

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19258

研究課題名(和文)光合成制御の進化をやり直す

研究課題名(英文) Experimental evaluation of the different evolution in photosynthetic regulation

研究代表者

鹿内 利治 (Shikanai, Toshiharu)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：70273852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：変動する光環境下では、チラコイドルーメンの酸性化をモニターし、シトクロムb6f複合体の活性を抑制することで光化学系Ⅰへの電子伝達を減速させる。被子植物は、光化学系Ⅰの受容体側の電子の安全弁(Flv)を失っており、このブレーキの重要性が増大している。被子植物に失ったFlvを戻すと、ブレーキの軽減が許容されるか？それは、光合成の効率を上昇させるか？この疑問に答えるため、FlvとKEA3oxの二つの組換え遺伝子をシロイヌナズナで共存させた。FlvはKEA3ox背景で光化学系Ⅰの光傷害を軽減した。それに加えて、Flvが変動光下で気孔の開度を上昇させることで、光合成と植物の生育を促進させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光化学系Ⅰを光傷害から守るには、上流での電子伝達抑制(photosynthetic control)とFlvによる下流からの電子の吸い出しが有効である。被子植物はFlvを失い、上流での制御に依存する戦略を選んだ。本研究は、シロイヌナズナにFlvを導入し、上流のブレーキを軽減することで、光化学系Ⅰの光傷害を防ぎながら光合成の効率を上げられるかを調べた挑戦的なものである。当初の予想を超え、Flvが変動光下で、気孔の開度を上げることで、CO₂固定速度と植物の生育を上昇させることを明らかにした。電子伝達と気孔の開閉のリンクの未知の部分に光を当て、学術、応用の両面で意義ある研究である

研究成果の概要(英文)：Under fluctuating light conditions, photosynthetic electron transport toward photosystem I is downregulated by controlling the activity of the cytochrome b6f complex. This photosynthetic control is induced by monitoring the acidification of the thylakoid lumen. The process is essential especially for angiosperms because they lacked the safety valve (Flv) of electrons functioning at the acceptor side of photosystem I. To test whether the introduction of Flv into angiosperms permits the weaker operation of photosynthetic control, resulting in the higher efficiency of photosynthesis, we combined two transgenes, Flv and KEA3ox in Arabidopsis. Flv alleviated the photodamage of photosystem I under the KEA3ox background in the fluctuating light. We also observed the Flv-dependent upregulation of CO₂ fixation and plant growth. The enhanced photosynthesis mainly depended on the larger stomatal opening in the Flv background.

研究分野：植物生理学

キーワード：光合成 葉緑体 KEA3 Flavidii ironタンパク質 シトクロムb6f複合体 変動光 気孔 光化学系

1. 研究開始当初の背景

光は光合成に必須である。しかし、過剰な光の受容は光合成装置に傷害を与えるが、その標的は光化学系 であると考えられてきた。一方、光化学系 は光傷害を受けにくい、それは複数の保護機構によってしっかり守られているからであることが、最近の研究によって明らかになっている。光化学系 の光傷害は、植物にとって大変危険である。シロイヌナズナ *pgr5* (*proton gradient regulation 5*) 変異株は、光化学系 周辺サイクリック電子伝達の主経路を欠損し、強光下でチラコイド膜ルーメンの酸性化を介したシトクロム *b₆f* 複合体の活性抑制 (photosynthetic control) を誘導できない。そのため、特に強度が変動する光の下で光化学系 が深刻な光傷害を受ける。

一方、シロイヌナズナ *pgr1* (*proton gradient regulation 1*) 変異株は、シトクロム *b₆f* 複合体の Rieske サブユニットに1アミノ酸置換をもち、photosynthetic control が中性付近から強く誘導される。そのため、光化学系 は変動光に耐性になる。*pgr1 pgr5* 二重変異株では、*pgr5* 変異株の光化学系 の光傷害が緩和され、photosynthetic control の重要性が示された。一方で、*pgr1* 変異株は、強い photosynthetic control により電子伝達が低いレベルで飽和し、連続的な強光に対しては、光化学系 はむしろ感受性になる。photosynthetic control の強さは、生育する光環境に合わせて最適化されなければならない。

もう一つ光化学系 を光傷害から守るのが、光化学系 から過剰に蓄積した電子を吸い出す戦略である。ここに関わるのが Flavodiiron タンパク質 (Flv) である。Flv はシアノバクテリアから裸子植物まで保存されているが、被子植物は、進化のごく初期に Flv を失っている。我々は、ヒメツリガネゴケの *FlvA*、*FlvB* 遺伝子を単離し、シロイヌナズナの野生株と *pgr5* 変異株に導入した。Flv は PGR5 依存のサイクリック電子伝達の生理的機能の多くを代替可能であった。一方、PGR5 依存サイクリック電子伝達活性を保持するシロイヌナズナ野生株に変動光耐性を付与した。同様な結果が、イネを用いても示されている。被子植物が、優秀な電子の安全弁である Flv を捨てた理由は謎であった。

2. 研究の目的

光化学系 に光傷害が起きると、しばしばそれは植物にとって致命傷になる。植物は、光化学系 への電子の流入速度を調節するため、チラコイド膜ルーメンの酸性化をモニターすることで、上流のシトクロム *b₆f* 複合体で電子伝達にブレーキを掛ける。これが、photosynthetic control と呼ばれる現象である。このブレーキは、強すぎると光合成の効率を下げる。また上流の光化学系 に負荷をかけることになり、光環境に対して最適化されることが必要である。被子植物は photosynthetic control に強く依存するが、それは、光化学系 の下流で電子を受け取る安全弁である Flv を失ったのがその理由の一つであろう。一方で、我々は、被子植物への Flv の導入が、光化学系 に変動光耐性を付与することを報告している。Flv の存在下では、植物は photosynthetic control によるブレーキを軽減することを許容するであろうか？またブレーキの軽減は光合成の効率を上昇させるのであろうか？これらの疑問に答えるため、一連の形質転換体を作成し、特に変動光下での光合成の効率を調べた。

3. 研究の方法

我々は、ヒメツリガネゴケの *FlvA*、*FlvB* 遺伝子を単離し、シロイヌナズナに導入することで、変動光に対する耐性を付与することに成功している (Flv 株)。一方、KEA3 は、チラコイド膜局在の H⁺/K⁺ アンチポーターであり、プロトン駆動力の大きさを維持したまま、プロトン濃度勾配を膜電位差に置き換えることで、シトクロム *b₆f* 複合体でのブレーキを軽減することができる。我々はすでに、KEA3 の過剰発現により、プロトン駆動力に膜電位差をより多く使うことで、電子伝達ブレーキの掛かりを軽減し、強光下でも積極的に電子伝達を行う植物を作成した。そして、その電子伝達を報告している (KEA3ox 株)。

この二つの形質転換体を交配し、二重形質転換体 (Flv-KEA3ox) を作成した。野生株、単一形質転換体と共に、定常光下での電子伝達の光強度依存性を Dual-PAM 装置を用いて解析した。また同じ装置を用いて、強光と弱光を交互に繰り返すことで、変動光下での電子伝達を解析した。特に、弱光～強光に切り替わった際の光傷害回避機構 (NPQ と photosynthetic control) の導入の速さ、また逆に強光～弱光に切り替わった際の、ブレーキの解除の速さを光化学系 I の光傷害に注目して解析を行なった。

続いて、変動光下 (50 μmol photons m⁻² s⁻¹ と 500 μmol photons m⁻² s⁻¹ を交互に照射する) で、野生株と各形質転換体を栽培し、生育に対する影響を調べた。光条件は、電子伝達解析の情報をもとに、効果的なものを設定した。また変動光下でガス交換解析を行い、光強度の変動に対する応答の速さが、二酸化炭素固定速度に対して、どう影響するか調べた。また、気孔の開閉を同時に

調べた。

4. 研究成果

二重形質転換体 (Flv-KEA3ox)、単一形質転換体 (Flv、KEA3ox) と野生株の光合成電子伝達のパラメーターの光強度依存性を調べた。KEA3ox では、中光域で photosynthetic control によるブレーキの軽減が確認されたが、この傾向は、Flv-KEA3ox では見えにくくなった。

一方、変動光下では、KEA3ox の問題が顕在化し、光化学系 の受容体側で電子伝達が律速された。また、このことによって、光化学系 の光傷害が進行した。この問題は、Flv-KEA3ox では解決され、野生株と同様の電子伝達を示した。KEA3ox によるブレーキの軽減の問題は、Flv による安全弁の導入により解決可能であることが明らかになった。一方、以前報告したように、Flv は、弱光～強光移行直後に起きる光化学系 の一過的な還元 (光傷害を引き起こす危険な状態) を防ぐことが可能であった。

これらの植物において、ガス交換を定常光と変動光 ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と $500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を 10 分おきに繰り返す) において測定した。野生株においても、 CO_2 固定速度は、変動光下では、定常光に比べて 2 割ほど減少した。これは、主に気孔の開度の減少によるものと考えられる。変動光が気孔の開度を抑制する分子機構は不明であるが、自然状態では光強度は変動するために、このような気孔開度で光合成を行っていることになる。

KEA3ox の効果は、光合成の立ち上がりが速いところに見られるが、変動光処理を繰り返すと野生株と差がなくなり、光合成の促進に対して大きな効果はなかった。一方、予想外なことに、Flv は気孔の開度が大きく、 CO_2 固定速度も有意に高くなった。これに加えて、さらに Flv-KEA3ox では、高い CO_2 固定速度まで速く到達した。

またガス交換と同じ光条件で、4 種類の植物を栽培した。定常光下では、遺伝子型による差はなかった。変動光下では、野生型を含むすべての遺伝子型で生育速度が低下した。これは、 CO_2 固定速度の低下と矛盾しない。しかしながら、Flv と Flv-KEA3ox は、野生型と KEA3ox に対して有意に高い成長を示した。

本研究から、Flv が KEA3ox による光化学系 の光傷害の問題を解決できることが明らかになった。KEA3ox のブレーキ軽減の光合成に対する正の効果は、光合成の誘導期に限定的であった。一方、予想外なことに、Flv が変動光下で CO_2 固定と生育の速度を上昇させる効果があることがわかった。当初、Flv には光化学系 の光傷害の軽減による効果を期待した。そのことは確認できたが、Flv 背景での CO_2 固定速度と生育の上昇は、想定を上回るものであった。このことは、光化学系 の光阻害の回避より、気孔の開度の上昇によるものに大きく起因すると考えられる。さらに、これらの効果は、定常光下では見られず、変動光下に特異的なものであった。変動光下で植物が気孔の開度を抑制する分子機構、さらには、Flv がその抑制を軽減する分子機構に関しては、さらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Basso Leonardo, Sakoda Kazuma, Kobayashi Ryouhei, Yamori Wataru, Shikanai Toshiharu	4. 巻 189
2. 論文標題 Flavodiiron proteins enhance the rate of CO ₂ assimilation in Arabidopsis under fluctuating light intensity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 375 ~ 387
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiac129	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 Zhou Qi, Wang Caijuan, Yamamoto Hiroshi, Shikanai Toshiharu	4. 巻 188
2. 論文標題 PTOX-dependent safety valve does not oxidize P700 during photosynthetic induction in the Arabidopsis <i>pgr5</i> mutant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1264 ~ 1276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiab541	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 Zhou Qi, Yamamoto Hiroshi, Shikanai Toshiharu	4. 巻 192
2. 論文標題 Distinct contribution of two cyclic electron transport pathways to P700 oxidation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 326-341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiac557	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 Yamamoto Hiroshi, Cheuk Anthony, Shearman Julia, Nixon Peter J, Meier Thomas, Shikanai Toshiharu	4. 巻 192
2. 論文標題 Impact of engineering the ATP synthase rotor ring on photosynthesis in tobacco chloroplasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1221-1233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiad043	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

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------