

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06148

研究課題名(和文) 針葉樹における光合成の光ストレス耐性機構 メーラー反応 に関する研究

研究課題名(英文) Study on a resistibility mechanism - Mehler reaction - of photosynthesis against light stress in conifer

研究代表者

津山 孝人 (Tsuyama, Michito)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：10380552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：メーラー反応は植物の光ストレス耐性に関わる重要な因子として古くから注目されてきた。メーラー反応とは、光合成電子伝達系の光化学系(系)下流での酸素還元反応である。一般に裸子植物(針葉樹)は被子植物よりもメーラー反応の能力が10倍高い。メーラー反応の解析においては競合する系サイクリック電子伝達反応の存在が障害となる。系サイクリック電子伝達反応は系下流から電子伝達体鎖へと電子を戻す反応である。メーラー反応と系サイクリックは互いに電子を奪いあう関係にあり、いずれも検出が非常に難しい。本研究では、系サイクリック電子伝達反応の測定が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メーラー反応と系サイクリック電子伝達反応は共に1950年代に発見された。植物の光ストレス耐性との関連でいずれにも数多くの研究がある。しかし、先行研究の多くは草本植物(各種主要作物、近年ではモデル植物)においてであり、裸子植物や針葉樹での例は皆無であった。草本植物における研究においてメーラー反応は無視しうる程小さいとされ、且つ、系サイクリックも生理学的条件下では機能しないとの認識が最近まで主流であった。本研究の成果によって今後、裸子植物(針葉樹)の光ストレス耐性の仕組みや制御に関する研究が進むと期待される。草本植物における両反応の意義を再び検証する契機ともなりうる。

研究成果の概要(英文)：The Mehler reaction, which is an oxygen reduction reaction at the downstream of photosystem I (PSI), has been attracted much attention for so long as an important factor relating to tolerance to high light of plants. In general, gymnosperms have a higher (about 10 times) capacity of the Mehler reaction than angiosperms. In assaying a regulation of the Mehler reaction, the presence of the cyclic electron transport around PSI, which returns electrons from acceptor side of PSI to the plastoquinone pool, becomes problem. The two reactions compete for electrons and are difficult to be measured separately. In this study, methods to detect and analyze the activity of the PSI cyclic electron flow has been established by measuring the prompt and delayed chlorophyll fluorescence. Also, it was found that analyses of redox state of P700, the reaction center of PSI, provides a basis of estimating the quantum yield of the PSI cyclic electron flow.

研究分野：樹木生理学

キーワード：裸子植物 針葉樹 光合成 環境ストレス耐性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物の成長に光は必須であるが、強過ぎる光はストレスとなる。これは、強光が光合成の阻害(光阻害)を引き起こすためである。進化の過程で植物は、光阻害を回避する様々な仕組みを発達させてきた。その一つに葉緑体チラコイド膜における酸素還元反応—メーラー(Mehler)反応—がある(図1)。申請者らは以前、裸子植物は被子植物よりも同反応の能力が約10倍高いことを見出した。

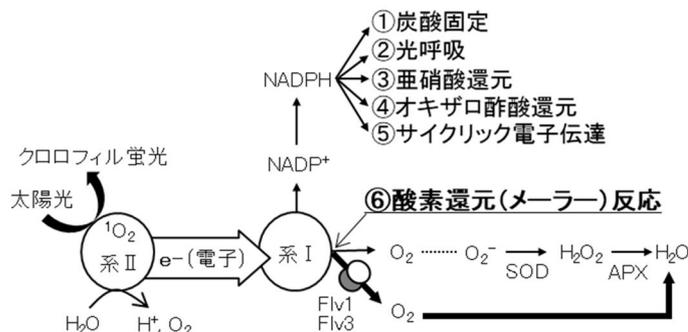


図1 光合成電子伝達反応の模式図

水を分解することによる電子が光化学系II(系II)から光化学系I(系I)に伝達される。電子伝達反応の最終産物 NADPH は、炭酸固定を始めとして様々な反応に利用される(図中 ~ )。系I下流側では酸素の還元(メーラー反応)も起きる。メーラー反応には、非酵素的な反応(細矢印)とフラボジオアイロンタンパク質 Flv1 および Flv3 が触媒する反応(太矢印)の2種類がある。被子植物のメーラー反応は非酵素的で効率が悪く、裸子植物のメーラー反応は Flv タンパク質に依存しており効率が低いと予想される。

### 2. 研究の目的

裸子植物の高いメーラー反応の制御機構を明らかにすることが研究目的であった。メーラー反応は光化学系I(系I)サイクリック電子伝達反応(図1)と競合し互いに電子を奪い合う関係にある。メーラー反応の制御を調べる上で系Iサイクリックの測定を行う必要があった。

針葉樹のEST(expressed sequence tag)データベースを用いて(ラン藻Flv遺伝子の)相同性検索を行った。その結果、複数の針葉樹(*Pinus sylvestris* ヨーロッパアカマツ、*Pinus taeda* テーダマツ、*Picea glauca* カナダトウヒ、*Picea sitchensis* シトカトウヒ、*Cryptomeria japonica* スギ)にラン藻Flvタンパク質の候補ホモログが存在することが分かった。これらの候補ホモログがメーラー反応を触媒することを示すことも目的としていた。

### 3. 研究の方法

系Iサイクリック電子伝達反応(CEF-PSI)を測定するためにクロロフィル蛍光法を応用した。パルス変調クロロフィル蛍光法において連続(作用)光消灯後にクロロフィル蛍光強度の一時的な増大(post-illumination Chl fluorescence: PIFI)が観察される。この増大はサイクリック電子伝達反応によるものである。本手法の改良を行うとともに、別途、遅延蛍光法も併用しながら、メーラー反応の活性に影響を及ぼす系Iサイクリック電子伝達反応の制御を調べた。上記Flvタンパク質の解析は諸事情に付き今後の課題とした。

### 4. 研究成果

#### (1) PIFTシグナルによる系Iサイクリック電子伝達反応の検出・改良・解析

図2はシロイヌナズナ野生株WTにおいて測定したクロロフィル蛍光強度の変化を示す。測定は光量子束密度が180および1470  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光合成作用光下で行った。クロロフィル蛍光は二つの異なる強度の測定光(0.3および0.6  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )によって励起した。0.3  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の測定光を用いた場合(図2A)、180  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の作用光照射下でクロロフィル蛍光は典型的な誘導曲線を描いた。作用光消灯後、クロロフィル蛍光強度は急激に低下し、その後ゆっくりと低下した。検出できる程度のはっきりとしたPIFIシグナルは検出されなかった。0.6  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (図2B)の測定光を用いた場合、明確なPIFIシグナルが検出された。作用光消灯後、クロロフィル蛍光は、初期の急激な低下の後、一時的(数秒間)ゆっくりと上昇した。PIFIはCEF-PSIによるPQの非光化学的な還元(それによる $Q_A$ の還元)が原因である。強光の作用光(1470  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )照射下では測定光強度が弱くても(0.3  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )PIFIシグナルは検出された(図2C)。測定光強度が強い場合(0.6  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )、PIFIシグナルはさらに明確になった(図2D)。

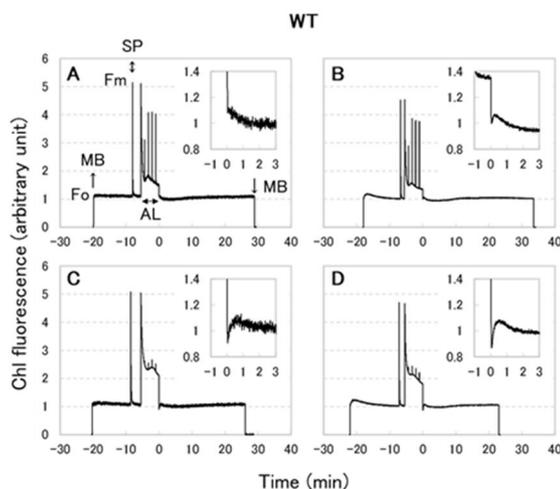


図2 シロイヌナズナ野生株 WT におけるクロロフィル蛍光強度の変化

測定は  $0.3$  (A, C) または  $0.6$  (B, D)  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の測定光 (MB) を用いて、 $180$  (A, B) または  $1470$  (C, D)  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の作用光 (AL) 照射下で行った。最小蛍光レベル  $F_o$  を記録するために暗適応した葉に測定光を照射した。続いて、最大蛍光レベルを記録するために、飽和光パルス (SP, 1 s,  $7500 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) を照射した。その後、一分間隔で飽和光パルスを葉に当てつつ、作用光 AL を 5 分間照射した。挿入図は、作用光照射停止以降の変化を時間軸を拡大して示している。

一方、 $0.6 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の測定光には光合成を誘導する欠点があった。測定光照射直後にクロロフィル蛍光は  $F_o$  レベルを超えて増大し、その後、ゆっくりと  $F_o$  まで低下した。 $F_o$  レベルは試料中の全ての電子伝達体  $Q_A$  が酸化型で存在する状態でのクロロフィル蛍光強度を指すが、強測定光 ( $0.6 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) 照射下ではその状態を誘導し、正しく  $F_o$  レベルを測定することは難しい。それは、程度の差こそあれ、弱測定光 ( $0.3 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) 照射下でも同じである。正しく  $F_o$  レベルを測定するには、さらに微弱な測定光を用いるか、測定光と赤外光を併用し、 $Q_A$  を積極的に酸化するしかない。しかし、微弱測定光ではクロロフィル蛍光強度が小さくなる上、赤外光はそれ自体が解析対象の系 I サイクリック電子伝達反応を誘導してしまう。

加えて、強い測定光による光合成の誘導は最大クロロフィル蛍光強度  $F_m$  の低下も引き起こし、系 最大量子収率  $F_v/F_m$  が低くなる結果を招いた (表 1)。それぞれ  $0.803 \pm 0.006$  と  $0.779 \pm 0.008$  で有意差があった。これは、 $0.3$  と  $0.6 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の僅かな違いにも植物は敏感に回答しているためである。一方、測定光の強度の違いは作用光照射下では測定 (系 量子収率  $\Phi_{\text{PSII}}$ ) に影響しなかった (表 1)。野生株において ( $180$  または  $1470 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) の作用光照射下でそれぞれ  $0.621 \pm 0.019$  と  $0.632 \pm 0.009$  であった。作用光照射下では僅かな測定光強度の違いは無視し得るためである。図 2BD の強い測定光は作用光照射停止後、電子伝達鎖へ電子を僅かながらも供給し、結果として、系 サイクリックを誘導・維持したと考えられる。PIFI の測定を厳密に解釈すれば、「作用光消灯後の蛍光強度の変化」ではなく、「作用光強度の大幅な低下後の蛍光強度の変化」とするのが正しい。以上の結果は、PIFI の検出において測定光の強度は強い方が望ましいことを示す。

表 1 測定光強度のクロロフィル蛍光パラメータへの影響

測定は  $0.3$  または  $0.6 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の測定光を用いて行った。系 量子収率  $\Phi_{\text{PSII}}$  は  $180$  または  $1470 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の作用光照射下での値を示す。3-5 回の測定の平均値と標準偏差を求め、t-test ( $P < 0.05$ ) による検定を行った。\*印は有意差があることを示す。

Parameter		Fv/Fm		$\Phi_{\text{PSII}}$			
AL ( $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )		0		180		1470	
ML ( $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )		0.3	0.6	0.3	0.6	0.3	0.6
WT	ave	0.803	0.779*	0.621	0.632	0.097	0.140
	std	0.006	0.008	0.019	0.009	0.019	0.030

系 サイクリック電子伝達反応 (CEF-PSI) は葉緑体 NADH dehydrogenase-like 複合体 (NDH 複合体) と proton gradient regulation 5 (PGR5) タンパク質に依存する二つの経路から成る。シロイヌナズナ *ndhM* 変異株では弱光の作用光 ( $180 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) の下では (図 3AB) 測定光の強度が強くても PIFI シグナルは検出されなかった (図 3B)。強光の作用光 ( $1470 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) 照射後 (図 3CD) は、弱い測定光 ( $0.3 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) 使用時も、*ndhM* 変異株は PIFI シグナルを示した (図 3C)。弱光照射後の野生株における PIFI は NDH 依存 CEF-PSI による PQ の非光化学的還元、強光照射後の野生株および *ndhM* 変異株における PIFI は PGR5 依存 CEF-PSI による PQ の非光化学的還元へ帰することができる。

*pgr5* 変異株における PIFI シグナルの出現は *ndhM* 変異株と作用光強度に関して真逆の結果となった。弱光の作用光 ( $180 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) を用いた場合 (図 4AB) 明確なシグナルは強い測定光 ( $0.6 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) (図 4B) が必要ではあったが、PIFI は観察された。これは NDH 依存 CEF-PSI による PGR5 依存 CEF-PSI の機能相補が原因であると思われる。強光の作用光 ( $1470 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) (図 4CD) では測定光を強くしても PIFI は観察されなかった (図 4D)。強光の作用光

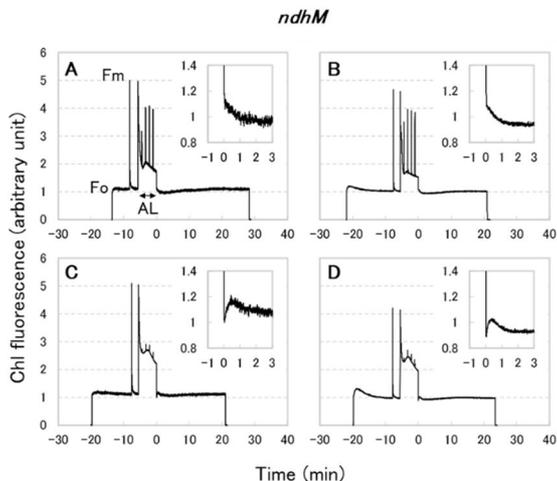


図3 シロイヌナズナ *ndhM* 変異株におけるクロロフィル蛍光強度の変化

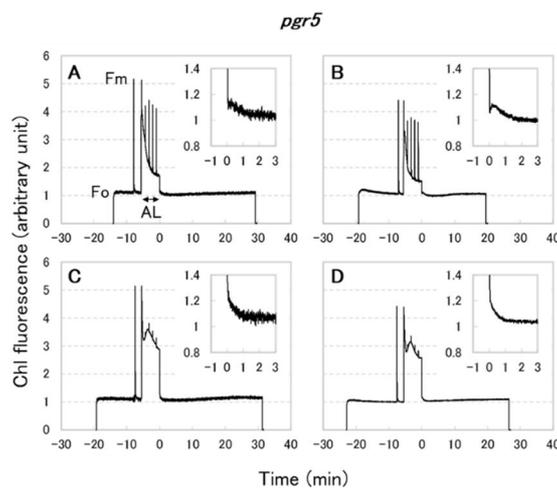


図4 シロイヌナズナ *pgr5* 変異株におけるクロロフィル蛍光強度の変化

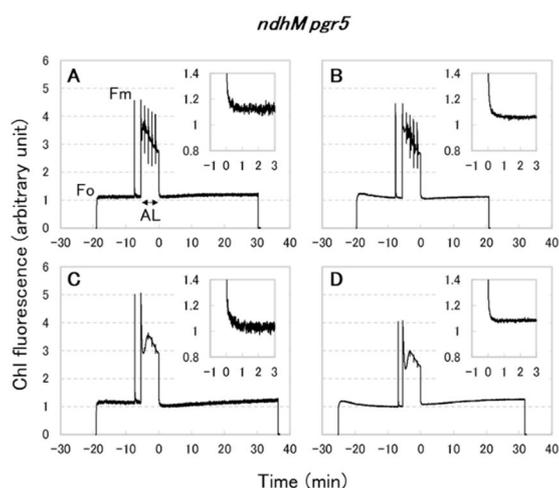


図5 *ndhM pgr5* 変異株におけるクロロフィル蛍光強度の変化

あった。

以上の結果をまとめると、NDH 依存 CEF-PSI は相対的に弱光下で機能し、PGR5 依存 CEF-PSI は強光下で機能する。赤外光に対して NDH 依存 CEF-PSI は応答するが、PGR5 依存 CEF-PSI はしない。本研究において残った課題は以下の通りである。PIFI の解析には測定光の

( $1470 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) での野生株および *ndhM* 変異株における PIFI シグナルは PGR5 依存 CEF-PSI による PQ の非光化学的還元に戻ることができる。

上記の各一重変異体の結果と一致して、*ndhM pgr5* 二重変異株においては測定光強度と作用光強度に関係なく PIFI シグナルは検出されなかった (図5)。この結果は、NDH 依存 CEF-PSI は相対的に弱い作用光の下で、PGR5 依存 CEF-PSI は強い作用光の下で機能することを示す。

## (2) 遅延蛍光法による系Iサイクリック電子伝達反応の検出と解析

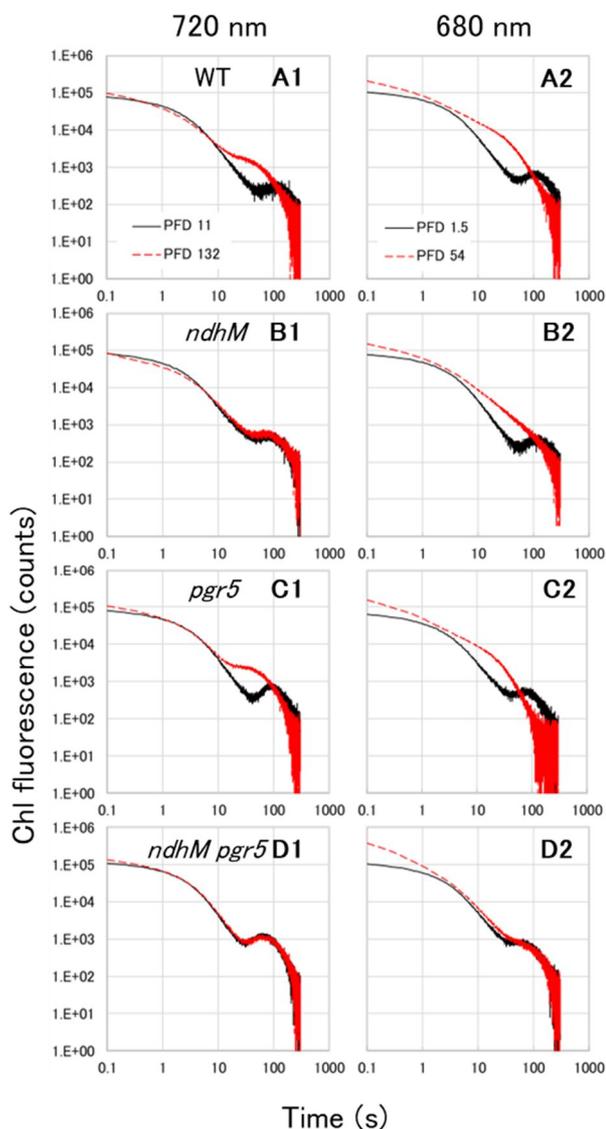
系Iサイクリック電子伝達反応の機能分担について遅延蛍光法を用いてさらに調べた。遅延蛍光法では測定光を用いず、連続光照射後にクロロフィル蛍光を完全暗所で測定する。そのため PIFI 測定におけるような測定光強度の問題がない。

作用光として 680 nm と 720 nm の光を用いた。680 nm 光は系IIを励起し、水から NADP までの電子伝達反応を十分に誘導する。720 nm 光は系Iを優先的に励起する一方、系IIの励起は弱く、水→NADP の電子伝達は実質的には誘導されない。野生株に  $11 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の 720 nm 光を照射した場合 (図6A1) 光照射停止後、遅延蛍光は約 50 秒間急激に低下した後にゆっくりと上昇し、蛍光減衰曲線に「ピーク」乃至は「肩」が現れた。その後、蛍光レベルは検出限界にまで低下した。より強い  $132 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の 720 nm 光を照射した場合、後半部で観察された蛍光減衰曲線上のピーク (肩) は 10~100 秒間の間にシフトした (図6A1)。肩のシフトは *pgr5* 変異株 (図6C1) では観察されたが、*ndhM* (図6B1) および *ndhM pgr5* (図6D1) では観察されなかった。これらの結果は、肩のシフトは NDH 依存 CEF-PSI によるものであることを示す。CEF-PSI により PQ が還元され、それにより  $Q_A$  および  $Q_B$  の還元レベルが上昇し、最終的に電荷再結合、さらに蛍光放出の結果となったと説明できる。

励起光として 680 nm の光を用いた場合、蛍光減衰曲線上の肩 (ピーク) のシフトは野生株および *pgr5* だけでなく *ndhM* 変異株においても観察された (図6A2, B2, C2)。この場合、680 nm 光の強度は  $1.5 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  から  $54 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  へと増大させた。一方で、*ndhM pgr5* 二重変異株においては、当該のシフトは観察されなかった (図6D2)。これらの結果は、680 nm 光の増大に伴うシフトは系Iサイクリックの二つの経路 (NDH および PGR5 依存) の両方に帰することができることを示す。720 nm 光照射後のシフトが NDH 依存 CEF-PSI に依存し、PGR5 依存 CEF-PSI は関与しなかった (図3A1, B1, C1, D1) こととは対照的であ

問題がある。得られた結果は明確であるが、イレギュラーとも言える測定条件（測定光が光合成を誘導する）においてであり、再検討を要する。遅延蛍光法により得られた結果—PGR5 依存 CEF-PSI は赤外光に反応しない（図 6 A1, B1, C1, D1）—は、同経路が強光下で機能する（弱光下では機能しない）との結果（図 3 ABCD）と同義かもしれない。これは、赤外光は系IIの励起が弱いため用いた赤外光（ $132 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ）が光合成にとって単に弱い光として感知された可能性があるためである。この点を確認するにはより強い赤外光を用いるしかないが、現有の装置（藻類用に開発されたもの）の制限により実行できていない。赤外光（720 nm）に反応しないとの結果を補強するために、より弱い赤色光（680 nm,  $54 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ）を用いた。予想通り、弱光の赤色光に対して *ndhM* 変異株は反応した（図 6B2）が、肝心のピーク（肩）の形状が不明瞭であり、結果として不安が残った。

本研究では、当初の予想に反して PGR5 依存 CEF の PIFI シグナルを検出できた。遅延蛍光法により両 CEF 経路の波長依存性の違いを示唆する結果も得られた。これらは、系 サイクリック電子伝達反応の検出がより安定的に行えるようになった成果である。今後、メーラー反応と系 サイクリック電子伝達反応の相互作用を様々な環境条件下で調べることで、針葉樹がどのようにして光の害を回避するのかを理解できるようになるとと思われる。



**図 6 シロイヌナズナにおける遅延蛍光強度の変化**

測定は野生株 WT (A1, A2), *ndhM* 変異株 (B1, B2), *pgr5* 変異株 (C1, C2), *ndhM pgr5* 変異株 (D1, D2) において行った。葉に 11 (黒線) または  $132 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (赤線) の 720 nm (A1-D1) の作用光を、1.5 (黒線) または  $54 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (赤線) の 680 nm (A2-D2) の作用光を 5 分間照射した。作用光照射停止後 5 分間遅延蛍光の減衰を記録した。3-5 回の実験における代表的な結果を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 津山孝人
2. 発表標題 針葉樹の光合成機能解析III - 系 サイクリック電子伝達反応の検出条件 -
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津山孝人
2. 発表標題 針葉樹の光合成機能解析 - 光化学系 サイクリック電子伝達反応の抑制 -
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津山孝人
2. 発表標題 針葉樹の光合成機能解析 - 光化学系 サイクリック電子伝達反応の検出 -
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------