

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440139

研究課題名(和文) 乾燥下の光合成：地上進出を支えた新型最強の光エネルギー散逸機構の探索と機構解明

研究課題名(英文) photosynthesis under drought: Survey and analysis of the senenergy dissipation mechanism that produced terrestrial plant

研究代表者

伊藤 繁 (Itoh, Shigeru)

名古屋大学・理学研究科・名誉教授

研究者番号：40108634

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)：乾燥耐性光合成生物が示す、「乾燥誘導性の過剰光エネルギー熱散逸機構」を発見した。温度300Kから77Kでの先端的なピコ秒蛍光寿命測定実験から、広範な生物種でこれを同定した。乾燥下の地衣類とコケでは光化学系の蛍光寿命が極端に短くなり、励起エネルギーが光反応で補えられるより早く熱散逸され光傷害が防がれることを明らかにした。この現象を、シアノバクテリア5種、藻類10種、地衣類(菌類と藻類・シアノバクテリアの共生体)55種、高等植物1種で確認し、その研究方法を確立した。生育環境の乾燥特性や光条件に応じて発動する複数の機構の存在を明らかにし、分子機構を検討した。

研究成果の概要(英文)：Mechanisms of drought-induced extra energy dissipation were newly identified in drought-tolerant photosynthetic organisms. Analysis by picosecond fluorescence lifetime measurement revealed this mechanism in a wide variety of species. Fluorescence lifetime was shown to become shorter due to the quenching of excited state that is faster than the photoreaction rate. Similar mechanisms were identified in 5 species of cyanobacteria, 10 species of mosses, 55 species of lichens (symbionts of fungi and cyanobacteria/algae) and 1 higher plant. Different types of mechanism were identified in organisms living under various environments.

研究分野：植物生理学

キーワード：光合成 環境応答 光障害 励起エネルギー移動 クロロフィル蛍光 光化学系 乾燥耐性 地衣類

1. 研究開始当初の背景

植物は、過剰な光エネルギーを熱散逸させるために非光化学的消光 (nonphotochemical quenching; NPQ) 機構をもつ。光が強く反応系が飽和すると、電子伝達反応で駆動されるイオン輸送、酵素反応、膜タンパク質の動きなどで NPQ 機構が発動され、過剰な光エネルギーは熱として放散され、傷害が防止される。ほとんどの光合成生物が光で活性化される NPQ 機構をもつ。しかし、乾燥や凍結条件下では状況は異なる。光の吸収はおこるが、電子伝達反応はとまるので、エネルギーは大過剰になる。しかし NPQ 機構は働かない。過剰な光エネルギーは、ラジカルを作り、光合成系を破壊し、植物は枯死する。ところが、一部の光合成生物は、乾燥や低温耐性をもつ。しかし乾燥下での光耐性の機構は長く不明であった。

我々は乾燥、太陽光下でも死なない地衣類の光合成反応を調査し、乾燥状態では光化学系上の励起エネルギーが超短時間 (10ps) で完全消失することを、超高速レーザー分光測定研究により明らかにした。ここではこの現象を「乾燥誘導性の消光機構 (drought induced NPQ; 以下 d-NPQ と略称)」と呼ぶ。

この d-NPQ 現象の分子機構解明のために研究を進めた。

2. 研究の目的

乾燥耐性の植物中で、乾燥で誘導される、過剰光エネルギー散逸機構 = d-NPQ を調べ、その分子機構を解明する。広範な乾燥耐性光合成生物 (地衣類: 菌類と藻類の共生体、コケ、維管束植物、藻類、シアノバクテリア) を対象に、この現象の有無を探索し、その分子機構と多様性、発動条件を明らかにする。新たな研究連携を作り、同定や扱いの困難であった共生型の光合成生物も対象に、乾燥条件下での光合成反応の解析方法を開発する。

3. 研究の方法

乾燥耐性生物として知られる地衣類とコケ多数種を、分類学者の協力も仰ぎ自然採取し試料とした。野外採取を共同で行い、同一試料の半分は当方が実験室に持ち帰り超高速蛍光寿命測定に使用し、残りは分類学者が持ち帰り種同定をするという方法で多数の未知試料を得て研究した。乾燥時の光エネルギーの移動・熱散逸過程は、我々が開発してきた超高速レーザー分光装置により室温と低温 77K のピコ秒領域でのクロロフィル蛍光寿命の変化として直接観察し、理論解析した。これにより、これまで研究対象としなかった試料の研究が可能となり、未知、複数の過剰エネルギー散逸機構を発見した。さらに分

子機構と遺伝子情報も検討した。

4. 研究成果

地衣類の d-NPQ 現象

一部の光合成生物は、乾燥耐性や低温耐性をもつ。樹皮や岩表面に広く分布する地衣類 (緑藻類やシアノバクテリアを内部共生する菌類) は、乾いて長時間強光にさらされても死なず、雨や霧で再湿潤するとすぐさま活動を再開する。その乾燥耐性の分子機構は長く不明であった。

我々は偶然に、乾燥地衣類を観察し、乾燥条件下では、内部共生藻の光化学系 II (PS II) 上の励起エネルギーが超短時間 (10ps 程度) で完全消失することを、超高速レーザー分光法による蛍光寿命測定で発見した。この短寿命化は可逆的で、水の再添加で数分以内に回復する。これ以前には、地衣類のクロロフィル蛍光強度が乾燥で低下するという Heber (共同研究者) らの報告があったがその機構はわかっていなかった。我々の蛍光寿命研究は、これが従来知られていた NPQ 機構とは違う新しい機構で起こることをあきらかにしただけでなく、d-NPQ の分子機構を探る新研究法も与えた。地衣類は、通常の wet 植物で連続光照射下で見られる NPQ よりも、10 倍以上強力な蛍光減少を乾燥時に示す。この d-NPQ は、見かけ上は NPQ 機構と似ている。しかし NPQ は脱水状態では起こらず、蛍光寿命の促進も桁違いに小さいので、蛍光寿命の違いから両者をはっきり区別でき、分子機構も異なることが示された。蛍光寿命測定を武器に d-NPQ 機構の分布、発動条件、分子機構を探った。

d-NPQ 現象は、地衣類でまず見出されたが、共生生物である地衣類での光合成は研究例が少なかった。地衣類研究はホストである菌類と、ゲストである藻類の両方を考えなくてはならない境界領域にある。国内外の地衣類研究者数は少なく (日本地衣類学会も会員数 50 名の小所帯)、分類研究に偏っている。地衣類の光合成についてはほとんどわかっていない。しかし、「ピコ秒蛍光測定装置中で、小石上に生えた地衣類の発する蛍光」は興味深いもので、これまでの光合成研究の常識を覆した。幸運にも恵まれ、地衣類約 50 種を採取、測定できた。一部発表論文を媒介に海外 (ドイツ、オランダ) 研究者との協力も生まれた。この d-NPQ 現象は、地衣類にとどまらず、藻類、シアノバクテリアそして以下に述べるように「コケ植物の一部」でもみられ、複数の機構が働いていることなどがわかりました。「維管束系を持つ以前に進化した」光合成生物に共通の、生物の地上進出に必須であった能力の一つとも考えられる。地衣類共生藻類の多くは d-NPQ を示し、種ごとに違う蛍光特性

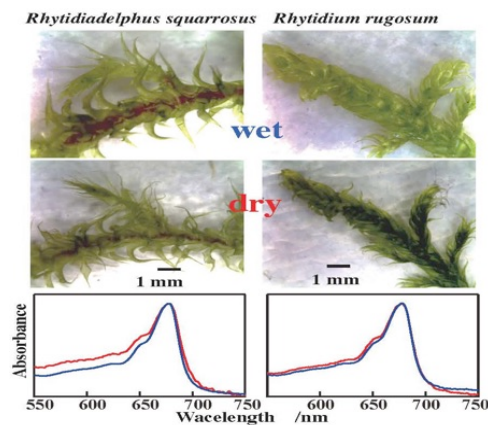
を示した。乾燥応答は4型に類型化でき、そのうち3類型（大部分）が **d-NPQ** 特性を示した。研究結果の全体については現在論文執筆中である。

コケの乾燥耐性に研究を進めた

さらに乾燥耐性コケの蛍光寿命測定を行い、**d-NPQ** 機構を確認した(分類には故岩月善之助氏; 服部研究所、の協力を得た)。さらに、近縁で乾燥耐性のあるコケ2種

Rhytidium rugosum と *Rhytidiadelphus squarrosus* の比較研究を、乾燥耐性研究の先駆者である「独 Tubingen 大・U. Heber (1931-2016) の提案で開始した。これら2種(図1)は近縁でともに乾燥耐性だが、*Rhytidiadelphus squarrosus* は陰性(日陰にのみ生育する)で、*Rhytidium rugosum* は陽性(日向に適応)である。陽性 *R. rugosum* は強い太陽光下で生育するが、陰性の *R. squarrosus* は乾燥に耐えるが、強光では枯れる。色素系は乾燥してもほぼ変わらないので、光の吸収量は湿潤

図 1. 陰性(左)と陽性(右)コケ *R. squarrosus* と *R. rugosum*。上段と中段は水和と乾燥状態の葉状体。下段は水和(青線)と乾燥(赤線)状態での吸収スペクトル



時と同等で、この2種は異なる **d-NPQ** 特性を示すことを明らかにした(図2)。

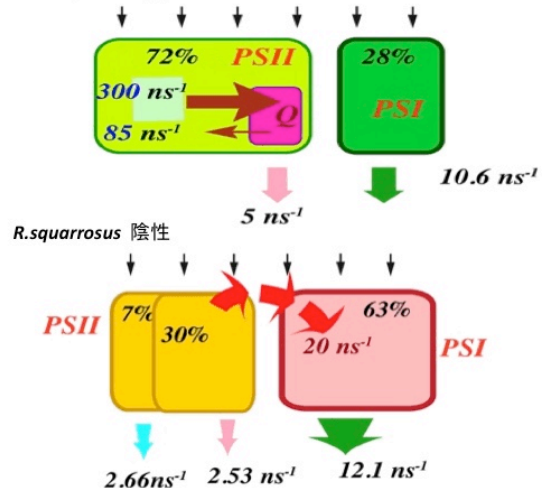
陽性コケでは **PSII** 色素系に **quencher** が生じ寿命が促進され(A型)、陰性コケではエネルギーは **PSI** などに逃げ寿命促進なしに消光される(B型)(H. Yamakawa ら 2017(4))。種によっては、A、B型が協奏的に働くことがわかった。

陰性の *R. squarrosus* では **PSII** 蛍光強度の減少は、**PSI** へのエネルギー移動(spill over)によると推定された。低温77Kでは spillover が

とまることが蛍光寿命測定でわかり uphill 過程の存在が推定された。従って、この spill over では **PSII** 内から、短波長の(エネルギーレベルの高い)アンテナクロロフィル色素を介して、**PSI** にエネルギーが移動すると推定された。

両種ともに、室温では **PSII** に吸収された過剰な励起エネルギーを散逸することができる。しかし陰性 *R. squarrosus* では **PSII** に流入した過剰エネルギーは **PSII** 内では消滅せず、**PSI** に

図 2. 乾燥下の陰性(上)と陽性(下)コケのエネルギー移動



移動して始めて消費される。したがって、過剰な励起エネルギーが流入する強光条件下では、エネルギーの一部は **PSII** にとどまり、損傷をおこす。同時に、弱光だけでも損傷をうけやすい乾燥下では、陰性種でも過剰エネルギー散逸機構が必要ではあり spill over 過程が働く。陽性コケ *R. rugosum* の **PSII** は、乾燥下で内部に **Quencher** を出現させ励起エネルギーを直接に減らすので、強光下でも過剰エネルギーを効率よく熱散逸するといえる。

考察と将来への展望

内部構造と藻類細胞の所在部分が複雑な地衣類だけでなく、コケでも **d-NPQ** 研究が可能となり、複数のメカニズムが推定された。コケでは、培養法、細胞の破壊法、葉緑体や光合成タンパク質の単離法がある程度確立されているので、*in vitro* の研究を展開できそうである。一方ではこれまで研究されていない、乾燥耐性や、光合成生物についても研究を広げたい。乾燥耐性の課題は維管束植物にも重要だろう。我々が開発した超高速蛍光寿命測定による解析法は、他の蛍光測定法とは違い、この分子機構の検討に直接的な情報を与える。高度な設備が必要ではあるが、現有設備を有効活用して、乾燥耐性だけでなく、植物の進化や地上進出といった大きな問題に関しても研究の新展開を考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

- (1) T. Kóbori, T Uzumaki, M Kis, L. Kovács, I. Domonkos, S. Itoh et al, **Phosphatidylglycerol is implicated in divisome formation and metabolic processes of cyanobacteria.** *Journal of Plant Physiology*, 査読有 2018, 223, 96-104. DOI: 10.1016/j.jplph.2018.02.008
- (2) T. Kondo, M Matsuoka, C Azai, M Kobayashi, S. Itoh, H. Oh-oka: **Light-induced electron spin-polarized (ESP) EPR signal of the (P800⁺Menaquinone⁻) radical pair state in oriented membranes of *H. modesticaldum*, role/location of menaquinone in the homodimeric Type I reaction center.** 査読有 *J Phys Chem B*, 2018, 122, 2536-2543. DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b12171
- (3) T. Noji, M. Matsuo, N. Takeda, A. Sumino, M. Kondo, M. Nango, S. Itoh, T. Dewa: **Lipid-controlled stabilization of charge-separated states (P⁺Q_B⁻) of a light-harvesting-reaction center core complex.** 査読有 *J Phys Chem B*, 2017, 122, 1066-1080. DOI:10.1021/acs.jpcc.7b09973
- (4) H. Yamakawa, I. H. M. van Stokkum, U. Heber, S. Itoh: **Mechanisms of drought-induced dissipation of excitation energy in sun- and shade-adapted drought-tolerant mosses.** 査読有 *Photosynthesis Research*, 2017, 135, 285-298. DOI:10.1007/s11120-017-0465-9
- (5) S. Koeda, T. Suzuki, T. Noji, K. Kawakami, S. Itoh, T. Dewa, N. Kamiya, T. Mizuno: **Rational design of novel high molecular weight solubilization surfactants for membrane proteins from the peptide gemini surfactants.** 査読有 *Tetrahedron*, 2016, 72, 6898-6908. DOI:10.1016/j.tet.2016.09.024
- (6) M. Shibata, S. Koeda, T. Noji, K. Kawakami, Y. Ido, Y. Amano, N. Umezawa, T. Higuchi, T. Dewa, S. Itoh, N. Kamiya, T. Mizuno: **Design of new extraction surfactants for membrane proteins from peptide-gemini surfactants (PG-surfactants).** 査読有 *Bioconjugate Chemistry*, 2016, 27, 2469-2479. DOI:10.1021/acs.bioconjchem.6b00417
- (7) T. Noji, K. Kawakami, J-R. Shen, T. Dewa, M. Nango, N. Kamiya, S Itoh, T. Jin: **Oxygen-evolving porous glass plates containing the photosynthetic photosystem II pigment-protein complex.** 査読有 *Langmuir*, 2016, 32, 7796-7805. DOI:10.1021/acs.langmuir.6b02106
- (8) T. Kondo, M. Matsuoka, C. Azai, S. Itoh, H. Oh-oka: **Orientations of iron-sulfur clusters F_A and F_B in the homodimeric Type-I photosynthetic reaction center of *H. modesticaldum*.** 査読有 *J. Physical Chemistry B*, 2016, 120, 4204-4212. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b01112
- (9) Y. Yoneda, T. Noji, T. Katayama, N. Mizutani, D. Komori, M. Nango, H. Miyasaka, S. Itoh, Y. Nagasawa, T. Dewa: **Extension of light-harvesting ability of photosynthetic light-harvesting complex 2.** 査読有 *J. American Chemical Society* 2015, 137, 13121-13129. DOI: 10.1021/jacs.5b08508
- (10) S. Itoh, T. Ohno, T. Noji, H. Yamakawa, H. Komatsu, K. Wada, M. Kobayashi, H. Miyashita: **Harvesting far-red light by chlorophyll *f* in photosystems I and II of unicellular cyanobacterium strain KC1.** 査読有 *Plant Cell Physiology* 2015, 56, 2024-2032. DOI: 10.1093/pcp/pcv122
- (11) T. Kondo, S. Itoh, M. Matsuoka, C. Azai, H. Oh-oka: **Menaquinone as the secondary electron acceptor in the Type I homodimeric photosynthetic reaction center of *Helio bacterium*.** 査読有 *J. Physical Chemistry B*, 2015, 19, 8480-8489. DOI:10.1021/acs.jpcc.5b03723

〔学会発表〕(計 13 件)

(1) 武藤 鷹矢、佐藤 知樹、北條 楽、伊藤 繁、岩崎 郁子 「地衣類共生シアノバクテリアの炭素濃縮機構 CCM と共生」 P144 第 59 回日本植物生理学会年会 2018/03/27-30 札幌コンベンションセンター

(2) 小杉 真貴子、小沢 真一郎、伊藤 美空、亀井 保博、菓子野 康浩、高橋 裕一郎、伊藤 繁、小池 祐幸 「南極に生育する緑藻、*Prasiola crispa* に見られる顕著な長波長シフトクロロフィルの生理学的解析」 第 59 回日本植物生理学会年会 2018/03/27-30 札幌コンベンションセンター

(3) 山川 壽伯、I. H. M. van Stokkum, U. Heber, 伊藤 繁 「乾燥耐性コケの過剰励起光エネルギー散逸機構・クロロフィル蛍光のグローバル解析」 第 59 回日本植物生理学会年会, 2018/03/27-30 札幌コンベンションセンタ

一.

(4) 伊藤 繁、大野 智輝、野地 智康、山川 壽伯、宮下 英明 「PSI と PSII で近赤外光アンテナとして働く Ch1 f ; 近赤外光培養された琵琶湖産単細胞シアノバクテリア KC1 のエネルギー移動」 第 8 回日本光合成学会年会 2017/05/27-28 龍谷大学瀬田キャンパス (大津市)

(5) 高橋 拓子、草間 友里、李 新祥、高市 真一、伊藤 繁、山川 壽伯、西山 佳孝 「シアノバクテリア光化学系 II の光防御機構におけるオレンジカロテノイドドプロテインの役割」 第 58 回日本植物生理学会年会 2017/03/10 鹿児島

(6) 伊藤 繁、山川 壽伯、岩崎 郁子、佐藤 知樹、Ulrich Heber 「乾燥下でのシアノバクテリア・藻・コケ・高等植物の過剰エネルギー散逸機構」 第 58 回日本植物生理学会年会 2017/03/10] 鹿児島

(7) 伊藤 繁、小村 理行、山川 壽伯、Ulrich Heber、佐藤 知樹、岩崎 郁子、「シアノバクテリア共生型地衣類で乾燥誘導されるフィコシアニンとクロロフィルの蛍光寿命促進」 第 7 回日本光合成学会年会 2017/05/27-28 東京理科大 葛飾キャンパス

(8) 伊藤 繁、山川 壽伯、H. Heber 「陰性と陽性のコケと地衣類で乾燥誘導される 2 種の過剰励起エネルギー散逸機構」 第 58 回日本植物生理学会年会 2016/03/19 岩手大学/盛岡

(9) 伊藤 繁、小村 理行、山川 壽伯、Ulrich Heber、佐藤 知樹、岩崎 郁子、「シアノバクテリア共生型地衣類で乾燥誘導されるフィコシアニンとクロロフィルの蛍光寿命促進」 第 7 回日本光合成学会年会 2017/05/27-28 東京理科大 葛飾キャンパス

(10) S. Itoh, M. Komura, H. Yamakawa, U. Heber, T. Sato, I. Iwasaki "Ultra-fast dissipation of excess excitation energy by multiple pathways in dry mosses and lichens with algal/cyanobacterial symbiont". (1A.48) The 17th international congress on photosynthesis research, 2016/08/7-12, Maastricht, The Netherlands.

(11) S. Itoh, M. Komura, H. Yamakawa, U.

Heber, T. Sato, I. Iwasaki.

"Ultra-fast dissipation of excess excitation energy by multiple pathways in dry mosses and lichens with algal/cyanobacterial symbionts" Light harvesting satellite meeting of the 17th Int. cong. on photosynthesis research. 2016/08/4-7 Egmond aan Zee, The Netherlands,

[図書] (計 3 件)

(1) 伊藤 繁、野地 智康 「光触媒を利用した人工光合成」 第 1 章 「天然-人工ハイブリッド光合成系の作成-光合成タンパク質を生体外で動かす」 エヌ・ティー・エス、2017 (共著) 400 頁

(2) 伊藤 繁、柴田 稔 「テイツ・ザイガー 植物生理学 原著 6 版 (翻訳): (共著担当部分、7 章光合成 p173-202)」 (原著者: L. テイツ/ E. ザイガー) 講談社サイエンティフィク 2017, /832 総ページ

[産業財産権]
なし

[その他]
ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 繁 (ITOH, Shigeru)
名古屋大学・理学研究科・名誉教授
研究者番号: 40108634

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

岩崎 郁子 (IWASAKI, Ikuko)
秋田県立大・生物資源科学部・准教授
研究者番号: 50312236

(4) 研究協力者

山川 壽伯 (YAMAKAWA, Hisanori)
名古屋大学・生命農学研究科・博士研究員
研究者番号: 40456645