

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450200

研究課題名(和文) 針葉樹における光合成の安全弁 酸素還元反応 の解析と応用

研究課題名(英文) An analysis and application of a safety valve of photosynthesis (Mehler-like oxygen photoreduction) in conifers

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物の成長に光は必須であるが、強すぎる光は成長を阻害する。これは、過剰な光が光合成の不可逆的な阻害、すなわち光阻害を引き起こすためである。進化の過程で植物は、光阻害を回避する仕組みを発達させてきた。本研究では、クロロフィル蛍光法を応用して、裸子植物(針葉樹)はチラコイド膜における酸素還元反応(メーラー反応)の能力が高いことを明らかにした。被子植物はメーラー反応の能力は低い、光化学系 サイクリック電子伝達の能力が高かった。

研究成果の概要(英文)：Light is essential for plant growth, but too much light retards it. This is because excessive light inhibits photosynthesis irreversibly (photo-inhibition). During evolution, plants have developed mechanisms to avoid photo-inhibition. In this study, by applying chlorophyll fluorescence method, it was found that gymnosperms (conifers) have higher capacity of oxygen reduction in the thylakoid membrane (Mehler reaction) than angiosperms. Angiosperms had increased capacity of cyclic electron flow around photosystem I.

研究分野：樹木生理学

キーワード：針葉樹 裸子植物 被子植物 光合成 酸素 クロロフィル蛍光

1. 研究開始当初の背景

被子植物と裸子植物は雌性生殖器官の構造が異なることはよく知られている。前者は胚珠が子房に包まれているが、後者は子房を持たない。両者は一般に葉の構造も異なる(広葉と針葉)。しかし、これまで光合成に違いがあるとは考えられてこなかった。我々は以前、クロロフィル蛍光法を応用して、裸子植物と被子植物には光合成電子伝達反応の制御に違いがあることを見出した(引用文献)。その原因は、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)の能力の違いにあるとも示唆された。メーラー反応は酸素を電子受容体とするため、二酸化炭素が不足する条件下でも電子伝達鎖を電子が流れ、植物は光阻害を回避することができる。

2. 研究の目的

上記の違いがこれまで見落とされてきたのは、メーラー反応を検出する迅速で簡便な手法がなかったこと、そもそも裸子植物を用いた研究自体が少なかったことによる。メーラー反応の重要性は、藍藻シアノバクテリアの研究によって広く認識されている。しかし、被子植物はメーラー反応の能力が極めて低く、したがって生理的意義も相対的に低く見積もられる傾向にあった。一方、裸子植物の光合成に特別な関心が寄せられることは稀であり、高等植物の一構成要素として被子植物における場合と同様の解釈が裸子植物にまで適用されてきた。迅速で簡便な測定法があれば、より多くの植物種でメーラー反応の解析が進み、光合成制御に関する正確な理解が可能となる。

クロロフィル蛍光法は、光合成に伴う酸素の発生速度や二酸化炭素の吸収速度の測定と共に、光合成研究に広く用いられている。したがって、クロロフィル蛍光法の応用であれば波及効果は極めて高い。本研究では、クロロフィル蛍光法の応用によるメーラー反応の能力の迅速簡便評価法の確立を行った。測定法の確立とメカニズムの解析とは目的は異なるが、必要となるデータは共通するところが多い。これら二つを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

葉を暗適応(1時間程度暗所に放置し光の前歴をなくす)させた後、葉に飽和光パルス(太陽光と同程度の強さ[1,700 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$]で持続期間一秒間の光)を照射した。これによりクロロフィル蛍光強度は最低レベル F_0 から最大レベル F_m へと上昇する。飽和光パルス消灯後、クロロフィル蛍光強度は F_0 レベルまで再び低下する。本研究では、この蛍光の減衰の過程を解析した。材料として、各種被子植物および裸子植物、シロイヌナズナ循環的電子伝達突然変異体(*pgr5*)、シアノバクテリアメーラー反応欠損株(Δflv1)を用いた。

以下で示すシロイヌナズナとクロマツの結果は、それぞれ被子植物と裸子植物の結果を代表するものである。

4. 研究成果

図1はモデル植物シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)における飽和光パルス照射に対するクロロフィル蛍光強度の変化を示す(飽和光パルスは $t=0$ で照射)。シロイヌナズナ野生株においては、蛍光強度は飽和光パルス消灯後、蛍光強度は約30秒間掛けて元のレベル F_0 まで低下した(図1、黒線)。 F_m 値と F_0 値で標準化した図では、減衰は蛍光強度 1.0 (F_m レベル) から 0.25 付近までは比較的速いが、その後遅くなる。特に、3秒付近から減衰カーブには肩(shoulder)を持つことが分かった。

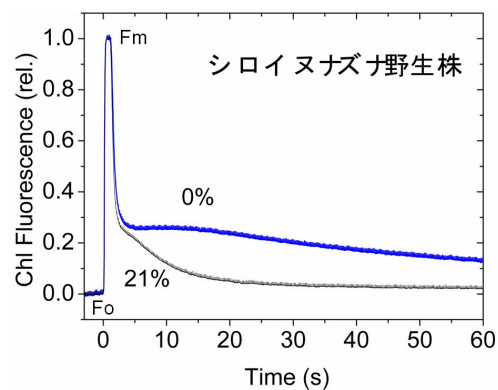


図1. シロイヌナズナ野生株における飽和光パルスの照射に対するクロロフィル蛍光強度の変化

クロマツ(*Pinus thunbergii*)の蛍光減衰はシロイヌナズナよりも速く、飽和光パルス消灯後約2-3秒で F_0 レベル付近まで低下した(図2、黒線)。興味深いことに、酸素を除去した気相中では、いずれの植物においても蛍光の減衰速度は著しく低下した。ただし、0% O_2 中でもなお、シロイヌナズナ野生株においての方がクロマツにおいてよりも減衰は遅かった(図1、2、青線)。酸素除去によりシ

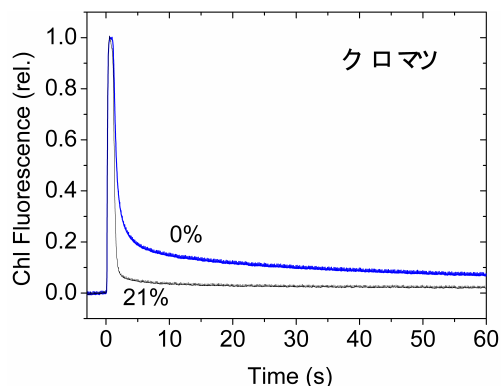


図2. クロマツにおける飽和光パルス照射に対するクロロフィル蛍光強度の変化

ロイヌナズナにおける減衰カーブの肩は一層大きくなった。以上の結果は、蛍光減衰が酸素に依存すること、クロマツはシロイヌナズナよりもその反応の能力が高いことを示唆する。

表 1 は、クロロフィル蛍光の減衰曲線の多成分解析の結果である。酸素存在下で測定された蛍光減衰曲線を、2 つまたは 3 つの成分 (Fast, Middle, Slow) から成る指数関数にフィットさせ、各成分の大きさ A (%) および半減期 $t_{1/2}$ (s) を得た。シロイヌナズナ野生株においては、半減期 199 ms の速い成分 (Fast) が減衰全体の約 84% を占めた。酸素なしの条件でもこの値は殆ど変化しなかった (表 1, 86%)。半減期は 295 ms に増大した (表 1)。一方、クロマツにおいては、21% O₂ 中で速い成分は全体の 97% を占めた (表 2)。シロイヌナズナと異なり、速い成分の大きさは酸素除去に伴い大きく低下した (表 2, 73%)。半減期はシロイヌナズナと同様に増大した (表 2)。以上の結果は、クロマツの高い酸素還元反応の能力は、速い成分の大きさ A (%) と半減期 $t_{1/2}$ (s) とで表すことができることを示す。

表 1. シロイヌナズナ野生株におけるクロロフィル蛍光の減衰パラメータ

	A (%)	$t_{1/2}$ (s)
21% O ₂		
Fast	84.2 ± 0.9	0.199 ± 5
Middle	-	-
Slow	15.8 ± 0.9	5.3 ± 1.2
0% O ₂		
Fast	85.5 ± 0.2	0.295 ± 7
Middle	-	-
Slow	14.5 ± 0.2	54.4 ± 4.4

表 2. クロマツにおけるクロロフィル蛍光の減衰パラメータ

	A (%)	$t_{1/2}$ (s)
21% O ₂		
Fast	97.3 ± 0.5	0.178 ± 11
Middle	-	-
Slow	2.7 ± 0.5	4.9 ± 1.1
0% O ₂		
Fast	72.7 ± 4.4	0.251 ± 35
Middle	18.6 ± 3.3	1.1 ± 0.1
Slow	8.7 ± 1.2	13.3 ± 1.2

藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 欠損株 *flavodiiron 1* ($\Delta flv1$) は、メーラー様反応を欠く。飽和光パルス消灯後の蛍光減衰を野生株と比較すると、 $\Delta flv1$ 欠損株の方が初期の減衰が

小さく、遅い成分が大きくなった (図 3)。成分分析の結果はこれを反映し、速い成分の大きさが約 10% 低下し、中間の成分が出現し、かつ、遅い成分が大きくなった (表 3)。野生株における速い成分の大きさはクロマツと同程度であり (-97%)、欠損株のそれはシロイヌナズナの値に近かった (84 - 87%)。一方、速い成分の半減期はシロイヌナズナとクロマツで差があったが (表 1, 2)、藍藻の二株には差が認められなかった。以上の結果は、蛍光減衰の速い成分の大きさはメーラー反応の能力を反映することを示す。半減期に関する矛盾は Flv タンパク質が関与しないメーラー反応を (シロイヌナズナにおいて) 仮定することで解消できるが、この点については今後の課題としたい。

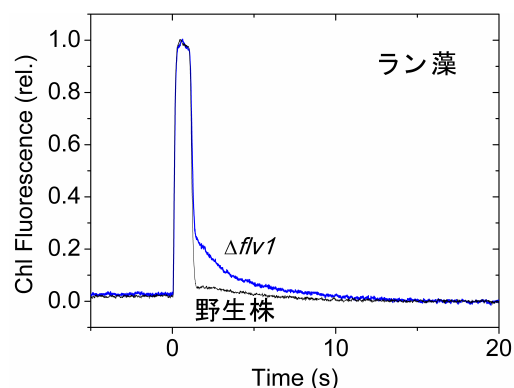


図 3. シロイヌナズナ野生株における飽和光パルスの照射に対するクロロフィル蛍光強度の変化

表 3. 藍藻野生株および $\Delta flv1$ 欠損株におけるクロロフィル蛍光の減衰パラメータ

	A (%)	$t_{1/2}$ (s)
WT		
Fast	97.3 ± 0.1	0.072 ± 1
Middle	-	-
Slow	2.7 ± 0.1	2.9 ± 0.2
$\Delta flv1$		
Fast	87.3 ± 1.0	0.075 ± 2
Middle	5.7 ± 1.7	0.95 ± 0.16
Slow	7.0 ± 2.0	2.9 ± 0.4

シロイヌナズナ突然変異体 *proton gradient regulation 5* (*pgr5*) は光化学系 サイクリック電子伝達に参与するタンパク質 PGR5 を欠く。光化学系 サイクリック電子伝達とは、光化学系 からの電子を系 受容体側から再びプラストキノールプールに戻す反応であり、NADPH の生成なしにチラコイド膜内外のプロトン濃度勾配を形成することができる。プロトン濃度勾配は ATP 生産の駆動力となる。図 4 に示すように、*pgr5* 変異株においては野生株 (図 1) で観察された蛍光減衰の肩がなく、減衰の遅い成分が大幅に縮小していた (図 4, 黒線)。肩の消失は無酸素条件

下でより一層明確であった(図1、3、青線)。以上の結果は、遅い成分や肩は、PGR5 依存系サイクリック電子伝達が関与することを示唆している。

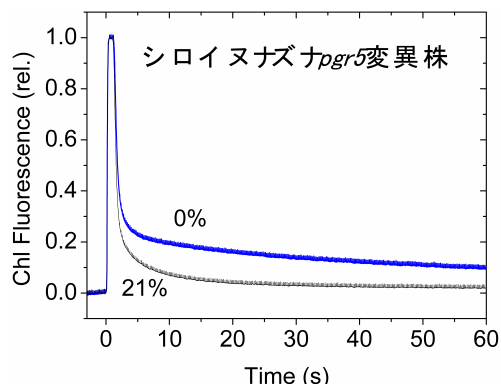


図4. シロイヌナズナ *pgr5* 変異株における飽和光パルス照射に対するクロロフィル蛍光強度の変化

表4は、*pgr5* 変異株における蛍光減衰の多成分解析の結果である。野生株(表1)との違いは、中間の成分(Middle)が現れる点、および、遅い成分(Slow)が小さくなる点である。酸素除去に伴い、野生株では遅い成分の半減期が非常に増大したが(5.54秒、表1)、*pgr5* ではあまり大きくならなかった(7.19秒、表3)。系サイクリック電子伝達の過程でPQプールは還元される。また、サイクリックにおける系からの電子の流出はPQプールの酸化を促進する。従って、遅い成分の縮小は、サイクリックによるPQプールの還元が停止するためではないかと思われる。中間の成分の出現は系からの電子の流出の停止が原因であると思われる。すなわち、中間と遅い成分は、系サイクリック電子伝達能力を反映すると考えられる。サイクリックの能力が高いほど、中間の成分が小さくなり、遅い成分が大きくなると思われる。

表3. シロイヌナズナ *pgr5* 変異株におけるクロロフィル蛍光の減衰パラメータ

	A (%)	t _{1/2} (s)
21% O ₂		
Fast	85.2 ± 0.3	0.233 ± 8
Middle	8.9 ± 1.1	1.7 ± 0.2
Slow	5.9 ± 1.4	6.9 ± 1.2
0% O ₂		
Fast	82.3 ± 0.6	0.254 ± 13
Middle	9.9 ± 1.0	1.1 ± 0.1
Slow	7.8 ± 0.4	18.5 ± 3.5

0%O₂ における減衰パラメータの値はクロマツと *pgr5* で似ていた。まず、中間の成分が共に検出された。また、遅い成分がシロイヌナズナ野生株と比べて小さい。これらの結果は、

クロマツでは系サイクリック電子伝達の能力が小さいことを示唆する。このため、0% O₂ 下でクロマツの減衰はシロイヌナズナ程には遅くなく、肩も無かったのかもしれない(図1、2)。

葉の暗適応および飽和光パルス照射は、本研究に特有の実験手順ではなく、クロロフィル蛍光測定において通常行われる。目的は、Fm レベルを求めることにより、Fv/Fm パラメータ (Fv = Fm - Fo) を得ることにある。このパラメータは光化学系の最大量子収率(光化学系の最大活性を反映する)を表すため、クロロフィル蛍光測定法の中でも最も広く利用されている。我々が注目したのはFmからの蛍光の減衰であり、Fv/Fm 測定の副産物と言える。蛍光減衰は、メーラー反応とサイクリック電子伝達能力を反映する。蛍光減衰パラメータは今後、Fv/Fm 値を補完する新たなパラメータとして、基礎研究から応用研究まで幅広く活用されることが期待できる。

<引用文献>

Shirao M, Kuroki S, Kaneko K, Kinjo Y, Tsuyama M, Förster B, Takahashi S, Badger MR (2013) Gymnosperms have increased capacity for electron leakage to oxygen (Mehler and PTOX reactions) in photosynthesis compared with angiosperms. *Plant Cell Physiol* 54:1152–1163. doi: 10.1093/pcp/pct066

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 0 件)

〔学会発表〕(計 9 件)

津山孝人、裸子植物と被子植物の光合成制御の違い、第128回日本森林学会年会、2017年3月26~29日、鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

津山孝人、偽循環的電子伝達能力の評価法、第58回日本植物生理学会、2017年3月16日~18日、鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

乗富真理、針葉樹の光ストレス耐性 - 変動光耐性の分子生物学的解析、第127回日本森林学会年会、2016年3月27日~30日、日本大学(神奈川県・藤沢市)

津山孝人、針葉樹は広葉樹よりも光合成の安全弁機能が高い、第127回日本森林学会年会、2016年3月27日~30日、日本大学(神奈川県・藤沢市)

中村将太、針葉樹における酸素依存光合成電子伝達反応の解析、第127回日本森林学会年会、2016年3月27日~30日、日本大学(神奈川県・藤沢市)

津山孝人、裸子植物は被子植物よりもチ

ラコイド膜における酸素依存電子伝達の能力が高い、第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18 日～20 日、岩手大学（岩手県・盛岡市）

津山孝人、ケニアの樹木は九州の樹木よりも葉の活性酸素消去能が高い 光合成の環境ストレス耐性（メーラー反応の能力）の数値化、第 126 回日本森林学会年会、2015 年 3 月 26 日～29 日、北海道大学（北海道・札幌市）

乗富真理、変動光に対する針葉樹の光防御機構 - メーラー反応の生理機能解析 -、第 126 回日本森林学会年会、2015 年 3 月 26 日～29 日、北海道大学（北海道・札幌市）

津山孝人、チラコイド膜の酸素還元反応は植物の水分・光環境適応に寄与する、第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 16 日～18 日、東京農業大学（東京都・世田谷区）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()