

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430191

研究課題名(和文) 高温ストレス下で光合成機能を維持する化合物の同定とその作用機構の解析

研究課題名(英文) Identification of the chemical compounds which alleviates heat damage of photosynthesis

研究代表者

明賀 史純 (Myouga, Fumiyoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：10342859

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)：本研究はクロロフィル蛍光を指標としたケミカルスクリーニングを行い、高温による光合成電子伝達阻害を緩和する化合物の同定を目指した。高温ストレス下で光合成の低下を大幅に緩和する化合物は得られなかったが、非ストレス条件下で光合成電子伝達を強力に阻害する2つの化合物を得た。これらの阻害活性は濃度依存的事であること、化合物の構造的に類縁なアナログまたは部分構造を持つ化合物もまた同程度に光合成阻害活性を示すこと、アナログとの競合実験から構造上活性に必要な部位が予想されたこと、1つの化合物は光化学系IIをそれ自身を阻害しており、もう一つの化合物は光化学系IIの下流(系IIなど)が阻害されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Using the RIKEN NPDepo chemical library, we try to identify the chemical compounds which suppress the damage of photosynthesis under heat stress by using chlorophyll fluorescence as an indicator. In first screening, we used the 80 of Authentic Library which contains standard natural compounds with bioactivity. Preliminary data show that chemical screening is useful for isolation of novel compounds that affect heat stress. In second screening that used the 400 of Pilot Library, we found two hit candidates of Fv/Fm inhibitor which showed considerably high inhibitory activity in dose dependent manner. Compounds having structurally related compounds (analogues) or partial structures of these compounds were found to exhibit the same photosynthetic inhibitory activity as the compounds obtained by the screening. Moreover, the photosynthetic parameters by chlorophyll fluorescence revealed that one compound inhibits the PSII itself and another compound inhibits somewhere downstream of the PSII.

研究分野：植物の環境応答

キーワード：植物ゲノム ケミカルバイオロジー 葉緑体 光合成 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

(1) 高温ストレスは植物の生長を阻害する。植物機能の中で高温への高い感受性を示すのは「光合成」である。温帯の C3 植物の多くは 30 付近に CO₂ の同化ピークを持ち、20 ~ 35 という幅広い光合成最適温度を持つことが知られている。しかしこの範囲を超えた高い葉面温度は、光合成装置を損傷させると同時に刺激された光呼吸により光合成効率を減少させ、その結果光合成を阻害する。

(2) 現在考えられている高温ストレス応答は、葉緑体チラコイド膜の透過性促進(チラコイド膜間のプロトン勾配の形成)と光化学系 (PSI)活性の促進(PSI 循環的電子伝達反応とステート遷移)そしてそれらの効果の結果として CO₂ 固定反応に關与する酵素であるルビスコの不活化である。

(3) この内、前者の葉緑体チラコイド膜の透過性と PSI 活性への変化は、最近のこの研究分野の急速な発展により、ある特定の波長のクロロフィル蛍光を測定する機器を用いることで比較的容易に観察することが可能となっている。これにより短期間で大量の試料の光合成電子伝達の状態を明らかにし、変異体のハイスループットな同定を行うことが可能となっている。

2. 研究の目的

(1) 急激な地球温暖化が進む中、動くことのできない植物の高温ストレスへの適応機構の解明は喫緊で重要な課題である。シロイヌナズナでは生育温度の至適温度を超える 35 ~ 42 の穏和な温度条件では葉緑体のチラコイド膜を含む植物生体膜の流動性の高まりと光合成に關連したタンパク質の不活性化により光合成電子伝達系への異常が生じ、光合成活性の低下が観察される。

(2) 本研究はクロロフィル蛍光を指標としたハイスループットなケミカルスクリーニングを行い高温ストレス条件下で光合成機能を維持可能とする化合物を同定し、得られた化合物の標的である光合成タンパク質の機能を明らかにすることにより植物の高温に対する適応機構の解明と高温下での光合成機能維持の付与を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 極端な高温ストレスは光合成の光化学系複合体 (PSII) を損傷することが知られている。一方、光照射下での穏やかな高温ストレス (35 ~ 42) は PSII を損傷しないことがクロロフィル蛍光を指標とした PSII 機能の測定により明らかになっている。しかし実際には PSI 循環的電子伝達反応とステート 1 からステート 2 への遷移との有意な増加が見られ、また electrochromic shift (ECS) によって測定されるチラコイド膜間のプロトン勾配形成が見られている。このことから穏やかな高温ストレスは循環的電子伝達が

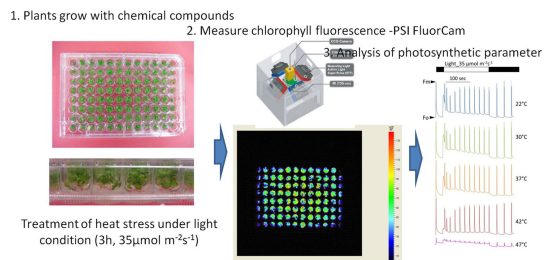
チラコイド膜の流動化を補償することで ATP 合成を続けることを可能にするのではないかと推測されている。本研究ではケミカルスクリーニングとクロロフィル蛍光測定を組み合わせたスクリーニング手法により、高温条件下でこれらの光合成電子伝達の阻害を抑える化合物を同定する。

(2) クロロフィル蛍光測定による化合物の多段階のスクリーニングにより複数の化合物が得られることが予想されるので、同じ作用機序を起こす化合物の分子構造を明らかにする。または同じような構造を持つ化合物間での高温ストレス下の光合成電子伝達阻害への抑制作用の強さを比較し、化合物関連図から予想される生理活性を持つ化学構造分子を推定する。これにより化合物を安価かつ大量生産することができ、高温耐性への植物の影響評価へと繋げることを可能とする。

(3) その化合物が影響を与える光合成電子伝達系の詳細な標的部位を明らかにし、化合物の標的である光合成タンパク質の機能を明らかにする。これには上記のスクリーニングとは異なる光波長を用いて行い、チラコイド膜のエネルギー状態をモニターする A518 吸収変化測定 (ECS 測定) や PSI の酸化還元状態をモニターする A810 吸収変化測定 (P700 測定) 等の物理学的手法を使うのと同様に、RNA プロット・イムノプロット・BN-PAGE 等の分子生物学的手法を用いて標的部位を明らかにする。これにより植物の高温に対する適応機構の 1 つを解明する。

4. 研究成果

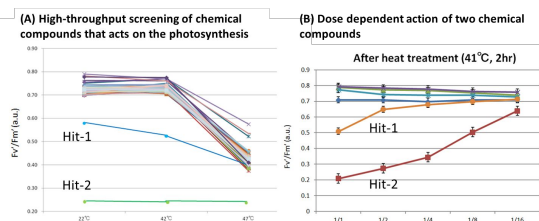
(1) 二次元クロロフィル測定装置を用いてクロロフィル蛍光を指標としたハイスループットなケミカルスクリーニングを行い、高温ストレスが及ぼす光合成電子伝達への負の影響を抑制する天然化合物の同定を目指した。



96 穴マルチタイタープレートの各ウェルに植物育成寒天培地と異なる天然化合物とを加えた培地を作成し、その上に 5 - 10 粒となるようにシロイヌナズナ野生型種子を播いた。良好に発芽させるために低温・暗所下で 3 日間放置して休眠処理を行った後、植物インキュベーターへプレートを移し通常育成条件下で 10 日間生育させた。10 日間育成した幼植物体を光照射下で 37 と 40 との 2 つの条件で 3 時間高温ストレス処理を行った。短時間暗所に置いた後、植物育成プレートを

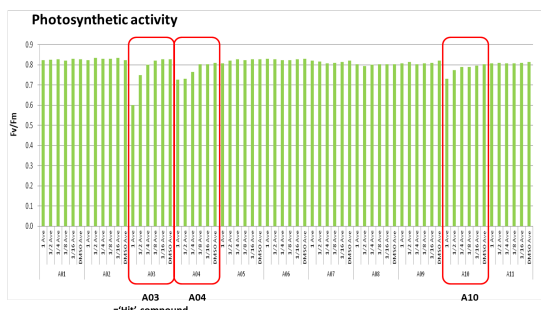
CCD カメラによる二次元クロロフィル蛍光測定装置 (PSI 社) を用いて 96 穴全ての植物体のクロロフィル蛍光を測定した。取得したクロロフィル蛍光データから光合成パラメータ値を算出し、高温ストレス処理前と処理後で他の化合物を加えた植物体とは異なる光合成パラメータ値の変化を示す「ヒット化合物」の有無を調べた。

(2) 試みとして行った約 80 種類の標準化合物による第一段目のスクリーニングの後、化合物数を増やした約 400 種類のパイロットライブラリーによる第二段目のスクリーニングを行った。1 回だけのスクリーニングによる植物の生育誤差などを排除するために同じ実験を 3 回繰り返した結果、化合物無しのコントロールと比べて高温ストレス下で光合成機能の低下を抑制する 4 つの化合物とストレスがない条件下でも光合成電子伝達を強力に阻害する 2 つの化合物とを得た。



(3) 光合成機能の低下を引き起こす 4 つの化合物の抑制活性はかなり弱く、高温ストレス下で光合成機能の低下を大幅に抑制する化合物は見つからなかった。一方、ストレスがない条件下で光合成電子伝達を強力に阻害する 2 つの化合物を得た。これらの 2 つの化合物の阻害活性は化合物濃度依存的であることを確認した。次にこれらの化合物と構造的に類縁な化合物 (アナログ) または部分構造を持つ化合物を用いて光合成阻害活性の有無を調べた。その結果、これらの構造的に類縁な化合物の中にスクリーニングで得られた化合物以上に高い阻害活性を持つものは存在せず、スクリーニングで得られた化合物と同様な光合成阻害活性を示した。

PSII activity of the commercial compounds similar with that of "Hit" compound



(4) 化合物同士を混合した時の阻害活性の変化を調べる競合実験を行い、化合物構造上で活性に必要と推測される部位を明らかに

した。さらにクロロフィル蛍光を用いた化合物を処理した時の光合成パラメータを調べることにより、光合成電子伝達上の標的の箇所を考察した。これにより 1 つの化合物は光化学系 II それ自身を阻害しており、もう一つの化合物の標的は光化学系 II の下流 (系 II など) に何らかが阻害されていることが示唆された。

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 5 件)

Takasaki H, Maruyama K, Takahashi F, Fujita M, Yoshida T, Nakashima K, Myouga F, Toyooka K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2015) SNAC-As, stress-responsive NAC transcription factors, mediate ABA-inducible leaf senescence. *Plant J.* 84: 1114-1123. doi: 10.1111/tpj.13067.
Motohashi R and Myouga F (2015) Chlorophyll Fluorescence Measurements in Arabidopsis Plants Using a Pulse-amplitude-modulated (PAM) Fluorometer. *Bio-protocol* 5(9): e1464.

<http://www.bio-protocol.org/e1464>. doi: なし

Motohashi R, Satou M, Myouga F, Oikawa A and Ohta D (2015) Arabidopsis Metabolome Analysis Using Infusion ESI FT-ICR/MS. *Bio-protocol* 5(9): e1463. <http://www.bio-protocol.org/e1463>. doi: なし

Higashi Y, Okazaki Y, Myouga F, Shinozaki K, Saito K. (2015) Landscape of lipidome and transcriptome under heat stress in Arabidopsis thaliana. *Scientific Reports* 5: 10533. doi: 10.1038/srep10533.

Nakahara J, Takechi K, Myouga F, Moriyama Y, Sato H, Takio S, Takano H. (2015) Bending of Protonema Cells in a Plastid Glycolate/Glycerate Transporter Knockout Line of Physcomitrella patens. *PLoS One*. 10:e0118804. doi: 10.1371/journal.pone.0118804.

(学会発表)(計 10 件)

Fumiyoshi Myouga, Kazuo Shinozaki (2017) Identification of the chemical compounds that inhibit photosynthetic electron transport system in Arabidopsis. The 58th Annual Meeting of the Japanese Society of Plant

Physiologists. Kagoshima University, Kagoshima, Japan, March 16-18, 2017. (Poster).

Kei Sakata, Yuki Akiyama, Atsushi Takabayashi, Fumiyoshi Myouga, Kazuo Shinozaki, Ayumi Tanaka and Ryouichi Tanaka (2017) Possible involvement of HCF173 and LIL6 (OHP2) in the repair process of photosystem II. The 58th Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists. Kagoshima University, Kagoshima, Japan, March 16-18, 2017. (Oral).

Fumiyoshi Myouga, Kazuo Shinozaki (2016) Identification of the chemical compounds that inhibit the photosynthetic electron transport systems in Arabidopsis. Cold Spring Harbor Asia Conference. Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyougo, Japan, November 29-December 2, 2016. (Poster).

Ryouichi Tanaka, Fumiyoshi Myouga, Kazuo Shinozaki, Yukako Kato, Ayumi Tanaka (2016) Functional analysis of OHP1 and LIL8(PSB33): Two LIL proteins involved in the assembly of photosystem II and in the connectivity of LHCS to the core complexes. 17th International Congress on Photosynthesis Research. Maastricht, Netherlands, 7-12 August, 2016. (Poster).

Myouga F., Shinozaki K (2016) Identification of the chemical compounds that help prevent thermal damage of electron transport in photosynthesis. The 57th Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists. Iwate University, Morioka, Japan, March 18-20, 2016. (Poster).

Motohashi R, Sakai A, Fukazawa C, Myouga F., Shinozaki K, Takeuchi A, Katsumata M (2016) Functional analysis of new chloroplast proteins using delayed fluorescence in Arabidopsis. The 57th Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists. Iwate University, Morioka, Japan, March 18-20, 2016. (Oral).

Myouga F., Shinozaki K (2015) Identification of the chemical compounds which alleviates thermal damage of photosynthetic electron-transport systems. 11th International Congress of Plant Molecular Biology. Bourbon Cataratas

Convention & Spa Resort, Iguazú Falls, Brazil, October 25- 30, 2015. (Poster).

Myouga F., Takahashi K, Tanaka R, Nakagami H, Shinozaki K (2015) A combined immunoprecipitation and mass spectrometric approach to determine OHP1-interacting partners. The 56th Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists. Tokyo University of Agriculture, Japan, 16-18 March, 2015. (Poster).

Higashi Y, Okazaki Y, Myouga F., Shinozaki K, Saito K (2015) Landscape of the lipidome and transcriptome under heat stress in Arabidopsis thaliana. The 56th Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists. Tokyo University of Agriculture, Japan, 16-18 March, 2015. (Oral).

Myouga F., Shinozaki K (2014) Search of the chemical compounds which alleviates thermal damage of photosynthetic electron-transport systems. 25th International Conference on Arabidopsis Research. University of British Columbia, Vancouver, Canada, July 28-August 1, 2014. (Poster).

〔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
タイトル:Chloroplast Function Database II
URL:http://range.psc.riken.jp/chloropla

st/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

明賀 史純 (MYOUGA, Fumiyoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学
学研究センター・研究員

研究者番号：1 0 3 4 2 8 5 9