

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03017

研究課題名（和文）常緑針葉樹の光合成調節機構の複合体プロテオミクスおよび分光学的手法による統合的解析

研究課題名（英文）Integrated analysis of the complex proteomics and spectroscopic methods for the photosynthetic regulatory mechanisms in evergreen conifers.

研究代表者

田中 亮一（Tanaka, Ryouichi）

北海道大学・低温科学研究所・教授

研究者番号：20311516

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：一般的に植物は低温下において、光合成電子伝達が原因となる傷害を起こすことが知られている。常緑樹はこのような傷害を防ぐため、冬季は光化学系IIでの持続的な熱放散を行っている。本研究では、この熱放散の分子機構を明らかにするため、イチイ、トドマツなどの常緑針葉樹を材料として、複数の光環境下において、RNA、タンパク質、タンパク質複合体、光合成色素、光合成エネルギー移動に関する総合的な解析を行い、ELIPとよばれる色素結合タンパク質がこのプロセスに関わることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物が低温で光傷害を起こすという現象は広く知られている。このような光傷害への感受性には種間差がある。また、さまざまな環境要因が光傷害への感受性に影響をしている。本研究は、なぜ常緑樹は低温での光傷害に強いのか、という疑問を出発点として、その仕組みの一端の解明につながる発見をした。とくにELIPという色素結合タンパク質が冬季の光化学系での熱放散に関わることを示すデータを得た。また、樹種によって、複数の熱放散の分子機構を持つ可能性を示す知見を得た。このような知見は、常緑樹の低温での光感受性の分子基盤として、将来、森林学、生態学の分野において活用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Generally, it is known that plants suffer damage due to photosynthetic electron transport at low temperatures. Evergreen trees prevent such damage by performing sustained thermal dissipation through photosystem II during wintertime. In this study, we conducted comprehensive analysis of RNA, proteins, protein complexes, photosynthetic pigments, and energy transfer related to photosynthesis with several different evergreen species including *Taxus cuspidata*, *Abies sachalinensis*, and a few other species, and indicated that a pigment-binding protein called early light-induced protein is involved in this thermal dissipation process.

研究分野：光合成

キーワード：光合成 樹木

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 寒冷圏で常緑樹が越冬するためには、細胞や組織が凍結耐性をもつだけでなく、光化学系が光傷害を受けないことが重要である。寒冷圏では、冬季においては、細胞内の代謝活性が大きく低下することにより、光化学系電子伝達で発生する電子を受容する物質が不足するため、電子伝達によって活性酸素が生じるリスクが高くなる。活性酸素による傷害を防ぐためには、光化学系電子伝達を抑制する必要がある。一般的に常緑樹においては、冬季に光化学系 II において励起エネルギーを熱として放散することにより、光化学系 II における電荷分離が抑制されることが知られており、この応答は持続的な熱放散として知られている。しかし、このような冬季の熱放散を引き起こす分子の実体や機構については明らかになっていなかった。

(2) 冬季の持続的な熱放散の分子機構に関する仮説としては、カロテノイドの一種であるゼアキサンチンの蓄積が熱放散を引き起こす、強光で蓄積すると言われる **Early light-induced protein (ELIP)** が関与している、光化学系 II の分解 (光障害) がおきる、などいくつかの仮説が提唱されていた。また、この研究を開始してまもなくのころ、Bagら(2020)によって、光化学系 II から光化学系 I への励起エネルギーの移動 (スピルオーバー) がこの分子機構の実体である、という論文が報告された。これらの仮説、および本研究における結論を図 1 にまとめた。

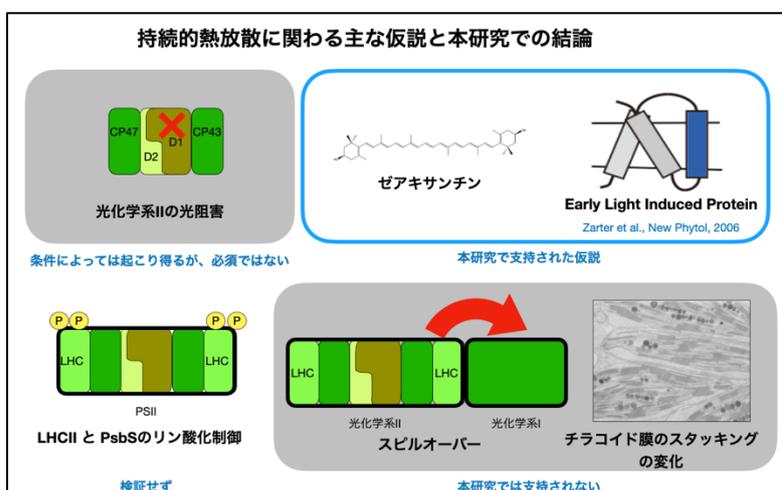


図 1: 冬季の持続的な熱放散の分子機構に関する主な仮説および本研究の結論

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、北海道に生息する代表的な常緑樹を材料として、各種の光合成に関するパラメーターの測定、RNA-Seq、光合成色素の変動、タンパク質およびタンパク質複合体の変動を解析することにより、これまでに提唱されていた仮説を検証しつつ、冬季の持続的な熱放散の分子機構を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

森林総研北海道支所にて、イチイ、ドドマツ、エゾマツ、エゾアカマツの苗を栽培し、それぞれ、Open 条件 (直射日光が当たる条件) と Shaded 条件 (寒冷紗によって被陰した条件) で生育した。(ヒノキアスナロも当初育成していたが、生育がよくなかったため、後日、実験から外した。) また、北大・低温研にてイチイの成木 (8 m 程度) およびツルマサキも研究に供した。これらの樹木の光化学系 II 最大量子収率 (Fv/Fm) や環境光における量子収率 (Phi2) の測定および光合成色素 (クロロフィル 2 種およびカロテノイド 7 種) の測定を年間を通して行った。

さらに、光化学系のサブユニットのタンパク質量を正確に行うため、多数のサンプルを扱う方法を開発した (この手法については一部、改良中)。光化学系 II や光化学系 I、アンテナタンパク質 LHC などの定量を行った。また、光化学系を Clear-native PAGE で分離し、光化学系の量を見積もった。また、持続的な熱放散に関わるタンパク質の同定のため、電気泳動を行ったゲルを網羅的に切り出し、質量分析によってタンパク質を同定した。

さらに、上記の常緑樹のチラコイド膜の抽出方法を開発し、チラコイド膜の時間分解クロロフィル蛍光測定を行い、夏および冬のイチイおよびツルマサキにおけるチラコイド膜内でのエネ

ルギー移動を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 年間を通じた Fv/Fm および Phi2 の変化

森林総研における4つの樹種、および、低温研にて育成している2つの樹種に関して、いずれにおいても冬季において、Fv/Fm および Phi2 の低下が観察された。ほぼ例外なく、冬季においても、Fv/Fm が Phi2 よりも若干高くなる現象がみられたことから、冬季においてもチラコイド膜における光合成電子伝達およびチラコイド膜での  $\Delta$ pH 形成がある程度行われていることが確認できた。上記の樹種において、森林総研において、Open 条件で育てた4つの樹種においてはとくに Fv/Fm および Phi2 の低下が顕著であった。森林総研において、一定光条件下で測定したクロロフィル蛍光の結果可から、冬季には PhiNO が高いことが示されたが、これは、冬季における持続的熱放散の増大を示している。

冬季の Shaded 条件において、イチイとトドマツは比較的高い、Phi2、Fv/Fm の値を示し、春先の持続的熱放散からの回復が早かった。一方、エゾマツ、アカエゾマツは同じ条件では比較的 Phi2、Fv/Fm とともに低い値を示し、持続的熱放散からの回復はイチイ、トドマツに比べて2週間程度遅くなった。Open 条件においては、いずれの樹種も Phi2、Fv/Fm とともに低い値を示し、春先の持続的熱放散からの回復も遅かった。

##### (2) 光合成色素の解析

いずれの場合にも冬季において、zeaxanthin の顕著な増加と violaxanthin の減少が観察された。とくに、chlorophyll あたりにおいても zeaxanthin の増加が顕著であったことから、これらの zeaxanthin は光化学系タンパク質には結合していない可能性が示唆された。一方で、Open 条件では、chlorophyll 量自体の現象がみられた。この結果は、Open 条件では葉がダメージを受けて、チラコイド膜自体が減少したと考えられた。この結果は Open 条件における光阻害を示唆している。森林総研の4つの樹種は Open 条件では年間を通して、比較的高い zeaxanthin 量を維持したが、Shaded 条件では、夏には大きく減少した。これらの結果は、光合成色素の応答には、季節に応答している要素と光強度（あるいは光ストレス）に応答している要素があることを示唆している。これらの光合成色素の変化は、低温研のイチイやツルマサキにおいても基本的に同様であった。

##### (3) RNA-Seq 解析

RNA-Seq 解析は低温研のイチイおよびツルマサキを材料として行った。いずれにおいても、冬季に顕著な ELIP mRNA の蓄積が見られた。とくにイチイにおいては、冬季の mRNA の 20%程度を占めるまでに ELIP mRNA が増加した。イチイにおいては、ELIP mRNA は 40 種類程度のアイソフォームがあると推定された。光化学系のサブユニットの遺伝子発現は冬季は全体的に減少していたが、この結果は、下記に述べるタンパク質発現の結果とは完全には一致せず、光化学系タンパク質に関しては、転写後制御や安定性が蓄積に大きく影響すると推測される。

##### (4) タンパク質複合体および光化学系タンパク質の解析

Open 条件においては、光化学系 II の D1 タンパク質の量は冬季に大きく減少した。一方、Shaded 条件においては、D1 タンパク質の量は緩やかに減少した。この結果は、Open 条件では強い光阻害が起きていることを示唆している。一方、Shaded 条件での緩やかな D1 の減少は、持続的熱放散を説明できるほどは大きくはなく、光阻害以外の持続的熱放散の機構が存在していることが示唆された。

Clear-Native PAGE による複合体の解析では、低温研のイチイは冬季も相当量の光化学系 II、光化学系 I を維持していることが示されたが、ツルマサキにおいては、光化学系 II が顕著に減少した。これは光化学系 II の応答、とくに光阻害に関して樹種、および、環境の差が大きく影響することを示している。

抗 ELIP 抗体を数種類作成したが、これらは、イチイおよびツルマサキにしか反応をしなかった。他の樹種については、質量分析の結果などを加味して ELIP の量を推定した。イチイおよびツルマサキに関しては、冬季に大量の ELIP が蓄積しており、その量は光化学系アンテナタンパク質と比較できるほどのレベルに達していた。トドマツ、エゾマツ、アカエゾマツにおいても、冬季に ELIP の蓄積がみられたが、イチイの数分の一程度の量ではないかと推定された。

##### (5) 時間分解クロロフィル蛍光測定

イチイのチラコイド膜（夏及び冬の試料）の時間分解クロロフィル測定を行ったところ、冬季の試料に置いては、非常に早い時間帯（30 - 40 psec）において、光化学系 II のアンテナにおいてクエンチングが起きていることが示唆された。ツルマサキにおいても光化学系 II の領域での蛍光寿命が短くなる現象が観察されたが、季節ごとのばらつきが大きいと、どの時間帯での変化が大きく寄与しているか、という点に関してはさらなる解析が必要な状況である。

一方、Bagら(2020)が指摘していたスピルオーバーに関しては、イチイおよびツルマサキにお

いて、夏季と冬季で大きな変化は観察されなかった。その他の樹種で持続的熱放散へのスピルオーバーの関与を排除できるものではないが、別途、横野ら(2008) がイチイでチラコイド膜のスタッキングの増減を調べた結果を考慮しても、必ずしも持続的熱放散の強い時期にチラコイド膜のスタッキングが緩むわけではないことから、スピルオーバーの関与は必須ではないと考えられる。

本研究を通じて、冬季の持続的熱放散をタンパク質、タンパク質複合体、光合成色素、RNA-Seq の解析によって、これまでよりも詳細に解析することができた。とくに、冬季の光化学系 II アンテナでのクエンチング、そして、ELIP の関与を示唆することができた。また、樹種や光条件に応じて、光阻害(光化学系 II の D1 サブユニット)を伴う量子収率の低下とこれによらない量子収率の低下の 2 種類があることを示すことができた。

#### 引用文献

- Bag, P., Chukhutsina, V., Zhang, Z., Paul, S., Ivanov, A.G., Shutova, T., et al. (2020) Direct energy transfer from photosystem II to photosystem I confers winter sustainability in Scots Pine. *Nat Commun.* 11: 6388.
- Yokono, M., Akimoto, S., and Tanaka, A. (2008) Seasonal changes of excitation energy transfer and thylakoid stacking in the evergreen tree *Taxus cuspidata*: How does it divert excess energy from photosynthetic reaction center? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* 1777: 379-387.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitao Mitsutoshi, Yazaki Kenichi, Tobita Hiroyuki, Agathokleous Evgenios, Kishimoto Junko, Takabayashi Atsushi, Tanaka Ryouichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Exposure to strong irradiance exacerbates photoinhibition and suppresses N resorption during leaf senescence in shade-grown seedlings of fullmoon maple ( <i>Acer japonicum</i> )	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1006413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2022.1006413	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kohata Ryoa, Lim HyunSeok, Kanamoto Yuki, Murakami Akio, Fujita Yuichi, Tanaka Ayumi, Swingley Wesley, Ito Hisashi, Tanaka Ryouichi	4. 巻 136
2. 論文標題 Heterologous complementation systems verify the mosaic distribution of three distinct protoporphyrinogen IX oxidase in the cyanobacterial phylum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 107 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-022-01423-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sapeta Helena, Yokono Makio, Takabayashi Atsushi, Ueno Yoshifumi, Cordeiro Andre M, Hara Toshihiko, Tanaka Ayumi, Akimoto Seiji, Oliveira M Margarida, Tanaka Ryouichi	4. 巻 74
2. 論文標題 Reversible down-regulation of photosystems I and II leads to fast photosynthesis recovery after long-term drought in <i>Jatropha curcas</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 336 ~ 351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/erac423	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Wada Naoki, Kondo Issei, Tanaka Ryouichi, Kishimoto Junko, Miyagi Atsuko, Kawai-Yamada Maki, Mizokami Yusuke, Noguchi Ko	4. 巻 131
2. 論文標題 Dynamic seasonal changes in photosynthesis systems in leaves of <i>Asarum tamaense</i> , an evergreen understorey herbaceous species	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Botany	6. 最初と最後の頁 423 ~ 436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/aob/mcac156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dey Debayan, Tanaka Ryouichi, Ito Hisashi	4. 巻 91
2. 論文標題 Structural Characterization of the Chlorophyllide a Oxygenase (CAO) Enzyme Through an In Silico Approach	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Evolution	6. 最初と最後の頁 225 ~ 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00239-023-10100-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maeda Hanaki, Takahashi Koharu, Ueno Yoshifumi, Sakata Kei, Yokoyama Akari, Yarimizu Kozue, Myouga Fumiyoshi, Shinozaki Kazuo, Ozawa Shin-Ichiro, Takahashi Yuichiro, Tanaka Ayumi, Ito Hisashi, Akimoto Seiji, Takabayashi Atsushi, Tanaka Ryouichi	4. 巻 135
2. 論文標題 Characterization of photosystem II assembly complexes containing ONE-HELIX PROTEIN1 in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 361 ~ 376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-022-01376-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dey Debayan, Dhar Dipanjana, Fortunato Helena, Obata Daichi, Tanaka Ayumi, Tanaka Ryouichi, Basu Soumalee, Ito Hisashi	4. 巻 19
2. 論文標題 Insights into the structure and function of the rate-limiting enzyme of chlorophyll degradation through analysis of a bacterial Mg-dechelataase homolog	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Computational and Structural Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 5333 ~ 5347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.csbj.2021.09.023	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukura Koki, Tanaka Ayumi, Tanaka Ryouichi, Ito Hisashi	4. 巻 266
2. 論文標題 Enrichment of chlorophyll catabolic enzymes in grana margins and their cooperation in catabolic reactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 153535 ~ 153535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jplph.2021.153535	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 田中亮一
2. 発表標題 常緑樹は低温下でどのように光障害を防いでいるのか？
3. 学会等名 第134回日本森林学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中亮一
2. 発表標題 寒冷圏の常緑樹はどのようにして低温下で光化学系を保護しているのだろうか？
3. 学会等名 組織と材質研究会2022年冬季シンポジウム「樹木の越冬メカニズム」（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中亮一
2. 発表標題 寒冷圏の常緑樹はなぜ低温下でも緑を保つことができるのか？
3. 学会等名 日本生化学会北海道支部会特別講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下原かこの、岸本純子、高林厚史、田中 亮一
2. 発表標題 常緑広葉樹ツルマサキの光化学系の年間変動
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Zihao Ye, Mina Sawada, Makiko Iwasa, Ryo Moriyama, Mitsutoshi Kitao, Toshihiko Hara, Ayumi Tanaka, Junko Kishimoto, Makio Yokono, Atsushi Takabayashi, Ryouichi Tanaka
2. 発表標題 Revisiting the ELIP hypothesis for sustained thermal dissipation in overwintering yew leaves
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 成田あゆ、小野清美、高林厚史、菅井徹人、北尾光俊、田中 亮一
2. 発表標題 常緑針葉樹4種における冬季の光合成色素・光化学系タンパク質の変動
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryouichi Tanaka, Ye Zihao, Mina Sawada, Makio Yokono, Makiko Iwasa, Ryo Moriyama, Toshihiko Hara, Ayumi Tanaka, Mitsutoshi Kitao, Junko Kishimoto, Atsushi Takabayashi
2. 発表標題 Revisiting the ELIP hypothesis for sustained thermal dissipation in overwintering yew leaves
3. 学会等名 International Congress on Photosynthesis Research 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryouichi Tanaka
2. 発表標題 Exploring the molecular mechanisms for sustained thermal dissipation in overwintering yew leaves
3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Regulation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ye Zihao, Mina Sawada, Ryo Moriyama, Makiko Iwasa, Toshihiko Hara, Ayumi Tanaka, Atsushi Takabayashi, Ryouichi Tanaka: Changes in the transcriptomes and the photosynthetic responses in overwintering Yew leaves
2. 発表標題 Changes in the transcriptomes and the photosynthetic responses in overwintering Yew leaves
3. 学会等名 第7回 北大・部局横断シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下原かのこ, 高林厚史, 田中亮一
2. 発表標題 ツルマサキにおける $\beta$ -carotene および lactucaxanthin の光化学系複合体への結合
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 亀尾辰砂, 松前れのん, 田中亮一, 高林厚史
2. 発表標題 光化学系タンパク質複合体の安定な分離のための CN-PAGE の改変
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Zihao Ye, Mina Sawada, Ryo Moriyama, Toshihiko Hara, Ayumi Tanaka, Atsushi, Takabayashi, Ryouichi Tanaka
2. 発表標題 Correlation of winter-specific gene expression and sustained thermal dissipation in over-wintering yew leaves
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021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
研究 分担者	秋本 誠志  (Akimoto Seiji)  (40250477)	神戸大学・理学研究科・准教授   (14501)	
研究 分担者	北尾 光俊  (Kitao Mitsutoshi)  (60353661)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等   (82105)	

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
---------	---------