

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450122

研究課題名(和文) C4植物に特化した光合成循環的電子伝達経路の解析

研究課題名(英文) Physiological role of cyclic electron transport around photosystem I in C4 photosynthesis

研究代表者

遠藤 剛 (Endo, Tsuyoshi)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：90201962

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)：キク科のC4植物フラベリア (*Flaveria bidentis*)の光合成循環的電子伝達に必須な葉緑体NAD(P)Hデヒドロゲナーゼ(NDH)複合体の発現抑制株を利用して循環的電子伝達のC4植物での役割を解析した。様々な光環境で、野生株と形質転換株を栽培し、光合成特性と生育を比較したところ、NDHの欠損は、特に光律速条件で、光合成速度の低下や生育の著しい遅延を引き起こした。この結果から、C4光合成ではNDH循環的電子伝達が、生育に重要なATP生成の補完機構として重要であることを示している。

研究成果の概要(英文)：Although contribution of cyclic electron flow around PS I (CEF) to C4 photosynthesis has long been suggested, there are few physiological evidences. I showed that without proper functioning of NDH-mediated CEF, a C4 dicot, *Flaveria bidentis* cannot operate efficient CO₂ assimilation by C4 photosynthesis under light limited condition. These results demonstrate that NDH-mediated CEF plays an indispensable role in C4 photosynthesis in *F. bidentis*.

研究分野：植物生理学

キーワード：循環的電子伝達 光化学系I フラベリア C4光合成 ATP生成 光・酸化的ストレス

1. 研究開始当初の背景

葉緑体 NAD(P)H デヒドロゲナーゼ (NDH) はチラコイド膜に局在し、光化学系 I の電子受容体側からプラストキノンへの電子伝達を仲介する。この NDH を介した光化学系 I 循環的電子伝達経路 (NDH 経路) では NADPH を生成することなく ATP の生成に必要なプロトン駆動力を発生させることが可能である。そのため NDH 経路は光合成電子伝達で生成される ATP/NADPH 比の調節に寄与すると考えられている。タバコ、シロイヌナズナ、イネなどの C₃ 植物では強光や高温ストレス下での光合成の維持に NDH 経路が重要となることが知られているが、これらの植物では NDH 経路とは別に PGR5 等に依存した光化学系 I 循環的電子伝達経路 (PGR5-PGRL1 経路) が主に機能しており、NDH 経路の役割は補助的なものであると考えられている。一方、トウモロコシ、ソルガムなどの C₄ 植物は ATP のエネルギーにより大気中の CO₂ を濃縮して炭酸固定を行うため、C₃ 植物に比べて光合成電子伝達で多くの ATP を生成する必要がある。これらの C₄ 植物では NDH の蓄積も C₃ 植物に比べて大きく上昇していることから C₃ 植物では補助的な役割しかもたない NDH 経路が C₄ 植物では光合成の維持により本質的な役割を果たしている可能性が提唱されてきた。

2. 研究の目的

NDH に依存した循環的電子伝達経路が C₄ 光合成で果たす機能について明らかにするために葉緑体 NDH を抑制した C₄ 植物を利用し、NDH 欠損が光合成特性や生育に及ぼす影響について生理学的な解析を行う。

3. 研究の方法

これまでの研究で作成した NDH 発現抑制株を野生株とともに、様々な環境条件で栽培し、光合成特性と生育を比較した。また、NDH 欠損が、循環的電子伝達以外の光合成装置に影響を与えるか否かを生化学的に解析した。

4. 研究成果

(1) NDH 発現抑制株の形質の解析

これまでに作成した Ndh-N サブユニットの発現抑制株について、NDH 複合体以外の光合成装置に影響がないか否かを生化学的に解析した。中程度の光強度で生育させた植物を用いて、イムノブロット解析にて、光化学系 II と I、NDH 複合体、PGR5 複合体、Rubisco、PEPC 等の光合成の主要な構成成分について、発現量を比較したところ、NDH 抑制株では NDH 複合体の蓄積が認められなかったが (図 1)、それ以外のタンパク複合体については野生株と NDH 発現抑制株に有意な差はなかった。また、循環的電子伝達活性をクロロフィル蛍光の作用光照射後の一過的上昇を指標として測定したところ、当該抑制株には活性が認められなかった (図 2)。

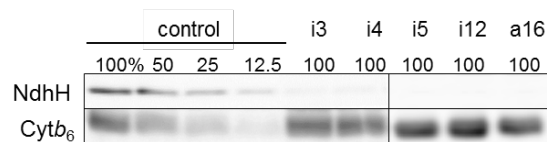


図 1 抗 NdhH 抗体を用いたイムノブロット解析。Vector control と形質転換株 (i3-a16 の 5 株)。各レーンには 30 μg タンパク質相当量の粗チラコイド膜画分およびその希釈系列をロードした。コントロールとして抗 Cytb₆ 抗体を用いた。

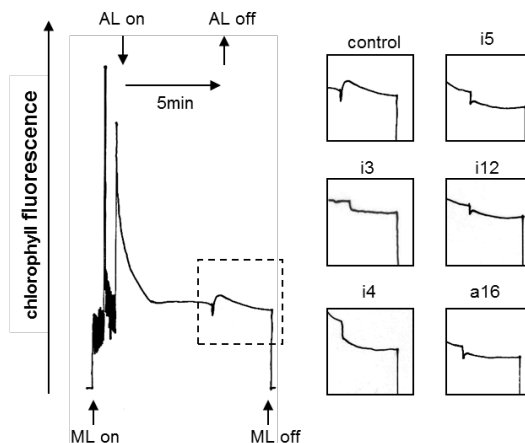


図 2 クロロフィル蛍光による *in vivo* NDH 活性測定。AL: 光合成作用光 (50 μmol photons m⁻² s⁻¹)、ML: 測定光、SP: 飽和パルス。光合成作用光消光後のクロロフィル蛍光の一過的上昇 (破線部) を NDH 活性として検出した。

(2) 異なる光環境下での生育

F. bidentis の NDH 抑制株を C₄ 植物の栽培に最適とされる中光条件 (400 μmol photons m⁻² s⁻¹) で栽培した。その結果、葉の大きさや色などの見た目にそれほど大きな差は見られなかったが (図 3 上図)、

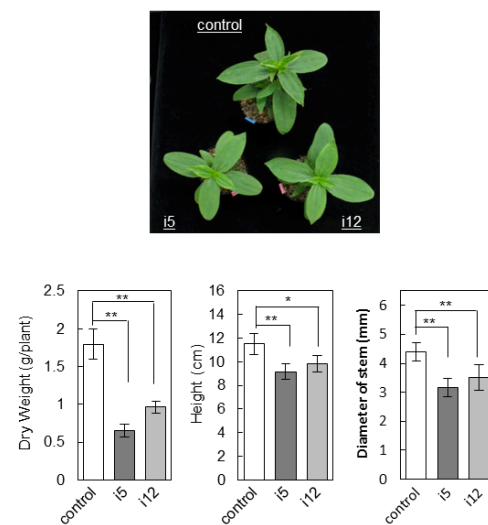


図 3 中光での vector control と抑制株の生育比較

地上部の乾燥重量、植物高、茎の太さに低下が見られ (図3下図)、NDH 経路の抑制が C₄ 植物の成長に影響を及ぼすことが示された。葉面積当たりの炭素量と C₄ 経路による CO₂ 濃縮効率を示す指標となる炭素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) の値 (Tazoe et al. 2008, Pengelly et al. 2010) にも低下が見られたことから、C₄ 光合成効率の低下が成長の低下を引き起こしていることが示唆された。C₄ 光合成は炭酸固定により多くの ATP を必要とするため、光合成電子伝達による ATP と NADPH の生成速度が律速条件となる弱光下で不利になる可能性が議論されてきた (Hatch 1970, Ehleringer and Björkman 1977, Sage 2014)。NDH 経路が C₄ 光合成に必要な ATP の供給に機能するのであれば、その寄与は ATP 律速となる弱光でより大きくなることが予想された。そこで NDH 抑制株を弱光条件 ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で栽培したところ、著しい生育遅延を示した (図4)。弱光下で栽培した NDH 抑制株では葉面積当たりの炭素量と $\delta^{13}\text{C}$ の値だけでなく、クロロフィル量、タンパク質量、窒素量の低下も見られた。また、NDH 抑制株の生育遅延はガラス温室内の自然光下で栽培した場合にも見られた。

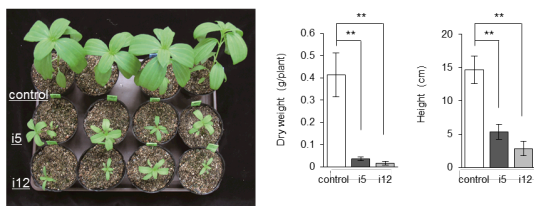


図4 弱光での vector control と抑制株の生育比較

(3) NDH 抑制株における二酸化炭素固定速度の測定

光強度に対する NDH 経路の抑制による影響を更に解析するために、中光条件で栽培した植物を用いて光強度に対する CO₂ 吸収速度 (Light-curve) の測定をおこなった。そ

の結果、弱光～中光条件 ($< 1,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で NDH 抑制株の CO₂ 吸収速度に低下が見られた (Fig. 2-6)。前述のように、イムノブロット解析では、PEPC、PPDK、Rubisco といった C₄ 経路や CBB サイクルで炭酸固定に寄与するタンパク質の蓄積は NDH 抑制株とコントロール株で特に差は見られなかったことから NDH の抑制によって CO₂ 吸収速度の低下が引き起こされていると示唆された。

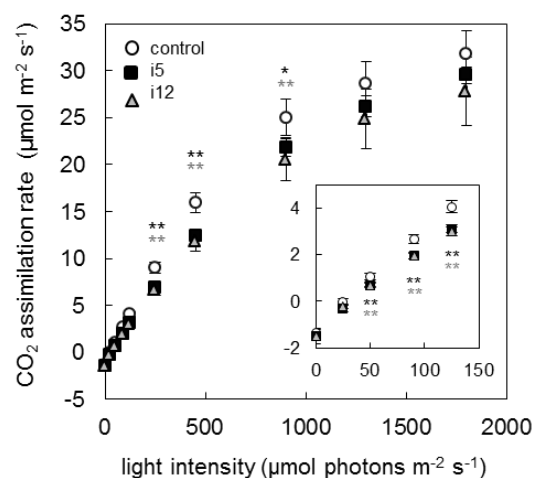


図5 NDH 抑制株の Light-curve。測定には中光条件 ($400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で栽培した播種後8週目の植物の最上位の完全展開葉を用いた ($n = 5$)。弱光領域を拡大したものを差込図として示した。エラーバーは標準偏差を表す。コントロール株と NDH 抑制株に有意差がある場合はアスタリスク (黒色: i5、灰色: i12) で示した。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (Tukey 検定)。

(4) NDH 抑制株における光合成電子伝達活性の測定

光強度に対する NDH 抑制株の光合成電子伝達活性を解析するために、中光条件で栽培した植物を用いてクロロフィル蛍光、P700 吸光度変化の測定をおこなった。これらの測定法が、C₄ 植物における光合成電子伝達活性の評価に有効であることは先行研究によって示されているが (Genty et al. 1989, Krall et al. 1991, Oberhuber et al. 1993、

Kiirats et al. 2010)、現行のクロロフィル蛍光および P700 測定装置では C₄ 植物の葉に存在する 2 つの異なる葉緑体 (葉肉細胞葉緑体、維管束鞘細胞葉緑体) から生じるシグナルを分けて検出することはできない。そのため、これらの装置を用いて得られた測定結果を葉肉細胞葉緑体、維管束鞘細胞葉緑体それぞれの光合成電子伝達活性と直接結びつけて解釈することはできない点に留意しなければならない。部分的に NAD-ME 型のような C₄ 経路を持つ *F. bidentis* では典型的な NADP-ME 型の C₄ 植物とは異なり維管束鞘細胞にもかなりの PS II の蓄積が認められる。また NDH も葉肉細胞、維管束鞘細胞の両葉緑体に存在する (Ketchner and Sayre 1992、Meister et al. 1996、Gowik et al. 2011、Nakamura et al. 2013)。そのため、本項で示すデータは葉肉細胞葉緑体、維管束鞘細胞葉緑体の両方に由来するシグナルを反映していると考えられた。

電子伝達速度に NDH 抑制株とコントロール株で特に差は見られなかった (図 6 左) が、NPQ は NDH 抑制株で低下していた (図 6 右)。NDH 抑制株とコントロール株に見られた NPQ の差は短時間の暗処理で解消されたことから、PS II アンテナからのフィードバック熱放散に由来するものであることが示唆された (Quick and Stitt 1989)。フィードバック熱放散は光合成電子伝達に伴うルーメンの酸性化によって引き起こされる (Müller et al 2001)。フィードバック熱放散の誘導にはチラコイド膜タンパク質 PsbS が必須であるが (Li et al. 2000)、PsbS の蓄積に NDH 抑制株とコントロール株の間で特に差は見られなかった。このことから NDH 抑制株ではチラコイド膜間でのプロトン輸送能が低下しルーメンの酸性化が抑制されていることが示唆された。

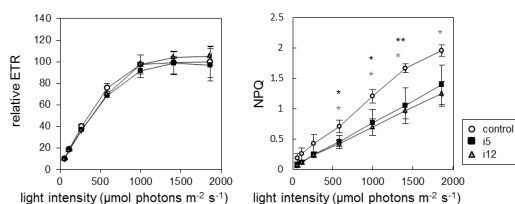


図 6 NDH 抑制株におけるクロロフィル蛍光測定。測定には中光条件 (400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で栽培した播種後 8 週間の植物の最上位の完全展開葉を用いた。(左) PS II の相対電子伝達速度、(右) NPQ ($n = 3$)。エラーバーは標準偏差を表す。コントロール株と NDH 抑制株に有意差がある場合はアスタリスク (黒色 : i5、灰色 : i12) で示した。* : $P < 0.05$ 、** : $P < 0.01$ (Tukey 検定)。

PS I の反応中心、P700 の酸化レベルを P700 の吸光度変化をモニターすることで見積もった。強光照射下では P700 は NDH 抑制株でコントロール株に比べてより還元的になることが示された (図 7)。C₃ 植物シロイヌナズナの PGR5-PGRL1 経路欠損株 (*pgr5*, *pgr1*) では中光以上 ($> 300 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で P700 が著しく過還元状態になることが知られている (Munekage et al. 2002、Dalcorso et al. 2008)。これに対し、シロイヌナズナの NDH 経路欠損株では定常光合成条件では P700 の過還元は見られない (Munekage et al. 2004)。しかし、超強光の照射 ($3,500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を 10 分照射) によって P700 の過還元が引き起こされることが NDH 経路欠損タバコで示されている (Endo et al. 1999)。C₃ 植物よりも NDH の蓄積が多い C₄ 植物の *F. bidentis* では定常光合成での電子伝達における NDH 経路の寄与が増大し、PGR5-PGRL1 経路同様に P700 の過還元を防ぐ役割を果たしていることが示唆された。一方、弱光下では P700 は NDH 抑制株でコントロール株に比べてより酸化的になることが示された (図 7)。弱光条件では光合成電子伝達による還元力が過剰に蓄積することが想定されにくいこ

とから、この表現型はコントロール株で P700 の過還元が生じているというよりはむしろ NDH 抑制株で NDH からシトクロム *b₆f* 複合体を経由した PS I への電子供与が抑制されていることを反映していると考えられた。シトクロム *b₆f* 複合体は光合成電子伝達に伴うストロマからルーメンへのプロトン輸送に機能し (Tikhonov 2014)、複合体 I との相同性から NDH も同様の機能を持つと考えられている (Friedrich 1995)。そのため NDH 抑制株ではシトクロム *b₆f* 複合体と NDH を通じたストロマからルーメンへのプロトン輸送能が低下していると考えられた。

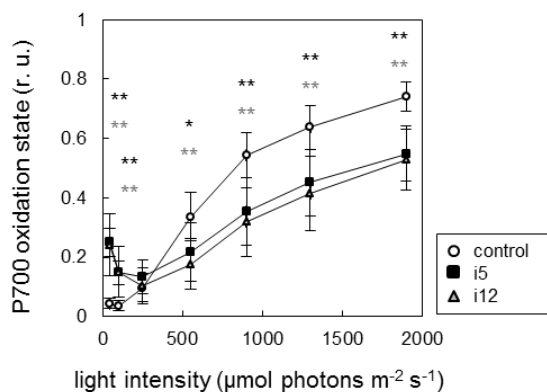


図7 NDH 抑制株における P700 酸化レベル。測定には中光条件 (400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で栽培した播種後 8 週目の植物の最上位の完全展開葉を用いた ($n=8$)。エラーバーは標準偏差を表す。コントロール株と NDH 抑制株に有意差がある場合はアスタリスク (黒色 : i5、灰色 : i12) で示した。* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ (Tukey 検定)。

まとめ

C_4 光合成の ATP 要求性と葉緑体 NDH の発現に高い相関性が見られることから光化学系 I 循環的電子伝達経路の一つである NDH 経路が C_4 光合成に必要な ATP の供給に重要であることが示唆されてきた (Takabayashi et al. 2005、Majeran et al. 2008)。本研究では C_4 植物 *F.bidentis* の NDH 抑制株を作成し、その光合成特性について解析

をおこない NDH 経路が C_4 光合成に重要な役割を果たしていることを生理学的に証明した。1 分子当たりの CO_2 の固定により多くの ATP を必要とする C_4 光合成は光合成電子伝達によるエネルギー生成が光合成を律速する弱光条件で C_3 光合成に比べて不利になるのではないかと、という議論はこれまでも幾度となされてきた (Hatch 1970、Ehleringer and Björkman 1977、Percy and Ehleringer 1984、Sage 2014)。この問いに対する一つの答えとして、Ehleringer らは C_3 光合成では大気条件で光呼吸によるエネルギーと CO_2 のロスがおこるため、光呼吸活性の高くなる高温条件 ($> 30^\circ\text{C}$) では ATP のコストを費やしたとしても C_4 光合成の方が高効率であるという結果を示した (Ehleringer and Björkman 1977、Percy and Ehleringer 1984)。これは光呼吸が C_3 光合成の本来の効率を阻害するという事実を明確にした非常に意義深いものであったが、その一方、 C_4 光合成に高いエネルギーコストを補うための仕組みは存在しないのか、という疑問は明らかにされないままだった。本研究では NDH 経路を抑制した C_4 植物 *F. bidentis* では特に弱光条件での C_4 光合成効率が著しく減少することを示し、 C_4 経路を駆動するための ATP コストは光合成電子伝達に利用可能な光エネルギーが制限される弱光条件で C_4 植物にとって負担となり、NDH 経路を増強させることによってその負担を軽減させている可能性が強く示唆された。一方、光呼吸存在下でも ATP/NADPH 要求比が直線的電子伝達経路における ATP/NADPH 生成比とそれほど乖離しない C_3 植物で NDH 経路を増強しても、ATP の消費キャパシティを超えたプロトン輸送がルーメン側の過度な酸性化を引き起こしチラコイド膜タンパク質へダメージを与える危険性が考えられた。こうした ATP 要求性の違いから C_4 植物では NDH の発現が増強

される反面、C₃植物ではNDHの蓄積は低く抑えられているのではないかと推定された。このように光合成電子伝達系は炭酸固定系のエネルギー要求に応じて最適化される必要性があり、本研究では、炭酸固定様式のC₄化に伴うエネルギー要求性の変化に伴ってC₄植物では光合成電子伝達もC₄化されているということを生理学的に示した。

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 4 件)

- ① Ishikawa, N., Takabayashi, A., Noguchi, K., Tazoe, Y., Yamamoto, H., von Caemmerer, S., Sato, F. and Endo, T. (2016) NDH-mediated cyclic electron flow around photosystem I is crucial for C₄ photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 57, 2020-2028. doi: 10.1093/pcp/pcw127.
 - ② Ikeuchi, M., Sato, F. and Endo, T. (2016) Allocation of Absorbed Light Energy in Photosystem II in NPQ Mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 57, 1484-1494.
 - ③ Tazoe, Y., Sazuka, T., Yamaguchi, M., Saito, C., Ikeuchi, M., Kanno, K., Kojima, S., Hirano, K., Kitano, H., Kasuga, S., Endo, T., Fukuda, H. and Makino, A. (2015) Growth properties and biomass production in the hybrid C₄ crop *Sorghum bicolor*. *Plant Cell Physiol.* 57, 944-952. doi:10.1093/pcp/pcv158.
 - ④ Ishikawa, N., Takabayashi, A., Sato, F. and Endo, T. (2016) Accumulation of the components of cyclic electron flow around photosystem I in C₄ plants, with respect to the requirements for ATP. *Photosynth. Res.* 129, 261-277. doi: 10.1007/s11120-016-0251-0.
- 以上、すべて査読あり。

[学会発表] (計 5 件)

- ① 2014 日本植物生理学会 3件
- ② 2015 日本植物生理学会 1件
- ③ 2014 日本光合成学会 1件

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 剛 (ENDO, Tsuyoshi)
京都大学・大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号 90201962

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし