

令和元年6月16日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04809

研究課題名(和文)クロロフィル蛍光による細胞内代謝推定システムの構築

研究課題名(英文) Prediction of cellular metabolism by chlorophyll fluorescence

研究代表者

園池 公毅 (Sonoike, Kintake)

早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授

研究者番号：30226716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：クロロフィルが発する蛍光は、生物試料に光を照射するだけで測定可能であるため、非破壊的な光合成測定の技術の一つとして広く用いられている。本研究においては、クロロフィル蛍光とその他の測定手法を組み合わせることにより、クロロフィル蛍光の時系列変化に理論的な枠組みを与え、蛍光変化から代謝の状態を推定するシステムを作ることを最終的な目的とした。研究の結果、クロロフィル蛍光と代謝の相互作用の接点は、プラストキノンプールとNADPHのレドックス状態であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代の光合成の研究において、クロロフィル蛍光測定による解析はなくてはならないものになっているが、多くの場合、クロロフィル蛍光と光合成の状態の関係は経験的なものであって必ずしも強固な理論的枠組みをもたない。そのような状況の中で、本研究の成果により、細胞内の代謝の何がどのように変化したときに光合成にどのような影響があるかを明確にできたことから、光合成の研究手法の確立に大きな寄与をしたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Chlorophyll fluorescence has been widely used as a non-destructive method to estimate photosynthesis. The aim of this study is to give theoretical framework to the chlorophyll fluorescence kinetics. The obtained results showed that redox condition of plastoquinone pool and NADPH is the two key components that connect the kinetics of chlorophyll fluorescence and cellular metabolism.

研究分野：植物生理学

キーワード：光合成 クロロフィル蛍光 微小吸収変化 電子伝達 レドックス プラストキノン NADPH 代謝

1. 研究開始当初の背景

ゲノム生物学の進展に伴い、さまざまな生物の DNA 配列のデータベースが構築され、それらに基づいて、統合的、生物横断的な解析が可能となった。ところが、4 ビットの情報の一次配列としてすべての生物を统一的に扱うことができる DNA 配列とは異なり、表現型の情報は生物種によって解析方法やデータのフォーマットが異なり、統合的なデータベースの構築や、生物横断的な解析が困難である。

この問題点を解決するため、我々は光合成生物であるシアノバクテリアにおいて、クロロフィル蛍光の時系列データベースを構築した。これは、単純なクロロフィル蛍光収率の一次元時系列データであるため、異なる光合成生物であっても统一的なフォーマットによりデータの取り扱いが可能である。約 750 の遺伝子破壊株について構築したクロロフィル蛍光挙動データベースの解析(参考文献、)によれば、光合成のみならず、呼吸や窒素代謝など、さまざまな細胞内の代謝の情報をクロロフィル蛍光挙動データから取得可能であることが明らかとなった。しかし、ここで見られる代謝とクロロフィル蛍光の時系列データとの間の関係は、純粋に経験的なものであり、特定のグループの遺伝子破壊が、よく似たクロロフィル蛍光変化を示すことを示しているにすぎない。従って、代謝における全く新奇な変化を解析することはできず、また、クロロフィル蛍光の時系列データを見ることだけによって、その意味を知ることはできない。このような問題点を解決するためには、代謝の変化と、クロロフィル蛍光挙動の変化を、より実験的に結びつける研究必要となる。

2. 研究の目的

本研究は、細胞内のさまざまな代謝反応の状態を、クロロフィル蛍光挙動の特定の特徴から定量的に推定するシステムを構築することを目的とした。シアノバクテリア細胞内の代謝系相互作用は広範囲に及んでいるため、様々な遺伝子変異の影響を、クロロフィル蛍光挙動の変化として検出することができる。これは純粋に経験的な方法であり、広い範囲への応用は難しいが、代謝の変化とクロロフィル蛍光挙動の変化の間の対応を定量的に解析することにより、その関係に理論的な裏付けを与え、最終的には、クロロフィル蛍光挙動を入力すると光合成の状態や他の代謝の状態、あるいは破壊株の場合はその原因遺伝子の推定機能が出力されるような半自動データベースを構築することを最終目標とした。

3. 研究の方法

研究の生物材料としては、クロロフィル蛍光挙動データベース Fluorome (<http://www.photosynthesis.jp/fluorome/>) が完備されているシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いた。クロロフィル蛍光の誘導期現象(暗所に置いた細胞に一定の励起光を照射した際の蛍光収率の時系列変化)の取得には、Photon Systems Instruments 社のクロロフィル蛍光カメラ FluorCAM 800MF を用いた。また、NADPH の測定には、Walz 社の Dual PAM に NADPH 蛍光測定ユニットを付けたものを用いた。さらに、光化学系 反応中心クロロフィルである P700 の酸化還元状態の測定には、本研究課題の研究費で購入した BioLogic 社のジョリオ型分光器を用いた。

4. 研究成果

(1) クロロフィル蛍光の時系列データと NADPH のレドックス状態との関係

光化学系 と光化学系 の間に存在するプラストキノンプールは、二つの光化学系の電子伝達活性の相対的な比を反映するとともに、シアノバクテリアにおいては呼吸系の電子伝達鎖によって共有されているため、その状態をも反映する。そして、このプラストキノンの酸化還元(レドックス)状態は、細胞内のシグナルとして二つの光化学系の量比調節やアンテナ調節(ステート遷移)を引き起こす。結果として、このプラストキノンのレドックス状態は、クロロフィル蛍光の時系列データに影響を与えることが、古くから知られおり、場合によっては光合成の調節機構をクロロフィル蛍光によって測定する際の、原理的な説明ともなっていた。

この点を詳しく解析した結果、プラストキノンのレドックス状態はクロロフィル蛍光の時系列変化のピークの高さとして反映される一方、ピークの位置(出現時間)は、光化学系の還元側の NADPH のレドックス状態を反映していることが明らかとなった。蛍光のピークの位置は、NADPH のレドックス以外にも、測定試料中のクロロフィル濃度によっても影響を受けるため、クロロフィル濃度を一定にした試料において測定するなどの一定の配慮が必要となるが、従来特殊な測定機器を使用することが必要であった NADPH のレドックス状態の検出が、簡便なクロロフィル蛍光の時系列データの測定のみから可能になったことは、蛍光挙動に理論的な裏付けを与えるという本研究の主要な目的への大きな一歩となったと考える。NADPH のレドックス状態は、光合成の電子伝達の状態を反映するだけでなく、細胞内の炭素代謝などの広

範な代謝系の影響を反映していることが明らかとなりつつある。このような代謝の相互作用は、今後の重要な解析テーマとなると考えている。

(2) 光合成測定の実用範囲の拡大

本研究費により購入したジョリオ型分光器(JST-10)は、クロロフィル蛍光とともに微小吸収変化の測定によって光化学系Ⅰの反応中心クロロフィルであるP700のキネティクスを測定することが可能である。従来、我々の研究室では、このP700の測定を、ドイツのWalz社のクロロフィル蛍光・吸収測定装置Dual PAMによって行っていた。Dual PAMは、生葉での測定にはきわめて適していたが、シアノバクテリアの生細胞の懸濁液での測定には、高濃度の試料を必要とし、その応用範囲が限られていた。今回のジョリオ型分光器の導入により、同試料での比較検討が可能となり、その結果、懸濁試料における測定にはジョリオ型分光器により期待していた以上に測定の実用範囲が広がり、結果としてクロロフィル蛍光によって推定されていた光合成系の変化が実際に起こっているのかどうかの検証を的確に進めることが可能になった。一方で、Dual PAMは、NADPH測定ユニットの増設によって光化学系の還元側のレドックス状態を測定することが可能であり、このデータとジョリオ型分光器で得られたデータを総合的に解釈することにより、光合成の解析能力は格段に上がった。このような研究環境の改善により、研究開始年度初めに発表したMisumi et al. (2016)による6種のシアノバクテリアの解析結果に加えて、同年度の最後には、対象を真核藻類に広げてMisumi and Sonoike (2017)として受理され、さらに、クロロフィル蛍光測定の測定方法についての総説をOgata et al. (2017)として発表することができた。

(3) アミノ酸代謝が光合成へ与える影響の解析

試薬の添加がシアノバクテリアの細胞のクロロフィル蛍光の時系列データへ与える影響の解析からは、これまでに、有機酸とアミノ酸の間で、その影響に大きな差があることが示されている。このことは、シアノバクテリアの代謝系の相互作用の中で、窒素代謝が重要な位置を占めていることを示唆しており、この点がシアノバクテリアの細胞の中の複雑な代謝の相互作用を切り分けて解析する上での突破口になるのではないかと考えた。また、一部の代謝産物だけが特異的にシアノバクテリアの生育に影響を与え、また、細胞内のレドックス状態を変化させることは、細胞内の代謝の中で、生育あるいはクロロフィル蛍光挙動に大きく影響を与える鍵となるステップがあることを示唆している。そこで、シアノバクテリアの細胞に、特定の代謝産物を添加した際に引き起こされるクロロフィル蛍光挙動の変化の解析を進めた。また、光化学系の還元側のレドックス状態が、栄養飢餓応答に異常のある変異株において特徴的な変化を示すことが明らかとなったため、この点についての解析を進めることとした。

細胞外に添加された代謝産物、とくにアミノ酸は、クロロフィル蛍光に大きな影響を与え、少なくともこの一部はNADPHのレドックス状態の変化によるものであることが明らかとなり、原核光合成生物であるシアノバクテリアにおいては、光化学系の還元側のレドックスが、細胞内の様々な反応の制御に、密接に影響を与えていることを示唆している。原核光合成生物においては、細胞内の代謝において光合成が重要な位置を占めることは言うまでもないが、実際に、様々な代謝の反応と光合成の電子伝達の状態が密接に絡み合うことにより、全体としての代謝の制御が成り立っていると考えられる。ただし、代謝産物の細胞添加の研究においては、細胞内への取り込み活性の影響を常に考慮する必要があることから、慎重に研究を進める必要があることはもちろんである。栄養飢餓応答に異常のある変異株の解析においては、クロロフィル蛍光挙動の解析の結果、光化学系の還元側のレドックス状態に影響を与えることを見出している。栄養飢餓といった一般的な環境要因によって、光合成系の特定のレドックス状態が変化することは、細胞内の代謝の調節における光合成の重要性を示しているのではないかと考えている。

そこで、よりターゲットを絞り、クエン酸の添加と緊縮応答の影響について詳しく調べることとした。クエン酸は、クエン酸回路の出発物質であり、回路によりイソクエン酸へと変化する。このイソクエン酸は、光化学系量比の調節に異常を持つ遺伝子破壊株が生育異常を引き起こす条件下で蓄積することが知られていることから、純粋に代謝の異常の影響だけではなく、光化学系量比の調節にも影響を与える可能性がある。得られた結果から、クエン酸の添加により光化学系量の相対的な減少が観察され、この光化学系量比の変化は、イソクエン酸量の変化が引き金になっている可能性が示唆された。また、緊縮応答に関しては、この応答にかかわる複数の遺伝子の変異株において細胞内レドックス状態の変化が見いだされた。これには、おそらく解糖系とペントースリン酸経路の変化が関与していると考えられる。これまでの結果を考え合わせると、細胞内の代謝の中で、炭素代謝が光合成への影響に中心的な役割を果たすのみならず、窒素の取り込みなどの炭素代謝と窒素代謝のクロストークが、細胞内のレドックス状態に大きな影響を与え、これが結果としてクロロフィル蛍光に影響を与えているのだと結論できる。

(4) 結論と展望

これまでの研究により、シアノバクテリアにおける細胞内の代謝とクロロフィル蛍光挙動の接点は、プラストキノンのレドックス状態と、NADPHのレドックス状態であることが明らかと

なりつつある。このことは、代謝と光合成の主要な接点が光合成の電子伝達鎖であることを示している。そして、そのような相互作用において、レドックスが重要なはたらきをしていることに間違いない。本研究の成果自体はシアノバクテリアにおけるものであるが、このような代謝の相互作用は、陸上植物においても見られると考えられる。陸上植物とシアノバクテリアの間には、形態的、進化的に大きな隔たりがあるが、電子伝達を間に挟んだ代謝とクロロフィル蛍光の間の相互作用という観点からすると、実は陸上植物とシアノバクテリアの間の違いはそれほど大きくない可能性がある。そのような、光合成生物に共通な代謝相互作用の存在を明らかにすることは今後の課題である。

<引用文献>

Ozaki, H., Ikeuchi, M., Ogawa, T., Fukuzawa, H. and *Sonoike, K. (2007) Large scale analysis of chlorophyll fluorescence kinetics in *Synechocystis* sp. PCC 6803: Identification of the factors involved in the modulation of photosystem stoichiometry. *Plant Cell Physiol.* 48, 451-458.

Ozaki, H. and *Sonoike, K. (2009) Quantitative analysis of the relationship between induction kinetics of chlorophyll fluorescence and function of genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.*, 101, 47-58.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Ogawa, T. and *Sonoike, K. (2018) Evaluation of the condition of respiration and photosynthesis by measuring chlorophyll fluorescence in cyanobacteria. *Bio-protocol* 8(9): e2834. DOI: 10.21769/BioProtoc.2834. 査読有

Misumi, M. and *Sonoike, K. (2017) Characterization of the influence of chlororespiration on the regulation of photosynthesis in the glaucophyte *Cyanophora paradoxa*. *Scientific Reports*, 7:46100 (DOI: 10.1038/srep46100) 査読有

*Ogawa, T., #Misumi, M. and *Sonoike, K. (2017) Estimation of photosynthesis in cyanobacteria by pulse amplitude modulation chlorophyll fluorescence: problems and solutions. *Photosynthesis Research*, 133, 63-73. (#equally contributed authors) 査読有

[学会発表](計3件)

Sonoike, K., Dark metabolism probed by chlorophyll fluorescence, Japan-Finland Seminar 2018, 2018

三角将洋、園池公毅、灰色藻 *Cyanophora paradoxa* と紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の葉緑体呼吸と光順応の比較、日本植物学会第80回大会、2016

小川敬子、鈴木健太、園池公毅、シアノバクテリアにおける翻訳関連遺伝子の破壊の影響は光化学系系 還元側を通してクロロフィル蛍光に反映される、日本植物学会第80回大会、2016

[その他]

ホームページ等

<http://www.photosynthesis.jp/>

6 . 研究組織

本研究は、研究分担者、研究協力者を置かずに行なった。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。