

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450079

研究課題名(和文) 光合成生物での、糖由来活性カルボニル化合物の生成・毒性および解毒メカニズムの解明

研究課題名(英文) Scavenging system of reactive carbonyl species in photosynthesis organisms

研究代表者

三宅 親弘 (Miyake, Chikahiro)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80294289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：活性カルボニル化合物(RCS)の解毒メカニズムとRCS毒性解明を行った。光合成に伴い活性酸素(ROS)が常に生成し、ROSによるチラコイド膜脂質酸化によりRCSが生成することを見出した。RCSは葉緑体で生成する。葉緑体局在RCS解毒酵素alkenal-one oxidoreductase (AOR)を欠損した植物では、RCSの蓄積とともに呼吸阻害が認められ、呼吸基質であるデンプンの分解系が酸化障害を受けることを見出した。このことが、植物の生育抑制の原因であることを明らかにした。つまり、AORは、光合成で生成するRCSを無毒化する機能をもつことを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the toxicity and scavenging mechanism of reactive carbonyl species (RCS) in higher plants. We found that in photosynthesis reactive oxygen species (ROS) was produced, and ROS oxidized lipids in thylakoid membranes of chloroplasts to produce RCS. In the mutant of Arabidopsis which was deficient in the enzyme (alkenal-one oxidoreductase (AOR)) to scavenge RCS, RCS accumulated and decreased respiration rate. RCS oxidatively inactivated the degradation enzymes of starch. The inactivation of respiration was the reason why the mutant showed the retarded growth, compared to wild type. That is, AOR functioned to detoxify RCS which produced in illuminated chloroplasts.

研究分野：植物生理学

キーワード：光合成

1. 研究開始当初の背景

本課題では、 $\square\square\square$ -不飽和カルボニル (以下、活性カルボニル RCS) の生成、解毒メカニズムの解明に取り組んだ。現在、RCS の生成経路は、生体内代謝活動の中で生成する活性酸素(ROS)による脂質過酸化分解によるものとされている。RCS は、ひとたび生成すれば、膜脂質のさらなる酸化・修飾分解、DNA およびタンパク質の修飾による機能損失をもたらす。ROS と比べて寿命が長い RCS の危険性は非常に高いと認識されている。

植物は自身が生きていくために太陽光のエネルギーを用いて二酸化炭素から糖を生合成する代謝活動、光合成、を葉緑体で営んでいる。この光合成で二酸化炭素を還元し糖を生合成する過程で、太陽光のエネルギーが化学エネルギー (NADPH および ATP) の形で二酸化炭素へ注ぎこまれる。このことは、当たり前のように教科書に記載されるが、光合成過程が安全にスムーズに進行していないことが最近の研究で明らかになってきた。これは、植物の光合成能力を上回る太陽光のエネルギーに植物は常にさらされるということ、あるいは植物が生育する環境は必ずしも光合成能力を 100% 発揮させる状況にないことなどが提唱されてきている。このような状況では、二酸化炭素に注ぎ込まれる以上の太陽光エネルギーに植物はさらされることになってしまう。この余剰の光エネルギーは葉緑体で光エネルギーを化学エネルギーに変換する場である葉緑体チラコイド膜で酸素(O₂)にわたり ROS が生成すると考えられている。

2. 研究の目的

本課題では、生化学的な解析で RCS を解毒することができ、かつ葉緑体に局在する酵素 alkenal-one oxidoreductase (AOR) を欠損した植物を用いることで、葉緑体での ROS 生成、そして ROS による RCS 生成、さらに RCS による代謝活動への障害の把握と作用機作の解明を目論んだ。

3. 研究の方法

(1) 光合成解析①CO₂固定解析では、赤外線分析システム(Li-7000, LiCor 社)を用いて生葉での CO₂ 取り込み、蒸散測定を行った。

②O₂発生解析では、Hansatech 社の O₂ 電極を用いて行った。

(2) クロロフィル蛍光解析: Walz 社の PAM をもちいて光合成電子伝達反応解析を行った。

(3) AOR 欠損株の作成: RNAi 手法を用いてシロイヌナズナで作成した。

(4) 遺伝子発現解析: Real-time PCR 解析にて、呼吸、光合成、デンプン分解にかかわる遺伝子の mRNA の定量解析を行った。

(5) デンプン蓄積解析: 電子顕微鏡観察により、葉緑体でのデンプン粒のカウント法を用いて定量を行った。

4. 研究成果

用いた植物は、シロイヌナズナ野生型(WT)および AOR の RNAi 株(deltaAOR)である。DeltaAOR での AOR の酵素活性は WT の約 60% へ低下していた。非常に大きな違いは両者の生育において認められた(図 1)。

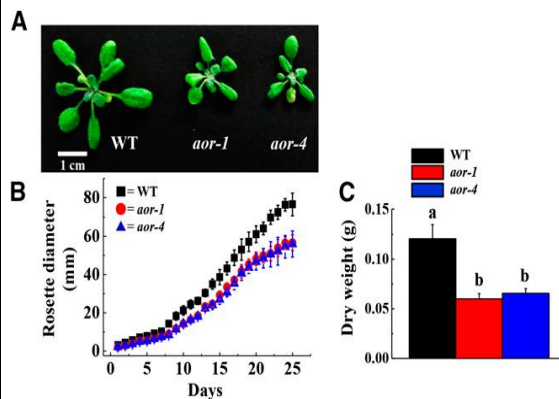
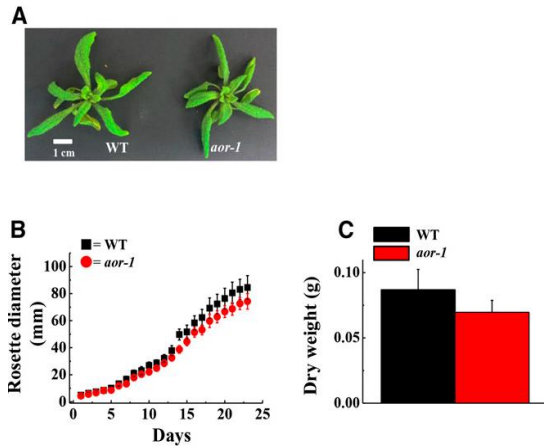


図 1 A. WT および deltaAOR (aor-1 および aor-2) の生育写真; B. 生育に伴う個体直径の遷移; C. WT および deltaAOR での個体乾燥重の比較。

明暗サイクルで生育させると、deltaAOR では WT の生育と比べて抑制され、乾燥重量では WT の 40% に過ぎなかった。さらに、個体サイズ、クロロフィル量、さらに生葉における窒素量も WT に比べて減少が認められた。一方、24 時間明期で両者を生育させると乾燥重量、個体サイズの違いは認められなかった(図 2)。これらの結果は、delta-AOR では呼吸能の損失が生じている可能性を示唆した、そこで、WT および deltaAOR での生葉の呼吸速度の比較を行ったところ、deltaAOR の

呼吸速度が WT の約 40%へ低下しているこ



とを見出した。

図2 24時間明期での生育比較 A. WT および deltaAOR (*aor-1*)の生育写真；B. 生育に伴う個体直径の遷移；C. WT および deltaAOR での個体乾燥重の比較。

AOR は葉緑体局在酵素である。植物における呼吸基質のスタートは光合成で生成し蓄積するデンプンであり、それは葉緑体に貯蔵される。そこで、deltaAOR において呼吸能低下の分子メカニズムを明らかにすべく、葉緑体でのデンプン蓄積量の比較を行った (図3)。その結果、明暗サイクルの生育条件で、明期の終わりでのデンプン蓄積量は WT および deltaAOR 間で差は見いだされなかった。しかしながら、暗期終わりでのデンプン蓄積量が deltaAOR において WT と比べ顕著に多いことが明らかとなった。これらの結果は、WT が健全に生育する環境で常に RCS 生成が生じていることを示唆している。

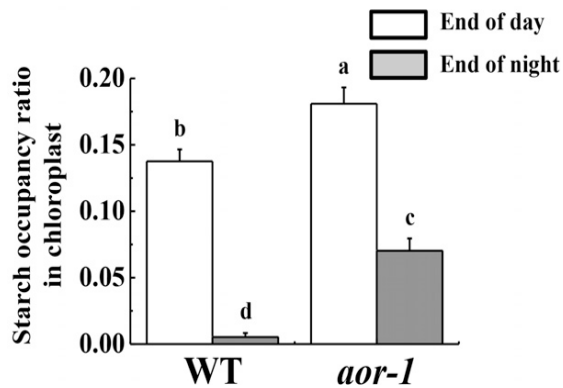


図3 WT および deltaAOR (*aor-1*)での葉緑体デンプンの蓄積量の比較： End of day, 明期の終わり；End of night, 暗期の終わり。

つぎに、RCS 生成のメカニズムを検証するために ROS 生成量の比較を WT および deltaAOR 間で行った。その結果、deltaAOR において、ROS である H₂O₂ の蓄積が顕著に認められた (図4)。



図4 H₂O₂ 検出試薬による生葉での H₂O₂ 蓄積量を WT および deltaAOR (*aor-1*)間で比較。色が濃いほど H₂O₂ が蓄積している。

また H₂O₂ は葉緑体における光合成にかかわる酵素の活性を低下させることが知られている。実際に、カルビンサイクル酵素である fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase) および phosphoribulokinase (PRK) の酵素活性が deltaAOR では WT よりも小さい値で会った。また、これら酵素の失活は、高 CO₂ 環境下での deltaAOR の光合成速度を WT よりも低下させる原因となっていた。これらの結果は、ROS が光合成に伴い常に生成し、RCS 生成をもたらしていることを示している。

将来的に地球温暖化をもたらす CO₂ の蓄積、つまり高 CO₂ 環境において、光合成速度はカルビン回路の初発反応を触媒する ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) carboxylase/oxygenase (Rubisco) により律速されず、RuBP 再正反応をになるカルビンサイクル酵素 FBPase などにより律速される。今回の研究成果は、将来的地球環境で生育する植物の光合成および生育を支える分子メカニズムを解明したことになる。なぜなら、RCS 解毒酵素 AOR は、カルビンサイクル酵素の機能を保護する役割をもっていることが明らかにされたからである。さらに、地球温暖化では顕著な気温の上昇に至る。植物の呼吸速度は、気温上昇に敏感であり、呼吸を維持保護する AOR 酵素の役割は、さらに要求されることが当然期待される。地球温暖化にさらされる植物・作物において AOR による RCS 解毒昨日は非常に重要なものとなる

であろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Daisuke Takagi, Katsumi Amako, Masaki Hashiguchi, Hidehiro Fukaki, Kimitsune Ishizaki, Goh Tatsuki, Yoichiro Fukao, Ryosuke Sano, Tetsuya Kurata, Taku Demura, Shinichiro Sawa and Chikahiro Miyake (2017) Chloroplastic ATP synthase builds up proton motive force for preventing reactive oxygen species production in photosystem I. **Plant Journal** (doi: 10.1111/tbj.13566)
2. Hitomi Hanawa, Daisuke Takagi, Ginga Shimakawa, Kana Nohira, Takehiro Sejima, Kei-ichiro Shaku, Amane Makino, Chikahiro Miyake (2017) Land plants drive photorespiration as higher electron-sink: Comparative study of post-illumination transient O₂-uptake rates from liverworts to angiosperms through ferns and gymnosperms. **Physiologia Plantarum** (doi: 10.1111/pp.12580).
3. Daisuke Takagi, Kimitsune Ishizaki, Hitomi Hanawa, Tomohito Mabuchi, Ginga Shimakawa, Hiroshi Yamamoto, Chikahiro Miyake (2017) Diversity of strategies for escaping reactive oxygen species production within photosystem I among land plants: P700 oxidation system is prerequisite for alleviating photoinhibition in photosystem I. **Physiologia Plantarum** (doi: 10.1111/pp.12562)
4. Ginga Shimakawa, Kimitsune Ishizaki, Shigeyuki Tsukamoto, Moeko Tanaka, Takehiro Sejima, Chikahiro Miyake (2017) The liverwort, *Marchantia*, drives alternative electron flow using a flavodiiron protein to protect PSI. **Plant Physiology** 173, 1636-1647.
5. Ginga Shimakawa, Yusuke Matsuda, Kensuke Nakajima, Masahiro Tamoi, Shigeru Shigeoka, Chikahiro Miyake (2016) Diverse strategies of O₂ usage for preventing photo-oxidative damage under CO₂ limitation during algal photosynthesis. **Scientific Reports** 7, 41022.
6. Takagi, D., Takumi, S., Hashiguchi, M., Sejima, T., Miyake, C. Superoxide and singlet oxygen produced within the thylakoid membranes both cause photosystem I photoinhibition. *Plant Physiol.* 171: 1626-1634. 2016.
7. Takagi, D., Ifuku, K., Ikeda, K. I., Inoue, K. I., Park, P., Tamoi, M., Inoue, H., Sakamoto, K., Saito, R., Miyake, C. Suppression of chloroplastic alkenal/one oxidoreductase represses the carbon catabolic pathway in *Arabidopsis* leaves during night. *Plant Physiol.* 170: 2024-2039. 2016.
8. Shimakawa, G., Shaku, K., Miyake, C. Oxidation of P700 in photosystem I is essential for the growth of *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Plant Physiol.* 2016. In press. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.16.01227>.
9. Shaku, K., Shimakawa, G., Hashiguchi, M., Miyake, C. Reduction-induced suppression of electron flow (RISE) in the photosynthetic electron transport system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* 57: 1443-1453. 2016.
10. Sejima, T., Hanawa, H., Shimakawa, G., Takagi, D., Suzuki, Y., Fukayama, H., Makino, A., Miyake, C. Post-illumination transient O₂-uptake is driven by photorespiration in tobacco leaves. *Physiol. Plant.* 156: 227-238. 2016.
11. Takagi, D., Hashiguchi, M., Sejima, T., Makino, A., Miyake, C. Photorespiration provides the chance of cyclic electron flow to operate for the redox-regulation of P700 in photosynthetic electron transport system of sunflower leaves. *Photosynth. Res.* 129: 279-290. 2016.
12. Shimakawa, G., Akimoto, S., Ueno, Y., Wada, A., Shaku, K., Takahashi, Y., Miyake, C. Diversity in photosynthetic electron transport under [CO₂]-limitation: the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 and green

- alga *Chlamydomonas reinhardtii* drive an O₂-dependent alternative electron flow and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence during CO₂-limited photosynthesis. *Photosynth. Res.* 2016. In press. DOI: 10.1007/s11120-016-0253-y.
13. Shimakawa, G., Shaku, K., Nishi, A., Hayashi, R., Yamamoto, H., Sakamoto, K., Makino, A., Miyake, C. FLAVODIIRON2 and FLAVODIIRON4 proteins mediate an oxygen-dependent alternative electron flow in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under CO₂-limited conditions. *Plant Physiol.* 167: 472-480. 2015.
 14. Anegawa, A., Ohnishi, M., Takagi, D., Miyake, C., Shichijo, C., Ishizaki, K., Fukaki H., Mimura, T. Altered levels of primary metabolites in response to exogenous indole-3-acetic acid in wild type and auxin signaling mutants of *Arabidopsis thaliana*: A capillary electrophoresis-mass spectrometry analysis. *Plant Biotechnol.* 32: 65-79. 2015.

[学会発表] (計 11 件)

(1) 国際光合成会議 (2017) (オランダ)

1. Hitomi Hanawa, Daisuke Takagi, Ginga Shimakawa, Kana Nohira, Amane Makino, Chikahiro Miyake (2017) O₂ usage determines photorespiration activity to function as electron sink.
2. Ginga Shimakawa, Chikahiro Miyake (2017) Oxidation of P700 in PSI is essential for the growth of cyanobacteria.
3. Takagi Daisuke, Katsumi Amak2, Masaki Hashiguchi, Hidehiro Fukaki, Kimitsune Ishizaki, Tatsuaki Goh, Yoichiro Fukao, Ryosuke Sano, Tetsuya Kurata, Taku Demura, Shinichiro Sawa, Chikahiro Miyake (2017) Chloroplastic ATPsynthase functions as an H⁺-gatekeeper to prevent the over-reduction state in photosystem I: H⁺-efflux management is critical for the regulation of ΔpH across the thylakoid membranes

(2) 日本植物生理学会(2016)岩手大会

1. Hitomi Hanawa, Takehiro Sejima, Ginga Shimakawa, Eriko Yamamoto,

Daisuke Takagi, Hiroshi Fukayama, Yuji Suzuki, Amane Makino, Chikahiro Miyake. Characterization of post-illumination transient O₂-uptake in intact leaves of higher plants.

2. Ginga Shimakawa, Ayumi Wada, Keiichiro Shaku, Seiji Akimoto, Yoshifumi Ueno, Yusuke Matsuda, Kensuke Nakajima, Yuichiro Takahashi, Chikahiro Miyake. Diversity of the response of photosynthetic electron transport to Low-[CO₂]: O₂ uses and the Use-nots.
3. Masaaki Hashiguchi, Daisuke Takagi, Katsumi Amako, Hidehiro Fukaki, Kimitsune Ishizaki, Tatsuaki Goh, Chikahiro Miyake. H⁺-efflux regulation by chloroplast localized ATPsynthase modulate the redox state of photosynthetic electron transport chain in higher plants.

(3) 日本植物生理学会 (岩手大会) シンポジウム

Daisuke Takagi, Masaaki Hashiguchi, Amane Makino, Chikahiro Miyake. Photorespiration, instead of cyclic electron flow around photosystem I, determines the oxidized state of P700 at low CO₂ concentration in sunflower leaves.

(4) 日本植物生理学会(2017)鹿児島大会

1. 嶋川銀河、石崎公衛、田中萌子、高木大輔、塙仁美、三宅親弘。基部陸上植物における PSI 防御戦略：ゼニゴケにおいて Flavodiiron タンパク質は P700 酸化に働く。
2. 高木大輔、小原綾夏、門田かなえ、伊福健太郎、三宅親弘。連続的パルス照射を用いた活性カルボニル解毒酵素(AOR)における PSI 防御メカニズムの解明
3. 塙仁美、高木大輔、嶋川銀河、牧野周、三宅親弘。陸上植物は高いエレクトロンシンク能として光呼吸が働く。

(5) 日本植物生理学会 (岩手大会) シンポジウム

Daisuke Takagi, Chikahiro Miyake. Molecular Mechanism for the regulation of reactive oxygen species production within photosystem I in vivo.

[その他]

- (1) シンポジウム企画 (オーガナイザー) 日本植物生理学会 (岩手大会) Diversity of respiration in photosynthetic organisms: Strategy for O₂-usages in photosynthesis.

- (2) 国際シンポジウム (オーガナイザー)

「日本植物生理学会（鹿児島大会）」（オーガナイザー） Production mechanisms of reactive oxygen species and molecular mechanisms of PSI photoinhibition in higher plants.

(3) ホームページ

<https://www.p700-oxidation-system/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 親弘 (Miyake Chikahiro)

神戸大学・大学院・農学研究科・准教授

研究者番号：0391167600