

# 光合成研究

第 25 卷 第 3 号 (通巻 74 号) 2015 年 12 月  
NEWS LETTER Vol. 25 NO. 3 December 2015

THE JAPANESE SOCIETY OF PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

次期会長選挙のお知らせ	174
研究紹介 3つの時計タンパク質によるシアノバクテリア生物時計再構成系の解析 大山 克明 浅井 智広 寺内 一姫 (立命館大)	175
研究紹介 シロザ由来の水溶性クロロフィル結合タンパク質の構造解析 高橋 重一 大槻 孝之 内田 朗 中山 克己 佐藤 浩之 (東洋大)	181
研究紹介 光合成初期過程への超分子化学からのアプローチ PDB 構造データに準拠した光合成系 における励起遷移過程の計算手法の提案 鈴木 哲 (信州大) 梅壽 雅人 (富山大) 沢井 裕佑 (富山大) 錦織 広昌 (信州大) 小野 慎 (金沢工大)	186
解説特集 「光合成炭素代謝研究の新展開」	192
序文 松田 祐介 (関西学院大)	193
解説 気孔調節による植物の CO <sub>2</sub> コンダクタンス制御 Wang Yin 木下 俊則 (名古屋大)	194
解説 紅藻由来の葉緑体を持つ二次共生藻類の炭素代謝 辻 敬典 (関西学院大) 白岩 善博 (筑波大)	202
解説 C <sub>4</sub> 型光合成の進化過程から C <sub>4</sub> 化の鍵を探る 宗景 ゆり (関西学院大)	212
報告記事 International Conference “Photosynthesis Research for Sustainability-2015”参加報告 梶 達也 (東京理科大学)	220
報告記事 International Conference “Photosynthesis Research for Sustainability-2015”に参加して 嶋川 銀河 (神戸大)	221
報告記事 山田コンファレンス 国際シンポジウム「Dynamics and Regulation of Photosynthesis」 に参加して 加藤 義宣 (京大)	222
報告記事 若手の会活動報告～第 12 回セミナーの開催、サイエンスアゴラ 2015 での出展報告～ 浅井 智広 (立命館大)	223
報告記事 「光合成若手&植物脂質若手ジョイントセミナー」開催報告 村川 雅人 (東工大)	224
集会案内 International Conference “Photosynthesis Research for Sustainability-2016”開催のお知らせ 梶 達也 (東京理科大学)	225
事務局からのお知らせ	225
日本光合成学会会員入会申込書	226
日本光合成学会会則	227
幹事会名簿	229
会員名簿	230
編集後記・記事募集	241
「光合成研究」編集委員・日本光合成学会 2015 年度役員	242
賛助法人会員広告	

## 日本光合成学会 次期会長選挙のお知らせ

「日本光合成学会会則（平成 21 年 6 月 1 日施行）第 5 条」に基づき、次期会長選挙（任期：平成 29 年 1 月 1 日～平成 30 年 12 月 31 日の 2 年間）を行ないます。本会では任期一年前に新会長を選出し、会の円滑、継続的な運営をはかることになっています。この会報の末尾に添付されている投票用紙に会員の中から会長候補者 1 名の氏名を明記し、同封の返信用封筒に入れて選挙管理委員会宛に 1 月 31 日までにご返信ください（当日消印有効）。会員名簿は本号の巻末をご覧ください。

これまでの本会会長は、宮地重遠、西村光雄、佐藤公行、金井龍二、井上頼直、高宮建一郎、村田紀夫、伊藤繁、池内昌彦、田中歩、高橋裕一郎（現会長：任期 平成 27 年 1 月 1 日～平成 28 年 12 月 31 日）の諸氏です。「会則 5 条の 1 では会長は二期を超えて再任されないこと」となっています。今回の選挙では現会長にも被選挙権があります。

日本光合成学会 選挙管理委員会

日原 由佳子（埼玉大学大学院理工学研究科）

西山 佳孝（埼玉大学大学院理工学研究科）

---

投票用紙の送付先

〒338-8570

さいたま市桜区下大久保 255

埼玉大学大学院理工学研究科

日原由佳子 研究室内

日本光合成学会選挙管理委員会 行き

## 研究紹介

3つの時計タンパク質によるシアノバクテリア生物時計再構成系の解析<sup>§</sup>

立命館大学 大学院生命科学研究科  
 大山 克明\* 浅井 智広 寺内 一姫

シアノバクテリアの生物時計は3つの時計タンパク質 KaiA、KaiB、KaiC と ATP によって *in vitro* で再構成可能である。中心振動体である KaiC のリン酸化状態が概日周期をもって変動する。このリン酸化変動は、生物時計を特徴付ける3つの特性を持ち合わせており、生物時計の本質を *in vitro* で研究できる唯一の実験系として知られている。ここでは、シアノバクテリアの生物時計の再構成系を、我々の研究成果を中心に紹介する。

## 1. はじめに

地球に生きるほとんどすべての生物にとって、昼と夜の変化は最も身近で大きな環境変動である。生物は昼夜の変化をあらかじめ予測して、より確実に生命活動を営むために生物時計（体内時計、概日時計ともいう）が機能している。

生物時計は、3つの固有の性質によって特徴づけられる<sup>1)</sup>。第1の特性は、およそ1日（24時間）で自律的に振動することである。第2の特性は、温度に対して時計の周期長が安定していることである。これを温度補償性という。第3の特性は、概日リズムの位相は外部からの刺激によって変化し、速やかに外部の位相に同調することである。この性質により、時計は外界の環境変化に同調して時刻を合わせ直すことができる。

シアノバクテリアは植物と同じ酸素発生型の光合成系を備えた原核生物である。生物時計を有する最も単純な生物と考えられており、時計研究分野において研究の進展が著しい生物である。かつて、生物時計は植物やヒトなど高等な真核生物にのみ存在し、原核生物が生物時計をもっているとは考えられていなかった。多くの原核生物は24時間より短い世代時間で細胞分裂し増殖することができる。例えば、シアノバクテリアの中には、最適な培養条件下において24時間で複数回の分裂が可能な種が存在する。このような生

物が世代時間よりも長い24時間周期のリズムをもたずはないと考えられていた。近年、モデル生物を用いた分子生物学的研究の発展により、多くの生物で時計に関連した遺伝子が発見され、その機能解析が進められている。その中でもシアノバクテリアのもつ堅牢かつ安定でシンプルな時計システムが注目されている。

本稿では、シアノバクテリアの Kai タンパク質を用いて試験管内で生物時計を再構成するという画期的な研究<sup>2)</sup>と、さらにその発見以降明らかになってきた生物時計の分子メカニズムを含めて、我々の研究を紹介したい。

## 2. シアノバクテリアの生物時計再構成系

シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を用いた研究により発見された3つの時計遺伝子は、日本語の回転の「回」にちなんで *kaiA*、*kaiB*、*kaiC* と命名された<sup>3)</sup>。その後の生化学的および構造生物学的解析により、中心振動体である KaiC は519個のアミノ酸残基からなるタンパク質で、ATP 依存的に六量体を形成し<sup>4)</sup>、自己リン酸化活性と自己脱リン酸化活性および ATPase 活性をもつことが明らかになっている<sup>5,6)</sup>。一方、KaiA や KaiB は KaiC の活性を調節する機能をもっており、KaiA は KaiC の活性を促進し<sup>7)</sup>、一方で KaiB は KaiA の反応を阻害するように働く<sup>8)</sup> (図1)。

2005年に名古屋大学の近藤グループが試験管内で KaiC のリン酸化レベルが概日振動するという画期的

<sup>§</sup>第5回日本光合成学会シンポジウム ポスター発表賞受賞論文

\*連絡先 E-mail: sj001087@ed.ritsumei.ac.jp

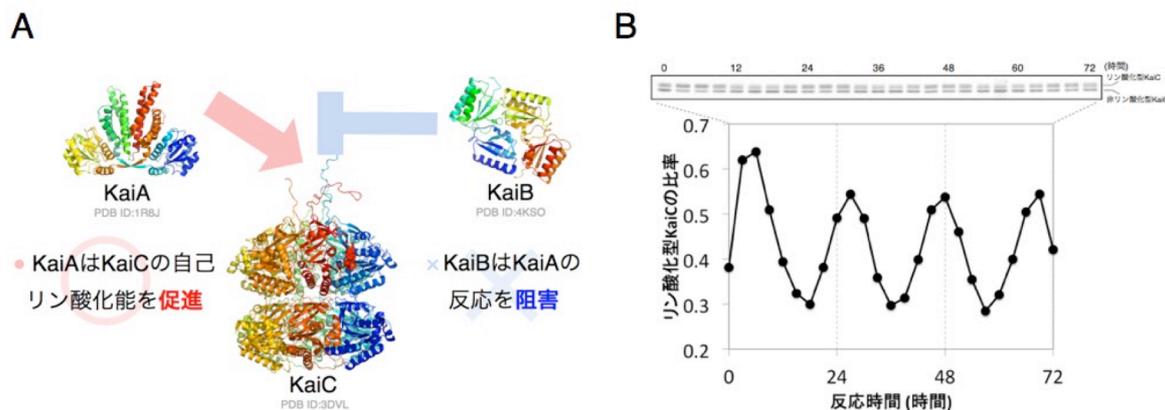


図 1. KaiA・KaiB・KaiC の構造・機能および生物時計再構成系

(A) KaiA (二量体)、KaiB (四量体)、KaiC (六量体) の結晶構造と機能。(B) 生物時計再構成系での KaiC のリン酸化状態変化。KaiA、KaiB、KaiC を ATP と混合し 30°C でインキュベーション後、反応溶液から一定時間毎に一部を取り出し、SDS-PAGE で分離し CBB で染色した。KaiC は SDS-PAGE によりリン酸化型 (上のバンド) と非リン酸化型 (下のバンド) に分離される (上のパネル)。この 2 つのバンドの濃さをもとに、KaiC 全体量に対するリン酸化型 KaiC の比率を求め、その経時変化をプロットした (下のパネル)。

な研究結果を発表した<sup>2)</sup>。大腸菌で発現させ精製した 3 つのタンパク質 KaiA、KaiB、KaiC と ATP を混ぜ 30°C でインキュベーションすると時計は動き始める。一定時間毎に取り出した反応溶液を SDS-PAGE で解析し、KaiC 全体におけるリン酸化型 KaiC の比率を求め、その経時変化をプロットすると、KaiC のリン酸化レベルが約 24 時間ごとに上昇と下降を繰り返す周期性をもって変動していることがわかる (図 1B)。この振動のエネルギー源として使われているのが ATP であり、ATP がなくなると振動は停止する<sup>6)</sup>。ATP の供給が持続すれば 10 日間以上にわたってリズムが継続する堅牢なシステムである<sup>9)</sup>。この試験管内での Kai タンパク質によるリン酸化振動が、生物時計としての 3 つの特性を備えていることもすでに検証されている<sup>2,10)</sup>。

上述したように KaiA が KaiC のリン酸化を促進し、KaiB が KaiA の効果を阻害することでリン酸化を抑制する。この KaiA と KaiB の KaiC に対する拮抗的作用が安定した 24 時間振動に重要である。KaiA、KaiB、KaiC の 3 つのタンパク質複合体の動的変動が、ゲル濾過やウエスタンブロット、NMR、X 線小角散乱、蛍光相関分光法、未変性状態での質量分析法 (native MS) など多様な分析法により解析されている<sup>11-15)</sup>。KaiC のリン酸化レベルが上昇する時間帯には、KaiA が KaiC と相互作用を繰り返す。その結果、KaiC のリン

酸化レベルがピークに達すると、次に KaiB が結合し KaiA の活性を阻害し始め、KaiC のリン酸化レベルは減少に転ずる。これが約 24 時間周期で繰り返されてリン酸化サイクルが生じると考えられている。

### 3. BN-PAGE による 3 つの Kai タンパク質解析

Blue Native PAGE (BN-PAGE) では、Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250) をタンパク質分子の表面に弱く結合させて全体を負に荷電させる。通常の Native PAGE ではタンパク質分子の荷電状態が移動度に大きく影響するため、必ずしも分子の大きさに応じて分離されない。一方、BN-PAGE では CBB G-250 の負電荷によってタンパク質の本来の荷電状態の影響を抑えることができ、タンパク質は高次構造や複合体構造を保持したまま、その大きさにしたがって分離される<sup>15)</sup>。我々は、この方法を用いて時計タンパク質の高次構造の動態を解析した。BN-PAGE で KaiC は主に 2 つのバンドとして検出された (図 2A)。KaiC 単量体の分子量は 58 kDa、KaiC 六量体の分子量は 348 kDa であることから、移動度が小さく上側に観察されるバンドが六量体 KaiC、移動度が大きく下側のバンドが単量体 KaiC であると考えられた。ところが、KaiC をゲル濾過クロマトグラフィーで分離すると、見かけの分子量で六量体にあたる位置に単一のピークで溶出され (図 2B)、BN-PAGE の結果と一致しなかった。

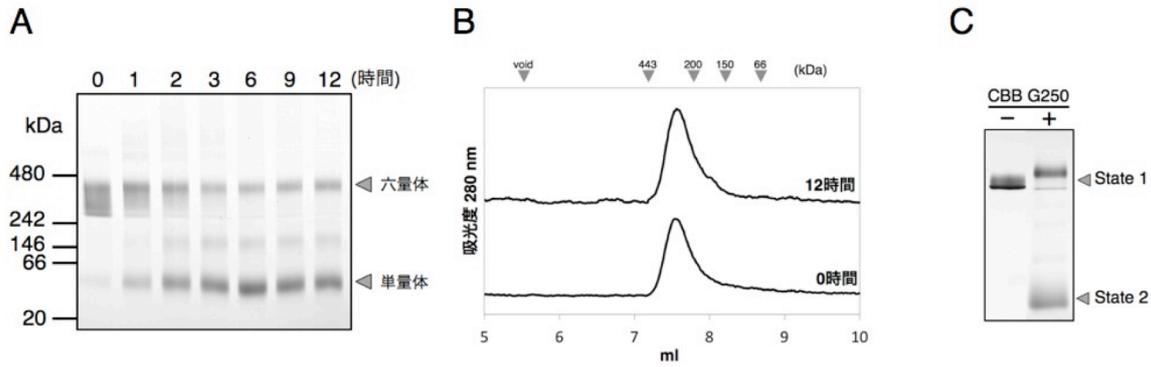


図 2. KaiC の BN-PAGE 解析とゲル濾過クロマトグラフィー

(A) ATP 存在下において KaiC を 30°C でインキュベーションし、各時間で BN-PAGE により解析した。見かけの分子量から、上側のバンドが六量体 (348 kDa)、下側のバンドが単量体 (58 kDa) に相当すると結論した。(B) 同様の KaiC を 30°C でインキュベーションする前 (0 h) と 12 時間後 (12 h) にゲル濾過クロマトグラフィーに供した。横軸は溶出位置 (ml) を表し、分子量マーカーとして apoferritin (443 kDa)、 $\beta$ -amylase (200 kDa)、alcohol dehydrogenase (150 kDa)、albumin (66 kDa) を用いた。(C) 30°C で 12 時間インキュベーションした KaiC (-) に CBB G-250 を添加 (+) して Native PAGE に供した。

これらの挙動の違いは、BN-PAGE で添加する CBB G-250 によって引き起こされたのではないかと推測し、KaiC に CBB G-250 を添加して Native PAGE をおこなった (図 2C)。その結果、CBB G-250 を添加したときに限って KaiC 単量体と思われるバンドが検出された。このことから、KaiC 六量体には、CBB G-250 存在下でも六量体を維持する構造状態 (State 1) と CBB G-250 存在下で解離する構造状態 (State 2) が存在することが示唆された。State 1 は KaiC 六量体の表面にのみ CBB G-250 が結合している状態であり、State 2 は六量体構造が緩み CBB G-250 が六量体の内部まで入り込みや

すくなった状態であると推測している。

#### 4. 生物時計再構成系と KaiC の構造変化

次に、生物時計再構成系における Kai タンパク質とその複合体の挙動を BN-PAGE を用いて解析した (図 3A)。反応開始時には、ブロードなバンドとして検出され State 1 の状態にある KaiC は、30°C で反応を開始してから 6 時間で、State 2 の状態を示す移動度の大きなバンドと、KaiC に KaiA と KaiB が結合した KaiABC 複合体のバンドとして検出された。これらのバンドは、ともに 12 時間後には減少し始め、21 時間ではほぼ完全

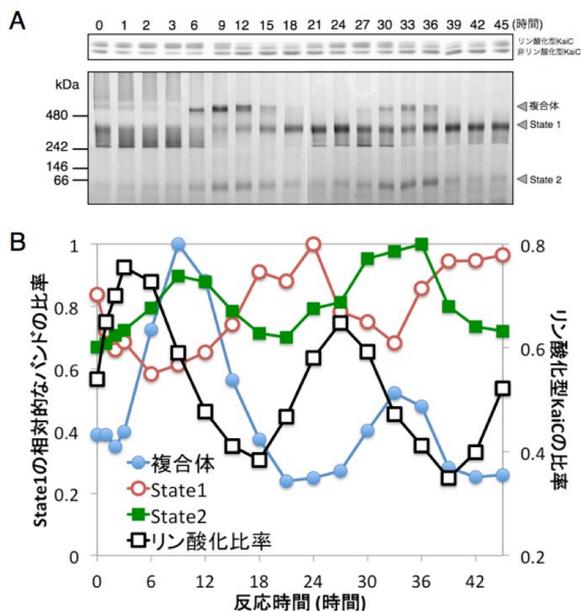


図 3. 生物時計再構成系における BN-PAGE 解析

(A) 生物時計再構成系における反応液を各時間で SDS-PAGE と BN-PAGE により解析した。上のパネルは SDS-PAGE での KaiC のリン酸化状態の解析、下のパネルは BN-PAGE での KaiC の挙動を表している。BN-PAGE で矢印を付した 3 つのバンドは、上から Kai 複合体、State 1 の KaiC、State 2 の KaiC に対応する。(B) A の結果をもとに、リン酸化 KaiC の比率、Kai 複合体、State 1-KaiC、State 2-KaiC の相対比率 (もっとも高い値を 1 とした) の経時変化をプロットした。

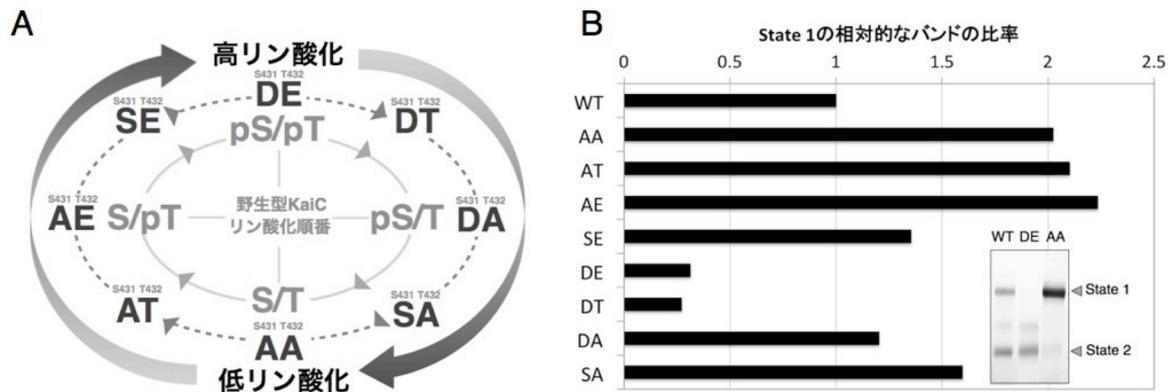


図 4. リン酸化模倣変異型 KaiC の構造状態

(A) KaiC リン酸化状態の 24 時間サイクル。KaiC の 2 つのリン酸化部位セリン 431 (S431) およびスレオニン 432 (T432) は、KaiC リン酸化サイクルにおいてリン酸化と脱リン酸化が一定の順序にしたがって進行する。pS/pT は S431 と T432 が共にリン酸化された状態を示す。8 つのリン酸化模倣変異型 KaiC (AA、AT、AE、SE、DE、DT、DA、SA) は、KaiC のリン酸化のサイクルの各過程に対応するように作製された。(B) ATP 存在下において 30 °C で 24 時間インキュベーションしたリン酸化模倣変異型 KaiC を BN-PAGE で解析した。野生型 KaiC (WT) の State 1 のバンドの濃さを 1 として変異型 KaiC の State 1 の相対的含量を算出した。インセットは、野生型 KaiC と AA、DE の BN-PAGE の結果を示す。

に消失し、KaiC は再度 State 1 となり 24 時間を迎え、また次の 6 時間後には、State 2 と複合体のバンドが出現した。これら一連の挙動の変化が、生物時計再構成系において約 24 時間周期で繰り返されていることが BN-PAGE で明らかにされた。State 1 のバンドはブロードであり、また時間と共に変化することから複数の状態があることが推測される。KaiC の State 2 が増加している時間帯に限って KaiABC 複合体のバンドが検出された。このことから、生物時計再構成系において概日リズムが生成される時、KaiC はその六量体構造を周期的に変化させており、KaiC の状態が State 1 から State 2 へと変換すると同時に、複合体が形成されると考えられた。KaiC が脱リン酸化している時に Kai タンパク質の複合体が最大になることから、構造変化の周期性とリン酸化は密接に関係しているように見える。そこで、KaiC のリン酸化と構造変化の関係を調べた。

KaiC は、2 つの隣り合ったリン酸化部位セリン 431 (Ser431) およびスレオニン 432 (Thr432) を保持しており、24 時間のリン酸化振動の中でこの 2 つの残基のリン酸化および脱リン酸化は一定の順序で進行する<sup>17)</sup>。非リン酸化型の KaiC (S/T) は、まず Thr432 がリン酸化され (S/pT)、次に Ser431 がリン酸化され (pS/pT)、2 カ所がリン酸化された状態となる。そして、Thr432 が脱リン酸化され (pS/T)、続いて Ser431 が脱リン酸化され、非リン酸化型 KaiC (S/T) にもど

る。この一連の反応が 24 時間周期で繰り返される。そこで、KaiC の 2 つのリン酸化部位をアラニン (A)、アスパラギン酸 (D) もしくはグルタミン酸 (E) に変異させて、8 種類のリン酸化模倣変異型 KaiC を作製した (図 4A)。KaiC-AA、KaiC-DE は両方のリン酸化部位が脱リン酸化、リン酸化した状態を、また KaiC-AE、KaiC-DA は一方のリン酸化部位がリン酸化もう一方が脱リン酸化した状態を模倣している。KaiC-AT、KaiC-SE、KaiC-DT、KaiC-SA は一方のリン酸化部位のみをリン酸化もしくは脱リン酸化状態に固定することで、リン酸化サイクルの途中の状態を模倣できると考えた。これらの 8 種類の変異タンパク質は、各々 24 時間のうちの 3 時間毎の時刻におけるリン酸化状態を模倣しており、リン酸化状態が各状態に固定されるため概日リズムは認められない。

野生型 KaiC およびリン酸化模倣変異型 KaiC の構造状態を BN-PAGE で解析した。両残基ともにリン酸化された状態 (pS/pT) を模倣した KaiC-DE と初期脱リン酸化状態 (pS/T) を模倣した変異型 KaiC-DT では共に State 1 の割合が極めて低く、ほぼすべての分子が State 2 の状態にある。一方、その他の変異 KaiC は State 1 の状態に留まっている (図 4B)。これらの変異型 KaiC の KaiB との結合を調べたところ、KaiC-DE および KaiC-DT のみが KaiB と結合することがわかった。すなわち、KaiC が State 2 になることで複合体が形成

されることを意味する。生物時計再構成系において、Kai タンパク質複合体はリン酸化状態が pS/pT から脱リン酸化する位相で増加する (図 3B)。そのため、State 2 の増加は複合体形成開始より後にピークを迎えることになる。

これらのことから、KaiC はリン酸化が進行するにつれ State 2 へと構造が変化し、この構造変化により KaiB の結合が促進され、KaiC は脱リン酸化に転ずると推察される。

## 5. 今後の展望

KaiC と KaiA や KaiB との相互作用が 24 時間周期で変動をくりかえし、KaiC のリン酸化サイクルや ATPase 活性の概日変動が生じるが、その本質は、KaiC 六量体の構造が変化することであると推察される。これまでに KaiC の NMR や X 線小角散乱法による観察により、六量体の構造が変動していることが提唱されている<sup>18, 19)</sup>。本研究では、BN-PAGE 法を用いることで、常に状態が変化する KaiC の構造変化と複合体形成を連続的に捉えることに成功した。

生物時計を知るには、その特性である、24 時間という周期長、温度補償性、位相同調性などの基盤となるメカニズムを解明することが重要である。Kai タンパク質による時計の位相同調は、KaiC のリン酸化が pS/pT から pS/T の位相でおきることが報告されている<sup>9)</sup>。この位相は KaiC 六量体の構造が State 2 の状態に対応する。そのため、今回見出した KaiC の構造状態変化は、生物時計の第 3 の特性である時刻合わせ、すなわち Kai タンパク質がどのようにして位相同調するかという疑問を解く手がかりとなるかもしれない。今後は、この点を視野にいれ生物時計の基本的性質の分子メカニズムを解き明かしたい。

## 謝辞

タンパク質精製や数日にわたるサンプリング実験を手伝ってくれた研究室のメンバーに感謝します。本研究の一部は、文部科学省科研費 (23107730, 26102543) の補助を受けて行われました。また、このような執筆の場を与えてくださった日本光合成学会ならびに編集委員の方々に御礼申し上げます。

Received July 27, 2015; Accepted September 8, 2015;

Published December 31, 2015

## 参考文献

1. Kondo, T., Strayer, C. A., Kulkarni, R. D., Taylor, W., Ishiura, M., Golden, S. S. and Johnson, C. H. (1993) Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 5672–5676.
2. Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Murayama, Y., Iwasaki, H., Oyama, T. and Kondo, T. (2005) Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation *in vitro*. *Science* 308, 414–415.
3. Ishiura, M., Kutsuna, S., Aoki, S., Iwasaki, H., Andersson, C. R., Tanabe, A., Golden, S. S., Johnson, C. H. and Kondo, T. (1998) Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science* 281, 1519–1523.
4. Pattanayek, R., Wang, J., Mori, T., Xu, Y., Johnson, C. H. and Egli, M. (2004) Visualizing a circadian clock protein: crystal structure of KaiC and functional insights. *Mol. Cell* 15, 375–388.
5. Nishiwaki, T., Iwasaki, H., Ishiura, M. and Kondo, T. (2000) Nucleotide binding and autophosphorylation of the clock protein KaiC as a circadian timing process of cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 495–499.
6. Terauchi, K., Kitayama, Y., Nishiwaki, T., Miwa, K., Murayama, Y., Oyama, T. and Kondo, T. (2007) ATPase activity of KaiC determines the basic timing for circadian clock of cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 16377–16381.
7. Iwasaki, H., Nishiwaki, T., Kitayama, Y., Nakajima, M. and Kondo, T. (2002) KaiA-stimulated KaiC phosphorylation in circadian timing loops in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 15788–15793.
8. Kitayama, Y., Iwasaki, H., Nishiwaki, T. and Kondo, T. (2003) KaiB functions as an attenuator of KaiC phosphorylation in the cyanobacterial circadian clock system. *EMBO J.* 22, 2127–2134.
9. Ito, H., Kageyama, H., Mutsuda, M., Nakajima, M., Oyama, T. and Kondo, T. (2007) Autonomous synchronization of the circadian KaiC phosphorylation rhythm. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1084–1088.
10. Yoshida, T., Murayama, Y., Ito, H., Kageyama, H.

- and Kondo, T. (2009) Nonparametric entrainment of the *in vitro* circadian phosphorylation rhythm of cyanobacterial KaiC by temperature cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 1648–1653.
11. Kageyama, H., Nishiwaki, T., Nakajima, M., Iwasaki, H., Oyama, T. and Kondo, T. (2006) Cyanobacterial circadian pacemaker: Kai protein complex dynamics in the KaiC phosphorylation cycle *in vitro*. *Mol. Cell* 23, 161–171.
  12. Akiyama, S., Nohara, A., Ito, K. and Maéda, Y. (2008) Assembly and disassembly dynamics of the cyanobacterial periodosome. *Mol. Cell* 29, 703–716.
  13. Mutoh, R., Mino, H., Murakami, R., Uzumaki, T., Takabayashi, A., Ishii, K. and Ishiura, M. (2010) Direct interaction between KaiA and KaiB revealed by a site-directed spin labeling electron spin resonance analysis. *Genes Cells* 15, 269–280.
  14. Goda, K., Ito, H., Kondo, T. and Oyama, T. (2012) Fluorescence correlation spectroscopy to monitor Kai protein-based circadian oscillations in real time. *J. Biol. Chem.* 287, 3241–3248.
  15. Snijder, J., Burnley, R. J., Wiegard, A., Melquiond, A. S., Bonvin, A. M., Axmann, I. M. and Heck, A. J. (2014) Insight into cyanobacterial circadian timing from structural details of the KaiB-KaiC interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 1379–1384.
  16. Schägger, H. and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199, 223–231.
  17. Nishiwaki, T., Satomi, Y., Kitayama, Y., Terauchi, K., Kiyohara, R., Takao, T. and Kondo, T. (2007) A sequential program of dual phosphorylation of KaiC as a basis for circadian rhythm in cyanobacteria. *EMBO J.* 26, 4029–4037.
  18. Kim, Y. I., Dong, G., Carruthers, C. W., Golden, S. S. and LiWang, A. (2008) The day/night switch in KaiC, a central oscillator component of the circadian clock of cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 12825–12830.
  19. Murayama, Y., Mukaiyama, A., Imai, K., Onoue, Y., Tsunoda, A., Nohara, A., Ishida, T., Maéda, Y., Terauchi, K., Kondo, T. and Akiyama, S. (2011) Tracking and visualizing the circadian ticking of the cyanobacterial clock protein KaiC in solution. *EMBO J.* 30, 68–78.

### *In vitro* Analysis of the Cyanobacterial Circadian Oscillator Composed of Three Kai Proteins

Katsuaki Oyama\*, Chihiro Azai and Kazuki Terauchi

Department of Life Sciences, Ritsumeikan University

## 研究紹介

シロザ由来の水溶性クロロフィル結合タンパク質の構造解析<sup>§</sup>

<sup>1</sup>東洋大学 生命科学部 <sup>2</sup>東邦大学 理学部  
高橋 重一<sup>1</sup> 大槻 孝之<sup>2</sup> 内田 朗<sup>2</sup> 中山 克己<sup>2</sup> 佐藤 浩之<sup>2</sup>

暗所で抽出されたシロザ由来の水溶性クロロフィル結合タンパク質は、光照射によって、自身に結合しているクロロフィル *a* のクロリン骨格をバクテリオクロリン様骨格に変換する極めてユニークな特性を持つが、その詳細な分子メカニズムは不明である。本タンパク質の立体構造を理解することは本メカニズムを解明する上で極めて重要な知見を与える。本稿では最近明らかとなった本タンパク質の光変換前の立体構造を報告するとともに、本タンパク質のアミノ酸置換変異体のクロロフィル結合能および光変換能についての解析結果を紹介する。

## 1. はじめに

陸上植物において、光合成に寄与するクロロフィルタンパク質は疎水性であり、葉緑体のチラコイドに局在するが、ある種の植物は光合成に寄与しない水溶性クロロフィル結合タンパク質 (Water-soluble chlorophyll-binding protein, WSCP) を保持する。

1963年に薬師寺先生らによって、シロザ葉の摩砕液から光変換型 (Class I) の WSCP が見出された事を端緒に研究が始まった<sup>1)</sup>。その後の調査から Class I WSCP はアカザ科、ヒユ科およびタデ科に属する植物種に分布していることが明らかとなった<sup>2,3)</sup>。また、カリフラワーやマメグンバイナズナといったアブラナ科植物からは非光変換型 (Class II) の WSCP が発見された<sup>4-6)</sup>。これらの WSCP の分子特性はいくつかの文献にまとめられているので<sup>3,5,7)</sup>、興味を持たれた方はそちらを参照して頂きたい。

長期に渡り Class I WSCP をコードする遺伝子は不明であったが、発見から 50 年という節目の年に、我々は本遺伝子が陸上植物に保存されている機能未知の DUF538 ファミリーに属することを報告することができた<sup>8,9)</sup>。一方、Class II WSCP は Kunitz 型のトリプシンインヒビターファミリーに属しており<sup>10-13)</sup>、両者は相同性を持たない全く別種のタンパク質である。

図 1 にシロザ由来の WSCP (CaWSCP) の吸収スペ

クトルを示す。青線は暗所で植物体より抽出・精製された光変換前の、赤線は光変換後の吸収スペクトルである。図 1 に示した様に、Class I WSCP の吸収スペクトルは光変換によって劇的に変化する。光変換前後のフォームは、長波長側の吸収ピークにちなみ、それぞれ CP668 および CP742 と呼ばれる。尚、光変換には O<sub>2</sub> またはフェリシアン化カリウムやシトクロム c (Fe<sup>3+</sup>) などが必要とされる<sup>14)</sup>。CaWSCP はクロロフィル (Chl) *a* および Chl *b* を結合するが、光変換の基質となるのは Chl *a* のみである<sup>2)</sup>。光変換された色素は Chl *a* の C7=C8 が還元されたもの、すなわちクロリン骨格がバクテリオクロリン様骨格に変換されたものであることが報告されている<sup>15,16)</sup>。CP668 は極めて安定な複合体であり、7M の尿素、5% の Triton X-100 や 10 mM の EDTA 処理に耐性を示す<sup>17)</sup>。ところが、βメルカプトエタノールおよび DTT といった還元剤存在下では光変換能が失われる<sup>18)</sup>。これは、分子内もしくは分子間で形成される SS 結合が重要であることを示唆する。また、ヨウ化カリウムも光変換を強力に阻害するが、これは CP668 のチロシン残基が化学修飾されることによると説明されていた<sup>18)</sup>。本稿では CaWSCP の CP668 の立体構造と、システインおよびチロシン残基のアミノ酸置換変異 CaWSCP のクロロフィル結合能および光変換能について報告し、これまでに考えられてきた光変換の分子メカニズムについて再考する。

<sup>§</sup>第 6 回日本光合成学会シンポジウム ポスター発表賞受賞論文

\*連絡先 E-mail: takahashi102@toyo.jp

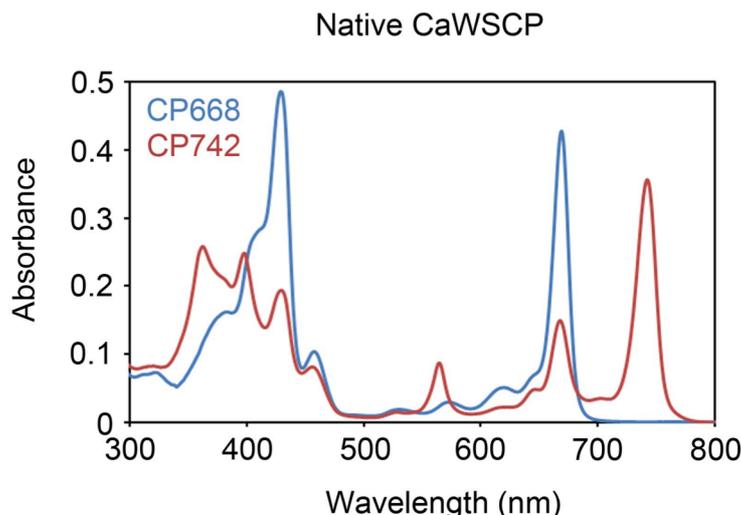


図 1. CaWSCP の吸収スペクトル図

暗所でシロザから抽出・精製を行った CaWSCP (CP668) の吸収スペクトルを青線で、光変換後の CaWSCP (CP742) の吸収スペクトルを赤線で示す。CP742 においても 668 nm に吸収ピークが残っており、これは CaWSCP に結合するすべての Chl *a* が光変換されるわけではないことを示している。

## 2. CaWSCP の立体構造

図 2 に X 線結晶構造解析によるシロザより抽出されたネイティブの CaWSCP (CP668) の立体構造を示す。CP668 はおよそ 16 kDa のサブユニットとクロロフィル 4 分子で構成されるホモテトラマーである (図 2A)。また、各サブユニットは 1 分子のクロロフィルを結合する (図 2A)。サブユニットは 13 の  $\beta$  ストランドと 1 つの  $\alpha$  ヘリックスから成り、中心にクロロフィルを結合している (図 2B)。クロロフィルのクロリン骨格は 2 つの 4 本鎖逆平行  $\beta$  シート ( $\beta$  ストランド 3、4、8、9 および 10、11、12、13) によって包み込まれており、一方、フィトール鎖は 1 つの逆平行  $\beta$  シート ( $\beta$  ストランド 1、2、5、6 および 7 で構成される) と  $\alpha$  ヘリックスにより抑え込まれている (図 2B)。

単量体の CP668 は分子内に 5 つのシステイン残基を保持するが、この内、 $\alpha$  ヘリックスを構成する Cys2 と  $\beta$  ストランド 1 の Cys30 が、また、 $\beta$  ストランド 3 の Cys48 と C 末端側のループを構成する Cys144 が SS 結合しており、Cys63 はフリーで存在する (図 2B)。クロロフィルの中心金属である  $Mg^{2+}$  とは Asn59 の側鎖の O 原子を介して配位結合する。

すでに述べたことであるが、CaWSCP は Chl *a*、Chl *b* いずれも結合することができるが、光変換の基質として利用することができるのは Chl *a* のみである<sup>8)</sup>。Chl *a* と Chl *b* の構造の違いは C7 位の官能基がメチル基であるか、もしくはホルミル基であるかのみである。興味

深いことに C7 位の官能基は CP668 に結合しているクロロフィルにあって、外部に露出している唯一の場所であり、他の分子との接触も容易である (図 2C)。

完全に光変換した後の CP742 のフォームであっても 668 nm の吸収ピークが残っていることから、一部のサブユニットでは光変換が起こらないといえる (図 1)。一定の光量下で CP668 から CP742 への光変換の変化率の経時変化を調べたところ、3 段階の異なるステップがあることを見出した<sup>19)</sup>。おそらく光変換は 3 つのサブユニットで起こり、1 つのサブユニットは光変換されないであろう。CP742 がどのような構造をしているのか、大変興味のあるところだが、現時点では全く不明である。今後の研究の進展に期待して頂ければ、と思う。

蛇足になるが Class II WSCP の構造について少しばかり説明をする。Class II WSCP もホモテトラマーであり 1 つの複合体あたり 4 分子のクロロフィルを結合するなど、CP668 との共通点もみとめられるが、各サブユニットが協調的に構築する疎水性ポケットを用いてクロロフィルを結合しており、クロロフィルの結合様式は全く異なる<sup>20)</sup>。

## 3. アミノ酸置換変異 CaWSCP の解析

先に述べたように、CP668 の光変換には SS 結合とチロシン残基が重要であると考えられてきたが、その検証を行うことは困難であった。最近、我々の研究グ

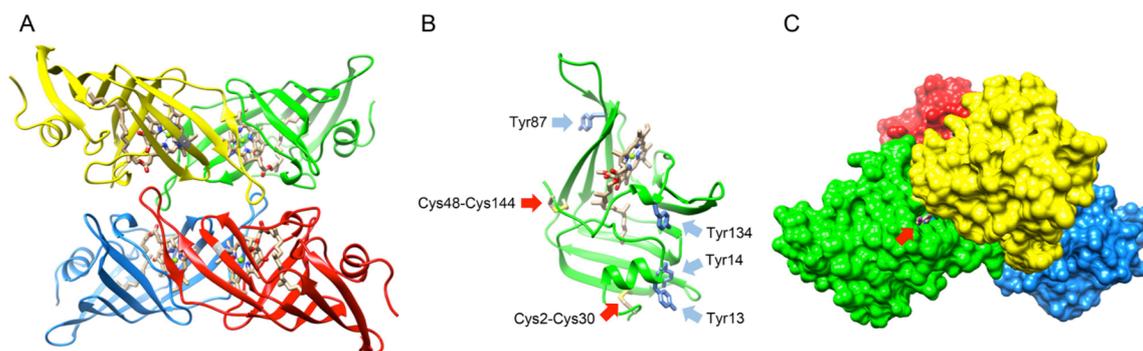


図 2. CaWSCP (CP668) の立体構造

A リボンモデルによる CP668 の立体構造図。CP668 はホモテトラマーであり、各サブユニットが 1 分子のクロロフィルを結合する。B 単量体の図。赤矢印は SS 結合 (Cys2-Cys30 および Cys48-Cys144) を示す。また、チロシン残基を青矢印で示す。C CP668 の分子表面の様子。赤矢印は外部に露出しているクロロフィルの C7 位の官能基を示す。

ループが光変換活性を有する組換え CaWSCP の発現系を構築し、クロロフィルとの再構成系も確立したことから、アミノ酸置換変異タンパク質を用い、これらの仮説を検証することが可能となった<sup>8)</sup>。5 つのシステイン残基をセリンに置換した変異体(C2S、C30S、C48S、C63S、C144S)および 4 つのチロシン残基をアラニンに置換した変異体(1~4 重変異体で計 15 種類)を作製し、そのクロロフィル結合能と光変換活性の評価を行った<sup>21,22)</sup>。結果、C2S および C30S ではクロロフィル結合能の消失が認められた(図 3A)<sup>21)</sup>。これは Cys2 と Cys30 間で形成される SS 結合が CP668 のクロロフィル結合に必須であることを明確に示している。また、Cys48 と Cys144 間で形成される SS 結合に関してはクロロフィル結合に必須ではなく、光変換にも影響しないことが明らかとなった(図 3A)。コアカザより、Class I WSCP をコードする 2 つの遺伝子 *CfWSCP1* および *CfWSCP2* をクローニングし、推定アミノ酸領域について CaWSCP との比較解析を行ったところ、*CfWSCP1* および *CfWSCP2* とともに Cys2 と Cys30 を保持していることを見出した<sup>9)</sup>。また、これらの Class I WSCP も CaWSCP 同様に DUF538 ファミリーに属するタンパク質であったが、他の DUF538 タンパク質には Cys2 と Cys30 が保存されているものではなく、また、アカザ科、タデ科、ヒユ科以外の多くの植物種に DUF538 ファミリーが分布していることから、DUF538 ファミリーが Class I WSCP なのではなく、DUF538 ファミリーの中であって、これらが Class I WSCP として独自の進化を遂げたと考えべきだろう。Cys2 および Cys30

の獲得は Class I WSCP へと進化する上で重要な出来事であったと思われる。

一方、チロシンを置換した変異体は全てクロロフィル結合能と光変換活性を保持していた(図 3B、4 重変異体である Y-13-14-87-134A のみ記載<sup>22)</sup>。また、4 重変異体、Y13-14-87-134A の光変換活性はヨウ化カリウム処理により完全に阻害された(図 3B) これらの結果はチロシン残基が光変換に関与しないことを示している。

#### 4. おわりに

本稿ではこれまで全く不明であった光変換前の Class I WSCP の構造を明らかにするとともに、光変換に関与するであろうと考えられてきたアミノ酸残基の解析結果について述べた。現時点では、光変換後の立体構造については全く不明であり、ヨウ化カリウム処理により光変換が阻害される分子メカニズムについても再考しなければならず、さらに光変換に直接関与するアミノ酸残基も定かでない。また、Class I WSCP が果たす生理機能も理解されていないなど、本タンパク質にはまだまだ多くの課題が残されている。組換えタンパク質の発現と再構成系が早くに確立した Class II WSCP は、そのシンプルな構造と、水溶性であり取り扱いも極めて容易であることと相まって、クロロフィルタンパク質における Chl-Chl 間もしくは Chl-タンパク質間の相互作用を解析するための最適なモデルとして、欧米の研究グループを中心に利用が進んでいる。Class I WSCP についても、組換え体を利用した解

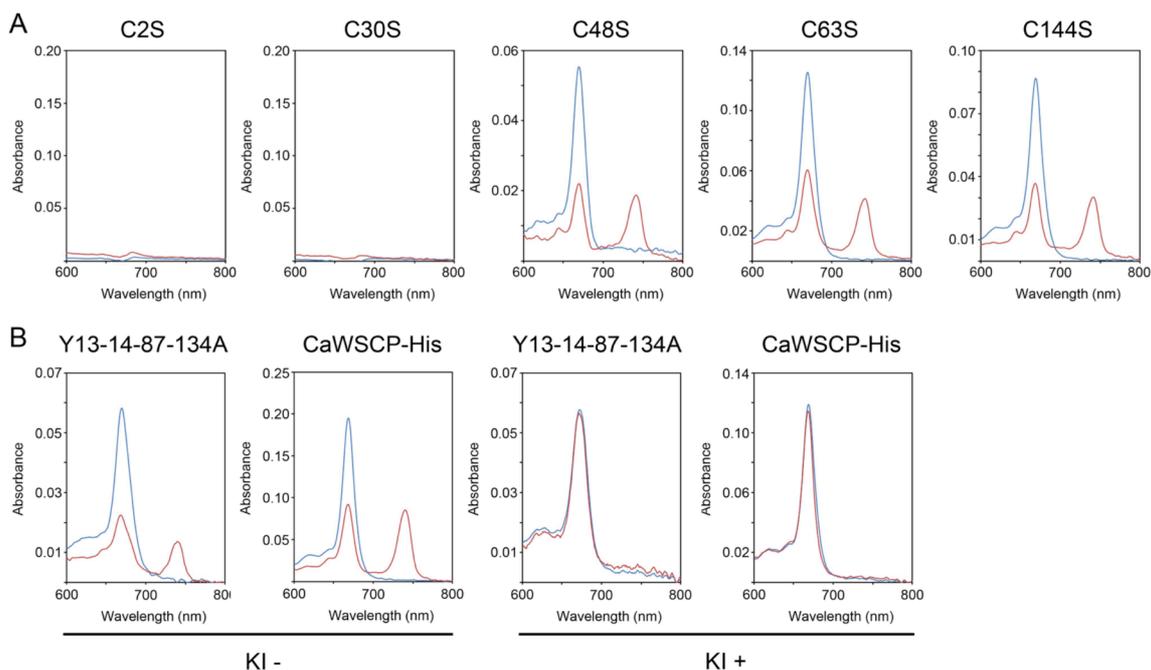


図 3. アミノ酸置換変異 CaWSCP の吸収スペクトル図

大腸菌中で発現させた各アミノ酸置換変異タンパク質をホウレンソウより調整したチラコイドと混合し、再構成した光変換前の吸収スペクトルを青線で、照射後の吸収スペクトルを赤線で示す。A システインをセリンに置換した CaWSCP 変異体の吸収スペクトル図。C2S および C30S ではクロロフィルの結合能が消失していた。B チロシンの 4 重置換変異体、Y13-14-87-134A の吸収スペクトル図。Y13-14-87-134A はコントロールの CaWSCP-His と同様に Chl 結合能と光変換能を保持し、ヨウ化カリウム (KI) により光変換が阻害された。

析を進めることが可能となったことから、新たなモデルタンパク質として利用されることを願っている。また、光変換を指標としたマーカーとしての利用等についても国内外から多数の問い合わせを頂いており、今後は本タンパク質を用いた新たなテーマにも挑戦していきたい。

### 謝辞

本稿で紹介した研究の一部は一般財団法人濱口生化学振興財団 (H25 to S.T.) の支援を受けて行われた。

Received October 31, 2015; Accepted December 3, 2015;  
Published December 31, 2015

### 参考文献

1. Yakushiji, E., Uchino, K., Sugimura, Y., Shiratori, I. and Takamiya, F. (1963) Isolation of water-soluble chlorophyll protein from the leaves of *Chenopodium album*. *Biochim. Biophys. Acta* 75, 293–298.
2. Takamiya, A. (1972) Distribution of photoconvertible water-soluble chlorophyll protein complex CP668 in plants related to *Chenopodium*

*album*. *Carnegie Inst. Washington Year Book* 71, 330–336.

3. 高宮 篤, 薬師寺 英次郎 (1976) 水溶性クロロフィルタンパク質. 別冊蛋白質核酸酵素 植物酵素・蛋白質研究法, 共立出版 76:2, 386–396.
4. Murata, T., Toda, F., Uchino, K. and Yakushiji, E. (1971) Water-soluble chlorophyll protein of *Brassica oleracea* var. *botrys* (cauliflower). *Biochim. Biophys. Acta* 245, 208–215.
5. 薬師寺 英二郎 (1970) 水溶性クロロフィル蛋白の諸性質. 植物生理 8, 73–76.
6. Murata, T. and Murata, N. (1971) Water-soluble chlorophyll-proteins from *Brassica nigra* and *Lepidium virginicum*. *Carnegie Inst. Washington Year Book* 70, 504–507.
7. Satoh, H., Uchida, A., Nakayama, K. and Okada, M. (2001) Water-soluble chlorophyll protein in Brassicaceae plants is a stress-induced chlorophyll-binding protein. *Plant Cell Physiol.* 42, 906–911.
8. Takahashi, S., Yoshikawa, M., Kamada, A., Ohtsuki, T., Uchida, A., Nakayama, K. and Satoh, H. (2013) The photoconvertible water-soluble chlorophyll-binding protein of *Chenopodium album* is a member of DUF538, a superfamily that

- distributes in Embryophyta. *J. Plant Physiol.* 170, 1549–1552.
9. Takahashi, S., Abe, E., Nakayama, K. and Satoh, H. (2015) Identification of genes encoding photoconvertible (Class I) water-soluble chlorophyll-binding proteins from *Chenopodium ficifolium*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79, 205–210.
  10. Satoh, H., Nakayama, K. and Okada, M. (1998) Molecular cloning and functional expression of a water-soluble chlorophyll protein, a putative carrier of chlorophyll molecules in cauliflower. *J. Biol. Chem.* 273, 30568–30575.
  11. Takahashi, S., Yanai, H., Nakamaru, Y., Uchida, A., Nakayama, K. and Satoh, H. (2012) Molecular cloning, characterization and analysis of the intracellular localization of a water-soluble Chl-binding protein from Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). *Plant Cell Physiol.* 53, 879–891.
  12. Takahashi, S., Ono, M., Uchida, A., Nakayama, K. and Satoh, H. (2013) Molecular cloning and expression of a water-soluble chlorophyll-binding protein from Japanese wild radish. *J. Plant Physiol.* 170, 406–412.
  13. Takahashi, S., Yanai, H., Oka-Takayama, Y., Zanma-Sohtome, A., Fujiyama, K., Uchida, A., Nakayama, K. and Satoh, H. (2013) Molecular cloning, characterization and analysis of the intracellular localization of a water-soluble chlorophyll-binding protein (WSCP) from Virginia pepperweed (*Lepidium virginicum*), a unique WSCP that preferentially binds chlorophyll *b* *in vitro*. *Planta* 238, 1065–1080.
  14. Takamiya, A., Obata, H. and Yakushiji, E. (1963) Properties of chlorophyll proteins isolated from leaves of *Chenopodium album*, in *Photosynthesis mechanism in green plants*. pp479–485, Natl Acad. Sci. Natl. research council (USA), Washington, D.C.
  15. Noguchi, T., Kamimura, Y., Inoue, Y. and Itoh, S. (1999) Photoconversion of a water-soluble chlorophyll protein from *Chenopodium album*: Resonance Raman and Fourier transform infrared study of protein and pigment structures. *Plant Cell Physiol.* 40, 305–310.
  16. Hirabayashi, H., Amakawa, M., Kamimura, Y., Shino, Y., Satoh, H., Itoh, S. and Tamiaki, H. (2006) Analysis of photooxidized pigments in water-soluble chlorophyll protein complex isolated from *Chenopodium album*. *J. Photochem. Photobiol. A* 183, 121–125.
  17. Oku, T., Yoshida, M. and Tomita, G. (1972) Heat stability of the phototransforming activity of *Chenopodium* chlorophyll protein. *Plant Cell Physiol.* 13, 183–186.
  18. Oku, T. and Tomita, G. (1975) The photoconversion of heat-treated *Chenopodium* chlorophyll protein and its pH dependence. *Plant Cell Physiol.* 16, 1009–1016.
  19. Takahashi, S., Uchida, A., Nakayama, K. and Satoh, H. (2014) Three-step photoconversion of only three subunits of the water-soluble chlorophyll-binding protein tetramer from *Chenopodium album*. *Protein J.* 33, 337–343.
  20. Horigome, D., Satoh, H., Itoh, N., Mitsunaga, K., Oonishi, I., Nakagawa, A. and Uchida, A. (2007) Structural mechanism and photoprotective function of water-soluble chlorophyll-binding protein. *J. Biol. Chem.* 282, 6525–31.
  21. Takahashi, S., Seki, Y., Uchida, A., Nakayama, K. and Satoh, H. (2014) Cysteine-2 and Cys30 are essential for chlorophyll-binding activity of the water-soluble chlorophyll-binding protein (WSCP) of *Chenopodium album*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 1825–1832.
  22. Takahashi, S., Seki, Y., Uchida, A., Nakayama, K. and Satoh, H. (2015) Are tyrosine residues involved in the photoconversion of the water-soluble chlorophyll-binding protein (WSCP) of *Chenopodium album*? *Plant Biol.* 17, 632–638.

### Structure of Water-soluble Chlorophyll-binding Protein from *Chenopodium album*

Shigekazu Takahashi<sup>1,\*</sup>, Takayuki Ohtsuki<sup>2</sup>, Akira Uchida<sup>2</sup>, Katsumi Nakayama<sup>2</sup> and Hiroyuki Satoh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Life Science, Toyo University, <sup>2</sup>Faculty of Science, Toho University

## 研究紹介

## 光合成初期過程への超分子化学からのアプローチ PDB 構造データに準拠した光合成系における励起遷移過程の計算手法の提案

<sup>1</sup>信州大学 名誉教授 <sup>2</sup>信州大学 工学部環境機能工学科

<sup>3</sup>富山大学 和漢医薬学総合研究所

<sup>4</sup>金沢工業大学 ゲノム生物学研究所

鈴木 哲<sup>1,\*</sup> 梅寄 雅人<sup>3</sup> 沢井 裕佑<sup>3</sup> 錦織 広昌<sup>2</sup> 小野 慎<sup>4</sup>

量子論に基づく電子状態計算法を適用するには初期入力構造が必要であり、通常、構造最適化計算を用いて最適化幾何構造を求め、その構造に対応した電子状態波動関数を求める方法が標準的な方法となっている。光合成系のように、反応中心複合体等の X 線結晶解析結果がタンパク質データベース (PDB) に登録され、研究者が自由にアクセスできる環境では、この構造データを利用する計算手法が見いだされれば、量子論に準拠した電子状態計算の適用領域が光合成初期過程研究へと広がることが期待される。本論文では、PDB 構造データを用いて励起状態計算を行う計算手順を提案した。著者らは PDB 構造データを用いて励起状態計算の入力データを作成する手順を構築することに成功したので、本論文でその手順の詳細を報告する。超分子系の光励起遷移に対してこの計算手順を適用し、提案した計算手順の妥当性を検証した。具体的な計算例として、*Rhodospseudomonas acidophila* の光捕集アンテナ系について、X 線結晶解析データから構築した B800 および B850 部位の計算入力データを用いて MO-S (INDO/S) 計算を行い、励起遷移にかかわる基本物理量 (遷移エネルギー、遷移確率など) を求め、超分子系における光合成初期過程の量子論的記述に寄与できることを示した。

### 1. はじめに

藤茂はその著書<sup>1)</sup>において、「光合成は緑色植物の体内では葉緑体で行われているが、植物の葉をすりつぶして葉緑体を取り出した懸垂液ではもはや正常の光合成をいとむ能力は失われてしまう。」と記している。さらに続けて、「ただし、後に CO<sub>2</sub> 固定を行う無傷の葉緑体標品を調整することに成功したので (Jensen & Bassham, 1966)、厳密にはこうはいえない」と述べている。このことは、その成分物質を抽出して分析するという化学の常套的な分析手法を機械的に葉緑体に適用することは、光合成機能を解明する研究法としては有効ではないことを示している。視点を変えて考えると、すりつぶすという操作は、葉緑体を構成する成分を取り出し、その組成を明らかにすることに役立てることはできても、光合成機能を担う

ことのできる葉緑体を取り出す操作とはなっていないことを示している。Jensen & Bassham の研究は、光合成の機能がそれを構成する分子などの成分因子が存在するだけでは出現しないこと、その機能の出現には成分因子の集合体に備えられているある秩序が必須であるということを示唆している点で、光合成研究を新しい段階に導いた画期的な発見であったということができよう。

この研究を契機に、葉緑体標品の調整法<sup>2,3)</sup>の研究は新しい階段を上り、光合成研究は光合成単位の単離へと質的な進化を遂げた。そのひとつの頂点をなす到達点は、光合成単位の X 線結晶解析の成功であった。1985年には *Rhodospseudomonas viridis* (*Blastochloris viridis*) の X 線結晶解析結果が発表され、その翌年には *Rhodobacter sphaeroides* の結果が相次いで発表され、光合成研究は、質的に新しい知見を獲得し、新しいステージに突入することとなった。

\*連絡先 E-mail: suzuki\_s@katch.ne.jp

超分子化学の概念と術語は、Jean-Marie Lehn<sup>4)</sup> によれば、種子がまかれていた初期の仕事を発展および一般化させるものとして、1978 年に導入された。Lehn は、共有結合に基礎を置いた分子化学に対比させて、分子集合体と分子間結合の化学として超分子化学を定義した。また、共有結合に基礎を置いた分子化学のかなたに分子間結合を制御する超分子化学の世界があると述べている。これらの定義を敷衍して、有賀ら<sup>5)</sup> は、「超分子化学は、複数の分子が弱い相互作用の分子間力で会合し、高秩序の分子集合体を形成する際に示す新しい機能を対象とする学問である」と定義している。

光合成研究において早い段階から注目されてきたスペシャルペアは、前述の秩序を具現した構造をもつ象徴的な実体であったということが出来る。しかしながら、X線結晶解析で明らかにされた反応中心複合体の構造を見ると、スペシャルペアばかりでなく、アクセサリクロロフィル、フェオフィチンからキノンに至るまで、反応中心複合体を構成する分子種が由来生物種に依存しない共通した特有の配列構造を有していることは瞠目に値すると考えられる。このような秩序構造をもつ反応中心複合体において制御された秩序をもつ超分子構造を認識することは、光合成における機能発現を記述する上で本質的に重要な視点だと考えられる。しかしながら、反応中心複合体をはじめとする光合成機能単位を超分子系と認識し、機能発現を超分子機能としてとらえる視点は、光合成あるいは超分子を主題とする成書には、いまだ共通認識として定着しているとは言い難い<sup>6,7)</sup>。

光合成系において、超分子構造を認識できる顕著な複合系として、整った環状構造を有する紅色光合成細菌の光捕集アンテナ系 LH1 および LH2 を挙げることができよう<sup>8)</sup>。光捕集アンテナ系が整った環状構造を構成していることの必然性を理解することができれば、換言すれば、特徴的な分子秩序の構築に伴って発現する機能と分子秩序との相関を見出すことができれば、光合成初期過程の解明にとっても重要な知見となると考えられる。

本論文は、タンパク質データベース (PDB) に登録された X線結晶解析結果を参照して超分子系と認識できる光合成機能単位について、その配列構造のもつ機能性を解明することを志向して、PDB 構造データに基

づいて超分子系の電子状態を求める計算手法を開発し、光合成初期過程における励起遷移過程の量子論的記述を可能にすることを目的としている。

## 2. 量子論に基づく光合成初期過程の記述

光合成系を構成する高秩序の分子複合体系は、典型的な量子系であることは論を俟たないであろう<sup>9)</sup>。量子論に基づいた分子軌道法 (MO 法) あるいは密度汎関数理論 (DFT) で求められた電子状態関数<sup>10)</sup>に基づいて、光合成複合体系において観測される物理量を電子状態関数から算出される期待値と比較・考察を行うことにより、光合成初期過程における励起遷移等の量子論的記述を行うことができる。

MO法あるいはDFTを用いて量子系の電子状態を求める標準的な計算手順は、系の原子配置を記述した初期入力構造データを作成し、構造最適化計算を用いて最適化幾何構造とその構造に対応した電子状態波動関数を求める手順である。上で述べたように、光合成機能複合体についてはX線結晶解析が行われ、その結果がタンパク質データベースに登録されている。したがって、初期入力構造に基づく構造最適化計算に代わって PDB 構造データを用いる計算手法を開発することができれば、特異な機能を発現する超分子系の電子状態計算も容易に実行することが可能となる。

本研究では、初期入力構造を用いる伝統的な構造最適化計算に代わりうる実体構造を反映した PDB 構造データに準拠した計算入力データを用いる計算手順を模索し、実体構造に対応した電子状態波動関数を求める方法を追究した。その結果、構造最適化計算を経由することなしに、PDB 構造データに基づいて実体構造に対応する励起エネルギーなどを求めることのできる計算手順を組み立てることに成功した。本報告では、その具体的な手順を記述し、適用例として LH2 を構成する B800 および B850 超分子系における励起遷移の計算結果を示した。

この計算手順を用いれば、周辺アンテナ系のみならず、中心アンテナ系を含む光捕集系や反応中心複合体における励起遷移についても、励起遷移エネルギー等を算出し、励起エネルギー緩和過程の考察に資することができる。この計算手順は、光合成初期過程の解明に新たな展望をもたらす可能性を秘めていると考えられる。

### 3. 超分子系の励起状態計算

PDB 構造データを用いて計算の入力データを作成する手順の探索を行った結果、以下に示す手順により励起状態計算が可能であることを見出すことができた。この方法の具体的な手順は以下のとおりにまとめることができる。なお、以下に例示する励起状態計算には、SCIGRESS MO Compact (SGMOC) にインストールされている MO-S (INDO/S) を使用している。ここでは、MO-S 計算を行うための入力データの作成手順を示した。

- 1) PDB サイトからダウンロードした識別子.ent をもつ構造データから、メモ帳その他の汎用のテキストエディターを用いて必要とする分子集合体部分の構造を切り出す。
- 2) .ent データを MOPAC の入力形式である.dat データに変換する。この変換操作には、汎用分子エディターの Winmostar<sup>11)</sup> を使用した。内部座標系としては、Cartesian あるいは Z-Matrix のいずれかの座標系を選択することができる。
- 3) 2)の操作により作成された入力データにおける原子の番号付けは、X 線結晶解析で用いられた番号付けに基づいて自動的に番号付けされる。しかしながらこの番号付けをそのまま用いたのでは、多くの場合に計算が収束しない。構造最適化計算にも適用できる番号付けに変更することが必須である。なお、内部座標として Z-Matrix を用いた場合は、結合参照関係の再設定も必須である。この過程における番号付けと結合参照関係の適否がこの計算手法を成功させる最も重要なポイントである。番号付けの変更と結合参照関係の設定にも Winmostar を使用した。
- 4) X 線結晶解析では水素原子の構造データは求められていない。水素原子の付加は、Winmostar の水素原子付加機能を用いて容易に完結することができる。
- 5) 励起状態計算を行うには、SGMOC に付属する分子エディターを用いて.mos 形式に変換する必要がある。

3)において、この計算手法の成功のポイントは原子の番号付けと結合参照関係の適切な設定にあると記したけれども、これは著者らの経験的な到達点にすぎない。残念ながら、計算が必ず収束する一般的な指針をここに示すことができないので、我々が計算に適した番号付けを見出すのに役立てた手段を紹介することとする。

原子の番号付けに先立って、超分子系を構成する分子の配列について最適化しておくことが望ましい。隣接構成分子との分子間距離ができるだけ短くなるように構成分子の配列順序を最適化しておくことが大変有効であった。次に、超分子系を構成するユニット分子内における原子の番号付けには、ユニット分子（この例では BChl *a*）の構造最適化計算の検討が有効であった。次章に示す具体例では、BChl *a* について内部座標に Z-Matrix を用いた構造最適化計算を行い、計算が適切に収束する原子の番号付けと結合参照関係をあらかじめ探し出しておき、超分子を構成するすべてのユニット分子に対しこの番号付けを適用した。このような手順に沿った原子番号付けを行うことにより、超分子系の計算が収束する入力データを作成することができた。

励起状態計算にはこれまでに数多くの方法が用いられてきたが、現在最も標準的と考えられる方法は、被占軌道から空軌道に電子 1 個を励起した一電子励起配置の配置間相互作用 (CIS) 計算であろう。原理的には、すべての一電子励起配置を考慮した配置間相互作用計算を行うべきであるが、原子数が大きくなると実行不可能となる。そのため、限定した数の励起配置についての配置間相互作用 (Limited CIS) 計算が行われる。結果の精度は考慮した励起配置の数に依存することになるので、計算資源の許す範囲で、できるだけ大きな数の励起配置を取り入れた計算を行うことが望ましい。

励起状態計算には、半経験的分子軌道法 (SEMO 法) に分類される SCIGRESS MO Compact Pro V1.0.6<sup>12)</sup> にインストールされている MO-S (INDO/S) を使用した。

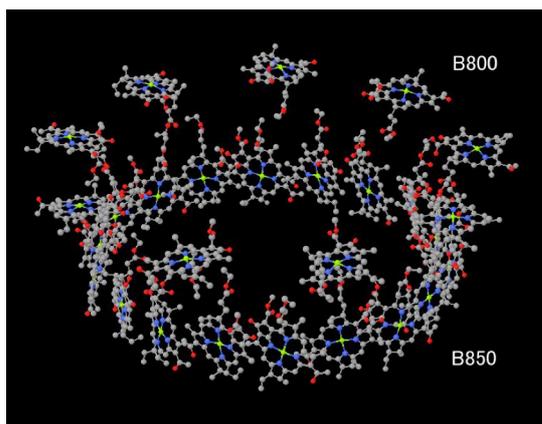


図 1. B800-850 複合系の俯瞰図

MO-S における 2 中心反発積分<sup>13)</sup> の計算には、大野、大野-Klopman、西本-又賀、西本-又賀-Weiss、DasGupta-藤永、Psriser-Parr の式が選択使用できる、RHF 近似レベルの励起状態計算では、西本-又賀の式が実験との一致がよいことから一般的に用いられてきた。

#### 4. 結果と考察

この章では 3. で示した計算手法の実行例を提示し、その有効性を考察することとする。紅色光合成細菌 *Rhodospseudomonas acidophila* (PDBID: 2fkw)<sup>14)</sup> の構造データに準拠した入力データを用いた B800 および B850 部位の励起状態計算結果を示す。

図 1 に *Rps. acidophila* の X 線結晶解析で求められた構造データから抽出した B800-850 部位の Jmol による表示結果を示した。計算入力データと対応させて、Bacteriochlorophyll *a* (BChl *a*) の phytyl 基は ethyl 基に短縮して表示している。

3. で示した手順に従って、B800 および B850 部位の計算入力データを作成する。その際に、phytyl 基を ethyl 基で置換して原子数を減少させることにより、計算負荷の軽減を図った。作成された計算入力データの SGMOC 分子エディターによる表示結果を図 2 に示した。

MO-S では、CIS 計算における一電子励起配置の項数の指定は CI(xx xx) コマンドで行うことができる。B800 および B850 について CI(64 64) と指定することにより、4096 項の励起配置を考慮した CIS 計算を行った。2 中心反発積分の計算には、計算結果と実測吸収スペクトルとの対応が良好であったことから、

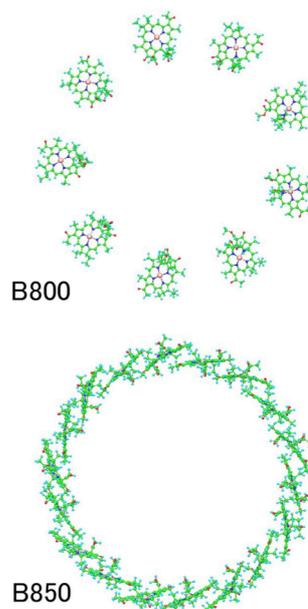


図 2. B800 および B850 に対する計算入力データ構造

DasGupta-藤永の式を用いた。上記の設定に基づいて求められた B800 および B850 の計算結果を励起遷移スペクトルとして図 3 に示した。795 nm および 875 nm 遷移を中心にして、それぞれ複数本の遷移がまとまって二つのグループの励起遷移帯を構成していることが分かる。

LH2 アンテナ系は、B800 および B850 が回転対称軸を共有する形で重畳した複合超分子系と認識することができる (図 1 参照)。この複合体を新たな超分子系と認識して励起状態計算を行うことは興味ある課題と考えられるが、著者らが使用している計算システムでは計算機資源の制約から計算を行うことができない。そのため、LH2 に対応する仮想スペクトルとして、図 3 に示した B800 および B850 の励起遷移スペクトルを重ね合わせた励起遷移スペクトルを作成し、図 3C に示した。

図 4 に *Rps. acidophila* の室温吸収スペクトルを示した (名古屋工業大学出羽研究室の測定結果)。800 nm および 850 nm 付近に、B800 および B850 を特性づける特徴的な吸収帯が観測されている。400 から 600 nm の領域には、構造をもつ吸収帯が観測されているが、本計算からは、この吸収帯の帰属にかかわる知見は得られなかった。

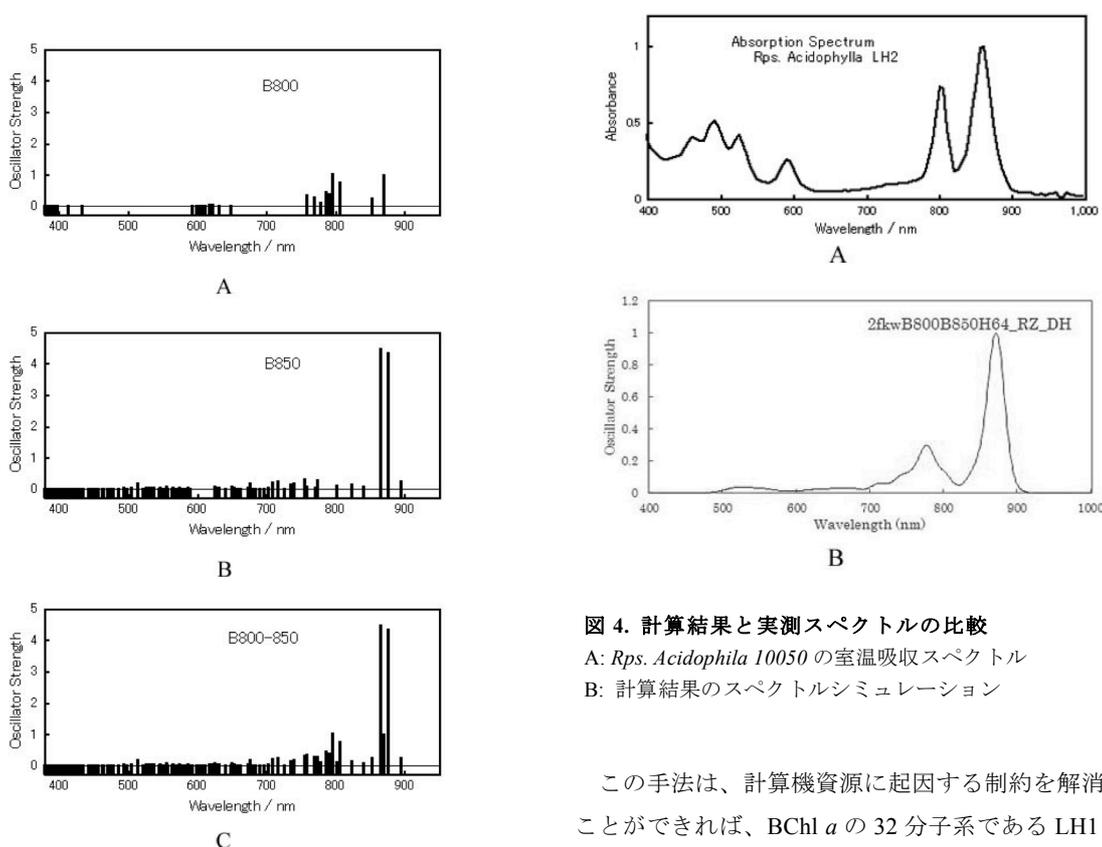


図 3. 励起遷移スペクトルの計算結果

A: B800, B: B850, C: B800 + B850 (本文参照)

図 3 に示した計算結果は、800 nm および 850 nm 吸収帯がいずれも単一の電子遷移ではなく、複数の励起遷移から構成された集合遷移帯であることを示唆している。計算で求められた遷移は、純電子遷移であるので線スペクトルで表すことになるが、実在の分子系が示す吸収帯は、振動がカップルした振電帯 (Vibronic band) で幅をもっている。直観的なスペクトル比較を容易にするために、Gauss 型の幅をもたせたスペクトルシミュレーション計算を行った。その結果は、図 4B に示した。実測スペクトルの特徴を良好に再現できていることが分かる。

MO-S 励起状態計算が収束したことは、励起エネルギー、遷移確率および励起遷移モーメントの向きが同時に求められたことを意味している。このことは、光吸収の結果として生成した光捕集アンテナ系の励起状態が量子論に基づいて記述できたことを意味している。励起状態生成に続くエネルギー緩和過程の考察は、別の論文で行うこととする。

図 4. 計算結果と実測スペクトルの比較

A: *Rps. Acidophila 10050* の室温吸収スペクトル  
B: 計算結果のスペクトルシミュレーション

この手法は、計算機資源に起因する制約を解消することができれば、BChl *a* の 32 分子系である LH1 にも適用できると考えられる。さらに、PSII および PSI 反応中心を構成する中心アンテナ系に適用することにより、中心アンテナ系の機能の解明にも役立てることが可能であると考えられる。

本論文で提案した計算手法は、その手法を適用して求められた LH2 の励起状態計算結果が光捕集アンテナ系の吸収スペクトルの特徴を再現することに成功しており、量子論的電子状態計算法の研究領域を超分子化学の光励起過程に拡張できる新しい研究手法であると結論してよいであろう。

謝辞

LH2 (*Rps. Acidophila 10050*) の室温吸収スペクトルを提供していただいた名古屋工業大学生命・物質工学科出羽毅久准教授および名古屋工業大学生命・物質工学科近藤政晴助教に深く感謝申し上げます。

Received September 15, 2015; Accepted October 13, 2015;  
Published December 31, 2015

参考文献

1. 藤茂宏 (1982) 光合成 明反応研究の流れ, p. 7,

- 東京大学出版会.
2. 加藤 栄, 宮地重遠, 村田吉男 (1981) 光合成研究法, 共立出版.
  3. 北海道大学低温科学研究所・日本光合成研究会共編 (2008) 光合成研究法, 低温科学, 第 67 卷.
  4. Lehn, J.-M., 竹内敬人訳 (1997) レーン超分子化学, 化学同人.
  5. 有賀克彦, 国武豊喜, 岡崎康治, 荻野 博 (2000) 超分子化学への展開, 岩波講座現代化学への入門 (16) 岩波書店.
  6. 阿久津秀雄, 月原富武, 島田一夫 (2006) 生命秩序を担う生体超分子, 共立出版.
  7. 菅原正, 木村栄一編 (2013) 超分子の化学, 裳華房.
  8. 住斉 (2000) 紅色光合成細菌のアンテナ系における励起エネルギー伝達の機構 電子と生命, 第 1-2 章, 共立出版.
  9. 園池公毅 (2008) 光合成とは何か, 生命システムを支える力, p. 4, 講談社.
  10. Lewars, E. (2003) Computational Chemistry, Kluwer Academic Publishers.
  11. Winmostar, <http://winmostar.com/jp>.
  12. SCIGRESS MO Compact Ver. 1.0.6 Professional, Copyright Fujitsu Limited, 1997-2011.
  13. <http://www.fujitsu.com/business-technology/tc/sol/mocompact>.
  14. 分子軌道計算プログラム MO-S version 1 ユーザーズマニュアル (1.1b 版), 5.2.3 二中心電子間反発積分  $\gamma_{BB}$ , pp. 65-67, 富士通株式会社.
  15. <http://pdbj.org/mine/summary/2fkw>.

**Supramolecular Approach to Photosynthetic Primary Processes:  
Proposition of Computing Procedures for Excitation Transitions on Photosynthetic Systems by  
Utilizing PDB Structural Data**

Satoshi Suzuki<sup>1</sup>, Masahito Umezaki<sup>3</sup>, Yusuke Sawai<sup>3</sup>, Hiromasa Nishikiori<sup>2</sup> and Shin Ono<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Professor Emeritus, <sup>2</sup>Department of Environmental Science and Technology, Faculty of Engineering, Shinshu University, <sup>3</sup>Institute of Natural Medicine, University of Toyama, <sup>4</sup>Genome Biotechnology Laboratory, Kanazawa Institute of Technology

解説特集

「光合成炭素代謝研究の新展開」

Editor: 松田 祐介 (関西学院大学 理工学部 生命科学科)

序文	松田 祐介 (関西学院大)	193
解説 気孔調節による植物の CO <sub>2</sub> コンダクタンス制御	Wang Yin 木下 俊則 (名古屋大)	194
解説 紅藻由来の葉緑体を持つ二次共生藻類の炭素代謝	辻 敬典 (関西学院大) 白岩 善博 (筑波大)	202
解説 C <sub>4</sub> 型光合成の進化過程から C <sub>4</sub> 化の鍵を探る	宗景 ゆり (関西学院大)	212

## 解説

序文<sup>‡</sup>

関西学院大学 理工学部 生命科学科  
松田 祐介<sup>1</sup>

M.D. Hutch と C.R. Slack による 1966 年の C<sub>4</sub> ジカルボン酸経路の実証は、炭酸同化の中心となるカルビン回路への基質供給を促進する CO<sub>2</sub> 濃縮機構の最初の発見であった。これ以降、ベンケイソウ代謝 (CAM) を含む様々な C<sub>4</sub> 型 CO<sub>2</sub> 濃縮代謝のバリエーションが発見され、カルビン回路に CO<sub>2</sub> を供給する機構が、乾燥や高温などの生育環境に適応するために、多様な起源から収斂進化したことを示している。一方、1978 年にカーネギー研究所の J.A. Berry のもとで、M.R. Badger と A. Kaplan が見いだした CO<sub>2</sub> 濃縮機構 (CCM) は、シアノバクテリアや微細藻類など、水圏の光合成生物が有する直接的な CO<sub>2</sub> ポンプ・蓄積機構である。この仕組みも極めて多様な起源から収斂進化したシステムであることが明らかになりつつある。これら C<sub>4</sub> 型および直接的な CO<sub>2</sub> 濃縮機構は、RubisCO 周辺の CO<sub>2</sub> 濃度を高めるだけでなく、光合成を行う細胞の無機炭素に対するコンダクタンスを高め、外界と RubisCO 間の“生理的距離”を実質的に短縮するための進化と言えるだろう。CO<sub>2</sub> 濃縮機構を持たない C<sub>3</sub> 植物の気孔開閉も、無機炭素コンダクタンス制御という括りで考えれば共通の生理的意義を内包しており、C<sub>3</sub> 植物の葉肉細胞内にも無機炭素コンダクタンスを制御する未知の因子が隠されている可能性もある。植物は、この“生理的距離”の短縮に、様々な代謝系を進化の道筋の中で他の生物や自身の代謝から“転用”しており、二次共生藻類を含めた光合成生物全体を考えると、この転用進化の柔軟性は極めて大きく、同時にこの代謝改変に大きな潜在力を示すものである。

本特集では、生理生化学的にはかなり確立した研究領域である、高等植物の C<sub>4</sub> ジカルボン酸経路と気孔開閉の問題について、C<sub>3</sub> 植物から C<sub>4</sub> 植物への進化に関わる組織発生と転写制御 (宗景ゆりさん) および気孔開閉を制御するシグナル伝達系 (Wang Yin さん)、といった新たな側面からのアプローチを解説していただいた。また、C<sub>4</sub> 有機酸代謝の柔軟な転用という問題は、二次共生藻類の分子・生化学研究の発展と共に、新たなステージを迎えている。このトピックについて、辻敬典さんに解説をいただいた。いずれも光合成周辺の炭素代謝とその制御について理解を深める一助となるものと考えている。

最後に本特集の編纂に当たって、第 5 回光合成学会でのシンポジウム開催にご尽力頂いた高橋裕一郎さんと、本誌編集委員長の西山佳孝さんに多くのご協力を頂いた。心から感謝を表する次第である。

<sup>‡</sup>解説特集「光合成炭素代謝研究の新展開」

<sup>1</sup>連絡先 E-mail: yusuke@kwansei.ac.jp

## 気孔調節による植物の CO<sub>2</sub> コンダクタンス制御<sup>†</sup>

<sup>1</sup>名古屋大学 トランスフォーマティブ生命分子研究所 <sup>2</sup>名古屋大学 高等研究院  
Wang Yin<sup>1,2,\*</sup> 木下 俊則<sup>1</sup>

植物は CO<sub>2</sub> を吸収し、光合成を行うことによって地球環境を整え、食物を提供する、人類や動物の生存に不可欠な存在である。植物の表皮に存在する気孔は、光合成を盛んに行う太陽光下で開口し、光合成に必要な CO<sub>2</sub> の取り込み、蒸散や O<sub>2</sub> の放出など、植物と大気間のガス交換を行っている。一方、乾燥ストレス下では、植物ホルモン・アブシジン酸に応答して閉鎖し、植物体からの水分損失を防ぐ。筆者らは気孔開閉メカニズムの解明を進めるとともに、これらの知見を利用し、気孔開度を調節した形質転換体の作出を進めてきた。本稿では、気孔開口の分子メカニズム及び最近の研究により明らかとなった植物の光合成や生産量に対する気孔開度の影響について紹介する。

### 1. はじめに

気孔は、植物の表皮に存在するガス交換のためのバルブである。葉表面はクチクラに覆われ、空気および水が透過しにくいので、気孔は大気と葉内部とのガス交換 (CO<sub>2</sub> の取り込み、蒸散や O<sub>2</sub> の放出) の主要な経路となっている。気孔は2つの孔辺細胞 (表皮細胞から特殊に分化した細胞) により構成され、その開き具合は、孔辺細胞の体積変動により調節される。気孔を構成する孔辺細胞には二つの形状があることが知られている。一つは図 1 (上) に示すような腎臓型の孔辺細胞、もう一つがダンベル型の孔辺細胞である (図 1 下)。腎臓型の孔辺細胞は双子葉植物 (例えばシロイヌナズナ、ソラマメなど) によく見られ、一方ダンベル型の孔辺細胞はイネ科の植物 (例えばイネ、エンバク、トウモロコシなど) によく見られる。近年シロイヌナズナを用いた気孔開閉の研究が盛んに行われ、腎臓型孔辺細胞の制御メカニズムはよく調べられてきたが、ダンベル型孔辺細胞の知見は少ない。後述する気孔の光応答性に関する光受容体や細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase などの役割は腎臓型孔辺細胞をモデルとしての成果である。これまでの多くの研究によって、光、CO<sub>2</sub> 濃度、水分状態が、気孔開度を制御する最も重要な環境要因であることがわかっている。

### 2. 光による気孔開口

#### 2.1 気孔開口に有効な光

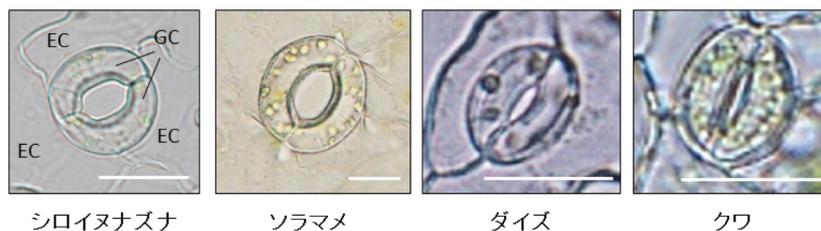
光が気孔開口を刺激する主な因子であることは百年以上前から知られていた。1898 年、F.ダーウィン (Francis Darwin) (Charles Darwin の息子であり、父親と一緒に植物の研究を行った) は初めて気孔観察研究をまとめて公表した<sup>1)</sup>。その中で、気孔の様々な環境応答を調べ、特に光による気孔開口について記載した。そのメカニズムは最近の約 40 年間で徐々に明らかになってきた。気孔開口の作用スペクトルの研究により、様々な単色光により気孔が開くことが分かってきた<sup>2)</sup>。近年は、光合成にもっとも有効な単色光、赤色光と青色光による気孔応答について研究が多く進められている。赤色光は光合成依存的に気孔開口を制御する。一つは、葉肉細胞の光合成を介して葉内 CO<sub>2</sub> 濃度 (C<sub>i</sub>) の低下を引き起こすことによる気孔開口<sup>3)</sup>; もう一つは、C<sub>i</sub> と関係しない気孔開口誘導である<sup>4,6)</sup>。どちらの場合でも光合成阻害剤 DCMU より阻害される。しかし、赤色光下の気孔開口の分子メカニズムはまだ明らかになっていない。

一方、青色光は気孔開口に対して最も顕著な効果を発揮する。青色光は光合成を駆動するのみならず、シグナルとして気孔開口を促進する。その絶妙な仕組みは近年明らかになった。簡単にまとめると、青色光は孔辺細胞に発現する青色光受容体フォトトロピンに

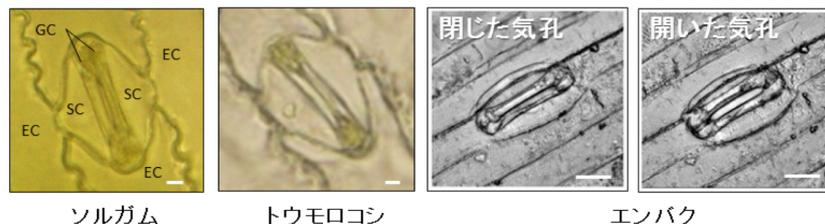
<sup>†</sup>解説特集「光合成炭素代謝研究の新展開」

\*連絡先 E-mail: wangy@bio.nagoya-u.ac.jp  
kinoshita@bio.nagoya-u.ac.jp

**腎臓型**



**ダンベル型**



**図 1. 腎臓型の気孔孔辺細胞とダンベル型の気孔孔辺細胞**

様々な植物における孔辺細胞の写真。GCは孔辺細胞、SCは副細胞、ECは表皮細胞を示す。スケールバーは20 μm。

受容され、気孔開口のキーエンザイムである細胞膜  $H^+$ -ATPase を活性化する<sup>7, 8)</sup> (図 2)。活性化された細胞膜  $H^+$ -ATPase は孔辺細胞の細胞膜の過分極を引き起こし<sup>9)</sup>、それによって細胞膜の内向き整流性  $K^+$ チャネル (細胞膜  $K^+_{in}$ チャネル) を介した  $K^+$ の取り込みが可能となる (図 2)。 $K^+$ の蓄積は孔辺細胞の膨張および気孔開口を引き起こす。以下において、青色光受容体フォトトロピンと細胞膜  $H^+$ -ATPase 及び最近明らかになった青色光シグナル伝達に関わる因子について紹介する。

**2.2 青色光受容体フォトトロピン**

フォトトロピン (phototropin) の名称は、光屈性 (phototropism) からの造語である。モデル植物シロイヌナズナには、フォトトロピン 1 (phot1) とフォトトロピン 2 (phot2) が存在する。phot1 は 1997 年のシロイヌナズナの光屈性の研究より、突然変異体 *nph1* の原因遺伝子として同定された<sup>10)</sup>。phot2 は phot1 のホモログとして報告された<sup>11)</sup>。フォトトロピンは、N 末端側に発色団 (FMN) と結合する 2 つの Light-Oxygen-Voltage (LOV) ドメインを、C 末端領域に典型的なセリン・スレオニンキナーゼドメインを持ち、青色光を受容すると自己リン酸化する<sup>12)</sup>。青色光による気孔開口には、phot1 と phot2 が重複して機能しており、フォトトロピン二重変異体 (*phot1 phot2*) では青

色光による気孔開口が全く見られない<sup>8)</sup>。また、フォトトロピンは青色光受容体として、光屈性と気孔開口に加え、葉緑体光定位運動、葉の伸展、葉や核の定位運動等においても機能する<sup>10, 13)</sup>。

**2.3 細胞膜  $H^+$ -ATPase**

気孔孔辺細胞プロトプラストを用いた生理・生化学研究により、細胞膜  $H^+$ -ATPase が青色光により活性化され、気孔開口の駆動力を形成することが示された<sup>14)</sup>。細胞膜  $H^+$ -ATPase は P 型 ATPase に属し、ATP 加水分解エネルギーを利用して  $H^+$ を細胞外へ能動輸送する酵素である。 $H^+$ -ATPase は 10 個の膜貫通領域を持ち、N 末端、C 末端と触媒ドメインが細胞質側に存在している。C 末端領域には約 110 アミノ酸からなる自己阻害ドメインを持つ。自己阻害ドメインを人為的に切断すると顕著に活性が上昇することから、通常は触媒ドメインに対し阻害的な作用をもつと考えられている<sup>15, 16)</sup>。青色光による  $H^+$ -ATPase の活性化には、自己阻害ドメインの C 末端から 2 番目のスレオニンのリン酸化が必須であると考えられている<sup>14)</sup>。リン酸化された自己阻害ドメインには、14-3-3 タンパク質が特異的に結合し、 $H^+$ -ATPase が活性化される<sup>17)</sup>。近年の研究により、C 末端スレオニンのリン酸化を介した  $H^+$ -ATPase の活性化は、孔辺細胞のみならず、植物細胞に共通した生理的な活性化機構であることが示さ

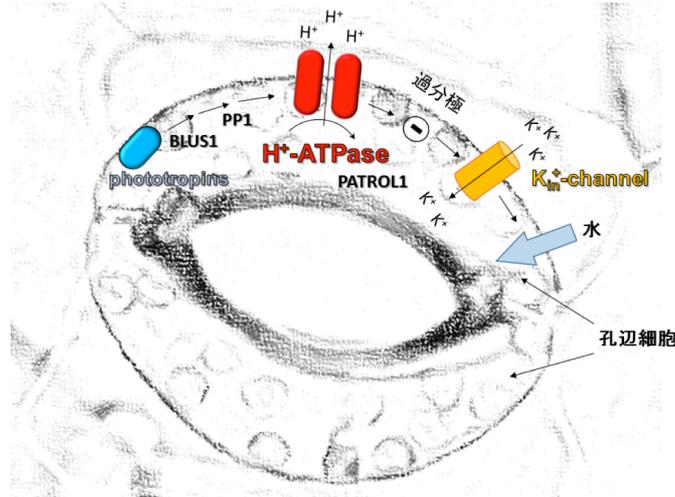


図 2. 青色光による気孔開口の分子メカニズムモデル

太陽光に含まれる青色光は、フォトトロピン (phototropin) に受容され、細胞内シグナル伝達を経て、細胞膜プロトンポンプ ( $H^+$ -ATPase) を活性化する。青色光により活性化されたプロトンポンプは膜電位の過分極を誘導し、電位依存性のカリウムチャネル ( $K^+$ -channel) を介して、カリウムの取り込みが引き起こされる。細胞内に大量に取り込まれたカリウムは、浸透圧を上昇させ、水が取り込まれ、孔辺細胞の体積が増加することで気孔が開く。BLUS1 : blue light-signaling 1 ; PP1 : タイプ 1 プロテインホスファターゼ ; PATROL1 : proton ATPase translocation control 1

れている<sup>18,19)</sup>。フォトトロピンの二重変異体の孔辺細胞では青色光による細胞膜  $H^+$ -ATPase の活性化が見られず、 $H^+$ -ATPase はフォトトロピンの下流で働くことが分かった。

シロイヌナズナでは細胞膜  $H^+$ -ATPase をコードする遺伝子は 11 個 (*AHA1*—*AHA11*) あり、これらのアイソフォームの一次構造に特別な違いは見られない<sup>15)</sup>。孔辺細胞では 11 個すべてのアイソフォームが発現しており、孔辺細胞において細胞膜  $H^+$ -ATPase が重要な役割を果たしていることを示めている<sup>20)</sup>。

## 2.4 青色光シグナル伝達に関わる因子

青色光受容体フォトトロピンから細胞膜  $H^+$ -ATPase の活性化に至る青色光シグナル伝達に関わる孔辺細胞の因子については、これまでにセリン/スレオニン・タイプ 1 プロテインホスファターゼ (PP1) の関与が示唆されている<sup>21,22)</sup>。さらに、青色光による気孔開口が損なわれた突然変異体 *blus1* の解析により、フォトトロピンと PP1 の間で働くセリン/スレオニン・プロテインキナーゼ BLUS1 が同定された<sup>23)</sup> (図 2)。BLUS1 は青色光に依存してフォトトロピンによりリン酸化されること、さらに、そのリン酸化が青色光による気孔開口に必要であることから、孔辺細胞の青色光シグナル伝達に必須のシグナル因子と考えられる。また、

細胞膜  $H^+$ -ATPase の局在を制御する PATROL1 も光による気孔開口に重要な役割を果たすことが最近報告された<sup>24)</sup>。しかし、フォトトロピンから細胞膜  $H^+$ -ATPase 活性化に至るシグナル伝達の全体像は未だ明らかになっておらず、今後の重要な課題である。

## 3. 気孔開口促進による光合成と生産量の増加

### 3.1 気孔開口が促進された形質転換体の作出

光合成に必要な  $CO_2$  は、大気から葉内へ拡散によって供給されている。植物が  $CO_2$  を取り込む過程において、境界層抵抗、気孔抵抗、細胞間隙抵抗などのいくつかの抵抗が存在することが知られている。これらの抵抗の中で、気孔抵抗は変化が大きく、 $CO_2$  取り込みの主要な制限と考えられる。気孔抵抗が植物による  $CO_2$  取り込みの主要な制限要因と考えられるにもかかわらず、光合成および植物成長の増加を目標として気孔開口 (気孔コンダクタンス) を増大させる試みは、これまでに殆どなされていなかった。近年の研究により、青色光による気孔開口には、青色光受容体フォトトロピン、細胞膜  $H^+$ -ATPase および細胞膜  $K^+$  チャネルが主要な因子として関与することが明らかとなっている (図 2)。そこで、光による気孔開口が促進された形質転換植物を作出するため、モデル植物シロイ

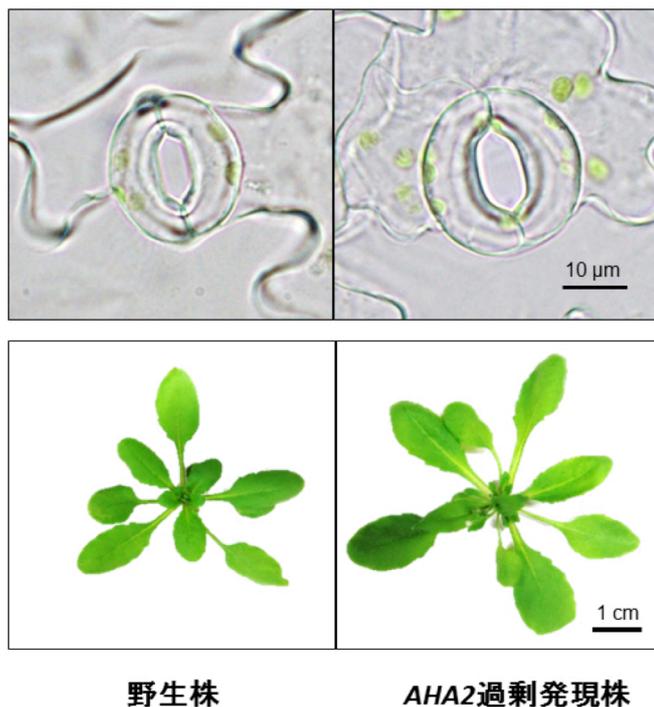


図3. 野生株と *AHA2* 過剰発現株の気孔開度と植物体の表現型の比較

*AHA2* 過剰発現株は、光照射後、野生株より常に大きな気孔開度を示す（上）。*AHA2* 過剰発現株は、野生株と比べて大きく生育する（下）。

ヌナズナを用いて、気孔開口の3つの主要因子：青色光受容体フォトトロピンのアイソフォームである *PHOT2*<sup>8)</sup>、細胞膜  $H^+$ -ATPase の代表的なアイソフォームである *AHA2*<sup>14)</sup>、ならびに細胞膜  $K^+$ <sub>in</sub> チャネルのアイソフォームである *KATI* および *AKTI*<sup>25-29)</sup> を孔辺細胞で高発現させることを試みた<sup>30)</sup>。これらのタンパク質の孔辺細胞特異的な過剰発現には、強力な孔辺細胞プロモーターとして知られる *GCI* (Guard Cell 1)<sup>31,32)</sup> を使用した。

細胞膜  $H^+$ -ATPase 過剰発現体 *GCI::AHA2* (*AHA2* 過剰発現株) の孔辺細胞における *AHA2* 転写量は、野生株の *AHA2* 転写量より約 3.5 倍以上高く、*AHA2* タンパク質レベルは、野生株の孔辺細胞における *AHA2* より約 1.5 倍高かった<sup>30)</sup>。これら *AHA2* 過剰発現株における気孔開口の光応答性を調べたところ、*AHA2* 過剰発現株では、2.5 時間の光照射後、野生株より約 25% 大きい気孔開度を示した (図3)。一方、これらの気孔は暗黒下では野生株と同様に閉じていた。興味深いことに、*AHA2* 過剰発現株の気孔は、30 分間の光照射下で野生株の気孔よりも迅速に開口することが明らかとなり、孔辺細胞の  $H^+$ -ATPase 量を増やすことにより、気孔開度が大きくなるだけでなく、気孔開口の速度が早まることが示された<sup>30)</sup>。また、*AHA2* 過剰発現株の気孔密度、気孔インデックスおよび気孔の大きさは、

野生株のそれらと同程度であり、孔辺細胞における *AHA2* の過剰発現は、気孔の分化や形態には影響を与えないことが示された。

対照的に、フォトトロピン過剰発現体 *GCI::PHOT2*、細胞膜  $K^+$ <sub>in</sub> チャネルの過剰発現体 *GCI::AKTI* および *GCI::KATI* では、導入遺伝子が孔辺細胞内で野生株と比較して顕著に増加していたにもかかわらず、気孔開口に影響を与えなかった。これらの結果は、細胞膜  $H^+$ -ATPase が光による気孔開口の制限因子であること、また孔辺細胞における  $H^+$ -ATPase の量の増加により気孔開口の大きさと速度の両方が増大することを示している。

### 3.2 気孔開口が促進された形質転換体の光合成活性

*AHA2* 過剰発現株の無傷葉における気孔コンダクタンスおよび光合成速度 ( $CO_2$  同化速度) について、ガス交換システム (LI-COR, LI-6400) を用いた詳細な解析を行った。その結果、*AHA2* 過剰発現株における気孔コンダクタンスと光合成速度は、比較的高い光強度 ( $200 \mu mol m^{-2} s^{-1}$  以上) で野生株より有意に高まっていた。光合成飽和光に近い強い光で照射した場合、*AHA2* 過剰発現株における気孔コンダクタンスは野生型植物より約 56~63% 高かった<sup>30)</sup>。これと同様に、

*AHA2* 過剰発現株における光合成速度は野生株における光合成の速度より約 14~16%高かった<sup>30)</sup>。さらに、*AHA2* 過剰発現株の高い光合成速度がその大きな気孔開口に起因するかどうかを判定するために、光合成速度と葉内 CO<sub>2</sub> 濃度との応答曲線 (A-Ci カーブ) が調べられた。その結果、野生株と *AHA2* 過剰発現株の曲線はほぼ一致しており、両植物間で光合成能力には差が無いことが示された<sup>30)</sup>。以上の結果は、*AHA2* 過剰発現株において、増大した気孔開口が光合成速度増加に寄与しているということを明確に示している。

*AHA2* 過剰発現株の気孔は高い光強度において大きく開くので、葉内 CO<sub>2</sub> 濃度は野生型植物と比べて増加が見られた。しかし、より多く取り込まれた CO<sub>2</sub> は光合成装置の制限によって固定できないため、*AHA2* 過剰発現株の水利効用率 (光合成速度と蒸散速度との比) は野生株と比べ約 14%低下していた。今後、光合成能を改善するような遺伝子を同時に導入することにより、さらなる光合成速度の促進が期待される。

### 3.3 気孔開口が促進された形質転換体における生産量

次に、*AHA2* 過剰発現株の生産量について調べた。植物を 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の光強度下で 25 日間生育させた場合、*AHA2* 過剰発現株は、野生株よりもロゼット葉の数が増加し、その生重量および乾燥重量は約 42~63%大きくなることが明らかとなった (図 3)<sup>30)</sup>。さらに、播種後 45 日目の *AHA2* 過剰発現株における種子、莢および花を含む全花茎の乾燥重量は、同じ生育条件下では野生株の全花茎の乾燥重量より約 36~41%大きかった<sup>30)</sup>。また、*AHA2* 形質転換植物における種子を含む莢 1 個の乾燥重量は野生株と同程度であるが、1 個体 (1 株) あたりの莢の数は野生株の 2 倍になった。

このような *AHA2* 過剰発現株の生産量の増加が、*AHA2* 形質転換植物のより開いた気孔開度に依存していることを示すために、植物体における炭素同位体比を調べた。CO<sub>2</sub> 固定を担うルビスコは、通常、<sup>13</sup>CO<sub>2</sub> よりも <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> を優先的に利用するが、葉内 CO<sub>2</sub> 濃度が低下し、<sup>12</sup>CO<sub>2</sub> が減少すると <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> も利用する。よって、植物体の炭素同位体比を調べ、*AHA2* 過剰発現株における <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> の割合が野生株よりも低いようであれば、気孔が大きく開くことにより葉内 CO<sub>2</sub> 濃度が低下あま

り起きていないことが考えられる。解析の結果、予想通り、*AHA2* 過剰発現株の <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> の割合は野生株よりも低く<sup>30)</sup>、気孔が大きく開くことにより大気から CO<sub>2</sub> を多く取り込んで光合成を行っていると考えられた。実際、マイルドな乾燥ストレス下で栽培した植物体の炭素同位体比を調べたところ、*AHA2* 過剰発現株と野生株の間で気孔開度に差が見られないため、炭素同位体比に有意な差は認められなかった。これらの結果は、*AHA2* 過剰発現株に見られる生産量の増加が気孔開度のみ依存していることをより強く示唆するものである。

ところで、*AHA2* 過剰発現株における光合成速度は、比較的高い光強度 (200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  以上) で有意に高いことが示されていたため、次に、有意な光合成活性差が見られない比較的低い光強度 (80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) での生産量を調べた。その結果、比較的低い光強度では、両植物において有意な生産量の差は観察されなかった。この結果は、植物が光合成を盛んに行っている比較的高い光強度 (200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  以上) の時に初めて、気孔開度が光合成や生産量の制限要因となることを示している。比較的低い光強度 (80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) では、気孔コンダクタンスではなく、光合成電子伝達速度が光合成や生産量の制限要因となっていると考えられる。以上の結果より、孔辺細胞の細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase 量を人為的に増加させることは、気孔開口促進のみならず、植物の光合成や生産量促進に非常に有用な方法であると考えられる<sup>30)</sup>。

近年、恒常的に気孔が開いたイネの突然変異体 *slac1* (アブシジン酸非感受性気孔開口変異体) の光合成活性が野生株植物と比べ、高いことが示された<sup>33)</sup>。しかし、*slac1* 変異体の生産量は、野生株と有意な差は見られなかった。これと一致して、細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase の第一膜貫通領域内の 68 番目のプロリンをセリンに置換することにより恒常的高活性型に変換した H<sup>+</sup>-ATPase<sup>34)</sup> を GC1 プロモーターにより人為的に孔辺細胞で増加させた形質転換植物 (GC1::*AHA2-P68S*) では、恒常的に気孔が開いた表現型を示すにも関わらず、生産量については野生株と有意な差は見られなかった。一つの要因は、恒常的な気孔開口による乾燥ストレスが考えられるが、これらの結果は、十分に水分を与えている状況においても観察されることから、恒常的な気孔開口による夜間の水分損失が植物のバイオ

マスの蓄積において不利である可能性も考えられる。なぜ夜間の水分損失が増加すると植物生産量が低下するのか、その分子機構の解明が待たれる。

### 3.4 気孔開口が促進された形質転換体の乾燥応答

さらに、*AHA2* 過剰発現株の乾燥ストレスに対する応答能についても調べた。*AHA2* 過剰発現株における光による気孔開口は、乾燥ストレスに応答して植物内で産出され、気孔を閉鎖する作用を持つ植物ホルモン・アブシジン酸により、野生株と同程度に阻害された。これと一致して、*AHA2* 過剰発現株から切り取ったロゼット葉の重量減少もまた、野生型における重量減少と類似していた。また、*AHA2* 過剰発現株を2週間通常条件で生育後、土壌の水分含量を通常の80%前後から40-50%に低下させるおだやかな乾燥ストレスに曝した場合でも、野生株と同様な気孔開度と生育抑制が観察されたが、野生株よりも枯れやすい傾向は見られなかった<sup>30)</sup>。また、2週間目以降、水を全く与えない強度の乾燥ストレス下においても、*AHA2* 過剰発現株は野生株と同様な時間変化で枯死することが示された。これらの結果は、*AHA2* 過剰発現株の乾燥ストレスに対する感受性が野生株とほぼ同様であることを示唆している。

### 4. おわりに

本稿では、気孔の光応答のメカニズムとこれまでの知見を利用した気孔開度制御の最新結果を紹介した。モデル植物シロイヌナズナを用いた気孔開度制御の研究により、気孔開口において重要な因子である青色光受容体フォトトロピン、細胞膜 $H^+$ -ATPase、細胞膜 $K^+$ チャネルのうち、細胞膜 $H^+$ -ATPaseを孔辺細胞内に人為的に増加させることが気孔開口促進に有効であり、気孔開口は光合成と成長の制限要因であることが明らかとなってきた。気孔開口のメカニズムは植物を通じて共通であると考えられることから、シロイヌナズナで得られたこの技術は他の植物、特に農作物やバイオ燃料植物などの実用植物にも適用可能であると考えられ、今後、農作物やバイオ燃料用植物の生産量増加への貢献が期待される。

Received October 31, 2015; Accepted November 19, 2015;

Published December 31, 2015

### 参考文献

1. Darwin, F. (1898) Observations on stomata. *Phil. Trans. R. Soc. B* 190, 531–621.
2. Sharkey, T.D. and Raschke, K. (1981) Effect of light quality on stomatal opening in leaves of *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiol.* 68, 1170–1174.
3. Roelfsema, M.R.G., Hanstein, S., Fell, H.H. and Hedrich, R. (2002)  $CO_2$  provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *Plant J.* 32, 65–75.
4. Messinger, S.M., Buckley, T.N. and Mott, K.A. (2006) Evidence for involvement of photosynthetic processes in the stomatal response to  $CO_2$ . *Plant Physiol.* 140, 771–778.
5. Lawson, T., Lefebvre, S., Baker, N.R., Morison, J.I.L. and Raines, C. (2008) Reductions in mesophyll and guard cell photosynthesis impact on the control of stomatal responses to light and  $CO_2$ . *J. Exp. Bot.* 59, 3609–3619.
6. Wang, Y., Noguchi, K. and Terashima, I. (2011) Photosynthesis-dependent and -independent responses of stomata to blue, red and green monochromatic light: Differences between the normally oriented and inverted leaves of sunflower. *Plant Cell Physiol.* 52, 479–489.
7. Shimazaki, K., Doi, M., Assmann, S.M. and Kinoshita, T. (2007) Light regulation of stomatal movements. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 219–247.
8. Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M. and Shimazaki, K. (2001) Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414, 656–660.
9. Shimazaki, K., Iino, M. and Zeiger, E. (1986) Blue light-dependent proton extrusion by guard-cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* 319, 324–326.
10. Huala, E., Oeller, P.W., Liscum, E., Han, I.S., Larsen, E. and Briggs, W. R. (1997) Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 278, 2120–2123.
11. Jarillo, J., Ahmad, M. and Cashmore, A.R. (1998) NPL1: a second member of the NPH serine/threonine kinase family of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 117, 719.
12. Inoue, S.I., Kinoshita, T., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Doi, M. and Shimazaki, K.I. (2008) Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U.S.A.* 105, 5626–5631.
13. Christie, J.M. (2007) Phototropin blue-light receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 21–45.
  14. Kinoshita, T. and Shimazaki, K. (1999) Blue light activates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *EMBO J.* 18, 5548–5558.
  15. Palmgren, M.G. (2001) Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: power houses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 817–45.
  16. Palmgren, M.G., Larsson, C. and Sommarin, M. (1990) Proteolytic activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by removal of a terminal segment. *J. Biol. Chem.* 265, 13423–13426.
  17. Kinoshita, T. and Shimazaki, K. (2002) Biochemical evidence for the requirement of 14-3-3 protein binding in activation of the guard-cell plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by blue light. *Plant Cell Physiol.* 43, 1359–1365.
  18. Kinoshita, T. and Hayashi, Y. (2011) New insights into the regulation of stomatal opening by blue light and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 289, 89–115.
  19. Wang, Y., Shimazaki, K. and Kinoshita, T. (2014) Multiple Roles of the Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase and Its Regulation. *The Enzymes* 35, 191–211.
  20. Ueno, K., Kinoshita, T., Inoue, S., Emi, T. and Shimazaki, K. (2005) Biochemical characterization of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activation in guard cell protoplasts of *Arabidopsis thaliana* in response to blue light. *Plant Cell Physiol.* 46, 955–963.
  21. Kinoshita, T. and Shimazaki, K.I. (1997) Involvement of calyculin A-and okadaic acid-sensitive protein phosphatase in the blue light response of stomatal guard cells. *Plant Cell Physiol.* 38, 1281–1285.
  22. Takemiya, A., Kinoshita, T., Asanuma, M. and Shimazaki, K.I. (2006) Protein phosphatase 1 positively regulates stomatal opening in response to blue light in *Vicia faba*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 13549–13554.
  23. Takemiya, A., Sugiyama, N., Fujimoto, H., Tsutsumi, T., Yamauchi, S., Hiyama, A., Tada, Y., Christie, J. and Shimazaki, K.I. (2013) Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening. *Nat. Commun.* 4, 2094.
  24. Hashimoto-Sugimoto, M., Higaki, T., Yaeno, T., Nagami, A., Irie, M., Fujimi, M., Miyamoto, M., Akita, K., Negi, J., Shirasu, K., Hasezawa, H. and Iba, K. (2013) A Munc13-like protein in *Arabidopsis* mediates H<sup>+</sup>-ATPase translocation that is essential for stomatal responses. *Nat. Commun.* 4, 2215.
  25. Kwak, J.M., Murata, Y., Baizabal-Aguirre, V.M., Merrill, J., Wang, M., Kemper, A., Hawke, S., Tallman, G. and Schroeder, J.I. (2001) negative guard cell K<sup>+</sup> channel mutants reduce inward-rectifying K<sup>+</sup> currents and light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127, 473–485.
  26. Szyroki, A., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R., Ache, P., Reintanz, B., Deeken, R., Godde, M., Felle, H., Steinmeyer, R., Palme, K. and Hedrich, R. (2001) KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 2917–2921.
  27. Anderson, J.A., Huprikar, S.S., Kochian, L.V., Lucas, W.J. and Gaber, R.F. (1992) Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 3736–3740.
  28. Schachtman, D.P., Schroeder, J.I., Lucas, W.J., Anderson, J.A. and Gaber, R.F. (1992) Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis* KAT1 cDNA. *Science* 258, 1654–1658.
  29. Sentenac, H. and Bonneaud, N. (1992) Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* 256, 663–665.
  30. Wang, Y., Noguchi, K., Ono, N., Inoue, S., Terashima, I. and Kinoshita, T. (2014) Overexpression of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 533–538.
  31. Kinoshita, T., Ono, N., Hayashi, Y., Morimoto, S., Nakamura, S., Soda, M., Kato, Y., Ohnishi, M., Nakano, T., Inoue, S.I. and Shimazaki, K.I. (2011) FLOWERING LOCUS T regulates stomatal opening. *Curr. Biol.* 21, 1232–1238.
  32. Yang, Y., Costa, A., Leonhardt, N., Siegel, R.S. and Schroeder, J.I. (2008) Isolation of a strong *Arabidopsis* guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Methods* 4, 6.
  33. Kusumi, K., Hirotsuka, S., Kumamaru, T. and Iba, K. (2012) Increased leaf photosynthesis caused by elevated stomatal conductance in a rice mutant deficient in SLAC1, a guard cell anion channel protein. *J. Exp. Bot.* 63, 5635–5644.
  34. Merlot, S., Leonhardt, N., Fenzi, F., Valon, C., Costa, M., Piette, L., Vavasseur, A., Genty, B., Boivin, K., Müller, A., Giraudat, J. and Leung, J. (2007)

Constitutive activation of a plasma membrane  $H^+$ -ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *EMBO J.* 26, 3216–3226.

## Stomatal Regulation on $CO_2$ Uptake

Yin Wang<sup>1,2,\*</sup> and Toshinori Kinoshita<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Transformative Bio-Molecules (ITbM), Nagoya University, <sup>2</sup>Institute for Advanced Research, Nagoya University

紅藻由来の葉緑体を持つ二次共生藻類の炭素代謝<sup>†</sup><sup>1</sup> 関西学院大学 理工学部生命科学科<sup>2</sup> 筑波大学 生命環境系辻 敬典<sup>1,\*</sup> 白岩 善博<sup>2</sup>

紅藻の二次共生により葉緑体を獲得したハプト藻や珪藻は、葉緑体が四枚の包膜に包まれている点や、貯蔵多糖として $\beta$ -グルカンを蓄積する点など、緑色植物とは異なる構造的および代謝的特徴を持つことが知られていた。近年の研究の進展により、これらの二次共生藻類では、葉緑体内での生合成系に必要な炭素化合物を直接カルビン・ベンソン回路から供給している点や、 $C_4$  有機酸を合成する酵素が複数の異なるオルガネラに局在する点など、貯蔵多糖以外にも緑色植物とは異なる点が多々あることが示されつつある。本稿では、近年の研究から提案されている二次共生藻の炭素代謝の特徴について、緑色植物の炭素代謝と比較しつつ紹介する。

## 1. 共生による葉緑体の獲得と真核光合成生物の多様化

真核光合成生物は、共生により葉緑体を獲得した多系統の生物群である。最初に、ある種の従属真核生物が、シアノバクテリアを取り込むことで葉緑体を獲得した (図 1)。シアノバクテリアの細胞内共生による葉緑体の獲得は「一次共生」と呼ばれ、一次共生により葉緑体を獲得した真核光合成物は、緑藻・紅藻・灰色藻の3つのグループに分岐した<sup>1)</sup>。これらの藻類 (および緑藻から派生した維管束植物) は単系統であり、一次植物あるいはアーケプラスチダ (Archaeplastida) と呼ばれる (図 1)。その後、さらに緑藻や紅藻などのアーケプラスチダが、他の従属真核生物に取り込まれる二次共生により、多様な真核生物が光合成の能力 (= 葉緑体) を獲得するに至った<sup>1)</sup> (図 1)。二次共生イベントは、進化過程において複数回起こり、異なる系統に属する多様な真核生物が葉緑体を獲得したため、真核光合成生物の多様化を進めた原動力であると言える。ただし、二次共生藻類の進化プロセスは複雑であり、二次共生がどのタイミングで何回起こったかははっきりしない。ハプト藻類や不等毛藻類 (珪藻、褐藻など) は、紅藻由来の葉緑体を持つことは確実であ

るが、その進化の道筋については不明な点が多く、さまざまな説が提唱されている。例えば、珪藻の核ゲノムには、紅藻由来の遺伝子を上回る数の緑藻由来遺伝子がコードされていることから、紅藻の葉緑体を獲得する前に緑藻由来の葉緑体を持っていた可能性が指摘されている<sup>2)</sup>。これに対する反論として、比較解析に使われた緑色植物の遺伝子数が約 20 万個であるのに対し、紅藻の遺伝子はわずか 1 万個程度であったため、必然的に緑藻由来の遺伝子が多く検出されたのではないかという指摘もなされている<sup>3,4)</sup>。今後は、多様な真核生物のゲノム情報に基づいて、二次共生藻類の系統関係が明らかになることが期待される。

細胞内共生が成立する過程では、共生体 (取り込まれた側) のゲノムの多くが宿主 (取り込んだ側) の核ゲノムに統合され、葉緑体包膜上の代謝産物輸送システムが確立されることにより共生体と宿主の代謝が統合される。二次共生は、細胞内共生イベントを二回経ているため、一次共生により葉緑体を獲得した緑色植物と比較すると、細胞構造や代謝に大きな違いがある。この総説では、近年の研究から明らかになりつつある、紅藻由来の葉緑体を持つ二次共生藻の炭素代謝について、緑色植物の代謝と比較しつつ紹介する。

<sup>†</sup>解説特集「光合成炭素代謝研究の新展開」

\*連絡先 E-mail: tsuji.yoshinori.fu@kwansei.ac.jp

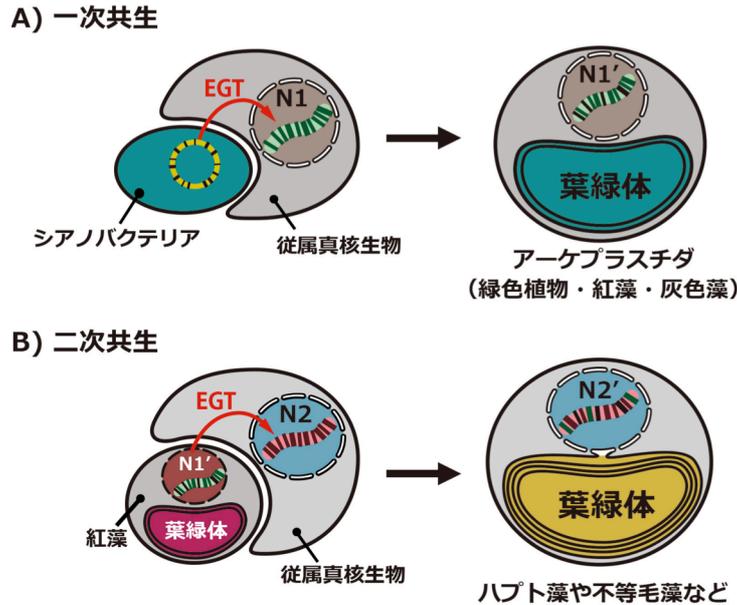


図 1. 一次共生 (A) および二次共生 (B) にもなる細胞構造およびゲノム構造の変化

一次共生では、ある種の従属真核生物がシアノバクテリアを取り込むことで葉緑体を獲得し、その後緑藻、紅藻、灰色藻の3つの系統に分岐した。これらの真核光合成生物は単系統であり、アーケプラスチダ (Archaeplastida) と呼ばれる。一次共生が成立する過程では、シアノバクテリアの染色体にコードされた遺伝子の大部分が、宿主真核生物の核 (N1) へと転移し、アーケプラスチダの核 (N1') に統合された。このような、共生に伴う共生体から宿主への遺伝子転移は、endosymbiotic gene transfer (EGT) と呼ばれる。ハプト藻や不等毛藻は、紅藻の二次共生により葉緑体を獲得した。二次共生においても、EGT によって共生体の核コード遺伝子は、宿主の核 (N2) へと転移し、最終的に二次共生藻の核 (N2') へと統合された。なお、紅藻の二次共生が進化上何回起こったかは不明であり、ハプト藻と不等毛藻が独立して別々に葉緑体を獲得したのか、あるいは葉緑体獲得後に両者が分岐したのかははっきりしていない。二次共生を経た結果、ハプト藻および不等毛藻の葉緑体は4枚の包膜に囲まれており、最外膜は核膜と融合したER膜からなる。

## 2. 維管束植物の炭素代謝のモデル

光合成炭素代謝の研究が最も進んでいるのは、アーケプラスチダの中の緑色植物に属する維管束植物（特にハウレンソウやシロイヌナズナなど）である。そこで、二次共生藻の代謝のモデルを紹介する前に、比較のために維管束植物の代謝について概説する。維管束植物は、二重の包膜に包まれた葉緑体を持ち、光合成時には様々な代謝産物が輸送体を介して葉緑体の内外へと輸送されている。葉緑体の外包膜には、ポリリン様タンパク質が存在し、30 kDa 程度までの大きさの分子であれば非選択的に透過することができる<sup>5)</sup>。一方、内包膜にはポリリン様タンパク質は存在せず、代謝産物は特定の輸送体を介して選択的に輸送される。

維管束植物の葉緑体では、内包膜に局在する色素体リン酸トランスロケーター (plastidic phosphate translocator, pPT) ファミリーが、葉緑体内外へのリン酸化化合物の輸送を担っている<sup>6,7)</sup>。pPT ファミリーの代表的なものとして、トリオースリン酸/Pi トランスロケーター (triose-P/Pi translocator, TPT) とホスホエノー

ルピルビン酸 (phosphoenolpyruvate, PEP) を輸送する PEP/Pi translocator (PPT)がある (図2)。TPT は同化産物であるトリオースリン酸 (ジヒドロキシアセトンリン酸およびグリセルアルデヒド3リン酸) の一部を葉緑体から細胞質へと輸送する<sup>6)</sup> (図2)。PPT は細胞質で合成された PEP を葉緑体に取り込む機能を有し、芳香族アミノ酸合成や脂肪酸合成の原材料として供給する (図2)。PEP は葉緑体内での様々な化合物の生合成に必須であるが、葉緑体内においてカルビン・ベンソン回路 (図中では C<sub>3</sub> cycle と表記) から直接供給する機構は存在せず、細胞質で合成された後 PPT を介して細胞質から供給される (図2)。維管束植物の葉肉細胞中の葉緑体内において、カルビン・ベンソン回路から直接 PEP が合成されない理由は、3-PGA (3-phosphoglycerate, 3-PGA) から PEP を作るために必要な2つの酵素 (3-PGA ムターゼおよびエノラーゼ) のうち、エノラーゼが葉肉細胞の葉緑体には存在しないためである<sup>8-10)</sup>。

葉緑体内包膜にはpPTファミリー以外にも様々な輸

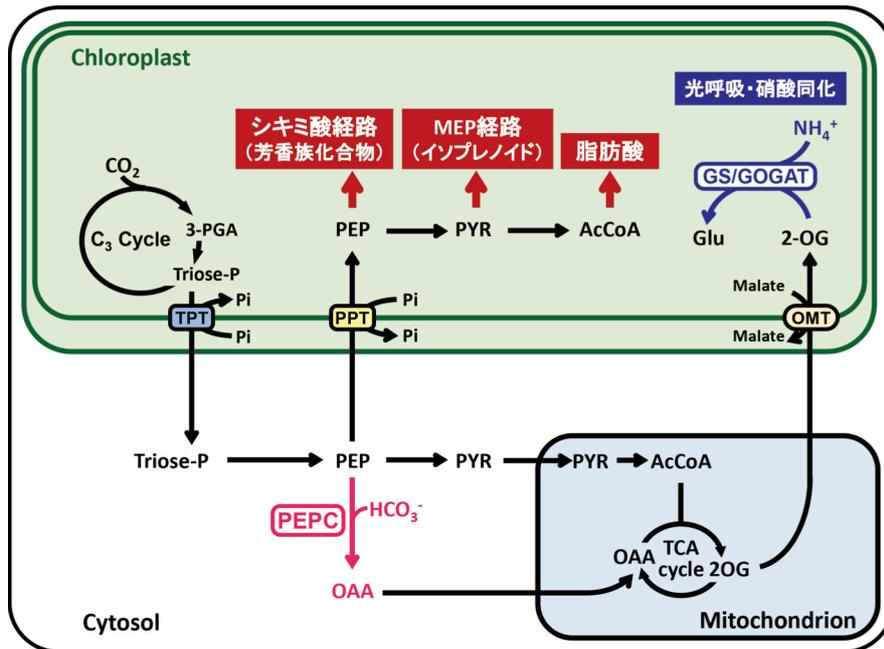


図 2. C<sub>3</sub>型緑色植物の葉緑体における PEP および有機酸の供給経路

カルビン・ベンソン回路 (図中では C<sub>3</sub> cycle と表記) で作られたトリオースリン酸の一部は細胞質に運び出され、PEP に変換された後に再び葉緑体内に移動する。葉緑体内にエノラーゼが存在しないため、カルビン・ベンソン回路から直接 PEP を合成することはできない。葉緑体内でのシキミ酸経路などに必要な PEP は、PPT を介して細胞質から供給される。光呼吸や硝酸還元により生じたアンモニアは GS/GOGAT サイクルによりグルタミン酸 (Glu) へと固定されるが、このときに必要な炭素骨格 (2-オキソグルタル酸, 2OG) は、ジカルボン酸輸送体 (2-oxoglutarate/malate transporter, OMT) を介して葉緑体へと輸送される。ミトコンドリアでは、窒素同化に伴い TCA 回路から 2OG が引き抜かれ、代謝中間体を補うためにオキサロ酢酸 (OAA) などの C<sub>4</sub> 有機酸が合成され TCA 回路へと補充される (アナプレロティック反応あるいは補充反応と呼ばれる)。緑色植物では、PEP カルボキシラーゼ (PEPC) が主要なアナプレロティック酵素として機能している。AcCoA, acetyl-CoA; OAA, oxaloacetate; PEP, phospho $eno$ pyruvate; 3-PGA, 3-phosphoglycerate; PYR, pyruvate; Triose-P, triose phosphate; OMT, 2-oxoglutarate/malate transporter; TPT, triose-P/Pi translocator; PPT, PEP/Pi translocator; TCA, tricarboxylic acid; PEPC, PEP carboxylase; GS, glutamine synthetase; GOGAT, glutamine:2-oxoglutarate aminotransferase

送体が存在し、代謝産物の選択的輸送を担っている。例として、特異性の異なる 2 種類のジカルボン酸輸送体 (2-oxoglutarate/malate transporter, OMT および general dicarboxylate transporter, DCT) がある (図 2)。OMT は、窒素同化に必要な 2-オキソグルタル酸 (2-OG) を葉緑体に供給し、DCT は窒素同化により作られたグルタミン酸を葉緑体外へと運び出す役割がある。近年シロイヌナズナにおいて、OMT はオキサロ酢酸 (OAA) にも高い親和性を示し、OMT によるオキサロ酢酸とリンゴ酸の対向輸送は、還元力を葉緑体から細胞質へと逃がすリンゴ酸バルブの分子実体であることが示された<sup>11)</sup>。また、C<sub>4</sub> 植物では、C<sub>4</sub> 回路において葉肉細胞の葉緑体へとピルビン酸を供給する Na<sup>+</sup> 依存性ピルビン酸輸送体 (bile acid sodium symporter family protein 2, BASS2) が同定されている<sup>12)</sup>。BASS2 は C<sub>3</sub> 植物の発達中の葉においても発現

しており、葉緑体内の非メバロン酸経路へとピルビン酸を供給している<sup>12)</sup>。維管束植物や緑藻類 (一次共生生物) の主要な貯蔵物質は、グルコースが  $\alpha$ -1,4 グルコシド結合で連なったアミロースと、 $\alpha$ -1,4 および  $\alpha$ -1,6 結合を持つアミロペクチンから構成されるデンプンである。デンプンは、ADP-グルコースからデンプン合成酵素の働きにより合成され、葉緑体ストロマやピレノイド周辺に蓄積する。多様な真核光合成生物の貯蔵多糖を比較すると、不溶性  $\alpha$ -グルカンを葉緑体の中に蓄積するという特性は、緑色植物にのみ見られる性質であり、真核光合成生物に普遍的な特徴ではない。本稿では貯蔵多糖については詳しく述べないが、光合成生物の貯蔵多糖の多様性については、Suzuki & Suzuki (2013) に詳しい<sup>13)</sup>。

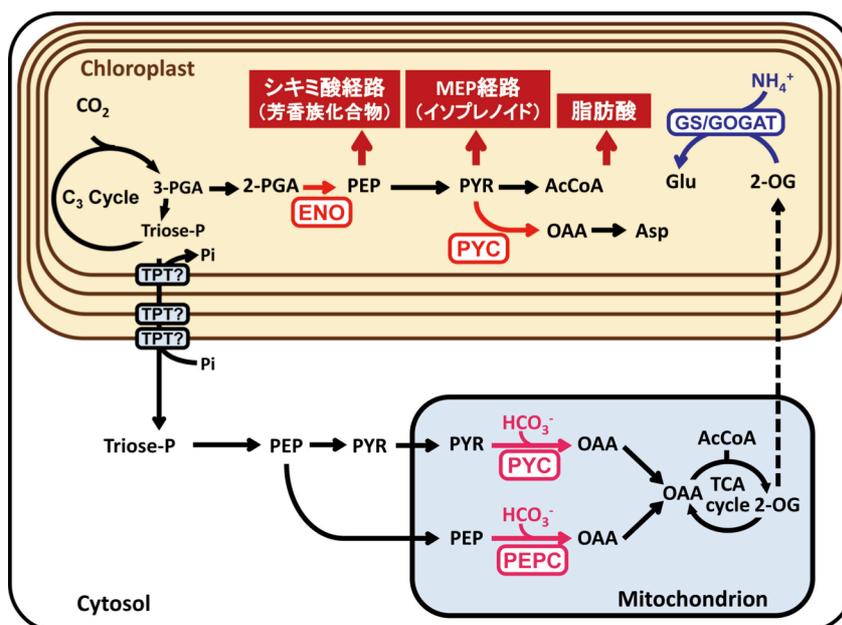


図 3. ゲノム情報から推測されるハプト藻および珪藻の葉緑体における PEP と有機酸の供給経路

ハプト藻 *Emiliania huxleyi* や珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* では、(ENO) やピルビン酸カルボキシラーゼ (pyruvate carboxylase, PYC) が葉緑体に局在し、カルビン・ベンソン回路から PEP や OAA が直接供給されると推測される。また緑色植物と同様に、ハプト藻や珪藻でも triose-P/Pi translocator (TPT) によってトリオースリン酸の一部が細胞質へと運び出されると推測されている。しかし、複数存在する TPT ホモログのうち、どの TPT ホモログが四枚ある包膜のどの膜に局在するかは明らかにされておらず、各 TPT ホモログの基質特異性も明らかにされていない。また、ミトコンドリアに PEPC および PYC が局在すると予測されており、これらの酵素がアナブレット反応に寄与していると考えられる。紅藻および紅藻由来の葉緑体を持つ二次共生藻類では、ジカルボン酸輸送体は見つかっておらず、葉緑体局在の GS/GOGAT サイクルに必要な 2OG がどのようにして葉緑体に輸送されるかは不明である。ハプト藻や珪藻では、複数の GS/GOGAT アイソザイムが存在し、葉緑体以外のオルガネラにおいても GS/GOGAT サイクルが機能している可能性がある。また、ハプト藻や珪藻では、緑色植物型の光呼吸とは異なるグリコール酸代謝経路を持つ可能性もあるため、これらの藻類の硝酸同化・光呼吸についてはさらなる研究が必要である。略号は図 2 を参照のこと。

### 3. 維管束植物以外のアーケプラスチダにおける炭素代謝

アーケプラスチダのうち、緑藻および紅藻では、維管束植物と同様に TPT がトリオースリン酸の葉緑体から細胞質への輸送を行い、PPT が細胞質で合成された PEP を葉緑体内へと輸送していると考えられている。紅藻 *Galdieria sulphuraria* では、TPT と PPT が同定されており、その基質特異性が詳細に調べられている<sup>14)</sup>。維管束植物(ホウレンソウ)で明らかにされた TPT は、トリオースリン酸に加え、3-PGA も輸送するが<sup>15)</sup>、紅藻 *G. sulphuraria* の TPT は、トリオースリン酸は輸送するものの、3-PGA は輸送しない<sup>14)</sup>。その点を除き、紅藻 *G. sulphuraria* の TPT および PPT は、基本的に維管束植物の TPT および PPT と同様の輸送特性を持つ。緑藻および紅藻でも、維管束植物と同様に葉緑体局在のエノラーゼは持たないため、葉緑体内での生合成に必要な PEP は、細胞質から PPT を介して取り込んでい

ると推測される<sup>14,16,17)</sup>。

以上のように、TPT による葉緑体から細胞質へのトリオースリン酸の輸送と、PPT による PEP の葉緑体内への輸送の仕組みは、紅藻と緑藻にも共通して保存されているようである。しかし灰色藻では、pPT ファミリーに属する輸送体が同定されておらず、pPT が機能していない可能性もある。灰色藻の葉緑体は、シアネレとも呼ばれ、その内包膜と外包膜の間にペプチドグリカン層が存在する点や、アンテナ色素としてフィコピリンを持つ点など、シアノバクテリアに近い性質を保持している。灰色藻 *Cyanophora paradoxa* から単離したシアネレを用いた実験では、トリオースリン酸と Pi の対向輸送が行われることが示唆されており、維管束植物と同様に TPT がトリオースリン酸の一部を葉緑体から運び出すと考えられていた<sup>18)</sup>。しかし、近年の *Cyanophora paradoxa* のゲノム解析および単離シアネレのプロテオーム解析では、TPT や PPT などの pPT

ファミリーに属する輸送体は見つかっておらず、単離シアネレにおけるトリオースリン酸輸送活性の分子実体は不明である<sup>19,20)</sup>。

一方、カルビン・ベンソン回路から PEP を合成するために必要な 2 種の酵素 (3-PGA ムターゼおよびエノラーゼ) が単離シアネレのプロテオーム解析で同定されており<sup>20)</sup>、カルビン・ベンソン回路で合成された 3-PGA から PEP が葉緑体内で合成され、葉緑体内代謝系に直接供給されていると考えられる。前述のとおり、灰色藻のシアネレはシアノバクテリアに近い性質を保持していることから、PEP 供給システムについても pPT ファミリーによる輸送システムが確立される前の特徴を保持している可能性が考えられる。したがって、灰色藻のシアネレの代謝産物輸送体を調べることで、一次共生成立に伴う宿主真核生物とシアノバクテリアの代謝統合プロセスのヒントが得られるかもしれない。

アーケプラスチダはいずれも不溶性の $\alpha$ -グルカンであるデンプンを合成するが、貯蔵場所が異なり、緑色植物は葉緑体内に、紅藻および灰色藻は細胞質にデンプンを蓄積する<sup>13)</sup>。緑色植物のデンプンはアミロースとアミロペクチンを含むが、多くの紅藻は「紅藻デンプン」と呼ばれるアミロペクチン型のデンプンを蓄積する。

#### 4. 紅藻由来の葉緑体を持つ二次共生藻類の炭素代謝

アーケプラスチダの葉緑体は二枚の包膜に囲まれているが、代謝産物輸送の障壁となるのは内包膜であり、内包膜上に存在する輸送体が代謝産物を選択的に輸送する<sup>5,6)</sup>。一方、ハプト藻や珪藻など、紅藻由来の葉緑体を持つ二次共生藻類の葉緑体は、四枚の包膜に包まれており、その最外膜は ER 膜を介して核膜と融合している (図 1)。二次共生によって新たに獲得された外側 2 枚の包膜においても、輸送体による選択的な代謝産物輸送が起こっていると推測される。しかし、二次共生藻類の四重包膜葉緑体における代謝産物輸送機構については、ほとんど調べられておらず、代謝産物が四枚の包膜を透過する機構も明らかになっていない。四重包膜葉緑体を持つ二次共生藻類の炭素代謝について体系的に説明することは難しいが、現時点で分かっている情報を元に、二次共生藻類の炭素代謝

の特徴を述べたい (図 3)。

アーケプラスチダの二重包膜葉緑体における代謝産物輸送体は、主に単離葉緑体を用いた実験系により明らかにされてきた。しかし、ハプト藻や珪藻では、葉緑体の最外膜が ER 膜を介して核膜とつながっているため<sup>21)</sup>、密度勾配遠心法による無傷葉緑体の単離は困難である。Wittpoth ら (1998) は、珪藻から無機炭素を基質とする酸素発生活性を保持した葉緑体の単離に成功したが、単離葉緑体の最内膜は無傷であったものの、外側三枚の包膜は壊れていた<sup>22)</sup>。単離葉緑体における無機炭素依存的な光合成酸素発生は、Pi 添加によって阻害され、3-PGA の添加によって回復したことから、3-PGA と Pi の対向輸送を行う TPT が機能していることが示唆された<sup>22)</sup>。真核光合成生物の pPT ファミリーの分子系統解析においても、アーケプラスチダの TPT と同じ系統に属する輸送体がハプト藻や珪藻から複数見つかっており<sup>23)</sup>、これらの二次共生藻類の葉緑体においても TPT を介してトリオースリン酸を輸送していると推測されている (図 3)。PEP の輸送に関しては、ハプト藻や珪藻ではアーケプラスチダの PPT と同じ系統に属する輸送体は見つかっておらず<sup>23)</sup>、PPT を介した葉緑体への PEP の輸送が起こっていない可能性がある<sup>23)</sup>。ハプト藻や珪藻では、カルビン・ベンソン回路から PEP を合成するために必要な二つの酵素 (3-PGA ムターゼ およびエノラーゼ) が葉緑体に局在することが示唆されており、芳香族アミノ酸などの生合成に必要な PEP は、葉緑体内でカルビン・ベンソン回路から閉鎖系的に供給すると推測されている<sup>24-26)</sup> (図 3)。ただし、珪藻 *Thalassiosira pseudonana* のゲノム上には葉緑体局在エノラーゼが見つかっておらず、葉緑体内での PEP 合成系が二次共生藻類の普遍的特徴であるかは分からない。

二次共生藻では、ゲノム解析により、PPT が存在しない点や、葉緑体内でカルビン・ベンソン回路から直接 PEP を合成する酵素系の存在が示唆された点など、アーケプラスチダとは異なる特徴を持つことが示されているが (図 3)、実験的証拠は不足しており、今後の生化学・分子生物学的手法による詳細な解析が望まれる。特に、pPT ファミリーに関しては、基質特異性を決定するアミノ酸残基はいまだ同定されておらず、アミノ酸配列から輸送基質を予測することは困難である<sup>27)</sup>。そのため、個々の輸送体に関して、基質特異

性と局在を実験的に明らかにすることが必要である。貯蔵多糖に関しても、ハプト藻や珪藻は、グルコースが  $\beta$ -1,3 および  $\beta$ -1,6 結合により連なった  $\beta$ -グルカン を細胞質の小胞内に蓄積することが古くから知られているが、 $\beta$ -グルカン合成酵素は同定されていないなど未解明の点が多い<sup>24)</sup>。また、一部のハプト藻では、 $\beta$ -グルカンではなくアルケノンと呼ばれる長鎖不飽和ケトンが主要な貯蔵物質として機能している<sup>28)</sup>。

## 5. 四重包膜葉緑体の痕跡オルガネラであるアピコプラストにおける代謝産物輸送機構

二次共生藻類の四重包膜葉緑体における代謝産物輸送については研究例が極めて少なく、不明な点が多い。しかし、四重包膜葉緑体の代謝産物輸送機構を知るための手がかりとなる研究が、寄生性原生生物であるマラリア原虫においてなされている。マラリア原虫はアルベオラータの中のアピコンプレクサと呼ばれる系統に属し、かつて紅藻由来の葉緑体を持っていたが、進化の過程で光合成の能力を失い寄生生活を送っている。四重包膜葉緑体の痕跡器官であるアピコプラストは、四枚の包膜に包まれており、光合成の能力は失っているが、脂肪酸やヘムなどの生合成の場として機能している。マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* では、アピコプラストの pPT ファミリーとして最外膜に局在する pPT (*PfopPT*) と、最内膜に局在する pPT (*PfipPT*) が同定されており、これらの pPT を介して生合成の材料となる  $C_3$  化合物を細胞質からアピコプラストの中へと供給していると考えられる<sup>27,29)</sup>。一般的に、光合成生物の pPT ファミリーは、3位の炭素がリン酸化された  $C_3$  化合物(トリオースリン酸や 3-PGA) を選択的に輸送する TPT と、2位がリン酸化された  $C_3$  化合物 (PEP) を選択的に輸送する PPT が存在する。これに対し、マラリア原虫 *P. falciparum* の *PfopPT* と *PfipPT* は、リン酸基の位置による基質選択性は小さく、トリオースリン酸 (ジヒドロキシアセトンリン酸)、3-PGA、PEP などの  $C_3$  化合物を非選択的にすべて輸送するという特徴がある<sup>27)</sup>。

上記のように、*P. falciparum* では、最外膜および最内膜に局在する *PfopPT* および *PfipPT* 以外に pPT ファミリーがゲノム上に見つかっておらず、中間の2枚の包膜における代謝産物の輸送機構は不明である<sup>27)</sup>。アピコプラストはマラリア原虫に特有のオルガネラで

あり、抗マラリア薬のターゲットとして盛んに研究が行われているため、今後、アピコプラストの研究から四重包膜葉緑体の物質輸送のヒントになる結果が得られることが期待される。

## 6. 二次共生藻類における $C_4$ 有機酸の合成経路とその機能

二次共生藻類の炭素代謝の特徴として、 $C_3$  化合物から  $C_4$  有機酸を合成する  $\beta$ -カルボキシラーゼ酵素が複数の異なる細胞内区画に存在することが挙げられる<sup>24,25,30,31)</sup>。光合成生物において代表的な  $\beta$ -カルボキシラーゼ酵素としては、PEP カルボキシラーゼ (phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC) が知られている。PEPC は、 $C_3$  化合物である PEP に  $HCO_3^-$  を付加し、 $C_4$  有機酸である OAA を合成する<sup>32)</sup>。緑色植物において PEPC は細胞質に局在し、アミノ酸合成に必要な TCA 回路の中間体を補充する反応 (アナプレロティック反応、補充反応とも呼ばれる) に寄与している<sup>32)</sup>。イネでは、例外的に葉緑体局在の PEPC (*OsPPC4*) も持ち、*OsPPC4* による有機酸の供給 (OAA, 2-オキソグルタル酸) が、GC/GOGAT 系によるアンモニアの速やかな固定に必要であることが示されている<sup>33)</sup>。PEPC によるアナプレロティック反応は、TCA 回路の中間体の枯渇を防ぐとともに、アミノ酸合成の炭素骨格となる有機酸を供給することで C/N バランスを調整する役割がある。また、 $C_4$  植物では、PEPC は  $C_4$  回路における最初の炭酸固定反応を担っていることも知られている。このように、 $C_3$ 、 $C_4$  植物の両方において、PEPC は炭素代謝および窒素代謝で重要な役割を担うことから、酵素学的な性質が詳細に調べられている<sup>32)</sup>。

PEPC はほとんどの藻類で見つかっており、維管束植物と同様にアナプレロティック反応を担っていると考えられる。ところが近年の研究により、多くの藻類では PEPC に加えて、ピルビン酸カルボキシラーゼ (pyruvate carboxylase, PYC) を持つことが明らかになった。PYC は、ピルビン酸から OAA を合成する酵素であり、維管束植物では見つかっておらず、主に動物や細菌などでアナプレロティック反応に寄与することが知られていた<sup>34)</sup>。藻類における PYC の存在については古くから議論があったが、維管束植物が PYC を持たないことや、多くの藻類において PYC の酵素活性が検出されなかったため、例外的に一部の藻

類でのみ機能していると考えられてきた<sup>35-37)</sup>。我々は、ハプト藻 *Emiliania huxleyi* が PYC (EhPYC1) 持つことを明らかにし、さらに EhPYC1 が葉緑体に局在することを示した<sup>30)</sup>。*E. huxleyi* の葉緑体では、EhPYC1 によって OAA を合成できると推測されている (図 3)<sup>25,26,30)</sup>。*E. huxleyi* のゲノムには、EhPYC1 に加え、ミトコンドリア局在の PYC および PEPC が予測されていることから、これらのミトコンドリアに局在する  $\beta$ -カルボキシレーション酵素が、アナプレロティック反応を担っていると推測される (図 3)。EhPYC1 による葉緑体内での OAA 合成経路の生理機能については不明だが、アナプレロティック反応とは独立して、葉緑体内で Asp ファミリーアミノ酸の炭素骨格を供給していると推測されている (図 3)。葉緑体型 PYC は、羽状目珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* にも存在することが予測されている<sup>24)</sup>。

二次共生藻類における  $\beta$ -カルボキシレーション酵素の重要な機能としては、珪藻や褐藻による暗条件下での硝酸同化とアミノ酸合成が挙げられる。多くの藻類は、光照射下においてのみ硝酸を同化するが、珪藻では、暗条件下においても硝酸を同化し、アミノ酸を合成する<sup>37)</sup>。このとき、TCA 回路からは 2-オキソグルタル酸や OAA がアミノ酸合成へと引き抜かれるため、アナプレロティック反応によって  $C_4$  有機酸が補充される。暗条件下では、PEP に  $CO_2$  を付加して OAA を合成する PEP カルボキシキナーゼ (PEP carboxykinase, PEPCK) の活性が上昇することから、PEPCK が暗条件下でのアナプレロティック反応を担っていると考えられている。なお、PEPCK が触媒する反応は  $CO_2$  固定反応であるため、暗条件下での硝酸同化に伴って  $CO_2$  が固定される。珪藻や褐藻では古くから暗条件下における  $CO_2$  固定活性が高いことが報告されており、条件によっては、暗条件下の  $CO_2$  固定速度が光合成  $CO_2$  固定速度の約 10% 程度に達することも報告されている<sup>38,39)</sup>。

二次共生藻類であるハプト藻や珪藻のゲノム解析では、PEPC や PYC など複数の OAA 合成酵素が、異なる細胞内コンパートメントに局在することが示唆されている<sup>24,25)</sup>。珪藻 *Thalassiosira pseudonana* では、 $\beta$ -カルボキシレーション酵素の局在解析がなされており、PEPC が葉緑体包膜間およびミトコンドリアに局在し、PEPCK がミトコンドリアに存在することが明らか

かになっている<sup>31)</sup>。さらに、細胞質および葉緑体に局在すると推測される PYC が見つかった<sup>31)</sup>。このように、二次共生藻類における OAA 合成経路は極めて複雑であり、各 OAA 合成酵素がオルガネラによって異なる機能を有するか、あるいは各オルガネラにおける  $C_4$  有機酸合成の厳密な調整に寄与すると考えられる。しかし、藻類においては、 $\beta$ -カルボキシレーション酵素の機能や局在についてはまだ体系的な研究がなされておらず、生理的役割や機能分担を明らかにするための研究が必要である。

## 7. 二次共生藻類の炭素代謝研究の展望

地球上の一次生産のおよそ半分は、海洋に生息する藻類が担っている。なかでも、紅藻由来の葉緑体を持つハプト藻や珪藻は、海洋の主要一次生産者であり、海の光合成生物の代表であるといえる<sup>40)</sup>。二次共生藻類の光合成の研究は、光合成生物の炭素代謝の進化・多様性の理解だけではなく、海洋における物質循環や海洋一次生産のモデリングの基礎となる重要な研究分野である。近年では、様々な二次共生藻類でゲノムが解読され、さらに珪藻など一部の二次共生藻類では外来遺伝子の発現系や、RNAi およびゲノム編集技術などの解析ツールが応用されている<sup>41-43)</sup>。これらのツールの発達により、二次共生藻類の分子レベルでの特徴が明らかになることが期待される。さらに、その学術的知見は、海洋生態系の理解に不可欠なものであり、化石燃料消費による大気  $CO_2$  濃度上昇に伴う地球温暖化や海洋酸性化等の影響に関する地球規模課題の解決に対して大きく貢献することに疑いはない。

## 謝辞

本原稿で紹介した筆者らの研究は、鈴木石根教授をはじめとする筑波大学植物代謝生理学研究室の皆様のご協力を頂きました。心より感謝を申し上げます。また、筆者らの研究の一部は、JST/CREST「海洋ハプト藻類のアルケノン合成経路の解明と基盤技術の開発」の成果です。最後に、本執筆の機会を頂きました関西学院大学松田祐介教授に感謝申し上げます。

Received October 31, 2015; Accepted November 23, 2015;  
Published December 31, 2015

## 参考文献

1. Keeling, P.J. (2013) The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 583–607
2. Moustafa, A., Beszteri, B., Maier, U.G., Bowler, C., Valentin, K. and Bhattacharya, D. (2009) Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms, *Science* 324, 1724–1726
3. Dagan, T. and Martin, W. (2009) Seeing green and red in diatom genomes. *Science* 324, 1651–1652.
4. Deschamps, P. and Moreira, D. (2012) Reevaluating the green contribution to diatom genomes. *Genome Biol. Evol.* 4, 683–688
5. Flügge, U.I. and Benz, R. (1984) Pore-forming activity in the outer membrane of the chloroplast envelope. *FEBS Lett.* 169, 85–89
6. Flügge, U.I. (1999) Phosphate translocators in plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 27–45
7. Facchinelli, F. and Weber, A.P.M. (2011) The Metabolite transporters of the plastid envelope: An Update. *Front. Plant Sci.* 2, 1–18
8. Streatfield, S.J., Weber, A., Kinsman, E.A., Häusler, R.E., Li, J., Post-Beittenmiller, D., Kaiser, W.M., Pyke, K.A., Flügge, U.I. and Chory, J. (1999) The phosphoenolpyruvate/phosphate translocator is required for phenolic metabolism, palisade cell development, and plastid-dependent nuclear gene expression. *Plant Cell* 11, 1609–1621
9. Prabhakar, V., Löttgert, T., Gigolashvili, T., Bell, K., Flügge, U.I. and Häusler, R.E. (2009) Molecular and functional characterization of the plastid-localized Phosphoenolpyruvate enolase (ENO1) from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 583, 983–991
10. Flügge, U.-I., Häusler, R. E., Ludewig, F. and Gierth, M. (2011) The role of transporters in supplying energy to plant plastids. *J. Exp. Bot.* 62, 2381–2392
11. Kinoshita, H., Nagasaki, J., Yoshikawa, N., Yamamoto, A., Takito, S., Kawasaki, M., Sugiyama, T., Miyake, H., Weber, A.P. and Taniguchi, M. (2011) The chloroplastic 2-oxoglutarate/malate transporter has dual function as the malate valve and in carbon/nitrogen metabolism. *Plant J.* 65, 15–26
12. Furumoto, T., Yamaguchi, T., Ohshima-Ichie, Y., Nakamura, M., Tsuchida-Iwata, Y., Shimamura, M., Ohnishi, J., Hata, S., Gowik, U., Westhoff, P., Bräutigam, A., Weber, A.P. and Izui, K. (2011) A plastidial sodium-dependent pyruvate transporter. *Nature* 476, 472–475
13. Suzuki, E. and Suzuki, R. (2013) Variation of storage polysaccharides in phototrophic microorganisms. *J. Appl. Glycosci.* 60, 21–27.
14. Linka, M., Jamai, A. and Weber, A.P.M. (2008) Functional characterization of the plastidic phosphate translocator gene family from the thermo-acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria* reveals specific adaptations of primary carbon partitioning in green plants and red algae. *Plant Physiol.* 148, 1487–1496.
15. Kammerer, B., Fischer, K., Hilpert, B., Schubert, S., Gutensohn, M., Weber, A. and Flügge, U.I. (1998) Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *Plant Cell* 10, 105–117
16. Klein, U. (1986) Compartmentation of glycolysis and of the oxidative pentose-phosphate pathway. *Planta* 81–86
17. Moriyama, T., Sakurai, K., Sekine, K. and Sato, N. (2014) Subcellular distribution of central carbohydrate metabolism pathways in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Planta* 240, 585–598
18. Schlichting, R. and Bothe, H. (1993) The Cyanelles (organelles of a low evolutionary scale) possess a phosphate-translocator and a glucose-carrier in *Cyanophora paradoxa*. *Bot. Acta* 106, 428–434
19. Price, D.C., Chan, C.X., Yoon, H.S., Yang, E.C., Qiu, H., Weber, A.P., Schwacke, R., Gross, J., Blouin, N.A., Lane, C., Reyes-Prieto, A., Durnford, D.G., Neilson, J.A., Lang, B.F., Burger, G., Steiner, J.M., Löffelhardt, W., Meuser, J.E., Posewitz, M.C., Ball, S., Arias, M.C., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Rensing, S.A., Symeonidi, A., Doddapaneni, H., Green, B.R., Rajah, V.D., Boore, J. and Bhattacharya, D. (2012) *Cyanophora paradoxa* genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants. *Science* 335, 843–847
20. Facchinelli, F., Pribil, M., Oster, U., Ebert, N.J., Bhattacharya, D., Leister, D. and Weber, A.P. (2013) Proteomic analysis of the *Cyanophora paradoxa* muroplast provides clues on early events in plastid endosymbiosis. *Planta* 237, 637–651
21. Ishida, K. (2005) Protein targeting into plastids: a key to understanding the symbiogenetic acquisitions of plastids. *J. Plant Res.* 118, 237–245
22. Wittpoth, C., Kroth, P. G., Weyrauch, K., Kowallik, K. V. and Strotmann, H. (1998) Functional

- characterization of isolated plastids from two marine diatoms. *Planta* 206, 79–85
23. Weber, A.P.M., Linka, M. and Bhattacharya, D. (2006) Single, ancient origin of a plastid metabolite translocator family in Plantae from an endomembrane-derived ancestor. *Eukaryot. Cell* 5, 609–612
  24. Kroth P.G., Chiovitti A., Gruber A., Martin-Jezequel V., Mock T., Parker M.S., Stanley M.S., Kaplan A., Caron L., Weber T., Maheswari U., Armbrust E.V. and Bowler C. A model for carbohydrate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* deduced from comparative whole genome analysis. *PLoS One* 3, e1426 (2008).
  25. Tsuji, Y., Suzuki, I. and Shiraiwa, Y. (2009) Photosynthetic carbon assimilation in the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Haptophyta): Evidence for the predominant operation of the C<sub>3</sub> cycle and the contribution of β-carboxylases to the active anaplerotic reaction. *Plant Cell Physiol.* 50, 318–329
  26. Tsuji, Y. and Shiraiwa, Y. (2015) Distinctive features of photosynthetic carbon metabolism in secondary endosymbiotic algae. *Perspect. Phycol.* in press
  27. Lim, L., Linka, M., Mullin, K.A., Weber, A.P.M. & McFadden, G.I. The carbon and energy sources of the non-photosynthetic plastid in the malaria parasite. *FEBS Lett.* 584, 549–554 (2010).
  28. Tsuji, Y., Yamazaki, M., Suzuki, I. and Shiraiwa, Y. (2015) Quantitative analysis of carbon flow into photosynthetic products functioning as carbon storage in the marine coccolithophore, *Emiliana huxleyi*. *Mar. Biotechnol.* 17, 428–440
  29. Mullin, K.A., Lim, L., Ralph, S.A., Spurck, T.P., Handman, E. and McFadden, G.I. (2006) Membrane transporters in the relict plastid of malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9572–9577
  30. Tsuji, Y., Suzuki, I. and Shiraiwa, Y. (2012) Enzymological evidence for the function of a plastid-located pyruvate carboxylase in the haptophyte alga *Emiliana huxleyi*: A Novel Pathway for the Production of C<sub>4</sub> Compounds. *Plant Cell Physiol.* 53, 1043–1052
  31. Tanaka, R., Kikutani, S., Mahardika, A. and Matsuda, Y. (2014) Localization of enzymes relating to C<sub>4</sub> organic acid metabolisms in the marine diatom, *Thalassiosira pseudonana*. *Photosynth. Res.* 121, 251–263
  32. Izui, K., Matsumura, H., Furumoto, T. and Kai, Y. (2004) Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 69–84
  33. Masumoto, C., Miyazawa, S., Ohkawa, H., Fukuda, T., Taniguchi, Y., Murayama, S., Kusano, M., Saito, K., Fukayama, H., Miyao, M. (2010) Phosphoenolpyruvate carboxylase intrinsically located in the chloroplast of rice plays a crucial role in ammonium assimilation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 5226–5231
  34. Jitrapakdee, S., St Maurice, M., Rayment, I., Cleland, W.W., Wallace, J.C., Attwood, P.V. (2008) Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* 413, 369–387
  35. Akagawa, H., Ikawa, T. and Nisizawa, K. (1972) The enzyme system for the entrance of dark CO<sub>2</sub>-fixation of brown algae. *Plant Cell Physiol.* 13, 999–1016
  36. Appleby, G. and Oriol, L. Variations in carboxylase activity in marine phytoplankton cultures. (1992) β-carboxylation in carbon flux studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 85, 163–169
  37. Clark, D. R., Flynn, K. J. and Owens, N. J. P. (2002) The large capacity for dark nitrate-assimilation in diatoms may overcome nitrate limitation of growth. *New Phytol.* 155, 101–108
  38. Morris, I., Yentsch, C. M. and Yentsch, C. S. (1971) Relationship between light carbon dioxide fixation and dark carbon dioxide fixation by marine algae. *Limnol. Oceanogr.* 16, 854–858
  39. Mortain-Bertrand, A., Descolas-Gros, C. and Jupin, H. (1988) Pathway of dark inorganic carbon fixation in two species of diatoms: influence of light regime and regulator factors on diel variations. *J. Plankton Res.* 10, 199–217
  40. Liu, H., Probert, I., Uitz, J., Claustre, H., Aris-Brosou, S., Frada, M., Not, F., and de Vargas, C. (2009) Extreme diversity in noncalcifying haptophytes explains a major pigment paradox in open oceans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12803–12808
  41. De Riso, V., Raniello, R., Maumus, F., Rogato, A., Bowler, C. and Falciatore, A. (2009) Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Nucleic Acids Res.* 37, e96.
  42. Sakaguchi, T., Nakajima, K. and Matsuda, Y. (2011) Identification of the UMP synthase gene by establishment of uracil auxotrophic mutants and the

- phenotypic complementation system in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol.* 156, 78–89
43. Daboussi, F., Leduc, S., Maréchal, A., Dubois, G., Guyot, V., Perez-Michaut, C., Amato, A., Falciatore, A., Juillerat, A., Beurdeley, M., Voytas, D.F., Cavarec, L., Duchateau, P. (2014) Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology. *Nat. Commun.* 5, 3831.

## Carbon Metabolism in Secondary Endosymbiotic Algae possessing Red Algal derived Plastid

Yoshinori Tsuji<sup>1,\*</sup> and Yoshihiro Shiraiwa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioscience, School of Science and Technology, Kwansei Gakuin University

<sup>2</sup>Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

## 解説

C<sub>4</sub>型光合成の進化過程から C<sub>4</sub>化の鍵を探る<sup>†</sup>

関西学院大学 理工学部/大学院理工学研究科

宗景 ゆり\*

C<sub>4</sub>型光合成は熱帯や温帯の草原に生息する植物が獲得した収斂進化形の一つであると考えられおり、C<sub>4</sub>型光合成を営む植物は被子植物に 66 系統存在することが確認されている。また C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型光合成を営む種が C<sub>4</sub>種と共通の祖先を持つことが多数の系統において報告されており、C<sub>4</sub>型光合成は、C<sub>3</sub>型から C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型を経て発生した可能性が指摘されている。本稿では、様々な植物の C<sub>4</sub>型、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型光合成の代謝経路と、同属内に多数の C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種や C<sub>4</sub>様種が存在するキク科 *Flaveria* 属植物の知見から、段階的に進んだ C<sub>4</sub>型光合成成立までの進化過程について紹介する。

## 1. はじめに

トウモロコシやソルガム、サトウキビに代表されるように、C<sub>4</sub>型光合成を営む C<sub>4</sub>型作物は、CO<sub>2</sub>濃縮機能を持つため、亜熱帯や温帯、そして半乾燥地帯での生産性が非常に高く、世界で主要な作物となっている。現在、C<sub>3</sub>型作物に C<sub>4</sub>型の形質を付加する C<sub>4</sub>化分子育種の取り組みが様々な国で行われている。しかしながら、植物の C<sub>4</sub>化は容易ではない。なぜなら、C<sub>4</sub>型光合成は非常に洗練されたシステムであり、CO<sub>2</sub>を濃縮するための代謝経路である C<sub>4</sub>回路の構築と共に、濃縮した CO<sub>2</sub>を逃がさないようにする細胞組織の形態変化、そして大きく変化した代謝産物のバランスや C<sub>4</sub>回路の駆動に必要なエネルギーの生産バランスを調節するメカニズムを同時に誘導する必要があるからである。

一方で、地球上に C<sub>4</sub>型光合成を営む植物は、単子葉類だけでなく双子葉類にも広く見られ、19 科にわたる約 7500 種の C<sub>4</sub>型植物の存在が確認されている。系統的解析により、それらは 66 系統に分類されることが明らかにされており、C<sub>3</sub>型から C<sub>4</sub>型への進化は 66 回引き起こされたと推察されている<sup>1)</sup>。これらの植物の生息地域から、C<sub>4</sub>型光合成は熱帯や温帯の草原に生息する植物が獲得した収斂進化形質の一つであると考えられている。また、C<sub>3</sub>型でもなく、C<sub>4</sub>型でもない C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型に分類される植物が 21 系統存在し、この

うち 10 系統において C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種と C<sub>4</sub>種が共通の祖先を持つことが報告されている<sup>2)</sup>。おそらく C<sub>4</sub>型光合成は、C<sub>3</sub>型から一足飛びに発生したのではなく C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型を経て発生したと考えられる。C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型光合成では、光呼吸で生じたグリシンを運んで CO<sub>2</sub>を濃縮する“C<sub>2</sub>回路”が働いている。この“C<sub>2</sub>回路”では C<sub>4</sub>回路と同様に二種類の細胞を使って CO<sub>2</sub>を濃縮する点において C<sub>4</sub>型光合成と類似しており、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型では、C<sub>4</sub>型光合成の準備段階の形態や代謝経路が構築されていると考えられる。

このように多くの系統において C<sub>4</sub>型への進化が独立に起こり得たということは、どの植物も C<sub>4</sub>化するポテンシャルを秘めている、言い換えると、C<sub>3</sub>型植物が潜在的に共通して持っているシステムを利用して C<sub>4</sub>化が引き起こされたと考えることができる。我々は、C<sub>3</sub>型から C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型を経て、C<sub>4</sub>型が発生したこの進化の過程を解析することにより、C<sub>4</sub>化分子育種へのヒントが得られると考えた。キク科 *Flaveria* 属植物は、比較的近年になって C<sub>4</sub>化が進んだ属であり、同属内に C<sub>3</sub>種、C<sub>4</sub>種だけでなく、多くの C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種、そして C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種と C<sub>4</sub>型の中間に位置する C<sub>4</sub>様種が数多く現存する<sup>1,3)</sup>。これらの *Flaveria* 属植物の光合成様式や生理学的解析に関する知見は比較的多い。本稿では、様々な植物種における C<sub>4</sub>型光合成経路と *Flaveria* 属近縁種の知見に加え、近年我々が行った解析から見える C<sub>4</sub>型光合成の進化過程について紹介する。

<sup>†</sup>解説特集「光合成炭素代謝研究の新展開」

\*連絡先 E-mail: munekage@kwansei.ac.jp



シバ (*Chloris gayana*) は細胞質の PEP-carboxykinase (PEP-CK) によってオキサロ酢酸が脱炭酸される PEP-CK 型に分類される。PEP-CK 型では、PEP-CK による脱炭酸経路を単独で持つ植物は見つかっておらず、ミトコンドリアにリンゴ酸を輸送して NAD-ME による脱炭酸を行う経路も同時に働く。実は C<sub>4</sub> 型植物のこれらのサブタイプへの分類は、主に働く脱炭酸酵素によって分類されており、植物によっては複数の経路を利用している種も存在する。トウモロコシやヒエ (*Echinochloa frumentacea*) は、NADP-ME 型に分類されるが、PEP-CK が発現していることが知られている<sup>5,6)</sup>。トウモロコシでは、<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 取り込み実験により 75% の <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> がリンゴ酸へ、約 25% の <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> がアスパラギン酸へ取り込まれることが観察されており<sup>7)</sup>、葉緑体 NADP-ME によるリンゴ酸の脱炭酸経路の他に、維管束鞘細胞へ輸送されたアスパラギン酸がミトコンドリアでオキサロ酢酸に変換された後、細胞質で PEP-CK により脱炭酸される経路も働くことが示唆されている<sup>8)</sup> (図 1B)。また、C<sub>4</sub> 種 *Flaveria* では、<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 取り込み実験により 60-65% の <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> がリンゴ酸へ、約 35-40% の <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> がアスパラギン酸へ取り込まれることが観察されている。C<sub>4</sub> 種 *Flaveria* では、他の NADP-ME 型植物よりも維管束鞘細胞における葉緑体 NADP-malate dehydrogenase (NADP-MDH) 活性が高く、またアスパラギン酸アミノ基転移酵素およびアラニンアミノ基転移酵素の活性も高いことから、維管束鞘細胞へ輸送されたアスパラギン酸が、葉緑体でオキサロ酢酸を経て、NADP-MDH によりリンゴ酸に変換され、葉緑体 NADP-ME により脱炭酸された後、アラニンに変換されて、葉肉細胞へ運ばれる経路が働くことが推測されている<sup>9)</sup> (図 1B)。

これらの経路をすべて同一の細胞に描くとやや複雑になってしまう (図 1A)。複数の経路をあえてこのように同一の細胞へ描いた理由は、進化の過程において、植物はこれらの経路をフレキシブルに、時には複数と同時に使いながら選んだと考えるからである。*Panicaceae* の系統樹を見ると、NAD-ME 型 *Panicum* 属 (*Panicum miliaceum*)、PEP-CK 型 *Megathyrsus* 属、NADP-ME 型 *Setaria* 属の 3 つのサブタイプが C<sub>3</sub> 種 *Panicum* を含む同じ系統樹に含まれる<sup>10)</sup>。おそらく、C<sub>3</sub> 型から C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間型へ進化した後、C<sub>4</sub> 代謝経路はフレキシブルに変化し、それぞれ異なるサブタイプへ分

岐したと考えられる。実際に *Flaveria* 属において Clade A 系統に属する C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種 *Flaveria ramosissima* では、NADP-ME だけでなく NAD-ME の発現量が上昇している<sup>11)</sup>。C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種 *Flaveria ramosissima* では、双方の経路が利用できるポテンシャルが維持され、C<sub>4</sub> 様型への進化過程で NADP-ME 経路が選択されたと考えられる。様々な C<sub>4</sub> 代謝経路を統合した図をみると、すべてに共通する基本形は、1) 葉肉細胞で PEP を使って HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> がオキサロ酢酸へ固定されること、2) リンゴ酸またはアスパラギン酸を維管束鞘細胞へ輸送して脱炭酸をおこなうこと、3) C<sub>3</sub> 回路の反応は、3-ホスホグリセリン酸 (3PGA) からトリオースリン酸 (TP) までのリン酸化・還元を除いて (後述)、維管束鞘細胞へ限定化されること、であることがわかる。では、どのようにして進化の過程で C<sub>4</sub> 回路が発達したのだろうか。

### 3. C<sub>3</sub> 型から C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間型へ

C<sub>4</sub> 型光合成は、C<sub>4</sub> 型から一足飛びに進化したわけではなく C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間型を経て、発生したと予想される。C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種に分類される種は、13 科と多岐にわたり分布しており、43 種現存することが確認されている<sup>2)</sup>。それらは系統学解析により 21 系統に分けられる。このうち 10 系統は、C<sub>4</sub> 種と共通の祖先から分岐しており、これらは進化の過程において C<sub>3</sub> 型と C<sub>4</sub> 型の中間に位置すると考えられる。最も C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種が多い属は、*Flaveria* 属で、9 種の C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種が存在し、近縁種に C<sub>4</sub> 様種、C<sub>4</sub> 種が含まれるため、これらの比較から進化過程を追うことができる。C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種では、C<sub>4</sub> 回路ではなく、光呼吸に依存した C<sub>2</sub> 回路により CO<sub>2</sub> を維管束鞘細胞へ濃縮する。その結果、C<sub>3</sub> 種よりも低い CO<sub>2</sub> 補償点を示す<sup>12)</sup>。C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種では、C<sub>3</sub> 種と同様に葉肉細胞に RuBisCO が存在し、C<sub>3</sub> 回路が機能している (図 2A)。C<sub>2</sub> 回路では、この葉肉細胞の RuBisCO オキシゲナーゼ反応により生じた 2-ホスホグリコール酸が、ペルオキシソームでグリシンへ変換され、維管束鞘細胞のミトコンドリアへ運ばれて、脱炭酸反応により CO<sub>2</sub> が放出される。脱炭酸の際に生じたセリンは、葉肉細胞へもどり、ペルオキシソームでグリセリン酸に変換された後、葉緑体で 3PGA となり C<sub>3</sub> 回路へ合流する。*Flaveria* 属を含め C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種が発生した地域は亜熱帯であり、植物は、光呼吸活性が高くなる生育条

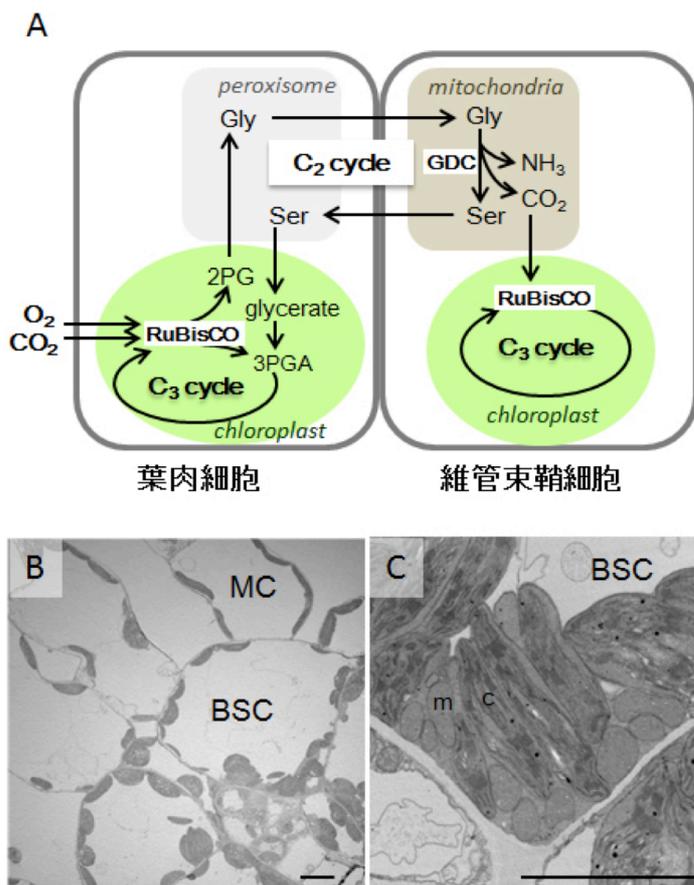


図 2. C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間型光合成

(A) C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間型代謝経路の模式図

RuBisCO のオキシゲナーゼ反応により生じた 2-ホスホグリコール酸 (2PG) は、ペルオキシソームでグリシン (Gly) へ変換され、維管束鞘細胞のミトコンドリアへ運ばれて、グリシンデカルボキシラーゼ (GDC) による脱炭酸反応により CO<sub>2</sub> が放出される。脱炭酸で生じたセリン (Ser) は、葉肉細胞へもどり、ペルオキシソームでグリセリン酸 (glycerate) に変換された後、葉緑体で 3-ホスホグリセリン酸 (3PGA) となり C<sub>3</sub> 回路へ合流する。(B) C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種 *Flaveria anomala* の葉切片電子顕微鏡写真 葉肉細胞:MC, 維管束鞘細胞:BSC, Bar = 5 μm。(C) 維管束鞘細胞の拡大写真 ミトコンドリア:m, 葉緑体:c, Bar = 5 μm。

件におかれていた<sup>1)</sup>。C<sub>2</sub>回路による CO<sub>2</sub>濃縮はこのような地域で非常に有利であったと考えられる。

C<sub>2</sub>回路による CO<sub>2</sub>濃縮経路が獲得される過程は、比較的シンプルな変化で説明されている。ここで、重要な要素となるのが、ミトコンドリアで脱炭酸反応を行うグリシンデカルボキシラーゼ (GDC) の発現領域である。GDC の発現領域が維管束鞘細胞に限定されることで、グリシンが濃度依存的に維管束鞘細胞へ移動し 2 細胞間の C<sub>2</sub>回路が働くと考えられている<sup>13,14)</sup>。C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種ではこの C<sub>2</sub>回路による CO<sub>2</sub>濃縮経路の獲得と共に、維管束鞘細胞でオルガネラが蓄積する (図 2B)。電子顕微鏡写真では、維管束鞘細胞の葉緑体が、ミトコンドリアの近傍に位置する様子が見られ (図 2C)、ミトコンドリアで放出された CO<sub>2</sub>を、葉緑体が効率よくトラップしていると考えられる。*Flaveria* 属 C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種を用いた生理・生化学的解析や、近年の *Flaveria* 属トランスクリプトーム比較解析から興味深い事象が明らかになっている。*Flaveria* 属 C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種の多くは、機能的な C<sub>4</sub>回路を持たないことが報告されているが<sup>12)</sup>、一方で、<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>の C<sub>4</sub>酸への取り込みが

低いレベルで観察されている<sup>15)</sup>。また、*Flaveria* C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種では、C<sub>4</sub>回路で働く酵素群、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC)、ピルビン酸リン酸ジキナーゼ (PPDK)、NADP-リンゴ酸酵素 (NADP-ME) や、アスパラギン酸アミノ基転移酵素およびアラニンアミノ基転移酵素の発現が、C<sub>3</sub>種と比較して高いことが報告されている<sup>16)</sup>。これらの事象は C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種においても、C<sub>4</sub>代謝酵素を使った代謝経路が部分的に機能することを連想させる。Mallmann らは、C<sub>2</sub>回路により維管束鞘細胞でグリシンの脱炭酸と共に放出されるアンモニアを代謝するために、C<sub>4</sub>代謝酵素群が使われた可能性を指摘している<sup>16)</sup>。

#### 4. C<sub>4</sub>回路の獲得と C<sub>4</sub>型光合成の最適化

前述のように、C<sub>4</sub>回路で働く酵素群は、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種で発現が上昇しており C<sub>4</sub>回路を獲得するきっかけとなる形質変化は、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間型で既に始まっていると考えられる。C<sub>4</sub>回路で働く主要酵素の発現領域を調べたところ、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種 *Flaveria floridana* では、葉肉細胞と維管束鞘細胞の双方で、遺伝子の発現が見られ、

代謝酵素の発現の細胞特異性が獲得されていないことが明らかになった (Taniguchi et al., in preparation)。C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種 *F. floridana* では、葉肉細胞と維管束鞘細胞の両方で、C<sub>4</sub> 代謝酵素群の発現が上昇しているため、2 細胞間での C<sub>4</sub> 回路による CO<sub>2</sub> 濃縮が起こっていないと考えられる。一方、C<sub>4</sub> 様種に分類される *F. brownii* では、不完全ではあるが C<sub>4</sub> 代謝酵素が細胞特異的に発現していた (Taniguchi et al., in preparation)。炭素同位体分別測定によると、C<sub>4</sub> 様種 *F. brownii* では  $\delta^{13}\text{C}$  の値が低下しており、C<sub>4</sub> 回路による CO<sub>2</sub> 濃縮が機能していることがわかる<sup>17)</sup>。これらのことから C<sub>4</sub> 代謝酵素群の発現領域の限定化により、C<sub>4</sub> 回路が CO<sub>2</sub> 濃縮経路として働くようになると考えられる。

また、C<sub>4</sub> 様種 *F. brownii* では、葉肉細胞でも RuBisCO が発現しており C<sub>3</sub> 回路が働いている<sup>18)</sup>。葉肉細胞では RuBisCO のオキシゲナーゼ反応も起こるため、C<sub>2</sub> 回路による CO<sub>2</sub> 濃縮も機能することが示唆されている<sup>19,20)</sup>。従って、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間型から C<sub>4</sub> 様型への進化の過程で、C<sub>2</sub> 回路に依存した CO<sub>2</sub> 濃縮から C<sub>4</sub> 回路による CO<sub>2</sub> 濃縮へ、段階的に移行したと考えられる。C<sub>4</sub> 様種に分類される *Flaveria palmeri* や *Flaveria vaginata* では、いずれも RuBisCO の発現が葉肉細胞に少し残存する<sup>21)</sup>。最終ステップである C<sub>4</sub> 様型から C<sub>4</sub> 型への過程では、RuBisCO の発現領域が維管束鞘細胞に限定化されることで、完全な C<sub>4</sub> 型光合成が成立する。

ここで C<sub>4</sub> 型光合成の ATP/NADPH エネルギー要求比についてふれたい。C<sub>3</sub> 型光合成では、C<sub>3</sub> 回路の駆動に、1 分子の CO<sub>2</sub> 固定あたり、ATP が 3 分子、NADPH が 2 分子必要であり、これらは葉緑体の電子伝達反応によって生産される。NADP-ME 型および NAD-ME 型 C<sub>4</sub> 光合成では、C<sub>3</sub> 回路に加え C<sub>4</sub> 回路を駆動するために ATP が 2 分子余分に必要であり、結果として 1 分子の CO<sub>2</sub> 固定あたり、ATP が 5 分子、NADPH が 2 分子必要となる。これらは、葉緑体の電子伝達反応によって生産される必要がある。PEP-CK 型では、ミトコンドリアの NAD-ME 脱炭酸反応によって放出される NADH から ATP が供給されると考えられており、葉緑体では 1 分子の CO<sub>2</sub> 固定あたり、3.6 分子の ATP、2.3 分子の NADPH が電子伝達反応によって生産される必要があると算出されている<sup>22)</sup>。従って、NADP-ME 型あるいは NAD-ME 型では、C<sub>3</sub> 型光合成と比較して葉緑体での ATP/NADPH 要求比が大きく上昇する。

葉緑体の直鎖型電子伝達反応では、ATP/NADPH 生産比は約 1.29 に固定されているため<sup>23)</sup>、ATP/NADPH 生産比を上昇させるために循環型電子伝達反応によって ATP が供給されていると考えられる。実際に、NADP-ME 型植物では、循環電子伝達活性が上昇しており、循環電子伝達に関わる NDH 複合体や PGR5、PGRL1 の発現量が上昇している<sup>24-27)</sup>。NADP-ME 型では、葉肉細胞で NADPH を使ってオキサロ酢酸をリンゴ酸へ還元して維管束鞘細胞へ運び、葉緑体で脱炭酸と共に NADPH を生成するため、維管束鞘細胞葉緑体での ATP/NADPH 要求比が上昇する。トウモロコシやソルガム、C<sub>4</sub> 種 *Flaveria* ではこの ATP/NADPH 要求比に対応するように、NDH 複合体の発現量は維管束鞘細胞で多くなっている。また、維管束鞘細胞の葉緑体チラコイド膜は、葉肉細胞の葉緑体チラコイド膜と大きく異なり、グラナ構造がほとんどみられない<sup>28)</sup>。光化学系 II 複合体はグラナに局在しており、グラナ構造の消失は光化学系 II の活性抑制と大きく関連している<sup>29,30)</sup>。トウモロコシやソルガムの成熟葉の維管束鞘葉緑体では、直鎖型電子伝達活性がほとんど観察されず、循環型電伝達による ATP 供給のみが行われていると考えられる。

葉肉または維管束鞘細胞の各葉緑体における ATP/NADPH 要求比に関しては Kanai and Edwards (1999) や Edward and Voznesenskaya (2011) で算出されている<sup>22,31)</sup>。ここで注意しておきたいことは、葉緑体 ATP/NADPH 要求比は葉肉細胞と維管束鞘細胞間の PGA/TP 交換輸送の見積もり量によって異なることである。PGA/TP 交換輸送は、どのサブタイプでも機能していると考えられる。それは、C<sub>3</sub> 回路で働く酵素の活性が、C<sub>4</sub> 型では維管束鞘細胞に限定化されるのに対し、PGA から TP までのリン酸化および還元反応に関わる、PGA キナーゼ (PGK) およびグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) は、葉肉細胞と維管束鞘細胞の双方で活性が見られることから推測されている<sup>32,33)</sup>。しかしながら、実際にどの程度の流量で働いているのかについてはよくわかっていない。維管束鞘細胞から葉肉細胞への CO<sub>2</sub> のリークを無視すると、NADP-ME 型では約 50% の PGA が葉肉細胞へ輸送され TP に変換されて戻ってくるとした時に、脱炭酸による NADPH 生産と C<sub>3</sub> 回路での NADPH の消費が釣り合い、維管束鞘細胞において直鎖型電子伝達反応による

NADPH 生産が必要ない計算になる。NADP-ME 型でも維管束鞘細胞葉緑体にグラナ構造が見られる植物では、維管束鞘細胞で直鎖型電子伝達反応が起こると考えられるため、PGA/TP 交換輸送が低く見積もられている<sup>22)</sup>。C<sub>4</sub>種 *Flaveria* では維管束鞘細胞葉緑体にグラナ構造が観察され、直鎖型電子伝達活性が見られるが、これは C<sub>4</sub>種 *Flaveria* の副代謝経路である、アスパラギン酸が維管束鞘細胞葉緑体でオキサロ酢酸を経て、NADP-MDH によりリンゴ酸に変換される過程で NADPH が消費されるので、直鎖型電子伝達反応による NADPH の生産が必要であるためと考えられている。いずれの場合も維管束鞘細胞葉緑体での ATP/NADPH 要求比は低くなるが、C<sub>4</sub>回路全体では ATP が 2 分子必要になることから、葉肉細胞での ATP/NADPH 要求比が上昇することとなる。進化の過程では、代謝反応経路に応じて、葉緑体での ATP/NADPH 生産比は、消費とつり合いが取れるように最適化されたと考えられる。*Flaveria* 属植物を用いた比較解析から、NDH 複合体量の増加とグラナ消失の過程は異なる制御系によって、前者は主に C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型から C<sub>4</sub>様型への進化過程で、後者は C<sub>4</sub>様型から C<sub>4</sub>型への進化の過程で誘導されていることが明らかになっている<sup>27)</sup>。

### 5. C<sub>4</sub>化の鍵となる因子は存在するのか？

C<sub>3</sub>型から C<sub>4</sub>型への進化は、被子植物界で引き起こされた収斂進化の一つであり、C<sub>3</sub>型植物が共通して持つシステムが使われていると考えられる。そこには、鍵となる因子が存在するのだろうか？ *Flaveria* 属で観察される C<sub>3</sub>型から C<sub>4</sub>型への進化の段階を一つずつ追うと、各段階における重要なイベントが見えてくる。C<sub>3</sub>型から C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型への過程では、GDC の維管束鞘細胞への局在化と（おそらく光呼吸活性の上昇に伴う）C<sub>4</sub>代謝酵素群の発現上昇が挙げられる。C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型から C<sub>4</sub>様型への進化の過程では、C<sub>4</sub>代謝酵素群の局在化が鍵となる。本稿では触れていないが、維管束鞘細胞の周りを葉肉細胞が 1 : 1 で存在するように配置されるクランツ構造は、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型から C<sub>4</sub>様型への進化の過程で明確になる<sup>34)</sup>。従って、細胞の位置情報や分化を制御するシステムが、クランツ構造の発達と C<sub>4</sub>代謝酵素群の細胞特異的発現の双方に関わる可能性が考えられる。C<sub>4</sub>様型から C<sub>4</sub>型への進化の最後の過程は、C<sub>4</sub>型光合成の最適化段階であり、RuBisCO の

発現領域が維管束鞘細胞へ限定化され、維管束鞘細胞葉緑体のグラナ構造が消失する。RuBisCO の発現領域の限定化は転写後制御が大きく関わるということが報告されており<sup>35)</sup>、mRNA の安定化に関わる因子やシャペロン等のタンパク質の蓄積に関わる因子が鍵となる可能性が考えられる。これら各段階で働く鍵因子が明らかになれば、作物の C<sub>4</sub>化も夢ではなく現実味を帯びてくる。

### 6. おわりに

様々な C<sub>4</sub>型種、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種や C<sub>4</sub>様種の比較解析から C<sub>4</sub>型光合成の進化過程が見えてくる。近年、急速に普及した次世代シーケンス解析により、非モデル植物においても遺伝子情報基盤が整いつつある。NADP-ME 型、NAD-ME 型、PEP-CK 型すべてにおいてトランスクリプトーム情報も蓄積している。しかしながら比較トランスクリプトームにより、発現量の変動する遺伝子が明らかになっても、それら遺伝子が原因遺伝子としてではなく結果として変動している場合も多く、鍵因子を探すことは難しい。今後の展開として期待されることは、C<sub>4</sub>化に関わるゲノム変異が同定されることである。進化の軌跡はゲノムに残されている。我々は、現在 C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種と C<sub>4</sub>様種の交雑により、次々世代 (F<sub>2</sub>) 集団を得ており、これらの集団では C<sub>4</sub>様種でみられる形質がいくつかに分離することが明らかになっている。今後、これらの C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種と C<sub>4</sub>様種の遺伝子地図や全ゲノム配列情報の解析が進めば、量的遺伝子座解析により、C<sub>4</sub>様型の形質を引き起こすゲノム変異を同定できると期待している。

Received November 2, 2015; Accepted November 16, 2015;  
Published December 31, 2015

### 参考文献

1. Sage, R.F., Sage, T.L. and Kocacinar, K. (2012) Photorespiration and the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 19–47.
2. Sage, R.F., Christin, P.A. and Edwards, E.J. (2011) The C<sub>4</sub> plant lineages of planet Earth. *J. Exp. Bot.* 62, 3155–3169.
3. Mckown, A. D., Moncalvo, J. M. and Dengler, N. G. (2005) Phylogeny of *Flaveria* (Asteraceae) and inference of C<sub>4</sub> photosynthesis evolution. *Am. J. Bot.* 92, 1911–1928.

4. Long, S.P. (1999) Environmental responses, in *C<sub>4</sub> Plant Biology* (Sage, R.F. and Monson, R.K., Eds.) pp 215-249, Academic Press, San Diego, USA.
5. Furumoto, T., Hata, S. and Izui, K. (1999) cDNA cloning and characterization of maize phosphoenolpyruvate carboxykinase, a bundle sheath cell-specific enzyme. *Plant Mol. Biol.* 41, 301–311.
6. Voznesenskaya, E.V., Franceschi, V.R., Chuong, S.D. and Edwards, G.E. (2006) Functional characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase-type C<sub>4</sub> leaf anatomy: immuno-, cytochemical and ultrastructural analyses. *Ann Bot.* 98, 77–91.
7. Hatch, M.D. (1971) The C<sub>4</sub>-pathway of photosynthesis. Evidence for an intermediate pool of carbon dioxide and the identity of the donor C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid. *Biochem. J.* 125, 425–432.
8. Wingler, A., Walker, R.P., Chen, Z-H. and Leegood, R.C. (1999) Phosphoenolpyruvate carboxykinase is involved in the decarboxylation of aspartate in the bundle sheath of maize. *Plant Physiol.* 120, 539–545.
9. Meister, M., Agostino, A. and Hatch, M.D. (1996) The roles of malate and aspartate in C<sub>4</sub> photosynthetic metabolism of *Flaveria bidentis* (L.). *Planta* 199, 262–269.
10. Aliscioni, S.S., Giussani, L.M., Zuloaga, F.O. and Kellogg, E.A. (2003) A molecular phylogeny of *Panicum* (Poaceae: Paniceae): tests of monophyly and phylogenetic placement within the Panicoideae. *Am. J. Bot.* 90, 796-821
11. Gowik, U., Bräutigam, A., Weber, K.L., Weber, A.P. and Westhoff, P. (2011) Evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis in the genus *Flaveria*: how many and which genes does it take to make C<sub>4</sub>? *Plant Cell* 23, 2087-2105.
12. Bauwe, H. (2011) Photorespiration: the bridge to C<sub>4</sub> photosynthesis, in *C<sub>4</sub> photosynthesis and related CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms*. (Raghavendra, A.S. and Sage, R.F., Eds.) pp 81–108. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
13. Engelmann, S., Wiludda, C., Burscheidt, J., Gowik, U., Schlue, U., Koczor, M., Streubel, M., Cossu, R., Bauwe, H. and Westhoff, P. (2008) The gene for the P-subunit of glycine decarboxylase from the C<sub>4</sub> species *Flaveria trinervia*: analysis of transcriptional control in transgenic *Flaveria bidentis* (C<sub>4</sub>) and *Arabidopsis* (C<sub>3</sub>). *Plant Physiol.* 146, 1773-1785.
14. Sage, T.L., Busch, F.A., Johnson, D.C., Friesen, P.C., Stinson, C.R., Stata, M., Sultmanis, S., Rahman, B.A., Rawsthorne, S. and Sage, R.F. (2013) Initial events during the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis in C<sub>3</sub> species of *Flaveria*. *Plant Physiol.* 163, 1266-1276.
15. Monson, R.K., Moore, B.D., Ku, M.S.B. and Edward, G.E. (1986) Co-function of C<sub>3</sub>- and C<sub>4</sub>-photosynthetic pathways in C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate *Flaveria* species. *Planta* 168, 493–502.
16. Mallmann, J., Heckmann, D., Bräutigam, A., Lercher, M.J., Weber, A.P., Westhoff, P. and Gowik, U. (2014) The role of photorespiration during the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis in the genus *Flaveria*. *eLife* 3, e02478.
17. Monson, R.K., Teeri, J.A., Ku, M.S., Gurevitch, J., Mets L.J. and Dudley, S. (1988) Carbon-isotope discrimination by leaves of *Flaveria* species exhibiting different amounts of C<sub>3</sub>-and C<sub>4</sub>-cycle co-function. *Planta* 174, 145–151.
18. Cheng, S.H., Moore, B.D., Edwards, G.E. and Ku, M.S.B. (1988) Photosynthesis in *Flaveria brownii*, a C<sub>4</sub>-like species. Leaf anatomy, characteristics of CO<sub>2</sub> exchange, compartmentation of photosynthetic enzymes, and metabolism of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. *Plant Physiol.* 87, 867–873.
19. Schulze, S., Mallmann, J., Burscheidt, J., Koczor, M., Streubel, M., Bauwe, H., Gowik, U. and Westhoff, P. (2013) Evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis in the genus *Flaveria*: establishment of a photorespiratory CO<sub>2</sub> pump. *Plant Cell* 25, 2522-2535.
20. Sage, R.F., Khoshravesh, R. and Sage, T.L. (2014) From proto-Kranz to C<sub>4</sub> Kranz: building the bridge to C<sub>4</sub> photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 65, 3341-3356.
21. Moore, B.D., Ku, M.S.B. and Edwards, G.E. (1989) Expression of C<sub>4</sub>-like photosynthesis in several species of *Flaveria*. *Plant, Cell Environ.* 12, 541–549.
22. Edwards, G.E. and Voznesenskaya, E.V. (2011) C<sub>4</sub> photosynthesis: Kranz forms and single-cell C<sub>4</sub> in terrestrial plants, in *C<sub>4</sub> photosynthesis and related CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms* (Raghavendra, A.S. and Sage, R.F. Eds.) pp 29–61. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
23. Allen, J.F. (2003) Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. *Trends Plant Sci.* 8, 15–19.
24. Kubicki, A., Funk, E., Westhoff, P. and Steinmiller, K. (1996) Differential expression of

- plastome-encoded *ndh* genes in mesophyll and bundle-sheath chloroplasts of the C<sub>4</sub> plant *Sorghum bicolor* indicates that the complex I-homologous NAD(P)H-plastoquinone oxidoreductase is involved in cyclic electron transport. *Planta* 199, 276–281.
25. Majeran, W., Zybaïlov, B., Ytterberg, A.J., Dunsmore, J., Sun, Q. and van Wijk, K.J. (2008) Consequences of C<sub>4</sub> differentiation for chloroplast membrane proteomes in maize mesophyll and bundle sheath cells. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 1609–1638.
  26. Takabayashi, A., Kishine, M., Asada, K., Endo, T. and Sato, F. (2005) Differential use of two cyclic electron flows around photosystem I for driving CO<sub>2</sub>-concentration mechanism in C<sub>4</sub> photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 16898–16903.
  27. Nakamura, N., Iwano, M., Havaux, M., Yokota, A. and Munekage, Y.N. (2013) Promotion of cyclic electron transport around photosystem I during the evolution of NADP-malic enzyme-type C<sub>4</sub> photosynthesis in the genus *Flaveria*. *New Phytol.* 199, 832–842.
  28. Andersen, K.S., Bain, J.M., Bishop, D.G., Smillie, R.M. (1972) Photosystem II Activity in Agranal Bundle Sheath Chloroplasts from *Zea mays*. *Plant Physiol.* 49, 461-466.
  29. Oswald, A., Streubel, M., Ljungberg, U., Hermans, J., Eskins, K., and Westhoff, P. (1990) Differential biogenesis of photosystem-II in mesophyll and bundle sheath cells of ‘malic’ enzyme NADP<sup>+</sup>-type C<sub>4</sub> plants. *Eur. J. Biochem.* 190, 185–194.
  30. Woo, K.C., Anderson, J.M., Boardman, N.K., Downton, W.J., Osmond, C.B. and Thorne, S.W. (1970) Deficient photosystem II in agranal bundle sheath chloroplasts of C<sub>4</sub> Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 67, 18-25.
  31. Kanai, R. and Edwards, G.E. (1999) The biochemistry of C<sub>4</sub> photosynthesis, in *C<sub>4</sub> Plant Biology* (Sage, R.F. and Monson, R.K., Eds.) pp 215-249, Academic Press, San Diego, USA.
  32. Slack, C.R., Hatch, M.D. and Goodchild, D.J. (1969) Distribution of enzymes in mesophyll and parenchyma-sheath chloroplasts of maize leaves in relation to the C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem. J.* 114, 489-498.
  33. Ku, S.B. and Edwards, G.E. (1975) Photosynthesis in mesophyll protoplasts and bundle sheath cells of various types of C<sub>4</sub> plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 77, 16–32.
  34. McKown, A.D. and Dengler, N.G. (2007) Key innovations in the evolution of Kranz anatomy and C<sub>4</sub> vein pattern in *Flaveria* (Asteraceae). *Am. J. Bot.* 94, 382–399.
  35. Patel, M. and Berry, J.O. (2008) Rubisco gene expression in C<sub>4</sub> plants. *J. Exp. Bot.* 59, 1625-1634.

## Learn from the Evolutionary Processes of C<sub>4</sub> Photosynthesis

Yuri Munekage\*

Department of Bioscience, School of Science and Technology, Kwansei Gakuin University

## 報告記事

# International Conference “Photosynthesis Research for Sustainability-2015”参加報告

東京理科大学 理学部  
鞆 達也

ギリシャのクレタ島にて International Conference “Photosynthesis Research for Sustainability-2015” が開催されました。会の雰囲気は嶋川さんの学会参加記をご参照ください。本会議は 2004 年に最初にカナダで催され、2007、2014 年にロシア、2011 年、2013 年にアゼルバイジャンで開催されています。本年はおよそ 20 の国々から約 150 人近くの参加者が集まり、日本からは大学院生 6 人（小松さん（筑波大）、篠田さん（東理大）、嶋川さん（神戸大）、寺村さん（立命大）、中村さん（名古屋大）、船津さん（筑波大）、）を含む 20 人が参加しました（写真 1、全体写真）。会議は James Barber (UK)、Eva-Mari Aro (Finland)、Govindjee (USA)、Tingyun Kuang (China)、Anastasios Melis (USA)、Kostas Stamatakis (Greece)、村田紀夫先生 (Japan)、佐藤公行先生 (Japan)らによるオープニングセレモニーから始まり、38 件の招待講演と 80 件近くのポスター発表が行われました。多岐にわたる光合成領域の討論が行われ実りある会議になりました。ギリシャは日本からの直行便がないため、到着にはかなりの時間がかかりましたが、学会会場はエーゲ海の南に面しており眺望も素晴らしく、また、エクスカーションでは青銅器時代の遺跡があるクノッソスへのツアーもありました。次回は来年ロシアで行われます。



写真 1. 会場（Ortho Academy of Science）の前でのグループフォト

## 報告記事

## International Conference “Photosynthesis Research for Sustainability-2015”に参加して

神戸大学 農学研究科  
嶋川 銀河

ギリシャのクレタ島で2015年9月21日～26日に開かれた International Conference “Photosynthesis Research for Sustainability-2015” in honor of George C. Papageorgiouに参加してきました。本会議への参加は今回が初めてでしたが、学会関係者の方、発表者の方ともに心優しく、学会の雰囲気にはすぐに慣れることができました。

学会以前の問題としてまず不安だったのが開催国であるギリシャの内情でしたが（ちょうど私がアテネ行きの往復航空券を買った直後にギリシャがデフォルトしました・・・）、これは想像以上に気にする事ではありませんでした。クレタ島はなおさらの事、アテネ市内ですら「本当にこんな穏やかで良いのか？」と思えるほど平和で過ごしやすい印象でした。学会会場はクレタ島でもひとときわ辺鄙なところにはありましたが、そこから見えるエーゲ海の景色は格別でした。

私の発表は5日目で日本人の中でも最後でした。発表した研究テーマ“Flavodiiron 2 and 4 proteins mediate an O<sub>2</sub>-dependent alternative electron flow in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under CO<sub>2</sub>-limited conditions”の概要は光合成研究2015年4月号にも研究紹介として載せていただいているので、ご興味のある方はそちらを参考にしてください。また、2日目と4日目にはポスターセッションもあり、熱気に包まれた会場で多くの方とお話する事ができました。

最終日には受賞式などもあり、日本人として長尾遼先生と一緒に Young Talents 賞をいただきました。余談ですが、同賞を受賞されたスロバキアの Marek Zivcak はうちのラボで瀬島健裕くんが組み上げた光化学系 I の失活誘導法（通称パルス法）を上手く実験に適用してくれています。本会でもコムギでの光化学系 I 光阻害について面白い話を聞かせていただきました。

本会を通して、光合成に関わる多様な研究の話を開きディスカッションする事ができました。個人的な話になってしましますが、特に(1)自身の発表テーマで着目している Flavodiiron 2 and 4 proteins を研究している Eva-Mari Aro のグループと濃いディスカッションを交わせた事、(2)中村伸さんら同年代の学生と話して良い刺激を受けた事は素晴らしい収穫でした。一点だけ、最終日の26日に発表プログラムが無かったことだけが残念ではありましたが、来年2016年はロシア・モスクワにて開かれるそうですので、ご興味のある方は是非とも参加してみたいかがでしょうか。最後に、韮達也先生や秋本誠志先生を初めとして、こんな弱者の私に対して発表の前後に親切にお声をお掛けして下さった大変多くの方々に、この場をお借りして改めて深くお礼申し上げます。

## 報告記事

### 山田コンファレンス 国際シンポジウム 「Dynamics and Regulation of Photosynthesis」に参加して

京都大学 理学研究科 植物分子遺伝学研究室  
博士課程 1 回生 加藤 義宣

国際シンポジウム「Dynamics and Regulation of Photosynthesis」が、2015 年 10 月 29 日～31 日にかけて奈良春日野国際フォーラムで開かれました。国内外から 38 名の研究者が集結し、最先端の研究が 3 日間にわたって発表され、活発な議論が行われました。内容は、光合成電子伝達の動態・制御過程を中心として、光合成色素の代謝系から光合成効率の改変まで多岐にわたるものでした。

これまで分野を牽引してきた先生方の 30 分のプレゼンテーションは非常に濃密なものでした。きちんと理解するためには、まだまだ私自身の勉強が足りていないと痛感することが多々ありましたが、それでも刺激的な研究成果からはたくさんのことを学ぶことができました。また、質疑応答では高度な議論が数多くなされました。意見のぶつけ合いとなり白熱した議論においては、時には自分の意見を“押し切る”こともこの世界で残っていくためには大切なのだな、と感じたシーンもありました。

2 日目の夜に開かれたバンケットでは、美味しい日本酒とともに様々な交流が行われました。私は意を決して、高橋裕一郎博士と Wollman 博士に質問をぶつけに行きましたが、ものの 20 秒で置いていかれました。さらに Redding 博士が入って 3 人の議論は加速していき、私は為す術なくフェードアウトすることしかできませんでした。ですが、先生方の頭の回転の速さを間近で感じることができ、いつかこのような議論にもついていけるようになりたいと思える刺激的な瞬間でした。

シンポジウムは非常に密度が高く、毎日終わるたびにくたくたになりましたが、私も日々の研究をもっと頑張ろうと刺激された 3 日間でした。最後にシンポジウムを開催して下さった久堀先生、皆川先生、高橋裕一郎先生、田中歩先生、鹿内先生にこの場をお借りして感謝を申し上げます。



集合写真（左）と 質疑応答で議論を行う Wollman 博士（右）

## 報告記事

### 若手の会活動報告 ～第12回セミナーの開催、サイエンスアゴラ2015での出展報告～

立命館大学 生命科学部 生命情報学科  
浅井 智広

若手の会では、前号の会報が発行された8月から今号が発刊される12月までに、合宿形式の若手の会のセミナーの開催と、サイエンスアゴラ2015での出展を通じたアウトリーチ活動行いました。

通算12回目となる若手の会のセミナーは、10月10日から11日の二日間にわたり、東京大学農学部キャンパスで開催しました。前号の会報でも告知させていただいた通り、今回は、植物脂質研究若手の会との共催による合同セミナーを企画しました。「植物脂質研究若手の会」は、植物や藻類の脂質を研究している若手研究者が集まり、昨年有志で発足された新しい研究会です (<http://www.plantmorphogenesis.bio.titech.ac.jp/~plantlipidyouth/> 参照)。今回の合同セミナーは、その代表幹事である東京工業大学の村川雅人さんにご提案頂き、開催までの準備と当日の運営のほぼ全てを村川さんが中心になって進めて下さいました。合同セミナーということで、例年のセミナーと比べて少し雰囲気が変わるかなと思っていましたが、実際始まってみるとそんな心配は杞憂に終わりました。今回も例年に引けを取らないくらい濃密な議論とフランクな交流ができたと思います。今回も開催と運営に当たりご協力下さった、東京工業大学の村川雅人さんをはじめ、清水隆之さん、東京大学の藤井祥さん、片山健太博士に、この場を借りて御礼申し上げます。詳しい合同セミナーの様子については、村川さんに執筆していただいた報告記事をご覧ください。

若手の会としては通算5回目を数えるサイエンスアゴラでの出展は、東京お台場の日本科学未来館で11月14日と15日の二日間行い、今年も盛況のままに終わることが出来ました。今回のサイエンスアゴラ2015の全体としてのテーマは「つくろう、科学ともにある社会」でした (<http://www.jst.go.jp/csc/scienceagora/> 参照)。このテーマに即して3つの主要な話題が提案され、このうちのひとつは「「ひかり」を通して見る人類の歩みと未来～原始から原子まで～」という光合成研究と深く関わる話題となっていました。若手の会では、幹事の辻敬典さん（関西学院大学）が中心となって出展を企画し、「若手研究者が伝えたい光合成の現在・過去・未来」というタイトルで常設展示が採択されました。パネル展示による光合成に対する理解の促進、デモ実験での光合成研究の疑似体験、様々な光合成生物の観察を通じた多様性の実感、若手研究者との直接対話による光合成研究の魅力の共有などを目指して出展に取り組みましたが、今回はデモ実験内容や協力していただいた方の顔ぶれが少し変わったこともあり、例年とは異なる感触や課題も得られました。現在、来訪者の感想アンケートを集計中ですので、詳細な出展報告については次号の会報の若手の会の活動報告で紹介したいと思います。

若手の会では、実年齢や身分、所属を問わず、多くの研究者の方々の積極的な参加を歓迎します。現場の研究を推進している研究者が若い気持ちで交流することは、学際性の強い光合成研究では絶対不可欠だと思います。この記事を読んで興味を持たれた方は、お気軽にご参加ください。また、ご自身の参加はもちろんのこと、周辺の方にも参加をお勧めいただきたいと思います。若手の会セミナーでの学生招待講演では、自薦他薦問わず、常時候補者を募集していますので、お気軽にご連絡いただければ幸いです。その他ご不明な点など、遠慮無く浅井 (cazai@fc.ritsumei.ac.jp) までお問い合わせください。

## 報告記事

### 「光合成若手&植物脂質若手ジョイントセミナー」開催報告

東京工業大学 大学院生命理工学研究科  
村川 雅人（植物脂質研究若手の会 代表幹事）

2015年10月10～11日にかけて、光合成学会若手の会と植物脂質研究若手の会の共催によるジョイントセミナーを開催いたしました。折しも2015年8月発行の光合成研究第25巻第2号（通巻73号）において『光合成と脂質』という特集が掲載された直後だったこともあり、当日は30名近くの光合成や脂質に関わる若手研究者の皆様にお集まりいただきました。セミナー会場として東京大学・弥生キャンパスの講義室、懇親会場としてキャンパス横すぐにある民宿、更新館の大広間をお借りしました。初日の話題提供にあたっては、首都大学東京の春田伸先生に「光合成細菌と他細菌との共生と物質のやりとり」について、東京大学の小林康一先生に「光合成（生物）における膜脂質代謝の重要性」についての招待講演をお引き受けいただきました。その後は、光合成学会若手の会の恒例である参加者全員の自己紹介を経て懇親会場へ移動し、寝る間を惜しんでの交流が行われました。翌日は大学院学生の招待講演として、埼玉大学の鬼沢あゆみさんに「光合成、脂肪酸合成に関わる転写制御因子」について、また筑波大学の西村貴皓さんには「野外における炭素フラックス測定方法の実際」について話題をご提供いただき、皆で朝早くから熱い議論を交わしました。本セミナーを通して、広い視野で研究を展開していくことの重要性を再確認することができました。活発な議論を盛り上げていただいた参加者の皆様に、心からの感謝を申し上げます。

私は2012年に植物脂質研究若手の会を発足し、2014年の11月には基礎生物学研究所の村田紀夫先生をお招きして第1回勉強会を開催しました。その際に「光合成研究と植物脂質研究において多大な功績を残されている村田先生にお話を伺ったからには、次はぜひ光合成学会若手の会とコラボレーションをしたい！」と思い立ち、代表の浅井智広さん（立命館大学）にジョイントセミナーの開催をご提案させていただいたところ二つ返事でご承諾いただきました。実のところ、未だ光合成学会若手の会のセミナーはおろか、日本光合成学会にすら参加したことがなかった私の提案を快く受け入れてくださった浅井さんをはじめ、光合成学会若手の会の皆様には心から感謝しております。来年以降もなんらかの形でこのご縁を繋いでいきたいと考えておりますので、引き続きよろしくお願いたします。

最後になりましたが、今回のジョイントセミナーの開催にあたってご協力いただきました浅井さん、東京工業大学の清水隆之さん、東京大学の藤井祥さん、同じく東京大学の片山健太さんにこの場を借りてお礼申し上げます。ありがとうございました。



## 集会案内

### International Conference “Photosynthesis Research for Sustainability-2016”開催のお知らせ

鞆 達也（東京理科大学）

2016年6月19-25日に同会議がロシアモスクワ郊外のPushchino (Institute of Basic Biological Problems)で開催されます。来年はPushchino研究所の開設50周年と重なることからノーベル賞受賞者2人(John Walker, Ada Yonath)の招待講演も予定されています。会議内容は前回同様に全ての光合成領域を含みますが、2016年は“持続ある水素エネルギー社会”についてもセッションを設けて討論を行います。光合成による水素発生等の研究している研究者の方々の参加もお待ちしています。なお、日本からモスクワへは直行便があり渡航は容易ですが、VISAが必要になります。VISA取得のために同研究所に招聘状を申請する必要があることから4月10日が一応の締め切り日となります。多くの方の参加をお待ちしております。詳細は下記ウェブサイトをご覧ください。よろしく御願います。

<http://photosynthesis2016.cellreg.org/Home.php>

## 事務局からのお知らせ

### ★入会案内

本会へ入会を希望される方は、会費（個人会員年会費：¥1,500、賛助法人会員年会費：¥50,000）を郵便振替（加入者名：日本光合成学会、口座番号：00140-3-730290）あるいは銀行振込（ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキョウと入力)、当座、0730290 名前：ニホンコウゴウセイガクカイ）にて送金の上、次ページの申し込み用紙、または電子メールにて、氏名、所属、住所、電話番号、ファックス番号、電子メールアドレス、入会希望年を事務局までお知らせください。

### ★会費納入のお願い

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

### ★事務局長交代のお知らせ

2016年度より、早稲田大学の園池公毅先生に事務局長を引き受けていただくことになりました。どうぞよろしくお願いいたします。8年間、至らないことばかりでしたが、会員の皆様のご協力で感謝いたします。

## 日本光合成学会会員入会申込書

平成 年 月 日

日本光合成学会御中

私は日本光合成学会の趣旨に賛同し、平成 年より会員として入会を申し込みます。

内に会員名簿上での公開承諾項目に○印をつけてください

氏名 (漢字) (必須)

氏名 (ひらがな)

氏名 (ローマ字)

所属

住所 1

〒

住所 2 (自宅の方または会誌送付先が所属と異なる場合にのみ記入)

〒

TEL1

TEL2 (必要な方のみ記入)

FAX

E-mail

個人会員年会費 1,500 円 (会誌、研究会、ワークショップなどの案内を含む)

賛助法人会員年会費 50,000 円 (上記と会誌への広告料を含む)

(振込予定日: 平成 年 月 日) (会員資格は1月1日~12月31日を単位とします)

\* 複数年分の会費を先払いで振り込むことも可能です。その場合、通信欄に (何年度~何年度分) とお書き下さい。

### 連絡先

〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

岡山大学 理学部生物学科

高橋裕一郎 研究室内

日本光合成学会

TEL : 086-251-7861

FAX : 086-251-7876

ホームページ: <http://photosyn.jp>

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

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

名前: ニホンコウゴウセイガッカイ

## 日本光合成学会会則

### 第1条 名称

本会は日本光合成学会（The Japanese Society of Photosynthesis Research）と称する。

### 第2条 目的

本会は光合成の基礎および応用分野の研究発展を促進し、研究者相互の交流を深めることを目的とする。

### 第3条 事業

本会は前条の目的を達成するために、シンポジウム開催などの事業を行う。

### 第4条 会員

#### 1. 定義

本会の目的に賛同する個人は、登録手続を経て会員になることができる。また、団体、機関は、賛助会員になることができる。

#### 2. 権利

会員および賛助会員は、本会の通信および刊行物の配布を受けること、本会の主催する行事に参加することができる。会員は、会長を選挙すること、役員に選出されることことができる。

#### 3. 会費

会員および賛助会員は本会の定めた年会費を納めなければならない。

### 第5条 組織および運営

#### 1. 役員

本会の運営のため、役員として会長1名、事務局長1名、会計監査1名、常任幹事若干名をおく。役員の任期は2年とする。会長、常任幹事は連続して二期を越えて再任されない。事務局長は五期を越えて再任されない。会計監査は再任されない。

#### 2. 幹事

幹事数名をおく。幹事の任期は4年とする。幹事の再任は妨げない。

#### 3. 常任幹事会

常任幹事会は会長と常任幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。常任幹事会は本会の運営に係わる事項を審議し、これを幹事会に提案する。事務局長と会計監査は、オブザーバーとして常任幹事会に出席することができる。

#### 4. 幹事会

幹事会は役員と幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。幹事会は、常任幹事会が提案した本会の運営に係わる事項等を審議し、これを決定する。

#### 5. 事務局

事務局をおき、事務局長がこれを運営する。事務局は、本会の会計事務および名簿管理を行う。

#### 6. 役員および幹事の選出

会長は会員の直接選挙により会員から選出される。事務局長、会計監査、常任幹事は会長が幹事の中から指名し、委嘱する。幹事は常任幹事会によって推薦され、幹事会で決定される。会員は幹事を常任幹事会に推薦することができる。

## 第6条 総会

1. 総会は会長が招集し、出席会員をもって構成する。議長は出席会員から選出される。
2. 幹事会は総会において次の事項を報告する。
  - 1) 前回の総会以後に幹事会で議決した事項
  - 2) 前年度の事業経過
  - 3) 当年度および来年度の事業計画
3. 幹事会は総会において次の事項を報告あるいは提案し、承認を受ける。
  - 1) 会計に係わる事項
  - 2) 会則の変更
  - 3) その他の重要事項

## 第7条 会計

本会の会計年度は1月1日から12月31日までとする。当該年度の経理状況は、総会に報告され、その承認を受ける。経理は、会計監査によって監査される。本会の経費は、会費および寄付金による。

## 付則

- 第1 年会費は個人会員1,500円、賛助会員一口50,000円とする。
- 第2 本会則は、平成14年6月1日から施行する。
- 第3 本会則施行後第一期の会長、事務局長、常任幹事にはそれぞれ、第5条に定める規定にかかわらず、平成14年5月31日現在の会長、事務局担当幹事、幹事が再任する。本会則施行後第一期の役員および幹事の任期は、平成14年12月31日までとする。
- 第4 本会則の改正を平成21年6月1日から施行する。

## 日本光合成学会の運営に関する申し合わせ

### 1. 幹事会：

幹事は光合成及びその関連分野の研究を行うグループの主催者である等、日本の光合成研究の発展に顕著な貢献をしている研究者とする。任期は4年とするが、原則として再任されるものとする。

### 2. 事務局：

事務局長の任期は2年とするが、本会の運営を円滑に行うため、約5期（10年）を目途に再任されることが望ましい。

### 3. 次期会長：

会長の引き継ぎを円滑に行うため、次期会長の選挙は任期の1年前に行う。

### 4. 常任幹事会：

常任幹事会の運営を円滑におこなうため、次期会長は常任幹事となる。

## 幹事会名簿

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

\*平成 27 年より新幹事

## 編集後記

9月に所用があつてタイ・バンコクを訪問しました。高温多湿の熱帯モンスーン気候のもと、眩しい太陽と濃い緑が目にとまりました。三島由紀夫は「暁の寺-豊饒の海・第三巻」で、戦前のバンコクの様子を、暁の寺（ワット・アルン）のかなたにトンブリの密林（ジャングル）が広がり、鳥の引き裂くような叫喚が充ちると描いています。さすがに今日では都市化が進み、トンブリの密林はビル群へと姿を変えましたが、街の中心部を一步出ると、バナナやパパイヤ、ココナッツなど熱帯果樹がいたるところにあり、多種多様な作物が勢い良く育っているのが見えます。稲も二毛作や多毛作で耕作しているとのこと。眩い太陽やうだるような暑さ、豊富な水は、人々に豊饒の大地を提供しているのでしょう。生き生きとした濃い緑の植物を見ると、その中で光合成がたくましく働いている姿が想像できます。道を歩きながら、なぜ実験室内だと光合成はかくも脆弱なのだろうと思いを巡らせました。もちろん生物種の違いや適応現象を考慮に入れなければならないが、高温多湿にはない条件、つまり低温や乾燥といった条件が大きいのだろう、そこに強光が加わればさらにストレスは増大するだろう、きっとそのときCO<sub>2</sub>固定が律速になっていることも多々あるのだろう――。

さて、今号では、2015年の第6回日本光合成学会・公開シンポジウム「光合成炭素代謝の新展開」でご講演いただいた方から3名の方の解説を掲載しました。このシンポジウムを企画された松田祐介さんが「序文」で述べられていますように、CO<sub>2</sub>濃縮機構や気孔開閉が光合成の進化に大きな役割を担っていると思われます。さらに、ポスター発表賞受賞者の中から大山克明さん（第5回）、高橋重一さん（第6回）、それに信州大学の鈴木哲さんに研究紹介を執筆していただきました。今号も力作が多いと思います。今号に関するご意見や本誌に対するご要望がございましたら、ぜひ私までご連絡ください。

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

編集長・西山 佳孝（埼玉大学）

## 記事募集

日本光合成学会では、会誌に掲載する記事を会員の皆様より募集しています。募集する記事の項目は以下の通りです。

- トピックス：光合成及び関連分野での纏まりのよいトピックス的な記事。
- 解説：光合成に関連するテーマでの解説記事。
- 研究紹介：最近の研究結果の紹介。特に、若手、博士研究員の方からの投稿を期待しています。
- 集会案内：研究会、セミナー等の案内。
- 求人：博士研究員、専門技術員等の募集記事。
- 新刊図書：光合成関係、または会員が執筆・編集した新刊図書の紹介。書評も歓迎します。

記事の掲載を希望される方は、会誌編集長の西山佳孝（[nishiyama@molbiol.saitama-u.ac.jp](mailto:nishiyama@molbiol.saitama-u.ac.jp)）までご連絡ください。

「光合成研究」編集委員会

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

---

日本光合成学会 2015年度役員

会長 高橋 裕一郎 (岡山大学)  
事務局長 鹿内 利治 (京都大学)

常任幹事 田中 歩 (北海道大学) 前会長  
常任幹事 池内 昌彦 (東京大学)  
常任幹事 野口 航 (東京薬科大学) 前編集長  
常任幹事 西山 佳孝 (埼玉大学) 編集長  
常任幹事 園池 公毅 (早稲田大学)  
常任幹事 久堀 徹 (東京工業大学) 渉外  
常任幹事 皆川 純 (基礎生物学研究所)  
常任幹事 日原 由香子 (埼玉大学) 年会 2013年  
常任幹事 熊崎 茂一 (京都大学) 年会 2014年  
常任幹事 柏山 佑一郎 (福井工業大学) 年会 2016年  
常任幹事 杉浦 美羽 (愛媛大学)  
常任幹事 松田 祐介 (関西学院大学) 年会 2015年  
常任幹事 鞆 達也 (東京理科大学) 光生物学協会

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

---

光合成研究 第25巻 第3号 (通巻74号) 2015年12月31日発行

日本光合成学会

〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

岡山大学 理学部生物学科

高橋裕一郎 研究室内

TEL : 086-251-7861

FAX : 086-251-7876

e-mail : jspr@photosyn.jp

ホームページ : <http://photosyn.jp/>

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

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

名前 : ニホンコウゴウセイガッカイ

---

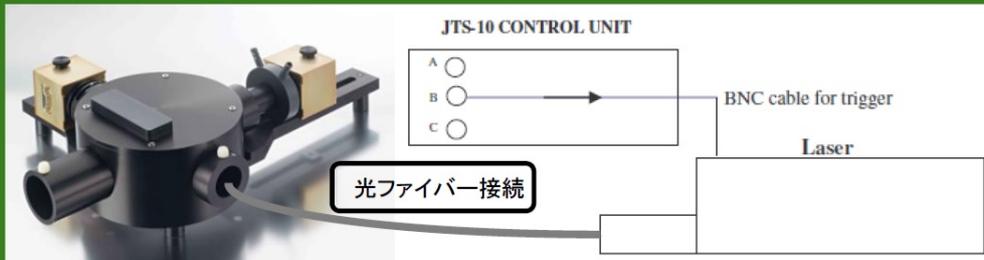
# JTS-10 光合成電子伝達反応解析装置



JTS-10 Photosynthesis Spectrometer

光学モジュールをExciting beam-Laserに変更可能です。  
精度の高いクロロフィル蛍光測定と吸光度測定が出来ます。

オプションのレーザー励起色素レーザーユニットにより早い光合成反応測定が可能になりました。  
P700他



JTS-10は安定した吸光度測定により、光化学系II以外の重要な電子伝達系の数の情報も得られます。  
温度コントロール可能なサンプルホルダーは葉だけでなく、単離葉緑体や藻類での精度良い測定も可能です。

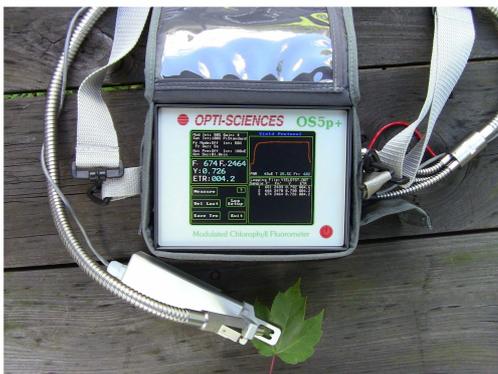


有限会社オーリー 〒599-8112 大阪府堺市東区日置荘原寺町400-4 TEL: 072-285-0117

ホームページ: <http://www.ollie.co.jp> E-mail: [information@ollie.co.jp](mailto:information@ollie.co.jp)

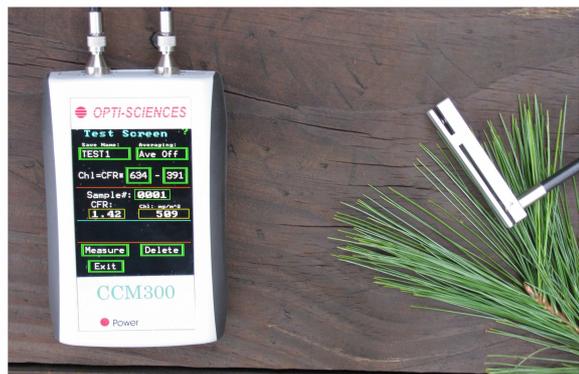
## OPTI-SCIENCES

### OS5p+ パルス変調クロロフィル蛍光光度計



- 最新鋭の携帯型システムでほぼ全タイプの植物ストレスを検出します。
- 幅広い自動プログラムの試験プロトコルで他の全ての携帯型フルオロメーターをしのぎます。
- 光合成量子収率(Y)、最大量子収率(Fv/Fm)、電子伝達速度(ETR)、光合成有効放射量(PAR)、葉の温度(T)が測定できます。
- PARクリップが標準装備になりました。

### CCM-300 極小葉用クロロフィル含有量メーター



- 極小葉のクロロフィル含有量 (mg m<sup>-2</sup>) を測定する装置です。
- 測定方法: クロロフィル蛍光比 (CFR) 法
- 測定面積: 直径3 mm、外径4 mmの円形



アイネクス株式会社(日本総代理店)  
〒144-0035 東京都大田区南蒲田2-16-1 テクノポートカマタセンタービル  
TEL: 03-5713-0388 FAX: 03-5713-1388  
Web site: [www.ai-nex.co.jp](http://www.ai-nex.co.jp)

世界シェアNo1の光合成基準測定システム

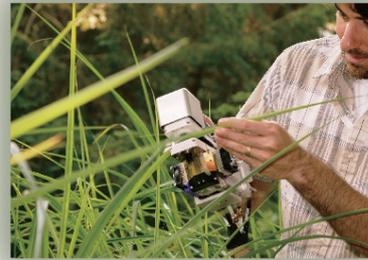
# LI-6400XT 植物総合解析システム

## 植物をはかる!!

光合成測定装置の決定版。植物のガス交換を直接測定することにより生理的活性を正確に把握することができます。

### 特徴

- ・国内納入台数300台以上
- ・光・CO<sub>2</sub>・温度・湿度 フィードバック安定環境制御、環境追従制御機能
- ・ファイトロン内でのリモートWi-Fi制御できるシステム
- ・LI-6400XT内部で自動データ変換、EXCELフォーマットで記録します



## 多彩なチャンバーアクセサリ



### ■モデル植物個体の光合成直接測定チャンバー

シロイヌナズナの光合成活性測定を個体ごと測定することができ、ワイルドタイプとミュータントの比較を、生理的活性で行うことができます。



### ■針葉樹などの立体状サンプルの光合成直接測定チャンバー

針葉樹など円錐型の、立体形状の植物サンプルの光合成活性測定を行うことができます。従来は難しかったサンプルでの光合成測定ができる可能性があります。



meiwafosis.com  
メイワフォーシス株式会社

東 京：〒160-0022 新宿区新宿1-14-2 KI御苑前ビル TEL:(03)5379-0051 代 FAX:(03)5379-0811 名古屋：〒464-0075 名古屋市千種区内山 3-10-18 TEL:052)688-4794 代 FAX:052)686-5114  
大 阪：〒558-0047 大阪市住吉区千林 2-4-25 TEL:(06)6674-2222 代 FAX:(06)6674-2323 仙 台：〒981-3133 仙台市泉区泉中央 3-4-1 TEL:(022)218-0560 代 FAX:(022)218-0561



## LED光による植物育成・研究支援機器



## ISシリーズ

## 高光量モデル 新登場

赤色パネルの光量を従来比約3倍に大幅アップ!

光合成光子束密度(PPFD)比較



光量や波長だけではなく、パルス発光など様々な面で光合成研究に最適な光環境を実現します。また、高光量モデルの充実化に伴い、ストレス実験などのニーズにもお応えいたします。

- 赤色光(660nm) ..... 最大 1,000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>
- 青色光(470nm) ..... 最大 800 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>
- 白色光 ..... 最大 1,000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>

参考PPFD:光源パネルより100mm下にて測定

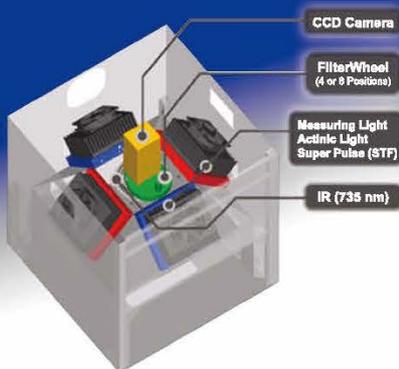
## シーシーエス株式会社

施設園芸課  
〒602-8019 京都市上京区室町通水上上ル近衛町33番地  
TEL:075-415-2101 FAX:075-432-0101  
URL: http://www.ccs-inc.co.jp / E-mail:agri-biotech@ccs-inc.co.jp

## FluorCam 800MF

# 二次元イメージング・クロロフィル蛍光測定器

フィルターホイールを内蔵、最高8枚のバンドパスフィルターを装填可能で発光波長、検出波長を任意で切り替えが可能です。飽和光としてLEDパネルを採用、最大13cm×13cmサイズのサンプルに高輝度で均一な光を照射できます。



### ●選択可能な光源

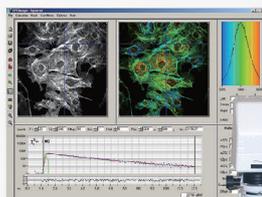
- ・高輝度LEDパネルの波長は任意に選択可能  
(例：390, 450, 470, 570, 605, 630, 735, その他任意)
- ・STFシングルターンオーバーフラッシュ
- ・高い光強度  
励起光：最高光強度、3,000  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ .  
飽和光：最高光強度、7,500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ .



[www.kyokko.com](http://www.kyokko.com)

旭光通商株式会社

〒150-0012 東京都渋谷区広尾1-1-39 恵比寿プライムスクエア2F  
TEL:03-6418-6908 FAX:03-6418-6933



高速ガルバノスキャナーを使用した蛍光寿命イメージングシステム  
高効率・高速測定、低価格でシステムアップグレードも可能

## 蛍光寿命イメージングシステム FLIM-DCS-120

- 時間相関単一光子計数 (TCSPC)法による蛍光寿命イメージング
- ピコ秒パルス半導体レーザー  
405 nm, 445 nm, 473 nm, 488 nm, 515 nm, 645 nm 対応
- 励起レーザー, GaASP検出器, TCSPCモジュールは  
最大2台まで同時搭載が可能
- 既存の共焦点顕微鏡にFLIM機能のアップグレードも可能
- FLIM, PLIM (りん光寿命イメージング), FCSIに対応

**TII** 株式会社 東京インスツルメンツ  
**TOKYO INSTRUMENTS, INC.**

<http://www.tokyoinst.co.jp/>

本 社 〒134-0088 東京都江戸川区西葛西6-18-14 TIビル TEL 03(3686)4711 FAX 03(3686)0831  
大阪営業所 〒532-0003 大阪市淀川区宮原4-1-46 新大阪北ビル TEL 06(6393)7411 FAX 06(6393)7055



Mess- und Regeltechnik  
**新型ポータブル クロロフィル蛍光測定器**



**Dual-PAM-100**  
 P700 & Chl Fluorescence Measuring System

Simultaneous assessment of P700 and Chlorophyll Fluorescence



**MULTI-COLOR-PAM** NEW  
 Multiple Excitation Wavelength  
 Chlorophyll Fluorescence Analyzer

High Quality Instrumentation for Plant Sciences



**MINI-PAM-II** NEW  
 Photosynthesis Yield Analyzer

Featuring fully digital leaf clip, touchscreen, and far red LED

Setting a New Benchmark for Photosynthesis Research in the Field

**MULTI-COLOR-PAM : 最高峰スペックでのクロロフィル蛍光解析測定**

MULTI-COLOR-PAM は、これまでの PAM 製品の伝統に沿ったものです。XE-PAM PAM-100 PHYTO-PAM and DUAL-PAM の為に独自に開発された Optical Unit ED-101U と同じ光学系を用いています。MULTI-COLOR-PAM は、これら機器の主要な長所を結集したものです。例えば PAM-2500 で用いられた高時間分解能を取り入れ、かつ XE-PAM and PHYTO-PAM で採用された強い測定光の活用が採用されています。ユーザーは PAM-2500 で利用されている PamWin ソフトウェアを使うこととなります。測定光・作用光・飽和パルス光 シングルターンオーバーフラッシュおよびマルチターンオーバーフラッシュは、それぞれ制御されることで 7 つの異なる波長が利用可能になりました。MULTI-COLOR-PAM は、希釈サンプル(単細胞藻類、シアノバクテリアそして単離葉緑体)を用いた解析に最適化されています。

**ナモト貿易株式会社**  
 〒272-0804 千葉県市川市南大野1-44-1  
 Tel: 047-338-3224 Fax: 047-338-3236  
 e-mail: mid@namoto.com  
<http://www.namoto.com>

## 長年の植物育成研究のハード&ソフトの成果を新たな発展の基盤に



省エネ!  
 植物育成に特化した  
 分光分布の蛍光灯型 LED  
 「プラントフレック」  
 を搭載!

model  
 LPH-411PFD-SP

**人工気象器<クローズド型>**  
 恒温/恒温・恒湿 プラントフレック搭載タイプ



反射型拡散板  
 ホトダイオード

学術分野で、光を測定する際の標準測定器として!  
 高精度・高精細な測定を可能に!  
 測定を  $\mu\text{Wcm}^{-2}\text{s}^{-1}$  でも、 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  でも、%でも!  
 光を瞬時に測定!

**分光放射光量子計**

**NKsystem** Bio & Clean 研究設備・機器 ● 本 社 〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目22番38号 ☎06-6443-0712 代  
 ● 東 京 支 店 〒183-0015 東京都府中市清水ヶ丘1丁目3番地8号 ☎042-365-3245 代  
 ● 札 幌 支 店 〒065-0028 札幌市東区北28条東18丁目5番5号 ☎011-786-7203 代  
 ● つくば営業所 ☎029-855-7401 代 ● 仙台営業所 ☎022-349-9525 代  
 ● 福岡営業所 ☎092-611-0530 代 ● 名古屋営業所 ☎052-910-3275 代  
 ● 広島出張所 ☎082-427-6789 代 ● 高松出張所 ☎087-815-5105 代  
 ● 羽曳野工場 ☎072-958-1919 代

**株式会社 日本医化器械製作所**  
 ホームページはこちら ▶▶▶ <http://www.nihonika.co.jp>  
 E-mail: info@nihonika.co.jp