

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440127

研究課題名(和文)変動光環境下における光合成系と呼吸系の相互作用の解析

研究課題名(英文) Analysis on interaction between photosynthesis and respiration under fluctuating light condition

研究代表者

野口 航 (NOGUCHI, Ko)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：80304004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：呼吸鎖にはシトクロム経路(CP)とAOXの2つの経路がある。AOXは光化学系IIの光阻害を緩和する役割があると考えられていたが、その仕組みは不明だった。本研究ではシロイヌナズナのAOX活性を欠損している*aox1a*株を用いて、強光処理後の光化学系IIの最大活性の測定を行った。C強光処理後に光化学系IIの光阻害が起こったが、*aox1a*株の方が顕著であった。光呼吸活性を低下させる条件では、*aox1a*株での光阻害の一部が緩和された。本研究からAOXは光呼吸経路と関連して、光化学系IIの光阻害を保護する役割があることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Respiratory electron transport has two ubiquinol-oxidizing pathways, the cytochrome pathway (CP) and the alternative oxidase (AOX). AOX is energetically wasteful but may alleviate photosystem II (PSII) photoinhibition. However, its mechanism remains unknown. We used *Arabidopsis aox1a* mutants lacking AOX and studied the mutation's effects on photoinhibition by measuring the decrease in the maximum quantum yield of PSII (Fv/Fm) after high light (HL) exposure. Since CP compensates for the lack of AOX, we monitored the extent of photoinhibition under conditions where CP activity is partially inhibited by antimycin A. When leaves were exposed to HL, the decline in Fv/Fm was faster in the *aox1a* mutants, but under conditions where photorespiration was suppressed, the decline in Fv/Fm was suppressed in the *aox1a* mutants, but not in the wild type. Our results demonstrate that the lack of AOX causes an acceleration of PSII photoinhibition in relation to the photorespiratory pathway.

研究分野：植物生理生態学

キーワード：強光ストレス 呼吸鎖 代謝の相互作用

1. 研究開始当初の背景

植物ミトコンドリアには、ATP合成と共役しているシトクロム経路と alternative oxidase (AOX) などの共役しないバイパス経路がある。葉緑体の光合成系とミトコンドリアの呼吸鎖とは密接な相互作用があり、シトクロム経路はスクロース合成に ATP を供給する役割、バイパス経路は葉緑体に蓄積した過剰な還元力を消費する役割があると考えられている。葉緑体に蓄積した還元力はリンゴ酸-オキサロ酢酸シャトル (Mal-OAA shuttle) で、細胞質やミトコンドリアに輸送されている (文献,)。

シロイヌナズナなどの葉では呼吸鎖の活性を阻害したり、ロックアウト株などで AOX の発現を抑制すると、光合成電子伝達系の光化学系 II の活性が低下する (文献,)。呼吸鎖のシトクロム経路と AOX のどちらの経路を抑えても、光化学系 II の活性は低下する。光化学系 II の活性の低下は、強光下で見られる。さらに乾燥ストレス下では、AOX 活性を抑制すると、光化学系 II の活性の低下が著しくなる (文献,)。

光照射下のミトコンドリア内では光呼吸系により NADH が生成される。その NADH の一部はミトコンドリア呼吸鎖によって酸化されると考えられている。乾燥下で気孔が閉鎖することにより葉内 CO₂ 分圧が低下し、光呼吸活性が高まると考えられる。乾燥ストレス下では、AOX 活性の抑制による光化学系 II の活性の低下が著しくなったのは、低 CO₂ 下の呼吸鎖がより働くべき条件で呼吸鎖活性が抑制されたためだと考えられる。しかし、呼吸鎖による光化学系 II の活性を維持する生理的なメカニズムには、まだ不明が多い。

また光化学系 I から生成される NADPH の一部は、Mal-OAA shuttle で細胞質やミトコンドリアに還元力が移動していると考えられているが、光化学系 I と呼吸鎖との関係についても不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、以下の事柄を明らかにすることを目的とした。

- (1) 光化学系 II が光阻害を受けるような強光下で、ミトコンドリア呼吸鎖を阻害したときに、光化学系 II の活性の低下がどの程度おこるかどうか、それは光化学系 II の損傷過程と修復過程のどちらに影響しているか。
- (2) ミトコンドリア呼吸鎖のシトクロム経路とバイパス経路である AOX との間に、光合成系との相互作用における役割の違いがあるか。
- (3) 呼吸鎖と光呼吸系との関連を明らかにするために、光呼吸活性を変化させたときにどのような影響があるか。
- (4) 光合成電子伝達系の下流である光化学

系 I と呼吸鎖とに関連はあるか。

3. 研究の方法

シロイヌナズナ野生株 (Col-0) と呼吸鎖バイパス経路である AOX1a の欠損株 (*aox1a*) を、100 μmol photon m⁻² s⁻¹、日長 12 時間の条件下で栽培し、得られた完全展開葉を実験に用いた。

Col-0 と *aox1a* の完全展開葉から、1.3 cm² のリーフディスクを抜き取り、シトクロム経路の阻害剤 antimycin A や光化学系 II の D1 タンパク質の合成阻害剤の chloramphenicol を、陰圧下で葉に与えた。

antimycin A は光化学系 I の循環的電子伝達系 (PSI-CEF) を阻害しうる。シトクロム経路と PSI-CEF の阻害効果濃度が異なるため、シトクロム経路のみを阻害する濃度 (2 μM) の antimycin A を与えた。2 μM の antimycin A は PSI-CEF を阻害しないことを、クロロフィル蛍光パラメータである NPQ を測定することで確認した。

350 μmol photon m⁻² s⁻¹ の強光照射処理を 4 時間与え、強光処理の間の光化学系 II の最大活性 (Fv/Fm) の変化を、二次元クロロフィル蛍光測定装置 (Handy FluorCam, PSI) で測定した。また強光処理 4 時間後に、光化学系 I と光化学系 II の最大活性、量子収率や蛍光パラメータを、Handy FluorCam および、Dual PAM/F (Walz) で測定した。

さらに、強光照射中の CO₂ 濃度や O₂ 濃度を変えることで、光呼吸経路の活性を変化させた条件でも実験を行なった。

4. 研究成果

図 1 のように強光処理時間にしたがって、光化学系 II の活性が低下した。antimycin A が無い条件では、Col-0 と *aox1a* の低下の程度の差は小さかった。しかし、antimycin A 存在下では光照射処理による光化学系 II の活性の低下が促進された。またその低下の程度は、Col-0 よりも、*aox1a* の方が顕著であった。

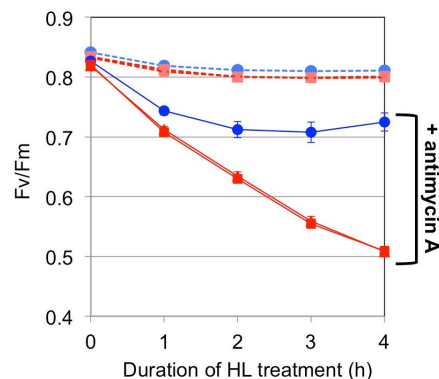


図 1 強光処理時間にしたがった光化学系 II の最大活性 (Fv/Fm) の変化。点線は antimycin A の非存在下、実線は存在下でのデータ。青は Col-0、赤は *aox1a* を示す。

光化学系 II の修復過程を阻害する chloramphenicol を与え、光化学系 II の損傷過程と修復過程への呼吸鎖阻害の影響を調べた。図 2 のように chloramphenicol を与えると、強光処理による光化学系 II の最大活性 (Fv/Fm) はより低下した。光化学系 II の修復過程が働いているために、強光下でも Fv/Fm が低下しなかったことがわかる。しかし、antimycin A 非存在下では、Col-0 と *aox1a* との間には、差が見られなかった。

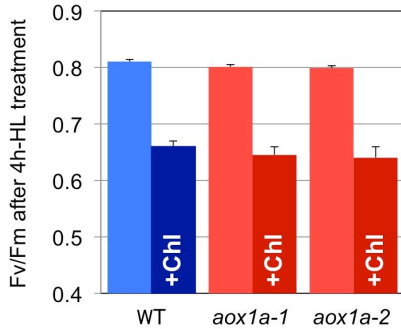


図 2 強光処理 4 時間後の光化学系 II の最大活性 (Fv/Fm)。「+Chl」は、chloramphenicol を与えた条件でのデータ。WT は Col-0 を示す。

図 3 のようにシトクロム経路を阻害する antimycin A 存在下では、Fv/Fm の値がより低下した。Col-0 では、chloramphenicol を与えた条件では、antimycin A の存在条件と非存在条件の間に差がないことから、antimycin A は、光化学系 II の修復過程に影響していることがわかった。また、*aox1a* のデータから、AOX が欠損している場合では、修復過程と損傷過程の両方の過程が影響を受けることがわかった。

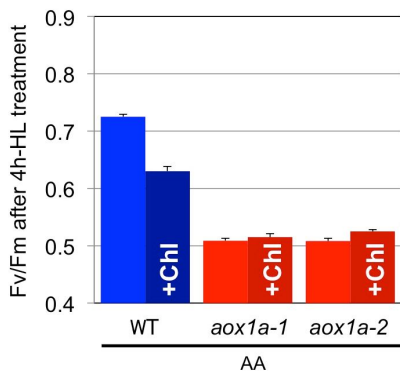


図 3 antimycin A を与えた葉の強光処理 4 時間後の光化学系 II の最大活性 (Fv/Fm)。「+Chl」は、chloramphenicol を与えた条件でのデータ。WT は Col-0 を示す。

また強光照射中の CO₂ 濃度や O₂ 濃度を変えて光呼吸の活性を変えると、光化学系 II の最大活性 (Fv/Fm) の低下の程度が変化した。図 4 右のように高 CO₂ 濃度 (3000 ppm) で処理すると、光化学系 II の最大活性の低下が抑えられた。また低 CO₂ 濃度 (40 ppm) で処理すると、光化学系 II の最大活性の低下が亢進

した (図省略)。

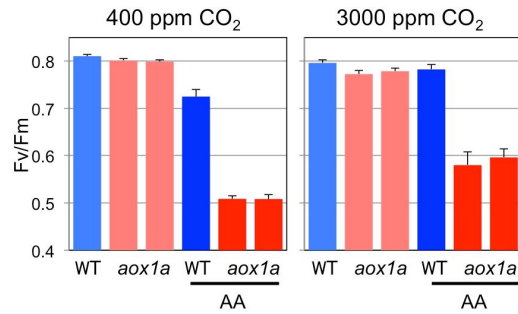


図 4 強光処理 4 時間後の光化学系 II の最大活性 (Fv/Fm)。400 ppm, 3000 ppm は、強光処理時の CO₂ 濃度を示す。WT は Col-0 を示す。

光呼吸活性が抑制され、光化学系 II の最大活性 (Fv/Fm) がそれほど低下しない高 CO₂ 条件 (3000 ppm) 下で、強光下の光化学系 II の量子収率 (YII) が低下するかを Dual PAM で測定した。YII の値は、antimycin A 存在下の *aox1a* では低かった (図 5 左)。また光化学系 II の Q_A の酸化レベルの指標である qp が低かった (図 5 右)。つまり、antimycin A 存在下の *aox1a* では、光化学系 II の下流の電子伝達が滞っていることがわかった。

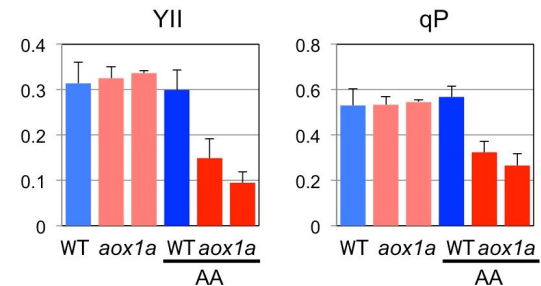


図 5 強光処理 4 時間後の葉の強光 (350 μmol m⁻² s⁻¹) 下の光化学系 II の量子収率 (YII) と光化学系 II の Q_A の酸化程度の指標である qp を示す。WT は Col-0 を示す。

光化学系 II の下流の電子伝達を調べるために、光化学系 I 反応中心 P700 の吸収を Dual PAM で調べた。強光下の光化学系 I の量子収率 (YI) は低下していた (図 6 左)。P700 の吸収変化の測定から、YND と YNA を求めた。YND は光化学系 I への電子流入が律速しているか、YNA は光化学系 I からの電子流出が律速しているかの指標である。YND の値が antimycin A 存在下の *aox1a* では低く、(図 6 右) YNA の値はどの条件でも同程度に低かった (図省略)。つまり、光化学系 I の量子収率 (YI) が低下するのは、上流からの電子の流入が滞っているためだと考えられる。

以上の測定から、antimycin A 存在下の *aox1a* では光化学系 II の量子収率が低下する理由として、光化学系 II 自体の光阻害と、光化学系 II から光化学系 I への電子伝達が阻害されることの 2 つが考えられる。今後は、そ

これらの要因について、精査していきたいと考えている。

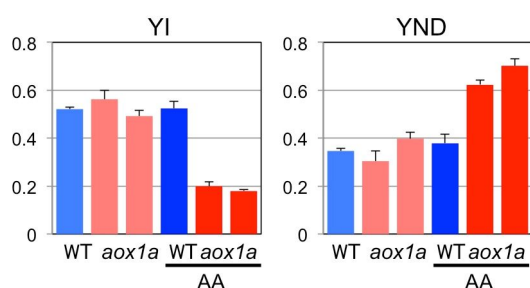


図6 強光処理4時間後の葉の強光 ($350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 下の光化学系 I の量子収率 (YI) と光化学系 I への電子流入の律速程度の指標である YND を示す。WT は Col-0 を示す。

< 引用文献 >

- Noguchi K, Yoshida K (2008) *Mitochondrion* 8: 87.
 Vanlerberghe GC (2013) *Int J Mol Sci* 14: 6805.
 Yoshida et al. (2006) *Plant Cell Physiol* 47: 22.
 Yoshida et al. (2011) *Plant Cell Env* 34: 1890.
 Giraud et al. (2008) *Plant Physiol* 147: 595.
 Dahal et al. (2014) *Plant Physiol* 166: 1560.

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4件)

- Kono M, Noguchi K, Terashima I (2014) Roles of the cyclic electron flow around PSI (CEF-PSI) and O_2 -dependent alternative pathways in regulation of the photosynthetic electron flow in short-term fluctuating light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 55: 990–1004 (査読有) DOI:10.1093/pcp/pcu033
Noguchi K, Yamori W, Hikosaka K, Terashima I (2015) Homeostasis of the temperature sensitivity of respiration over a range of growth temperatures indicated by a modified Arrhenius model. *New Phytologist*, 207: 34–42 (査読有) DOI: 10.1111/nph.13339
Noguchi K, Watanabe CK, Terashima I (2015) Effects of elevated atmospheric CO_2 on primary metabolite levels in *Arabidopsis thaliana* Col-0 leaves: An examination of metabolome data. *Plant and Cell Physiology*, 56: 2069–2078 (査読有) DOI:10.1093/pcp/pcv125
 Watanabe CKA, Yamori W, Takahashi S, Terashima I, Noguchi K (2016) Mitochon-

drial alternative pathway-associated photo-protection of Photosystem II is related to the photorespiratory pathway. *Plant and Cell Physiology*, in press (査読有) DOI:10.1093/pcp/pcw036

[学会発表] (計5件)

- 姜振祥, 吉田啓亮, 寺島一郎, 野口航 「葉における光合成系と呼吸系の相互作用」日本植物学会第77回大会 2013年09月13日～2013年09月15日 北海道大学札幌キャンパス, 北海道、札幌市
 姜振祥, 吉田啓亮, 寺島一郎, 野口航 「葉における光合成系と呼吸系の相互作用」日本植物生理学会第55回大会 2014年03月18日～2014年03月20日 富山大学五福キャンパス, 富山県、富山市
 河野優, 野口航, 寺島一郎 「変動光が光化学系 I と II の光阻害に及ぼす影響」日本植物学会第78回大会 2014年09月13日～2014年09月15日 明治大学生田キャンパス, 神奈川県、川崎市
 Watanabe CK, Yamori W, Takahashi S, Terashima I, Noguchi K “Roles of the respiratory system in alleviation of photoinhibition via the photorespiratory system” 9th International conference for plant mitochondrial biology, 2015年05月17日～2015年05月22日, Wroclaw, Poland
野口航, 渡辺千尋 「光合成している葉におけるミトコンドリア呼吸の役割」日本植物生理学会第57回大会 2016年03月18日～2016年03月20日 岩手大学上田キャンパス, 岩手県、盛岡市

[その他]

ホームページ等

<http://www.ls.toyaku.ac.jp/~ecology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口航 (NOGUCHI, Ko)
 東京薬科大学・生命科学部・教授
 研究者番号: 80304004