

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：34504

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15122

研究課題名（和文）電気化学を利用した光合成制御リミッターの解除

研究課題名（英文）Relaxation of limitation to photosynthesis by an electrochemical technique

研究代表者

嶋川 銀河（Shimakawa, Ginga）

関西学院大学・生命環境学部・助教

研究者番号：60853885

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：課題を通して、シアノバクテリアにおける酸化的五糖リン酸経路(OPPP)がプラストキノン還元を通して細胞電流の大きさに影響することを明らかにし、その生理活性の定量に取り組み、OPPPによる電子伝達フラックスが光合成電子伝達の4割ほどに達することを明らかにした。また、シアノバクテリアにおいて細胞外膜が細胞外電子伝達に与える影響を明らかにする研究に部分的に携わる中で、細胞外膜の剥離が本研究課題においても有効に働きうることを推定した。最終年度の終わりには、光合成および呼吸電子伝達を含めたシアノバクテリア電子伝達反応に関する総説を執筆し、光合成のリミッター解除を目指す上での重要な知見を再考した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光合成電子伝達を抑制するリミッターとして、これまで関連分野における多くの研究ではチラコイド膜内外におけるプロトン勾配依存的な制御メカニズム(PREG)が注目されてきたが、還元により誘導される抑制(RISE)の生理機能や分子メカニズムについては未だ不明な点が多く、本研究で得られた知見は従来の視点とは異なる新たなコンセプトで光合成制御を操作する発想へと繋がるものである。

光合成の改変を目的とした研究には、主として遺伝子操作を用いることで光合成能力や環境ストレス耐性の向上を目指したものが多く、本研究で行った野生株ベースでの電気化学的リミッター解除による光合成の促進は新奇アプローチといえる。

研究成果の概要（英文）：During the term of the research, we clarified that the oxidative pentose phosphate pathway (OPPP) in cyanobacteria affects the magnitude of cellular currents through plastoquinone reduction, and worked to quantify its physiological activity. It was found to be about 40%. In addition, while I was partly involved in research that clarified the effect of the extracellular membrane on extracellular electron transfer in cyanobacteria, we presumed that the exfoliation of the extracellular membrane could work effectively in this project as well. At the end of this year, I wrote a review article on cyanobacterial electron transfer reactions, including photosynthesis and respiratory electron transfer, and reconsidered the important findings in aiming to lift the limiter of photosynthesis.

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

今後も想定される地球人口の増加を見越して、再生可能エネルギーの開発や作物収量の増加は近年ますます需要が高まっており、また太陽エネルギーを用いた高付加価値の物質生産を目指した試みも活発に行われている。こうした社会的背景もあって、これまで以上に生物工学的な光合成反応の制御や改変が求められている。実際に農学、工学、理学分野において遺伝子操作を主とした取り組みが盛んに進められているが、未だ革新的な生産性の向上には結びついておらず、また遺伝子操作に頼った手法では野外開放環境下での実用化が困難である。さらに最も大きな問題の一つとして、光合成生物自身もつ光合成制御メカニズムの存在がほとんど無視されていることが挙げられる。

光合成(ここでは酸素発生型光合成を意味する)は、光エネルギーを利用して水を酸化し、NADPH や ATP を生成する電子伝達反応とそれら還元力を消費して CO₂ から有機物を合成する炭酸固定反応から成り立っており、反応式 $6\text{H}_2\text{O} + 6\text{CO}_2 \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$ で表される。反応式から見て取れるように、基質である CO₂ が不足すると光合成速度は低下するが、実際この時に電子伝達反応を抑制している実体は環境要因ではなく、光合成生物そのものが有する制御メカニズムである。つまり光合成生物は、環境に応じて自ら事前に電子伝達速度を下げている、これは、電子伝達系で過剰な還元力が余ることで活性酸素が生成するのを防ぐためと考えられる。この自律的な電子伝達反応の抑制は、原核光合成生物シアノバクテリアにおいて主に Reduction-induced suppression of electron flow (RISE) によって誘導される (Shaku et al. 2016, Shimakawa et al. 2018)。

図1に RISE 誘導のスキームを示す。まず光合成炭酸固定反応の基質である CO₂ が不足してくると還元力の消費が滞ることによって電子伝達系におけるプラストキノン (PQ) プールの還元レベルが上がる。この PQH₂ 蓄積によって、シトクロム複合体との間における電子の授受が阻害されることが RISE による電子伝達抑制の原因とされる。RISE が生じることで電子伝達系下流に位置する光化学系 I が酸化的に維持され、有毒な活性酸素の生成が抑制される。シアノバクテリアにおいて RISE は活性酸素の生成を防ぐための防御システムであるが、その一方で過度なブレーキにより光合成速度を下げる要因となっている。実際、RISE が誘導される際に電子伝達系の最終受容体である NADPH の蓄積量が低下することから、RISE による電子伝達の抑制は幾らかの「ゆとり」を伴って生じていることが示されている (Shaku et al. 2016)。さらに、酸化剤を投入して PQH₂ の蓄積を緩和することで一過的な電子伝達反応の促進が観察できるが (Shimakawa et al. 2018)、RISE の解除は活性酸素の生成を誘発する恐れもあるため、より厳密な外部からの制御技術が必要である。

既報 (Lu et al. 2014) における電気化学的手法を応用することで光合成電子伝達の制御メカニズムである RISE を解除、また再誘導することが可能となる。また本手法の利点として、後述するチラコイド膜内外のプロトン勾配形成に影響せずレドックスへ干渉できることが挙げられる。

2. 研究の目的

本研究では世界で初めて電気化学の観点から光合成制御メカニズムの操作を試みる。また本実験技術を応用することで真核光合成生物における RISE の生理的意義を明らかにする。

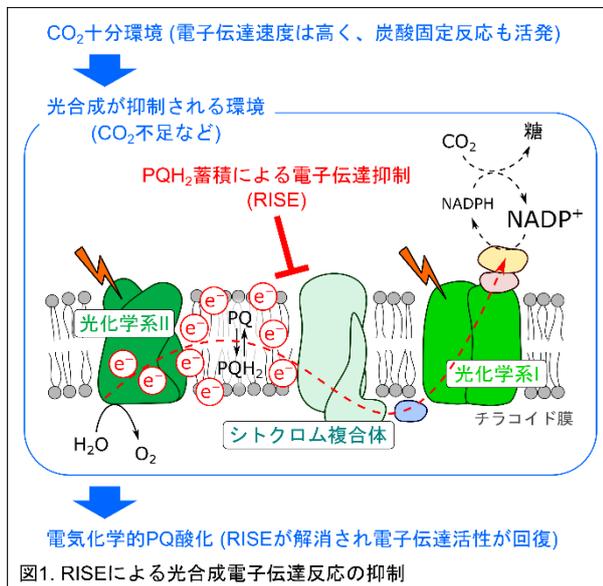
3. 研究の方法

計画-1. 外部電極による RISE の解除

電気化学セル内においてシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の光合成生理解析および電気化学測定を同時に行う。CO₂ の拡散効率が大气と比べて 1 万分の 1 に低下する水層では光合成が速やかに CO₂ 律速に移行して RISE が誘導されるが、この時の生理応答をクロロフィル蛍光および吸収測定によって評価する。ポテンショスタットを用いて作用電極の電位を操作することで、シアノバクテリア生細胞の可逆的なレドックス干渉を試みるとともに、有用なメディエーターを選定する。

計画-2. RISE の解除による光合成電子伝達速度の最適化

本研究では活性酸素生成のリスクを伴わない範囲で RISE を解除することにより、安全かつ高効率な光合成電子伝達速度の維持を試みる。これは即ち実験室レベルにおいてシアノバクテリアの最適な光合成電子伝達速度を同定すること、さらには RISE が潜在的に有する防御システム



の「ゆとり」を定量化することを意味する。活性酸素生成の危険性についてはクロロフィル吸収測定から可視化できる (Shimakawa et al. 2016)。また RISE の解除による電子伝達速度の維持が光合成物質生産にもたらす影響を質量分析によって定量化する。

計画-3. 真核光合成生物における RISE の生理的意義解明

真核光合成生物である藻類や植物では、プロトン勾配依存的な電子伝達抑制 (photosynthetic regulation, 本報告書では PREG とする) が光合成のリミッターとして主に働くと考えられている (Foyer et al. 1990)。これは PQ とシトクロム複合体間の電子伝達がチラコイド膜内の酸性化によって阻害されるためであるが、通常の光化学反応の下では電子伝達系における PQH₂ 蓄積とチラコイド膜内酸性化はしばしば相関をもつため、これまで RISE と PREG の寄与を分けて評価することが困難であった。本研究における電気化学的手法では外部から直接 PQ 還元を行うことでプロトン勾配を形成することなく電子伝達系のレドックスを操作することが期待でき、これによって多様な藻類 (緑藻、紅藻、珪藻など) や植物における RISE と PREG の生理機能を選択的に解析し、これまで明らかにされてこなかった RISE の生理的意義を解明する。

4. 研究成果

RISE の解除を行うために、外部電極による細胞内レドックスへの干渉に試みたが、当初の想定とは異なり、暗所での還元レベル上昇および名所での細胞内酸化が観察された。これは光合成生物の中でもシアノバクテリアに特徴的にみられる光合成と呼吸電子伝達の交差が原因で生じたと考えられた。すなわち、シアノバクテリアの PQ プール酸化還元は、必ずしも光合成によってのみ影響を受けるものではなく、そのレドックス制御には呼吸電子伝達も大きく関与しており、これら両者の影響を明らかにしなければ PQ プールのレドックス動態を予測できない。そこで研究代表者の嶋川は、まず呼吸電子伝達反応における還元力の出所と PQ プール還元への効果を調べることにした。

グリコーゲン分解酵素やグルコース 6 リン酸還元酵素など諸々の欠損株を作製、解析した結果、酸化的ペントースリン酸経路が呼吸代謝の主要な還元力生成反応であり、そこで生じた NADPH の還元力が、PQ を経て最終的に PSI の反応中心へと渡っていることが明らかとなった (業績①: Hatano et al. 2022)。またこの活性は条件次第で PSII からの電子フラックスの 4 割近くへと達し、細胞内全体のレドックスに対して大きな影響をもつことが示唆された。本研究で見出した電子伝達活性は、従来「循環的電子伝達」と混同されるものであるが、研究代表者らは、酸化的ペントースリン酸経路を特異的に阻害するグリコールアルデヒドを用いることで、呼吸電子伝達と循環的電子伝達を分別し、定量的に解析することに成功した (業績②: Kusama et al. 2022a)。これら一連の研究を経て、シアノバクテリアにおける光合成と呼吸電子伝達の関係性がより明確なものとなり、当該分野の知見を最新のものにアップデートするため、シアノバクテリアの細胞内電子伝達に関する総説を執筆した (業績③: Shimakawa 2023)。また光合成電子伝達制御全体の観点からみると、陸上植物と比べて、シアノバクテリアでは PREG の影響は小さいと考えられ、電子伝達のリミッターとしては主に RISE が働くことが示唆された。

光合成および呼吸の電子伝達がそれぞれ PQ プールに与える影響を明らかにしたことで、外部電極による RISE への干渉を行うための実験条件の検討が容易となったが、その一方で、新たな問題が生じた。シアノバクテリアは、植物とは異なり、光化学系エネルギー分配制御機構 (=ステート遷移) によってさまざまな光環境における光合成電子伝達の最適化を行っているが、このステート遷移によるクロロフィル蛍光変化が原因で RISE 誘導の判別が極めて困難になってしまう。本研究課題では、ステート遷移の影響を無視した上で、RISE 解除を実施したが (未発表データ)、今後の研究によってステート遷移の影響も考慮した際のデータ解釈が必要になると考えられる。

また残された課題として、外部電極によるレドックス干渉を最適化するメディエーターについては未だ十分な検討がなされていない。本研究課題の一環として、外膜剥離シアノバクテリアを用いた細胞外電流の研究にも携わり、シアノバクテリアの細胞内レドックスへ干渉するための知見は得られたものの (業績④: Kusama et al. 2022b)、今後はより化学的な視点から、メディエーターの改良に注力する必要がある。

<業績>

- ① Hatano J, Kusama S, Tanaka K, Kohara A, Miyake C, Nakanishi S, Shimakawa G. 2022. NADPH production in dark stages is critical for cyanobacterial photocurrent generation: a study using mutants deficient in oxidative pentose phosphate pathway. *Photosynth. Res.* **153** 113-120
- ② Kusama S, Miyake C, Nakanishi S, Shimakawa G. 2022a. Dissection of respiratory and cyclic electron transport in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Plant Res.* **135** 555-564
- ③ Shimakawa G. 2023. Electron transport in cyanobacterial thylakoid membranes: are cyanobacteria simple models for photosynthetic organisms? *J. Exp. Bot.*

- ④Kusama S, Kojima S, Kimura K, Shimakawa G, Miyake C, Tanaka K, Okumura Y, Nakanishi S. 2022b. Order-of-magnitude enhancement in photocurrent generation of *Synechocystis* sp. PCC 6803 by outer membrane deprivation. *Nat. Commun.* **13** 3067

<参考文献>

- Foyer C, Furbank R, Harbinson J, Horton P. 1990. The mechanisms contributing to photosynthetic control of electron transport by carbon assimilation in leaves. *Photosynth. Res.* **25** 83-100
- Lu Y, Nishio K, Matsuda S, Toshima Y, Ito H, Konno T, Ishihara K, Kato S, et al. 2014. Regulation of the cyanobacterial circadian clock by electrochemically controlled extracellular electron transfer. *Angew. Chem., Int. Ed.* **53** 2208-2211
- Shaku K, Shimakawa G, Hashiguchi M, Miyake C. 2016. Reduction-induced suppression of electron flow (RISE) in the photosynthetic electron transport system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* **57** 1443-1453
- Shimakawa G, Shaku K, Miyake C. 2016. Oxidation of P700 in photosystem I is essential for the growth of cyanobacteria. *Plant Physiol.* **172** 1443-1450
- Shimakawa G, Shaku K, Miyake C. 2018. Reduction-induced suppression of electron flow (RISE) is relieved by non-ATP-consuming electron flow in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Front. Microbiol.* **9** 886

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimakawa Ginga	4. 巻 -
2. 論文標題 Electron transport in cyanobacterial thylakoid membranes: are cyanobacteria simple models for photosynthetic organisms?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/erad118	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 Kusama Shoko, Miyake Chikahiro, Nakanishi Shuji, Shimakawa Ginga	4. 巻 135
2. 論文標題 Dissection of respiratory and cyclic electron transport in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 555-564
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10265-022-01401-z	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 Kusama Shoko, Kojima Seiji, Kimura Ken, Shimakawa Ginga, Miyake Chikahiro, Tanaka Kenya, Okumura Yasuaki, Nakanishi Shuji	4. 巻 13
2. 論文標題 Order-of-magnitude enhancement in photocurrent generation of <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 by outer membrane deprivation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 e3067
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-30764-z	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 -
1. 著者名 Hatano J, Kusama S, Tanaka K, Kohara A, Miyake C, Nakanishi S, Shimakawa G	4. 巻 153
2. 論文標題 NADPH production in dark stages is critical for cyanobacterial photocurrent generation: a study using mutants deficient in oxidative pentose phosphate pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Photosynthesis Research	6. 最初と最後の頁 113-120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11120-022-00903-0	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 嶋川 銀河
2. 発表標題 Evolution and diversity of photosynthetic organisms based on the strategy for P700 oxidation
3. 学会等名 第64回 日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 嶋川 銀河
2. 発表標題 なぜ褐虫藻はサンゴと共生するのか？
3. 学会等名 サンゴ礁生態系におけるレドックスエコバイオロジー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ginga Shimakawa
2. 発表標題 O ₂ photoreduction mediated by flavodiiron proteins ~Memory of the collaboration with Dr. Pierre Setif~
3. 学会等名 French Photosynthesis Society（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 嶋川 銀河
2. 発表標題 光合成解析から見えてくる藻類の多様な生き様
3. 学会等名 日本藻類学会ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 嶋川銀河
2. 発表標題 藍藻チラコイド膜の電子伝達
3. 学会等名 藍藻ゲノム交流会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 嶋川銀河
2. 発表標題 “ 生きている光合成 ” から学ぶこと～光合成の反応制御と活性酸素生成抑制システム～
3. 学会等名 電気化学秋季大会（招待講演）
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

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