry* *47*, 11637-11646.
23. Kruse, O., Hankamer, B., Konczak, C., Gerle, C., Morris, E., Radunz, A., Schmid, G. H. and Barber, J. (2000) Phosphatidylglycerol is involved in the dimerization of photosystem II, *J. Biol. Chem.* *275*, 6509-6514.
24. Herranen, M., Battchikova, N., Zhang, P., Graf, A., Sirpio, S., Paakkarinen, V. and Aro, E. M. (2004) Towards functional proteomics of membrane protein complexes in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant Physiol.* *134*, 470-481.

High Concentrations of Detergent Induce a Dimerization of Photosystem II!?

Mai Watanabe*

Department of Life Sciences (Biology),
Graduate School of Arts and Science, University of Tokyo

高等植物におけるガラクト脂質の合成とその役割[§]

東京大学・大学院総合文化研究科

小林 康一*

1. はじめに

葉緑体は、シアノバクテリアの細胞内共生によって植物細胞にもたらされたと考えられている。実際、葉緑体の膜脂質組成は、細胞膜やミトコンドリア膜などその他の膜の脂質組成とは大きく異なっており、シアノバクテリアの膜脂質組成と非常によく似ている。すなわち、細胞膜やミトコンドリア膜などではグリセリン脂質が主要構成脂質であるのに対し¹⁻³⁾、葉緑体やシアノバクテリアではモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG)、ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG) といったガラクト脂質が膜脂質の大部分を占めている (図1)^{4,5)}。これらのガラクト脂質は、単純な化学構造であるにもかかわらず、非光合成生物ではほとんど見られない。そのため、植物のガラクト脂質は葉緑体の共生進化の際にもたらされた可能性が示唆されている⁶⁾。

葉緑体とシアノバクテリアは非常に類似した光合成装置を持っており、ともに酸素発生型の光合成を行う。このことから、両者の間でよく保存されてきたこれらの膜脂質も、酸素発生型の光合成に深く関与していると考えられている。実際、ガラクト脂質の光合成における役割について、近年様々な研究成果が報告されている。さらに最近の研究から、ガラクト脂質の光合成以外での役割も明らかとなってきた。特に、リン欠乏条件下では、DGDGがプラスチド外へ輸送され、減少したリン脂質を補っていることが明らかとなり、これらの糖脂質の機能が葉緑体の発達に限定されないことが分かってきた。本稿では、高等植物におけるガラクト脂質の生合成機構とその重要性について、最新の知見をまじえて紹介したい。

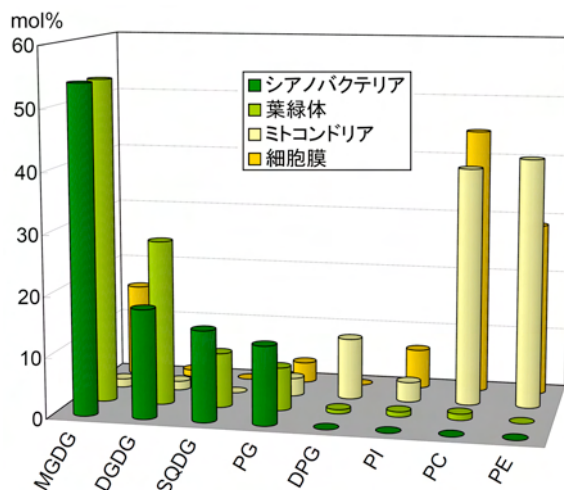


図1 シアノバクテリアと高等植物のオルガネラにおける脂質組成の比較

Synechocystis sp. PCC 6803の全抽出膜 (シアノバクテリア)⁵⁾、トウモロコシ葉肉細胞の葉緑体膜 (葉緑体)⁴⁾、シロイヌナズナ培養細胞のミトコンドリア膜 (ミトコンドリア)²⁾、およびオオムギ葉の細胞膜 (細胞膜)³⁾から得られたグリセロ脂質の組成。MGDG, モノガラクトシルジアシルグリセロール; DGDG, ジガラクトシルジアシルグリセロール; SQDG, スルホキノボシルジアシルグリセロール; PG, ホスファチジルグリセロール; DPG, ジホスファチジルグリセロール (カルジオリピン); PI, ホスファチジルイノシトール; PC, ホスファチジルコリン; PE, ホスファチジルエタノールアミン。

2. 高等植物におけるガラクト脂質合成

2-1. ガラクト脂質合成経路

ガラクト脂質の骨格となるジアシルグリセロール (DAG) の合成は、葉緑体内で完結する原核型経路と、小胞体を経由する真核型経路の二つの経路によって行われる⁷⁾。これらの経路で合成されたDAGは、ガラクト脂質をはじめ様々なグリセロ脂質合成に使われる。高等植物では、MGDG合成の最終ス

[§] 第9回日本光合成研究会シンポジウム ポスター賞受賞論文

* 連絡先 E-mail: ckk@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

トップは、UDP-ガラクトースからガラクトース分子をDAGに転移する反応によって行われる。この糖転移反応は、葉緑体包膜に局在するMGDG合成酵素(MGD)によって触媒される⁸⁾。MGDによって作られたMGDGは、膜の構成だけではなく、DGDG合成の基質としても利用される。つまりDGDG合成は、MGDGにもう1分子のガラクトースを転移することによって行われる。シロイヌナズナでは、ほとんどのDGDGはUDP-ガラクトースからMGDGへの糖転移反応により合成される。この反応は、MGDと同様に葉緑体包膜に局在するDGDG合成酵素(DGD)によって触媒される^{9,10)}。さらに、高等植物ではMGDGから別のMGDGにガラクトースを転移する(結果としてDGDGとDAGが生成される)酵素活性が単離葉緑体で見つかっている^{11,12)}。この酵素反応はさらに連続的におこり、オリゴガラクトシルジアシルグリセロールを生成することが分かっているが、この反応を担う酵素の正体はまだ分かっていない。DGDによって合成されたDGDGは2つ目のガラクトースが α 結合なのに対し、MGDG2分子から合成されるDGDGのガラクトースは β 結合であることから、DGDとはまったく異なった酵素によって行われると考えられる。

2-2. A-typeとB-typeのMGD

シロイヌナズナには、MGD1、MGD2、MGD3の3つのMGDアイソフォームが存在している。これらの酵素はアミノ酸配列の相同性から、A-type (MGD1) とB-type (MGD2/3) に分類される¹³⁾。A-typeとB-typeはアミノ酸配列だけでなく、以下の様々な点において異なった特徴を示す。i) MGD1はN端に葉緑体移行シグナルを持ち、葉緑体の内包膜に輸送されるのに対し、MGD2/3は明確な移行シグナルを持たず、外包膜に局在する。ii) MGD1は原核型経路と真核型経路のどちらの経路で合成されたDAGに対しても高い親和性を示すのに対し、MGD2/3は真核型経路で合成されたDAGに対してより高い特異性を示す。iii) MGD1タンパク質は葉緑体で蓄積が見られるが、MGD2/3タンパク質はほとんど検出できない。iv) MGD1の遺伝子発現は緑色組織で強く見られるが、MGD2/3は光合成組織でほとんど発現を示さず、根や花といった器官の組織で特異的に発現する。v) MGD1の遺伝子発現は光によって誘導されるのに対し、MGD2/3の発現は光の影響を受けず、一方でリン欠乏時に強く誘導される。

以上の特徴は、A-typeとB-typeのMGDはそれぞれ異なった役割を担っていることを示唆している。

2-3. DGD1とDGD2

シロイヌナズナには、DGD1とDGD2の二つのDGDアイソフォームが存在している^{9,14)}。DGD1とDGD2は共に、MGDGとUDP-ガラクトースからDGDGを合成する活性を有する。DGD2では、糖転移活性を担うC末端領域はDGD1と50.8%のidentityを示すのに対し、DGD1に見られるN末端部分は欠失している。このN末端領域は、DGD1が葉緑体外包膜に局在するのに必須であるが¹⁵⁾、それを欠失したDGD2も外包膜に局在することが確かめられている¹⁰⁾。DGD1は外包膜への局在にATPを必要としないのに対し¹⁵⁾、DGD2はATP依存的に輸送されることから¹⁰⁾、このN末端部位の違いにより、膜への輸送機構や局在の仕方の違いが生じている可能性がある。

2-4. MGD1-DGD1による内包膜経路

MGD1のノックアウト変異体(*mgd1-2*)では、MGDGだけでなくDGDGもほとんど検出されない¹⁶⁾。このことは、MGD1は膜構成に使われるMGDGだけでなく、DGDG合成に使われるMGDGの合成もメインに担っていることを示している。また、DGD1のノックアウト変異体(*dgd1*)ではDGDG含量が野生株の10%ほどにまで低下することから¹⁷⁾、DGDG合成の大部分はDGD1によって行われることが明らかとなっている。つまり、MGD1-DGD1がガラクト脂質合成の主要経路であり、通常生育条件下ではこの経路によってほとんどのガラクト脂質が合成されている(図2)。MGD1は内包膜局在であり、外包膜局在のDGD1と局在性の違いがあるが、DGD1に見られるN末端部位が、内包膜から供給されるMGDGの受け取りに関与しているのかもしれない。

2-5. MGD2/3-DGD2による外包膜経路

MGD2/3の二重変異体(*mgd2mgd3*)は、最適生育条件下では生長や脂質組成に野生株との違いをまったく示さない¹⁸⁾。このことから、B-type MGDは通常生育時にはガラクト脂質合成にほとんど寄与していないと考えられる。しかし、リンを欠乏した条件下では、野生株で見られるDGDGの蓄積が、*mgd2mgd3*二重変異体では大幅に低下していた。特に、根におけるDGDGの増加は、*mgd2mgd3*ではまったく見られな

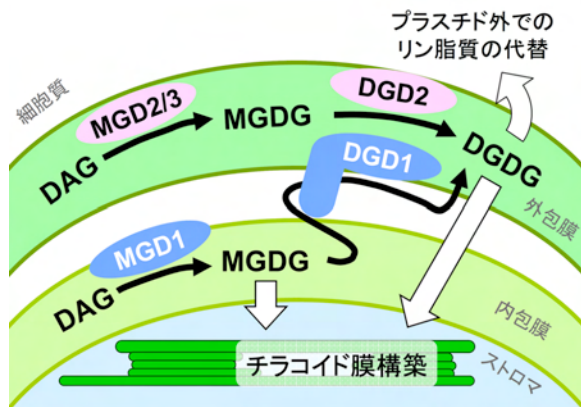


図2 シロイヌナズナ葉緑体包膜におけるガラクト脂質合成
 ガラクト脂質合成の大部分は、MGD1-DGD1経路によって行われる。この経路はチラコイド膜構築に必須である。それに対し、外包膜におけるMGD2/3-DGD2経路はリン欠乏時に活性化され、プラスチド外へのDGDGの蓄積に寄与している。プラスチド外へ輸送されたDGDGはリン脂質の代替を果たすことで、膜脂質におけるリンの使用を抑える。

かったことから、これらの酵素は、リン欠乏時の根でのDGDGの増加に必須であることが明らかとなった¹⁸⁾。さらに、DGD2においても同様の役割が報告されている。すなわち、DGD2は最適条件下ではそれほど大きな貢献をしないが、リン欠乏時には、特に根でのDGDGの蓄積に重要であることが変異体解析から示された^{10, 19)}。さらに、DGDGの脂肪酸解析から、MGD2/3によるMGDG合成は、DGD2によるDGDG合成と強くリンクしていることが明らかとなった^{10, 18)}。リン欠乏条件下においてもMGDGの増加はほとんど見られないことから、MGD2/3によって合成されたMGDGの大部分はDGD2によるDGDG合成に使われると考えられる(図2)。リン欠乏時にはDGDGはプラスチド外へ輸送されることが分かっているが^{1, 2, 19, 20)}、外包膜に局在するMGD2/3-DGD2経路は、このプラスチド外へのDGDGの輸送に有利なのかもしれない。

3. ガラクト脂質の光合成における役割

3-1. チラコイド膜構築における役割

植物やシアノバクテリアでは、チラコイド膜脂質の約80%がガラクト脂質で占められていることから、これらの脂質はチラコイド膜構築に必須の基礎要素となっている。実際、ガラクト脂質をほとんど欠失した*mgd1-2*では、チラコイド膜の形成がまったく起らない¹⁸⁾。また、MGDGの含量が野生株の42%にまで

減少したMGD1ノックダウン変異体²¹⁾では、強光下での光合成効率が大きく低下していた²²⁾。この変異体では、チラコイド膜におけるプロトン駆動力が減少しており、その結果pH依存的な非光化学消光が減少したと考えられる。この結果は、MGDGが膜間のプロトン勾配の形成・維持に重要であることを示している。一方、DGDG含量が大幅に減少した*dgd1*や*dgd1dgd2*二重変異体においても、チラコイド膜の減少や変形が見られている^{17, 23)}。MGDGは極性基の小さいコーン型の構造をしており、単独では脂質二重膜を形成できないノンラメラ脂質であるのに対し、DGDGはラメラ脂質であり、単独で脂質二重膜を形成できる。このような特性の違いなどから、MGDG:DGDG比がおおよそ2:1程度で存在していることが、チラコイド膜の安定的な層構造の形成に重要であると言われている²⁴⁾。ガラクト脂質を欠損した変異体では、そのような膜構造の安定性が損なわれていると考えられる。

3-2. 集光性クロロフィルタンパク質複合体 (LHC) における役割

LHCはグラナの形成など、チラコイド膜の構成に必須である。*in vitro*での再構成実験から、MGDGはノンラメラ脂質であるにもかかわらず、LHCIIと相互作用することでラメラ構造を取ることが示された²⁵⁾。凝集したLHCIIにMGDGを添加することでMGDG-LHCII複合体が形成されたことから、MGDGはアンテナ複合体の形成に重要であると考えられている。さらに、リボソーム内でのLHCII-光化学系IIの再構成実験から、MGDGはLHCIIと光化学系IIの相互作用を増加させ、これらの複合体間でのエネルギー伝達効率を上昇させることが報告されている²⁶⁾。DGDGも、LHCII複合体の形成に重要であることが示されている。ハウレンソウのLHCIIの結晶構造解析から、2分子のDGDGが3量体LHCII同士の接着面に局在していることが報告された²⁷⁾。また、エンドウの結晶化LHCIIでは、複合体の疎水性部位に3分子のDGDG分子が見つかった²⁸⁾。実際、シロイヌナズナ*dgd1*変異体の解析から、DGDGはLHCII三量体の安定化に重要であることが分かっている¹⁷⁾。*dgd1*に*Chloroflexus aurantiacus*の糖転移酵素を導入し、グルコシルガラクトシルジアシルグリセロール(β Glc β GalDG)を蓄積させた形質転換体でも、DGDG欠損に起因する三量体LHCIIの減少を完全には回復できなかったことか

ら、DGDGの α 結合したガラクトースとLHCII三量体との相互作用が、三量体の安定化に重要であると考えられている^{23,29}。

3.3. 光化学系における役割

シアノバクテリアにおける結晶構造解析により、光化学系複合体には多数の脂質分子が含まれていることが示されている。光化学系Iの反応中心近傍には、3分子のホスファチジルグリセロール (PG) と共に1分子のMGDGが存在している³⁰。また、光化学系 II 複合体ではより多くの脂質の存在が明らかとなっており^{31,32}、最新のデータでは、単量体あたり、11分子のMGDGと7分子のDGDGが、他の脂質と共に含まれていることが示された³³。特に、プラストキノン-プラストキノール交換キャビティに位置するMGDGは、プラストキノンの速やかな交換に関与している可能性が示唆されている。このように、MGDGが光合成反応に直接関わっている可能性が考えられているが、MGDGは膜の基礎要素として必須であることなどから、光化学系における直接的な役割はほとんど解明できていない。

それに対し、DGDGの欠失変異は、シアノバクテリア (*Synechocystis* sp. PCC 6803)、高等植物 (シロイヌナズナ) のどちらにおいても致死にならないため、これまでに様々な研究がなされている。シロイヌナズナの*dgd1*変異体では、光化学系 I タンパク質の減少やアクセプター側における阻害が観察されており、DGDGが光化学系Iの安定化や活性に重要なことが分かっている^{34,35}。また、*dgd1*や*dgd1dgd2*二重変異体の解析から、DGDGは光化学系II複体内での安定的な電荷分離に重要であることが示されている³⁶。これらの変異体では、光化学系IIのアクセプター側よりもドナー側により強い影響が見られたことから、DGDGは酸素発生系の反応に特に重要であると考えられている。DGDGの光化学系IIに対する重要性はシアノバクテリアでも調べられており、*Synechocystis* sp. PCC 6803のDGDG合成酵素欠損変異株の解析から、DGDGは表在性タンパク質を介した酸素発生複合体の安定化に重要であることが最近示された³⁷。また、DGDG欠損は光化学系IIにおける光傷害を増大させることが、シロイヌナズナと*Synechocystis*のどちらにおいても観察されている^{17,23,38,39}。DGDG欠損によるマンガクラーターの不安定化や、修復サイクルの

阻害が光傷害の増大を引き起こしている可能性が考えられている。特に、シロイヌナズナを用いた解析において、 β Glc β GalDGを蓄積するDGDG欠損変異体も、それを蓄積しない変異体と同様に強い光傷害を示したことから²³、 α 結合したガラクトースがこのようなDGDGの役割に重要であると考えられる。光化学系IIの結晶構造内において、DGDGは他の脂質と共にD1、D2を取り巻く脂質ベルトを構成していることから³³、DGDGは傷害を受けたD1の速やかな交換に重要である可能性が示唆されている。

4. ガラクト脂質の光合成以外での役割

4.1. リン欠乏適応におけるガラクト脂質の役割

DGDGを欠損した*Synechocystis*は、野生株に比べリン欠乏条件下での生育により強い阻害が見られたことから、DGDGは低リン条件下でのシアノバクテリアの生存に重要であることが示されている⁴⁰。生育に多量の光合成膜を必要とするシアノバクテリアは、リンの少ない生育環境下でより有利に生存するために、リンを用いないガラクト脂質代謝系を進化させてきたのかもしれない。一方、チラコイド膜形成がシアノバクテリアと植物に共通したガラクト脂質の役割であるのに対し、リン欠乏時に見られる、プラスチド外でのDGDGによるリン脂質の代替機構は、植物が葉緑体を獲得して以来、進化の過程で独自に発達させてきたシステムとすることができる。この代替機構がおかしくなった*mgd2mgd3*二重変異体では、リン欠乏時のみ生長の低下が見られた¹⁸。この結果は、DGDGによるリン脂質の代替機構が、低リン条件下での植物の生存に有利に働くことを示している。リンはアルミニウムや鉄などと結合し不溶性の化合物を形成しやすいため、土壌中での利用可能なリン酸の濃度は低く、10 μ Mを超えることはあまりないと言われている⁴¹。10 μ Mのリン酸濃度は、MGD2/3やDGD1/2の遺伝子発現誘導やDGDGの蓄積を引き起こすのに十分低い値であることから^{10,13}、自然界では頻繁にこの代替機構が働いていると予想される。実際、B-type MGDやDGD2はシロイヌナズナだけでなく、被子植物に広く保存されており、また、多くの植物でリン欠乏時にDGDGの蓄積が誘導されることが分かっている^{18,42}。植物は自由に動くことができないので、本来プラスチドの脂質であるDGDGをプラスチド外の膜構築に利用することで、低リン土壌における生存性を高めてきた

のだろう。同じ非リン脂質であるMGDGは、ノンラメラ脂質であり、またプラスチド外での存在が報告されていないことから、ラメラ脂質であるDGDGの特性が、プラスチド外でのリン脂質の代替に重要であると考えられている。

4-2. 根粒形成におけるガラクト脂質の役割

マメ科植物の根粒の細胞内に入り込んで共生している根粒菌は、ペリバクテロイド膜と呼ばれる、植物細胞に由来する膜に包まれ、活発に窒素固定を行うことが知られている⁴³⁾。ダイズやミヤコグサを用いた解析から、このペリバクテロイド膜にDGDGが多量に存在していることが示されている⁴⁴⁾。根粒形成の際には、多量の脂質がペリバクテロイド膜構築のために必要となることから、この時合成されるDGDGは、リン欠乏の場合と同様に、リン脂質を代替することで膜におけるリンの使用を制限している可能性が考えられている。

4-3. 生殖過程におけるガラクト脂質の役割

ペチュニアの花を用いた解析から、花の発達に伴ってMGDG合成活性が上昇し、最終的にDGDGの大幅な増加が起こることが示されている⁴⁵⁾。さらに、ユリ花粉を用いた解析によって、花粉管伸長時にガラクト脂質含量の増加が起こることが分かった⁴⁶⁾。花粉管伸長時には非常に長い細胞膜を形成する必要があるため、リン脂質に加え、ガラクト脂質もその膜構成に利用されているのかもしれない。実際、シロイヌナズナでのレポーター遺伝子を使った組織発現解析から、MGD2/3の発現が花粉管伸長時に強く誘導されることが分かっており⁴⁷⁾、外包膜経路が、花の発達、とくに受精の過程で機能している可能性が考えられる。mgd2 mgd3 二重変異体は生殖過程では特に異常な表現型を示さないが、この過程ではMGD1が B-type MGD を相補している可能性も考えられ、生殖過程におけるガラクト脂質の役割は、今後解明すべき課題として残されている。

Received July 16, 2009, Accepted July 17, 2009, Published August 31, 2009

参考文献

1. Andersson, M. X., Stridh, M. H., Larsson, K. E., Liljenberg, C. and Sandelius, A. S. (2003) Phosphate-

deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol, *FEBS Lett.* 537, 128-132.

2. Jouhet, J., Maréchal, E., Baldan, B., Bligny, R., Joyard, J. and Block, M. A. (2004) Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria, *J. Cell Biol.* 167, 863-874.

3. Rochester, C. P., Kjellbom, P., Andersson, B. and Larsson, C. (1987) Lipid composition of plasma membranes isolated from light-grown barley (*Hordeum vulgare*) leaves: identification of cerebroside as a major component, *Arch. Biochem. Biophys.* 255, 385-391.

4. Poincelot, R. P. (1973) Differences in lipid composition between undifferentiated and mature maize chloroplasts, *Plant Physiol.* 51, 802-804.

5. Wada, H. and Murata, N. (1989) *Synechocystis* PCC6803 mutants defective in desaturation of fatty acids, *Plant Cell Physiol.* 30, 971-978.

6. Murata, N. and Nishida, I. (1987) Lipids of blue-green algae (cyanobacteria), in *The Biochemistry of Plants* (Stumpf P. K. Ed.) 9, pp 315-347, Academic Press, Orlando, Florida.

7. Joyard, J., Maréchal, E., Miège, C., Block, M. A., Dorne, A. J. and Douce, R. (1998) Structure, distribution and biosynthesis of glycerolipids from higher plant chloroplasts, in *Lipid in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics* (Siegenthaler P. A. and Murata N. Eds.) pp 21-52, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

8. Shimojima, M., Ohta, H., Iwamatsu, A., Masuda, T., Shioi, Y. and Takamiya, K. (1997) Cloning of the gene for monogalactosyldiacylglycerol synthase and its evolutionary origin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 333-337.

9. Kelly, A. A. and Dörmann, P. (2002) DGD2, an Arabidopsis gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions, *J. Biol. Chem.* 277, 1166-1173.

10. Kelly, A. A., Froehlich, J. E. and Dörmann, P. (2003) Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes *DGD1* and *DGD2* in Arabidopsis reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis, *Plant Cell* 15, 2694-2706.

11. van Besouw, A. and Wintermans, J. F. (1978) Galactolipid formation in chloroplast envelopes. I. Evidence for two mechanisms in galactosylation, *Biochim. Biophys. Acta* 529, 44-53.

12. Xu, C., Fan, J., Riekhof, W., Froehlich, J. E. and Benning, C. (2003) A permease-like protein involved in ER to thylakoid lipid transfer in Arabidopsis, *EMBO J.* 22, 2370-2379.

13. Awai, K., Maréchal, E., Block, M. A., Brun, D., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K., Ohta, H. and Joyard, J. (2001) Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in

- photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10960-10965.
14. Dörmann, P., Balbo, I. and Benning, C. (1999) Arabidopsis galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1, *Science* 284, 2181-2184.
 15. Froehlich, J. E., Benning, C. and Dörmann, P. (2001) The digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase DGD1 is inserted into the outer envelope membrane of chloroplasts in a manner independent of the general import pathway and does not depend on direct interaction with monogalactosyldiacylglycerol synthase for DGDG biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 276, 31806-31812.
 16. Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M. and Ohta, H. (2007) Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 17216-17221.
 17. Dörmann, P., Hoffmann-Benning, S., Balbo, I. and Benning, C. (1995) Isolation and characterization of an Arabidopsis mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol, *Plant Cell* 7, 1801-1810.
 18. Kobayashi, K., Awai, K., Nakamura, M., Nagatani, A., Masuda, T. and Ohta, H. (2009) Type-B monogalactosyldiacylglycerol synthases are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling, and are crucial for low-phosphate adaptation, *Plant J.* 57, 322-331.
 19. Härtel, H., Dörmann, P. and Benning, C. (2000) DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10649-10654.
 20. Andersson, M. X., Larsson, K. E., Tjellstrom, H., Liljenberg, C. and Sandelius, A. S. (2005) Phosphate-limited oat. The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane, *J. Biol. Chem.* 280, 27578-27586.
 21. Jarvis, P., Dörmann, P., Peto, C. A., Lutes, J., Benning, C. and Chory, J. (2000) Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* *MGD synthase 1* mutant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8175-8179.
 22. Aronsson, H., Schöttler, M. A., Kelly, A. A., Sundqvist, C., Dörmann, P., Karim, S. and Jarvis, P. (2008) Monogalactosyldiacylglycerol deficiency in *Arabidopsis* affects pigment composition in the prolamellar body and impairs thylakoid membrane energization and photoprotection in leaves, *Plant Physiol.* 148, 580-592.
 23. Hölzl, G., Witt, S., Gaude, N., Melzer, M., Schöttler, M. A. and Dörmann, P. (2009) The role of diglycosyl lipids in photosynthesis and membrane lipid homeostasis in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 150, 1147-1159.
 24. Lee, A. G. (2000) Membrane lipids: it's only a phase, *Curr. Biol.* 10, R377-R380.
 25. Simidjiev, I., Stoylova, S., Amenitsch, H., Javorfi, T., Mustardy, L., Laggner, P., Holzenburg, A. and Garab, G. (2000) Self-assembly of large, ordered lamellae from non-bilayer lipids and integral membrane proteins in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1473-1476.
 26. Zhou, F., Liu, S., Hu, Z., Kuang, T., Paulsen, H. and Yang, C. (2009) Effect of monogalactosyldiacylglycerol on the interaction between photosystem II core complex and its antenna complexes in liposomes of thylakoid lipids, *Photosynth. Res.* 99, 185-193.
 27. Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X. and Chang, W. (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution, *Nature* 428, 287-292.
 28. Standfuss, J., Terwisscha van Scheltinga, A. C., Lamborghini, M. and Kühlbrandt, W. (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution, *EMBO J.* 24, 919-928.
 29. Hölzl, G., Witt, S., Kelly, A. A., Zähringer, U., Warnecke, D., Dörmann, P. and Heinz, E. (2006) Functional differences between galactolipids and glucolipids revealed in photosynthesis of higher plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 7512-7517.
 30. Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W. and Krauss, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature* 411, 909-917.
 31. Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A. and Biesiadka, J. (2005) Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II, *Nature* 438, 1040-1044.
 32. Sakurai, I., Shen, J. R., Leng, J., Ohashi, S., Kobayashi, M. and Wada, H. (2006) Lipids in oxygen-evolving photosystem II complexes of cyanobacteria and higher plants, *J. Biochem. (Tokyo)* 140, 201-209.
 33. Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A. and Saenger, W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 334-342.
 34. Guo, J., Zhang, Z., Bi, Y., Yang, W., Xu, Y. and Zhang, L. (2005) Decreased stability of photosystem I in *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett.* 579, 3619-3624.
 35. Ivanov, A. G., Hendrickson, L., Krol, M., Selstam, E., Oquist, G., Hurry, V. and Huner, N. P. (2006) Digalactosyl-diacylglycerol deficiency impairs the capacity for photosynthetic intersystem electron transport and state transitions in *Arabidopsis thaliana* due to photosystem I acceptor-side limitations, *Plant Cell Physiol.* 47, 1146-1157.

36. Steffen, R., Kelly, A. A., Huyer, J., Dörmann, P. and Renger, G. (2005) Investigations on the reaction pattern of photosystem II in leaves from *Arabidopsis thaliana* wild type plants and mutants with genetically modified lipid content, *Biochemistry* **44**, 3134-3142.
37. Sakurai, I., Mizusawa, N., Wada, H. and Sato, N. (2007) Digalactosyldiacylglycerol is required for stabilization of the oxygen-evolving complex in photosystem II, *Plant Physiol.* **145**, 1361-1370.
38. Mizusawa, N., Sakata, S., Sakurai, I., Sato, N. and Wada, H. (2009) Involvement of digalactosyldiacylglycerol in cellular thermotolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Arch. Microbiol.* **191**, 595-601.
39. Mizusawa, N., Sakurai, I., Sato, N. and Wada, H. (2009) Lack of digalactosyldiacylglycerol increases the sensitivity of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to high light stress, *FEBS Lett.* **583**, 718-722.
40. Awai, K., Watanabe, H., Benning, C. and Nishida, I. (2007) Digalactosyldiacylglycerol is required for better photosynthetic growth of *Synechocystis* sp. PCC6803 under phosphate limitation, *Plant Cell Physiol.* **48**, 1517-1523.
41. Schachtman, D. P., Reid, R. J. and Ayling, S. M. (1998) Phosphorus uptake by plants: from soil to cell, *Plant Physiol.* **116**, 447-453.
42. Kobayashi, K., Nakamura, Y. and Ohta, H. (2009) Type A and type B monogalactosyldiacylglycerol synthases are spatially and functionally separated in the plastids of higher plants, *Plant Physiol. Biochem.* **47**, 518-525.
43. Verma, D. P. and Hong, Z. (1996) Biogenesis of the peribacteroid membrane in root nodules, *Trends Microbiol.* **4**, 364-368.
44. Gaude, N., Tippmann, H., Flegmetakis, E., Katinakis, P., Udvardi, M. and Dörmann, P. (2004) The galactolipid digalactosyldiacylglycerol accumulates in the peribacteroid membrane of nitrogen-fixing nodules of soybean and Lotus, *J. Biol. Chem.* **279**, 34624-34630.
45. Nakamura, Y., Arimitsu, H., Yamaryo, Y., Awai, K., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K. and Ohta, H. (2003) Digalactosyldiacylglycerol is a major glycolipid in floral organs of *Petunia hybrida*, *Lipids* **38**, 1107-1112.
46. Nakamura, Y., Kobayashi, K. and Ohta, H. (2009) Activation of galactolipid biosynthesis in development of pistils and pollen tubes, *Plant Physiol. Biochem.* **47**, 535-539.
47. Kobayashi, K., Awai, K., Takamiya, K. and Ohta, H. (2004) *Arabidopsis* type B monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation, *Plant Physiol.* **134**, 640-648.

Galactolipid Synthesis and Its Roles in Higher Plants

Koichi Kobayashi*

Department of General Systems Studies,
Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

光照射下の葉の呼吸系の働き

東京大学 大学院理学系研究科

野口 航*

1. はじめに

植物の呼吸系の研究をしていると、「光が当たっている葉では呼吸系がどれくらい働いているか」と訊かれることがある。一概に呼吸系といっても、光照射下では、CO₂発生に関わるミトコンドリアマトリックスにおける炭素代謝系と、O₂消費に関わるミトコンドリア内膜における呼吸電子伝達系とは光への応答が異なる上に、まだ議論がまとまっていない部分もある。質問されるたびに、頭の中でそれぞれの応答を整理できず、明確に答えられないことが多い。この解説記事を書く機会に、光照射下の葉の呼吸系の応答や働きについてまとめる。ここでは、主にC₃植物の葉の呼吸系の応答や働きについて紹介する。

2. 光照射下の葉の呼吸速度 (CO₂発生速度)

光照射下のC₃植物の葉では、RubiscoとPEPCaseによるCO₂固定、光呼吸経路のグリシン脱炭酸酵素複合体 (GDC) からのCO₂発生 (R_{PR}) と、ピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDC) やTCA回路からのCO₂発生 (R_{day}, R_dとも略される) が同時に起こる。そのため、ガス交換測定装置などでは、直接、R_{day}を測定できない。これまで、carboxylation速度などのRubisco kineticsのパラメータを求めたりや総光合成速度を求めために、光照射下におけるR_{day}を推定する方法がいくつか報告されている。それらの方法や問題点については、光合成研究法 (2.1.c章) に簡単にまとめたので、ここでは省略させていただく。これらの方法を用いた研究結果をみると、R_{day}は暗呼吸速度 (R_n) の25から100%程度という値になる。つまり、光照射により葉の呼吸速度は、CO₂発生速度で見積もった場合は、ある程度は暗呼吸速度より低下している場合が多いと考えられる。

ここで例として、¹⁴CO₂のパルスチェイス実験からR_{day}を推定したPärnikとKeerbergの研究²⁾を紹介する。彼らは、あらかじめ¹⁴CO₂を葉に光合成でとりこませ、その葉を¹²CO₂中におき、光照射下の¹⁴CO₂発生を測定した。そして、測定中のO₂濃度やCO₂濃度を変えて、光照射下の葉のR_{PR}やR_{day}を推定した。さらに、3%という高い¹²CO₂中で¹⁴CO₂発生を測定したデータから、ミトコンドリアで発生したCO₂が葉内でRubiscoによって再固定される速度 (R_{rf}) も推定した。再固定率は種や測定条件によって変わるが、5から50%程度のものである。彼らは、光合成産物としてデンプンを主に蓄積する種 (ヒマワリなど) と蓄積しない種 (コムギなど) を4種ずつの結果を比較し、暗呼吸速度 (R_n) に対するR_{day}の割合 (R_{day}/R_n) をそれぞれ26%と51%と報告している。光合成産物をデンプンとして葉緑体に蓄積する植物種では、光照射下においてそれらの呼吸系による消費が少ないことを示している。一方、光呼吸速度 (R_{PR}) はどちらのタイプの種でも、R_{day}の6-7倍程度であったと報告している。

3. 光照射下の葉のミトコンドリアマトリックスの代謝系

ミトコンドリア内の呼吸系のCO₂発生は、PDCとTCA回路のNAD-イソクエン酸脱水素酵素 (NAD-IDH) と2-オキソグルタル酸脱水素酵素複合体 (OGDC) で行われる (図1)。光照射下のC₃植物の葉では光呼吸が行われるため、GDC-セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (SHMT) により、NH₄⁺、NADH、CO₂がミトコンドリアマトリックスで生じる。そのとき、この光呼吸系からのNH₄⁺により、ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ (PDK) の活

*連絡先 E-mail: knoguchi@biol.s.u-tokyo.ac.jp

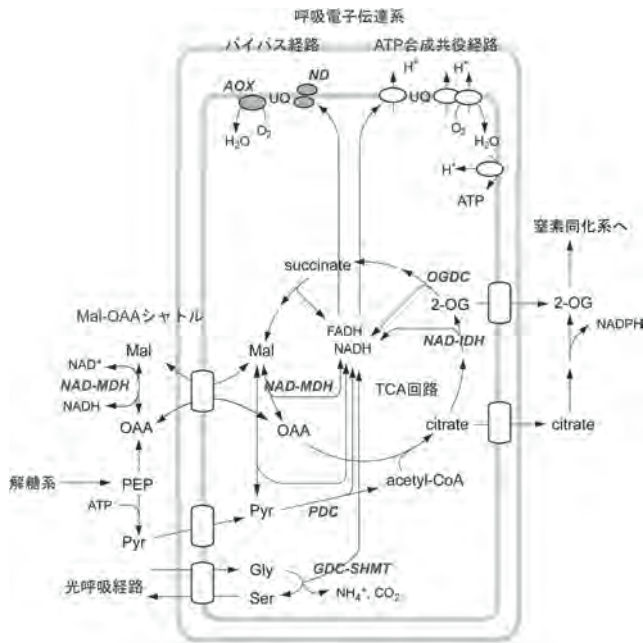


図1 植物ミトコンドリアの呼吸系。

イタリックは酵素を示す。PDC: ビルビン酸脱水素酵素複合体、GDC-SHMT: グリシン炭酸酵素複合体—セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ、NAD-IDH: NAD-イソクエン酸脱水素酵素、OGDC: オキソグルタル酸脱水素酵素複合体、NAD-MDH: NAD-リンゴ酸脱水素酵素、ND: II型NAD(P)H脱水素酵素、AOX: alternative oxidase。

性を介して、PDC活性が可逆的に阻害されると考えられている³⁾。また、光照射下で光呼吸系が働いているときには、ミトコンドリア内のNADH/NAD⁺比やNADPH/NADP⁺比が高くなる⁴⁾。したがって、光呼吸により生じたNADHにより、PDCだけではなく、NAD-IDHのような呼吸系脱水素酵素もフィードバック阻害を受けると考えられていた。

Tcherkezらは、¹³Cラベルをしたビルビン酸とグルコースをインゲンの葉に取り込ませ、葉から発生する¹³CO₂とNMRを用いた中間代謝産物の測定から、光照射下の葉のCO₂発生速度R_{day}や¹³Cが取り込まれる代謝産物を調べた⁵⁾。彼らの実験の画期的だった点は、基質内の¹³Cをラベルする炭素の位置を変えることにより、PDCからの¹³CO₂とTCA回路からの¹³CO₂とを分離したことである。彼らの結果から、光照射下の葉では、解糖系によるグルコースの分解は進まないこと、TCA回路からのCO₂発生は95%も低下していたことが分かった。一方、予想に反して、PDCからのCO₂発生は27%しか低下していなかった。光合成による

CO₂の再固定も考えると、PDCからのCO₂発生の低下は5%程度と計算された。彼らの結果は、光照射下のミトコンドリアのPDC活性は光呼吸由来のNH₄⁺により可逆的に阻害されるという報告と矛盾するようであるが、彼らは光照射下で阻害されずに活性を示すPDCは葉緑体型PDCかもしれないと考察している。彼らはさらに、O₂濃度やCO₂濃度を変えて同様の実験を行い、光呼吸速度が増加する低CO₂条件では通常のCO₂条件に比べ、光照射下のTCA回路からのCO₂発生の低下が40%程度にまで緩和されていると報告した⁶⁾。解糖系によるグルコース分解の光照射による低下も、低CO₂条件下では緩和されていた。光照射下の葉では、光呼吸系からの産物(NADHやNH₄⁺)がミトコンドリアPDCやTCA回路のNAD-IDHの活性を阻害していると考えられていたが、Tcherkezらのデータを考慮すると必ずしもそう単純ではないのかもしれない。

話題をNADHに変えよう。GDC-SHMTで生じたNADHは、ペルオキシソームにあるヒドロキシビルビン酸還元酵素(HPR)(最近では細胞質型HPRも報告されている⁷⁾)に消費されるため、ミトコンドリアから細胞質に輸送される必要がある。GDC-SHMTで生じるNADHとHPRで消費されるNADHは等量だが、ミトコンドリアから運ばれるNADHは30-50%程度で、残りは葉緑体から輸送されており、細胞質に輸送されなかったNADHは呼吸電子伝達系で酸化されていると考えられている⁸⁾。GDCは比較的低濃度のNADHで阻害される(K_i = 15 μM)⁹⁾ので、光呼吸で生じたNADHがミトコンドリア内の呼吸電子伝達系ですばやく酸化されることは重要だと思われる。ミトコンドリアから細胞質へのNADHの輸送は、主にリンゴ酸(Mal)-オキサロ酢酸(OAA)シャトルを介していると考えられる(図1)。ここで注意しなければならないのは、Mal-OAAシャトルを介してNADHが細胞質に輸送されるためには、TCA回路におけるNAD-リンゴ酸脱水素酵素(NAD-MDH)の反応とは逆反応が起こる必要がある。Mal-OAAシャトルとTCA回路で働くNAD-MDHの局在性が異なる可能性¹⁰⁾や、光照射下ではTCA回路が部分的にしか働いていない可能性などが考えられているが、その実態については未だ不明である。

光呼吸系を維持するためにはNADHの酸化だけでなく、同じくGDC-SHMTから生じるNH₄⁺の再固定が必

表1 PärnikとKeerberg²⁾の光呼吸速度 R_{PR} 、光照射下の呼吸速度 R_{day} 、暗呼吸速度 R_n のデータの平均値をもとに推定した、光照射下と暗黒下それぞれのNADH生成速度と、それらの比(光/暗黒比)。

光合成産物として主にデンプンを蓄積する種(SA種、ヒマワリ、ジャガイモ、シロイヌナズナ、ヘラオオバコ)と蓄積しない種(SD種、コムギ、ライムギ、オオムギ、オオスズメノカタビラ)それぞれのデータを用いて推定した。計算には、光呼吸系のGDCから生成するNADHの40%がミトコンドリアから輸送されること、呼吸系では3分子のCO₂発生の際に、解糖系とTCA回路からNADHとFADH₂が合わせて6分子生成され、光呼吸経路では1分子のCO₂発生の際に、1分子のNADHが生成されることを仮定した。速度の単位は $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ である。

	R_{PR}	R_{day}	R_n	光照射下のNADH生成速度	暗黒下のNADH生成速度	光/暗黒比
SA種	2.49	0.36	1.37	2.21	2.74	80.9%
SD種	2.47	0.42	0.82	2.32	1.64	141.5%

須である。葉緑体でのグルタミン合成酵素(GS)-グルタミン酸合成酵素(Fd-GOGAT)によるNH₄⁺の再固定のための炭素骨格、2-オキソグルタル酸(2-OG)は、ペルオキシソームのグルタミン酸-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ(GGAT)によってもたらされる。GGAT活性が1割程度に低下したシロイヌナズナの遺伝子破壊株は通常のCO₂条件下において、著しく成長が抑制される¹¹⁾。しかし、NH₄⁺の再固定ではなく、新規の窒素同化のための炭素骨格としては、TCA回路によるクエン酸(Cit)もしくは2-OGが重要である(図1)。クエン酸合成酵素(CS)の活性が約50%低下したジャガイモでは窒素代謝に影響があった¹²⁾が、NAD-IDHの活性が43-92%低下したシロイヌナズナでは、窒素代謝はほとんど影響されていなかった¹³⁾。これらから考えると、TCA回路からは主にCitが炭素骨格として窒素代謝系に供給されているのだろう。

最近、光呼吸経路に付加的に働きうる酵素が植物ミトコンドリアに局在していると報告されている¹⁴⁾。例えば、ミトコンドリアに局在するグリコール酸脱水素酵素(GLYDH)はグリコール酸をグリオキシル酸に変換する。その酵素の活性が低いシロイヌナズナでは、低CO₂下で光呼吸活性が低下していたと報告されている¹⁵⁾。またFd-GOGATがミトコンドリアにも局在し、SHMTと相互作用しているという報告もある¹⁶⁾。それらの酵素が、教科書で書かれているメインの光呼吸経路に対して、どの程度のフラックスを支えているかは不明であるが、高温や気孔が閉鎖する乾燥下で、光呼吸系が光散逸系として重要なときには有用な経路として働くのかもしれない。

ドイツのFerneらのグループではTCA回路の各酵素遺伝子のアンチセンス株や突然変異株を用いて、生理学的な解析やメタボローム解析を行い、TCA回路の

各酵素の生体内での役割を解明しようとしている¹⁷⁾。アコニターゼやNAD-リンゴ酸脱水素酵素(NAD-MDH)の活性が低いトマトでは光合成速度が増加したと報告している^{18,19)}。彼らの解析からだけでは、まだこれらの変異トマトで光合成速度が高い理由は明確ではない。今後その増加が、どのようなメカニズムで引き起こされているかを明確にする必要がある。

4. 光照射下の葉のミトコンドリア呼吸電子伝達系

光照射下の葉では、PDC・TCA回路から生じたNADHに加え、光呼吸経路のGDC-SHMTから生じたNADHの一部が呼吸電子伝達系で酸化される。植物のミトコンドリア呼吸電子伝達系には、ATP合成と共役している複合体I、シトクロム経路とも呼ばれる複合体III、IVとともに、それらのバイパス経路であるII型のNAD(P)H脱水素酵素(ND)とalternative oxidase(AOX)が電子伝達に関わっている(図1)。呼吸電子伝達系による葉緑体からの還元力の散逸機構と、そのときのAOXの重要性については吉田²⁰⁾により詳しく書かれているので省略する。ここでは、光照射下の葉のO₂消費速度の推定と、呼吸電子伝達系コンポーネントの突然変異体や形質転換体の研究結果についてまとめる。

まず、NADH生成速度から光照射下の葉のO₂消費速度を推定し、暗黒下のそれと比較してみよう。ここでは、PärnikとKeerberg²⁾の光照射下の葉の光呼吸速度(R_{PR})とCO₂発生速度(R_{day})、暗呼吸速度(R_n)のデータの平均値を用いて計算してみる(表1)。計算の前提として、光照射下でも暗黒下でも呼吸系では解糖系とTCA回路が働くこと、光呼吸経路のGDC-SHMTで生成したNADHの40%は細胞質に輸送され、

残りが呼吸電子伝達系で酸化されること、呼吸系では3分子のCO₂発生のときに、解糖系とTCA回路からNADHとFADH₂が合わせて6分子生成され、光呼吸経路では1分子のCO₂発生のときに、1分子のNADHが生成されることを仮定する。計算の結果を表1に示す。暗黒下に対する光照射下のNADH生成速度は、光照射下の葉でデンプンを蓄積する種(SA種)でも80.9%、デンプンを蓄積しない種(SD種)では141.5%となった。NADH生成速度とO₂消費速度は比例するので、光照射下の葉のO₂消費速度は、暗黒下に比べて、81-142%程度であることを示している。暗呼吸速度(R_n)に対するR_{day}の割合(R_{day}/R_n)が、26-51%であることを考えると、光照射下の葉のO₂消費速度はCO₂発生速度と同じように低下しているわけではなく、逆に高い可能性がある。

この計算には含まれていないが、強光下では葉緑体からの過剰な還元力がミトコンドリアに輸送されるので、呼吸電子伝達系で酸化される還元力の量は増える^{20,21)}。このように、光照射下の葉のO₂消費速度が高いこと、つまり呼吸電子伝達系で酸化されるNADH量が暗黒下よりも増加することは、ユビキノン(UQ)の酸化還元レベルのデータからも推察される。弱光下で栽培したシロイヌナズナの葉を暗黒下から強光下に移すと、PQの酸化還元レベルとともに、UQの酸化還元レベルも還元側にシフトした(吉田ら、未発表)。UQの酸化還元レベルに応じて、AOXやATP合成と共役しているシトクロム経路はO₂消費反応を行うので、O₂消費速度が光照射下の方が暗黒下よりも高い可能性が支持される。そのような場合には、ATP消費過程による律速を受けないAOXやNDといったバイパス経路が効率よく働き、呼吸電子伝達系が還元状態になるのを防いでいると考えられる。それらの経路の遺伝子発現が強光下で誘導されるという結果²²⁾も、この考察とよく一致する。

光照射下でも機能していると考えられる呼吸電子伝達系であるが、そのコンポーネントの量が変化した形質転換植物や突然変異体の光合成代謝はどのような影響を受けているだろうか。ATP合成と共役しているコンポーネント(複合体I, III, IV)の突然変異体には、成長や葉緑体の発達に影響するものが数多く知られている²³⁾。特に、複合体Iの機能が低下したタバコやキュウリの突然変異体は、光合成系を含めた一次代謝系について詳しく調べられてきた^{24,25)}。その2

種の植物を用いた結果をまとめてみると、どちらの種でも突然変異体では成長は抑制され、葉面積あたりの光合成速度(CO₂吸収速度)が低下し、光呼吸速度が増加していた。突然変異体のATP/ADP比やNAD(P)H/NAD(P)⁺比などは2種で応答が異なり、これらのパラメータからは突然変異体の光呼吸速度の増加は説明できなかった。しかし、どちらの種の葉でもCO₂の内部コンダクタンス(g_m)が低下し、葉緑体内のCO₂濃度が低下したために、光呼吸速度が高くなっていったようであった^{24, 25)}。複合体IやIVのサブユニットに変異の入ったトウモロコシ(NCS突然変異体)では、葉緑体の発達が影響を受け、縞模様の葉を形成する²³⁾。今のところ、なぜ呼吸電子伝達系の複合体Iの機能が低下したCMSIIやMSC9では、g_mが下がるのかは全く不明である。葉緑体の発達・形成機構が影響を受けた結果かもしれない。

一方、ATP合成と共役していないバイパス経路の量が変化した形質転換体や突然変異体の研究例はまだ少ない。複合体Iのバイパス経路であるII型NDでは、シロイヌナズナAtNDA1の遺伝子破壊体やジャガイモNDB1の過剰発現タバコが報告されている^{26, 27)}。タバコNDB1の過剰発現株ではNADPH/NADP比が下がっていたが、いずれの場合も成長には大きな変化はなかった。シトクロム経路のバイパスであるAOXに関しては、タバコやシロイヌナズナの変異体で詳しく調べられている^{28,29)}。それらの結果では、通常の生育条件下では野生型と変異体では差がないが、ストレス下では光合成系IIが影響を受ける場合があることが報告されている。AOXが強光下で過剰な葉緑体還元力を散逸するために働く可能性が示唆されているが、その散逸機構の重要性、フラックスや分子機構などは不明である^{20,30)}。今後は、ATP合成と共役している複合体I, III, IVとバイパス経路との役割の違いや散逸機構を詳細に明らかにしていく必要がある。

5. 葉緑体呼吸とPTOX

ここまでの、光照射下の葉のミトコンドリアの呼吸系の働きについてまとめてきたが、いわゆる葉緑体呼吸と言われる経路は光照射下の葉ではどのようなのだろうか。葉における葉緑体呼吸は、プラストキノン(PQ)を還元する2つの経路、I型のNDH複合体とPGR5経由の経路とPQを酸化するplastoquinol terminal oxidase (PTOX)によって構成されると考えられてい

る。最近、II型のNDの1つであるNDC1がミトコンドリアの内膜だけではなく、シロイヌナズナの葉緑体にも局在することが示された³¹⁾。葉緑体内でのNDC1の生理機能は不明であるが、循環的電子伝達のバイパス経路として有効かもしれない。

この記事ではPTOXに注目する。PTOXとAOXのアミノ酸配列は非常に似ており、PTOXとAOXはもともと第二鉄カルボキシレートファミリー (the di-iron carboxylate family)として同じタンパク質であったと考えられている³²⁾。細胞内共生がおきる以前に両者が分かれ、植物は細胞内共生により、AOXとPTOXそれぞれをミトコンドリアと葉緑体に有したようである。葉におけるPTOXの役割の一つは、PQH₂の酸化を介して、カロチノイド合成のphytoene desaturase (PDS) の反応を進ませることである³³⁾。PTOXの変異体では、白色のC₄₀カロチノイド中間体であるフィトエンが蓄積し、葉が斑入りになる。葉におけるもう一つの役割として、PQの過還元を防ぐ安全弁として働く可能性が示唆されていた。高温ストレス下でPTOXが誘導されることや、高山の植物種ではPTOX量が多いことなども、間接的にその仮説を支持している³⁴⁾。しかし、突然変異体や過剰発現体を使った結果からは、期待されたほどの安全弁として働いていないようである。シロイヌナズナのPTOXを過剰発現したタバコ³⁵⁾ やシロイヌナズナのPTOXの過剰発現体と突然変異体*immutans*との比較³⁶⁾ では、連続光照射下や光合成誘導期にクロロフィル蛍光パラメータのレベルが若干違っていたこと以外には大きな違いがなく、RossoらはPTOXの安全弁としての働きにはかなり否定的である。しかし、トマトのPTOXの突然変異体*ghost*を使った結果ではシロイヌナズナの結果とは違っており、Fv/Fmや1-q_pに野生型との差があった³⁷⁾。トマトとシロイヌナズナの結果の差は不明であるが、PQの安全弁としてのPTOXの役割は光合成誘導期や変動環境下に限定されているのかもしれない。

6. おわりに

ここでは、光照射下の葉におけるミトコンドリア呼吸系の働きを、CO₂発生系であるPDC・TCA回路とO₂消費系である呼吸電子伝達系とに分けてまとめた。CO₂発生系は光照射下ではある程度抑制されているが、O₂消費系は暗黒下とほぼ同じかそれ以上に働いていると言える。しかし、始めに述べた定量的

な問題に関しては、植物種や測定環境に大きく依存する。統一的な見解を得るには、まだ研究が不足している。これまでの研究の多くは、ストレスがなく、かつ光強度や温度条件が一定である定常状態の植物を用いている。野外で見られる変動環境や光呼吸系が働くような高温や乾燥下では、AOXやNDのようなバイパス経路を含めて呼吸系はより重要な働きをしていると考えられる。

謝辞

本稿を作成するにあたり、吉田啓亮、寺島一郎両氏に適切なお助言を頂いた。

Received July 7, 2009, Accepted July 21, 2009, Published August 31, 2009

参考文献

1. 彦坂幸毅 (2008) 個葉の光合成速度が決まるしくみと測定原理, 光合成研究法 低温科学67, 67-71.
2. Pärnik, T., and Keerberg, O (2007) Advanced radiogasometric method for the determination of the rates of photorespiratory and respiratory decarboxylations of primary and stored photosynthates under steady-state photosynthesis, *Physiol. Plant.* 129, 34-44.
3. Tovar-Mendez, A., Mierniyk, J. A., and Randal, D. D. (2003) Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells, *Eur. J. Biochem.* 270, 1043-1049.
4. Igamberdiev, A. U., and Gardeström, P. (2003) Regulation of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves, *Biochem. Biophys. Acta* 1606, 117-125.
5. Tcherkez, G., Cornic, G., Blligny, R., Gout, E., and Ghashghaie, J. (2005) In vivo respiratory metabolism of illuminated leaves, *Plant Physiol.* 138, 1596-1606.
6. Tcherkez, G., Blligny, R., Gout, E., Mahe, A., Hodges, M., and Cornic, G. (2008) Respiratory metabolism of illuminated leaves depends on CO₂ and O₂ conditions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 797-802.
7. Timm, S., Nunes-Nesi, A., Pärnik, T., Morgenthal, K., Wienkoop, S., Keerberg, O., Weckwerth, W., Kleczkowski, L. A., Fernie, A. R., and Bauwe, H. (2008) A cytosolic pathway for the conversion of hydroxypyruvate to glycerate during photorespiration in Arabidopsis, *Plant Cell* 20, 2848-2859.
8. Krömer, S., Hanning, I., and Heldt, H.W. (1992) On the sources of redox equivalents for mitochondrial oxidative phosphorylation in the light, in *Molecular, Biochemical and Physiological Aspects of Plant Respiration* (Lambers, H., and van der Plas, L.H.W.,

- Eds) pp. 167-175, SPB Academic Publishing, The Hague.
9. Oliver, D.J. (1994) The glycine decarboxylase complex from plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 323-337.
 10. Wiskich, J. T., and Meidan, E. (1992) Metabolic interactions between organelles in photosynthetic tissue: a mitochondrial overview, in *Plant Organelles* (Tobin, A.K. Ed) pp. 1-19, Cambridge University Press, Cambridge.
 11. Igarashi, D., Miwa, T., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., and Ohsumi, C. (2003) Identification of photorespiratory glutamate:glyoxylate aminotransferase (*GGAT*) gene in *Arabidopsis*. *Plant J.* **33**, 975-987.
 12. Sienkiewicz-Porzucek, A., Nunes-Nesi, A., Sulpice, R., Lisec, J., Centeno, D. C., Carillo, P., Leisse, A., Urbanczyk-Wochniak, E., and Fernie, A. R., (2008) Mild reductions in mitochondrial citrate synthase activity result in a compromised nitrate assimilation and reduced leaf pigmentation but have no effect on photosynthetic performance or growth, *Plant Physiol.* **147**, 115-127.
 13. Lemaitre, T., Urbanczyk-Wochniak, E., Flesch, V., Bismuth, E., Fernie, A.R., and Hodges, M. (2007) NAD-dependent isocitrate dehydrogenase mutants of *Arabidopsis* suggest the enzyme is not limiting for nitrogen assimilation. *Plant Physiol.* **144**, 1546-1558.
 14. Foyer, C. H., Bloom, A. J., Queval, G., and Noctor, G. (2009) Photorespiratory metabolism: Genes, mutants, energetics, and redox signaling, *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 455-484.
 15. Niessen, M., Thiruveedhi, K., Rosenkranz, R., Kebeish, R., Hirsch, H.-J., Kreuzaler, F., and Peterhansel, C. (2007) Mitochondrial glycolate oxidation contributes to photorespiration in higher plants, *J. Exp., Bot.* **58**, 2709-2715.
 16. Jamai, A., Salome, P. A., Schilling, S. H., Weber, A. P. M., and McClung, R. (2009) *Arabidopsis* photorespiratory serine hydroxymethyltransferase activity requires the mitochondrial accumulation of ferredoxin-dependent glutamate synthase, *Plant Cell*, **21**, 595-606.
 17. Nunes-Nesi, A., Sweetlove, L. J., and Fernie, A. R. (2007) Operation and function of the tricarboxylic acid cycle in the illuminated leaf. *Physiol. Plant.* **129**, 45-56.
 18. Carrari, F., Nunes-Nesi, A., Gibon, Y., Lytovchenko, A., Loureiro, M. E., and Fernie, A. R. (2003) Reduced expression of aconitase results in an enhanced rate of photosynthesis and marked shifts in carbon partitioning in illuminated leaves of wild species tomato. *Plant Physiol.* **133**, 1322-1335.
 19. Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Lytovchenko, A., Smith, A. M. O., Loureiro, M. E., Ratcliffe, R. G., Sweetlove, L., J., and Fernie, A. R. (2005) Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants, *Plant Physiol.* **137**, 611-622.
 20. 吉田啓亮 (2006) ミトコンドリアによる葉緑体の強光防御機構, 光合成研究 **46**, 14-19.
 21. Yoshida, K., Terashima, I., and Noguchi, K. (2007) Up-regulation of mitochondrial alternative oxidase concomitant with chloroplast over-reduction by excess light. *Plant Cell Physiol.* **48**, 606-614.
 22. Yoshida, K., and Noguchi, K. (2009) Differential gene expression profiles of the mitochondrial respiratory components in illuminated *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Physiol.* in press.
 23. Newton, K. J., Gabay-Laughnan, S., and De Paepe, R. (2004) Mitochondrial mutants in plants, in *Plant Mitochondria: From Genome to Function* (Day, D.A., Millar, A.H., and Whelan, J. Eds), pp. 121-142, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
 24. Priault, P., Tcherkez, G., Cornic, G., De Paepe, R., Naik, R., Ghashghaie, J., and P. Streb, P. (2006) The lack of mitochondrial complex I in a CMSII mutant of *Nicotiana glauca* increases photorespiration through an increased internal resistance to CO₂ diffusion, *J. Exp. Bot.* **57**, 3195-3297.
 25. Juszczuk, I. M., Flexas, J., Szal, B., Dabrowska, Z., Ribas-Carbo, M., and Rychter, A. M. (2007) Effect of mitochondrial genome rearrangement on respiratory activity, photosynthesis, photorespiration and energy status of MSC16 cucumber (*Cucumis sativus*) mutant, *Physiol. Plant.* **131**, 527-541.
 26. Moore, C. S., Cook-Johnson, R. J., Rudhe, C., Whelan, J., Day, D. A., Wiskich, J. T., and Soole, K. L. (2003) Identification of AtNDI1, an internal non-phosphorylating NAD(P)H dehydrogenase in *Arabidopsis* mitochondria. *Plant Physiol.* **133**, 1968-1978.
 27. Liu, Y.-J., Norgerg, F. E. B., Szilágyi, A., De Paepe, R., Akerlund, H.-E., and Rasmusson, A. G. (2008) The mitochondrial external NADPH dehydrogenase modulates the leaf NADPH/NADP⁺ ratio in transgenic *Nicotiana glauca*, *Plant Cell Physiol.* **49**, 251-263.
 28. Giraud, E., Ho, L. H. M., Clifton, R., Carroll, A., Estavillo, G., Tan, Y.-F., Howell, K. A., Ivanova, A., Pogson, B. J., Millar, A. H., and Whelan, J. (2008) The absence of ALTERNATIVE OXIDASE1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress. *Plant Physiol.* **147**, 595-610.
 29. Watanabe, C.K., Hachiya, T., Terashima, I., and Noguchi, K. (2008) The lack of alternative oxidase at low temperature leads to a disruption of the balance in carbon and nitrogen metabolism, and to an up-regulation of anti-oxidant defense systems in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Cell Environ.* **31**, 1190-1202..
 30. Noguchi, K., and Yoshida, K. (2008) Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves. *Mitochondrion* **8**, 87-99.

31. Carrie, C., Murcha, M. W., Kuehn, K., Duncan, O., Barthelet, M., Smith, P. M., Eubel, H., Meyer, E., Day, D. A., Millar, A. H., Whelan, J. (2008) Type II NAD(P)H dehydrogenases are targeted to mitochondria and chloroplasts or peroxisomes in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett.* 582, 3073-3079.
32. McDonald, A. E., and Vanlerbergh, G. C. (2006) Origins, evolutionary history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase, *Comp. Biochem. Physiol., Part D, 1*, 357-364.
33. Aluru, M. R., Yu, F., Fu, A., and Rodermel, S. (2006) *Arabidopsis* variegation mutants: new insights into chloroplast biogenesis, *J. Exp. Bot.* 57, 1871-1881.
34. Rumeau, D., Perlier, G., and Cournac, L. (2007) Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response, *Plant Cell Env.* 30, 1041-1051.
35. Joët, T., Genty, B., Josse, E. M., Kuntz, M., Cournac, L., and Peltier, G. (2002) Involvement of a plastid terminal oxidase in plastoquinone oxidation as evidenced by expression of the *Arabidopsis thaliana* enzyme in tobacco, *J. Biol. Chem.* 277, 31623-31630.
36. Rosso D., Ivanov, A. G., Fu, A., Geisler-Lee, J., Hendrickson, L., Geisler, M., Stewart, G., Krol, M., Hurry, V., Rodermel, S. R., Maxwell, D. P., and Hüner, N. P. A. (2006) IMMUTANS does not act as a stress-induced safety valve in the protection of the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis* during steady-state photosynthesis, *Plant Physiol.* 142, 574-585.
37. Shahbazi, M., Gilbert, M., Labouré, A.-M., and Kuntz, M. (2007) Dual role of the plastid terminal oxidase in tomato, *Plant Physiol.* 145, 691-702.

Roles of the Respiratory System in Illuminated Leaves

Ko Noguchi*

Graduate School of Science, The University of Tokyo

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 $200 \mu\text{M/s}$ 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。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れば、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行うことができた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ントニン・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、ゼアキサントニ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。

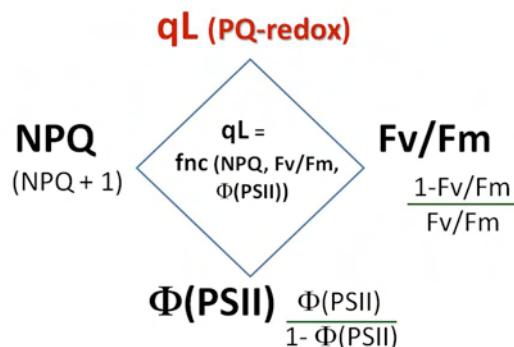


図1. クロロフィル蛍光パラメーターの相関関係

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⁾。

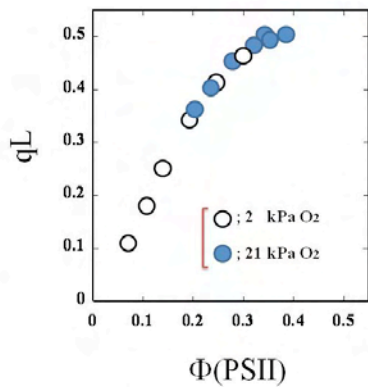


図2. qLの $\phi(\text{PSII})$ 依存性

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

解説

シアノバクテリアの酸素適応と活性酸素適応

京都大学・名誉教授

浅田浩二*

1. はじめに

シアノバクテリアは2種の光合成細菌(*Chlorobium*, *Rhodospseudomonas*)のそれぞれの反応中心を PSI, PSIIとして利用し、さらに、PSIIに2 H₂Oを4電子酸化して(反応性の高い活性酸素となる酸素の還元分子種を遊離することなく) O₂を発生できる Mn₄Ca-Cluster-Cl (water oxidase) を PSII に組み込むことによって、酸素発生型光合成生物の現在に至るまでの進化の基となった。これによって生物圏に無限にあるH₂Oを光合成の電子供与体とすることができ、地球大気にO₂を、地上に有機基質を供給し、好気呼吸を初め、地球上のすべての生物進化の基となった。シアノバクテリアは、しかしながら、それまでの嫌気的環境を生存圏としていた光合成細菌と異なり、細胞内で自らO₂を発生する初めての生物である。そのためシアノバクテリアは、細胞自身が発生するO₂そのものによる酸素ストレス、活性酸素が最も生じやすい太陽光の下でCO₂固定を進行させなければならぬために避けられない活性酸素ストレスに直面したはずである。ここではシアノバクテリアがどのようにしてこれらのストレスを緩和しつつ酸素発生型光合成の機能を進化させてきたかを中心に、酸素発生型光合成生物の酸素分子の消去機構、活性酸素の消去機構を考えてみたい。

2. シアノバクテリア出現以前の地球大気の酸素濃度

シアノバクテリアによってO₂が発生する以前の地球大気O₂濃度を推定する一つの手がかりは、探査機によって測定された現在の金星大気、火星大気の地表面でのO₂濃度であろう。これまで金星、火星にはO₂を発生する生物、その他どのような生物の存在も証明され

ていないが、これら惑星の表面での大気圧、O₂の分圧、このO₂が水に溶けて平衡になった時の濃度を、現在の地球大気と比べると以下の通りである¹⁾。

	地表面の大気圧 (bar)	大気O ₂ 体積 (%)	O ₂ 分圧 (bar)	水と平衡時のO ₂ 濃度 (μ M, 25°C)
地球	1	21	2.1×10^{-1}	250
火星	0.006	0.13	7.8×10^{-6}	0.0093
金星	90	0.0069	6.2×10^{-3}	7.4

金星は大気圧が地球に比べ2桁近く高く、また地球に比べ温度が高い(735 K)ため30億年以前の地球大気を直接に反映していないが、それでも地表面での大気O₂濃度はゼロではない。火星大気は、地球でシアノバクテリアがO₂を大気に供給し始める以前の状態をより反映していると考えられるが、これら惑星大気に含まれている極低濃度のO₂は、大気に含まれているH₂O(現在の火星大気にも0.03%の水分が検出されている)の紫外線分解(オゾン層がないため波長の短いUVも地表に届く)によって、さらに、放射線分解も寄与して生じたO₂と、このO₂が地表面成分と反応して消費されたバランスを反映していると考えられる。しかし、シアノバクテリア出現以前の岩石としてFeはFeS₂(黄鉄鉱)としてのみ見いだされているので、この極低濃度のO₂と地表面成分との反応は無視できるほどであったと考えてよいであろう。Fe²⁺とO₂が反応して生ずるFe₂O₃とシリカが縞状になっている縞状鉄鉱床が見いだされるのは、25~20億年前からであり、シアノバクテリアによって地球大気にO₂が供給されて初

* 連絡先 E-mail: k.asada@ks5.ecs.kyoto-u.ac.jp

めて Fe_2O_3 が生成沈積したと考えられ、逆にこれからシアノバクテリアの出現時期が推定されている²⁾。

3. 嫌気性菌の酸素消去酵素としてのcyt c oxidase

シアノバクテリアが O_2 を発生する以前に出現していた嫌気性の古細菌、(真正)細菌はその当時、できるだけ還元的な、極低濃度 O_2 のない環境を選んで生存していたと思われる。それでも当時の極低濃度の O_2 に接触する危険性があり、嫌気性細菌は極低濃度 O_2 を細胞内で速やかに消去し、酸化されやすい嫌気性菌の細胞成分を O_2 から保護する必要があったはずである。25億年前、シアノバクテリアが出現するまでの地球大気 O_2 濃度を火星の大気 O_2 濃度に等しいと仮定すれば、当時の地球の水たまりの O_2 濃度は上の表のように9.3 nMとなる。

このレベルの O_2 濃度は、酸素代謝生化学の立場からみれば、好気性代謝を象徴するcytochrome c oxidase (cyt c oxidase)の O_2 に対する K_m 値(ミトコンドリアがState 3で80 nM, State 4で20 nM)に近い値である³⁾。この K_m 値は cyt c oxidaseが機能している細胞内部の O_2 環境を反映しているため、ミトコンドリア周辺の O_2 濃度は空気の O_2 飽和の水に比べ3~4桁低いと推定される。実際に動物の肝臓組織での、血管ヘモグロビンの酸素結合比、肝臓細胞のcyt c oxidaseの O_2 濃度によるcyt a₃の酸化還元比などが組織、細胞レベルで測定され、細胞内の O_2 濃度勾配が測定されている。これらの結果から、物理的拡散だけによって O_2 が移動する肝臓細胞内で O_2 濃度勾配があり、cyt c oxidaseが結合しているミトコンドリアの周りの O_2 濃度は、血管からオキシヘモグロビン、オキシミオグロビンの解離によって供給される O_2 濃度に比べ低く、細胞膜とミトコンドリアの間に~100倍の O_2 濃度勾配があることが明らかにされている³⁾。この濃度勾配によって細胞膜からミトコンドリアへ O_2 が拡散移動しているが、ミトコンドリアとcyt c oxidase 周辺の O_2 濃度は、シアノバクテリア出現以前の地球大気、現在の火星大気 O_2 が水に溶けた濃度に等しいレベルである。

cyt c oxidaseはシアノバクテリアを含め好気性生物のみでなく、シアノバクテリアが大気に O_2 を供給する以前に出現した嫌気性の古細菌、(真正)細菌にも存在している。cyt c oxidase のsubunit 1, 2 (Complex 1, 2)の古細菌、(真正)細菌から好気性生物に至る分子進化の解析から、現在、ミトコンドリアで高い効率でATP

を生産し、好気性代謝を代表するこの酵素の祖先タンパク質は、古細菌と(真正)細菌に見いだされ、これらの最後の共通祖先生物にすでに獲得されていたと推定されている(30~35億年前)^{4,5)}。その時の地球の O_2 環境は現在の火星の大気環境であり、その時に獲得された極低濃度の O_2 を利用できる(還元できる)性質、すなわち、 O_2 に対する低い K_m 値を、現在でも保持している。このcyt c oxidaseの性質によって、細胞内 O_2 濃度を、30億年以前の地球 O_2 濃度に保ちつつ、活性酸素の生成を抑え、極低濃度の O_2 でも効率の高い酸素呼吸によってATPを生産している。この能力によって、酸素発生型光合成細胞以外の全ての好気性生物は、細胞内 O_2 濃度を低く保ちつつ、酸素障害を防ぐことができる。哺乳動物、昆虫などで O_2 濃度を空気より高くすると、活性酸素の生成増加による老化、寿命短縮が観察されている²⁸⁾。循環系の機能がまだ充分でない未熟児に空気より高い濃度で O_2 を与えた時、網膜細胞が破壊されて生じた失明(未熟児網膜症)も、細胞内の O_2 濃度を極低濃度に維持することがいかに重要かを示している。すなわち、極低濃度 O_2 を利用できるcyt c oxidaseの機能は、シアノバクテリアによって大気 O_2 濃度が上昇する以前に獲得され、これが現在の好気性生物まで保持され、細胞内 O_2 濃度が低くても機能できる。これは好気性生物にとって避けられない活性酸素による障害抑制に大きく寄与している⁴⁾。

シアノバクテリア出現以前の極限環境で生育する古細菌、嫌気性菌でcyt c oxidaseは細胞内の O_2 消去の機能をもっていたと考えられている⁴⁾。cyt c oxidaseは O_2 の還元分子種(O_2^- , H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$)を遊離することなく、極低濃度の O_2 を4電子還元して2 H_2O に還元できる。この機能によって嫌気性の古細菌、細菌は活性酸素を遊離することなく細胞内 O_2 濃度を低下させ、 O_2 に不安定な嫌気性菌に含まれる細胞成分の分解を抑えることができる。さらに、毒性のあるNO, N_2O の消去に関与していた可能性もあり、さらに、硝酸呼吸、硫酸呼吸などに関与する酵素もその祖先タンパク質は、古細菌、真正細菌の共通祖先に由来すると考えられている⁵⁾。

シアノバクテリアにもcyt c oxidase が存在しているが⁴⁾、これが O_2 消去酵素として機能しているかどうかは示されていない。しかし、heterocystにdinitrogenaseをもち、これによって窒素固定をしているシアノバクテリアがある。dinitrogenaseは酸素によって失活しやすいため、heterocyst細胞の酸素濃度は低く保つ必要が

ある。そのため cyt c oxidase が酸素消去酵素として機能し heterocyst の dinitrogenase を酸素による失活から保護している可能性が考えられる。

4. 嫌気性古細菌、細菌の酸素消去酵素

シアノバクテリア出現以前の嫌気性古細菌、真正細菌で cyt c oxidase が O_2 消去酵素として機能している可能性について述べてきた。嫌気性菌は cyt c oxidase 以外に、 O_2 を消去する酵素 (H_2O -forming NADH oxidase) が極低濃度 O_2 によって誘導合成し、これらも cyt c oxidase と同様、 O_2 消去酵素として機能していると考えられる⁶⁻⁸⁾。さらに、嫌気性の古細菌、細菌から、rubredoxin を電子供与体として O_2 を $2 H_2 O$ に還元する酵素 flavodiiron protein (Flv) (A type flavoprotein) が見出されている⁹⁾。Flv は Fe とフラビンを含み、嫌気的な生育環境で生育している嫌気性菌が極低濃度の O_2 に接触したとき、嫌気性菌にとって有毒ガスである O_2 を $2H_2O$ に還元していると考えられる。

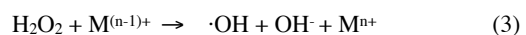
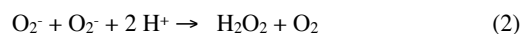
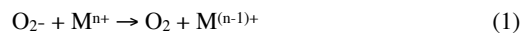
5. シアノバクテリアの flavodiiron protein (Flv)

シアノバクテリア (*Synechocystis* 6803) に Flv1~4 がコードされ発現している¹⁰⁾。このうち Flv1、Flv3 が PSI での O_2 の光還元に関与している¹⁰⁾。植物葉緑体の PSI では最初に O_2 が 1 電子還元され $O_2^- \rightarrow H_2O_2 \rightarrow 2H_2O$ の water-water Cycle を経て $2H_2O$ に還元される¹¹⁻¹²⁾。しかし、*Synechocystis* では O_2 の PSI での光還元はその酸素同位体効果の測定から、植物葉緑体と異なり、 O_2^- 、 H_2O_2 を遊離しないで 4 電子還元され $2 H_2O$ になる¹³⁾。一方、Flv1、Flv3 の破壊株の結果から、この PSI での O_2 の 4 電子還元は嫌気性菌に由来する O_2 消去酵素 Flv1+Flv3 を利用している¹⁴⁾。これによって低 CO_2 、高照度の光過剰ストレス環境になっても、過剰の PSI 還元当量は活性酸素を遊離することなく“安全に”消去できる。このように *Synechocystis* は自ら発生した O_2 を過剰の還元当量の消去に用いているが、植物葉緑体と異なり活性酸素消去機能が不十分であったためか嫌気性菌の O_2 消去システムである Flv を利用し、活性酸素を生じないようにしている。逆に、植物はなぜ Flv1+Flv3 のシステムを失って活性酸素を生ずるシステムになったのか、植物に Flv1+Flv3 のシステムを導入すればどうなるか、などはこれからの研究課題であろう。

一方、*Synechocystis* の Flv2、Flv4 破壊株は、野生株に比べ PSII 光阻害の生じやすい条件下、すなわち、低 CO_2 、高照度下での PSII 反応中心の失活 (D1 タンパク質分解) が生じやすくなる¹⁵⁾。現在のところ、Flv2+Flv4 がどのような生化学的機構によって *Synechocystis* で PSII 失活を防禦しているか明らかではないが、上のような光過剰ストレス下では D1 タンパク質の再合成に必要な elongation factor G が活性酸素によって酸化失活を受けやすいため¹⁶⁾、Flv2+Flv4 が PSII で生成する活性酸素を消去し、elongation factor G の失活の抑制に機能しているかも知れない。このように、*Synechocystis* の PSI、PSII 共に、嫌気性菌の O_2 消去酵素であった Flv を利用し、活性酸素ストレスに対処している。

6. superoxide dismutase (SOD)

O_2 が 1 電子還元されて生ずる O_2^- は細胞成分との反応性はあまり高くないため、これ自身が酸素障害の作用分子となる場合は少ない。しかし、 O_2^- によってラジカル反応が開始される場合もあり、 O_2^- のみによって細胞障害が誘起されることもある。例えば、公害ガスである SO_2 による植物障害は光照射下で顕著にみられるが、これは葉緑体で生ずる O_2^- が sulfite のラジカル連鎖酸化反応を開始するためである¹⁷⁾。一方、次式 (1~3) に示すように O_2^- は触媒量の遷移金属イオン (M^{n+}) があるとこれを還元し、反応性の高い $\cdot OH$ を次の反応連鎖で生成する (metal-catalyzed Haber-Weiss reaction)。この反応連鎖で生ずる $\cdot OH$ による酸素障害を防禦するために O_2^- は生成したその site で消去する必要がある。遷移金属イオンは酸化還元酵素をはじめ多くの酵素の反応中心となる必須元素であるが、下の反応連鎖を引き起こしにくい配位子に配位しているか、細胞内の O_2^- の生成サイトから離れたサイトでの局在なども、反応性の高い $\cdot OH$ による障害を防ぐ上で重要である。



O_2^- は自発的不均化反応 (反応(2)) でもかなりの速度で消滅するが ($5.3 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, pH 7.0)、それでも O_2^- を生成サイトから拡散する前に消去し、 $\cdot OH$ 生成を抑制できる superoxide dismutase (SOD) が酸素障害を防ぐ上に必須である。SOD は反応中心となる金属によって Fe-

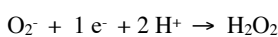
SOD、Mn-SOD、CuZn-SOD、Ni-SODの4種が見出されている。これらSODはすべて、O₂の不均化反応を拡散律速より速い速度で(2 X 10⁹ M⁻¹ s⁻¹)で触媒している。この速い反応は、CuZn-SODでは反応中心Cuの近くのArg残基によってO₂が静電的に誘引され、可能となっている。海洋生物でFe-SODが欠損しているとNi-SODをコードしていることが多く、これはFeが成長の制限因子になることの多い海洋ではNi-SODがFe-SODの代替作用をしていると考えられている¹⁸⁾。

SODの速い反応速度からみて、これが効果的であるためにはSODはO₂の生成サイトに局在しO₂が拡散する前に消去しなければならない。光照度がCO₂固定能に比べ高い場合や環境ストレスによってCO₂固定能が低下したとき、PSIでCO₂固定に利用できなかった還元当量がO₂を1電子還元しO₂を生成する。植物の葉緑体ではCuZn-SODがチラコイド膜でO₂を生成するPSI複合体のストロマ側に局在し、PSIで生成したO₂が生成siteから拡散する前に消去している¹⁹⁾。これによって葉緑体でwater-water cycle^{11, 12)}による活性酸素消去が完全なシステムとなっている。

嫌気性光合成細菌はFe-SOD、シアノバクテリアはFe-SOD、Mn-SODをもち、コケ、シダを初めとする陸上植物は、Fe-SOD、Mn-SODに加えCuZn-SODをもっている²⁰⁾。Ni-SODはシアノバクテリアを初めとする原核生物、真核生物にもコードされている¹⁸⁾。Ni-SODをコードしている光合成細菌のSODはシアノバクテリアによるO₂発生以前の極低濃度O₂が1電子還元されて生ずるO₂を消去する役割をもっていると考えられる。そのため、シアノバクテリアがO₂を細胞内で発生するようになって、直ちに対応できたはずである。一部のシアノバクテリアは上に述べたようにFlv1によってPSIでO₂を生成しないようにしているが、FlvをもたないシアノバクテリアではSODが、PSIその他で生ずるO₂の消去に寄与していると考えられる。

7. superoxide reductase (SOR)

極限環境に生存している嫌気性古細菌に、O₂⁻をSODによる不均化ではなく、電子供与体によってO₂⁻をH₂O₂に還元する2Feを反応中心とするSORが見いだされている²¹⁾。



嫌気性菌にとって、極低濃度O₂によって生じたO₂からSODによって1/2でもO₂が再び生成するよりはSORによってO₂が全く生成しない方が有利と考えられる。反応速度はSODと同様に拡散律速に近く、SORがO₂⁻生成サイトにあればO₂⁻が拡散するまでに消去できる。

S O R 反応で電子供与体として、好熱古細菌の *Pyrococcus furiosus* の場合、rubredoxinが機能している。細胞内のO₂濃度が高いシアノバクテリア、植物などでは、O₂⁻からO₂が発生してもあまり危険でないためか、SORは見いだされていない。しかし、好熱性古細菌のSORをタバコ培養細胞で発現させると、耐熱性が上昇することが示され²²⁾、植物細胞にSOR反応に必要な電子供与体があり、この反応が耐熱性に関与していると考えられている。SORにferrocyanideが会合すると、H₂O₂がさらに2H₂Oにまで還元される²³⁾、細胞内に見つけられていないferrocyanideに相当するFe-chelateは同定されていない。

8. H₂O₂-消去酵素

上述のようにシアノバクテリアでは、PSIでFlv1+Flv3によってO₂が2H₂Oに光還元される場合、O₂⁻、H₂O₂を遊離しないので、SOD、SOR、H₂O₂-消去酵素は必要ではない。しかし、植物葉緑体のようにこの4電子還元システムがない場合、O₂からSOD、SORによって生成するH₂O₂を消去する必要がある。*Anacystis nidulans*は光照射によってPSIで生じたH₂O₂を細胞外に排出する²⁴⁾。植物の葉緑体ではアスコルビン酸(AsA)を電子供与体とするペルオキシダーゼ(APX)によってH₂O₂を2H₂Oに還元する¹¹⁻¹²⁾、真核藻類でも同様のwater-water cycleが機能している²⁵⁾。APXをコードしていない*Synechocystis* PCC6803はthioredoxin peroxidaseによってH₂O₂を消去している²⁶⁾。catalase-peroxidaseによって消去しているシアノバクテリアもあり²⁷⁾、シアノバクテリアは多岐にわたる機構でH₂O₂を消去している。

9. おわりに

酸素発生型光合成が進行している細胞は、動物細胞はもちろん、葉緑体をもっていない植物細胞に比べても、細胞内のO₂濃度は少なくとも~4桁以上高い。上に述べたように好気呼吸によってATPを生産している動物細胞でさえ、細胞内O₂濃度はシアノバクテリア出現

以前の大気O₂濃度レベルであるが、初めて細胞内でO₂を発生したシアノバクテリアはこれによって大きな酸素ストレスに直面したのではない。これに対応するため極低濃度O₂に適応していた嫌気性菌がもっていたO₂消去機構、O₂、H₂O₂消去機構を利用し、シアノバクテリアは酸素ストレス、活性酸素ストレスを緩和してきたことが伺える。

Received July 15, 2009, Accepted July 21, 2009, Published August 31, 2009

参考文献

1. 理科年表 (2004) 惑星：衛星の大気組成, p. 85.
2. 田近英一 (2009) 地球環境46億年の大変動史, pp. 90-107, 化学同人.
3. 田村 守、櫛木 修 (1988) 細胞内酸素濃度とその制御、活性酸素 (中野、浅田、大柳編) pp. 203-209, 共立出版.
4. Castresana, J., Lubben, M., Saraste, M. and Higgins, D.G. (1994) Evolution of cytochrome c oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen. *EMBO J.* 13, 2516-2525.
5. Castresana, J. and Moreira, D. (1999) Respiratory chains in the last common ancestor of living organisms. *J. Mol. Biol.* 49, 453-460.
6. Kawasaki, S., Mimura, T., Satoh, T., Takeda, K., and Niimura Y. (2006) Response of the microaerophilic *Bifidobacterium* species, *B. Boum* and *B. thermophilum*, to oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6854-6858.
7. Kawasaki, S., Ishikura, J., Chiba, D., Nishino, T. and Niimura, Y. (2004) Purification and characterization of an H₂O-forming NADH oxidase from *Clostridium aminovalericum*: existence of an oxygen-detoxifying enzyme in an obligate anaerobic bacteria. *Arch Microbiol.* 181, 324-330.
8. Kawasaki, S., Ono, M., Watamura, Y., Sakai, Y., Satoh, T., Arai, T., Satoh, J. and Niimura, Y. (2007) An O₂-inducible rubrerythrin-like protein, rubperoxin, is functional as a H₂O₂ reductase in an obligatory anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *FEBS Lett.* 581, 2460-2464.
9. Kawasaki, S., Watamura, Y., Ono, M., Watanabe, T., Takeda, K. and Niimura, Y. (2005) Adaptive response to oxygen stress in obligatory anaerobes *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium aminovalericum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8442-8450.
10. 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 O₂ in cyanobacteria. *Cur. Biol.* 13, 230-235.
11. 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.
12. Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141, 391-396.
13. Helman Y., Barkan, E., Eisenstadt, D., Luz, B. and Kaplan, A. (2005) Fractionation of the three stable oxygen isotopes by oxygen-producing and oxygen-consuming reactions in photosynthetic organisms. *Plant Physiol.* 138, 2292-2298.
14. Hackenberg, C., Engelhardt, A., Matthijs, H. C. P., Wittink, F., Bauwe, H., Kaplan, A., and Hagemann, M. (2009) Photorespiratory 2-phosphoglycolate metabolism and photoreduction of O₂ cooperate in high light acclimation of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Planta* (in press).
15. Zhang, P., Allahverdiyeva, Y., Eisenhurd, 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.
16. Kojima, K., Oshita, M., Nanjo, Y., Kasai, K., Tozawa, Y., Hayashi, H. and Nishiyama, Y. (2007) Oxidation of elongation factor G inhibits the synthesis of the D1 protein of photosystem II. *Mol. Microbiol.* 65, 936-947.
17. Asada, K. and Kiso, K. (1973) Initiation of aerobic oxidation of sulfite by illuminated spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 33, 253-257.
18. Dupont, C. L., Neupane, K., Shearer, J. and Palenik, B. (2008) Diversity, function and evolution of genes coding for putative Ni-containing superoxide dismutase. *Environ. Microbiol.* 10, 1831-1843.
19. Ogawa, K., Kanematsu, S., Takabe, K. and Asada, K. (1995) Attachment of CuZn-superoxide dismutase to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplasts: Detection by immune-gold labeling after rapid freezing and substitution method. *Plant Cell Physiol.* 36, 565-573.
20. Asada, K., Kanematsu, S., Okada, S. and Hayakawa, T. (1980) Phylogenetic distribution of the three types of superoxide dismutase in organisms and in cell organelles, in *Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase* (Bannister JV and Hill HAO, Eds.) pp. 136-153, Elsevier, North Holland.
21. Jenny, F. E. Jr., Verhagen, M. F. J. M., Cui, X. and Adams, M. W. W. (1999) Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase. *Science* 286, 306-309.
22. Im, J. I., Mikyoung J., Lee, A. M., Boss, W. F. and Grunden, A. M. (2005) Production of a thermostable archeal superoxide reductase in plant cells. *FEBS Lett.* 579, 5521-5526.
23. Molina-Heredia, F.P., Houee-Levin, C., Berthomieu, C., Touati, D., Tremey, E., Favaudon, V., Adam, V. and Niviere, V. (2006) Detoxification of superoxide without production of H₂O₂: Antioxidant activity of superoxide

- reductase complexed with ferrocyanide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 14750-14755.
24. Patterson, C. O. P. and Myers, J. (1973) Photosynthetic production of hydrogen peroxide by *Anacystis nidulans*. *Plant Physiol.* 51, 104-109.
25. Miyake, C., Michihata, F. and Asada, K. (1991) Scavenging of hydrogen peroxide in prokaryotic and eukaryotic algae: Acquisition of ascorbate peroxidase during the evolution of cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 32, 33-43.
26. Yamamoto, H., Miyake, C., Dietz, K.-J., Tomizawa, K. and Murata, N. (1999) Thioredoxin peroxidase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* 447, 269-273.
27. Miller, A. G., Hunter, K. J., O'Leary, J. B. and Hart, L. J. (2000) The photoreduction of H₂O₂ by *Synechococcus* sp. PCC 7942 and UTEX 625. *Plant Physiol.* 123, 625-635.
28. 加藤邦彦 (1988) 老化、活性酸素 (中野, 浅田, 大柳編) pp. 475-483, 共立出版.

Adaptation to Molecular Oxygen and Reactive Oxygen Species in Cyanobacteria

Kozi Asada*

Kyoto University, Emeritus

報告記事

第9回日本光合成研究会シンポジウム報告

小川健一（岡山生物科学総合研究所）

2009年5月29日から30日に第9回日本光合成研究会シンポジウムが東京大学駒場キャンパスにて開催され、120名以上の方が参加されました。今回のシンポジウムは、牧野周氏（東北大）と私がオーガナイズを行い、「植物の生産性を支える多様な側面」という大きなテーマのもと、光合成と生産性を結びつける様々な話を盛り込みました。ポスター発表の中から選ばれた2名を含め、合計9名の方にシンポジウム講演をお願いしました。

シンポジウムでは、シンポジウム演題に加えて46題のポスター発表が行われ、シンポジウムの演題だけではカバーできない分野についても活発な質疑応答が行われていました。各発表者はパワーポイントを利用した1分間のプレゼンテーションを行いましたが、一般的な学会発表に比べて、より個性と研究の重要性をアピールする上で良いトレーニングであると感じました。こうした取組みは、若い学生さんも教員のかたも区別なく、お互いのアピールの仕方を比較することで、自分に足りないところを学べる良い機会であると思いました。特に若い人に限らず、今後も重要な取組みであると思います。また投票により、7名の方がポスター賞を受賞されました（次項参照）。

総合討論を1日目と2日目に設けました。初日には、我々の大先輩の先生方に今一度、メッセージを残してほしいというオーガナイザーの意向を汲み取っていただき、金井龍二先生に昔の研究をお話していただきました。この内容をもう一度見ていただけるよう、原稿のPDF版をホームページにアップしていただきました（http://www.soc.nii.ac.jp/photosyn/ACTIVITIES/SYMPOSIUM/090529_kanai-3.pdf）。新しいことを見つけるためには、やはり歴史も知る必要があるというのが私個人の意見ですが、情報があふれる世の中で、正確な話を効果的につかむのは、本やインターネットだけでは難しいというのが現状だと感じます。本を編集する立場の人も同じような思いをされることがあるのではないかと思います。大先輩方の生の話、最先端に行く研究者の方々の生のデータや意見を交換できる機会として、今回のようなシンポジウムが十分機能し、この後のみなさまの研究活動がいつそう有意義なものになることを期待します。

シンポジウムの後には「若手の会」が開催されました。オーガナイザーで企画したものではありません。遠方からも多くの方が参加される折角の機会ですので、親睦を深める意味でも今後も継続されればよいと思います。

懇親会とはまた違う交流があると思います。来年は、同時期に筑波大の小林正美先生と埼玉大の西田生郎先生がオーガナイザーとなってシンポジウムが企画されます。場所は未定ですが、その時期は是非空けておいていただければと思います。最後に個人的感想ですが、シンポジウムの開催に当たっては、突貫工事のようなところがあり、オーガナイザーとしては反省すべきところも多かったです。しかし、結果的には、全体としては良いシンポジウムに出来たのではないかと思います（自己満足）。参加の皆様のなかで、今後の研究のヒントを見出せたと思う人がいれば、なお、オーガナイザーとしてはうれしく思います。



金井龍二先生



懇親会の様子

第9回日本光合成研究会シンポジウムポスター賞受賞者

全参加者の投票により、以下の7名の方々（五十音順）がポスター賞を受賞されました。受賞者の方々の研究については、順次、会誌「光合成研究」にて、紹介していく予定です。

久保田寿子（東京大学・大学院総合文化研究科）

Purification and characterization of photosystem I complex from *Synechocystis* sp. PCC 6803 by expressing histidine-tagged subunits

小林康一（東京大学・大学院総合文化研究科）

高等植物の光合成におけるガラクト脂質の役割

鈴木伸郎（原子力機構・量子ビーム）

^{13}C を用いた光合成産物のイメージング：ソース・シンクバランスと転流速度の解析

寺島一郎（東京大学・大学院理学系研究科）

強い白色光のもとで緑色光は赤色光よりも高効率で光合成を駆動する

長尾 遼（東京理科大学・理学部、東京大学・大学院総合文化研究科）

珪藻 *Chaetoceras gracilis* の酸素発生光化学系II複合体の特徴

本橋 健（東京工業大学・資源研）

高等植物葉緑体チラコイド膜におけるストロマから内腔への還元力伝達機構の解析

渡邊麻衣（東京大学・大学院総合文化研究科）

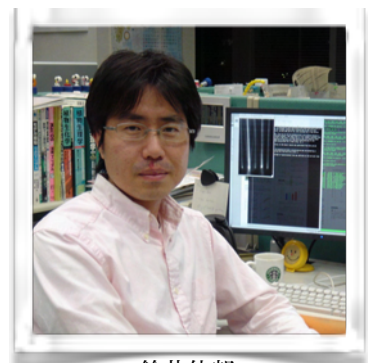
光化学系II複合体は界面活性剤により二量体化する？



久保田寿子



小林康一



鈴木伸郎



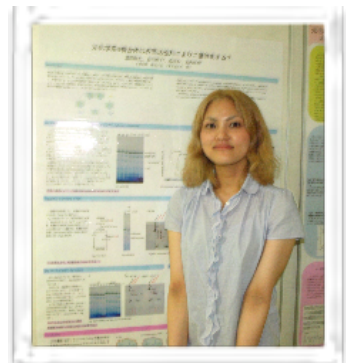
寺島一郎



長尾 遼



本橋 健



渡邊麻衣

光合成学会「若手の会企画会」の報告ならびに 若手の会セミナー開催のお知らせ

近年の研究では専門性の高い解析手法を用いる一方、様々な分野の知識・技術が必要とされます。光合成学会は多分野の専門家が集う学会であり、お互いが積極的に交流することは、光合成研究の更なる発展につながると考えています。そこで、先日の研究会シンポジウム後に20人の会員が集い、活発に意見を交わしました。その結果、成川を発起人、その他数名の補佐により「第一回若手の会セミナー」を開催し、これを期に「若手の会」を発足させることを決定しました。今後、「若手の会」主催でのセミナーの開催、HPやメーリングリストなど研究者の交流の機会をつくる会として、本学会と連携し運営していく予定です。多くの学生・研究者の参加と、会員の先生方のご協力をいただければ幸いです。

第一回若手の会セミナー『みんなで光合成研究』

趣旨：生物材料や測定法について学び、あるいは関連分野の最先端の研究についても勉強する機会を設け、個別の研究へのフィードバックと新たな研究分野の開拓の場となることを期待しています。

形式：お互いの研究について情報交換、討論するために、参加者には全員発表をしてもらうことになりました（自己紹介のみも可）。更に、より深く議論する、あるいは参加者同士の交流を深めるための時間を長く設けるために、宿泊研修形式にしました。

日時：2009年10月17-18日（2日間）

場所：東京大学・本郷キャンパス

（宿泊、懇親会：「太栄館」キャンパスの近所です）

内容：

一日目：参加者全員の口頭発表（研究計画や自己紹介だけでも可）

（自己紹介：1分、研究内容：0、5、10、15分から選択）

二日目：『光合成研究について考えよう』

「酸素非発生型光合成を行う光合成生物の研究について」

原田 二郎（久留米大・医・助教）

「FT-IRによる光合成研究（仮）」

鈴木 博行（筑波大・数理物質科学・PD）

「関連分野のトピック」（予定）

「光合成研究の昔・今・これから」

伊藤 繁（名古屋大・理・教授、前会長）

参加費（宿泊・懇親会費込み）：学生 ¥8,000- その他 ¥10,000-

問い合わせ・申し込み: 成川 礼（東京大・大学院総合文化研究科・助教）

Tel: 03-5454-4375, e-mail: narikawa@bio.c.u-tokyo.ac.jp

集会案内

15th International Congress of Photosynthesis Beijing, China, August 22-27, 2010

<http://www.psbj2010.com/>

2010年に北京で開催される第15回国際光合成会議の Second Circular がOpenになりました。詳しくは上記のWebサイトをご確認下さい。Submissionに関するImportant datesは以下の通りです。

Important Dates:

May, 2009	Second Circular
November, 2009	Final Announcement
November, 2009	Abstract submission and online registration opens
April, 2010	Abstract submission and early registration deadline

新刊図書

Lipids in Photosynthesis

Essential and Regulatory Functions

Series: Advances in Photosynthesis and Respiration , Vol. 30

Wada, Hajime; Murata, Norio (Eds.)

2009, Approx. 450 p., Hardcover

ISBN: 978-90-481-2862-4

<http://www.springer.com/life+sci/plant+sciences/book/978-90-481-2862-4>

Handbook on Cyanobacteria: Biochemistry, Biotechnology and Applications

Gault, Percy M.; Marler, Harris J. (Eds.)

ISBN: 978-1-60741-092-8

Nova Science Publishers

https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=9524

「光合成研究法」高解像度版pdf

低温科学第67巻「光合成研究法」の高解像度版pdf (96.5Mb) がダウンロードできるようになりました。以下のWebサイトより一括ダウンロードすることが出来ます。

<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/LTS/index.html>

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）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

会費が未納の場合、未納印とともにお手元の封筒の宛名シールの下に、会費未納の年が印字されています。ご確認の上、会費納入にご協力をお願いいたします。納められた会費は、古い未納年から順に充当させていただきます。会費納入状況などにつきましては、ご遠慮なく事務局（shikanai@pmg.bot.kyoto-u.ac.jp）までお問い合わせください。会員の皆様のご理解とご協力をお願い申し上げます。

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、博士研究員の方々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。書評も歓迎いたします。

記事の掲載を希望される方は、会誌編集担当、増田（ctmasuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）まで御連絡下さい。

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

〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1

東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

池内・成川研究室内 日本光合成学会

TEL: 03-5454-6641, FAX: 03-5454-4337

E-mail: photosyn@bio.c.u-tokyo.ac.jp

ホームページ: <http://photosyn.c.u-tokyo.ac.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

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

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

「光合成研究」の著作権委譲に関するお願い

会員ならびに著者各位

日本光合成学会（以下「本会」という）は、創刊以来、「光合成研究」を刊行して参りました。長きに渡り「光合成研究」を刊行できましたことは、ひとえに会員各位のご支援、ご協力の賜物と深く感謝申し上げます。これまで、本会は「光合成研究」の誌面をpdfファイルの形式で電子データ化し、本会のインターネットウェブサイト上で公開してまいりました。また今後、国会図書館への納本や科学技術進行機構（JST）のオンライン情報システムへの収録など、学術雑誌としての「光合成研究」の利用価値をますます高め、多くの方に利用して頂けるように努力していく所存です。「光合成研究」の発刊ならびにインターネットウェブサイト上での公開にあたっては、著作権法により、掲載された論文などの著者からその著作権（複製権、公衆送信権を含む）の許諾又は譲渡を必要とします。

これまで「光合成研究」は、著作権の委譲が明確にされていない状態となっておりました。これらの事情から今後、既に発刊済の著作についても著作権は本会に帰属していただくことといたしたく、ここに著作権の譲渡をお願い申し上げる次第です。万一、この件に関しましてご了承いただけない場合、あるいはご不審の点がある場合は、2009年10月31日までに本会事務局に文書または電子メールでお申し出下さい。

本会は、このお知らせが著者のみなさまの目に触れることを前提としておりますが、何らかの事情でこの件をお知りになる機会がなかった場合には、期限を過ぎましても、あらためて個別にご相談させていただき所存です。なお、お申し出のない場合には、ご了承いただいたものとして、論文を掲載させていただきたいと存じます。

日本光合成学会会長
池内昌彦

編集後記

今号は、本会が「日本光合成学会」として名称変更後、初めて発行する記念すべき「光合成研究」となりました。看板を架け替えるだけでも、会則の変更からロゴに至るまで、さまざまな修正が必要になり、予想以上に大変な編集作業になりました。また今号から、「光合成研究」編集委員会の設置が幹事会で認められ、新たな編集体制でスタートしました。新たな試みとして、投稿記事についての査読を行うとともに、英語でのタイトル表記を加えるなど、内容の充実とレベルアップを図っています。今回は、締切の関係などから査読に十分な時間が充てられなかったのですが、第三者が記事に目を通し、コメントすることで、内容的にも随分改善されたものもあつたように感じています。

<東京大学 増田 建>

「光合成研究」編集委員会

編集担当 増田 建 (東京大学)
発行担当 和田 元 (東京大学)
編集委員 栗栖源嗣 (大阪大学)
編集委員 野口 航 (東京大学)
編集委員 増田真二 (東京工業大学)

日本光合成学会 2008-2009年役員

会長 池内昌彦 (東京大学)

事務局 鹿内利治 (京都大学)

常任幹事 沈 建仁 (岡山大学) (日本光生物学協会)
常任幹事 和田 元 (東京大学) (会誌担当)
常任幹事 増田 建 (東京大学) (会誌担当)
常任幹事 佐藤直樹 (東京大学) (ホームページ担当)
常任幹事 寺島一郎 (東京大学) (企画担当)
常任幹事 高市真一 (日本医科大学) (企画担当)
常任幹事 小川健一 (岡山県生物科学総合研究所) (企画担当)
常任幹事 西田生郎 (埼玉大学) (企画担当)
常任幹事 小林正美 (筑波大学) (企画担当)
常任幹事 原登志彦 (北海道大学) (企画担当)

会計監査 小池裕幸 (中央大学)

光合成研究 第19巻 第2号 (通巻55号) 2009年8月31日発行

日 本 光 合 成 学 会

〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1

東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

池内・成川研究室内 日本光合成学会

TEL: 03-5454-6641, FAX: 03-5454-4337

E-mail: photosyn@bio.c.u-tokyo.ac.jp

ホームページ: <http://photosyn.c.u-tokyo.ac.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