

光合成生物の環境適応と その分子機構について

北海道大学 低温科学研究所・学術変革(A) 光合成ユビキティ 編 Edited by Institute of Low Temperature Science (Hokkaido University) and Photosynthesis Ubiquity (JSPS KAKENHI)

はじめに

人類による化石燃料の大量消費に端を発する気候変動は、近年、世界中で深刻な災害をもたら している。先進国を中心に各国で対策が検討されており、その中には人工材料や装置を用いて二 酸化炭素を吸収するというアイデアもあるが、人間がどんなにがんばっても、地球上で光合成生物が 行っている炭素固定の規模とは比べようがない。例えば、北米から戻る飛行機の窓から外を眺めると (飛行高度が低ければ)、カナダの広大な森林を目にすることができるし、東南アジアに旅すれば熱 帯のジャングルを身近に感じることもできる。このような地球上を覆う樹木に匹敵するような二酸化炭 素吸収装置を人工的に開発するのは現実的とは思えない。もちろん、森林を形成する生物は、いず れ分解され樹木を構成していた炭素は二酸化炭素として大気中に放出されるので、その意味では 森林が二酸化炭素を減らしているわけではないかもしれない、しかし、森林そして光合成生物は天 然の二酸化炭素を減らしているわけではないかもしれない、しかし、森林そして光合成生物は天 然の二酸化炭素を減らしているわけでくないかもしれない。とかし、森林そして光合成生物は天 然の二酸化炭素を吸収して保持してくれる。しかも、使うのは基本的には日光と水だけ、 この素晴らしく自律的な二酸化炭素の吸収兼リザーバー装置を維持・拡大することが、気候変動 対策の一丁目一番地ではないかと、光合成研究者の一人として考える。(つまりさまざまな生態系を 保護することが重要、という意味である。)

光合成の基本的な仕組みは多くの点で解明されてきているが、その多様性についてほとんど理解 は進んでいないとも言える.なぜ南極のような低温で光合成が可能なのか、常緑樹の光合成は冬 季にはどのような状況なのか、光合成生物によって環境への適応や応答が異なるのはなぜなのか、 そもそも光合成生物には、光合成装置や光合成のしくみ、という点でどれほどの多様性があるのか、 光合成研究者は地球上の光合成生物の多様性についてまだ十分に理解できていない.

令和5年度に発足した文部科学省科学研究費補助金学術変革領域(A)「あらゆる地球環境 で光合成を可能とする超分子構造制御」(略称:光合成ユビキティ)は、光合成の環境適応機構 を俯瞰して、シアノバクテリア・藻類・陸上植物が海水・淡水・陸上、そして熱帯から寒冷域まで 生息域の拡大を果たした環境適応の原理を解明することを目指している.環境変化に対応する超 分子複合体の制御系では、オングストローム[Å]からサブµmの異なった空間スケールと、ピコ秒から 分の時間幅で分子機械であるタンパク質を中心に多様な調節機能が働いている.この多次元・多 階層システムの理解に取り組むには、急速に利用が広がっている先端的構造生物学による可視化 技術、非モデル生物にまで展開している我が国が誇る信頼度の高い光合成解析技術、そして比較 的容易に決定可能となった豊富なゲノム情報を駆使した比較ゲノム解析とAlphaFoldに代表される 正確な予想構造を駆使した情報解析技術の融合にあると考えた. ユビキタスな光合成に切り込む 我々の研究を『光合成ユビキティ』と名付けて真に新しい融合研究により初めて到達できる新しい学 理の構築を目指している. 最新の研究成果からは,光合成生物は環境に適応する際にチラコイド膜 上の基本分子装置そのものは変えず,特定のタンパク質やその組み合わせを多様化することで,個 別の環境に適応した集光やその制御を進化させてきたと推察される. すなわち,光合成の環境適応 においては様々なタイプの超分子装置の機能制御と構造形成を軸に環境適応を理解することが重 要であると判り始めたのである. "環境適応において形成される超分子装置"をキーワードに,時空 間的な広がりを繋ぎ,領域研究を多階層・多次元研究へと推進することで「光合成ユビキティ」の 不思議を解明する研究プロジェクトが進行中である.

本巻は、北海道大学・低温科学研究所で毎年発行されている紀要集「低温科学」の特集として、 学術変革領域研究(A)光合成ユビキティと低温科学研究所の共同編集によって、光合成生物の 環境適応とその分子機構について、「多様な環境に適応する光合成生物」「光合成生物に幅広く 共通する分子機構」「光合成研究の基盤となる実験技術・手法」という3つの角度から最新の知 見を取りまとめた.これらの解説論文は、分野外の研究者や大学院生にもわかりやすく書かれている. これらの解説が、光合成および関連分野の理解や今後の研究の発展につながっていくことが期待 される.

最後に、本巻の刊行にあたり、ご多忙の中、論文を執筆してくださったすべての著者にこの場を借 りて御礼申し上げる.

「低温科学」第83巻編集委員会および光合成ユビキティ共同編集

栗栖	源嗣	(大阪大学蛋白質研究所)
伊藤	寿	(北海道大学低温科学研究所)
高林	厚史	(北海道大学低温科学研究所)
小野	清美	(北海道大学低温科学研究所)

田中 亮一(北海道大学低温科学研究所)

はじめに	
第1章 非モデル生物における光合成の分子機構,適応機構,進化	
葉緑体における酸素還元反応 嶋川 銀河	1
極限環境に生息する紅色光合成細菌由来 LH1-RC 複合体の構造と機能 木村 行宏, 谷 一寿, 大友 征宇	9
ヘテロシストを形成しない糸状性窒素固定シアノバクテリア Leptolyngbya boryana : 新たなモデルシアノバクテリアの可能性 藤田 祐一,山本 治樹,馬場 真里	23
紅色進化系統藻類の光捕集複合体 I:構造多様化の進化メカニズム 熊沢 穣, 伊福 健太郎	37
ナンキョクカワノリが獲得した遠赤色光利用型光合成 そのメカニズムと進化系統 小杉 真貴子	49
紅葉の仕組みとその役割について 北尾 光俊	61
冬季の常緑植物における持続的熱放散	69
越冬および積雪が常緑植物の光合成や分布に与える影響	79

目 次

第2章 光合成生物に幅広く共通する分子機構

構造から光合成の仕組みを解き明かす	87
シアノバクテリアのステート遷移とユニバーサルストレスタンパク質 園池 公毅	99
レドックス制御系による葉緑体の機能調節 着田 啓亮, 久堀 徹	109
パートナースイッチングシステムの 30 年 ― シアノバクテリア研究者の観点から ― 日原 由香子	119
光化学系 II 修復におけるタンパク質修飾と D1 タンパク質分解 加藤 裕介, 坂本 亘	135
光合成研究におけるモデル生物のシトクロム b ₆ f 複合体変異株	143
オルガネラ DNA 分解の多様化と植物の成長戦略 高見 常明, 坂本 亘	157
光合成生産におけるシンク・ソース関係:生理生態学研究 寺島 一郎	165
植物における光化学系Iの光阻害とその防御機構	181
秋の紅葉とクロロフィルの分解 伊藤 寿	189
植物の越冬と凍結抵抗性について 荒川 圭太, 鈴木 伸吾	201

第3章 光合成研究の基盤となる実験技術・手法

祖先型遺伝子の再現による環境適応進化の解析 嶺井 隆平, 大森 聡, 土方 敦言	引,土屋	裕子,	白井	剛	211
電気泳動の原理と buffer 系の比較 — SDS-PAGE から Native-PAGE へ		<u>च</u> ब	高林 🌖	厚史	221
原子間力顕微鏡の仕組みと光合成膜試料観察への応用	山本	大輔, 山	山野	奈美	229
緑色系統におけるカロテノイドの分析	関 荘	一郎,萠	泰井	律子	237

第1章

非モデル生物における光合成の分子機構, 適応機構, 進化

葉緑体における酸素還元反応

嶋川 銀河¹⁾

2024年11月21日受付, 2024年12月18日受理

植物や藻類,シアノバクテリアが行う酸素発生型光合成では光エネルギーを利用して水と二酸化炭 素から糖と酸素が生じる.一般的に酸素は光合成において「生成」されるものだが、実際は光合成を行 う葉緑体やシアノバクテリア細胞では光照射下において酸素の還元、すなわち「消費」も起こっており、 そこに係る分子メカニズムの中には、細胞レベルにおいて光合成に引けをとらない活性をもつものも 存在する.本稿では、光合成において明反応でも暗反応でもない「ナニカ」である葉緑体の酸素還元に ついて解説する.

Oxygen-reducing reactions in chloroplasts

Ginga Shimakawa¹

Oxygenic photosynthesis in plants, algae, and cyanobacteria produces sugar and O2 with light energy. Generally, O2 is recognized as what produced, and actually it is also what consumed in illuminated chloroplasts and cyanobacterial cells through the molecular mechanisms, some of which have comparable capacity to photosynthesis at cellular levels. Here, I review the O2-reducing reactions in chloroplasts that are neither light nor dark reactions of photosynthesis.

キーワード:酸素の光還元,代替的電子伝達,水-水サイクル,フラボジアイアンタンパク質,末端酸化酵素 O2 photoreduction, Alternative electron flow, Water-water cycle, Flavodiiron proteins, Terminal oxidases

1. はじめに

光合成は、地球上に生存するあらゆる生物の営みに欠 かせない生体反応である. 植物や藻類、シアノバクテリ アが行う酸素(O₂)発生型光合成では、光エネルギーを利 用して水(H₂O)を酸化し、チラコイド膜にある電子伝達系 を駆動することによって還元力であるNADPHと高エネル ギー化合物であるATPを生成し、それらを使って二酸化炭 素(CO₂)から糖(C₆H₁₂O₆)を合成する(式1).

連絡先 嶋川 銀河 神戸大学大学院農学研究科 〒 657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台 1-1 Tel: 078-803-5850 Email: gshimakawa@panda.kobe-u.ac.jp

6
$$H_2O$$
 + 6 CO_2 → $C_6H_{12}O_6$ + 6 O_2 - 式1

やや単純化し過ぎてはいるものの,式1に示される光合 成反応の基本構造はあらゆる光合成生物において普遍で あり,今から30億年ほど前に誕生して以来本質的には変 わることなく維持されてきたシステムと考えられる.O₂ 発生型光合成において,電子伝達系におけるATPおよび NADPHの生成(明反応)とカルビン・ベンソン回路におけ

神戸大学大学院農学研究科 Graduate School of Science, Chiba University, Chiba, Japan

るそれらの消費(暗反応)のカップリングは大原則であり、 前者の明反応(光化学系IIにおけるH,Oの酸化で生じた電子 が光化学系IにおけるNADP⁺の還元へと使われる過程)はよ り具体的に直線的電子伝達と呼ばれる(図1; ※単に光化学 系IIと光化学系Iの間で起こる電子伝達反応を直線的電子 伝達と定義するケースもあるが、本稿ではあくまで暗反 応と厳密にカップリングする電子伝達反応に対してこの 語を用いる). 直線的電子伝達とカルビン・ベンソン回路 のみを想定した場合,光合成の反応は式1の通りに進むと 想定される. その一方で、電子伝達系で生じた還元力は 生物種に特有の分子メカニズムを介して様々な代謝へと 利用され、それらが細胞レベルにおいてカルビン・ベン ソン回路におけるCO。同化速度に匹敵する反応速度を有し ていた場合、式1だけでは光合成で起こっている生理現象 を説明できない、このとき生じる「直線的電子伝達以外の 電子伝達反応 |が代替的電子伝達である.

酸素分子は2つの不対電子をもつため細胞内で還元され やすくスーパーオキシドラジカル (O₂⁻)を生じることが知 られるが、この反応に光化学系IIでH2O酸化 (式2)から生 じた電子が使われた場合、光合成電子伝達系で生じた全 ての還元力がカルビン・ベンソン回路で消費されたとは 言えない.

$$\mathbf{2} \mathbf{H}_2 \mathbf{O} \rightarrow \mathbf{O}_2 + \mathbf{4} \mathbf{H}^+ + \mathbf{4} \mathbf{e}^- \qquad - \vec{\mathbf{x}} \mathbf{2}$$

ここで重要なのは、そのO₂還元が細胞内で「どれくらい」 起こっているかである.もしも細胞レベルの反応速度が, 光合成CO2同化速度と比べて無視できるほど小さければ、 少なくとも光合成全体の反応(式1)に影響しないが、CO, 同化速度に引けを取らないレベルで起こっていた場合, そのO2還元反応は代替的電子伝達としてはたらく.この 場合、電子受容体はNADP+ではなくO,となるが、実験に おいて電子伝達「活性」を検出することができる. また光 化学系IIから光化学系Iへの電子伝達が生じていればシト クロムb。f複合体におけるO-サイクルによってプロトン濃 度勾配が形成され、ATP生成は行われる(図1,2).そして 電子伝達系における各コンポーネントの酸化還元レベル もO2に強く依存することになるであろう.はたして、そ のようなことが自然界で起こりうるだろうか? 葉緑体に おけるO2の還元反応については昔から多くの研究が進め られているが、21世紀に入ってから分子レベルでの理解 がさらに進展し、とりわけ代替的電子伝達に対する認識 はこの20年で大きく変わったように思える.本稿では過 去の研究の流れを交えつつ.可能な限り簡単に最新の知 見をまとめることに努める.各項目についてより詳細な 情報は引用元の文献などを参照することを勧める.また 本稿のタイトルは、ミトコンドリア呼吸と分けて議論す るため「葉緑体における・・」としたが、基本的に原核光 合成生物であるシアノバクテリア細胞も植物や藻類のも つ葉緑体と同じ立場において話を進める.

2. Water-water cycle

植物の葉から単離精製したチラコイド膜に様々なタン パク質や酸化還元物質を添加してクロロフィル蛍光を測 定することで, *in vitro*で再構成した光合成電子伝達系の 活性評価が可能である.一連の実験結果から,アスコル ビン酸(AsA)や過酸化水素(H₂O₂),モノデヒドロアスコル ビン酸(MDA)還元酵素などの存在下において再構成した 電子伝達系におけるクロロフィル蛍光の光化学的消光が 観測され,光合成電子伝達系で生じる還元力を利用した H₂O₂の消去システム (water-water cycle)の全容が明らかと なった (Miyake and Asada 1992, Miyake et al. 1998). Waterwater cycleの詳細については多くの総説や解説記事が公表 されているため (Asada 2000),本稿では反応の概要および 細胞レベルにおける活性に絞って解説する.

$2 \ \mathbf{O}_2 + 2 \ \mathbf{e}^- \rightarrow 2 \ \mathbf{O}_2^-$	- 式3a
$2 \ \mathbf{O_2}\text{-} + 2 \ \mathbf{H}^{\scriptscriptstyle +} \rightarrow \mathbf{H_2}\mathbf{O_2} + \mathbf{O_2}$	- 式3b
$H_2O_2 + 2 AsA \rightarrow 2 H_2O + 2 MDA$	- 式3c
$2 \text{ MDA} + 2 \text{ H}^+ + 2 \text{ e}^- \rightarrow 2 \text{ AsA}$	- 式3d
$\mathbf{O_2} + 4 \ \mathbf{H}^{\scriptscriptstyle +} + 4 \ \mathbf{e}^{\scriptscriptstyle -} \rightarrow 2 \ \mathbf{H_2O}$	- 式3e

まず光化学系IにおいてO₂が還元し、O₂「が生成する(式 3a; Mehler 1951, Asada et al. 1974). 生じたO₂「はスーパー オキシドジスムターゼによって速やかにH₂O₂へと不均化 され(式3b), これをAsAペルオキシダーゼがH₂Oへと還元 する(式3c). この過程でAsAが酸化して生じたMDAは, MDA還元酵素(電子供与体はNADPH)あるいはフェレドキ シン(Fd)によってAsAへと再還元される(式3d). 一連の 反応式を足し合わせると式3eとなり,光化学系IIにおける H₂Oの酸化(式2)を考慮すればO₂の収支はプラスマイナス ゼロであるため、O₂を発生せずNADPHも生成しない電子 伝達反応が光化学系IIと光化学系Iの間に生じることとな る(図2).

残念ながら、生葉を用いて行われた実験によって、C3 植物の光合成電子伝達活性は概ねカルビン・ベンソン回 路と光呼吸のみから説明できることが示され(Driever and



図1:酸素発生型光合成における直線的電子伝達とカルビン・ ベンソン回路 直線的電子伝達の経路を赤点線で示す.





Baker 2011, Miyake 2020), 結論として細胞レベルにおける water-water cycleの反応速度は少なくとも光合成CO₂同化速 度と比べると無視できるほど小さいことが分かっている. 恐らくは,そもそもO₂⁻の生成速度がそこまで高くないの であろう(猛毒である活性酸素の生成速度がそこまで大き くないのは当然のことかもしれない).このことは,強光 や低CO₂条件などO₂⁻生成が予想されるストレス環境にお いて光化学系I周辺が酸化的に保たれることとも一致し, 光合成生物はできるだけ光化学系Iにおいて活性酸素生 成が起きないように電子伝達反応を制御しているようで ある(Shimakawa and Miyake 2018, Furutani et al. 2023).こ れらを踏まえると,water-water cycleは代替的電子伝達と いうよりも活性酸素の消去システムとして重要な役割を 担っていると考えられる.

3. Flavodiironタンパク質

シアノバクテリアや緑藻では、上述したC3植物とは異 なり、細胞レベルにおいてwater-water cycleの活性が高く 検出されていたが、その分子的実体は長らく不明であっ た(Badger et al. 2000). そんな中、21世紀に入って新た に同定されたO₂還元酵素がフラボジアイアンタンパク質 (Flavodiiron protein, FLV)である(Helman et al. 2003). FLV は2鉄センター、フラビンモノヌクレオチド結合モチー フ、そしてNAD(P)H:フラビン酸化還元酵素類似モチーフ という3つのドメインから成り立つ分子量70 kDa程度のフ ラビンタンパク質であり(図3; Vicente et al. 2002, Vicente et al. 2008a),シアノバクテリアや緑藻、基部陸上植物(コ

ケ,シダ,裸子植物),そして一部の渦鞭毛藻でのみ見つ かっている (Alboresi et al. 2019). また上述した3つのドメ インのうち2鉄センターとフラビンモノヌクレオチド結合 モチーフを有したオルソログが多くの細菌で見つかって おり、FDPと総称される(FLVはFDPの中で光合成生物がも つものに対する略称と思われる). FLVはその一次構造か らタイプAとタイプBの2種類に細分され、上記の光合成生 物はAB両方の酵素を最低1セットは有している. 遺伝子組 換えによって片方のタイプを欠損させると表現型がみら れること (Helman et al. 2003, Allahverdiyeva et al. 2013), ま た渦鞭毛藻SymbiodiniaceaeがAタイプとBタイプの遺伝子 をポリシストロニックにコードすること (Shimakawa et al. 2022)から、FLVは異なるタイプの酵素がヘテロ二量体ま たは四量体を形成して機能すると考えられている (Beraldo et al. 2024). 細胞レベルの実験から, FdがFLVの電子供与 体としてはたらくことが分かっており (Sétif et al. 2020), in vitroにおいてFLVがFdとの相互作用を示すこともこれを 裏付けている(Hanke et al. 2011). また細菌のもつ多くの FDPにおいて反応過程で活性酸素が検出されないことから (Romão et al. 2016), FLVによるO,還元もH,Oへの4電子還 元(式3e)であると考えられている(図2).

FLVが触媒するO2還元は、細胞レベルにおいてその反応速度が非常に大きく、シアノバクテリアにおいては最大CO₂同化速度の半分に近いスケールに達することもある(Helman et al. 2003, Shimakawa et al. 2015). これはミトコンドリア呼吸におけるO₂還元速度の比ではなく、現在までに見出されているO₂還元酵素の中でも恐らく最大クラスであろう. その活性の高さゆえに、FLVによる代替的



図3:ゼニゴケがもつAおよびBタイプFLVのAlphaFold予測構造 図にはAlphaFold3による予測構造を使用し、モチーフが予測される配列箇所を 色付けした.

電子伝達は光合成生物において様々な機能を有すること が分かっている. 中でも最も有名なものは、シアノバク テリアや緑藻、コケ植物におけるFLV欠損株の解析結果か ら明らかとなった光化学系Iの保護機能である.変動光な ど急激な光強度変化を含む光ストレスやCO。欠乏環境にお いては、NADPHの消費が間に合わず光化学系Iの下流が過 還元状態となる危険があるが、これを防ぐためにFLVが O2へと余剰の電子を逃がしており、活性酸素生成を防い でいる (Allahverdiyeva et al. 2013, Gerotto et al. 2016, Chaux et al. 2017, Shimakawa et al. 2017). またFLVによる代替的 電子伝達はNADPHを生成することなくプロトン濃度勾配 を形成する (ATPを生成する) ため、CO2同化反応の誘導を 促進したり、その最大活性を高めることが示されている (Hasunuma et al. 2014, Gómez et al. 2018). ピレノイド型の CO,濃縮機構をもつ緑藻クラミドモナスはCO,同化酵素ル ビスコへ供給するCO,をチラコイド膜内腔の酸性条件を利 用して生成しているが、FLVはプロトン濃度勾配の形成を 促進することでルビスコへのCO₂供給をサポートすること も報告されている (Burlacot et al. 2022). さらにその他の生 理機能として、シアノバクテリアのヘテロシストではFLV による代替的電子伝達がO2除去にはたらくことも示され ており (Ermakova et al. 2014), これはまさにChlorobaculum tepidumなど嫌気性細菌においてFDPが担う生理機能と似 たものである (Li et al. 2009). これら一連の生理機能には, CO2同化速度に匹敵する反応速度だけではなく、FLVがも つ高いO2親和性にも支えられている。例えば光呼吸の初 発反応であるルビスコのオキシゲナーゼ反応はKm値が 100-1600 µM程度であるが (Orr et al. 2016, Tcherkez 2016), 細菌のもつFDPはO₂に対して1 μM程度のK_m値を示し

(Vicente et al. 2008b),同様に光合成生物のFLVも極めて高 い O_2 親和性有していると推定される(Hayashi et al. 2014). シアノバクテリアや緑藻,コケ植物にとってFLVのもつ高 い O_2 親和性は、気体の拡散が制限される水中環境で役立っ ていたのかもしれない(Shimakawa et al. 2017).

興味深いことに、FLVによるO₂還元反応は、カルビン・ ベンソン回路や光呼吸によって還元力の消費が十分に行 われている際にはほとんど見られない.これが単にFd-NADP⁺酸化還元酵素(FNR)やFLVのFdに対する親和性で 決まっているのか、あるいは電子伝達系の酸化還元状況 に応じて何らかの制御がはたらいているのかについては、 未だ決着がついていない(Beraldo et al. 2024).また筆者を 含めて多くの研究者が、in vitroにおけるFLV反応の再現に 挑戦したが、未だタンパク質レベルでFLVのO2還元反応 を正確に捉えた研究報告は出ていない.

4. 末端酸化酵素

植物や藻類の葉緑体は、ミトコンドリア呼吸電子伝達 系ではたらくオルタナティブオキシダーゼのオルソログ に相当する葉緑体末端酸化酵素(Plastid terminal oxidase, PTOX)をもつ(Kuntz 2004, Nawrocki et al. 2015). PTOXは 葉緑体ストロマに局在する40 kDa程度の可溶性タンパク 質であり、還元型プラストキノン(PQH₂)を電子供与体と してO₂の4電子還元を行う(式3e). この反応は葉緑体呼吸 と呼ばれ、PTOXによるO2還元反応は*in vitro*においても 再現可能である(Yu et al. 2014). 酸化型プラストキノン (PQ)は光化学系IIによって還元されるため、光照射下に おいてPTOXが行うO₂還元反応は代替的電子伝達としては たらく可能性があるが (Laureau et al. 2013), 通常生葉や 生細胞レベルで検出されるPTOXのO₂還元速度は, 光合成 CO₂同化速度などと比べると無視できるほど小さいようで ある (Trouillard et al. 2012). その一方で, PTOXはその発 現量が増加する乾燥や塩ストレスなどにおいて代替的電 子伝達としてはたらくことも指摘されている (Johnson and Stepien 2016).

原核光合成生物であるシアノバクテリアの細胞内では, 植物や藻類のミトコンドリア呼吸においてはたらくシト クロムc酸化酵素や大腸菌など細菌の呼吸電子伝達系では たらくbd-キノール酸化酵素,あるいはこれら両方の末端 酸化酵素が、光合成電子伝達系と同じチラコイド膜に存在 する (図4). それゆえ光合成と呼吸それぞれの電子伝達系 は、PQプールのみならずシトクロムb₆f複合体やプラスト シアニン (およびシトクロム c_6) をシェアしており (Binder 1982, Peschek et al. 2004), これらを中継地点として光合 成-呼吸の各電子伝達系間で電子の交換が行われることが 多くの研究によって証明されている (Cooley and Vermaas 2001, Liu et al. 2012, Lea-Smith et al. 2013, Shimakawa et al. 2014). ただし, 先行研究では基本的に阻害剤や遺伝子組 換えによっていずれかの経路を完全に止めた状態で他の 経路の電子伝達活性を評価する手法が取られており、光 合成と呼吸両方の電子伝達系が健全な状態においてどの 程度のリークが起こりうるのか定量的な報告は未だない. シアノバクテリアの細胞呼吸が示すO2還元速度は、葉緑 体呼吸よりも遥かに大きく、細胞内に蓄積された呼吸基 質の量によるが光合成最大CO2同化速度の3割程度のス ケールまでは増加する (Helman et al. 2005, Shimakawa et al. 2021). とはいえ前述した通り,いくら呼吸電子伝達の速 度が大きくても、その中の何%が光合成電子伝達と干渉し ているかが不明瞭であるため、シアノバクテリアの細胞呼 吸を単純に代替的電子伝達と捉えるのは難しい. 少なくと もシアノバクテリア呼吸におけるOっ還元速度は主に呼吸 基質(より具体的には還元力であるNADPHを供給する酸 化的ペントースリン酸経路)に依存しており、光強度には 直接的な影響を受けないことが分かっている(Shimakawa 2023).

5. 未知のO2光還元メカニズム

現在まで明らかになっている葉緑体O2還元反応の分子 メカニズムは、そのほとんどが実験で扱いやすいモデル 生物において同定されたものであり、その他の多種多様 な生物種、とりわけ二次共生藻(ユーグレナ藻、クリプト 藻, 珪藻, 渦鞭毛藻など)の多くでは分子レベルの研究が ほとんど行われていない. 例えば特定の珪藻種において光 合成CO₂同化速度に匹敵するwater-water cycleの活性が報告 されている(Waring et al. 2010). また真正眼点藻*Vischeria punctata*や多くの褐藻(大型藻類)においてO2光還元による 光化学系Iの酸化が観察されている(Shimakawa et al. 2019). これら二次共生藻は,進化系統的にFLVをもたないと考え られ,その代替的電子伝達には未同定の新規分子が係る ことが期待される.

6. おわりに

「光合成は明反応と暗反応から成り立つ」というのが教 科書に記載される定説であるが,今回取り上げたO₂還元 反応は、代替的電子伝達としてはたらくことで光合成全 体の反応(式1)にとって無視できない「明反応でも暗反応 でもないナニカ」となる. 分子レベルの研究が進展する中 で、O2還元反応の実体も今ではより明確なものとなって きた(図2). 光合成においてO2を「生成」する葉緑体の中 にこれほど多種多様なO₂を「消費」する分子メカニズムが 存在するのは、ひとえに還元されやすいO2の性質が関係 するものと思われる.とはいえ、決して代替的電子伝達 =O2還元反応でもない.本稿では取り上げないが,藻類 やシアノバクテリアを中心としてO2還元を伴わない代替 的電子伝達が報告されており, その分子的実体は未だに 不明である (Halsey and Jones 2015, Shimakawa and Matsuda 2024). さらには光化学系Iの下流からPQやシトクロム b。f複合体へ電子が戻る循環的電子伝達も提唱されている (Arnon 1991). 細胞レベルにおける反応速度や分子メカニ ズムについてはまだ議論の渦中であるが、循環的電子伝 達は昔から多くの光合成研究者がターゲットとしており, 今なお世界各所で独自の研究が展開されている (Strand and Kramer 2014, Yamori and Shikanai 2016, Buchert et al. 2020, Theune et al. 2021, Ohnishi et al. 2023, Maekawa et al. 2024). このように、光合成には明反応と暗反応のほかに、未だ その実体や機能が解き明かされていない謎が隠されてい る.本稿に触れた学生諸君が、これまでとは少し違う視 点で光合成を眺めれるようになれば幸いである.

謝辞

本稿執筆の機会を与えてくださった田中亮一先生(北海 道大学)および原稿執筆に際して貴重なご助言をくださっ た三宅親弘先生(神戸大学)に深くお礼申し上げます.ま



図4:光合成と呼吸の電子伝達が共存したシアノバクテリアチラコイド膜の模式図 直線的電子伝達および呼吸電子伝達をそれぞれ赤点線と黒点線で示す.

た本原稿の執筆は学術変革領域「光合成ユビキティ」にお ける活動の一環として行いました(No. 24H02102 to G.S.).

参考文献

- Alboresi, A., Storti, M. and Morosinotto, T. (2019) Balancing protection and efficiency in the regulation of photosynthetic electron transport across plant evolution. *New Phytol.* 221: 105-109.
- Allahverdiyeva, Y., Mustila, H., Ermakova, M., Bersanini, L., Richaud, P., Ajlani, G., et al. (2013) Flavodiiron proteins Flv1 and Flv3 enable cyanobacterial growth and photosynthesis under fluctuating light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110: 4111-4116.
- Arnon, D.I. (1991) Photosynthetic electron transport: Emergence of a concept, 1949–59. *Photosynth. Res.* 29: 117-131.
- Asada, K., Kiso, K. and Yoshikawa, K. (1974) Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination. *J. Biol. Chem.* 249: 2175-2181.
- Asada, K. (2000) The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 1419-1431.
- Badger, M.R., von Caemmerer, S., Ruuska, S. and Nakano, H. (2000) Electron flow to oxygen in higher plants and algae: rates and control of direct photoreduction (Mehler reaction) and rubisco oxygenase. *Philos. Trans. R. Soc. London* 355: 1433-1446.
- Beraldo, C., Traverso, E., Boschin, M., Cendron, L., Morosinotto, T. and Alboresi, A. (2024) Physcomitrium patens flavodiiron proteins form heterotetrametric complexes. *J. Biol. Chem.* 300.

Binder, A. (1982) Respiration and photosynthesis in energy-

transducing membranes of cyanobacteria. J. Bioenerg. Biomembr. 14: 271-286.

- Buchert, F., Mosebach, L., G\u00e4belein, P. and Hippler, M. (2020) PGR5 is required for efficient Q cycle in the cytochrome b₆f complex during cyclic electron flow. *Biochem. J.* 477: 1631-1650.
- Burlacot, A., Dao, O., Auroy, P., Cuiné, S., Li-Beisson, Y. and Peltier, G. (2022) Alternative photosynthesis pathways drive the algal CO₂-concentrating mechanism. *Nature* 605: 366-371.
- Chaux, F., Burlacot, A., Mekhalfi, M., Auroy, P., Blangy, S., Richaud, P., et al. (2017) Flavodiiron proteins promote fast and transient O₂ photoreduction in *Chlamydomonas. Plant Physiol.* 174: 1825-1836.
- Cooley, J.W. and Vermaas, W.F.J. (2001) Succinate dehydrogenase and other respiratory pathways in thylakoid membranes of Synechocystis sp. strain PCC 6803: Capacity comparisons and physiological function. *J. Bacteriol.* 183: 4251-4258.
- Driever, S.M. and Baker, N.R. (2011) The water–water cycle in leaves is not a major alternative electron sink for dissipation of excess excitation energy when CO₂ assimilation is restricted. *Plant Cell Environ.* 34: 837-846.
- Ermakova, M., Battchikova, N., Richaud, P., Leino, H., Kosourov, S., Isojarvi, J., et al. (2014) Heterocyst-specific flavodiiron protein Flv3B enables oxic diazotrophic growth of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. Proc. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111: 11205-11210.
- Furutani, R., Wada, S., Ifuku, K., Maekawa, S. and Miyake, C. (2023) Higher reduced state of Fe/S-signals, with the suppressed oxidation of P700, causes PSI inactivation in *Arabidopsis thaliana. Antioxidants* 12: 21.
- Gómez, R., Carrillo, N., Morelli, M.P., Tula, S., Shahinnia, F.,

- Gerotto, C., Alboresi, A., Meneghesso, A., Jokel, M., Suorsa, M., Aro, E.-M., et al. (2016) Flavodiiron proteins act as safety valve for electrons in Physcomitrella patens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113: 12322-12327.
- Halsey, K.H. and Jones, B.M. (2015) Phytoplankton strategies for photosynthetic energy allocation. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 7: 265-297.
- Hanke, G.T., Satomi, Y., Shinmura, K., Takao, T. and Hase,
 T. (2011) A screen for potential ferredoxin electron transfer partners uncovers new, redox dependent interactions. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* 1814: 366-374.
- Hasunuma, T., Matsuda, M., Senga, Y., Aikawa, S., Toyoshima, M., Shimakawa, G., et al. (2014) Overexpression of *flv3* improves photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 by enhancement of alternative electron flow. *Biotechnol. Biofuels* 7: 493.
- Hayashi, R., Shimakawa, G., Shaku, K., Shimizu, S., Akimoto, S., Yamamoto, H., et al. (2014) O₂-dependent large electron flow functioned as an electron sink, replacing the steadystate electron flux in photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, but not in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Biosci Biotechnol Biochem* 78: 384-393.
- Helman, Y., Tchernov, D., Reinhold, L., Shibata, M., Ogawa, T., Schwarz, R., et al. (2003) Genes encoding A-type flavoproteins are essential for photoreduction of O₂ in cyanobacteria. *Curr. Biol.* 13: 230-235.
- Helman, Y., Barkan, E., Eisenstadt, D., Luz, B. and Kaplan, A. (2005) Fractionation of the three stable oxygen isotopes by oxygen-producing and oxygen-consuming reactions in photosynthetic organisms. *Plant Physiol.* 138: 2292-2298.
- Johnson, G.N. and Stepien, P. (2016) Plastid terminal oxidase as a route to improving plant stress tolerance: Known knowns and known unknowns. *Plant Cell Physiol*. 57: 1387-1396.
- Kuntz, M. (2004) Plastid terminal oxidase and its biological significance. Planta 218: 896-899.
- Laureau, C., De Paepe, R., Latouche, G., Moreno-Chacón, M., Finazzi, G., Kuntz, M., et al. (2013) Plastid terminal oxidase (PTOX) has the potential to act as a safety valve for excess excitation energy in the alpine plant species Ranunculus glacialis L. *Plant Cell Environ*. 36: 1296-1310.

- Lea-Smith, D.J., Ross, N., Zori, M., Bendall, D.S., Dennis, J.S., Scott, S.A., et al. (2013) Thylakoid terminal oxidases are essential for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to survive rapidly changing light intensities. *Plant Physiol*. 162: 484-495.
- Li, H., Jubelirer, S., Garcia Costas, A.M., Frigaard, N.-U. and Bryant, D.A. (2009) Multiple antioxidant proteins protect *Chlorobaculum tepidum* against oxygen and reactive oxygen species. *Arch. Microbiol.* 191: 853.
- Liu, L.-N., Bryan, S.J., Huang, F., Yu, J., Nixon, P.J., Rich, P.R., et al. (2012) Control of electron transport routes through redox-regulated redistribution of respiratory complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109: 11431-11436.
- Maekawa, S., Ohnishi, M., Wada, S., Ifuku, K. and Miyake, C. (2024) Enhanced reduction of ferredoxin in PGR5-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* stimulated ferredoxindependent cyclic electron flow around photosystem I. *Int. J. Mol. Sci.* 25: 2677.
- Mehler, A.H. (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 33: 65-77.
- Miyake, C. and Asada, K. (1992) Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiol.* 33: 541-553.
- Miyake, C., Schreiber, U., Hormann, H., Sano, S. and Kozi, A. (1998) The FAD-enzyme monodehydroascorbate radical reductase mediates photoproduction of superoxide radicals in spinach thylakoid membranes. *Plant Cell Physiol*. 39: 821-829.
- Miyake, C. (2020) Molecular mechanism of oxidation of P700 and suppression of ros production in photosystem I in response to electron-sink limitations in C₃ plants. *Antioxidants* 9: 230.
- Nawrocki, W.J., Tourasse, N.J., Taly, A., Rappaport, F. and Wollman, F.-A. (2015) The plastid terminal oxidase: Its elusive function points to multiple contributions to plastid physiology. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66: 49-74.
- Ohnishi, M., Maekawa, S., Wada, S., Ifuku, K. and Miyake, C. (2023) Evaluating the oxidation rate of reduced ferredoxin in Arabidopsis thaliana independent of photosynthetic linear electron flow: Plausible activity of ferredoxin-dependent cyclic electron flow around photosystem I. *Int. J. Mol. Sci.* 24: 12145.
- Orr, D.J., Alcântara, A., Kapralov, M.V., Andralojc, P.J., Carmo-Silva, E. and Parry, M.A.J. (2016) Surveying Rubisco diversity and temperature response to improve crop photosynthetic efficiency. *Plant Physiol.* 172: 707-717.

- Peschek, G.A., Obinger, C. and Paumann, M. (2004) The respiratory chain of blue-green algae (cyanobacteria). *Physiol. Plant.* 120: 358-369.
- Romão, C.V., Vicente, J.B., Borges, P.T., Frazão, C. and Teixeira, M. (2016) The dual function of flavodiiron proteins: oxygen and/or nitric oxide reductases. *JBIC*, J. Biol. Inorg. Chem. 21: 39-52.
- Sétif, P., Shimakawa, G., Krieger-Liszkay, A. and Miyake, C. (2020) Identification of the electron donor to flavodiiron proteins in *Synechocystis* sp. PCC 6803 by in vivo spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1861: 148256.
- Shimakawa, G., Hasunuma, T., Kondo, A., Matsuda, M., Makino, A. and Miyake, C. (2014) Respiration accumulates Calvin cycle intermediates for the rapid start of photosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biosci Biotechnol Biochem* 78: 1997-2007.
- Shimakawa, G., Shaku, K., Nishi, A., Hayashi, R., Yamamoto, H., Sakamoto, K., et al. (2015) FLAVODIIRON2 and FLAVODIIRON4 proteins mediate an oxygen-dependent alternative electron flow in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under CO₂-limited conditions. *Plant Physiol.* 167: 472-480.
- Shimakawa, G., Ishizaki, K., Tsukamoto, S., Tanaka, M., Sejima, T. and Miyake, C. (2017) The liverwort, *Marchantia*, drives alternative electron flow using a flavodiiron protein to protect PSI. *Plant Physiol*. 173: 1636-1647.
- Shimakawa, G. and Miyake, C. (2018) Oxidation of P700 ensures robust photosynthesis. *Front. Plant Sci.* 9: 1617.
- Shimakawa, G., Murakami, A., Niwa, K., Matsuda, Y., Wada, A. and Miyake, C. (2019) Comparative analysis of strategies to prepare electron sinks in aquatic photoautotrophs. *Photosynth. Res.* 139: 401-411.
- Shimakawa, G., Kohara, A. and Miyake, C. (2021) Characterization of light-enhanced respiration in cyanobacteria. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 342.
- Shimakawa, G., Shoguchi, E., Burlacot, A., Ifuku, K., Che, Y., Kumazawa, M., et al. (2022) Coral symbionts evolved a functional polycistronic flavodiiron gene. *Photosynth. Res.* 151: 113-124.
- Shimakawa, G. (2023) Electron transport in cyanobacterial thylakoid membranes: are cyanobacteria simple models for photosynthetic organisms? *J. Exp. Bot.* 74: 3476-3487.
- Shimakawa, G. and Matsuda, Y. (2024) Extra O₂ evolution reveals an O₂-independent alternative electron sink in photosynthesis of marine diatoms. *Photosynth. Res.* 159: 61-68.

- Strand, D.D. and Kramer, D.M. (2014) Control of nonphotochemical exciton quenching by the proton circuit of photosynthesis. In *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria.* Edited by Demmig-Adams, B., Garab, G., Adams Iii, W. and Govindjee pp. 387-408. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Tcherkez, G. (2016) The mechanism of Rubisco-catalysed oxygenation. Plant Cell Environ. 39: 983-997.
- Theune, M.L., Hildebrandt, S., Steffen-Heins, A., Bilger, W., Gutekunst, K. and Appel, J. (2021) In-vivo quantification of electron flow through photosystem I – Cyclic electron transport makes up about 35% in a cyanobacterium. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1862: 148353.
- Trouillard, M., Shahbazi, M., Moyet, L., Rappaport, F., Joliot, P., Kuntz, M., et al. (2012) Kinetic properties and physiological role of the plastoquinone terminal oxidase (PTOX) in a vascular plant. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1817: 2140-2148.
- Vicente, J.B., Gomes, C.M., Wasserfallen, A. and Teixeira, M. (2002) Module fusion in an A-type flavoprotein from the cyanobacterium Synechocystis condenses a multiplecomponent pathway in a single polypeptide chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294: 82-87.
- Vicente, J.B., Carrondo, M.A., Teixeira, M. and Frazao, C. (2008a) Structural studies on flavodiiron proteins. *Methods Enzymol* 437: 3-19.
- Vicente, J.B., Justino, M.C., Goncalves, V.L., Saraiva, L.M. and Teixeira, M. (2008b) Biochemical, spectroscopic, and thermodynamic properties of flavodiiron proteins. *Methods Enzymol* 437: 21-45.
- Waring, J., Klenell, M., Bechtold, U., Underwood, G.J.C. and Baker, N.R. (2010) Light-induced responses of oxygen photoreduction, reactive oxygen species production and scavenging in two diatom species. J. Phycol. 46: 1206-1217.
- Yamori, W. and Shikanai, T. (2016) Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis and plant growth. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67: 81-106.
- Yu, Q., Feilke, K., Krieger-Liszkay, A. and Beyer, P. (2014) Functional and molecular characterization of plastid terminal oxidase from rice (*Oryza sativa*). *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1837: 1284-1292.

極限環境に生息する紅色光合成細菌由来 LH1-RC 複合体の構造と機能

木村 行宏¹⁾,谷 一寿²⁾,大友 征宇³⁾

2024年12月1日受付, 2024年12月24日受理

紅色光合成細菌は酸素発生を伴わない原始の光合成生物であり,酸素発生型光合成生物が利用しない低エネルギーの近赤外光を吸収して,光一物質変換を営んでいる.その中心的な役割を担うのが光 捕集1反応中心(LH1-RC)複合体である.構造および機能的に比較的シンプルであり,さまざまな極限 環境に生息する種が存在するため,光合成タンパク質の構造機能相関を調べる上で非常に魅力的なツー ルである.本稿では,極限環境で生息する紅色光合成細菌の中から好熱性紅色細菌,好塩性紅色細菌, 低エネルギーを利用する紅色細菌に焦点を絞り,ここ10年ほどで明らかになってきたLH1-RCの構造と 機能について紹介する.

Structure and function of the LH1–RC complexes from purple phototrophic bacteria living in extreme environments

Yukihiro Kimura¹, Kazutoshi Tani², Seiu Otomo³

Purple photosynthetic bacteria are ancient phototrophs that do not evolve oxygen. These organisms absorb lowenergy near-infrared (NIR) light—unused by oxygen-evolving phototrophs—and convert the NIR light energy into chemical energy, which is necessary for carbon assimilation. The key protein of purple bacterial photosynthesis is a light-harvesting 1–reaction center (LH1–RC) complex. Purple bacteria are relatively simple in their structures and functions and can survive under various extreme environments. Therefore, they serve as an excellent model for studying the structure-function relationships of photosynthetic proteins. Here, we focus on thermophilic, halophilic, and low-energy-utilizing species among purple photosynthetic bacteria living in extreme environments, and introduce the structure–function relationships of the LH1-RC complexes, which have been revealed in the last decade.

キーワード:紅色光合成細菌,光捕集1反応中心複合体,好熱性,好塩性,近赤外光 Purple phototrophic bacteria, Light-harvesting 1-reaction center complex, Thermophilic, Halophilic, Near-infrared light

1. はじめに

原始の光合成生物である紅色光合成細菌の中には、さ

連絡先

木村 行宏
神戸大学大学院農学研究科
〒 657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1
Tel: 078-803-5819
Email: ykimura@people.kobe-u.ac.jp

- まざまな極限環境(温度,塩濃度,pHなど)に生息する種 が報告されている(Madigan 2003).このような極限環境光 合成生物が備える光合成タンパク質の構造と機能を明らか
- 神戸大学大学院農学研究科 Department of Agrobioscience, Graduate School of Agriculture, Kobe University, Kobe, Japan
 筑波大学計算科学研究センター

2) 現成人子前身件子前先モンラー Center for Computer Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan

 茨城大学大学院理工学研究科 Faculty of Science, Ibaraki University, Mito, Japan



図1:Tch. tepidum由来LH1-RC複合体の立体構造(PDB: 5Y5S). 左図は全体構造,右図は補欠分子族のみを示している.

にすることは、光合成生物の環境適応戦略を理解し、それ らを利活用する上で極めて重要である。本稿では、極限環 境に生息する紅色光合成細菌の中でも好熱性紅色細菌、好 塩性紅色細菌、低エネルギーを利用する紅色細菌に焦点を 絞り、光合成反応の中心的な役割を担う光捕集1反応中心 (LH1-RC: Light-Harvesting 1–Reaction Center) 複合体が有す る構造と機能について最新の研究報告も交えて解説する.

2. LH1-RCの構造

光合成反応においてキノンが電子伝達を担うII型反応 中心の詳細な構造は、紅色非硫黄光合成細菌Blastochloris (Blc.) viridisについて初めて報告され(Deisenhofer et al. 1985), これらの業績に対して1988年にノーベル化学賞 が授与された.その後、より本質的な光合成反応機構の 理解のためにLH1を保持したRC(LH1-RC)複合体の立体 構造解明が精力的に進められた.2003年に4.8 Åの分解能 で報告されたRhodopseudomonas (Rps.) palustris LH1-RC の構造情報に留まっていたが(Roszak et al. 2003),2014年 に好熱性の紅色硫黄光合成細菌Thermochromatium (Tch.) tepidum由来LH1-RCのX線結晶構造が3.0 Åの分解能で解 かれ(Niwa et al. 2014),その後1.9 Åの原子分解能で構造 の詳細が明らかにされた(Yu et al. 2018).近年、クライ オ電子顕微鏡 (CryoEM)による構造解析技術が飛躍的な進 歩を遂げ、これまでX線結晶構造解析では困難であった 種々の紅色光合成細菌についてもLH1-RCの詳細な立体構 造が明らかにされている (Kimura et al. 2023; Liu et al. 2024; Swainsbury et al. 2023).

表1は代表的な紅色光合成細菌のLH1-RC複合体に 関する構造情報をまとめたものである. 紅色硫黄細菌 のChromatiaceaeに属するTch. tepidum, Trv. frisius, Alc. tepidumおよびAlc. vinosumでは、16対のαβ-サブユニットか ら成る閉環型のLH1構造をとっている(図1).各サブユニッ トには2分子のBChl aが結合しており、32分子のBChl aが LH1のペリプラズム側に円状に配列している。また、カロ テノイドやキノンなどの補欠分子族を結合している.一方, Halorhodospiriaceaeに属するHalorhodospira (Hlr.) halophila では16対のαβ-サブユニットから成る閉環型のLH1構造 を有しているが、各サブユニットにはペリプラズム側の BChl a 2量体に加え、サイトプラズム側に2サブユニット 当たり1分子のBChl aが結合している (Tani et al. 2025a). BChl bを含むHlr. halochlorisでは16対のαβγ-サブユニットと 1対のαβ-サブユニットから成る閉環型のLH1構造を有して いる (Qi et al. 2024). 各サブユニットにはペリプラズム側 のBChl b 2量体 (B1020) に加え、サイトプラズム側にBChl b単量体が2分子(B820およびB800)結合している. 紅色硫 黄細菌のRC複合体は4つのヘムを含むC-サブユニットと H-, L-, M-サブユニットから構成されている(図1).

一方,紅色非硫黄細菌のLH1-RCはより多様性に富んでいる. *Rhodobacter*属では14対のLH1 αβ-サブユニット

	種	分解能 (Å)	LH1 BChl	LH1 サブユニット	LH1 形状	RC サブユニット	PDB ID
— — 和菌 —	Tch. tepidum ^(a)	1.90	$16(BChl a)_2$	$\alpha_{16}\beta_{16}$	閉環型	C, H, L, M	5Y5S
	Trv. frisius ^(b)	2.82	$16(BChl a)_2$	$\alpha_{16}\beta_{16}$	閉環型	C, H, L, M	7C9R
	Alc. tepidum ^(c)	2.81	$16(BChl a)_2$	$\alpha_{16}\beta_{16}$	閉環型	C, H, L, M	7VRJ
	Alc. vinosum ^(d)	2.24	$16(BChl a)_2$	$\alpha_{16}\beta_{16}$	閉環型	C, H, L, M	8WDU
	Hlr. halophila ^(e)	2.64	$16(BChl a)_2$ $8(BChl a)$ $1(Extra BChl a)$	$\alpha_{16}\beta_{16}$	閉環型	C, H, L, M	8Z83
	Hlr. halochloris ⁽¹⁾	2.42	$17(\operatorname{BChl} b)_2$ $32(\operatorname{BChl} b)$	$\alpha_{17}\beta_{17}\gamma_{16}$ Protein G Protein Q	閉環型	C, H, L, M	8K5O
	<i>Rba. sphaeroides</i> IL106 monomer ^(g)	2.94	14(BChl a) ₂	$\alpha_{14}\beta_{14}$ PufX ProteinU	開環型	H, L, M	7F0L
- 紅色非硫 黄細菌 - - - -	<i>Rba. sphaeroides</i> IL106 dimer ^(h)	2.75	$28(BChl a)_2$	$\begin{array}{c} 2 \ \alpha_{14}\beta_{14} \\ 2 \ PufX \\ ProteinU \end{array}$	開環型	H, L, M	7VY2
	<i>Rba. sphaeroides</i> PufX R53L monomer ⁽ⁱ⁾	2.5	14(BChl a) ₂	$\alpha_{14}\beta_{14}$ PufX ProteinU	開環型	H, L, M	7PIL
	<i>Rba. sphaeroides</i> DBCΩG dimer ^(j)	2.9	$28(BChl a)_2$	$\begin{array}{c} 2 \ \alpha_{14}\beta_{14} \\ 2 \ PufX \\ 2 \ ProteinU \end{array}$	開環型	H, L, M	7PQD
	<i>Rba. sphaeroides</i> 2.4.1 monomer ^(k)	2.79	14(BChl a) ₂	$\alpha_{14}\beta_{14}$ PufX ProteinU	開環型	H, L, M	7VNY
	<i>Rba. sphaeroides</i> 2.4.1 dimer ^(k)	2.74	$28(BChl a)_2$	$\begin{array}{c} 2 \ \alpha_{14}\beta_{14} \\ 2 \ PufX \\ 2 \ ProteinU \end{array}$	開環型	H, L, M	7VOR
	Rps. palustris ⁽¹⁾	2.65	$14(\text{BChl }a)_2$	$\alpha_{14}\beta_{14},$ Protein W	開環型	H, L, M	6Z5S
	Rps. palustris ⁽¹⁾	2.80	$16(BChl a)_2$	$\alpha_{16}\beta_{16}$	閉環型	H, L, M	6Z5R
	Rsp. rubrum ^(m)	2.76	$16(\text{BChl }a)_2$	$\alpha_{16}\beta_{16}$	閉環型	H, L, M	7EQD
	Rsp. rubrum ⁽ⁿ⁾	2.5	$16(\text{BChl }a)_2$	$\alpha_{16}\beta_{16}$	閉環型	H, L, M	70Y8
	Rpi. globiformis ⁽⁰⁾	2.24	$17(\text{BChl }a)_2$	$\alpha_{17}\beta_{17}\gamma_{11}$	閉環型	C, H, L, M	7XXF
-	Blc. viridis ^(p)	2.87	$17(\text{BChl }b)_2$	$\alpha_{17}\beta_{17}\gamma_{16}$	閉環型	C, H, L, M	6ET5
	Blc. tepida ^(q)	2.21	17(BChl <i>b</i>) ₂	$\alpha_{17}\beta_{17}\gamma_{16}$	閉環型	C, H, L, M	9J2F

表1 代表的な紅色光合成細菌由来LH1-RC複合体の構造情報

^(a) (Yu et al. 2018), ^(b) (Tani et al. 2020), ^(c) (Tani et al. 2022c), ^(d) (Tani et al. 2024), ^(e) (Tani et al. 2025a), ^(f) (Qi et al. 2024), ^(g) (Tani et al. 2021b), ^(h) (Tani et al. 2022a), ^(h) (Qian et al. 2021c), ^(f) (Qian et al. 2021a), ^(h) (Cao et al. 2022), ^(f) (Swainsbury et al. 2021), ^(m) (Tani et al. 2021a), ⁽ⁿ⁾ (Qian et al. 2021b), ^(o) (Tani et al. 2022b), ^(f) (Cao et al. 2022b), ^(f) (Swainsbury et al. 2021), ^(m) (Tani et al. 2021a), ⁽ⁿ⁾ (Qian et al. 2021b), ^(o) (Tani et al. 2022b), ^(f) (Cao et al. 2022b), ^(f) (Swainsbury et al. 2021), ^(m) (Tani et al. 2021a), ^(f) (Qian et al. 2021b), ^(f) (Tani et al. 2022b), ^(f) (Cao et al. 2022b), ^(f) (Swainsbury et al. 2021b), ^(f) (Cao et al. 2022b), ^(f) (Cao et al. 2022b), ^(f) (Swainsbury et al. 2021b), ^(f) (Cao et al. 2022b), ^(f) (Cao et al. 2022b), ^(f) (Swainsbury et al. 2021b), ^(f) (Cao et al. 2022b), ^(f) (Cao et al. 202

^(p)(Qian et al. 2018), ^(q)(Kimura et al. 2025)

からなる開環したC字型LH1構造を有し,開口部にはPufX および新規に見出されたProtein-U (PufY) が存在している (Cao et al. 2022; Qian et al. 2021c; Tani et al. 2021b). 各サブ ユニットには2分子のBChl aが結合しており,LH1-RCあ たり28分子のBChl aを含む.また,C字型のLH1-RCが2量 化したS字型の構造も報告されている (Cao et al. 2022; Qian et al. 2021a; Tani et al. 2022a). 2003年に4.8 Å分解能で構造 が解かれた*Rps. palustris*LH1-RCにおいては分解能が2.65 Åに向上し (Swainsbury et al. 2021), 14対のLH1 αβ-サブユ ニットで構成される開環型LH1構造をとること、およびその開口部付近にProtein Wが存在することが示された. 興味深いことにProtein W欠損株ではLH1が閉環型の構造を示す (Swainsbury et al. 2021). 一方, *Rsp. rubrum*ではLH1は 16対のαβ-サブユニットのみで構成される閉環構造を持つ (Qian et al. 2021b; Tani et al. 2021a). 上記のBChl a型紅色 非硫黄細菌はRC C-サブユニットおよびLH1 γ-ポリペプチ ドを持たないが,好酸性の*Rpi. globiformis*は例外的で,こ れらのタンパク質が確認された唯一の種である (Tani et al.



図2:紅色硫黄細菌*Chromatiaceae*由来LH1-RC複合体におけるLH1ポリペプチド発現パターンの多様性とCa²⁺結合能.^(a)(Yu et al. 2018),^(b)(Tani et al. 2020),^(c)(Tani et al. 2022c),^(d)(Tani et al. 2024).

2022b). LH1は17対のαβサブユニットと11個のγサブユニッ トから構成され, RCにおいてもH, L, Mに加えてCサブ ユニットを有している. また, BChl bを有するBlc. viridis (Qian et al. 2018)およびBlc. tepida (Kimura et al. 2025)では, Hlr. halochlorisと同様, 16対のαβγ-サブユニットと1対の αβ-サブユニットから成る閉環型のLH1構造を有している. 各サブユニットはペリプラズム側に2分子のBChl bを結合 しており, LH1あたり34分子のBChl bを含んでいる. RC はC, H, L, Mサブユニットにより構成されている.

3. 好熱性紅色光合成細菌のLH1-RC

3.1 Thermochromatium tepidum

*Tch. tepidum*は米国イエローストーン国立公園のMammoth Hot Springsより単離された好熱性紅色光合成細菌である (Madigan 1984). 至適生育温度を48 – 50℃(最高58℃) に示し,紅色細菌の中でも最も耐熱性に優れ,LH1–RC 立体構造解析のターゲットとして注目されていた. *Tch. tepidum*のRCについては高純度試料の結晶化により高分解 能で3次元X線結晶構造が決定された(Katayama et al. 1994; Kobayashi and Nozawa 1993; Nogi et al. 2000; Nozawa et al. 1987). 一方,LH1–RCについても試料調製方法の確立な らびに結晶化・計測技術の改良により,*Tch. tepidum*由来 LH1–RCの詳細な立体構造が解明された(Niwa et al. 2014; Suzuki et al. 2007; Yu et al. 2018). *Tch. tepidum*由来LH1–RC

の生化学的および物理化学的解析結果から、その吸収特 性や構造安定性にはCa²⁺の密接な関与が報告されており (Fathir et al. 1998; Kimura et al. 2008; Kimura et al. 2009; Ma et al. 2009; Ma et al. 2008; Suzuki et al. 2007), 高分解能X線 結晶構造解析により実際にその存在が証明された. LH1は 16対のαβサブユニットから成るが,各サブユニットあた り1つのCa²⁺がLH1のC末端部位に結合しており、その結合 サイトはα-ポリペプチドのAsp側鎖, TrpおよびIle主鎖, β-ポリペプチドのTrp主鎖,2つの水分子により構成されてい る (Yu et al. 2018). LH1のα-ポリペプチドおよびβ-ポリペ プチドの集合体はそれぞれ内側および外側のLH1リングを 形成しており、Ca²⁺は2つのリングを連結させるバインダー として機能することにより、LH1-RCの構造安定性を高 めていることが判明した. Tch. tepidum LH1-RCのCa²⁺はin vivoで生合成的にSr²⁺と置換することやin vitroで生化学的 にSr²⁺またはBa²⁺と置換することが可能であり、LH1 Q_vバ ンドが888 nmにブルーシフトし, 耐熱性が低下すること が報告されている (Kimura et al. 2008; Kimura et al. 2009). Sr²⁺ (Ba²⁺) 置換型LH1-RCのX線結晶構造から、Sr²⁺ (Ba²⁺) はLH1のC末端部位に結合するが、その結合部位はCa²⁺と は僅かに異なっており、LH1 α-ポリペプチド間のみを連結 していることが判明した (Yu et al. 2016). すなわち, Sr²⁺ (Ba²⁺) 置換体ではLH1 α-ポリペプチドおよびβ-ポリペプチ ド間の連結が消失しており、このことが耐熱性の低下や 吸収特性の変化に影響していると考えられる.

3.2 Allochromatium tepidum

Alc. tepidumはニュージーランドの硫黄泉から単離さ れた好熱性紅色硫黄細菌で、44℃~45℃に至適生育温 度を示す (Madigan et al. 2022). この温度は好熱性のTch. tepidumよりも僅かに低いが、常温性のAlc. vinosum (30℃ ~ 35℃) よりも有意に高い. また, 16S rRNA解析よりAlc. tepidumはTch. tepidumの類縁種であることから、その耐 熱化機構とCa²⁺の関連性が動機となり,研究が進められた (Kimura et al. 2017). Alc. tepidumとTch. tepidumの光合成 生育,LH1の吸収特性 (Q,バンド位置),LH1-RCの熱耐性 (熱変性温度)におけるCa²⁺除去の影響を詳細に比較した結 果, Tch. tepidumではCa²⁺の効果が支配的であったのに対し, Alc. tepidumでは限定的であった. さらに等温滴定熱量分 析および誘導結合プラズマ発光分析より見積もられたAlc. tepidum LH1-RCに結合するCa²⁺の数はそれぞれ5.3個およ び4.2個であった. Tch. tepidum LH1-RCの16個と比較する と著しく少ないことから, Alc. tepidum のCa²⁺要求量はTch. tepidumよりも有意に低く, Alc. tepidum LH1-RCあたり4~ 6個のCa²⁺が結合していることが示唆された (Kimura et al. 2017).

近年, Alc. tepidum LH1-RCのCryoEM構造が明らかに された (Tani et al. 2022c). 16対のαβサブユニットから成 るLH1リング構造はTch. tepidumと類似していたが, Tch. *tepidum* LH1では16個のCa²⁺が存在するのに対して (Yu et al. 2018), Alc. tepidum LH1では僅か6個のCa²⁺しか結合して いないことが証明された. Alc. tepidumのゲノムにはLH1 のα-およびβ-ポリペプチドをコードする複数の遺伝子が存 在し (Madigan et al. 2022), このうちα-ポリペプチドの3種 類 (α1, α2, α3), β-ポリペプチドの2種類 (β1, β3) につい て発現が確認された (Tani et al. 2022c). CryoEM構造の電 子密度から, Alc. tepidum LH1ではα1を含むαβ-ポリペプチ ド(α1β1またはα1β3)に6個のCaイオンが結合しており、各 Ca²⁺はα1-Trp, α1-Asp, α1-Ileおよびβ1-Trpまたはβ3-Trpに 配位していることが明らかになった(図2).一方,これら のアミノ酸残基はα2-またはα3-ポリペプチドには存在せ ず,他の $\alpha\beta$ ペア($\alpha2\beta1$, $\alpha2\beta3$, $\alpha3\beta1$)ではCa²⁺を結合する能 力が無いことも判明した. さらに、これまでCa²⁺依存的な 挙動を示すことが報告された紅色硫黄細菌についてLH1ポ リペプチドのアミノ酸配列を比較した結果, LH1 C末端領 域にα-WxxDxIおよびβ-Wxを含むCa²⁺結合モチーフの存在 が明らかにされた(図2) (Tani et al. 2022c). 同様のモチー フは近縁の常温菌Alc. vinosumでも見出されていたが、Alc. *vinosum* LH1-RCはCa²⁺依存的な特性変化を示さなかった ことからCa²⁺を含んでいないと考えられていた(Kimura et al. 2017). しかしながら,高分解能のCryoEM構造解析の 結果,*Alc. vinosum*のLH1–RCにも*Alc. tepidum*と同じ6ヶ所 のサイトにCa²⁺の電子密度が観測され,再検証の結果,極 めて僅かではあるがCa²⁺依存的な吸収特性や耐熱性の変化 が確認された (Tani et al. 2024). これまでに構造が解かれ た4つの紅色硫黄細菌全てのLH1–RC複合体においてCa²⁺ の存在およびCa²⁺結合モチーフ (α -WxxDxI/Vおよびβ-Wx) の保存が確認されたことから,Ca²⁺が*Chromatiaceae*に属 する紅色硫黄細菌のLH1–RCの吸収特性や構造安定性を 制御する必須の因子である可能性が提唱されており(図2) (Madigan et al. 2024),現在も系統的な解析が進められて いる.

3.3 Blastochloris tepida

Blc. tepidaは温泉の微生物マットから単離された好熱性 の紅色非硫黄細菌である. 至適生育温度を42℃(<47℃) に示し (Madigan et al. 2019; Resnick and Madigan 1989), 主 要色素としてBChl bを有する. Tch. tepidumやAlc. tepidum と異なり、その吸収特性や構造安定性はCa²⁺非依存的であ ることが知られている (Seto et al. 2020). Blc. tepida LH1-RC耐熱化のメカニズムを明らかにするため、生化学的お よび分光学的アプローチにより常温性の類縁菌であるBlc. viridis LH1-RCとの比較研究が行われた (Seto et al. 2020). その結果、カロテノイドの組成に顕著な差異が見られ、 Blc. viridisはニューロスポレン類 (86.3 mol%) が主成分で あったのに対し、Blc. tepidaではニューロスポレン類(52.8 mol%) とリコペン類 (47.2 mol%) が同程度含まれているこ とが判明した. しかしながら, 26℃で培養したBlc. tepida 細胞のLH1-RCはニューロスポレン類が主体であり、熱安 定性が低下した. また, Blc. viridisにおいても培養温度の 昇温に伴ってリコペン類の含有率が上昇し,熱安定性が向 上した. これらの結果より, Blastochloris種のLH1-RC耐 熱化にリコペン類が関与していることが示唆された(Seto et al. 2020).

より詳細な耐熱化機構を解明するために*Blc. tepida* LH1– RCのCryoEM構造解析が進められ、その構造が2.21 Åの高 分解能で報告された (Kimura et al. 2025). 既に構造が解か れている*Blc. viridis* LH1–RCとの詳細な比較により、LH1 内およびLH1とRC間の相互作用について有意な差が見ら れた(表2). 第一に、*Blc. tepida*ではLH1内において3.5 Å以 内で静電的あるいは疎水的な相互作用をしているペアの 数が623対あり、*Blc. viridis*の576対を大きく上回った.特に、 *Blc. tepida*の α — α 間, α — β 間相互作用の数は*Blc. viridis*より も有意に多かったことから、*Blc. tepida* LH1複合体は内側

			相互作用ペアの数(3.5 Å 以内)		
	相互作用ペア			Blc. viridis LH1–RC (PDB: 6ET5)	
	LH1-α	LH1-α	147	80	
	LH1-α	LH1-β	281	239	
	LH1-α	LH1-γ	1	24	
LH1 内	LH1-β	LH1-β	34	49	
	LH1-β	LH1-γ	160	184	
	LH1-γ	LH1-γ	0	0	
	윩	-	623	576	
	LH1-α	RC-C	3	4	
LH1 – RC 間	LH1-α (β)	RC-H	28 (6)	31 (2)	
	LH1-α	RC-L	9	9	
	LH1-α	RC-M	16	8	
·	클 T	L.	65	54	

表2 Blc. tepidaおよびBlc. viridis由来LH1-RCにおけるLH1内またはLH1とRC間の相互作用

のα-リング内および α-リングとβ-リング間をより強固に 連結させることにより, Blc. viridis LH1よりもコンパクト な構造体を形成していると言える. また, LH1とRC間の 相互作用ペアにおいても、Blc. viridisの54対であるのに対 し, Blc. tepidaでは65対存在し,特にM-サブユニット-LH1 間においてより密接な複合体を形成していた. さらにBlc. tepidaのC-サブユニットにはC-Asp166, C-Asn167, LH1 α-Ser42および3つの水分子によって配位されるMg²⁺が存在 し、CサブユニットとLH1 α-ポリペプチドのバインダーと して機能している. Blc. viridis LH1-RCには上記Mg²⁺とそ の結合サイトは存在しないことから、好熱種のLH1-RC複 合体の構造安定性を高める要因である可能性が高い.3V ソフトウェアによるシミュレーション (Voss and Gerstein 2010)の結果, LH1リングの溶媒接触面積/体積はBlc. tepida で0.278 (Å⁻¹)となり, Blc. viridisの0.340 (Å⁻¹)よりも有意に 低い値を示した.以上の結果から, Blc. tepidaのLH1-RC 複合体は、LH1内およびLH1とRC間の密接な相互作用に より形成されるコンパクトでアクセスしにくい構造体が 耐熱化に重要な因子であることが示された(Kimura et al. 2025). 先行研究において, Blc. tepida LH1-RCにおける カロテノイドと耐熱性の関連性について報告したが (Seto et al. 2020), 今回の高分解能 (2.21Å) データでもニューロ スポレン類とリコペン類を厳密に区別することは困難で あった.従って、リコペン類によるLH1-RCの耐熱化機構 の解明にはさらなる高分解能の構造情報が必要である.

4. 好塩性紅色細菌のLH1-RC

4.1 Halorhodospira halochloris

Hlr. halochlorisはエジプトの温暖な高アルカリ性の ソーダ湖から単離されたHalorhodospiriaceaeに属する好 塩性の紅色硫黄細菌である (Imhoff and Truper 1977). Hlr. halochlorislt, 47-50°C, pH 8-9, 14-27% (w/v) (2.4-4.6M) のNaCl濃度で生育し, 好塩性, 好熱性, 好アルカリ性を 示す3重好極限性を備えた希少種である. さらに, Hlr. halochlorisのLH1-RCはBChl bで光捕集系が構築されてお り、そのLH1 Q,吸収ピークは現存する光合成生物の中で 最も長波長の1016 nmであることが知られている (Kimura et al. 2023). 2章で述べた通り、最近Hlr. halochloris LH1-RC のCryoEM構造が報告され、LH1はαβγ-サブユニットの16量 体とαβ-サブユニットから成る3重リングであり、各サブユ ニットのC末端側にBChl b 2量体 (B1020), N末端側に2種 類のBChl b単量体 (B820およびB800) を結合していること. カロテノイドはLH1リングにリコペン1分子のみが含まれ ること、新規の膜貫通へリックスProtein GおよびProtein Q の存在が明らかにされている(Qi et al. 2024).

5.4で後述のように, *Hlr. halochloris* LH1–RCの吸収バンドは塩濃度あるいはpHの低下により960 nm付近にブルーシフトし(図3Aおよび3B), 構造安定性が著しく低下する(Kimura et al. 2022; Kimura et al. 2021a). すなわち, LH1 *Q*_yバンド位置はLH1–RC複合体の構造安定性を反映する パラメータであり, BChlの周辺環境の性質に大きく依存



図3: *HIr. halochloris* LH1–RCのpH8におけるNaCl濃度依存的なスペクトル変化 (A) および200 mM NaCl存在下におけるpH依存的なスペクトル変化 (B). (C) 代表的な紅色光合成細菌由来LH1α-およびβ-ポリペプチドのアミノ酸配列. BChlのHis軸配位子 (緑) に対してアラインされている. (D) *HIr. halochloris* LH1–RC (PDB: 8K5O)より得られたCys⁴³とBChl bの相互作用.

する. BChlに影響を及ぼす可能性のあるLH1ポリペプチ ドのC末端部位およびRCのCサブユニットに着目し、そ れらのアミノ酸組成を他の紅色細菌と比較した結果, Hlr. halochlorisのLH1 α, β-polypeptide の塩基性残基に対する酸 性残基の割合は、非好塩性の紅色細菌と比較して有意に 高い値を示した(図3C) (Kimura et al. 2022). 一般的に好 塩性タンパク質表面の豊富な酸性残基による負電荷は、高 塩濃度での溶解性と柔軟性を向上させることが知られて いる (Elcock and McCammon 1998; Fukuchi et al. 2003; Lanyi 1974; Mevarech et al. 2000). 従って, 高濃度の塩の存在は Hlr. halochlorisのLH1-RC複合体表面の過剰な負電荷を安 定化し、正常な機能を保持するために必要であると考え られる.対照的に、これらの静電的反発は、低塩濃度下 におけるタンパク質不安定化の主要因であると考えられ ており (Elcock and McCammon 1998), Hlr. halochloris LH1-RC複合体の塩濃度依存的な不安定化と一致する.

一方, 好塩性タンパク質表面の高い負電荷近傍の水分子 が「水和殻」を形成することによりタンパク質の構造維持 に寄与していることが報告されている(Britton et al. 2006; Mevarech et al. 2000; Richard et al. 2000). *Hlr. halochloris* LH1–RCが水和殻を形成しているとすれば,低pHにおける LH1–RCの顕著な不安定化は,表面の酸性残基の部分的プ ロトン化による水和殻の消失による可能性がある.このよ うな水和殻は,好熱菌である*Tch. tepidum* LH1–RCの高分 解能(1.9 Å)X線結晶構造解析においても確認されている が(Yu et al. 2018),最近報告された*Hlr. halochloris* LH1–RC のCryoEM構造(2.4 Å分解能)からは水分子に関する情報は 得られなかった(Qi et al. 2024). 従って, *Hlr. halochloris* LH1-RCに関する上記の仮説を証明するには, 水和殻の情 報も含めたより高分解能のLH1-RC立体構造を明らかにす る必要がある.

4.2 Halorhodospira halophila

Hlr. halophila (BN9622株)は、pH10.7で塩分濃度が35% を超えるリビア砂漠の超塩湖から単離された極度の好塩 性かつ好アルカリ性を示す紅色硫黄細菌である (Imhoff et al. 1978; Imhoff et al. 2022). 長らく純粋なLH1-RCの単離 が困難であり、その詳細な特性解析は報告されていなかっ たが、その理由が最近のCryoEM解析により判明した. す なわち, Hlr. halophilaの光合成膜の中には, LH1-RCに加 えて、LH1リングの内部にLH2リングが組み込まれたLH1-LH2という新規のタンパク質複合体が含まれており、これ が高純度LH1-RCの精製を困難にしていた. LH1-RC (Tani et al. 2025a) およびLH1-LH2 (Tani et al. 2025b) を画像解析 により分離し、それぞれの構造を決定することに成功し た. ここではLH1-RCについて紹介する. Hlr. halophila由 来LH1-RCは2.64 Åの分解能で構造が解明され、LH1複合 体はα1β1サブユニットとα2β2サブユニットが交互に配列 したリング状の16サブユニットから構成されている. 各 LH1サブユニットにはC末端側にBChl a 2量体が結合して いるが、さらにN末端側に2サブユニット毎にBChl a単量 体が結合している. RCはC, M, L, Hサブユニットで構 成されており、LH1に取り囲まれた構造をとっている. Hlr. halophilaも高度の好塩性細菌であり、RCのCサブユ

ニットには塩基性アミノ酸と比べて酸性アミノ酸が豊富 に含まれているが、その中でも比較的疎水性の高い領域に 水溶性の電子伝達タンパク質であるHiPIP (High-potential iron-sulfur protein)の疎水性領域が相互作用することにより LH1-RC-HiPIP複合体を形成していることがCryoEM構造 解析 (2.44 Å)により明らかにされた (Tani et al. 2025a).大 部分のLH1-RCがHiPIPと複合体を形成しており、HiPIPか らCサブユニットへの電子伝達が電子トンネリングにより 進行している可能性が提唱された.同様な電子トンネリ ング機構は好熱菌*Tch. tepidum*においても報告されている (Kawakami et al. 2021).従って、このような効率的な長距 離型の光合成電子伝達機構は、光合成細菌が極限環境で 生き抜くための生存戦略の1つであると考えられる.

5. 低エネルギーを利用する紅色細菌

2章で述べた通り、紅色光合成細菌のLH1は28-34分子の BChlがO字型あるいはC字型に配列した集合体を形成する ことにより, BChl a型LH1-RC複合体では865 nm-960 nm, BChl b型LH1-RC複合体では1000 nm-1020 nmの近赤外光 利用を可能にしている (Kimura et al. 2023). 特に後者の存 在は希少であり、Blastochloris属 (Hiraishi 1997; Resnick and Madigan 1989) やHalorhodospira属 (Imhoff and Truper 1977, 1981)は既知の光合成生物の中で最も低いエネルギーで 光-物質変換を営んでいる。一方,ほとんどの紅色細菌 はBChl aで光捕集系が構築されており、典型的なもので は880 nm付近にLH1吸収バンドを示す (Cogdell et al. 2006; Kimura et al. 2023; Reimers et al. 2016). しかしながら, BChl a型LH1-RCの中でも900 nmより長波長の近赤外光を 利用する種が知られており, Roseospirillum (Rss.) parvum 930I (Tuschak et al. 2004), Tch. tepidum (Madigan 1984, 2003), および Trv. frisius (Methner et al. 2023; Permentier et al. 2001; Rücker et al. 2012) がそれぞれ909, 915, 963 nmに LH1の吸収極大を示す. Rss. parvum 930I では、LH1のBChl a近傍に存在するCysが大きな長波長シフトの要因である と考えられている (Tuschak et al. 2004). 一方, Tch. tepidum およびTrv. frisiusではCa²⁺がLH1の長波長シフトに密接に関 与している (Imanishi et al. 2019; Kimura et al. 2008). Ca²⁺除 去によりLH1吸収バンドは一般的な紅色細菌と同じ880 nm 付近までブルーシフトするが、Ca²⁺を再添加することによ り可逆的に元の吸収バンドまでレッドシフトする. さら *VCAlc. tepidum* (Kimura et al. 2017) *PAlc. vinosum* (Tani et al. 2024) も程度は小さいがこのようなCa²⁺によるシフトが観 測されることから、*Chromatiaceae*の紅色硫黄細菌はCa²⁺結

合によりLH1の吸収波長を巧みに制御し、生息環境に適応 した近赤外光エネルギーを利用できるような戦略をとっ てきたことが推測される.これまで報告されたBChl aある いはBChl b型LH1-RCの吸収特性を制御する因子を以下に まとめる.

5.1 色素--タンパク質間相互作用

紅色細菌のLH1複合体では、BChl分子のC3アセチルC=O とLH1-αおよびLH1-βに保存されているTrp残基との間に特 異的な水素結合が形成されており、その相互作用の強度 がLH1複合体の近赤外光吸収特性を高度に制御している ことが知られている (Callahan and Cotton 1987; Cotton and Vanduvne 1981; Imanishi et al. 2019; Kimura et al. 2012; Kimura et al. 2017; Kimura et al. 2023; Sturgis et al. 1997; Sturgis and Robert 1997). 355nm励起によるLH1-RCの共鳴ラマンスペ クトルでは1640-1620 cm⁻¹ にC3アセチル基のC=O伸縮振動 バンド, 1685-1640 cm⁻¹にC13ケト基のC=O伸縮振動バン ドが観測されるが、BChlとLH1-α/βのTrp残基との水素結合 が強いほど、C3アセチルC=O伸縮振動バンドは低波数シ フトし、LH1 Q,バンドは長波長シフトする. BChl aあるい はBChl bを含む系について、一部の例外を除いてLH1 Q,吸 収バンドのシフト量ΔLH1-Q,とC3アセチルC=O伸縮振動バ ンドのシフト量△C3-acetyl vC=Oには直線的な相関がある ことが判明した (Kimura et al. 2023). 特にBChl a型LH1-RC の中で最も長波長側にLH1 Q_vバンドを示すTrv. frisiusでは, α-Trp47と隣接するHis48がBChl aのC3アセチル基と強く水 素結合していることがCryo-EM構造解析により明らかにさ れた (Tani et al. 2020). また, BChl bを有するBlc. tepidaお よびBlc. viridisについても隣接する2つのTrp残基(α-Trp47 およびα-Trp48)がBChl aのC3アセチル基と強力な水素結合 ネットワークを形成していることが判明した (Kimura et al. 2025; Kimura et al. 2021b; Qian et al. 2018).

密度汎関数法 (DFT) を用いたBChlおよびChl化合物の Q,吸収遷移エネルギー計算によれば,BChl分子のQ,遷移 双極子モーメントに沿ったC3位近傍の正電荷は,最高占 有分子軌道 (HOMO) と最低非占有分子軌道 (LUMO)のエ ネルギー差を減少させる (Saito et al. 2020). 従って,Trp側 鎖との水素結合によってBChlのC3位にもたらされた正電 荷がLH1 Q,バンドの長波長シフトに密接に関与している と考えられる.唯一の例外は3重好極限性を示すBChl b型 のHlr. halochloris (Kimura et al. 2022) であり,この種では 水素結合以外の要因がLH1 Q,遷移エネルギーを支配的に 制御していると思われる (5.4参照).



図4: (A) *Tch. tepidum* LH1複合体 (PDB: 5Y5S) におけるIntra BChl dimer間距離 (赤の点線) およびInter BChl dimer間距離 (黒の点線). (B) 構造情報が得られている紅色光合成細菌のLH1 Q_yピークに対するIntra BChl dimer 間距離 (赤丸) およびInter BChl dimer間距離 (黒丸) のプロット. 1: *Blc. viridis* (PDB: 6ET5), 2: *Blc. tepida* (PDB: 9J2F), 3: *Trv. frisius* (PDB: 7C9R), 4: *Tch. tepidum* (PDB: 5Y5S), 5: *Alc. tepidum* (PDB: 7VRJ), 6: *Rps. palustris* (PDB: 6Z5R), 7: *Rps. palustris* (PDB: 6Z5S), 8: *Rsp. rubrum* (PDB: 7EQD), 9: *Rba. sphaeroides* (PDB: 7FOL).

5.2 励起子相互作用

BChl aのQ,バンドは760 nmにピークを示すが、LH1 α-またはβ-polypeptideとの結合により780 nmに, αβ-subunitの 形成により820 nmに、14-17個のαβ-subunitが円状に配列し たLH1複合体を形成することにより860-970 nmにレッド シフトする (Kimura et al. 2023; Wang et al. 2003). これらの BChl分子は、部分的にクロリン環を重ね合わせるように BChlのリングを形成しているため、LH1 Q,の遷移エネル ギーには励起子相互作用が大きく寄与することが知られ ており、その強度はLH環内に円形に配列された隣接する BChl分子間の遷移双極子モーメントに依存する. (Cogdell et al. 2006; Fujimoto et al. 2024; Reimers et al. 2016). 図4A に示すように、LH1のBChlには2種類の隣接するペア(Intra BChl dimerとInter BChl dimer)が存在する. 前者では, α_n-ポリペプチドに結合したBChl aと, β_n-ポリペプチドに結 合したBChl aが相互作用して, Intra BChl dimerを形成して いる(赤破線).また、後者ではα,-ポリペプチドに結合し たBChl aとβ_{n+1}-ポリペプチドに結合したBChl aが相互作用 してInter BChl dimerを形成する(黒破線). 図4Bは, LH1-RC構造が報告された紅色細菌のLH1 Q,ピークに対して、 Intra BChl dimerおよびInter BChl dimer間距離をプロットし た図である. Q.バンドのレッドシフトに伴ってIntra BChl dimerの距離は有意に減少, Inter BChl dimerの距離は僅か に増大しており、ほぼ一定の値に収束する傾向を示して いる. これらの結果は、LH1環内においてIntra BChl dimer とInter BChl dimerを介したより均一な分子配列が強い励起

子相互作用を生じ、HOMO—LUMO間のエネルギー差が 減少する方向に作用した結果、LH1の低エネルギー近赤外 光の吸収を可能になることを示唆している.

5.3 LH1複合体の構造的な揺らぎ

LH1 BChlのQ.吸収特性は周辺タンパク質の環境によっ ても特徴づけられる (Monshouwer et al. 1995; vanGrondelle et al. 1997; Vanmourik et al. 1992). Blc. viridis由来のLH1複合 体は16対のαβγ-ポリペプチドと1対のαβ-ポリペプチドによ り構成されている (Qian et al. 2018). 興味深いことに, Blc. viridisのLH1 γ1-4-サブユニットの欠損株より得られたLH1-RCではLH1のQ,バンドが1018 nmから972 nmにブルーシフ トし, γ₁-またはγ₄-サブユニットの再結合により完全また は部分的に Q_v バンドが回復した (Namoon et al. 2022). こ れらの結果は、γ-サブユニットの結合によるLH1リング構 造の揺らぎの減少、すなわちがLH1構造のかたさがLH1 Q, バンドのレッドシフトに密接に関与していることを支持 するものである (Hitchcock et al. 2023; Namoon et al. 2022). また、Tch. tepidum (Kimura et al. 2008) およびTrv. frisius (Imanishi et al. 2019) はCa²⁺除去により顕著なブルーシフト および熱耐性の低下を示す. Ca²⁺はLH1ポリペプチドのC 末端側に結合しているため、Ca²⁺が欠如した状態では構造 的な揺らぎが生じている可能性が高い.従って、これら の種ではCa²⁺結合によるLH1複合体の構造的揺らぎの減少 がLH1 Q_vバンドの長波長シフトに寄与していると考えら れる. さらに、Tch. tepidumのX線結晶構造(Yu et al. 2018)

では1.9 Åの高分解能にも関わらず、LH1 α -ポリペプチド のC末端部位はdisorderにより観測されなかったが、Trv. frisius LH1–RCのCryoEM構造 (Tani et al. 2020) では2.82 Å の分解能でもLH1 α -ポリペプチドC末端ドメインの電子密 度が明確に観測された.以上の結果は、Trv. frisiusではTch. tepidumよりもBChl a結合部位に近いLH1 C末端部位の構造 的な揺らぎが少なく、分子運動が制限されていることを 示唆しており、LH1の構造的な剛性がTrv. frisius LH1- Q_y バ ンドの異常なレッドシフトを可能にする要因のひとつで あると考えられている (Kimura et al. 2023).

5.4 BChl近傍の電荷の効果

BChl bを含む好塩性紅色硫黄光合成細菌Hlr. halochloris のLH1–RCはpH8および1 MのNaCl存在下においては,LH1 Q_y バンドを1010–1020 nmに示すが,pHあるいはNaCl濃度 の低下に伴って950–960 nmにブルーシフトすることが知 られている (Kimura et al. 2021a). これらのpHあるいは塩 濃度依存的なスペクトル変化は可逆的であるが塩の種類 には依存しないことから,Chromatiaceaeの紅色硫黄細菌 が示すCa²⁺特異的な変化とは異なる2つの要因が提唱され た(Kimura et al. 2021a; Madigan et al. 2024).

第1の要因として,ほとんどの紅色光合成細菌ではLH1 α-BChlおよびβ-BChlの軸配位子はヒスチジンであるが, *Hlr. halochloris*ではLH1 β-BChlの軸配位子がAsn側鎖のア ミド酸素である点である (図3D). 高等植物の集光性タン パク質LHCIにおいて,軸配位子がAsnであるLhca3および Lhca4の吸収バンドが長波長シフトすることが報告されて いる (Morosinotto et al. 2003; Qin et al. 2015). 従って, *Hlr. halochloris* LH1 Q_y バンドの異常な長波長シフトにAsnが関 与している可能性がある(Kimura et al. 2021a).

第2の要因はLH1 α-BChl bの軸配位子α-His⁰近傍に局在す るLH1 α-Cys⁺³の電荷である(Kimura et al. 2021a; Tsukatani et al. 2019; Tuschak et al. 2004). ほとんどの紅色細菌(*Rss. parvum*を除く)では、この位置にはLeuやValなどの非極性 アミノ酸が存在している(図3C). また、Cysは周辺タンパ ク質の環境に応じてpKa値を変化させることが知られてい る(pKa=2.9 ~ 9.8)(Awoonor-Williams and Rowley 2016). 従って、このCysのチオール残基がpHによってBChl周辺 の電荷分布を変化させ、LH1 Q_y 吸収バンドがシフトする 分子機構が提唱された(Kimura et al. 2021a). 高pH条件下 においてはα-Cys⁺³ 側鎖はチオレートアニオンとして存在 し、LH1 Q_y バンドの異常なレッドシフトに寄与している が、低pH条件下においてはα-Cys⁺³ 側鎖はチオールとして 存在し、LH1 Q_y バンドをブルーシフトさせていると考え

られる. 高塩濃度環境下では、チオレートアニオンがカ チオンと相互作用し, 低pHにおいてもカチオンがチオレー トのプロトン化を阻害するため、長波長シフトした状態 を維持できると考えられる.一方,低塩濃度環境下では カチオンが制限されるため, α-Cys⁺³ チオレートのプロト ン化が起こりやすく、LH1 Q_vバンドのブルーシフトが起 こりやすくなる. BChlおよびChl類縁体のDFT計算によれ ば (Saito et al. 2020), BChl分子のQx遷移双極子モーメン トに沿った負電荷の局在がLUMOよりもHOMOのエネル ギーを不安定化させ、HOMO-LUMO間エネルギー差の減 少により0.吸収バンドのレッドシフトが観測される. 実 際に最近報告されたHlr. halochloris由来LH1-RCのCryoEM 構造 (PDB: 8K5O) では, 推定のキノンゲートを除く全て のLH1 αβγサブユニットにおいてα-Cys⁺³側鎖がBChl bのC8 ビニル基から3.2Åの位置に局在していた(図3D). したがっ て、pHや塩濃度によってα-Cys⁺³チオール基の荷電状態が 変化し、C8ビニル基の二重結合を介してBChl bのHOMO およびLUMOのエネルギー順位を変化させることにより, pHまたは塩濃度依存的なスペクトルシフトを生じさせる 機構の存在が示唆された. 今後, 更なる詳細については, 構造生物学的および計算科学的知見に基づいて検討して いく必要がある.

6. おわりに

CryoEM構造解析の飛躍的な進展により、ここ10年間で さまざまな紅色光合成細菌のLH1-RCに関する有益な情報 が蓄積され、構造に基づく本質的な機能の理解が可能に なってきた.本稿で紹介したものはその一部に過ぎない が、今後もさまざまな極限環境に適応した紅色細菌につ いて研究が進展していくと思われる.集積された構造と 機能に関する知見は新たな研究フェーズへの展開につな がるものと期待されるが、その一つが近赤外光の資源化 である. 紅色細菌が備える近赤外光を吸収できるLH1の 集光システム.エネルギー勾配を遡ってLH1からRCヘエ ネルギーを伝達するUphillエネルギー移動のメカニズム, そして得られた還元力を効率的に伝達するキノン輸送機 構の解明により、紅色細菌の光合成システムを模倣した 近赤外応答型人工光合成への展開が可能になる.従って, 紅色光合成細菌は未利用のエネルギー資源である近赤外 光の有効活用を実現する上で非常に魅力的な研究ツール であると言える.

謝辞

本稿で紹介した紅色光合成細菌は南イリノイ大学の Michael T. Madigan教授から提供されたものである.ま た,多くの共同研究者や学生の協力を得て円滑に研究を 進めることができた.関係者各位に深く感謝する次第で ある.本研究の一部はJSPS科研費(20H05101,22K06111, 22K06144,24H02084)および国立研究開発法人日本医 療研究開発機構(AMED)創薬等ライフサイエンス研究 支援基盤事業 創薬等先端技術基盤プラットホーム (BINDS)の課題番号(JP21am0101116,JP21am0101118, JP23ama121004)の支援を受けたものである.

参考文献

- Awoonor-Williams, E. and Rowley, C.N. (2016) Evaluation of methods for the calculation of the pKa of cysteine residues in proteins. J. Chem. Theory. Comput. 12: 4662-4673.
- Britton, K.L., Baker, P.J., Fisher, M., Ruzheinikov, S., Gilmour, D.J., Bonete, M.J., et al. (2006) Analysis of protein solvent interactions in glucose dehydrogenase from the extreme halophile *Haloferax mediterranei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 4846-4851.
- Callahan, P.M. and Cotton, T.M. (1987) Assignment of bacteriochlorophyll a ligation state from absorption and resonance Raman spectra. J. Am. Chem. Soc. 109: 7001-7007.
- Cao, P., Bracun, L., Yamagata, A., Christianson, B.M., Negami, T., Zou, B., et al. (2022) Structural basis for the assembly and quinone transport mechanisms of the dimeric photosynthetic RC-LH1 supercomplex. *Nat. Commun.* 13: 1977.
- Cogdell, R.J., Gall, A. and Kohler, J. (2006) The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to in vivo membranes. *Quart. Rev. Biophys.* 39: 227-324.
- Cotton, T.M. and Vanduyne, R.P. (1981) Characterization of bacteriochlorophyll interactions in vitro by resonance Raman spectroscopy. J. Am. Chem. Soc. 103: 6020-6026.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. and Michel, H. (1985) Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodopseudomonas viridis* at 3Å resolution. *Nature* 318: 618-624.
- Elcock, A.H. and McCammon, J.A. (1998) Electrostatic contributions to the stability of halophilic proteins. *J. Mol. Biol.* 280: 731-748.

- Fathir, I., Ashikaga, M., Tanaka, K., Katano, T., Nirasawa, T., Kobayashi, M., et al. (1998) Biochemical and spectral characterization of the core light harvesting complex 1 (LH1) from the thermophilic purple sulfur bacterium *Chromatium tepidum. Photosynth Res* 58: 193-202.
- Fujimoto, K.J., Tsuji, R., Wang-Otomo, Z.Y. and Yanai, T. (2024) Prominent Role of Charge Transfer in the Spectral Tuning of Photosynthetic Light-Harvesting I Complex. ACS Phys. Chem. Au 4: 499-509.
- Fukuchi, S., Yoshimune, K., Wakayama, M., Moriguchi, M. and Nishikawa, K. (2003) Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria. *J. Mol. Biol.* 327: 347-357.
- Hiraishi, A. (1997) Transfer of the bacteriochlorophyll b-containing phototrophic bacteria *Rhodopseudomonas* viridis and *Rhodopseudomonas sulfoviridis* to the genus Blastochloris gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 217-219.
- Hitchcock, A., Swainsbury, D.J.K. and Hunter, C.N. (2023)
 Photosynthesis in the near infrared: the gamma subunit of *Blastochloris viridis* LH1 red-shifts absorption beyond 1000 nm. *Biochem. J.* 480: 455-460.
- Imanishi, M., Takenouchi, M., Takaichi, S., Nakagawa, S., Saga, Y., Takenaka, S., et al. (2019) A dual role for Ca²⁺ in expanding the spectral diversity and stability of lightharvesting 1 reaction center photocomplexes of purple phototrophic bacteria. *Biochemistry* 58: 2844-2852.
- Imhoff, J.F., Hashwa, F. and Trüper, H.G. (1978) Isolation of extremely halophilic phototrophic bacteria from the alkaline Wadi Natrun. *Egypt. Arch. Hydrobiol.* 84,: 381-388.
- Imhoff, J.F., Kyndt, J.A. and Meyer, T.E. (2022) Genomic Comparison, Phylogeny and Taxonomic Reevaluation of the *Ectothiorhodospiraceae* and Description of *Halorhodospiraceae* fam. nov. and *Halochlorospira* gen. nov. *Microorganisms*. 10: 295.
- Imhoff, J.F. and Truper, H.G. (1977) *Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov., a new extremely halophilic phototropic bacterium containing bacteriochlorophyll *b. Arch. Microbiol.* 114: 115-121.
- Imhoff, J.F. and Truper, H.G. (1981) Ectothiorhodospira abdelmalekii sp. nov. a new halophilic and alkaliphilic phototropic bacterium. Zbl. Bakt. Mik. Hyg. I C 2: 228-234.
- Katayama, N., Kobayashi, M., Motojima, F., Inaka, K., Nozawa, T. and Miki, K. (1994) Preliminary X-ray crystallographic studies of photosynthetic reaction center from a thermophilic sulfur bacterium, *Chromatium tepidum. FEBS Lett.* 348: 158-

160.

- Kawakami, T., Yu, L.J., Liang, T., Okazaki, K., Madigan, M.T., Kimura, Y., et al. (2021) Crystal structure of a photosynthetic LH1–RC in complex with its electron donor HiPIP. *Nat. Commun.* 12: 1104.
- Kimura, Y., Hirano, Y., Yu, L.J., Suzuki, H., Kobayashi, M. and Wang, Z.Y. (2008) Calcium ions are involved in the unusual red shift of the light-harvesting 1 Q_y transition of the core complex in thermophilic purple sulfur bacterium *Thermochromatium tepidum. J. Biol. Chem.* 283: 13867-13873.
- Kimura, Y., Inada, Y., Numata, T., Arikawa, T., Li, Y., Zhang, J.P., et al. (2012) Metal cations modulate the bacteriochlorophyllprotein interaction in the light-harvesting 1 core complex from *Thermochromatium tepidum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1817: 1022-1029.
- Kimura, Y., Kanno, R., Mori, K., Matsuda, Y., Seto, R., Takenaka, S., et al. (2025) The thermal-stable LH1– RC complex of a hot spring purple bacterium powers photosynthesis with extremely low-energy near-infrared light. *Biochemistry*. 64: 170-179.
- Kimura, Y., Lyu, S., Okoshi, A., Okazaki, K., Nakamura, N., Ohashi, A., et al. (2017) Effects of calcium ions on the thermostability and spectroscopic properties of the LH1– RC complex from a new thermophilic purple bacterium *Allochromatium tepidum. J. Phys. Chem. B* 121: 5025-5032.
- Kimura, Y., Nakata, K., Nojima, S., Takenaka, S., Madigan, M.T. and Wang-Otomo, Z.Y. (2022) Salt- and pH-dependent thermal stability of photocomplexes from extremophilic bacteriochlorophyll *b*-containing *Halorhodospira species*. *Microorganisms* 10: 959.
- Kimura, Y., Nojima, S., Nakata, K., Yamashita, T., Wang, X.P., Takenaka, S., et al. (2021a) Electrostatic charge controls the lowest LH1 Q_y transition energy in the triply extremophilic purple phototrophic bacterium, *Halorhodospira halochloris*. *Biochim. Biophys. Acta* 1862: 148473.
- Kimura, Y., Tani, K., Madigan, M.T. and Wang-Otomo, Z.Y. (2023) Advances in the spectroscopic and structural characterization of core light-harvesting complexes from purple phototrophic bacteria. J. Phys. Chem. B 127: 6-17.
- Kimura, Y., Yamashita, T., Seto, R., Imanishi, M., Honda, M., Nakagawa, S., et al. (2021b) Circular dichroism and resonance Raman spectroscopies of bacteriochlorophyll *b*-containing LH1–RC complexes. *Photosynth. Res.* 148: 77-86.

- Kimura, Y., Yu, L.J., Hirano, Y., Suzuki, H. and Wang, Z.Y. (2009) Calcium ions are required for the enhanced thermal stability of the light-harvesting-reaction center core complex from thermophilic purple sulfur bacterium *Thermochromatium tepidum. J. Biol. Chem.* 284: 93-99.
- Kobayashi, M. and Nozawa, T. (1993) Purification and crystallization of the reaction-center from the thermophilic purple sulfur bacterium *Chromatium tepidum. Bull. Chem. Soc. Jpn.* 66: 3834-3836.
- Lanyi, J.K. (1974) Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 38: 272-290.
- Liu, L.N., Bracun, L. and Li, M. (2024) Structural diversity and modularity of photosynthetic RC-LH1 complexes. *Trends Microbiol.* 32: 38-52.
- Ma, F., Kimura, Y., Yu, L.J., Wang, P., Ai, X.C., Wang, Z.Y., et al. (2009) Specific Ca²⁺-binding motif in the LH1 complex from photosynthetic bacterium *Thermochromatium tepidum* as revealed by optical spectroscopy and structural modeling. *FEBS J.* 276: 1739-1749.
- Ma, F., Kimura, Y., Zhao, X.H., Wu, Y.S., Wang, P., Fu, L.M., et al. (2008) Excitation dynamics of two spectral forms of the core complexes from photosynthetic bacterium *Thermochromatium tepidum. Biophys. J.* 95: 3349-3357.
- Madigan, M.T. (1984) A novel photosynthetic purple bacterium isolated from a Yellowstone hot spring. *Science* 225: 313-315.
- Madigan, M.T. (2003) Anoxygenic phototrophic bacteria from extreme environments. *Photosynth. Res.* 76: 157-171.
- Madigan, M.T., Absher, J.N., Mayers, J.E., Asao, M., Jung, D.O., Bender, K.S., et al. (2022) *Allochromatium tepidum*, sp. nov., a hot spring species of purple sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* 204: 115.
- Madigan, M.T., Resnick, S.M., Kempher, M.L., Dohnalkova, A.C., Takaichi, S., Wang-Otomo, Z.Y., et al. (2019) *Blastochloris tepida*, sp. nov., a thermophilic species of the bacteriochlorophyll *b*-containing genus *Blastochloris*. Arch. *Microbiol*. 201: 1351-1359.
- Madigan, M.T., Sattley, W.M., Kimura, Y. and Wang-Otomo, Z.Y. (2024) Calcium and the ecology of photosynthesis in purple sulfur bacteria. *Environ. Microbiol.* 26: e16591.
- Methner, A., Kuzyk, S.B., Petersen, J., Bauer, S., Brinkmann, H., Sichau, K., et al. (2023) *Thiorhodovibrio frisius* and *Trv. litoralis* spp. nov., two novel members from a clade of fastidious purple sulfur bacteria that exhibit unique red-shifted Llight-harvesting capabilities. *Microorganisms* 11: 2394.

21

- Mevarech, M., Frolow, F. and Gloss, L.M. (2000) Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophys. Chem.* 86: 155-164.
- Monshouwer, R., Visschers, R.W., Vanmourik, F., Freiberg, A. and Vangrondelle, R. (1995) Low-temperature absorption and site-selected fluorescence of the light-harvesting antenna of *Rhodopseudomonas viridis* - evidence for heterogeneity. *Biochim. Biophys. Acta* 1229: 373-380.
- Morosinotto, T., Breton, J., Bassi, R. and Croce, R. (2003) The nature of a chlorophyll ligand in Lhca proteins determines the far red fluorescence emission typical of photosystem I. *J. Biol. Chem.* 278: 49223-49229.
- Namoon, D., Rudling, N.M. and Canniffe, D.P. (2022) The role of the gamma subunit in the photosystem of the lowest-energy phototrophs. *Biochem. J.* 479: 2449-2463.
- Niwa, S., Yu, L.J., Takeda, K., Hirano, Y., Kawakami, T., Wang-Otomo, Z.Y., et al. (2014) Structure of the LH1–RC complex from *Thermochromatium tepidum* at 3.0 Å. *Nature* 508: 228-232.
- Nogi, T., Fathir, I., Kobayashi, M., Nozawa, T. and Miki, K. (2000) Crystal structures of photosynthetic reaction center and high-potential iron-sulfur protein from *Thermochromatium tepidum*: Thermostability and electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 13561-13566.
- Nozawa, T., Trost, J.T., Fukada, T., Hatano, M., Mcmanus, J.D. and Blankenship, R.E. (1987) Properties of the reaction center of the thermophilic purple photosynthetic bacterium *Chromatium tepidum. Biochim. Biophys. Acta* 894: 468-476.
- Permentier, H.P., Neerken, S., Overmann, J. and Amesz, J. (2001) A bacteriochlorophyll a antenna complex from purple bacteria absorbing at 963 nm. *Biochemistry* 40: 5573-5578.
- Qi, C.H., Wang, G.L., Wang, F.F., Wang, J., Wang, X.P., Zou, M.J., et al. (2024) Structural insights into the unusual core photocomplex from a triply extremophilic purple bacterium, *Halorhodospira halochloris. J. Integr. plant Biol.* 66:2262-2272.
- Qian, P., Croll, T.I., Hitchcock, A., Jackson, P.J., Salisbury, J.H., Castro-Hartmann, P., et al. (2021a) Cryo-EM structure of the dimeric *Rhodobacter sphaeroides* RC-LH1 core complex at 2.9 A: the structural basis for dimerisation. *Biochem. J.* 478: 3923-3937.
- Qian, P., Croll, T.I., Swainsbury, D.J.K., Castro-Hartmann, P., Moriarty, N.W., Sader, K., et al. (2021b) Cryo-EM structure of the *Rhodospirillum rubrum* RC-LH1 complex at 2.5 Å.

Biochem. J. 478: 3253-3263.

- Qian, P., Siebert, C.A., Wang, P.Y., Canniffe, D.P. and Hunter, C.N. (2018) Cryo-EM structure of the *Blastochloris viridis* LH1–RC complex at 2.9 Å. *Nature* 556: 203-208.
- Qian, P., Swainsbury, D.J.K., Croll, T.I., Salisbury, J.H., Martin, E.C., Jackson, P.J., et al. (2021c) Cryo-EM structure of the monomeric *Rhodobacter sphaeroides* RC-LH1 core complex at 2.5 A. *Biochem. J.* 478: 3775-3790.
- Qin, X.C., Suga, M., Kuang, T.Y. and Shen, J.R. (2015) Structural basis for energy transfer pathways in the plant PSI-LHCI supercomplex. *Science* 348: 989-995.
- Reimers, J.R., Biczysko, M., Bruce, D., Coker, D.F., Frankcombe, T.J., Hashimoto, H., et al. (2016) Challenges facing an understanding of the nature of low-energy excited states in photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1857: 1627-1640.
- Resnick, S.M. and Madigan, M.T. (1989) Isolation and characterization of a mildly thermophilic nonsulfur purple bacterium containing bacteriochlorophyll *b. FEMS Microbiol. Lett.* 65: 165-170.
- Richard, S.B., Madern, D., Garcin, E. and Zaccai, G. (2000) Halophilic adaptation: Novel solvent protein interactions observed in the 2.9 and 2.6 Å resolution structures of the wild type and a mutant of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*. *Biochemistry* 39: 992-1000.
- Roszak, A.W., Howard, T.D., Southall, J., Gardiner, A.T., Law, C.J., Isaacs, N.W., et al. (2003) Crystal structure of the RC-LH1 core complex from *Rhodopseudomonas palustris*. *Science* 302: 1969-1972.
- Rücker, O., Köhler, A., Behammer, B., Sichau, K. and Overmann, J. (2012) Puf operon sequences and inferred structures of light-harvesting complexes of three closely related *Chromatiaceae* exhibiting different absorption characteristics. *Arch. Microbiol.* 194: 123-134.
- Saito, K., Mitsuhashi, K. and Ishikita, H. (2020) Dependence of the chlorophyll wavelength on the orientation of a charged group: Why does the accessory chlorophyll have a low site energy in photosystem II? *J. Photochem. Photobiol. A* 402: 112799.
- Seto, R., Takaichi, S., Kurihara, T., Kishi, R., Honda, M., Takenaka, S., et al. (2020) Lycopene-family carotenoids confer thermostability on photocomplexes from a new thermophilic purple bacterium. *Biochemistry* 59: 2351-2358.
- Sturgis, J.N., Olsen, J.D., Robert, B. and Hunter, C.N. (1997)

Functions of conserved tryptophan residues of the core light-harvesting complex of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* 36: 2772-2778.

- Sturgis, J.N. and Robert, B. (1997) Pigment binding-site and electronic properties in light-harvesting proteins of purple bacteria. J. Phys. Chem. B 101: 7227-7231.
- Suzuki, H., Hirano, Y., Kimura, Y., Takaichi, S., Kobayashi, M., Miki, K., et al. (2007) Purification, characterization and crystallization of the core complex from thermophilic purple sulfur bacterium *Thermochromatium tepidum*. *Biochim*. *Biophys. Acta* 1767: 1057-1063.
- Swainsbury, D.J.K., Qian, P., Hitchcock, A. and Hunter, C.N. (2023) The structure and assembly of reaction centre-lightharvesting 1 complexes in photosynthetic bacteria. *Biosci. Rep.* 43 : BSR20220089.
- Swainsbury, D.J.K., Qian, P., Jackson, P.J., Faries, K.M., Niedzwiedzki, D.M., Martin, E.C., et al. (2021) Structures of *Rhodopseudomonas palustris* RC-LH1 complexes with open or closed quinone channels. *Sci. Adv.* 7: eabe2631.
- Tani, K., Kanno, R., Harada, A., Kobayashi, Y., Minamino, A., Takenaka, S., et al. (2024) High-resolution structure and biochemical properties of the LH1–RC photocomplex from the model purple sulfur bacterium, *Allochromatium vinosum*. *Commun. Biol.* 7: 176.
- Tani, K., Kanno, R., Ji, X.C., Hall, M., Yu, L.J., Kimura, Y., et al. (2021a) Cryo-EM Structure of the Photosynthetic LH1– RC Complex from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry* 60: 2483-2491.
- Tani, K., Kanno, R., Kikuchi, R., Kawamura, S., Nagashima, K.V.P., Hall, M., et al. (2022a) Asymmetric structure of the native *Rhodobacter sphaeroides* dimeric LH1–RC complex. *Nat. Commun.* 13: 1904.
- Tani, K., Kanno, R., Kurosawa, K., Takaichi, S., Nagashima, K.V.P., Hall, M., et al. (2022b) An LH1–RC photocomplex from an extremophilic phototroph provides insight into origins of two photosynthesis proteins. *Commun. Biol.* 5: 1197.
- Tani, K., Kanno, R., Makino, Y., Hall, M., Takenouchi, M., Imanishi, M., et al. (2020) Cryo-EM structure of a Ca²⁺-bound photosynthetic LH1–RC complex containing multiple αβpolypeptides. *Nat. Commun.* 11: 4955.
- Tani, K., Kanno, R., Nagashima , K.V.P., Kawakami , M., Hiwatashi, N., Nakata, K., et al. (2025a) A Native LH1–RC– HiPIP Supercomplex from an Extremophilic Phototroph. *Commun. Biol.* 8: 42.

- Tani, K., Kobayashi, K., Hosogi, N., Ji, X.C., Nagashima, S., Nagashima, K.V.P., et al. (2022c) A Ca²⁺-binding motif underlies the unusual properties of certain photosynthetic bacterial core light-harvesting complexes. *J. Biol. Chem.* 298: 101967.
- Tani, K., Nagashima, K.V.P., Kanno, R., Kawamura, S., Kikuchi, R., Hall, M., et al. (2021b) A previously unrecognized membrane protein in the *Rhodobacter sphaeroides* LH1–RC photocomplex. *Nat. Commun.* 12: 6300.
- Tani, K., Nagashima , K.V.P., Kojima, R., Kondo, M., Kanno,
 R., Satoh, I., et al. (2025b) A Distinct Double-Ring LH1–
 LH2 Photocomplex from an Extremophilic Phototroph. *Nat. Commun.* 16: 1410.
- Tsukatani, Y., Hirose, Y., Harada, J., Yonekawa, C. and Tamiaki, H. (2019) Unusual features in the photosynthetic machinery of *Halorhodospira halochloris* DSM 1059 revealed by complete genome sequencing. *Photosynth. Res.* 140: 311-319.
- Tuschak, C., Beatty, J.T. and Overmann, J. (2004) Photosynthesis genes and LH1 proteins of *Roseospirillum parvum* 930I, a purple non-sulfur bacterium with unusual spectral properties. *Photosynth. Res.* 81: 181-199.
- vanGrondelle, R., Monshouwer, R. and Valkunas, L. (1997) Photosynthetic light-harvesting. *Pure Appl. Chem.* 69: 1211-1218.
- Vanmourik, F., Visschers, R.W. and Vangrondelle, R. (1992) Energy transfer and aggregate size effects in the inhomogeneously broadened core light-harvesting complex of *Rhodobacter sphaeroides. Chem. Phys. Lett.* 193: 1-7.
- Voss, N.R. and Gerstein, M. (2010) 3V: cavity, channel and cleft volume calculator and extractor. *Nucleic Acids Res.* 38: W555-W562.
- Wang, Z.Y., Shimonaga, M., Suzuki, H., Kobayashi, M. and Nozawa, T. (2003) Purification and characterization of the polypeptides of core light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria. *Photosynth. Res.* 78: 133-141.
- Yu, L.J., Kawakami, T., Kimura, Y. and Wang-Otomo, Z.Y. (2016) Structural basis for the unusual Q_y red-shift and enhanced thermostability of the LH1 complex from *Thermochromatium tepidum. Biochemistry* 55: 6495-6504.
- Yu, L.J., Suga, M., Wang-Otomo, Z.Y. and Shen, J.R. (2018) Structure of photosynthetic LH1–RC supercomplex at 1.9 Å resolution. *Nature* 556: 209-213.

ヘテロシストを形成しない糸状性窒素固定シアノバクテリア Leptolyngbya boryana:新たなモデルシアノバクテリアの可能性

藤田 祐一¹⁾, 山本 治樹¹⁾, 馬場 真里¹⁾

2024年12月2日受付, 2025年1月6日受理

Leptolyngbya boryanaは、糸状性シアノバクテリアであり、ヘテロシストを分化せず、嫌気(微好気) 環境において窒素固定的に生育することができる.また、完全暗所においてもグルコースなどの糖を 利用して従属栄養的に生育することができることから、光合成生育能を欠いた変異株の単離が可能で ある.全ゲノム配列が既に解読済みであり、電気穿孔法もしくは接合法により形質転換が可能である. シャトルベクターを利用した大量発現系およびレポーター系が利用でき、トランスポゾン変異導入に よる順遺伝学的解析も可能である.本稿では、L. boryanaの特徴と研究事例(クロロフィル生合成、窒 素固定、細胞外小胞、従属栄養に関する分子生物学的研究)および窒素固定研究の方法を紹介し、今後 の展望について述べる.

The nonheterocystous filamentous nitrogen fixing cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*: Potential as a new model cyanobacterium

Yuichi Fujita¹, Haruki Yamamoto¹, Mari Banba¹

Leptolyngbya boryana is a filamentous cyanobacterium that can grow diazotrophically without heterocyst differentiation under anaerobic (microoxic) conditions. Since *L. boryana* can also grow heterotrophically in the dark using respiratory substrates such as glucose, mutants lacking photosynthetic growth capacity can be isolated. The genome has been sequenced, and *L. boryana* is transformable by electroporation or conjugation. Shuttle vector, reporter, and transposon mutagenesis systems have been established in *L. boryana*. Using the *L. boryana*'s characteristics, molecular biological studies on chlorophyll biosynthesis, nitrogen fixation, extracellular vesicles, and heterotrophy have been conducted. In this paper, the characteristics of *L. boryana*, research examples and methods of nitrogen fixation studies are presented, and prospects are discussed.

キーワード:シアノバクテリア,従属栄養,窒素固定,形質転換,ゲノム解析 Cyanobacteria, Heterotrophy, Nitrogen fixation, Transformation, Genome analysis

1. はじめに

シアノバクテリアは,植物と同じ酸素を作る光合成を行 う原核生物である.進化的には,祖先シアノバクテリアの

連絡先
藤田 祐一
名古屋大学大学院生命農学研究科
〒 467-8601 名古屋市千種区不老町
Tel: 052-789-4089
Email: fujita@agr.nagoya-u.ac.jp

ー系統が、祖先真核生物の細胞に取り込まれ細胞内共生 を介して、葉緑体となったと考えられる. これまでにモ デルシアノバクテリアとしてSynechococcus elongatus PCC 7942やSynechocystis sp. PCC 6803およびAnabaena sp. PCC

 名古屋大学大学院生命農学研究科 Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya, Japan



図1:A.L. boryana (赤矢印) とモデルシアノバクテリア3種; Synechocystis sp. PCC 6803 (青矢印), Synechococcus elongatus PCC 7942 (黒矢印), Anabaena sp. PCC 7120 (黄色矢印, ヘテ ロシスト)

B-E. L. boryana (窒素固定による生育と硝酸を窒素源とする生育) 窒素欠乏培地 (B, D)と硝酸栄養培地 (C, E)上で嫌気・連続光 条件で2週間培養した.紫外線照射下で観察すると,光合成色 素 (クロロフィル,フィコシアニン)による蛍光がすべての細胞 において観察され (D, E),窒素固定生育時にも光合成色素が維 持されていることがわかる.

7120が広く光合成や窒素固定研究に活用されてきた. その中で,私たちは,糸状性シアノバクテリアLeptolyngbya boryana (旧学名Plectonema boryanum)を用いて,既存のモ デルシアノバクテリアにはない特徴を活かしながら分子 生物学的研究を展開してきた.本稿では,L. boryanaの特 徴と研究例および窒素固定研究の方法を紹介し,今後の 展望について述べたい.

2. 形態と生育特性

L. boryanaは、細胞が一列につながったまま紐状に増殖 していく糸状性のシアノバクテリアである(図1).細胞は、 概ね2 μmの直径、高さもほぼ同じ程度の円柱形で、枝分 かれすることなく直線状につながり、糸状体 (trichome) を形成する. Anabaena sp. PCC 7120の糸状体に比べると かなり細く、一つの細胞を比べてもSynechocystis sp. PCC 6803よりも少し小さい. 窒素固定条件でも均質な細胞で あり、ヘテロシストを形成しない (図1B). シアノバクテ リアの古典的分類 (Rippka et al. 1979)では、形態的特徴に 基づいて5つのSectionに分類される: Section I (単細胞), II (凝集体、ベオサイト形成), III (糸状性,細胞分化なし), IV (糸状性、ヘテロシスト分化、分岐なし), V (糸状性、 ヘテロシスト分化、分岐あり). L. boryanaは形態的特徴か らSection IIIに分類される.

L. boryana IAM M-101は,淡水性種であり,BG-11培地, 30℃で光照射下で培養すると光合成独立栄養的に生育す る.例えば,光強度20~50 µmol/m²/s程度の光照射下で液 体培地で振とう培養すると世代時間5.5 daysで光合成的に 生育する (Fujita et al. 1992).より早く生育させるために は,CO₂を2%程度含む空気で通気し,光強度を200 µmol/ m²/s程度まで上げると世代時間約6~7 hで増殖する (Fujita et al. 1998; Yamazaki et al. 2006).

3. 暗所での従属栄養

L. boryanaの重要な特徴の一つが高い従属栄養能である. Synechocystis sp. PCC 6803では, 暗所従属栄養生育を維持 するために毎日15分程度の光照射を必要とする光活性化 従属栄養 (Light-activated heterotrophic growth; LAHG) と いう限定的な従属栄養生育を示す (Anderson and McIntosh 1991) が, L. boryanaの暗所従属栄養生育ではそのような 光照射は必要としない. L. borvanaは30 mM グルコースを 含むBG-11培地(BG-11Glc)にて完全暗所で従属栄養的に生 育することができる.炭素源としてグルコース以外に、リ ボース, スクロース, マンニトール, マルトース, フル クトースなどが利用でき、グルコースを使った液体培養で は世代時間が12 daysと報告されている (IU-594株, White and Shilo, 1974). L. boryana IAM M-101は, BG-11Glc液体 培地にて世代時間103 h (4.3 days) で増殖する (Fujita et al. 1992). より早く生育できる暗所適応株を得るために、野 生型を暗所従属栄養条件で長時間(40 days) 培養すること でdg5株が単離された (Fujita et al. 1996). dg5 は, 暗所従 属栄養での世代時間が59hと短く、光照射下での光合成 による生育では親株と違いが見られない. このため, dg5 が野生型として利用されることが多い (Fujita et al. 1996, Kada et al. 2003).

4. 窒素固定

L. boryanaのもう一つの特徴は、窒素固定能である (Stewart and Lex 1970). 窒素固定反応を触媒する酵素ニ トロゲナーゼが酸素によって速やかに不活性化してしま う性質をもつため、光合成で酸素を作るシアノバクテリ アにおいてどのように光合成と窒素固定を両立させるの か,いわゆる"酸素パラドクス"をどのように解決するの かが重要な視点となる.これは、単に環境中の酸素に対 する防御対応のみの他の窒素固定生物とは異なるシアノ バクテリア固有の観点である.シアノバクテリアの"酸素 パラドクス"を統御する戦略として最もよく知られている のが、窒素固定に特化した細胞ヘテロシスト分化による、 光合成と窒素固定との空間的隔離である(Zeng and Zhang 2022). ヘテロシストは、分厚い細胞壁によって酸素の流 入を抑制し、光化学系IIをなくして細胞内で酸素を発生さ せず,細胞膜の高い呼吸活性によりわずかな酸素も除去 することで、ニトロゲナーゼが作動できる充分な嫌気的 環境を作り出す. このシステムにより, Anabaena sp. PCC 7120を始めとするヘテロシスト形成型シアノバクテリア は、通常の空気下(21%酸素)という好気的環境でも窒素 固定が可能となっている.

ヘテロシストを分化しない糸状性種L. boryanaは窒素 固定生育には嫌気的環境を必要とする (Stewart and Lex 1970). ただ,嫌気条件においても光合成による酸素発生 は継続するため,正確には微好気 (microoxic)環境と表現 するべきかもしれない.ジチオナイト (亜ジチオン酸ナト リウム) を添加すると*in vivo*ニトロゲナーゼ活性が大幅に 促進される (Nagatani and Haselkorn 1978). これはジチオ ナイトが酸素を完全に除去することによる効果と推察さ れる.

一方,窒素固定を夜間に限定して行うことで,光合成と 窒素固定とを時間的に隔離して酸素パラドクスを統御す る戦略も知られている(Mitsui et al. 1986; Grobbelaar N. et al. 1986). これらのシアノバクテリアでは,窒素固定活性 と光合成活性が各々夜間と日中で活性が互いに概日的に 振動するという,明瞭な概日リズムで制御されている. こ のような制御は, *L. boryana* UTEX 594においても報告さ れている(Misra and Tuli 2000). なお,ヘテロシストを分 化しないシアノバクテリアの窒素固定は,嫌気的(微好気) 環境を要するタイプ(*L. boryana*),好気的環境下において 概日リズム制御で夜間に限定されるタイプ(*Cyanothece*), 好気的環境で日中に限定されるタイプ(*Trichodesmium*), 明け方と日没直後に限定されるタイプ(温泉微生物マット のSynechococcus)と多様性が見られる (Bergman et al. 1997, Stal and Zehr 2008).

5. ゲノム解読

L. boryanaのゲノムは, 主要な環状ゲノム (6,176,364 bp), 1つの環状プラスミド (pLBA, 77,793 bp), 2つの 線状プラスミド (pLBX, 504,942 bp; pLBY, 44,369 bp) か ら構成される. Synechocystis sp. PCC 6803 (3,573,470 bp; Kaneko et al. 1996) や Gloeobacter violaceus PCC 7421 (4,659,019 bp; Nakamura et al. 2003) よりもかなり大きい が, Anabaena sp. PCC 7120 (主要環状ゲノム 6,413,771 bp; Kaneko et al. 2001) よりやや小さい.

dg5のゲノム解読も行われ,野生型ゲノムとの比較によりdg5の暗所従属栄養生育向上をもたらした変異が特定されている(Hiraide et al. 2015).野生型とdg5のゲノム塩基 配列の違いはわずか3ヶ所(2つの1塩基置換と1塩基挿入)であり,このうち、シトクロム c_M をコードする遺伝子*cytM*(LBWT_49050)のコード領域の1塩基挿入(フレームシフトにより*cytM*が機能欠失)が,暗所での従属栄養生育を向上させる原因変異である.シトクロム c_M の機能はまだ不明であるが、*Synechocystis* sp. PCC 6803での*cytM*欠損株の解析から、シトクロム c_M はグルコース存在下において光合成と呼吸電子伝達系のレドックス制御に関わると推定される(Solymosi et al. 2020).

ゲノム解読の結果、他の多くのシアノバクテリアにお ける, L. boryanaの分子系統的な位置付けがわかってき た (Shih et al. 2013). 主に細胞形態に基づく古典的な分類 ではSection IIIとされてきたが、54種の多様なシアノバク テリアで作られた分子系統樹 (Shih et al. 2013) では, L. boryana はGeitlerinema sp. PCC 7407を近縁種とするサブク レードDに位置付けられる. また, Komárekらによる分類 では、Synechococcales目に分類されている (Komárek et al. 2014, 須田ら 2022). シアノバクテリアの分類はまだ未確 定な部分が多く、その中でも特にL. boryanaとよく似た糸 状性の形態の種は多系統を示しており、未だ分類が確立さ れていない. つまり, Leptolyngbyaという属名であっても, 単に類似した細胞形態に基づき命名されているため、属 名だけで互いに系統的に近い関係であるとは必ずしもい えないことは注意を要する. なお, L. boryana IAM M-101 とほぼ同一と思われる株は, PCC 6306 (ATCC 27894) (Shih et al. 2013), PCC 6402 (ATCC 27902), PCC 73110 (ATCC 29407) (UTEX 594 (IU 594)) (Schrautemeier et al. 1994), PCC 7410 (ATCC 29136), PCC 7505 (ATCC 29170), NIES-



図2: *L. boryana*の形質転換 エレクトロポレーション法 (A) と 接合法 (B)

2135 (Hirose et al. 2021), UTEX 485 (Yamazaki et al. 2006) である.

6. 遺伝子操作の基盤技術

6-1 エレクトロポレーションによる形質転換

L. boryanaの形質転換は、電気穿孔法(エレクトロポレー ション)によって行う(図2A, Fujita et al. 1992; Tsujimoto et al. 2015).特定遺伝子を欠損させた変異株の単離は、まず、 ターゲット遺伝子を薬剤耐性遺伝子で分断したプラスミ ドを構築し、これを電気穿孔法によって細胞に導入し、 細胞内でプラスミドとゲノム上のターゲット遺伝子との 二回相同組換えを起こした細胞を、薬剤耐性で選抜して 単離する.具体的には、プラスミド(あらかじめ制限酵素 処理により線状化する)溶液と細胞懸濁液を混合し、電気 パルス(電圧12.5 kV/cm、時定数9~11 ms程度の減衰波パ ルス)を与えることで、プラスミドを細胞に導入する.パ ルス印加後,薬剤非添加の明条件で24 h程度培養したのち、 薬剤を含む選択培地に移し、明条件で培養を継続すると、 1週間から10日程度で薬剤耐性コロニーが生じる.ただし、 薬剤耐性コロニーには、プラスミド上の2つのゲノム相同 領域の一方でのみゲノムと組換わることで、プラスミド 全体がゲノムに取り込まれた一回組換え体が高頻度で含 まれる(Fujita et al. 1992).コロニー PCR等で確認し、一 回組換え体を除外し、目的とする二回組換え体を選抜し、 ターゲット遺伝子欠損株とする.また、アンピシリンに 対する感受性を確認する(ベクター由来のアンピシリン耐 性遺伝子が失われている)ことで二回組換え体を選抜する こともできる(6-3、表1参照).

6-2 接合法による形質転換

上記の電気穿孔法に加え, 最近, 接合法による形質 転換も確立された (図2B; Hida et al. 2024). ターゲット 遺伝子を分断するように薬剤耐性遺伝子を導入したプ ラスミドのベクター部分を、接合用プラスミドpZJD29a (Masuda and Bauer 2004) に置き換えたプラスミドを構築 する. このプラスミドを大腸菌E. coli S17-1 λpirに導入す る. pZJD29aは、λpirにコードされるπタンパク質に依存 して複製される複製起点oriR6Kを有するため, E. coli S17-1 λpirでは維持されるが、 λpirを有しないE. coliやシアノバ クテリアの細胞では複製されないため安定に保持されな い. このプラスミドを有するS17-1 λpirとL. boryana細胞を 混合することで、接合を介してプラスミドをE. coliからL. borvana細胞に導入する. プラスミド上の一方の相同領域 を介した一回相同組換えによってプラスミド全体がゲノ ムに挿入された一回組換え体を薬剤耐性により選抜、単離 する. pZJD29aのベクター部分にはスクロースを致死物質 レバンに変換する酵素の遺伝子sacBがコードされており、 一回組換え体はスクロース感受性を示す. 一回組換え体 において、もう一方の相同配列間で2回目の組換えが起 こると、ゲノムからプラスミドが除かれ、分断されたター ゲット遺伝子のコピーだけがゲノム上に残され、ターゲッ ト遺伝子欠損株が得られる.具体的には、一回組換え体 をスクロース (5%) を含むBG-11培地に接種し、スクロー ス耐性株を選抜する. 接合法は、ターゲット遺伝子欠損 株を得るために、2回の選抜を必要とするが、その一方、 実際の実験操作は、上述の電気穿孔法に比べると簡素で あり、概してより多くの形質転換体が得られる.また、 接合法では, sacBによる選択を利用した, 薬剤耐性遺伝 子を用いないターゲット遺伝子欠損株(マーカーレス変異 体)の単離も可能である.

抗生物質	使用濃度 (μg/ml)	遺伝子名	薬剤耐性遺伝子由来	参考文献
カナマイシン	15	neo	pKC7	Rao and Rogers 1979
クロラムフェニコール	25	cat	pBR325	Walton et al. 1993
ストレプトマイシン*	10	aadA	pKUT-Tn5-Sm/Sp	Watabe et al. 2014
	0.5	bla	pUC19	Fujita et al. 1992

表1 L. boryanaで利用できる抗生物質と耐性遺伝子

* トランスポゾン変異導入でのみ利用実績 (6-4参照, Tomatsu et al. 2018)

** 一回組換え体と二回組換え体を区別するための利用に限定(接種後24 h程度でコロニーを実体顕微鏡で観察することで感受性/耐性を容易に判別できる)

6-3 薬剤耐性遺伝子

L. boryanaで利用可能な抗生物質とその耐性遺伝子を表 1に示す.カナマイシンが最も広く使われる.シャトルベ クター pPBH201 (後述6-5) はクロラムフェニコール耐性 遺伝子が選択マーカーとなっている.ストレプトマイシン 耐性遺伝子は、トランスポゾン変異導入で利用された(後 述6-4).なお,スペクチノマイシンとジェンタマイシンは、 野生型が比較的高い耐性を示すため、薬剤耐性による選 抜には利用できない.ジェンタマイシンは接合法におい てドナーとなったE. coliを排除するために低濃度(20~25 µg/ml)で利用される.

6-4 トランスポゾン変異導入系

L. boryanaにおいてトランスポゾン (Tn) を活用したin vivo変異導入系も確立されている (Tomatsu et al. 2018). Tn5を有するベクター pKUT-Tn5-Sm/Sp (Watabe et al. 2014) を用いる. このベクターもpZJD29aと同じくπタンパク質 に依存した複製起点を有するため, E. coli S17-1 λpirで維 持させ、接合法によりL. boryanaの細胞に導入する.L. borvanaの細胞内で、pKUT-Tn5-Sm/Spにコードされるト ランスポゼースの作用により,同じベクターに保持され ているME配列に挟まれた薬剤耐性(ストレプトマイシン およびスペクチノマイシン耐性遺伝子)が切り出され、L. boryanaのゲノムのランダムな位置に挿入される. 選抜は ストレプトマイシン (Sm) で行う. 通常の光合成条件で培 養すると、10日程度でSm耐性のコロニー(トランスコン ジュガント)が生じる. Tn挿入は、ゲノム全体にわたって ほぼ均等に起こり、位置的な偏りがあるようには見えな い. この方法により、形質に基づく順方向の遺伝学的解 析(形質に基づき変異体を単離し、Tn挿入部位から原因遺 伝子を特定する)が可能となった.実際に、私たちは、窒 素固定生育に必要とされる遺伝子群の特定のためにこの 方法を利用した. Sm耐性トランスコンジュガントを,2種

類の寒天培地BG-11およびBG-11。(硝酸塩を含まないBG-11)に接種し、嫌気的に培養し、BG-11で生育するがBG-11。で生育しないもしくは生育不良を示す株を選抜するこ とで、窒素固定生育に異常を来したトランスコンジュガ ントを収集した.BG-11。で生育不良を示した一つのトラン スコンジュガントCT1590のゲノム解析の結果、銅イオン 輸送体をコードする遺伝子*ctaA*(LBDG_29640)にTnが挿 入されていることが判明し、銅イオンの効率的な取り込 みが*L. boryana*の窒素固定生育に重要であることがわかっ た(Tomatsu et al. 2018).

6-5 シャトルベクター

L. boryanaでは、シャトルベクターを利用し特定の遺 伝子を大量発現させることができる. L. boryanaのシャ トルベクター pPBH201は, Plectonema boryanum (株名は 不明)が有する機能不明の潜在的プラスミドpGL3 (1,504 bp) をpBR322由来の複製起点とpBR325由来のクロラム フェニコール耐性遺伝子を連結させて構築された(Walton et al. 1993). このプラスミドの分与を受けて, pPBH202 などの一連のシャトルベクターを構築し活用した.シャ トルベクター系は,遺伝子欠損株の相補実験や,特定 のタンパク質の大量発現のために用いられる. 強力な プロモーターとしてE. coli由来のtrcやT5プロモーターが 有効である.大量発現によるL. boryanaの光非依存的(暗 所作動型)プロトクロロフィリド還元酵素 (DPOR, darkoperative protochlorophyllide oxidoreductase)の生化学的解析 (Yamamoto et al. 2009), 大量発現系を相補系として活用 したヒメツリガネゴケ葉緑体ゲノムのDPORサブユニット の解析 (Yamamoto et al. 2011), クロマツ葉緑体ゲノムの DPOR遺伝子のmRNAに対するRNAエディティングの効果 の解析が行われた (Yamamoto et al. 2017). また, 光依存 型プロトクロロフィリド還元酵素の大量発現(Yamamoto et al. 2020) によってシアノバクテリア細胞でプロラメラ体

様構造が形成されることを報告した例もある. また, 植物のフェレドキシン (Fd) をシャトルベクターで発現させることで, *L. boryana* のFd遺伝子*petF*を欠損させることが可能である. この系を利用し, 植物のFdのアイソフォームの生理学的解析が行われた (Kimata-Ariga et al. 2000).

6-6 レポーター系

レポーター系についても、*luxAB*を使った生物発光によ る概日リズムの検出の実績がある.pPBH201を使って、 Fd遺伝子*petFと*DPORサブユニット遺伝子*chlB*のプロモー ターを*luxAB*に連結したプラスミドを構築し、生物発光に よる概日リズムが測定された(Terauchi et al. 2005). いず れのプロモーターでも、恒明条件で約24 h周期の明瞭な概 日リズムが観察された.また、暗所(恒暗)条件でも概日 リズムが観察されたが、その周期が約21 hと短周期化して いたことは興味深い.

7. L. boryanaを使った研究紹介

以下, L. boryanaの特徴(暗所従属栄養能・窒素固定)を 活かした研究例を紹介する.

7-1 葉緑体ゲノムにコードされた遺伝子の機能同定

ゼニゴケの葉緑体ゲノムにおいて、ニトロゲナーゼのFe タンパク質NifHと有意な類似性(アミノ酸レベルで30%程 度)を示すタンパク質をコードする遺伝子frxC (ferredoxin にちなんだ暫定的な名称)が見つかった (Ohyama et al. 1986). ニトロゲナーゼは原核生物にのみ分布することか ら、frxCはおそらく窒素固定ではなく光合成に関係する機 能を有すると推定された. 暗所従属栄養で生育する能力を もつシアノバクテリアL. boryanaを葉緑体のモデル生物と し、frxC遺伝子の機能の解明を目指した(藤田 2013). そ の過程で電気穿孔法による形質転換系を確立し、frxC欠損 株を単離した. frxC欠損株は、光合成条件では野生型と変 わらず生育し、特に形質が認められなかったが、暗所従 属栄養条件で生育させると異常に青い色調を呈した. 色 素分析の結果、frxC欠損株は暗所生育ではクロロフィル の生合成が停止し、クロロフィル生合成中間体であるプ ロトクロロフィリドを蓄積することがわかった. この形 質から、frxCがDPORに関わることが示され、L. boryana の高い暗所従属栄養生育能が活用された最初の研究例と なった (Fujita et al. 1992). また, frxC欠損株が明所では クロロフィルが正常に生合成されることから、被子植物 の光依存的緑化の鍵酵素として知られていた光依存型

プロトクロロフィリド還元酵素(LPOR, light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase)が進化的にはシアノバク テリアに由来することが示唆された. その後, frxCは機能 に基づきバクテリオクロロフィル生合成系でのオルソログ 遺伝子の名称 (bchL) に合わせてchlLと改名された(Suzuki and Bauer 1992). また, L. boryanaは, DPORの他の2つの サブユニットをコードする遺伝子 (chlN, chlB)の同定にお いても活用された (Fujita et al. 1993; Fujita et al. 1996).

7-2 シアノバクテリアを使った黄化・緑化過程の解析

L. boryanaのDPORのサブユニット遺伝子の欠損株 (*AchlL*) では、明条件であればLPORの活性でプロトクロ ロフィリド還元が進行し、クロロフィルaは正常に生合成 される. ところが, 暗所で従属栄養的に生育させると, クロロフィルの生合成が停止した状態で細胞増殖が進行 する. すなわち、クロロフィル含量の低下は、対数的な 細胞増殖と鏡像的な関係を示した. このことは、クロロ フィルは積極的に分解されず、細胞分裂による希釈によっ てクロロフィル濃度が低下することを示している. プロ トクロロフィリド還元酵素としてLPORのみを利用する被 子植物では、種子を暗所で芽生えさせると、クロロフィ ルが含まれない黄化状態(いわゆる「もやし」)となる. す なわち、L. boryanaのDPOR欠損株の暗所培養により、被 子植物の黄化芽生えと類似した状況をシアノバクテリア 細胞で現出させることができる. さらに, 被子植物の芽 生えと同様に、光を照射することで緑化(クロロフィル生 合成)を開始させることもできる (Kada et al. 2003). また, 黄化の初期過程で、光化学系Iの方が光化学系IIよりも先 に分解されていくことが示された.この過程で光化学系I サブユニットの遺伝子 (psaA, psaC) の転写物のレベルは 暗所でもほとんど変化しなかったことから、翻訳後ある いは翻訳過程で、クロロフィル供給不足によりタンパク 質が不安定化して分解されると推察される.

7-3 細胞外小胞の解析

L. boryanaのΔchlLを暗所で培養すると,DPORの基質プ ロトクロロフィリドが細胞内に大量に蓄積し,さらに一 部は細胞外に漏出し,培地が黄色く変色する.このプロ トクロロフィリドの培地への輸送は,細胞外小胞(EV)を 介していることが明らかとなった(Usui et al. 2022). EVと は,細胞外膜が出芽することで生じる脂質二重膜に囲ま れたナノサイズの構造体である.これまでに多様な生物 でEVが調べられ,細胞間コミュニケーション,バイオフィ ルム形成,栄養物排出/吸収,解毒,遺伝子水平移動,代
謝物排出、環境ストレス応答などさまざまな機能を担う ことが報告されてきた (Schwechheimer and Kuehn, 2015). ∆chlLの解析を通して、シアノバクテリアのEVが光合成色 素の分泌という新しい機能を有することが見出された. さ らに、最近、L. boryanaの野生型が光合成もしくは暗所従 属栄養で生育する際にも、EVが形成されることが明らか となった.野生型のEVはカロテノイド(ケトミクソール配 糖体とゼアキサンチン)を主要な色素として含むが、加え て、クロロフィル生合成中間体(プロトポルフィリンIX、 プロトポルフィリンIXモノメチルエステル、プロトクロ ロフィリド、クロロフィリドなど)が含まれることが明ら かになった (Usui et al. 2024). EVにはこれらのクロロフィ ル生合成中間体の40%程度(培養液全体を100%として)が 局在していると見積もられ、シアノバクテリアがクロロ フィル生合成中間体をEVを介して分泌する能力を有する ことが強く示唆された、シアノバクテリアのEVは、細胞 内(チラコイド膜)にわずかに蓄積する生合成中間体によ る酸化障害を回避するための安全弁としての機能を果た しているのかもしれない.

7-4 長期にわたる暗所従属栄養生育による微小進化研究

高い暗所従属栄養能を利用して、L. boryanaを長期にわ たって暗所で培養を継続することが可能である. この性 質を利用して,長期間の暗所従属栄養による形質変化と 変異蓄積を検討した (Hida et al. 2024). dg5を親株とした6 系統(49ヶ月暗所培養),野生型を親株とした16系統(15ヶ 月暗所培養)と6系統(7ヶ月暗所培養)について、生育特性 を親株と比較したところ、全ての暗所適応株(28株)が親 株よりも暗所従属栄養条件での生育が向上していた. ま た,光合成条件では,多くの適応株が生育低下を示し, 15株は光合成生育能を失っていた。暗所適応株全28株の ゲノムリシーケンシングを実施し変異の蓄積を解析した. 全株で合計90ヶ所の変異が特定され、うち19ヶ所の変異 が一つの遺伝子LBDG 21500に集中して生じていた. す なわち、28株中19株でこの遺伝子への変異が生じていた。 LBDG 21500のアノテーションは"serine phosphatase RsbU, regulator of sigma subunit"とされており、原核生物に広く 分布する情報伝達システムの一つパートナースイッチン グシステム (PSS, partner switching system) で作動するホ スファターゼをコードすると思われる. PSSは, 3つのコ ンポーネント;キナーゼ (アンチシグマ因子), アンタゴ ニストおよびホスファターゼで構成されており、その多 くはシグマ因子依存的な転写を介して多様な細胞過程; ストレス応答, 胞子形成, バイオフィルム形成, 病原性 等を制御している.改めてLBDG_21500の単独欠損株を単 離し,形質を調べたところ,光合成条件で生育が低下し, 暗所での従属栄養条件で生育が促進された.このことは, *L. boryana*においてこのホスファターゼを含むPSSが,光 合成生育と従属栄養生育に関わる遺伝子発現を制御して いることを示している.この結果を受け,LBDG_21500を *phsP* (phototroph and heterotroph switching phosphatase)と命 名することを提案した.暗所適応株でPSSのホスファター ゼ遺伝子に多くの変異が高い頻度で生じたことは,光合 成喪失に向かう進化の初期過程で,光合成独立栄養と従 属栄養に関わる遺伝子発現制御システムに変異が生じる ことを示しており,非常に興味深い.

7-5 ヘテロシストによらない窒素固定の解析

窒素固定とは、化学的に不活性な窒素分子を、多くの 生物が利用できるアンモニアに変換するプロセスであり、 地球の窒素循環において極めて重要な役割を担う、窒素 固定反応を触媒するニトロゲナーゼは、酸素によって速 やかに分解される金属クラスターを活性中心とする酵素 であるため、酸素に触れると秒から分の単位で不活性化 されてしまう.このため窒素固定は嫌気的環境を必要と する.シアノバクテリアの約半数種は窒素固定の能力を もつとされているが、光合成で酸素を発生することから、 窒素固定をどのように光合成と両立させているのかにつ いての視点は、窒素固定研究でも独特の位置づけとなる.

L. boryanaを用いた窒素固定研究が開始される以前は、 シアノバクテリアの窒素固定に関する分子生物学的知見 は主に2種のヘテロシスト形成種Anabaena sp. PCC 7120 および Trichormus variabilis ATCC 29413 (旧名 Anabaena variabilis ATCC 29413) での実験結果に基づくものであっ た. Anabaena sp. PCC 7120では、栄養細胞からヘテロシス トへの分化は、グローバルな窒素制御タンパク質NtcAに よる窒素欠乏シグナル感知, ヘテロシスト分化特異的な 制御タンパク質HetRとの共同的な制御により初期および 中期応答性遺伝子群が活性化され、その中にnif遺伝子の 転写を活性化する転写制御タンパク質が誘導されて、へ テロシスト分化と窒素固定生育が可能となると想定され ていた.このため、nif遺伝子の転写活性化には、NtcA、 その活性化因子PipX、シグマ因子SigEが関わると考えら れていた (Flores et al. 2015). L. boryanaはヘテロシストを 形成しないことから、よりシンプルにnif遺伝子の転写制 御に焦点を当てた研究が可能である. L. boryanaを使った 研究の初期に、葉緑体ゲノムのfrxCのオルソログ遺伝子 のクローニングと合わせてnifHを含む3.4 kb HindIII断片の



図3: L. boryanaの窒素固定生育

窒素欠乏培地と硝酸栄養培地プレートの左側に L. boryana dg5, 右側に非窒素固定種Synechocystis sp. PCC 6803 を接種し、嫌気 および好気条件,連続光、30℃で1週間培養した.窒素欠乏培 地において好気条件下では両種が窒素欠乏による生育不良を示 すのに対し (C)、嫌気条件下では L. boryana は窒素固定により 良好に生育する (A). 硝酸栄養培地では嫌気/好気条件の違いで 大きな差は見られない(B, D).

クローニングも行っていた (Fujita et al. 1991). この断片 には、nifHのすぐ下流にnifDが見つかっており、この断片 の前後には他のnif遺伝子群が存在すると期待された.L. boryanaを使った窒素固定研究を開始するに当たって、ま ずnifH周辺の遺伝子解析を実施した. nifHの上流とnifDの 下流に向けた遺伝子ウォーキングの結果, nifHDを含む約 50 kbにわたって多数のnifおよびnif関連遺伝子が集中的に コードされていることが判明し、これをnif遺伝子クラス ターと名付けた (Tsujimoto et al. 2014). この50-kb nif遺伝 子クラスターには、ニトロゲナーゼの構造遺伝子nifHDK とニトロゲナーゼの金属クラスター生合成に関わる遺伝 子群を始め、フェレドキシン遺伝子、シトクロムc酸化酵 素遺伝子、モリブデン輸送体遺伝子、嫌気代謝に関わる 遺伝子など50個の遺伝子が含まれていた.その中に、転 写制御タンパク質をコードする遺伝子patBが見つかった. patBは, Anabaena sp. PCC 7120で変異が生じるとヘテロシ ストの形成パターンが異常になる遺伝子として報告され ていた (Jones et al. 2003) が, ヘテロシストを形成しないL. boryanaでの機能には興味がもたれた. patB欠損株 (ΔpatB) を単離したところ窒素固定生育能が失われ, ニトロゲナー ゼ活性は全く検出されず, すべてのnif遺伝子群の転写物 が検出できなかった. patBをシャトルベクター pPBH202 を使ってΔpatBで大量発現させると, 硝酸イオン存在下で もnif遺伝子群が発現しニトロゲナーゼ活性が検出された. これらの結果から, PatBタンパク質がnif遺伝子群の転写 を活性化するマスターレギュレーターであることが判明 した. patBは窒素固定シアノバクテリアに普遍的に保存さ れていることから, この機能に基づき, patBという名称を cnfR (cyanobacterial nitrogen fixation regulator) とすることを 提案した (Tsujimoto et al. 2014).

8. 窒素固定生育・ニトロゲナーゼ活性測定法

L. boryanaの窒素固定は、嫌気条件に限定されており、 窒素固定で生育させるためにも、窒素固定を評価するニ トロゲナーゼ活性にも嫌気的条件を必要とする. 最後に, L. boryanaを使った窒素固定生育とニトロゲナーゼ活性の測 定法を紹介する (Tsujimoto et al. 2014; Nonaka et al. 2019).

8-1 窒素固定生育

BG-11寒天培地にて好気条件で光合成的に生育させたL. boryana IAM M-101およびdg5を,硝酸イオン・アンモニウ ムイオンを含まないBG-11寒天培地(BG-11₀)に接種する. この寒天培地を透明なプラスチックボックス(アネロパッ ク角型ジャー,三菱ガス化学)に入れ,酸素を除去するた めのパウチ(アネロパック・ケンキ10%,三菱ガス化学)を 開封してボックスに入れ,直ちに密閉する.約30分でボッ クス内の酸素レベルはほぼ0に達する.ボックス内の酸素 レベルが十分低下したかどうかは、メチルビオローゲン が塗布された短冊片(GasPak[™] Anaerobic Indicator Strips, BD)が青から白色に変化したことで確認する.ボックス を光照射下でインキュベートすると5~7日程度で明瞭な 窒素固定生育が認められる(図3).

8-2 ニトロゲナーゼ活性測定

窒素固定により生成されるアンモニアは細胞内で速や かに同化されるため、アンモニア生成量の測定による窒 素固定活性の評価は容易ではない。分子状窒素のニトロ ゲナーゼによる固定量を直接測定したい場合には安定同 位体¹⁵N₂の取り込み実験を行う必要があるが、取り込みに 時間がかかることや感度の低さ、安定同位体ガスが高額



図4:スラント培地を用いたアセチレン還元活性の経時的測定 バイアル内で固化させた窒素欠乏培地(BG-11₀)に*L. boryana*を 接種し、通気可能な発泡シリコン製キャップで蓋をする.バイ アルを嫌気処理用の角型ジャー入れ、嫌気・30℃・連続光条件 で培養する(A, C).アセチレン還元活性を測定する際には嫌気 チャンバー内で発泡シリコン製キャップをシリコンセプタムに 付け替え、アルミシールで固定する(B, D).培養開始1週間後(C, 培養用に発泡シリコン製キャップを装着)と3週間後(D,活性測 定用にシリコン製セプタムを装着)を比較すると、窒素欠乏培 地上でも窒素固定により旺盛に生育していることがわかる.

であるといった要因がネックとなる.そこで,ニトロゲ ナーゼがアセチレンを基質としてエチレン生成する性質 を利用し,アセチレン還元活性を測定することでニトロ ゲナーゼの活性を見積もる手法が適用されている.ここ では本研究室で使っている3つの方法を紹介する.

8-2-1 窒素固定能誘導直後の高いニトロゲナーゼ活性の 検出

BG-11寒天培地にて好気条件で光合成的に生育させたL. boryanaの細胞を滅菌水に懸濁し、一定量(OD₇₃₀ 5.0の懸 濁液 1 ml)をBG-11₀寒天培地の中央部に滴下する.寒天培 地に液体を完全に染み込ませたのち、上述のように嫌気 条件に移し(アネロパック・ケンキ10%を入れた専用角型 ジャー),光照射下で16~20hインキュベートすることで、 nif遺伝子群の発現を誘導する.嫌気チャンバーにシャー レを持ち込み,L.boryanaの細胞を少量(1 ml)のBG-11₀液 体培地で懸濁し、ガラスバイアル(30 ml)に回収する.バ イアルをブチルゴム製セプタムで密閉してアルミシール で固定し、嫌気チャンバーから持ち出す.ニトロゲナー ゼ活性を高めて安定化させるために要時調製した0.5 M ジ チオナイト10µlを添加する.アセチレン混合ガス(10% ア セチレン-90% アルゴン)をシリンジで10秒間パージする ことでバイアル内の気相を完全にアセチレン混合ガスに



図5:液体通気培養における経時的なニトロゲナーゼ活性測定 液体培養で生育中の L. boryana のアセチレン還元活性を測定す るためには、空気(酸素)を混入させることなく培養液を採取す る必要がある.液体培養管に挿入したパスツールピペットの上 部を小さなシリコン栓で密閉しサンプリング管とした(A).こ のシリコン栓に針を刺しシリンジで培養液を採取する(B).な お、採取に用いるシリンジはあらかじめ窒素ガスなどで内部の 空気を置換しておく.

置換し、30分間、光照射下でインキュベートする. バイア ルを氷上にて遮光することで活性を停止させ、一定量の 気相をガスクロマトグラフにロードし、エチレン生成量 を分析する. 嫌気チャンバーの使用法は文献(野亦・藤田 2009)、ガスクロマトグラフの条件はTsujimoto et al. (2014) を参照してほしい.

8-2-2 窒素固定生育時の経時的なニトロゲナーゼ活性測 定方法

横向きに寝かせた50 ml ガラスバイアル内にBG-11₀寒天 培地 13 ml を流しいれて固めたスラント培地を作成し、滅 菌可能なシリコンセプタムで封じておく. このスラント 培地にL. boryanaを接種し、蓋を通気可能な発泡シリコ ン製キャップに交換してバイアルごと上述の角型ジャー に入れ、嫌気光合成条件で窒素固定的に生育させる(図 4A, C). 活性測定時には嫌気チャンバー内で発泡シリコ ン製キャップをシリコンセプタムに交換しアルミシール で固定した後(図4B, D), 上述の方法9-2-1でアセチレン 還元活性を測定する. この方法では、活性測定後も再度 嫌気チャンバー内でセプタムを滅菌済み発泡シリコン製 キャップに交換し、アネロパックと共に角型ジャーに密 閉して生育を継続させることができる. この方法により, ジチオナイトを添加しないより自然に近い状態でのニト ロゲナーゼ活性を、生育期間を通じて経時的に測定する ことができる.活性はバイアル単位での評価となる.詳

細は他菌種の事例ではあるが Uesaka et al. (2024) を参照さ れたい. 液体に容易に懸濁できない窒素固定種のニトロ ゲナーゼ活性測定にも有用な方法である.

8-2-3 液体通気培養における経時的なニトロゲナーゼ活 性測定方法

上述の方法8-2-1は寒天培地での培養による経時的な測 定法だったが、液体通気培養においても経時的な活性測 定が可能である.この方法では、通気液体培養サンプル から測定用の菌体を採取する際、空気(酸素)の混入を避 けるための工夫がなされている.液体培地での窒素固定 生育のためには、綿濾管や滅菌フィルターを介して窒素 と二酸化炭素の混合ガス (2% CO₂, 98% N₂)を通気して培 養する (図5A). この培養管にサンプリング用のガラス管 (管内の容積が小さくシリンジによる吸出しが容易なパス ツールピペットを使用)を増設し,小型のシリコン栓で開 口部を塞いでおく. このシリコン栓にシリンジの針を刺 し、嫌気的に培養液を吸い出して予め嫌気的に密閉して おいたガラスバイアルに注入する. こうして培養液を直 ちにアセチレン還元活性測定に供することが可能となる (図5B). サンプリング管の内部に培養液が残った場合は シリンジで窒素ガスを注入して追い出しておく.野生型 のL. boryana であればジチオナイト添加なしでアセチレン 還元活性が確認できるが、ジチオナイトを加えればより 高感度な活性の検出が可能となる.活性測定後に濁度や 細胞スペクトル,光合成/呼吸活性の測定や,mRNA や SDS-PAGEのためのタンパク質抽出に菌体を供することが 可能なので、窒素固定的に生育している細胞の経時的か つ多面的な評価が可能となる.

なお,培養時の光強度には注意を要する.L. boryanaでは, 光強度が高い条件では光合成による酸素発生が高まり窒 素固定が抑制される傾向がある.液体培養で窒素固定生 育させる場合は光合成と窒素固定が両立する光強度をあ らかじめ検討しておく必要がある.

9. 今後の展望

以上のように, L. boryanaは, クロロフィル生合成やヘ テロシストによらない窒素固定といった, 固有の特徴を 活用した研究材料とされてきたが, それほど広く活用さ れてはいない. ある意味, モデルと非モデルの中間的な 位置づけのシアノバクテリアと捉えられるかもしれない. 長期にわたる暗所従属栄養生育は, 他のシアノバクテリ アでは容易には実現がむずかしいユニークな実験系であ り,光合成が喪失していく進化過程を実際に追跡してい くことが可能である.暗所従属栄養条件で長期にわたり 植え継ぎを継続している系統も維持している(最長1993年 から).また,この能力をDPOR欠損株に応用することで, クロロフィル含量が極めて減少した黄化状態の細胞を作 り出すことができ,クロロフィル欠乏状態の細胞の生理 学・生化学,光照射により開始される緑化過程の詳細な 追跡,といった方向の研究展開が可能である.

L. boryanaを寒天培地で培養していると、時折、寒天培 地全体に広がっていく運動性を獲得した変異株が自発的 に出現することがある.このような運動性を獲得した変 異株の原因変異(ジグアニル酸シクラーゼをコードする *dgc2*遺伝子(LBDG_02920)への変異)や運動性の詳細な解 析も報告されており(Toida et al. 2023),糸状性シアノバク テリアの運動性に関する研究も本株の特徴を活かした研 究方向の一つである.

概日時計に関する研究において、最近、L. boryanaの KaiClとそのパラログKaiC2の生化学的解析が報告された (Matsukami et al. 2024).

窒素固定の研究では、最近、単細胞性の窒素固定シア ノバクテリアCyanothece sp. ATCC 51142でターゲット遺 伝子欠損株の単離の報告がある (Min and Sherman 2010; Liberton et al. 2019) が、今後もL. boryanaはヘテロシスト を作らないシアノバクテリアの実験系というユニークな 位置付けのモデルとしての活用が期待される.

謝辞

L. boryanaの従属栄養能に着目し、モデルシアノバクテ リアとして利用できるという慧眼をもたれていた高橋康 弘先生・松原央先生、Synechocystis sp. PCC 6803が広く活 用されている中にあって主宰研究室でL. boryanaをモデル シアノバクテリアとして活用していただいた長谷俊治先 生、L. boryanaを用いた研究の初期の頃から応援していた だいた小俣達男先生、概日リズム研究等にL. boryanaを活 用されている寺内一姫先生、窒素固定研究で貢献してい ただいた辻本良真博士、黄化緑化研究で貢献していただ いた加田茂樹博士、ゲノム解析で貢献していただいた平 出優人博士・井原邦夫先生・上坂一馬博士、そして、卒 研生、大学院生としてL. boryana研究に関わってきた多く の学生さんに感謝いたします.

本稿で紹介した研究の一部は、科研費24H02075, 22H19146, 18K19173及びCOI-NEXT(JPMJPF2102)の助 成を受けて実施されたものです.

参考文献

- Anderson, S.L. and McIntosh, L. (1991) Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. *J Bacteriol* 173: 2761-2767.
- Bergman, B., Gallon, J.R., Rai, A.N. and Stal, L.J. (1997) N₂ fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 19: 139-185.
- Flores, E., López-Lozano, A. and Herrero, A. (2015) Nitrogen fixation in the oxygenic phototrophic prokaryotes (Cyanobacteria): The fight against oxygen. In *Biological Nitrogen Fixation*. Edited by de Bruijn, F.J. pp. 879-889. John Wiley & Sons.
- Fujita, Y., Matsumoto, H., Takahashi, Y. and Matsubara, H. (1993) Identification of a *nifDK*-like gene (ORF467) involved in the biosynthesis of chlorophyll in the cyanobacterium *Plectonema boryanum. Plant Cell Physiol* 34: 305-314.
- Fujita, Y., Takagi, H. and Hase, T. (1996) Identification of the *chlB* gene and the gene product essential for the lightindependent chlorophyll biosynthesis in the cyanobacterium *Plectonema boryanum. Plant Cell Physiol* 37: 313-323.
- Fujita, Y., Takagi, H. and Hase, T. (1998) Cloning of the gene encoding a protochlorophyllide reductase: the physiological significance of the co-existence of light-dependent and -independent protochlorophyllide reduction systems in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Cell Physiol* 39: 177-185
- Fujita, Y., Takahashi, Y., Chuganji, M. and Matsubara, H. (1992) The *nifH*-like (*frxC*) gene is involved in the biosynthesis of chlorophyll in the filamentous cyanobacterium *Plectonema boryanum. Plant Cell Physiol* 81: 81-92.
- Fujita, Y., Takahashi, Y., Shonai, F., Ogura, Y. and Matsubara, H. (1991) Cloning, nucleotide sequences and differential expression of the *nifH* and *nifH*-like (*frxC*) genes from the filamentous nitrogen-fixating cyanobacterium *Plectonema borynaum. Plant Cell Physiol* 32: 1093-1106.
- Grobbelaar, N., Huang, T.C., Lin, H.Y. and Chow, T.J. (1986) Dinitrogen-fixing endogenous rhythm in *Synechococcus* RF-1. *FEMS Microbiol Lett* 37: 173-177.
- Hida, S., Nishio, M., Uesaka, K., Banba, M., Takatani, N.,Takaichi, S., et al. (2024) Microevolution toward loss of photosynthesis: Mutations promoting dark-heterotrophic growth and suppressing photosynthetic growth in

cyanobacteria. *BioRxiv*: doi.org/10.1101/2024.1104.1108.588 626.

- Hiraide, Y., Oshima, K., Fujisawa, T., Uesaka, K., Hirose, Y., Tsujimoto, R., et al. (2015) Loss of cytochrome c_M stimulates cyanobacterial heterotrophic growth in the dark. *Plant Cell Physiol* 56: 334-345.
- Hirose, Y., Ohtsubo, Y., Misawa, N., Yonekawa, C., Nagao, N., Shimura, Y., et al. (2021) Genome sequencing of the NIES Cyanobacteria collection with a focus on the heterocystforming clade. *DNA Res* 28: 1-11.
- Jones, K.M., Buikema, W.J. and Haselkorn, R. (2003) Heterocyst-specific expression of *patB*, a gene required for nitrogen fixation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. J Bacteriol 185: 2306-2314.
- Kada, S., Koike, H., Satoh, K., Hase, T. and Fujita, Y. (2003) Arrest of chlorophyll synthesis and differential decrease of Photosystems I and II in a cyanobacterial mutant lacking light-independent protochlorophyllide reductase. *Plant Mol Biol* 51: 225-235.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C.P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., et al. (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res* 8: 205-213.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., et al. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* 3: 109-136.
- Kimata-Ariga, Y., Matsumura, T., Kada, S., Fujimoto, H., Fujita, Y., Endo, T., et al. (2000) Differential electron flow around photosystem I by two C4-photosynthetic-cell-specific ferredoxins. *EMBO J* 19: 5041-5050.
- Komárek, J., Kastovsky, J., Mares, J. and Johansen, J.R. (2014) Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86: 295-335.
- Liberton, M., Bandyopadhyay, A. and Pakrasi, H.B. (2019) Enhanced nitrogen fixation in a *glgX*-deficient strain of *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142, a unicellular nitrogenfixing cyanobacterium. *Appl Environ Microbiol* 85: e02887-18.
- Masuda, S. and Bauer, C.E. (2004) Null mutation of HvrA compensates for loss of an essential *relA/spoT*-like gene in

Rhodobacter capsulatus. J Bacteriol 186: 235-239.

- Matsukami, Y., Oyama, K., Azai, C., Onoue, Y., Fujita, Y. and Terauchi, K. (2024) KaiC family ATPases in the nonheterocystous nitrogen-fixing cyanobacterium *Leptolyngbya boryana. Sci Rep* 14: 30949.
- Min, H. and Sherman, L.A. (2010) Genetic transformation and mutagenesis via single-stranded DNA in the unicellular, diazotrophic cyanobacteria of the genus *Cyanothece*. *Appl Environ Microbiol* 76: 7641-7645.
- Misra, H.S. and Tuli, R. (2000) Differential expression of photosynthesis and nitrogen fixation genes in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Physiol* 122: 731-736.
- Mitsui, A., Kumazawa, S., Takahashi, A., Ikemoto, H., Cao, S. and Arai, T. (1986) Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photosynthetically. *Nature* 323: 720-722.
- Nagatani, H.H. and Haselkorn, R. (1978) Molybdenum independence of nitrogenase component synthesis in the nonheterocystous cyanobacterium *Plectonema*. J Bacteriol 134: 597-605.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Mimuro, M., Miyashita, H., Tsuchiya, T., et al. (2003) Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA Res* 10: 137-145.
- Nonaka, A., Yamamoto, H., Kamiya, N., Kotani, H., Yamakawa, H., Tsujimoto, R., et al. (2019) Accessory proteins of the nitrogenase assembly, NifW, NifX/NafY, and NifZ, are essential for diazotrophic growth in the nonheterocystous cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. Front Microbiol 10: 495.
- Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., et al. (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322: 572-574.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. and Stanier, R.Y. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111: 1-61.
- Schrautemeier, B., Cassing, A. and Böhme, H. (1994) Characterization of the genome region encoding an *fdxH*type ferredoxin and a new 2[4Fe-4S] ferredoxin from the nonheterocystous, nitrogen-fixing cyanobacterium *Plectonema boryanum* PCC 73110. *J Bacteriol* 176: 1037-1046.

- Schwechheimer, C. and Kuehn, M.J. (2015) Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol* 13: 605-619.
- Shih, P.M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S.D., Fewer, D.P., Talla, E., et al. (2013) Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 1053-1058.
- Solymosi, D., Nikkanen, L., Muth-Pawlak, D., Fitzpatrick, D., Vasudevan, R., Howe, C.J., et al. (2020) Cytochrome $c_{\rm M}$ decreases photosynthesis under photomixotrophy in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol* 183: 700-716.
- Stal, L.J. and Zehr, J.P. (2008) Cyanobacterial nitrogen fixation in the ocean: Diversity, regulation, and ecology. In *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*, Edited by Herrero, A. and Flores, E. pp. 423-446. Caister Academic Press.
- Stewart, W.D. and Lex, M. (1970) Nitrogenase activity in the blue-green alga *Plectonema boryanum* strain 594. Arch Mikrobiol 73: 250-260.
- Suzuki, J. and Bauer, C. (1992) Light-independent chlorophyll biosynthesis: involvement of the chloroplast gene *chlL (frxC)*. *Plant Cell* 4: 929-940.
- Terauchi, K., Katayama, M., Fujita, Y. and Kondo, T. (2005) Circadian rhythm of the facultative cyanobacterium *Plectonema boryanum*. In *Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives*. Edited by van der Est, A. and Diner, B. pp. 729-730. Allen Press.
- Toida, K., Kushida, W., Yamamoto, H., Yamamoto, K., Ishii, K., Uesaka, K., et al. (2023) The GGDEF protein Dgc2 suppresses both motility and biofilm formation in the filamentous cyanobacterium. *Microbiol Spectr* 11: e0483722.
- Tomatsu, C., Uesaka, K., Yamakawa, H., Tsuchiya, T., Ihara, K. and Fujita, Y. (2018) *In vivo* transposon tagging in the nonheterocystous nitrogen-fixing cyanobacterium *Leptolyngbya boryana. FEBS Lett* 592: 1634-1642.
- Tsujimoto, R., Kamiya, N. and Fujita, Y. (2014) Transcriptional regulators ChIR and CnfR are essential for diazotrophic growth in nonheterocystous cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 6762-6767.
- Tsujimoto, R., Kotani, H., Nonaka, A., Miyahara, Y., Hiraide, Y. and Fujita, Y. (2015) Transformation of the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana* by electroporation. *Bio-protocol* 5: e1690.
- Uesaka, K., Banba, M., Chiba, S. and Fujita, Y. (2024)

Restoration of the functional *nif* gene cluster by complex recombination events during heterocyst development in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Calothrix* sp. NIES-4104. *Plant Cell Physiol.* 65: 1050-1064.

- Usui, K., Yamamoto, H., Mori, H. and Fujita, Y. (2025) Extracellular vesicle-mediated secretion of chlorophyll biosynthetic intermediates in the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana. Plant Cell Physiol.* 66: 214-228.
- Usui, K., Yamamoto, H., Oi, T., Taniguchi, M., Mori, H. and Fujita, Y. (2022) Extracellular vesicle-mediated secretion of protochlorophyllide in the cyanobacterium. *Plants (Basel)* 11: 910.
- Walton, D., Gendel, S. and Atherly, A. (1993) DNA sequence and shuttle vector construction of plasmid pGL3 from *Plectonema boryanum* PCC 6306. *Nucleic Acids Res* 21: 746.
- Watabe, K., Mimuro, M. and Tsuchiya, T. (2014) Development of a highly-frequent *in vivo* transposon mutagenesis system for *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* 55: 2017-2026.
- White, A.W. and Shilo, M. (1975) Heterotrophic growth of the filamentous blue-green alga *Plectonema boryanum*. Arch. *Microbiol.* 102: 123-127.
- Yamamoto, H., Kojima-Ando, H., Ohki, K. and Fujita, Y. (2020) Formation of prolamellar-body-like ultrastructures in etiolated cyanobacterial cells overexpressing light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in *Leptolyngbya boryana*. *J Gen Appl Microbiol* 66: 129-139.
- Yamamoto, H., Kurumiya, S., Ohashi, R. and Fujita, Y. (2009) Oxygen sensitivity of a nitrogenase-like protochlorophyllide reductase from the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Plant Cell Physiol* 50: 1663-1673.
- Yamamoto, H., Kurumiya, S., Ohashi, R. and Fujita, Y. (2011) Functional evaluation of a nitrogenase-like protochlorophyllide reductase encoded by the chloroplast DNA of *Physcomitrella patens* in the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana. Plant Cell Physiol* 52: 1983-1993.
- Yamamoto, H., Kusumi, J., Yamakawa, H. and Fujita, Y. (2017) The effect of two amino acid residue substitutions via RNA editing on dark-operative protochlorophyllide oxidoreductase in the black pine chloroplasts. *Sci Rep* 7: 2377.
- Yamazaki, S., Nomata, J. and Fujita, Y. (2006) Differential operation of dual protochlorophyllide reductases for chlorophyll biosynthesis in response to environmental oxygen levels in the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Plant*

Physiol 142: 911-922.

- Zeng, X. and Zhang, C.C. (2022) The Making of a Heterocyst in Cyanobacteria. *Annu Rev Microbiol* 76: 597-618.
- 藤田 (2013)「私の論文」No. 11. pp. https://photosyn.jp/ column-mypub_11.php.
- 藤田,野亦 (2009) 嫌気条件下でのタンパク質精製. In 低温 科学 67巻「光合成研究法」 pp. 423-427.
- 須田, Hutabarat, Handung, 上原 (2022) シアノバクテリア/ ラン藻の分類の現状と今後 *漢類* 70: 13-23.

紅色進化系統藻類の光捕集複合体 I :構造多様化の進化メカニズム

熊沢 穣¹⁾, 伊福 健太郎¹⁾

2024年12月31日受付, 2025年1月6日受理

水圏の光合成の約半分を担う紅色進化系統藻類は、紅藻からクリプト藻、不等毛藻、ハプト藻へと 細胞内共生を通じて色素体が伝播する過程で、光捕集システムが多様な進化を遂げた.とりわけ光化 学系I (PSI)に結合する光捕集複合体 (LHCI)は、各系統で特徴的な構造を持つ.我々は、クライオ電 子顕微鏡の構造解析データと分子系統解析により、同一、もしくは遺伝子重複と分化によって生じた LHC分子が複合体の新しい位置に結合する「Neolocalization」という現象を見出した.この現象は、極限 環境への適応や細胞内共生を経験した藻類において顕著であり、多様な光環境への適応において重要 であると考えられる.

Light-Harvesting Complex I in Red-Lineage Algae : Evolutionary Mechanisms of Structural Diversification

Minoru Kumazawa¹, Kentaro Ifuku¹

Red-lineage algae, which account for about half of the oceanic photosynthesis, have undergone diverse evolutionary trajectories in their light-harvesting systems as plastids have spread from red algae through endosymbiotic events to cryptophytes, heterokonts, and haptophytes. In particular, the light-harvesting complex I (LHCI) associated with photosystem I (PSI) shows distinctive structural characteristics in each lineage. We combined the structural data from cryo-electron microscopy analyses with molecular phylogenetic analyses and revealed that neolocalization—a phenomenon in which identical or duplicated and differentiated LHC molecules bind to new positions within the complex—serves as a crucial evolutionary mechanism driving this diversification. This phenomenon is particularly pronounced in algae that have adapted to extreme environments or have undergone endosymbiotic events, suggesting its role as a key evolutionary mechanism for adaptation to diverse light environments.

キーワード:紅色進化系統藻類,光捕集タンパク質LHC,複合体進化,細胞内共生, co-option Red-lineage algae, Light-harvesting complex (LHC), Molecular complex evolution, endosymbiosis, co-option.

1. はじめに

全球の一次生産の約半分を占める水圏の光合成を担う 生物は、主に藻類と呼ばれる生物群である (Field et al.,

連絡先
 伊福 健太郎
 京都大学大学院農学研究科
 〒 606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町
 Tel: 075-753-6109
 Email: ifuku.kentaro.2m@kyoto-u.ac.jp

1998). 藻類は分類・系統的には多様なグループの総称で あり, 原核生物であるシアノバクテリアと真核生物の多様 な分類群に分けられる. 真核藻類は, 紅藻, 緑藻, 灰色藻, クリプト藻, 珪藻や褐藻などの不等毛藻, ハプト藻, 渦鞭

 京都大学大学院農学研究科 Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan



図1:主な紅色進化系統藻類の細胞内共生による色素体と核ゲノムコード遺伝子の推定伝播過程 実線の矢印は構造体としての色素体及び色素体ゲノムの伝播を表し、破線の矢印は核ゲノムコード遺伝子の伝播 を表す.矢印の近くに表示した引用がそれぞれの伝播を主張及び支持する文献である.色素体を囲う膜の数は図 中の一本線で実際の二重膜を表す.渦鞭毛藻およびアルベオラータのクロメラに関してはこの図には含まれない.

毛藻,クロメラなどを含んでいる. 真核藻類をめぐる進化 で最も興味を引き立てる点の一つがその色素体(葉緑体) の成立過程であるが,これまで謎に包まれてきた.本稿で は、真核藻類,特に紅藻やクリプト藻,不等毛藻,ハプト 藻などの紅色進化系統藻類において,光エネルギーを効率 的に集めて光合成に利用する光化学系-光捕集色素-タンパ ク質複合体の進化を議論する. はじめに真核藻類の色素体 の成立過程について,近年の研究を紹介する.

紅色進化系統藻類の色素体獲得と 進化シナリオの現状

真核藻類においては幾度に渡って細胞内共生イベント が起こった.これらのイベントの結果,さまざまな系統に 葉緑体が伝播し,多様な光合成生物群が形成された.初 めに,太古の真核生物がシアノバクテリアを取り込み, 細胞内共生を通じてオルガネラ化した(一次)葉緑体を 獲得した(Delwiche, 1999).こうして成立した藻類を一 次共生藻類と呼ぶ.これらの藻類は,アーケプラスチダ (Archaeplastida)と呼ばれる分類に含まれる.それらは紅 藻類(Rhodophyta),緑色植物(Viridiplantae:緑藻類および 陸上植物),および灰色藻(Glaucophyta)を含み,紅藻が 最も初期にこれらのうちから分岐したとされる(Irisarri et al., 2021).これ以外の真核藻類は二次共生藻類と総称され, 一次共生藻類がさらに他の真核生物に,二次あるいはそれ 以上の多次の細胞内共生をすることで,葉緑体が伝播して 生じたとされる.例えば,紅藻類に由来する葉緑体を獲得 した二次共生藻類は紅色進化系統二次共生藻類と呼ばれ, 現代の海洋で優占する珪藻類やハプト藻類などの重要な海 洋生物群を含む (Croce and van Amerongen, 2020; Yoon et al., 2002b). これらの藻類は,石油の主な起源生物であるだけ でなく,ドーバー海峡に見られる何kmにもわたる石灰岩 の起源でもあり,太古の昔から地球環境を支えている生 物である.また,次世代の生物資源として期待されるユー グレナ藻やクロララクニオン藻類は,緑藻の細胞内共生に よって葉緑体を獲得したため,緑色進化系統二次共生藻類 と呼ばれる.

紅色進化系統藻類の二次以上の細胞内共生の進化過程 については、長年議論されており、未だ完全に統一された 見解は得られていない.しかしながら、近年、核ゲノムに コードされた遺伝子(核コード遺伝子)と色素体ゲノムに コードされた遺伝子(色素体コード遺伝子)の系統解析な どから、ようやくその全体像が少しずつ見えてきた(図1) (Penot et al., 2022; Sibbald and Archibald, 2020).本稿では紙 面の制約のため、渦鞭毛藻やクロメラ等については詳細を 取り扱わない.

まず,紅色進化系統藻類の色素体の伝播のうち,確実 とされている点は次の2点である.i) クリプト藻が有する 色素体は,縮退したゲノムを有する痕跡器官(ヌクレオモ ルフと呼ばれる)を伴っており,これは共生体の核に由 来する.ii) 色素体ゲノム遺伝子を利用した系統樹におい てもクリプト藻の色素体は紅藻亜門と姉妹群を形成する (Curtis et al., 2012; Yoon et al., 2002b).従って,クリプト藻 の色素体は紅藻に直接由来したものと考えられている. 一方で、クリプト藻以外の不等毛藻やハプト藻について は、その色素体の起源に関連する情報は非常に複雑である。 色素体ゲノム遺伝子の分子系統樹では、紅色進化系統二次 共生藻類は紅藻亜門と姉妹群の単系統を示し、そのクレー ド内では不等毛藻がまず分岐し、クリプト藻とハプト藻の 単系統のクレードと姉妹群を形成する(Kim et al., 2017). そして、クリプト藻とハプト藻の色素体ゲノムは、*Rpl36* と呼ばれる遺伝子が紅藻や不等毛藻と異なる起源を有す ることから、お互いに近縁性が示唆されている(Rice and Palmer, 2006). これらの事実から、ハプト藻の色素体はク リプト藻の色素体に直接由来すると考えられる(Bodył et al., 2009).

ハプト藻の色素体の由来が色素体ゲノムから示された のとは対照的に、不等毛藻の色素体の伝播過程は、核ゲ ノムにコードされたタンパク質の遺伝子から推定された. 即ち、網羅的な相同性検索の結果から、大規模な核コー ド遺伝子の移入がクリプト藻から不等毛藻へ、不等毛藻 からハプト藻へ生じたことが示されている (Stiller et al., 2014). この結果は、色素体ゲノム遺伝子の分子系統解析 において、クリプト藻/ハプト藻と不等毛藻の分岐が紅藻 から分岐した後に生じたとする結果と矛盾しない (Kim et al., 2017). さらに、核コードの遺伝子のうち、色素体 に移行するタンパク質の遺伝子に着目すると,不等毛藻, 特にその中でもディクチオカ藻とペラゴ藻に由来した遺 伝子が多くハプト藻に存在することが判明した (Dorrell et al., 2017). しかしながら、ハプト藻において、不等毛藻 から伝播した核コード色素体移行タンパク質遺伝子がク リプト藻由来の色素体の獲得の前に存在したのか、ある いはその後に獲得されたのかは不明である. また、その 伝播が細胞内共生によるのか、包摂した藻類を一定期間 細胞内に留めおく盗葉緑体のような現象によるのかも未 解明な点である (Bodył, 2018).

上記のシナリオには対立する仮説も存在するが、それ らは全体として整合性が取れないことからあまり支持され ていない.例えば、色素体ゲノム遺伝子の分子系統樹の樹 形は、非常に近縁な別の紅藻種が、それぞれ別の分類群 の宿主に独立して細胞内共生し、多様な二次共生藻類を生 じた可能性を否定しない.しかしながら、紅色進化系統二 次共生藻類は、いずれも細胞質から複数の膜で包まれた色 素体へのタンパク質の輸送に、紅藻にはなくクリプト藻 に起源を持つとされるSELMAと呼ばれる共通したトラン スロコン複合体を利用し、SELMAが不等毛藻やハプト藻 類でも独立して誕生したとは考えにくい (Kim et al., 2017; Zimorski et al., 2014).図1は、現時点での情報をもとに紅 色進化系統藻類の色素体と核コードで色素体に移行するタンパク質遺伝子の由来を考慮して,主な紅色進化系統藻類の細胞内共生による遺伝子の推定伝播過程を示したものである.ただし,この図で示したパターンに当てはまらない遺伝子の伝播も提案されており (Dorrell et al., 2021, 2017), 藻類の遺伝子の由来を考える際には,頻繁な水平伝播や細胞内共生を通した伝播を念頭においた上で,個々に丁寧な分子系統解析を行うことが重要である.

紅色進化系統藻類の光合成システムと光 捕集複合体の多様性

3.1 紅色進化系統藻類における光合成電子伝達系の概略

光合成では、光エネルギーがクロロフィル (Chl) やカロ テノイドの光捕集色素によって吸収され、その励起エネル ギーが光化学系複合体の反応中心Chlに伝わって電荷分離 を引き起こすことで、化学エネルギーが生成する. こうし て得られた化学エネルギー,ここでは還元力(電子)がチ ラコイド膜に存在する複合体間で伝達される.より具体的 には、葉緑体のチラコイド膜には2種類の光化学系 (PS), PSIIとPSIが存在し、シトクロム (Cyt) b₆fがこれらを電気 化学的に連結している. PSIIとCyt b。fの間は、チラコイド 膜中のプラストキノンの酸化還元によって電子は受け渡 される. 一方, Cyt b₆fからPSIへは, 陸上植物ではチラコ イド膜内腔に存在する銅イオンを補因子とするプラストシ アニンによって電子は運ばれる.しかし、紅色進化系統藻 類の不等毛藻である珪藻の多くの系統では、プラストシア ニンを有しておらず、その代わりにヘム鉄を補因子に有 するCyt c₆を利用している (Ban et al., 2023; Groussman et al., 2015). 典型的なCyt c₆は、シアノバクテリア、緑藻、紅藻 を含む紅色進化系統藻類に保存されるが、陸上植物には 存在しない (Slater et al., 2021). PSIで生成された電子は, フェレドキシンを介して様々な生体反応に還元力を供給す る。その代表的なものがカルビン・ベンソン・バッシャム (CBB)回路と呼ばれる炭素固定反応である。また、陸上 植物や緑色進化系統藻類の多くは、還元型フェレドキシン からプラストキノンに電子を還流させる循環的電子伝達系 路と呼ばれる機構を有するが、紅色進化系統藻類ではその 存在は明確にされていない.

3.2 紅色進化系統藻類の光捕集システム

光合成生物の多くは2種類の光化学系の周辺に光捕集色 素-タンパク質複合体を有し、捕集した光エネルギーを励 起エネルギー移動によって光化学系反応中心に伝達する

(Croce and van Amerongen, 2020). この光捕集複合体は光 捕集アンテナとも呼ばれる.シアノバクテリアではビリ ン色素を結合した膜表在性の光捕集アンテナであるフィコ ビリソームをPSIIのストロマ側に結合しており、その詳細 な立体構造も近年明らかにされた (X. Zhang et al., 2024). 真核藻類では、紅藻類は、PSIIの光捕集アンテナとして フィコビリソームを持ち、PSIの周囲にはチラコイド膜内 に平面的に配置された3回膜貫通型の光捕集色素タンパ ク質複合体 (Light-harvesting complex; LHC) を持っている (Marquardt and Rhiel, 1997; Pi et al., 2018; Wolfe et al., 1994; You et al., 2023). 灰色藻を除く他の真核藻類では、PSIIと PSIの両方の光捕集アンテナとしてLHCを用いているが、 クリプト藻においてはLHCに加えてルーメン側にフィコビ リタンパク質 (フィコビリソームではない)を有している (Rathbone et al., 2023; Spear-Bernstein and Miller, 1989). *‡* た、渦鞭毛藻は水溶性のChl a-ペリディニン結合タンパク 質を有しており、LHCに加えてこちらも光捕集に利用して いる (Haidak et al., 1966; Hofmann et al., 1996).

3.3 光合成色素の多様性

LHCは紅藻類と緑藻類,陸上植物,紅色進化系統二次共 生藻類,緑色系統二次共生藻類,および渦鞭毛藻類にお いて光捕集アンテナとして機能しており,その結合する 光捕集色素として結合するChlとカロテノイドは非常に多 様である(Büchel, 2015; Koziol et al., 2007).紅藻はChl aと β-カロテンを共通して持ち,さらにLHCにはChl aに加え, ゼアキサンチンやルテインが結合している.ウシケノリ 綱(Bangiophyceae)と多くの真正紅藻綱(Florideophyceae) は上記に加え,主にα-カロテンを有しており,それ以外 の綱の紅藻の一部はアンテラキサンチンも有している (Takaichi et al., 2016).なお,β-カロテンはほとんどの真核 藻類の光化学系の反応中心複合体(コア)に存在するため, 以降の記載ではβ-カロテンについては省略する.

紅色進化系統二次共生藻類では、クリプト藻はChl aに 加え、Chl c₂を有するのが特徴であり、カロテノイドは主 にアロキサンチンを有している (Ingram and Hiller, 1983; Pennington et al., 1985). ほとんどの系統の不等毛藻はChl a に加えて、Chl cも有するが、どのChl cを有するかは分類 群ごとに多様性があり、区別して調べられていない系統も ある (Jinkerson et al., 2023). 不等毛藻に属する珪藻はChl c₁とc₂を有しており、近い系統であるディクチオカ藻やペ ラゴ藻はそれらに加えてChl c₃も有している. 近年、不等 毛藻の中でも珪藻、ボリド藻/パルマ藻、ピングイオ藻、ディ クチオカ藻やペラゴ藻が属するDiatomistaと呼ばれる分類 群でこれらのChl c_{1.2}生合成酵素遺伝子が同定された(Jiang et al., 2023; Jinkerson et al., 2023). 一方で,不等毛藻のもう 一つの主要な分類群の一つであるChrysistaに属する藻類も Chl cを有するものの,このホモログ遺伝子を有していな いことから,まだ同定されていないChl c生合成遺伝子が 存在する可能性がある.

不等毛藻が有するカロテノイドは主にフコキサンチン である. Nannochloropsisなどの真正眼点藻類は例外的に フコキサンチンを有しておらず、バウケリアキサンチン (Vaucheriaxanthin) やビオラキサンチンを主要なカロテノ イドとして有している.ハプト藻はChlaに加えて、Chl c23を有し、多くの系統で19'-ヘキサノイルフコキサンチン を有している (Büchel, 2015; Jinkerson et al., 2023). また, Chl c2-MGDGを有することもその特徴である (Garrido et al., 2000). ハプト藻で最も初期に分岐したパブロバ亜綱に 属する藻類はChl c12を持ち, 19'-ヘキサノイルフコキサン チンを持たず、フコキサンチンを有していることから、ハ プト藻の中にもChl cとカロテノイドには多様性が存在す る (Kawachi et al., 2021; Zapata et al., 2000). フコキサンチ ンの生合成遺伝子群もまだ全てではないが同定が進んで おり、それらはChl c生合成遺伝子と同様に、不等毛藻の うちDiatomistaとハプト藻では保存されている一方で、不 等毛藻でもCrysistaでは保存されていないことから、異な る遺伝子産物でフコキサンチンを生合成していると考え られている (Bai et al., 2022; Cao et al., 2023). 渦鞭毛藻は Chl a, c₁とペリディニンを持つ種が多いが、色素体の由来 が多様であるため、珪藻やハプト藻に由来する色素体を 持つ種ではフコキサンチンを有する種もある (Jinkerson et al., 2023). 渦鞭毛藻の複雑な色素体の系譜については別 の総説などを参照されたい (Miyagishima, 2023; Yoon et al., 2002a).

紅色進化系統二次共生藻類に特徴的なChlとカロテノイ ドは主にLHCに結合している.これらのLHCは結合する 色素の種類を名前に取って、フコキサンチン-Chl a/c 結 合タンパク質 (FCP) などと呼ばれることも多い (Büchel, 2015).水圏の光環境は、水自体によって光が吸収される だけでなく、そこに存在する微細藻類や微粒子によっても 光は吸収・拡散されるため、陸上の光環境とは大きく異な る (Stomp et al., 2007).紅色進化系統二次共生藻類のLHC はChl aに加えてChl cとカロテノイド類を結合するが、こ のうち、Chl cとカロテノイド類は青緑色の光をより吸収 する特性を有しており、青緑色の光が優占する水中の光環 境に適応した光捕集を行い、海洋での繁栄を支えている.

3.4. 紅色進化系統LHCファミリーのサブファミリー

LHCを構成する色素の多様性に加えて、LHCの配列にも 多様性があり、LHCファミリー内で多数のサブファミリー を構成している.著者らは珪藻のLHCを含む網羅的な分子 系統解析の結果から、LHCのサブファミリーは珪藻におい ては6つ (Lher, Lhez, Lheq, Lhef, Lhex, および CgLher9 ホモログ) に分類されることを明らかとした (Kumazawa et al., 2022). また,他の不等毛藻のLHCにおいては,上記 の6つのサブファミリーに加えて, Red-shifted Chromera 光 捕集タンパク質 (Red-CLH) サブファミリーを加えた7つ に分類されることが報告されている(Kotabová et al., 2014; Umetani et al., 2018). また著者らは、紅藻はLhcrサブファ ミリーのみを有しており、クリプト藻はLhcrとLhczサブ ファミリーを有することも明らかとした (Kumazawa et al., 2022). 不等毛藻のLHCは, 真正眼点藻類や褐藻でRed-CLHを有する他は、6つのサブファミリーからなる. ハプ ト藻のLHCも珪藻などと同様に6つのサブファミリーから なる. 渦鞭毛藻の中でも初期のハプト藻の色素体を獲得し た分類にある種 (Heterocapsa circularisquama) では, 珪藻 やハプト藻と同様の6つのサブファミリーのうちLhcxサブ ファミリーだけ同定されなかった.ただし、1種のみのト ランスクリプトームから取得した遺伝子データセットを利 用したため、渦鞭毛藻におけるLhcxの存在を完全には否 定できない点は注意する必要がある (Shikata et al., 2019).

3.5. PSI-LHCI超複合体の構造多様性

近年、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析技術が向 上したことによって, 巨大な膜タンパク質複合体である 光化学系とLHCの超複合体 (PS-LHC) の立体構造が次々 に報告されており、紅色進化系統藻類のPSI-LHCIの立体 構造は、主要な分類群からそれぞれ少なくとも1種は構 造情報が存在している.以下に紅色進化系統藻類のPSI-LHCIの構造の解析例を代表的なPDBのIDとともにあげ る (図2). 紅藻では, Cyanidioschyzon merolae; 5ZGB (Pi et al., 2018), Cyanidium caldarium RK-1 (NIES-2137); 8WEY (Kato et al., 2024a), Porphyridium purpureum; 7Y5E (in situ のトモグラフィーから単粒子を選び構成されたフィコビ リソーム-PSII-PSI-LHCIの一部) (You et al., 2023) のPSI-LHCIが報告されている. クリプト藻では, Chroomonas placoidea; 7Y7B (Zhao et al., 2023), Rhodomonas salina; 8WM6 (S. Zhang et al., 2024) が報告されている. 不等毛 藻では珪藻のみで報告されており, Chaetoceros gracilis; 6L4U (Nagao et al., 2020; Xu et al., 2020), 6LY5 (Xu et al., 2020), Thalassiosira pseudonana; 8XLS (Kato et al., 2024b),



図2:紅色進化系統藻類のPSI-LHCI構造

PSI-LHCIの構造は、いずれもストロマ側の垂直方向から見下ろした状態で示した.それぞれの構造の下には由来する種と対応するPDB IDを付記した.PsaK (黄色),Psa28 (PsaRとも表記されることがある.シアン)を除き、PSIコアを緑色で表示し、RedCAPを赤色、Lhcrを橙色、Lhcqをマゼンタ、Lhcfを緑色、CgLhcr9ホモログをピンク、Lhcaを紺色、サブファミリーが同定されていないLHCを灰色で表した.ハプト藻PSI-LHCIは執筆時点でPDBのデータが公開されていなかったため、ここには含んでいない.

8ZEH (Feng et al., 2024) である. ハプト藻では*Isochrysis* galbana; 8Z11 (He et al., 2024) である. 渦鞭毛藻では, *Symbiodinium* sp.; 8JJR (Zhao et al., 2024), 8JZE (Li et al., 2024), *Amphidinium carterae*; 8JW0 (Li et al., 2024) である. これらのPSI-LHCIにおけるLHCIの分子集合様式は非常に 多様である (図2).

LHCファミリー遺伝子は全て藻類で一貫して核コードで あり、光化学系タンパク質をコードする遺伝子の多くは色 素体ゲノムコードである、3回膜貫通のLHCファミリーと 共通の祖先に由来すると考えられる1回膜貫通タンパク質 のOHP (one-helix protein) も、真核藻類の核ゲノムにコー ドされている.さらに、LHCやOHPを含むLHCスーパーファ ミリー内には、3回膜貫通型タンパク質だがLHCファミリー とは姉妹系統として進化的に別個に成立し、紅色進化系統 のLHCIを構成するRedCAPも含まれ、核ゲノムにコードさ れている (Engelken et al., 2010; Sturm et al., 2013). 前章で



図3:紅藻PSI-LHCIの推定される進化過程

LHCIの立体構造上の位置 (p0からp7) はP. purpureum PSI-LHCI 構造モデルの付近に表した. 推定された最終共通祖先紅藻PSI-LHCIと, ガルディエラのPSI-LHCIは, P. purpureumのPSI-LHCI 構造モデルに基づいて描かれている. Psa28 (別名PsaR) を除く PSIコアサブユニットは緑色で, Psa28はシアンで示している. RedCAPは赤色で, LHCI中のLhcrは橙色で示している. Lhcrグ ループの番号は, それぞれの推定モデル上に示している.

紹介したように,核コードで色素体に移行するタンパク質 の大半は細胞内共生によって生物間で伝播されてきた.な お,盗葉緑体に代表される一時的な細胞内共生においても, 同様な遺伝子の水平伝播は起こったと考えられる.LHCを コードする遺伝子も例外ではなく,なんらかの細胞内共生 の過程で水平伝播し,それぞれの系統で特徴的なLHCIを 形成したと考えられる.

4. 保存性と多様性から見る 紅色進化系統LHCIの分子進化

次に紅藻門の内部と、紅藻からクリプト藻への色素体の 伝播におけるLHCIの保存性と多様性及びその進化過程の 推定を、著者らの論文から紹介する(Kumazawa and Ifuku, 2024).緑色系統藻類のLHCにおいて、分子系統解析が示 すオルソロガスな関係と複合体における位置構造から進 化を推定する試みは2010年にすでに行われていた(Neilson and Durnford, 2010).しかしながらその時点では、陸上植 物のPSI-LHCIの立体構造がX線結晶構造解析によってよう やく明らかにされたところであり,緑色進化系統でも立体 構造情報が十分ではなかった (Amunts et al., 2007). その後, 多くの種のPSI-LHCI立体構造が報告されたが,紅色進化 系統のLHCIの複合体進化の推定は,立体構造上の位置の みに基づいた議論が行われており,正確な推定が行われ ていなかった (Bai et al., 2021; Zhao et al., 2023). 著者らは Neilson and Durnford (2010)のアプローチを参考に,紅色進 化系統藻類のLHCのうち,紅藻とクリプト藻でLHCIを構 成するLherサブファミリーの網羅的な分子系統解析を行っ て, 紅漢内部でのLHCIの複合体進化,及び,紅藻からク リプト藻への細胞内共生の過程でLHCIがどのように変遷 したかを推定した.

4.1 紅藻門のLHCIの分子系統に基づいた進化過程推定

紅藻門は二つの亜門、紅藻亜門とイデユコゴメ亜門に分 かれる (Park et al., 2023). それぞれの亜門の中でもいくつ かの綱に分かれるが、可能な限りそれらを網羅するように ゲノム情報やトランスクリプトーム情報を集め、BLASTP を利用してLHCのアミノ酸配列を網羅的に取得した. そし て, 多重配列整列 (MSA: multiple sequence alignment) を行 なったのち、分子系統推定を行ってオルソロガスな関係を 明らかにした. こうした網羅的な分子系統解析を行う際に は、用いる配列を精査することが重要である. その結果, 紅藻亜門のLhcrにおいてはグループ I からグループVIIの7 つのオルソロガスグループが保存されていることが明らか になった.一方で、イデユコゴメ亜門においては、初期に 分岐したガルディエラ目の紅藻ではグループⅠ. IVからVI の5グループとガルディエラ目に特異的なグループを有し ていた. イデユコゴメ (Cyanidioschyzon merolae) では、グ ループV, Ⅵ, Ⅶの3グループのみが保存されていた. こ れを紅藻亜門のPorphyridium purpureumとイデユコゴメ亜 門のイデユコゴメのPSI-LHCI立体構造で比較すると図3の ようになる. P. purpureum PSI-LHCIにおいてLHCIの位置 をストロマ側から見た時に、RedCAPから反時計回りにp0 からp7とすると、グループ I からVIIのLhcrはそれぞれp1か らp7に同定された.一方で、イデユコゴメではp5からp7 はP. purpureumと同様にグループVからVIIのLhcrが同定さ れたが、p0にはRedCAPではなくグループVのLhcrが、p1 にはグループ I ではなくグループ VIのLhcrが同定された. ガルディエラ目ではRedCAPが保存されていることから, RedCAPをp0に結合する*P. purpureum*の構造がより祖先的で あると考えられる. つまり、イデユコゴメのPSI-LHCIの



図4:紅藻からクリプト藻への細胞内共生におけるクリプト藻PSI-LHCIの推定成立仮定 クリプト藻*Chroomonas placoidea*のPSI-ACPIは1つのRedCAPと13個のLHC (ACP)を持ち、そのうち6つは紅藻の LhcrとホモロガスなLhcrで、7つはクリプト藻特異的なLhcrである。クリプト藻のPSI-ACPIは、色素体の由来す る紅藻の推定PSI-LHCIと同様に、Psa28を含むPSIコアを保存しており、RedCAPとグループIV、V、VIのLHCが それぞれp0、p4-p6の位置に存在している。細胞内共生イベントの過程で、クリプト藻特異的なLhcrがACPI-1に、 そしてグループVのLhcrとクリプト藻特異的なLhcrを含む3セットのヘテロ三量体がPSI-LHCIの3つの異なる側面 に付加されたと推定される。Psa28 (別名PsaR)を除くPSIコアサブユニットは緑色で、Psa28はシアンで示している。 RedCAPは赤色で、LHCI中の紅藻にホモログの存在するLhcrは橙色で、クリプト藻特異的なLhcrは褐色で示して いる。Lhcrグループの番号は、それぞれの推定モデル上に示している。

構造において、p0及びp1に結合しているグループV及び VIのLherは二次的にその位置に結合するようになったと推 定される.一方、p5からp7のLherは、紅藻の両亜門でオル ソログが結合位置を保存していたことから、祖先型PSI-LHCIにおいても同様であったと考えられる.

ここで、ガルディエラ目のPSI-LHCIの構造を推定して みる. P. purpureumとイデユコゴメのPSI-LHCIの間で見ら れたように、オルソログは基本的にはその位置を保存する と仮定すると、PSI-LHCIはp0にRedCAP、p1にグループ I のLhcr、p4からp7にグループIVからVIIのLhcrがそれぞれ結 合すると考えられる。ガルディエラにはガルディエラ目 特異的なLhcrオルソロググループも存在することから、も う一分子のLhcrがいずれかの位置に結合すると予測され る.以上から推定されるガルディエラ目のPSI-LHCIの構 造は図3の通りである。さらにP. purpureumとガルディエラ 目のPSI-LHCIの構造上の特徴から、最終共通祖先紅藻の PSI-LHCIは少なくとも、p0にRedCAP、p1にグループ I の Lhcr、p4からp7にグループIVからVIIのLhcrを有していたと 推定された。すなわち、現在同定されている紅藻種の最終 共通祖先の段階でPSI-LHCIの構成はすでに「完成」していたことが示唆された.

4.2 クリプト藻のLHCIの分子系統に基づいた進化過程推定

同様の解析を紅藻から紅色進化系統藻類に広げ、クリプ ト藻PSI-LHCI (LHCが結合する色素にちなんでPSI-ACPI またはPSI-CACIとも呼ばれる)についても検討した.クリ プト藻PSI-LHCIでは、p4からp6にグループIVからVIのLhcr がそれぞれ結合しており、p0のRedCAPとともに紅藻から そのオルソログの位置を保存している.また、クリプト藻 にはグループVのLhcrはホモログが他に3つ存在し、図4に 示したように、分子系統樹上でクリプト藻特異的なクレー ドに同定された2分子のLhcrとともに、それぞれヘテロ三 量体を形成していた.P7にはこのクリプト藻特異的なLhcr が結合している.これらのことから、クリプト藻は、細胞 内共生の過程でLHCIのうち、RedCAP、グループIVからVI のLhcrのみを保存し、新たに遺伝子重複と分化によって獲 得したクリプト藻特異的なLhcrとともに遺伝子重複したグ ループVのLhcrで、3コピーのヘテロ三量体を形成するこ とで、アンテナの大きさを回復、さらに拡大させることで 機能的なPSI-LHCIを成立させたと考えられる。

おわりに: 複合体進化の新しい概念 "Neolocalization" " "

紅藻イデユコゴメでは、同じLHC分子が推定される祖先 LHCIとは異なる位置にも結合する現象が見られ、細胞内 共生によって紅藻から色素体を獲得したクリプト藻では 遺伝子重複と分化によって獲得したLHCが別の位置に結合 する現象が確認された. 遺伝子重複と分化によって他の 機能を獲得することをNeofunctionalization (新機能獲得)と 呼び,いわゆるevo-devo (進化発生生物学)の概念の「cooption (流用)」の一種とされる.今回,LHCに関しては同 一もしくは遺伝子重複と分化によって生じたLHCが、集光 という機能は保存しつつ、複合体の他の位置に結合するよ うになったことが明らかとなった. 著者らはこの現象を複 合体立体構造におけるNeolocalization (新局在獲得)と名付 けた. このNeolocalizationも広義にはco-optionの一種であ ると言えるだろう.

我々はこうしたevo-devo的な視点を構造生物学に取り入 れることで、複雑な進化の過程を経ている藻類の巨大複 合体分子についても、その成立過程を議論することが可 能であることを提案する. 紅藻イデユコゴメは極限環境 生物であり、ゲノムサイズが縮小し遺伝子数が減少する ゲノム縮退が生じていることが知られている (Cho et al., 2023). また、クリプト藻の色素体は紅藻からの細胞内共 生をへて色素体が成立している. こうしたゲノム縮退や細 胞内共生といった現象においては、機能的な複合体を形 成する遺伝子セットが不足し, Neolocalizationが促進され る可能性がある. さらに別の例として, ハプト藻におい ては、PSIのサブユニットの多くの遺伝子は色素体ゲノム にコードされクリプト藻に由来すると考えられる一方で, LHCは核ゲノムコードであり不等毛藻に由来すると考えら れる(図1). すなわち、ハプト藻のPSI-LHCIはクリプト藻 由来のPSIと不等毛藻由来のLHCIを有しており、LHCI全 体でNeolocalizationが生じていると推定された(Kumazawa and Ifuku, 2024). この予測は最近報告されたハプト藻 Isochrysis galbana PSI-LHCIの構造において完全に支持さ れた (He et al., 2024). このようにNeolocalizationは藻類PS-LHC複合体で一般的な進化駆動原理であり、この視点に 立って様々なPS-LHC構造を俯瞰することで、藻類が生育 する光環境に適応してきた過程の一端を解明できると考え ている.

謝辞

本稿で紹介した研究の一部は,科研費22KJ2017,23H0247, 24H02081の助成をうけて実施されたものです.

参考文献

- Amunts, A., Drory, O., Nelson, N., 2007. The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution. *Nature* 447, 58–63.
- Bai, T., Guo, L., Xu, M., Tian, L., 2021. Structural Diversity of Photosystem I and Its Light-Harvesting System in Eukaryotic Algae and Plants. *Front Plant Sci* 12.
- Bai, Y., Cao, T., Dautermann, O., Buschbeck, P., Cantrell, M.B., Chen, Y., Lein, C.D., Shi, X., Ware, M.A., Yang, F., Zhang, H., Zhang, L., Peers, G., Li, X., Lohr, M., 2022. Green diatom mutants reveal an intricate biosynthetic pathway of fucoxanthin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119.
- Ban, H., Sato, S., Yoshikawa, S., Yamada, K., Nakamura, Y., Ichinomiya, M., Sato, N., Blanc-Mathieu, R., Endo, H., Kuwata, A., Ogata, H., 2023. Genome analysis of Parmales, the sister group of diatoms, reveals the evolutionary specialization of diatoms from phago-mixotrophs to photoautotrophs. *Commun Biol* 6.
- Bodył, A., 2018. Did some red alga-derived plastids evolve via kleptoplastidy? A hypothesis. *Biological Reviews* 93, 201–222.
- Bodył, A., Stiller, J.W., Mackiewicz, P., 2009. Chromalveolate plastids: direct descent or multiple endosymbioses? *Trends Ecol Evol*.
- Büchel, C., 2015. Evolution and function of light harvesting proteins. *J Plant Physiol* 172, 62–75.
- Cao, T., Bai, Y., Buschbeck, P., Tan, Q., Cantrell, M.B., Chen, Y., Jiang, Y., Liu, R.Z., Ries, N.K., Shi, X., Sun, Y., Ware, M.A., Yang, F., Zhang, H., Han, J., Zhang, L., Huang, J., Lohr, M., Peers, G., Li, X., 2023. An unexpected hydratase synthesizes the green light-absorbing pigment fucoxanthin. *Plant Cell* 35, 3053–3072.
- Cho, C.H., Park, S.I., Huang, T.-Y., Lee, Y., Ciniglia, C., Yadavalli, H.C., Yang, S.W., Bhattacharya, D., Yoon, H.S., 2023. Genome-wide signatures of adaptation to extreme environments in red algae. *Nat Commun* 14, 10.
- Croce, R., van Amerongen, H., 2020. Light harvesting

in oxygenic photosynthesis: Structural biology meets spectroscopy. *Science* 369, eaay2058.

- Curtis, B.A., Tanifuji, G., Maruyama, S., Gile, G.H., Hopkins, J.F., Eveleigh, R.J.M., Nakayama, T., Malik, S.B., Onodera, N.T., Slamovits, C.H., Spencer, D.F., Lane, C.E., Gray, M.W., Archibald, J.M., Burki, F., Hirakawa, Y., Reyes-Prieto, A., Keeling, P.J., Fast, N.M., Green, B.R., Grisdale, C.J., Gruber, A., Kroth, P.G., Irimia, M., Arias, M.C., Ball, S.G., Kuo, A., Schmutz, J., Grimwood, J., Lindquist, E., Lucas, S., Salamov, A., Grigoriev, I. V., Rensing, S.A., Symeonidi, A., Elias, M., Herman, E.K., Klute, M.J., Dacks, J.B., Oborník, M., Kořený, L., Durnford, D.G., Neilson, J.A.D., Armbrust, E.V., Rocap, G., Aves, S.J., Liu, Y., Beiko, R.G., Coutinho, P., Henrissat, B., Hempel, F., Maier, U.G., Zauner, S., Häppner, M.P., Ishida, K.I., Shirato, S., Suzuki, S., Kim, E., Richards, T.A., Mc Rose, D., Worden, A.Z., Mock, T., Poole, A.M., Pritham, E.J., Roy, S.W., Schaack, S., Bell, C., Bharti, A.K., Crow, J.A., Kramer, R., Mc Fadden, G.I., 2012. Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. Nature 492, 59-65.
- Delwiche, C.F., 1999. Tracing the Thread of Plastid Diversity through the Tapestry of Life. *Am Nat* 154, S164–S177.
- Dorrell, R.G., Gile, G., McCallum, G., Méheust, R., Bapteste, E.P., Klinger, C.M., Brillet-Guéguen, L., Freeman, K.D., Richter, D.J., Bowler, C., 2017. Chimeric origins of ochrophytes and haptophytes revealed through an ancient plastid proteome. *eLife* 6, 1–45.
- Dorrell, R.G., Villain, A., Perez-Lamarque, B., Audren de Kerdrel, G., McCallum, G., Watson, A.K., Ait-Mohamed, O., Alberti, A., Corre, E., Frischkorn, K.R., Pierella Karlusich, J.J., Pelletier, E., Morlon, H., Bowler, C., Blanc, G., 2021. Phylogenomic fingerprinting of tempo and functions of horizontal gene transfer within ochrophytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118.
- Engelken, J., Brinkmann, H., Adamska, I., 2010. Taxonomic distribution and origins of the extended LHC (light-harvesting complex) antenna protein superfamily. *BMC Evol Biol* 10, 233.
- Feng, Y., Li, Z., Yang, Y., Shen, L., Li, X., Liu, X., Zhang, X., Zhang, J., Ren, F., Wang, Y., Liu, C., Han, G., Wang, X., Kuang, T., Shen, J. R., Wang, W., 2024. Structures of PSI– FCPI from *Thalassiosira pseudonana* grown under high light provide evidence for convergent evolution and light-adaptive strategies in diatom FCPIs. *Journal of Integrative Plant Biology* 00, 1–18.

- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., Falkowski,
 P., 1998. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* 281, 237–240.
- Garrido, J.L., Otero, J., Maestro, M.A., Zapata, M., 2000. The main nonpolar chlorophyll c from Emiliania huxleyi (Prymnesiophyceae) is a chlorophyll c₂monogalactosyldiacylglyceride ester: A mass spectrometry study. J Phycol 36, 497–505.
- Groussman, R.D., Parker, M.S., Armbrust, E.V., 2015. Diversity and evolutionary history of iron metabolism genes in diatoms. *PLoS One* 10.
- Haidak, D.J., Mathews, C.K., Sweeney, B.M., 1966. Pigment Protein Complex from Gonyaulax. *Science* 152, 212–213.
- He, F.-Y., Zhao, L.-S., Qu, X.-X., Li, K., Guo, J.-P., Zhao, F., Wang, N., Qin, B.-Y., Chen, X.-L., Gao, J., Liu, L.-N., Zhang, Y.-Z., 2024. Structural insights into the assembly and energy transfer of haptophyte photosystem I–light-harvesting supercomplex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 121.
- Hofmann, E., Wrench, P.M., Sharples, F.P., Hiller, R.G., Welte,
 W., Diederichs, K., 1996. Structural Basis of Light Harvesting
 by Carotenoids: Peridinin-Chlorophyll-Protein from
 Amphidinium carterae. Science 272, 1788–1791.
- Ingram, K., Hiller, R.G., 1983. Isolation and characterization of a major chlorophyll a/c₂ light-harvesting protein from a *Chroomonas* species (Cryptophyceae). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 722, 310–319.
- Irisarri, I., Strassert, J.F.H., Burki, F., 2021. Phylogenomic Insights into the Origin of Primary Plastids. *Syst Biol* 71, 105–120.
- Jiang, Y., Cao, T., Yang, Y., Zhang, H., Zhang, J., Li, X., 2023. A chlorophyll *c* synthase widely co-opted by phytoplankton. *Science* 382, 92–98.
- Jinkerson, R.E., Poveda-Huertes, D., Cooney, E.C., Cho, A., Ochoa-Fernandez, R., Keeling, P.J., Xiang, T., Andersen-Ranberg, J., 2023. Biosynthesis of chlorophyll c in a dinoflagellate and heterologous production in planta. Current Biology.
- Kato, K., Hamaguchi, T., Kumazawa, M., Nakajima, Y., Ifuku,
 K., Hirooka, S., Hirose, Y., Miyagishima, S., Suzuki, T.,
 Kawakami, K., Dohmae, N., Yonekura, K., Shen, J.-R.,
 Nagao, R., 2024a. The structure of PSI-LHCI from *Cyanidium* caldarium provides evolutionary insights into conservation and diversity of red-lineage LHCs. Proceedings of the

National Academy of Sciences 121.

- Kato, K., Nakajima, Y., Xing, J., Kumazawa, M., Ogawa, H., Shen, J.-R., Ifuku, K., Nagao, R., 2024b. Structural basis for molecular assembly of fucoxanthin chlorophyll *a/c*-binding proteins in a diatom photosystem I supercomplex. *eLife* 13.
- Kawachi, M., Nakayama, T., Kayama, M., Nomura, M., Miyashita, H., Bojo, O., Rhodes, L., Sym, S., Pienaar, R.N., Probert, I., Inouye, I., Kamikawa, R., 2021. Rappemonads are haptophyte phytoplankton. *Current Biology* 31, 2395-2403.e4.
- Kim, J.I., Moore, C.E., Archibald, J.M., Bhattacharya, D., Yi, G., Yoon, H.S., Shin, W., 2017. Evolutionary Dynamics of Cryptophyte Plastid Genomes. *Genome Biol Evol* 9, 1859– 1872.
- Kotabová, E., Jarešová, J., Kaňa, R., Sobotka, R., Bína, D., Prášil, O., 2014. Novel type of red-shifted chlorophyll *a* antenna complex from *Chromera velia*. I. Physiological relevance and functional connection to photosystems. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1837, 734–743.
- Koziol, A.G., Borza, T., Ishida, K.I., Keeling, P., Lee, R.W., Durnford, D.G., 2007. Tracing the evolution of the lightharvesting antennae in chlorophyll *a/b*-containing organisms. *Plant Physiol* 143, 1802–1816.
- Kumazawa, M., Ifuku, K., 2024. Unraveling the evolutionary trajectory of LHCI in red-lineage algae: Conservation, diversification, and neolocalization. *iScience* 27, 110897.
- Kumazawa, M., Nishide, H., Nagao, R., Inoue-Kashino, N., Shen, J., Nakano, T., Uchiyama, I., Kashino, Y., Ifuku, K., 2022. Molecular phylogeny of fucoxanthin-chlorophyll *a/c* proteins from *Chaetoceros gracilis* and Lhcq/Lhcf diversity. *Physiol Plant* 174, e13598.
- Li, X., Li, Z., Wang, F., Zhao, S., Xu, C., Mao, Z., Duan, J., Feng, Y., Yang, Yang, Shen, L., Wang, G., Yang, Yanyan, Yu, L.J., Sang, M., Han, G., Wang, X., Kuang, T., Shen, J.R., Wang, W., 2024. Structures and organizations of PSI– AcpPCI supercomplexes from red tidal and coral symbiotic photosynthetic dinoflagellates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 121.
- Marquardt, J., Rhiel, E., 1997. The membrane-intrinsic lightharvesting complex of the red alga *Galdieria sulphuraria* (formerly *Cyanidium caldarium*): biochemical and immunochemical characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1320, 153–164.
- Miyagishima, S. ya, 2023. Taming the perils of photosynthesis by eukaryotes: constraints on endosymbiotic evolution in aquatic ecosystems. *Commun Biol.*

- Nagao, R., Kato, K., Ifuku, K., Suzuki, T., Kumazawa, M., Uchiyama, I., Kashino, Y., Dohmae, N., Akimoto, S., Shen, J.-R., Miyazaki, N., Akita, F., 2020. Structural basis for assembly and function of a diatom photosystem I-light-harvesting supercomplex. *Nat Commun* 11, 2481.
- Neilson, J.A.D., Durnford, D.G., 2010. Structural and functional diversification of the light-harvesting complexes in photosynthetic eukaryotes. *Photosynth Res.*
- Park, S. I., Cho, C. H., Ciniglia, C., Huang, T., Liu, S., Bustamante, D. E., Calderon, M. S., Mansilla, A., McDermott, T., Andersen, R. A., Yoon, H. S. 2023. Revised classification of the Cyanidiophyceae based on plastid genome data with descriptions of the Cavernulicolales ord. nov. and Galdieriales ord. nov. (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 59(3), 444–466.
- Pennington, F.C., Haxo, F.T., Borch, G., Liaaen-Jensen, S., 1985. Carotenoids of cryptophyceae. *Biochem Syst Ecol* 13, 215–219.
- Penot, M., Dacks, J.B., Read, B., Dorrell, R.G., 2022. Genomic and meta-genomic insights into the functions, diversity and global distribution of haptophyte algae. *Applied Phycology* 3, 340–359.
- Pi, X., Tian, L., Dai, H.-E., Qin, X., Cheng, L., Kuang, T., Sui, S.-F., Shen, J.-R., 2018. Unique organization of photosystem I–light-harvesting supercomplex revealed by cryo-EM from a red alga. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, 4423–4428.
- Rathbone, H.W., Laos, A.J., Michie, K.A., Iranmanesh, H., Biazik, J., Goodchild, S.C., Thordarson, P., Green, B.R., Curmi, P.M.G., 2023. Molecular dissection of the soluble photosynthetic antenna from the cryptophyte alga *Hemiselmis* andersenii. Commun Biol 6, 1158.
- Rice, D.W., Palmer, J.D., 2006. An exceptional horizontal gene transfer in plastids: Gene replacement by a distant bacterial paralog and evidence that haptophyte and cryptophyte plastids are sisters. *BMC Biol* 4.
- Shikata, T., Takahashi, F., Nishide, H., Shigenobu, S., Kamei, Y., Sakamoto, S., Yuasa, K., Nishiyama, Y., Yamasaki, Y., Uchiyama, I., 2019. RNA-Seq Analysis Reveals Genes Related to Photoreception, Nutrient Uptake, and Toxicity in a Noxious Red-Tide Raphidophyte *Chattonella antiqua. Front Microbiol* 10, 1–14.
- Sibbald, S.J., Archibald, J.M., 2020. Genomic insights into plastid evolution. *Genome Biol Evol* 12, 978–990.
- Slater, B., Kosmützky, D., Nisbet, R.E.R., Howe, C.J., 2021.

The Evolution of the Cytochrome *c*₆ Family of Photosynthetic Electron Transfer Proteins. *Genome Biol Evol* 13.

- Spear-Bernstein, L., Miller, K.R., 1989. Unique location of the phycobiliprotein light-harvesting pigment in the cryptophyceae. *J Phycol* 25, 412–419.
- Stiller, J.W., Schreiber, J., Yue, J., Guo, H., Ding, Q., Huang, J., 2014. The evolution of photosynthesis in chromist algae through serial endosymbioses. *Nat Commun* 5, 1–7.
- Stomp, M., Huisman, J., Stal, L.J., Matthijs, H.C.P., 2007. Colorful niches of phototrophic microorganisms shaped by vibrations of the water molecule. *ISME Journal*.
- Sturm, S., Engelken, J., Gruber, A., Vugrinec, S., G Kroth, P., Adamska, I., Lavaud, J., 2013. A novel type of light-harvesting antenna protein of red algal origin in algae with secondary plastids. *BMC Evol Biol* 13, 159.
- Takaichi, S., Yokoyama, A., Mochimaru, M., Uchida, H., Murakami, A., 2016. Carotenogenesis diversification in phylogenetic lineages of Rhodophyta. *J Phycol* 52, 329–338.
- Umetani, I., Kunugi, M., Yokono, M., Takabayashi, A., Tanaka, A., 2018. Evidence of the supercomplex organization of photosystem II and light-harvesting complexes in *Nannochloropsis granulata. Photosynth Res* 136, 49–61.
- Wolfe, G.R., Cunningham, F.X., Grabowski, B., Gantt, E., 1994. Isolation and characterization of Photosystems I and II from the red alga *Porphyridium cruentum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1188, 357–366.
- Xu, C., Pi, X., Huang, Y., Han, G., Chen, X., Qin, X., Huang, G.,
 Zhao, S., Yang, Y., Kuang, T., Wang, W., Sui, S.-F., Shen, J.R., 2020. Structural basis for energy transfer in a huge diatom
 PSI-FCPI supercomplex. *Nat Commun* 11, 5081.
- Yoon, H.S., Hackett, J.D., Bhattacharya, D., 2002a. A single origin of the peridinin- and fucoxanthin-containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 11724–11729.
- Yoon, H.S., Hackett, J.D., Pinto, G., Bhattacharya, D., 2002b. The single, ancient origin of chromist plastids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 15507–15512.
- You, X., Zhang, Xing, Cheng, J., Xiao, Y., Ma, J., Sun, S., Zhang, Xinzheng, Wang, H.-W., Sui, S.-F., 2023. In situ structure of the red algal phycobilisome–PSII–PSI–LHC megacomplex. *Nature* 616, 199–206.
- Zapata, M., Rodríguez, F., Garrido, J., 2000. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and

pyridine-containing mobile phases. *Mar Ecol Prog Ser* 195, 29–45.

- Zhang, S., Si, L., Su, X., Zhao, X., An, X., Li, M., 2024. Growth phase-dependent reorganization of cryptophyte photosystem I antennae. *Commun Biol* 7, 560.
- Zhang, X., Xiao, Y., You, X., Sun, S., Sui, S.F., 2024. In situ structural determination of cyanobacterial phycobilisome–PSII supercomplex by STAgSPA strategy. *Nat Commun* 15.
- Zhao, L.S., Wang, N., Li, K., Li, C.Y., Guo, J.P., He, F.Y., Liu, G.M., Chen, X.L., Gao, J., Liu, L.N., Zhang, Y.Z., 2024. Architecture of symbiotic dinoflagellate photosystem I–lightharvesting supercomplex in *Symbiodinium. Nat Commun* 15.
- Zhao, L.-S., Wang, P., Li, K., Zhang, Q.-B., He, F.-Y., Li, C.-Y., Su, H.-N., Chen, X.-L., Liu, L.-N., Zhang, Y.-Z., 2023. Structural basis and evolution of the photosystem I–lightharvesting supercomplex of cryptophyte algae. *Plant Cell* 35, 2449–2463.
- Zimorski, V., Ku, C., Martin, W.F., Gould, S.B., 2014. Endosymbiotic theory for organelle origins. *Curr Opin Microbiol*.

ナンキョクカワノリが獲得した遠赤色光利用型光合成 そのメカニズムと進化系統

小杉 真貴子 1)

2024年12月1日受付, 2025年1月6日受理

ナンキョクカワノリは南極の陸上環境に大きなコロニーを形成することで知られている.最近の研 究から、ナンキョクカワノリは可視光が届きにくいコロニーの内部環境で可視光より長波長の遠赤色 光を吸収する光捕集アンテナ蛋白質 (Pc-ftLHC)を発現し、アップヒル型のエネルギー移動により可視 光より低いエネルギーの光で酸素発生型の光合成を行うことが明らかになった.構造解析の結果、PcftLHCは11量体のリング構造をしており、長波長吸収型の3量体クロロフィルを結合することが分かっ た.系統解析の結果、Pc-ftLHCはトレブクシア藻綱の中で、緑藻の多くが持っている可視光吸収型 LHCIのひとつからアミノ酸配列の変化を経て進化したことが示唆された.

Far-red light driven photosynthesis acquired in the evolutionary process of an Antarctic alga, *Prasiola crispa* ~Its mechanism and evolutionary lineage~

Makiko Kosugi¹

Prasiola crispa is known to form large colonies in terrestrial environments of Antarctica. In our recent studies, it has been revealed that *P. crispa* expresses a far-red light-harvesting chlorophyll (Chl)-binding protein complex (Pc-frLHC) in the internal environment of colony where infrared light is predominant, and performs photosynthesis using far-red light, which is lower energy than visible light, through uphill energy transfer. Structural analysis has revealed that Pc-frLHC has a homo 11-mer ring like structure and binds long-wavelength absorbing trimeric chlorophylls. Phylogenetic analysis suggests that Pc-frLHC evolved in Trebouxiophyceae, through changes in amino acid sequence from one of the visible light absorbing LHCI that is a common LHC in green algae.

キーワード:南極, 光合成, 緑藻, アップヒル型励起エネルギー移動 Antarctica, photosynthesis, green algae, uphill excitation energy transfer

1. 南極光合成生物の生育環境

1.1 南極の環境と生態系

南極地域(南緯60°以南)は、気候の違いから海洋性気候 (Maritime Antarctica) と大陸性気候(Continental Antarctica)

連絡先

小杉 真貴子 基礎生物学研究所 環境光生物学研究部門 〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38 Tel: 0564-55-7517 Email: mkosugi@nibb.ac.jp の2つの地域に大きく分けられる(Holdgate 1964, Holdgate 1970, Terauds et al. 2012, Terauds and Lee 2016). 島が点在す る南緯46°から60°の地域である亜南極地域(Subantarctica) も生物地理学上, 南極と同列に扱われることが多い. 海 洋性南極および亜南極は, 年間を通して気温差が少なく

自然科学研究機構 基礎生物学研究所 環境光生物学研究部門
 Division of Environmental Photobiology, National Institute for Basic Biology, National Institutes of Natural Sciences, Okazaki, Japan

降水量が多い温暖・湿潤な気候で、南米大陸の南に位置 する南極半島とその周辺の島々が含まれる. 南極大陸の 大半を占める大陸性南極は、海洋性南極に比べて気温が 低く降水量が砂漠並みに少なく、多くの生物にとって極 限的環境である.大陸性南極の中で生物が主に生息して いるのは、氷河の後退によって沿岸部に形成された露岩 域(ice free area)と呼ばれる地域である. 冬と夏の平均気温 は, 亜南極で-2℃と+8℃, 海洋性南極で-12℃と+2℃で あるのに対し、大陸性南極沿岸では-30℃と-3℃ほどであ る (Convey 2006). 南極の生態系は温暖湿潤な環境ほど豊 かであり、維管束植物は大陸性南極に分布しないが、海 洋性南極には2種(ナンキョクコメススキ, ナンキョクナ デシコ), 亜南極には60種が分布している (Convey 2006). 極域の植生で大きな生物量を占める蘚類は、大陸性南極 では25種であるのに対して、海洋性南極では100種、亜南 極では250種が分布している (Convey 2006). 降水量の少な い大陸性南極の露岩域では、水環境が光合成生物の分布 に大きく影響を与えており、湖沼、氷河融解水の流路、"ス ノードリフト"(障害物の風下に形成される雪だまり)の周 辺が主な生育地となっている.また、湖沼の深部を除き 陸上環境で生物が利用可能な液体の水が存在する期間は 夏季に限定される. そのため, 陸上に生育する光合成生 物は共通して優れた乾燥耐性を有し、長期間の乾燥に休 眠状態として耐え,水が利用可能になると吸水後に代謝 を迅速に回復させる能力を持つ (Heber et al. 2006, Satoh et al. 2002, Kosugi et al. 2010).

1.2 光合成への光ストレスの影響

南極の陸上環境ではシアノバクテリアや藻類. 蘚類. 地衣類などの光合成生物が一次生産者として生態系を支 えている.全ての光合成生物にとって、光は光合成に不 可欠であるが、過剰な光エネルギーが吸収されると活性 酸素を生成し細胞に損傷を与える「光阻害」を引き起こす ため危険である (Kok 1959). 光阻害が起こるメカニズム として、①光化学系II反応中心の水分解に関わるマンガ ンクラスターが光エネルギーによって破壊されることで 引き起こされるもの (Hakala et al. 2005, Ohnishi et al. 2005, Tyystjärvi et al. 2002, Hakala et al. 2006, Sarvikas et al. 2006) と, ②電子伝達系で処理しきれない過剰な酸化還元力が 生じることで引き起こされるものが知られている(Jones and Kok 1966, Santabarbara et al. 2001, Asada 1999, Bondarava et al. 2010, Zulfugarov et al. 2014, Nishiyama et al 2001, 2004, Allakhverdiev et al. 2004, Takahashi and Asada 1988, Jung and Kim 1990, Terashima et al. 1994, Sonoike 2011, Sonoike et al. 1995). ①はマンガンクラスターが吸収する紫外線や青 色光で特に起こりやすく, ②は光合成色素が吸収した光 エネルギーに依存する. 低温や乾燥のストレス環境下で 炭酸固定が抑制されることでより起こりやすくなるため (Takahashi and Asada 1988, Jung and Kim 1990, Terashima et al. 1994, Sonoike 2011, Sonoike et al. 1995), 南極の陸上環境 では光阻害が光合成生物の生育に与える影響が大きいと 考えられている.

著者らは南極の露岩域に生育する地衣類, 蘚類, 藻類 の光阻害の影響を調べるために, 光阻害でダメージを受 けやすい光化学系IIの最大量子収率 (F_v/F_m)を指標として 320 ~ 750 nmの間の11光波長における光阻害の速度定数を 測定した (Kosugi et al. 2018, 小杉真貴子, 小池裕幸 2019). 光損傷による光化学系II最大量子収率 (F_v/F_m)の低下は蛋白 質合成阻害剤の存在下で照射時間に対して1次反応で起こ ることが知られており, 次の式で表される (Wünschmann and Brand 1992, Tyystjärvi et al. 1994, Tyystjärvi et al. 1996).

 $y = a \times e^{-k_{pi} \times t}$

反応係数 k_{pi} は速度定数, aは初期値の定数である. k_{pi} は 光子の波長あるいは光量子束密度 (photon flux density) に依 存する.単色光による照射を行う場合, k_{pi} はエネルギー束 密度 (energy flux density) (*I*) に対する反応係数 (E_{pi}) に置き 換えることが可能である.

$$E_{\rm pi} \times I = k_{pi}$$

$$y = a \times e^{-E_{pi} \times I \times t}$$

自然光下における光損傷の速度定数は各波長の速度定数(k_{ai})を積算したものとなるので以下の式で求められる.

$$k_{pi} = \sum_{320 nm}^{750 nm} \left\{ (E_{pi})_{\lambda} \times I_{\lambda} \right\}$$

(320 nmから750 nmまでの照射エネルギーに対する速度定数)

南極で採集した緑藻類ナンキョクカワノリ (Prasiola crispa),地衣類ネナシイワタケ (Umbilicaria decussata), 蘚類ヤノウエノアカゴケ (Ceratodon purpureus)の光化学系 IIにおける光阻害の波長依存性を比較したところ,ナン キョクカワノリは短波長ほど光阻害を起こしやすく,紫 外線と青色光で特に影響が見られた.これに対して地衣 類はどの波長においても反応係数がほぼゼロで光阻害が 見られず,蘚類ではUV-Bの波長 (320 nm)において若干の



図1:ナンキョクカワノリコロニーの光環境

南極で採集したナンキョクカワノリのコロニー (A)をカミソリで上層(Upper part), 中層(Middle part), 下層(Lower part)の3層にスラ イスし,ソーラーシミュレーター HAL-100 (朝日分光)を光源として各層の透過スペクトルを測定し透過率スペクトルを算出した(B). 南極昭和基地から20キロほど離れた露岩域であるラングホブデ,四つ池谷のナンキョクカワノリ生育地に設置した微気象観測機で得 た2日間の波長別光強度のデータとBのコロニー内部の透過率スペクトルから,コロニー表層,中層,下層における1時間ごとの積算光 強度を250-400 nm (紫),400-500 nm (青),500-600 nm (緑),600-700 nm (赤),700-750 nm (黄土色)で色分けして示した.

光阻害が見られたものの反応速度定数(k_{pi})はナンキョクカ ワノリの7分の1程度であった.このことから、ナンキョ クカワノリは地衣類や蘚類に比べて南極の生育環境下で 光阻害を起こしやすく、光阻害によるダメージの回復に 多くのコストを払っていると考えられた.

2. ナンキョクカワノリの適応戦略

2.1 南極での分布

トレブクシア藻綱に属するPrasiola属は、日本を含めて 世界中に35種類ほどが知られている。南極では数種が記 載されていたが、分子系統解析および形態と生態に基づ く分類の見直しによりナンキョクカワノリP. crispa(気生 藻)、とP. glacialis(気生藻)、P. borealis(地衣類Mastodia tessellataの共生藻)の3種に集約されている(Pérez-Ortega 2010, Moniz et al. 2012)。海洋性、大陸性南極の両地域の 露岩に広く分布するナンキョクカワノリは、鳥の営巣地 の周辺など富栄養環境に分布する傾向がみられる。海洋 性南極では地表に拡がる大きなコロニーを形成するため、 藻類の中で特に目立つ存在である。ナンキョクカワノリは の葉状体が重なって層構造を形成する.一方, P. glacialis は貧栄養環境を好み, Nostocなどの窒素固定シアノバク テリアと混生することが多く,ロス海に面した米国観測 基地マクマード基地周辺や乾燥したマクマードドライバ レー周辺で生育が確認されている(Broady 1996).また, P. borealisを共生させている地衣類M. tessellataは海洋性南極 に分布し,塩耐性があり海岸近くの岩上に着生するよう である.昭和基地周辺の露岩域ではナンキョクカワノリ 以外のPrasiola属は確認されていない.昭和基地から20キ ロほど南方に位置するラングホブデの四つ池谷に比較的 大きなコロニーが存在している.

2.2 生理生態学的特徴

これまでにナンキョクカワノリの乾燥や強光に対する 優れた耐性に着目した研究がなされて来た(Kosugi et al. 2010, Lud et al. 2001, Holzinger et al. 2006).乾燥に対する 応答は地衣類や蘚類と似ており,細胞内の水分が減少す ると全ての代謝を停止して休眠状態となるが,水を再度 吸水すると即座に活性を回復する.乾燥時には,光合成 系が吸収した光エネルギーを安全に消去し光阻害を防ぐ 機構を持つことが知られている.しかし,前項で示した

図2:ナンキョクカワノリコロニー表層と内部における光阻害 の反応係数の日変動

図1のCで算出したナンキョクカワノリコロニーの表層および中層,下層における波長別の光強度データと,Kosugi et al. 2018 で測定したナンキョクカワノリの光化学系IIにおける光阻 害の反応係数を用いて,実際の微気象観測データからナンキョ クカワノリコロニー表層と内部の光阻害反応速度係数を推定した.反応速度係数が大きいほど光阻害を起こしやすく,ダメー ジの回復にかかるコストが大きくなる.

通り吸水状態においてナンキョクカワノリは地衣類や蘚 類に比べて波長が短くエネルギーの大きな紫外線や青色 光で光阻害を起こしやすいことが分かっている.一方で、 南極の露岩域においてナンキョクカワノリは葉状体の個 体が何層にも重なったコロニーを形成することが多くコ ロニーの表層と内部では光環境が大きく異なる(図1).日 射の強い環境においてコロニー上層の葉緑素(クロロフィ ル)が光阻害により減少して白っぽくなるのに対して、コ ロニーの中層から下層は葉緑素が多く光阻害の影響は少 ないと考えられた.図1のCで算出したナンキョクカワノ リコロニーの表層および中層、下層における波長別の光 強度データと、Kosugi et al. 2018 で測定したナンキョクカ ワノリの光化学系Ⅱにおける光阻害の反応係数を用いて、 ナンキョクカワノリ生育地の微気象観測データからナン キョクカワノリコロニー表層と内部の光阻害反応速度係 数を推定すると、表層に比べて中層では反応速度係数は 10分の1以下となり、下層では快晴の日中もほぼゼロで あった(図2).

緑藻類の葉緑素であるクロロフィルaとbは青色光と赤 色光を主に吸収するため、コロニーの内部ほど青と赤の 割合が少なく緑や可視光より長波長 (>700 nm)の光が卓越 する (図1) (Kosugi et al. 2023, 小杉ら 2020). 一般的な酸 素発生型の光合成では700 nmより長波長の光は光合成に ほとんど使われないため、コロニー内部は光合成に不利 な環境である.しかし著者らの最近の研究から、コロニー 内部に位置するナンキョクカワノリの細胞は葉緑素の一 部が遠赤色光(700~750 nm)を吸収できるように変化し、 長波長の光を光合成に利用する能力があることが分かっ た(Kosugi et al. 2020).この特性はコロニー内部の光合成 生産量を高めることに寄与していると考えられる.

ナンキョクカワノリに見つかった 遠赤色光利用型光合成

3.1 遠赤色光利用型光合成の学術的重要性

酸素発生型光合成は光エネルギーで水を分解して得た還 元力とATPで二酸化炭素を固定する反応であり,電荷分離 反応を起こす2つの反応中心蛋白質,光化学系Iと光化学 系IIが関わっている(Kok 1963, Döring et al. 1969).光化学 系IIは電荷分離により水を分解し電子とプロトン(H⁺)を電 子伝達系に供給する.この時,水から生じた酸素は細胞外 に放出されるため,酸素の発生速度の計測により光合成活 性を測定することができる.一部のシアノバクテリアを除 く酸素発生型光合成生物の光化学系IIは680 nmに相当する 赤色光で励起されるため,680 nmよりエネルギーの低い長 波長の光では励起効率が大きく下がる(Laisk et al. 2014).

光合成生物の酸素発生活性の作用スペクトルを測定する と赤色光域の680 nm付近に酸素発生活性のピークが観測さ れるが、ナンキョクカワノリにおいては680 nmに加えて遠 赤色光の710 nm付近に明瞭な酸素発生活性のピークが確認 される. 藻体の吸収率スペクトルにおける680 nmと710 nm のピーク高の比率は、作用スペクトルにおけるピーク高の 比率とほぼ同じであった. このことは、藻体に吸収され た光子のうち光化学系IIを励起する光子の割合が680 nmと 710 nmで変わらないことを示唆している.

3.2 アップヒル型の励起エネルギー移動

光化学系IIの反応中心が一般的な藻類と同じP680である 場合,ナンキョクカワノリに吸収された遠赤色光のエネル ギーは効率的なアップヒル型の励起エネルギー移動により 赤色光のエネルギーに変換されていると考えられる.光合 成系において光エネルギーはクロロフィルやカロテノイド によって吸収され,色素間の励起エネルギー移動を経て反 応中心のクロロフィルへ伝達される.アップヒル型の励起 エネルギー移動は,色素間のエネルギー差が熱エネルギー によって補填される範囲で生じるとされている.ここで,





オンキョクカワノリから遠赤色光吸収型LHCであるPc-frLHCを精製し、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により得られた構造 解析分子モデル(A).上図はストロマ側から見たもので下図はチラコイド膜断面から見たもの。異なるサブユニットのペプチドを異な る色で示した.クロロフィル(緑)がサブユニットに11個ずつ結合し、そのうちのChl603-609-708が3量体を形成する(B).Pc-frLHCの吸 収スペクトル(C)にはクロロフィルaのQy帯である680 nm付近の吸収帯に加えて、708 nmに吸収ピークを持つ多量体クロロフィルaの 吸収帯が存在する.

680 nmで励起されるクロロフィルと710 nmで励起される長 波長クロロフィルの2分子間における励起エネルギー移動 を考えてみる.波長680 nmと710 nmのエネルギー差は熱に 換算すると1光子あたり622℃(12.36×10⁻¹⁹ kJ)ほどになる. そのエネルギー差を乗り越えて励起エネルギーが,680 nm のエネルギーレベルのクロロフィルに存在する確率は,ボ ルツマン分布から25℃において約7%と計算される.一般 的なアンテナ蛋白質において可視光励起によるダウンヒル 型のエネルギー移動は100%近い効率で生じることを考え ると,ナンキョクカワノリの細胞に吸収された710 nmと 680 nmの光子の光化学系II励起収率が同等であることは興 味深く,効率的なアップヒル型の励起エネルギー移動のメ カニズムが存在する可能性がある(Kosugi et al. 2023).

3.3 ナンキョクカワノリの遠赤色光吸収型アンテナ蛋白質

アップヒル型の励起エネルギー移動を含んだ遠赤色光 利用型光合成メカニズムの詳細を明らかにするためには遠 赤色光を吸収する光合成色素および色素が結合する蛋白 質を同定する必要がある.著者らはモデル緑藻クラミド モナスで用いられている方法を応用し、ショ糖密度勾配 遠心と陰イオン交換カラムにより光合成蛋白質の精製を 行った. 最終的に遠赤色光に顕著な吸収帯を持つ新規のク ロロフィル結合型光捕集アンテナ蛋白質複合体が同定さ n. Prasiola crispa far-red light-harvesting chlorophyll binding protein complex (Pc-frLHC) と命名した (Kosugi et al. 2023). 高速液体クロマトグラフ (HPLC) による色素分析の結果, Pc-frLHCに結合する色素は一般的な緑藻で報告されてい る, クロロフィルa, bとカロテノイドのロロキサンチンお よびビオラキサンチンであった. このうちクロロフィルa は有機溶媒中で660 nm付近に吸収を持つが、クロロフィル のポルフィリン環同士が接近してπ-πスタッキングを形成 すると電子軌道の安定化により吸収が長波長にシフトする ことが知られており、シアノバクテリアや植物において2 量体や3量体化したクロロフィルaによる吸収帯の長波長シ フトが知られている.このことから、Pc-frLHCの顕著な遠 赤色光吸収帯はクロロフィルaの多量体化によるものであ ると考えられた(Kosugi et al. 2023).

3.4 構造解析

2010年代後半から、クライオ電子顕微鏡を用いた蛋白質 構造解析が急速に普及し、一般の研究者も利用可能な状況 となった.それまで主流であったX線による構造解析では 蛋白質の結晶化が必要であり、非モデル生物でサンプル量 が非常に限られているナンキョクカワノリのような生物で は構造解析のハードルが非常に高かった.Pc-ftLHCの構造 解析は、生命科学・創薬研究支援基盤事業(BINDS)のサポー トを受けて高エネルギー加速器研究機構の千田俊哉セン ター長の協力の元、2019年度に同機構の200 kVのクライオ 電子顕微鏡により取得した画像データで行われ、3.13Åの 分解能で構造を解くことに成功した(図3A)(Kosugi et al. 2023).

Pc-frLHCは11個の4回膜貫通型のサブユニットがリング 状に繋がった巨大な複合体であった.なお、この解析は11 個のサブユニットが全て同じものであることを前提として 11回回転対象性を考慮しているため、サブユニット間の細 かい違いは見ることができない. リング中央の穴にも蛋白 質が存在している可能性があるが、中央部には11回対象性 が無いためモデル上から消失している. これまでに報告さ れている緑藻の光合成アンテナ蛋白質はLHCスーパーファ ミリーと呼ばれ単系統である (Green and Parson 2003, Koziol et al. 2007, Dolganov et al 1995) が、11量体のリング構造は ナンキョクカワノリのPc-frLHCで初めて報告された.1つ 1つのサブユニットはモデル緑藻や植物のアンテナ蛋白質 (LHC)と相同性が高く、特に緑藻の4回膜貫通型LHCIに 系統が近いことが示唆された. Pc-frLHCにはサブユニッ ト当たり11個のクロロフィルと2種類のカロテノイド、ロ ロキサンチンとビオラキサンチンが1分子ずつ結合してい る. クロロフィルのポルフィリン環の励起子相互作用の計 算から、11個のクロロフィルのうち接近した3つのクロロ フィル (Chl603, Chl609, Chl708) が多量体化した3量体クロ ロフィルとしてアサインされ、708 nmに吸収ピークを持つ 長波長クロロフィルであると考えられた (図3B, C). この 3量体クロロフィルは他のLHCには存在せず.近縁の4回膜 貫通型LHCIにも存在しないことから、Pc-frLHCの遠赤色 光利用型光合成の進化の鍵であると考えられる。

4. Pc-frLHCの系統と発現メカニズム

4.1 ナンキョクカワノリのゲノム解析

Pc-frLHCの分子生物学的解析を進めるためにはナンキョ クカワノリのゲノム情報が必要である.著者らは2016年度 の科研費先進ゲノム支援による援助を受け,ナンキョクカ



図4:緑藻型LHCの系統樹

ナンキョクカワノリと様々な緑藻および植物のLHCのアミノ 酸配列を用いた系統解析結果(Kosugi et al. 2024)を簡略に示し た.LHCIに関しては藻類種間でシノニムに相当するものに異 なる名称が付けられているため、モデル緑藻であるクラミド モナスで命名されているLHCI名を示し、各LHCIと光化学系I (Photosystem I)の結合様式を図に示した。

ワノリの培養株 (*Prasiola crispa* 4113)の、核ゲノムを含む ゲノムシーケンス解析と遺伝子予測を行った(Kosugi et al. 2024). 培養株は島根大学の大谷修司教授(現名誉教授)が 1999年に南極昭和基地周辺で採取した土壌サンプルから単 離培養されたものを使用した. イルミナHiseqによるショー トリードと PacBio によるロングリードによるシーケンス を行い、核ゲノムサイズ 92.2 Mbp, 1,045 本のスキャホー ルドを得た. RNA-seqにより得たトランスクリプトーム データを用いて解析し、210,244個の遺伝子が推定された.

4.2 Pc-frLHCの系統解析

光合成関連の遺伝子のうち、真核光合成生物の光捕集 アンテナ蛋白質(LHC)の遺伝子は全て核ゲノムにコード されている.ナンキョクカワノリの核ゲノムには26個の LHC遺伝子が見つかり、そのうち4個がPc-frLHCの遺伝子 と推定された(Kosugi et al. 2024).ナンキョクカワノリの LHC遺伝子から推定されたアミノ酸配列と様々な緑藻や 植物のLHC配列を使って系統解析を行った(図4).その結 果、モデル緑藻クラミドモナスが持つ9つのLHCI(LHCA 1~9)(Elrad et al. 2002, Stauber et al. 2003, Minagawa and Takahashi 2004, Tokutsu et al. 2004)にそれぞれ相当するシノ

pcri_g8716.t1.p1	MAPYS	VVASVLAAAP	PQQ	SGSVRQLPST	INRA I TORSO	SRH-VASASS	ASSPTTMLEE	RDNLWEIGGP	YWWPFSSFTP	PAHLDG-SLP	GDRGFDPFSL	GTSWGLPPVD	106
pcri_g8718. t1. p1	MAPYS	VVASVLAAAP	PQQ	SGSVRQLPST	INRA I TORSO	SRH-VASASS	ANSPTTMLEE	RDNLWEIGGP	YWWPFSSFTP	PAHLDG-SLP	GDRGFDPFSL	GTSWGLPPVD	106
pcri_g8720. t1. p1								MS1	RRWPFSSFTP	PAHLDG-SLP	GDRGFDPFSL	GTSWGQPPVD	42
pcri_g8045.t1.p1	MLD	TATKIFEATE	SQQ	NLN-RIS	ARRTISQRWE	PRYFTDSAAV	SGPPNTLLKE	PDNLWE I GGP	FWVPFSSFTP	PAHLDG-SLP	GDRGFDPFSL	GTSWGQPPVD	101
KAA6421879. 1_Trebouxia	MAYAL ID	QVTCKSAICS	TKSLLRRSPR	VTVLKRSPVE	ARRT	VRQGASS	RDGPNWVLDE	PKRLWEIGSR	YWLPFNNFEP	PEYLDG-SLP	GDRGFDPLRL	GATWGNPPDE	107
BDA47009. 1_Coccomyxa_0bi		MAAIVR	THVSGFGNKK	AAFGRIEPTT	MRRT	VKGKA	TSGPNFKLEQ	PEKLWEIGSS	SWIPFNNYEG	PEYLDG-SLP	GDRGFDPFSL	GATWGSPPDG	94
BDA45444. 1_Coccomyxa_Obi	MATMLLSGAP	TLLKNASPLS	SRINR-	SST	-LVPCS	RRN—VAVCA	EHTPSWKLEK	PNRLWELDT-	TWYP-GAEP	PSYLDG-SLA	GDRGFDPFRL	GA	89
pcri_g5451. t1. p1	MNAALMINSTS	HLTAKSALCG	KQVSSARAQ-	PAR	VAQPLG	VR	AS	VVGDGPLGE-	RWYP-NAKV	PAYLEKADLP	GTYGFDPLGL	GV	81
Cr LHCA2		MAMLLK	SRVSAGVSR-	PS		-R	AT	VRVSASTRP-	MWYP-GATA	PAHLDG-SML	GDYGFDPLRL	GV	58
									* .	* :*: . :	* ****: *	*	
							_						
	Helix B	602 6	610			Helix C	606 708	609 609			Helix A	610 612 602	
pcri_g8716. t1. p1	VSDPNYDESR	LRWLLEGELY	NGRVANLAVV	GVLTVEAQGK	GPWWE I PGNL	NLYGAPYVAG	WGTHLAFAL	LEKKRLENFR	ETGOAGHFGA	ARFDPLDL1E	TNPLGTDYNR	QAEVRIVCRLA	226
pcri_g8718. t1. p1	VSDPNYDESR	LRWLLEGELY	NGRVANLAVV	GVLTVEAQGK	GPWWE I PGNL	NLYGAPYVAG	VVGGHLAFAL	LEKKRLENFR	ETGQAGHFGA	ARFDPLDLIE	TNPLGTDYNR	QAEVRNCRLA	226
pcri_g8720. t1. p1	VSDPNYDEAR	LRWLLEGELY	NGRLAMLAVV	GVLTVEAQGK	GPWWE I PGNL	NLFGTPYVVA	WGGHLAFAL	LEKKRLENFR	ETGEAGHFGA	ARFDPLDLTE	ANPLGTDYNR	QAEVRNCRLA	162
pcri_g8045.t1.p1	IDAPKYDEAR	LRWLLEGELY	NGRLAMLAVV	GVLTVEAQGK	GPWWE I PGNY	DYFGTQYVTG	WATHWFAL	LEKKRLENFR	EMGEAGHFGS	STFDPLGLTE	ANPLGTDYNR	QAEVRIVCRLA	221
KAA6421879.1_Trebouxia	SDSSQSR	IGWLLEGELY	NGRVANLAVV	GILTVEALGR	GPWWQAYNTS	SWPAGQYAAV	WAVHLAFAL	LEKORLENFE	EKGEAGHFGQ	APFDPAGLT-	DDYKR	QAEVRNARLG	218
BDA47009. 1_Coccomyxa_Obi	ATDSQSR	LGWLLEGELY	NGRLAMLAVV	GILTVEYLGK	GPWWTAPVAA	AIPVGTYVTG	WATHVTFAL	LEKKRLENWQ	EKGEAGHFGL	APFDPVGLT-	TDYNR	QAEVRINCRILA	205
BDA45444. 1_Coccomyxa_Obi	NPST	LPWLVEGELY	NGRVAMLAVA	GILLVEAAGL	GPWWTAPFRV	DWPL-PYWPG	VIVSHAIYAG	FEAKRFDNFQ	KYGEGGLLGF	VPFDPLNLR-	DDYKR	QSEVRNGRLA	196
pcri_g5451.t1.p1	KPEN	LLWYHEAEKT	NGRWAMAACA	GILFVELTKG	ANWVNAGAEA	DMVL-PLPTL	IGIEVVLFAL	LEYKRYEGFK	KTGKSGFLGS	YPFDPAGLD-	SPANR	EKEIKNGRLA	188
Cr_LHCA2	NKDN	LKWFREAELT	NGRWAMAAVV	GILFTDAVGL	PKFWTAGAEK	-YAL-DNQTL	AL I EVAVFAV	LEGKRYETYK	KTGETGFLSF	APFDPMGMK-	SEEMK	LKELKNGRLA	164
		:* *.*	*** ** * .	*:* . :	:		:*	:* :* : :.	: *: * :.	*** . :	:	* * **	
Helix F													
pori g8716.t1.p1	MLTFLGFSV0	AWVTGKGPIE	NAKDHLASPF	EANIFTYGOR	GTNVVAIFSA	FAAVMHIAEL	AREKKA			292			
pcri g8718. t1. p1	MLTFLGFSVQ	AWVTGKGPIE	NAKDHLASPF	EANIFTYGOR	GTNVVAIFSA	FAAVMHIAEL	ARQKNAEDKP	RSRNRTMSGA	S	307			
pcri g8720. t1. p1	MLTFLGFSVQ	AWVTGKGPIE	NAKDHLASPF	EANIFTYGOR	GTNVVAIFSA	FAAVMHIAEL	AREKKAEDKP	RSRNRTLSGS	S	243			
pcri g8045. t1. p1	MLTFLGFSVQ	AWVTGKGPIE	NAKDHLASPF	EANIFTYGOK	GTTVVGIFAL	LAGAVHIGEL	YRORNOTOOA	LGN-RTVRST		300			
KAA6421879.1 Trebouxia	MLAVGGFAVQ	AWVTGKGPIQ	NAIDHLKDPF	GONIFTOGEK	GLQVTGIFLV	FAVGLHLIEA	VRNSAQKKSN	GKSSRGSLA-		297			
BDA47009. 1_Coccomyxa Obi	MLAALGFATQ	AYVTGKGPLD	NAVDHLRDPF	GONIFTOGEK	GTTWAIFLA	FSVVLHAAEF	ARQAAASKGY	SKRGLA		281			
BDA45444. 1_Coccomyxa_Obi	MLAFVGFCSQ	AANTGKGPLE	NLKDHIADPT	HNNIFSSGVA	LEVTLAV-IA	ITVTPILLEA	RKQLSSGDKE	GDNFRALPFL		275			
pcri_g5451. t1. p1	MMAFVGFASV	YANRGMLP IE	AMMAHIADPG	QQNIFTTGQG	YP I TVAA-VA	LSIVPIIIEA	RQELDPDED-	EFTAIPW-		263			
Cr_LHCA2	MLAFLGFCSQ	AAVYGKGPIE	TLQLHLADPG	HNN I YTSSVG	PETAVTV-AV	LCVLPMIIEA	TKTLNPGKE-	SVPYFPWN	EPWNKV	246			
_	*:: **.	* *::	*: .*	**::.		: *	:						

図5:遠赤色光吸収型LHCと4回膜貫通型LHCIのアミノ酸配列比較

ナンキョクカワノリのゲノムからアサインされた4つのPc-frLHC遺伝子から推定されたアミノ酸配列(pcri_g8716.tl.pl, pcri_g8718.tl.pl, pcri_g8720.tl.pl, pcri_g8045.tl.pl)と相同性が高い*Trebouxia*および*Coccomyxa*のLHC(KAA6421879.1_Trebouxia, BDA47009.1_Coccomyxa_Obi, BDA45444.1_Coccomyxa_Obi)とナンキョクカワノリとクラミドモナスの4回膜貫通型LHCI(pcri_g5451.tl.pl, Cr_LHCA2)のアミノ酸配列をClustal omega(EMBL-EBI)によりアライメントした。配列上部の数字は配位するクロロフィルの番号、構造解析から膜貫通へリックス部分が特定されているものは色違いの影を付けた.Pc-frLHCのChl708はヒスチジン(H)に、4回膜貫通型LHCIのChl606はひとつ隣のグルタミン酸(E)に配位している.

ニム遺伝子をナンキョクカワノリが持つことが分かった. 4つのPc-frLHC遺伝子はひとつのクレードを形成し、モデ ル緑藻のLHCのうち4回膜貫通型LHCI (LHCA2) のクレー ドに最も近縁であった.このことから、Pc-frLHCは緑藻 の4回膜貫通型LHCIから進化したことが示唆された.更に, データベース上で検索し見つかったPc-frLHCと相同性の 高いアミノ酸配列を持つCoccomyxaとTrebouxia sp.のLHC を系統解析に加えたところ、4回膜貫通型LHCIとPc-frLHC の間のクレードに分類された. これらのLHCの機能は明 らかにされていないが、Pc-frLHCと同様に遠赤色光吸収 型のLHCである可能性がある. Pc-frLHCとCoccomyxaおよ びTrebouxiaのLHCを4回膜貫通型LHCIと共にアライメン トすると、Pc-frLHCにおいて3量体クロロフィル (Chl603-609-708)を形成するChl708が配位するアミノ酸(ヒスチジ ン,H)残基がCoccomyxaとTrebouxiaのLHCにも確認された (図5). 一方で4回膜貫通型LHCIではこのヒスチジンが中 性アミノ酸に置き換わっており、ひとつとなりのアミノ

酸(グルタミン酸, E) にChl606が配位していた. このこと から、4回膜貫通型LHCIからPc-frLHCが進化する過程で、 アミノ酸変異によりChl606がひとつC末側のアミノ酸へ移 動したことでChl708となり、Chl603-609との空間距離が近 くなったことで3量体Chl603-609-708が形成されたと考え られる(図6).

4回膜貫通型LHCIは原始緑藻オストレオコッカスも遺伝 子を持っており、PSI-LHCIの構造解析から、クラミドモ ナスの4回膜貫通型LHCIと同じ位置に結合していることが 分かっている(Ishii et al. 2023). このことから、4回膜貫通 型LHCIは緑藻の進化の初期に既に存在していたと考えら れる.一方でChl708が結合するヒスチジンはトレブクシア 藻綱の中にしか見つからないことから、4回膜貫通型LHCI からナンキョクカワノリが持つ遠赤色光吸収型LHCへの 進化はトレブクシア藻綱の中で起きた可能性がある.

トレブクシア藻綱(Lemieux et al. 2014)は陸上環境に生 育する気生藻が多く含まれるグループで, *Coccomyxaや*



図6:Pc-frLHCと4回膜貫通型LHCIサブユニットの構造比較 Pc-frLHC(緑, PDB:8HW1)とモデル緑藻クラミドモナスの4 回膜貫通型LHCI, Cr_LHCA2(マゼンタ, PDB:7dz8)の構造モ デルの比較.クロロフィルのマグネシウムをボールで示し、ク ロロフィルの番号を示した.遠赤色光吸収クロロフィルとして アサインされた3量体クロロフィルを点線で示した.

Trebouxia属はナンキョクカワノリと同様に南極の土壌な どから単離される他、地衣類の共生藻としても知られて いる、赤外線は水に吸収されるため水中では遠赤色光を 光合成に利用するメリットが少ないと考えられる、祖先型 の緑藻は水中で進化を遂げてきた、水深が深いほど、波 長の長い光は届きにくく青や緑色の光が残る場合が多い、 オゾン層が形成され、陸上環境に徐々に生物が進出し始 めたころ、藻類の一部も浅瀬や陸上環境へ生育範囲を広 げたと考えられる、浅瀬や陸上では、ナンキョクカワノ リのコロニーのように局所的に可視光より赤外線が卓越 するような微環境が形成されることがある、藻類マット 内部や土壌中は可視光が制限されるが紫外線のダメージ を避けられる点からメリットが大きかったと考えられる、 ナンキョクカワノリが有するPc-ftLHCはトレブクシア藻 綱が陸上へ進出する過程で獲得されたのかもしれない.

4.3 Pc-frLHCの発現制御メカニズム

ナンキョクカワノリの培養株は白色蛍光灯下ではPcftLHCをほとんど合成しないが,赤色LED(ピーク波長 650 nm)下へ置くとPc-ftLHCを合成する. RNA-seqによる 発現変動解析では、4つのPc-ftLHC遺伝子は赤色LED下に 移動後、1週間ごろまで発現が増加し、その後発現量が減 少した(Kosugi et al. 2024).一方,蛋白質はSDS-PAGEで 確認する限り発現が減少した後もすぐに分解されること

はなかった. Pc-frLHC遺伝子の共発現遺伝子を特定する ため、Pc-frLHC遺伝子の発現の挙動と相関性がある遺伝 子を検索したところ, 複数の発現関連因子や輸送関連因 子が抽出されたがPc-frLHC以外の光捕集蛋白質などの光 合成蛋白質は含まれなかった. 蛍光灯から赤色LED下へ移 動させることによって、LHCIIやLHCI、核にコードされ ている光化学系反応中心複合体のサブユニットの発現は 増加するが、Pc-frLHC遺伝子の発現が頭打ちになり減少 を始めた後も、一様に増加を続けていることがわかった. このことは、Pc-frLHCは他の光合成蛋白質とは異なる転 写制御を受けていることを示している. Pc-frLHC遺伝子 の共発現遺伝子として抽出されたものの中には、青色光 受容体として知られているクリプトクロムとフォトトロ ピンの関連遺伝子が複数含まれていた. 最近の研究から. 青色光がPc-frLHC遺伝子の発現を抑制する実験データが 得られている.一方で、赤色/遠赤色光受容体として知ら れているフィトクロムの遺伝子はナンキョクカワノリの ゲノム上には確認されなかった. ゲノムの網羅的解析か ら、トレブクシア藻綱を含む緑藻の多くのグループはフィ トクロム遺伝子を持たないことが示唆されている. 原始 緑藻はフィトクロムを持つものが確認されており、シア ノバクテリアと植物がフィトクロムを有することを考慮 すると、緑藻の一部は進化の過程でフィトクロムの遺伝 子を失った可能性が高い.長波長光が届きにくい海中で はフィトクロムを利用する必要性は少ないと思われるが. 陸上化を果たした気生藻は大量の赤外線が降り注ぐ環境 に晒されることになった. 今後, 赤外線が卓越する微環 境へ適応する過程で獲得されたと考えられるPc-frLHC遺 伝子の発現と翻訳制御機構を解明することにより、 トレ ブクシア藻綱の陸上進出を成功させた適応進化の一端を 明らかにすることができるかもしれない.

5. おわりに

地衣類や蘚類が非常に優れた光阻害防御機構を持つの に対して、光損傷を受けやすいナンキョクカワノリは層状 に重なったコロニーを形成することによって上層が遮光 の役目を果たし、可視光が制限されるコロニー内部の環 境において遠赤色光利用型光合成を発達させた.ナンキョ クカワノリの遠赤色光による光化学系IIの励起現象は、コ ロニー全体の光合成効率と純生産量を増加することに役 立っていると考えられ、南極におけるナンキョクカワノ リの生育優位性を高めている可能性がある.ナンキョク カワノリや他の真核藻類に見られる遠赤色光利用型の光 合成システムがどのような進化の経路を経て獲得された のかは興味深く、今後の生理学的、分子生物学的な研究 の進展が期待される.

謝辞

ここで紹介したナンキョクカワノリに関する研究は、国 立極地研究所の工藤 栄博士,伊村 智博士,中央大学の 小池 裕幸博士,兵庫県立大学の菓子野 康浩博士,東北 大学の柴田 穣博士,秋田県立大学の原 光二郎博士,東 京農業大学の高市 真一博士, 高エネルギー加速器研究機 構の千田 俊哉博士,川崎 政人博士,安達 成彦博士(現筑 波大学),守屋 俊夫博士,国立遺伝学研究所の豊田 敦博 士, 島根大学の大谷 修司博士, 岡山大学の高橋 裕一郎 博士,小澤 真一郎博士,基礎生物学研究所の亀井 保博 博士, 西出 浩世博士, 皆川 純博士, など多くの方との 共同研究により進められました.研究の一部は、科研費 [24770030, 17K19431, 22K06380 (小杉), 19H03187 (柴田), JP23H02504 (菓子野), JP21H05040, JP23H04960 (皆川), JP16H06279 (PAGS)],国立研究開発法人日本医療研究開 発機構(AMED)のBINDS[JP20am0101071, 22ama121001(千 田)]および住友財団[151376(小杉)]からの助成と、国立 極地研究所 [31-29 (菓子野), AAS6006 (小杉)], 自然科 学研究機構 基礎生物学研究所の共同研究支援[15-604, 17-702, 18-506, 19-704 (小杉)], 自然科学研究機構 生命創成 探究センター特別共同研究 [22-S6, 23-S7, 24-S4 (小杉)] お よびアストロバイオロジーセンターの支援を得て行われま した. 図1で使用した微気象観測データは第60次, 61次, 62次, 63次日本南極地域観測隊の協力の元, 取得されまし た. 深く御礼申し上げます.

参考文献

- Allakhverdiev, S.I., Murata, N. (2004) Environmental stress inhibits the synthesis de novo of proteins involved in the photodamage–repair cycle of Photosystem II in Synechocystis sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta* 1657: 23–32.
- Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molecul. Biol.* 50: 601–639.
- Bondarava, N., Gross, C.M., Mubarakshina, M., Golecki, J.R., Johnson, G.N., Krieger-Liszkay, A. (2010) Putative function of cytochrome b559 as a plastoquinol oxidase. *Physiol. Plant.*

138, 463-473.

- Broady, P.A. (1996) Diversity, distribution and dispersal of Antarctic terrestrial algae, *Biodivers. Conserv.* 5: 1307–1335.
- Convey, P. (2006) Antarctic Terrestrial Ecosystems:Responses to Environmental Change. *Polarforschung* 75: 101–111.
- Dolganov, N. A., Bhaya, D., Grossman, A. R. (1995).
 Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll *a*/*b* binding proteins of higher plants: evolution and regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 636–640. doi: 10.1073/pnas.92.2.636
- Döring, G., Renger, G. & Witt, H. T. (1969) Properties of the photoactive chlorophyll-aII in photosynthesis. Z. Naturforsch. 24: 1139–1143.
- Elrad, D., Niyogi, K. K., Grossman, A. R. (2002) A major lightharvesting polypeptide of photosystem II functions in thermal dissipation. *Plant Cell* 14: 1801–1816.
- Green, B. and Parson, W. W. (2003) Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis. (Springer Netherlands, 2003)
- Heber, U., Lange, O.L. and Shuvalov, V.A. (2006) Conservation and dissipation of light energy as complementary processes: homoiohydric and poikilohydric autotrophs. *J. Exp. Bot.* 57: 1211–1223.
- Hakala, M., Tuominen, I., Keranen, M., Tyystjärvi, T., Tyystjärvi, E. (2005) Evidence for the role of the oxygenevolving manganese complex in photoinhibition of Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1706: 68–80.
- Hakala, M., Rantamaki, S., Puputti, E.M., Tyystjärvi, T.,
 Tyystjärvi, E. (2006) Photoinhibition of manganese enzymes: insights into the mechanism of photosystem II photoinhibition. *Journal Exp. Bot.* 57: 1809–1816.
- Holdgate, M.W. (1964) Terrestrial ecology in the maritime Antarctic. *Biologie Antarctique*, (Carrick R., Eds.) Hermann, Paris, pp 181–194.
- Holdgate, M.W. (1970) *Antarctic Ecology, Vol. 2*, Academic Press, London.
- Holzinger, A., Karsten, U., Lütz, C. and Wiencke, C. (2006) Ultrastructure and photosynthesis in the supralittoral green macroalga *Prasiola crispa* from Spitsbergen (Norway) under UV exposure. *Phycologia*. 45: 168–177.
- Ishii, A., Shan, J., Sheng, X., Kim, E., Watanabe, A., Yokono, M., et al. (2023). The photosystem I supercomplex from a primordial green alga *Ostreococcus tauri* harbors three lightharvesting complex trimers. *Elife* 12: e84488. doi: 10.7554/ eLife.84488.sa2

- Jones, L.W., Kok, B. (1966) Photoinhibition of chloroplast reactions. I. Kinetics and action spectra. *Plant Physiol.* 41: 1037–1043.
- Jung, J., Kim, H.S. (1990) The chromophores as endogenous sensitizers involved in the photogeneration of singlet oxygen in spinach thylakoids. *Photochem. Photobiol.* 52: 1003–1009.
- Kok, B. (1956) On the inhibition of photosynthesis by intense light. *Biochim. Biophys. Acta* 21: 234–244.
- KoK, B. (1963) Significance of P700 as an intermediate in photosynthesis. *Proc. Int. Congr. Biochem.* 6: 73–81.
- Koziol, A. G. et al. (2007) Tracing the evolution of the lightharvesting antennae in chlorophyll *a/b*-containing organisms. *Plant Physiol.* 143: 1802–1816.
- Kosugi, M., Katashima, Y., Aikawa, S., Tanabe, Y., Kudoh, S., Kashino, Y., Koike, H. and Satoh, K. (2010) Comparative study on the photosynthetic properties of *Prasiola* (chlorophyceae) and *Nostoc* (cyanophyceae) from Antarctic and non-Antarctic sites. J. Phycol. 46: 466–476.
- Kosugi, M., Maruo, F., Inoue, T., Kurosawa, N., Kawamata, A., Koike, H., Kamei, Y., Kudoh, S., Imura, S. (2018) A comparative study of wavelength-dependent photoinactivation in photosystem II of drought-tolerant photosynthetic organisms in Antarctica and the potential risks of photoinhibition in the habitat. *Ann. Bot.* 122: 1263-1278
- 小杉真貴子,小池裕幸 (2019) 南極の陸生光合成生物にお ける光化学系 II の光不活性化波長依存性と生 育環境に おける光阻害の潜在的リスク 光合成研究 29 (1): 29-38.
- Kosugi, M., Ozawa, S.-I., Takahashi, Y., Kamei, Y., Itoh, S., Kudoh, S., et al. (2020) Red-shifted chlorophyll *a* bands allow uphill energy transfer to photosystem II reaction centers in an aerial green alga, *Prasiola crispa*, harvested in Antarctica. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg* 1861: 148139.
- 小杉真貴子,伊藤美空,小池裕幸(2020)南極露岩域に生 育するナンキョクカワノリの光合成適応戦略,光合成 研究 30 (1): 19-25.
- Kosugi, M., Kawasaki, M., Shibata, Y., Hara, K., Takaichi, S., Moriya, T., et al. (2023) Uphill energy transfer mechanism for photosynthesis in an Antarctic alga. *Nat. Commun.* 14: 730.
- Kosugi M, Ohtani S, Hara K, Toyoda A, Nishide H, Ozawa SI, Takahashi Y, Kashino Y, Kudoh S, Koike H, Minagawa J. (2024) Characterization of the far-red light absorbing lightharvesting chlorophyll *a/b* binding complex, a derivative of the distinctive Lhca gene family in green algae. *Front Plant Sci*.15:1409116.

- Laisk, A., Oja, V., Eichelmann, H. & Dall'Osto, L. (2014) Action spectra of photosystems II and I and quantum yield of photosynthesis in leaves in state 1. *Biochim. Biophys. Acta -Bioenerg.* 1837: 315–325.
- Lemieux, C., Otis, C., Turmel, M. (2014). Chloroplast phylogenomic analysis resolves deep-level relationships within the green algal class Trebouxiophyceae. *BMC Evol. Biol.* 14: 211. doi: 10.1186/s12862-014-0211-2
- Lud, D., Buma, A.G.J., Van de Poll, W., Moerdijk, T.C.W. and Huiskes, A.H.L. (2001) DNA damage and photosynthetic performance in the Antarctic terrestrial alga *Prasiola crispa ssp. Antarctica* (Chlorophyta) under manipulated UV-B radiation. J. Phycol. 37: 459–467.
- Ohnishi, N., Allakhverdiev, S.I., Takahashi, S., Higashi, S., Watanabe, M., Nishiyama, Y., Murata, N. (2005) Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: step 1 occurs at the oxygenevolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. *Biochemistry* 44: 8494–8499.
- Pérez-Ortega, S., Ríos Ade, L., Crespo, A. and Sancho, L.G. (2010) Symbiotic lifestyle and phylogenetic relationships of the bionts of *Mastodia tessellata* (Ascomycota, incertae sedis). *Am. J. Bot.* 97: 738–752.
- Moniz, M.B., Rindi, F., Novis, P.M., Broady, P.A. and Guiry, M.D. (2012) Molecular phylogeny of Antarctic *Prasiola* (Prasiolales, Trebouxiophyceae) reveals extensive cryptic diversity. *J. Phycol.* 48: 940–955.
- Minagawa, J., Takahashi, Y. (2004). Structure, function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins. *Photosynth Res.* 82: 241–263.
- Nishiyama, Y., Yamamoto, H., Allakhverdiev, S.I., Inaba, M., Yokota, A., Murata, N. (2001) Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *EMBO Journal* 20: 5587–5594.
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., Yamamoto, H., Hayashi, H., Murata, N. (2004) Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 43: 11321–1130.
- Sarvikas, P., Hakala, M., Patsikka, E., Tyystjärvi, T., Tyystjärvi,
 E. (2006) Action spectrum of photoinhibition in leaves of wild type and *npq1-2* and *npq4-1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47: 391–400.
- Santabarbara, S., Neverov, K.V., Garlaschi, F.M., Zucchelli, G., Jennings, R.C. (2001) Involvement of uncoupled antenna

chlorophylls in photoinhibition in thylakoids. *FEBS Lett.* 491: 109–113

- Satoh, K., Hirai, M., Nishio, J., Yamaji, Y, Kashino, Y. and Koike, H. (2002) Recovery of photosynthetic systems during rewetting is quite rapid in a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc commune. Plant Cell Physiol.* 43: 170–176.
- Sonoike, K. (2011) Photoinhibition of photosystem I. *Physiol. Plantarum* 142: 56–64.
- Sonoike, K., Terashima, I., Iwaki, M., Itoh, S. (1995) Destruction of photosystem I iron–sulfur centers in leaves of *Cucumis sativus* L. by weak illumination at chilling temperatures. *FEBS Lett.* 362: 235–238.
- Stauber, E. J., Fink, A., Markert, C., Kruse, O., Johanningmeier, U., Hippler, M. (2003) Proteomics of chlamydomonas reinhardtii light-harvesting proteins. *Eukaryotic Cell* 2: 978– 994. doi: 10.1128/EC.2.5.978-994.2003
- Takahashi, M., Asada, K. (1988) Superoxide production in aprotic interior of chloroplast thylakoids. Archives of Biochemistry and Biophysics 267: 714–722
- Terauds, A., Chown, S.L., Morgan, F., Peat, H.J., Watts, D.J., Keys, H., Convey, P. and Bergstrom, D.M. (2012) Conservation biogeography of the Antarctic. *Diversity and Distributions* 18: 726–741.
- Terauds, A. and Lee, J.R. (2016) Antarctic biogeography revisited: updating the Antarctic Conservation Biogeographic Regions. *Diversity and Distributions* 22: 836–840.
- Terashima, I., Funayama, S., Sonoike, K. (1994) The site of photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L. at low temperatures is photosystem I, not photosystem II. *Planta* 193: 300–306.
- Tokutsu, R., Teramoto, H., Takahashi, Y., Ono, T., Minagawa, J. (2004). The light-harvesting complex of photosystem I in chlamydomonas reinhardtii: protein composition, gene structures and phylogenic implications. *Plant Cell Physiol*. 45: 138–145.
- Tyystjärvi, T., Tuominen, I., Herranen, M., Aro, E.M., Tyystjarvi,
 E. (2002) Action spectrum of *psbA* gene transcription is similar to that of photoinhibition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* 516: 167–171.
- Tyystjärvi, E., Mäenpää, P., Aro, E.M. (1994) Mathematical modelling of photoinhibition and Photosystem II repair cycle.
 I. Photoinhibition and D1 protein degradation in vitro and in the absence of chloroplast protein synthesis in vivo. *Photosyn. Res.* 41: 439–449.

- Tyystjärvi, E., Aro, E.M. (1996) The rate constant of photoinhibition, measured in lincomycin-treated leaves, is directly proportional to light intensity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 93: 2213–2218.
- Wünschmann, G., Brand, J.J. (1992) Rapid turnover of a component required for photosynthesis explains temperature dependence and kinetics of photoinhibition in a cyanobacterium, *Synechococcus* 6301. *Planta* 186: 426–433
- Zulfugarov, I.S., Tovuu, A., Eu, Y.J., Dogsom, B., Poudyal, R.S., Nath, K., Hall, M., Banerjee, M., Yoon, U.C., Moon, Y.H., An, G., Jansson, S., Lee, C.H. (2014) Production of superoxide from Photosystem II in a rice (*Oryza sativa* L.) mutant lacking PsbS. *BMC Plant Biol.* 14: 242.

紅葉の仕組みとその役割について

北尾 光俊 1)

2024年11月28日受付, 2024年12月27日受理

紅葉はクロロフィルの分解と同時に赤い色素であるアントシアニンが集積することによって生じる. アントシアニンの働きとしては、1)遮光効果と抗酸化作用によって低温下での光ストレスから葉を守 り、窒素回収に貢献するという「光防御仮説」と、2)植食性昆虫に対して防御物質が多く窒素栄養が少 ないことを知らせるシグナルとして働くという「共進化仮説」が主流であった.本稿では、ハウチワカ エデの季節変化を調べた研究を例に取り、アントシアニンがデンプンの代替として光合成産物の消費 先となることで糖濃度の上昇と光阻害を抑え、窒素回収に貢献するという新しい説を紹介する.

Mechanisms and roles of autumn coloring

Mitsutoshi Kitao¹

Two major hypotheses regarding the role of anthocyanins are the 'photoprotection hypothesis' and the 'coevolution hypothesis.' The former suggests that anthocyanins function as a sunscreen and antioxidants, while the latter proposes that anthocyanins serve as a signal indicating a higher amount of defensive substances and poor nutrient conditions. Based on the seasonal changes in physiological traits of a typical anthocyanic tree species, *Acer japonicum*, we propose a novel hypothesis: anthocyanins act as alternative sinks for carbon and energy in response to a decline in starch synthesis, contributing to nitrogen resorption by circumventing photoinhibition.

キーワード:代替エネルギー消費,アントシアニン,窒素回収,光阻害,糖バッファー Alternative energy sink, anthocyanins, N resorption, photoinhibition, sugar buffer

1. はじめに

秋の山を眺めると、葉が紅く色づく木(紅葉)、黄色く なる木(黄葉)、そして緑のまま冬を迎える樹と様々であ り、それぞれが相まって美しい景観を織りなしている. とりわけ落葉広葉樹と常緑針葉樹が混交する北海道では、 長い冬を迎える前のひととき、色とりどりの木々が私た ちの目を楽しませてくれる.紅葉は、赤い色素であるア

連絡先 北尾 光俊 森林総合研究所北海道支所 〒 062-8516 札幌市豊平区羊ケ丘 7 番地 Tel: 011-590-5526 Email: kitao@ffpri.affrc.go.jp ントシアニンが集積すると同時に緑の色素であるクロロ フィルが消失することで生じる. 黄葉は, アントシアニ ンは集積せずにクロロフィルが消失し, 残存するカロテ ノイドの黄色が顕わになることで生じると考えられてい る. 紅葉の原因となるのはアントシアニンという赤色の 色素である. アントシアニンは糖を基質として合成され るフラボノイド化合物のアントシアニジンに糖が結合し た配糖体の総称であり, 結合する糖の種類や結合部位の

 森林総合研究所北海道支所 Hokkaido Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute, Sapporo, Japan 北尾 光俊

2021年11月4日

 2020年10月28日
 2021年10月28日

 2020年10月20日
 2021年10月28日

2020年11月2日

図1:ハウチワカエデの紅葉.森林総合研究所北海道支所樹木 園に生育する樹齢約50年,樹高約10mのハウチワカエデ成木. 2020年と2021年で紅葉と落葉のタイミングはほぼ同じであった.



図2:ハウチワカエデ紅葉期における葉柄部の顕微鏡切片(矢 崎未発表). 紅葉期(2020年10月26日)においても明確な離層の 発達は認められない.

違いによって数多くの種類がある.カエデ類の紅葉では 主としてアントシアニジンの1種であるシアニジンにグル コースが結合したCyanidin 3-O-glucoside が集積することが 報告されている(Iwashina and Murai, 2008).

紅葉する樹木の中でも特にカエデ類は鮮やかな赤色を 呈するものが多い.ちなみに「カエデ」というのはカエル の手(蛙手)に由来しており,切れ込みが浅いものが「カエ デ」(イタヤカエデ,ハウチワカエデなど),切れ込みの 深いものが「モミジ」(イロハモミジ,ヤマモミジなど)と 呼ばれている.本稿は,カエデ類の中でもひときわ美し く紅葉するハウチワカエデ(Acer japonicum)の生理機能の 季節変化をもとに紅葉の仕組みとその役割について概説 する(図1).

2. 転流阻害と紅葉

葉の糖含量とアントシアニンの集積には密接な関係が あることが知られている. インターネットで紅葉について 検索すると「秋になると離層形成により師管がブロックさ れることで転流が阻害され,葉の糖濃度が上昇すること でアントシアニンの集積が生じる」という解説が散見され る.事実,枝への環状剥皮処理(Murakami et al., 2008)や冷 却処理 (Schaberg et al., 2017)によって転流を抑制すること でアントシアニンの集積が誘導されることから,離層形 成による転流阻害が紅葉の一因であると考えられていた. ハウチワカエデを対象として紅葉期の離層形成について 顕微鏡観察を行ったところ,離層による師管のブロックは 確認されなかった(図2).サトウカエデ(Acer saccharum Marsh.)では赤い葉より黄色い葉の方が離層形成のタイミ ングが早いという研究例(Schaberg et al., 2008)も離層によ る師管のブロックがアントシアニンの集積を必ずしも誘 導するわけではないことを示唆している.さらに,ハウ チワカエデの葉のアントシアニン量と窒素含量の定量を 行ったところ,紅葉期の葉の窒素含量の低下(すなわち転 流による枝や幹などの貯蔵器官への窒素回収)とアントシ アニンの集積は同時に進行していることが明らかとなり (Kitao et al., 2024),転流阻害が生じることでアントシアニ ンの集積が誘導されるのではないことが示唆された.

3. 日の当たり方と紅葉

紅葉が鮮やかな赤色を呈するためには、日がよく当た り気温が低い方がよいと言われている.ハウチワカエデ の樹冠外側と樹冠内部の葉でアントシアニン量を比較す ると日当たりの良い樹冠外部の葉の方に顕著に高いアン トシアニンの集積が観察された.紅葉の初期段階では樹 冠を外側から眺めたときには全体が赤くなっているよう に見えるが、樹の下から上を眺めると日の光が差し込む ところだけが赤くなり、葉が重なり日の当たらないとこ ろは緑のままである(図3).このような光と紅葉との関 係はアントシアニンが光を遮ることで葉を守る「光防御仮 説(後述)」の根拠の一つとなっている.

活性酸素が葉緑体での光合成反応に付随して発生する ことを考えると葉緑体内に抗酸化作用のあるアントシア ニンを集積するほうが有利であるが、実際にはアントシ アニンは液胞内に局在し酸性条件で安定する.アントシ アニンが抗酸化物質として機能する際には、葉緑体内で



図3:樹冠の下から見上げたハウチワカエデの紅葉の様子(2020 年10月13日撮影)

生じた活性酸素を過酸化水素として液胞まで移動して消 去していると考えられている(Agati et al., 2020, 2021). 葉 内でのアントシアニンの分布は,表皮細胞に集積する場 合と表皮細胞の下に位置する柵状組織を中心に集積する 場合がある.常に赤色を呈するバジルの品種の場合は表 皮細胞にアントシアニンを集積する(Tattini et al., 2014). 一方で,ノルウェーカエデ(*Acer platanoides* L.)では,春先 には表皮細胞にアントシアニンが集積するが,秋の紅葉 期には葉肉細胞に集積する(Merzlyak et al., 2008).季節に よるアントシアニン集積部位の違いは,それぞれの時期 におけるアントシアニンの機能の違いを反映していると 考えられる.

4. アントシアニンを巡る2つの仮説

アントシアニンの働きとして2つの有名な仮説が 存在する(Archetti et al., 2009).一つ目は「光防御仮説 (photoprotection hypothesis)」と呼ばれるもので、アントシ アニンは光を遮る働きを持ち、強い光によるストレスを回 避して葉を守り、秋季の養分回収、特に窒素回収に貢献 すると考えられている.また、アントシアニンが持つ抗 酸化作用も強光による活性酸素の発生に対処するための 「光防御」に含まれる.もう一つの仮説は「共進化仮説(coevolution hypothesis)」と呼ばれるもので、アントシアニン の赤色は、植食性昆虫に対して窒素などの栄養が少ない ことや被食防衛物質が多いことをアピールして昆虫を忌 避するというものである.具体的には昆虫による秋の産 卵を避けることで、翌春の食害被害を抑える効果がある とされている.

北米ではヨーロッパと比べて日射量が多く、気温の変 動も大きいため紅葉する樹種が多いことを示して光防御 仮説の正当性を主張した論文 (Renner and Zohner, 2019) から端を発し、学術雑誌「New Phytologist」の誌面上で繰 り広げられた一連の議論は、2000年頃から始まったと言 われる光防御仮説(生理学者)と共進化仮説(生態学者)の 論争を垣間見ることとなり非常に興味深かった(Agati et al., 2021; Hughes et al., 2022; Pena-Novas and Archetti, 2020, 2021; Renner and Zohner, 2020). 光防御仮説の立場からは アントシアニンによる光防御が主たる役割であり、昆虫 の忌避は副産物であるとしている.一方で、共進化仮説 を唱える研究者はアントシアニンの遮光効果や抗酸化作 用は認めるものの, 個体内また樹種間でも赤い葉と黄色 い葉に窒素回収の違いがない(実際には窒素回収に貢献す るという結果と貢献しないという結果が混在する)という データをもって、アントシアニンによる光防御の重要性 を否定している.

筆者はどちらかというと光防御仮説を支持している. 庇陰条件で育てたハウチワカエデのポット苗を紅葉期に 異なるタイミングで全天環境(強光条件下)に移動するこ とで早期落葉による光阻害を想定した実験をおこなった 結果,窒素回収を盛んに行っている時に光阻害(活性酸素 による障害)が生じた場合には窒素回収に悪影響が出るこ とが示された(Kitao et al., 2022).このことは、光阻害の回 避が窒素回収を滞りなく遂行するために必須であること を示唆している.

光阻害という言葉は、狭義には長時間持続する光合成 活性の低下と定義されるが、広い意味では、光合成での 光エネルギー消費に対する過剰な光供給による活性酸素 の発生とそれに伴う光酸化障害も含む. 植物は光阻害を 回避するために幾重もの防御機構を備えている.よく知 られているのはキサントフィルサイクルが関わるアンテ ナクロロフィルでの熱放散であるが、光合成の電子伝達 自体もエネルギーの消費という側面から重要であり、ク ロロフィル量の減少や葉緑体の移動も吸収する光エネル ギーの低減に貢献する (Long et al., 1994). これらの防御機 構は相補的に働いており, 乾燥, 貧栄養, 大気汚染など のストレスがかかった際には、様々な防御機構の協調に よって光阻害の危険性が一定範囲に収まるように制御さ れている(Kitao et al., 2019). 逆に言うと, 光阻害が顕在化 するような状況は防御機構の制御範囲を越える極端なス トレスが掛かっていることを示している.

紅葉期の樹木においても、通常繰り返される秋季の季



図4:ハウチワカエデ成木の樹冠外部の葉(A)と樹冠内部の葉(B)のアントシアニン含量(C), 窒素含量(D),光化学系II活性(Fv/Fm,E)および糖:非構造炭水化物比(F)の季節変化.夏季 は2021年8月17日,紅葉期は2021年10月22日にサンプリングした葉の測定値である.写真(A,B) は2021年10月22日に撮影した.6月から11月の期間の日平均積算日射量は樹冠外部で18.5 mol m⁻² day⁻¹,樹冠内部で1.3 mol m⁻² day⁻¹であった.非構造炭水化物量は葉の糖含量とデンプン含 量の合計とした.(Kitao et al. 2024より作図)

節変化においては、紅葉、黄葉にかかわらず光阻害を回 避するための防御機構が働いているはずであり、紅葉と 黄葉の比較において光阻害や窒素回収の程度に違いがな くても不思議はない(図4D).例えば、同一樹種内での紅 葉、黄葉を考える際には、強い光が当たる葉(陽葉)が赤 くなり、当たる光が弱い葉(陰葉)は赤が薄く黄色い葉を 呈する傾向がある(図4A,B).陽葉に集積するアントシ アニンは光防御を担うが、陰葉ではそもそも当たる光が 弱いためアントシアニンがなくても光阻害を受けにくい (図4C,E,*光化学系IIの活性を示すF,/Fmの低下が光阻 害の指標となる).結果として、樹冠内の光環境の違いに 関わらず、同じように光阻害が進行し、窒素の回収も同 じように進行することになる.樹種間での紅葉と黄葉の 違いについては後ほど考察する.

5. 糖・デンプンの季節変化

「光防御仮説」と「共進化仮説」とは異なるアントシアニ ンの働きとして、糖を消費することで糖濃度の上昇を抑 えて老化の進行を遅らせるとともに、エネルギーの消費先 として光阻害を回避する役割が提唱されている(Davies et al., 2022; Landi et al., 2015; Lo Piccolo et al., 2018; Lo Piccolo and Landi, 2021). アントシアニンの合成には糖が基質と して必要なこと、さらに配糖体の形で液胞内に存在する ことから、アントシアニンは光合成で生じる糖の有効な 消費先として考えられている. また、糖を消費すること で光合成の流れを滞らせないだけでなく,アントシアニ ン合成のためにATPやNADPHを消費することで,さらな るエネルギー消費にも貢献する(Soubeyrand et al., 2018).

筆者は糖の挙動だけではなく、秋のデンプンの挙動が紅 葉にとって重要であると考えている。落葉樹では秋にな るとデンプンの分解が進み、糖の濃度が上昇する(Keskitalo et al., 2005; Kim, 2019). デンプンの分解によってもたら される糖濃度の上昇にはエネルギー供給とともに老化の 誘因となるシグナルとしての働きがあると考えられてい る (Kim, 2019; Ono et al., 2001; Wingler et al., 2006). 常緑針 葉樹では冬季の耐凍性を高めるためにデンプンから糖へ の変換が生じ、冬季間はデンプン濃度がほぼゼロとなる ことが知られている (Larcher, 1995). 一方で、冬季の休眠 状態から回復した針葉樹の葉は新しい葉を作るまでの間, 光合成によって得た光合成産物をデンプンとして葉内に 溜め込むため、開葉直前は年間を通してもっともデンプ ン含量が高くなる時期となる (Kitao et al., 2004). デンプ ンは不溶性で生理機能に影響を与えないため光合成産物 の貯蔵物質として有用であり、バッファー的に必要に応 じた糖の供給源として様々な環境ストレスへの適応に関 わっている (Thalmann and Santelia, 2017).

ハウチワカエデの葉の糖・デンプン含量の季節変化を調 べた結果では、10月初旬からデンプン量の低下が見られ、 アントシアニンの集積が進み紅葉化する10月下旬にはデ ンプン量はほぼゼロになることが明らかとなった.一方 で、糖については10月初旬より上昇を始めるが、アント
シアニンの集積が顕在化する10月下旬には若干の低下が 見られた.結果として,糖の非構造炭水化物(糖+デンプ ン) に対する比率(糖:非構造炭水化物比)は10月下旬には ほぼ1となり、糖ばかりが存在する状態となっていた(図 4F). 糖・デンプン含量の絶対値は光環境により顕著な 違いがあるが(日当たりのよい葉の方が糖・デンプン量が 多い傾向)、秋季における糖:非構造炭水化物比の季節変 化は、樹冠内の光環境によらず同じ傾向を示した.また、 対象としたハウチワカエデ成木で2020年と2021年で同じ タイミングで上昇が見られただけでなく、異なる光環境 で生育したハウチワカエデのポット苗でも同じタイミン グで糖:非構造炭水化物比が紅葉期に上昇していくこと が明らかとなった、さらに、遺伝子発現解析の結果、光 環境の異なる樹冠外部と内部の葉で同じタイミングでデ ンプン分解に関連する酵素の遺伝子発現量が増加し、合 成に関わる酵素の遺伝子発現量が低下することが明らか となった.以上のことから、デンプン合成の停止と分解 の促進は光環境にかかわらず、季節的に厳密に制御され た生理反応と考えることができる.

樹冠外部の日がよく当たる葉では、デンプン合成が抑 えられた状態でも光合成による糖の生成とATPやNADPH などの化学エネルギー物質の生成は続くため、デンプン の代替物質としてアントシアニン合成が促進されたと考 えられる.一方で、日当たりの悪い樹冠内部では糖の生 成とATPやNADPHの生成速度が遅いため、顕著なアント シアニンの集積は見られなかったと考えられる.前述の ノルウェーカエデで観察された季節によるアントシアニ ン集積部位の違いは (Merzlyak et al., 2008)、若い葉では表 皮細胞に集積して遮光効果を発揮し、老化した葉では光 合成を盛んに行う柵状組織でデンプンの代替としてアン トシアニンの集積が見られたと考えるとつじつまが合う. アントシアニンは遮光、抗酸化、デンプンの代替などの 複数の機能を持ち、それぞれが状況に応じて相補的に働 いていると考えるのが妥当であろう.

6. フラボノイドの役割

秋季のデンプンの合成停止と分解促進による糖への転 換は紅葉か黄葉かにかかわらず生じており,落葉広葉樹 の窒素回収のためのエネルギー供給と老化の誘因となる シグナルの役割を担っていると考えられる.デンプン合 成が停止することで生じる光阻害の危険性と糖濃度上昇 による早期落葉に対しては、アントシアニンを合成せず 葉が黄色くなる樹種でも何らかの対応が必要となるはず

である.二次代謝産物であるフラボノイド化合物にはア ントシアニン、フラボノールを始めとして様々な種類が あり, 抗酸化作用や紫外線の低減効果によって環境スト レスに対する植物の防御機能に関与すると考えられてき た(Agati et al., 2024). 一方で、フラボノイド化合物は合成 経路を共有し, 配糖体の形で液胞内に遍在することから, アントシアニン以外のフラボノイド化合物も糖濃度調節 や光阻害回避の機能を有すると予想される (Hernández and Van Breusegem, 2010). 例えば、フラボノイド化合物の一 種であるフラボノールは白から淡黄色の色素であり、ク ロロフィルやカロテノイドの色に隠れてしまうため葉色 に対する影響はほとんどない. 一方で、フラボノールに ついては葉の老化に伴い増加する傾向がSilver birch (Betula pendula) やブドウ (Vitus vinifera L.) において報告されてい る (Bouderias et al., 2020; Mattila et al., 2018, 2021). 紅葉と 黄葉の違いにかかわらずフラボノイド化合物がデンプン の代替として働いているのであれば、紅葉する樹種(アン トシアニン合成)と黄葉する樹種(例えばフラボノール合 成)を比較した際にアントシアニンの光防御作用.特に窒 素回収への貢献が顕在化しなかったとしても不思議では ない. 以上を踏まえて, 筆者は落葉広葉樹すべてに共通 するフラボノイドの機能として「デンプン合成停止後の余 剰エネルギー消費のための代替経路の確保と糖濃度の抑 制」が存在すると考えている.この仮説を検証するために, 様々な落葉広葉樹を対象としてアントシアニンとフラボ ノールをはじめとするフラボノイド化合物の量的評価を おこなうことが今後の研究課題である.

謝辞

本稿は、JSPS科研費JP20H03036、JP20H03017、JP23H 02262、JP24K01806の助成を受けて実施した研究成果の一 部を取りまとめたものです.また、本稿執筆の貴重な機 会を与えていただいた北海道大学低温科学研究所の田中 亮一教授に心から感謝申し上げます.

参考文献

- Agati, G., Brunetti, C., Fini, A., Gori, A., Guidi, L., Landi, M., et al. (2020) Are flavonoids effective antioxidants in plants? Twenty years of our investigation. *Antioxidants*. 9: 1098.
- Agati, G., Brunetti, C., dos Santos Nascimento, L.B., Gori,A., Lo Piccolo, E., and Tattini, M. (2024) Antioxidantsby nature: an ancient feature at the heart of flavonoids'

multifunctionality. *New Phytologist*. https://doi.org/10.1111/ nph.20195.

- Agati, G., Guidi, L., Landi, M., and Tattini, M. (2021) Anthocyanins in photoprotection: knowing the actors in play to solve this complex ecophysiological issue. *New Phytologist.* 232: 2228–2235.
- Archetti, M., Döring, T.F., Hagen, S.B., Hughes, N.M., Leather, S.R., Lee, D.W., et al. (2009) Unravelling the evolution of autumn colours: an interdisciplinary approach. *Trends in Ecology and Evolution*. 24: 166–173.
- Bouderias, S., Teszlák, P., Jakab, G., and Kőrösi, L. (2020) Age- and season-dependent pattern of flavonol glycosides in Cabernet Sauvignon grapevine leaves. *Sci Rep.* 10: 14241.
- Davies, K.M., Landi, M., van Klink, J.W., Schwinn, K.E., Brummell, D.A., Albert, N.W., et al. (2022) Evolution and function of red pigmentation in land plants. *Annals of Botany*. 130: 613–636.
- Hernández, I., and Van Breusegem, F. (2010) Opinion on the possible role of flavonoids as energy escape valves: Novel tools for nature's Swiss army knife? *Plant Science*. 179: 297–301.
- Hughes, N.M., George, C.O., Gumpman, C.B., and Neufeld, H.S. (2022) Coevolution and photoprotection as complementary hypotheses for autumn leaf reddening: a nutrient-centered perspective. *New Phytologist.* 233: 22–29.
- Iwashina, T., and Murai, Y. (2008) Quantitative variation of anthocyanins and other flavonoids in autumn leaves of *Acer palmatum. Bull Natl Mus Nat Sci, Ser B.* 34: 53–62.
- Keskitalo, J., Bergquist, G., Gardeström, P., and Jansson, S. (2005) A cellular timetable of autumn senescence. *Plant Physiology*. 139: 1635–1648.
- Kim, J. (2019) Sugar metabolism as input signals and fuel for leaf senescence. *Genes Genom.* 41: 737–746.
- Kitao, M., Qu, L., Koike, T., Tobita, H., and Maruyama, Y. (2004) Increased susceptibility to photoinhibition in pre-existing needles experiencing low temperature at spring budbreak in Sakhalin spruce (*Picea glehnii*) seedlings. *Physiologia Plantarum.* 122: 226–232.
- Kitao, M., Tobita, H., Kitaoka, S., Harayama, H., Yazaki, K., Komatsu, M., et al. (2019) Light energy partitioning under various environmental stresses combined with elevated CO₂ in three deciduous broadleaf tree species in Japan. *Climate*. 7: 79.

Kitao, M., Yazaki, K., Tobita, H., Agathokleous, E., Kishimoto, J., Takabayashi, A., et al. (2022) Exposure to strong irradiance

exacerbates photoinhibition and suppresses N resorption during leaf senescence in shade-grown seedlings of fullmoon maple (*Acer japonicum*). *Frontiers in Plant Science*. 13: 1006413.

- Kitao, M., Yazaki, K., Tobita, H., Agathokleous, E., Kishimoto, J., Takabayashi, A., et al. (2024) Anthocyanins act as a sugar-buffer and an alternative electron sink in response to starch depletion during leaf senescence: a case study on a typical anthocyanic tree species, *Acer japonicum. Journal of Experimental Botany*. 75: 3521–3541.
- Landi, M., Tattini, M., and Gould, K.S. (2015) Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions. *Environmental and Experimental Botany.*, *Functional roles of secondary metabolites in plantenvironment interactions* 119: 4–17.
- Larcher, W. (1995) Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups, 3rd edition. ed. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Lo Piccolo, E., and Landi, M. (2021) Red-leafed species for urban "greening" in the age of global climate change. *Journal* of Forestry Research. 32: 151–159.
- Lo Piccolo, E., Landi, M., Pellegrini, E., Agati, G., Giordano, C., Giordani, T., et al. (2018) Multiple consequences induced by epidermally-located anthocyanins in young, mature and senescent leaves of *Prunus. Frontiers in Plant Science*. 9: 917.
- Long, S.P., Humphries, S., and Falkowski, P.G. (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 45: 633–662.
- Mattila, H., Sotoudehnia, P., Kuuslampi, T., Stracke, R., Mishra, K.B., and Tyystjärvi, E. (2021) Singlet oxygen, flavonols and photoinhibition in green and senescing silver birch leaves. *Trees.* 35: 1267–1282.
- Mattila, H., Valev, D., Havurinne, V., Khorobrykh, S., Virtanen, O., Antinluoma, M., et al. (2018) Degradation of chlorophyll and synthesis of flavonols during autumn senescence-the story told by individual leaves. *AoB PLANTS*. 10.
- Merzlyak, M.N., Chivkunova, O.B., Solovchenko, A.E., and Naqvi, K.R. (2008) Light absorption by anthocyanins in juvenile, stressed, and senescing leaves. *Journal of Experimental Botany*. 59: 3903–3911.
- Murakami, P.F., Schaberg, P.G., and Shane, J.B. (2008) Stem girdling manipulates leaf sugar concentrations and anthocyanin expression in sugar maple trees during autumn. *Tree Physiology*. 28: 1467–1473.

- Ono, K., Nishi, Y., Watanabe, A., and Terashima, I. (2001) Possible mechanisms of adaptive leaf senescence. *Plant Biology*. 3: 234–243.
- Pena-Novas, I., and Archetti, M. (2020) Biogeography and evidence for adaptive explanations of autumn colors. *New Phytologist.* 228: 809–813.
- Pena-Novas, I., and Archetti, M. (2021) Missing evidence for the photoprotection hypothesis of autumn colours. *New Phytologist.* 232: 2236–2237.
- Renner, S.S., and Zohner, C.M. (2019) The occurrence of red and yellow autumn leaves explained by regional differences in insolation and temperature. *New Phytologist.* 224: 1464–1471.
- Renner, S.S., and Zohner, C.M. (2020) Further analysis of 1532 deciduous woody species from North America, Europe, and Asia supports continental-scale differences in red autumn colouration. *New Phytologist.* 228: 814–815.
- Schaberg, P.G., Murakami, P.F., Turner, M.R., Heitz, H.K., Hawley, G.J. (2008) Association of red coloration with senescence of sugar maple leaves in autumn. *Trees.* 22: 573–578.
- Schaberg, P.G., Murakami, P.F., Butnor, J.R., and Hawley, G.J. (2017) Experimental branch cooling increases foliar sugar and anthocyanin concentrations in sugar maple at the end of the growing season. *Canadian Journal of Forest Research*. 47: 696–701.
- Soubeyrand, E., Colombié, S., Beauvoit, B., Dai, Z., Cluzet, S., Hilbert, G., et al. (2018) Constraint-based modeling highlights cell energy, redox status and α-ketoglutarate availability as metabolic drivers for anthocyanin accumulation in grape cells under nitrogen limitation. *Frontiers in Plant Science*. 9: 421. doi: 10.3389/fpls.2018.00421.
- Tattini, M., Landi, M., Brunetti, C., Giordano, C., Remorini, D., Gould, K.S., et al. (2014) Epidermal coumaroyl anthocyanins protect sweet basil against excess light stress: multiple consequences of light attenuation. *Physiologia Plantarum*. 152: 585–598.
- Thalmann, M., and Santelia, D. (2017) Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytologist*. 214: 943–951.
- Wingler, A., Purdy, S., MacLean, J.A., and Pourtau, N. (2006) The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany.* 57: 391–399.

冬季の常緑植物における持続的熱放散

叶 子豪^{1), 2)}, 田中 亮一¹⁾

2024年12月27日受付, 2025年1月7日受理

寒冷圏の常緑植物は、冬期は、光合成電子伝達を抑制する必要がある。光化学系IIを夏季の半分程 度までに減らすことで電子伝達を抑制している植物も存在するが、もっとも重要なのは光化学系IIに おいて励起エネルギーを熱として放散し、電子伝達を抑制することである。冬季の常緑植物において 持続的に活性化している熱放散(持続的熱放散)の分子メカニズムについて、本稿では、提唱されてい る主要な6つの仮説、すなわち、光阻害、スピルオーバー、ゼアキサンチンによる熱放散、Early lightinduced proteinによる熱放散、電荷再結合について概説する。

Sustained energy dissipation in overwintering evergreens

Zihao Ye^{1, 2}. Ryouichi Tanaka¹

Evergreen plants in cold regions need to suppress photosynthetic electron transport during winter. Some plants achieve this by reducing the level of photosystem II (PSII) to about half of its summer level, but the most important mechanism in general is increasing the dissipation of excitation energy as heat in PSII, thereby suppressing electron transport. This article summarizes recent progress toward understanding the molecular mechanisms of thermal dissipation (sustained heat dissipation) that are continuously active in evergreen plants during winter, focusing on six main hypotheses: photoinhibition, spillover, zeaxanthin-dependent thermal dissipation, thermal dissipation by Early light-induced protein, and charge recombination.

キーワード:常緑植物,葉緑体,光化学系 chloroplast, evergreen, photosystem

1. 冬季の常緑植物における光合成活性の調節

1.1 冬季に針葉樹は光合成をしているのか?

冒頭から大雑把な質問で申し訳ないが,植物科学に携 わる研究者のみなさんは「冬季に常緑樹は光合成をしてい るのか」と聞かれることはないだろうか?このように誰か に聞かれたら,我々は,「みなさんが思っているほど,光 合成はしていませんよ.とくに札幌ぐらいの気温だと1月,

連絡先

田中 亮一 北海道大学・低温科学研究所 〒 060-0819 札幌市北区北 19 条西 8 丁目 Tel: 011-706-5493 Email: rtanaka@lowtem.hokudai.ac.jp 2月はほとんど光合成はしていません.」と答えるようにしている.実際,1月,2月の北大構内のニホンイチイ(*Taxus cuspidata*)を例に取ると二酸化炭素の吸収速度は,検出限界以下で(Tanaka,2007)また,蛍光の測定によって見積もった光化学系IIの最大量子収率も大きく低下している(図1).

このように答えると,次に聞かれるのは,「それでは常 緑針葉樹が緑色を保つのは何のためなのか?」という質問 である.この質問に対する答えは(研究者の視点によって,

- 北海道大学・低温科学研究所 Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan
- 北海道大学大学院環境科学院 Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan



図1:イチイのFv/Fm (光化学系IIの最大量子収率)の年間変化 北大のキャンパス内のニホンイチイ (*T. cuspidata*)の3本の成木の南側 (Sun side:赤)および北 側(Shade side:青)の光化学系IIの最大量子収率をMultispeQ (PhotosynQ Inc., USA)を用いて測定 した. Ye et al., 2025のデータをもとに再解析をしてプロットをした.

答え方は異なると思われるが)「常緑針葉樹は気温が少し 上がればすぐに(数時間以内に)光合成をすることができ るが,落葉樹は一度,葉を落としてしまうとすぐに光合 成をすることはできない.だから,気温が低い地域では, 年間の光合成量を考えると(春先や初冬での光合成を考え ると)常緑針葉樹が落葉樹に対してアドバンテージを持つ ケースも多い.」となる.実際に上述のニホンイチイの例 では,野外のニホンイチイの枝を20°C程度の室温に持っ てくると3時間程度で二酸化炭素の吸収活性が検出される ようになる(Tanaka, 2007).

では、上述のように冬季に常緑針葉樹の光合成活性が 抑制されているのはなぜであろうか?それは、光合成の 電子伝達において、電子を受け取る分子が不足するため と考えられる。光化学系IIの水分子の分解で始まる電子伝 達は、光化学系Iを経由するいくつもの過程を経て、通常 はNADP⁺に電子が渡される(図2).光合成反応が活発な条 件では、NADPHの多くはカルビン反応などの代謝経路で 消費されるが、低温下ではこれらの代謝経路の活性が低 下し、NADP⁺を十分に消費できなくなる。このような条 件では、光化学系Iから電子の行き場がなくなり、その結果、 電子と酸素分子が反応する確率が上昇し、活性酸素が発 生すると考えられる。活性酸素の発生する量が上昇する と、葉緑体内のさまざまな分子が酸化され、機能を失う と考えられる。

常緑植物の場合,クロロフィルがあれば気温に関わらず 光の吸収が起こるため,低温下でエネルギーの入力(光の 吸収)と出力(電子をNADP⁺に渡す)のインバランスが生じ る可能性は高い. これを防ぐためには、エネルギーの入 力を抑える(つまり光化学系IIを分解する、光化学系IIの活 性を下げる)か、出力をあげる (NADP⁺以外の電子受容体 を利用して,光化学系Iに電子がたまらないようにする)必 要がある.なお、話はそれるが、この場合、光化学系Iの 循環的電子伝達の活性を上げることは、(結局は電子は光 化学系Iに戻ってしまうので)エネルギーのインバランスの 根本的な解決にならない. 裸子植物にはflavodiiron protein (FLV) とよばれるタンパク質が存在し、光化学系Iのアク セプター側(ストロマ側)で酸素分子を水に還元している ことが報告されているが (Bag et al., 2023), 電子伝達速度 が高い場合はFLVのキャパシティを超えることも十分に想 定されるため、やはり冬季の常緑樹の光化学系IIの分解あ るいは活性の制御によって、電子伝達速度を抑える必要 があると思われる.

1.2 光化学系IIの量の減少

光化学系IIの減少は冬季の常緑植物で広く報告されて いる(表1に本文中の植物名の英名,和名の対応表を記 載). ヨーロッパアカマツ(*Pinus sylvestris*: Ensminger et al., 2004; Ivanov et al., 2005; Ottander et al., 1995), クマコケモ モ(*Arctostaphylos uva-ursi*: C. Ryan Zarter et al., 2006a), バ ルサムモミ(*Abies balsamea*: Verhoeven et al., 2009), コント ルタマツ(*Pinus contorta*: Verhoeven et al., 2009), ストロー ブマツ(*Pinus strobus*: Verhoeven and Kornkven, 2023), シロ



光化学系IIはD1, D2, CP47, CP43などのサブユニットから構成されるコア複合体とLHCIIな どLHCスーパーファミリーのタンパク質から構成される周辺アンテナからなる.春から秋に かけて,光合成活性が活発な時期は水分子の分解によって得られた電子は最終的にはNADP⁺ が受け取るが,冬季にNADP⁺が不足すると酸素分子が電子を受け取り,活性酸素となるリス クが高まる.そのため,冬季の低温下では光化学系IIの活性を抑える必要がある.

トウヒ (*Picea glauca*: Verhoeven and Kornkven, 2023) といっ た常緑樹では、光化学系IIのコア複合体のD1タンパク質は 夏や秋と比べて、顕著に減少している.一方、ベイマツ (*Pseudotsuga menziesii*: Ebbert et al., 2005) や 著者らの研究 ではニホンイチイでは、冬季でも目立ったD1タンパク質 の減少は見られなかった (Ye et al., 2025). このような結果 を総合すると、冬季の常緑樹の応答は、光化学系IIの減少 を伴うわけではないと考えて良さそうである.

ただし、上述の研究でD1タンパク質の定量に用いられ たイムノブロッティングは、そもそも定量という点では 精度が悪い手法であり,実験間の比較が難しい.この点で, 上述の植物のうち、冬季のストローブマツ、バルサムモミ においては、光化学系IIのコア複合体のD1タンパク質は減 少しているものの、周辺アンテナ複合体のLHCIIは減少し ておらず、クロロフィルの減少も見られない (Verhoeven et al., 2009) という結果が得られているが、このような場合 は、クロロフィルを結合する何らかのタンパク質が増加 しているか、あるいは、D1タンパク質の定量に誤差があ るか、どちらかの可能性を検討しなければならない、著 者らの研究室では,現在,定量の安定性を高めたイムノ ブロッティングの手法を開発中であるが、D1タンパク質 のように20%-50%程度の小さな変動を議論するためには、 より安定性・再現性の高い定量的イムノブロッティング の手法が必要であると考える.

1.3 持続的熱放散とは

上述のように、D1や光化学系IIは、札幌のニホンイチイ の成木のようにほとんど減らないものから、夏と比べて

1/10程度まで減少するスウェーデン Umeåのヨーロッパア カマツのようなものもある (Ottander et al., 1995). いずれ にせよ、カルビンサイクルなどの活性がほとんどない状 況では吸収した光エネルギーの大部分を熱として放散す る必要があると考えられる. 冬季に光化学系Ⅱの量子収率 が低下する例は多数の植物で知られており、吸収した光 の持続的な冬の放散 (Öquist and Hüner, 2003), あるいは, 持続的なエネルギー放散(A. Verhoeven, 2013), 持続的な非 **光化学的消光** (Grebe et al., 2020) などと呼ばれている.本 稿では(光合成における)持続的熱放散とよぶことにする. いずれも、冬季に観察され、気温の上昇によって、数時 間から数日で解消される(あるいは減少する)のが特徴で ある (Grebe et al., 2020; Tanaka, 2007; Verhoeven, 2013). 興 味深いことに、冬季間は量子収率と気温が直線的な関係 を示すが、秋にはそのような関係は見られない(図3).こ の量子収率の減少は、単純に気温によるカルビンサイク ルの活性低下に伴う、電子伝達のシンクの不足では説明 がつかないのではないかと思われる. 我々は持続的熱放 散のメカニズムにはなんらかの温度依存的な制御が含ま れるのではないかと推測している.

2. 持続的熱放散のメカニズム

以下の章では,現在,提唱されている持続的熱放散の メカニズムに関する6つの仮説(図4)について概説する.

2.1 光阻害による持続的熱放散の可能性

光阻害は光によって誘導される光化学系IIの不活性化で、葉緑体のタンパク質合成なしには回復しない不可逆



図3:気温とY(II)(光化学系IIの量子収率)の相関

北大のキャンパス内のニホンイチイの成木の北側の葉の光化学系IIの量子収率をMultispeQ (PhotosynQ Inc., USA)を用いて年間を通して測定し、測定時の気温とY(II)をプロットした. Ye et al., 2025の図2(B)を再掲. 各点の色は測定時の月を表す. 気温がおよそ15℃以下の場合は気 温とY(II)の相関が見られるが、11月と12月前半(図中の左上の丸で囲んだ部分)は気温が低く なってもY(II)は高く保たれている.

的なものをさす(Tyystjärvi, 2013). 一般的には, 長時間(数 時間以上)に渡って光化学系IIの活性が低下する場合やD1 タンパク質の減少が観察される場合に光阻害が起きてい る、と判断されることが多い.光阻害においては、(1)光 化学系IIにある種のダメージが起こって不活性化した後, (2) 光化学系のD1タンパク質の分解が起こり、(3) その後、 D1タンパク質が再合成されることにより、光化学系IIの活 性が回復すると考えられる (Nawrocki et al., 2021). この過 程において、光化学系IIにどのようなダメージ(あるいは 変化)が起こることによって光化学系IIが不活性化するの か、という点は現在でもさまざまな議論があり、明らか になっていない (Nawrocki et al., 2021; Tyystjärvi, 2013). 持 続的熱放散の研究では、そもそも、光化学系IIの活性低 下とD1タンパク質の減少が見られた場合には光阻害が起 きて持続的熱放散が起きていると判断されるようである (Ottander et al., 1995). ただし, 上述のようにイムノブロッ ティングの定量性には種々の問題があるため、D1タンパ ク質だけが減っているのか、それとも光化学系IIのコア複 合体全体が減っているのかという判断は難しいように思 われる. 顕著なD1の減少なしにも持続的熱放散は起きる と思われるが、光阻害の初期に起こると考えられる光化学 系IIの不活性化については、持続的熱放散の際に必ず見ら れるのかという点は不明である. そもそも, 光阻害に特 徴的な光化学系IIの不活性化を定量的に検出する方法も確 立されていないので、光阻害であるか、それ以外のメカニ ズムなのか、それを検証する方法から考える必要がある. 一つ考えられるのは、Decay-associated spectra (DAS: クロ ロフィル蛍光の減衰スペクトル)を解析するという方法で ある. 我々が秋と冬のイチイのチラコイドのDASを比較 したところ, 30 psから40 psの速い領域で, 周辺アンテナ (LHC)からの強い蛍光の減衰が観察された(Ye et al., 2025). 一方, Nawrockiら (2021) のChlamydomonas reinhardtiiでの 解析では、光阻害の後で蛍光寿命が短くなっていたにも 関わらず、DASに変化はみられなかった. この結果は、 光阻害の場合は反応中心近傍で熱放散が起きていて、常 緑樹の持続的熱放散は周辺アンテナで起きていると解釈 される. ただし、これらの結果のみから持続的熱放散は 光阻害でないと結論づけるのは早計であり、今後、さま ざまな条件、生物で光阻害と持続的熱放散のDASを比較 してみる必要があると思われる.

2.2 LHCIIおよびPsbSタンパク質のリン酸化

光化学系IIの周辺アンテナにおいて熱放散を誘導するタンパク質としては、PsbSが知られている. PsbSはLHCIIと



図4:持続的熱放散の分子メカニズムに関する6つの仮説

同じスーパーファミリーに属するタンパク質で、構造的 にはLHCIIとの類似性を示すが、ほとんど光合成色素を結 合していないという点で、LHCIIとは根本的な違いがある. PsbSは二量体化するとクロロフィルaを一分子結合するこ とが報告されているが、カロテノイドなどを結合してい ないので、それ自身が励起エネルギーを放散するのでは なく、LHCIIなどの構造変化を誘導することで熱放散を誘 導すると考えられている (Fan et al., 2015). Grebeら (2020) はドイツトウヒ (Picea abies) において持続的熱放散が見ら れる時期にLHCに3つのリン酸基が添加されること、また、 PsbSのリン酸化が見られることを質量分析によって見出 した. 興味深いことに、これらのリン酸化はドイツトウ ヒの葉を室温に戻すと持続的熱放散の消失とともに消失 した. これ以外にも、リン酸化タンパク質に対する抗体 を用いて持続的熱放散とベイマツのD1のリン酸化の相関 が示されており (Verhoeven et al., 2009). ストローブマツ およびシロトウヒにおいては、光化学系IIのコア複合体の サブユニット (D1, D2, CP43) およびLHCとのリン酸化の 関連を報告している (Verhoeven and Kornkven, 2023). また、 ストローブマツおよびシロトウヒにおいても持続的熱放 散の消失とこれらのタンパク質の脱リン酸化の関連が示 されている (Merry et al., 2017). これらのリン酸化が持続 的熱放散に直接関与するかどうかは不明であるが、持続 的熱放散のメカニズムの一つとして興味深い.

2.3 スピルオーバーの持続的熱放散への関与

光化学系IIにおける熱放散のメカニズムとして,さまざ まな植物で光化学系IIから光化学系Iへの励起エネルギー 移動(スピルオーバー)が報告されている(Yokono et al., 2019). Bagら (2020) は、クロロフィル蛍光のキネティク スをターゲットモデリングすることにより、持続的熱放 散の活性が比較的高いと思われる初春のヨーロッパアカ マツにおいて、スピルオーバーの活性が高いという報告 をしている. 彼らはさらに同じ時期にチラコイド膜のグ ラナラメラが減少することから、グラナラメラの減少が スピルオーバーの活性の増加と持続的放散につながると いう仮説を提唱している. しかし、ニホンイチイでは、もっ とも持続的熱放散が活発な冬にはグラナラメラはむしろ 増加しており (Yokono et al., 2008), スピルオーバーの活性 の増加も観察されていない (Ye et al., 2025). 樹種や季節に よっては、スピルオーバーが持続的熱放散に関わる可能 性は十分に考えられる.

2.4 ゼアキサンチンの持続的熱放散への関与

光化学系IIに結合するカロテノイドのうち、ゼアキサン チン、アンテラキサンチン、ビオラキサンチンの3つのキ サントフィルは、相互に変換しうる環状の代謝経路を形成 している.通常は、ゼアキサンチン、アンテラキサンチン、 ビオラキサンチンの順番で代謝され、弱光条件ではビオ ラキサンチンが主に光化学系IIの周辺アンテナのタンパク 質に結合している、強光条件(すなわちチラコイド膜内腔 が酸性化している条件)ではビオラキサンチンは脱エポキ シ化されてゼアキサンチンに戻り、やはり光化学系IIの周 辺アンテナに結合する.主にシロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana)を用いた研究から、ゼアキサンチンの蓄積は光化 学系IIにおける熱放散を誘導することが示されている(Lee et al., 2024; Niyogi et al., 1998).しかし、強光条件下にお いて、ゼアキサンチン自身は周辺アンテナにおけるクエ ンチャー(注:励起エネルギーを消光する分子)として機 能するわけではないと考えられており,間接的に周辺ア ンテナや他のタンパク質に作用することにより,周辺ア ンテナにおける熱放散を誘導すると考えられている(Kress and Jahns, 2017; Ruan et al., 2023; Sacharz et al., 2017).

持続的熱放散が起こっている植物では、例外なくゼア キサンチンの蓄積が見られる (Demmig-Adams et al., 2020). また、シロイヌナズナなど、持続的熱放散が報告されて いない植物種では、キサントフィルサイクルの色素のう ち、最大でも50%程度までしかゼアキサンチンの比率が上 昇しないが、持続的熱放散が起こる植物では、持続的熱放 散が起こっている状況ではキサントフィルサイクルの色 素のうち、80%以上をゼアキサンチンが占める (Demmig-Adams et al., 2020). 冬季の常緑樹では, ゼアキサンチン だけでなく、ほかのカロテノイドの蓄積も増加するため、 βカロテンからゼアキサンチンが合成される経路も活性化 していると考えられる. その結果, クロロフィルあたり のキサントフィルサイクルの色素の量とゼアキサンチン の比率の両方が上昇する (Demmig-Adams et al., 2020). も し、ゼアキサンチンが周辺アンテナにしか結合をしない とすると、周辺アンテナのタンパク質においてクロロフィ ルとカロテノイドの比率は一定であると考えられるので、 クロロフィルあたりのゼアキサンチンの量の増加は説明 がつかない. (1) 周辺アンテナ以外のタンパク質にゼアキ サンチンが結合している,(2) ゼアキサンチンはタンパク 質には結合していない、(3) ゼアキサンチンは周辺アンテ ナに結合しているが、結合している場所は本来カロテノ イドが結合している場所ではない、という3つの可能性が 考えられる. ゼアキサンチンの局在は、持続的熱放散の 理解に重要であると考えられることから、今後のゼアキ サンチンの局在に関する研究の進展が待たれる.

2.5 Early light-induced protein (ELIP)の役割

持続的熱放散に関わると考えられるタンパク質の一つ が、Early light-induced protein (ELIP) である. ELIPは1980 年代にオオムギ (*Hordeum vulgare*) などの黄化芽生えが光 照射時に誘導されるタンパク質として同定された (Grimm et al., 1989; Grimm and Kloppstech, 1987). ELIPはチラコ イド膜に存在する3回膜貫通タンパク質で,LHCIIと同じ タンパク質スーパーファミリーに属する. Adamskaらは エンドウ (*Pisum sativum*) からELIPを精製し,クロロフィ ルaとカロテノイドを結合していることを報告している (Adamska et al., 1999). また,近年,Skotonicováらは、シ ロイヌナズナのELIPをシアノバクテリアの細胞で発現、 精製し、同様にクロロフィルとカロテノイド(ゼアキサン チン)が結合しうることを報告している.また、このELIP では、Ultrafast transient absorptionの解析から、クロロフィ ルの励起エネルギーが非常に早く放散されると見積もら れている(Skotnicová et al., 2021).我々は、常緑植物のツ ルマサキ(*Euonymus fortunei*)のELIPを解析し、クロロフィ ルaと複数種類のカロテノイドを結合し、高い熱放散能力 を持つ、という結果を得ている(未発表).

Zarterら (2006a, 2006b) はクマコケモモ, ポンデローザマ ツ (Pinus ponderosa), コントルタマツ, ミヤマバルサム, エンゲルマントウヒ (Engelmann spruce) といった幅広い 樹種で冬季に蓄積していることを報告している. Zarterら (2006b)は当時すでにELIPが持続的熱放散に関わるのでは ないか、という可能性を指摘している. 国内でも宇梶と原 が冬のニホンイチイにおいて, Established Sequence Tag解 析(注:cDNA libraryのクローンをランダムに解析する手法) を用いてELIPのmRNAが大量に発現していることを報告 している (Ukaji and Hara, 2007). しかし, 近年まで, ELIP と光合成の関連を明確に示した研究結果は報告されてい なかった.シロイヌナズナにおいて、ELIPの過剰発現や 欠損では、光合成に関する形質の変化は見られない (Hutin et al., 2003; Rossini et al., 2006) が, 過剰発現株において, 稀に葉緑体の発達の欠損が見られる (Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007). したがって、これらの結果からはELIPの機 能は明らかにはなっていなかったが、前述のSkotnicováら の結果 (Skotnicová et al., 2021) は、ELIPの蓄積が熱放散を 誘導しうる可能性を示している.

我々の研究室では、2007年頃から断続的に持続的熱放散 の研究を行ってきたが、2017年に本格的に持続的熱放散の 研究を再開した.この時点では、単に冬季に蓄積するタ ンパク質の一つとしてELIPがある、というだけで、ELIP が持続的熱放散に関わるかどうかは不明であった. 我々 は、持続的熱放散のメカニズムを解明する糸口をつかむ ため、野外のニホンイチイの葉において、日光のよくあ たる南側、陰となっている北側、当年葉、一年葉におい て、光化学系IIの量子収率を毎週測定し、色素の変動、ト ランスクリプトーム、タンパク質の発現については、月 ごとに詳細に比較した. その結果, いずれの葉において も冬季に同じようなタイミングで量子収率の低下が起き ていた.同じタイミングで、ELIPのmRNAの増加が見ら れ, その割合はトランスクリプトームのおよそ20%, タン パク質のレベルでは、LHCIIのおよそ半分(分子数でみる とLHCIIと同等)と見積もられた(Ye et al., 2025). また, 改 めてELIPに着目して先行研究のトランスクリプトームの データを見てみると、ベイマツにおいても、冬季のELIP の発現は全トランスクリプトームの15%程度におよぶと 見積もられた (Cronn et al., 2017). 一般的に大量に発現す る遺伝子はゲノム上のコピー数が多いことが知られてい るが、ニホンイチイのIso-Seqの結果では、ニホンイチイ のELIPのisoformは37種類以上あると見積もられる. また、 アブラマツ (*Pinus tabuliformis*: Niu et al., 2021)の詳細なゲ ノム解析では、この種においては100コピー以上のElip遺 伝子がゲノム上に存在すると見積もられた. これらの結 果は、越冬中の常緑樹においては、大量のELIPを発現す る必要があるということを示唆している.

なお,我々のトランスクリプトーム解析において,冬 季は転写も翻訳もほとんど止まっているのではないか. という質問をよく受けるが、我々の実験においては、冬 季のmRNAの量(葉の重量あたり)やタンパク質の量は夏季 とさほど差は見られず、季節に伴ったトランスクリプトー ムの変化は越冬中でも見られる. また, 同様に北米オレ ゴン州Pacific Northwestのベイマツにおいても冬季には秋 季に比べてむしろトランスクリプトームのカウントは増 加している (Cronn et al., 2017) ことから, 寒冷圏の冬季だ からといって、転写や翻訳が停止しているとは考えられ ない. もちろん、地域によって、常に-10℃や-20℃を下回 るような場所では、転写や翻訳が停止しているかもしれ ないが、札幌の場合は、冬季の気温は激しく変動しており、 気温がプラスとマイナスを行き来するのは珍しくはない. 札幌のような環境では、光合成の応答やトランスクリプ トームも気温にすぐに応答するような状態にあり、転写 や翻訳も含めて冬でも基本的な代謝プロセスは動いてい ると考えるのが妥当である.

ELIPが仮に光化学系IIと相互作用をしていないとする と、ELIPは、それ自身が吸収した光エネルギーを放散す るだけということになり、冬季の常緑樹で見られるよう な劇的な量子収率の低下は説明ができない.ELIPが光化 学系IIと相互作用をするかどうか、という点は、ELIPの持 続的熱放散における役割を考える上で非常に重要である. しかし、PsbSの研究例をみてみると、ELIPと光化学系II の相互作用を証明するのは容易ではないのかもしれない とも予想される.PsbSは発見から20年以上も経っており、 変異体の解析からは光化学系IIの熱放散に関わることが確 実であるにも関わらず、どのように光化学系IIと相互作用 するのかという点については、いまだに諸説あるという 状況である.PsbSと光化学系IIの相互作用は非常に弱く、 一時的であるという可能性があり、PsbSと光化学系IIの安 定的な複合体を検出するのは難しいという可能性がある. ELIPと光化学系IIが弱く相互作用しているのであれば、そ の相互作用を捉えるのは難しいかもしれない. そのため, ELIPがもし光化学系IIと相互作用するのであれば、例え ばELIPの過剰発現体の光合成活性を分析するなどの生理 学的な手法が有効であると予想される.もし、ELIPが持 続的熱放散の制御に関わっていないとすると、ELIPの機 能としてもう一つ考えられるのは、光化学系IIから外れた 色素のリザーバーとしての役割である (Hutin et al., 2003). つまり、冬季に光化学系IIを一時的に分解する必要があり、 その際にクロロフィルを保持しておくのがELIPである。 という仮説である.この説は、なぜELIPが大量に必要な のか、という説明にはなっているが、一方で、なぜクロ ロフィルを保持しておく必要があるのか. 一度保持され たクロロフィルをもう一度,光化学系に取り込めるのか, という疑問も残る.いずれにせよ、ELIPの機能に関しては、 さらなる研究が必要であることは間違いがない.

2.6 電荷再結合による熱放散

田中歩 (2007) は、光化学系IIのコア複合体に結合してい るQ_Aと反応中心P680⁺の電荷再結合よって持続的熱放散が おきる、という可能性を提唱している. その根拠の一つは、 冬季のニホンイチイの葉にさまざまな温度条件で340 µmol m⁻² s⁻¹の光を照射し,暗所に戻したときに,クロロフィル 蛍光の戻りが低温では遅くなる、という観察である.低 温下で、常に一定量のQ_Aが温度に逆比例して還元状態に あるとすると、図3の結果の説明にはなると思われるが、 暗所にしても常に一定量のQ₄を還元状態に保つことが可 能なのかどうかは不明である.この仮説に関して、我々 の研究は、持続的熱放散は周辺アンテナで行われている ことを示唆しているので、この点では支持されていない. しかし、コア複合体における熱放散の可能性自体は排除 されたわけではないため、今後は、他の方法でQ₄の還元 状態を調べることによって、この仮説を検証できるので はないかと考えている.

まとめ

冬季の常緑植物では、持続的熱放散という現象が広く 観察されるが、熱放散の分子メカニズムは不明である. 光阻害、スピルオーバー、LHCIIやPsbSのリン酸化、ゼ アキサンチン、ELIP、電荷再結合などがそのメカニズム に関与すると提唱されているが、いずれに関しても決定 的な証拠はない、樹種によって異なるメカニズムを用い ている可能性もあるので、複数の樹種を対象とした持続

学名	英 名	和名
Abies balsamea	balsam fir	バルサムモミ
Abies lasiocarpa	subalpine fir	ミヤマバルサム
Arabidopsis thaliana	Thale cress	シロイヌナズナ
Arctostaphylos uva-ursi	bearberry	クマコケモモ
Chlamydomonas reinhardtii		コナミドリムシ
Euonymus fortunei	Fortune's spindle	ツルマサキ
Hordeum vulgare	barley	オオムギ
Picea abies	Norway spruce	ドイツトウヒ
Picea engelmannii	Engelmann spruce	エンゲルマントウヒ
Picea glauca	white spruce	シロトウヒ
Pinus contorta	lodgepole pine	コントルタマツ
Pinus ponderosa	ponderosa pine	ポンデローザマツ
Pinus sylvestris	Scots pine	ヨーロッパアカマツ
Pinus tabuliformis	Chinese pine	アブラマツ
Pinus strobus	eastern white pine	ストローブマツ
Pseudotsuga menziesii	Douglas fir	ベイマツ
Pisum sativum	pea	エンドウ
Taxus cuspidata	Japanese yew	ニホンイチイ

表1:本稿で記載した植物名,英名,和名

的熱放散の研究も重要であろう.近年,針葉樹の光化学 系の構造解析が少しずつ進んでいるが(Kouřil et al., 2020; Opatiková et al., 2023),今後,冬季の常緑植物の光化学系 IIのクライオ電顕を用いた構造解析などがブレークスルー になる可能性がある.また,さまざまな仮説を検証する ためには,時間分解クロロフィル蛍光測定に基づくDAS 解析なども必須であると考えられ,複合的な研究領域か らのアプローチが持続的熱放散のメカニズムの解明につ ながると期待される.

謝辞

本稿で紹介した研究の一部は科研費23H04960および 24K01806の助成を受けて実施された.

参考文献

- Adamska, I., Roobol-Bóza, M., Lindahl, M., and Andersson,
 B. (1999) Isolation of pigment-binding early light-inducible proteins from pea. *Eur. J. Biochem.* 260: 453–460.
- Bag, P., Chukhutsina, V., Zhang, Z., Paul, S., Ivanov, A.G., Shutova, T., et al. (2020) Direct energy transfer from photosystem II to photosystem I confers winter sustainability

in Scots Pine. Nat. Commun. 11: 6388.

- Bag, P., Shutova, T., Shevela, D., Lihavainen, J., Nanda, S., Ivanov, A.G., et al. (2023) Flavodiiron-mediated O2 photoreduction at photosystem I acceptor-side provides photoprotection to conifer thylakoids in early spring. *Nat. Commun.* 14: 3210.
- Cronn, R., Dolan, P.C., Jogdeo, S., Wegrzyn, J.L., Neale, D.B., Clair, J.B.St., et al. (2017) Transcription through the eye of a needle: daily and annual cyclic gene expression variation in Douglas-fir needles. *BMC Genomics*. 18: 1–18.
- Demmig-Adams, B., Stewart, J.J., López-Pozo, M., Polutchko, S.K., and Adams, W.W. (2020) Zeaxanthin, a Molecule for Photoprotection in Many Different Environments. *Molecules*. 25: 5825.
- Ebbert, V., III, W.W.A., MATTOO, A.K., SOKOLENKO, A., and Demmig-Adams, B. (2005) Up-regulation of a photosystem II core protein phosphatase inhibitor and sustained D1 phosphorylation in zeaxanthin-retaining, photoinhibited needles of overwintering Douglas fir. *Plant, Cell Environ.* 28: 232–240.
- Ensminger, I., Sveshnikov, D., Campbell, D.A., Funk,C., Jansson, S., Lloyd, J., et al. (2004) Intermittent lowtemperatures constrain spring recovery of photosynthesis in

boreal Scots pine forests. Global Change Biol. 10: 995-1008.

- Fan, M., Li, M., Liu, Z., Cao, P., Pan, X., Zhang, H., et al. (2015) Crystal structures of the PsbS protein essential for photoprotection in plants. - PubMed - NCBI. *Nat. Structur. Mol. Biol.* 22: 729–735.
- Grebe, S., Trotta, A., Bajwa, A.A., Mancini, I., Bag, P., Jansson, S., et al. (2020) Specific thylakoid protein phosphorylations are prerequisites for overwintering of Norway spruce (*Picea abies*) photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 202004165.
- Grimm, B., and Kloppstech, K. (1987) The early light-inducible proteins of barley. Characterization of two families of 2-h-specific nuclear-coded chloroplast proteins. *Euro. J. Biochem.* 167: 493–499.
- Grimm, B., Kruse, E., and Kloppstech, K. (1989) Transiently expressed early light-inducible thylakoid proteins share transmembrane domains with light-harvesting chlorophyll binding proteins. *Plant Mol. Biol.* 13: 583–593.
- Hutin, C., Nussaume, L., Moise, N., Moya, I., Kloppstech, K., and Havaux, M. (2003) Early light-induced proteins protect Arabidopsis from photooxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4921–4926.
- Ivanov, A.G., Krol, M., Sveshnikov, D., Malmberg, G., Gardeström, P., Hurry, V., et al. (2005) Characterization of the photosynthetic apparatus in cortical bark chlorenchyma of Scots pine. *Planta*. 223: 1165.
- Kouřil, R., Nosek, L., Opatíková, M., Arshad, R., Semchonok, D.A., Chamrád, I., et al. (2020) Unique organization of photosystem II supercomplexes and megacomplexes in Norway spruce. *Plant J.* 104.
- Kress, E., and Jahns, P. (2017) The Dynamics of Energy Dissipation and Xanthophyll Conversion in Arabidopsis Indicate an Indirect Photoprotective Role of Zeaxanthin in Slowly Inducible and Relaxing Components of Nonphotochemical Quenching of Excitation Energy. *Front. Plant Sci.* 8: 2094.
- Lee, T.-Y., Lam, L., Patel-Tupper, D., Roy, P.P., Ma, S.A., Lam, H.E., et al. (2024) Chlorophyll to zeaxanthin energy transfer in nonphotochemical quenching: An exciton annihilation-free transient absorption study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 121: e2411620121.
- Merry, R., Jerrard, J., Frebault, J., and Verhoeven, A. (2017)A comparison of pine and spruce in recovery from winter stress; changes in recovery kinetics, and the abundance and

phosphorylation status of photosynthetic proteins during winter. *Tree Physiol.* 37: 1239–1250.

- Nawrocki, W.J., Liu, X., Raber, B., Hu, C., Vitry, C. de, Bennett, D.I.G., et al. (2021) Molecular origins of induction and loss of photoinhibition-related energy dissipation qI. *Sci. Adv.* 7: eabj0055.
- Niu, S., Li, J., Bo, W., Yang, W., Zuccolo, A., Giacomello, S., et al. (2021) The Chinese pine genome and methylome unveil key features of conifer evolution. *Cell*. 185: 1-14
- Niyogi, K.K., Grossman, A.R., and Björkman, O. (1998) Arabidopsis Mutants Define a Central Role for the Xanthophyll Cycle in the Regulation of Photosynthetic Energy Conversion. *Plant Cell*. 10: 1121–1134.
- Opatíková, M., Semchonok, D.A., Kopečný, D., Ilík, P., Pospíšil, P., Ilíková, I., et al. (2023) Cryo-EM structure of a plant photosystem II supercomplex with light-harvesting protein Lhcb8 and α-tocopherol. *Nat. Plants.* 9: 1359–1369.
- Öquist, G., and Hüner, N.P.A. (2003) Photosynthesis of overwintering evergreen plants. *Annual Rev. Plant Biol.* 54: 329–355.
- Ottander, C., Campbell, D., and Öquist, G. (1995) Seasonal changes in photosystem II organisation and pigment composition in Pinus sylvestris. *Planta*. 197: 176–183.
- Rossini, S., Casazza, A.P., Engelmann, E.C.M., Havaux, M., Jennings, R.C., and Soave, C. (2006) Suppression of both ELIP1 and ELIP2 in Arabidopsis does not affect tolerance to photoinhibition and photooxidative stress. *Plant Physiol.* 141: 1264–1273.
- Ruan, M., Li, H., Zhang, Y., Zhao, R., Zhang, J., Wang, Yingjie, et al. (2023) Cryo-EM structures of LHCII in photo-active and photo-protecting states reveal allosteric regulation of light harvesting and excess energy dissipation. *Nat. Plants.* 9: 1547–1557.
- Sacharz, J., Giovagnetti, V., Ungerer, P., Mastroianni, G., and Ruban, A.V. (2017) The xanthophyll cycle affects reversible interactions between PsbS and light-harvesting complex II to control non-photochemical quenching. *Nat. Plants.* 3: 16225.
- Skotnicová, P., Staleva-Musto, H., Kuznetsova, V., Bína, D., Konert, M.M., Lu, S., et al. (2021) Plant LHC-like proteins show robust folding and static non-photochemical quenching. *Nat. Commun.* 12: 6890.
- Tanaka, A. (2007) Photosynthetic activity in winter needles of the evergreen tree Taxus cuspidata at low temperatures. *Tree Physiol.* 27: 641–648.

- Tyystjärvi, E. (2013) Photoinhibition of Photosystem II. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 300: 243–303.
- Tzvetkova-Chevolleau, T., Franck, F., Alawady, A., Dall'Osto, L., Carriere, F., Bassi, R., et al. (2007) The light stressinduced protein ELIP2 is a regulator of chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 50: 795–809.
- Ukaji, N., and Hara, T. (2007) Expressed sequence tags (EST) から見た樹木の越冬戦略(<特集2>エコゲノミクス:ゲ ノムから生態学的現象に迫る).日本生態学会誌. 57: 89–99.
- Verhoeven, A. (2013) Sustained energy dissipation in winter evergreens. *New Phytol.* 201: 57–65.
- Verhoeven, A., and Kornkven, J. (2023) Differences in photoprotective strategy during winter in Eastern white pine and white spruce. *Tree Physiol.* 44: tpad131.
- Verhoeven, A., Osmolak, A., Morales, P., and Crow, J. (2009) Seasonal changes in abundance and phosphorylation status of photosynthetic proteins in eastern white pine and balsam fir. *Tree Physiol.* 29: 361–74.
- Verhoeven, A.S. (2013) Recovery kinetics of photochemical efficiency in winter stressed conifers: the effects of growth light environment, extent of the season and species. *Physiol. Plant.* 147: 147–58.
- Ye, Z., Sawada, M., Iwasa, M., Moriyama, R., Dey, D., Furutani, M., et al. (2025) Revisiting the early light-induced protein hypothesis in the sustained thermal dissipation mechanism in yew leaves. J. Exp. Bot. 2: 513-531.
- Yokono, M., Akimoto, S., and Tanaka, A. (2008) Seasonal changes of excitation energy transfer and thylakoid stacking in the evergreen tree Taxus cuspidata: How does it divert excess energy from photosynthetic reaction center? *Biochim. Biophy. Acta - Bioenergetics.* 1777: 379–387.
- Yokono, M., Takabayashi, A., Kishimoto, J., Fujita, T., Iwai, M., Murakami, A., et al. (2019) The PSI–PSII Megacomplex in Green Plants. *Plant Cell Physiol*. 60: 1098–1108.
- Zarter, C. Ryan, Adams, W.W., Ebbert, V., Adamska, I., Jansson, S., and Demmig-Adams, B. (2006a) Winter acclimation of PsbS and related proteins in the evergreen Arctostaphylos uva-ursi as influenced by altitude and light environment. *Plant, Cell Environ.* 29: 869–878.
- Zarter, C Ryan, Adams, W.W., Ebbert, V., Cuthbertson, D.J., Adamska, I., and Demmig-Adams, B. (2006b) Winter downregulation of intrinsic photosynthetic capacity coupled with up-regulation of Elip-like proteins and persistent energy

dissipation in a subalpine forest. New Phytol. 172: 272-282.

越冬および積雪が常緑植物の光合成や分布に 与える影響

小野 清美 1)

2024年12月6日受付, 2024年12月18日受理

中高緯度地域に分布する常緑植物は,越冬時に低温や乾燥にさらされる.まず,越冬時に,土壌や 通導組織の水が凍結し引き起こされる障害と,常緑広葉樹・常緑針葉樹の分布との関係について述べる. 次に積雪が日本海側と太平洋側での近縁種の分布のような,植物種の分布に与える影響について述べ る.さらに,積雪の有無による光合成能力や生存の違いを調べた研究例を紹介する.積雪下の植物の 光合成,特に光化学系のタンパク質や色素に関しては研究が進んでいないため,今後の研究が期待さ れる.最後に,温暖化による積雪深や雪解け時期の変化が,常緑植物の生存や植生の変化に与えうる ことを示した研究を紹介する.

Overwintering of evergreen plants, and effects of snow cover on photosynthesis and distribution of evergreen plants

Kiyomi Ono¹

Evergreen plants distributed in mid- to high-latitude regions are exposed to low temperatures and drought during overwintering. I will explain the damage caused by freezing water in soil and xylem tissues during overwintering and discuss its relationship to the distribution of evergreen broadleaf and evergreen conifer species. Next, the effects of snow cover on the distribution of plant species, such as the distribution of closely related species on the Sea of Japan and Pacific Ocean sides, will be discussed. Snow cover can alter not only plant water use but also light utilization. Studies examining changes in photosynthetic capacity and survival with and without snow cover will be presented. Future research on photosynthesis in plants under snow cover, especially with regard to photosystem proteins and pigments, is expected to be conducted, since such research has not progressed to date. Finally, I will present studies which show that changes in snow depth and snowmelt timing due to global warming can affect the survival of evergreen plants and vegetation.

キーワード:常緑植物,越冬,光合成,積雪 Evergreen plants, overwintering, photosynthesis, snow cover

1. はじめに

中高緯度地域には四季があり、冬は日長が短くなり、 気温も低い.地域によっては、日最高気温が氷点下にな

連絡先
小野 清美
北海道大学低温科学研究所
〒 060-0819 北海道札幌市北区北 19 条西 8 丁目
Tel: 011-706-5469
Email: kiyomion@lowtem.hokudai.ac.jp

る日が続き,生物の生存にとって厳しい環境になる.生 育場所を移動できない植物は,様々な形で越冬する.冬 季は種子として過ごす1年生草本,ロゼット葉などの形で 地表面に葉を維持する,あるいは地上部は枯らすものの,

 北海道大学低温科学研究所 Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan



図1:環境制御下で,段階的に温度を低下させた(低温)と常温のまま栽培したアラカシ実生の 光化学系IIの最大量子収率(Fv/Fm)の変化. 横軸は日付を示す. Fv/Fmの測定は室温で行った. 各点は,各個体から1枚の葉を測定したデータを示す. 異なるシンボルは,異なる個体を示す. 常温(昼/夜:22℃/18℃)(•,▲,■),低温処理(昼/夜:22℃/18℃,2023年1月25日から16 ℃/8℃,2月2日から12℃/4℃,2月20日から4℃/0℃)(•,▲,■). グラフ中の矢印は低温 処理での温度設定を変更した日を示す.

根茎のような地下部は維持する多年生草本, 葉を落とし て芽の形で翌年の成長に備える落葉樹, 何らかのメカニ ズムを用いて冬季も葉を維持する常緑植物がある. 植物 が越冬するうえで, 生育場所によっては, 細胞凍結を招 くような気温の低下にだけでなく, 土壌の凍結による乾 燥害, 雪の重みによる物理的な傷害, 雪腐れ病のような 病害に応答する必要がある. 栽培作物では, 凍害, 乾燥害, 雪腐れ病による害を受けることがある (酒井 2003). 物 理的な傷害と雪腐れ病菌による害に関しては, 本稿では 取り上げないため, 酒井 (2003) を参照してほしい. 本稿 では, 光の利用だけではなく, 水利用に影響を与える積 雪に主に焦点を当てて, 常緑植物の光合成と生存や種の 分布について論じる.

2. 常緑植物の越冬

まず, 土壌凍結等による冬季の乾燥害と植物体内の水輸 送について述べる. 中・高緯度地域の冬季には, 気温が低 下し, 湿度が低下する. 高緯度地域では, 土壌凍結も起こる. 土壌が凍結すると, 土壌からの吸水が妨げられる. 土壌か らの吸水が妨げられると, 葉をつけた状態では気孔を閉じ ていないと, 植物体から水が失われてしまう. シベリアの ように冬季の気温の低下が著しい地域では, Larixのよう な落葉針葉樹が分布するが,高緯度地域では, Picea, Abies やPinusのような常緑針葉樹が主に分布する.また,中緯 度地域では,常緑広葉樹が分布する.寒さが厳しい地域 では常緑広葉樹の分布は限られ, Rhododendron (シャクナ ゲ,アルペンローゼなど)やVaccinium vitis-idaea (コケモモ) といったツツジ科の植物やEuonymus fortunei (ツルマサキ) のように,例が少ない.

比較的温暖な地域に分布する常緑広葉樹Quercus glauca (アラカシ)は、どの程度の低温までなら大きな光阻害を受 けずに葉の光合成能力を保てるのだろうか.ここでは、光 合成能力や光阻害の程度を、PAM-2000 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany)を用いて、光化学系IIの最大量子収率 (Fv/Fm)を測定することにより見積もった.FvはFm (飽 和光照射時の最大蛍光レベル)-Fo (測定光照射時の最小 蛍光レベル)であり、この値は光ストレス応答の指標とし てよく用いられる(Maxwell and Johnson 2000).環境制御し た栽培室と非環境制御のガラス室で栽培し、気温の低下 に伴ったFv/Fmの変化を調べた.PAM-2000による測定は、 実験室内、室温にて行った.暗順化は60分程度行った.図 1は、環境制御下(12時間明期・12時間暗期、測定葉付近の 光合成有効光量子束密度PPFDは常温で約280 µmol m⁻² s⁻¹,



図2:A:当年葉のFv/Fmが大きく低下した時期の,ガラス室内の気温と湿度の変化. 自記記録計で測定した結果を示す. 横軸は日付を示す(2021年12月29日から2022年1月7日まで). 気温をトレースしたものを赤い曲線で示す. B:季節変化に伴った自然な気温の低下によるアラカシ苗木の葉のFv/Fmの変化. 横軸は日付を示す(2021年11月11日から2022年1月7日まで). 各点は1個体からの1枚の葉のデータを示す. 実線は当年葉,点線は一年葉の結果を示す. 個体#10,#11の1年葉は,11月下旬から12月上旬の間に落ちた. 各葉齢の個体数が少なくなったため,個体#12を途中から測定対象とした.

低温処理で約170 µmol m⁻² s⁻¹) で段階的に設定温度を下げ た場合のアラカシ当年生実生のFv/Fmの変化を示す(小野 未発表). 常温は, 22 ℃ /18 ℃ (昼/夜) であり, 低温処理 では、16℃/8℃、12℃/4℃、4℃/0℃と数日おきに気温 を低下させた. 16 ℃ /8 ℃ではほとんどFv/Fmは変化しな かったが、12℃/4℃では、2個体で0.7程度まで低下し、1 個体は0.6程度にまで低下した. さらに気温を下げると、2 個体で0.6を下回る程度まで低下し、1個体は0.4程度まで低 下した.しかし,数日経ってもFv/Fmがさらに低下するこ となく、一定の値に保たれたことから、処理時の気温に順 化したことが推測された. 土壌凍結を引き起こすような低 温でなければ、常緑広葉樹の実生であっても、0℃を下回 らない低温に対しては順化できることが示唆された. 図2 はガラス室での自然な気温の低下に伴ったアラカシ苗木の 葉のFv/Fmの変化を示す(小野 未発表). ガラス室での栽 培では、太陽光のみで人工的な光で補っていないため、日 長変化に伴って、 苗木が光を受ける時間は短くなった. ま た、2021年11月25日の12時半ごろに測定した、葉の表面の PPFDは,約100 μmol m⁻² s⁻¹であった.この苗木は,当年生

実生とは異なり、複数の葉齢の葉をつけていた. 個体#10, #11では、栽培開始時に、当年葉のほうが1年葉より高い Fv/Fmを示した. 11月後半に最低気温が0℃前後になり, 年末年始には最高気温も氷点下になった. 20℃前後の室 内でFv/Fmを測定した.1年葉(点線)では、最低気温が0 ℃を下回る頃にはFv/Fmが低下し、落葉が見られた、当年 葉 (実線)は、最高気温が0℃を下回る頃に、おそらく土壌 凍結に伴って、Fv/Fmが大きく低下した、葉は乾燥気味に なり、さらに枯死した.実験に用いたアラカシ苗木は熊本 県産で、もともとの生育地は最低気温が0℃を下回ること はあっても、最高気温が0℃を下回ることがない。ポット 栽培の影響もあると考えられるが、北海道のように最高気 温が氷点下にまで、気温が大きく低下する環境は、常緑広 葉樹の生存に不適であると考えられる.しかし、シャクナ ゲやツルマサキは北海道でも生存しており、どのようなメ カニズムが働いて、生存が可能になっているのか、水利用 という点からも、光の利用という点からも興味深い.

水利用という点では,針葉樹と広葉樹では,水の輸送を 担うのが,仮道管であるか導管であるかが異なる. 寒冷地 では、冬季に通導組織内の水が凍結し、通導組織の水に溶 けている空気の一部が気泡になり、その後、気温の変化に よる凍結融解により気泡が生じて,水輸送を妨げる現象 (エンボリズム) が起こる. 広葉樹であるQuercus gambelli Nutt. (ガンベルオーク) は最もエンボリズムを起こしやす く, Populus tremuloides Michx (アメリカヤマナラシ) や Betula occidentalis Hook. (ウォーターバーチ)は次に、針葉 樹であるJuniperus scopulorum Sarg (コロラドビャクシン) ではあまり起こらず, Abies lasiocarpa Nutt.ではほとんど 見られなかった (Sperry and Sullivan 1992). また, Taneda and Tateno (2005) は、常緑広葉樹 Cinnamomum camphora Thunb. $(\cancel{1} \varkappa \heartsuit \cancel{1})$, Quercus myrsinaefolia Blume $(\cancel{2} \neg \cancel{1})$ シ), 常緑針葉樹 Abies firma Siebold & Zucc. (モミ), Abies *homolepis* Siebold & Zucc. (ウラジロモミ)を東京(暖温帯, 常緑広葉樹が分布)と日光(冷温帯)で栽培し、秋から冬に かけての通導, 光合成や葉の水バランスを比較し, 常緑 広葉樹は常緑針葉樹よりも凍結融解によるエンボリズム を受けやすいことを検証した.木部液の凍結融解は、東 京では起こらず、日光では38回起こった. 針葉樹ではエ ンボリズムは起こらず、導管径の小さな常緑広葉樹でも 深刻なエンボリズムは起こらなかった一方、クスノキや シラカシのような導管径の大きな常緑広葉樹では冬の間 に葉の水欠乏が生じて、地上部が枯死した(Taneda and Tateno 2005). Taneda and Tateno (2005) は、導管径の大き な常緑広葉樹の分布は、凍結融解によるエンボリズムに より暖温帯に制限されていると結論した. これらの研究 (Sperry and Sullivan 1992, Taneda and Tateno 2005)から、エ ンボリズムは、仮道管を持つ針葉樹の方が回避しやすい とされ、凍結解除後の水輸送の障害を受け難く、冬季の 寒さが厳しい地域にも分布できるとされる.

常緑樹の越冬時の光の吸収と利用に関しては、光合成 系の色素やタンパク質が関わり、樹種によって、どのメ カニズムが、どの程度関わっているのかが異なっている とされるが、本稿ではそれらのメカニズムに関しては言 及しないため、Ye et al. (2024)を参照してほしい、水利用 や光の利用に関わるメカニズムの違いが、針葉樹と広葉 樹の冬の寒さへの応答のしやすさの違いに関わっている 可能性はある.

3. 冬季の積雪と植物の光合成

次に水利用や光の利用にも関わる,冬季の積雪と植物の越冬の関係について述べる.降水は,気温が低い冬季

には降雪になる. 積雪下では、気温の極端な低下が抑え られ,ほぼ暗黒状態になる.例えば,日本海側の新潟県 土樽(次章での多雪地である日本海側と少雪地である太平 洋側の植物の分布で取り上げる)では、12月から翌4月の 積雪期には、雪に覆われた地表は、ほぼ暗黒状態になり、 温度は12月から翌3月まで、0℃付近に保たれていたこと が示されている (Kume and Ino 1993). 湿度はほぼ100%に 保たれる. そこで次に, 積雪による葉の保護について述 べる. 高山の森林限界に生える常緑低木のRhododendron ferrugineum L. (アルペンローゼ)では、積雪が不完全な時 期には、光化学系IIの最大量子収率(Fv/Fm)が0.05程度に まで低下し、完全に積雪に覆われるとFv/Fmが回復した (Neuner et al. 1999). この論文内でもFv/Fmが積雪下で回 復するためには、積雪によって被陰され、0℃付近の凍 結しない温度におかれることが大事であると述べている. 不完全な積雪の場合には、冬季の乾燥(脱水)にさらされ るとしている. Hacker and Neuner (2006) では、このアル ペンローゼを含めたいくつかの常緑植物で,海抜600m(低 地)の場所と海抜1950m(高山)の場所で、1月のFv/Fmを 比較している. 高山の1月の月平均気温は, 積雪に覆わ れていないと氷点下である一方,積雪下では0℃付近であ り、低地と同等であった. クッション型の草本植物であ るSaxifraga paniculataは非積雪下でFv/Fmが冬季に0.6程度 まで低下したが、積雪下では冬季でも0.7-0.8程度に保たれ た (Hacker and Neuner 2006). 低地に比べて高山で低いFv/ Fmを示す傾向があり、アルペンローゼでは低地では0.5-0.6 程度であったものが、高山では0.2-0.3程度にまで低下して いた (Hacker and Neuner 2006). Picea abies (オウシュウト ウヒ)でも同様に、低地でFv/Fmが0.6程度であったものが、 高山では0.3程度になっていた (Hacker and Neuner 2006). 一方,地衣類であるCetraria islandicaやクッション型の草 本植物であるSaxifraga paniculataは高山でも0.6程度のFv/ Fmを示し、高山でもほかの種が低地で示した値と同等で あった (Hacker and Neuner 2006). 地面から近い場所に葉 をつけるクッション植物は、ロゼット葉で冬越しする植 物と同様に寒さに強いと考えられる. ここでも, 水輸送 の影響があるのではないかと考えられる.

4. 常緑植物の地理的分布

ここでは、日本列島の地域による積雪深の違いが、植物 の分布に与える影響について述べる。日本列島は、高い山 脈が中央に走り、太平洋側と日本海側で冬季の積雪量が大 きく異なる。太平洋側と日本海側では、植物種の分布が異



図3:積雪に覆われるクマイザサ (Sasa senanensis). 2014年12 月10日に北海道大学・低温科学研究所の敷地内の林で撮影した.

なる.ここでは、例として太平洋側と日本海側での種(あ るいは変種)の分布と、ササ類の分布を取り上げる.日本 では太平洋側のように冬季の積雪がほとんど見られない 地域と、日本側のような多雪地に形態の異なる常緑広葉 低木の近縁種の分布が見られる.例えば、太平洋側には、 Acuba japonica var. japonica (アオキ), Camellia japonica (ヤ ブツバキ), Ilex crenata var. crenata (イヌツゲ)が、日本海 側には対応するものとして、それぞれAcuba japonica var. borealis (ヒメアオキ), Camellia rusticana (ユキツバキ), Ilex crenata var. paludosa (ハイイヌツゲ)が分布し、日本海 側に分布する常緑低木の系統は、小型化していることが述 べられている(久米 2003).

Kume and Ino (1993) は、日本海側の(冬季には3 mを超 える積雪が見られる)新潟県土樽のヒメアオキと、太平 洋側の(1月から2月初めに日最低気温が氷点下になるこ とが多い)千葉県清澄のアオキを対象として、1989年4月 (当年葉)から翌年の4月(1年葉)に3年生シュート(切り枝) を用い、葉面積当たりの光合成速度(300-350 µmol m⁻² s⁻¹, 15-20℃)および呼吸速度(25℃)を実験室内で測定し、葉 面積当たりのクロロフィル量およびクロロフィルa/b比 を調べた.積雪期間以外にアオキとヒメアオキの間にこ れらの値の差は見られなかった(Kume and Ino 1993).ま た、アオキでは、秋から春先までの間にクロロフィルa/ b比が増加していたが、ヒメアオキでは、積雪期にはク ロロフィルa/b比がほぼ一定に保たれた.さらに、積雪下 から掘り起こしたヒメアオキ、アルミホイルで覆って暗 処理した野外のアオキ、積雪下を模した氷上暗黒処理を 行った(通常は積雪に覆われない)アオキに関して、処理 前(対照),処理中(あるいは積雪下),回復状態を見るイ ンキュベーション処理 (100 µmol m⁻² s⁻¹, 12時間明期, 15℃ 1日)を行い,光合成速度やクロロフィルa/b比がインキュ ベーション処理により回復しうることを示し、耐凍性に も違いが見られなかったとしている.このように、生理 的能力は両者に差がないものの,積雪により生育期間が 異なることが、アオキと(小型化した)ヒメアオキの形態 上の違いをもたらしていると考えられる(久米 2003). また, Kume and Ino (1993) では、太平洋側に分布するア オキを新潟県土樽に、日本海側に分布するヒメアオキを 千葉県清澄にと3年生の実生を用いた交換移植実験を行い、 アオキが積雪に覆われても、ヒメアオキが積雪に覆われな くても、お互いの生育地で傷害なく生育できたと述べてい る. アオキとヒメアオキの間には、光合成、呼吸、耐凍 性に差異が認められなかったが、ヤブツバキとユキツバ キの間には、光合成や呼吸に差異が認められている(久米 2003). 久米らの研究 (Kume and Ino 1993など) では, CO₂ ガス交換を用いた光合成速度や呼吸速度やクロロフィルが 調べられているが、光化学系のタンパク質やクロロフィル 以外の色素、あるいは炭酸固定系の酵素が雪下のヒメアオ キや、雪に覆われていないアオキで、どのように維持され ているのか、それとも変化しているのかは研究されていな Vr.

日本海側の多雪地帯や山地にはSasa kurilensis (Rupr.) Makino & Shibata (チシマザサ)が、太平洋側の少雪地帯に はSasa nipponica (Makino) Makino & Shibata (ミヤコザサ) が、これらの中間地域にはSasa senanensis (Franch. & Sav.) Rehder emed. M. Kobay. (クマイザサ) が分布し、クマイザ サの分布域が最も広くなっている(豊岡ら1984,学名は小林 2017を参照した). 平野部に分布するクマイザサとミヤコ ザサの分布の境界であるミヤコザサ線は、関東から東北 地方にかけては、最大積雪深50 cmの等深線と一致し、こ れより太平洋側にミヤコザサが分布するが、北海道では50 cmを超えて、道東では100 cm等深線と重なる(嶋田 1984). 最大積雪深は、このようにササの分布を決定づけるが、他 の種の分布や越冬時の傷害の発生地帯区分とも密接に関連 する(嶋田 1984).分枝の位置にも最大積雪深の影響が見 られ, チシマザサは上方, チマキザサ (クマイザサはチマ キザサ節)は各節、ミヤコザサは地中や地際とされる(小林 2017). クマイザサは最大積雪深が50 cm以上の地域に分布 する一方,耐凍性が高い.クマイザサの高い耐凍性には, 発達した厚壁組織のような氷の障壁になるような構造や生 化学的な機構が働いていて、これらが過冷却を保つために

重要であるとされた(Ishikawa et al. 2015). チシマザサも耐 凍性が高いササの一つとされる(小林 2017). 図3に積雪に 覆われつつあるクマイザサの写真を示す. この後,積雪深 が増加すると,図3に示したクマイザサは完全に積雪に覆 われ,越冬する.冬季に,クマイザサ,あるいはチシマザ サが積雪に覆われずに越冬した場合に,葉の光合成系はど のような変化を示すのか,著者らは,クマイザサとチシマ ザサの複合体(雑種)を用いて,解析を進めている.

5. 気候変動が積雪の変化を通じて, 常緑植物の成長や分布に及ぼす影響

高緯度地域では、気候変動の影響を受けやすい、冬季 に気温が上昇する日が増加すると、土壌は融解と凍結のサ イクルを繰り返す. 積雪深は浅くなり. 積雪期間は短くな る可能性がある.積雪深が浅くなった状態で、気温が低下 すると、土壌の凍結が起こりやすくなるとされる.気温 の上昇は生育期間の拡大というプラスの効果をもたらすと 考えられるが、それとは反対に、気温の上昇による凍結融 解のサイクル, 圧雪状態や部分的な浸水というマイナスの 効果は、実生の生存や成長にどのような影響を及ぼすの だろうか. Domisch ら (2017) は、15-18cmの雪で覆う処理 (SNOW),雪の層が10 cmで、時折水をかけ圧縮した雪の 上に氷の層がある状態にする処理 (ICE),水に覆われた凍 結した土壌(FLOOD)と積雪に覆われない状態(NO SNOW, 無処理)の処理(以上4つ,2014年12月5日から70日間,「冬 処理」)を行い、その後、気温(2℃から20℃へ)や土壌の温 度 (-2℃から15℃へ) が上昇する「春」10日間と, 気温20 ℃, 土壌の温度15 ℃の「夏」32日間まで, Pinus sylvestris (ヨーロッパアカマツ)の1年生実生の生存を調べた.この 実験期間終了時には、FLOODとNO SNOWでは、実生の針 葉はほとんど褐変し、ICEでは、雪や氷の層の上の針葉や 枝が枯死した一方, SNOWでは, 針葉の褐変はほとんど抑 えられ,新しいシュートの成長も見られた (Domisch et al. 2017). これらの結果は、実生が積雪に覆われて越冬する ことの重要性を示し、積雪状態が変化すると実生の生存 や森林の生産に影響することが示唆された(Domisch et al. 2017). 高緯度地域とともに, 高山帯も気候変動の影響を 受けやすいとされる.大雪山の高山帯では,雪解け時期 が早まり、チシマザサの分布が拡大し、他の植物を被陰 したり、土壌の含水量を低下させたりしている (Kudo et al. 2011, 工藤, 雨谷 2018). 高山帯では, 森林帯と比較して ササの小型化や最大光合成速度の適温の低下が見られ、サ サが高山帯の環境に応じた成長を行っていた(工藤, 雨谷

2018). このように,雪解け時期が早まることは,常緑植物の光合成活動の早期化をもたらす一方,他の植物の分布にも影響を与える.

6. おわりに

積雪に覆われて越冬する常緑広葉樹ヒメアオキでも. 常緑草本クマイザサ (Ishikawa et al. 2015) やチシマザサ, S. paniculataでも、葉そのものは高い耐凍性を持つ. ヒメア オキは樹高が低く, S. paniculataは茎のない、 クッション 状のロゼット植物である.また、常緑広葉樹アラカシへ の低温処理で気温が昼4℃・夜0℃程度であれば、光化 学系IIの最大量子収率 (Fv/Fm)の大きな低下が抑えられた が、環境が制御されていない状態での季節変化により、 土壌が凍結する気温にまで低下した場合には、Fv/Fmが大 きく低下し、落葉が起きた(小野 未発表).この結果は、 常緑広葉樹が寒さの厳しい地域に分布を広げられない要 因に木部での凍結解除時のエンボリズムが関わるという 説 (Taneda and Tateno 2005) を支持する結果であると考えら れる. ササのように幹や枝ではなく, 稈が支持や通導の 役割を担っている植物や、地面に近い場所に葉を広げる クッション植物では、物理的傷害をあまり受けることな く積雪に埋もれて越冬することができる. 葉は維持され ているので、土壌凍結解除後、1年生草本や落葉樹が葉を 広げる前に、これらの植物は光合成を行うことができる. 冬季に緑色(クロロフィル)を維持している葉が、どのよ うなメカニズムで光合成系を維持していることに関して は、様々な研究がある (Ye et al. 2024参照) が、雪下の植物 の葉に関しては、研究が進んでいない、また、大雪山で みられるようにチシマザサの分布拡大は土壌の乾燥化を 引き起こし、他の植物の分布が変わりつつある(工藤、雨 谷 2018). 今後も冬季の気温や降水量の変化に伴って, 積 雪量や雪解け時期が変化することが予測される. そのよ うな変化に伴って、常緑植物の越冬の仕方が変化し、長 期的にみると、それぞれの植物種がどのように分布して いくのかも変化すると考えられる.

謝辞

本稿にあげた実験の一部は,低温科学研究所低温実験 室2,3を使って行われ,科学研究費助成事業(課題番号 19K06139)の助成を受けた.本稿について,寺島一郎博士 (現 國立中興大)に多くのご助言をいただいた.ここに 深く感謝の意を表する.

参考文献

- Domisch, T., Martz, F., Repo, T. and Rautio, P. (2017) Winter survival of Scots pine seedlings under different snow conditions. *Tree Physiol.* 38: 602-616
- Hacker J. and Neuner G. (2006) Photosynthetic capacity and PSII efficiency of evergreen cushion plant *Saxifraga paniculata* during winter at different altitudes. *Arc, Ant Alp Res* 38: 198-205
- Ishikawa, M., Oda, A., Fukai, R. and Kuriyama, A. (2015) Factors contributing to deep supercooling capability and cold survival in dwarf bamboo (*Sasa senanensis*) leaf blades. *Frontiers in Plant Sci* 5: 791
- 工藤岳,雨谷教弘(2018)高山帯におけるササの分布拡大 メカニズムと生態系への影響.地球環境23:17-26
- Kudo, G., Amagai, Y., Hoshino, B. and Kaneko, M. (2011) Invasion of dwarf bamboo into alpine snow-meadows in northern Japan: pattern of expansion and impact on species diversity. *Eco Evo* 1: 85-96
- 小林幹夫(2017) 原色植物分類図鑑 日本のタケ亜科植物. 北隆館
- 久米篤(2003) 第7章 植物の分布を分ける生理的制約: 進化生態学との接点、光と水と植物のかたち 植物生 理生態学入門 種生物学会編
- Kume, A. and Ino, Y. (1993) Comparison of ecophysiological responses to heavy snow in two varieties of *Acuba japonica* with different areas of distribution. *Eco Res* 8: 111-121
- Maxwell, K. and Johnson GN. (2000) Chlorophyll florescence a practical guide. *J Exp Bot* 51: 659-668
- Neuner, G., Ambach, D. and Aichner, K. (1999) Impact of snow cover on photoinhibition and winter desiccation in evergreen *Rhododendron ferrugineum* during subalpine winter. *Tree Physiol.* 19:725-732
- 酒井昭(2003)植物の耐寒戦略. 北海道大学図書刊行会
- 嶋田徹 (1984) 主要気候帯における草種・品種の適応性と 育種効果 北海道草地研究会報18:8-17
- Sperry, JS. and Sullivan, J. (1992) Xylem embolism in response to freeze-thaw cycles and water-stress in ring-porous, diffuseporous, and conifer species. *Plant Physiol.* 100: 605-613
- 豊岡洪,佐藤明,石塚森吉 (1984) 北海道ササ分布図. 新技 術情報No.10,林業試験場北海道支場
- Ye, Z., Sawada, M., Iwasa, M., Moriyama, R., Dey, D., Furutani, M., Kitao, M., Hara, T., Tanaka, A., Kishimoto, J., Yokono,

M., Akimoto, S., Takabayashi, A. and Tanaka, R. (2024) Revisiting the early light-induced protein hypothesis in the sustained thermal dissipation mechanism in yew leaves. *J. Exp. Bot.* erae412.

第2章

光合成生物に幅広く共通する分子機構

構造から光合成の仕組みを解き明かす

野地 智康¹⁾

2024年12月1日受付, 2025年1月8日受理

光合成生物は、光センサータンパク質内の吸収波長や光化学系膜タンパク質の電子伝達補因子の酸 化還元電位を調整することで、多様な光環境に適応できるように進化したと考えられる。光合成生物 が多様な光環境に適応できる理由を知るためには、光センサータンパク質や光化学系膜タンパク質の 吸収波長や光吸収後におこる電子移動がどのような物理化学的要因の違いによって調整されているか を理解する必要がある。本稿では、(1)タンパク質内の吸収波長がどのような要因に決定しているのか、 (2)光励起後に起こる電子移動はどのような構造で高効率におこるのか、という点に注目して紹介する。

Revealing the mechanism of photosynthesis from its structure

Noji Tomoyasu¹

Photosynthetic organisms are believed to have evolved the ability to adapt to diverse light environments by modifying the absorption wavelengths of photosensor proteins and the redox potential of electron transfer cofactors in photosystem membrane proteins. Understanding why photosynthetic organisms can adapt to various light environments requires identifying the physicochemical factors that regulate absorption wavelengths and the electron transfer processes following light absorption in photosensor and photosystem membrane proteins. This article focuses on (1) the factors that determine absorption wavelengths in proteins and (2) the structural features that enable efficient electron transfer after photoexcitation.

キーワード:理論化学,量子化学,光吸収,電子移動,電位 Theoretical chemistry, quantum chemistry, absorbance, electron transfer, electric potential

1. はじめに

光合成に関与するタンパク質には、光環境を認識する 光センサータンパク質、太陽光を高効率に捕集する光捕 集アンテナタンパク質、光捕集アンテナタンパク質から 受け取った励起エネルギーで電荷分離反応を起こす光化 学系膜タンパク質などが存在する.これらのタンパク質

連絡先

野地 智康 東京大学 先端科学技術研究センター 〒153-0041 東京都目黒区駒場4丁目6番1 Tel: 03-5452-5082 Email: tnoji@protein.rcast.u-tokyo.ac.jp が、協調的に反応することで、光合成生物は多様な環境 に適応できると考えらえる.そのため、これらのタンパ ク質の機能がどのように発現しているのかを物理化学的 に解明することは、光合成生物が多様な環境に適応でき る理由を知るうえで重要である.

光センサータンパク質,光捕集アンテナタンパク質,光 化学系膜タンパク質はいずれも色素を有しており,その色

 東京大学 先端科学技術研究センター Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

素が光を吸収することで反応が始まる。従って、タンパ ク質の機能を物理化学的に理解する第一歩として、色素 の吸収波長がどのように決定されるのかを明らかにする 必要がある. 色素の吸収波長は基底状態と励起状態のエ ネルギー準位差で決まるため、両者のエネルギー準位を 把握することが求められる.しかし、実験でこれらのエ ネルギー準位を測定することは難しく、特に1つのタンパ ク質に複数の色素が結合している場合は、ほぼ不可能だ と考えられる.この課題を解決するために、構造情報を 基に理論化学的手法を用いて個々の色素のエネルギー準 位を推定する方法が開発されている.本稿では、以下の 内容について説明する. 第2章では、構造から計算した吸 収波長が実験結果とどの程度一致するかについて、バク テリオロドプシンやフィコシアノビリン結合光センサー タンパク質を例に解説する. 第3章では、光吸収後に生じ る高速電子移動の過程について、光センサータンパク質 と光化学系膜タンパク質を例に、電子移動を高効率で実 現するための要因を論じる.第4章では、これらの研究手 法について簡易的に説明する.

タンパク質の構造を基に実験結果を解釈する機会が訪 れたときに、本稿がヒントになれば幸いである.

タンパク質内の色素分子の吸収波長の 決定要因

2.1 色素とタンパク質との静電相互作用の影響

バクテリオロドプシンは光駆動プロトンポンプ膜タンパ ク質である. Halobacterium salinarum由来のバクテリオロ ドプシンでは色素レチナールがLys216と共有結合し、シッ フ塩基を形成している. レチナールシッフ塩基が光を吸収 するとall-trasn型(吸収波長568 nm) (Varo and Lanyi 1991)か ら13-cis型へ光異性化反応を起こし、吸収波長が約617 nm (Polland et al. 1986; Shim et al. 2009)のJ状態に遷移する. そ の後, K_0 (約604 nm (Nogly et al. 2018; Polland et al. 1986)), K_E (600 nm (Dioumaev and Lanyi 2009)) K_L (590 nm (Varo and Lanyi 1991)), L (546 nm (Varo and Lanyi 1991)), M (410 nm (Varo and Lanyi 1991)), N (563 nm (Varo and Lanyi 1991)), N' (563 nm (Varo and Lanyi 1991)), O (640 nm (Varo and Lanyi 1991)) 状態を経由し、最終的に暗状態(568 nm) に戻る. このように様々に吸収波長が変化するのは、レチ ナールシッフ塩基の光異性化に伴う捻じれ、シッフ塩基の 脱プロトン化、レチナールシッフ塩基近傍のAsp85のプロ トン化状態の変化が原因であると、定性的に説明されてき た (Hayashi et al. 2002; Miyahara and Nakatsuji 2019). しか



図1:バクテリオロドプシンの構造から計算された吸収波長と実験値の比較. 文献(Noji and Ishikita 2022)の図を改変. •: 分解能に存在が依存する結晶構造を削除してバルク水による静電遮蔽効果を考慮した場合. 〇: 分解能に存在が依存する結晶構造を削除せずバルク水の影響を考慮した場合(R²=0.66).この相関図における吸収波長の計算値は,文献(Noji and Ishikita 2022)に記載された補正式を用いて補正.BR_{LT},K_{LT} は低温で形成される中間体を示す(Noji and Ishikita 2022).BR_{13-cis} with T89-OH/NH conf.とBR_{13-cis} with T89-OH/NH conf.はレチナールシッフ塩基が13-cis異性体の状態で,さらにThr89の側鎖の2つの異なる配置を考慮した結果である.これらの詳しい説明については,文献(Noji and Ishikita 2022)を参照.

しながら、タンパク質の結晶構造から高い精度で吸収波長 を予測する方法はこれまで確立されておらず定量的な議論 は難しかった. その主な原因は、各状態の結晶構造の分解 能や、同定された水分子の数が異なること、さらに、結晶 構造中に同定されていないバルク水分子の存在が挙げられ る. 結晶構造に同定されている水分子(結晶構造水)のみな らず、同定されていない水分子も静電遮蔽効果を持つ. こ のため、バルク水の影響を考慮せず結晶構造水のみを考慮 した場合、タンパク質の持つ電荷がレチナールシッフ塩基 のエネルギー準位に及ぼす影響を過大評価してしまう. 高 分解能の結晶構造では、低分解能の構造よりも多くの水分 子が同定されるため、低分解能構造では水分子による静電 遮蔽効果が低く見積もられる傾向がある.このため、静電 遮蔽効果が結晶構造の分解能に依存し、レチナールシッフ 塩基のエネルギー準位および励起エネルギー(吸収波長) の計算結果が分解能に依存するという問題が生じる.従っ て、分解能が異なる結晶構造から計算された吸収波長を 単純に比較することは難しい。特に、中間状態の結晶構 造は暗状態(基底状態)の結晶構造よりも分解能が低い傾 向にある.



図2:バクテリオロドプシン内のレチナールシッフ塩基の吸収波長が変化する機構. (a) バク テリオロドプシン内のレチナールシッフ塩基 (Nogly et al. 2016). (b) 基底状態 (BR状態) から 励起状態への分子内電荷移動. Asp85, Asp212との静電反発によって電荷移動が妨げられるた め、励起するには高い励起エネルギーが必要となり、Asp85. Asp212が存在しない場合 (点線の 位置) より吸収波長は短波長になる. (c) O状態ではAsp85がプロトン化するため、分子内電荷 移動はBR状態よりも低いエネルギーで励起できる. (d) J状態では、分子内電荷移動の距離が BR状態より短いため、Asp85. Aps212との静電反発に逆らった分子内電荷移動は, BR状態よ り低いエネルギーで励起できる.

そこで著者は、レチナールシッフ塩基に水素結合して いる重要な水分子以外の水分子を削除し、空いた空間を バルク水(誘電率80の分極連続体モデル)で置き換える手 法を採用した. 簡単に言えば、同定されている水分子だ けでなく、結晶構造に同定されていない水分子も存在す ると仮定し、水分子が存在可能な空間をすべてバルク水 で満たすことで、静電遮蔽効果を分解能に依存しないよ うにした.

この手法により,バルク水の静電遮蔽効果を考慮して 計算された吸収波長は,実験値と良好な相関を示した(決 定係数R²=0.98)(Noji and Ishikita 2022).相関直線を用い た補正によって,実験値と比較可能な吸収波長を計算し た結果,標準偏差はわずか4 nmであった(図1).一方,存 在の有無が分解能に依存する結晶構造水を削除しない従 来の計算手法では,計算値と実験値の相関は著しく低かっ た(図1).この結果から,タンパク質内の色素の吸収波長, すなわちエネルギー準位を正確に決定する上で,バルク 水の静電遮蔽効果を適切に考慮することの重要性が示さ れた.

ではなぜ、レチナールシッフ塩基の吸収波長が各状態 で変化するのかだろうか. それを理解するには、電子励 起に伴う分子内での電荷移動を知る必要がある. 励起状 態では、基底状態から光励起などにより電子が高いエネ ルギー準位の分子軌道に遷移し、その結果、基底状態と は異なる電荷分布が生じる. 基底状態と励起状態の電荷 分布の差を計算することで、電子の局在がどのように移 動するのかが明らかになり、これが分子内での電荷移動 に相当する. レチナールシッフ塩基の基底状態では、プ ロトン化されたシッフ塩基が正に、β-イオノン環側は負電 荷に偏っている(図2aおよびb下段). レチナールシッフ塩 基は、励起されるとβ-イオノン環からシッフ塩基側に電子 が移動する性質を持つ(図2b上段). 基底状態から励起状 態への遷移によって生じるこのような電荷移動(分子内電 荷移動)がタンパク質環境によって阻害される場合,たと えばバクテリオロドプシンのように,電子が移動する先 に負に帯電した残基(Asp85やAsp212)との静電的反発があ ると,励起に伴う電荷移動を引き起こすためには静電反 発に逆らって移動させなければならないため,より高い エネルギーが必要となる(図 2b右側).一方で,Asp85が プロトン化されたO状態(図 1のO_{like}はAsp85Ser変異体で, Asp85がプロトン化されたO状態を想定した変異体)では, 分子内電荷移動を妨げていたAsp85の負電荷が消失するた め,暗状態(BR状態)よりも低いエネルギーで分子内電荷 移動が起こる(図 2c).そのため,O状態(O_{like},609 nm)は BR状態(568 nm)よりも長波長にシフトする.

分子内電荷移動が小さくなった場合はどうなるだろう か.J状態(約617 nm)は、レチナールシッフ塩基が基底状 態よりも捻じれ、分子軌道が非局在化し、分極ベクトル がBR状態よりも小さくなり、それに伴い、分子内電荷移 動も小さくなる(図2d)(Noji et al. 2024b).これは、Aps85 およびAsp212の負電荷との静電反発に逆らって電荷が移 動しなればならない距離が短くなることを意味し、その 結果、BR状態よりも少ない励起エネルギーで励起状態に なれることを示す.O状態(640 nm)とJ状態(約617 nm)は おおよそ同じ吸収波長であるが、その機構は全く異なる.

シッフ塩基近傍のAla215がThrに変異した変異体では, BR状態(568 nm)より短い吸収波長554 nmを持つ(図1). これは,Thrのヒドロキシ基のO原子に由来するδの負電荷 がシッフ塩基側に追加されたため,励起に伴う分子内電 荷移動を起こすために必要なエネルギーがBR状態より大 きくなったことに起因する.

このようにタンパク質内の吸収波長がどのようにして 決定しているかを理解するには,①色素分子の励起に伴 う分子内電荷移動がどのような方向で行われるかを知る こと,②分子内電荷移動の先に,分子内電荷移動を促進 または阻害する残基があるか,を知ること,が重要である.

2.2 色素の平面性と色素とタンパク質との 分子軌道の共有の影響

フィコシアノビリン (phycocyanobilin, PCB) 結合型光セ ンサータンパク質は, 主に光合成の最適化に関与しており, 様々な環境で光合成生物が生息するために必要不可欠なタ ンパク質の一つである (Rockwell and Lagarias 2010). PCB 結合光センサータンパク質は, 植物ではフィトクロム, シ アノバクテリアではシアノバクテリオクロムとして呼称さ れている. PCBは, 4つのピロール環が鎖状に結合した分



図3: PCBの構造式. 文献 (Noji et al. 2024b)の図を改変. (a) 一般 的なlactum型. (b) lactim 1, (c) lactim 2, (d) lactim 3型.

子で、プロピオン酸を2つ持つ(図3a). PCBの吸収波長は 500-700 nmであり、吸収波長と4つのピロール環の共平面 性(A環とB環、B環とC環、C環とD環の二面角の合計)の 間には、高い相関があることが知られており、共平面性が 0°に近ければ近いほど、即ちすべてのピロール環が同一平 面上にあればあるほど長波長になることが知られている (Bandara et al. 2021). これは、共役二重結合が同一平面上 にあるほど、分子軌道が広範囲に非局在化し、エネルギー 準位が安定化するため、理にかなった結果である.

興味深いことに、シアノバクテリアAnabaena cylindrica PCC 7122由来のPCB結合タンパク質Anacy_2551g3 (Pfr) のPCBの吸収波長は、PCB結合タンパク質の中でも最も 長波長である728 nmであることが報告された (Bandara et al. 2021). しかし、PCBの平面性は低く、共平面性と吸 収波長の相関直線から逸脱していた (Bandara et al. 2021). Anacy_2551g3 (Pfr) 構造内のPCBの吸収波長は、共平面性 では説明できないため、PCBはlactum型ではなく、lactim 型であると考えられた. これは、lactim型はlactum型より 長波長であるということが既に報告されていたからである (Singer et al. 2014). lactum型とは、A環とD環のO原子が脱 プロトン化している状態であり、一般的によく知られて いるPCBの状態である (図 3a). 一方で、lactim型では、A 環またはD環のO原子がプロトン化している状態である(図 3b, c, d).



図4: PCB結合タンパク質における吸収波長の計算値と実験値の比較.文献(Noji et al. 2024b)の図を改変. (a) ●: lactum型. ■: lactum型. ▲: B環の窒素原子が脱プロトン化した状態のlactum型.赤色はAnacy_2551g3 (Pfr)を表す.これらのシンボルで示される結果は、量子化学的に計算する範囲をPCBとPCBに共有結合するCysさらに、PCBと水素結合ネットワークを形成するアミノ酸残基や水分子に指定した.○: 量子化学的に計算する範囲をPCB (lactum型)およびPCBに共有結合するCysのみした場合の結果.この相関図における吸収波長の計算値は、文献(Noji et al. 2024b)における計算値の補正式で補正されている.

この仮説が正しいかを検証し、PCBの吸収波長が決定 される要因を明らかにするため、著者はAnacy_2551g3 (Pfr)を含む7つのPCB結合タンパク質構造においてPCBの 波長を計算した.lactum型を想定した場合、7つのPCB結 合タンパク質の結晶構造から計算された吸収エネルギー は、Anacy_2551g3 (Pfr)も含めて、高い相関が得られた (図 4).Anacy_2551g3 (Pfr)においてlactim型を想定する と、吸収エネルギーが相関直線から逸脱した.この結果は、 Anacy_2551g3 (Pfr)におけるPCBはlactum型であることを 示唆する.

Anacy_2551g3 (Pfr) 以外は, 共平面性と吸収波長に高い 相関があった (図 5). Anacy_2551g3 (Pfr) の共平面性は約 100°であり, 共平面性から予測される吸収波長は約560 nm である. 一方で, Anacy_2551g3 (Pfr) の吸収波長の実験値 は728 nmであり, これは共平面性から予測される波長よ りも約170 nmも長波長である.

吸収波長が長波長になる要因を調べるため、 Anacy_2551g3 (Pfr)と、共平面性で吸収波長を説明できる 中で最も長波長であるRcaE (Pr)構造内のPCBに注目し、 それぞれのPCBにおけるHOMOとLUMOの分子軌道を比



図5: 共平面性と吸収波長の関係. 文献(Noji et al. 2024b)の図を 改変.

較した. Anacy2551g3 (Pfr) では, A環とD環の距離が近 く, 分子軌道の重なり(図 6aのピンク色で囲った領域)は, HOMOは反結合的な特徴, LUMOは結合性軌道的な特徴を 持つ, そのため, HOMOは不安定化, LUMOは安定化し, HOMO-LUMOエネルギー差は小さくなる(図 6b). 一方で, RcaE (Pr)ではA環とD環の間は遠い(図 6a). そのため, A 環とD環間に相互作用は無く, 励起エネルギーへの影響は ない(図 6b). A環とD環の距離が近いのは, 7つのPCB結合 光センサータンパク質においてAnacy_2551g3 (Pfr) のみで ある. このような理由により, Anacy_2551g3 (Pfr) は例外 的に平面性と吸収波長の相関直線から逸脱する.

また、興味深い事に、量子化学計算の範囲をPCBと水 素結合ネットワーク形成するアミノ酸残基や水分子を含 める場合と、含めない場合 (PCB,およびPCBと共有結合 するCys残基のみを量子化学計算の範囲に含める場合)で は、PCB結合タンパク質AnPixJg2(Pr)とSlr1393g3(Pr) が相関直線から逸脱した(図4の白丸). AnPixJg2 (Pr), Slr1393g3 (Pr), Sb.phyB (PG) -PCB (Pr) はほぼ同じ共 平面性を持つ (図 5). AnPixJg2 (Pr), Slr1393g3 (Pr) では PCB近傍にTrpが存在するが、Sb.phyB (PG) -PCB (Pr) は Trpが存在せず,相関直線上にある(図4の白丸).この理 由を調べるため、これらのタンパク質構造内のPCBの分子 軌道に注目した. その結果, AnPixJg2 (Pr)とSlr1393g3 (Pr) ではHOMOの分子軌道がTrpと共有していることがわかっ た(図 7a). このような分子軌道の共有は、エネルギー準 位が近く, 且つ, 近距離にいる場合に起こると考えられる. PCBとTrpのHOMO同士の分子軌道の共有が起こると、反 Anacy_2551g3 (Pfr)

LUMO

HOMO

(b)

RcaE (Pr)

LUMO (PCB)

hν

HOMO (PCB) Anacy_2551g3 (Pfr)

LUMO (PCB)

hv

HOMO (PCB)

図6: RcaE (Pr) とAnacy2551g3 (Pfr) 構造におけるPCBのHOMOとLUMOの分布および励起エネルギーとの関係. 文献 (Noji et al. 2024b) の図を改変. (a) HOMOとLUMOの分布. ピンクの 矢印と楕円は, 環Aと環Dの分子軌道の重なりを示す. (b) 分子軌道の重なりが励起エネルギー に与える影響.



図7: Sb.phyB (PG) -PCB (Pr), AnPixJg2 (Pr), Slr1393g3 (Pr) におけるPCBのHOMOとLUMOの分布および励起 エネルギーとの関係. 文献 (Noji et al. 2024b) の図を改変. (a) HOMOとLUMOの分布. (b) 励起エネルギーへの分子 軌道共有の影響.

結合性軌道が生じる.この反結合性軌道から光学遷移が 生じるため、反結合性軌道が生じない場合よりもHOMO-LUMO遷移に必要な励起エネルギーは小さくなる(図7b).

このように, 色素が色素近傍に存在するπ電子系を持つ 分子と分子軌道を共有し, 色素単独で存在するよりもエ ネルギー準位が変化している可能性があり, それがタン パク質機能に重要である場合もあるため, 注意が必要で ある.

3. 電子移動が速く起こる構造とはどんな構造か?

3.1 アミノ酸残基と補因子間の静電相互作用が 電子移動速度へ及ぼす影響

Blue light using flavin (BLUF) は、青色に吸収を持つ発 色団フラビンモノヌクレオチド (flavin mononucleotide, FMN)を有する青色光センサータンパク質の呼称である. PixDはBLUFの一つであり、光合成生物の走光性(光に向 かって移動する)に関与する光センサータンパク質の一つ である (Lukacs et al. 2022). PixDの結晶構造は2種類が報

(a)

LUMO

номо

RcaE (Pr)



図8: PixDに お け るFMN結 合 部 位 (Noji et al. 2023). (a) Trp91_{out}立体異性体構造 (Yuan et al. 2006). (b) Trp91_{in}立体異性 体構造 (Yuan et al. 2006). 黒い点線はH結合を示す. 赤で示し た残基は, Trp91_{out}と (b) Trp91_{in}立体異性体構造の主な違いに対 応する.

告された (Yuan et al. 2006). 一つは、FMN近傍にMet93が 位置し、Trp91が溶媒に露出したTrp91ω構造である. もう 一つは、Trp91がフラビン近傍に位置し、Met93が溶媒に露 出したTrp91』構造である (図 8) (Yuan et al. 2006). フラビ ンが光励起を受けると、Tyr8からフラビンへ電子移動が起 こる. この過程の電子移動時定数も, 7-14 psと40-180 psの 2種類が存在することが報告されており、それぞれ異なる PixDの立体異性体に対応することが示唆された (Fujisawa et al. 2021; Gauden et al. 2006). しかしながら, Trp91_{in}と Trp91。このどちらが速い電子移動を起こす立体異性体であ るかは長い間わかっていなかった.これは、PixDおよび PixDと相同性の高いBLUFタンパク質の基底状態の構造が Trp_{in}であること (Goings et al. 2018; Yuan et al. 2006; Yuan et al. 2011), Trpoutであること (Collette et al. 2014; Karadi et al. 2020), をそれぞれ示唆す研究結果が報告されたからであ る. そのため、シグナル伝達における重要な構造がどち

らであるかについては解明されていなかった.

7-14 psの速い電子移動を起こす立体異性体と,40-180 psの遅い電子移動を起こす立体異性体の決定的な違いは, 速い電子移動を起こす立体異性体のみが,シグナリング 状態に到達するという実験結果によって明らかにされて いる(Fujisawa et al. 2021).そこで,シグナリング状態に 到達する基底状態の立体異性体を決定するために,著者 はTrp91_{in}構造とTrp91_{out}構造のどちらで速い電子移動が生 じるかを調べることにした.具体的には,バルク水の影 響を考慮した励起状態,電荷分布状態の量子化学計算を 行い,励起状態から電荷分離状態へ遷移するために必要 な活性障壁を計算した.

基底状態の原子座標(coordinate q₁)における光励起状 態[FMN*]のエネルギー準位は、Trp19,, Trp91,のどち らの構造においてもほぼ同じであった(図 9b, cにおける coordinate q₁の赤丸) (Noji et al. 2023). 光励起状態[FMN*] で再配置した原子座標 (coordinate q1*) における光励起状態 [FMN*]のエネルギー準位も、どちらの構造においてもほ ぼ同じであった (図 9b, cにおけるcoordinate q₁*の赤丸). しかし、興味深い事に、FMNとTyrの間で電荷分離してい る状態[Tyr⁸⁺⁺/FMN⁻]のエネルギー準位は、Trp19_{au}構造では 光励起状態[FMN*]のエネルギー準位より120 meV低いエ ネルギー準位であるのに対し, Trp91』構造では310 meVも 光励起状態[FMN*]のエネルギー準位より不安定であった. マーカスの電子移動理論に基づくと、光励起状態[FMN*] での再配置後における光励起状態[FMN*]と電荷分離状態 [Tyr^{*+}/FMN⁺]とのエネルギー準位差が、小さければ小さい ほど、電子移動反応における活性障壁は小さくなる。従っ て、この結果はTrp91。m構造が速い電子移動を起こす基底 状態の構造であることを示唆する.

ではなぜ、Trp91_{out}では光励起状態[FMN*]と電荷分離状 態[Tyr8⁺⁺/FMN⁺]のエネルギー準位差が小さく、Trp91_{in}では 大きいのだろうか.この疑問に答えるため、光励起状態 [FMN*]と電荷分離状態[Tyr⁸⁺⁺/FMN⁺]のエネルギー差を大 きくさせているアミノ酸残基を特定することにした.具 体的には、各アミノ酸残基が電荷分離状態[Tyr⁸⁺⁺/FMN⁺] のエネルギー準位に与える静電相互作用の影響を調べた. Trp91_{in}構造では、Tyr63、Asp69が主にエネルギー準位を 不安定に、Arg65、Arg71が安定化に寄与していた(図10a) (Noji et al. 2023).この傾向はTrp91_{out}構造でも同じであっ た(図10b).Trp91_{in}とTrp91_{out}の寄与の差を取ると、これら の寄与の大きさは同程度であるため、打ち消し合った(図 10c).意外にも、寄与の差の中で大きかったのはSer28



図9: PixDにおける光誘起電子移動 (Noji et al. 2023). (a) 1, 暗順応状態; 1*, 光励起[Tyr8/ FMN*]状態; 2, 電荷分離[Tyr8^{+/}/FMN⁺]状態;. (b) 中間状態のエネルギー準位. 丸印は光励起状 態(赤)と電荷分離[Tyr8^{+/}/FMN⁺]状態; (青)のエネルギー準位を示す.

であった (図 10c). Ser28はFMN近傍にあり, Trp91』構造 ではSerの側鎖はIle24の主鎖と水素結合を形成しており、 FMNに近い向きに向いている. この向きでは、Ser28のヒ ドロキシ基-OHの酸素原子のδとFMN が静電反発するた め, 電荷分離状態[Tyr⁸⁺⁺/FMN^{*-}]のエネルギー準位が不安定 化したのだと考えられる.一方で、Trp91out構造では、Ser 側鎖がLeu25の主鎖と水素結合を形成し、FMNから遠ざか る向きに向いているため、FMN^{*}との反発は起こらない. そのため、Ser28の向きによって電子移動速度が速いか、 遅いかが決まっていることが示唆された.興味深い事に、 Ser28の向きは、Trp91とMet93の位置関係で制御されてい る. Trp91』構造ではTrp91の側鎖, Met93とLeu25の主鎖,に よって、水分子H₂O-1008が水素結合しており、Ser28の側 鎖がLeu25ではなく、Ile24の主鎖と水素結合することにな る (図 8) (Noji et al. 2023). 従って, Trp91_{in}構造では必然 的にSer28は電子移動が遅くなる向きを向いていると考え られるため、Trp91ou構造がシグナリング状態に到達する ことができる速い電子移動を起こす基底状態であること が示唆された (Noji et al. 2023).

励起状態と電荷分離状態のエネルギー準位がほぼ同じ 値にある原子座標に達したときに、活性障壁が小さくな り、高速な電子移動反応が起こる.これは、マーカスの電 子移動理論から容易に予想されることだが、PixDでは、ほ ぽーつのSer残基のヒドロキシ基の向きで制御されている ことがわかった.これは、電子受容体や電子供与体近傍 の、Ser、Thr、Tyrの-OH基、Cysの-SH基、Asn、Glnな ど の-NH₂や=O基の向き、Arg、Lys、Asp、Gluとの距離、の 調整によって、電荷分離前後の構造における電荷分離状態 のエネルギー準位を調整できることを予想させる.PixDの みならず、他のタンパク質でも同様な制御が起きていると 考えらえる.

3.2 補因子そのものが変わることによる 電子移動速度への影響

酸素発生活型光合成生物であるシアノバクテリアや高 等植物は、2種類の光化学系膜タンパク質を持つ.光化学 系IIは太陽光エネルギーを使って水から電子を引き抜く役 割を担い、光化学系I(photosystem I, PSI)は光化学系IIか



図10: 光励起状態[FMN*]で再配置した原子座標(coordinate q_{1*})における電荷分離状態[Tyr8^{+/}/FMN⁺]のエネルギー準位に対 する残基の寄与. 文献 (Noji et al. 2023)の図を改変. (a) Trp91_{in} 構造, (b) Trp91_{ou}構造, (c) 寄与の差(Trp91_{in} - Trp91_{out}).

ら受け取った電子に光エネルギーを供給し,高い還元力 をもつ電子を生成する役割を担う.PSIには、約100個の Chl aが結合し、PSIの吸収波長のピークは約680 nmである (Jordan et al. 2001).PSIに結合する大部分のChl aは光捕集 アンテナの役割を担い、吸収した太陽光エネルギーを光 化学反応中心へ供給する.光化学反応中心は、P700,A₋₁, A₀,A₁,F_x,F_A,F_Bによって構成される(図 11)(Jordan et al. 2001).P700はChl aとChl aの光学異性体であるChl aの エピマー(Chl a')の二量体であり、その吸収波長は700 nm であるためP700と呼ばれる.P700の2つのChlの内,Chl a' はPsaA側に存在するためP_Aと呼ばれ、Chl aであるPsaB側 はP_Bと呼ばれる.A₋₁,A₀,A₁はそれぞれ,Chl a,Chl a, フィロキノン(PhyQ)である.P700はPSIのサブユニット のPsaA,PsaBが交差する位置に存在するが,A₋₁,A₀,A₁ はそれぞれのサブユニットに一つずつ結合し、PsaA側で



図11:PSIの電子伝達補因子.(a)可視光駆動型.(b)近赤外光駆動型. 動型.

はA_{-1A}, A_{0A}, A_{1A}, PsaB側ではA_{-1B}, A_{0B}, A_{1B}と呼ばれる (Kawashima and Ishikita 2018). 光捕集アンテナから供給さ れた励起エネルギーはP700に移動し, 最初の電荷分離反応 が起こる. その後, 電子はA_{-1A}, A_{0A}, A_{1A} (A-blanch) 側, またはA_{-1B}, A_{0B}, A_{1B} (B-blanch) 側の経路を経由して, 最 終的にPsaC結合する3つの鉄硫黄クラスター F_x, F_A, F_Bに 移動する (Kawashima and Ishikita 2018).

酸素発生活型光合成生物には、Chl aよりも30-40 nm長 波長であるChl dやChl fを有する光合成生物も存在する (Miyashita et al. 1996). Chl dやChl fを有する光合成生物 は、可視光領域の光が遮られ、近赤外光の環境下でも適 応し、生存できるように進化したと考えられる (Gisriel et al. 2023). 近赤外光で酸素発生型光合成を達成していると いうことは、即ち、Chl aを有する光合成生物よりも低エ ネルギーで酸素発生型光合成を達成していることになり、 近赤外駆動型の光化学系膜タンパク質の反応機構解明に 注目が集まっている.

シアノバクテリアAcaryochloris marina (A. marina) は主 要色素としてChl dを利用する酸素発生活型光合成生物の 一つであり, PSIもほぼChl dで構成されている. 過渡吸 収実験からA. marina PSIのP740とA.1はChl dであるが, A0 はChl aであると考えられていた (Itoh et al. 2007; Kumazaki et al. 2002). しかし,近年報告されたA. marina PSIのクラ イオ電顕構造では, A0はPheo aであった (Hamaguchi et al. 2021). Pheo aは光化学系IIの電子伝達補因子としてよく知 られていたが, PSIで確認されたのは初めてである. その ため, なぜA. marina PSIのA0はChl aではなくPheo aとなっ たのか, という疑問が挙がった. 著者はこの疑問に答え るべく, Chl aを主要色素としてもつThermosynechococcus



図12:一電子還元におけるChl補因子のE_m. 文献(Noji et al. 2024a)の図を改変. (a) *A. marina*のPSI. 赤はChl *d*, 青はPheo *a*を示す. 全てのChl補因子をChl *a*に置き換えた場合の電位は黒で示される. (b) *T. elongatus*のPSI.

elongatus (T. elongatus) のPSI構造とA. marina PSI構造の P700 (P740), A.₁, A₀の酸化還元電位(E_m)をそれぞれの構 造から計算し, 比較した. また, 考察するためにA. marina PSI 構造内のP740, A.₁, A₀をChl aに置換したall-Chl a A. marina PSIの電位も計算した.

all-Chl a A. marina PSI構造のA_{0A}, A_{-1A}のE_mは, T. elongatus PSI構造のA_{0A}, A_{-1A}とほぼ同じ値である (図 12) (Noji et al. 2024a). この結果は、A_{0A}、A_{-1A}周囲のタンパ ク質環境はA. marina PSI構造とT. elongatus PSI構造で同じ であることを示唆する. A. marina PSI構造においてA_1 (Chl d)のE_m -959 mVは, all-Chl a A. marina PSI構造のA_{-1A} (Chl d) のE_m -1191 mVより約230 mV高い(図 12) (Noji et al. 2024a). この差はChl aとChl dのE_mの違い200 mVに由 来する (Kobayashi et al. 2016). A. marina PSI構造におけ るA-1AがChl dである場合, A0AがChl aだとA-1AよりA0Aの電 位が低く,一方で,A_{0A}がPheo aだとA-1AよりA_{0A}の電位が 高くなる (図12) (Noji et al. 2024a). この結果は、A_{0A}が Pheo aであればA-1AからA0Aへの電子移動が起こるが、A0A がChl aであればA₋₁₄からA₀₄への電子移動は起きないこと を示唆する.このようなことは、PAとA-IA間の関係にも言 える. A. marina PSI構造におけるアンテナChlはChl dであ るため、光を吸収し電荷分離を起こすには、P_A、P_BもChl dでなければならないと考えられる.もしも、P_A、P_BがChl aだと、吸収波長がChl dよりも短波長になるためである. A-1AがChl aのままだと、PAの電位より低くなり、やはり電 子移動は起こらない(図 12a) (Noji et al. 2024a). そのため, A-IAもChl dにする必要があったと考えられる. A-IAがPheo aではない理由は、アンテナからPA, PBへの励起エネルギー

移動を仲介する役割も担っているからかもしれない. *A. marina* PSIはアンテナChlとP_A, P_B, A.₁をChl *d*に置き換え, 近赤外光を吸収し電荷分離状態を形成できるようになっ たが, A_{0A} がChl *a*のままだと $A_{.1A}$ から A_{0A} の電子移動を起こ すことができないため, Pheo *a*に置き換えたのだと考えら れる.

4. 計算手法

結晶構造やクライオ電顕構造には水素原子の座標が 無いため,水素原子を付与し,座標を最適化する必要 がある.本稿で述べた研究では、分子力学 (molecular mechanics, MM) 法により水素原子座標の最適化を行っ た. 分子力学法とは、簡単に説明すると体積と電荷を持っ たボールとボールがばねで繋がっていると考える方法で ある (MacKerell et al. 1998). ばねは, 共有結合だけなく, 角度や二面角にも設定される. 電荷と体積を持ち, ばね で繋がったボールがどの位置で落ち着くか、即ち、系の エネルギーが最小になる水素原子位置を探索することで. 最適な水素原子座標を決定する. その後, 酸, 塩基のプ ロトン化状やChlやPheo aなどの酸化還元電位を,静電相 互作用の法によって決定する (Bashford and Karplus 1990; Kawashima and Ishikita 2018). 励起エネルギーや, 光励 起状態や電荷状態のエネルギー準位は量子化学により計 算する. 量子化学計算では, quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) 法という手法を用いる (WARSHEL and KARPLUS 1972). これは、励起エネルギーや、エ ネルギー準位を調べたい範囲のみを、量子力学(quantum mechanics, QM)的に扱い,残りの領域はMM的に扱う方 法である.QM領域の計算には多大なコスト(時間や費用 など)が掛かるが,MM領域は計算コスト小さい.QM領域 を限定することで現実的な時間や費用で計算結果を得る 利点がある.

5. おわりに

光合成生物が多様な環境に適応できるのは、アミノ酸 残基の制御による補因子への影響を変更したり、補因子 自体変更したりすることで、タンパク質内での光吸収を 変更しても電子移動が起こるように、微調整できるから だと考えられる.光合成生物が生息できる範囲が決まる 要因の一つは、タンパク質本来の性能や機能を保持でき る範囲だと考えられる.今後は、光捕集アンテナ内の吸 収波長制御機構や励起エネルギー移動経路、近赤外駆動 型の光化学系II膜タンパク質などを調べることで、近赤外 光に適用する機構をさらに詳しく調べていきたい.

参考文献

- Bandara, S., Rockwell, N.C., Zeng, X.L., Ren, Z., Wang, C., Shin, H., et al. (2021) Crystal Structure of a Far-Red-Sensing Cyanobacteriochrome Reveals an Atypical Bilin Conformation and Spectral Tuning Mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118: https://doi.org/10.1073/pnas.2025094118
- Bashford, D. and Karplus, M. (1990) pK_as of Ionizable Groups in Proteins - Atomic Detail from a Continuum Electrostatic Model. *Biochemistry* 29: 10219-10225.
- Collette, F., Renger, T. and Busch, M.S.A. (2014) Revealing the Functional States in the Active Site of BLUF Photoreceptors from Electrochromic Shift Calculations. *J. Phys. Chem. B* 118: 11109-11119.
- Dioumaev, A.K. and Lanyi, J.K. (2009) Two Bathointermediates of the Bacteriorhodopsin Photocycle, from Time-Resolved Nanosecond Spectra in the Visible. J. Phys. Chem. B 113: 16643-16653.
- Fujisawa, T., Masuda, S., Takeuchi, S. and Tahara, T. (2021) Femtosecond Time-Resolved Absorption Study of Signaling State of a BLUF Protein PixD from the Cyanobacterium Synechocystis: Hydrogen-Bond Rearrangement Completes during Forward Proton-Coupled Electron Transfer. J. Phys. Chem. B 125: 12154-12165.

Gauden, M., van Stokkum, I.H.M., Key, J.M., Luhrs, D.C., Van

Grondelle, R., Hegemann, P., et al. (2006) Hydrogen-Bond Switching Through a Radical Pair Mechanism in a Flavinbinding Photoreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 10895-10900.

- Gisriel, C., Shen, G., Flesher, D., Kurashov, V., Golbeck, J., Brudvig, G., et al. (2023) Structure of a Dimeric Photosystem II Complex from a Cyanobacterium Acclimated to Far-Red Light. J. Biol. Chem. 299: DOI: 10.1016/j.jbc.2022.102815
- Goings, J.J., Reinhardt, C.R. and Hammes-Schiffer, S. (2018) Propensity for Proton Relay and Electrostatic Impact of Protein Reorganization in SIr1694 BLUF Photoreceptor. J. Am. Chem. Soc. 140: 15241-15251.
- Hamaguchi, T., Kawakami, K., Shinzawa-Itoh, K., Inoue-Kashino, N., Itoh, S., Ifuku, K., et al. (2021) Structure of the Far-Red Light Utilizing Photosystem I of *Acaryochloris marina*. *Nat. Commun.* 12: https://doi.org/10.1038/s41467-021-22502-8
- Hayashi, S., Tajkhorshid, E. and Schulten, K. (2002) Structural Changes during the Formation of Early Intermediates in the Bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys. J.* 83: 1281-1297.
- Itoh, S., Mino, H., Itoh, K., Shigenaga, T., Uzumaki, T. and Iwaki, M. (2007) Function of Chlorophyll d in Reaction Centers of Photosystems I and II of the Oxygenic Photosynthesis of *Acaryochloris marina*. *Biochemistry* 46: 12473-12481.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W. and Krauss, N. (2001) Three-Dimensional Structure of Cyanobacterial Photosystem I at 2.5 Angstrom Resolution. *Nature* 411: 909-917.
- Karadi, K., Kapetanaki, S.M., Raics, K., Pecsi, I., Kapronczai, R., Fekete, Z., et al. (2020) Functional Dynamics of a Single Tryptophan Residue in a BLUF Protein Revealed by Fluorescence Spectroscopy. *Sci. Rep.* 10: https://doi. org/10.1038/s41598-020-59073-5
- Kawashima, K. and Ishikita, H. (2018) Energetic Insights into Two Electron Transfer Pathways in Light-Driven Energy-Converting Enzymes. *Chem. Sci.* 9: 4083-4092.
- Kobayashi, M., Sorimachi, Y., Fukayama, D., Komatsu, H., Kanjoh, T., Wada, K., et al. (2016) Physicochemical Properties of Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. pp. 95-147.
- Kumazaki, S., Abiko, K., Ikegami, I., Iwaki, M. and Itoh, S. (2002) Energy Equilibration and Primary Charge Separation in Chlorophyll d-Based Photosystem I Reaction Center Isolated from *Acaryochloris marina*. *FEBS Lett.* 530: 153-157.

- Lukacs, A., Tonge, P.J. and Meech, S.R. (2022) Photophysics of the Blue Light Using Flavin Domain. *Acc. Chem. Res.* 55: 402-414.
- MacKerell, A.D., Jr., Bashford, D., Bellott, R.L., Dunbrack,
 R.L., Jr., Evanseck, J.D., Field, M.J., et al. (1998) All-Atom
 Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics
 Studies of Proteins. J. Phys. Chem. B 102: 3586-3616.
- Miyahara, T. and Nakatsuji, H. (2019) Light-Driven Proton, Sodium Ion, and Chloride Ion Transfer Mechanisms in Rhodopsins: SAC-CI Study. *J. Phys. Chem. A* 123: 1766-1784.
- Miyashita, H., Ikemoto, H., Kurano, N., Adachi, K., Chihara, M. and Miyachi, S. (1996) Chlorophyll d as a major pigment. *Nature* 383: 402-402.
- Nogly, P., Panneels, V., Nelson, G., Gati, C., Kimura, T., Milne, C., et al. (2016) Lipidic Cubic Phase Injector is a Viable Crystal Delivery System for Time-Resolved Serial Crystallography. *Nat. Commun.* 7. DOI: 10.1038/ ncomms12314
- Nogly, P., Weinert, T., James, D., Carbajo, S., Ozerov, D., Furrer, A., et al. (2018) Retinal Isomerization in Bacteriorhodopsin Captured by a Femtosecond X-Ray Laser. *Science* 361. DOI: 10.1126/science.aat0094
- Noji, T. and Ishikita, H. (2022) Mechanism of Absorption Wavelength Shift of Bacteriorhodopsin During Photocycle. J. Phys. Chem. B 126: 9945-9955.
- Noji, T., Saito, K. and Ishikita, H. (2024a) How the Electron-Transfer Cascade is Maintained in Chlorophyll-d Containing Photosystem I. *Biochemistry*. 64: 203-212
- Noji, T., Saito, K. and Ishikita, H. (2024b) Molecular Origins of Absorption Wavelength Variation Among Phycocyanobilin-Binding Proteins. *Biophys. J.* 123: 3375-3385.
- Noji, T., Tamura, H., Ishikita, H. and Saito, K. (2023) Difference in the Charge-Separation Energetics between Distinct Conformers in the PixD Photoreceptor. J. Phys. Chem. B 127: 10351-10359.
- Polland, H.J., Franz, M.A., Zinth, W., Kaiser, W., Kolling, E. and Oesterhelt, D. (1986) Early Picosecond Events in the Photocycle of Bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* 49: 651-662.
- Rockwell, N. and Lagarias, J. (2010) A Brief History of Phytochromes. *Chemphyschem* 11: 1172-1180.
- Shim, S., Dasgupta, J. and Mathies, R.A. (2009) Femtosecond Time-Resolved Stimulated Raman Reveals the Birth of Bacteriorhodopsin's J and K Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 131: 7592-7597.

- Singer, P., Fey, S., Göller, A., Hermann, G. and Diller, R. (2014) Femtosecond Dynamics in the Lactim Tautomer of Phycocyanobilin: A Long-Wavelength Absorbing Model Compound for the Phytochrome Chromophore. *Chemphyschem* 15: 3824-3831.
- Varo, G. and Lanyi, J.K. (1991) Kinetic and Spectroscopic Evidence for an Irreversible Step Between Deprotonation and Reprotonation of the Schiff-Base in the Bacteriorhodopsin Photocycle. *Biochemistry* 30: 5008-5015.
- Warshel, A. and Karplus, M. (1972) Calculation of Ground and Excited-State Potential Surfaces of Conjugated Molecules .1. Formulation and Parametrization. J. Am. Chem. Soc. 94: 5612-5625.
- Yuan, H., Anderson, S., Masuda, S., Dragnea, V., Moffat, K. and Bauer, C. (2006) Crystal Structures of the Synechocystis Photoreceptor SIr1694 Reveal Distinct Structural States Related to Signaling. *Biochemistry* 45: 12687-12694.
- Yuan, H., Dragnea, V., Wu, Q., Gardner, K.H. and Bauer, C.E. (2011) Mutational and Structural Studies of the PixD BLUF Output Signal That Affects Light-Regulated Interactions with PixE. *Biochemistry* 50: 6365-6375.
シアノバクテリアのステート遷移と ユニバーサルストレスタンパク質

園池 公毅 1)

2024年12月16日受付, 2024年12月28日受理

シアノバクテリアの光環境応答メカニズムの一つであるステート遷移は、周辺集光装置であるフィ コビリソームから光化学系 I と光化学系 II へのエネルギー分配を、秒から分単位で調節する.陸上植 物や緑藻の周辺集光装置LHCIIからのエネルギー分配が調節される同様のメカニズムの解明が比較的 進んでいるのに対して、シアノバクテリアのステート遷移には未解明の点が多い.本稿では、ステー ト遷移のメカニズムとそれに関わる因子を概説した後、ごく最近になってステート遷移にかかわるこ とが示されたUniversal Stress Proteinの一種であるShr0244について紹介する.最後に、Universal Stress Proteinによるシグナル伝達の様々な可能性について考察する.

State transition in cyanobacteria and Universal Stress Protein

Kintake Sonoike¹

State transitions, one of the light-environment response mechanisms of cyanobacteria, regulate the distribution of energy from the phycobilisome, a peripheral light-harvesting apparatus, to photosystem I and photosystem II on a second-to-minute scale. While the similar regulatory mechanism of energy distribution from the peripheral antenna LHCII to photosystems in land plants and green algae is relatively well understood, the state transition in cyanobacteria is still largely unexplored. In this paper, after outlining the mechanism of state transitions and the factors involved, we introduce Slr0244, a type of Universal Stress Protein that has recently been shown to be involved in state transitions. Finally, the various possibilities of the signal transduction by the Universal Stress Protein is discussed.

キーワード:光合成,呼吸,シアノバクテリア,ステート遷移,USP Photosynthesis, Respiration, Cyanobacteria, State transition, USP

1. ステート遷移のメカニズム

1.1 光合成におけるステート遷移

1.1.1 ステート遷移の概略 陸上植物と藻類、シアノバクテリアの光合成において

は,光化学系 I と光化学系 II が直列に機能して電子伝達

連絡先 園池 公毅 早稲田大学 教育・総合科学学術院 〒 162-8480 東京都新宿区若松町 2-2 Tel: 03-5369-7306

Tel: 03-5369-7306 Email: sonoike@waseda.jp を駆動しているため、2種類の光化学系が不均等に励起された場合には、電子伝達の収率が低下するのみならず、 光阻害が誘発され得る.これを避けるために光化学系 I と II の存在量自体を変化させる馴化応答である光化学系 量比調節が知られているが、これには単細胞生物の場合 でも完了まで通常12時間程度が必要とされる(Hihara and

早稲田大学 教育・総合科学学術院 Faculty of Education and Integrated Sciences, Waseda University, Tokyo, Japan

Sonoike 2001). 他方, 過剰に励起された光化学系から, もう一方の光化学系へ, 集光性のアンテナ複合体が移動 することにより, 励起を均等化する仕組みがステート遷 移である (Allen 1992). このステート遷移は, 数秒から数 分の間で誘導され得る応答であり, 1969年の発見 (Murata 1969, Bonaventura and Myers 1969)以来, 光合成の制御機構 の一つとして, そのエネルギー分配調節の仕組みが研究 されてきた.

陸上植物と緑藻では、アンテナ複合体として働くのは、 クロロフィルaとクロロフィルbを含む集光性クロロフィル タンパク質複合体 (LHCP) である. この内, 光化学系Ⅱの 周辺集光装置として働くLHCIIは、クロロフィルa/b比が1.2 程度であるのに対して、光化学系Iの周辺集光装置として 働くLHCIのクロロフィルa/b比は4程度である.コア集光 装置は光化学系IIでも光化学系Iでもクロロフィルaのみ でクロロフィルbを含まないことを考えると、クロロフィ ルbを選択的に励起する光,例えば450 nm付近や660 nm付 近の光が照射された場合には、光化学系Ⅱが主に励起され て2種類の光化学系の励起バランスが崩れることになる. そのような条件下で,通常は光化学系Ⅱの周辺集光装置と して働くLHCIIが光化学系 Iの周辺集光装置として働くよ うになり、結果として励起バランスを回復させる仕組みが ステート遷移である.光化学系Ⅱがより選択的に励起され る状態をステート2,光化学系 I がより選択的に励起され る状態をステート1と呼び、光環境の変化に応じてステー ト1からステート2への、あるいは逆へのステート遷移が引 き起こされる (van Thor et al. 1998).

LHCIIが吸収した光エネルギーが二種類の光化学系のど ちらに分配されるのかは、LHCIIと光化学系の相互作用が 重要な役割を果たしており、実際に、ステート2の条件に おいて誘導される光化学系 I とLHCIIが結合した様々な超 複合体が生化学的に単離されている(Minagawa 2011).他 方、周辺集光装置と光化学系の結合による調節とは別に、 光化学系間のエネルギー移動(スピルオーバー)の調節の存 在も示唆されている.

1.1.2 ステート遷移における光環境感知機構

ステート遷移における励起バランスの感知にはプラス トキノン (PQ) プールのレドックス状態が利用されている. 光化学系 II が主に励起され,光化学系 I の活性がそれに 追いつかない場合,光化学系間の電子伝達成分は,光化学 系 II からの電子によって還元されることになる.したがっ て, PQプールが還元されている状態は,ステート2であり, LHCIIが吸収した光エネルギーを光化学系 I へと渡すよう にステート遷移を起こすことにより励起バランスが回復され. 逆にPQ プールが酸化されている状態はステート1であり,LHCIIが吸収した光エネルギーを光化学系Ⅱへと渡すようにステート遷移を起こすことにより励起バランスを回復できる.陸上植物では,暗順応した植物のPQプール は酸化的であり,光照射によって還元されるため,光質の変化だけでなく,光量の変化もPQプールのレドックス状態を変化させる.強光条件において誘導されるステート遷移は,励起バランスの調節というよりは,強光からの光合成,特に光化学系Ⅱの保護に働いている可能性が考えられる(Bellafiore et al. 2005, Fujimori et al. 2005).

PQプールのレドックス状態の具体的な感知メカニズム については、詳細まで解明されたとは言い難いものの、少 なくとも陸上植物と緑藻においては大筋の流れが明らか となってきている (Minagawa 2011). 還元型のPQがシトク ロムb₆f 複合体のキノン酸化サイト (Qo) に結合すると複合 体,特にリスケ (Rieske) タンパク質の構造変化が誘導され る (Vener et al. 1995, 1997, Zito et al. 1999). この構造変化 は、サブユニットIVを通してこれに結合したセリン・ス レオニンキナーゼを活性化し (Dumas et al. 2017), キナー ゼは複合体から遊離してLHCIIをリン酸化し(Depège et al. 2003, Bellafiore et al. 2005), ステート2への遷移を誘導す る. このセリン・スレオニンキナーゼは、緑藻のクラミ ドモナスで最初に発見され、Stt7と命名された.シロイヌ ナズナでのオルソログはStn7と呼ばれている.他方、PQ プールが酸化されると、キナーゼが不活性化されるととも に、フォスファターゼ (TAP38あるいはPPH1) によりLHCII が脱リン酸化されてステート1に移行する (Pribil et al. 2010, Shapiguzov et al. 2010).

1.2 シアノバクテリアのステート遷移

上述の陸上植物や緑藻とは異なり、シアノバクテリアで は、クロロフィルを結合したLHCPを持たず、周辺集光装 置としてフィコビリソームが用いられている。フィコビリ ソームは一部の藻類(紅藻、灰色藻など)とシアノバクテリ アに見られ、陸上植物には見られない、LHCPがチラコイ ド膜を貫通するαへリックスを持つ膜タンパク質であるの に対して、フィコビリソームは、開環テトラピロール構造 を持つ発色団ビリンを結合した水溶性タンパク質(フィコ ビリタンパク質)の巨大な複合体であり、光化学系IIの周 辺集光装置として働く(Glazer 1984, Zilinskas and Greenwald 1986). アンテナの性質は大きく異なるものの、陸上植物 のLHCPと同様に、シアノバクテリアのフィコビリソーム においても、光環境変化に応答して光化学系Iへとエネル

ギーを分配するステート遷移がみられる (Mullineaux 1992, 1994). アンテナが、LHCPであってもフィコビリソーム であっても、そのステート遷移のメカニズムには共通点が 多くみられ、その制御にはPQプールのレドックスがかか わっている (Mao et al., 2002). また, フィコビリソームは チラコイド膜上を実際に動き得ることが蛍光消光からの回 復測定 (FRAP: Fluorescence recovery after photobleaching) に よって明らかとなっている (Mullineaux et al. 1997, Sareina et al. 2001). ただし、フィコビリソームと光化学系 I の相互 作用がどのようにステート遷移を誘導するのかには不明の 点が多い.陸上植物においてみられたシトクロムb₆f複合 体とリン酸化反応の関与に関しては、フィコビリソームの リン酸化が報告され、シアノバクテリアでも同様なメカニ ズムが存在するという考え方がある一方で、シトクロムb₆ f複合体は直接ステート遷移にはかかわらず、フィコビリ ソームのリン酸化もステート遷移に必須ではないという報 告もあり、決定的な結論は得られていない(Calzadilla and Kirilovsky 2020).

フィコビリソームの発色団の吸収極大は、その種類に よって異なるが、フィコシアノビリンで620 nm付近、フィ コエリスロビリンで550 nm付近と、いずれもクロロフィル の吸収が小さい緑色から橙色にかけての領域である.他方、 クロロフィルの結合数は、光化学系 I のコア集光装置では 40程度であるのに対して、光化学系 I のコア集光装置では 100程度と大きい(Rögner et al. 1990).従って、基本的にフィ コビリソームが吸収する波長の光は光化学系 I 励起光、ク ロロフィルが吸収する波長の光は光化学系 I 励起光として 働く、ビリンとクロロフィルの間では、吸収波長が大きく 異なることから、照射される光の波長のシアノバクテリア のステート遷移に対する影響は、陸上植物の場合よりも格 段に大きい.

1.3 シアノバクテリアの呼吸とステート遷移

シアノバクテリアは原核生物であり,光合成と呼吸の 代謝の反応は,同じ細胞区画に共存しているのみならず, 電子伝達系の一部を共有している.具体的には,通常の 呼吸系におけるユビキノン (UQ) プールとシトクロムbc₁ 複合体の代わりに,チラコイド膜上に存在するPQプール とシトクロムb₆f 複合体が,光合成と呼吸に共通して使わ れる (Aoki and Katoh 1982, Peschek and Schmetterer 1982). 従って,呼吸の電子伝達の初発部位であるNADHデヒド ロゲナーゼ様複合体 (NDH複合体) からの電子は,PQプー ルに入ったのち,シトクロムb₆f 複合体を経て,チラコイ ド内腔に存在するシトクロムcからシトクロムc酸化酵素 (末端酸化酵素) 複合体へ渡り, 最終的に酸素へと抜ける ことになる.

暗順応したシアノバクテリアの細胞のPQプールは, 陸上植物とは異なって還元的であると報告されており (Mullineaux and Allen 1986, Schreiber et al. 1995, Campbell and Öquist 1996), これは, この光合成と呼吸の相互作用 を反映したものであると考えられている、すなわち、呼吸 系の電子伝達のみが働く暗所において、NDH複合体の活 性が下流の末端酸化酵素シトクロムc酸化酵素複合体の活 性より高いため、途中のPQプールは還元状態になると考 えられる. 結果として、十分に暗順応したシアノバクテリ ア細胞は、還元的なPQプールによりステート遷移が誘導 されてステート2になり (Mullineaux and Allen 1990). 生育 光程度の光が照射されると光合成の電子伝達が働くため にPQプールがより酸化されてむしろステート1に移行する (Campbell and Öquist 1996, Campbell et al. 1998). さらに照 射光量を上げると、光合成の電子伝達がシトクロムb₆f複 合体によって律速されるため、PQプールは再び還元され てステート2となる.

光量の増加に伴うステート2→ステート1→ステート2と いう変化は、多くの種のシアノバクテリアに見られるが、 暗所でステート1になる種も存在する(Misumi et al. 2015). また、同様なステート遷移の変化と暗所でのPQプールの 還元は藻類でも見られ、典型的には灰色藻のCyanophora paradoxaで報告されている(Misumi and Sonoike 2017).同 じようなPQプールのレドックス状態の変化は、緑藻でも 見られるが、種や培養条件によってその程度はさまざまで ある、藻類における暗所でのPQプールの還元は、葉緑体 呼吸によるものだと考えられるが、そのメカニズムには不 明の点が多い.

2. シアノバクテリアのステート遷移にかかわる因子

2.1 フィコビリソームおよび光化学系 I の因子

破壊するとステート遷移に異常がみられる遺伝子は数 多く知られている.例えば、フィコビリソームのコアと 光化学系をつなぐApcDおよびApcEをコードする遺伝子の 破壊株においては、ステート遷移が見られなくなる(Ashby and Mullineaux 1999a).ただし、ApcD/Eの遺伝子の破壊や 変異がもたらす影響は複雑であり、ステート遷移に対す る影響と、光化学系へのエネルギー移動に対する影響は、 数多くの報告の中で必ずしも一致していない(Calzadilla and Kirilovsky 2020). ApcD/Eは、ステート遷移とエネル ギー移動の両方に影響を与えており、ステート遷移への 直接的な影響と、エネルギー移動に対する影響の間接的 な影響を同時に観察している可能性がある.また、シア ノバクテリアの種によってもその影響は異なるように思 われる.

Synechocystis sp. PCC 6803においては、フィコビリソー ムのサブユニットのリンカーとして働くCpcGタンパク質 にCpcG1とCpcG2の2コピーがあり、このうち、CpcG1を コードする遺伝子を破壊するとステート遷移が見られな くなることが報告されている(Kondo et al. 2009).このこ とは、CpcG1がステート遷移を制御していることを意味す るのではなく、CpcG2を含むフィコビリソームが、光化学 系Iのアンテナとして働いているために(Kondo et al. 2005, 2007)ステート遷移に関与していないことを反映している と考えられる.同様に光化学系Iのアンテナとして働く フィコビリソームとして、CpcLを含むものが知られてい る(Watanabe et al. 2014).

他方,光化学系 I 側の因子としては, PsaK2が報告され ている (Fujimori et al. 2005). Synechocystis sp. PCC 6803に おいて、光化学系Iサブユニットの発現は強光下で抑制 されるが、その構成サブユニットの内、唯一PsaK2のみが 強光で発現が誘導されることが知られていた(Hihara et al. 2001). PsaK2は、*sll0629*遺伝子にコードされた光化学系 Iのサブユニットであり, 強光条件下で発現が誘導されて 光化学系 I 複合体に組み込まれる. 強光馴化した細胞にお いては、PsaK2の欠損によりステート遷移が見られなくな るが、興味深いことに、弱光に馴化した細胞においては、 PsaK2欠損株であっても野生株並みのステート遷移が見ら れる (Fujimori et al. 2005). このことは, 弱光馴化した細胞 と強光馴化した細胞では、異なるメカニズムによるステー ト遷移が働いており、PsaK2は、強光馴化細胞におけるス テート遷移にのみ働いていることを意味している. PsaK2 の欠損株は強光条件での生育低下がみられることから、強 光条件で見られるPsaK2依存のステート遷移は、光質変化 に応答した光合成効率の維持ではなく、光量変化に応答し た強光からの光合成系の保護に働いていると考えられる. なお、PsaK2の強光による発現誘導自体は少なくとも数十 分の時間を必要とする馴化過程であるのに対して、一度 PsaK2 が光化学系 I に組み込まれると、ステート遷移の応 答自体は秒から分単位で誘導される.

2.2 その他の因子

2.2.1 代謝関連変異株とステート遷移

ステート遷移は、PQプールのレドックス状態の変化に 依存して誘導されるため、シアノバクテリアにおいては、 呼吸の電子伝達、あるいはより一般的な代謝系の変化に よっても影響を受ける. 例えば, 呼吸の電子伝達におい てキノンの還元を担うNDH複合体のサブユニットNdhF1 の欠損株では、暗順応した細胞においてもPQプールへの 電子の流入が抑制されるため、PQプールは酸化状態に保 たれる. 従って, 暗順応によりPQプールを還元してス テート2を誘導する簡便な方法ではPQプールは酸化された ままになり、光化学系ⅡのQ₄からQ_Bへの電子伝達の阻害 剤であるDCMUの存在下で光照射をしてPQプールを酸化 し、その状態との差によってステート遷移を検出しよう としても、見かけ上、ステート遷移は観察されない(Ogawa et al. 2013). さらに、呼吸系の電子伝達の出発点となる NADPHは、シアノバクテリアにおいては主に酸化的ペン トースリン酸回路によって生成されるため、酸化的ペン トースリン酸回路を構成する酵素の一つ6-ホスホグルコン 酸デヒドロゲナーゼを欠く欠損株 (*Δgnd*) においても, や はり見かけ上ステート遷移は見られなくなる (Ogawa et al. 2021). しかし、このような場合でも、シトクロムc酸化酵 素を阻害するシアン化カリウムを添加して暗順応した場 合には、ステート2を誘導することが可能であり、間接的 な代謝の影響を排除してステート遷移を評価することが 可能になる.

2.2.2 rpa遺伝子

ランダムに変異を入れたSynechocystis sp. PCC 6803のコ ロニーのクロロフィル蛍光イメージングにより集光機能 の調節に異常を示す変異株をスクリーニングした結果, rpaAと rpaBが単離された (Ashby and Mullineaux 1999b). これらの遺伝子の変異株は、フィコビリソームから光化 学系へのエネルギー伝達に異常を示すが、これらの遺伝 子は転写因子として働くOmpR型のレスポンスレギュレー ターをコードしており、その制御はステート遷移ではな く、遺伝子発現レベルのものであると考えられる、どち らの遺伝子も、代謝のグローバルな調節に働いている (Riediger et al. 2019, Scheurer et al. 2021) ことが明らかに なっていることから, 前節で述べたような代謝の間接的 な影響を観察していた可能性が考えられる.他方、同様 にして単離されたrpaCについては, 短期的な応答である ステート遷移に働いていると報告されているが (Emlyn-Jones et al. 1999), その具体的なメカニズムについては不 明である.

2.2.3 slr0244遺伝子

ごく最近,比較ゲノムの手法を用いてステート遷移に

関わる新しい因子が単離された(Fukunaga et al. 2024). フィ コビリソームをアンテナ系として持つシアノバクテリア の中で、Prochlorococcus、Prochlorothrix、Acaryochlorisの 3属はフィコビリソームを持たないと考えられる.フィコ ビリソームが独立に3回失われたとすれば、この3属の種 のゲノムには存在せず、残りの多くの種のゲノムに存在 する遺伝子は、フィコビリソームの機能に関与する可能 性が高いと考えられる.実際に、そのような解析により リストアップされた上位の10遺伝子のうち、5遺伝子は フィコビリソームの構成タンパク質の遺伝子,2遺伝子は フィコビリソームの発色団の合成にかかわる遺伝子,1遺 伝子はフィコビリソーム内での過剰なエネルギー制御に かかわるカロテノイドタンパク質OCPの遺伝子であった. 残る2遺伝子の内, slr0244は、後述するUSPモティーフが タンデムに2つ並んだ機能未知遺伝子であったが、その破 壊株は、フィコビリソーム含量とPOプールの酸化還元は 正常でありながら、ステート遷移の能力が失われていた. Slr0244は、ステート遷移におけるPQプールのレドックス 感知か、それ以降の過程にかかわると考えられるが、そ の具体的な機能については、現時点では明らかではない.

3. Universal Stress Proteinと環境応答

3.1 Universal Stress Proteinの特徴

Universal Stress Protein (USP)は, 定常期(stationary phase) を含む様々なストレス条件下における大腸菌のプロテオー ム解析において、共通に発現が上昇するタンパク質として 同定された (van Bogelen et al. 1990). その発現は、グロー バル転写調節因子の支配下にはない一方、セカンドメッ センジャーとして知られるグアノシン4リン酸 (ppGpp) に より発現が調節されていることが示されている.発現調 節に必要な因子や、調節のメカニズム、そして緊縮応答 やSOS応答との関係については、非常に多くの研究が行 われているが、個々のタンパク質の機能についての知見 は少ない (Kvint et al. 2003). USPは、細菌、アーキア、菌 類,植物に広く存在するが,動物にはあまり見られない. 全長がほぼ単独のUSPモティーフだけからなるもの、2つ のUSPモティーフがタンデムに並んでいるもの、トランス ポーターの下流に1つまたは2つのUSPモティーフが並んで いるもの,キナーゼの下流に1つまたは2つのUSPモティー フが並んでいるものなどが、典型的にみられる. USPモ ティーフの一部はATPの結合部位を持ち、ATP加水分解活 性を持つことが示唆されている.



図1: Synechocystis sp. PCC 6803のゲノムに見られるUSP モティーフを持つ遺伝子

保存されたシステインを持つUSPモティーフを桃色で、それ以 外のUSPモティーフを青で示す.赤字で示した3つの遺伝子が、 保存されたシステインが存在するUSPモティーフを持っている.

3.2 シアノバクテリアのUSP

Synechocystis sp. PCC 6803の場合, USPモティーフを持 つ遺伝子は、ゲノム上に9つ存在する(図1).このうち、 slr1101, sll1654, sll1388は、ほぼ全長が単独のUSPモティー フからなる遺伝子であるのに対して, slr0244, slr0670, slr1230はタンデムに並ぶ2つのUSPから構成されている. 残るslr1731, slr0415, sll1864は, トランスポーターなど の下流にUSPモティーフが現れるタイプの遺伝子である. この内、slr0415がコードするのは、Synechocystis sp. PCC 6803が持つ6つのNa⁺/H⁺のアンチポーター NhaS1 ~ NhaS6 のうちの一つNhaS5であり、細胞膜に存在する (Tsujii et al. 2024). このNhaS5の生理的な機能はわかっていないが, サイクリックdi-AMPの結合タンパク質のスクリーニング において候補タンパク質として挙げられており (Selim et al. 2021), サイクリックdi-AMPが浸透圧ストレス応答の シグナル伝達に働く例があることを考えると、浸透圧の 恒常性維持に関与している可能性がある. その場合, 推 定ATP結合部位は、実際にはサイクリックdi-AMPを結合 しているのかもしれない.

Slr0244は、グルタレドキシンとの相互作用の網羅的な 解析から、グルタレドキシンと相互作用する標的タンパ ク質の候補として挙げられている(Li et al. 2007). Slr0244 に存在する4つのシステイン残基の内、2番目のUSPドメ インの推定ATP結合部位の前後にある2つのシステインは、 全長がUSPモティーフからなるSlr1101とSll1654にも保存 されており、これらのUSPは、光化学系Iの還元側のレドッ クス状態による制御を受けている可能性が考えられる. Slr0244がかかわるステート遷移は、PQプールのレドック



図2:様々な生物のUSPの推定ATP結合部位周辺のアミノ酸配列 ATP結合にかかわると推定されるアミノ酸残基の内保存されているものと,前後をはさむ2つ のシステインの内保存されているものを,それぞれ黄色と赤色で示す.

ス状態により制御されているはずであるが、シアノバク テリアの場合、光合成の電子伝達のレドックス状態は、1.3 節で述べたように、暗所や弱光条件下では呼吸系の電子 伝達の影響もうけることから、光合成と呼吸の状態を切 り分けて応答するために、レドックス状態を異なる場所 で感知してシグナルを統合している可能性などが考えら れる.クロロフィル蛍光挙動データベースFluorome(https:// photosyntheis.jp/fluorome/)による解析においては、*slr0244* の破壊株は*rpaB*の破壊株と蛍光挙動の類似性を示すこと が示されており、RpaBとの相互作用により代謝の制御に かかわっている可能性も考えられる(Fukunaga et al. 2024). 実際にSlr0244がどのようにステート遷移を制御している のかの具体的なメカニズムの解明はこれからの課題であ る.

3.3 USPと環境からのシグナルの伝達

ストレス条件下における様々なUSPの発現調節にかかわ る研究例は多いものの、その調節は、個別の遺伝子によっ て異なり、例えば、上述の*slr0244*では、強光下(Hihara et al. 2001)や重金属(Mehta et al. 2014)などのストレス条件で その発現はむしろ低下する、少なくとも、一部のUSPにつ いては、USP自体の発現調節というよりも、結合ヌクレオ チドによる制御やレドックス制御によって、その機能が 調節されている可能性が高い.

推定ATP結合部位は多くのUSPにある程度保存されてい るものの、すべてのUSPがATPを結合しているわけでは なく、ATP結合型のものとATP非結合型のものが存在する (Kvint et al. 2003). ATP結合型のものについては、ATP加 水分解活性を持っている可能性があることから、GTPを結 合して環境シグナルを伝達するGタンパク質のように、環 境からのシグナルの入力によりATP結合型になったのち、 時間が経過するとその加水分解活性によりADP結合型に 戻ることによりシグナルをスイッチングする可能性が指 摘されているが、これまで、個別のUSPの実際の機能につ いての知見がほとんどなかったことから、その実態は不 明である.3.2節で述べたように、サイクリックdi-AMPが 結合して浸透圧ストレス応答のシグナル伝達に働く可能 性なども考えられる.

レドックス応答との関係においては、推定ATP結合部位 の周辺のアミノ酸配列を他の生物種のUSPと比較すると、 その前後にシアノバクテリアの一部のUSPに見られた1対 のシステイン残基が陸上植物にまで保存されている(図 2).従って、このシステイン残基ペアをもつUSPは、レドッ クス型USPとして、光合成生物などの様々なレドックス応 答に関与している可能性が考えられる.

アデニンヌクレオチドの結合の有無によるATP結合型と ATP非結合型,システイン残基ペアの有無によるレドック ス型と非レドックス型が,様々な生物種においてどのよう な関係にあるのかの詳細な解析はまだなされていない.し かし,これらのUSPは,極めて多様な生物種と様々な環境 変化において働いているシグナル伝達因子であることは間 違いないと考えられる.今後,幅広い生物種においてこの USPの機能が明らかにされることを期待したい.

謝辞

本稿の初期の原稿に対してご意見をくださった東京都 立大学の渡辺麻衣博士に感謝申し上げます. ここで紹介 した研究の一部はJSPS科研費22H02651および23H04961の 助成を受けて行われました.

参考文献

- Allen, J. F. (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1098: 275–335.
- Aoki, M. and Katoh, S. (1982) Oxidation and reduction of plastoquinone by photosynthetic and respiratory electron transport in a cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Biochim. Biophys. Acta* 682: 307–314.
- Ashby, M.K. and Mullineaux, C.W. (1999a) The role of ApcD and ApcF in energy transfer from phycobilisomes to PS I and PS II in a cyanobacterium. *Photosynth. Res.* 61: 169–179.
- Ashby, M.K. and Mullineaux, C.W. (1999b) Cyanobacterial ycf27 gene products regulate energy transfer from phycobilisomes to photosystems I and II. *FEMS Microbiol. Lett.* 181: 253–260.
- Bellafiore, S., Barneche, F., Peltier, G. and Rochaix, J.-D. (2005) State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature* 433: 892–895.
- Bonaventura, C., and Myers, J. (1969) Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim. Biophys. Acta* 189: 366–383.
- Calzadilla, P.I. and Kirilovsky, D. (2020) Revisiting cyanobacterial state transitions. *Photochem. Photobiol. Sci.* 19: 585-603.
- Campbell, D. and Öquist, G. (1996) Predicting light acclimation in cyanobacteria from nonphotochemical quenching of photosystem II fluorescence which reflects state transition in these organisms. *Plant Physiol.* 111: 1293–1298.
- Campbell, D., Hurry, V., Clarke, A.K., Gustafsson, P. and Öquist, G. (1998) Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 667–683.
- Depège, N., Bellafiore, S. and Rochaix, J.-D. (2003) Role of Chloroplast Protein Kinase Stt7 in LHCII Phosphorylation and State Transition in *Chlamvdomonas*, *Science* 299: 1572–1575.
- Dumas, L., Zito, F., Blangy, S., Auroy, P., Johnson, X., Peltier, G. and Alric, J., (2017) A stromal region of cytochrome b₆f subunit IV is involved in the activation of the Stt7 kinase in *Chlamydomonas. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114: 12063– 12068.
- Emlyn-Jones, D., Ashby, M.K., and Mullineaux, C.W. (1999) A gene required for the regulation of photosynthetic lightharvesting in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Mol. Microbiol.* 33: 1050–1058.

- Fujimori, T, Hihara, Y., and Sonoike, K. (2005) PsaK2 subunit in photosystem I is involved in state transition under high light condition in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 280: 22191-22197.
- Fukunaga, T., Ogawa, T., Iwasaki, W. and Sonoike, K. (2024) Phylogenetic profiling analysis of the phycobilisome revealed a gene encoding novel state-transition regulator in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol*. 65: 1450-1460.
- Glazer, A. N. (1984) Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta* 768: 29–51.
- Hihara, Y. and Sonoike, K. (2001) Regulation, inhibition and protection of Photosystem I. *in* Regulation of Photosynthesis, pp.507-531 (E.-M. Aro and B. Andersson eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Hihara, Y., Kamei, A, Kanehisa, M., Kaplan, A., and Ikeuchi, M. (2001) DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. *Plant Cell* 13: 793-806.
- Kondo, K., Geng, X.X., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2005) Distinct roles of CpcG1 and CpcG2 in phycobilisome assembly in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.* 84: 269–273.
- Kondo, K., Ochiai, Y., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2007) The membrane associated CpcG2-phycobilisome in *Synechocystis*: a new photosystem I antenna. *Plant Physiol*. 144: 1200–1210.
- Kondo, K., Mullineaux, C.W. and Ikeuchi, M. (2009) Distinct roles of CpcG1-phycobilisome and CpcG2-phycobilisome in state transitions in a cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.* 99: 217-225.
- Kvint, K., Nachin, L. Diez, A. and Nyström, T. (2003) The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Current Opinion in Microbiology* 6: 140-145.
- Li, M., Yang, Q., Zhang, L., Li, H., Cui, Y. and Wu, Q. (2007) Identification of novel targets of cyanobacterial glutaredoxin. *Arch. Biochem. Biophys.* 458: 220–228.
- Mao, H. B., Li, G. F., Ruan, X., Wu, Q. Y., Gong, Y. D., Zhang, X.
 F., and Zhao, N. M. (2002) The redox state of plastoquinone pool regulates state transitions via cytochrome b₆f complex in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* 519: 82–86.
- Mehta, A., Lpez-Maury, L. and Florencio, F.J. (2014) Proteomic pattern alterations of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to cadmium, nickel and cobalt. J.

Proteomics 102: 98-112.

- Minagawa, J. (2011) State transitions The molecular remodeling of photosynthetic supercomplexes that controls energy flow in the chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta* 1807: 897–905.
- Misumi, M., Katoh, H., Tomo, T., Sonoike, K. (2015) Relationship between photochemical quenching and nonphotochemical quenching in six species of cyanobacteria reveals species difference in redox state and species commonality in energy dissipation. *Plant Cell Physiol.* 57: 1510-1517.
- Misumi, M. and Sonoike, K. (2017) Characterization of the influence of chlororespiration on the regulation of photosynthesis in the glaucophyte *Cyanophora paradoxa*. *Scientific Reports* 7: 46100.
- Mullineaux, C. W. (1992) Excitation energy transfer from phycobilisomes to Photosystem I in a cyanobacterium. *Biochim. Biophys. Acta* 1100: 285–292.
- Mullineaux, C. W. (1994) Excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in a cyanobacterial mutant lacking photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1184: 71–77.
- Mullineaux, C.W. and Allen, J.F. (1986) The state 2 transition in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 can be driven by respiratory electron flow into the plastoquinone pool. *FEBS Lett.* 205: 155–160.
- Mullineaux, C.W. and Allen, J.F. (1990) State 1–State 2 transitions in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 are controlled by the redox state of electron carriers between photosystems I and II. *Photosynth. Res.* 23: 297–311.
- Mullineaux, C. W., Tobin, M. J., and Jones, M. R. (1997) Mobility of photosynthetic complexes in thylakoid membranes. *Nature* 390: 421–424.
- Murata, N. (1969) Control of excitation transfer in photosynthesis I. Light-induced change of chlorophyll *a* fluoresence in *Porphyridium cruentum*. *Biochim. Biophys. Acta* 172: 242–251.
- Ogawa, T., Harada, T., Ozaki H. and Sonoike, K. (2013) Disruption of the *ndhF1* gene affects chlorophyll fluorescence through state transition in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, resulting in the apparent high efficiency of photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 54: 1164-1171.
- Ogawa, T., Suzuki, K. and Sonoike, K. (2021) Respiration interacts with photosynthesis through the acceptor side of photosystem I, reflected in the dark-to-light induction

kinetics of chlorophyll fluorescence in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Frontiers in Plant Science* 12: 717968.

- Peschek, G.A. and Schmetterer, G. (1982) Evidence for plastoquinol-cytochrome *f/b*₅₆₃ reductase as a common electron donor to P700 and cytochrome oxidase in cyanobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108: 1188–1195.
- Pribil, M., Pesaresi, P., Hertle, A., Barbato, R. and Leister, D. (2010) Role of plastid protein phosphatase TAP38 in LHCII dephosphorylation and thylakoid electron flow. *PLoS Biol.* 8: e1000288.
- Riediger, M. Kadowaki, T. Nagayama, R. Georg, J. Hihara, Y. Hess, W.R. (2019) Biocomputational analyses and experimental validation identify the regulon controlled by the redox-responsive transcription factor RpaB. *iScience* 15: 316-331.
- Rögner, M., Nixon, P. J., and Diner, B. A. (1990) Purification and characterization of photosystem I and photosystem II core complexes from wild-type and phycocyanin-deficient strains of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 265: 6189–6196.
- Sarcina, M., Tobin, M. J., and Mullineaux, C. W. (2001) Diffusion of phycobilisomes on the thylakoid membranes of the cyanobacterium *Synechococcus* 7942. *J. Biol. Chem.* 276: 46830–46834.
- Scheurer, N.M. Rajarathinam, Y. Timm, S. Köbler, C. Kopka, J. Hagemann, M. Wilde, A. (2021) Homologs of circadian clock proteins impact the metabolic switch betweenlight and dark growth in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Front *Plant Sci.* 12: 675227.
- Schreiber, U., Endo, T., Mi, H. and Asada, K. (1995) Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by saturation pulse method: particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 36: 873–882.
- Selim, K.A., Haffner, M., Burkhardt, M., Mantovani, O., Neumann, N., Albrecht, R., Seifert, R., Krüger, L, Stülke, J., Hartmann, M.D., Hagemann, M. and Forchhammer, K. (2021) Diurnal metabolic control in cyanobacteria requires perception of second messenger signaling molecule c-di-AMP by the carbon control protein SbtB. *Science Advances* 7: eabk0568.
- Shapiguzov, A., Ingelsson, B., Samol, I. Andres, C. Kessler,
 F., Rochaix, J.-D., Vener A.V. and Goldschmidt-Clermont,
 M. (2010) The PPH1 phosphatase is specifically involved in LHCII dephosphorylation and state transitions in Arabidopsis.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107: 4782-4787.

- Tsujii, M., Kobayashi, A., Kano, A., Kera, K., Takagi, T., Nagata, N., Kojima, S., Hikosaka, K., Oguchi, R., Sonoike, K., Azai, C., Inagaki, T., Ishimaru, Y. and Uozumi, N. (2025) Na⁺-driven pH regulation by Na⁺/H⁺ antiporters promotes photosynthetic efficiency in cyanobacteria. *Plant Physiol.* 197: kiae562.
- van Thor, J. J., Mullineaux, C. W., Matthijs, H. C. P., and Hellingwert, K. J. (1998) Light harvesting and state transitions in cyanobacteria. *Bot. Acta* 111: 430–443.
- Van Bogelen R.A., Hutton M.E. and Neidhardt F.C. (1990) Gene-protein database of *Escherichia coli* K-12: edition 3. *Electrophoresis* 11: 1131-1166.
- Vener, A.V., van Kan, P.J., Gal, A., Andersson, B. and Ohad, I. (1995) Activation/deactivation cycle of redox-controlled thylakoid protein phosphorylation. J. Biol. Chem. 270: 25225–25232.
- Vener, A.V., van Kan, P. J., Rich, P.R., Ohad, I. and Andersson, B. (1997) Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome *bf* mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: Thylakoid protein kinase deactivation by a single-turnover flash. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 1585–1590.
- Watanabe, M., Semchonok, D.A., Webber-Birungi, M.T., Ehira, S., Kondo, K., Narikawa, R., Ohmori, M., Boekema, E.J. and Ikeuchi, M. (2014) Attachment of phycobilisomes in an antenna-photosystem I supercomplex of cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 2512–2517.
- Zilinskas, B. A., and Greenwald, L. S. (1986) Phycobilisome structure and function. *Photosynth. Res.* 10: 7–35.
- Zito, F., Finazzi, G., Delosme, R., Nitschke, W., Picot D. and Wollman, F.A. (1999) The Qo site of cytochrome b₆f complexes controls the activation of the LHCII kinase. *EMBO* J. 18: 2961–2969.

レドックス制御系による葉緑体の機能調節

吉田 啓亮¹⁾, 久堀 徹^{2,3)}

2024年12月2日受付, 2024年12月31日受理

酸化・還元を基盤とした翻訳後修飾であるレドックス制御は,光合成システムの制御に重要な役割 を果たしている.この制御系は従来,鍵因子であるチオレドキシンが電子伝達系によって生じる還元 力を特定の標的酵素に伝達し,その酵素を活性化するというシンプルなものとして考えられていた. ところが近年,植物葉緑体のレドックス制御系は,数多くの制御因子および標的酵素が関わる複雑な 還元力伝達ネットワークによって構成されていることが明らかになってきた.本稿では,最近の研究 成果から見えてきたレドックス制御系の実体について,今後の研究展望を交えながら概説する.

The redox regulation system for controlling chloroplast functions

Keisuke Yoshida¹, Toru Hisabori^{2,3}

The redox regulation system is one of the post-translational mechanisms, which is important for photosynthesis. In recent years, many regulatory factors and target enzymes have been identified in plant chloroplasts, raising a possibility that the redox regulation system is composed of highly divergent redox pathways. We discuss a current understanding of the molecular basis and physiological importance of this regulatory network, with future perspectives of this research field.

キーワード:レドックス制御・チオレドキシン Redox regulation, Thioredoxin

1. はじめに

レドックス制御とは,酸化還元状態に応じて標的酵素 のチオール基の状態(ジスルフィド結合の形成・開裂な ど)を制御することで,その酵素の分子機能を調節する翻 訳後修飾機構である.葉緑体のレドックス制御系は,光 合成電子伝達系の駆動によって得られる還元力を用いる ことにより,光照射に応じた葉緑体酵素の機能調節(多

連絡先

吉田 啓亮

東京科学大学・総合研究院・化学生命科学研究所 〒226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259-R1-30 Tel: 045-924-5859 Email: kyoshida@res.titech.ac.jp くの場合は活性化)を可能にしている.その制御システムの基盤は、電子伝達系の構成成分であるフェレドキシン(Ferredoxin; Fd)からレドックス制御の鍵因子であるチオレドキシン(Thioredoxin; Trx)を介して特定の標的酵素へと至る単純な還元力伝達経路(Fd/Trx経路)である(図1 A).この経路は1970年代にアメリカのブキャナン(Bob. B. Buchanan)らによって発見され、それ以来教科書にも記載 される知見として一般に受け入れられてきた(Buchanan,

 東京科学大学・総合研究院・化学生命科学研究所 Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Integrated Research, Institute of Science Tokyo, Yokohama, Japan
 総合研究大学院大学
 The Graduate University for Advanced Studies, SOKENDAI, Hayama, Japan
 神奈川大学・総合理学研究所 Research Institute of Integrated Science, Kanagawa University, Yokohama, Japan



図1:葉緑体のレドックス制御系の概観. 古典的なモデル(A)と多くの因子が関わるネットワーク状の新たなモデル(B)を示す.

2016)、ところが近年、網羅的研究(ゲノム解析・プロテオー ム解析)の進展により、葉緑体のレドックス制御系が、従 来は知られていなかった数多くの制御因子群および標的 酵素群によって構成されていることが明らかになってき た(図1B). 例えば、後で詳述するように、古くから知ら れる制御因子のTrxには、活性部位以外のアミノ酸配列に よって分類される5つもの分子種(サブタイプ)が存在す る。すべての生物は普遍的にTrxを持つが、Trxにこのよう な多様性が見られるのは植物葉緑体のみである. これら の知見から、「葉緑体レドックス制御系は、還元力伝達経 路をネットワーク状に複雑に張り巡らせ、様々な葉緑体 機能を環境の変化に応じて巧みに操っているのでは?」と いう可能性が示唆される. レドックス制御系は葉緑体内 でどのように構成され、環境の変化にどのように応答し、 そして植物の生存戦略においてどのような役割を果たし ているのだろうか.半世紀以上の歴史を持つレドックス 制御系の研究は、今まさに新たな局面を迎えている.

2. レドックス制御の標的酵素

「どのような葉緑体酵素がTrxの標的としてレドックス制 御を受けるのか」を理解することは、葉緑体のレドックス 制御系の研究における重要課題の1つである.ブキャナ

ンらがFd/Trx経路をレドックス制御系の基本経路として確 立した当初(1980年頃), Trxの標的として提案されていた 酵素は、カルビン・ベンソン回路の4つの酵素[グリセル アルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH);フルク トース-1,6-ビスホスファターゼ(FBPase);セドヘプツロー ス-1,7-ビスホスファターゼ(SBPase);ホスホリブロキナー ゼ (PRK)], ATP合成酵素 (ATP synthase), リンゴ酸バルブ で働くNADP-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (NADP-MDH). 酸化的ペントースリン酸経路のグルコース-6-リン酸デヒ ドロゲナーゼ(G6PDH)の7つのみであった(これらの酵素 のほとんどが還元されると活性化されるが、G6PDHだけ は還元によって不活性化される). この認識に転機が訪れ たのは、Trxと相互作用を示す酵素のスクリーニング法が 複数考案された2000年以降のことである(Motohashi et al., 2001; Hisabori et al., 2005; Montrichard et al., 2009). 同時期 に質量分析を用いたプロテオミクス研究が急速に発展し たこともあり、レドックス制御の標的酵素に関する情報 は飛躍的に増加した. 例えば、デンプン代謝やクロロフィ ル合成などに関与する酵素がTrxによってレドックス制御 を受ける可能性が指摘され、また抗酸化システムで働く 酵素が触媒反応に用いる還元力をTrxから供給されること も新たに明らかになってきた (図1B).本稿では個々の標 的酵素の記述は省略するが. それらはそれぞれの原著論



図2:レドックス制御の標的酵素の一例(PFK).(A)葉緑体型PFKとサイトゾル型PFKのタンパク質 の一次構造の簡略図.葉緑体型のオレンジの領域は、2つのシステイン残基[Cys152とCys157(シロ イヌナズナ)]を含む挿入領域を示す.cTP,葉緑体移行ペプチド.(B)AlphaFold3で予測した葉緑体 PFK(テトラマー)の立体構造.オレンジのボックスは、挿入領域の2つのシステイン間での分子内 ジスルフィド結合を示す.(C)FBPaseとPFKのレドックス制御による明/暗の代謝切替えの可能性. 明所では、FBPaseとPFKはともに還元されるが、FBPaseは活性化されPFKは不活性化される.その結 果、カルビン・ベンソン回路が促進される.暗所では、FBPaseとPFKはともに酸化されるが、FBPase は不活性化されPFKは活性化される.その結果、葉緑体解糖系が促進される.Yoshida and Hisabori (2023) より改変.

文に加えて複数の総説でもまとめてリスト化されている (Lindahl and Kieselbach, 2009; Montrichard et al., 2009).

ただし、このような網羅的解析からTrxとの相互作用の 可能性が示唆された酵素は、あくまでレドックス制御の 標的の候補であることに注意しなければならない. プロ テオミクス技術の高感度化に伴う偽標的の非特異的な検 出を避けるのは難しいし、少なくとも「酸化還元状態の 変化は機能変化につながるのか?」、「その場合どのよう に?」、「その変化は可逆的なのか?」などといった重要な 問いに対する答えは、この方法では得ることができない. それぞれの酵素のレドックス制御の可否を結論づけ、そ の分子機構を明らかにするためには、個々の酵素に注目 した詳細な解析が必要になる.

そのような視点に基づいて、私たちはこれまで精製タン パク質を用いた生化学解析を進めてきた.ここでは、葉緑 体局在型のホスホフルクトキナーゼ (Phosphofructokinase; PFK)のレドックス制御について検証した最近の例につい て紹介する (Yoshida and Hisabori, 2021). PFKは、一般的 にサイトゾルでの解糖系の律速段階を触媒する酵素とし て知られるが、植物の場合は葉緑体局在型のアイソフォー ムが存在する.実はこの酵素は、私たちの知る限り、上 記のプロテオミクスベースの標的の探索方法では同定さ れていない.しかし、エンドウマメの単離葉緑体を用いた 古い論文に、葉緑体PFKの酵素活性は明暗処理によって変 化し、さらにDCMUによる電子伝達阻害やDTTによる還元 処理によっても影響を受けるという興味深い記述があっ た (Heuer et al., 1982). これらの結果は, 葉緑体PFKがレ ドックス制御下にあることを示唆するものと言えるのだ が、その裏づけとなる十分な生化学データがなかったた めに、これまでレドックス制御の標的酵素として認識さ れてこなかった. そこで私たちは、大腸菌で発現させた 葉緑体PFKを精製し、一連のin vitro解析を行って、(1)葉 緑体PFKは還元によって可逆的な不活性化を受けること, (2) その還元には、複数のTrxサブタイプのうち f 型Trxが 有効であること(Trxサブタイプについては後述),(3)葉緑 体PFKはサイトゾル型にはない挿入アミノ酸配列を持って おり、その配列上のシステインペアが酸化還元スイッチ として分子内ジスルフィド結合を形成すること(図2A, B) などを明らかにした。特に、還元によって不活性化され、 酸化によって活性化されるという制御様式は、他の多く の標的酵素とは逆であり、興味深い発見と言える、PFKが よく知られたレドックス制御の標的酵素であるFBPaseの 逆反応を触媒することを考えると、両酵素のレドックス 制御が明/暗の葉緑体代謝の切替えに重要な役目を果た しているのかもしれない(図2C).このような可能性に迫 るにはin vitroの生化学解析だけでは不十分であり, in vivo レベルの生理学的な解析が必要になる.

3. レドックス制御系のin vivo動態

各酵素のレドックス制御の分子機構の理解だけでなく, それが光変動のような環境刺激に対して植物体内でどの ように応答しているのかを明らかにすることも重要な課 題である.古くから,分析対象とする酵素の活性が酸化 還元状態によって規定されるという前提の下,一定時間 光照射などの処理を施した葉緑体や葉から酵素を抽出し, 分光測定などに基づいてその活性を調べるといった方法 が用いられてきた.しかし実際には,葉緑体内pHやマグ ネシウム濃度といった他の要因も葉緑体酵素の活性に影 響することが分かっているので,酸化還元状態の変化の みを反映しているとは限らない.酵素の抽出開始から活 性測定に到るまでの間,酵素の酸化還元状態が維持でき ているのか疑わしいということも,排除しきれなかった 問題である.

私たちは、葉から酵素を抽出して即座にチオール基を マレイミド試薬で修飾し、非還元SDS-PAGE後にウェスタ ンブロット解析を行うことで、目的酵素のin vivoの酸化還 元状態をバンドシフトの形で識別する手法を用いている (Yoshida and Hisabori, 2019). これによって、複数の酵素 は光に応答して酸化型から還元型へとシフトすることを 観測し、レドックス制御系のin vivoでの駆動をはっきりと した形で示すことができた (Yoshida et al., 2014). 興味深 いことに、光依存的に還元される効率は、酵素間で大き く異なっていた. 例えばATP合成酵素は弱い光の下でも迅 速に還元され、一方でカルビン・ベンソン回路の酵素で あるFBPaseやSBPaseなどは光照射開始後にゆっくりと還 元される. この還元効率の違いを生み出している要因は まだ明らかになっていない. 単純に酵素ごとの酸化還元 電位の違いでは説明がつかない. 1つの可能性として葉 緑体内の局在の違い(チラコイド膜局在かストロマ局在か の違い)が考えられるが、その可能性はまだ実験的に支持 されていない (Fukushi et al., 2022). 早い応答を示すATP合 成酵素とゆっくりとした応答を示すFBPaseやSBPaseでは, 制御に用いる還元力伝達経路そのものが異なる可能性も ある. すなわち、FBPaseやSBPaseの還元は絶対的にFd/Trx 経路に依存する一方、ATP合成酵素の還元は未同定の還元 力伝達経路が関与しているかもしれない(後述). 還元効 率の違いの根底にある分子メカニズムの解明は、今後の 研究の大きな課題である.また、その生理的な意義に迫 ろうとする研究も必要である.

ごく最近, チオール基修飾に基づいた解析をプロテオ ミクスレベルで応用した研究が複数報告され, これまで レドックス制御の標的(候補)として知られていなかった 酵素が光に応じて酸化還元状態を変化させることが見 出された (Zimmer et al., 2021; Huang et al., 2023; Hou et al., 2024). これらの報告は, レドックス制御系が支配する葉 緑体機能の理解をさらに拡張する重要な発見であると言 える. 今後,上述したような個別の生化学解析をこれら の新規に見出された標的酵素候補に対して行い,レドッ クス制御系の分子基盤の全体像を明らかにしていくこと が重要である.

4. レドックス制御因子群の機能分担

標的酵素の多様性だけでなく、制御因子の多様性も葉 緑体レドックス制御系の大きな特徴である.前述したよ うに、葉緑体には典型的なTrxだけで5つのサブタイプ が存在し、また特徴的なハイブリッド構造を持つNTRC (NADPH-Trx reductase C)、さらにはTrxの活性部位のアミ ノ酸配列WCGPCと似た配列を持つ複数のTrx様タンパク 質なども存在することが分かっている.これらの制御因 子群がレドックス制御系においてどのように使い分けら れてシステム全体を支えているのかの解明は、当該分野 の重要課題である.

4.1 5つのTrxサブタイプ

Fd/Trx経路が発見されて間もない頃, 葉緑体のTrxとし てはf型とm型の2種類のみが同定されていた. この2つは Trxサブタイプの中で比較的発現量が多いことが (Okegawa and Motohashi, 2015; Yoshida et al., 2015), 植物のゲノム情 報が明らかにされる前に見つかっていた理由ではないか と考えられる. その後, 2001年のシロイヌナズナの全ゲ ノム解読を契機として、x型、y型、z型が葉緑体に局在 することが報告された. まだ完全ではないものの, これ ら計5つのTrxサブタイプの機能の違いについてはある程 度の知見が蓄積している. f型とm型はそれぞれFBPaseと NADP-MDHの効率的な活性化因子という特性に基づいて 命名された. その後の研究から、f型とm型は他3つのサ ブタイプと比較して、カルビン・ベンソン回路酵素やATP 合成酵素など光合成反応に直接関わる酵素の還元・活性 化に効率的であることが示されている (e.g., Yoshida et al., 2015; Sekiguchi et al., 2020). 加えてm型は、チラコイド膜 ルーメンへの還元力供給(Motohashi and Hisabori, 2006)や サイクリック電子伝達制御 (Okegawa and Motohashi, 2020) など、特別な機能を担っている可能性がある.シロイヌ ナズナにおいて, f型の変異株では顕著な生育阻害は観 測されない一方, m型の変異株は生育阻害を示すという 事実は、そのようなm型の特異的機能を反映しているの かもしれない. 一方で, x型とy型は抗酸化系酵素への 還元力供給に効率的に機能する (e.g., Collin et al., 2004).

この機能と直接関係しているのかはまだはっきりしてい ないが、最近、x型とy型が変動光下で協調的に光化学 系Iのアクセプター側の還元を抑制していることが示され た(Okegawa et al, 2023). z型は、細菌型RNAポリメラー ゼ(Plastid-encoded RNA polymerase; PEP) 複合体による葉緑 体の遺伝子発現に関わると報告されている(Arsova et al., 2010). 実際、z型のノックアウト株はアルビノの表現型 を示す.ただし、この表現型の原因は、単にPEP複合体 の構成因子としての機能が重要で、レドックス制御機能 は必須ではない可能性がある(Wimmelbacher and Bornke, 2014). 一方で、z型の別の形での葉緑体遺伝子発現や RNA編集への関与も示唆されており(Diaz et al., 2018; Wang et al., 2021)、まだ謎が多いTrxと言える.

4.2 NTRC

NTRCは、同一ポリペプチド内にNADPH-Trx reductase ドメインとTrxドメインを持つハイブリッドタンパク質と して2004年に同定された (Serrato et al., 2004). NTRCは還 元力源としてNADPHを用いるため、Fd/Trx経路とは独立 して働くことができる.シロイヌナズナのNTRC欠損株 は葉の黄化を伴う生育阻害を示すので、Fd/Trx経路では 補完できない重要な機能があると予想されるが、それに 関する統一的な見解はまだ得られていない、最初に提案 されたNTRCの機能が、葉緑体の主要な抗酸化系酵素で ある2-Cys peroxiredoxin (2-Cys Prx) への還元力供給である (Moon et al., 2006; Perez-Ruiz et al., 2006). その後、デンプ ン合成 (Michalska et al., 2009), クロロフィル合成 (Richter et al., 2013; Perez-Ruiz et al., 2014), カルビン・ベンソン回 路 (Nikkanen et al., 2016), ATP合成 (Carrillo et al., 2016), サイクリック電子伝達 (Nikkanen et al., 2018) などの制御が 相次いで報告され、NTRCの機能に関する議論は依然とし て混沌とした状況が続いている.

これに関する現在最も有力な説は、2-Cys Prxへ還元力 を供給してこの酵素の酸化還元バランスを保ち、Fd/Trx 経路を正常に働かせるということであろう(Perez-Ruiz et al., 2017). この説は、NTRC欠損株の表現型が、2-Cys Prx を同時に欠損させることで回復したことに基づいている. NTRC欠損株では2-Cys Prxに還元力を供給することができ ないために、2-Cys PrxがTrxから還元力を奪ってしまうこ とで、他の光合成関連酵素の光依存的な還元・活性化に 支障をきたしているというシナリオが提案された. さら に、NTRCが2-Cys Prxの酸化還元バランスを保つという機 能は、次に述べるタンパク質酸化経路の還元力伝達の調 節においても決定的な役割を果たす可能性がある.



図3:レドックス制御系の酸化側.Trx様タンパク質である TrxL2とACHTが標的酵素を酸化し、受け取った還元力を2-Cys Prxを介して過酸化水素へと伝達して消去する.NTRCは、 2-Cys Prxの酸化還元バランスを調節することで、タンパク質酸 化経路の還元力伝達の調節にも関わる可能性がある.また、他 の因子もタンパク質酸化に関わる可能性がある.

4.3 Trx様タンパク質

葉緑体は複数のTrx様タンパク質を持つが、データベー ス解析および局在・発現解析にとどまる報告が多く、その 機能についてはほとんど明らかになっていなかった. 私 たちは, 2018年にそのうちの1つであるTrx-like 2 (TrxL2) がタンパク質酸化因子として機能することを見出した (Yoshida et al., 2018). その酸化還元電位は典型的なTrxと 比べてかなり高く、それがおそらくTrxL2に酸化機能をも たらす理由の1つである. また, TrxL2のもう1つの特徴 として、ほとんどの酵素に対して還元活性を示さない一 方で、2-Cys Prxに対してだけは非常に高い還元活性を示 す. この結果から、TrxL2が酸化の標的となる酵素から 還元力を奪い、それを2-Cys Prxを介して過酸化水素へと 流して消去しているという経路が考えられた(図3).実 際、この経路はin vitro構成系実験で完全に再現され、ま た2-Cys Prxの変異株を用いたin vivoでの解析によっても支 持されている.この研究は、レドックス制御系の長年の ブラックボックスであったタンパク質酸化経路を同定し, 光が途切れた際に光合成を抑制するという新たな光合成 制御メカニズムを提示する成果となった(Jacquot, 2018).

この発見を端緒として、私たちはさらにタンパク質酸 化のメカニズムの解析を進めている.これまでに、TrxL2 とは別のTrx様タンパク質であるACHT (Atypical Cys Hisrich Trx)がもう1つのタンパク質酸化因子として働くこと (図3:Yokochi et al., 2019), TrxL2とACHTが異なる酵素 を酸化の標的としていること (Yokochi et al., 2021a) などを 明らかにしてきた.興味深いことに、NTRC欠損の表現型 は、TrxL2やACHTの同時欠損によっても回復する.この



図4:シロイヌナズナのNADP-MDHの酸化還元スイッチ破壊.(A) NADP-MDHの一次構 造の簡略図.N末端側とC末端側のシステインペアのうち,C末端側のペアをゲノム編集によ り破壊した.(B) 生育の表現型.ゲノム編集株では,変動光環境下での生育が阻害される. Yokochi et al. (2021b)より改変.

表現型回復は、2-Cys Prxへの酸化還元バランスを保つこ とがレドックス制御系全体の機能を支えるために重要と いうモデルで説明できるように思えるが、それを支持す る実験的な証拠はまだ乏しい.レドックス制御系の酸化 側に関する研究は始まったばかりであり、その実体解明 のためにはさらなる研究が必要とされる.

5. レドックス制御系の生理的重要性

あるタンパク質の植物内での生理的役割や重要性に迫 るには、そのタンパク質の機能欠損植物を用いた解析、 すなわち逆遺伝学的な解析が有効であり、レドックス制 御系の研究分野でも例外ではない、2020年頃までは、シ ロイヌナズナのT-DNA挿入株を用いた解析がほとんどで あり、Trx各サブタイプやNTRCなどのT-DNA挿入変異株、 あるいはそれらを交配して得られた多重欠損株の表現型 が多数報告されてきた (e.g., Yoshida and Hisabori, 2016). これらの表現型については、2018年の日本光合成学会誌 「光合成研究」に要約されている(吉田 2018).

ゲノム編集技術CRISPR/Cas9によって自在に植物の遺 伝子改変ができるようになってきたことで、私たちはそ の特性を活用して新たな変異株作成を試みた.標的酵素 の酸化還元スイッチ部位をピンポイントで機能不全にし ようという試みである.代表的な標的酵素であり、葉緑 体からの過剰還元力の排出に重要なリンゴ酸バルブの鍵 酵素であるNADP-MDHを改変のターゲットとして設定し た(Yokochi et al., 2021b).具体的には、シロイヌナズナを 用いて、NADP-MDHのC末端側に保存されている酸化還 元スイッチ部位のシステイン残基1つを欠失させた(図4 A).この変異型NADP-MDHは、欠失させたスイッチ部位 でのジスルフィド結合の形成ができなくなり,暗所でも 活性を抑えることができない.この変異株の表現型を解 析した結果,NADP-MDHのレドックス制御(暗所~弱光 下での不活性化)は、変動する光環境において、葉緑体の NADPH恒常性を維持し植物の生育を維持するために重要 であることが分かった(図4B).この研究は、酸化還元ス イッチ部位のみを欠失させているため本来のNADP-MDH の蓄積量に影響を与えず、この酵素のレドックス制御の 影響のみを評価できた点に価値がある.当該研究分野に 新たな方向性を示した研究と言えるだろう.今後、同様 の戦略を他の酵素に適用することで、個々の酵素のレドッ クス制御の生理的な役割を次々に明らかにできるものと 期待される.

ゲノム編集技術は、レドックス制御系の古典的な経路 であるFd/Trx経路の重要性の解決にも大きく貢献した. Fd/Trx経路の存在そのものは古くから認識されていたもの の、この経路がいかに植物にとって重要なのかは意外な くらいに明らかになっていなかった. その理由の1つが, この経路の完全な機能抑制に関する報告がなかったこと にある. 我々は、シロイヌナズナを用いて、CRISPR/Cas9 によってFdとTrxの間で還元力伝達のハブとして働くFd-Trx reductase (FTR) のノックアウト株を作製した (Yoshida et al., 2022). このノックアウト株は極めて強い生育阻害を 示し(図5), またストロマに局在するレドックス制御の 標的酵素の還元が完全に阻害されていた. これらの結果 は、1)ストロマ酵素の光に応じた還元・活性化は絶対的 にFd/Trx経路に依存し、他の経路では代替できないこと、 2) それが植物の生育に決定的なインパクトをもたらすこ とを示している.興味深いことに、調べた酵素のうちATP 合成酵素だけは例外的に変異株でも還元されていた.同



図5:シロイヌナズナのFd/Trx経路の機能を抑制したゲノム 編集株の生育の表現型. Yoshida et al. (2022)より改変.

時にNTRCを欠損させた場合でも、まだ部分的にその還元 能は保持されていた.これらの事実は、ATP合成酵素の還 元・活性化の過程にはまだ私たちが知らないメカニズム が潜んでいることを示唆しており、今後の実体解明が待 たれる.

6. おわりに

葉緑体のレドックス制御系は、ネットワーク状に高度 に組織化され、環境変動に対してダイナミックに応答し、 そして光合成の調節や植物の生育に決定的な役割を果た しているということが少しずつ明らかになってきた.と はいえ、おそらく現在の私たちの理解はまだ部分的かつ 断片的であり、その全貌を統合的に解明するための研究 を今後も続けていかなければならない.ゲノム編集の利 点を生かした生理学的解析、酸化還元状態の変化をプロ テオームレベルで捉える技術開発、細胞内酸化還元状態 を可視化するバイオセンサーの活用など、新たな研究戦 略が積極的に組み込まれていくべきである.そして、レ ドックス制御系を多くの因子が関与するネットワークと して俯瞰的に捉えつつ、様々な階層から詳細に調べてい くことが重要であろう.

謝辞

本研究は、日本学術振興会・科学研究費助成事業の支援を 受けて行われています(22K19130; 23H02498; 23H04961).

参考文献

Arsova B, Hoja U, Wimmelbacher M, Greiner E, Ustun S, Melzer M, Petersen K, Lein W, Bornke F (2010) Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana. Plant Cell 22: 1498-1515

- Buchanan BB (2016) The path to thioredoxin and redox regulation in chloroplasts. Annu Rev Plant Biol 67: 1-24
- Carrillo LR, Froehlich JE, Cruz JA, Savage L, Kramer DM (2016) Multi-level regulation of the chloroplast ATP synthase: the chloroplast NADPH thioredoxin reductase C (NTRC) is required for redox modulation specifically under low irradiance. Plant J 87: 654-663
- Collin V, Lamkemeyer P, Miginiac-Maslow M, Hirasawa M, Knaff DB, Dietz KJ, Issakidis-Bourguet E (2004) Characterization of plastidial thioredoxins from Arabidopsis belonging to the new y-type. Plant Physiol 136: 4088-4095
- Diaz MG, Hernandez-Verdeja T, Kremnev D, Crawford T, Dubreuil C, Strand A (2018) Redox regulation of PEP activity during seedling establishment in Arabidopsis thaliana. Nat Commun 9: 50
- Fukushi Y, Yokochi Y, Wakabayashi KI, Yoshida K, Hisabori T (2022) Verification of the relationship between redox regulation of thioredoxin target proteins and their proximity to thylakoid membranes. Antioxidants (Basel) 11: 773
- Heuer B, Hansen MJ, Anderson LE (1982) Light modulation of phosphofructokinase in pea leaf chloroplasts. Plant Physiol 69: 1404-1406
- Hisabori T, Hara S, Fujii T, Yamazaki D, Hosoya-Matsuda N, Motohashi K (2005) Thioredoxin affinity chromatography: a useful method for further understanding the thioredoxin network. J Exp Bot 56: 1463-1468
- Hou LY, Sommer F, Poeker L, Dziubek D, Schroda M, Gengenberger P (2024) The impact of light and thioredoxins on the plant thiol-disulfide proteome. Plant Physiol 195: 1536-1560
- Huang J, Staes A, Impens F, Demichev V, Van Breusegem F, Gevaert K, Willems P (2023) CysQuant: simultaneous quantification of cysteine oxidation and protein abundance using data dependent or independent acquisition mass spectrometry. Redox Biol 67: 102908
- Jacquot JP (2018) Dark deactivation of chloroplast enzymes finally comes to light. Proc Natl Acad Sci U S A 115: 9334– 9335
- Lindahl M, Kieselbach T (2009) Disulphide proteomes and interactions with thioredoxin on the track towards

understanding redox regulation in chloroplasts and cyanobacteria. J Proteomics 72: 416-438

- Michalska J, Zauber H, Buchanan BB, Cejudo FJ, Geigenberger P (2009) NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 9908-9913
- Montrichard F, Alkhalfioui F, Yano H, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB (2009) Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. J Proteomics 72: 452-474
- Moon JC, Jang HH, Chae HB, Lee JR, Lee SY, Jung YJ, Shin MR, Lim HS, Chung WS, Yun DJ, Lee KO (2006) The C-type Arabidopsis thioredoxin reductase ANTR-C acts as an electron donor to 2-Cys peroxiredoxins in chloroplasts. Biochem Biophys Res Commun 348: 478-484
- Motohashi K, Hisabori T (2006) HCF164 receives reducing equivalents from stromal thioredoxin across the thylakoid membrane and mediates reduction of target proteins in the thylakoid lumen. J Biol Chem 281: 35039-35047
- Motohashi K, Kondoh A, Stumpp MT, Hisabori T (2001) Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 11224-11229
- Nikkanen L, Toivola J, Rintamaki E (2016) Crosstalk between chloroplast thioredoxin systems in regulation of photosynthesis. Plant Cell Environ 39: 1691-1705
- Nikkanen L, Toivola J, Trotta A, Diaz MG, Tikkanen M, Aro EM, Rintamaki E (2018) Regulation of cyclic electron flow by chloroplast NADPH-dependent thioredoxin system. Plant Direct 2: 1-24
- Okegawa Y, Motohashi K (2015) Chloroplastic thioredoxin m functions as a major regulator of Calvin cycle enzymes during photosynthesis in vivo. Plant J 84: 900-913
- Okegawa Y, Motohashi K (2020) M-type thioredoxins regulate the PGR5/PGRL1-dependent pathway by forming a disulfidelinked complex with PGRL1. Plant Cell 32: 3866-3883
- Okegawa Y, Sato N, Nakakura R, Murai R, Sakamoto W, Motohashi K (2023) x- and y-type thioredoxins maintain redox homeostasis on photosystem I acceptor side under fluctuating light. Plant Physiol 193: 2498-2512
- Perez-Ruiz JM, Naranjo B, Ojeda V, Guinea M, Cejudo FJ (2017) NTRC-dependent redox balance of 2-Cys peroxiredoxins is needed for optimal function of the photosynthetic apparatus. Proc Natl Acad Sci U S A 114: 12069-12074
- Perez-Ruiz JM, Spinola MC, Kirchsteiger K, Moreno J, Sahrawy M, Cejudo FJ (2006) Rice NTRC is a high-efficiency redox

system for chloroplast protection against oxidative damage. Plant Cell 18: 2356-2368

- Perez-Ruiz JM, Guinea M, Puerto-Galan L, Cejudo FJ (2014) NADPH thioredoxin reductase C is involved in redox regulation of the Mg-chelatase I subunit in Arabidopsis thaliana chloroplasts. Mol Plant 7: 1252-1255
- Richter AS, Peter E, Rothbart M, Schlicke H, Toivola J, Rintamaki E, Grimm B (2013) Posttranslational influence of NADPH-dependent thioredoxin reductase C on enzymes in tetrapyrrole synthesis. Plant Physiol 162: 63-73
- Sekiguchi T, Yoshida K, Okegawa Y, Motohashi K, Wakabayashi KI, Hisabori T (2020) Chloroplast ATP synthase is reduced by both f-type and m-type thioredoxins. Biochim Biophys Acta Bioenerg 1861: 148261
- Serrato AJ, Perez-Ruiz JM, Spinola MC, Cejudo FJ (2004) A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in Arabidopsis thaliana. J Biol Chem 279: 43821-43827
- Wang Y, Wang Y, Ren Y, Duan E, Zhu X, Hao Y, Zhu J, Chen R, Lei J, Teng X, Zhang Y, Wang D, Zhang X, Guo X, Jiang L, Liu S, Tian Y, Liu X, Chen L, Wang H, Wan J (2021) white panicle2 encoding thioredoxin z, regulates plastid RNA editing by interacting with multiple organellar RNA editing factors in rice. New Phytol 229: 2693-2706
- Wimmelbacher M, Bornke F (2014) Redox activity of thioredoxin z and fructokinase-like protein 1 is dispensable for autotrophic growth of Arabidopsis thaliana. J Exp Bot 65: 2405-2413
- Yokochi Y, Fukushi Y, Wakabayashi KI, Yoshida K, Hisabori T (2021a) Oxidative regulation of chloroplast enzymes by thioredoxin and thioredoxin-like proteins in Arabidopsis thaliana. Proc Natl Acad Sci U S A 118: e2114952118
- Yokochi Y, Sugiura K, Takemura K, Yoshida K, Hara S, Wakabayashi KI, Kitao A, Hisabori T (2019) Impact of key residues within chloroplast thioredoxin-f on recognition for reduction and oxidation of target proteins. J Biol Chem 294: 17437-17450
- Yokochi Y, Yoshida K, Hahn F, Miyagi A, Wakabayashi KI, Kawai-Yamada M, Weber APM, Hisabori T (2021b) Redox regulation of NADP-malate dehydrogenase is vital for land plants under fluctuating light environment. Proc Natl Acad Sci U S A 118: e2016903118
- Yoshida K, Hara A, Sugiura K, Fukaya Y, Hisabori T (2018) Thioredoxin-like2/2-Cys peroxiredoxin redox cascade

supports oxidative thiol modulation in chloroplasts. Proc Natl Acad Sci U S A 115: E8296-E8304

- Yoshida K, Hara S, Hisabori T (2015) Thioredoxin selectivity for thiol-based redox regulation of target proteins in chloroplasts. J Biol Chem 290: 14278-14288
- Yoshida K, Hisabori T (2016) Two distinct redox cascades cooperatively regulate chloroplast functions and sustain plant viability. Proc Natl Acad Sci U S A 113: E3967-E3976
- Yoshida K, Hisabori T (2019) Simple method to determine protein redox state in Arabidopsis thaliana. Bio Protoc 9: e3250
- Yoshida K, Hisabori T (2021) Biochemical basis for redox regulation of chloroplast-localized phosphofructokinase from Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol 62: 401-410
- Yoshida K, Hisabori T (2023) Current insights into the redox regulation network in plant chloroplasts. Plant Cell Physiol 64: 704-715
- Yoshida K, Matsuoka Y, Hara S, Konno H, Hisabori T (2014) Distinct redox behaviors of chloroplast thiol enzymes and their relationships with photosynthetic electron transport in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol 55: 1415-1425
- Yoshida K, Yokochi Y, Tanaka K, Hisabori T (2022) The ferredoxin/thioredoxin pathway constitutes an indispensable redox-signaling cascade for light-dependent reduction of chloroplast stromal proteins. J Biol Chem 298: 102650
- 吉田啓亮. (2018) レドックスを基盤とした葉緑体の機能統 御ネットワーク. 光合成研究 28: 39-50
- Zimmer D, Swart C, Graf A, Arrivault S, Tillich M, Proost S, Nikoloski Z, Stitt M, Bock R, Muhlhaus T, Boulouis A (2021) Topology of the redox network during induction of photosynthesis as revealed by time-resolved proteomics in tobacco. Sci Adv 7: eabi8307

パートナースイッチングシステムの30年 ーシアノバクテリア研究者の観点から一

日原 由香子 1)

2024年12月24日受付, 2025年1月6日受理

パートナースイッチングシステム (PSS) は、セリンキナーゼ (アンチシグマ因子)、アンタゴニスト、 およびPP2C型ホスファターゼの3者から成る調節系であり、様々な細菌が、ストレス応答、細胞分化、 運動性、病原性の獲得など、多様な細胞機能の制御に利用している。本稿では、筆者の博士論文にお ける推定セリンキナーゼPmgAの同定と、当時、枯草菌で進められていたPSSの分子機構の解明に始まり、 多様なPSSの発見を経て、シアノバクテリアのPSSが光合成や炭素同化、糖異化などの代謝制御に重要 な役割を果たしていることが明らかになりつつある現在までの研究史を、シアノバクテリア研究者の 観点から概説する.

30 years of partner switching systems – From the perspective of a cyanobacterial researcher –

Yukako Hihara¹

The partner switching system (PSS) is a tripartite regulatory system consisting of a serine kinase (an antisigma factor), an antagonist and a PP2C-type phosphatase. PSS has been widespread among bacterial species to regulate diverse cellular functions such as stress response, cell differentiation, motility and pathogenesis. In this paper, the research history of PSS is described from the perspective of a cyanobacterial researcher, starting with the identification of the putative serine kinase PmgA in cyanobacteria during the author's PhD study, together with the early PSS studies in *Bacillus subtilis*, and continuing through to the notion that PSSs play an important role in metabolic control to balance photosynthetic electron transport, carbon assimilation and sugar catabolism in cyanobacteria.

キーワード:アンチシグマ因子,シアノバクテリア,環境応答,パートナースイッチングシステム, PmgA anti-sigma factor, cyanobacteria, environmental adaptation, partner switching system, PmgA

1. Synechocystis sp. PCC 6803における PmgAの同定

1.1 PmgAの同定と研究室内小進化

1995年に、東大駒場の池内研究室で博士課程の研究を

連絡先 日原 由香子 埼玉大学大学院理工学研究科 〒 338-8570 埼玉県さいたま市桜区下大久保 255 Tel: 048-858-3396 Email:hihara@mail.saitama-u.ac.jp スタートさせた筆者は,淡水性・単細胞性のモデルシア ノバクテリアSynechocystis sp. PCC 6803 (以下S.6803)のグ ルコース耐性野生株を変異原処理して,強光感受性になっ た株の原因遺伝子を同定することで,強光順化の分子機 構を明らかにしたいと考えた.しかし変異原処理を繰り

埼玉大学大学院理工学研究科 Graduate School of Science and Engineering, Saitama University, Saitama, Japan



図1: *Synechocystis* sp. PCC 6803の研究室内小進化 池内研究室で当時培養していた野生株における*pmgA*コーディング領域のダ イレクトシーケンス結果と光独立栄養条件下で形成されるコロニーの様子. 909390番塩基を矢印で示した. Hihara and Ikeuchi (1997) Photosynth Res. Fig.4を 改変.

返しても、期待どおりの強光感受性株は一向に得られず、 10月になってしまったある日,野生株が光独立条件下の 培養プレート上で形成するコロニーサイズに大小がある ことに気づいた(図1).大小コロニーを別々に培養して みたところ, 大コロニー由来の株は光独立栄養条件下で は良く増殖するが、培地にグルコースを加えた光混合栄 養条件下で致死となることが分かった. 大小コロニーの 遺伝的差異を明らかにするために、グルコース入りのプ レート上で培養した大コロニー由来株に野生株のゲノム ライブラリーを滴下して, 致死性を相補するゲノム領域を 絞り込んでいくと、大コロニー由来株では、S.6803ゲノム における909390番シトシンがチミンに変異した結果とし て、機能未知ORFである*sll1968*の35番ロイシン (Nakamura et al. 2024に従い, ORF開始位置を909492番とした場合)が フェニルアラニンに置換していることがわかった. sll1968 の遺伝子破壊株も、L35F変異株と同様、光混合栄養条 件下で致死となったことから,筆者らはこの遺伝子を pmgA (photomixtrophic growth related protein A) と名付けた (Hihara and Ikeuchi 1997).

野生株コロニーに大小があることに気づいた時点で、 研究室で培養していた野生株中にpmgAのL35F変異がすで に広がっていたわけであるが、一体、この変異はいつ出 現してどのように広がっていったのだろうか? 凍結保存 株や培養中の株からゲノムDNAを単離してpmgAコーディ ング領域のダイレクトシーケンスを行うと、1991年に凍 結保存されていた株の909390番塩基は100%がシトシンで、 全て小コロニーを形成した(図1). 筆者が研究を開始し て間もない1995年6月時点の株のシーケンス結果は100%シ トシンだったが1割ほどが大コロニーを形成した、1996年 3月の株ではシーケンス結果で40%ほどチミンのピークが 検出され、1996年7月の株はチミン100%で全てが大コロ ニーを形成した. このことから、pmgAは光条件や栄養条 件が様々に変動する自然界で生き抜くために必要な遺伝 子であるが、恒常的な光独立栄養・弱光条件下で植え継 ぎを繰り返す実験室環境では、野生株より速く増殖でき るpmgAのL35F変異株が、出現して1年少しの間に野生株を 駆逐してしまったと考えられる、その後、次世代シーケ ンサーによって全ゲノム塩基配列を容易に決定できる時 代が到来し、各研究室で維持しているS.6803野生株のゲノ ム塩基配列に、様々な変異が生じていることが明らかに なったが (Kanesaki et al. 2012, Trautmann et al. 2012), [pmgA] の研究室内小進化」は、これらの報告に先駆けて、点突然 変異が生じて野生型と置き換わっていく様子をリアルタ イムで捉えていたことになる. 当初予定していた, 変異 原処理により強光感受性株を取得する計画は全く上手く いかなかったが、野生株中に生じた自然突然変異に気づ き、pmgAを同定したことが学位取得につながったのは筆 者にとって幸運であった.後日談として,池内研で維持 していた野生株には、その後再びpmgAに突然変異が生じ、 2012年時点でGT-I株 (ゲノムリシーケンスが行われた当時 の池内研の野生株)に特異的な変異として、909360番塩基 の置換によるE45K変異がリストされている (Kanesaki et al. 2012).

1.2 pmgA欠損株の光混合栄養条件下での表現型

pmgA L35F株やpmgA欠損株を,終濃度5 mMのグルコースを加えたBG11プレートに塗り広げ,パラフィルムを巻いて50 µmol photons m⁻²s⁻¹程度の光を当てて培養すると,3 日間程度は順調に増殖して緑色が濃くなるが,その後,厳しい増殖阻害と退色が観察される.パラフィルムを巻か



図2:光混合栄養条件下のpmgA L35F株から疑似復帰変異株が 生じる様子

1996年当時の実験ノートより. 終濃度5 mMグルコースを添加したBG11プレートにパラフィルムを巻き, 50 µmol photons m²s⁻¹の 光照射下で7/23から培養を開始すると, 7/26には増殖が止まり, 7/27に退色が始まり, 7/28には疑似復帰変異株の緑色のコロニー が出現した. これらのコロニーよりゲノムDNAを抽出し, 変異 部位を同定した.

ない場合や、グルコースとともにDCMUを添加して光合 成電子伝達を阻害した光従属栄養条件では、 増殖阻害は観 察されない. グルコースを添加しての液体通気培養では. 被陰効果を防ぐため24時間毎に植え継ぎを繰り返すと, 野生株が一定の速度で増殖するのに対し、pmgA変異株は 最初の植え継ぎ以降の増殖が遅れ、光が強いほど、CO,濃 度が高いほど,顕著な増殖阻害が観察される(Takahashi et al. 2008, Haimovich-Dayan et al. 2011, Nishijima et al. 2015). シアノバクテリアは細胞小器官を持たないため、チラコ イド膜上で光合成と呼吸の電子伝達鎖が共有され、細胞 質において各種代謝反応が区画化されることなく行われ る. 光合成による炭素同化と糖異化の両方が可能な光混 合栄養条件下では、相反する方向性の代謝反応を両立さ せる必要があり、pmgA変異株ではこの制御に異常がある と推測された. pmgA変異株をグルコース入りのプレート 上で培養して5日ほど経過すると、退色が進む一方で、疑 似復帰変異株の緑色のコロニーが多く出現してくる (図 2). 筆者は, pmgA変異株の致死原因に関して手がかり を得るため、これらのコロニーについて光混合栄養条件 下での増殖を可能とする原因遺伝子を同定しようと考え た. pmgA L35F株から生じた疑似復帰変異株の各コロニー からゲノムDNAを抽出し、pmgAを同定したときと同じ要

領で、光混合栄養条件下でのpmgA L35F株の致死性を相 補するゲノム領域を絞り込んだところ、7株中6株から全 く同じ ndhF3 (sll1732) G354W変異が同定された. この結 果を検証するため、pmgA欠損株に対し、ndhF3 G354W変 異を導入、もしくはndhF3を欠損させると、いずれの場合 も大気条件下では野生株並みの光混合栄養増殖が可能と なった。1%CO₂の光混合栄養条件下では、G354W変異は 十分な相補効果を示したが、ndhF3欠損はそれ自体が増殖 遅延を招いた.当時,名古屋大学の小川教授のグループ は、S.6803の1型NAD (P) Hデヒドロゲナーゼ (NDH-I) 複 合体サブユニットの欠損株でCO,取り込みが阻害されるこ とを見出し (Ohkawa et al. 2000), NdhF3, NdhD3 (sll1733 にコードされる). CupA (sll1734にコードされる) が低 CO₂条件下で誘導される高親和性CO₂取り込みユニットを, NdhF4, NdhD4, CupBが恒常的に発現する低親和性CO,取 り込みユニットを形成することを報告していた (Shibata et al. 2001). pmgA変異株ではグルコースとCO₂の取り込み制 御の異常が、光混合栄養条件下での致死原因であると推 測されたが, 当時の筆者にはこれ以上の研究の展開は難 しく、これらのデータはイスラエルのKaplan教授のグルー プのデータと一緒に後年発表され、ようやく日の目を見 た (Haimovich-Dayan et al. 2011).

1.3 pmgA欠損株の強光下での表現型

PmgAは光混合栄養条件下での生存に必須な因子として 同定されたが、pmgA欠損株の表現型解析から、長期間の 強光条件下での生存にも必須であることが明らかになっ た (Hihara et al. 1998). S.6803の弱光下での光化学系 I/系 Ⅱ比は2程度であるが、200-300 µmol photons m⁻²s⁻¹程度の 強光に移すと、クロロフィルとフィコビリンの合成や、 系Iとフィコビリソームサブユニット遺伝子の転写が厳 しく抑制され、結果として倍加時間である6時間が経過し た頃には、細胞あたりの光合成色素量と系 I 量は半減し、 系Ⅰ/系Ⅱ比は1に近づく.この応答は、単量体あたり95分 子ものクロロフィルを結合し、自ら光捕集を行う系 Iと、 単量体に結合するクロロフィルは35分子でありフィコビ リソームによって集光能を補う系Ⅱが, 強光下でそれぞ れアンテナサイズを減少させる結果である. pmgA欠損株 もこの初期応答は正常に行うものの、強光照射6時間以降、 一旦減少したクロロフィル合成活性,および系 I 反応中 心遺伝子psaAB転写産物量を低く保つことができず,野生 株に比べて系 I/系 II 比が増加していく (Hihara et al. 1998, Muramatsu and Hihara 2003, Muramatsu et al. 2009). 強光下 での系 I 量が野生株より30%以上多いpmgA欠損株では、

プラストキノンプールが野生株に比べて酸化的であり,系 Ⅱは光阻害を受けにくい. そのため, 短期間の強光条件 下では野生株より光合成電子伝達活性が高く、増殖速度も 速いが、光混合栄養条件下での実験と同様、24時間毎に 薄く植え継ぐと、強光48時間以降、生存率が大きく低下 する (Sonoike et al. 2001). pmgA欠損株に少量のDCMUを 添加して, 強光下での光合成活性を野生株程度に低下さ せると、その増殖阻害が回避されることから、S.6803野生 株が強光下で系Ⅰ/系Ⅱ比を低下させる生理的意義は、光 合成電子伝達活性の最適化ではなく,光合成電子伝達活 性を抑制し、系 I 還元側における還元力過剰による有害 な活性酸素分子種の生成を防ぐことにあると考えられる. 系 I 量を絞ることで, 電子伝達鎖の上流側は過還元にな りやすく, 系Ⅱは光阻害のリスクにさらされるが, S.6803 からすれば、損傷・修復を日常的に繰り返している系Ⅱ が壊れるほうが、修復機構が備わっていない系Iが壊れ るよりダメージが少ないということであろう.近年,米 国のPakrasi教授が、モデルシアノバクテリアSynechococcus elongatus PCC 7942とゲノム上で55ヌクレオチドの違いし かないものの、1,500 μ mol photons m⁻²s⁻¹、5%CO₂、42°Cの 超強光条件下で, 倍加時間1.5時間という速さで増殖可能 なSynechococcus elongatus UTEX 2973株の解析を行い、こ の株では、PCC 7942株と比べて、系 I 量が1.6倍、シトク ロムb。f複合体量が1.5倍、プラストシアニンが2.4倍多いこ とを報告した (Ungerer et al. 2018). UTEX 2973株は, S.6803 のpmgA変異株と同様、強光下で系 I 量を絞らずに光合成 電子伝達活性を最大化しており、かつS.6803と異なり、光 合成電子伝達鎖から供給される豊富な還元力を十分消費 できる代謝キャパシティーを持つため、還元力過剰によ る増殖阻害を招かないのかもしれない.

遺伝子欠損株の表現型解析から、PmgAは光混合栄養 条件下での炭素代謝制御や、強光下でのクロロフィル量 や系 I 量の制御に必須な因子であることが明らかになっ てきたが、細胞内で具体的にどのように働いているのか、 その分子機構は不明なままであった。PmgAのアミノ酸配 列について相同性検索を行うと、その当時、英米のグルー プがしのぎを削って解明を進めていたパートナースイッ チングシステム (PSS) のセリンキナーゼ (アンチシグマ因 子)と全長にわたり、特にキナーゼ活性部位やヌクレオチ ド結合ドメイン (N box, G1 box, G2 box等)において、高 い相同性を示した。このことから、PmgAはATPを結合し てキナーゼ活性を示すのではないかと推測されたが、その 検証にはこれまで行ってきた生理学解析ではなく、PmgA タンパク質の生化学解析が必要であった。



図3:典型的なパートナースイッチングシステムの模式図 (A) 転写抑制条件.アンタゴニストはキナーゼによりリン酸化 され、キナーゼは標的シグマ因子を捕捉する.(B) 転写活性化 条件.ホスファターゼに脱リン酸化されたアンタゴニストがキ ナーゼと相互作用することで、シグマ因子が解放され、RNAポ リメラーゼコア酵素(RNAP)に結合して標的遺伝子(青色部分) の転写活性化に働く.

2. 枯草菌のパートナースイッチングシステム

2.1 Spoll系による σ^Fの制御

細菌は、増殖のステージや環境変動に応じて特定の遺 伝子群を発現誘導するために,何種類ものシグマ因子を 使い分ける.シグマ因子はRNAポリメラーゼの着脱可能 なサブユニットであり, コア酵素に結合して標的遺伝子 のプロモーター認識に関わる.特定の条件下で働くシグ マ因子が固有のプロモーター配列を認識することで、そ れぞれ異なる遺伝子群の発現が誘導される.たとえば栄 養増殖期の枯草菌細胞では主要シグマ因子であるσ^Aが働 いているが、栄養が欠乏して胞子形成初期に入るとg^Hが働 き,不等分裂が起きる.その結果として生じた母細胞で $t\sigma^{E} \geq \sigma^{K}$. 胞子細胞で $t\sigma^{F} \geq \sigma^{G}$ が順番に働き. 胞子形成の 各段階で必要とされる遺伝子群を誘導していく. 1980年 代から、各シグマ因子を適切なタイミングで合成・活性 化する調節機構の研究が進められ. パートナースイッチ ングシステム (PSS) はその過程でσ^Fの活性制御機構とし て発見された.

σ^Fをコードする*spoIIAC*遺伝子は,*spoIIAA*,*spoIIABと*オペロンを形成している.Schmidtら (1990) は,これらの変 異株の表現型解析から,SpoIIABがσ^F標的遺伝子の転写活 性化を阻害する一方で,SpoIIAAはSpoIIABの阻害効果を



(A) SpoII系によるσ^Fの制御, (B) Rsb系によるσ^Bの制御

抑制することを明らかにした、以後、複数の研究グループ により、これらの因子の調節関係について遺伝学および 生化学解析が進められ、それらの結果にもとづき、Alper らが1994年に「パートナースイッチング」の概念を提唱し た. 典型的なPSSは、HATPaseドメインを持つセリンキナー ゼ, STAS (sulfate transporter and anti-sigma antagonist) ドメ インを持つアンタゴニスト.およびPP2C型ホスファター ゼから成る. 転写抑制条件下において、アンタゴニスト はキナーゼによりリン酸化されており, リン酸化型アン タゴニストはキナーゼと相互作用しない.キナーゼは標 的シグマ因子を捕捉し、RNAポリメラーゼコア酵素への 結合を抑制している(図3A).一方,転写活性化条件では, 何らかのシグナルを受けてホスファターゼが活性化され、 アンタゴニストを脱リン酸化する. 脱リン酸化されたア ンタゴニストはキナーゼに対し、シグマ因子よりも高い 親和性を示す、その結果、キナーゼの相互作用パートナー が、シグマ因子から脱リン酸化型のアンタゴニストにス イッチングし、解放されたシグマ因子がRNAポリメラー ゼコア酵素に結合することで、標的遺伝子の転写が活性 化される (図3B). この調節系において、代謝シグナルや 環境シグナルを検知し、パートナースイッチングの引き 金を引くのはホスファターゼということになる. PSSのキ ナーゼはシグマ因子を捕捉してその機能を抑制すること から、一般的には「アンチシグマ因子」と呼称される.し

かし後述するように,現在ではシグマ因子を制御対象と しないPSSが数多く同定されており,本稿ではその実態に 即して「キナーゼ」と表記する.

SpoII系におけるキナーゼSpoIIAB, アンタゴニスト SpoIIAA, ホスファターゼSpoIIEの働きは1990年代のうち にほぼ解明されたが (図4A), SpoII系の因子が不等分裂 以前から転写翻訳されているのに関わらず, σ^{f} が胞子細 胞でのみ活性化される分子機構は長らく不明であった. 現在では, SpoIIEが不等分裂隔壁の胞子細胞側に局在し (Khanna et al. 2021, Chareyre et al. 2024), 母細胞側に存在 するSpoIIEはプロテアーゼFtsHに分解されることが示され ており (Bradshaw and Losick, 2015), 母細胞に比べ胞子細 胞でSpoIIE濃度が高くなる結果として, SpoIIAAが脱リン 酸化され, σ^{f} が活性化されるという分子機構が提唱されて いる.

2.2 Rsb系による σ^Bの制御

枯草菌では、σ^Fを制御するSpoII系と並行して、σ^Bを制 御するPSSに関しても研究が進められた(図4B).σ^Bは,熱, 塩,酸,有機溶媒などの環境ストレスや、栄養飢餓や対 数増殖期から定常期への移行などのエネルギーストレス に応答して遺伝子発現を誘導するシグマ因子で、SpoII系 と同様、PSSの他の構成因子とともにオペロンを形成して いる、オペロンを構成する遺伝子は*rsbR-rsbS-rsbT-rsbU*- rsbV-rsbW-sigB-rsbXと, SpoII系と比べて多いが, これは Rsb系が上流・下流の2つのモジュールから成るためであ る (Pané-Farré et al. 2005) (図4B). 上流モジュールの構成 成分である推定センサータンパク質RsbRと足場タンパク 質RsbSは、それぞれアンタゴニストと相同性を示しSTAS ドメインを持つ. これらのSTASドメインが会合するこ とで、ストレスソームと呼ばれるリング状の複合体を形 成し、非ストレス条件下ではキナーゼRsbTを捕捉してい る (Zhao et al. 2024). また, 下流モジュールではキナー ゼRsbWがσ^Bを捕捉している.環境ストレスシグナルを受 けるとストレスソームは構造変化を起こし、RsbTにより RsbRとRsbSがリン酸化される. RsbTはストレスソームか ら解離し、ホスファターゼRsbUと相互作用する、その結果、 RsbUが活性化されて下流モジュールのアンタゴニスト RsbVを脱リン酸化することで、RsbVはRsbWと相互作用 できるようになり、RsbWからσ^Bが解放される結果として、 ストレス応答遺伝子群の転写が活性化される. ストレス ソームによる環境ストレス検知機構は未だ解明されてい ないが、センサータンパク質RsbRのパラログ4種 (RsbRA, RB, RC, RD) が, それぞれ異なるストレス応答特性を持 ち、複数の環境シグナルを統合していると考えられてい る. ストレスシグナルが消失すると、RsbRとRsbSはホス ファターゼRsbXにより脱リン酸化されRsbTを再び捕捉す る. 結果として、RsbUは再び不活化され、下流モジュー ルではRsbWがσ^Bを捕捉する.一方,エネルギーストレス 条件下では、RsbUとは異なるホスファターゼRsbPがシグ ナルインプットに働くことが知られている. α/β加水分解 酵素であるRsbQがRsbPを活性化すると、RsbVが脱リン 酸化されてパートナースイッチングが起き、o^Bが解放さ れる. RsbQがエネルギーストレスを検知する機構は不明 であるが, 最近, 植物における生理活性物質であるブテ ノライドが結合するとRsbQのシグナリング活性が抑制さ れ, σ^Bレギュロンの転写活性化を抑制, 枯草菌のバイオ フィルム形成を促進するという報告がなされ (Melville et al. 2024). ブテノライド様のエフェクター分子が関与する 可能性が示されている.

3. PmgA研究のその後の展開

3.1 光混合栄養条件下でのpmgA欠損株の メタボローム解析

筆者は2000年に埼玉大学の助手として着任して以降, PmgAタンパク質の生化学実験を行うために、各種の発現 ベクターや大腸菌を用いて、Hisタグ、GSTタグ、SUMOタ

グ等を、N末、C末に付加してのPmgAの大量発現と精製を 試みたが,可溶性画分からの精製はいずれも成功せず,封 入体から精製した場合には透析時に大量に凝集してしまっ た. 大腸菌由来の翻訳因子で構成された無細胞翻訳系も試 したが十分量のタンパク質を得ることができず、枯草菌で のPSS研究の展開を目の当たりにしながら、PmgAタンパ ク質の機能解析を始める目途はなかなか立たなかった. 一 方,2000年代に発達した網羅的解析手法により、国内外 のグループによりpmgA欠損株の表現型解析が進められた. 筆者らはキャピラリー電気泳動質量分析 (CE/MS) による 代謝解析を行い (Takahashi et al. 2008). 光混合栄養条件(グ ルコース添加, 50 µmol photons m⁻²s⁻¹の光照射, 1% CO₂で 通気培養) で24時間の培養後に、pmgA欠損株では野生株に 比べて、イソクエン酸が10倍蓄積する一方、6-ホスホグル コン酸、リブロース-5-リン酸、グリセルアルデヒド-3-リ ン酸などの糖リン酸は、野生株ほど高蓄積しないことを 見出した. さらに、グルコースの有無によらずpmgA欠損 株では光合成活性(酸素発生活性)が野生株より高く、グ ルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼと6-ホスホグルコノラ クトナーゼの酵素活性は野生株より低く、グルコース添 加後に野生株のような呼吸活性(酸素消費活性)の増加が 見られない等のデータが得られたことから (Takahashi et al. 2008), pmgA欠損株では恒常的に光合成活性が高い一方, 光混合栄養条件下で酸化的ペントースリン酸経路の活性化 が十分でないと予想された.米国のBryant教授のグループ が、グルコースの有無によらず、pmgA欠損株では細胞内 に野生株の2倍程度の糖が蓄積していると報告したことか らも (Sakuragi et al. 2006), pmgA欠損株では、炭素同化活 性に比べて異化活性が低いことが、光混合栄養条件下での 増殖阻害の原因となっている可能性がある.

3.2 pmgA欠損株のトランスクリプトーム解析

筆者らがDNAマイクロアレイ解析により,光混合栄養 条件下(グルコース添加,50 μmol photons m⁻²s⁻¹の光照射, 1% CO₂で通気培養)で6時間培養後の野生株とpmgA欠損株 の遺伝子発現プロファイルを比較したところ,両株とも リボソームタンパク質遺伝子やgroEL等,少数の遺伝子が 発現誘導されるのみで,株間の違いは観察されなかった. S.6803にグルコースを添加しても遺伝子発現変動が顕著で ないことは他グループからも報告されており,光独立栄 養から光混合栄養への代謝モードの切り換えは転写制御 によらず行われていると考えられる.一方,デンマーク とドイツのグループは光独立栄養条件下(50 μmol photons m⁻²s⁻¹,3% CO₂で通気培養)でDNAマイクロアレイ解析を 行い(de Porcellinis et al. 2016), pmgA欠損株において,系 Ⅱ反応中心サブユニット遺伝子やリボソームタンパク質 遺伝子の発現レベルが高く,系Iやフィコビリソームの サブユニット遺伝子の発現レベルが低いといった,強光 下での野生株と似た遺伝子発現プロファイルを報告して いる.彼らはノンコーディングRNA Ncr0700の発現量が, 野生株に比べてpmgA欠損株で8倍低いことに着目し,その 遺伝子欠損株を作製すると,pmgA欠損株と同様に光混合 栄養条件下で増殖阻害を示し,グリコーゲンを高蓄積し たことから,これをPmgR1と命名した.pmgA欠損株にお いてPmgR1を過剰発現させると,光混合栄養条件下での 表現型が相補されることから,PmgR1はシグナル伝達経 路においてPmgAの下流に位置し,光混合栄養条件下での 代謝制御に関与している可能性がある.

3.3 光混合栄養条件下におけるpmgA欠損株の 疑似復帰変異株の解析

池内研時代に行ったpmgA L35F株の疑似復帰変異株の解 析結果では、7コロニー中6コロニーから全く同じ ndhF3 G354W変異が同定され、その時点でpmgAL35F株の中に広 がりつつあった突然変異体を拾った結果であると考えら れた. それから15年ほどが経過し、次世代シーケンサー による全ゲノム塩基配列決定が可能になったことで、今 度はpmgA欠損株からシングルコロニーを単離し、まず遺 伝的背景を均一にした後に、 グルコース添加プレート上 で新たに生じる疑似復帰変異株を単離し、その変異部位 を同定してみようと思い立った (Nishijima et al. 2015). 驚 くべきことに、シングルコロニー由来の親株を用いたに も関わらず、変異を同定できた13株中、8株はndhF3内 に変異をもち、その内訳は、R32stop、W62stop (2株)、 V147I, G266V, G354W, G586C, コーディング領域内7 bpの欠失と、615アミノ酸の全長にわたり変異が生じてい た.残りの5株中、2株はndhF3とオペロンを形成している cupAコーディング領域内への1塩基の挿入および欠失,1 株はndhC (slr1279) 上流域の推定-10配列への1塩基挿入に よりndhCKJの転写産物量が減少しており、2株は翻訳開始 因子IF-2をコードするinfB (slr0744) 内の433 bp欠失であっ た. じつに、13株中、11株がNDH-1複合体に関連する遺 伝子に変異をもつという結果になった. この頃までには, S.6803のNDH-1複合体アイソフォームの生理機能に関する 情報が蓄積しており、呼吸鎖の複合体 I として働くNDH-1L複合体が他生物のNDH-1と同様、L字型を取るのに対し、 CO2濃縮機構の一環として働くNDH-1MS複合体では、膜 貫通サブユニットであるNdhD1とNdhF1の代わりに低CO2 誘導型のNdhD3とNdhF3が組み込まれ、CO2水和活性を持 つCupAがL字型の先端に結合しているためU字型構造をと ることが明らかになっていた (Folea et al. 2008). NDH-1複 合体が電子伝達に共役してチラコイド膜のルーメン側へ プロトンを取り込むのに伴い、細胞質側には局所的にア ルカリ領域が形成される. その環境を利用して, CupAが CO₅を重炭酸イオンに変換することで、取り込んだCO₅の 細胞外への漏出を防ぐとともに、細胞内のCO2濃度を下げ てさらなる取り込みを促進し、細胞内CO2濃縮に寄与して いると考えられる (Han et al. 2017). 3.1節で述べたように, pmgA欠損株は光混合栄養条件下において、炭素同化活性 に比べて異化活性が低い.疑似復帰変異株の変異部位が NDH-1MS複合体に集中していたという実験結果は、この 複合体が寄与するCO2取り込み活性を低下させることで, 炭素同化と異化のバランスが回復し、光混合栄養条件下 での生存が可能になることを示しているかもしれない. そこで筆者らは野生株, pmgA欠損株, 疑似復帰変異株の CO2取り込み活性を比較したが、残念ながら有意な差を検 出することはできなかった(Nishijima et al. 2015). しかし, pmgA欠損株の光混合栄養条件下での致死性は、無機炭素 がCO2ではなく重炭酸イオンの形をとるpH8.0では観察さ れないという報告もあり (Sakuragi et al. 2006), これまで に得られている知見はいずれも、炭素源としてグルコー スとCO2を共に利用可能な条件下でpmgA欠損株が致死と なることを示している. 今後, PmgAとNDH-1MS複合体 の関係性を解明するためには、PmgAの直接の制御対象を 同定する必要があると考えられる.

4. パートナースイッチングシステムの多様性

シグマ因子の捕捉と解放により遺伝子発現を制御する典型的なPSSは枯草菌で発見されたが、2000年代に入ると、 グラム陽性・陰性を問わず、様々な細菌種で研究が進めら れ、細胞分化、運動性、バイオフィルム形成、病原性の獲 得など、多様な細胞機能の制御に利用されていることが明 らかになってきた(Bouillet et al. 2018).また、キナーゼ、 アンタゴニスト、ホスファターゼがそれぞれ独立したタン パク質として働くのではなく、例えば、N末側にキナーゼ ドメイン、中央にレスポンスレギュレーターのレシーバー ドメイン、C末側にホスファターゼドメインなど、複雑な ドメイン構造をもつ因子が様々な組み合わせで働くこと が分かってきた、また、9個のの^Bホモログ、45個のRsbU/RsbPホモログ が複雑な調節ネットワークを形成していると考えられる *Streptomyces coelicolor* A3 (2) (Sevcikova et al. 2020) のよう な例も存在し, PSSの用い方は細菌種によって実に多様で ある.

様々な細菌についてPSSの研究が進む過程で、キナーゼ がシグマ因子の活性制御というアウトプットを担う典型 的な系とは異なり、アンタゴニストがアウトプットを担 う場合もあることが分かってきた. 典型的な系では、キ ナーゼがシグマ因子を捕捉し、脱リン酸化型のアンタゴニ ストがキナーゼと相互作用してシグマ因子を解放するた め、キナーゼとアンタゴニストの単独欠損株の表現型は真 逆となり、二重欠損株はアウトプットを担うキナーゼの 欠損株と同様な表現型を示す. それに対し, アンタゴニス トがアウトプットを担うPSSでは、二重欠損株はアンタゴ ニスト欠損株と同様な表現型を示す. このような非典型的 な系として、Vibrio fischeriにおいてコロニーやバイオフィ ルムの形成を制御するSyp系 (Morris and Visick 2013) や, Rhodobacter capsulatusにおいてGene Transfer Agent (GTA: 細菌間の遺伝物質のやりとりに用いられるウイルス様粒 子)の形成を制御するRba系 (Mercer and Lang 2014) が報告 されている.いずれの場合も制御対象はシグマ因子である とは考えにくく、アンタゴニストと相互作用する因子の同 定が今後の課題となっている. 枯草菌で同定された古典的 なPSSと役者は似ていても、その働き方が全く異なる系が 次々と見つかっている現状では、これらを一括りに「パー トナースイッチングシステム」「アンチシグマ因子」「アン チシグマアンタゴニスト」などと呼称するのは実態にそぐ わず、名称を再考すべき時期に差し掛かっているかもしれ ない.

シアノバクテリアの パートナースイッチングシステム

5.1 Synechocystis sp. PCC 6803

5.1.1 icfGオペロンにコードされるパートナースイッチング システム

S.6803ゲノムにおいて、キナーゼをコードするのは pmgAとslr1861の2遺伝子、アンタゴニストをコードする のはssr1600, slr1856, slr1859, slr1912の4遺伝子である. このうち、slr1856, slr1859, slr1861は10遺伝子(slr1852slr1862)から成るオペロンを形成しており、その中には PP2Cホスファターゼ様因子をコードするicfG(slr1860)も 含まれる.シアノバクテリアのPSS構成因子に関する最初 の研究報告は、1994年にBeufらによってなされたicfG欠損 株の表現型解析であった.まだ、S.6803のゲノム全塩基配



図5: Synechocystis sp. PCC 6803のパートナースイッチングシス テム

列が解読されていない時代,彼らは無機炭素代謝に関わ る遺伝子を同定する目的で,炭酸脱水酵素遺伝子の高保 存領域の縮重プローブを用いて,ゲノムDNA断片中から, 相補的に結合する配列の単離を試みた.得られた塩基配 列は炭酸脱水酵素ではなく,当時の限られたデータベー ス情報中には相同配列が存在しなかったが,遺伝子欠損 株は,無機炭素(Ci)源を除いた培地にグルコースを添加し た条件下で致死となったことから,"Cifixation influenced by glucose"の頭文字を取って*icfG*と命名された.この遺伝 子はグルコース添加後,3~5時間のうちに発現誘導され ることや,*icfG*欠損株では,低無機炭素・グルコース添 加条件下で,¹⁴Cラベルした重炭酸ナトリウムの細胞内へ の取込みと有機分子への組込みが顕著に抑制されること, 光混合栄養条件下での増殖阻害はTCA回路中間体の添加 により軽減されることも示された.

Shiら(1999)は、*icfG*オペロンにコードされているPSS関 連因子を大腸菌内で発現誘導し、その粗抽出液にγ³²P-ATP を添加してリン酸化アッセイを行った.その結果、IcfG はMg²⁺やMn²⁺の存在下でホスファターゼ活性を示し、ア ンタゴニストSlr1856を脱リン酸化するがSlr1859を脱リン 酸化しないことや、キナーゼSlr1861は主にSlr1856をリン 酸化するが、Slr1859もわずかにリン酸化し得ることが示 された(図5).このPSSでは、Slr1861とIcfGがSlr1856をそ れぞれリン酸化・脱リン酸化することで、無機炭素とグ ルコース代謝のバランス制御に働いている可能性がある が、シグナルのインプットやアウトプットについての知 見は得られていない.

5.1.2 PmgAとSsr1600

S.6803のもう1つのキナーゼPmgAの生化学実験につい ては進展のない状態が続いていたが,筆者らは2017年に コムギ無細胞翻訳系による*in vitro*合成によって,ようやく リン酸化アッセイを行えるだけのPmgAタンパク質を得る ことに成功した.4種のアンタゴニストSsr1600,Slr1912, Slr1856,Slr1859は,Hisタグタンパク質として大腸菌中で 容易に発現・精製することができたので,これらをPmgA の*in vitro*翻訳液と混合し,γ³²P-ATPを添加してリン酸化反 応を行うと,4種のアンタゴニストのうち,His-Ssr1600を 添加した場合のみ,リン酸化バンドが検出された.キナー ゼ活性に必須とされる56番アスパラギンをアラニンに置 換したPmgAを用いた場合には,リン酸化バンドは検出さ れなかった (Nakamura et al. 2024).

次に、実際にS.6803細胞内でSsr1600がPmgAによりリン 酸化されるかどうか調べるため、pmgAとssr1600の遺伝子 欠損株・過剰発現株について、Ssr1600を抗体検出した. するとpmgA欠損株では、ssr1600の転写は正常に行われて いるにも関わらずSsr1600タンパク質が全く検出されず, pmgA過剰発現株ではssr1600過剰発現株と同様にSsr1600 の高蓄積が観察された. さらに、いずれの株において もSsr1600はリン酸化型としてのみ検出されることから、 Ssr1600が細胞内に蓄積するためにはPmgAによるリン酸化 が必須であることが分かった.強光下での表現型解析を行 うと、1.2項で述べたpmgA欠損株(Ssr1600が蓄積しないた め、実質的にはpmgA ssr1600二重欠損株)と同様、ssr1600 の欠損株でも、強光照射6時間以降、一旦減少したクロロ フィル合成活性と系 I 反応中心遺伝子psaAB転写産物量 を低く保つことができない表現型が観察された. PmgAと Ssr1600から成るPSSは、二重欠損株とアンタゴニスト単 独欠損株の表現型が同じであることから、3項で述べた「非 典型的な系」に分類され、しかもリン酸化によりパート ナースイッチングが起きるのではなく、アンタゴニスト の蓄積量が制御されるという、これまでに報告例のない 独自な系であることが明らかになった(図5)(Nakamura et al. 2024).

遊離のクロロフィルは光酸化ストレスの原因となるた め、クロロフィルとアポタンパク質の合成は協調的に制 御される必要がある.PmgA-Ssr1600系はこの制御を行い、 系I量やクロロフィル量を適正に保つことで、光合成電子 伝達反応による還元力供給レベルの調節を行っていると 考えられる.光混合栄養条件下でのPmgA-Ssr1600系の働 きは不明であるが、Slr1861-Slr1856-IcfG系とのクロストー クにより、光合成による還元力供給と炭素代謝による還

元力消費とのバランス制御に関わっている可能性がある (図5). PmgAは4種のアンタゴニストのうち, Ssr1600の みをリン酸化したが, Bacterial two-hybrid法によりタンパ ク質間相互作用を検出すると、Ssr1600、Slr1856、Slr1859 と同程度に強く、Slr1912とは弱い相互作用を示した.前 節で述べたように、Slr1856とSlr1859はキナーゼSlr1861に よりリン酸化されることが示されている (Shi et al. 1999). Slr1856やSlr1859がPmgAと相互作用することで、PmgA-Ssr1600間相互作用に影響を与える、反対に、Ssr1600が Slr1861と相互作用することで、Slr1861-Slr1856間相互作用 に影響を与えるといった、PSS間のクロストークが存在す るかもしれない. pmgA欠損株が、炭素同化活性に比べて 異化活性が低く、高CO,条件・グルコース存在下で致死と なる (Takahashi et al. 2008) のに対し, icfG欠損株は, 炭素 同化活性が低く、低無機炭素(Ci)条件・グルコース存在下 で致死になるという知見 (Beuf et al. 1994) は、炭素代謝制 御に関してのPmgAとIcfGの密接な関連を示唆している.

5.1.3 ホスファターゼ

S.6803ゲノムにコードされている推定PP2Cホスファ ターゼ8種のうち、Slr0114、Slr1860 (IcfG)、Slr1983、Slr2031、 Sll1365は、枯草菌のPSSホスファターゼであるSpoIIE やRsbUと同じSpoIIEクラスに分類される (Irmler and Forchhammer 2001). PSSホスファターゼは、C末側のPP2C ホスファターゼドメインに加え,N末端側に活性制御のた めのドメインを持つ場合も多く、Slr1860 (IcfG) とSll1365 はHAMPドメイン, Slr1983はヒスチジンキナーゼ (HisKA) とレスポンスレギュレーター (REC) ドメイン, Slr2031は GAFドメインを持つ. これらのうち、PSSホスファターゼ であることが実験的に示されているのは、5.1.1節で述べ たIcfGのみであるが、Slr2031については、S.6803野生株 間での変異の有無について研究報告が存在する.現在使 用されているS.6803野生株には様々な系統があるが、そ れらはすべて1968年にカリフォルニアの淡水環境から単 離されたS.6803をストック化したBerkelev株に由来してい る. その株がカルチャーコレクションに登録されてPCC 株、およびATCC株とされ、ATCC株から単離されたグル コース耐性株がGT株であり、GT株からシングルコロニー として単離され、1996年に全ゲノム塩基配列が決定され た株がKazusa株である (Ikeuchi and Tabata 2001, Kanesaki et al. 2012). PCC株とGT株のゲノムには14か所の違いがあり (Kanesaki et al. 2012), そのうちの1つが, GT株における *slr2031*の上流域154 bpの欠失である.2か所のダイレクト リピートで相同組換えが起きた結果、その内側のslr2031

開始コドンを含むゲノム領域を欠失したと考えられる. PCC株において*slr2031を*欠損させると,GT株と同様に運動性を失い,強光耐性の獲得,強光下でのクロロフィル とフィコシアニン含量の増加,形質転換効率の上昇など, その表現型はGT株に近づいた(Kamei et al. 1998).同じく PSSホスファターゼをコードすると推測される*slr1983*も, GT株では1塩基置換の結果としてA225V変異が生じている (Kanesaki et al. 2012).1.1節で述べた*pmgA*の研究室内小進 化の例のように,PSSの因子が変異すると,特定の条件下 で生存に有利になる場合があるため,集団内に変異が定 着しやすいのかもしれない.

5.2 Synechococcus elongatus PCC 7942

S.6803と同様に自然形質転換が可能な、淡水性・単細 胞のモデルシアノバクテリアSynechococcus elongatus PCC 7942は、PSSのキナーゼ、アンタゴニスト、ホスファター ゼ遺伝子を各1個ずつ保持しており,キナーゼホモログ について研究報告が存在する. シアノバクテリアは栄養 欠乏条件下では,豊富に存在する集光アンテナタンパク 質複合体フィコビリソームを積極的に分解して, 光捕集と 代謝の不均衡を防ぐとともに、フィコビリタンパク質の 構成成分をリサイクルする. Synechococcus elongatus PCC 7942では、この応答を行えず、栄養欠乏条件下でも退色 しないnon-bleaching 表現型を示す変異株が複数単離され, その原因遺伝子が同定されてきた. そのうちの1つは, PmgAとのアミノ酸配列同一性が47%であるキナーゼホモ ログをコードしており, nblCと命名された (Sendersky et al. 2005). nblC欠損株では窒素や硫黄欠乏条件下でnblAが 発現誘導されず、nblC過剰発現株ではnblAの発現量が増加 してフィコビリソームの分解が促進された. NblAは、約 60アミノ酸のアダプタータンパク質であり、フィコビリ タンパク質、フィコビリン色素のアポタンパク質への結 合を触媒するリアーゼ、およびClpプロテアーゼなど、複 数のタンパク質と相互作用してフィコビリソームの分解 に働く (Hu et al. 2020). nblAの発現誘導に関わるレスポン スレギュレーター NblR (Luque et al. 2001) の欠損株では, nblCを過剰発現させても、フィコビリソームの分解が促 進されないことから (Sendersky et al. 2005), NblCはNblR と競合する因子を捕捉するなどして、間接的にnblAの発現 制御に関与するのではないかと考えられている. S.6803の pmgA欠損株では、窒素欠乏条件下でのnblAの誘導レベル が野生株に比べて低いが、フィコビリソームの分解は野 生株と同様に観察される (Sato et al. 2008).

1.2項で述べたSynechococcus elongatus PCC 7942の近

縁種で、強光条件下で高速増殖が可能なSynechococcus elongatus UTEX 2973株において、強光耐性に寄与する因 子を同定するため、ゲノム上のPCC 7942株と異なる部位 を1つずつPCC 7942型に置換し、強光感受性となる原因 遺伝子を同定する実験が行われた.その結果、N末端側に GAFドメインを持つPP2Cホスファターゼ遺伝子が同定さ れ、hlt4 (high light tolerance protein <u>A</u>)と命名された (Walker and Pakrasi 2022). HltAの35番残基はPCC 7942株ではアル ギニンであるが、UTEX 2973株ではシステインであるこ とが強光耐性の原因であると推測された. HltAはS.6803の Shr2031オルソログであり、前節で述べた、PCC株におい てslr2031を欠損させるとGT株のように強光耐性を獲得し たという報告と合致する (Kamei et al. 1998).

5.3 Nostoc punctiforme PCC 73102

淡水性・糸状性のモデルシアノバクテリアNostoc punctiforme PCC 73102のゲノムには、キナーゼ4遺伝子、 キナーゼとホスファターゼのハイブリッド1遺伝子,キ ナーゼと二成分制御系因子のハイブリッド1遺伝子,アン タゴニスト6遺伝子,ホスファターゼ4遺伝子,およびス トレスソームの構成成分RsbRSTモジュールをコードする オペロンが存在する. 枯草菌のRsb系のように上流・下流 に分かれたPSSが存在すると考えられるが、その詳細は不 明である.これまでに解析が進んでいるPSSは、Hmp系と Hcy系であり、どちらもホルモゴニア(連鎖体)の分化およ び運動性を制御する(図6).ホルモゴニアとは、糸状性シ アノバクテリアが分化する短いフィラメントであり、栄 養細胞より細胞サイズが小さく, IV型線毛を用いた滑走 運動により、コロニーやマットの形成、好適光環境下へ の移動、宿主植物への共生など、ダイナミックな環境応 答を行う (Risser 2023). ホルモゴニアへの分化は光強度 や栄養状態の変化、共生パートナーの分泌物など様々な 要因により引き起こされ、運動性が48~72時間程度持続 した後に、再び栄養細胞状態へと戻る.

Hmp系はキナーゼHmpW,アンタゴニストHmpV,ホス ファターゼHmpUから成る系で、ホルモゴニアの分化や ホルモゴニア状態の維持に働く(図6A)(Riley et al. 2018). hmpVあるいはhmpUが欠損すると、細胞表層の多糖類や、 ピリ線毛を構成するPilAタンパク質の蓄積量が減少し、ホ ルモゴニアの運動性や、ホルモゴニア状態の継続時間も 減少する.一方、hmpWの欠損はホルモゴニアの運動性 を増加させ、ホルモゴニア状態の継続時間も長くなる. hmpV・hmpW二重欠損株の表現型はhmpV欠損株と同様で あることから、シグナル伝達の下流に位置しアウトプッ



図6: Nostoc punctiforme PCC 73102のパートナースイッチングシステム (A)Hmp系,および(B) Hcy系によるホルモゴニア分化の制御

トとして働くのは、アンタゴニストHmpVであると考え られる.環境シグナルのインプットは、ホスファターゼ HmpUのN末端側に存在するRECドメインやGAFドメイン が、ヒスチジンキナーゼによるリン酸化、あるいはサイ クリックヌクレオチドや光といったシグナルを受け、C末 端側のPP2Cホスファターゼドメインを活性化することで 行われると推測されている. HmpVはHmpWにリン酸化さ れると不活化し、HmpUにより脱リン酸化されると、未同 定の標的タンパク質と相互作用し, PilAや細胞外多糖の分 泌に関わる遺伝子の発現を促進,運動性を増加させると 考えられており、PmgA-Ssr1600の場合と同様、アンタゴ ニストがアウトプットとして働く点で、アンチシグマ因 子によるσ因子の捕捉・解放をアウトプットとする典型的 なPSSとは異なっている. Hmp系はほとんど全ての糸状性 種に保存されているが、単細胞種には存在しないことか ら、糸状性シアノバクテリア特有の運動や分化の制御に 働くと考えられる.

Hcy系はキナーゼHcyC, アンタゴニストHcyA, ホスファ ターゼHcyBから成る系で, UV-A照射時のホルモゴニア分 化を制御する (図6B) (Klicki et al. 2022). hcyAを欠損する と, 野生株に比べてUV-A照射下でのホルモゴニア分化が 抑制されるが, hcyCを欠損してもそのような影響は見ら れないことから, HcyCはホルモゴニア分化カスケードの 阻害に働き, HcyAがHcyCによる阻害を解除すると推測さ れる. つまりこの系は典型的なPSSとして働いている可能 性があるが, HcyCはホルモゴニア分化に関わるシグマ因 子として同定されているSigC, SigF, SigJとは相互作用せ ず,Hcy系のアウトプットの分子機構は不明である.この 系のインプットに関しては、マルチセンサーヒスチジン キナーゼHcyDがUV-A光を検知し、ホスファターゼHcyB のRECドメインをリン酸化するのではないかと推測され ている.UV-A照射下の*N. punctiforme*は、ホルモゴニアに 分化して逃避行動をとるか、栄養細胞のままでUV-A吸収 物質であるスキトネミンを合成するか、フィラメント単 位で異なる応答戦略を取ることが知られている.Hcy系は スキトネミン合成を制御する二成分制御系とホルモゴニ ア分化を制御するσ因子の両方により発現誘導されること から、両シグナル伝達経路のクロストークに働き、UV-A 応答戦略の選択に関わっているのかもしれない.

5.4 Leptolyngbya boryana IAM M-101

淡水性・糸状性シアノバクテリアLeptolyngbya boryana IAM M-101のゲノムには、キナーゼ4遺伝子、アンタゴ ニスト6遺伝子、ホスファターゼ3遺伝子が存在する. Leptolyngbya boryana IAM M-101はグルコース等の糖を与 えることで、暗所での従属栄養増殖が可能である。名古 屋大の藤田教授のグループは、この株を長期間暗所で培 養することで、暗所での増殖が促進され、明所での光合 成増殖が抑制された自然突然変異株を単離した(Hida et al. 2024). 興味深いことに、28株中の19株において、PP2Cホ スファターゼをコードするLBWT_21500遺伝子上に何らか の変異が同定された. 変異の多くがC末側のPP2Cホスファ ターゼドメインに集中していたことから、ホスファターゼ 活性の欠損もしくは低下が、暗所での従属栄養増殖促進と 明所での独立栄養増殖の抑制をもたらすと考えられ、この ホスファターゼはPhsP (phototrophic-heterotrophic switching phosphatase)と命名された. PhsP はN末端側にGAFドメイ ンを持ち、S.6803のSlr2031、Synechococcus elongatus PCC 7942のHltAのオルソログと考えられるが、Slr2031やHlrA の欠損株が強光耐性を得るのに対し、PhsP欠損株では光 独立栄養増殖が抑制されることから、これらの生理的役 割は異なっているように思われる.一方で、光独立栄養 条件下におけるphsP欠損株の、野生株に比べてクロロフィ ルが少なく、光化学系系 I/系 II 比が低く、光合成活性が 低いという表現型は、S.6803のpmg4欠損株と真逆であり、 PSSにおいてホスファターゼとキナーゼである両者の、機 能的関連性が示唆される.

5.5 今後の展望

シアノバクテリアにおいて、PSSの構成因子について は1990年代から遺伝子欠損株の表現型解析が行われてき たが、PSS全体の分子機構とその生理的役割については、 2018年のNostoc punctiforme PCC 73102のHmp系を皮切り に、ようやく複数の種において、解析が本格化してきた 段階にあると言えよう. 分子機構については、シグマ因 子の捕捉・解放を行わないPSSでどのようにアウトプット が行われているのか、今後、個々の系について相互作用 因子を同定する必要がある. S.6803のPmgAとSsr1600の解 析からは、アンタゴニストのリン酸化がタンパク質間相 互作用のスイッチングに働くのではなく、アンタゴニス ト自体の蓄積量制御に働くという、他の細菌で報告例の ない新しい制御の形が見えてきた. アンタゴニストがア ウトプットとして働く非典型的な系のバリエーションと して、今後、Ssr1600の相互作用因子の同定や、脱リン酸 化型のSsr1600が速やかに分解される分子機構の解明を行 いたい. また、2つのPSSのクロストークにより光合成と 炭素代謝の協調的制御が行われているのかどうか、どの ホスファターゼがどのようにシグナルインプットに働い ているのか等. S.6803のPSSの全体像を明らかにすべく. 解析を進めていきたい.

シアノバクテリアのPSSの生理的役割については, NostocのHmp系やHcr系が,これまでに報告されてきた様々 な細菌のPSSと同様,ストレス応答や細胞分化,運動性な どを制御対象としている一方で,S.6803, Synechococcus elongatus PCC 7942, Leptolyngbya boryana IAM M-101のPSS 構成因子は,光や栄養条件の変動に応答しての光化学系 I,フィコビリソーム,クロロフィル合成など光合成系の 制御や,炭素源の多寡や種類に応答しての炭素同化・異化 活性の制御など、代謝を制御対象としている点が他細菌と 一線を画している. 代謝制御を担うPSSの構成因子に起き た突然変異は、光独立栄養・光混合栄養・従属栄養条件下 での増殖の有利不利に直結し、有利な条件下において集団 内に広まり定着することが、PmgA, Slr2031, HltA, PhsP などの研究から明らかになってきた. また、 増殖に不利な 条件下ではそのまま死に絶えるのではなく、 PmgA欠損株 のndhF3変異に見られるように、ゲノム上の別部位に生じ る疑似復帰変異により、逆境を乗り越えて増殖していく. このたくましさが、シアノバクテリアが地球上のあらゆる 環境下に生息域を広げることができた一因と考えられる. 本項で取り上げた4種のみを見ると、単細胞種に比べて糸 状性種のほうが多くのPSS因子を持つように思えるが、シ アノバクテリア全体に目を向けると、キナーゼを1、2個 しか持たないSynechococcus elongatus PCC 7942やS.6803の ような種は少数派で、3個から5個を保持している単細胞種 が多く存在する.おそらく、シアノバクテリアにとって最 も重要なのは、キナーゼを1、2個しか持たない種に保存 されている代謝制御用のPSSであり、多くのキナーゼを持 つ種は、それに加えて他の細菌に見られるような、細胞分 化や運動性,ストレス応答等を制御するPSS,さらにスト レスソームなどを保持しているのであろう. 今後, 多くの 種について解析が進むことで、シアノバクテリアにおける PSSの多様性が明らかになると期待される.

謝辞

筆者の博士課程における研究指導から、本稿に対するご 助言まで、池内昌彦先生には長きにわたり様々な形でお 世話になり続けてきました.また、埼玉大学におけるS.6803 のPSS研究の展開は、多くの卒研生、大学院生の皆さんの 努力によるものです.心より感謝申し上げます.本稿は JSPS科研費 23H04962の助成を受けて執筆しました.

参考文献

- Alper, S., Duncan, L. and Losick, R. (1994) An adenosine nucleotide switch controlling the activity of a cell typespecific transcription factor in *B. subtilis. Cell* 77:195-205.
- Beuf, L., Bédu, S., Durand, M.C. and Joset, F. (1994) A protein involved in co-ordinated regulation of inorganic carbon and glucose metabolism in the facultative photoautotrophic cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Plant Mol Biol.* 25: 855-864.

- Bouillet, S., Arabet, D., Jourlin-Castelli, C., Méjean, V. and Iobbi-Nivol, C. (2018) Regulation of sigma factors by conserved partner switches controlled by divergent signalling systems. *Environ Microbiol Rep.* 10: 127-139.
- Bradshaw, N. and Losick, R. (2015) Asymmetric division triggers cell-specific gene expression through coupled capture and stabilization of a phosphatase. *eLife*. 4: 1-18.
- Chareyre, S., Li, X., Anjuwon-Foster, B.R., Updegrove, T.B., Clifford, S., Brogan, A.P., Su, Y., Zhang, L., Chen, J., Shroff, H. and Ramamurthi, K.S. (2024) Cell division machinery drives cell-specific gene activation during differentiation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 121: e2400584121.
- Folea, M., Zhang, P., Nowaczyk, M.M., Ogawa, T., Aro, E.-M. and Boekema, E.J. (2008) Single particle analysis of thylakoid proteins from *Thermosynechococcus elongatus* and *Synechocystis* 6803: Localization of the CupA subunit of NDH-1. *FEBS Lett.* 582: 249-254.
- Haimovich-Dayan, M., Kahlon, S., Hihara, Y., Hagemann, M., Ogawa, T., Ohad, I., Lieman-Hurwitz, J. and Kaplan, A. (2011)
 Cross-talk between photomixotrophic growth and CO₂concentrating mechanism in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Environ Microbiol.* 13: 1767-1777.
- Han, X., Sun, N., Xu, M. and Mi, H. (2017) Co-ordination of NDH and Cup proteins in CO₂ uptake in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Exp Bot.* 68: 3869-3877.
- Hida, S., Nishio, M., Uesaka, K., Banba, M., Takatani, N., Takaichi, S., Yamamoto, H., Ihara, K. and Fujita, Y. (2024)
 Microevolution toward loss of photosynthesis: Mutations promoting dark-heterotrophic growth and suppressing photosynthetic growth in cyanobacteria. BioRxiv, doi. org/10.1101/2024.04.08.588626
- Hihara, Y. and Ikeuchi, M. (1997) Mutation in a novel gene required for photomixotrophic growth leads to enhanced photoautotrophic growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth Res.* 53: 243-252.
- Hihara, Y., Sonoike, K. and Ikeuchi, M. (1998) A novel gene, *pmgA*, specifically regulates photosystem stoichiometry in the cyanobacterium *Synechocystis* species PCC 6803 in response to high light. *Plant Physiol*.117: 1205-1216.
- Hu, P.-P., Hou, J.-Y., Xu, Y.-L., Niu, N.-N., Zhao, C., Lu, L., Zhou, M., Scheer, H. and Zhao, K.-H. (2020) The role of lyases, NblA and NblB proteins and bilin chromophore transfer in restructuring the cyanobacterial light-harvesting

complex. Plant J. 102: 529-540.

- Ikeuchi, M. and Tabata, S. (2001) *Synechocystis* sp. PCC 6803
 a useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria. *Photosynth Res.* 70: 73-83.
- Irmler, A. and Forchhammer, K. (2001) A PP2C-type phosphatase dephosphorylates the PII signaling protein in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Proc Natl Acad Sci* USA 98: 12978-12983.
- Kamei, A., Ogawa. T. and Ikeuchi, M. (1998) Identification of a novel gene (*slr2031*) involved in high-light resistance in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Photosynthesis: Mechanisms and Effects. pp.2991-2994, Kluwer Academic Publishers
- Kanesaki, Y., Shiwa, Y., Tajima, N., Suzuki, M., Watanabe, S., Sato, N., Ikeuchi, M. and Yoshikawa, H. (2012) Identification of substrain-specific mutations by massively parallel wholegenome resequencing of *Synechocystis* sp. PCC 6803. DNA Res. 19: 67-79.
- Khanna, K., Lopez-Garrido, J., Sugie, J., Pogliano, K. and Villa, E. (2021) Asymmetric localization of the cell division machinery during *Bacillus subtilis sporulation*. *eLife* 10: e62204.
- Klicki, K., Ferreira, D., Risser. D. and Garcia-Pichel, F. (2022) A regulatory linkage between scytonemin production and hormogonia differentiation in *Nostoc punctiforme. iScience* 25: 104361.
- Luque, I., Zabulon, G., Contreras, A. and Houmard, J. (2001) Convergence of two global transcriptional regulators on nitrogen induction of the stress-acclimation gene *nblA* in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol Microbiol*. 41: 937-947.
- Melville, K.T., Kamran, M., Yao, J., Costa, M., Holland, M., Taylor, N.L., Fritz, G., Flematti, G.R. and Waters, M.T. (2024)
 Perception of butenolides by *Bacillus subtilis* via the α/β hydrolase RsbQ. *Curr Biol.* 34: 623-631.
- Mercer, R.G. and Lang, A.S. (2014) Identification of a predicted partner-switching system that affects production of the gene transfer agent RcGTA and stationary phase viability in *Rhodobacter capsulatus. BMC Microbiol.* 14: 71.
- Morris, A.R. and Visick, K.L. (2013) The response regulator SypE controls biofilm formation and colonization through phosphorylation of the *syp*-encoded regulator SypA in *Vibrio fischeri. Mol Microbiol.* 87: 509-525.

Muramatsu, M. and Hihara, Y. (2003) Transcriptional regulation

of genes encoding subunits of photosystem I during acclimation to high-light conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Planta* 216: 446-453.

- Muramatsu, M., Sonoike, K. and Hihara, Y. (2009) Mechanism of downregulation of photosystem I content under high-light conditions in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* 155: 989-996.
- Nakamura, R., Takahashi, Y., Tachibana, S., Terada, A., Suzuki, K., Kondo, K., Tozawa, Y. and Hihara, Y. (2024) Partnerswitching components PmgA and Ssr1600 regulate high-light acclimation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* 196: 621-633.
- Nishijima, Y., Kanesaki, Y., Yoshikawa, H., Ogawa, T., Sonoike, K., Nishiyama, Y. and Hihara, Y. (2015) Analysis of spontaneous suppressor mutants from the photomixotrophically grown *pmgA*-disrupted mutant in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth Res.* 126: 465-475.
- Ohkawa, H., Price, G.D., Badger, M.R. and Ogawa, T. (2000) Mutation of *ndh* genes leads to inhibition of CO₂ uptake rather than HCO₃⁻ uptake in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol.* 182: 2591-2596.
- Pané-Farré, J., Lewis, R.J. and Stülke, J. (2005) The RsbRST stress module in bacteria: a signalling system that may interact with different output modules. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 9: 65-76.
- de Porcellinis, A.J., Klähn, S., Rosgaard, L., Kirsch, R., Gutekunst, K., Georg, J., Hess, W.R. and Sakuragi, Y. (2016) The non-coding RNA Ncr0700/PmgR1 is required for photomixotrophic growth and the regulation of glycogen accumulation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 57: 2091-2103.
- Riley, K.W., Gonzalez, A. and Risser, D.D. (2018) A partnerswitching regulatory system controls hormogonium development in the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme. Mol Microbiol.* 109: 555-569.
- Risser, D.D. (2023) Hormogonium development and motility in filamentous cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 89: e0039223.
- Sakuragi, Y., Maeda, H., Dellapenna, D. and Bryant, D.A. (2006) Alpha-tocopherol plays a role in photosynthesis and macronutrient homeostasis of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 that is independent of its antioxidant function. *Plant Physiol.* 141: 508-521.

- Sato, H., Fujimori, T. and Sonoike, K. (2008) *sll1961* is a novel regulator of phycobilisome degradation during nitrogen starvation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* 582: 1093-1096.
- Schmidt, R., Margolis, P., Duncan, L., Coppolecchia, R., Moran Jr, C.P. and Losick, R. (1990) Control of developmental transcription factor sigma F by sporulation regulatory proteins SpoIIAA and SpoIIAB in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87: 9221-9225.
- Sendersky, E., Lahmi, R., Shaltiel, J., Perelman, A. and Schwarz, R. (2005) NblC, a novel component required for pigment degradation during starvation in *Synechococcus* PCC 7942. *Mol Microbiol.* 58: 659-668.
- Sevcikova, B., Rezuchova, B., Mingyar, E., Homerova, D., Novakova, R., Feckova, L. and Kormanec, J. (2020) Pleiotropic anti-anti-sigma factor BldG is phosphorylated by several anti-sigma factor kinases in the process of activating multiple sigma factors in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* 755: 144883.
- Shi, L., Bischoff, K.M. and Kennelly, P.J. (1999) The *icfG* gene cluster of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 encodes an Rsb/Spo-like protein kinase, protein phosphatase, and two phosphoproteins. *J Bacteriol*. 181: 4761-4767.
- Shibata, M., Ohkawa, H., Kaneko, T., Fukuzawa, H., Tabata, S., Kaplan, A. and Ogawa, T. (2001) Distinct constitutive and low-CO₂-induced CO₂ uptake systems in cyanobacteria: genes involved and their phylogenetic relationship with homologous genes in other organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 11789-11794.
- Sonoike, K., Hihara, Y. and Ikeuchi, M. (2001) Physiological significance of the regulation of photosystem stoichiometry upon high light acclimation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 42: 379-384.
- Takahashi, H., Uchimiya, H. and Hihara, Y. (2008) Difference in metabolite levels between photoautotrophic and photomixotrophic cultures of *Synechocystis* sp. PCC 6803 examined by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *J Exp Bot.* 59: 3009-3018.
- Trautmann, D., Voß, B., Wilde, A., Al-Babili, S. and Hess, W.R. (2012) Microevolution in cyanobacteria: Re-sequencing a motile substrain of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.* 19: 435-448.
- Ungerer, J., Lin, P.-C., Chen, H.-Y. and Pakrasi, H.B. (2018) Adjustments to photosystem stoichiometry and electron

transfer proteins are key to the remarkably fast growth of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *mBio* 9: e02327-17.

- Walker, P.L. and Pakrasi, H.B. (2022) A ubiquitously conserved cyanobacterial protein phosphatase essential for high light tolerance in a fast-growing cyanobacterium. *Microbiol Spectr.* 10: e0100822.
- Zhao, Z., Hajiahmadi, F., Alehashem, M.S. and Williams, A.H. (2024) Molecular architecture and function of the bacterial stressosome. *Curr Opin Microbiol.* 82:102541.
光化学系II修復におけるタンパク質修飾と D1タンパク質分解

加藤 裕介¹⁾,坂本 亘²⁾

2024年11月27日受付, 2024年12月12日受理

光合成を駆動するために光は必要不可欠であるが,光は同時にチラコイド膜上の光化学系II複合体 に損傷を与える.光合成生物は損傷した光化学系IIを修復する優れた機構を持っており,損傷を受け た反応中心タンパク質D1を選択的に分解し,新規合成したものと入れ換える.FtsHプロテアーゼは損 傷D1タンパク質の分解で主要な役割を果たしており,その機能調節や基質認識メカニズムが解き明か されつつある.ここでは光化学系IIの修復機構を概説するとともに,FtsHの機能調節についての進展と, D1タンパク質で生じるアミノ酸の酸化修飾が損傷D1タンパク質の選別と分解に関わるメカニズムに ついて述べる.

Post-translational modification of D1 and its proteolysis in the Photosystem II repair.

Yusuke Kato¹, Wataru Sakamoto²

Light energy is essential for driving photosynthesis but also causes oxidative damage to the Photosystem II (PSII) complex. Photosynthetic organisms have developed an efficient PSII repair mechanism to maintain photosynthetic activity. Photo-damaged D1, the primary target of unavoidable photo-oxidative damage, is selectively degraded by proteases and replaced with a newly synthesized D1 protein. FtsH, a thylakoid-bound ATP-dependent metalloprotease, plays a crucial role in the specific degradation of photo-damaged D1. Here, we provide an overview of the PSII repair mechanism and highlight recent progress in understanding the functional regulation of FtsH. We also introduce our recent study, which revealed that an oxidative post-translational modification of a Trp residue at the N-terminal tail of D1 is a critical factor in D1 degradation by FtsH.

キーワード:葉緑体,光合成,光阻害,光化学系II修復,FtsHプロテアーゼ Chloroplast, Photosynthesis, Photoinhibition, PSII repair, FtsH protease

1. はじめに

光合成は、光エネルギーを利用して、二酸化炭素を有機 物に変換するプロセスである。光合成は二つの段階から成 り、第一段階で水から電子を取り出してNADPHとATPを

連絡先 坂本 亘 岡山大学 資源植物科学研究所 〒710-0046 岡山県倉敷市中央 2 丁目 20-1 Tel: 086-434-1206 Email: saka@okayama-u.ac.jp 生成する電子伝達系が行われ,第二段階でこれらを用いて 二酸化炭素から糖を合成する炭素固定反応が行われる.光 エネルギーは第一段階である電子伝達系で利用され,光化 学系IIタンパク質複合体(光化学系II)と光化学系Iタンパク 質複合体(光化学系I)において,反応中心クロロフィルを

1) 摂南大学 農学部

Faculty of Agriculture, Setsunan University, Hirakata, Japan 1) 岡山大学 資源植物科学研究所 Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, Kurashiki, Japan



図1:光化学系||修復サイクルの概略図

光化学系IIの修復サイクルを示す. D1タンパク質が光によって損傷後,光化学系II複合体の部分的な 解体が起きる.続いて,損傷を受けたD1タンパク質がFtsHプロテアーゼにより分解され,その後に 新たなD1タンパク質が合成され,機能的な光化学系IIが再構築される.LHCII;集光アンテナ複合体, OEC; 膜表在性タンパク質.

励起し,光合成を駆動する力となる.一方で,光エネル ギーは光合成装置に恒常的に損傷を与えることが知られて いる(Vass, 2012).光による損傷は光合成効率を低下させ る光阻害を引き起こすが,これら損傷は光エネルギーを利 用する光合成において本質的に切り離すことが出来ないも のである.特に光化学系IIは光による損傷を受けやすく, 光合成生物は光損傷を受けた光化学系IIを修復し,その機 能を維持する洗練された機構を作りあげてきた(Kato and Sakamoto, 2009, Järvi et al., 2015).本稿では光化学系IIの修 復機構を概説するとともに,FtsHプロテアーゼの機能調節 や光化学系IIの構成タンパク質に生じるアミノ酸修飾が光 化学系II修復に及ぼす効果についての研究成果を紹介した い.

2. 光化学系||の損傷と修復

光化学系IIの反応中心はP680と呼ばれる特別なクロロ フィルa分子二量体であり,反応中心タンパク質D1とD2 の間に埋め込まれている.D1,D2タンパク質の外側には CP43,CP47と呼ばれる2つのタンパク質が結合し,D1, D2タンパク質と合わせて光化学系IIコア複合体を構成す る.さらに光化学系IIコア複合体の周囲を取り囲む複数の 膜貫通タンパク質とチラコイド膜内腔側に結合する膜表 在性タンパク質が加わり,20種以上のサブユニットから構 成される巨大タンパク質複合体が形成される.このような 巨大な光化学系II複合体は光による損傷に常に晒されてお り,損傷によって機能が低下することが知られている.一 方で,損傷を修復するメカニズムが存在しており,この機 構は光化学系II修復サイクルと呼ばれる.強光照射下では, 光による光化学系IIの損傷速度が修復サイクルの速度を上 回り,光合成活性が低下する.この状態は光阻害と呼ばれ, 強光下で植物をはじめとした光合成生物の生育を妨げる要 因となっている(Murata et al., 2007).

光化学系IIを構成するサブユニットの中で、反応中心と 結合するD1タンパク質のターンオーバーは突出して高い (Aro et al., 1993). この知見は、D1タンパク質が光による 酸化損傷の主要な標的であること、損傷を受けたD1タン パク質が特異的に分解され、新規合成されたものに置き 換わる修復メカニズムがあることを示している. D1タン パク質だけを入れ換える光化学系II修復サイクルは、光合 成生物にとってエネルギーコスト的に有利であり (Raven, 2011), 光化学系II修復サイクルはシアノバクテリアのよ うな初期の光合成生物から陸上植物まで幅広い光合成生物 が持ち,光合成を支える基本的なメカニズムと言える.光 化学系II修復サイクルは1)部分的な光化学系IIの解体(CP43 タンパク質および酸素発生複合体の解離), 2)損傷D1タン パク質の特異的な分解,3)新規D1タンパク質の合成とプ ロセッシング、4)光化学系IIの再構築、という段階で進む (図1). また植物の葉緑体のように、グラナ構造が発達し ている場合は、損傷を受けた光化学系IIのグラナからスト

ロマチラコイドへの移行と再構築された光化学系IIのグラ ナへの再配置が必要となる(Kato and Sakamoto, 2009).

3. D1タンパク質を分解するプロテアーゼ

損傷したD1タンパク質の特異的な分解は、光化学系II修 復において鍵となるステップである.損傷D1タンパク質 を分解するプロテアーゼの研究は、主にシアノバクテリア やシロイヌナズナで進められ、チラコイド膜局在のFtsHプ ロテアーゼが主要な役割を果たしていることが明らかと なってきた (Silva et al., 2003, Kato et al., 2009). FtsHは膜貫 通ドメインを持つATP依存性メタロプロテアーゼであり, ストロマ側にATPaseドメインとプロテアーゼドメインを もつ. 光合成生物ではリング状のヘテロ六量体を形成して 機能しているとされる. FtsHのATPaseドメインは膜側に面 しており、ATP依存的に基質タンパク質の構造をほどき、 膜から引き抜く. 続いて, 膜から引き抜かれた基質は六量 体構造の中心部にある孔からプロテアーゼ部位に送り込ま れ,分解される.シロイヌナズナではtype A サブユニット (FtsH1, FtsH5)とtype Bサブユニット (FtsH2, FtsH8)から 構成されたヘテロ六量体が機能しており,損傷したD1タ ンパク質の分解を担う (Yu et al., 2004). 特にFtsH2とFtsH5 は主要なサブユニットであり、これらFtsHを欠損した変異 体は光ストレスに対して脆弱であることが知られている (Sakamoto et al., 2002). またFtsH2欠損変異体では、葉緑 体内に活性酸素種が蓄積しているのが確認されており、損 傷したD1タンパク質を取り除くことは、光化学系II修復 に必要なだけでなく、機能不全な光化学系IIから発生する 活性酸素種を防ぐためにも重要であると言える (Kato et al., 2009). FtsH2を欠損した変異体の解析から、FtsHは弱光下 から強光下までのすべての光条件でD1タンパク質分解に 寄与しており、D1タンパク質分解の基幹となるプロテアー ゼであると言える(Kato et al., 2009).

一方、シロイヌナズナではATP非依存型のセリンプロテ アーゼDegのD1タンパク質分解への関与が示唆されてい る.Degプロテアーゼはチラコイド膜のストロマ側と内腔 側の両側に複数のホモログが局在しており、D1のストロ マ側ならびに内腔側に露出したループ構造を切断すると される (Schuhmann and Adamska, 2012).シロイヌナズナの 葉緑体では、チラコイド膜のストロマ側に局在するDeg2, Deg7、チラコイド膜内腔側に局在するDeg1,Deg5,Deg8 がD1タンパク質分解に関与すると報告されている.Degは エンド型プロテアーゼであり、D1タンパク質の膜貫通ド メインをつなぐループ構造を切断するとされるが、その機 能はFtsHに比べ限定的で,強光照射下でD1タンパク質を 断片化し,FtsHによるD1タンパク質分解を補助している と考えられている.FtsHの変異体では,Degによって切断 されたD1タンパク質の分解断片が蓄積しており,強光照 射下ではDegとFtsHが協調的にD1タンパク質を分解してい ると考えられる(Kato et al., 2012).

4. FtsHプロテアーゼの機能調節について

光化学系II修復でFtsHがD1タンパク質を分解する主要 なプロテアーゼと明らかになったが、損傷したD1タンパ ク質をどのように効率的に分解するのかは残された疑問 であった. 光照射下では損傷D1タンパク質の増加に伴い. FtsHによる分解が活発になると考えられる. FtsHのプロテ アーゼ活性については、緑藻クラミドモナスでの研究か ら. ジスルフィド結合の酸化還元状態によってFtsHの活性 が制御される可能性が示された(Wang et al., 2017). また FtsH自身のリン酸化も報告されており、リン酸化が活性に 影響する可能性も示唆された(Wang et al., 2014). しかしな がら、我々の解析結果では、シロイヌナズナのFtsHのリン 酸化は複合体形成に影響するが、活性制御には直接的に 関わるものではないことが示唆された(Kato and Sakamoto, 2019). このような中, 最近の研究ではFtsH自身のターン オーバーに注目が集まっている. FtsHの転写量は強光下で 大きく増加する一方で、そのタンパク質の増加量は転写の 増加量と比較して明らかに少ない. これはFtsH自身のター ンオーバーが速いことを示唆している(Wang et al., 2017) (図2). また我々の研究では、シロイヌナズナのFtsHと相 互作用する因子としてリボソーム生合成に関与するEngA を見出した.興味深いことにEngAを高発現する形質転換 体はFtsH欠損変異体同様の斑入りを示し、D1タンパク質 の分解産物と活性酸素種の蓄積が認められた. その詳細 は不明であるが、EngA高発現形質転換体ではFtsH自身の 分解が遅れており、FtsH自身のターンオーバー異常が光化 学系II修復に影響したものと考えられた (Kato et al., 2018). 損傷を受けた光化学系IIは活性酸素種を発生させると考え られており、その分解を行うFtsH自体も活性酸素種に晒さ れやすいと推測される. このため傷ついたFtsHを入れ換え る必要があり、FtsHのターンオーバーが速くなっていると 考えられる. FtsHは大腸菌やミトコンドリアでは、六量体 構造をつくるだけではなく,別のタンパク質複合体(HflKC/ Prohibitin)と結合し、巨大複合体として機能している.し かしながら, 光合成生物では, チラコイドFtsHとProhibitin からなる巨大複合体はシアノバクテリアで報告されている



図2:FtsHターンオーバーと光化学系II修復サイクル

光化学系II修復サイクルでは、FtsHは損傷を受けたD1タンパク質に近接し、D1タンパク質を分解す るが、機能不全の光化学系IIから発生する活性酸素種により損傷を受けると考えられる.損傷した FtsHは除去され、新たなFtsHは細胞質から運ばれる.強光下では、FtsHの発現が増加し、FtsHの速 いターンオーバーを支えている.

のみであり、葉緑体ではProhibitinに対応するタンパク質は 報告されていない、光化学系II修復におけるFtsHのターン オーバーやその他因子との複合体形成については未解明な 部分がまだ多く、それらがFtsHの活性調節に関与するのか もしれない.

5. D1タンパク質の酸化修飾とFtsHによる基質認識

次いで、基質であるD1タンパク質の光による損傷とそ の影響について考えたい。光化学系IIでは一重項酸素¹O₂を 含む活性酸素種が発生し、その構成タンパク質のアミノ 酸残基を光依存的に酸化することが報告されている.活 性酸素種により酸化されるアミノ酸残基の種類は多様で あり、システイン残基 (Cys) やメチオニン残基 (Met) は酸 化されやすいアミノ酸として知られている. しかし, Cys やMetの酸化修飾は、酵素的に還元され、修復される可逆 的な酸化修飾である.一方で、これらの可逆的な酸化修 飾とは対照的に、トリプトファン残基 (Trp) のように不可 逆的な酸化修飾を受ける残基がある (Rinalducci et al., 2008, Ehrenshaft et al., 2015). このような不可逆的に酸化修飾を 受けた残基を除去する唯一の方法はタンパク質分解であ り、不可逆的な酸化修飾が光化学系IIにおいても複数生じ ていることが報告されている. 我々の解析においても、シ ロイヌナズナおよびクラミドモナスの光化学系IIコア複 合体の複数箇所にTrpの酸化修飾が起きていることが明ら

かとなった (Kato et al., 2023). その多くは反応中心クロロ フィルP680やMnCaクラスター近傍のチラコイド膜内腔側 であり、これはMnCaクラスター近傍のアミノ酸残基が光 損傷の初期段階で酸化されるという、これまでの知見と一 致する (Dreaden Kasson et al., 2012, Kale et al., 2017). 一方 で、興味深いことにD1タンパク質N末端にあり、ストロマ 側に面する14番目のトリプトファン残基(Trp-14)の酸化修 飾が両者に共通して見出された(図3). さらに, このTrp-14の酸化修飾は、FtsH2欠損変異体(var2)で増加しており、 FtsH機能との関連が示唆された。FtsHは膜に埋め込まれた 基質タンパク質のN末端またはC末端を認識し、ATPase活 性によって基質を膜から引き抜く. 膜から引き抜かれた 基質は、プロテアーゼ部位に送り込まれ、分解される (Ito and Akiyama, 2005). 基質であるD1タンパク質のN末端は, FtsHのATPase 部位およびプロテアーゼ部位が存在するス トロマ側に露出しており、FtsHはこの露出したN末端を認 識していると考えられている.シアノバクテリアでの実験 では、N末端の20残基を欠失したD1タンパク質はFtsHに認 識されず、分解を受けないことが示された、プロテアーゼ は、変性したり不要になった基質タンパク質を識別し、こ れを分解する.しかしながら,光化学系Ⅱ修復において, FtsHがどのように損傷したD1タンパク質と正常なものを 区別し、そのN末端を捉えているかは未解明である。この ためD1タンパク質のN末端に位置するTrp-14の酸化修飾と FtsHによるD1タンパク質の分解は重要な手がかりとなる



図3:光化学系||コア複合体におけるトリプトファン残基の酸化修飾

光化学系IIコア複合体内で検出された酸化されたトリプトファン残基の位置を示す.DIのN末端側にあるトリプトファン残基(Trp-14)は隣接するPsbIサブユニットのセリンと水素結合を作るが、酸化によりこの水素結合が壊れる.FtsHプロテアーゼはDIタンパク質のN末端(赤点線)を認識すると考えられる.但し、DIタンパク質のN末端の構造情報がないため赤点線部分は推定.

可能性が示唆された.

そこでTrp-14の酸化修飾がD1タンパク質の分解に影響す るかの検討を、クラミドモナスの葉緑体形質転換系を用い て、Trp-14をフェニルアラニン(Phe)に置換することによっ て行なった. 形質転換されたクラミドモナスは, 弱光下で は野生株と同等の生育を示し、光化学系Ⅱタンパク質の蓄 積も同程度であった.また光化学系IIの酸素発生活性にお いても、形質転換体は野生型と同等の活性を示した。-方で, 強光下では, 形質転換体の生育が著しく阻害され, Trp-14のPheへの置換が光化学系II修復に大きく影響を及ぼ すことが示唆された.続いて,葉緑体タンパク質の合成阻 害剤存在下,光照射下でのD1タンパク質の蓄積量の変化 を解析した. その結果, 形質転換体のD1タンパク質量は 弱光下では野生株と同等であったが、強光下では光照射に よって大きく減少することが示された. この結果は, Trp-14がPheに置換されたD1タンパク質を持つ光化学系IIにお いて, 光による損傷, D1タンパク質の新規合成もしくは D1タンパク質分解のどれかに異常が起きていることを示 唆する.光合成活性を指標として光化学系Ⅱの光による損 傷を野生株と形質転換体を比較した結果では、両者に差は なく、さらに新規D1タンパク質の合成速度においても野 生株と形質転換体の間で有意な差は認められなかった. す なわち、Trp-14のPheへの置換は、光化学系IIの安定性およ び光による損傷, D1タンパク質の合成には影響を与えず, D1タンパク質の分解を促進していることが示唆された.

この形質転換体とftsH変異体の交配を行なった結果では, ftsH変異体背景ではD1タンパク質分解の促進が抑えられる ことが確認された.この結果は,強光下での形質転換体の D1タンパク質減少がFtsHによる分解に起因することを示 す.また抗FtsH抗体を用いた共免疫沈降の結果では,Trp-14をPheへ置換したD1タンパク質はFtsHと結合しやすいこ とが示された.以上の結果から,Trp-14がPheへ置換され たD1タンパク質がFtsHに基質として認識されやすくなり, その分解が促進されていると考えられた.

これら結果を考察するため. 分子動力学シミュレーショ ンを用いて, 好熱性シアノバクテリア (Thermosynechococcus vulcanus)の光化学系II複合体の結晶構造をもとに、光化学 系II複合体中のアミノ酸の動きをシミュレーションした. Trp-14はD1タンパク質のN末端にあるaヘリックスに位置 し、隣接するPsbIサブユニットの25番目のセリン (Ser)と 水素結合をつくる. この水素結合はD1 タンパク質のN末 端の揺らぎを制限していると考えられる.一方で, Trp-14 がPheへ置換された場合、この水素結合が消失し、PsbIと の分子間の距離が拡がるとともに、Trp-14を含めたN末端 側の揺らぎが増大することが示された. Trp-14の酸化修飾 でも同様に水素結合が失われ、D1タンパク質のN末端の 揺らぎが増大する. FtsHは揺らぎが大きくなったD1タン パク質のN末端を認識し、基質として分解していると推定 される. つまり, N末端に存在するTrp-14に生じる酸化修 飾が光により損傷したD1タンパク質を見分ける鍵であり、

FtsHによる損傷D1タンパク質分解の引き金になっていると言える.

6. おわりに

光化学系IIのD1タンパク質分解については30年近くの研 究が続けられてきた. その中で, 近年のシロイヌナズナや シアノバクテリアを用いた研究からFtsHの主要な役割が明 らかにされた. さらに損傷したD1タンパク質の酸化修飾 とFtsHによる基質認識の機構が明らかになり、その分解メ カニズムの解明はひとつの区切りを迎えたと言える.一方 で、光化学系II修復の過程全体を考えるとFtsHのD1タンパ ク質へのアクセスに必要なCP43タンパク質の解離など未 解明な部分はまだ多い. アミノ酸酸化修飾の質量分析解析 の結果では、D1タンパク質以外にD2、CP43、CP47タンパ ク質においてもトリプトファン残基の酸化修飾が検出され た. 我々はD1タンパク質での実験と同様に、CP43タンパ ク質で酸化修飾が見られた2つのTrp残基をPheに置換した が、その影響は限定的であり、光化学系II修復にほとんど 影響を与えないようであった.このため、光化学系Ⅱ修復 過程でのCP43タンパク質の解離はアミノ酸酸化修飾とは 異なるメカニズムで起きている可能性がある. 今後のさら なる研究発展により、これらが明らかになることを期待し たい.

謝辞

本稿で紹介した研究の一部は科研費23H04959の助成を 受けて実施されたものです.

参考文献

- Aro, E.M., Virgin, I. and Andersson, B. (1993) Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1143: 113–134.
- Dreaden, T.M., Rexroth, S. and Barry, B.A. (2012) Lightinduced oxidative stress, N-formylkynurenine, and oxygenic photosynthesis. *PLoS One.* e42220.
- Ehrenshaft, M., Deterding, L.J. and Mason, R.P. (2015) Tripping up Trp: Modification of protein tryptophan residues by reactive oxygen species, modes of detection, and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.* 89: 220–228.
- Ito, K. and Akiyama, Y. (2005) Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu. Rev. Microbiol.*

59: 211-231.

- Järvi, S., Suorsa, M. and Aro, E.M. (2015) Photosystem II repair in plant chloroplasts--Regulation, assisting proteins and shared components with photosystem II biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1847: 900–909
- Kale, R., Hebert, A.E., Frankel, L.K., Sallans, L., Bricker, T.M. and Pospíšil, P. (2017) Amino acid oxidation of the D1 and D2 proteins by oxygen radicals during photoinhibition of Photosystem II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114: 2988– 2993.
- Kato, Y., Hyodo, K. and Sakamoto, W. (2018) The Photosystem II repair cycle requires FtsH turnover through the EngA GTPase. *Plant Physiol.* 178: 596–611.
- Kato, Y., Kuroda, H., Ozawa, S.I., Saito, K., Dogra, V., Scholz, M., et al. (2023) Characterization of tryptophan oxidation affecting D1 degradation by FtsH in the photosystem II quality control of chloroplasts. *Elife* 12: 1–30.
- Kato, Y., Miura, E., Ido, K., Ifuku, K. and Sakamoto, W. (2009) The variegated mutants lacking chloroplastic FtsHs are defective in D1 degradation and accumulate reactive oxygen species. *Plant Physiol.* 151: 1790–1801.
- Kato, Y. and Sakamoto, W. (2009) Protein quality control in chloroplasts: A current model of D1 protein degradation in the photosystem II repair cycle. *J. Biochem.* 146: 463–469.
- Kato, Y. and Sakamoto, W. (2019) Phosphorylation of the chloroplastic metalloprotease FtsH in Arabidopsis characterized by Phos-Tag SDS-PAGE. *Front. Plant Sci.* 10: 1–13.
- Kato, Y., Sun, X., Zhang, L. and Sakamoto, W. (2012) Cooperative D1 degradation in the photosystem II repair mediated by chloroplastic proteases in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 159: 1428–1439.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y. and Allakhverdiev, S.I. (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1767: 414–421.
- Raven, J.A. (2011) The cost of photoinhibition. *Physiol. Plant.* 142: 87–104.
- Rinalducci, S., Murgiano, L. and Zolla, L. (2008) Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *J. Exp. Bot.* 59: 3781– 3801.
- Sakamoto, W., Tamura, T., Hanba-Tomita, Y., Sodmergen. and Murata, M. (2002) The VAR1 locus of Arabidopis encodes a choloroplastic FtsH and is responsible for leaf variegation in

the mutant alleles. Genes to Cells 7: 769–780.

- Schuhmann, H. and Adamska, I. (2012) Deg proteases and their role in protein quality control and processing in different subcellular compartments of the plant cell. *Physiol. Plant.* 145: 224–234.
- Silva, P., Thompson, E., Bailey, S., Kruse, O., Mullineaux, C.W., Robinson, C., et al. (2003) FtsH is involved in the early stages of repair of photosystem II in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant Cell* 15: 2152–2164.
- Vass, I. (2012) Molecular mechanisms of photodamage in the Photosystem II complex. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1817: 209–217.
- Wang, F., Qi, Y., Malnoë, A., Choquet, Y., Wollman, F.A. and de Vitry, C. (2017) The high light response and redox control of thylakoid FtsH protease in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Plant* 10: 99–114.
- Wang, H., Gau, B., Slade, W.O., Juergens, M., Li, P. and Hicks, L.M. (2014) The global phosphoproteome of chlamydomonas reinhardtii reveals complex organellar phosphorylation in the flagella and thylakoid membrane. *Mol. Cell Proteomics* 13: 2337–2353.
- Yu, F., Park, S. and Rodermel, S.R. (2004) The Arabidopsis FtsH metalloprotease gene family: Interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes. *Plant J*. 37: 864–876.

光合成研究におけるモデル生物の シトクロム *b*₆f 複合体変異株

小澤 真一郎 1)

2024年12月16日受付, 2025年1月6日受理

シトクロムb₆f複合体の構成サブユニットは核または葉緑体ゲノムにコードされ,複合体の実態が明 らかになる前からPSIIとPSIとの電子伝達を行なう成分として変異株が単離され重要な知見を提供して いる.モデル生物が確立していく過程で,葉緑体遺伝子解析と葉緑体遺伝子改変の技術確立とともに 変異株が作出された.同時にエレクトロクロミックシフトによる活性測定技術も確立しスクリーニン グと変異株解析に大きく貢献している.近年になって確立した遺伝子編集技術が新しいモデル生物に 適用され新たな変異株が単離されており今後の動向が注目される.

Mutants of cytochrome $b_6 f$ complex for photosynthesis research in model organisms.

OZAWA Shin-Ichiro¹

Nuclear and chloroplast genes encode the cytochrome b_6f complex subunits. The b_6f mutants have been isolated as mutants, carrying essential components for the electron transfer between PSII and PSI that had been disrupted, even before isolating the b_6f complex. During the establishment of model organisms, the newly developed chloroplast gene manipulation and analysis techniques have been applied to generate b_6f mutants for their characterization. In recent years, gene editing technology has been used to isolate b_6f mutant strains in new model organisms.

キーワード:シトクロム b₆f 複合体, 葉緑体遺伝子, 遺伝子改変技術, モデル生物 Cytochrome b₆f complex, chloroplast genome, gene manipulation technique, model organism

1. はじめに

シトクロムb₆f複合体(b₆f複合体)は電子伝達経路と速 度を巧みに制御する事でエネルギー調整役を担う.光化 学系Iと光化学系IIは当初から複合体として認識されてい たが,(Nelson and Neumann, 1972)らによる報告までは電 子伝達に関わるヘムが1つの複合体に組み込まれておら ずキノンやプラストシアニンのように個々の粒子として

連絡先

小澤 真一郎 岡山大学資源植物科学研究所 〒710-0046 岡山県倉敷市中央 2-20-1 Tel: 086-434-1225 Email: OzwSh1r@okayama-u.ac.jp 電子伝達を担う可能性が考えられていた.複合体として の実態が不明な段階から光化学系I反応中心の酸化還元状 態に影響する電子伝達成分の変異株としてb₆f複合体の変 異株は単離され議論が進められていた.結晶構造解析に より原子分解能でb₆f複合体の構造が解かれ(Kurisu et al., 2003; Stroebel et al., 2003),以前から指摘されていた呼吸 鎖のComplex III(bc₁複合体)との類似点とb₆f複合体の特 徴が示されると、タンパク質構造から新たな疑問が生じ、

 岡山大学 資源植物科学研究所 Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, Okayama, Japan 構造生物学の知見に基づく機能解析研究が進められ変異 株が作出されている.また,近年になって遺伝子編集技 術が確立したことによって20世紀に確立したモデル生物 以外で変異株が得られ,さらなる発展が見込まれる.

2. 本稿での遺伝子名記載方法について.

b₆ J複合体は葉緑体ゲノムまたは核ゲノムにコードされ るタンパク質が混在する.そして変異株は葉緑体遺伝子 改変技術の進歩と密接に関わっているためタンパク質を コードする遺伝子の場所を認識することは大切である. タンパク質をコードする遺伝子の場所を意識しながら読 み進める事ができるよう,

https://www.chlamycollection.org/resources/tools/genenomenclature/

https://www.chlamycollection.org/content/uploads/2021/11/ Nomenclature-Final.pdf

に記載される緑藻クラミドモナスの遺伝子名記載方法に 則った.

どちらも,遺伝子名は斜体,タンパク質名は立体で表記 する.

葉緑体遺伝子:小文字から書き始め,サブユニットは大 文字.遺伝子産物は大文字で書き始める.

核遺伝子:大文字で表記する.変異株はすべて小文字で 斜体.

3. *bf*複合体の機能・構造・サブユニット構成 ならびにコファクター

 $b_{d}f$ 複合体は、複合体内の電子伝達と共役したQサイクル によって、ストロマのプロトン(H⁺)を消費しルーメンに H⁺を放出することによって、プロトンチャネル機構に因ら ずルーメンのH⁺濃度を上昇させる(図1).Qサイクルは2 段階のサイクルとして記述できる.第1サイクルでは、1 分子のプラストキノール(PQH₂)がQ_{o(p)}サイトに結合する. このときPQH₂の2電子はhigh potential chainとlow potential chainとに1電子ずつ分岐しシトクロム b_{d} 7複合体内部で独 立の電子伝達経路をとる.PQH₂は電子を渡すとセミキノ ン(SQ)となり2つのH⁺がルーメン側に放出されプラスト キノン(PQ)となりhigh potential chainでは1電子が[2Fe-2S] クラスター - へムfへと電子伝達する.low potential chainで は1電子がへム $b_{L(p)}$ に伝達しPQがチラコイド膜に放出され、 ヘム $b_{H(m)}$ からストロマ側のヘム $c_{i(m)}$ に到達し第1サイクルが 完了する.第2サイクルは第1サイクルと同じ電子伝達反応



図1:シトクロムb₆f複合体の電子伝達の概略 電子伝達の概略を模式的に示す. 黄色で囲んだ部分をシトクロ ムb₆f複合体が担い,Qサイクルの1ステップ目をシアン,2ステッ プ目をマゼンタで記す. それぞれの略称は本文参照.

が起きるが、ヘムb_{H(0}に至った1電子と第1サイクルで到達 したc_{i(n)}の1電子とでQ_{i(n)}サイトに結合する1分子のPQをスト ロマのH⁺を2つ消費して2電子還元しPQH₂がチラコイド膜 に放出される.ここで、Qサイクルの二つのサイクルはス テップごとに進行するため[2Fe-2S]クラスターが再酸化さ れる第1サイクル完了まで第2サイクルは開始されずQ_{i(n)}サ イトのPQが一度に2電子還元されることはない.これらの 経路は変異株を用いた解析よりも酵素学的な解析で明らか となった.

b。f複合体は8種類のサブユニットが会合した単量体が ホモ二量体を形成し合計16サブユニットの約240 kDaの二 量体で機能する(表1と図2A). これら8つのサブユニット は光合成生物で保存されており四つの比較的大きなタン パク質 (HMWタンパク質グループ), Cyt f (32 kDa 程度), Cyt b₆ (24 kDa 程度), リスケ鉄硫黄タンパク質 (20 kDa 程 度,以下,PETCタンパク質と表記),SuIV (20 kDa 程度, 以下、PetDタンパク質と表記)が中心部に、その外側に5 kDa以下の四つの小サブユニット(LMWタンパク質グルー プ)が会合する (PetG. PetL. PETM, PETN), HMWタン パク質グループは電子伝達に必要な補欠分子族とキノン 分子結合とH⁺放出に重要なモチーフを適切な位置に配置 する. Cyt b₆は二つのbタイプヘムとストロマ側にある一 つのcヘムを、PETCタンパク質は [2Fe-2S] クラスターを、 Cyt fはヘムfを、それぞれ結合し、PetDはQ_{o(p)}サイトでH⁺ 放出に重要なPEWYモチーフを形成する. LMWタンパク 質グループはb₆f複合体の安定化に寄与するとされている. cヘムは2003年にb。f複合体の構造解析がなされたときに bc₁とは異なる特徴として記述されたが (Kurisu et al., 2003;



図2:シトクロム b_0 /複合体の構造と電子伝達. タンパク質構 造はホウレンソウの構造(Malone et al., 2019) (PDB ID 6RQF) A:全体の構造をコファクターを省略しタンパク質のみで示す. Cyt f: orange, Cyt b_6 : cyan, PETC: yellow, PetD: green, PetG: violet, PetL: rasberry, PETM: red, PETN: gray (60%). B: コファ クターの配置. C: それぞれのモノマーを示す. 1つのモノマー をマゼンタまたは緑で示す. D:コファクターの配置と電子伝達 経路を示す. 2つのうち1つのモノマータンパク質表面構造を書 いている方のモノマー)に属す.

Stroebel et al., 2003), キャリアーGとして提案されていた (Lavergne, 1983; Joliot and Joliot, 1988). コファクターの位 置関係のみを見ると単量体でも機能するように見えるが (図2B), PETCタンパク質の典型的なドメインスワッピ ング構造により,シトクロムb_of複合体は必ず二量体で機 能する(図2C). PTECタンパク質の構造を見ると二量体で なければ機能しないことを確認できる. PETCタンパク質 は膜貫通部分とルーメン側の親水性のドメインから構成 されており,親水性のドメインに [2Fe-2S] クラスターを もつ. この親水性ドメインはもう一方の単量体へムf近く まで伸び,もう一方の単量体での電子伝達経路を提供す る(図2D). このPETCタンパク質の親水性ドメインが電 子伝達に伴い動くことでへムfとの物理的な距離が変化し [2Fe-2S]とへムfとの電子伝達が行なわれる.

b_df複合体の8種類のサブユニットタンパク質のうち, PETCとPETMは核ゲノムにコードされるが,残り6つは葉 緑体ゲノムにコードされる.ただし緑藻クラミドモナス とボルボックスのPETNは核ゲノムにコードされる(表1). petA遺伝子は葉緑体遺伝子であるが翻訳産物のCyt fのN末 端配列が切断されることが報告され (Willey et al., 1984) 末 端のTyr残基のα-amino groupがヘムcのリガンドの1つとし

て機能する (Martinez et al., 1994). さらに植物にはみられ ないサブユニットも存在する. 緑藻クラミドモナスにおい てサブユニットV (SuV, PETO遺伝子にコード) が複合体 の構成サブユニットと提案され(Lemaire et al., 1986), その 後遺伝子クローニングならびにステート2で可逆的にリン 酸化されることが示されb。f複合体のサブユニットと同定 された (Hamel et al., 2000). PETO 遺伝子はクラミドモナス 近縁の緑藻で保存され, artificial micro RNAを用いたPETO ノックダウン変異株を用いた解析によってプラストキノ ンプールの酸化還元状態に依存してANR1やPGRL1やFNR とともにCyclic Electron Flow (CEF)の効率を上げることが 示された (Takahashi et al., 2016). 現在まで, SuVを含むシ トクロムb。f複合体の構造解析は報告されていない。SuV がどのような構造を取りシトクロムb₆f複合体に会合して いるかが明らかになれば、その情報に基づく部位特異的突 然変異によるアミノ酸置換で変異株を作出し機能解析を 行なう事で、構造と生理機能との関連を明確に示す事が 期待される. PetPはシアノバクテリアと紅藻に保存されシ トクロムb。f複合体のサイトプラズム側(植物・藻類のスト ロマ側に相当)に結合する (Volkmer et al., 2007; Gendrullis et al., 2008). 高熱性シアノバクテリアのPetP遺伝子欠損株の 解析により直鎖電子伝達 (Linear Electron Flow) に影響を与 えることが示された (Rexroth et al., 2014). その後, NMR による構造解析を経て (Veit et al., 2016) クライオ電子顕微 鏡による単粒子解析でPetPを結合したシトクロムb₆f複合 体の構造が報告された (Proctor et al., 2022). 今後, 構造情 報を元にした変異株作出と機能解析の進展が期待される.

4. b。f複合体変異株の歴史と今後

4.1 順遺伝学的に単離された変異株

1980年代頃までは紫外線や薬剤により変異を誘発しサ ブユニットを欠損した変異株を選抜し変異遺伝子を同定 する順遺伝学的手法が採られた文献が多く見られる.し かしシトクロムb_ofを構成する8つのサブユニットのうち 6つが葉緑体ゲノムにコードされるためであろうか,1980 年代から1990年代にかけて葉緑体ゲノム解読や葉緑体遺 伝子改変技術がモデル生物で確立されるようになると, 葉緑体遺伝子の改変可能なモデル生物を材料とした逆遺 伝学的手法で研究展開される.

緑藻クラミドモナス (Chlamydomonas reinhardtii) は酢酸 を炭素源として与えることで光合成機能が欠損しても生 育できる.よって,任意の変異原を作用させた後に細胞 を最少培地で生育させ酢酸要求性を検定すれば光合成変

b₆f 複合体の安定

b₆f 複合体の安定

b₆f 複合体の安定

CEF に重要

LEF と強光応答に必要

表1				
タンパク質名	サイズ (kDa)	機能	遺伝子名	遺伝子の場所
Cytf	32	電子伝達(ヘム f 結合)	petA	葉緑体
Cyt b ₆	24	電子伝達(ヘム b, ヘム c 結合)	petB	葉緑体
PETC(リスケ鉄硫黄タンパク質)	19	電子伝達([2Fe-2S] 結合)	PETC	核
PetD (SuIV)	18	PEWY モチーフ	petD	葉緑体
PetG	4	b₀f 複合体の安定	petG	葉緑体

3

4

3

15

7

b₆f複合体の構成サブユニットの一覧

PetL

PETM

PETN

PETO (SuV)

PetP

^a: C. reinhardtii. Volvox carteri などでは核遺伝子にコードされる

^b: C. reinhardtii, V. carteriなどにみられる

⁶: シアノバクテリアで見られる.本稿では触れない

異株を選抜できる.加えて核相は単相であり表現型の観 察が容易で、生育速度も比較的早く(酢酸存在下の光従属 栄養の条件では倍加時間は6-8時間だが変異株によって は10時間程度に及ぶものもある)、単細胞なので細胞の生 理状態を揃えることができることから、迅速に変異株を 単離できる. そして, 二種の接合型を掛け合わせ四分子 解析を行なう事で核遺伝子変異株を純化できる。1960年 には紫外線照射により変異を与え42の酢酸要求性変異株 (acetate mutants, 頭文字をとりac変異株系統)が報告され た (Levine, 1960). ac変異株系統は標準株 (野生株) との戻 し交雑で表現型がメンデル遺伝することを確認した核遺 伝子変異系統である. この報告の本文で表現型を詳細に 記載された変異株はac-21であり、PETCタンパク質の蓄積 が大きく損なわれb。f複合体を蓄積しない変異株である(表 1). ac変異株系統は42番より後の系統も単離されており一 部が報告されている (Levine and Smillie, 1962). 1960年当 時はac21がb。f複合体の変異株である事は示されなかった が、b。f複合体を精製し生化学的に解析することで判明す る (Lemaire et al., 1986). ac21はb₆f 欠損株として使われる こともあったが、光合成的生育が自然復帰することが知 られておりPETC遺伝子相補実験には適さないことが知ら れていた. 1999年にac21はPETC-W163Rの1アミノ酸置換 株であり、葉緑体プロテアーゼでPETCタンパク質が分解 しやすくなっていることが判明する (de Vitry et al., 1999). ac21が初めて報告された時期,光合成機能欠損株は二酸 化炭素固定をできないことに着目し,¹⁴Cで標識した炭酸 水素ナトリウムを培地に添加し¹⁴Cのシグナルをオートラ

ヂオグラフで検出することで二酸化炭素固定機能を欠損 した株を検出する手法を示した報告があり (Levine, 1960), ここでもac21が使われたが、この手法はこれ以降の文献は 見られない. その7年後に光合成機能欠損はクロロフィル 蛍光強度が高いことを利用したスクリーニング手法が示 され (Bennoun and Levine, 1967), 放射性同位元素を取り込 ませる手法より簡便かつ迅速な手法として紹介された.こ の1967年の報告ではメタンスルホン酸メチルを変異源と して処理したのち, 酢酸を添加した従属栄養条件で培養す ることで薬剤処理を生き延びた個体の形成するコロニー から発するクロロフィル蛍光を観察しスクリーニングし た. ここで光合成的生育の可否ではなくクロロフィル蛍光 強度で変異体の選抜を行ない、大文字のFから始まる変異 株が単離されている. このF系統の中では、F16 (Drager et al., 1998) やF18 (Xie et al., 1998) がb₆f複合体変異株として 利用されてきたが単離から数十年後に原因遺伝子が特定 された. 同様の選抜手法は1963年にDuysensとSweerが藻類 ではなく植物の葉を測定対象としてクロロフィル蛍光の 時間変化で光化学反応測定を報告し (Duysens and Sweers, 1963), 1973年には変異株選抜に使えるほどの簡便さと速 度で使える手法として提案されている (Miles and Daniel, 1973). このように1960-1970年代にはすでにクロロフィル 蛍光強度の時間変化に基づく光合成変異株選抜が行なわ れている. 生物物理学的解析手法開発と並行して遺伝学 的手法の発展もみることができる. 葉緑体に独自のオル ガネラゲノムが存在することが示される前にも,四分子 解析で母性遺伝する遺伝因子は認識されており、非メン

葉緑体

核

葉緑体。

核⁵

_ c

petL

petM

petN

PETO

PetP

デル遺伝の片親遺伝として研究が進められていた. 葉緑 体遺伝子変異株単離は, Floxuridine (5-Fluorodeoxyuridine) によって特異的に葉緑体遺伝子変異を誘発することが*C. reinhardtii*で報告され (Wurtz et al., 1979), 葉緑体遺伝子変 異株の単離がなされた (Shepherd et al., 1979). 変異原薬剤 名称にちなんでFUD系統として葉緑体遺伝子変異系統が 単離・確立され (Bennoun et al., 1981), クロロフィル蛍光 の誘導期現象の時間変化パターンからb₆f複合体変異株と してクラス分けされたFUD2, FUD4, FUD6, FUD8が生 化学的解析によってそれぞれCyt b₆, Cyt f, PetD, cへム 挿入不全の変異株として報告された (Lemaire et al., 1986). これら葉緑体遺伝子変異系統はb₆f複合体欠損株だけでは なく他の光合成機能欠損標準株として使用され後の技術 進歩により詳細な変異も示される.

b。f複合体サブユニットをコードする遺伝子発現に必 要な因子も順遺伝学的手法で単離された. C. reinhardtii を材料とした研究で4.3項で紹介するControl by Epistasy of Synthesis (CES) がb₆f複合体の分子集合機構として提唱さ れているが、その過程で発見された因子も多い. petA遺 伝子のmRNA安定・プロセシングと翻訳(Wostrikoff et al., 2001; Boulouis et al., 2011), petD遺伝子のmRNAの安定化 (Rymarquis et al., 2007), petG遺伝子のmRNA安定またはプ ロセシング (Wang et al., 2015) それぞれに必要なRNA結合 タンパク質が発表されている. さらに, mRNA結合タン パク質をコードする遺伝子を効率的に同定する試みも行 なわれている. RNA結合タンパク質が結合する場所は比 較的分解されづらいことを利用して、RNAseqのデータを 野生株と変異株とで比較し解析する変異株を絞り込むこ とでpetBのmRNA翻訳に関わるTCB1遺伝子が同定された (Cavaiuolo et al., 2017).

シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana)のゲノムが解読さ れ (Arabidopsis Genome, 2000),その後トランスポゾン遺 伝子 (T-DNA)を核ゲノムヘランダムに挿入した遺伝子タ ギングによる網羅的な遺伝子破壊系統が確立され2024年 現在も利用される公的に配布される体制がととのえられ た (Alonso et al., 2003). T-DNA挿入破壊株系統は各研究グ ループが独自に作出し変異株選抜に使われることもある. また,A. thalianaではethyl methanesulfonate (EMS)などの 変異原処理を行なったのちに変異株を任意の条件で選抜 し原因遺伝子を探索する順遺伝学的手法による研究も行 なわれる.光合成の変異株は高いクロロフィル蛍光が観 察されるので、high chlorophyll fluorescence (HCF) に数字 が続く変異株がしばしば記載される (Meurer et al., 1996). A. thalianaの葉緑体遺伝子でpsbB-psbT-psbH-petB-petDが共 転写されるが、このポリシストロニックmRNAのプロセ シングまたは安定化に必要な因子としてpentatricopeptide repeat をもつRNA結合タンパク質のHCF152が報告された (Meierhoff et al., 2003). この報告とは独立にpetDのmRNA 安定化に重要とされるCSP41タンパク質が報告された (Bollenbach et al., 2009). また, petLの翻訳に必要なRNA 結合タンパク質のPGR3が同定された(Higashi et al., 2021). トウモロコシ (Zea mays) において、トランスポゾンを利用 した遺伝子タギング手法でb。f複合体に関連する葉緑体遺 伝子制御因子が単離され、HCF152に類似したCRP1タン パク質 (chloroplast RNA processing 1) はZ. mays 葉緑体のポ リシストロニックmRNAのpsbB -psbH-petB-petD のpetDの RNAプロセシングに必要な因子として単離された(Barkan et al., 1994; Fisk et al., 1999). サブユニットをコードする 遺伝子の翻訳因子に加えて膜への組み込みや分子集合に 必要な因子も単離されている. Cyt b₆の組み込みを仲介す るインセルターゼとしてALB3の可能性がin vitro解析によ り示された (Kroliczewski et al., 2016). 他には, Conserved in Plant Lineage and Diatoms49 (CPLD49) DC. reinhardtiil おいて (Wittkopp et al., 2018), DE-ETIOLATIONINDUCED PROTEIN 1 (DEIP1) (Sandoval-Ibanez et al., 2022) & <u>n</u>ew tiny albino 1 (NTA1)が(Li et al., 2023) A. thalianaにおいて, それぞれ単離されている.

植物を材料とした場合, b₆f複合体のHMWサブユニッ トは電子伝達を担うため欠損すると光合成機能を失い seedling lethalとなるが栄養成長させることで光合成変異株 は単離される. A. thalianaにおいて、PETC欠損株が単離さ れ直鎖電子伝達の完全阻害が確認されている (Maiwald et al., 2003). 光合成機能が失われるとクロロフィル蛍光強度 が相対的に高くなるが、単純な強度ではなく、連続光照射 中にフラッシュランプを焚くことによる測定で、非光化学 的消光 (NPQ) を測定し、NPQに基づいたスクリーニング で光合成機能の一部が失われた変異株を単離し解析する ことで詳細な光合成電子伝達機能が明らかになっている. PSIとPSIIの量子収率は変わらないもののNPOが低下した 変異株がA. thalianaで単離され (Shikanai et al., 1999), その 後の解析でPETCタンパク質の1アミノ酸置換変異(PETC-P194L) でありphotosynthetic control機能が損なわれたpgrl (proton gradient regulation 1)が示され (Munekage et al., 2001; Jahns et al., 2002; Okegawa et al., 2005), C. reinhardtiiにお いては逆遺伝学的手法で作出され解析された (Ozawa et al., 2023).

4.2 葉緑体遺伝子改変手法の確立

現代では葉緑体遺伝子改変は粒子銃による相同組み換 えによる遺伝子導入手法がクラミドモナスとタバコで確 立され日常的に行なわれる. 黎明期から現在まで俯瞰す ると,当初はタバコにおいてアグロバテリウム感染で導 入を行なう試みや,粒子銃による導入,などさまざまな 手法が試されそれぞれで変異株を得ていた.その後薬剤 耐性付加を与える遺伝子カセットを粒子銃で導入し薬剤 耐性で変異株を選抜するという手法が確立し研究が進展 するようになる.

粒子銃による遺伝子導入は緑藻クラミドモナスのac*u-c-2-29* (*atpB*遺伝子 2 塩基置換によるATP合成酵素βサブ ユニット欠損株)にatpB遺伝子断片を導入し光合成的生育 を相補する手法として報告された (Boynton et al., 1988). その後、スペクチノマイシン・ストレプトマイシン耐性 を付与する大腸菌のAminoglycoside-3"-adenyltransferase を コードするaadA遺伝子を35Sプロモーターで発現するバ イナリベクターをタバコ (Nicotiana tabacum) にアグロバテ リウム感染で導入し薬剤耐性を付与させる系が示された (Svab et al., 1990). 同年に同じグループから, N. tabacum SPC2系統において、スペクチノマイシンとストレプトマ イシン耐性を与える葉緑体遺伝子変異配列を粒子銃で導 入することで薬剤耐性を付加したことが報告された (Svab et al., 1990). 翌年にC. reinhardtiiにおいて, C. reinhardtiiの atpA遺伝子 (葉緑体ATP合成酵素αサブユニットをコード) のプロモーターと5'-UTRとルビスコLサブユニットの3'-UTRとでaadA遺伝子発現を制御するaadAカセットが報告 された (Goldschmidt-Clermont, 1991). その後N. tabacumに おいても葉緑体リボソームRNAオペロンを改変したプロ モーターとpsbA遺伝子の3'-UTRで制御するaadAカセット が報告された (Svab and Maliga, 1993). C. reinhardtiiでaadA カセットの両末端に相同配列を組み込んだリサイクラブ *ルaadA*カセットも開発された(Fischer et al., 1996). このリ サイクラブルaadAカセットは薬剤選択圧をなくすとaadA カセットが脱落するので. aadAカセット導入による薬剤 耐性で変異株を選抜後同じ薬剤耐性でさらに別の変異を 追加導入することができる. 選抜に利用できる薬剤の種 類は限られているので葉緑体の別の場所に追加で複数の 変異を導入するときにリサイクラブルaadAカセットは汎 用される.しかしながら,現在のC. reinhardtiiにおける遺 伝子導入でも必ずしもリサイクラブルaadAカセットが使 われるとは限らない.

4.3 逆遺伝学的手法を駆使した葉緑体遺伝子解析

葉緑体ゲノム解読プロジェクトの成果が20世紀末に発 表されると、葉緑体遺伝子改変手法は相同組み換えであ る事を利用し逆遺伝学的手法がひろく取り入れられ多く の成果が発表された.葉緑体ゲノム上で機能未知読み枠 の遺伝子を破壊することで機能を同定することが行なわ れ、タンパク質の構造情報が手に入るようになると部位 特異的突然変異を導入し構造情報とリンクした機能解析 を行なえるようになった.葉緑体ゲノム情報が完全にア センブルされた報告はタバコにおいて初めて行なわれた (Shinozaki et al., 1986). 一方, *C. reinhardtii*では21世紀 に入ってようやく全体がアセンブルされた(Maul et al., 2002). ただ, *C. reinhardtii*ではそれまでも断片的な葉緑体 ゲノム情報をもとにして重要な光合成遺伝子のクローニ ングならびに遺伝子発現解析は行なわれていた.

葉緑体ゲノム情報の中には読み枠 (open reading frame, ORF) が多数アサインメントされたが,機能未知の物も あった.そこで,葉緑体遺伝子にコードされ生物種間で 保存される機能未知の読み枠hypothetical chloroplast open reading frames (*ycf*)を規定し通し番号をつけ網羅的に*ycf*遺 伝子破壊を行ない機能解析が行なわれた.

 $b_{a}f$ 複合体の変異株では、クロロフィル蛍光のパター ンに加えて、ジョリオらにより確立された、作用光照射 により誘起されるエレクトロクロミックシフト(Electro Chromic Shift, ECS)の解析技術が大きく貢献する(Joliot and Delosme, 1974; Joliot and Joliot, 1984, 1984). このECSは、 膜電位変化に伴う520 nm近傍の吸収変化を利用した手法 で、PSI-PSIIの電荷分離、 $b_{a}f$ 複合体内の電子伝達、ATP合 成酵素の活性を推定・評価する. ECS測定ではこれらの現 象を直接測定していないので結果の解釈は慎重に行なわ れる必要があるが、生化学・遺伝学的な手法とを組み合 わせることで $b_{a}f$ 複合体の機能を詳細に解析し変異株の単 離と機能解析が行なわれた.

1980-1990年代当時, photosynthetic electron transportに由 来し, petにアルファベットが続く遺伝子群の同定と命名 がb₆f複合体の構造解析を待たずに並行して行なわれたた ため, PSI・PSII・ATP合成酵素のように複合体のサブユ ニットにまとまった名前がつけられず, b₆f複合体のサブ ユニットに加えてプラストシアニン (PETE), フェレドキ シン(PETF), FNR (PETH), シトクロムc₆ (PETJ)をコー ドする遺伝子もPETから始まる. b₆f複合体のサブユニッ トのうち, HMWタンパク質グループをコードする遺伝 子 (petA, petB, PETC, petD) は確定していた. ところが, LMWタンパク質グループ (petG, petL, PETM, PETN) は

149

コファクターは結合せず電子伝達機能への影響はないう えに数kDaの小さなサブユニットが200 kDa超のb₆f複合 体の重要な構成サブユニットであるという認識は当時は 懐疑的であった. そのような状況のなかでも遺伝子破壊 とb₆f複合体の精製ならびに慎重な生物物理学的解析を通 して着実にサブユニット同定が進められた. 先行してい たb。f複合体精製で得られたサブユニットのアミノ酸配列 情報から遺伝子クローニングは着実に進行しており、C. reinhardtiiにおいてpetG遺伝子のクローニングが報告され ると (Fong and Surzycki, 1992) すみやかに遺伝子破壊とそ れにつづく機能解析が報告された(Berthold et al., 1995). C. reinhardtiiにおいてycf7遺伝子をaadAカセット挿入により 破壊し、電子伝達機能は維持されるが対数増殖期を過ぎ て定常期にまで細胞を生育するとb。f複合体の安定性が損 なわれる事を見いだしb₆f複合体の安定性に重要なサブユ ニットPetLとして同定された(Takahashi et al., 1996). PetL タンパク質を欠損すると細胞の老化に伴いb。f複合体が不 安定となる可能性を期待できる. C. reinhardtiiの研究から 10年ほど経過し, N. tabacumでpetLを破壊した株が解析さ れb。f複合体の光合成機能と安定性への影響は種を越えて 保存されることを確認するとともに、葉の老化に伴うb_of 複合体の影響が示された (Schottler et al., 2007). これは単 細胞モデル生物で得られた細胞生物学的な影響から予測 される生物個体への影響が多細胞モデル生物において表 現型として観察された好例と言える. N. tabacumにおいて, vcf6遺伝子をaadAカセット挿入により破壊しPetNサブユ ニットとして同定した(Hager et al., 1999). PETN遺伝子はC. reinhardtiiでは核遺伝子であり2024年現在でもC. reinhardtii では欠損株・変異株の報告はない. PETM遺伝子は核遺伝 子であり4.4に示すように2020年代になるまで遺伝子破壊 株作出は行なわれなかったが、C. reinhardtiiにおいて精製 したb₆f複合体の構成サブユニットのアミノ酸配列を決定 し遺伝子クローニングは行なわれた (de Vitry et al., 1996). 葉緑体遺伝子解析が進むにつれて、過去に単離されたb₆f 複合体変異株が詳細に解析され変異が特定された。FUD2 はpetBのCDSのうち36塩基が繰り返されることによるCyt b_6 サブユニットcdループの延長 (Finazzi et al., 1997) が示さ れた. FUD6はpetDの5'-UTR配列撹乱によるpetD翻訳不全 (Sturm et al., 1994) が示されpetDの翻訳形式の詳細な理解 にもつながった(Sakamoto et al., 1994). 現在でもFUD6はC. reinhardtiiにおいてb₆f複合体欠損株として用いられること がある. FUD8はb₆f複合体のヘムの組み込み因子ccsA遺伝 子破壊株(ycf5遺伝子)である事が決定された.

b。f複合体のサブユニットをコードする葉緑体遺伝子解

析が行なわれる中でC. reinhardtiiにおいて, 葉緑体遺伝子 発現を制御する機構も明らかとなった. petD遺伝子欠損株 においてpetA遺伝子の翻訳が抑制されることから、Cyt fタ ンパク質のC末端側の領域がpetA遺伝子の5'-UTRに結合し petA遺伝子発現を抑制するCESが示された(Choquet et al., 1998; Choquet and Vallon, 2000; Choquet et al., 2003). CES/t, PetDに分子集合できないCyt fタンパク質の合成を抑制する ことで機能しない複合体生合成を抑制する機構として理 解される.この成果から始まり、CES機構は分子集合でき ない葉緑体タンパク質であるCESタンパク質が自身の翻訳 を抑制する共通の機構として, C. reinhardtiiを材料として, PSI (PsaA と PsaC が CES) (Wostrikoff et al., 2004), PSII (D1とCP47がCES) (Minai et al., 2006), ATP合成酵素CF1 (AtpBとα₃β₃がCES. ただしAtpBは*atpA*の翻訳を促進する) (Drapier et al., 2007) において、ルビスコにおいて (RbcLが CES. 2007年の報告はN. tabacumを材料) (Khrebtukova and Spreitzer, 1996; Wostrikoff and Stern, 2007; Wietrzynski et al., 2021), としてそれぞれ報告される. これら一連の研究で はC. reinhardtiiを材料とした場合, Cyt fをレポーター遺伝 子として汎用された.

4.4 構造情報に基づく変異株と最近の遺伝子編集による 変異株

b₆f複合体のQサイクルはbc₁複合体と共通した機構とさ れた. bc₁複合体の構造生物学と機能解析はb₆f複合体に先 行しており、とりわけキノン結合部位や [2Fe-2S] などは 酵母やバクテリアを材料としたbc₁複合体の結果をもとに 作出された変異株を用いて研究が行なわれた文献がみら れる.

Cyt fのN末端はプロセシングされTyr末端がcへムに配位 するが、C. reinhardtiiにおいて末端のTyr残基と続くPro残 基を置換した複数の変異株が解析されProをValに置換す ると大きく機能が損なわれることが報告されている(Zhou et al., 1996). C. reinhardtiiにおいてbc₁複合体のキノンを 酸化するキノン結合サイトのQ_{o(p}サイトを形成するPEWY 配列が、b_ofに相同なSuVIにもPetD-77PEWY80が見いださ れ、PetD-78EのGluをLysまたはLeuに置換すると機能が損 なわれることから、このPEWY配列はb_of複合体において もPQを結合するためのQ_{o(p}として機能することが提案さ れた(Zito et al., 1998). b_of複合体のキノン結合部位は阻害 剤を結合させ構造解析で結合状態のキノンが同定され たが(Malone et al., 2019), それよりも前に変異株解析を通 して結合サイトが同定されていた.PETCのアミノ酸置換 株を作出し機能解析するためには、PETC欠損株にPETCを 相補させて作出する手段を執ることがある. ところがC. reinhardtiiにおける古典的なpetc変異株ac21はPETC-W163R でありPETCタンパク質蓄積が復帰することもあるため遺 伝子相補によるアミノ酸置換株作出には向かない. そこ で新たにUVで変異を誘発し選抜したC. reinhardtiiの788株 (petC-Δ1)を安定したPETC欠損株として見いだし遺伝子相 補により部位特異的突然変異株を作出した(de Vitry et al., 1999). bc₁複合体の報告から、PETCタンパク質では [2Fe-2S] をもつ親水性ドメインが電子伝達に伴い動くため、 PETCタンパク質の膜貫通部分と親水性ドメインを結ぶ6 つのGly残基(6G)が連続した部分がヒンジ部分として機能 すると期待される. petC-Δ1を親株として使いPETC遺伝子 を相補することでヒンジ部分をすべてAlaに置換した場合 (de Vitry et al., 1999)とGlyの1残基欠損ならびにGlyの5残基 挿入(de Vitry et al., 2004)では変化がなかったが, Glyを3残 基欠損させると電子伝達活性が大幅に低下した (de Vitry et al., 2004) ことから、ある程度の柔軟性があるものの、こ のヒンジは電子伝達に必要であることが示されている.

21世紀初頭にb。f複合体の全体構造がX線結晶構造解析 によって, C. reinhardtiiを材料とした成果がフランスの グループから (Stroebel et al., 2003), シアノバクテリアの Mastigocladus laminosusを材料とした成果が米国のグルー プから (Kurisu et al., 2003), それぞれ独立報告された. C. reinhardtiiでは葉緑体遺伝子組み換えによりCytfのC末端に 6×Hisを融合した形質転換体を作出し、Niアフィニティー カラムクロマトグラフィーで精製している. Cyt fのN末 端側は成熟段階で切断されN末端がcヘムのリガンドとし て機能するため、C末端にタグを融合している. Cyt fの C末端はストロマ側に露出するが、b。f複合体はストロマ 側は平坦な構造なので、結果として精製に有利なアフィ ニティータグ融合となった. その後、構造情報をもと にした変異株作出が行なわれるが、一部を紹介する.C. reinhardtiiにおいて、PetDのF40Y置換株が作出され、PetD-F40Yはbへムの再酸化速度が大きく低下したことからcim ヘム鉄の配位状態に影響を与え近傍のb_{Hm}へムにも影響し Q_{i(n)}でのキノン交換にも波及したと推測された(de Lacroix de Lavalette et al., 2009). PQプールが還元状態になると, STT7キナーゼを活性化しタンパク質リン酸化を引き起こ すがb。fが及ぼす機能ならびに構造的特徴は不明であっ た. そこでとくにステート遷移の活性が高いC. reinhardtii を材料にして, Error-Prone PCR法によりpetDに対してPCR 時の複製エラーを利用してランダム変異を導入すること で、SuVIのストロマループに相当するAsn122、Tyr124、

Arg125を候補として得て,部位特異的突然変異でPetD-N122L, Y124K, R125Eを導入することで,PetDのストロマ ループでSTT7が相互作用しキナーゼ活性がオンになると 提唱した(Dumas et al., 2017).

遺伝子編集技術でこれまで順遺伝学的手法では単離さ れていないサブユニットの変異株も作出・機能解析が 行なわれている. PetMを欠損させた例としてA. thaliana (Lan et al., 2021)とトマトのSolanum lycopersicum (Bulut et al., 2023), がある. ほかにも20世紀にウキクサのLemna perpusilla (no. 1073) においてb₆f欠損株が報告されたが (Lam and Malkin, 1985; Bruce and Malkin, 1991), 今世紀 に入っては続報はなかった. しかしゲノム情報整備と CRISPR/Cas 9などの遺伝子編集技術開発が進展しており これまでのモデル生物の成果を踏まえた研究が今後展開 されるかもしれない(Acosta et al., 2021).

5. まとめ

b_d/複合体の実態が明らかになる前から変異株が単離さ れており、葉緑体遺伝子改変技術の発展と並行した遺伝子 クローニング・葉緑体遺伝子発現様式の知見が報告され た.これら20世紀になされた「モデル生物」による成果は 生物種間で保存された普遍的なb_d/複合体の機能を理解す ることに貢献してきた.このような歴史を鑑みると、さ まざまな生物種で光合成複合体の構造が解かれ、遺伝子 編集技術を適用できる生物種が拡大している現状は、多 様な光合成生物がb_d/複合体をどのように駆使して生き抜 くのかを、その新たな「モデル生物」で理解を深める段階 にきているのではなかろうか、一方で20世紀に確立され た「モデル生物」のb_d/複合体変異株解析は構造情報に基づ きより詳細に生理的な理解が深まる方向に研究が進展し ていくのかもしれない.

参考文献

- Acosta K, Appenroth KJ, Borisjuk L, Edelman M, Heinig U, Jansen MAK, Oyama T, Pasaribu B, Schubert I, Sorrels S, Sree KS, Xu S, Michael TP, Lam E (2021) Return of the Lemnaceae: duckweed as a model plant system in the genomics and postgenomics era. Plant Cell 33: 3207-3234
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N,

Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. Science 301: 653-657

- Arabidopsis Genome I (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. Nature 408: 796-815
- Barkan A, Walker M, Nolasco M, Johnson D (1994) A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. EMBO J 13: 3170-3181
- Bennoun P, Delepelaire P, Delosme M (1981) A uniparental mutant of Chlamydomonas reinhardtii resistant to chloramphenicol. Curr Genet 3: 251-253
- Bennoun P, Levine RP (1967) Detecting Mutants That Have Impaired Photosynthesis by Their Increased Level of Fluorescence. Plant Physiology 42: 1284-1287
- Berthold DA, Schmidt CL, Malkin R (1995) The deletion of petG in Chlamydomonas reinhardtii disrupts the cytochrome bf complex. J Biol Chem 270: 29293-29298
- Bollenbach TJ, Sharwood RE, Gutierrez R, Lerbs-Mache S, Stern DB (2009) The RNA-binding proteins CSP41a and CSP41b may regulate transcription and translation of chloroplast-encoded RNAs in Arabidopsis. Plant Mol Biol 69: 541-552
- Boulouis A, Raynaud C, Bujaldon S, Aznar A, Wollman FA, Choquet Y (2011) The Nucleus-Encoded trans-Acting Factor MCA1 Plays a Critical Role in the Regulation of Cytochrome f Synthesis in Chlamydomonas Chloroplasts. Plant Cell 23: 333-349
- Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB, et al. (1988) Chloroplast transformation in Chlamydomonas with high velocity microprojectiles. Science 240: 1534-1538
- Bruce BD, Malkin R (1991) Biosynthesis of the chloroplast cytochrome b6f complex: studies in a photosynthetic mutant of Lemna. Plant Cell 3: 203-212
- Bulut M, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Alseekh S (2023)Characterization of PetM cytochrome b6f subunit 7 domaincontaining protein in tomato. Hortic Res 10: uhad224

Cavaiuolo M, Kuras R, Wollman FA, Choquet Y, Vallon O

(2017) Small RNA profiling in Chlamydomonas: insights into chloroplast RNA metabolism. Nucleic Acids Res 45: 10783-10799

- Choquet Y, Stern DB, Wostrikoff K, Kuras R, Girard-Bascou J, Wollman FA (1998) Translation of cytochrome f is autoregulated through the 5 ' untranslated region of petA mRNA in Chlamydomonas chloroplasts. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 4380-4385
- Choquet Y, Vallon O (2000) Synthesis, assembly and degradation of thylakoid membrane proteins. Biochimie 82: 615-634
- Choquet Y, Zito F, Wostrikoff K, Wollman FA (2003) Cytochrome f translation in Chlamydomonas chloroplast is autoregulated by its carboxyl-terminal domain. Plant Cell 15: 1443-1454
- de Lacroix de Lavalette A, Barucq L, Alric J, Rappaport F, Zito F (2009) Is the redox state of the ci heme of the cytochrome b6f complex dependent on the occupation and structure of the Qi site and vice versa? J Biol Chem 284: 20822-20829
- de Vitry C, Breyton C, Pierre Y, Popot JL (1996) The 4-kDa nuclear-encoded PetM polypeptide of the chloroplast cytochrome b6f complex. Nucleic acid and protein sequences, targeting signals, transmembrane topology. J Biol Chem 271: 10667-10671
- de Vitry C, Finazzi G, Baymann F, Kallas T (1999) Analysis of the nucleus-encoded and chloroplast-targeted rieske protein by classic and site-directed mutagenesis of Chlamydomonas. Plant Cell 11: 2031-2044
- de Vitry C, Ouyang Y, Finazzi G, Wollman FA, Kallas T (2004)
 The chloroplast Rieske iron-sulfur protein. At the crossroad of electron transport and signal transduction. J Biol Chem 279: 44621-44627
- Drager RG, Girard-Bascou J, Choquet Y, Kindle KL, Stern DB (1998) In vivo evidence for 5'-->3' exoribonuclease degradation of an unstable chloroplast mRNA. Plant J 13: 85-96
- Drapier D, Rimbault B, Vallon O, Wollman FA, Choquet Y (2007) Intertwined translational regulations set uneven stoichiometry of chloroplast ATP synthase subunits. EMBO J 26: 3581-3591
- Dumas L, Zito F, Blangy S, Auroy P, Johnson X, Peltier G, Alric J (2017) A stromal region of cytochrome b6f subunit IV is involved in the activation of the Stt7 kinase in Chlamydomonas. Proc Natl Acad Sci U S A 114: 12063-12068

- Duysens LN, Sweers H (1963) Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. Plant and Cell Physiology Special issue: Studies on microalgae and photosynthetic bacteria: 353-372
- Finazzi G, Buschlen S, de Vitry C, Rappaport F, Joliot P, Wollman FA (1997) Function-directed mutagenesis of the cytochrome b6f complex in Chlamydomonas reinhardtii: involvement of the cd loop of cytochrome b6 in quinol binding to the Q(o) site. Biochemistry 36: 2867-2874
- Fischer N, Stampacchia O, Redding K, Rochaix JD (1996) Selectable marker recycling in the chloroplast. Mol Gen Genet 251: 373-380
- Fisk DG, Walker MB, Barkan A (1999) Molecular cloning of the maize gene crp1 reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. EMBO J 18: 2621-2630
- Fong SE, Surzycki SJ (1992) Organization and structure of plastome psbF, psbL, petG and ORF712 genes in Chlamydomonas reinhardtii. Curr Genet 21: 527-530
- Gendrullis M, Dyczmons N, Gomolla D, Gathmann S, Bernát
 G, Schneider D, Rögner M (2008) PetP, a New Cytochrome
 b6f Subunit, and Cytochrome bd Oxidase Two Potential
 Regulatory Players of Cyanobacterial Electron Transport.
 In JF Allen, E Gantt, JH Golbeck, B Osmond, eds,
 Photosynthesis. Energy from the Sun. Springer Netherlands,
 Dordrecht, pp 585-589
- Goldschmidt-Clermont M (1991) Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site-directed transformation of chlamydomonas. Nucleic Acids Res 19: 4083-4089
- Hager M, Biehler K, Illerhaus J, Ruf S, Bock R (1999) Targeted inactivation of the smallest plastid genome-encoded open reading frame reveals a novel and essential subunit of the cytochrome b(6)f complex. EMBO J 18: 5834-5842
- Hamel P, Olive J, Pierre Y, Wollman FA, de Vitry C (2000) A new subunit of cytochrome b6f complex undergoes reversible phosphorylation upon state transition. J Biol Chem 275: 17072-17079
- Higashi H, Kato Y, Fujita T, Iwasaki S, Nakamura M, Nishimura Y, Takenaka M, Shikanai T (2021) The Pentatricopeptide Repeat Protein PGR3 Is Required for the Translation of petL and ndhG by Binding Their 5' UTRs. Plant Cell Physiol 62: 1146-1155

Jahns P, Graf M, Munekage Y, Shikanai T (2002) Single point

mutation in the Rieske iron-sulfur subunit of cytochrome b6/ f leads to an altered pH dependence of plastoquinol oxidation in Arabidopsis. FEBS Lett 519: 99-102

- Joliot P, Delosme R (1974) Flash-induced 519 nm absorption change in green algae. Biochim Biophys Acta 357: 267-284
- Joliot P, Joliot A (1984) Electron transfer between the two photosystems. I. Flash excitation under oxidizing conditions. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 765: 210-218
- Joliot P, Joliot A (1984) Electron transfer between the two photosystems. II. Equilibrium constants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 765: 219-226
- Joliot P, Joliot A (1988) The low-potential electron-transfer chain in the cytochrome bf complex. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 933: 319-333
- Khrebtukova I, Spreitzer RJ (1996) Elimination of the Chlamydomonas gene family that encodes the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 13689-13693
- Kroliczewski J, Piskozub M, Bartoszewski R, Kroliczewska B (2016) ALB3 Insertase Mediates Cytochrome b6 Cotranslational Import into the Thylakoid Membrane. Sci Rep 6: 34557
- Kurisu G, Zhang H, Smith JL, Cramer WA (2003) Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. Science 302: 1009-1014
- Lam E, Malkin R (1985) Characterization of a photosynthetic mutant of Lemna lacking the cytochrome b6-f complex. Biochim Biophys Acta 810: 106-109
- Lan Y, Chen Q, Kong M, Liu Y, Lyu MA, Perveen S, Mi H (2021) PetM Is Essential for the Stabilization and Function of the Cytochrome b6f Complex in Arabidopsis. Plant Cell Physiol 62: 1603-1614
- Lavergne J (1983) Membrane potential-dependent reduction of cytochrome b-6 in an algal mutant lacking Photosystem I centers. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 725: 25-33
- Lemaire C, Girard-Bascou J, Wollman F-A, Bennoun P (1986) Studies on the cytochrome b6/f complex. I. Characterization of the complex subunits in Chlamydomonas reinhardtii. Biochim Biophys Acta 851: 229-238
- Levine RP (1960) Genetic Control of Photosynthesis in Chlamydomonas Reinhardi. Proc Natl Acad Sci U S A 46: 972-978

- Levine RP (1960) A screening technique for photosynthetic mutants in unicellular algae. Nature 188: 339-340
- Levine RP, Smillie RM (1962) The pathway of triphosphopyridine nucleotide photoreduction in Chlamydomonas reinhardi. Proc Natl Acad Sci U S A 48: 417-421
- Li N, Wong WS, Feng L, Wang C, Wong KS, Zhang N, Yang W, Jiang Y, Jiang L, He JX (2023) The thylakoid membrane protein NTA1 is an assembly factor of the cytochrome b(6)f complex essential for chloroplast development in Arabidopsis. Plant Commun 4: 100509
- Maiwald D, Dietzmann A, Jahns P, Pesaresi P, Joliot P, Joliot A, Levin JZ, Salamini F, Leister D (2003) Knock-out of the genes coding for the Rieske protein and the ATP-synthase delta-subunit of Arabidopsis. Effects on photosynthesis, thylakoid protein composition, and nuclear chloroplast gene expression. Plant Physiol 133: 191-202
- Malone LA, Qian P, Mayneord GE, Hitchcock A, Farmer DA, Thompson RF, Swainsbury DJK, Ranson NA, Hunter CN, Johnson MP (2019) Cryo-EM structure of the spinach cytochrome b6 f complex at 3.6 A resolution. Nature 575: 535-539
- Martinez SE, Huang D, Szczepaniak A, Cramer WA, Smith JL (1994) Crystal structure of chloroplast cytochrome f reveals a novel cytochrome fold and unexpected heme ligation. Structure 2: 95-105
- Maul JE, Lilly JW, Cui L, dePamphilis CW, Miller W, Harris EH, Stern DB (2002) The Chlamydomonas reinhardtii plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. Plant Cell 14: 2659-2679
- Meierhoff K, Felder S, Nakamura T, Bechtold N, Schuster G (2003) HCF152, an Arabidopsis RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast psbB-psbT-psbH-petB-petD RNAs. Plant Cell 15: 1480-1495
- Meurer J, Meierhoff K, Westhoff P (1996) Isolation of highchlorophyll-fluorescence mutants of Arabidopsis thaliana and their characterisation by spectroscopy, immunoblotting and northern hybridisation. Planta 198: 385-396
- Miles CD, Daniel DJ (1973) A rapid screening technique for photosynthetic mutants of higher plants. Plant Science Letters 1: 237-240
- Minai L, Wostrikoff K, Wollman FA, Choquet Y (2006) Chloroplast biogenesis of photosystem II cores involves a

series of assembly-controlled steps that regulate translation. Plant Cell 18: 159-175

- Munekage Y, Takeda S, Endo T, Jahns P, Hashimoto T, Shikanai T (2001) Cytochrome b(6)f mutation specifically affects thermal dissipation of absorbed light energy in Arabidopsis. Plant J 28: 351-359
- Nelson N, Neumann J (1972) Isolation of a cytochrome b 6 -f particle from chloroplasts. J Biol Chem 247: 1817-1824
- Okegawa Y, Tsuyama M, Kobayashi Y, Shikanai T (2005) The pgr1 mutation in the Rieske subunit of the cytochrome b6f complex does not affect PGR5-dependent cyclic electron transport around photosystem I. J Biol Chem 280: 28332-28336
- Ozawa SI, Buchert F, Reuys R, Hippler M, Takahashi Y (2023) Algal PETC-Pro171-Leu suppresses electron transfer in cytochrome b6f under acidic lumenal conditions. Plant Physiol 191: 1803-1817
- Proctor MS, Malone LA, Farmer DA, Swainsbury DJK, Hawkings FR, Pastorelli F, Emrich-Mills TZ, Siebert CA, Hunter CN, Johnson MP, Hitchcock A (2022) Cryo-EM structures of the Synechocystis sp. PCC 6803 cytochrome b6f complex with and without the regulatory PetP subunit. Biochem J 479: 1487-1503
- Rexroth S, Rexroth D, Veit S, Plohnke N, Cormann KU, Nowaczyk MM, Rogner M (2014) Functional characterization of the small regulatory subunit PetP from the cytochrome b6f complex in Thermosynechococcus elongatus. Plant Cell 26: 3435-3448
- Rymarquis LA, Webster BR, Stern DB (2007) The nucleusencoded factor MCD4 participates in degradation of nonfunctional 3' UTR sequences generated by cleavage of pre-mRNA in Chlamydomonas chloroplasts. Mol Genet Genomics 277: 329-340
- Sakamoto W, Sturm NR, Kindle KL, Stern DB (1994) petD mRNA maturation in Chlamydomonas reinhardtii chloroplasts: role of 5' endonucleolytic processing. Mol Cell Biol 14: 6180-6186
- Sandoval-Ibanez O, Rolo D, Ghandour R, Hertle AP, Armarego-Marriott T, Sampathkumar A, Zoschke R, Bock R (2022) Deetiolation-induced protein 1 (DEIP1) mediates assembly of the cytochrome b6f complex in Arabidopsis. Nat Commun 13: 4045
- Schottler MA, Flugel C, Thiele W, Bock R (2007) Knock-out of the plastid-encoded PetL subunit results in reduced stability

and accelerated leaf age-dependent loss of the cytochrome b6f complex. J Biol Chem 282: 976-985

- Shepherd HS, Boynton JE, Gillham NW (1979) Mutations in nine chloroplast loci of Chlamydomonas affecting different photosynthetic functions. Proc Natl Acad Sci U S A 76: 1353-1357
- Shikanai T, Munekage Y, Shimizu K, Endo T, Hashimoto T (1999) Identification and characterization of Arabidopsis mutants with reduced quenching of chlorophyll fluorescence. Plant Cell Physiol 40: 1134-1142
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng BY, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H, Sugiura M (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. EMBO J 5: 2043-2049
- Stroebel D, Choquet Y, Popot JL, Picot D (2003) An atypical haem in the cytochrome b6f complex. Nature 426: 413-418
- Sturm NR, Kuras R, Büschlen S, Sakamoto W, Kindle KL, Stern DB, Wollman FA (1994) The petD gene is transcribed by functionally redundant promoters in Chlamydomonas reinhardtii chloroplasts. Mol Cell Biol 14: 6171-6179
- Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 8526-8530
- Svab Z, Harper EC, Jones JD, Maliga P (1990) Aminoglycoside-3"-adenyltransferase confers resistance to spectinomycin and streptomycin in Nicotiana tabacum. Plant Mol Biol 14: 197-205
- Svab Z, Maliga P (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 913-917
- Takahashi H, Schmollinger S, Lee JH, Schroda M, Rappaport F, Wollman FA, Vallon O (2016) PETO Interacts with Other Effectors of Cyclic Electron Flow in Chlamydomonas. Mol Plant 9: 558-568
- Takahashi Y, Rahire M, Breyton C, Popot JL, Joliot P, Rochaix JD (1996) The chloroplast ycf7 (petL) open reading frame of Chlamydomonas reinhardtii encodes a small functionally important subunit of the cytochrome b6f complex. EMBO J 15: 3498-3506
- Veit S, Nagadoi A, Rogner M, Rexroth S, Stoll R, Ikegami

T (2016) The cyanobacterial cytochrome b6f subunit PetP adopts an SH3 fold in solution. Biochim Biophys Acta 1857: 705-714

- Volkmer T, Schneider D, Bernát G, Kirchhoff H, Wenk SO, Rögner M (2007) Ssr2998 of Synechocystis sp. PCC 6803 is involved in regulation of cyanobacterial electron transport and associated with the cytochrome b6f complex. J Biol Chem 282: 3730-3737
- Wang F, Johnson X, Cavaiuolo M, Bohne AV, Nickelsen J, Vallon O (2015) Two Chlamydomonas OPR proteins stabilize chloroplast mRNAs encoding small subunits of photosystem II and cytochrome b6 f. Plant J 82: 861-873
- Wietrzynski W, Traverso E, Wollman FA, Wostrikoff K (2021) The state of oligomerization of Rubisco controls the rate of synthesis of the Rubisco large subunit in Chlamydomonas reinhardtii. Plant Cell 33: 1706-1727
- Willey DL, Auffret AD, Gray JC (1984) Structure and topology of cytochrome f in pea chloroplast membranes. Cell 36: 555-562
- Wittkopp TM, Saroussi S, Yang W, Johnson X, Kim RG, Heinnickel ML, Russell JJ, Phuthong W, Dent RM, Broeckling CD, Peers G, Lohr M, Wollman FA, Niyogi KK, Grossman AR (2018) GreenCut protein CPLD49 of Chlamydomonas reinhardtii associates with thylakoid membranes and is required for cytochrome b6 f complex accumulation. Plant J 94: 1023-1037
- Wostrikoff K, Choquet Y, Wollman FA, Girard-Bascou J (2001) TCA1, a single nuclear-encoded translational activator specific for petA mRNA in Chlamydomonas reinhardtii chloroplast. Genetics 159: 119-132
- Wostrikoff K, Girard-Bascou J, Wollman FA, Choquet Y (2004) Biogenesis of PSI involves a cascade of translational autoregulation in the chloroplast of Chlamydomonas. EMBO J 23: 2696-2705
- Wostrikoff K, Stern D (2007) Rubisco large-subunit translation is autoregulated in response to its assembly state in tobacco chloroplasts. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 6466-6471
- Wurtz EA, Sears BB, Rabert DK, Shepherd HS, Gillham NW, Boynton JE (1979) A specific increase in chloroplast gene mutations following growth of Chlamydomonas in 5-fluorodeoxyuridine. Mol Gen Genet 170: 235-242
- Xie Z, Culler D, Dreyfuss BW, Kuras R, Wollman FA, Girard-Bascou J, Merchant S (1998) Genetic analysis of chloroplast c-type cytochrome assembly in Chlamydomonas reinhardtii:

One chloroplast locus and at least four nuclear loci are required for heme attachment. Genetics 148: 681-692

- Zhou J, Fernandez-Velasco JG, Malkin R (1996) N-terminal mutants of chloroplast cytochrome f. Effect on redox reactions and growth in Chlamydomonas reinhardtII. J Biol Chem 271: 6225-6232
- Zito F, Finazzi G, Joliot P, Wollman FA (1998) Glu78, from the conserved PEWY sequence of subunit IV, has a key function in cytochrome b6f turnover. Biochemistry 37: 10395-10403

オルガネラ DNA 分解の多様化と植物の成長戦略

高見 常明¹⁾,坂本 亘¹⁾

2024年12月19日受付, 2025年1月7日受理

細胞内共生により生じたミトコンドリアとプラスチドは独自のDNA (オルガネラDNA)を保持してい る.これまでにモデル植物であるシロイヌナズナを用いた研究から、このオルガネラDNAはプラスチ ドとミトコンドリアに共局在するエキソヌクレアーゼDPD1により成熟花粉や老化葉といった組織特異 的に分解されることが明らかとなっている.このオルガネラDNAの分解産物が回収され、リン酸など 養分の利用効率向上に寄与する機構が提唱されている.加えて母性遺伝にも関与していることが明ら かとなっている.DPD1ホモログは種子植物に広く保存されており、イネにおいてもシロイヌナズナと 同様に花粉中のオルガネラDNA分解を担っていることが明らかとなっている.本稿ではオルガネラエ キソヌクレアーゼDPD1の機能とその生理的意義について議論する.

Diversification of organelle DNA degradation and its benefit for plant

Tsuneaki Takami¹, Wataru Sakamoto¹

Mitochondria and plastids, originating from endosymbiotic events, retain their own DNA (organelle DNA). DPD1, Mg²⁺-dependent organelle exonuclease targeted to plastids and mitochondria, is involved in the tissuespecific organelle DNA (orgDNA) degradation and has an important role for the nutrient salvage mechanism in Arabidopsis. DPD1 homologues are well conserved in flowering plants. The function of DPD1 in rice is also investigated. OsDPD1 degrades orgDNA during pollen maturation. In addition, tobacco DPD1 degrades orgDNA during pollen maturation. Furthermore, DPD1 homologues are fused to MutS, DNA repair enzyme, in moss plants. In this review, we will discuss the diversification of DPD1 exonuclease.

キーワード:オルガネラDNA, エキソヌクレアーゼ, 母性遺伝 Organelle DNA, Exonuclease, Maternal inheritance

1. 葉緑体の起源とそのDNAについて

細胞のエネルギー転換反応に関わる細胞小器官(オルガ ネラ)であるミトコンドリアは約15億年以上前に原核生物 に好気性細菌が,藻類と植物に特異的な葉緑体(プラスチ ド)は約12億年前にミトコンドリアを持つ真核生物に酸素 発生型光合成細菌が取り込まれたことにより獲得された と考えられている.1960年代にこれらのオルガネラに遺 伝物質であるDNAがあることがわかり,核の染色体DNA と区別するためにオルガネラDNA,細胞質DNAなどと呼 ばれるようになった.その後、オルガネラDNAのゲノム 配列や遺伝子発現のしくみも明らかとなり、ミトコンド

¹⁾ 岡山大学 資源植物科学研究所 光環境適応研究グループ Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, Kurashiki, Japan



図1:細胞内共生によるオルガネラの獲得とオルガネラエキソ ヌクレアーゼDPD1の出現(坂本,高見2019より改変).

リアと葉緑体がそれぞれαプロテオバクテリア(好気性細 菌)とシアノバクテリア(酸素発生型光合成細菌)の共生に 由来して進化したという,「細胞内共生説」を支持する強 力な状況証拠が得られている(図1, Dyall et al. 2004).

葉緑体ゲノムには、100個ほどの遺伝子があり転写・翻 訳され、タンパク質合成をする.しかし、葉緑体を構成 するタンパク質は3000以上あり、残りのタンパク質を作 る遺伝子は、共生進化の過程ですべて染色体DNAに移行 しており,一部を核ゲノムの遺伝子として発現させるこ とで、細胞と協調して葉緑体の機能が分化するようになっ た (Kleine et al. 2009). もう1つ葉緑体DNAの特徴的な性 質として、核と比べてかなり小さいゲノムサイズ(約150 キロ塩基対)であるのに対し、細胞当たりのゲノムコピー 数が非常に多いことが知られている (Sakamoto et al. 2008, Liere and Börner 2013). シロイヌナズナ成熟葉の葉肉細 胞では、細胞に80-120個の葉緑体が存在し、コピー数は 1000コピー以上になる (Sakamoto and Takami 2018). つま り, 葉緑体は遺伝子数が圧倒的に少ないのとは対照的に, 量が多く、全DNA量の30%以上を占めることになる。ま た,器官や組織,発生段階でプラスチドDNAを定量する と、細胞当たりのコピー数が変動している(Zoschke et al. 2007).本稿では、細胞内共生によって生じた葉緑体とそ のDNAの分解と存在意義について、これまでの知見を紹 介しながら、植物のオルガネラDNA分解と成長戦略につ いて議論する.

DPD1の発見とオルガネラDNA分解の 生理的意義

ミトコンドリアや葉緑体(もしくはプラスチド)は植物 のほぼ全ての組織に存在しているオルガネラである.オル ガネラDNAの観察は固定した組織の薄切片をDAPIなどの DNA特異的蛍光色素で染色することで行うことができる (Kuroiwa 2010).検出されたオルガネラDNAは顆粒状の形 態で観察され、核様体と呼ばれる.これまでに発生の進ん だ成熟葉や花粉ではこの方法によりオルガネラDNAがほ とんど観察されない例が報告され(Rowan 2004)、オルガ ネラDNAが何らかの理由で組織特異的に分解されること がBendichらにより提唱されていた(Oldenburg and Bendich 2015).ところが、これらの分解現象は最近の定量的PCR を使った実験系により詳細に解析されるまでは懐疑的に 解釈されていたので、葉緑体やミトコンドリアのDNAが 分解されるかどうかについては研究者の間で意見が対立 していた(Golczyk et al. 2014, Oldenburg et al. 2014).

筆者の所属する研究室では、この疑問に明確な答えを得 るため、アブラナ科のモデル植物であるシロイヌナズナ の花粉を用いた以下のフォワード遺伝学の解析を試みた. 多くの被子植物の花粉は、成熟するとオルガネラDNAが 蛍光色素で検出できなくなるので(Zhang et al. 2003)、シ ロイヌナズナを突然変異処理したM1集団の花粉をDNA特 異的蛍光色素で染色し観察することで、花粉のオルガネ ラDNAが残存している突然変異体を単離した(Matsushima et al. 2011). 突然変異の原因を調べたところ、Defective in Pollen organelle DNA Degradation1 (DPD1)と名付けたDNA 分解酵素の機能欠損が起こると、花粉の成熟過程におい てオルガネラDNAが分解されないことがわかった(図2 A, Matsushima et al. 2011).

花粉のオルガネラDNAが分解されないことからも推察 できるように、DPD1遺伝子は花粉で強く発現しており、 そのタンパク質のN末端側にはプラスチドとミトコンドリ アの両方への移行シグナル配列があり、共局在もするこ とが確認されている。DPD1のエキソヌクレアーゼとして の活性を組換えタンパク質を精製して評価すると、DNA 特異的にその3'末端を認識して連続的に分解するMg²⁺依 存性のエキソヌクレアーゼ活性を持つこともわかった (Matsushima et al. 2011, Takami et al. 2018).

DPD1の同定により、オルガネラDNAは積極的に分解 されるという現象が明確に示されたが、オルガネラDNA が分解される生理的意義については不明であった. そこ で筆者らは、まず花粉でのオルガネラDNA分解が母性遺



図2:A) 花粉の成熟過程におけるDPD1によるオルガネラDNA 分解.B) 葉の老化過程におけるDPD1による葉緑体DNA分解.

伝を保証するメカニズムであるのではないかと仮説を立 て、その検証を試みた.多くの被子植物においてオルガ ネラDNAは受精時に雌側から遺伝する(母性遺伝)する(林 ら 2006, Hagemann and Schrödoer 1989). 雄側である花粉 のオルガネラDNAを消失させるDPD1は、母性遺伝の一つ の要因として考えることが可能である.多くの被子植物 ではプラスチドは花粉成熟過程で精細胞が形成される非 対称分裂の際に除外されるので、雌側から遺伝する種が ほとんどである.またミトコンドリアは精細胞にも存在 するが最終的に雌側から遺伝する(Matsushima et al. 2008). オルガネラDNAを分解できない*dpd1*変異体では雄由来の オルガネラDNAが遺伝するのではないかと考え,*dpd1*変 異体を父親株としてF1後代のミトコンドリアDNAの遺伝 を300個体調べたが、父親由来のミトコンドリアDNAは確 認できなかった(Matsushima et al. 2011).

さらに花粉活性,花粉の発芽などにオルガネラDNA分 解が寄与するかを調べたが,野生株と比較して変異株で 有意な差は認められなかった.以上の結果を踏まえて花 粉以外でのオルガネラDNA分解の生理的意義について検 証を行った.まずDPDI遺伝子の発現パターンを公共デー タベースであるGENEVESTIGATOR (https://genevestigator. com/)を用いて精査したところ,花粉のみならず老化葉 でも強く発現していることがわかった (Tang and Sakamoto 2011).そこで葉組織におけるオルガネラDNA分解の生理 的意義の解明を目指し研究を行った.実際に、DPDI遺伝 子は葉の老化過程で誘導されるとともにオルガネラDNA. 特に葉緑体DNAの分解に関わっていることが証明された (図2B). また,野生型の老化葉では葉緑体にコードされ ている遺伝子の発現が低下するが, dpd1変異体ではこの 発現低下が遅延してステイグリーン表現型を示し、野生 型と比べ光合成活性も維持されるようになった. しかし ながら、dpd1変異体をリン欠乏条件で栽培すると、葉の 褐変,地上部重量及び種子量の低下など典型的なリン欠 乏症状を示した、さらにリン欠乏応答性遺伝子群の発現 が抑制されており、下部組織からの上部組織へのリンの 移動が制限されていた(Takami et al. 2018). つまり, DPD1 により分解される分解産物がリン栄養の供給. もしくは リン欠乏応答の活性化に関与する可能性が示された. こ れらの結果に基づき、筆者らは葉緑体DNAが遺伝情報で あるとともにリン貯蔵にもはらたくという、リザーバー モデルを提唱している (Sakamoto and Takami 2024).

3. 種子植物におけるDPD1機能の考察

シロイヌナズナDPD1配列を用いてphytozome (https:// phytozome-next.jgi.doe.gov/) などのデータベースでBLAST 検索を行うと多くの植物種でDPD1ホモログが保存されて いることがわかる.後述のようにほとんどの陸上植物にみ られるが藻類には存在しない. 2コピー以上持つ植物も多 く、シロイヌナズナが例外的に1コピーのようである、こ れらのDPD1は植物間で同じ組織特異性(花粉,老化葉)と 機能を有するのだろうか. イネの場合ではOsDPD1遺伝子 とOsDPD1 like遺伝子の2コピーが存在している (Islam et al. 2024). これら2つの遺伝子の発現パターンを実際に調べて みると、OsDPD1遺伝子はシロイヌナズナ同様に花粉や老 化葉で発現しており, OsDPD1 like遺伝子の発現はOsDPD1 遺伝子に比べ非常に低く偽遺伝子の可能性が考えられ た. 加えてイネの遺伝子発現データベースであるRiceXPro (https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/) で確認するとOsDPD1 like遺 伝子の発現はどのサンプルにおいてもOsDPD1遺伝子より も低いものであった. CRISPR-Cas9によりイネが持つ2つ のDPD1遺伝子 (OsDPD1とOsDPD1 like) が同時に破壊され たイネDPD1破壊株を作製して表現型解析したところ、シ ロイヌナズナと同様に花粉成熟過程でオルガネラDNA分 解に関与していることが明らかとなった.一方で,葉の老 化過程ではイネDPD1の欠損によるオルガネラDNA分解へ の顕著な影響は確認できなかった.加えて、リン欠乏に 対する応答性をRNA-seqにより調べたところ、シロイヌナ



図3:DPD1ホモログの系統樹. 灰色で示されているDPD1は遺伝子発現が公共データベースで 確認ができないもしくはパラログと比較して著しく発現が低いもの.

ズナ*dpd1*変異体で見られたリン欠乏応答遺伝子群の発現 低下についてはイネ*DPD1*破壊株ではみられなかった.農 業形質を調べたところイネ野生株とイネ*DPD1*破壊株の間 で大きな差はなかったが,種子量についてはイネ野生株 と比べ顕著な低下が見られた.シロイヌナズナでは花粉 の発芽にはオルガネラDNA分解の影響は観察されなかっ たが,イネでは花粉の発芽や花粉管伸長などに影響を及 ぼしていることが考えられる(Islam et al. 2024).

また木本植物のポプラ(Populus alba)を調べたところ DPD1ホモログを持っており、その遺伝子発現は春(新緑 期)から秋(落葉期)にかけて増加しており、オルガネラ DNA量の減少とも良い相関が確認されている(Takami et al. 2018).

最近になりタバコのDPD1破壊株に関する報告があり、 タバコでは2コピー存在するDPD1遺伝子(NtDPD1S及び NtDPD1T)を破壊すると、花粉においてオルガネラDNA が分解されず、加えて父性側から葉緑体DNAが遺伝する 割合が著しく上昇することが示された。タバコやシロイ ヌナズナではプラスチドDNAは母性遺伝するが、低頻度 (10⁻⁵程度)で父親のDNAが遺伝することが報告されている (Azhagiri and Maliga 2007, Ruf et al. 2007, Svab and Maliga 2007). タバコDPD1破壊株では、paternal leakageと呼ばれ るこの父性遺伝の頻度が100倍程度上昇していた。また興 味深いことに、*dpd1*変異だけでなく、花粉親の個体が低 温にさらされることでpaternal leakageの頻度がさらに高く なることも報告している.低温はDPD1の分解活性を低下 させる可能性に加え,花粉母細胞の体細胞分裂を経て精 細胞が分化する際におこるプラスチドの排除も抑制する 可能性が示されている(Chung et al. 2023).

タバコDPD1の研究から父親側のプラスチドDNAが保持 されることが遺伝様式に重要であることが示された.ま た,ミトコンドリアDNAが父性遺伝することが知られ ているキュウリもDPD1ホモログ (CsDPD1)を保持してい る. *CsDPD1*遺伝子は花粉で発現しており,シロイヌナズ ナと同様にオルガネラDNA分解を担っている (Shen et al. 2015).しかしながらキュウリの精細胞ではミトコンドリ アDNAは分解されずに維持されることからキュウリの精 細胞ではミトコンドリアDNAをCsDPD1から保護する機構 が存在していると考えられる.以上のように父性遺伝に はオルガネラDNAが維持されていることが重要であると 考えられる.

4. DPD1は陸上植物に普遍的に存在するか?

前述にあるようにDPD1ホモログは広く植物種に存在 していることがわかる.そこで改めてゲノミクス,トラ ンスクリプトームなどの公共のデータベースから得られ る情報を用いてDPD1ホモログの系統樹を作成した(図3).



図4: MutSホモログの系統樹(Sloan et al. 2024より一部抜粋・改変). N末にDPD1を持つ植物については●で示している.

図3の系統樹に使用したDPD1ホモログはphytozomeを用い て取得し、さらにTargetP 2.0 (https://services.healthtech.dtu. dk/services/TargetP-2.0/) により葉緑体もしくはミトコンド リアへの移行シグナルを持つと予測されたDPD1ホモログ を選抜した.また、これまでに報告されているDPD1ホモ ログは組織特異的に発現し機能していることから、eFP browser (https://bar.utoronto.ca/) などで遺伝子発現解析情 報が公開されている植物種のDPD1ホモログに着目して系 統樹を作成した.老化葉や花粉などで発現があるDPD1ホ モログについては黒、発現がないものは灰色で表示して いる.

DPD1ホモログは大きく分けてコケ植物,双子葉類と 単子葉類のクレードを形成していることがわかる.加え て、単子葉類では老化葉や花粉などで発現が確認できる クレードと発現がみられないクレードに分けられ、機能 していると考えられるDPD1とイネのOsDPD1-likeのよう に偽遺伝子として存在していると考えられるものに区別 された.

DPD1発見当初,著者らはコケ植物やシダ植物にはDPD1 は存在していないのではないかと考えていた.しかし, Sloanらによるコケ植物から種子植物にかかるDNA修復に 関わるMutSの系統解析から,DPD1がゼニゴケやヒメツリ ガネゴケのMutSとの融合タンパク質として存在している ことが示された(図4,Sloan et al. 2024). ヒメツリガネゴ ケやゼニゴケの遺伝子発現データベース(ヒメツリガネゴ ケ:https://peatmoss.plantcode.cup.uni-freiburg.de/expression_ viewer/input, ゼニゴケ:https://mbex.marchantia.info/)を用 いて発現パターンを調べると雄性配偶体側である胞子や 造精器で発現していることがわかる.

以上のように植物種によって生活環や生殖様式が異な る点もあり,ひとくくりにするのは難しい点もあるが, シロイヌナズナ,イネ、タバコ、キュウリ、ポプラで調 べられてきた結果からも植物においてDPD1は共通の役割 として組織特異的にオルガネラDNA分解を行なっている と考えられる.一方で、シロイヌナズナ、イネ、タバコ の研究からステイグリーン表現型やリン欠乏応答性、母 性遺伝などオルガネラDNA分解に関連した表現型には種 間差があると考えられる.

5. まとめ

DPD 1 はInterProによる分類ではThree-prime repair exonuclease 1/2 (IPR040393) に分類され、このタンパク質 ファミリーには哺乳類が持つゲノムDNA分解を介して自 己免疫疾患に関わるTREX1(Lehtinen et al., 2008)や大腸 菌のDNAポリメラーゼIII複合体の校正機能を担うDnaQサ ブユニットなどが含まれている (Scheuermann and Echols 1984). このDnaQサブユニットはDNAポリメラーゼIIIの 配列内にドメインとして存在していたが、進化の過程で グラム陰性菌が出現した時に分離してきたと考えられて いる (Huang, Y. et al. 1997). DPD1は細胞内共生によりミ トコンドリアや葉緑体を獲得し陸上植物が出現した時に はMutSとの融合タンパク質として存在しており、データ ベースを用いた解析からも生殖細胞で強く発現している ことから、おそらく母性遺伝に関わる因子として機能し てきたと考えられる. その後に種子植物へと進化した際 にはMutSの内部配列から切り離され、DPD1は新たに花粉 でのオルガネラDNA分解だけでなく葉組織でのオルガネ ラDNA分解も行うようになり、過剰に存在しているオル ガネラDNAを養分として再利用し、植物の栄養成長から 生殖成長までを支える役割を得たのではないだろうか.

謝辞

本稿で紹介した研究の一部は科研費(23H04959, 24K02044)の助成を受けて実施されたものです.

参考文献

- Azhagiri, A.K. and Maliga, P. (2007) Exceptional Paternal Inheritance of Plastids in Arabidopsis Suggests that Lowfrequency Leakage of Plastids via Pollen may be Universal in Plants. *Plant J.* 52: 817–823.
- Chung, K.P., Gonzalez-Duran, E., Ruf, S. et al. (2023) Control of Plastid Inheritance by Environmental and Genetic Factors. *Nat. Plants.* 9, 68–80.
- Dyall, S.D., Brown, M.T. and Johnson, P.J. (2004) Ancient Invasions: from Endosymbionts to Organelles. *Science*. 304: 253-257.
- Golczyk, H., Greiner, S., Wanner, G., Weihe, A., Bock, R., Börner, T. and Herrmann, R.G. (2014) Chloroplast DNA in Mature and Senescing Leaves: A Reappraisal. *Plant Cell*. 26: 847-854.
- Hagemann, R. and Schrödoer, M.-B. (1989) The Cytological Basis of the Plastid Inheritance in Angiosperms. *Protoplasma*. 152: 57–64.
- 林純一,杉山康雄,坂本亘,田中寛,正木春彦. (2006) 二層膜 オルガネラの遺伝学,蛋白質核酸酵素特集号,共立出版.
- Huang, Y., Braithwaite, D.K. and Ito, J. (1997) Evolution of DnaQ, the Gene Encoding the Editing 3' to 5' Exonuclease Subunit of DNA Polymerase III Holoenzyme in Gramnegative Bacteria. *FEBS Lett.* 400:94-8.
- Islam M.F., Yamatani, H., Takami, T., Kusaba, M., Sakamoto, W. (2024) Characterization of Organelle DNA Degradation Mediated by DPD1 Exonuclease in the Rice Genome-edited Line. *Plant Mol. Biol*.114:71.
- Kleine, T., Maier, U.G. and Leister, D. (2009) DNA Transfer from Organelles to the Nucleus: the Idiosyncratic Genetics of Endosymbiosis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 115-138.
- Kuroiwa, T. (2010) Review of Cytological Studies on Cellular and Molecular Mechanisms Of Uniparental (Maternal Or Paternal) Inheritance of Plastid and Mitochondrial Genomes Induced by Active Digestion of Organelle Nuclei (nucleoids). J. Plant Res. 123: 207–230.
- Lehtinen, D.A., Harvey, S., Mulcahy, M.J., Hollis, T., and Perrino, F. W. (2008) The TREX1 Double-stranded DNA Degradation Activity is Defective in Dominant Mutations Associated with Autoimmune Disease. J. Biol. Chem. 283: 31649–31656.
- Liere, K. and Börner, T. (2013) Development-Dependent Changes in the Amount and Structural Organization of Plastid

DNA. In: Biswal, B., Krupinska, K., Biswal, U. (eds) *Plastid* Development in Leaves during Growth and Senescence. Advances in Photosynthesis and Respiration, vol 36.

- Matsushima, R., Hamamura, Y., Higashiyama, T., Arimura,
 S., Sodmergen, Tsutsumi, N. and Sakamoto W. (2008)
 Mitochondrial dynamics in Plant Male Gametophyte
 Visualized by Fluorescent Live Imaging. *Plant Cell Physiol.* 49: 1074-1083.
- Matsushima, R., Tang, L.Y., Zhang, L., Yamada, H., Twell, D. and Sakamoto, W. (2011) A Conserved, Mg²⁺-Dependent Exonuclease Degrades Organelle DNA during Arabidopsis Pollen Development. *Plant Cell*. 23: 1608-1624.
- Oldenburg, D.J., Rowan, B.A., Kumar, R.A. and Bendich, A.J.
 (2014) On the Fate of Plastid DNA Molecules during Leaf Development: Response to the Golczyk et al. Commentary. *Plant Cell.* 26: 855-861
- Oldenburg, D.J. and Bendich, A.J. (2015) DNA Maintenance in Plastids and Mitochondria of Plants. *Front. Plant Sci.* 29: 883.
- Rowan, B.A., Oldenburg, D.J. and Bendich A.J. (2004) The Demise of Chloroplast DNA in Arabidopsis. *Curr Genet.* 46: 176-181.
- Ruf, S., Karcher, D. and Bock, R. (2007) Determining the Transgene Containment Level Provided by Chloroplast Transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 6998– 7002.
- Sakamoto, W., Miyagishima, S.Y. and Jarvis, P. (2008) Chloroplast Biogenesis: Control of Plastid Development, Protein Import, Division and Inheritance. *The Arabidopsis Book.* 6:e0110.
- Sakamoto, W. and Takami, T. (2018) Chloroplast DNA Dynamics: Copy Number, Quality Control and Degradation. *Plant Cell Physiol.* 59: 1120-1127.
- 坂本亘,高見常明. (2019) オルガネラDNAを自己分解して 栄養分にする〜細胞内共生から生じた種子植物の生存 戦略〜. *化学と生物*. 57: 478-483.
- Sakamoto, W. and Takami, T. (2024) Plastid Inheritance Revisited: Emerging Role of Organelle DNA Degradation in Angiosperms. *Plant Cell Physiol.* 65:484-492.
- Scheuermann, R.H., and Echols, H. (1984) A Separate Editing Exonuclease for DNA Replication: The Epsilon Subunit of Escherichia coli DNA Polymerase III Holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 7747–7751.
- Shen. J., Zhao. J., Bartoszewski, G., Malepszy, S., Havey, M. and Chen, J. (2015) Persistence and Protection of

Mitochondrial DNA in the Generative Cell of Cucumber is Consistent with its Paternal Transmission. *Plant Cell Physiol.* 56:2271-82.

- Sloan, D.B., Broz, A.K., Kuster, S.A., Muthye, V., Peñafiel-Ayala, A., Marron, J.R., et al. (2024) Expansion of the MutS Gene Family in Plants. *bioRxiv* [Preprint]. 2024.07.17.603841.
- Svab, Z. and Maliga, P. (2007) Exceptional Transmission of Plastids and Mitochondria from the Transplastomic Pollen Parent and its Impact on Transgene Containment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 7003–7008.
- Takami, T., Ohnishi, N., Kurita, Y., Iwamura, S., Ohnishi, M., Kusaba, M., et al. (2018) Organelle DNA Degradation Contributes to the Efficient Use of Phosphate in Seed Plants. *Nat. Plants.* 4: 1044-1055.
- Tang, L.Y. and Sakamoto W. (2011) Tissue-specific Organelle DNA Degradation Mediated by DPD1 Exonuclease. *Plant Signal Behav.* 6: 1391-3.
- Zhang, Q., Liu, Y. and Sodmergen. (2003) Examination of the Cytoplasmic DNA in Male Reproductive Cells To Determine the Potential for Cytoplasmic Inheritance in 295 Angiosperm Species. *Plant Cell Physiol.* 44: 941-951.
- Zoschke, R., Liere, K. and Börner, T. (2007) From Seedling to Mature Plant: Arabidopsis Plastidial Genome Copy Number, RNA Accumulation and Transcription are Differentially Regulated during Leaf Development. *Plant J.* 50: 710-722.

光合成生産におけるシンク・ソース関係 :生理生態学研究

寺島 一郎 1)

2024年11月28日受付, 2024年12月28日受理

光合成生産は、糖を合成する葉の活性(ソース活性)と、根や茎などの非光合成器官、貯蔵器官、展開 中の若い葉などの糖消費活性(シンク活性)のどちらか低い方に律速される。シンク・ソース関係に注目 して、個体や個葉の光合成系の構築、維持、老化などに関して著者自身、あるいは研究室の先輩や同僚 が行ってきた40年にわたる生理生態学的な研究を、基本的な事項の解説を交えながら振り返った。

Ecophysiological studies on sink-source relationships in photosynthetic production

TERASHIMA Ichiro¹

Photosynthetic production is limited by the lower of the activity of the sugar-synthesising leaves (source activity) or the sugar-consuming activity of non-photosynthetic organs such as roots and stems, storage organs and unfolding young leaves (sink activity). Ecophysiological studies on the construction, maintenance, and senescence of the leaf and whole-plant photosynthetic systems conducted by the author, his superiors or colleagues for these 40 years are reviewed, with particular attention to sink-source relationships.

キーワード: ABA, 光合成のフィードバック阻害, 全身性制御, 分配, 老化 ABA, allocation of photosynthates, feedback inhibition of photosynthesis, senescence, systemic regulation.

はじめに

光合成速度というとよく用いられる単位はµmol m⁻² s⁻¹で ある.この場合の面積は葉の面積であり,光合成速度の 定常値を表現することが多い.一方,植物の生産というと, 普通は1年あるいは1シーズンあたりの生産を表す.単位 にはkg 乾燥重量(あるいは炭素重量) m⁻² year⁻¹が用いられ る.面積は土地面積の場合が多い.純生産,あるいは純生 産に植物の呼吸を加えた総生産で表現される.本稿では, その中間の時間スケール,「日」~「週」程度の光合成生

連絡先

寺島 一郎 国立中興大学・生命科学院・分子生物学研究所 Tel: +886 958 127 704 Email: terashimaichiro@nchu.edu.tw terashimaichiro6@gmail.com 産に関する現象を取り扱う.この時間スケールで考える と,植物個体レベルの光合成生産は、葉が光合成産物を 合成する活性と、光合成産物を受け入れて消費する器官 (根や茎などの非光合成器官、貯蔵器官、光合成産物に依 存して展開中の若い葉など)の光合成産物消費(受け入れ) 活性のどちらか低い方に律速される.光合成産物に着目 すると、それを合成する活性(ソース活性, source activity) とそれを消費する活性(シンク活性, sink activity)のうち、 低い方によって律速される.自明ともいえる関係である. Neales and Incoll (1968)は、Mason and Maskell (1928a, b)

 国立中興大学・生命科学院・分子生物学研究所 台湾 40227 台中市 南区 興大路 145 号 国立中興大学 生命科学大楼 Institute of Molecular Biology, College of Life Sciences, National Chung Hsing University, Taichung City, Taiwan を「シンク・ソース概念の祖」としている. 1928aには sourceは1回, sinkは2回使われており,以下の文にその両 方が出てくる.

As there is no evidence of a mass movement through the sieve-tubes, and as the rate of movement of sugar is greatly in excess of that due to diffusion, even assuming a saturated sugar solution at source and zero concentration at sink, Dixon concluded that the sieve-tubes could not be the normal channels for the downward movement of carbohydrate.

Dixon とあるのはDixon の教科書 (1923) を指すと思われ る. これは参照はできなかったが, Dixon and Ball (1922) 論文のタイトルが同じなので単純拡散を計算して考察し たのだろう. Munchの圧流説が提出されたのが1930年なの で無理もない見解である. 1928bには, sourceが11回, sink が7回使われているが,数式で用いられる場合も含めて上 記と同じように篩部輸送の輸送元と輸送先の意味で用い てある. 「概念の祖」と持ち上げておきながらもNeales and Incoll (1968)の取扱いは頼りない(下線は筆者).

First, one must mention the "model" system theory of the plant that has been held by most whole-plant physiologists since the work of Mason and Maskell (1928a, b), <u>although</u> they did not specifically use the source/sink terminology given below. This, now commonplace, model envisages the plant as the assimilatory surface of the leaves, (the "source" of assimilates), a conducting pathway through which assimilates move (usually as sucrose), and the many places (meristems, fruits, tubers, etc.) where assimilates are either stored or utilized in growth (the "sink" of assimilates).

激変する地球環境への適応策として,世界各地で光合 成能力を高めようとするプロジェクトが展開されている. ソース能力を高めようとすると研究目標ははっきりと定 められよう.一方,もう一つの律速過程であるシンク活 性とは,いわば植物の成長や生活の全てである.したがっ てシンクに関する研究は多岐にわたる.もちろん筆者に はその全貌を概観する能力はない.本稿では,筆者自身や, 先輩や同僚が行った研究を,歴史的な状況を含めて記す ことにする.筆者は「研究者の個体発生は系統発生を繰り 返す」と信じているので,拙稿が読者の温故知新に少しで も役だてば幸甚である.

1. 分配

物質生産生態学の古典, Monsi and Saeki (1953) を著した 門司正三は「光合成産物」を基本とする植物の成長のモデ ルも構築した (Monsi 1960, 図1). このモデルのキーワード は、分配、そして構成呼吸と維持呼吸である、構成呼吸、 維持呼吸については、Tamiya (1932) のコウジカビの研究 にまでさかのぼることができる. 田宮博は魔法瓶を改造し た自作の熱量計、酸素消費速度を測定するためのマノメー ター、天秤を駆使して、コウジカビに与えた糖のうちカビ の体となったものと、呼吸として消費されたものとの割合 を定量した.植物の根や茎でも同じ事が起こる.植物体内 において、根や茎は光合成産物である糖を輸入する.こ の光合成産物(糖)を、自分の体の素材となる糖、体を生合 成するために必要なATPやNAD(P)Hの生成のために必 要な糖、体を維持するために必要なエネルギーを供給する ための糖、に三分することができる。後の2つは呼吸基質 で最終的にはCO2となる糖である.もちろん、糖にも生産 されるATPにも何の区別もないが、体を作るための構成呼 吸と体を維持するための維持呼吸とを定量的に分けて考 えることには意義がある.構成呼吸と維持呼吸について は、野口(2001)、寺島(2024)、最新の研究例としてInoue et al. (2025)などを参照されたい.



図1: Monsi (1960) に基づく光合成器官と非光合成器官の成長 モデル.

xの時点の光合成器官の量をFx,非光合成器官の量をCxとする. xからx+1までの一定期間の総光合成量、 ΔPg ,は光合成器官 の量に比例する(比例定数はa).それが光合成器官と非光合成 器官に分配され、各器官で3用途(維持呼吸、構成呼吸、植物 体構成の素材)に利用される.光合成器官において新たに形成 される葉の量を ΔF は、成長転換効率 $Y_G[Y_G = \Delta F / (\Delta F + 構成呼吸$ 量)],維持呼吸係数m,などを使って表すことができる.光合成 $器官の枯死率を<math>d_f$ とすると、 F_{x+1} も計算できる.非光合成器官に ついても同様である.添字のfとcは光合成器官と非光合成器官 を表す.Monsi(1960)の原図では、光合成速度から呼吸速度を 引いた純光合成速度が使ってあるが、木村と戸塚(1979)にした がい、総光合成速度と呼吸とに分けた(寺島 2024). Monsi (1960)の模式図は,光合成産物のうち葉で使用 するものと葉以外の器官で消費するものを分け,時間*4*t後 の光合成器官の成長と枯死,非光合成器官の成長と枯死 とを表現した差分方程式である.葉にはシンクである若 い葉も含んでいる.光合成産物を葉に分配すると葉は増 えるが,根や茎にまわす光合成産物が減る.水や土壌栄 養塩の栄養塩の吸収や支持器官の増強が成長のために必 須であることを考えれば,葉のみに分配してはならない こと,最適な分配値が存在すること,それが時間や環境 とともに変化することは自明であろう.

Furuhata and Monsi(1973)は、ダイズを湿潤条件とやや 乾燥した条件で栽培した.これらの分配率を比較すると、 乾燥条件の方が根への分配率が大きく、水を吸収しやす い体制となる.栽培途中で灌水条件を変えると分配率は 大きく変化することも見出した.この説明に、Saeki(1970, 佐伯敏郎)は地上部と地下部との器官間競争を想定した. 器官の成長の水ポテンシャル依存性が地上部と地下部で 同じだとしても、地下部の方が水資源に近く水ポテンシャ ルは高いので、水を先に利用し成長する.佐伯は、土壌 の窒素濃度が低い場合に地下部への分配が相対的に大き くなる現象も器官間競争で説明できると考えていた.資 源が余った分しか地上部には回らないので、地下部で使 う光合成産物が地上部よりも多い.結果として根への分 配率は大きくなるというのである.

Saab et al. (1990) は乾燥に応答して作られるアブシシン 酸(ABA)に注目した.トウモロコシの芽生えでは地上部 と地下部の成長のABAに対する応答が異なり、地上部の 成長の方がABAに敏感に反応し停止する. カロテノイド やABAの合成を阻害するfluridoneを作用させると、水を制 限した状態でも地上部の成長が十分に抑えられず、地上部 と地下部の成長の差が小さくなった. しかし、ABAで全 てが説明できるかというとそうではない. 湿潤な状態で 成長しているトウモロコシの根に、乾燥した状態で成長 しているトウモロコシの根と同じ濃度になるようにABA を与えると、根の成長は抑制される (Sharp et al. 1994). -方, 土壌の乾燥によって地上部の成長が抑えられた状態 のコムギを、加圧チェンバーにいれて地上部の水ポテン シャルを高めても、地上部の成長は抑制されたままであっ た (Passioura 1988). また, 湿潤条件で成長している地上 部にABAのみを与えても成長は停止しない. したがって, 乾燥した根が地上部に送るシグナルはABAのみではない だろう (Munns and Sharp 1993). 根やシュートの成長は, 水ポテンシャルだけでも、ABAだけでも説明できないの である.

このような研究によって佐伯の器官間競争説は否定さ れたように見えるかもしれない.しかし,器官間競争説 において重要なのは,環境要因による地上部と地下部の 成長の差別化である.そのシグナルとしてABAや未知の 物質が効いていると佐伯説を拡張することもできる.

1980年代には、地下部でつくられたABAが地上部の成 長や気孔開度を制御するというデータが数多く報告され た (Davies and Zhang 1991). たとえばツユクサでは, 根系 の一部が乾燥するとそこで作られたABAが蒸散流ととも に地上部に達して気孔が閉じる. きたるべき乾燥ストレ スに対して準備し、気孔を閉じて水ストレスの被害を小 さくする保守的な戦略をとっている、と解釈できる.こ の現象は、根系を二分し片側には十分の水を与え、片側 を乾燥させた実験(根分法, split-root technique)によって実 証された (Zhang et al. 1987). 根分法をトウモロコシに適 用した研究では、土壌の乾燥により気孔が閉じるとする もの (Blackman and Davies 1985) と、地上部の成長は抑制 されるが気孔は閉じないとするもの(Saab and Sharp 1989) がある. 最近, シロイヌナズナでは地下部の乾燥に応じ て作られたペプチドホルモン (CRE25) が地上部に蒸散流 にのって移動し、地上部でABAの合成を誘導することが 明らかになった(Takahashi et al. 2018).シロイヌナズナの 蒸散流には根由来のABAは含まれないのだろうか. 生理 生態学の立場からは、どちらの経路がどれだけ気孔閉鎖 や地上部の成長の抑制に寄与するのかを、明らかにして ほしい. また、Munns and Sharp (1993) が未知の物質とし たものがこのペプチドホルモンであった可能性もある. 新しい成果は、過去の研究成果に照らして位置づけられ なければならない. 組織中の植物ホルモンの濃度と化学 種の検討も必須である.たとえば、同じ濃度のABAをツ ユクサの剥離表皮, 中央脈経由, 葉片に与えた場合, 閉 鎖効果はこの順に低下する. 葉肉よる吸収がこの原因と される (Trejo et al. 1993).

適切な分配はどのように実現されるのだろうか. 篩管 の連続した経路は積み込み (loading) や荷下し (unloading) の仕組みを考えると, 糖の輸送経路として一方通行であ ると考えるのが普通である. しかし, 積荷側と荷下し側 のSUTやSWEETタンパク質のターンオーバーは極めて速 く, SUTの半減期は約2時間程度である (Kühn et al. 1997, Vaughn et al. 2002). 糖濃度差が逆転し, SUTやSWEETが 逆の場所に発現すれば, 逆方向の輸送も可能なのではな かろうか.

ともあれ、スクロース濃度や光強度に依存してSUTの発 現量は増え、篩管の数も増える。荷下し側のトランスポー

ター発現のメカニズムはこれとは逆の状況(すなわち,ア ポプラストの糖濃度の低下など)に応答するだろう.ソー スと篩管が原形質連絡によって直接繋がっているシンプ ラストタイプの篩管についても,原形質連絡の密度,原 形質連絡のゲーティング (gating), 篩管の伝導度の調節な どに同様の制御が考えられる (Ayre and Turgeon 2018). シ ンクの活性自体が水ポテンシャルやABAによって規定さ れていて、その結果が荷下し部のアポプラストの糖濃度 に反映されれば物流は確保されるだろう. したがって, どこに転流されるのかは、基本は各部分のシンク活性に 依存して決まると思われる.しかし、シンクとソースの 差を増幅するメカニズムがはたらけばよりメリハリの利 いた反応が可能となる。Okamoto et al. (2022) は、暗黒処 理あるいは地上部へのDCMU塗布によって光合成を阻害 したシロイヌナズナの根の道管液からペプチドホルモン のCLE2を見出した. CLE2は根の糖欠乏を地上部に伝え, 地上部のローディングに寄与するSUCの発現を亢進し、地 下部への転流を促進している可能性がある.

分配が重要なのは、地上部と地下部の問題ばかりでは ない. 生殖器官への分配を何時どのように行うのかは、 適応度を左右する生態学的に最も重要な問題である. 一 年生草本がいつ花や実をつければよいのかは、最適切換 問題として有名である. Cohen (1976)は、制御理論を使っ てこの問題を解いた. Yokoi (1978)は、Monsi (1960)のモ デルを基礎として同じ結論を導いた.

Monsi (1960) モデルや制御理論に基づいて、生殖器官 の最大化問題を検討することは、花成ホルモンの同定(Abe et al. 2005) などの分子遺伝学・生理学の研究とは無関係 のように見えるかもしれない. しかし、たとえばオオマ ツヨイグサなどのように、秋に発芽、越年、夏に開花結 実という生活史をもつ越年二年草が、実は、ロゼットが 一定の大きさになるまでは冬季の低温による春化処理が 効かず、長日条件となってもロゼットのままであること、 貧栄養のハビタットではロゼットのままで数年 (貧栄養の 砂丘におけるオオマツヨイグサの場合には5年程度)すご すこと、抽薹する大きさになったロゼットを部分被陰す ると抽薹が起らなくなることなどの現象は、次世代のた めの光合成産物蓄積が春化や花成の前提となっているこ とを示している (可知1986). ロゼットの被陰の効果など については筆者の研究室でも確認した(岡部二三男 修士 論文2014). シロイヌナズナにおいては、スクロースの 濃度の変動がトレハロース6-リン酸濃度の変動としてモ ニターされること、遺伝子操作によりトレハロース6-リ ン酸の濃度を低下させると開花が遅れ、上昇させると開

花が早まることが示された(Wahl et al. 2013).また,一 年生草本では、貧栄養ストレス条件にさらすと栄養成長 から繁殖への相転換が早まることが知られている.この 問題についても、貧栄養下で飢餓センサーであるリン酸 化酵素SnRK1の活性が低下し、脱リン酸化された転写因 子(FLOWERING BHLH 4)が核に移行、これによってFT の発現が誘導されることが明らかになった(Sanagi et al. 2021).このように、日長感知を基本とした花成の研究が、 徐々に物質生産の現象や最適化研究の結果と結びついて きた.花成ホルモンと知られるFTは、ジャガイモの塊茎 形成でもはたらく(Navarro et al. 2011)物質生産ホルモン なのである.

2. シンク律速状態がソース葉に及ぼす影響・ 葉の老化

シンク活性が光合成生産を律速すると、ソース葉に光 合成産物が蓄積する.葉の光合成の光合成産物による フィードバック阻害は、シンク活性との関連で研究され てきた.Thorne and Evans (1964)による、サトウダイコン (*Beta vulgaris*)とフダンソウ(根の太らない*B. vulgaris*の品 種, spinach rootと呼ばれる)を接ぎ木にした鮮やかな実験 系や、シュート頂付近の若い葉を含む部分(decapitation), 果実(de-podding)、や葉芽(de-budding)の除去、葉柄冷却 による篩部輸送の抑制(cold girdling)などの操作実験系が、 シンク・ソース関係の研究に用いられてきた.

一方、シンク・ソース関係と密接に関係する老化に関 する研究では、切り葉や葉片を用いた研究も行われてき た.パンチで打ち抜いた葉ディスクは植物ホルモンの作用 を調べるためなどの実験に現在でもよく用いられる.下 面気孔の葉ディスクをサイトカイニンなどの溶液に浮か べる際に葉の向軸側を上側にする、あるいはワセリンを 塗るなどして気孔をはたらかなくすると、ホルモンの吸 収量が減るので効果が小さくなる(Kuraishi 1976).葉ディ スクで光阻害の実験を行う場合にも、CO₂供給を確保する ことに注意が必要である.ダイコンの子葉やシロイヌナ ズナの葉を用いた研究、培養細胞系をもちいた老化実験 では、20年以上前からさまざまなプロテアーゼ系(Yoshida 2003)、ユビキチン系(Yoshida 2003)が注目され、最近で はオートファジー系(井上ら2018、中村、泉2018)や膜交 通系(Hasegawa et al. 2024)などの研究もすすんでいる.

本稿では光合成生産と関連した老化研究をいくつか紹 介する. Okada et al. (1992) はイネの切り葉の老化を解析 した. 切り葉を暗黒下におくと24時間程度のラグの後,

クロロフィル量が減少する. 弱い白色光 (5 μmol m⁻² s⁻¹で 最大の効果が得られた)を照射すると、クロロフィル量の 減少は著しく抑制される.24時間のラグにはフィトクロ ムは関与していないようで、遠赤色光のもとでもラグは 消えない. その後の光によるクロロフィル分解の抑制は フィトクロムの制御下にあり、赤色で分解が抑制される. 野外では、夕方、波長成分として遠赤色光が相対的に多 くなる (end of day effect). これを考慮して暗黒条件にする 前に遠赤色光を照射する実験も行われたが、ラグに影響 はなかった. 暗期に入って即座に分解されてしまうと次 の日の光合成に不都合なので、ラグには生態的な意味が ある.一方, Rubiscoの分解には顕著なラグが見られず,1 日目にすでに顕著な減少がみられる。白色光を照射して も分解の抑制はわずかである. Rubiscoの分解には顕著な ラグがみられないこと、白色光による分解抑制が弱いこ とから、クロロフィルとRubiscoの分解には異なるシステ ムが関与すると考察されている.

Sheenは、トウモロコシの葉肉細胞のプロトプラストに 糖を与えると、光合成系の遺伝子発現が抑えられること を報告した(Sheen 1990). この研究が糖センサーのキソキ ナーゼの同定につながる. この研究に刺激された研究と して、Krapp et al. (1991)を紹介しよう. 毎日9時間の明期 条件下で、ホウレンソウのソース葉とシンク葉の切り葉 の葉柄から50 mM グルコースを与え、老化の経過を解析 した. ソース葉にグルコースを与えた場合にのみ顕著な 老化が起こった. クロロフィルの分解にはラグが認めら れるが、その後の分解は弱い光が毎日照射されるのにも 関わらず顕著で、7日目には1/4程度となる. Rubiscoの分 解にはラグが見られず、7日目にはRubiscoはほとんど存在 しなくなった.

Okada et al. (1992) では、白色光を照射する際の光強度 を光補償点以下に設定してあるので、切り葉の糖濃度は 低下したはずである. したがって、糖飢餓の条件下の老 化を解析したことになる(糖濃度は測定していない). 一 方、Krapp et al. (1991)の研究では、グルコースを与えた葉 で糖の濃度が著しく増加しており、同じ切り葉とはいえ 状況が違う. 次に, Krapp et al. (1993), Krapp and Stitt (1995) は、ホウレンソウ個体を用いて葉柄を5℃に冷やす (cold girdling)実験を行った. 葉柄を低温にすると篩部の転流活 性は低下するが、死細胞からなる道管を介した輸送は継 続する. 葉には光合成産物が蓄積し、4~5日目から光合成 速度の低下が観察されるようになる. これは、光合成系 の遺伝子(RbcSなど)の発現レベルが低下し、光合成系の タンパク質が減少したためであった. 切り葉の場合とく らべて、タンパク質量の減少が始まる日が遅くなった.

Hikosaka et al. (1994) は、セイヨウアサガオを水平に這 わせて、すべての葉が同じ光を受ける実験システムを構築 した. 続いてHikosaka (1996) は、植物に与える窒素レベ ルを2段階とし、葉の光環境を黒色の寒冷紗で個別に制御 して老化過程を解析した. 自然光温室で、若い葉が2枚展 開するとそれらよりも早く展開した葉を35%、14%、4% の光を受けるように順次被陰した. 被陰によりクロロフィ ル量はそれほど低下しなかったが、クロロフィルあたり のRubisco量 (Rubisco/Chl)、シトクロムf/Chl、C550 (光化 学系IIの反応中心量) /Chlは顕著に低下した. また、Chl a/ b比も被陰によって低下した. 一方、P700/Chlはほとんど 変化しなかった.

Okada and Katoh (1998) はイネの幼植物を密植して、下 位葉のうける光強度が葉の齢とともに低下することに着 目した研究を行った. 光吸収能力は保持しつつも最大光 合成活性のみが低下するという陰葉化の過程を見たこと になる. クロロフィル量の低下の抑制にはフィトクロム が関与していた. Okada and Katoh (1998) では, 葉の生重 量当たりのCP47や酸素発生系の表在性タンパク質(光化学 系Ⅱの反応中心量に比例)に大きな変化は見られなかった. 葉群であれば、葉による被陰により葉が透過する遠赤色 光が相対的に多くなる. Okada and Katoh (1998)の栽培実 験では白熱電灯が用いられているので遠赤色光の効果は さらに大きかっただろう.一方, Hikosaka (1996)の被陰 には黒色の寒冷紗が用いられているので被陰によって光 の質は変化しない. イネとセイヨウアサガオと材料が異 なるが、これらの論文間の光化学系II/Chlの挙動の違いは、 光質の違いによっている可能性もある.メタ解析では、 P700/Chlは栽培光環境によって大きく変化せず、PSII/Chl は強光になるほど増加するという例が多い(Hikosaka and Terashima 1995, Schöttler and Tóth 2014). しかし、これら のメタ解析では光質は考慮されていない.

Hikosaka (1996) ではP700/Chlは被陰によってほとんど 変化しなかった. Terashima et al. (2021) も, 黒色寒冷紗を 用いてクワズイモで同様の結果を得ている. 群落状態で イネを栽培したYamazaki et al. (1999) でも, 上位葉と下位 葉との間でP700/Chlは一定であった. P700/Chlが一定のレ ベルであれば, 弱光下にある植物に突然強い光が照射さ れた場合などに, 光化学系Iの光阻害を防ぐ効果があるは ずである (Terashima et al. 2021, Kono et al. 2024, Terashima et al. 2025).

3. シンク・ソースモデル

1970年代後半から1980年代には、ホウレンソウなどから 包膜をもった無傷葉緑体が単離されるようになり、無傷 葉緑体を用いた光合成反応の研究が行われた。夜間に葉 をやや高温に保ってデンプン粒をなくすと、機械的な破 砕と遠心によって短時間に無傷葉緑体を得ることができ る. また, プロトプラストを単離して, それを低張処理 により穏やかに破裂させた後、パーコールの密度勾配遠 心で無傷葉緑体を精製することもできる. 葉緑体レベル の光合成産物は六炭糖やデンプンではなく、三炭糖リン 酸である.無傷葉緑体にはリン酸を与えなければ炭酸固 定を行わない. 無傷の葉緑体にHCO」に依存した光合成を 行わせるために必要な葉緑体の懸濁液の組成が検討され、 光合成誘導の際に与える物質(たとえばジヒドロキシアセ トンリン酸やホスホグリセリン酸が与えられる)や.リン 酸の濃度も決定された.光合成活性のリン酸の濃度依存 性は非常に鋭いピークを示す. 包膜の三炭糖リン酸/リン 酸対向輸送体の役割などが明らかにされた. また, 無傷 葉緑体を用いて、光化学系Iの循環的電子伝達経路によ るATP合成速度が測定された.ショ糖合成系の理解, 葉緑 体におけるデンプンの合成系や分解系の研究も行われた. これらの研究についてはHeber and Heldt (1981) やHeldtの 教科書(1999)を参照されたい.

澤田信一は、このような生化学の進展を視点に入れつ つ、シンク・ソース関係のために新たなモデルを開発し た. インゲンやダイズの初生葉は対生である. この初生 葉を利用したもので、最初はHumphries (1963) にならっ て、インゲンの葉柄の途中から不定根を生じさせたモデ ルを作った.根は水耕液中で成長する.水耕液を純水に 変えると、根の成長は止まり、葉の光合成速度は低下した. 根にリン酸を与えると、光合成速度は上昇したが、その パターンはリン酸飢餓の期間によって異なった. 飢餓期 間が長いほどリン酸を与えてから短い時間(3時間)で光合 成速度が上昇した (Sawada et al. 1982). 澤田は、インゲン マメの葉の展開がだらだらと続くことや、葉柄が肥大す ることが気にいらなかったそうで、材料をダイズに変え、 葉柄を切り取り、葉身の付けねから根を出させるという 究極のシンク・ソースのモデルを開発した (Sawada et al. 1986). 適当な光強度 (500 µmol m⁻² s⁻¹) で日長を調節 (10 h 明期)すると、葉の重量、面積、面積あたりの光合成速度 はほとんど変化せず、根だけが伸長する. このシステム を巧妙に用い, 定常的な状態にあるモデル植物を, 連続 明期に変えてソース活性を高めると、葉には糖やデンプ ンが蓄積し,光合成速度は5日間で40%程度に低下した. これを暗黒条件に32時間おくと光合成速度は完全に回復 する.また,光合成速度の低下はデンプンではなく,ショ 糖の濃度と強い相関を示した(Sawada et al. 1986).根のみ を低温において根の成長を止めシンク活性を抑制すると, 葉には光合成産物が蓄積し光合成速度は低下した.根を 通常の温度に戻すとショ糖濃度の低下とともに光合成速 度も回復した(Sawada et al. 1987).

Sawada et al. (1989) では, 連続光照射によるソース活性 の増強実験を再び行い、独自にカラムなどを開発した液 体クロマトグラフィーを駆使して、カルビンベンソン回 路の中間体を測定した. 糖の増加した葉ではRuBPやATP/ ADP比が著しく増加していた。興味深いのは、ソース活 性増加においても、シンク活性の抑制の際も、数日間に わたる処理期間中にRubisco酵素量の増減は殆どなく、そ の活性化レベルのみが変化していたことである、この後 は、Rubiscoの生化学の研究も推進した (Sawada et al. 1990, Sawada et al. 1992). Rubiscoの活性化にはマグネシウムと 高濃度のHCO,を用いるのが一般だが、大気CO2濃度下で もリン酸が存在するとRubiscoの活性化が可能であること を示した (Anwaruzzaman et al. 1995). また,通常のCO₂濃 度下で活性化率の落ちたRubiscoをもつ葉に、CO2濃度1700 ppmの空気を与えると、Rubiscoが活性化され光合成速度 も対照と同等になることも見出した (Kasai et al. 1996). さらに、C4植物のスギモリゲイトウAmaranthus cruentus L. (Sawada et al. 1999, 2002) やサツマイモなどでも同様の システムを開発 (Sawada et al. 2003) し, C4光合成のレドッ クス制御系や、シンク能の制御なども視点にいれた研究 を展開しようとした。個体の操作によって、これらのモ デルで見られたことと同様の現象を,個体レベルで確認 することも怠らなかった(Sawada et al. 1995, Kasai 2008).

小野清美も老化における糖センサーの役割に注目した モデル研究を行った. Ono and Watanabe (1997) では, 貧 N条件下のヒマワリ成熟葉に光化学系IIの光合成電子伝達 (QAからQB)の阻害剤のDCMUを塗布した. DCMUを塗布 した葉では, Rubiscoの小サブユニットの遺伝子の発現が 継続し, Rubiscoタンパク質の量の減少が遅れた. 光合成 が阻害されているのにもかかわらずRubiscoの減少が抑え られるのは, 光合成の阻害によって葉の糖の量が減少し たためであると結論した. Ono et al. (2001) はさらに, イ ンゲンマメの初生葉の老化による光合成活性の低下に注 目し, 上位の三出複葉を寒冷紗で覆って光合成生産を阻 害した場合, 初生葉の糖の含量の上昇が抑えられ, 光合 成活性は長期間高い状態を保つことを見出した. これら
に基づいて, Ono et al. (2001) では「光合成産物の蓄積に よって葉は自身の光合成が個体全体に役立っているのか 否かを感知し, その遺伝子発現を制御している」という仮 説を提唱した. 1995年ごろから2012年ごろまでのこの分 野の事情は, 小野と永野(2013)に詳しい.

植物体内の葉の老化においては、光合成系の一部のタ ンパク質量(Rubisco,光化学系II,シトクロームf,H⁺-ATPaseなど)が低下するのが一般である。一方、澤田ダイ ズの葉身と根のモデルでは、4~5日のシンク-ソースバラ ンスの攪乱処理の際にもRubisco含量自体は減ってはいな い、葉緑体内のリン酸欠乏によるRubiscoの活性化率の低 下で光合成活性の低下がよく説明できる。晴れた日が数日 続いて糖がたまったからといってRubiscoが分解されてい たのでは野外の環境には適応できない。一方、Krapp and Stitt (1995)は、cold girdlingによって糖の濃度が増えると 光合成速度が低下することを見出した。原因は、Rubisco の活性化率の低下ではなく、酵素量の減少であると結論 した。

切り葉を暗黒下で処理する、あるいは光補償点以下の弱 光下で処理する実験では、炭素飢餓状態が現出する.一方、 光条件下で葉に糖を与えても老化が誘導される.後者は ヘキソキナーゼなどの糖センサーによる光合成系やプロ テアーゼの遺伝子発現制御によって光合成タンパク質が 減少することによるもので、切り葉でも個体レベルの操 作実験の場合でも起こると思われる.一方、澤田モデル の操作実験では、シンク・ソースバランスの崩れる期間 は数日レベルと長いにも関わらず、Rubiscoそのものの量 は減らず、データはその活性化レベルの調節によって説 明できる.この違いは、澤田らの系には若い葉がないこと、 栄養は十分に与えてあること、などに起因するのかもし れないが、原因は不明である.オミックス解析が待たれる.

4. 窒素栄養との関係

窒素栄養がソース・シンク制御や老化において重要なは たらきをしていることはいうまでもない.重要な栄養塩 だけとしてではなく,硝酸イオンそのものがシグナル物 質として重要なはたらきをしている (Delgado et al. 2024). 窒素栄養がサイトカイニンシグナリングを誘導すること もよく知られている (Sakakibara 2021).地上部と地下部の 成長差別化の議論と似てくるが、炭素の視点から見ると, 窒素欠乏によるシンク器官の成長抑制の結果、ソースに 光合成産物が蓄積し、それがソース活性を抑制する、と いうしくみがはたらくと思われる.光合成産物を中心に



図2:非構造性糖の濃度と光合成の抑制に関する窒素栄養の影響.

A,窒素栄養による制御が強く働くはたらく場合.

B, 窒素栄養による制御が弱い場合.シンク活性の低下によっ

てソース器官の非構造性糖の濃度が増える場合.

図は, Araya et al. (2010)を改変したもの.

考えるか,窒素を中心とするのかというアプローチの違いによって見出された,それぞれの環境応答経路がどちらも機能していると思われる.相互作用の実態は,ぜひ明らかにされなければならない.

相互作用の指標として、Ono et al. (1996) は「個体窒素欠 乏」を提案した. ヒマワリを窒素栄養2段階, 光強度2段階 で栽培し,本葉の第一葉に注目すると,葉が展開しよう とする際の乾燥重量あたりの窒素含量には栽培環境によ る違いがなかった. この時の窒素含量をNmax,時刻tの 窒素含量N(t),植物体の重量をP(t)として,個体窒素欠乏, N*,を

 $N^* = P(t) [Nmax - N(t)]$

で表した.第一葉の葉面積あたりの窒素含量の減少は, 栽培光や窒素含量によらず植物体全体のN欠乏であるN* の増加にかなりよくしたがう.ただし,N(t)自体が指標 に含まれているという欠点がある.Araya et al. (2010)は, C/N比を考慮した概念的なモデルを提示した(図2).この ようなモデルは、ソース活性の制御に窒素シグナルが効 くのか、窒素欠乏がシンク活性を抑制し、それが間接的 に作用するのかを定量的に解析するうえで有効であろう.

5. 全体と一部の問題

植物体全体を被陰すると、老化の速度は遅くなる (Hidema et al. 1991)が、植物体全体が強い光にある中で特 定の葉一枚だけを被陰した場合には、その葉のみが老化 する (Weaver and Amasino 2001). このような部分と全体 との被陰効果の違いは、植物個体内ではたらく制御機構



図3:一年生草本シロザのシュート頂部と成熟葉の栽培光強度 が展開中の葉の柵状組織の細胞層数に及ぼす影響. 展開中の葉は弱光下にあっても成熟葉が強光下(A)にあれば 柵状組織の細胞層数は2層になる(••). 逆に展開中の葉は強光 下にあっても成熟葉が弱光下(B)にあれば、1層(•)である. Yano and Terashima (2001)のデータをまとめたもの.

を明らかにするための鍵となる. 仮説の一つに蒸散流に よるサイトカイニン供給説がある. 被陰によって蒸散が 抑えられた葉にはサイトカイニンが供給されにくいとい う仮説である. 同じ光環境下の葉でも, 葉のまわりを高 湿度に保つと, 窒素含量が高まらない (Pons and Bergotte 1996, Pons et al. 2001). しかし, 蒸散流中のサイトカイ ニン濃度が時間的・空間的に一定である保証はない. 個 葉一枚を被陰すると老化が速まる場合, この葉の糖濃度 が高まることはないと思われるが, Weaver and Amasino (2001) には糖濃度のデータはない. 今後の検討が待たれ る問題である.

CO₂についても同様な研究がなされている. Sims et al. (1998) は、ダイズの三出葉の一枚の小葉のみを個体全体 とは異なるCO₂ 濃度で処理する系を作り、全体を250 ppm で一枚の小葉のみを1000 ppm、あるいはその逆にして栽 培する実験を行った. 全体を250 ppmにした植物の中で1 枚だけ1000 ppm CO₂にさらされた小葉の糖濃度は他の小 葉の糖濃度の2倍程度であったが、面積当たりのRubisco量 などは他の小葉と同じであった. 逆の場合も1枚だけ250 ppmにすると糖の量は半減するが、光合成活性は周りの葉 と同じであった. この例では、葉の光合成能力は糖のレ ベルでは説明できない. 他の小葉や, 他の葉との相互作 用が示唆される.

葉が展開しソース葉になるまでには自身の受ける光環 境は変化する.ソース葉になった際に、個体にとって適

切な光合成活性となるのはどのようなメカニズムによる のだろうか. Yano and Terashima (2001) では、図3のよう な装置を使って、一年生草本シロザの展開中の葉と個体 のそれ以外の葉との光環境を制御した.シロザの陽葉の 柵状組織の細胞層は2層,陰葉の柵状組織の細胞層は1層 である(陽葉と陰葉の発生については、Yano and Terashima 2004を参照されたい). この図のAの処理, すなわち, 自 身は弱光環境にあっても周りのまわりの成熟葉が強光を 受ける場合は、細胞層数が2層に、自身が強光環境にあっ ても成熟葉が弱光下にあるBの処理の場合には、細胞層数 は1層のままであった. この研究は、Nakajima-Munekage et al. (2015) および Hoshino et al. (2019) がシロイヌナズナの 変異体なども使って発展させた. Nakajima-Munekage et al. (2015) は、成熟葉からの細胞層分裂シグナルがレドック スシグナルである可能性を議論したが、同定までには至っ ていない. Hoshino et al. (2019) は最終的な柵状組織細胞の 伸長にはショ糖が関与しているとしている.

Lake et al. (2001) は、シロイヌナズナの下位成熟葉に与 えた空気のCO2濃度によって、若い葉の気孔密度(面積あ たりの気孔の数)と気孔指数(表皮細胞中の孔辺細胞の割 合)が異なり、成熟葉を高CO₂にさらすと気孔密度と気孔 指数の両方が低下することを見出した. この成熟葉シグ ナルも同定されていない. CO2濃度によって気孔密度や気 孔指数が変化することはよく知られていたが、これにも システミックな制御が効いていたのである. Miyazawa et al. (2006) は、この現象を追求し、ポプラを用いて下位葉 から若い葉へののシグナルを絞りこもうとした. 上位の 若い葉の環境は一定とし、下位葉の周りのCO2濃度、湿度、 光強度を変化させた.上位葉の気孔密度などと最も密接 な正の相関を示したのは, 光合成速度や蒸散速度ではな く、下位葉の実際の気孔コンダクタンスだった.しかし、 そのメカニズムについての議論は、これまでに紹介した いくつかの仮説の否定にとどまっている.

Araya et al. (2008) も同様なシステムを構築し、光合成 系構築のシステミック制御の研究を推進しようとした. このシステムでは、インゲンの本葉第一葉(三出複葉)以 外を同じ環境に置き、対生初生葉の環境を変化させた(図 4参照).結果をまとめると表のようになる.このシステ ムでは処理中の下位葉の光合成速度をかなり正確に測定 できたので、処理中の初生葉の光合成速度と、箱から取 り出して精密に測定した初生葉および三出複葉の光合成 能力,Rubisco/Chlが比較してある.Sims et al. (1998) とは 異なり、初生葉を低CO₂におくと光合成能力は高まり、高 CO₂に置くと光合成能力は低下する.三出複葉の光合成能



図4:インゲンの初生葉のみを全体と異なる制御環境下におくシステムとデータ. 左,写真.初生葉用のチェンバー底部には水が循環し,温度を一定に保つことができる. 右,データをまとめた表.システム自体に赤外線ガス分析器が組み込まれているので,処理中の初生葉の光 合成速度をモニターすることができる. +,++,+++;チェンバー内における単位面積あたりの光合成速度(in situ),およびチェンバーから取り出して測 定した最大光合成速度(potential). sun, neutral, shade; Rubisco/Chl量を陽葉緑体・陰葉緑体の指標とした. Araya et al. (2008)による.

力は、初生葉の箱のなかの光合成速度と逆の関係を示した。また、高CO₂濃度下の初出葉の光合成の速度が高いと、 三出複葉の光合成能力は下がる。低CO₂濃度下で初生葉 の光合成速度が低いと、三出複葉の光合成能力は上がる。 また、初生葉の光合成能力決定にはレドックス制御がは たらき、低CO₂処理にするとRubisco/Chlが増え、高CO₂処 理および弱光処理を施すとRubisco/Chlが低下した。興味 深いことに、これらがすべて同じ環境にあった三出複葉 のRubisco/Chlにも反映されていた。

これらの結果は以下のようにまとめられよう.初生葉 の光合成速度はCO₂濃度が高い方が高かった.しかし,箱 から取り出して測定した光合成能力は逆で,低CO₂処理葉 の方が,光合成速度が高くRubisco/Chlも多かった.上位 葉は初生葉の光合成速度が低ければ高く,高ければ低い という関係を示した.Rubisco/Chlの序列は,初生葉と三 出複葉とで同じであった.前者には下位葉の光合成産物 生産が効きうるし,後者にはレドックス制御が効きうる. 同じ強さの光をうける場合,低CO₂濃度の方が電子伝達系 は還元的になる(Huner et al. 1998).この研究には注力し たかったが,異動や予算獲得の失敗が重なり,このシス テムを用いた研究は1編だけしか発表できなかった.

シンク - ソース研究の古典に, Thone et al. (1964)の サトウダイコンを用いた実験があることは既に述べた. sugar-beetの方が, spinach-beet (フダンソウ)に比して貯蔵 根と純同化率 (NAR)がともに大きい点に着目し, どちら が原因でどちらが結果かを決めるために, 両beetsの 4つの 可能な組み合わせの接ぎ木を作って成長解析を行ったも のである.純同化率とは個体全体の乾燥重量がW,葉面 積がLAのとき, $\frac{1}{LA} \cdot \frac{dW}{dt}$ で定義する.葉だけではなく,個体 全体の呼吸も考慮した「純生産の指標」といえる.データ は,sugar-beetの根の大きなsinkがNARを高めたことを示 している.ThorneはHumphriesとRothamstead研究所の同僚 で、シンク・ソース関係を調べるために、Sawadaのモデ ルのもととなったインゲンの葉柄から根を直接生やす実 験も行い (Humphries and Thorne 1964),根の形成ととも にNARが増加することを見いだした.

6. 地球環境変化の適応策としてのCO2応答

地球環境が激変中であり、大気のCO₂濃度が上昇してい る. 植物のCO₂応答はソース・シンクの関係から議論さ れなければならない.例えば、稲作がどうなるのか、と いう問題については、イネFACE(自由空気CO₂負荷実験) で大規模な実験が行われた.FACEとは、一定の面積内の CO₂濃度をたとえば、外気平均の+200 ppmに保つことが できる野外栽培システムである.精密な風向風速計にし たがって、一定面積を囲んだバルブのうち風上のものか らCO₂が噴き出す仕組みになっている.その成果はわかり やすい総説にまとめられている(長谷川ら2013, Hasegawa et al. 2013).白米として食用するためのイネの品種は、小 ぶりの籾にびっしりとデンプンが詰め込まれるように育 種されてきており、それが実現するように栽培される. いったん面積当たりの穀粒の数が決まってしまうと、ケ イ酸の殻が堅く実は太ることができない.したがって、 高いCO₂濃度となって潜在的にはソース活性が高まる場合 でも、あらかじめ決まった土地面積当たりの穀粒の総体 積を越える生産は不可能である.一方、米粉や家畜のえ さ用の品種の穀粒は粒ぞろいである必要はない.シンク を大きく設定すれば、ソース活性が高い場合には光合成 産物を無駄なく貯蔵できる.

Usuda (2004a, b, 2006) は、葉ダイコンと胚軸の大きな ハツカダイコンの、大気CO2濃度に対する成長や光合成を 比較し、ハツカダイコンで高CO2濃度条件でも光合成に フィードバック阻害が起こりにくいのは、シンク能力が 大きいためであると議論した. Sugiura et al. (2015, 2017) は、Thorne et al. (1964) のサトウダイコンの研究になら い、ハツカダイコンで接ぎ木を行い臼田らの研究のさら なる展開をめざした.しかし、高CO2条件ではデンプンや 糖などの非構造性糖類のみならず、構造性の糖(細胞壁な ど)もかなり増加することが分かり、単純なシンク・ソー ス関係の操作実験とはならなかった. また, 胚軸のふく らみは植物体内の糖濃度が一定濃度に達することで始ま るのではないかと期待していたが、胚軸の大きな品種は 最初から胚軸が肥大した. 高CO2濃度で栽培した場合も同 様であった (Sugiura et al. 2017). 糖による光合成の抑制と いう結果がそれほど明確に得られなかったので、当初は 残念にも思ったが、非構造性の糖に感受性の高い植物ば かりでないことは、むしろ高CO2時代あって、糖に光合成 が抑制されにくい植物の改変の指針ともなる. Sugiura et al. (2019) では、古典的なde-buddingなどをインゲン、ダ イズ,アズキに施した.非構造性糖の蓄積によって,顕 著に光合成が抑制されRubiscoが減少したのはインゲンだ けだった.しかし、他の植物でも構造性糖は顕著に増加 した. ダイズとインゲンについて、これらの処理を施し た際の葉肉細胞の細胞壁の厚さは、対照の100 nmに比べ て常緑広葉樹なみの400 nmに達し、葉肉コンダクタンス (細胞間隙から葉緑体までのCO2拡散コンダクタンスを葉 面積あたりで表したもの)は著しく低下した (Sugiura et al. 2020).シロイヌナズナの糖代謝の変異体の高CO2応答を 調べたMizokami et al. (2019) でも同様で, 光合成速度にお よぼす影響は細胞壁の肥厚による葉肉コンダクタンスの 低下が最も顕著であった.

7. あとがき

筆者自身,あるいは先輩や同僚が行った,炭素に注目 したシンク・ソースの研究を40年ほどたどった.筆者は 生理生態学者である.植物の機能の一端をシロイヌナズ ナなどのモデル植物で明らかにしたと称する、「矢印のま とめ図」を載せた論文を読む時、それぞれの矢印が野外の 植物の実際の生活をどの程度説明するのか?という疑問 が頭をめぐる.矢印の太さ、矢印同士の相互作用,種間差、 などが気になる.いろいろな植物を対象にして解明され た事柄を寄せ集めて選択し、矢印を繋いで理解したよう なつもりになってはいけないと思ってはいる.生物はシ グナル伝達だけでは生きていけない、シグナル伝達は適 応的なCやNの個体内の物流や繁殖に役立ってはいるが、 適応的物流や繁殖の主役でない.その意味で、糖や硝酸 イオンのような物流の対象そのものがシグナル物質でも あるということは意味が深い.

拙稿を書き進めつつ,種間差,品種間差,実験系の違いなどの影響の大きさを今さらながら強く感じた.矢印 図を批判しつつ,気の利いた図の1枚さえも描けなかった. しかし,今後の課題は随所に書き留めたつもりである.高 CO₂に対する植物の応答を研究する上では,より徹底した フェノミクス研究が重要であろう.変異体などを用いる 研究では他の遺伝子産物による補償作用が起こる.ここ に紹介した,澤田,小野,矢野,宮澤,新谷,杉浦らの「操 作」モデルをうまく使えば,補償作用をかなり除外するこ とも可能である.シンク・ソース関係の解明には,「操作」 モデル実験へのオミックス解析の導入が必須である.

謝辞

編集委員の小野清美博士は、「低温科学」への寄稿の機 会を与えてくださった.また小野博士は高林厚史博士と ともに綿密な査読の労もとられた.厚くお礼申し上げる. この分野の研究を筆者とともに行ってくださった方々、 議論をしてくださった方々に感謝したい.特に澤田信一 教授(故人)には様々なことを教えていただいた.丸田恵 美子教授には,論文をご教示いただいた.筆者らの研究 の一部は科研費(課題番号 16207002,23370015,17H03693) によって行われた.また,彦坂幸毅教授の「二酸化炭素資 源化」CRESTにも加えていただいた.そのほかの多くの 研究は,往時かなりの額が配分されていた経常経費によっ て実施したことも記しておきたい.

参考文献

Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi,A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K. and Araki,T. (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral

pathway integrator FT at the shoot apex. Science 309: 1052-1056.

- Anwaruzzaman, Sawada, S., Usuda, H. and Yokota, A. (1995) Regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase activation by inorganic phosphate through stimulating the binding of the activator CO₂ to the activation sites. Plant Cell Physiol. 36: 425-433.
- Araya, T., Noguchi, K. and Terashima, I. (2008) Manipulation of light and CO₂ environments of the primary leaves of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) affects photosynthesis in both the primary and the first trifoliate leaves: Involvement of systemic regulation. Plant Cell Environ. 31: 50-61.
- Araya, T, Noguchi, K. and Terashima, I. (2010) Effect of nitrogen nutrition on the carbohydrate repression of photosynthesis in leaves of *Phaseolus vulgaris* L. J. Plant Res. 123: 371-379.
- Ayre, B.G. and Turgeon, R. (2018) Export of photosynthates from the leaf. *In*. Adams III, W.W. and Terashima, I. eds. The Leaf; A Platform for Performing Photosynthesis. Pp. 55-79. Springer
- Blackman, P. and Davies, W.J. (1985) Root to shoot communication in maize plants of the effects of soil drying. J. Exp. Bot. 36: 39-48.,
- Cohen, D. (1976) The optimal timing of reproduction. Amer. Nat. 110: 801-807.
- Davies, W.J. and Zhang, J. (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 55-76.
- Delgado, D., Nunez-Pascual, V., Riveras, E., Ruffel, S. and Gutiérrez, R. A. (2024) Recent advances in local and systemic nitrate signaling in *Arabidopsis thaliana*.
- Dixon, H.H. and Ball, N.G. (1922) Transport of organic substances in plants. Nature 109: 236-237.
- Furuhata I. and Monsi M. (1973) Analytical study on the ecophysiological adaptation of soybean plants to limited water supply. J. Fac. Sci. Univ. Tokyo 11: 243–62.
- 長谷川 利拡, 酒井 英光, 常田 岳志, 中村 浩史, 臼井 靖浩,
 林 健太郎(2013)つくばみらいFACE実験によるイネの高
 CO₂応答の検証.光合成科学 23:18-23.
- Hasegawa, T., Sakai, H., Tokida, T., Nakamura, H., Zhu,
 C., Usui, Y., Yoshimoto, M., Fukuoka, M., Watatsuki, H.,
 Katayanagi, N., Matsunami, T., Kaneta, Y., Sato, T., Takakai,
 F., Sameshima, R., Okada, M., Mae, T. and Makino, A. (2013)
 Rice cultivar responses to elevated CO₂ at two free-air CO₂

enrichment (FACE) sites in Japan. Funct. Plant Biol. 40: 148-159.

- Hasegawa, Y., Luo, Y. and Sato, T. (2024) Recent advances in ubiquitin signals regulating plant membrane trafficking. Plant Cell Physiol. 65 : 1907-1924.
- Heber, U. and Heldt, H.K. (1981) The chloroplast envelope: structure, function, and role in leaf metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. 32: 139-168.
- Heldt, H.K. (1999) Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag. (金井龍二 訳 2000 植物生化学 シュプリ ンガーフェアラーク東京.)
- Hidema, J., Makino, A., Mae, T. and Ohira, K. (1991)
 Photosynthetic characteristics of rice leaves aged under different irradiances from full expansion through senescence.
 Plant Physiol. 97: 1287-1293.
- Hikosaka, K. (1996) Effects of leaf age, nitrogen nutrition and photon flux density on the organization of the photosynthetic apparatus in leaves of a vine (*Ipomoea tricolor Cav.*) grown horizontally to avoid mutual shading of leaves. Planta 198: 144-150.
- Hikosaka, K. and Terashima, I. (1995) A model of the acclimation of photosynthesis in the leaves of C3 plants to sun and shade with respect to nitrogen use. Plant Cell Environ. 18: 605-618.
- Hikosaka, K., Terashima, I. and Katoh, S. (1994) Effects of leaf age, nitrogen nutrition and photon flux density on the distribution of nitrogen among leaves of a vine (*Ipomoea tricolor* Cav.) grown horizontally to avoid mutual shading of leaves. Oecologia 97: 451-457.
- Hoshino, R., Yoshida, Y. and Tsukaya, H. (2019) Multiple steps of leaf thickening during sun-leaf formation in Arabidopsis. Plant J. 100: 738-753.
- Humphries, E. C. (1963) Dependence of net assimilation rate on root growth of isolated leaves. Ann. Bot. New Series 27: 175-183.
- Humphries, E.C. and Thorne, G.N. (1964) The effects of root formation on photosynthesis of detached leaves. Ann. Bot. 28: 391-400.
- Huner, N.P.A., Öquist, G. and Sarhan, F. (1998) Energy balance and acclimation to light and cold. Trends Plant Sci. 3: 24-230.
- Inoue, T., Fujimura, T. and Noguchi, K. (2025) Growth, morphology and respiratory cost responses to salinity in the mangrove plant *Rhizophora stylosa* depend on growth temperature. Plant Cell Environ. 48: 965-977.

- 井上悠子,高塚千広,森安裕二 (2018) タバコ BY-2 細胞 を用いた植物オートファジーの解析.植物科学最前線 9: 11-16
- 可知直毅(1986)二年生草本の生活史の進化.日本生態学 会誌 36:19-27.
- Kasai, M. (2008) Regulation of leaf photosynthetic rate correlating with leaf carbohydrate status and activation state of Rubisco under a variety of photosynthetic source/sink. Physiol. Plant 134: 216-226.
- Kasai, M., Yamaguchi, A. and Sawada, S. (1996) The effects of CO₂ on the photosynthetic fixation of CO₂ and the activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in single-rooted soybean leaves under sink-limited conditions. Plant Cell Physiol. 37: 1193-1196.
- 木村允, 戸塚績 (1979) 植物の生産過程. 共立出版.
- Kono, M., Oguchi, R. and Terashima, I. (2024) Photoinhibition of PSI and PSII in nature and in the Laboratory: Ecological approaches. Prog. Bot. 84: 241-292 (published online in 2022).
- Krapp, A., Hofmann, B., Schafer, C. and Stitt, M. (1993) Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: A mechanism for the 'sink regulation' of photosynthesis? Plant J. 3: 817-828.
- Krapp, A., Quick. W. P. and Stitt M. (1991) Ribulose-1,5bisphosphate carboxylase-oxygenase, other Calvin-cycle enzymes, and chlorophyll decrease when glucose is supplied to mature spinach leaves via the transpiration stream. Planta 186: 58-69.
- Krapp, A. and Stitt, M. (1995) An evaluation of direct and indirect mechanisms for the "sink-regulation" of photosynthesis in spinach: Changes in gas exchange, carbohydrates, metabolites, enzyme activities and steady-state transcript levels after cold-girdling source leaves. Planta 195: 313-323.
- Kühn, C., Franceschi, V.R., Schulz, A., Lemoine, R. and Frommer, W.B. (1997) Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. Science 275: 1298-1300.
- Kuraishi, S. (1976) Ineffectiveness of cytokinin-induced chlorophyll retention in hypostomatous leaf discs. Plant Cell Physiol. 17: 875-885.
- Lake, J.A., Quick, P., Beerling D.J. and Woodward F.I. (2001) Signals from mature to new leaves. Nature 411: 154.

Mason, T. G. and Maskell, E.J. (1928a) Studies on the transport

of carbohydrates in the cotton plant. I. A study of diurnal variation in the carbohydrates of leaf, bark, and wood, and of the effects of ringing. 42: 189-253.

- Mason, T. G. and Maskell, E.J. (1928b) Studies on the transport of carbohydrates in the cotton plant. II. The factors determining the rate and the direction of movement of sugars Ann Bot. 42: 571-636
- Monsi, M. (1960) Dry-matter reproduction in plants 1. Schemata of dry-matter reproduction. Bot. Mag. Tokyo 73: 81-90.
- Monsi, M. und Saeki, T. (1953) Über den Lichtfaktor in den Pflanzengesellschaften und seine Bedeutung für die Stoffproduktion. Japan. J. Bot. 14: 22–52. English translation by Schortemeyer, M. (2005) On the factor light in plant communities and its importance for matter production. Ann. Bot. 95: 549-567.
- Miyazawa, S.-I., Livingston, N.J. and Turpin, D.H. (2006)
 Stomatal development in new leaves is related to the stomatal conductance of mature leaves in poplar (*Populus trichocarpa x P. deltoides*). J. Exp. Bot. 57: 373-380.
- Mizokami, Y., Sugiura, D., Watanabe, C.K.A., Betsuyaku, E., Inada, N. and Terashima, I. (2019) Elevated CO₂-induced changes in mesophyll conductance and anatomical traits in wild type and carbohydrate-metabolism mutants of Arabidopsis. J. Exp. Bot. 70: 4807-4818.
- Nakajima-Munekage, Y., Inoue, S., Yoneda, Y. and Yokota, A. (2015) Distinct palisade tissue development processes promoted by leaf autonomous signalling and long-distance signalling in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Environ. 38: 1116-1126.
- 野口航(2001)環境応答のコスト. 寺島一郎 編 環境応 答 pp. 195-206. 朝倉書店
- Munns, R. and Sharp, R.E. (1993) Involvement of abscisic acid in controlling plant growth in soils of low water potential. Aust. J. Plant Physiol. 20: 425-437.
- 中村咲耶,泉正範(2018)壊れた葉緑体はオートファジーで 丸ごと除去される. 植物科学最前線 9:36-45
- Navarro, C., Abelenda, J.A., Cruz-Oró, E., Cuéllar, C., Tamaki, S., Silva, J., Shimamoto, K. (2011) Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. Nature 478: 119-122.
- Neales, T.F. and Incoll, L.D. (1968) The control of leaf photosynthesis rate by the level of assimilate concentration in the leaf: A review of the hypothesis. Bot. Rev. 3: 107-125.
- Okada, K., Inoue, Y., Satoh, K., and Katoh, S. (1992) Effects

of light on degradation of chlorophyll and proteins during senescence of detached rice leaves. Plant Cell Physiol. 33: 1183-1191.

- Okada, K. and Katoh, S. (1998) Two long-term effects of light that control the stability of proteins related to photosynthesis during senescence of rice leaves. Plant Cell Physiol. 39: 394-404.
- Okamoto, S., Kawasaki, A., Makino, Y., Ishida T., and Sawa, S. (2022) Long-distance translocation of CLAVATA3/ESRrelated 2 peptide and its positive effect on roots sucrose status. Plant Physiol. 189: 2357-2367.
- 小野清美, 永野聡一郎 (2013) 葉の老化に影響を与える 環境要因と葉の老化の制御機構 日本生態学会誌 63: 49-57.
- Ono, K., Nishi, Y., Watanabe, A. and Terashima, I. (2001)Possible mechanisms of adaptive leaf senescence. Plant Biol. 3: 234-243.
- Ono, K. and Watanabe, A. (1997) Levels of endogenous sugars, transcripts of rbcS and rbcL, and RuBisCO protein in senescing sunflower leaves. Plant Cell Physiol. 38: 1032-1038.
- Ono, K., Terashima, I. and Watanabe, A. (1996) Interaction between nitrogen deficit of a plant and nitrogen content in the old leaves. Plant Cell Physiol. 37: 1083-1089.
- Passioura, J.B. (1988) Root signals control leaf expansion in wheat seedlings growing in drying soil. Australian Journal of Plant Physiology 15: 687-693.
- Pons, T.L. and Bergotte, M. (1996) Nitrogen allocation in response to partial shading of a plant: Possible mechanisms. Physiol. Plant. 98: 571-577.
- Pons, T.L., Jordi, W. and Kuiper, D. (2001) Acclimation of plants to light gradients in leaf canopies: evidence for a possible role for cytokinins transported in the transpiration stream. J. Exp. Bot. 52: 1563-1574.
- Saab, I.N. and Sharp, R.E. (1989) Non-hydraulic signals from maize roots in drying soil: inhibition of leaf elongation but not stomatal conductance. Planta 179: 466-474.
- Saab, I.N., Sharp, R.E., Pritchard, J. and Voetberg, G.S. (1990) Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. Plant Physiol. 93: 1329-1336.
- Saeki, T. (1970) Growth of plant organs under water stress. *In* Photosynthesis and utilization of solar energy (Edited by M. Monsi), JIBP/PP. pp. 85-87.
- Sakakibara, H. (2021) Cytokinin biosynthesis and transport for

systemic nitrogen signaling. Plant J. 105: 421-430.

- Sanagi, M., Aoyama, S., Kubo, A., Lu, Y., Sato, Y., Ito, S., Abe, M., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., Kiba, T., Nakagami, H., Rolland, F., Yamaguchi, J., Imaizumi, T. and Sato T. (2021) Low nitrogen conditions accelerate flowering by modulating the phosphorylation state of FLOWERING BHLH 4 in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 118:
- Sawada, S., Arakawa, O., Muraki, I., Echigo, H. Miyashita, M., Iwafune, M., Kasai, M. and Usuda H. (1999) Photosynthesis with single-rooted *Amaranthus* leaves. I. Changes in the activities of RuBP-1,5-bisphosphate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase and the amounts of intermediates in photosynthetic metabolism in response to changes in the source-sink balance. Plant Cell Physiol. 40: 1143-1151.
- Sawada, S., Enomoto, S., Tozu, T., Kasai, M. (1995) Regulation of the activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in response to changes in the photosynthetic source-sink balance in intact soybean plants. Plant Cell Physiol. 36: 551-556.
- Sawada, S., Hasegawa, Y., Kasai, M. and Sasaki, M. (1989) Photosynthetic electron transport and carbon metabolism during altered source/sink balance in single-rooted soybean leaves. Plant Cell Physiol. 30: 691-698.
- Sawada, S., Hayakawa, T., Fukushi, K. and Kasai, M. (1986) Influence of carbohydrates on photosynthesis in single, rooted soybean leaves used as a source-sink model. Plant Cell Physiol. 27: 591-600.
- Sawada, S., Igarashi, T. and Miyachi, S. (1982) Effects of nutritional levels of phosphate on photosynthesis and growth studied with single, rooted leaf of dwarf bean. Plant Cell Physiol. 23: 27-33.
- Sawada, S., Kawamura, H., Hayakawa T. and Kasai, M. (1987) Regulation of photosynthetic metabolism by low-temperature treatment of roots of single-rooted soybean plants. Plant Cell Physiol. 28: 235-241.
- Sawada, S., Sakamoto, T., Sato, M., Kasai, M. and Usuda, H. (2002) Photosynthesis with single-rooted *Amaranthus* leaves.
 II. Regulation of ribuelose-1,5-bisphosphate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxy-lase, NAD-malic enzyme and NAD-malate dehydrogenase and coordination between PCR and C4 photosynthetic metabolism in response to changes in the source-sink balance. Plant Cell Physiol. 43: 1293-1301.
- Sawada, S., Sato, M., Kasai A., Yaochi, D., Kameya, Y., Matsumoto, I. and Kasai, M. (2003) Analysis of the feed-

forward effects of sink activity on the photosynthetic sourcesink balance in single-rooted sweet potato leaves. I. Activation of RuBPcase through the development of sinks. Plant Cell Physiol. 44: 190-197.

- Sawada, S., Usuda, H., Hasegawa, Y., Tsukui, T. (1990) Regulation of ribulose-l,5-bisphosphate carboxylase activity in response to changes in the source/sink balance in singlerooted soybean leaves: The role of inorganic orthophosphate in activation of the enzyme. Plant Cell Physiol. 31: 697-704.
- Sawada, S., Usuda, H. and Tsukui, T. (1992) Participation of inorganic orthophosphate in regulation of the ribulose-1,5bisphosphate carboxylase activity in response to changes in the photosynthetic source-sink balance. Plant Cell Physiol. 33: 943-949.
- Schöttler, M.A. and Tóth, S. Z. (2014) Photosynthetic complex stoichiometry dynamics in higher plants: Environmental acclimation and photosynthetic flux control. Front. Plant Sci.
- Sharp, R.R., Wu, Y., Voetberg, G.S., Saab, I.N. and LeNoble, M.E. (1994) Confirmation that abscisic acid accumulation is required for maize primary root elongation at low water potentials. J. Exp. Bot. 45: 1743-1751.
- Sheen J. (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. Plant Cell 2: 1027- 1038.
- Sims, D.A., Luo, Y., Seemann, J.R. (1998) Importance of leaf versus whole plant CO₂ environment for photosynthetic acclimation. Plant Cell Environ. 21: 1189-1196.
- Sugiura, D., Betsuyaku, E. and Terashima, I. (2015) Manipulation of the hypocotyl sink activity by reciprocal grafting of two *Raphanus sativus* varieties: Its effects on morphological and physiological traits of source leaves and whole-plant growth. Plant Cell Environ. 38: 2629-2640.
- Sugiura, D., Betsuyaku, E. and Terashima, I. (2019) Interspecific differences in how sink-source imbalance causes photosynthetic downregulation among three legume species. Ann. Bot. 123: 715-726.
- Sugiura, D., Watanabe, C.K.A., Betsuyaku, E. and Terashima, I. (2017) Sink-source balance and down-regulation of photosynthesis in *Raphanus sativus*: Effects of grafting, N and CO₂. Plant Cell Physiol. 58: 2043-2056.
- Sugiura, D., Terashima, I. and Evans, J.R. (2020) A decrease in mesophyll conductance by cell-wall thickening contributes to photosynthetic downregulation. Plant Physiol. 183: 1600-1611.
- Takahashi, F., Suzuki, T., Osakabe Y., Betsuyaku, S., Kondo, Y., Dohmae, N., Fukuda. H., Yamaguchi-Shinozaki, K. and

Shinozaki, K. (2018) A small peptide modulates stomatal control via abscisic acid in long-distance signaling. Nature 556: 235-238.

- Tamiya, H. (1932) Zur Energetik des Wachstums. Beiträge zur Atmungsphysiologie der Schimmelpilze. II. Acta Phytochim. 6: 265-304.
- 寺島一郎 (2024) 植物の生態—生理機能を中心に 改訂版. 裳華房
- Terashima, I., Matsuo, M, Suzuki, Y., Yamori, W. and Kono, M. (2021) Photosystem I in low light-grown leaves of *Alocasia odora*, a shade-tolerant plant, is resistant to fluctuating lightinduced photoinhibition. Photosynth. Res. 149: 69-82.
- Terashima, I., Oguchi, R., Atsuzawa, K., Kaneko, Y. and Kono, M. (2025) Excitation spillover from PSII to PSI measured in leaves at 77K. Plant Cell Physiol. Published online, DOI: 10.1093/pcp/pcaf002
- Thorne, G.N. and Evans. A.F. (1964) Influence of tops and roots on net assimilation rate of sugar-beet and spinach beet and grafts between them. Ann. Bot. 28: 499-508.
- Trejo, C.L., Davies, W.J. and Ruiz, L. del M.P. (1993) Sensitivity of stomata to abscisic acid : An effect of the mesophyll. Plant Physiol. 102: 497-502.
- Usuda, H. (2004a) Effects of growth under elevated CO₂ on the capacity of photosynthesis in two radish cultivars differing in capacity of storage root. Plant Prod. Sci. 7: 377-385.
- Usuda, H. (2004b) Evaluation of the effect of photosynthesis on biomass production with simultaneous analysis of growth and continuous monitoring of CO₂ exchange in the whole plants of radish, cv Kosena under ambient and elevated CO₂. Plant Prod. Sci. 7: 386-396.
- Usuda, H. (2006) Effects of elevated CO_2 on the capacity for photosynthesis of a single leaf and a whole plant, and on growth in a radish. Plant Cell Physiol. 47: 262-269.
- Vaughn, M.W., Harrington, G.N. and Bush, D.R. (2002) Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 10876-10880.
- Wahl, V., Ponnu, J., Schlereth, A., Arrivault, S., Langenecker, T., Franke, A., Feil, R., Lunn, J.E., Stitt, KM., Schmid, M. (2013)
 Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. Science 339: 704-707.
- Weaver, L.M. and Amasino, R.M. (2001) Senescence is induced in individually darkened Arabidopsis leaves, but inhibited in whole darkened plants. Plant Physiol. 127: 876-886.

- Yamazaki, J., Kamimura, Y. and Sugimura, Y. (1999) Changes in photosynthetic apparatus in the juvenile rice canopy and a possible function of photosystem I in the bottom leaves. Z. Naturforsch. 54c: 915-922.
- Yano, S. and Terashima, I. (2001) Separate localization of light signal perception for sun or shade type chloroplast and palisade tissue differentiation in *Chenopodium album*. Plant Cell Physiol. 42: 1303-1310.
- Yano, S. and Terashima, I. (2004) Developmental process of sun and shade leaves in *Chenopodium album* L. Plant Cell Environ. 27: 781-793.
- Yokoi, Y. (1978) Quantitative relationships between growth and respiration. I. Components of respiratory loss and growth efficiencies of etiolated red bean seedlings. Bot. Mag. Tokyo 91:31-41.
- Yoshida, S. (2003) Molecular regulation of leaf senescence. Curr. Opin. Plant Biol. 6: 79-84.
- Zhang, J., Schurr, U. and Davies, W.J. (1987) Control of stomatal behaviour by abscisic acid which apparently originates in the roots. J. Exp. Bot. 38: 1174-1181.

物質生産生態学の古典

物質生産生態学に興味を持たれた方があれば,是非, 以下の図書を読んでいただきたい.

戸塚績 木村允 (1972) 生態学講座9 植物の生産過程. 共 立出版

Monsi (1960)の解説, 植物の成長に関する記述などが 新鮮.

岩城英夫編 (1979) 植物生態学講座3 群落の機能と生 産. 朝倉書店

門司研究室出身の黒岩澄雄、及川武久、岩城英夫、お よび牛島忠広、宇田川武俊らの気迫のこもった分担執 筆.現在にも通用するヒント集として活用できる.

野本宣夫・横井洋太(1981) 生物学教育講座6 植物の物 質生産. 東海大学出版

物質生産生態学を創始した東京大学理学部と東京都立 大学理学部の生態学研究室の活躍を知ることができる.

門司正三・野本宣夫訳 (1982) ボイセンイェンセン 植物の物質生産. 東海大学出版

物質生産生態学の創始者の古典(1932)の翻訳. 弟子の Müller による追悼文, Monsi and Saeki (1953)のドイツ 語原著の和訳も掲載. 宝月欣二(1984)生物経済学. 裳華房

物質生産生態学の立場からの植物生態学概論.

黒岩澄雄(1990) UP BIOLOGY 物質生産の生態学.東京大 学出版会

群落内光環境,分配などの研究を自身で推進した著者 の力作.豊富な内容の小冊子.

植物における光化学系Ιの光阻害とその防御機構

桶川 友季 1)

2024年12月1日受付, 2024年12月12日受理

植物は常に変動する環境にさらされる.例えば、植物が光合成能力を超える光にさらされた場合、 吸収された光エネルギーは過剰となり、活性酸素種の生成を引き起こす.活性酸素種は光合成装置に 損傷を与え、結果として植物の光合成能力の低下となる(光阻害).植物はこのような光阻害を回避す るために様々な戦略を持つ.光阻害の主要な場所は光化学系IIであることから、植物の光防御機構に関 する研究もPSIIが中心であった.しかし近年になって、変動する光環境ではPSIIよりもPSIが顕著な光 阻害を受けることが明らかにされ、PSIの光防御機構にも注目が集まっている.ここでは、PSIの光阻 害とその防御機構について紹介する.

Photoinhibition of photosystem I and its photoprotective mechanisms in plants

Yuki Okegawa¹

Plants are exposed to constantly changing environments. When light exceeds the photosynthetic capacity of plants, the excess light energy absorbed causes the production of reactive oxygen species (ROS). ROS damages the photosynthetic apparatus, resulting in a decreased photosynthetic activity in plants (photoinhibition). Therefore, plants have various strategies to avoid photoinhibition in response to fluctuations in light intensity. Until recently, photosystem II was thought to be the primary site of photoinhibition, and studies on plant photoprotection mechanisms have focused on PSII. However, since it has been shown that PSI is more significantly photoinhibited than PSII under fluctuating light conditions, the photoprotection mechanism of PSI has also attracted attention. Here, we discuss the photoinhibition of PSI and its photoprotective mechanisms as revealed by recent studies.

キーワード:光化学系I,光阻害,光損傷,サイクリック電子伝達,チオレドキシン Photosystem I, photoinhibition, photodamage, cyclic electron transport, thioredoxin

1. はじめに

光合成は、太陽の光エネルギーを化学エネルギーに変換 する反応であり、チラコイド膜での一連の電子伝達反応と ストロマでの炭素固定反応からなる.チラコイド反応では、

連絡先 桶川 友季 岡山大学・資源植物科学研究所 〒710-0046 岡山県倉敷市中央2丁目20-1 Tel: 086-434-2341 Email: okegawa@okayama-u.ac.jp 光化学系II (PSII)で水の分解反応で生じた電子が、シトク ロムb₆f複合体と光化学系I (PSI)を通ってNADP⁺に伝達さ れ、最終的に還元力であるNADPHが生成される.電子伝 達反応はストロマからチラコイド内腔へのプロトン輸送と 共役し、チラコイド膜の内外で形成されたプロトンの濃度

1) 岡山大学・資源植物科学研究所

Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, Kurashiki, Japan 勾配を利用してATPが合成される.炭素固定反応では、こ れらのNADPHとATPを使って二酸化炭素が有機物に変換 される.このように、光合成には光が必要だが、植物の光 合成能力を超える過剰な光は活性酸素種を発生させ、光合 成装置に損傷を与えることによって植物の光合成能を低下 させる(これを光阻害という).動くことのできない植物は 自然の生育環境では光強度の急激な変化にさらされる.そ のため植物はこうした光の変動に対応した、光阻害を回避 あるいは最小化する様々な仕組みを備えている.

2. PSIの光阻害研究の歴史

光化学系の光阻害は1950年代に単離した葉緑体やチラ コイド膜での光照射実験において報告された(Kok 1956). PSIについてもチラコイド膜を使った実験で光阻害が起こ ることが明らかにされている (Jones and Kok 1966). しか し、 生葉でのPSI特異的な 光阻害は、 1994年に Terashimaら によって低温感受性植物であるキュウリ(Cucumis sativus L.) で発見されるまで報告が無く (Sonoike and Terashima 1994; Terashima et al. 1994), PSIIに比べてPSIの光阻害に 関する研究はあまり進んでいなかった. キュウリの葉を, 10℃より低い温度に数時間さらすとPSIIよりもPSIに顕著 な光阻害が見られた. また、PSI特異的な光阻害は酸素 存在下(大気条件)でのみ見られたことから、PSIで発生し た活性酸素種によって引き起こされることが示唆された (Terashima et al. 1994). その後の研究で、PSIで発生した ヒドロキシルラジカル (•OH) が、PSI複合体のサブユニッ トであるPsaBの分解を引き起こすことが明らかにされた (Sonoike et al. 1997). 一方で、低温でPSIが特異的に光阻 害を受ける植物は限られており、多くの植物種では低温 条件でPSIを光阻害から守る仕組みを持つと考えられてい る (Sonoike 2011). 特定の植物種で, また低温などの特定 の条件でしかPSI光阻害が観察されなかったこともPSIの 光阻害研究にあまり注目が集まらなかった理由なのかも しれない. 低温条件でPSIを光阻害から守るメカニズムに ついてはまだあまりわかっていないが、最近、キュウリ を使ってそのメカニズムを明らかにする試みがいくつか 報告されている (Lv et al. 2022; Takeuchi et al. 2022; Wang et al. 2022). キュウリの中でも品種によって低温に対する感 受性は大きく異なる. Takeuchiらは、低温感受性・耐性を 評価する方法としてPSIの光合成パラメーターを測定し、 PSIの反応中心であるP700の酸化型の比率を示すY (ND) が低温耐性と相関があることを報告した(Takeuchi et al. 2022). どのようなメカニズムで低温耐性を示す品種が高

いY(ND)を誘導するのか、今後のさらなる研究が期待される.また、近年では短時間の間に弱光と強光を繰り返 し照射する変動光の利用や連続的なパルス光の照射により、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を含む様々の植物でPSI光阻害を特異的に誘導する条件が見つけられており、PSI光阻害に関する研究が進んできている(Kono et al. 2017; Lempiäinen et al. 2022; Sejima et al. 2014).

3. PSIIの光阻害

最近まで, 光合成の光阻害は主にPSIIで生じると考えら れてきた. これはPSIIが他の光合成装置に比べて光感受性 が高く. 強光下で容易に失活してしまうことが原因だと 考えられている.PSIIのD1サブユニット(PsbA)は,弱光 条件下でも常に分解と合成が繰り返される非常に代謝回 転の速いタンパク質であるが、植物が過剰な光にさらさ れると、D1サブユニットの分解と合成のバランスが崩れ、 結果としてPSIIの光阻害が起こる.損傷したD1サブユニッ トは分解され、新たに合成されたサブユニットと置き換 わることで、機能的なPSII複合体の再集合が可能になる. この修復機構は「光化学系II修復サイクル」と呼ばれてい る.この修復機構では、FtsHと呼ばれる金属プロテアー ゼがATPを分解して得られたエネルギーを使って損傷を受 けたD1の分解することがわかっている (Kato and Sakamoto 2009). また最近では、クラミドモナスの変異体を使った 解析から、損傷したD1タンパク質がFtsHによって選択的 に分解するメカニズムも明らかになってきた (Kato et al. 2023). このようにPSIIの光阻害およびその修復機構に関 する研究は精力的に行われてきており、その知見も蓄積 している. PSIIの光阻害とその修復機構については摂南大 学の加藤先生と岡山大学の坂本先生が別の記事で詳しく 書かれているのでそちらを参照されたい.

4. PSIの光保護

その一方で、PSIの光阻害はPSIIと比べてあまり注目さ れてこなかった.これは植物がPSIを様々な環境ストレス から守る仕組みを備えており、そのためPSIの光阻害が見 られる条件が限定的であるためと考えられる.例えば、 PSIIの光阻害もまたPSIの光防御機構の一つとして働く. PSIIの光損傷によりPSII活性が低下することで過剰な電子 がPSIに流れることを防ぎ、PSIを光阻害から守る.PSIIの 光阻害が効率的なPSII修復サイクルによって速やかに回復 する一方で、光損傷を受けたPSIの回復は非常にゆっくり



図1:PSI光防御に関わる電子伝達経路

PSIサイクリック電子伝達はFdからPQプールへと電子を戻すことによって、チラコイド内腔の 酸性化に寄与する.また、PSI電子受容体側の酸化にも寄与する.TrxはFdを電子供与体として 標的タンパク質の制御をおこなう.Trx xおよびTrx yがPSIの光保護に重要であることは分かっ ているがそのメカニズムは分かっていない.FlvはPSIを電子供与体として酸素を水に変換する ことによって、チラコイド内腔の酸性化に寄与するだけでなくPSIの酸化にも寄与する.Flvは 被子植物では失われている.

であり, 植物の成長に大きな影響を与える (Lempiäinen et al. 2022; Li et al. 2004; Zhang et al. 2011). PSIの光防御機構 のいくつかは光合成電子伝達と連動しており、チラコイ ド膜を介して形成されるプロトンの濃度勾配(チラコイド 内腔の酸性化)によって制御されている. "photosynthetic control"と呼ばれるシトクロムbd 複合体のダウンレギュ レーションは、光合成の制御における基本的なメカニズ ムである (Tikhonov 2015). シトクロムb f 複合体がチラ コイド内腔の酸性化を感知して自身の活性を低下させる ことによってPSIへの過剰な電子の流入を防ぐ (Stiehl and Witt 1969). また, チラコイド内腔の酸性化は, PSIIアン テナによって吸収された過剰な光エネルギーの熱散逸の 誘導にも寄与する (Li et al. 2002; Muller et al. 2001). この 過程は、クロロフィル蛍光の非光化学的消光(NPQ)とし てモニターすることができる (Niyogi et al. 1998). 植物で はNPQは主にPSIIへの酸化ストレスを回避するための光保 護機構であり、PSIの光保護への貢献は少ないと考えられ ている (Roach and Krieger-Liszkay 2012). その一方で, 緑 藻クラミドモナスではLHCSR3によって誘導されるNPQが 変動する光環境下でPSI光保護に寄与することが最近報告 されており (Roach 2020), 植物でもNPQの変動光条件に おけるPSI光保護に対する貢献を再検討する必要があるか もしれない (Nosalewicz et al. 2022). 植物はまた, PSI反応 中心のクロロフィルP700の酸化還元状態を調節すること

によって、PSIを保護するメカニズムも持つ.酸化型P700⁺ は強光や乾燥などのストレス条件で蓄積し、PSIの還元型 電子受容体を電荷再結合を介して酸化できるため、過剰 な還元力の散逸に寄与する (Miyake 2020).

5. PSIサイクリック電子伝達

上記の光防御機構の誘導にはPSIサイクリック電子伝 達によるプロトンの濃度勾配の形成が重要であることが シロイヌナズナの変異株使った解析から明らかにされ た (Munekage et al. 2002; Suorsa et al. 2012; Yamamoto and Shikanai 2019; Chaux et al. 2015). PSIサイクリック電子 伝達は、約70年前にArnonらによってATPを合成する経 路(サイクリック光リン酸化)として発見された (Arnon et al. 1954). 被子植物は部分的に重複して働く2つのサイ クリック電子伝達経路を持つ(図1).一つめはPROTON GRADIENT REGULATION 5 (PGR5) タンパク質に依存し た経路で、アンチマイシンAに感受性を示す (Munekage et al. 2002). もう一つはNADH脱水素酵素様 (NDH) 複合 体に依存した経路でアンチマイシンAに非感受性である (Hashimoto et al. 2003). サイクリック電子伝達ではフェレ ドキシン (Fd) からプラストキノン (PQ) を介してシトクロ ムbf複合体、プラストシアニン(PC)、PSIへと電子が循環 するため、NADPHの生成に関与することなく光防御機構



図2:変動光が植物の生育に与える影響

野生株, Trx xおよびTrx yの欠損変異(*trx x yly2*), NDHまたは PGR5依存のPSIサイクリック電子伝達の欠損変異株(*crr2*および *pgr5*)を30 µmol photons m⁻² s⁻¹の弱光を5分, 500 µmol photons m⁻² s⁻¹の強光を1分繰り返し交互に照射する変動光条件で19日間生 育させた. 文献 (Okegawa et al., 2023 *Plant Physiol*)より抜粋し, 一部改変.



図3:葉緑体ストロマにおけるTrxアイソフォームの蓄積量 Trxアイソフォーム特異的な抗体を使って葉緑体ストロマでの それぞれのTrxの蓄積量を定量した. *n* = 5. NDは検出不可を示 している. 文献(Okegawa and Motohashi 2015 *Plant J*)より抜粋し, 一部改変.

の誘導に必要なプロトンの濃度勾配を形成(チラコイド内 腔の酸性化) することが出来る. シロイヌナズナなどのC3 植物ではPGR5依存のサイクリック電子伝達が主経路であ る.この経路で働くPGR5は既知のドメインやモチーフを 持たない低分子量のタンパク質で、足場タンパク質である PGR5-LIKE1 (PGRL1) を介してチラコイド膜に安定して 局在する(図1). この経路を欠損するシロイヌナズナpgr5 変異株はphotosynthetic controlとNPQを誘導することが出来 ず、強光や変動光条件でPSIの電子受容体側が過還元状態 となり、結果としてPSI光阻害を示す (Munekage et al. 2002; Suorsa et al. 2012; Yamamoto and Shikanai 2019). さらに最 近, PGR5依存の経路はP700を酸化しPSIを保護するために, PSIの受容体側にある電子のプールをPQプールに移動させ るために必要であることが提唱された (Zhou et al. 2022). このように、PGR5依存の経路はPSIの電子供与体と電子受 容体側の両方の制御に必要であると考えられている.

pgr5変異株はシロイヌナズナの一般的な生育条件では野 生株と同様の成長を示すのに対し、変動光条件や自然の 光環境では生きることができない (Suorsa et al. 2012). こ の顕著な表現型を利用してpgr5のサプレッサー変異株が数 多く単離されている (Penzler et al. 2024). 単離されたサプ レッサー変異株には特徴があり、そのほとんどがPSII, シ トクロムb_of 複合体またはPCの欠損によりPSIへの電子の 流入が減少しているか、NDH依存のPSIサイクリック電子 伝達活性が上昇しているかであった. 結果として、サプ レッサー変異株ではPSI電子供与体側の制御が回復し、PSI 電子受容体側の過還元状態も部分的に回復していた.これらの結果からもPGR5依存の経路によるphotosynthetic controlの誘導と, PSI電子受容体側の制御がPSIの光防御に 重要であることは明らかである.

一方で、サイクリック電子伝達のマイナーな経路であ るNDH経路のPSI光保護に対する貢献はまだあまりわかっ ていない.しかし最近の研究から、NDH依存経路が変動 する光条件で重要であることが明らかとなり、その防御 メカニズムにも注目が集まっている(Kono and Terashima 2016; Yamori et al. 2016; Zhou et al. 2022). NDH経路のPSI 光防御における役割も将来明らかになると期待される.

6. チオレドキシン(Trx)システム

PSIサイクリック電子伝達経路に加えて、最近私たちは 酸化還元タンパク質であるチオレドキシン(Trx)がPSIの 光防御に寄与することを発見した(Okegawa et al. 2023). Trxはあらゆる生物に普遍的に存在し、活性中心に保存さ れた一対のシステイン残基を持つ低分子量の酸化還元タ ンパク質である. 葉緑体に局在するTrx は光合成電子伝 達に依存してFd、Fd-Trx 還元酵素(FTR)を介して還元さ れ、標的タンパク質のジスルフィド結合(S-S結合)を還 元することによって、そのタンパク質の活性を調節する (Schurmann and Buchanan 2008). シロイヌナズナの葉緑 体ストロマには5グループ10種類のTrxアイソフォームが 存在する(Trx f1, f2, m1, m2, m3, m4, x, y1, y2, z)



図4:変動光が光化学系の活性に与える影響(PSIIとPSIの光阻害) PSIIの最大量子収率(*Fv/Fm*)とPSIの活性(*Pm*)を変動光処理前後で比較した. *n* = 12-18. 異な る文字は統計的有意差があることを示している(Tukey-Kramer test, *P* < 0.05). 文献(Okegawa et al., 2023 *Plant Physiol*)より抜粋し,一部改変.

(Okegawa and Motohashi 2015). 葉緑体での蓄積量が多い Trx fおよびTrx mはATP合成酵素やカルビン・ベンソン回 路の酵素など、光合成反応で働く多くの酵素を光依存的 に活性化することによって効率的に光合成を誘導する(図 3: Geigenberger et al. 2017). 一方で, 蓄積量が少ないTrx xおよびTrx yについては生化学的解析から抗酸化機能を持 つと考えられていたが、in vivoでの生理的な役割はあまり わかっていなかった (Collin et al. 2003; Collin et al. 2004). 実際、これらの欠損変異株を強光などのストレス条件に さらしても顕著な表現型は見られなかった.しかし、こ れらの変異株を変動光条件で生育させると生育阻害を示 すことがわかった (図2). Trx xの欠損変異株 (trx x) を30 μ mol photons m⁻² s⁻¹の弱光を5分と500 μ mol photons m⁻² s⁻¹ の強光を1分繰り返し交互に照射する変動光条件で育てた 場合, 生重量は野生株の73%まで減少していた. 一方で, Trx yの欠損変異株 (trx yly2) と野生株の生重量に違いは見 られなかったが、Trx xとTrx yの両方を欠損したtrx x trx yly2三重変異株は, trx x変異株よりも生重量がさらに減少 していた(野生株の36%).変動する光環境下でこれらの変 異株の光合成パラメーターを調べるとPSIの電子受容体側 が過還元となり、変動光処理後、PSIの活性が野生株に比 べて顕著に減少することがわかった(図4).また、活性 低下はPSI特異的に見られた. これまでのところ、Trxによ るPSI光保護の制御機構については分かっていないが、今 後解明していきたいと考えている.

7. PSI型Flavodiironタンパク質(Flv)との関係

シアノバクテリア、緑藻類、コケ類では、PSI型 Flavodiiron タンパク質 (Flv) が主に変動する光条件下で PSIを光阻害から守ることが知られている (Alboresi et al. 2019). Flvは2つの非ヘム鉄をもつ2鉄センターとフラビ ンモノヌクレオチド (FMN) を結合するタンパク質で、PSI の電子受容体側で電子を受け取り,酸素を水に還元すると 考えられている (図1). ヒメツリガネゴケ (Physcomitrium patens)のflvノックアウト変異株は変動光条件下で成長阻 害とPSIの光阻害を示す (Gerotto et al. 2016). 一方, 被子 植物では、進化の過程でFlvが失われている (Alboresi et al. 2019). ヒメツリガネゴケから単離されたFlv遺伝子をシロ イヌナズナのpgr5変異株に導入すると、PSIの光保護機能 が部分的に回復した (Yamamoto et al. 2016). これらの結 果は、被子植物がPSIから効率的に電子を受け取る他のメ カニズムを進化させてきたことを示唆している (Alboresi et al. 2019). Flvは光照射後の最初の数秒間, PSIの下流 で主要な電子受容体として機能することがわかっている (Gerotto et al. 2016). Trx xとTrx yはFTRからより効率的に 電子を受け取り (Yoshida and Hisabori 2017), 他のTrxより も高いインスリン還元活性を示す (Okegawa and Motohashi 2020). その生化学的特異性を考えると、Trx xとTrx yは, 弱光から強光への急激な光強度の変化の際、主要な電子 受容体として働くのかもしれない. さらなる解析により, Flvの欠損を補うために被子植物が進化の過程で獲得した 光防御のメカニズムが明らかになるかもしれない.

8. おわりに

PSI光阻害の研究は、PSI光阻害が生葉ではなかなか確 認できなかったこと、PSI特異的な光阻害を示す植物種 が限られていたことからPSIIの光阻害研究に遅れをとっ ている.しかし、最初の方でも少し触れたが、特定の光 照射条件を使うことによって、例えばモデル植物である シロイヌナズナの野生株でもPSI光阻害の研究が可能と なった. また、pgr5変異株の出現によってPSI光阻害の研 究はその重要性が認められ、近年飛躍的に進んだと言え る. さらに最近, TiwariらによってPSI光損傷が野生株に おいても一定の強光条件で起こるという興味深い報告も された (Tiwari et al. 2024). これまで、PSIの光阻害はスト レス処理後に光酸化可能なPSI反応中心P700の全量 (Pm) (Klughammer and Schreiber 1994) で評価する方法が一般的 だった. 彼らはPmの測定に加え、PSIの電子受容体である 鉄硫黄クラスター, F_xとF_{AB}の損傷も調べた. P700からFd への電子伝達は、フィロキノン、F_x、F_{AB}を介して起こる. 野生株に強光処理した場合, Pmの低下やFxの損傷は観察 されなかったが、F_{AB}の損傷が起こっていることが明らか になった. F_{AB}の損傷はリニア電子伝達や二酸化炭素の固 定速度にも影響を与えないためこれまで明らかになって いなかったと考えられる.一方,同じ強光処理条件でも pgr5変異株ではPmの低下、FxとFABの損傷の全てが観察さ れた. これらの研究から、PSIの光阻害には段階があるこ とがわかった. F_{AB}の損傷はチラコイド膜を単離して電子 常磁性共鳴 (EPR) 分光により測定する必要がある (Tiwari et al. 2024) ため、Pm測定に比べるとかなり測定のハード ルが高いが、F_{A/B}の損傷の条件が分かれば、今後、F_{A/B}だけ が損傷した植物を解析することでPSIの光防御機構とPSIで はまだわかっていない修復機構が明らかになると期待さ れる.

謝辞

本記事の執筆の機会を与えてくださった北海道大学の 田中亮一先生および高林厚史先生に御礼申し上げます. また,本稿をまとめるにあたってご助言をいただいた岡 山大学の坂本亘先生,京都大学の鹿内利治先生に深く感 謝申し上げます.本稿で紹介した研究の一部(第6章)は, 科研費(21K06219,23H04961)の助成を受けて実施された ものです.

参考文献

- Alboresi, A., Storti, M. and Morosinotto, T. (2019) Balancing protection and efficiency in the regulation of photosynthetic electron transport across plant evolution. *New Phytol* 221: 105-109.
- Arnon, D.I., Allen, M.B. and Whatley, F.R. (1954) Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Nature* 174: 394-396.
- Chaux, F., Peltier, G. and Johnson, X. (2015) A security network in PSI photoprotection: regulation of photosynthetic control, NPQ and O2 photoreduction by cyclic electron flow. *Frontiers in Plant Science* 6.
- Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Marchand, C., Hirasawa, M., Lancelin, J.M., Knaff, D.B., et al. (2003) The Arabidopsis plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity. *J Biol Chem* 278: 23747-23752.
- Collin, V., Lamkemeyer, P., Miginiac-Maslow, M., Hirasawa, M., Knaff, D.B., Dietz, K.J., et al. (2004) Characterization of plastidial thioredoxins from Arabidopsis belonging to the new y-type. *Plant Physiol* 136: 4088-4095.
- Geigenberger, P., Thormahlen, I., Daloso, D.M. and Fernie, A.R. (2017) The Unprecedented Versatility of the Plant Thioredoxin System. *Trends Plant Sci* 22: 249-262.
- Gerotto, C., Alboresi, A., Meneghesso, A., Jokel, M., Suorsa, M., Aro, E.M., et al. (2016) Flavodiiron proteins act as safety valve for electrons in Physcomitrella patens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 12322-12327.
- Hashimoto, M., Endo, T., Peltier, G., Tasaka, M. and Shikanai, T. (2003) A nucleus-encoded factor, CRR2, is essential for the expression of chloroplast ndhB in Arabidopsis. *Plant J* 36: 541-549.
- Jones, L.W. and Kok, B. (1966) Photoinhibition of Chloroplast Reactions. II. Multiple Effects. *Plant Physiol* 41: 1044-1049.
- Kato, Y., Kuroda, H., Ozawa, S.-I., Saito, K., Dogra, V., Scholz, M., et al. (2023) Characterization of tryptophan oxidation affecting D1 degradation by FtsH in the photosystem II quality control of chloroplasts. *eLife* 12: RP88822.
- Kato, Y. and Sakamoto, W. (2009) Protein Quality Control in Chloroplasts: A Current Model of D1 Protein Degradation in the Photosystem II Repair Cycle. *The Journal of Biochemistry* 146: 463-469.
- Klughammer, C. and Schreiber, U. (1994) An Improved Method,Using Saturating Light-Pulses, for the Determination ofPhotosystem-I Quantum Yield Via P700+-Absorbency

Changes at 830 Nm. Planta 192: 261-268.

- Kok, B. (1956) On the inhibition of photosynthesis by intense light. *Biochimica et Biophysica Acta* 21: 234-244.
- Kono, M. and Terashima, I. (2016) Elucidation of Photoprotective Mechanisms of PSI Against Fluctuating Light photoinhibition. *Plant and Cell Physiology* 57: 1405-1414.
- Kono, M., Yamori, W., Suzuki, Y. and Terashima, I. (2017) Photoprotection of PSI by Far-Red Light Against the Fluctuating Light-Induced Photoinhibition in Arabidopsis thaliana and Field-Grown Plants. *Plant and Cell Physiology* 58: 35-45.
- Lempiäinen, T., Rintamäki, E., Aro, E.-M. and Tikkanen, M. (2022) Plants acclimate to Photosystem I photoinhibition by readjusting the photosynthetic machinery. *Plant, Cell & Environment* 45: 2954-2971.
- Li, X.-G., Duan, W., Meng, Q.-W., Zou, Q. and Zhao, S.-J. (2004) The Function of Chloroplastic NAD(P)H Dehydrogenase in Tobacco during Chilling Stress under Low Irradiance. *Plant* and Cell Physiology 45: 103-108.
- Li, X.P., Muller-Moule, P., Gilmore, A.M. and Niyogi, K.K. (2002) PsbS-dependent enhancement of feedback deexcitation protects photosystem II from photoinhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15222-15227.
- Lv, C., Li, F., Ai, X. and Bi, H. (2022) H2O2 participates in ABA regulation of grafting-induced chilling tolerance in cucumber. *Plant Cell Reports* 41: 1115-1130.
- Miyake, C. (2020) Molecular Mechanism of Oxidation of P700 and Suppression of ROS Production in Photosystem I in Response to Electron-Sink Limitations in C3 Plants. *Antioxidants* 9: 230.
- Muller, P., Li, X.P. and Niyogi, K.K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125: 1558-1566.
- Munekage, Y., Hojo, M., Meurer, J., Endo, T., Tasaka, M. and Shikanai, T. (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in Arabidopsis. *Cell* 110: 361-371.
- Niyogi, K.K., Grossman, A.R. and Bjorkman, O. (1998) Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* 10: 1121-1134.
- Nosalewicz, A., Okoń, K. and Skorupka, M. (2022) Non-Photochemical Quenching under Drought and Fluctuating Light. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 5182.

- Okegawa, Y. and Motohashi, K. (2015) Chloroplastic thioredoxin m functions as a major regulator of Calvin cycle enzymes during photosynthesis in vivo. *Plant J* 84: 900-913.
- Okegawa, Y. and Motohashi, K. (2020) M-Type Thioredoxins Regulate the PGR5/PGRL1-Dependent Pathway by Forming a Disulfide-Linked Complex with PGRL1. *Plant Cell* 32: 3866-3883.
- Okegawa, Y., Sato, N., Nakakura, R., Murai, R., Sakamoto, W. and Motohashi, K. (2023) x- and y-type thioredoxins maintain redox homeostasis on photosystem I acceptor side under fluctuating light. *Plant Physiol* 193: 2498-2512.
- Penzler, J.-F., Naranjo, B., Walz, S., Marino, G., Kleine, T. and Leister, D. (2024) A pgr5 suppressor screen uncovers two distinct suppression mechanisms and links cytochrome b6f complex stability to PGR5. *The Plant Cell* 36: 4245-4266.
- Roach, T. (2020) LHCSR3-Type NPQ Prevents Photoinhibition and Slowed Growth under Fluctuating Light in Chlamydomonas reinhardtii. *Plants* 9: 1604.
- Roach, T. and Krieger-Liszkay, A. (2012) The role of the PsbS protein in the protection of photosystems I and II against high light in Arabidopsis thaliana. *Biochimica et Biophysica Acta* (*BBA*) - *Bioenergetics* 1817: 2158-2165.
- Schurmann, P. and Buchanan, B.B. (2008) The ferredoxin/ thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxid Redox Signal* 10: 1235-1274.
- Sejima, T., Takagi, D., Fukayama, H., Makino, A. and Miyake, C. (2014) Repetitive Short-Pulse Light Mainly Inactivates Photosystem I in Sunflower Leaves. *Plant and Cell Physiology* 55: 1184-1193.
- Sonoike, K. (2011) Photoinhibition of photosystem I. *Physiologia Plantarum* 142: 56-64.
- Sonoike, K., Kamo, M., Hihara, Y., Hiyama, T. and Enami, I. (1997) The mechanism of the degradation of psaB gene product, one of the photosynthetic reaction center subunits of Photosystem I, upon photoinhibition. *Photosynthesis Research* 53: 55-63.
- Sonoike, K. and Terashima, I. (1994) Mechanism of Photosystem-I Photoinhibition in Leaves of Cucumis-Sativus L. *Planta* 194: 287-293.
- Stiehl, H.H. and Witt, H.T. (1969) Quantitative treatment of the function of plastoquinone in phostosynthesis. *Z Naturforsch B* 24: 1588-1598.
- Suorsa, M., Jarvi, S., Grieco, M., Nurmi, M., Pietrzykowska, M., Rantala, M., et al. (2012) PROTON GRADIENT

REGULATION5 is essential for proper acclimation of Arabidopsis photosystem I to naturally and artificially fluctuating light conditions. *Plant Cell* 24: 2934-2948.

- Takeuchi, K., Che, Y., Nakano, T., Miyake, C. and Ifuku, K. (2022) The ability of P700 oxidation in photosystem I reflects chilling stress tolerance in cucumber. *J Plant Res* 135: 681-692.
- Terashima, I., Funayama, S. and Sonoike, K. (1994) The Site of Photoinhibition in Leaves of Cucumis-Sativus L at Low-Temperatures Is Photosystem-I, Not Photosystem-Ii. *Planta* 193: 300-306.
- Tikhonov, A.N. (2015) Induction events and short-term regulation of electron transport in chloroplasts: an overview. *Photosynth Res* 125: 65-94.
- Tiwari, A., Mamedov, F., Fitzpatrick, D., Gunell, S., Tikkanen, M. and Aro, E.M. (2024) Differential FeS cluster photodamage plays a critical role in regulating excess electron flow through photosystem I. *Nat Plants* 10: 1592-1603.
- Wang, X., Mi, S. and Miao, H. (2022) Transcriptomic Responses to Chilling Reveal Potential Chilling Tolerance Mechanisms in Cucumber. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 12834.
- Yamamoto, H. and Shikanai, T. (2019) PGR5-Dependent Cyclic Electron Flow Protects Photosystem I under Fluctuating Light at Donor and Acceptor Sides. *Plant Physiol* 179: 588-600.
- Yamamoto, H., Takahashi, S., Badger, M.R. and Shikanai, T. (2016) Artificial remodelling of alternative electron flow by flavodiiron proteins in Arabidopsis. *Nat Plants* 2: 16012.
- Yamori, W., Makino, A. and Shikanai, T. (2016) A physiological role of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis under fluctuating light in rice. *Scientific Reports* 6: 20147.
- Yoshida, K. and Hisabori, T. (2017) Distinct electron transfer from ferredoxin-thioredoxin reductase to multiple thioredoxin isoforms in chloroplasts. *Biochem J* 474: 1347-1360.
- Zhang, Z., Jia, Y., Gao, H., Zhang, L., Li, H. and Meng, Q. (2011) Characterization of PSI recovery after chilling-induced photoinhibition in cucumber (Cucumis sativus L.) leaves. *Planta* 234: 883-889.
- Zhou, Q., Yamamoto, H. and Shikanai, T. (2022) Distinct contribution of two cyclic electron transport pathways to P700 oxidation. *Plant Physiology* 192: 326-341.

秋の紅葉とクロロフィルの分解

伊藤寿1)

2024年11月27日受付, 2024年12月18日受理

秋の樹木の紅葉はクロロフィルが分解されることによってみられる現象である. 秋になると気温が 下がり光合成ができなくなるため、落葉樹はクロロフィルを分解する. このように、クロロフィルの 分解は植物の発達段階の最後に見られる現象である. そのため、クロロフィルの分解自体には生理学 的役割はないとも考えられる. しかし、クロロフィルの分解を抑制したり促進したりすると、光化学 系の量が変動する. また、クロロフィルの分解は老化の進行に影響を与える. このように、クロロフィ ルの分解自体も細胞の機能や個体の成長に影響を与える. 本稿ではクロロフィルの分解機構を概説し、 その生理学的役割について論じる.

Autumn leaves and chlorophyll degradation

Hisashi Ito¹

The autumn color of trees is caused by the degradation of chlorophyll. In autumn, deciduous trees degrade chlorophyll as temperatures drop and photosynthesis is no longer possible. Thus, chlorophyll degradation is a process seen at the end of the plant developmental stage. Therefore, chlorophyll degradation itself may not have a physiological role. However, when chlorophyll degradation is suppressed or accelerated, the amount of photosystems changes. Chlorophyll degradation also affects the progression of senescence. Thus, chlorophyll degradation itself also affects cell function and plant growth. Here we summarize the mechanisms of chlorophyll degradation and discuss their physiological roles.

キーワード: クロロフィル分解, 植物ホルモン, 代謝系の進化, 葉の老化 chlorophyll degradation, leaf senescence, metabolic pathway evolution, plant hormone

1. 植物はなぜクロロフィルを分解するのか

自然界で緑色といえば植物の葉の色が代表的なもので ある.この緑色は光合成色素であるクロロフィル(葉緑 素)の色である.植物はクロロフィルを使って太陽の光を 吸収し、光エネルギーを化学エネルギーに変換する反応、 つまり光合成をおこなっている.秋になり気温が下がる

連絡先
伊藤 寿
北海道大学 低温科学研究所
〒 060-0819 札幌市北区北 19 条西 8 丁目
Tel: 011-706-5469
Email: ito98@lowtem.hokudai.ac.jp

と光合成ができなくなる.低温環境下では酵素反応が進 みにくくなるためである.その結果、イチョウやカエデ はクロロフィルを分解して紅葉する(図1A).イネも秋の 収穫前はクロロフィルを分解して葉が黄色くなる.この 時、クロロフィルは「なんとなく」分解されるわけではな い.エネルギーを使った酵素反応によって分解されてい る.つまり吸収した光エネルギーによってクロロフィル

北海道大学 低温科学研究所 Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan

 A
 Image: C
 Image:

図1:秋の紅葉

(A)秋の北海道大学低温科学研究所の正面玄関.①のハルニレ は落葉を終え、②のシラカバは黄葉し落葉中である.③のカエ デは紅葉し落葉が始まっている.④のイチイは常緑樹のため緑 色の葉をつけている.(B)初夏のイチイの葉.黄緑色の葉が新 芽で,枯れた葉は黄色くなっている.常緑樹のイチイは新芽の 伸びるこの時期に黄葉する.(C)緑色のミヤマハンノキの落ち 葉.ミヤマハンノキは根粒菌と共生し,窒素を十分に獲得でき るため,落葉するときに葉の養分を回収する必要がない.その ためクロロフィルも分解せず緑色の葉を落葉する(黄色い葉は カツラ).

は化学的に退色するのではなく,生物学的な過程を経て 分解される.

植物は次のような理由でクロロフィルを分解する. 植 物が葉に蓄積している養分は、その葉が枯れるとき新し く展開する葉や種子に転流して再利用される。ここでい う養分とは、主にタンパク質を構成しているアミノ酸で ある. そのため、養分を運び出すまでは葉が健常で養分 を運び出すという機能を維持しなければならない、この ときクロロフィルが光を吸収すると活性酸素を生じ、細 胞を傷つけてしまう恐れがある. そこで、細胞を守るた めにあらかじめクロロフィルを分解しておく. また、ク ロロフィルはタンパク質と結合してクロロフィルタンパ ク質複合体を形成し、光合成をおこなっている. 植物は このタンパク質を分解してアミノ酸を養分として回収し ている (図2). この時まずクロロフィルを分解しなければ タンパク質の部分が分解できない. クロロフィルが複合 体の表面に存在すると、 タンパク質分解酵素がタンパク 質に接触できないためである.このように、葉の養分を



図2: クロロフィルタンパク質複合体の分解

クロロフィルタンパク質複合体は、クロロフィルがタンパク質 部分をプロテアーゼから守っているため、プロテアーゼでは分 解されない.そのためクロロフィルタンパク質複合体の分解は、 まずクロロフィルの分解から始まる(第一段階).クロロフィ ルaはMg脱離酵素、クロロフィルbはクロロフィルb還元酵素に よって代謝され、複合体から外れる.その結果タンパク質部分 にプロテアーゼがアクセスできるようになり、タンパク質部分 の分解が進む(第二段階).タンパク質がアミノ酸まで分解され ると、そのアミノ酸は転流し再利用される(第三段階).

回収し、それを次の世代に投資するために植物はクロロ フィルを分解している.なお、初夏に新しい葉を作る常 緑針葉樹は秋ではなく初夏に葉が枯れる.葉の養分を幹 にためることなく直接新しい葉の形成に転流するためで ある(図1B).また、落葉樹であっても根に根粒菌が共生し、 窒素を比較的容易に獲得できるミヤマハンノキなどでは 葉の養分を回収せず、緑色のまま落葉している(図1C). つまり、葉の養分を回収する必要がない場合、クロロフィ ルを分解する必要もない.葉が枯れるときのクロロフィ ルの分解は視覚的に顕著であるが、クロロフィル分解は 別の場面でも行われている.葉緑体内ではすべてのクロ ロフィルはタンパク質と結合してクロロフィルタンパク 質複合体を形成している.遊離のクロロフィルは存在し



図3: クロロフィル分解経路

グルタミン酸から始まったクロロフィル合成経路はクロロフィ ルaで完成する.クロロフィルaの一部がクロロフィルbに変換 される.植物はこのクロロフィルaとクロロフィルbを光合成色 素として利用している.クロロフィルbはクロロフィルaに戻さ れてからクロロフィルaと同じ経路で分解される.クロロフィ ルbの段階でMgが外れることはない.この図で示した反応はす べて葉緑体内で行われている.

ない. 遊離のクロロフィルは吸収した光エネルギーを光 合成に使うことができず,活性酸素を生じてしまうため である. そのため,クロロフィルが結合するタンパク質 に対してクロロフィルが過剰に合成された場合,クロロ フィルを分解しなければならない. また,植物が強い光 にさらされると集光性クロロフィルを減少させる. この 時もクロロフィルを分解しなければならない. このよう に, 植物は発達段階や光環境に応じてクロロフィルを分 解している.

2. クロロフィルの分解経路

クロロフィルの合成はグルタミン酸から始まり、十数段 階の反応を経てクロロフィルaが合成される. クロロフィ ルbはクロロフィルaの7位のメチル基がフォルミル基に 酸化されることによって合成される (Bryant et al. 2020). クロロフィルbの分解は、まず7-ヒドロキシメチルクロ ロフィルaに還元され、さらにクロロフィルaに還元され てから、クロロフィルaと同じ経路で分解される、クロロ フィルaの分解は最初に中心金属のマグネシウム(Mg)が外 され、次に疎水性の側鎖のフィチル基が加水分解によっ て除かれる、その後フェオフォルビドa酸素化酵素によっ てテトラピロール環が開環し, 還元反応を経て葉緑体外 に運び出される. 最終的には分解産物は液胞に運び込ま れる (図3) (Tanaka and Ito 2024). クロロフィル分解系に おいて、テトラピロール環が開環した後の分子は検出が 困難なことから、開環後の代謝系の詳細は不明な点が残 されている、変異体の解析などから、開環した分子が環 元されると光を吸収しても活性酸素を生じにくくなり, 光障害という観点からは危険な分子ではないと考えられ ている.また、開環した代謝産物は葉緑体から運び出さ れたのち、水溶性を高めるため糖鎖の付加などの修飾を 受ける. このようにしてクロロフィルは無毒化され貯蔵 しやすい形態に加工される. なお, 開環したテトラピロー ルの分解はそれ以上あまり進まないと考えられている. そのためピロール環に含まれる窒素など、クロロフィル の構成成分は養分としては回収されないまま液胞に残り. 落葉や枯死によって失われると考えられている. ヒトも クロロフィルと似た構造のヘムを持つ. このヘムも開環 後は分解が進まず、ビリルビンなどとして排出され回収 されない.

クロロフィル分解の研究はモデル植物,特にシロイヌ ナズナを使ってすすめられた部分が多い.遺伝学的手法 を利用しやすいためである.テトラピロール環の開環と それに続く還元反応まではすべての植物で共通している と思われる.しかし,それ以降の代謝系については多様 であり,未解明な点が多い.クロロフィルの分解産物は 光障害を起こさず水溶性が高い分子でなければならない. 種によってさまざまな分解産物を生じるとしても,この 二つの条件を満たしているはずである.詳細なクロロフィ ル分解の全体像やその制御については総説を参照してい ただきたい(Kuai et al. 2018; Tanaka and Ito 2024). 本稿では, クロロフィルaとクロロフィルbの分解について述べる.

3. クロロフィルaの分解

3.1 形質転換体の性質

すべての酸素発生型の光合成をおこなう生物はクロロ フィルaを持つ.陸上植物のクロロフィルaの分解は中心 金属のMgが外れることから始まる.この反応が陸上植物 のクロロフィル分解の律速段階である.この反応はクロ ロフィルからMgを脱離する反応なので,この反応を触媒 する酵素はMg脱離酵素と呼ばれている.なお,クロロフィ ルaの分解はMgが外れる前にクロロフィラーゼと呼ばれる 酵素によってフィチル基が加水分解され、その後Mgが外 れるという可能性もある.しかし変異体の解析などから, 老化段階ではクロロフィラーゼは関与せず,Mg脱離酵素 によってクロロフィルaは分解されていると考えられてい る.

Mg脱離酵素はStay-Green (SGR) と呼ばれる遺伝子に コードされている. SGR遺伝子は枯れる時期になっても 緑色を維持 (stay green) している変異体から同定されたた めこの名がつけられている (Park et al. 2007). なお、メン デルが遺伝の法則を確立するときに使った緑色のマメの 原因遺伝子もSGRである (Sato et al. 2007). Mg脱離酵素は すべてのクロロフィルaとクロロフィルbを持つ真核型光 合成生物に見つかっている. 被子植物だけがさらにStay-Green Like (SGRL)と呼ばれるパラログを持つ.

Mg脱離酵素の欠損株は、クロロフィルが分解できない ため、枯れる時期になっても葉が緑色のままである(図 4A) (Chen et al. 2021). しかし、細胞は老化し、Rubisco なども減少しているため光合成は行っていない. クロロ フィルタンパク質複合体については、光化学系Iのコア複 合体とアンテナ複合体、光化学系IIのアンテナ複合体は老 化しても分解されずに残存している. クロロフィルが分 解されないと、タンパク質部分も分解できないためであ る(図2).ただし、光化学系IIのコア複合体は分解される. この複合体は他のクロロフィルタンパク質複合体とは異 なる方法で分解が制御されていると思われる. Mg脱離酵 素を過剰発現すると、クロロフィルが分解され、葉が黄色 くなる (Shimoda et al. 2016) (図4B). Mg脱離酵素はクロ ロフィルaだけを代謝し、クロロフィルbは分解できない. そのため、Mg脱離酵素の過剰発現株ではクロロフィルbは 分解されずに残るとも予想される.しかし、Mg脱離酵素



図4:Mg脱離酵素変異体のシロイヌナズナ Mg脱離酵素を持たない変異体は老化が進み枯れる時期になっ てもクロロフィルを分解できないため緑色を維持(stay green)し ている(A).ただし、光合成は行っていない、逆に、Mg脱離酵 素を過剰発現した植物は、クロロフィルを分解してしまうため、 葉が緑色にならない(B).

を過剰発現したことによりクロロフィルaが分解されると ジャスモン酸やエチレンが合成される (Ito et al. 2022; Ono et al. 2019). その結果クロロフィルbを分解する遺伝子が 誘導されてクロロフィルbも分解される (Sato et al. 2018). 結果的に, Mg脱離酵素を過剰に発現するとクロロフィル a, クロロフィルbともに分解されて光合成装置が分解さ れる.

3.2 酵素の性質

クロロフィルのMgはピロール環の窒素と配位結合して いる.この配位結合は弱く、プロトンが豊富な酸性条件下 ではプロトンが窒素と結合し、Mgは外れてしまう.つま りクロロフィルからのMgの脱離は酸性条件下でも非酵素 的に進む反応である (Saga and Tamiaki 2012).そのためMg を外す酵素は植物には必要ないという考えもあった.SGR の遺伝子が同定された時も、これがクロロフィルの分解 にかかわる遺伝子であることは確かだが、クロロフィル を分解する酵素かどうかわからなかった (Park et al. 2007).



図5:Mg脱離酵素へクロロフィルが結合した予想図 灰色で示している構造がMg脱離酵素で、ドッキングシミュレーションにより水色のクロロフィルを結合 させている。結合部分を角度を変えて右の四角の枠内に拡大している。オレンジ色、黄色、緑色の棒状の 構造はD34, H32, D62である。D34は触媒部位の入り口にあり溶媒に接している。この模式図では、球で 示されているクロロフィルのMgがヒスチジンの窒素と配位し、D34, H32, D62とプロトンが送られ、D62 からテトラピロール環の窒素にプロトンが渡される仮説を示している。

実際、植物ホルモンの変異体などの中には、クロロフィ ルを分解できないものもある.最終的にはSGRの組み換 えタンパク質がクロロフィルからMgを脱離することが示 され、SGRがMg脱離酵素であることが確定した(Shimoda et al. 2016).Mg脱離酵素はクロロフィルaからMgを外す ことができるが、クロロフィルbやクロロフィルaの合成 前駆体であるクロロフィリドのMgを外すことはできない. 被子植物だけがSGRLと呼ばれるSGRと相同な遺伝子を持 ち、その組み換えタンパク質はクロロフィリドのMgも外 すことができる.

緑色植物の葉緑体内でのクロロフィルの合成,分解に かかわる酵素の遺伝子の中でMg脱離酵素が最後に同定さ れた遺伝子である.クロロフィル合成系で,Mgが挿入さ れるまでの酵素反応はへムの合成系と同じであり,大腸 菌など非光合成生物の情報が遺伝子の同定に利用できた. Mg挿入以降もクロロフィルaまでは光合成細菌と合成系が 同じであり,光合成細菌を利用して遺伝子が同定された. クロロフィル分解系の遺伝子は、クロロフィル分解中間 体を蓄積し光障害を起こしやすい変異体などを利用して 同定されていった.そうした中,Mg脱離酵素の遺伝子の 同定が最後になってしまったのは、組み換えタンパク質 を利用した酵素活性の検出が困難だったことも理由の一 つである.現在でも,植物のMg脱離酵素の組み換えタン パク質を大腸菌内で大量発現することには成功していない.

SGRと相同性の高い遺伝子が、緑色植物だけではなく、 枯草菌などのバクテリアのゲノム上にも見つかっている (Obata et al. 2019). ただし、これらのバクテリアは光合成 をせずクロロフィルを持っていない. 光合成細菌からは これまでのところSGRと相同な遺伝子は見つかっていな い. バクテリアの中でSGRと相同な遺伝子の役割は不明で ある. しかし、このバクテリアの組み換えタンパク質は クロロフィルのMgを脱離する活性を持ち、大腸菌を利用 して大量に調製することができる (Dey et al. 2022). その ため、バクテリアの持つ遺伝子(ここではMg脱離酵素ホモ ログと呼ぶ)の組み換えタンパク質を利用してMg脱離酵素 の性質が調べられた. Anaerolineaeの持つSGRホモログが バクテリアのSGRホモログの中でも植物とアミノ酸配列 の相同性が高かったため、このバクテリアのSGRホモログ が利用された.X線結晶構造解析によりMg脱離酵素ホモ ログの構造は明らかになっている (PDB Code: 7Y5Y). コ ンピューターを利用した植物のMg脱離酵素の予測構造は バクテリアのMg脱離酵素ホモログとほぼ一致している. ただし、基質特異性は植物のMg脱離酵素とは異なる。植 物のMg脱離酵素はクロロフィルaのみを基質とし,SGRL はさらにクロロフィリドaも基質とする.それに対してバ クテリアのMg脱離酵素ホモログはこれらの基質だけでは なくクロロフィルbやクロロフィルcも基質にできる.人工 基質を利用して基質特異性を詳細に調べたところ,基質 に電子吸引性の側鎖があると酵素活性が低下することが 明らかになった(Sato et al. 2024).また大きな側鎖を導入 しても酵素の基質になるが,A環と比べてB環に大きな側 鎖を導入すると酵素活性が低下することが明らかになり, この結果から,B環のほうが触媒部位に深く入ると推測 された.このような基質特異性の特徴は酵素と基質のドッ キングシミュレーションの結果とも一致した.

SGRの遺伝子群のアミノ酸の保存性と立体構造を利用 して、触媒にかかわると予想されるアミノ酸の変異体を 作製した. その結果Anaerolineae のMg脱離酵素ホモログの H32をアラニンに、D34、D62をアスパラギンに置換する と活性が失われることがわかり、これらのアミノ酸が触 媒にかかわることが示された (Dey et al. 2022) (図5). Mg 脱離酵素が二つのプロトンを供与することによって, Mg の脱離が起こると予想されていたので、Mg脱離酵素とク ロロフィルのドッキングシミュレーションの結果も踏ま えて、プロトンの供与体としてD62とH32が候補として挙 げられた.D34は触媒部位の入り口近くにあるため、葉緑 体内では脱プロトン化されていてプロトン供与体にはな れないと考えられる. それに対してH32はタンパク質の内 部、D62はさらに奥にある、H32、あるいはD62が供与す るプロトンはD34を介して溶媒から取り込まれている可能 性がある. さらに、基質のクロロフィルを触媒部位に取 り込む過程で、これらのアミノ酸がMgへの配位子として 機能している可能性もある. なお, ヘムの分解経路にお いても中心金属の鉄が遊離する段階がある.しかし、へ ムの分解では鉄を結合した状態でテトラピロール環が開 環し、その結果鉄が遊離する. そのため鉄を外すという 特異的な反応は必要ない. それに対して植物のテトラピ ロール環を開環する酵素(フェオフォルビドa酸素化酵素) はMgが外れたものだけを基質とするため、クロロフィル の分解系ではあらかじめMgを外しておく必要がある.

4. クロロフィルbの分解

4.1 クロロフィルbの還元

クロロフィルbの分解経路においてクロロフィルbは二 段階の還元反応を経てクロロフィルaに戻り、その後クロ ロフィルaと同じ経路で分解される.クロロフィルbがクロ ロフィルaに戻される理由は、クロロフィルb特有の構造を 維持した分解産物は、分解が途中で止まってしまうため である (Hörtensteiner et al. 1995). 具体的には、クロロフィ ルaはMg脱離酵素によってMgが外れたのちフィチル基が 除かれ、酸化的に開環されるが、この反応を触媒するフェ オフォルビドa酸素化酵素がクロロフィルbのように7位に フォルミル基を持つ分子は代謝することができない. その ためクロロフィルbを分解するためにはクロロフィルaに戻 す必要がある. また、クロロフィルaと比べてクロロフィ ルbの方が中心のMgがテトラピロール環に強く配位してい るため外れにくい. そのためクロロフィルaに戻すことに よってMg脱離酵素が働きやすくなる.

クロロフィルb還元酵素は、老化しクロロフィルを分解 する段階になってもクロロフィルbを分解できない変異体 の原因遺伝子 (Non Yellow Coloring 1; NYC1) として同定さ れた(Kusaba et al. 2007). さらに, クロロフィルb還元酵素 には, NYC1-Like (NOL)と呼ばれるオルソログが存在する. 緑藻から陸上植物まで、すべての光合成生物が両方の遺 伝子を持つ. イネではNYC1とNOLの一方が欠損するとク ロロフィルbの分解が抑制される (Sato et al. 2009). それに 対してシロイヌナズナではNYC1の欠損株はクロロフィル bの分解が抑制されるが、NOLの欠損はクロロフィルbの 分解にはあまり影響を与えない(Horie et al. 2009). また, シロイヌナズナではNYC1は老化段階で遺伝子の発現が誘 導されるのに対して、NOLの遺伝子の発現量は生育期間 を通して大きな変動はない、そのためシロイヌナズナで はNYC1が老化段階では主要なクロロフィルbを分解する 酵素であると考えられている.進化系統的には近傍のイ ネとシロイヌナズナでなぜこのような機能の分化が起き ているか不明である.緑藻などのクロロフィルb還元酵素 についてはまだ調べられていない.

クロロフィルb還元酵素の欠損株は、老化段階でもク ロロフィルbを分解できないため集光性アンテナ複合体 (LHC) IIが分解されずに残る(Kusaba et al. 2007).光化学 系のコア複合体はクロロフィルbが結合していないため欠 損株でも分解される.LHCIにはクロロフィルbが結合して いるが、コア複合体に結合していない状態では安定に存 在できないため分解される.クロロフィルb還元酵素の欠 損株はLHCIIが残るため、老化した葉緑体を電子顕微鏡で 観察するとグラナスのスタッキングが増加した構造が見ら れる.また、クロロフィルb還元酵素の欠損株では強光に さらされた時のクロロフィルb還元酵素の過剰発現株はクロロ フィルbの蓄積量が減少し、LHCIIも減少している(Jia et al. 2015). これらの結果はクロロフィルb還元酵素がLHCIIの 量の制御にかかわっていることを示している.

クロロフィルb還元酵素のNYC1とNOLの構造上の違い は、NYC1が膜貫通ドメインを持つのに対してNOLは持た ない点である. 膜貫通ドメイン以外のアミノ酸配列は相 同性が高いため、同じ触媒反応機構によりクロロフィルb を還元していると思われる. NYC1は膜タンパク質である ため、大腸菌を利用した組み換えタンパク質の合成がで きない. そのためNOLの組み換えタンパク質を利用して 酵素の性質が調べられている(Horie et al. 2009). NOLに対 してはクロロフィルbだけではなくクロロフィリドbも基 質になり、NADPHが還元剤として利用されている.

4.2 7-ヒドロキシメチルクロロフィルaの還元

クロロフィルbの7位のフォルミル基がクロロフィルb 還元酵素により還元されるとヒドロキシメチル基になり, そのクロロフィルは7-ヒドロキシメチルクロロフィルaと 呼ばれている.このヒドロキシメチル基はさらに7-ヒドロ キシメチルクロロフィルa還元酵素によってメチル基に還 元される.このような経路によりクロロフィルbはクロロ フィルaに戻る.7-ヒドロキシメチルクロロフィルa還元酵 素は7-ヒドロキシメチルクロロフィルa還元酵 素は7-ヒドロキシメチルクロロフィルa還元酵 素は7-ヒドロキシメチルクロロフィルaを蓄積するシロイ ヌナズナの変異体から同定された(Meguro et al. 2011).7-ヒドロキシメチルクロロフィルa還元酵素は鉄硫黄クラス ターとフラビンを補酵素として持つ.大腸菌により作製 した組み換えタンパク質の解析からフェレドキシンを還 元剤として利用することが明らかになっている.

7-ヒドロキシメチルクロロフィルa還元酵素の進化には 興味深い点がある.クロロフィルbを蓄積するすべての緑 藻や陸上植物はこの酵素を持っている. この酵素と相同 な遺伝子がシアノバクテリアにも存在し、その遺伝子は クロロフィルa合成にかかわっている (Ito and Tanaka 2014; Suehiro et al. 2021). 具体的には、クロロフィルa合成過程 で側鎖のビニル基をエチル基に還元している. シアノバ クテリアが真核生物に共生して葉緑体になり、 クロロフィ ルbを分解しなければならなくなった時、クロロフィルa合 成に使っていた酵素をクロロフィルbの分解に転用したと 思われる、そうしてこの酵素が行っていたビニル基から エチル基への還元反応は相同性のない別の遺伝子にコー ドされた酵素が行うようになった (Nagata et al. 2005). 実 際、シアノバクテリアのビニル基をエチル基に還元する 酵素は7-ヒドロキシメチルクロロフィルaを還元する活性 も持っている. さらにシアノバクテリアの酵素はメタン 産生古細菌の持つF420ヒドロゲナーゼ複合体とアミノ酸 配列や構造が似ている(Vitt et al. 2014).シアノバクテリア はこの遺伝子をメタン産生古細菌から取り込んでクロロ フィル合成に利用したと考えられる.つまり、メタン産 生古細菌の遺伝子をシアノバクテリアが取り込んでクロ ロフィル合成に使い、緑色植物はこの遺伝子をクロロフィ ル分解に転用したと考えられる.

5. クロロフィルの分解制御とその生理学的な役割

5.1 葉, 果実, 胚でのクロロフィル分解

植物は成長段階で三度クロロフィルを分解する場面が ある.一つ目は葉の老化段階である.これが最も目につき, クロロフィルの分解としては葉のクロロフィルの分解を 想定することが多い. 二つ目は果実のクロロフィルの分 解である. トマトやバナナなど. 農業上の有用性の観点 から果実のクロロフィル分解の研究も盛んである。三つ めは胚のクロロフィルの分解である. これは目につきに くい現象だが、種子の品質に大きな影響を与える、植物 は受精後の胚発生中に葉緑体を発達させ緑化する. 胚の 発生のためには多量のエネルギーが必要で、そのエネル ギー源となる有機物は母体から供給されるが、それを呼 吸によって分解しATPを合成するための酸素が足りない。 この酸素を作るために胚でも光合成をおこなっていると 考えられている (Rolletschek et al. 2002). 種子の成熟過程 で胚のクロロフィルが分解されないと、その種子は品質 が悪く発芽率が下がる (Li et al. 2017; Nakajima et al. 2012). Mg脱離酵素欠損株は葉,果実,胚,すべてのクロロフィ ル分解が抑制されおおむね同じ方法でクロロフィルを分 解していると考えられる. しかし様々な変異体を調べた 結果から、葉と胚に比べ、果実のクロロフィル分解はフィ チル基の除去の方法など他の組織とは異なることが示唆 されている (Guyer et al. 2014). また, 光化学系IIの反応中 心は常に分解と再生を繰り返しているため一定量のクロ ロフィルが供給されなければならない. この時, 分解さ れた光化学系IIから供給されたクロロフィルがそのまま再 利用されるのではなく、フィチル基がいったん取り除か れ,通常のクロロフィル合成系と同じ方法で新規に合成 されたクロロフィルが光化学系IIに取り込まれるとする考 えがある (Lin et al. 2016). このように, 再利用するために クロロフィルを分解するときは、老化した葉とは異なっ た方法でクロロフィルを分解している可能性がある.

5.2 クロロフィル代謝系の局在

葉緑体のチラコイド膜構造は、グラナコア、マージン、

ストロマラメラに分類できる. グラナコアに光化学系II が多くストロマラメラに光化学系Iが多いと考えられてい る. クロロフィル分解系の酵素はマージンに多く存在し ている (Fukura et al. 2021). チラコイド膜が湾曲している ため, 酵素が基質に近づきやすいためかもしれない. ま たクロロフィル分解系の酵素群が同じ場所に存在するこ とで,分解中間体を速やかに次の酵素に渡すことができ, 代謝系が効率よく進むと思われる. クロロフィル合成系 の酵素もマージンに局在することが示されている (Wang et al. 2016). マージンがクロロフィル代謝の場なのであれば, どのようにしてマージンに酵素や基質が局在するかが解 明されなければならない.

5.3 クロロフィルの分解と老化の進行の関係

クロロフィルは老化段階で分解されるため、クロロフィ ル分解系は老化によって活性化されると考えられる. 葉 の老化をどのようにとらえるかはいろいろな観点がある. 光合成という面からは,光合成を終え,葉緑体の内容物 を分解して他の器官に転流し始めると老化が始まったと みなすことができる.ただし、この場合もどのようにして 老化が始まるのかについて分子的な実体は不明な点が多 い、そのような中で、ジャスモン酸やエチレンなど老化 を促進する植物ホルモンがクロロフィル分解の誘導にか かわっているのは間違いないと思われる(Kuai et al. 2018). クロロフィル分解系の遺伝子の中で、Mg脱離酵素、クロ ロフィルb還元酵素,およびフェオフォルビドa酸素化酵素 が老化段階で誘導される代表的な遺伝子であり、老化の マーカー遺伝子としても使われている. これらの遺伝子 は植物ホルモンによってその発現が制御されている.ク ロロフィルaとクロロフィルbはそれぞれMg脱離酵素,ク ロロフィルb還元酵素によって分解が始まるため、それぞ れの分解は異なった制御が可能である.しかし、クロロ フィルaの分解が誘導されるとクロロフィルbの分解も誘 導される. クロロフィルaが分解されるとジャスモン酸や エチレンが誘導され、これらの植物ホルモンがクロロフィ ルb還元酵素の遺伝子の発現を誘導するためである (Ito et al. 2022; Ono et al. 2019). クロロフィル分解と植物ホルモ ンの合成は以下に述べるような関係を持つと考えている. クロロフィルaが分解されると光化学系複合体が分解され てチラコイド膜の分解も進み、その成分である脂肪酸が 遊離してこれを原料にジャスモン酸を合成できる.また, 老化促進にかかわるアブシジン酸も分解された光化学系 から遊離したカロテノイドから合成できる. このように クロロフィル分解によって引き起こされた光合成装置の

分解が,植物ホルモンの材料を提供していることになる. クロロフィルbはクロロフィルaに変換されてから分解さ れることも考えあわせ,クロロフィル分解の制御を理解 するためには,Mg脱離酵素によるクロロフィルaの分解が 重要になる.Mg脱離酵素の蓄積量の制御は,遺伝子の発 現の調節だけではなく,Mg脱離酵素への制御タンパク質 の結合による安定化やユビキチン化による分解制御が提 案されている(Wang et al. 2020; Wei et al. 2023).

6. 残された課題

最後に、クロロフィル分解について残された課題を挙 げたい.

6.1 光化学系IIのフェオフィチンの合成

酸素発生型の光合成をおこなう生物はすべて光化学系II の反応中心にフェオフィチンを持っている.フェオフィ チンはクロロフィルからMgが外れることによって作られ る. しかしシアノバクテリアはSGRと相同性のある遺伝 子を持っていない.光合成細菌や、紅藻、珪藻、褐藻な どもSGRと相同性のある遺伝子を持たないにもかかわらず Mgの取り除かれた(バクテリオ)フェオフィチンを光化学 系の成分として使っている. このフェオフィチンがどの ようにして作られたか不明である. 既知のクロロフィル 合成経路の酵素の性質を考えると、Mgが一度も挿入され ることなく既知のクロロフィル合成経路や類似の経路で フェオフィチンが合成されるとは想定しづらい.反応中 心を構成するD1タンパク質がMgを取り除く活性があれば 反応中心のフェオフィチンの存在が説明できる.しかし. 光合成細菌を含めて反応中心はアミノ酸置換体などを使 い精力的に調べられてきたにもかかわらず、フェオフィ チンを特異的に合成できない変異体は知られていない. また、D1タンパク質にはMgを外すためのプロトン供与体 となる酸性アミノ酸も見当たらない. そのためD1タンパ ク質がフェオフィチン合成に働く可能性は低いと思われ る.光化学系IIのフェオフィチンの合成は、クロロフィル 分解という範囲にとどまらず、光化学系の構築という観 点からも、残された重要な課題である、

6.2 緑藻のクロロフィル分解

緑藻クラミドモナスはMg脱離酵素の遺伝子SGRと相同 な遺伝子を持ち、その組み換えタンパク質はMg脱離活性 を示し、植物に導入すると確かにクロロフィルを分解す る (Matsuda et al. 2016). しかし、クラミドモナスのこの 遺伝子の破壊株で窒素欠乏によりクロロフィル分解を誘 導したところ、クロロフィルは正常に分解された (Chen et al. 2019). この時クロロフィル分解にかかわるフェオフォ ルビドa酸素化酵素の遺伝子は誘導されているが、Mg脱離 酵素の遺伝子は誘導されていない、このことは、クラミ ドモナスのMg脱離酵素がクロロフィル分解にはかかわっ ていないことを示唆している. この変異体は光化学系Ⅱが 少なくフェオフィチンの量が少ないことから、クラミド モナスではMg脱離酵素は光化学系IIのフェオフィチン合 成にかかわっていることが示唆された. その場合, 緑藻 では別の酵素がクロロフィルを分解していることになる. 珪藻なども培養条件によってクロロフィルが分解される が.上述のようにSGRと相同性のある遺伝子は持っていな い.クロロフィルを分解するためのMg脱離酵素がSGR以 外に間違いなく存在すると思われるが、その実体は不明 である.

6.3 LHCIIのクロロフィル分解の開始

上述の通り、シロイヌナズナのMg脱離酵素欠損株、ク ロロフィルb還元酵素欠損株のどちらにおいてもLHCIIは 分解されない (Chen et al. 2021; Horie et al. 2009). LHCIIが 分解されるためにはクロロフィルが外れてタンパク質分 解酵素がLHCIIのポリペプチドに接触できるようになる必 要があるためである(図2). この時, Mg脱離酵素欠損株は クロロフィルb還元酵素を持つため、LHCIIのクロロフィ ルbは分解されてもおかしくない. しかし、クロロフィル aだけではなくクロロフィルbも分解されず、LHCIIは安定 に残存する.クロロフィルb還元酵素欠損株も同じである. クロロフィルb還元酵素欠損株はMg脱離酵素を持つため一 部のクロロフィルaは分解されているはずである.これら の結果から、どちらのクロロフィルも他のクロロフィルが 分解されないとそれ以上はクロロフィルの分解が進まな いという閾値があると思われる.もっとも単純な仮説は、 LHCIIのクロロフィルaとクロロフィルbが一分子ずつ分解 された時だけさらにクロロフィルの分解が進むというも のである.光化学系の安定性という観点からも,光化学 系上のクロロフィルの分解の進行過程の解明は残された 課題である. またこれと関連し、クロロフィル分解にか かわる多くの酵素は水溶性のタンパク質である. これら のタンパク質が疎水的な環境にある基質にどのようにア クセスするか不明である.特にMg脱離酵素とクロロフィ ルb還元酵素の基質であるクロロフィルaとクロロフィルb は光化学系のタンパク質に強く結合し、また複合体の奥 に埋もれている. クロロフィル分解にかかわる酵素の触

媒部位入り口周辺は疎水的なアミノ酸が多く,疎水的な 環境にある基質にアクセスしやすいと思われる(Ando et al. 2024).しかし、さらに何らかの補助的な因子や環境が酵 素と基質の相互作用を促進している可能性がある.

6.4 バクテリア内でのMg脱離酵素ホモログの機能

植物のMg脱離酵素の遺伝子はバクテリアから水平伝播 したものだと推測されている. またバクテリアのMg脱離 酵素ホモログの組み換えタンパク質は確かにMgをクロロ フィルから外す活性を持つ (Obata et al. 2019). しかし, バ クテリア内でのMg脱離酵素ホモログの機能が分かってい ない. この遺伝子を持つものはバクテリアの中でも一部 のものにすぎず、それらのバクテリアに共通した特徴は 見当たらない. またゲノム上でこの遺伝子の前後の遺伝 子を調べたところ、異なる種間で共通した遺伝子やこの 遺伝子の機能を示唆する遺伝子は見つかっていない.バ クテリアが餌として取り込んだクロロフィルを分解して いる可能性があるが、ヘムの分解と同じようにテトラピ ロール環を開環してしまえばMgは自動的に外れる. その ためMgを外すための特別な酵素を準備する価値は少ない. バクテリア内でのMg脱離酵素ホモログの機能解明は植物 のクロロフィル分解系の進化の理解にもつながると思わ る未解決の問題である.

7. まとめ

クロロフィルの分解はクロロフィルタンパク質複合体 のタンパク質部分を分解してアミノ酸を回収するために 必要である. また、クロロフィル分解自体が植物ホルモ ンの合成を介して老化の進行に影響を与えていると考え られる. このように、クロロフィルは不要になったから 分解されるだけではなく、クロロフィルの分解自体が生 理学的な役割を担っている. 葉緑体内でのクロロフィル 分解にかかわる遺伝子はすべて同定された現在、クロロ フィル分解の研究はその制御に焦点が移っている。これ までのところクロロフィル分解のフィードバック制御は 報告されていない。また、タンパク質のリン酸化やレドッ クス制御、あるいは複合体の形成による活性制御につい ても顕著な例は知られていない.おおむね遺伝子の発現 制御によってクロロフィル分解系は制御されていると考 えられている. しかし変動する環境や葉緑体の複雑な内 部構造を反映した分解制御が今後明らかになる可能性も 考えられる. また、クロロフィル分解は養分の転流を通 して植物の成長にもかかわっているはずだが、クロロフィ

ル分解と植物の成長をつなぐ研究は十分には進んでいな い. 今後はこれらを含めて包括的なクロロフィル分解の 研究を進める必要がある.

参考文献

- Ando, S., Tanaka, R. and Ito, H. (2024) Activity examination of plant Mg-dechelatase and its bacterial homolog in plants and in vitro. *Plant Physiol. Biochem.* 215: 109073.
- Bryant, D.A., Hunter, C.N. and Warren, M.J. (2020) Biosynthesis of the modified tetrapyrroles-the pigments of life. J. Biol. Chem. 295: 6888-6925.
- Chen, Y., Shimoda, Y., Yokono, M., Ito, H. and Tanaka, A. (2019) Mg-dechelatase is involved in the formation of photosystem II but not in chlorophyll degradation in Chlamydomonas reinhardtii. *Plant J.* 97: 1022-1031.
- Chen, Y., Yamori, W., Tanaka, A., Tanaka, R. and Ito, H. (2021) Degradation of the photosystem II core complex is independent of chlorophyll degradation mediated by Stay-Green Mg2+ dechelatase in Arabidopsis. *Plant Sci.* 307: 110902.
- Dey, D., Nishijima, M., Tanaka, R., Kurisu, G., Tanaka, H. and Ito, H. (2022) Crystal structure and reaction mechanism of a bacterial Mg-dechelatase homolog from the Chloroflexi Anaerolineae. *Protein Sci.* 31: e4430.
- Fukura, K., Tanaka, A., Tanaka, R. and Ito, H. (2021) Enrichment of chlorophyll catabolic enzymes in grana margins and their cooperation in catabolic reactions. *J. Plant Physiol.* 266: 153535.
- Guyer, L., Hofstetter, S.S., Christ, B., Lira, B.S., Rossi, M. and Hörtensteiner, S. (2014) Different Mechanisms Are Responsible for Chlorophyll Dephytylation during Fruit Ripening and Leaf Senescence in Tomato. *Plant Physiol.* 166: 44-56.
- Horie, Y., Ito, H., Kusaba, M., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2009) Participation of chlorophyll b reductase in the initial step of the degradation of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes in Arabidopsis. J. Biol. Chem. 284: 17449-17456.
- Hörtensteiner, S., Vicentini, F. and Matile, P. (1995) Chlorophyll breakdown in senescent cotyledons of rape, Brassica napus L.: Enzymatic cleavage of phaeophorbide a in vitro. *New Phytol.* 129: 237-246.
- Ito, H., Saito, H., Fukui, M., Tanaka, A. and Arakawa, K. (2022) Poplar leaf abscission through induced chlorophyll breakdown

by Mg-dechelatase. Plant Sci. 324: 111444.

- Ito, H. and Tanaka, A. (2014) Evolution of a New Chlorophyll Metabolic Pathway Driven by the Dynamic Changes in Enzyme Promiscuous Activity. *Plant Cell Physiol.* 55: 593-603.
- Jia, T., Ito, H. and Tanaka, A. (2015) The Chlorophyll b Reductase NOL Participates in Regulating the Antenna Size of Photosystem II in Arabidopsis Thaliana. *Procedia Chemistry* 14: 422-427.
- Kuai, B., Chen, J. and Hörtensteiner, S. (2018) The biochemistry and molecular biology of chlorophyll breakdown. *J. Exp. Bot.* 69: 751-767.
- Kusaba, M., Ito, H., Morita, R., Iida, S., Sato, Y., Fujimoto, M., et al. (2007) Rice NON-YELLOW COLORING1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence. *Plant Cell* 19: 1362-1375.
- Li, Z., Wu, S., Chen, J., Wang, X., Gao, J., Ren, G., et al. (2017) NYEs/SGRs-mediated chlorophyll degradation is critical for detoxification during seed maturation in Arabidopsis. *Plant J.* 92: 650-661.
- Lin, Y.-P., Wu, M.-C. and Charng, Y.-y. (2016) Identification of a chlorophyll dephytylase involved in chlorophyll turnover in Arabidopsis. *Plant Cell* 28: 2974-2990.
- Matsuda, K., Shimoda, Y., Tanaka, A. and Ito, H. (2016) Chlorophyll a is a favorable substrate for Chlamydomonas Mg-dechelatase encoded by STAY-GREEN. *Plant Physiol. Biochem.* 109: 365-373.
- Meguro, M., Ito, H., Takabayashi, A., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2011) Identification of the 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase of the chlorophyll cycle in Arabidopsis. *Plant Cell* 23: 3442-3453.
- Nagata, N., Tanaka, R., Satoh, S. and Tanaka, A. (2005) Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in Arabidopsis thaliana and implications for the evolution of Prochlorococcus species. *Plant Cell* 17: 233-240.
- Nakajima, S., Ito, H., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2012) Chlorophyll b reductase plays an essential role in maturation and storability of Arabidopsis seeds. *Plant Physiol.* 160: 261-273.
- Obata, D., Takabayashi, A., Tanaka, R., Tanaka, A. and Ito, H. (2019) Horizontal Transfer of Promiscuous Activity from Nonphotosynthetic Bacteria Contributed to Evolution of Chlorophyll Degradation Pathway. *Mol. Biol. Evol.* 36: 2830-2841.

- Ono, K., Kimura, M., Matsuura, H., Tanaka, A. and Ito, H. (2019) Jasmonate production through chlorophyll a degradation by Stay-Green in Arabidopsis thaliana. *J. Plant Physiol.* 238: 53-62.
- Park, S.Y., Yu, J.W., Park, J.S., Li, J., Yoo, S.C., Lee, N.Y., et al. (2007) The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. *Plant Cell* 19: 1649-1664.
- Rolletschek, H., Borisjuk, L., Koschorreck, M., Wobus, U. and Weber, H. (2002) Legume embryos develop in a hypoxic environment. J. Exp. Bot. 53: 1099-1107.
- Saga, Y. and Tamiaki, H. (2012) Demetalation of chlorophyll pigments. *Chemistry & Biodiversity* 9: 1659-1683.
- Sato, R., Ito, H. and Tanaka, A. (2015) Chlorophyll b degradation by chlorophyll b reductase under high-light conditions. *Photosynth. Res.* 126: 249-259.
- Sato, S., Hirose, M., Tanaka, R., Ito, H. and Tamiaki, H. (2024) In vitro demetalation of central magnesium in various chlorophyll derivatives using Mg-dechelatase homolog from the chloroflexi Anaerolineae. *Photosynth. Res.*
- Sato, T., Shimoda, Y., Matsuda, K., Tanaka, A. and Ito, H. (2018) Mg-dechelation of chlorophyll a by Stay-Green activates chlorophyll b degradation through expressing Non-Yellow Coloring 1 in Arabidopsis thaliana. *J. Plant Physiol.* 222: 94-102.
- Sato, Y., Morita, R., Katsuma, S., Nishimura, M., Tanaka, A. and Kusaba, M. (2009) Two short-chain dehydrogenase/ reductases, NON-YELLOW COLORING 1 and NYC1-LIKE, are required for chlorophyll b and light-harvesting complex II degradation during senescence in rice. *Plant J.* 57: 120-131.
- Sato, Y., Morita, R., Nishimura, M., Yamaguchi, H. and Kusaba, M. (2007) Mendel's green cotyledon gene encodes a positive regulator of the chlorophyll-degrading pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U. S. A. 104: 14169-14174.
- Shimoda, Y., Ito, H. and Tanaka, A. (2016) Arabidopsis STAY-GREEN, Mendel's green cotyledon gene, encodes magnesium-dechelatase. *Plant Cell* 28: 2147-2160.
- Suehiro, H., Tanaka, R. and Ito, H. (2021) Distribution and functional analysis of the two types of 8-vinyl reductase involved in chlorophyll biosynthesis in marine cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 203: 3565-3575.
- Tanaka, A. and Ito, H. (2024) Chlorophyll Degradation and Its Physiological Function. *Plant Cell Physiol.*
- Vitt, S., Ma, K., Warkentin, E., Moll, J., Pierik, A.J., Shima, S., et al. (2014) The F420-reducing [NiFe]-hydrogenase complex

from Methanothermobacter marburgensis, the first X-ray structure of a group 3 family member. *J. Mol. Biol.* 426: 2813-2826.

- Wang, L., Kim, C., Xu, X., Piskurewicz, U., Dogra, V., Singh, S., et al. (2016) Singlet oxygen- and EXECUTER1mediated signaling is initiated in grana margins and depends on the protease FtsH2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113: E3792-E3800.
- Wang, P., Richter, A.S., Kleeberg, J.R.W., Geimer, S. and Grimm, B. (2020) Post-translational coordination of chlorophyll biosynthesis and breakdown by BCMs maintains chlorophyll homeostasis during leaf development. *Nat. Commun.* 11: 1254.
- Wei, W., Luo, Q., Yang, Y.y., Wu, C.j., Kuang, J.f., Chen, J.y., et al. (2023) E3 ubiquitin ligase MaRZF1 modulates high temperature-induced green ripening of banana by degrading MaSGR1. *Plant, Cell & Environment*.

植物の越冬と凍結抵抗性について

荒川 圭太¹⁾, 鈴木 伸吾²⁾

2024年12月10日受付, 2025年1月8日受理

植物は夏から秋にかけて成長が停止し,休眠を始める. さらに秋から冬にかけて低温馴化過程を経 て凍結抵抗性が高まり,越冬が可能となる.また,冬から春にかけて気温が上昇するにつれて脱馴化 過程を経ることで凍結抵抗性が低下すると共に,開芽・開葉など成長が始まる.越冬する植物にとっ て必要な低温馴化や凍結抵抗性の上昇などの現象は休眠過程と並行して起こるもので,多くの生理反 応が関与する.本章では,越冬する植物にとって必要な低温馴化や凍結抵抗性などの生理機構や凍結 に対する細胞の応答(凍結挙動)について概説する.

Title: Freezing Resistance of Overwintering Plants

Keita Arakawa¹, Shingo Suzuki²

Plants gradually stop growing in late summer and enter dormancy. From autumn to winter, plants undergo a cold acclimation process, which increases their freezing resistance, enabling them to survive the winter. As the temperature rises from winter to spring, plants undergo a deacclimation process, which reduces their freezing resistance, and they also begin to grow, with buds opening and leaves expanding. Cold acclimation and increase in freezing resistance, which are necessary for overwintering plants, occur in parallel with the dormancy process and involve a number of physiological responses. This chapter outlines the physiological mechanisms including cold acclimation and freezing resistance that are necessary for overwintering plants and the cellular response of plants to freezing.

キーワード:植物,低温馴化,凍結挙動,凍結抵抗性 cold acclimation, freezing behavior, freezing resistance, plants

1. 緒言

成長に適した春や夏の季節と成長に適さない秋や冬の 季節を交互に迎えるような地域に生息する植物は、こう した季節の変化に見合った生活環を示す.例えば一年生 植物であれば、春に発芽した芽生えが成熟し、冬を迎え る前に種子散布を終える.二年生植物であれば、実生が

連絡先

荒川 圭太
 北海道大学 大学院農学研究院 樹木生物学研究室
 〒 060-8589 札幌市北区北 9 条西 9 丁目
 Tel: 011-706-2516
 Email: keita-ar@agr.hokudai.ac.jp

越冬する際に春化し, 翌春に生殖成長することで開花結 実する. 多年生植物の木本植物であれば, 発芽したあと は複数年にわたって成長を続け, 成熟してから種子散布 を行うことになる. 日本のように明確な季節変化がみら れる環境では, 夏から秋へと季節が移り変わるにつれて 日長は次第に短くなり, 外気温は徐々に低下するので, このような気候の変化が端緒となり, 越冬する植物は成

- 北海道大学大学院農学研究院 Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University Sapporo, JAPAN
- 北海道大学 大学院歯学研究院 学術支援部 Faculty of Dental Medicine, Hokkaido University Sapporo, JAPAN

長を止める一方で,低温馴化過程を経ることで凍結抵抗 性を上昇させ,厳寒期を乗り切ることが可能となる.本 章では,越冬して翌春に成長を再開するために必要な低 温馴化や凍結抵抗性といった植物の生理機能に関して概 説する.

植物の越冬

2.1 越冬する環境(条件)について

越冬と一言で表現しても、どのような発達段階で、どの ような状態で冬を迎えるかは植物によって様々である. そ のため、越冬に関する植物の生理・生態について詳しく知 ることは、植物の越冬能力を理解する上でとても重要なこ とである (酒井 1995). 例えば、越冬する植物の発達段階(形 態)として、種子や芽生え、幼植物体 (実生、幼木)、成熟 個体などが挙げられる.また、越冬する状況(環境条件)と しては,水中や土壌中,落葉層に埋もれている場合,積雪 層の下に埋もれる場合, 寒風にさらされている場合など, 様々な状況がある. 土壌中や積雪層の深くに埋もれるよう な場合には、外気温が低下する影響を直接的に受けにくい 環境といえる.一方,積雪量が少ない地域や風が強くて雪 が堆積しにくいような場所、また積雪層上面よりも高い場 所に位置する組織・器官などは、気温の影響を直接受けや すい環境といえる. そのため, 水中や土壌深くに存在する 個体や組織は凍らない程度の低温で、また積雪層下に埋 まってしまうような植物個体は比較的高い氷点下温度で, さらに積雪層より高い場所に位置する植物個体や組織は厳 しい凍結温度で、それぞれ越冬することになる.しかも、 深い積雪層や被陰環境は、同時に日照量にも影響を及ぼし うる. そのため, 融雪時期の気温上昇の程度や植物が受け る光強度などは、越冬する植物の生育環境や生存率にも影 響を及ぼす環境要因とみなすことができる、しかも、秋か ら冬,冬から春のような季節の移行期には,気温や降雪量 の変化は毎年同じではないため、例年より気温低下が遅れ たり時として一過的に大きい気温低下が起きたりすること で植物の成長(停止や再開)や低温馴化・脱馴化の程度に 影響が出るため、霜害や凍害を被る可能性にも影響が生じ る.一方、厳寒期では、凍結抵抗性が十分に発揮された時 期であるため、その凍結抵抗性の最大値に応じて凍霜害の 程度が異なる. そのため、低温馴化や脱馴化の進行程度と 生育環境の変動の大きさによって傷害の有無、程度が影響 される. このような観点から, 近年顕在化している気候変 動による秋~冬、冬~春の極端な気温変化などが生産性に 大きく影響することが予想される.



図1:冬コムギ緑葉の凍結傷害について.

低温馴化した冬コムギの緑葉切片を酸性条件下で凍結処理もしくは 過冷却処理した後で生存率を測定して、酸性雪ストレスの影響をシミュ レーションした.凍結,植氷して凍結処理した試験区;過冷却,植氷 せずに過冷却を維持した試験区;水,超純水を添加した試験区;酸: 3 mM 硫酸溶液 (pH 2) を添加した試験区. この図は, Inada et al. (2006) *Plant Cell Physiol.* 47: 504–512 のFig. 3を改変して転載した.

2.2凍結抵抗性の評価と凍結傷害

植物が有する凍結抵抗性の能力を超えるほど低い氷点 下温度まで冷却されて凍結すると、凍結傷害を被る(酒井 1995, Sakai and Larcher 1987). このように過度の凍結スト レスを受けると、例えば、凍結融解後に開芽や開葉、再成 長がみられなくなったり、葉が褐変して枯死・落葉したり する. 植物の凍結抵抗性を調べる際, 多くの研究者が実施 する試験では、様々な設定温度まで凍結させた組織を融解 させた後,植物の生存率を検定する.個体レベルで生存率 を検定する場合、凍結融解後の植物個体の再成長が対照区 (未凍結試料)と比べてどれだけ低下したのかを調べるこ とが一般的である.再成長の割合をどのように判断するの かは、試験の目的や試験に使用した植物試料の発達状態な どによって異なるが、開芽や開葉の割合を調べたり、個体 の背丈や重量などの成長量を調べたり、種子生産量を調べ たりするなど、研究目的に応じて選択される.この場合、 生存率の検定を終えるまでに相応の時間を要する. そのた め, 生存率の検定までの時間を節約して, 組織や細胞レベ ルで生存率を検定する事例も多々みられる. 凍結融解に よって致死的な傷害を被ると、細胞膜を筆頭に生体膜の機 能損傷が生じるため、細胞の選択的透過性が解消されてし まう. そのため, 凍結融解後の組織を一定量の水に浸して 緩やかに振とうするとイオンなどの細胞内容物が漏出して くる. そこで組織外の水の電気伝導率を測定し、対照区(未 凍結試料)と比べてどれだけ電気伝導率が高まったかで傷 害率を算出し、その逆数でもって生存率をもとめることが



図2:凍結融解後の冬コムギ緑葉に対する光照射の影響について. 低温馴化した冬コムギ実生に3 mM 硫酸水溶液 (pH 2) を添加して酸性条件下で凍結融解する ことで酸性雪ストレスをシミュレーションした後,成熟葉 (A) と若葉 (B) からそれぞれクロ ロフィル粗抽出画分を調製し,吸収スペクトルを測定して対照区 (超純水で凍結融解した試 料) 由来のものと比較した. 黒色のグラフ,試験区 (pH 2.0の硫酸水溶液を使用した試料);灰 色のグラフ,対照区 (二酸化炭素を飽和させてpH 5.6にした超純水を使用した試料). この図は, Inada et al. (2007) *Environ. Sci.*, 14 (Suppl): 53-71のFig. 1を改変して転載した.

できる(Uemura and Yoshida 1984). また、組織や細胞の生 存率を評価するため、生命力のひとつの指標として組織や 細胞が有する還元力を指標とする方法も利用されており、 還元力がどの程度残存しているかを調べることで生存率を 算出することが可能である(Steponkus and Lanphear 1967). このような還元力を利用する方法では、還元力を利用して 組織を染色することができるので、どの組織が健全性を 保っているかを視覚的に確認することもできる. 組織が染 色された後、有機溶媒を使用することで還元された化合物 を組織から抽出することで定量化もできる.

同様に細胞レベルで生存率を測定する方法として、細 胞に基質を投与して酵素活性によって得られる化合物の有 無でもって細胞の生死を判断するものもある。例えば、二 酢酸フルオレセインを細胞に投与すると、細胞内のエステ ラーゼ活性によって分解されて蛍光を発するようになる (Murai and Yoshida 1998). また、細胞が致死的な傷害を被 るとエステラーゼ活性を損なうので蛍光を発しなくなる. そのため、蛍光を発する細胞の有無で生死判定が可能とな る. 草本植物の場合、プロトプラストを調製しやすいため、 モデル実験として用いることがある.プロトプラストの場 合,細胞壁が無いので膨張して破裂しないよう細胞の浸透 圧よりもわずかに高張な溶液に細胞を懸濁しているため. 外液に加える溶質(主に糖アルコールのような適合溶質) が凍害保護効果を示して実際よりも高い凍結抵抗性を示す のではないかと心配される場合がある. そのため、利用す る植物材料に応じて組織とプロトプラストの間で凍結抵抗 性に違いがないかを事前に確かめて細胞の性質を知ってお く必要がある.実際,プロトプラスト化しても凍結抵抗性 が組織のものと同程度であった事例が知られている場合に は,プロトプラストも植物組織と同様に扱いやすいものと 考えられている (Gordon-Kamm and Steponkus 1984).一方 で,プロトプラスト化することで凍結抵抗性が高まってい た事例も知られている (Murai and Yoshida 1998).この場合 には,細胞壁の除去による影響や懸濁液に利用した浸透圧 調整用の溶質による影響などが原因のひとつとして考えら れるので,組織切片の細胞間隙にプロトプラスト懸濁用の 溶液を満たしたものを用いて凍結抵抗性を測定するなどし て,プロトプラストを懸濁する高張な溶液が凍結抵抗性に 及ぼす影響を事前に評価しておく必要がある.特に,溶質 による細胞膜の保護効果によって凍結による膜傷害を軽減 している可能性が十分に考えられる.

元来,細胞外凍結が進行することで発生し始める凍結傷 害は,細胞膜の不可逆的な構造変化の発生頻度と相関性が みられることや,凍結傷害が生じると細胞から電解質漏出 が起こることなどから,細胞膜が凍結傷害の初発部位と考 えられてきた(Steponkus 1984).そのため,凍結傷害が発 生する細胞膜の健全性を維持することが凍結抵抗性には重 要であるという考え方に則って,低温馴化過程における細 胞膜の構造的・機能的変化に注目して研究が行われてきた 経緯がある.厳しい気温低下にさらされて細胞外凍結が過 度に進むと,凍結脱水によって細胞が著しく収縮変形した り(Steponkus and Webb 1992),細胞外水晶に挟まれて押し つぶされたりする (Fujikawa 1995). これによって細胞膜 とほかの生体膜とが異常接近した部位が生じると, 脂質二 重膜同士で相互作用を起こして局所的に膜融合を起こすな ど,不可逆的な構造変化が生じてしまう. それによって細 胞膜は機能を喪失し, 膜傷害が発生すると考えられている.

当研究グループでは、以前、酸性降下物を含む雪(すな わち酸性雪)による影響を、冬コムギを使ったシミュレー ション実験で調べたことがある.酸性雪の場合,積雪層の 下層では再結晶化によって氷晶表面や間隙に酸性降下物が 濃縮され、積雪層に埋まる植物は凍結濃縮された酸性降下
 物と比較的長期にわたって接触する可能性が高くなるもの と考えられた. そこで, 低温馴化させた冬コムギ実生を用 い、硫酸の希釈水溶液を凍結してから製氷機で削って得ら れた細氷で実生を覆ったり、少量の硫酸の希釈水溶液と共 に実生や緑葉切片を凍結させたりすることで酸性雪ストレ スをシミュレーションし、その影響を評価した. 例えば、 超純水で作った細氷で人為的に低温馴化させた冬コムギ実 生を覆ったものを対照区とし、3 mM 硫酸水溶液 (pH 2) で 作った細氷で覆ったものを試験区とし、両者を-4℃のフ リーザーで3日間処理し、融解後に実生を通常の生育条件 で栽培したところ、数日後には試験区の成熟葉で局所的に 枯死した部位が観察され始め、3週間後には対照区に比べ て成長量が顕著に低下していた. 3 mM 硫酸水溶液 (pH 2) というと結構な酸性度だと感ずるが、凝固点降下の原理に したがって考えると、濃度の異なる溶液を同じ温度まで凍 結させた場合,残存する未凍結な硫酸水溶液は凝固点に達 するまで濃縮されるはずなので、処理前に硫酸水溶液の濃 度が異なっていても、同じ氷点下温度で処理する限り、凍 結濃縮された硫酸溶液の濃度は同じになるはずである. そ の代わり、凍結濃縮された硫酸水溶液の体積はpH 2の処理 区の方がpH 4の処理区の100倍多い計算になる. そのため, 雪のpHが低いほど、氷晶と氷晶との間で凍結濃縮された 硫酸溶液の量が多くなるので、植物が濃縮された硫酸水溶 液と接触する頻度や範囲が多くなることが考えられる. こ のような凍結濃縮は酸性雪に限ることではなく、塩や重金 属などでも同様のことが起こりうるため、氷点下温度で水 が凍ることによって凍結濃縮された溶存物質の影響が融解 後に顕在化することによる負の影響は低温下特有のストレ ス因子として位置付けられる.また,緑葉切片にpH 2の硫 酸水溶液を添加し、植氷せずに-12℃まで過冷却させても、 超純水を添加した対照区と比べ、昇温後の試料の生存率は ほとんど低下しなかった.一方,植氷して酸性条件下で凍 結させると,対照区と比べて融解後の試料の生存率は顕著 に低下した(図1). このことは、単なる気温低下という環

境刺激に比べ,それによって生じるアポプラストの水の凍 結の方が植物細胞の凍結脱水や収縮変形を誘発し,共存す る有害な溶質を凍結濃縮しうるため,越冬する植物にとっ ては負荷が大きいことを示唆している (Inada et al. 2006).

また,凍結による損傷を受けた後で光照射されると,二 次的な酸化傷害が発生して被害が拡大することはよく知ら れている.これは光合成器官を有する緑色植物にとって不 可避な問題ともいえる. すなわち, 凍結融解によって生存 率(=生命力)の低下した緑葉が太陽光を浴びることで、消 費しきれなかった光エネルギーによって活性酸素種が発生 し、それによってさらなる緑葉の傷害へと繋がることが予 想される.筆者らは、冬コムギ実生に対してpH 2の酸性条 件下で凍結融解処理を終えてから、光照射の有無の条件設 定のもとで10℃にて実生を栽培して酸性雪ストレス処理に よる影響を調べたところ, 超純水で凍結融解した対照区や 酸性条件下で凍結融解した直後から暗処理をおこなった試 験区の成熟葉の応答とは異なり、融解直後から光照射をお こなった試験区の成熟葉では12時間以内に光化学系IIの最 大量子収率 (Fv/Fm) が低下しており, 24時間以内に乾燥 重量や相対含水率も低下していた (Inada et al. 2007). 成熟 葉から得られたクロロフィル粗抽出画分の吸収スペクトル を調べると、酸性条件下での凍結融解直後からクロロフィ ル分解が生じた徴候が観察されたため(図2),その後の 光照射によって成熟葉では二次的な酸化傷害が発生して損 傷が大きくなった可能性が示唆された (Inada et al. 2007).

2.3. 低温馴化

毎年冬を迎える多年生植物は、毎年成長と休眠のサイク ルを繰り返す.すなわち、気温が高く成長に向いている 時期と、気温が低く成長に不向きな時期が交互に訪れる. そのため、温帯や亜寒帯で自生する越冬植物は成長期と 休眠期を交互に迎える.このような植物は、秋から冬に かけて日照時間が短くなるにつれ成長速度が低下して休 眠期へと移行する.それと並行するように、気温が低下 するにつれて低温馴化が進み、植物の凍結抵抗性は向上 する.休眠と凍結抵抗性の向上はほぼ同時期に生じるが、 休眠と低温馴化は異なる生理学的プロセスである (Welling and Palva 2006).

低温馴化過程では様々な遺伝子の発現が伴う現象で ある.近年の網羅解析 (オミクス解析) によって,遺伝 子転写産物レベル (トランスクリプトーム) (Fowler and Thomashow 2002),遺伝子翻訳産物 (タンパク質) レベル (プロテオーム) (Kawamura and Uemura 2003),代謝産物レ ベル (メタボローム) (Guy et al. 2008) などでいろいろな植 物の低温馴化過程が調べられているように、様々なレベル で変化が生じることが明らかにされている.これらの網羅 解析結果からも明らかなように、低温馴化過程では様々な 変化が生じることで、結果的に凍結抵抗性が向上して植物 は越冬が可能となる.

オーソドックスな研究では, 越冬する草本植物として 秋蒔きのコムギ (Triticum aestivum) (Tanino and McKersie 1985) やライムギ (Secale cereale) (Uemura and Steponkus 1994), ペレニアルライグラス (Lolium perenne) (Abeynayake et al. 2015) などのようなイネ科の単子葉植物のほか、ア $\mathcal{W} \supset \mathcal{T} \mathcal{W} \supset \mathcal{T}$ (*Medicago sativa*) (Mohapatra et al. 1987), セイヨウアブラナ (Brassica napus) (Kubacka-Zębalska and Kacperska 1999), シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) (Gilmour et al. 1988), バレイショ (Solanum tuberosum) (Palta et al. 1993) などの双子葉植物を利用した研究が多くみら れた. この他, 木本植物ではヤマグワ (Morus bombycis) (Yoshida 1984) や*Cornus* (ミズキ属) (Li et al. 1966), モモ (Prunus persica) (Buchanan et al. 1976) などを用いた研究が 知られている.例えば、季節変化に伴う細胞成分の組成変 化を精査して,低温馴化による凍結抵抗性の向上と正の相 関性を示す主成分に着目する研究がいくつかみられた. そ の主たる成分が凍結傷害の初発部位と考えられている細 胞膜の膜脂質 (Uemura and Steponkus 1994) や膜タンパク質 (Kawamura and Uemura 2003) を始め、可溶性糖やLEA (Late Embryogenesis Abundant) タンパク質のような熱可溶性タン パク質群などである (Fujikawa et al. 2006).

可溶性糖については、適合溶質として機能するといわ れている. 最も典型的な低温誘導性の可溶性糖はスクロー スであり、多くの植物種で多量に蓄積するものとして知ら れている. このほか, 多量ではないが, ラフィノースやス タキオースのようなラフィノース族オリゴ糖も低温誘導性 の可溶性糖として検出されている. これらの糖は、種類に かかわらず多量に蓄積することで細胞内の溶質濃度が高ま り、凝固点降下度が増すという利点がある、このほか、凍 結脱水時には細胞内の自由水の量がかなり減少するため. これらの可溶性糖に水和している結合水が細胞内高分子の 構造安定化 (凍害保護) に寄与するともいわれている. ま た、リポソームなどを利用した実験系では、膜脂質表面に 結合した糖がガラス化を起こすことで、リポソーム同士の 膜融合を阻害することも報告されている. このように、適 合溶質としての可溶性糖は、濃度が高ければ浸透圧調節に 関与するし、濃度が高くなくても保護物質として安定化に 関与するものと考えられている.

また、細胞壁を構成する多糖類の組成の変化を示唆する

結果がいくつかの植物種で示されている.これらの変化は、 細胞壁の化学的、物理的性質に影響を及ぼすため、特に細 胞外凍結する細胞において、細胞壁の強度が増すことで極 度の細胞の変形が防がれ、細胞膜と生体膜との間の相互作 用を抑制して細胞膜の凍結傷害の発生頻度を低下させる可 能性が考えられる. この他にも、細胞壁内部での氷晶の伝 播の程度は細胞間隙や細胞壁内部の微小な空隙の大きさに 依存することが考えられる. 細胞間隙や細胞壁内部に分布 するペクチンは、メチル化修飾されているとカルシウムを 介したペクチン間での架橋構造が形成できないので物質の 透過性が向上すると共に細胞壁の柔軟性が向上するといわ れている. さらに、ペクチンのガラクタン含量を低下させ ると細胞壁の強度が低下傾向を示すだけでなく、凍結抵抗 性も低下することがシロイヌナズナの形質転換体を用いて 実証されている (Takahashi et al. 2024). また,器官外凍結 する冬芽では、凍結感受性の高い原基と細胞外氷晶を蓄積 する空隙・細胞間隙との間に位置する組織において細胞壁 や細胞間隙にペクチンを堆積して、原基組織への細胞外氷 晶の伝播を抑制する役割を担っているとも考えられている (Kuprian et al. 2017). そのような組織では冬を迎える前ま でにペクチンの蓄積が進む事例も知られており、ペクチン の化学組成や構造特性が凍結挙動に与える影響はとても興 味深い.

このほか、低温馴化過程ではLEAタンパク質群の蓄積 も知られている (Thomashow 1999, Welling and Palva 2006). これらは、植物組織から得られるタンパク質の粗抽出液を 沸騰水中で10~20分間くらい加熱しても熱変性による不 溶化を起こしにくいという性質を表す熱可溶性タンパク質 として称されている.この性質を示すものの多くは、親水 性の高いものや低分子で単純な構造を有するタンパク質が 多いとされている.これらのタンパク質を調べると、LEA タンパク質やHSPs (Heat Shock Proteins) の一部などが検出 される. LEAタンパク質であれば、細胞内の高次構造を有 する成分 (タンパク質や膜脂質) などを保護・安定化する ような作用を示す報告が多い。HSPsであれば、分子シャ ペロン活性によって構造変化の防止や変性タンパク質の回 復に貢献するものと予想される.いずれも植物細胞の凍結 脱水時に細胞内成分の機能損傷を防ぐことで細胞内代謝系 の酵素群や膜輸送系などの活性を維持するものとして位置 付けられる (Fujikawa et al. 2006).

また,細胞膜の脂質(特にリン脂質)の組成変化に注 目すると,凍結脱水によって細胞膜と他の生体膜とが異 常接近する場合において,膜脂質の極性基に結合水が多 いことは,膜脂質同士の相互作用を抑制するのに都合が 良い性質といえる. 実際, 極性基への結合水の多い膜脂 質が低温馴化過程で増加する傾向にあった (Uemura and Steponkus 1999).

さらに、抗酸化に関与する様々な成分も低温誘導性を 示すため、酸化ストレス防止に貢献する.特に、凍結傷害 を受けた組織では、光照射によって発生する活性酸素種に よって凍結傷害が助長される.これは、いわゆる光傷害と 同じような症状のため、抗酸化酵素などの誘導は、二次的 な酸化傷害の抑制に効果的である.また、前述したような 保護や安定化に関わる成分の増加は、結果的に細胞全体の 保護・安定化に貢献することが期待される.さらに、光合 成組織において光合成活性はストレス感受性が高い因子な ので、凍結傷害の指標とみなす実験系も確立されている. 光合成組織のクロロフィル励起能を調べることで地上部の 凍結によるダメージを評価する研究も知られており、凍 結抵抗性の指標としても用いられる事例がある(Ehlert and Hincha 2008).

2.4. 凍結挙動

気温が低下して周囲の水が凍結するような時、植物細 胞の凍結に対する応答の様式は、気温の低下に応じて平衡 的に脱水する「細胞外凍結」と、気温が低下しても脱水しな いもしくは脱水量が気温の低下に伴っていない「深過冷却」 の2つのタイプに大きく分類される (Fujikawa 2006). 多 くの草本植物や樹木の樹皮の細胞のように多くの植物細胞 で見られるのは細胞外凍結である。氷点下温度に気温が低 下した場合、土壌や植物体表面などで水分が凍結すること がきっかけとなって植物体内の細胞外(アポプラスト)の水 も凍結が始まる. 土壌微粒子などの塵芥や氷核細菌などが 植物体表面に付着していると、それらが核となって氷晶形 成(凍結)が始まり、それがきっかけとなって気孔などを 通じて植物体内のアポプラスト水まで凍結が進む. このよ うな氷核の形成を促すような成分を氷核活性物質と呼ぶ. このような環境因子のほかにも、アポプラスト水を凍結さ せうる植物由来の氷核活性物質が存在するという報告が ある. 例えば, 花粉表面の多糖類 (Pummer et al. 2012) や レンギョウの枝髄から検出されたシュウ酸カルシウム一水 和物 (石川ら 2016), カツラの樹皮の細胞壁成分 (古賀ら 2021)などに凍結を促す氷核活性が検出されている。特に、 枝髄から検出されたシュウ酸カルシウム一水和物やカツラ 樹皮の細胞壁成分は、植物体内からアポプラスト水の凍結 を誘導する可能性も考えられる. すなわち,0℃以下に気 温が低下したにもかからず外環境由来で凍結が生じない場 合でも,植物体自身が有する氷核活性によって一過的な過

冷却が解消されて細胞外凍結が始まる可能性があることを 意味する.一過的な過冷却が過度に進行してから凍結する よりも少しでも高い温度で凍結が始まった方が脱水速度は 緩やかになるため,最終的に脱水量が同じでも細胞にとっ て負荷が小さくなる.そのため,ある程度まで気温が低下 すると細胞外凍結が始まるような仕組みになっていると考 えることもできそうである.

アポプラストの水は細胞内部に比べて溶質濃度が低いこ とや、氷核活性物質が細胞外に存在することなどの理由に よって細胞外の水が凍結を始めると、細胞膜の内側の水と の間で生じた蒸気圧差に応じて細胞内から細胞外へと水が 移動することで細胞が脱水する(凍結脱水). それによっ てさらに細胞外氷晶が大きく成長するので、脱水収縮だけ でなく大きくなった細胞外氷晶によっても変形する.この ような凍結脱水は、原形質分離とは異なり、細胞壁ごと細 胞を潰す(サイトリシス). 能力を超えた気温低下によっ て過度の凍結脱水が生じると、それが原因となる著しい収 縮変形が起き,細胞膜が細胞内の他の生体膜と異常接近 することで両者の間で不可逆的な微細構造変化が生じて 膜傷害が発生すると考えられている (Steponkus 1984). 札 幌近郊のイネ科草本植物だと、LT50(50%が致死的傷害を 受ける凍結温度)は-30℃よりも高いことが多いが、同じ く札幌近郊の木本植物の樹皮の柔細胞では、LT50が-40℃ 以下のものも多くみられる. ヤマグワの樹皮の柔細胞も その一例であり、緩速凍結で-60℃以下まで処理した後に 液体窒素処理しても50%近く生き残ることが実証されてい る. このような非常に高い凍結抵抗性を示す理由として, 小胞体 (ER) の構造変化が関与するという仮説がある. こ れによると、季節的な低温馴化過程でER由来の膜小胞が 増加した柔細胞が比較的高い氷点下温度で細胞外凍結され ると、膜小胞が融合して嚢状のERが何層にも細胞膜直下 に配置する多重層構造を構築することが明らかになった (Fujikawa and Takabe 1996). 季節的な低温馴化によってこ のER多重層構造が構築される頻度が高くなり、季節的な 脱馴化が進むほどER多重層構造がみられる頻度が低くな るため、凍結抵抗性の季節変化と正の相関性がみられた. このようなER多重層構造は、凍結抵抗性の低いシロイヌ ナズナでは観察されなかった. そのため, このような構造 変化は樹木のように高い凍結抵抗性を有するものにみられ るものであり、凍結脱水によって形成されるERの多重層 構造が細胞膜の直下に配置されることで、細胞膜と内膜と の直接的な相互作用を妨げるという仮説が立てられている (Fujikawa et al. 2006). 現時点では、このようなER多重層 構造がみられる樹種は限られている.
一方,氷点下温度で深過冷却する木部の柔細胞の場合は, 細胞外凍結とは異なり,アポプラストの水が凍結し始めて も脱水が起きない.そのため,細胞内部で過冷却する水は 気温が低下するほど細胞内凍結の発生するリスクが高まる が,現実的には樹幹や枝が強い風や積雪などで物理的な刺 激を受けても木部組織の柔細胞が細胞内凍結を起こさない くらい安定的に過冷却が維持されているので深過冷却と呼 ばれている.しかも,札幌近郊の樹木では,日常的に体験 できるような一過的な過冷却とは異なり,-30~-40℃近 くまで冷却されても細胞内凍結を起こさないものも多い.

木部組織における柔細胞の占有率や含水率に依存する が、細胞内の水の凍結によって生じる発熱(潜熱の放出) のピークを熱分析や示差熱分析によって検出することがで きれば、その発熱開始温度が深過冷却の解消された温度と して認識できるので、木部柔細胞の深過冷却能は比較的容 易に評価できる(Sakai and Larcher 1987).ただし、この発 熱量が検出感度以下であると、細胞外凍結の場合と同様の 発熱パターンを示すので両者を区別するのが困難となる. このような場合、低温走査型電子顕微鏡(cryo-SEM)のよ うな装置を使用して細胞内氷晶のサイズを調べることで細 胞内凍結の有無を判断する(Fujikawa and Kuroda 2000).

前述したように、示差熱分析で容易に細胞内凍結の発 生を判断できる木部組織を用い、ペクチンを消化するペク チナーゼ処理したり、カルシウムイオンを捕捉するような EGTA処理してから熱分析や示差熱分析をおこなうと、過 冷却が解消して細胞内凍結が生じることで得られる発熱 ピークが高い温度側にシフトしたり、ピークそのものが 小さくなって検出しづらくなったことが示された. これ らの結果などからもわかるように、深過冷却能における 細胞壁構造の重要性が示唆されている (Wisniewski 1995, Wisniewski et al. 2014). このような深過冷却の維持するメ カニズムとして、木部柔細胞の内部の水が細胞外氷晶の影 響で植氷されないように、細胞壁構造によって隔離されて いる微小な水滴のように存在することが重要だといわれて いた (Ashworth and Abeles 1984). その後、細胞内に蓄積す るポリフェノール成分である一部のフラボノイド配糖体や 加水分解性タンニンから、氷核活性を抑制して凍結温度を 低下させる抗氷核活性が検出されたことから、細胞内成分 にも過冷却の維持に貢献する可能性があると考えられてい る (Fujikawa et al. 2018, Kasuga et el. 2008, Wang et al. 2012). なお,余談ではあるが,このような抗氷核活性は凍結を遅 延・抑制する効果が期待されるため、筆者らの研究グルー プでは抗氷核活性を利用して凍霜害抑制を試みたことも ある.表面に氷核細菌を塗布した緑葉でも凍結抑制効果 を示すような緑葉粗抽出物をいくつか選抜し(Suzuki et al. 2017),それらを鉢植えに噴霧すると氷核細菌に起因する 凍結を回避することが可能であった.そのうちの1つであ るチャの粗抽出物を茶畑の一部に散布する試験を複数年に わたって実施したところ、実施した年度の気象条件などに かなり影響を受けたと思われるが、チャの凍霜害の抑制効 果がみられた年度もあったことから、限定的ではあるもの の、抗氷核活性を有する緑葉粗抽出物の野外での有効性も 確認できたと考えている(荒川ら 2023).

また、カラマツやカツラなどの冬芽でみられる器官外凍 結という凍結挙動では、凍結抵抗性の低い原基組織が凍結 抵抗性の高い組織 (芽鱗など) によって細胞外氷晶から隔 離されながら越冬するものである (Sakai and Larcher 1987、 Ashworth et al. 1989). この原基組織は, 気温の低下に応じ て非平衡的に脱水するため、細胞外凍結とは異なり脱水量 が限られる、そのため、原基細胞内に残存する水は深過冷 却状態にある.一方,脱水された水は、原基組織から離れ た領域(芽鱗と芽鱗の間や芽鱗内部の細胞間隙など)に蓄 積されるため,器官外凍結する冬芽を採取して垂直方向に 剃刀刃で割断すると, 芽鱗の基部に細胞外氷晶の集積する 様子が観察される (Ishikawa et al. 2015, Neuner et al. 2019). このような凍結挙動を示す冬芽から原基だけを取り出して 緩速凍結を始めると、無傷の冬芽の時とは大きく異なり、 原基細胞の凍結傷害が容易に発生することから (Endoh et al. 2009), 冬芽の構造が保持されていて初めて正常な器官 外凍結が成立し、相応の凍結抵抗性が発揮されることが理 解できる.おそらく、原基から脱水された水が芽鱗のよう な細胞外氷晶を蓄積する部位まで正しく移動して細胞外氷 晶を形成することや、原基が細胞外氷晶の伝播から隔離さ れることのために、冬芽を構成する組織が協同して器官外 凍結を成立させるものと考えられている.

2.5. まとめ

近年のテクノロジーの進歩によって研究の進展は目覚ま しいものがあるが、日常的に目にする草本植物や木本植物 の越冬だけでもまだ未解明な現象が残されている.また、 気候変動の影響なのか、今までの我々の常識の範囲を超え る様な降雨(雪)量や気温の変動が生じるため、環境応答に 関する研究では、これまでよりも柔軟な発想やきめ細やか な条件設定などが必要となってきているように思われる. なかでも季節の移り変わりの時期に生じる低温馴化や脱馴 化という生理変化をもたらす過程は、凍結抵抗性の上昇・ 下降に直接影響するため、越冬する植物の生存戦略にとっ て重要である.今回は触れていないが、脱馴化過程では、 凍結抵抗性の低下に加えて休眠解除による成長の再開が始 まる時期のため、気温の変化などの環境変化の影響を受け やすい状態といえる.そのため、脱馴化過程の植物生理を 明らかにするため、低温馴化と同様に丁寧な解析が進めら れている.今後もいろいろなアプローチによって植物の越 冬機構に関する理解が深まることが期待される.

謝辞

本章で取り上げた筆者らの研究グループによる研究成 果の多くは、北海道大学名誉教授の藤川清三先生のご指導 のもと、多くの卒業生や共同研究者との連携によって得ら れたものです.また、これらの研究成果の一部は、JSPS 科研費(JP24K09012, JP21K05699, JP15H04615, JP16580270, ほか)や北海道大学ロバスト農林水産工学国際連携研究教 育拠点などの助成によるものです.ここに謝意を表します.

参考文献

- Abeynayake, S. W., Etzerodt, T. P., Jonavičienė, K., Byrne, S., Asp, T. and Boelt, B. (2015) Fructan metabolism and changes in fructan composition during cold acclimation in perennial ryegrass. *Front. Plant Sci.* 6: 329, doi: 10.3389/ fpls.2015.00329.
- Ashworth, E. N. and Abeles, F. B. (1984) Freezing behavior of water in small pores and the possible role in the freezing of plant tissues. *Plant Physiol*. 76: 201–204.
- Ashworth, E. N., Davis, G.A. and Wisniewski, M. E. (1989) The formation and distribution of ice within dormant and deacclimated peach flower buds. Plant Cell Environ. 12: 607–612.
- Buchanan, D. W., Biggs, R. H. and Bartholic, J. F. (1976) Cold acclimation of Florida peach and nectarine cultivars. *Hortscience* 11: 398-400.
- Ehlert, B. and Hincha, D. K. (2008) Chlorophyll fluorescence imaging accurately quantifies freezing damage and cold acclimation responses in Arabidopsis leaves. *Plant Meth.* 4:12 doi: 10.1186/1746-4811-4-12.
- Endoh, K., Kasuga, J., Arakawa, K., Ito, T., Fujikawa, S. (2009) Cryo-scanning electron microscopic study on freezing behaviors of tissue cells in dormant buds of larch (Larix kaempferi). *Cryobiology* 59:214–222.
- Fowler, S. and Thomashow, M. F. (2002) Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory

pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* 14: 1675-1690.

- Fujikawa, S. (1995) A freeze-fracture study designed to clarify the mechanisms of freezing injury due to the freezing-induced close apposition of membranes in cortical parenchyma cells of mulberry. *Cryobiology* 32: 444–454.
- Fujikawa, S. (2016) Plant Responses to Freezing. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, doi: 10.1002/9780470015902. a0023719.
- Fujikawa, S. and Kuroda, K. (2000) Cryo-scanning electron microscopic study on freezing behavior of xylem ray parenchyma cells in hardwood species. *Micron.* 31: 669–686.
- Fujikawa, S., Kuwabara, C., Kasuga, J., Arakawa, K. (2018)
 Supercooling-Promoting (Anti-ice Nucleation) Substances.
 In: Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation
 -Adaptation Mechanisms and Their Applications-. pp. 289-320 (Eds Iwaya-Inoue, M., Sakurai, M., Uemura, M.),
 Springer.
- Fujikawa, S. and Takabe, K. (1996) Formation of multiplex lamellae by equilibrium slow freezing of cortical parenchyma cells of mulberry and its possible relationship to freezing tolerance. *Protoplasma* 190: 189–203.
- Fujikawa, S., Ukaji, N., Nagao, M., Yamane, K., Takezawa, D. and Arakawa, K. (2006) Functional Role of Winteraccumulating Proteins from Mulberry Tree in Adaptation to Winter-induced Stresses. In: *Cold Hardiness in Plants*. pp. 181-202 (Eds Chen, T. H. H., Uemura, M. and Fujikawa, S.), CABI Publishing.
- Gordon-Kamm, W. J. and Steponkus, P. L. (1984) Lamellarto-hexagonalII phase transitions in the plasma membrane of isolated protoplasts after freeze-induced dehydration. *Proc. Natl. Sci. USA*, 81: 6373-6377.
- Guy, C., Kaplan, F., Kopka, J., Selbig, J. and Hincha, D. K.
 (2008) Metabolomics of temperature stress. *Physiol. Plant*.
 132: 220–235.
- Inada, H., Fujikawa, S. Saito H. and Arakawa, K. (2006) Influence of Simulated Acid Snow Stress on Leaf Tissue of Wintering Herbaceous Plants. *Plant Cell Physiol.* 47: 504– 512.
- Inada, H., Nagao, M., Fujikawa, S. and Arakawa, K. (2007) Effects of Light Condition after Simulated Acid Snow Stress on Leaves of Winter Wheat. *Environ. Sci.*, 14 (Suppl): 53-71.
- Ishikawa, M., Ishikawa, M., Toyomasu, T., Aoki, T. and Price, W. S. (2015) Ice nucleation activity in various

tissues of Rhododendron flower buds: their relevance to extraorgan freezing. *Front. Plant Sci.* 6:149, doi: 10.3389/fpls.2015.00149.

- Kasuga, J., Hashidoko, Y., Nishioka, A., Yoshiba, M., Arakawa, K. and Fujikawa, S. (2008) Deep supercooling xylem parenchyma cells of katsura tree (Cercidiphyllum japocum) contain flavonol glycosides exhibiting high anti-ice nucleation activity. *Plant Cell Environ.* 31: 1335–1348.
- Kawamura, Y. and Uemura, M. (2003) Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of Arabidopsis leaves associated with cold acclimation. *Plant J* 36: 141–154.
- Kuprian, E., Munkler, C., Resnyak, A., Zimmermann, S., Tuong, T. D., Gierlinger, N., Müller, T., Livingston, D. P., Neuner, G. (2017) Complex bud architecture and cell-specific chemical patterns enable supercooling of Picea abies bud primordia, *Plant Cell Environ.* 40: 3101–3112.
- Li, P. H., Weiser, C. J. and Van Huyst. R. (1966) The Relation of Cold Resistance to The Status of Phosphorus and Certain Metabolites in Red-Osier Dogwood (Cornus stolonifera Michx.) *Plant Cell Physiol.* 7: 475-484.
- Murai, M. and Yoshida, S. (1998) Evidence for the cell wall involvement in temporal changes in freezing tolerance of Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.) tubers during cold acclimation. *Plant Cell Physiol.* 39: 97-105.
- Neuner, G., Monitzer, K., Kaplenig, D. and Ingruber, J. (2019) Frost Survival Mechanism of Vegetative Buds in Temperate Trees: Deep Supercooling and Extraorgan Freezing vs. Ice Tolerance. *Front. Plant Sci.* 10: 1-13.
- Pummer, B. G., Bauer, H., Bernardi, J., Bleicher, S., Grothe, H. (2012) Suspendable macromolecules are responsible for ice nucleation activity of birch and conifer pollen. *Atmos. Chem. Phys.* 12: 2541–2550.
- Sakai, A. and Larcher, W. (1987) Frost Survival of Plants; Responses and Adaptation to Freezing Stress. Springer-Verlag. Berlin, pp. 321.
- Steponkus, P. L. (1984) Role of the Plasma Membrane in Freezing Injury and Cold Acclimation. Annu. Rev. Plant Physiol. 35: 543-584.
- Steponkus, P. L. and Lanphear, F. O. (1967) Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol.* 42: 1423-1426.
- Steponkus, P. L. and Webb, M. S. (1992) Freeze-induced dehydration and membrane destabilization in plants. In:

Somero G. N., Osmond, C. B. and Bolis, C. L. (eds) *Water* and Life: Comparative Analysis of water Relationships at the Organismic, Cellular and Molecular Level, pp. 338–362. Springer-Verlag: Berlin.

- Suzuki, S., Fukuda, S., Fukushi, Y., Arakawa, K. (2017) Screening of plant resources with anti-ice nucleation activity for frost damage prevention. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81: 2090-2097.
- Takahashi, D., Soga, K., Kikuchi, T., Kutsuno, T., Hao, P., Sasaki, K., Nishiyama, Y., Kidokoro, S., Sampathkumar, A., Bacic, A., Johnson, K. L. and Kotake, T. (2024) Structural changes in cell wall pectic polymers contribute to freezing tolerance induced by cold acclimation in plants. *Current Biol.* 34: 958–968.
- Tanino, K. K., and McKersie, B. D. (1985). Injury within the crown of winter wheat seedlings after freezing and icing stress. *Can. J. Bot.* 63: 432–436.
- Thomashow, M. F. (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 50:571–599.
- Uemura, M. and Steponkus, P. L. (1994) A Contrast of the Plasma Membrane Lipid Composition of Oat and Rye Leaves in Relation to Freezing Tolerance. *Plant Physiol.* 104: 479-496.
- Uemura, M. and Steponkus, P. L. (1999) Cold acclimation in plants: relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane. *J. Plant Res.* 112: 245–254.
- Uemura, M. and Yoshida, S. (1984) Involvement of Plasma Membrane Alterations in Cold Acclimation of Winter Rye Seedlings (Secale cereale L. cv Puma). *Plant Physiol.* 75: 818-826.
- Wang, D., Kasuga, J., Kuwabara, C., Endoh, K., Fukushi, Y., Fujikawa, S. and Arakawa, K. (2012) Presence of supercooling-facilitating (anti-ice nucleation) hydrolyzable tannins in deep supercooling xylem parenchyma cells in *Cercidiphyllum japonicum. Planta* 235: 747–759
- Welling, A. and Palva, E. T. (2006) Molecular control of cold acclimation in trees. *Physiol. Plant.* 127: 167-181.
- Wisniewski, M. (1995) Deep supercooling in woody plants and the role of cell wall structure. In: Lee RE, Warren GJ, Gusta LV (eds) *Biological ice nucleation and its applications*. APS Press, Minneapolis, pp. 163–181.
- Wisniewski, M., Gusta, L. and Neuner, G. (2014) Adaptive

mechanisms of freeze avoidance in plants: a brief update. *Environ. Exp. Bot.* 99: 133–140.

- Yoshida, S. (1984) Chemical and biophysical changes in the plasma membrane during cold acclimation of mulberry bark cells (Morus bombycis Koidz cv Goroji). *Plant Physiol.* 76: 257-265.
- 荒川圭太,工藤尚美,鈴木伸吾,高橋淳,後藤高秋,中澤佑哉, 福士幸治,藤川清三. (2023) 植物粗抽出液の抗氷核活性 (過冷却促進活性) による凍結傷害軽減の試み. 低温生物 工学会誌 69:1-6.
- 石川雅也,野村孝之, 槌谷明日香. (2016) シュウ酸カルシウ ムを含む氷核活性剤. 公開特許. 特許第6029058号.
- 古賀泰雅, 鉄穴口晃, 鈴木伸吾, 重冨顕吾, 荒川圭太. (2021) カツラ樹皮由来の氷核活性物質に関する研究. 低温生物 工学会誌 67: 141–145.

酒井昭. (1995) 植物の分布と環境適応. pp. 164 朝倉書店.

第3章

光合成研究の基盤となる実験技術・手法

祖先型遺伝子の再現による環境適応進化の解析

嶺井 隆平¹⁾, 大森 聡¹⁾, 土方 敦司²⁾, 土屋 裕子³⁾, 白井 剛¹⁾

2024年11月17日受付, 2024年12月12日受理

最尤法・ベイス推定法などの分子系統樹推定法により祖先型遺伝子・タンパク質の配列が再現できる. これは生物の環境適応進化を実験室で検証する機会を提供する.この方法によりルシフェラーゼの発 光色進化やミオグロビンの海洋再適応進化を解析した結果,化石からは得られない生化学・分子生物 学的データによる進化仮説の検証が可能となった.

Analyses of evolutionary environmental adaptation by resurrecting ancestral genes

Ryuhei Minei¹, Satoshi Ohmori¹, Atsushi Hijikata², Yuko Tsuchiya³, Tsuyoshi Shirai¹

The methods for molecular phylogeny inference, such as maximum likelihood or Bayes inference, can provide the sequences of ancestral genes/proteins. This approach makes it possible to examine the environmental adaptations of organisms in laboratory. The evolution of luminescence color from firefly luciferases and marine readaptation of myoglobins were examined with this method, and the biochemical and molecular biological data, for which fossil samples could not provide, successfully verified the hypotheses of evolution.

キーワード:祖先型タンパク質,分子進化,分子系統樹 Ancestral protein, molecular evolution, molecular phylogeny

1. はじめに

地球は46億年の歴史の中で大きな環境変動を何度も経 験し,その表面で様々な生物種が栄枯盛衰を繰り返して きたとされる.この生物種の変遷を研究するための最有 力の試料は化石であるが,状態の良い化石の数は限られ ており,大部分の化石試料は不完全であったり大きく損 傷していることから,恣意性の高い従来の解釈が新しい

連絡先

白井 剛 長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部 〒 526-0829 滋賀県長浜市田村町 1266 Tel: 0749-64-8117 Email: t_shirai@nagahama-i-bio.ac.jp

化石試料の発見により覆されることは頻繁に起こる.

例えば、カナダのバージェス頁岩から採取された化石 に基づくHallucigenia (ハルキゲニア、腹面に7対の棘状 の脚を、背面に7本の触手をもつ細長い葉足動物)の初期 復元図は、現存生物のボディプランからかけ離れていた ことから、カンブリア爆発の象徴として注目を集めたが (Morris 1977)、その後爪のある化石の発見により体の背 腹(上下)軸が入れ替わり(Ramsköld 1991)、眼の痕跡のあ

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部 Department of Bioscience, Nagahama Institute of Bioscience and Technology, Nagahama, JAPAN

東京薬科大学・生命科学部 School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, Hachioji, JAPAN

国立研究開発法人産業技術総合研究所・人工知能研究センター Artificial Intelligence Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tokyo, JAPAN

る化石の発見により前後軸も訂正された (Smith and Caron 2015). 結果として, *Hallucigenia*はカギムシなど現存する 有爪動物につながる生物と解釈されるようになった. こ のように,残念ながら化石から得られる情報は完全では なく,特に生化学的・分子生物学的なデータを得ること は困難である.

近年では高速シークエンサを利用した化石DNAの解析 により、古代生物の遺伝子の直接解読の成功例も多数報 告されている.例として、Svante Pääbo博士らは、およ そ4万年前のものと推定されるネアンデルタール人骨から 抽出されたDNAから全ゲノム配列を決定した(Green et al. 2010).このゲノム情報は、Homo sapiens(ヒト)とHomo neanderthalensis(ネアンデルタール人)の交雑と寒冷環境 への適応を示し、その研究は2022年ノーベル生理学・医 学賞につながった.

ただし化石中でDNAは徐々に分解されるので,現状 この方法ではおよそ100万年前(1 Ma = Million years ago, megaannum,以降この表記を用いる)まで遡ることが限界 である.現時点で最古の化石DNA解析例は、シベリア凍 土から発見された*Mammuthus primigenius*(ケナガマンモ ス)遺骸の大臼歯から採取されたものである(van der Valk et al. 2021).この例では低温状態で保存されていたことが 幸いしたと考えられるので、今後化石DNAで1 Maの壁を 越えるのは容易ではないように思われる.しかし、この 限界を超えることを可能にする方法の一つとしてデータ サイエンスがある.

2. 最尤法・MCMCベイズ法による祖先配列の 推定

DNAの塩基配列やタンパク質のアミノ酸配列を解読し 分子系統樹を推定することで、生物進化の歴史をある程 度まで定量的に解析することが可能になった. 配列情報 に基づく分子系統樹推定法は数多く提案されており、主 として配列間の距離に基づく距離法(distance method)と、 主として残基置換過程に基づく形質状態法(character state method)に大別される(Nei and Kumar 2000).

前者の距離法としては非加重結合法 (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA法), 近隣結合 法 (neighbor joining method, NJ法) などが代表的である. 後者の形質状態法には, 最大節約法 (maximum parsimony method, MP法), 最尤法 (maximum likelihood method, ML 法), ベイズ推定法 (Bayesian inference method, BI法) など がある.



図1:祖先配列の推定 右の系統樹で*a_{i,4-7}*が現存配列, *a_{i,1-3}*が祖 先配列の残基にあたる. *a_{i,4-7}と進*化距離*d_{s(),j}*から最大尤度 (ML 法)または最大事後確率(BI法)をもつ*a_{i,1-3}*を推定する.

Figure 1: Prediction of ancestral sequence The $a_{i,4-7}$ in the phylogeny on right are the extant residues, and $a_{i,1-3}$ are ancestral residues. The methods predict $a_{i,1-3}$ with maximum likelihood (ML method) or posterior probability (BI method) from $a_{i,4-7}$ and $d_{s(t),i}$.

代表的な形質状態法の1つであるML法は、現存配列の アラインメントAから、尤度L(A|T)を最大化する(つまり結 果としてAが実現する確率を最大にする)系統樹Tを探索す る方法である(Felsenstein 1981). 尤度L(A|T)は残基置換確 率と進化距離から計算され、系統樹T内のノードjの親ノー ドs(j)における配列サイトiの残基 $a_{i,s(j)}$ がブランチ $s(j) \rightarrow j$ の進化距離 $d_{s(j),j}$ の間にノードjの残基 $a_{i,j}$ に置換される確率 を $p\{a_{i,s(j)}, a_{i,j}, d_{s(j),j}\}$ として以下のように定義される.

$$L(A|T) = \prod_{i,j} p\{a_{i,s(j)}, a_{i,j}, d_{s(j),j}\}$$

つまりこの過程で計算される系統樹Tのモデルは祖先型 配列{*a_{ij}*;*j* ∉ 現存ノード}を含むので,系統樹推定の過程で 祖先配列が再現されることになる(MP法やBI法など他の 形質状態法も同様である).ただし,*L*(*A*|*T*)を最大にする *T*を解析的に求める方法は知られていないので,何らかの 経験的なアルゴリズムが必要になる.

近年多用される方法は、ベイズ更新により系統樹モデル を経験的に順次改良するBI法である.この方法では、ベ イスの定理により定義される以下の式で、事後確率L(T/A) を最大化する系統樹Tを探索する.以下の式では簡単の ため各系統樹の事前確率は一様分布すると仮定しており、 その場合はL(A|T_k)は上式で求められる系統樹T_kの尤度に等 しい.

$$L(T|A) = L(A|T) / \sum_{k} L(A|T_{k})$$

ただしこの方法でも、上式右辺の分母をすべての可能 な系統樹*T*_kについて計算することは事実上不可能である



図2: ルシフェラーゼの分子系統樹 リーフ(末端)ノードに生物種名と発光色(丸印)を示している. 枝上の数値はブートストラップ値である. AncLampなどの名称は再現された内部ノードと発光色(四 角)を示している. この系統樹は無根系統樹であり,青色で示した時代区分(Ma)は目安である. **Figure 2**: Molecular phylogeny of luciferases The species name and fluorescent color (circle) of extant luciferases are shown on the leaf nodes. The numbers on branches indicate bootstrap probabilities. The names and fluorescent color (square) on the internal nodes show the resurrected ancestral luciferases. This phylogeny is unrooted, and the ages shown in blue (Ma) are not accurate.

ので、通常はマルコフ連鎖モンテカルロ法(Markov chain Monte Carlo method, MCMC法)と組み合わせることで経験 的に推定する. なんらかの方法(例えば計算が高速なNJ法 で系統樹のトポロジー $\{s(j)\}$ とブランチ長 $\{d_{s(j),j}\}$ を求め, MP法で祖先型配列 $\{a_{i,j}\}$ を求めるなど)で初期系統樹モデ ル $L(A|T_0)$ を求める. その後パラメータを若干変更した系統 樹 T_1 を作成し、同様に $L(A|T_1)$ を計算する. 両者を比較し、 $L(A|T_1) > L(A|T_0)$ であれば必ず、そうでない場合は一定の低 い確率で系統樹 T_1 を採用する. これを $L(A|T_n)$ が収束するま で繰り返し、 T_n を順次更新する. 収束したのち、不安定で あることの多い初期系統樹を除いて、一定の期間の $\{T_n\}$ を 採用し集計することで、上記式の分母が推定される.

この方法では、 $\{T_n\}$ 群の統計により祖先配列 $\{a_{i,j}, j \notin \mathcal{H}$ 存ノード $\}$ を含む系統樹パラメータは事後確率の分布とし

て求められる.通常は,各サイトで最大事後確率をもつ 残基を選択することで祖先型配列を構成する.推定され た祖先型配列を合成しさまざまな実験を施すことで,化 石からは再現不可能な様々な情報を得ることができる(図 1).以下,この方法をホタルの発光色進化と哺乳類の海 洋再適応進化の解析に応用した例について解説する.

3. ホタルの発光波長の進化

Lampyridae (ホタル科)の甲虫は、およそ100 Maに出現 したとされる.これは、腹部末端に発光器と思われる体 節を持つ甲虫が閉じ込められた琥珀化石の発見に基づい ている (Kazantsev 2015).現存するホタルは赤から緑まで の幅広い発光色を示すが (図2),この祖先ホタルが何色に



図3: 祖先型ルシフェラーゼの発光スペクトル 波長(横軸)ごとの発光強度を最大100%として示している. AncLamp ~ AncElatは再現された祖先型, LcLuc1, LcLuc2, PpyLuc1はそれぞれ現存するゲンジボタル*Luciola cruciata*のLUC1, LUC2, *Pyrocoelia pygidialis*のLUC1のスペクトルを示す.

Figure 3: Fluorescent spectrum of ancestral luciferases The horizontal axis shows intensities of fluorescent light scaled maximum values as 100%. AncLamp~AncElat are resurrected ancestral luciferases, and LcLuc1, LcLuc2, and PpyLuc1 are extant *Luciola cruciata* LUC1, LUC2, and *Pyrocoelia pygidialis* LUC1.



図4:祖先型ルシフェラーゼAncLampの立体構造 (左) AncLamp (緑色, PDBコード 6K4C) とLuciola cruciata のLUC1 (LcLuc1, 白色, PDBコード2D1S)の立体構造の重ね合わせ (RMSD 1.64 Å)をリボンモデルで示している. (右)活性部位付近の構造.反応中間体アナログ (DLSA)を青,保存されたPhe残基を赤,置換されたアミノ酸を橙色の空間充填モデルで示し、Phe-DLSAの距離(Å)と基質結合キャビティーの体積(Å3)を示している. **Figure 4**:Three dimensional structure of AncLamp (Left) Superposed structures of AncLamp (green, PDB code 6K4C) and LUC1 of *Luciola cruciata* (LcLuc1, white, PDB code 2D1S) in ribbon models with 1.64 Å RMSD. (Right) Structures of catalytic centers. The reaction intermediate analogue (DLSA), conserved Phe residue, and replaced residues are shown in space-filling models in blue, red, and orange, respectively. The distances between Phe and DLSA (Å) and the volume of substrate-binding cavities (Å3) are indicated.

発光していたかを化石から知ることはできない. ホタル の発光は以下の式のように,酵素ルシフェラーゼによる D-ルシフェリンのオキシルシフェリンへの酸化反応で発 生し,それぞれのホタル生物種の発光スペクトルは,試 験管内でこれらの分子のみで再現可能である.

 $\text{D-Luciferin} + \text{ATP} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Luciferase+ Mg}^{2^+}} \text{Oxoluciferin} + \text{AMP} + \text{PP}_i + \text{CO}_2 + hv$

そこで、祖先型ルシフェラーゼの配列をML法で推定 し、主要な祖先配列を合成し発光スペクトルの測定を含 む各種の実験を行った(Oba et al. 2020). 図2の系統樹で *Lampyridae*ルシフェラーゼのルートはAncLampに相当し、 この祖先型は深緑色に発光することが示された(図3). AncLamp以前の*Elateridae*(コメツキムシ科)との共通祖先 AncElatからは発光がほぼ認められず, *Phengodidae*(フェ ンゴデス科)との共通祖先AncCanthでは弱い赤色であった ことから、緑色発光はLampyridaeの成立前後に獲得され たと推測される.ただし、AncLampのノードはLampyridae ルシフェラーゼの主要なパラログであるLUC1とLUC2の 遺伝子重複に相当し、遺伝子重複とLampyridae成立との厳 密な前後関係は不明である(図2).AncLamp直後のLUC1・ LUC2パラログの祖先型AncLuc1・AncLuc2は緑色発光を維 持していたが、AncLuc1系統はその後黄緑(AncLampn1)~ 黄色(AncLucin1)に長波長シフトしたのに対し、AncLuc2 系統は現在に至るまで緑色を維持していた.

祖先ホタルの発光色が何色であったかについて,緑 色であったとする説が唱えられている(Martin et al. 2017). 一般的にホタルの発光は交尾時にオスがメスを惹きつけ るためのmating display(求愛信号)の役割をすると認識さ れているが,実際は多くのホタルは卵・幼虫・蛹も発光 する.成虫以外の発光は捕食者に対する警告信号warning display(警告信号)であり,これが発光の本来の機能であり,



図5:ミオグロビンの分子系統樹 この系統樹は省略されてお り、リーフ(末端)ノードは生物種をまとめて代表的な種を一般 名で示している.丸印と三角印で示した内部ノードは再現され た祖先型ミオグロビンを示しており、aMbWpなどの分子名称 を赤色で示している(クジラ類祖先*Basilosaurus*については,2 つの対立する進化系統仮説にもとづいて2種類の配列aMbWbと aMbWb'を再現した).青色矢印は海洋再適応が起こった枝を示 している.swMb, esMb, hsMbは現存するマッコウクジラ,ゾ ウアザラシ,ウマのミオグロビンである.この系統樹は年代推 定された有根系統樹であり,時代区分(Ma)を青色で示している.

Figure 5: Molecular phylogeny of myoglobins This phylogeny is simplified, and the species at leaf nodes are indicated by representative spices in common name. The squares and circles at internal nodes indicate the resurrected ancestral myoglobins, and the names of molecule, such as aMbWp, are shown in red (two different sequences aMbWb and aMbWb' were resurrected for *Basilosaurus* based on two controversial phylogenetic hypotheses). The blue arrows indicate the marine adaptation branches. swMb, esMb, and hsMb are extant myoglobins of sperm whale, elephant seal, and horse, respectively. This phylogeny is rooted and estimated ages are shown in blue (Ma).

夜間の視認性の高さから緑色が適していたとするのが祖 先ルシフェラーゼ緑色仮説である.

Lampyridaeでは、遺伝子重複で成立したパラログのうち LUC2は主としてwarning display, LUC1はmating displayに 関与する.再現された祖先型ルシフェラーゼAncLampの緑 色発光はAncLuc2から現存するLUC2群までwarning display 用として進化的に保存されており,LUC1はmating display に転用され機能分化することで(おそらく交尾の際の種間 識別のために)黄緑色や黄色に短波長シフトしたと考える と、祖先型再現の結果はこの仮説と非常に良く整合して いた(図2).

祖先型再現のもう一つの利点は,再現された分子の構造 解析から進化の物理化学的根拠を得ることができる点に ある(Konno et al. 2011).祖先型ルシフェラーゼAncLamp についてX線結晶解析実験を行い,2.1Å分解能の結晶構 造を決定した(図4).得られた構造は,現存するLuciola *cruciata* (ゲンジボタル)のLUC1 (LcLuc1)とよく類似していた (Nakatsu et al. 2006). 構造解析は反応中間体アナログである5'-O-[N-(dehydroluciferyl)- sulfamoyl]adenosine (DLSA)との複合体で行われたが, AncLampとLcLuc1で活性部位や基質結合部位のアミノ酸残基は基本的に保存されていた.

しかし、分子系統樹から推定される置換残基と結晶構造 から, 基質結合キャビティーの微妙な構造変化が明らか となった. 基質であるルシフェリンを芳香環スタッキン グにより結合するPhe残基(AncLampではPhe246, LcLuc1 ではPhe249)は進化的に高度に保存されているが、この芳 香環を裏側で支えている残基の置換(AncLamp→LcLucl でIle240→Val243およびLeu285→Ile288) により、Pheから ルシフェリン芳香環への距離がLcLuc1でAncLampと比べ て若干長くなっており、その結果として、 基質結合キャ ビティーの体積も大きいことが示された. これにより キャビティー内での基質の運動は、AncLampでは比較的 制限されていたことが示唆される. 基質の熱振動は量子 効率の低下を通じてエネルギー損失による発光波長の長 波長シフトを引き起こすと想定されるので、この構造は AncLampの緑色から現存LUC1の黄緑色~黄色の発光色の 変化が、少数のアミノ酸置換による基質結合キャビティー の構造変化によりもたらされたことを示唆している.

4. 哺乳類の潜水適応進化

脊椎動物は,昆虫 (480 Ma)・植物 (470 Ma) に約1億年 遅れておよそ385 Maに陸上進出したとされる. その後陸 上で進化した動物のうち、クジラ類(鯨類)とアザラシ類 (鰭脚類)に代表されるいくつかの系統は、およそ50 Maに 海洋に再進出した. これは白亜紀末期のK-Pg大量絶滅で Mosasaurs (モササウルス) などの大型海洋爬虫類が絶滅し たことで、空白となったニッチに進出したものとされて いる. 海洋再進出には多くの遺伝子の進化が必要であっ たと考えられるが、その一つが筋肉で酸素を貯蔵するミ オグロビン (Mb) の進化である (McGowen et al. 2014). こ れらの海洋再進出した動物はすでに鰓を失っているため 海中では呼吸できないので、潜水前に海面で呼吸したO2 を大量に貯蔵する必要がある. そのため、これらの動物 の筋肉には陸生哺乳類に比べて著しく高濃度にMbが溶解 されている (Snyder 1983). これらのMbは側鎖に正電荷を 持つ塩基性アミノ酸 (Lys, Arg, His) の分子表面での頻度を 上げて表面電荷Z_{Mb}を高くすることで、静電反発により高 濃度での凝集を防いでいるとされる (Mirceta et al. 2013).



図6:祖先型ミオグロビンの分子間反発・溶解度・沈殿剤耐性 祖先型および現存ミオグロビンの分子間反発(左, *A*₂)・溶解度(中, *logS*₀)・沈殿剤耐性(右, β)が現在を0とした進化距離(横軸)に対してプロットされている. 各 ミオグロビンを表す丸印と三角印は図5と同じである.

Figure 6:Intermolecular repulsion, solubility, precipitant resistance of ancestral myoglobins Intermolecular repulsion (left, A_2), solubility (middle, $logS_0$) and precipitant resistance (right, β) of ancestral and extant myoglobins are plotted against molecular evolutional distance (horizontal axis as present is 0). The squares and triangles are indicating the molecules as shown in Fig. 5.



図7: 祖先型ミオグロビンの立体構造 X線結晶解析により決定した祖先型および現存ミオグロビンの構造が進 化順に示されている. 置換された残基が空間充填モデルで, ヘム分子がボール&スティックモデルで示されてい る. 括弧内はそれぞれの構造のPDBコードである. 各ミオグロビンを示す丸印と三角印は図5と同様である. Figure 7: Molecular structures of ancestral myoglobins The X-ray crystallographic structures of ancestral and extant myoglobins are shown in order of evolution. The replaced residues and heme moiety are shown in space-filling and ball & stick models, respectively. In parentheses are PDB code of each structure. The squares and triangles are indicating the molecules as shown in Fig. 5.

この説はシンプルで説得力があり広く受け入れられてい るが、実験的検証は十分になされていない.

化石試料から、クジラ類の陸上祖先はイヌに類似した 四足動物Packicetus(パキケトゥス、aMbWp)であり、海 洋再適応した初期クジラ類はイルカ様の鰭を持ち後脚の 無いBasilosaurus(バシロサウルス、aMbWb)であるとさ れる. また、アザラシ類の陸上祖先はイタチ様のPuijila(プ イジラ、aMbSp)、海洋再適応した初期アザラシ類は四足 が鰭状になったEnaliarctos(エナリアークトス、aMbSe)と 推定されている(括弧内のaMbWpなどは祖先型Mbの名称 である). そこで、これらの海洋最適応前後の祖先型Mbを 復元して、溶解度・安定性・分子間相互作用などを実験 的に求めた(図5)(Isogai et al. 2018; Isogai et al. 2021; Isogai et al. 2022).

上記の説によると、海洋再適応によってMb間の同族分 子間反発が大きくなり、それに従って溶解度が増大する

と期待される.そこで, Mb間の反発力を小角X線散乱(Small Angle X-ray Scattering; SAXS) により測定した (Kratky and Glatter 1982). SAXSにより評価される第二ビリアル係数 (A₂)は理想気体近似された分子間の斥力が大きいほど正に 大きくなる. さらに、溶解度をポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法により評価した. これは, 一般的にタンパ ク質の溶解度は添加した沈殿剤濃度に依存して減少する ので、PEGを徐々に添加しつつ溶存タンパク質濃度(縦軸) をPEG濃度(横軸)に対して一次近似することにより、縦 軸切片から純水 (PEG濃度0) に対する溶解度logS₀, 傾きか ら沈殿耐性に相当するβを求める方法である(Kramer et al. 2012). 結果として, 分子間斥力A2はクジラ類では増加し ていたが、アザラシ類では大きな変化が認められなかっ た. また溶解度logS₀も海洋再適応に従って増大する傾向 は見られず、クジラ類においては陸上祖先のaMbWpが最 も高いという、仮説とは整合しない結果が得られた(図6).



図8:ミオグロビン分子パラメータのPCA解析

祖先型および現存ミオグロビンが各種分子パラメータの主成分 分析により第1(横軸PC1,海洋再適応軸)-第2(縦軸PC2,ク ジラ-アザラシ差軸)主成分軸にプロットされている.分子パラ メータは、熱力学測定から得られたフォールド自由エネルギー (ΔG_{fold})・水和自由エネルギー(ΔG_{soh}),溶解度測定からの溶解 度(logS₀)・沈殿剤耐性(β),SAXSによる分子間斥力(A_2),立体 構造から評価された分子量(Mr)・表面電荷(Z_{Mb})・等電点(pl)・ 分子表面積(ASA_{pho})・週本性分子表面積(ASA_{phi})・竦水性分子表 面積(ASA_{pho})・回転半径(R_g)・分子内ファンデルワールス相互作 用数(vdW)・分子内水素結合数(HB)・分子内静電相互作用数(IP) である.ベクトル(矢印)は各分子パラメータの主成分寄与率で あり、海洋再適応軸(赤)・クジラ-アザラシ差軸(青)・その他(黒) に分類されて示されている.各ミオグロビンを表す丸印と三角 印は図5と同様であり、進化の順番に点線で結ばれている.

Figure 8: PCA analysis of molecular parameters of myoglobins The ancestral and extant myoglobins are plotted via PCA analysis on the 1st (horizontal "marine adaptation" axis) and 2nd (vertical "whale-seal differentiation" axis) principle axes plane. The molecular parameters are fold free energy difference (ΔG_{fold}), solvation free energy difference (ΔG_{solv}) from thermodynamics experiments, solubility $(\log S_0)$, precipitant resistance (β) from solubility experiments, molecular repulsion (A2) from SAXS experiments, and molecular weight (Mr), surface net charge (Z_{Mb}) , isoelectric point (pI), molecular surface area (ASA_{total}), hydrophilic molecular surface area (ASA_{nhi}), hydrophobic molecular surface area (ASA_{nho}), radius of gyration (R_{o}) , intramolecular van der Waals (vdW), hydrogen bond (HB), electrostatic (IP) interactions evaluated from three dimensional structures. The overlayed vectors indicate the proportion of variances of each molecular parameter and assigned to 1st, 2nd, or other principal axes and colored in red, blue, or black, respectively. The squares and triangles are indicating the molecules as shown in Fig.5 and connected in order of evolution through dotted lines.

この結果を受けて、X線結晶構造解析や熱力学安定性解 析などから各種の分子パラメータを測定し、海洋再適応 と最も相関の高い要因を探索した.X線結晶構造解析によ り全ての祖先型Mbで主鎖構造は保存されていることが確 認された(図7).

これらの Mbの再現実験や立体構造から計算により得

られた分子パラメータの主成分分析 (Principle Component Analysis; PCA)を行った (図8) (Pearson 1901). 第1主成分 軸 (PC1) に沿って陸上祖先種から現存海洋適応種が分布 (図8の点線で左から右)することから,この軸は海洋再適 応軸に相当すると考えられる.また第2主成分軸 (PC2) に 沿ってクジラ類とアザラシ類が分離することから,この クジラ-アザラシ差軸PC2は両者の海洋再適応メカニズム の違い (適応メカニズムの多様性)を示していると解釈で きる.

海洋再適応軸PC1に主として寄与する(すなわち海洋再 適応の主要因と推定される)パラメータの一つが表面電荷 Z_{Mb}であるので,定説通り表面電荷は海洋再適応と高く相 関する(クジラ類ではaMbWpからswMbへの進化に伴って +0.1から+3.9へ,アザラシ類でも同様にaMbSpからesMbへ の進化に伴って+1.92から+4.50へと明確に増加している). しかし前述の通り,溶解度*logS*₀と分子間斥力*A*₂の海洋再適 応軸PC1への寄与は高くない.分子間斥力*A*₂はクジラ-アザ ラシ差軸PC2の主要な寄与因子であるので,確かにクジラ 類の海洋最適応には分子間反発が寄与しているが,アザ ラシ類においては同様の寄与は認められず,定説の同族 分子間反発の重要性は一般には成立しないと考えられる.

一方で, 沈澱剤耐性 (β) や分子内相互作用による安定化 要因 (ΔG_{fold}, HB, IPなど) が海洋再適応軸PC1に高く寄与 していることが示された.細胞内は生化学実験で用いられ る希薄緩衝水溶液と異なり, 沈殿剤として機能しうる様々 な生体高分子で満たされたクラウディング状態にあるこ とから, Mbが高濃度の溶液状態を維持するためには, そ れらの沈殿剤との非同族分子間相互作用が重要であると 考えられる (Phillip et al. 2009; Rivas and Minton 2016).ま たタンパク質の沈殿は,部分的に変性したタンパク質が 衝突し複合体を形成することで促進されると推定される ことから,分子内相互作用の強化による構造の安定化は, 沈殿の防止に寄与する (Dasmeh et al. 2013).すなわち祖先 型Mb再現の結果は,非同族分子である沈殿剤との相互作 用およびMb分子内相互作用の強化が海洋再適応のより一 般的な要因であることを示唆している.

5. おわりに

祖先タンパク質の分子系統樹による再現は,生物がど のように環境に適応してきたかを実験室で検証する機会 を提供することができる.例として示したルシフェラー ゼの発光色進化やミオグロビンの海洋再適応進化の解析 は,化石からは得られない比較的明瞭な分子生物学的デー タを提供した.

しかし、これらの例はこの方法の課題も同時に示して いる.ルシフェラーゼとミオグロビンは主として単量体 で機能するタンパク質であるので、祖先型と表現型(実験 データ)を容易に対応づけることができる.一方、多くの タンパク質は複数のサブユニットのヘテロ複合体として 機能する.その場合、それぞれのサブユニットの分子系 統樹の同期という問題が生じるので、祖先型ヘテロ複合 体の再現実験は格段に困難になる.この課題を追求する ことが現在の主要な目的の一つである.

そこで現在,祖先型光合成複合体の再現を目的とした 研究を進めている.光合成は数百種類のタンパク質が関 与する生命にとって最重要の化学反応の1つであるが,そ れらのタンパク質の多くは1000 Ma (10億年)を超える進 化の歴史を持ち,さらに巨大複合体(supramolecule)を形成 するので,祖先型再現としては最難関の課題である.一 方で,光合成複合体が地球規模の環境変動に適応して進 化しユビキタスな光合成能力を獲得してきたメカニズム は,気候変動が大きな問題となっている現代に必要な情 報であり,祖先型再現を現実的な問題に適用することが できるテーマであるとも言える.近年の機械学習 (AI)と それに付随した大量データ(ビックデータ)処理技術の進 展も,このテーマの追求を後押しする形となるので,祖 先型光合成複合体再現が一連の研究の集大成となること を期待している.

ここで紹介した研究は磯貝泰弘博士(富山県立大),今 村比呂志博士(長浜バイオ大),大場裕一博士(中京大), 加藤太一郎博士(鹿児島大),墨智成博士(室蘭工業大), 常重アントニオ博士(法政大)らとの共同研究で,JSPS科 研費JP23H04964,JP23K21721の助成を受けて実施したも のであり,最後に感謝申し上げます.

参考文献

- Dasmeh, P., Serohijos, A.W., Kepp, K.P. and Shakhnovich, E.I. (2013) Positively selected sites in cetacean myoglobins contribute to protein stability. *PLoS Comput Biol* 9: e1002929.
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17: 368-376.
- Green, R.E., Krause, J., Briggs, A.W., Maricic, T., Stenzel, U., Kircher, M., et al. (2010) A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 328: 710-722.
- Isogai, Y., Imamura, H., Nakae, S., Sumi, T., Takahashi, K.I., Nakagawa, T., et al. (2018) Tracing whale myoglobin

evolution by resurrecting ancient proteins. Sci Rep 8: 16883.

- Isogai, Y., Imamura, H., Nakae, S., Sumi, T., Takahashi, K.I. and Shirai, T. (2021) Common and unique strategies of myoglobin evolution for deep-sea adaptation of diving mammals. *iScience* 24: 102920.
- Isogai, Y., Imamura, H., Sumi, T. and Shirai, T. (2022) Improvement of Protein Solubility in Macromolecular Crowding during Myoglobin Evolution. *Biochemistry* 61: 1543-1547.
- Kazantsev, S. (2015) Protoluciola albertalleni gen.n., sp.n., a new Luciolinae firefly (Insecta: Coleoptera: Lampyridae) from Burmite amber. *Russian Entomological Journal* 24.
- Konno, A., Kitagawa, A., Watanabe, M., Ogawa, T. and Shirai, T. (2011) Tracing protein evolution through ancestral structures of fish galectin. *Structure* 19: 711-721.
- Kramer, R.M., Shende, V.R., Motl, N., Pace, C.N. and Scholtz, J.M. (2012) Toward a molecular understanding of protein solubility: increased negative surface charge correlates with increased solubility. *Biophys J* 102: 1907-1915.
- Kratky, O. and Glatter, O. (1982) Small angle x-ray scattering. Academic Press, London ;.
- Martin, G.J., Branham, M.A., Whiting, M.F. and Bybee, S.M. (2017) Total evidence phylogeny and the evolution of adult bioluminescence in fireflies (Coleoptera: Lampyridae). *Mol Phylogenet Evol* 107: 564-575.
- McGowen, M.R., Gatesy, J. and Wildman, D.E. (2014) Molecular evolution tracks macroevolutionary transitions in Cetacea. *Trends Ecol Evol* 29: 336-346.
- Mirceta, S., Signore, A.V., Burns, J.M., Cossins, A.R., Campbell, K.L. and Berenbrink, M. (2013) Evolution of mammalian diving capacity traced by myoglobin net surface charge. *Science* 340: 1234192.
- Morris, S. (1977) A new metazoan from the Cambrian Burgess Shale of British Columbia. *Palaeontology* 20: 623-640.
- Nakatsu, T., Ichiyama, S., Hiratake, J., Saldanha, A., Kobashi, N., Sakata, K., et al. (2006) Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature* 440: 372-376.
- Nei, M. and Kumar, S. (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.
- Oba, Y., Konishi, K., Yano, D., Shibata, H., Kato, D. and Shirai,T. (2020) Resurrecting the ancient glow of the fireflies. *Sci Adv* 6.
- Pearson, K. (1901) LIII. On lines and planes of closest fit to

systems of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 2: 559-572.

- Phillip, Y., Sherman, E., Haran, G. and Schreiber, G. (2009) Common crowding agents have only a small effect on proteinprotein interactions. *Biophys J* 97: 875-885.
- Ramsköld, L.X., H. (1991) New early Cambrian animal and onychophoran affinities of enigmatic metazoans. *Nature* 351: 225-228.
- Rivas, G. and Minton, A.P. (2016) Macromolecular Crowding In Vitro, In Vivo, and In Between. *Trends Biochem Sci* 41: 970-981.
- Smith, M.R. and Caron, J.B. (2015) Hallucigenia's head and the pharyngeal armature of early ecdysozoans. Nature 523: 75-78.
- Snyder, G.K. (1983) Respiratory adaptations in diving mammals. *Respir Physiol* 54: 269-294.
- van der Valk, T., Pecnerova, P., Diez-Del-Molino, D., Bergstrom, A., Oppenheimer, J., Hartmann, S., et al. (2021) Million-yearold DNA sheds light on the genomic history of mammoths. *Nature* 591: 265-269.

電気泳動の原理とbuffer系の比較 — SDS-PAGEからNative-PAGEへ

高林 厚史 1)

2024年12月2日受付, 2025年1月5日受理

ゲル電気泳動法はタンパク質やタンパク質複合体の分離に広く用いられてきた手法である.本稿ではまず,ゲル電気泳動において考慮すべき三つの要点について説明する.すなわち,1)負電荷の付与方法,2)ゲルマトリックス,3)界面活性剤の選択である.次に,SDS-PAGE, blue-native (BN)-PAGE, clear-native (CN)-PAGEの各電気泳動法について,そのbuffer系の歴史と原理を解説する.特に,SDS-PAGEとCN-PAGEについては,標準的なbuffer系に加え,改変buffer系についても紹介する.

Principles of electrophoresis and comparison of buffer systems — from SDS-PAGE to Native-PAGE

TAtsushi Takabayashi

Gel electrophoresis is a widely used technique for the separation of proteins and protein complexes. This paper discusses three critical considerations in gel electrophoresis: 1) selection of the chemical that gives negative charge to the protein, 2) selection of the gel matrix, and 3) selection of the detergent. In addition, I review the historical development and underlying principles of buffer systems used in SDS-PAGE, blue-native (BN) PAGE, and clear-native (CN) PAGE. Special attention is given to the standard buffer systems used in SDS-PAGE and CN-PAGE, as well as modified buffer systems, two of which have been developed by the author.

キーワード:ゲル電気泳動, SDS-PAGE, BN-PAGE, CN-PAGE Gel electrophoresis, SDS-PAGE, BN-PAGE, CN-PAGE

1. はじめに

ゲル電気泳動は核酸やタンパク質などの生体分子を分 離するための手法として広く用いられてきた.分子量に応 じて生体分子を分離する方法としては,他にもゲル濾過ク ロマトグラフィーやショ糖密度勾配遠心法などがあるが, 電気泳動では負に荷電した生体分子がゲルの中を移動する ことで分子篩い分け効果が働き,生体分子を分子量に応じ て分離できることが特徴である.そのメリットとしては,

連絡先

高林 厚史 北海道大学低温科学研究所 〒 060-0819 北海道札幌市北区北 19 条西 8 丁目 Tel: 011-706- 5469 Email: takabayashi@lowtem.hokudai.ac.jp 安価かつ短時間で分離できること、2)多サンプルを同時に分離できること、3)分離能が高いこと、4)様々な染色法と組み合わせて生体分子を可視化できること、などがあげられる.また、手法のバリエーションも多く、タンパク質に限っても、例えば、一つ一つのタンパク質を変性条件で分離するsodium dodecyl sulfate (SDS) - polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)、タンパク質複合体をその機能や構造を保ったまま分離するblue-native (BN) -PAGEや clear-native (CN) -PAGEなど、様々な目的に使われている.

 北海道大学低温科学研究所 Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan 本稿では、タンパク質の電気泳動にフォーカスを当て、その原理や歴史,buffer系の違いなどを解説する.

2. タンパク質電気泳動において 考慮すべきいくつかのこと

2.1. タンパク質の表面への負電荷の付与方法の選択

核酸は文字通り「酸」であるためbuffer中で負に荷電する. しかし、タンパク質の表面電荷はタンパク質のアミノ酸組 成によって大きく異なる.つまり、泳動条件においてタ ンパク質は1)正に荷電するもの、2)ニュートラルなもの、 3)負に荷電するもの、の3種類に分かれる.そのため、泳 動時にタンパク質を負に荷電させるための工夫が必要にな る.そして、その方法は大きく2つに分けられる.アルカ リ性の泳動bufferを用いる方法と負電荷を持つ分子をタン パク質に結合する方法である.

アルカリ性の泳動bufferを用いることのメリットは負電 荷を持つ分子をタンパク質と結合させる必要がないこと であり、安価で、かつ、プロトコールも簡単である.実 際、古典的なNative-PAGEの系ではアルカリ性のbuffer条件 でSDSを加えずにタンパク質を分離していた.ただし、こ の手法には大きな問題点が3つある.1つは全てのタンパ ク質(複合体)を負に荷電させることは実際にはできないこ と、またアルカリ性で変性するタンパク質(複合体)もめず らしくないこと、さらには泳動度と分子量が大きくずれる こと、である.そのため、その適用範囲は限られていた.

そのため、現在では、負電荷を持つ化合物をタンパク 質に結合させた後に泳動する方法が主流である.特に有名 な手法はSDS-PAGEである.SDS-PAGEにおいては負電荷 を持つSDSをタンパク質に結合させることでタンパク質を 負に荷電させ、電気泳動を可能にする.他方、BN-PAGE やCN-PAGEなどの現在主流のNative-PAGEではCBBやDOC (sodium deoxycholate)などの(変性作用をほとんど持たない が) 負電荷を持つ化合物をタンパク質(複合体)の表面に結 合させることで電気泳動を可能にする.この手法において もCBBやDOCの結合量はタンパク質の分子量とよく相関 すると考えられている.しかも興味深いことにタンパク質 複合体の泳動度と分子量は強い正の相関を示す. このこと はタンパク質複合体においては、高次構造よりも表面電 荷の方が、泳動度への影響が大きいことを示唆している. また執筆者らは両親媒性ポリマーのamphipolの1つである A8-35を用いたCN-PAGEのbuffer系を開発した. これにつ いては後述する.

2.2. ゲルマトリックスの選択

電気泳動においては荷電した生体分子が高分子のハイ ドロゲルの中を通過する際に、その生体分子の大きさごと にゲル内の移動度が異なる「分子篩い分け効果 (molecular sieve effect)」が生じ、分子量に応じて生体分子を分離する ことができる.これは核酸においてもタンパク質において も同様である.しかし、タンパク質は一般的に核酸よりも 小さいため、核酸の分離で主に用いられるアガロースはほ とんど使われない.その代わりに主にポリアクリルアミド ゲルが用いられる.

ポリアクリルアミドゲルはアクリルアミドとその架橋 剤であるビスアクリルアミドを混合しAPSとTEMEDを加 えて重合反応を開始することで作成される.アクリルアミ ドの濃度が低いほど大きなタンパク質の分離に優れ、逆に 言えば濃度が高いほど小さいタンパク質の分離に優れる. また、アクリルアミドとビスアクリルアミドの比率も泳動 度に影響し、一般的にはビスアクリルアミドの比率が高い ほどより小さなタンパク質の分離に優れる.ただし、例 外的に、ビスアクリルアミドの比率を「極端に」高くするこ とで逆にゲルのポアサイズを大きくし、非常に大きなタ ンパク質複合体の分離を可能にするlarge-pore BN(もしく はCN)-PAGEとよばれるnative-PAGE法も開発されている (Strecker et al., 2010).

SDS-PAGEにおいては単一濃度のポリアクリルアミドゲ ルが広く用いられているが、native-PAGEにおいてはリニ アグラジエルトゲルが主流である。例えば、BN-PAGEや CN-PAGEでよく用いられる4-13%のゲルでは数十kDaから 数千kDaのタンパク質複合体を分離できる。また、SDS-PAGEにおいてもリニアグラジエントゲルを用いることで 広範囲の分子量のタンパク質を高い分離能で分離できる。 リニアグラジエントゲルは自作できるが、手間も時間もか かるため、SDS-PAGEにおいては市販のゲルを購入するこ とも多い.一方で、BN-PAGEやCN-PAGEのゲルを販売す るメーカーは限られており、またゲル濃度も限られている ため、ゲルを自作する研究者の方が多いのではないかと推 測される。

2.3. 膜タンパク質の可溶化の際の界面活性剤の選択

膜タンパク質の可溶化はとりわけnative-PAGEにおける 大きな課題である.まずSDS-PAGEにおいては強力な可溶 化力を持つSDSを用いて膜タンパク質を生体膜から可溶化 することで、多くのケースでは高効率でタンパク質を可 溶化できる.つまり、SDS-PAGEにおいてSDSは可溶化と タンパク質への負電荷の付与と2つの役割を持つ.一方で SDSは強力な変性剤であるため, native-PAGEでは使用で きない.

Native-PAGEで最も広く用いられている界面活性剤は dodecylmaltoside (DDM)である (Choy et al., 2021). これに は光学異性体であるα-DDMとβ-DDMがあり,いずれもよ く用いられる.共通する性質として,非イオン性の界面活 性剤であり,変性作用が小さいマイルドな界面活性剤では あるものの,膜からのタンパク質の可溶化力も比較的強い. 古くから用いられてきたのはβ-DDMであり,α-DDMより も安価であることもあって現在でもよく用いられている. 一般的にはα-DDMはβ-DDMよりもより変性作用が小さい 傾向があると考えられており (Kotov et al., 2019; Pagliano et al., 2012),それに期待してα-DDMを選択することも増え てきている.また最近ではDDMとcholesteryl hemisuccinate (CHS)の混合液を用いた可溶化も増えている (Choy et al., 2021).

また,より変性作用の小さい界面活性剤として, digitonin/GDNも用いられている (Choy et al., 2021). Digitoninは植物由来のマイルドな界面活性剤で、PSI-LHCI-LHCIIやPSI-PSII megacomplexなど, DDMを用いた可 溶化では解離してしまうような壊れやすい複合体の構造を 維持したまま可溶化することができる (Järvi et al., 2011). ただし、いくつかの欠点を抱えており、使いづらい界面活 性剤でもある.まず,天然由来であるため,メーカーやロッ トによる品質や純度の差が大きい.次に、水に溶けづらく、 一旦溶けても不溶化することもあるため扱いづらい. そこ で、最近になって用いられるようになったのがdigitoninの 構造アナログであるGlyco-diosgenin (GDN) である. これ は水に溶けやすく、しかも天然由来ではないため品質も 安定している. これによりdigitoninの使いづらさは解消さ れたといえる.ただし、両者ともにDDMと比べると可溶 化力が低く,特にPSIIが局在するgrana coreの可溶化に難が あることには注意が必要である. なお, それを逆手にとっ て, digitonin/GDNを用いた選択的な可溶化により, grana core, grana margin, stroma lamellaeの分画をする手法もよ く用いられている (Koochak et al., 2019; Nishioka et al., 2021; Yokoyama et al., 2016). また、DDMと同様にCHSとの組み 合わせもよく用いられる.

3. 電気泳動のbuffer系の原理と比較

3.1. LaemmliによるSDS-PAGEの開発とそのbuffer系

もっとも著名な電気泳動のbuffer系は間違いなくLaemmli のbuffer系であろう(Laemmli, 1970). このbuffer系は1970年 に報告され,現在でも広く用いられている.SDS-PAGEの 特徴は界面活性剤のSDSにある.まず,電気泳動の課題の 一つは膜タンパク質の可溶化である.その可溶化には主に 界面活性剤を用いることになるが,特に強い可溶化力を持 つのがSDSである.そのため,SDS-PAGEにおいては生体 膜に局在するタンパク質も可溶化し,分離することができ る.これがSDSを用いることの1つ目の利点である.

次に、電気泳動においてはタンパク質の表面電荷が問題 になる.「酸」であり水溶液中で負電荷を持つDNAやRNA と異なり、タンパク質を構成するアミノ酸のpKaはアミノ 酸ごとに大きく異なるため、中性~弱アルカリ性のbuffer 中でタンパク質が負電荷を持つかどうかはタンパク質に よって異なる.電荷を持たないタンパク質は電気泳動がで きないため、負電荷を持たせる工夫が必要になる.SDS-PAGEでは負電荷を持つSDSがタンパク質に比較的均一に 結合し、SDSとタンパク質の複合体として分離される.そ してその複合体は負電荷を持つことになり、タンパク質の 表面電荷によらず分離が可能になる.

さらに、タンパク質の電気泳動ではその立体構造も問 題になる.同じ分子量のタンパク質であっても立体構造に よってゲル内での移動速度は異なり、結果として泳動後の 移動度が分子量とずれてしまうからである.そしてここで もSDSは重要な働きを持つ.SDSは強力なタンパク質変性 作用を持ち、還元剤および熱処理との組み合わせにより、 タンパク質問の相互作用を切断し、タンパク質の立体構造 を壊すことができる.

つまり, SDSはタンパク質の可溶化, 負電荷の付与, 立 体構造の破壊という3つの機能を持つ界面活性剤であり, 一石三鳥の効果がある. これがSDS-PAGEが長年にわたり 最も広く用いられる理由と考えられる.

次にLaemmliのbuffer系に注目したい. そのbuffer系では buffering ionにTris, leading ionとしてCl, trailing ionとして glycineが用いられている.特に注目すべきはglycineである. Glycineは安価ではあるもののtrailing ionとしては移動度が 遅い. これはLaemmliのSDS-PAGEで低分子量(<20kDa)の タンパク質の分離が悪い原因の1つである(Schägger and von Jagow, 1987).また, glycineは中性では電荷が釣り合っ てしまいtrailing ionとしては機能しない.これはLaemmli の系がアルカリ性のbufferを用いる理由である.ただし, 中性のbuffer系で分離することにはメリットがあり,例え ばゲルの保存性が良くなり,泳動時のタンパク質の修飾が 減ること,などが指摘されている.そのため、SDS-PAGE の改変buffer系ではこのglycineの置き換えが行われること が多い. ただし、trailing ionとしてglycineを用いることには安価 であること以外にもメリットがある.それは、stacking gel (濃縮ゲル)を作成できることである.詳しくは市販のマ ニュアルを参照いただきたいが、濃縮ゲルではゲル内の pHを弱酸性にしてglycineの電荷をニュートラルにする. それによりglycineの移動度をタンパク質よりも遅らせるこ とでタンパク質をleading ionであるCIとglycineで挟み込む. それにより、局所的な高電圧を形成し、サンプルを濃縮し ている.この濃縮ゲルを利用できるのはtrailing ionとして glycineを選ぶことのメリットであり、他のbuffer系では濃 縮ゲルは利用できない.

まとめると、LaemmliのSDS-PAGEは最もよく用いら れる電気泳動法であるもののtrailing ionとしてglycineを 用いたことには問題点もあり、現在では特に低分子量(< 20kDa)のタンパク質の分離の向上が必要な場合には他の trailing ionを用いた系が利用されることも増えつつある. 次はそれらについて紹介する.

3.2. SDS-PAGEの改変buffer系

LaemmliのSDS-PAGEのbuffer系の最大の課題はおそらく 低分子量のタンパク質の分離能が悪いことである.そし て,その原因は先述のようにtrailing ionにある.逆に言えば, glycineよりも速いtrailing ionを用いることでその改善が可 能である.なかでも最も有名な改善系がTris-Tricine-SDS-PAGEである (Schägger and von Jagow, 1987). この系では trailing ionとしてTricineを用い, buffering ionにはLaemmliと 同様にTrisを用いている.この系はSchäggerらによって開 発され,低分子量のタンパク質の分離に長く利用されてき た.SchäggerはBN-PAGEやCN-PAGEの開発者でもあるが, これについては後述する.

また、最近ではbuffering ionとしてBisTrisを利用し、 trailing ionとしてMESやMOPSを用いたBisTris-SDS-PAGE 系が、Invitrogen社(現ThermoFisher Scientific社)で開発され、 NuPAGE Bis-Tris gelという製品名で同社から販売されてい る. この系は低分子量タンパク質の分離に優れるだけで なく、中性でタンパク質を分離できることで泳動の際の タンパク質の修飾が低減できるなどの利点があるとのこ とである.

このようにglycine以外のtrailing ionを選ぶことで低分子 量のタンパク質の分離を向上させるとともに、中性域での 分離が可能になる.ただし、濃縮ゲルが作成できないこと に加えて、ランニングコストが上がるなどの欠点もあり、 目的に応じて使い分けることが好ましい.

3.3. BN-PAGEのbuffer系

古典的なnative-PAGEはSDSを使わないSDS-PAGEとも言 えるものであり、分離能に課題があり、またアルカリ性の bufferでの分離により、構造や機能を失ってしまうタンパ ク質複合体も多かったと思われる. その状況を一変させた のがBN-PAGE (Schägger and von Jagow, 1991) の登場であっ た. BN-PAGEは多くのタンパク質複合体の機能や構造を維 持したまま分離することができ、しかもその分離能は従来 のNative-PAGEと比べてとても高い. このBN-PAGEの開発 者がTricine-SDS-PAGEと同じSchäggerらであることは注目 に値する. 実際, BN-PAGEのbuffer系はTricine-SDS-PAGE との共通点が多いのである. ここからは具体的にBN-PAGE のbuffer系を見ていきたい. まず, buffering ionはBisTrisも しくはimidazole (Wittig et al., 2006) であり, bufferのpHは7.0 と中性である. この点はTrisをbuffering ionとし, アルカリ 性のpHで分離するTricine-SDS-PAGEとは異なる.一方で, trailing ionはTricineであり、Tricine-SDS-PAGEと同じである. これらの点でBN-PAGEのbuffer系はTricine-SDS-PAGEを中 性で泳動できるようにした,いわば改変版と言える.

では、Schäggerらは、SDSを使わずにどのようにしてタ ンパク質複合体に負電荷を付与したのだろうか?その秘密 が名前にある.青色の色素であるCBBの利用である.CBB R-250は水に溶けにくいが、CBB G-250は水に溶ける.また、 CBBは水溶液中で負電荷を持つ.つまり、CBB G-250をタ ンパク質複合体に結合させることで、タンパク質複合体の 表面に負電荷を供与することが可能になり、泳動すること ができるようになるのである.しかも、Bradford法という CBBを用いたタンパク質の比色定量法があるように、CBB はタンパク質複合体に対して比較的一様に結合する.その ため、BN-PAGEではタンパク質複合体の分子量に応じて CBBが結合し、それにより、タンパク質複合体は分子量に 応じて分離される.これがBN-PAGEではタンパク質複合 体の分離能がよい理由である.

では、CBBの結合はタンパク質複合体にどのような影響があるのだろうか.著者らによれば、一般的に、CBB の結合はタンパク質複合体間の相互作用を壊すことはな く、むしろ強める働きさえあるとのことである(Schägger and von Jagow, 1991). この主張はこれまでの先行研究で 多くのタンパク質複合体がBN-PAGEで分離できたことを 考えると、それなりに妥当なのではないかと考えられる. ただし、青色のCBBは分光学的な解析や色素解析などを 妨害するため、例えば光合成タンパク質複合体の解析に は邪魔であることは間違いない.これを改善したのが次 のCN-PAGEである.

(a) 標準的なCN-PAGE





図1:標準的なCN-PAGEとamphipol A8-35を用いたCN-PAGEのbuffer系の比較

標準的なCN-PAGE (Schägger et al. 1994) は、buffering ionにBisTris (もしくはImidazole), trailing ionにTricine, タンパク質複合体に負電荷を付与するための化合物には無色透明なDOCを用いたbuffer系である. Cathodeバッファーには十分な量のTricineとDOCが含まれており、これらは電気泳動中、陰極から陽極へと継 続的に移動し続ける. この過程で、Tricineはタンパク質やDOCよりも速く移動し、均一な電場の形成に重要 な役割を果たす. 図中ではTricineのフロントのみが示されているが、実際にはフロントからCathodeまで全体 に分布していると考えられる. DOCもまたタンパク質よりも速く移動し、タンパク質複合体とDOCの結合は 一時的なものであり、泳動中は結合と解離を繰り返しながらゲル内を移動する. そのため、遊離状態のDOC もフロントからCathodeまで全体に分布していると考えられる.

筆者らの開発したamphipol A8-35を用いたCN-PAGE(Kameo et al. 2021)のbuffer系はほぼ標準的なCN-PAGE と変わらない. DOCの代わりにamphipol A8-35を用いた点が最も大きな点である. なお, A8-35とタンパク質 複合体の結合は泳動中に離れないほどに強いため, cathode buffer にA8-35を加える必要はなかった. A8-35は 高価な試薬であるため, この発見はランニングコストを劇的に下げることに繋がった.

3.4. CN-PAGEのbuffer系

BN-PAGEの課題として青色のCBBが下流の実験を妨 害する事が挙げられた.それを解決したのは、やはり、 Schäggerらである(Schägger et al., 1994).彼らは、無色透明 でタンパク質複合体に結合し、しかもタンパク質複合体へ の変性作用が小さい化合物としてDOCに着目した. 陰イ オン性の界面活性剤であり、胆汁酸の成分でもあるDOC はまさに先ほどの条件を充たす化合物なのである.この泳 動系は最初Colorless-Native-PAGEと名付けられたが、その 後に著者らによってClear-Native-PAGEと改名された.いず れにせよ略称はCN-PAGEである.

CN-PAGEのbuffer系はBN-PAGEと全く同じであり,ただ, CBBがDOCに代わっただけである.おそらく多くの場合, 泳動パターンもよく似たものになるが,著者らの経験では, DOCの方がタンパク質複合体は少し解離しやすい傾向に あるのかもしれない.ただ,特に分光学的な解析や色素解 析が重要な光合成研究者にとってはCN-PAGEの方がよく 利用されている.

3.5. 筆者らによるCN-PAGEのbuffer系の改良

CN-PAGEは光化学系の分離のための優れた実験系であ るものの,泳動中にPSII-LHCIIからLHCIIや酸素発生系 (OEC)が解離するという課題も抱えていた.その課題を解 決するために,筆者らは2つのアプローチを取った.1つは DOCよりも変性作用の小さな化合物を探索すること,も う1つは弱酸性のbuffer系を確立することである.2つのア プローチともに論文としてまとめることができたため,こ こではそれについて紹介したい.

まず前者についてはDOCの変成作用によるものではな いかと考えDOCの代替の化合物を探した.そして,両親 媒性ポリマーのamphipol類に着目した.Amphipol類は結晶 構造解析などで用いられるようになっており,一般的に膜 タンパク質は界面活性剤ミセル中よりもamphipol類との複 合体中の方が安定であると考えられている.そして,広く 利用されているamphipol A8-35は水溶液中で負電荷を持つ. そのためこのA8-35をDOCの代わりに用いれば,より安定 に光化学系を分離できるのではないかと考えた.



図2: (Amphipol A8-35を用いたCN-PAGEとwaCN-PAGEのbuffer系の比較

A8-35を用いたCN-PAGEはPSII-LHCIIからのLHCIIの解離を効果的に抑制することができた.しかし, PSII-LHCIIからの酸素発生複合体(OEC)の解離を防ぐことはできなかった.そこで,筆者らは可溶化および泳動時のpHを弱酸性にしたbuffer系を開発した(waCN-PAGE).この系ではpH6.5でのpKaを考慮して,buffering ionをBisTrisもしくはHistidineとし,trailing ionとしてMESを選択した.また,DOCはこのpHでは不溶化するため利用できない.そのため,waCN-PAGEではA8-35を利用する必要がある.

waCN-PAGEではOECを保持したままPSII-LHCIIを分離することに成功した(Matsumae et al. 2022). 自分の 知る限り, waCN-PAGEはOECを保持したままPSII-LHCIIを分離することのできる唯一のnative-PAGEである. ただし,これまでのbuffer系のCN-PAGEと比べると,泳動時間が長くかかる(Histidineで約2倍, BisTrisで約4倍) ため,筆者自身も必要に応じて使い分けている.

実際にA8-35を用いたCN-PAGEを試したところ、期待通り、DOCを用いた従来のCN-PAGEよりもPSII-LHCIIからのLHCIIの解離を防ぐことができた.また、A8-35は高価な化合物ではあるが、A8-35とタンパク質複合体との結合は強く、泳動中に解離しないことが明らかになった.そのため、cathode bufferにA8-35を添加する必要はなく、ロードするサンプルにのみ添加すればいいことも明らかになった.これによりランニングコストを劇的に低下させることができた.この実験系については2021年に報告することができた(Kameo et al., 2021)(図1).

次にOECの解離については先行研究から、弱アルカリ 性の条件でPSIIを可溶化するとOECがPSIIから解離する が、弱酸性ではその解離を劇的に抑制できることが明ら かになっていた. CN-PAGEではpH7.0のbufferを用いるが 泳動中のゲルのpHは7.5であると報告されており、この弱 アルカリ性での分離が問題なのではないかと考えていた. そのため、弱酸性 (pH 6.5) で分離できるCN-PAGEのbuffer 系の開発に取り組んだ.そして、trailing ionをMESとし、 buffering ionをhistidineもしくはBisTrisとすることで可能と した. 実際に泳動すると、期待通り、OECを保持したまま でPSIIを分離することに成功した.なお、この系ではDOC を用いることはできない.DOCのpKaは6.5に近く不溶化し てしまうためである.このbuffer系でCBBを利用したBN-PAGEを行うことはできるものの,実際に泳動するとPSII からOECは解離してしまった.つまり,PSIIからのOECの 解離を防ぐためには,弱酸性のbuffer系とamphipol A8-35の 両方が必要らしい.つまり,私たちの実験系はPSIIにOEC を保持したまま分離できる唯一のnative-PAGEである.こ の実験系については2022年に論文として報告することがで きた(Matsumae et al., 2022) (図2および図3).

ただし、現時点では弱酸性のbuffer系を用いたCN-PAGE は通常のbuffer系のCN-PAGEよりも分離に必要な時間が長 くかかる(histidineの系でおよそ2倍、BisTrisの系でおよそ 4倍). そのため、筆者らの研究室では普段はA8-35を用い た通常のbuffer系でのCN-PAGEを行うことが多い. いずれ この欠点も改善できればと願っている.

4. まとめ

ここまでbuffer系の変遷を中心に,駆け足で,SDS-PAGE とnative-PAGEの開発の歴史をみてきた. 電気泳動,特に native-PAGEは分離後もタンパク質複合体の機能や構造が



図3:A8-35を用いたCN-PAGEとwaCN-PAGE

A8-35を用いたCN-PAGEとwaCN-PAGEで(目で見える)バンド パターンはほとんど変わらない.ただし、2D-CN/SDS-PAGE後 に銀染色やウエスタン解析を行うと、waCN-PAGEでは1)PSII からのPsbPの解離が見られず、2)ATP合成酵素のサブユニット 解離も見られない、の2つの利点があることが明らかになって いる(Matsumae et al. 2022).

維持されているため、様々な応用が可能である.現行の native-PAGEは非常に洗練されており、筆者らも日常的に 利用しているが、native-PAGEではほぼ必須のグラジエン トゲルの作成が難しいこと、また分離後のタンパク質をゲ ルから取り出すが難しいこと、などの課題もある.これら の課題についても現在取り組んでおり近い将来にその報告 ができればと願っている.

参考文献

- Choy, B.C., Cater, R.J., Mancia, F., and Pryor, E.E., Jr (2021) A 10-year meta-analysis of membrane protein structural biology: Detergents, membrane mimetics, and structure determination techniques. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 1863: 183533.
- Järvi, S., Suorsa, M., Paakkarinen, V., and Aro, E.-M. (2011) Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super- and mega-complexes. *Biochem J.* 439: 207–214.
- Kameo, S., Aso, M., Furukawa, R., Matsumae, R., Yokono, M., Fujita, T., et al. (2021) Substitution of Deoxycholate with the Amphiphilic Polymer Amphipol A8-35 Improves the Stability

of Large Protein Complexes during Native Electrophoresis. *Plant Cell Physiol.* 62: 348–355.

- Koochak, H., Puthiyaveetil, S., Mullendore, D.L., Li, M., and Kirchhoff, H. (2019) The structural and functional domains of plant thylakoid membranes. *Plant J.* 97: 412–429.
- Kotov, V., Bartels, K., Veith, K., Josts, I., Subhramanyam, U.K.T., Günther, C., et al. (2019) High-throughput stability screening for detergent-solubilized membrane proteins. *Sci Rep.* 9: 10379.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680–685.
- Matsumae, R., Kameo, S., Tanaka, R., and Takabayashi, A. (2022) Letter to the editor: Weak-acidic clear-native polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of the intact forms of thylakoid protein complexes. Plant Cell Physiol. 63: 883–885.
- Nishioka, K., Kato, Y., Ozawa, S.-I., Takahashi, Y., and Sakamoto, W. (2021) Phos-tag-based approach to study protein phosphorylation in the thylakoid membrane. *Photosynth Res.* 147: 107–124.
- Pagliano, C., Barera, S., Chimirri, F., Saracco, G., and Barber, J. (2012) Comparison of the α and β isomeric forms of the detergent n-dodecyl-D-maltoside for solubilizing photosynthetic complexes from pea thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1817: 1506–1515.
- Schägger, H., Cramer, W.A., and von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem.* 217: 220–230.
- Schägger, H., and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. 166: 368–379.
- Schägger, H., and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*. 199: 223–231.
- Strecker, V., Wumaier, Z., Wittig, I., and Schägger, H. (2010) Large pore gels to separate mega protein complexes larger than 10 MDa by blue native electrophoresis: isolation of putative respiratory strings or patches. *Proteomics*. 10: 3379– 3387.
- Wittig, I., Braun, H.-P., and Schägger, H. (2006) Blue native PAGE. *Nat Protoc.* 1: 418–428.

Yokoyama, R., Yamamoto, H., Kondo, M., Takeda, S., Ifuku, K., Fukao, Y., et al. (2016) Grana-localized proteins, RIQ1 and RIQ2, affect the organization of light-harvesting complex II and Grana stacking in Arabidopsis. *Plant Cell*. 28: 2261–2275.

原子間力顕微鏡の仕組みと光合成膜試料観察への応用

山本 大輔¹⁾,山野 奈美²⁾

2024年11月29日受付, 2024年12月28日受理

光合成膜で起こるエネルギー移動や電子伝達反応の理解には、膜内におけるタンパク質の配置に関 する情報を得ることは必要不可欠である.原子間力顕微鏡(AFM)は、溶液環境を保ったまま光合成膜内 のタンパク質を一分子レベルで観察できる手法であり、紅色細菌から高等植物に至るまで、様々な生 物の光合成膜におけるタンパク質分布を明らかにしてきた.本稿では、AFMの測定原理と空間分解能 について解説するとともに、近年開発されたAFMの高速化技術についても取り上げる.また、実際に 光合成膜を観察する際のサンプル処理方法と、AFMを用いて光合成膜を観察した代表的な研究例につ いて紹介する.

Mechanism of Atomic Force Microscopy and its Application to Photosynthetic Membranes

Daisuke Yamamoto¹, Nami Yamano²

To understand the well-organized photosynthetic reaction, it is important to obtain information on the distribution and orientation of proteins in the membrane. Atomic force microscopy (AFM) is one of the most powerful tools for visualizing the protein structure at the molecular level under physiological conditions. AFM has been applied to various photosynthetic membranes from photosynthetic bacteria, cyanobacteria, and higher plants. In this CHAPTER, we first explain working principle, spatial resolution of AFM, and data interpretation. Next, several representative imaging research of photosynthetic membranes using conventional AFM and high-speed AFM are introduced.

キーワード:原子間力顕微鏡,高速原子間力顕微鏡,光合成膜 Atomic force microscopy, high-speed AFM, photosynthetic membrane

1. はじめに

原子間力顕微鏡(Atomic force microscope: AFM)(Binnig et al. 1986)は1986年にBinnigらによって開発された顕微鏡 である.カンチレバーと呼ばれる微小な板バネの先端に 取り付けられた探針で試料表面を走査し,試料の表面構

連絡先 山本 大輔 福岡大学理学部 〒 814-0180 福岡県福岡市城南区七隈 8 丁目 19-1 Tel: 092-871-6631 Email: dyamamoto@fukuoka-u.ac.jp 造を取得する.ナノメートルオーダーの空間分解能を有 し,大気中,真空中,液中を問わず様々な環境下にある 試料を直接観察可能であり,現在では生体試料への応用 が広く行われている.代表的なタンパク質構造解析手法 であるX線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡法と比較す ると空間分解能が一桁低く,また,得られる構造は表面

1) 福岡大学理学部

Faculty of Science, Fukuoka University, Fukuoka, Japan 2) 福岡大学理学部

Faculty of Science, Fukuoka University, Fukuoka, Japan



図1:AFM装置の模式図.カンチレバー背面に照射されたレー ザー光の反射光をフォトダイオードで検出し,信号が一定値と なるようにフィードバック回路により試料をz方向へ上下動さ せる.上下動のz電圧をパソコンで読み取り,表面構造を疑似 カラー表示する.

形状のみである. そのため, タンパク質の構造解析とい う点ではこれらの手法に数段階劣る. 一方で, AFMは生 体膜に内在するタンパク質を1分子レベルで直接可視化す ることができ, タンパク質レベルまで可溶化することな く膜内に存在するままの構造を捉えることができるとい う点で大きな利点がある.

本稿では、AFMの動作機構について解説し、その後、 AFMによる光合成膜試料の観察例とそれらから得られる 光合成システムの実像について紹介する.

2. AFMの仕組み

ここでは、AFMの仕組みを概観する.代表的なAFM測 定方法であるコンタクトモード、タッピングモードなら びに近年広がりつつある高速AFMについて述べ、AFM測 定において実際に留意すべき点についても触れる.

2.1 AFMの測定原理

AFMによる画像化の原理は光学顕微鏡など波の結像を 原理とする顕微鏡とは大きく異なり,探針先端と試料表 面との局所的な相互作用の検出を基にしている.図1に AFM装置の概要を示す.探針先端を試料と相互作用する 距離まで近接させ,2次元走査する.その際に探針と試料 との間に生じる相互作用が一定となるように探針または 試料を上下動させる.各xy座標における上下動の量(z座標) を擬似カラー表示することで表面構造像を得る.AFMの 測定原理はこのように比較的単純なものであるが,生体 試料のナノ構造を直接観察するためには,試料が探針か ら受ける力の精密なコントロール,ナノメートルオーダー の先端曲率半径を持つ鋭い探針,高い精度のxyz試料位置



図2:光てこ法.カンチレバーのたわみにより生じる反射光の 角度変化を二分割フォトダイオードで検出する.それぞれの受 光素子から出力される電圧の差(*V*₁-*V*₂)がたわみ量に比例する.

制御など、多くの技術的な要件がある.

生体試料を非破壊でAFM観察するためには、測定中に 作用する力を最小限に保つ必要がある。膜タンパク質で あるバクテリオロドプシンのAFMによる観察例では、探 針先端で100 pNよりも大きい力を加えるとEへリックスと Fへリックスを結ぶループ構造が押しつぶされ観察されな くなることが報告されている (Müller et al. 1995a). タンパ ク質の表面構造を高い信頼性で得るためには、100 pNも しくはそれ以下の力であることが要求される。生体試料 の測定には0.1 N/m程度のバネ定数をもつ柔らかいカンチ レバーが一般的に用いられる. このバネ定数は、探針先 端に加わる100 pNの力によってカンチレバーが1 nmたわ む硬さに相当する. 相互作用力を10 pNのオーダーに保つ ためには探針先端の変位、すなわちカンチレバーのたわ みをオングストロームオーダーの精度で検出し制御する 必要があることを意味する.

カンチレバーのたわみ量は、背面に集光したレーザー 光の反射を計測することで得ることができる.カンチレ バーがたわむとレーザー光の反射角が変化し、二分割フォ トダイオードに入射する位置がわずかに変化する.入射 位置は、分割されたフォトダイオードのそれぞれに入射 された光量の差として出力される(図2).この方法は光 てこ法(Meyer and Amer 1988)と呼ばれ、簡便かつ高い精 度を有するためAFM装置で広く採用されている.我々の AFM装置でも光てこ法を採用しており、およそ20 nmの変 位で1 V出力される程度の感度を有する.検出装置の電気 ノイズが5 mVであれば1Åの変位を検出でき、力分解能は 10 pN程度となる.しかしながら、このように高い感度を 持つ装置であっても、相互作用力を10 pN未満に保つこと は容易ではない.カンチレバーのたわみが熱揺らぎによっ



図3:AFM測定モードの模式図. (a)コンタクトモード. (b)タッ ピングモード.

て変動するためである.カンチレバーの熱揺らぎ量の二 乗 Δz²はエネルギー等分配則に従い,

$$\frac{1}{2}k\Delta z^2 = \frac{1}{2}k_{\rm B}T$$

と表される.ここで、kはカンチレバーのバネ定数、 k_B は ボルツマン定数、Tは絶対温度である.0.1 N/mのカンチレ バーを用いた場合、室温においてカンチレバーの揺らぎ $\sqrt{\Delta z^2}$ は2Å程度となる、探針先端を試料に確実に相互作用 させるために熱揺らぎを乗り越えた領域で測定するなら ば、20 pN以上の力が必要と見積もられる.

探針先端と試料との間の距離の制御や試料のxy二次元 スキャンをオングストロームオーダーの精度で行うため に、ピエゾ素子が用いられる. ピエゾ素子とは、電圧を 加えると伸縮などの変形を生じるデバイスである.xvzの 3軸にそれぞれピエゾ素子を配することで、各軸方向の制 御が可能である.一度にスキャンできる最大スキャン範 囲はAFM装置あるいはそれぞれの製品に用意されている スキャナの種類により異なり, xv方向に1~100 μm程度, z方向に1~10 μm程度である. 最小スキャン範囲はxy制御 の位置ノイズ等によって制約される. 仮に1 Vの電圧を印 加した際に10 nm伸縮するピエゾ素子であれば、1 mVの電 気ノイズによる位置ノイズは0.1Åである. 1 Vで100 nm伸 縮するピエゾであれば位置ノイズは1Åとなる. すなわち, 高分解能測定など高い位置精度が要求される場合には, 最大可能スキャン範囲が狭いスキャナを用いる方が有利 である.

2-2 測定モード

AFMには様々な測定モードが存在する.AFM測定モードは、カンチレバーのどのような物理量を用いて探針-試料間相互作用を検出するかにより分類される.ここでは、生体試料観察に広く用いられるコンタクトモードと タッピングモードについて解説する.

コンタクトモード (contact mode) は, 探針先端を試料表

面に常時接触させながらスキャンする方法であり(図3a), いくつかの膜タンパク質について高分解能観察がなされ ている (Müller et al. 1995b, Scheuring et al. 1999). 探針が試 料から受ける斥力により、カンチレバーはz方向にたわむ. その位置z_eの変化をフィードバック信号として用いる.ス キャンの間、たわみ量すなわち斥力の大きさが一定値に なるように探針-試料間距離が制御される. コンタクト モードでは、50 pN以上の斥力で画像取得がなされること が多い、コンタクトモードにおいて生じる力は、フック の法則により $F = k(z_c - z_0)$ と表される. ここでz₀は外力 が作用していないときのカンチレバーの平衡位置である. 一方で、外力が働かない状態であってもカンチレバーの 平衡位置z。は変動する、それにより斥力の大きさが変化す るため、スキャン中に観察者が画像を確認しながら手動 で調節する必要が生じる.また、コンタクトモードにお いては探針先端を常時接触させながら横方向へ動かすた め、凹凸の大きい試料の場合には横方向への力が生じる. そのため、コンタクトモードは水溶性タンパク質よりも、 表面の粗さが1 nm程度である膜タンパク質試料の観察に 向いている.凹凸の大きい試料に対しては、次に述べる タッピングモードが適している.

タッピングモードは、カンチレバーを強制的に振動させ (図3b), その振幅値をフィードバック信号として用いる. 探針と試料との相互作用による振幅値の変化を検出する ことから、振幅変調モード (amplitude modulation mode) と もよばれる. 試料表面をスキャンする間. 振動振幅は一 定値に保たれる. 探針先端は振動の1周期ごとに試料に接 触し、それ以外の時間は非接触状態となる、コンタクト モードと比較してスキャン中に横方向へ生じる力を大幅 に低減することができる. そのため、コンタクトモード では観察が極端に難しい試料であっても、タッピングモー ドでは観察可能な場合がある. タッピングモードにおい て生じるz方向への斥力は振動1周期を通した力の平均値で 表されることが多い. 試料との相互作用がない状態の振 幅(自由振動振幅)をA. スキャン中の振動振幅をA. カン チレバーのQ値をQとすれば、斥力の平均値〈F〉は次の式 で表すことができる(García 2010).

$$\langle F \rangle = \frac{kA_0}{2Q} \left[1 - \left(\frac{A}{A_0}\right)^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

この式より、タッピングモードにおいて力を小さく保 つためには、自由振動振幅40を小さく、スキャン中の振動 振幅4は可能な限り自由振動振幅に近い値に設定すること が重要であることが分かる、一方で、自由振動振幅が小



図4:探針曲率半径によるAFM水平方向分解能への影響. 点線: 探針曲率半径を5 nm, 試料の高さと幅を1 nmと仮定したときの 探針先端の軌跡. AFM表面構造は5 nm程度の幅をもった構造と して観察される.

さすぎる場合には試料への横方向への力が発生しやすく なる. そのため、タンパク質試料を観察する場合には4.は 1 nm程度以上に設定される. なお、Q値は品質係数ともよ ばれ、媒質の粘性に逆比例する量である. 我々が通常タッ ピングモード測定で適用するパラメーター (k = 0.1 ~ 0.2 N/m, $Q \sim 1$, $A_0 \sim 1$ nm, $A \sim 0.9$ nm) の場合, タッピン グ力の平均値は20~40 pN程度と計算される. この値は あくまでも非接触状態の時間も含めた平均値であり、タッ ピング力のピーク値(F_{peak})はさらに大きい. その計算式(Hu and Raman 2007) を用いると、 試料のヤング率を100 MPa. 探針先端の曲率半径を2 nm, タッピングのパラメーター を先ほどと同じと仮定したとき、 F_{peak} は $\langle F \rangle$ の5倍程度と計 算される.カンチレバーの強制振動は,一般的に,カン チレバー付近に取り付けた振動子によって機械的に生じ させる. その励振効率は時間とともに変化し、そのため、 自由振動振幅40は長時間にわたり変動する.これにより, コンタクトモードの場合と同様に力が変動するため、観 察者による調整が必要となる.

2-3. 空間分解能

AFMによるタンパク質観察において、サブユニット構造が明瞭に観察される場合がある.このような高分解能測定では、横方向の空間分解能は1 nm程度であると見積もられる(Fechner et al. 2009). AFM測定における空間分解能は、主に探針先端の形状により制限される. 先端の鋭い探針であるほど横方向分解能は高くなる. 市販のカンチレバーでは、曲率半径10 nm以下の探針先端をもつものが入手可能である.また、電子ビームによりカンチレバー先端に探針を成長させる方法(Electron Beam Deposition: EBD)(Wendel et al. 1995)を用いれば、探針を自作することもできる.いずれの場合においても、探針先端の形状がAFMの横方向分解能に大きく影響する.仮に図4のような高さ1 nmの試



図5:ダブルチップによるアーチファクト. (a)ダブルチップを 持つ探針によるAFM観察の模式図. (b) ダブルチップにより得 られるAFM像の模式図. A:突起Aによる構造. B:突起Bによ る構造.

料を曲率半径5 nmの探針でスキャンすると,探針先端の軌 跡,すなわちAFM測定により得られる表面構造像は半値 全幅で4 nm広がることになる.これはタンパク質のサブユ ニット構造を1 nmの空間分解能で可視化できることと矛盾 しているように思われる.このことは,探針先端の形状は 必ずしも球形ではなく,局所的に突出した構造をもつこと を示唆している.突出箇所が探針先端にあれば高い空間分 解能でAFM画像を得ることができる.ただし,探針先端 の形状を正確に制御することは困難であり,高分解能観察 が可能な探針であるか否かは運によるところが大きい.な お,近年ではデータ解析方法や情報処理により,探針形状 の影響を低減し分解能を上げる技術も進展している (Heath et al. 2021, Matsunaga et al. 2023).

AFM測定において探針で試料をスキャンする間,探針 先端は常に同じ形状を保っているとは限らない. 試料と の相互作用による先端形状の変化あるいはコンタミの付 着により,突然画質が変化することがある. 探針の先端 形状による効果をタンパク質の構造と混同することのな いように,データの解釈に注意を払う必要がある. 特に ダブルチップと呼ばれる効果には注意を要する. 探針先 端にふたつの突起があると,それぞれの突起先端が同じ 構造をなぞることになる. 結果として,ある突起Aによる 表面構造と突起Bによる表面構造とが1枚の画像の中に重 なった画像が得られる(図5).全ての分子が同じ向きにそ ろっているように見えることがあるが,そのような画像 が得られた場合にはまずダブルチップの可能性を考える 必要がある.

2-4. 高速AFM

2001年に高速AFMが報告(Ando et al. 2001)されて以降, 現在に至るまでAFM装置の高速化と関連技術の開発が進 んできた. それ以前は1枚の画像を得るのに数分以上要し ていたものが0.1秒以下で画像取得が可能になり,近年で は1秒間に50枚の画像取得性能を有するAFMも市販されて いる.ここでは、AFMの高速化技術の概要を述べる.

AFM測定は、試料(もしくはカンチレバー)のxyスキャン と同時に相互作用力を一定に保つためのz方向へのフィー ドバック動作を伴う. その機械的な動作をいかに速くで きるかが高速化の要点である. 質量の大きな試料台(もし くはカンチレバーホルダ)を急激に動作させると過渡的な 振動が生じる. その機械的な特性のため、1枚のAFM画像 を得るのに必要な時間が制限される。例えるなら、下端に おもりをぶら下げたバネの上端を手で上下動させ、そのと きおもりと手の上下動を同じにするためには、ゆっくり と上下させる必要があるのと同じである. 速く動かせば バネの不要な伸び縮みや振動が生じてしまい、正しい表面 構造を得ることができない. このようなAFM構成部品の 過渡的な応答を小さくするためには、おもりの質量を減ら す、つまり機械的な動作をする部品のサイズを小さくすれ ばよい. そのため、高速AFMのスキャナでは小型のピエ ゾ素子が用いられ、特殊な形状のスキャナ(Marchesi et al. 2021) を除けばxy方向の動作範囲は1 ~ 数µm程度, z方向は 数百nm~1μm程度となる. さらに過渡的な振動を能動的 に抑制するアクティブダンピングにより、スキャナの動作 速度はより高められる(Kodera et al. 2005).

スキャナだけでなく,探針と試料との相互作用により 生じるカンチレバーの応答速度の向上も高速化において 重要である.カンチレバーの応答速度を向上させるため には、スキャナの部品と同様、質量を減らせばよい、つ まりカンチレバーそのものの大きさを小さくすればよい (Viani et al. 2000). そのため、高速AFMで使用されるカン チレバーは、一般的なカンチレバーよりも一桁サイズが 小さく,長さ10 µm程度である.カンチレバーの応答速度 は、同程度のバネ定数であれば、共振周波数が高いほど 速くなると考えてよい. 高速AFM用のカンチレバーは小 さいバネ定数と高い共振周波数が両立するように設計さ れており、大気中で1 MHz以上の共振周波数を持つものが 販売されている.実際に溶液環境中で使用する場合には, 周囲の水の存在により共振周波数は低下する. そのため. タッピングモードで用いる励振周波数は大気中の共振周 波数のおよそ1/3になる.

タッピングモードAFMにおいては、カンチレバーの振 動振幅をフィードバック信号として用いる.そのため、 高速AFMでは振動振幅の計測における遅延を小さくする ことにも力が注がれている.高速AFMが開発された当初 は振幅計測の遅延としてカンチレバー振動周期の1/2の時 間を要していたものが,現在ではほぼ無視できる程度の 遅延時間で振幅値を計測することが可能である(Umeda et al. 2021). その他, x方向への順方向スキャン時にのみ画 像を取得する方法(Fukuda and Ando 2021)や,順方向スキャ ンで得られた画像と逆方向スキャンで得られた画像を重 ね合わせる方法(Kubo et al. 2023)により,画像取得時間の 短縮が図られている.

3. AFMの光合成研究への応用

光捕集に始まる一連の光合成反応は、流動的な膜の中 で光合成タンパク質が高度に組織化されることで達成さ れる. AFMは、光合成膜内のタンパク質の配置や相互作 用を、高解像度かつ生理条件下で直接観察することがで きる有用な手法である.ここでは、AFMで観察するため にサンプルに求められる条件、およびAFMを用いた代表 的な研究について紹介する.

3.1 AFM観察の実際

高分解能のAFM像を取得するには、サンプルとなる光 合成膜はできるだけ平坦である必要がある. シアノバク テリアのチラコイド膜や、一部の光合成細菌でみられる ラメラ状クロマトフォアのような平面膜であれば、細胞 から単離された膜を必要に応じて精製したのち、そのま ま基板であるマイカに吸着させて観察される. 高等植物 のチラコイド膜のように膜が三次元構造を形成している 場合,低濃度の界面活性剤で可溶化し,膜を断片化させ る必要がある.これをショ糖密度勾配やゲルろ過カラム で精製することで観察用のサンプルが調製される.ホウ レンソウやシロイヌナズナからAFM観察用の膜を単離す る場合、界面活性剤としてジギトニンが広く用いられて おり、ルーメン側が表に向いた反転グラナ膜や乖離した ストロマラメラを観察することが可能である. しかしな がら、界面活性剤の使用は膜構造が変化するリスクを伴 う. 観察目的に応じた界面活性剤の選択と可溶化濃度の 最適化が必要である.

得られたAFM像には、必要に応じてノイズリダクショ ン等の画像処理が施される.現在、AFMの空間分解能は、 膜水平方向に1 nm、高さ方向に0.1 nmに達する.そのた め、PSI、PSIIの表在性サブユニットや、Cyt b₆fのルーメ ン側サブユニットなど、膜面から3-4 nm飛び出ているタ ンパク質であれば、AFMで捉えることは比較的容易であ る.一方、膜面との高低差が小さいアンテナタンパク質や、 逆にATPaseのCF₁サブユニットなど、膜面からの突出が大 きく針との相互作用で容易に乖離してしまうタンパク質 は観察が難しく、測定やデータ解析に工夫が求められる. また、光合成膜を占めるメジャーなタンパク質について は、既に構造が解かれており、その三次元座標がPDBバン クに登録されている.この原子座標をもとにAFM像をシ ミュレーションし (Amyot and Flechsig 2020)、取得された AFM像と照らし合わせることで、タンパク質の帰属やサ ブユニットの結合の有無に関する情報を得ることが可能 である.

3-2 AFMを用いた複合体高次構造の観察

これまでに、紅色細菌、紅藻、シアノバクテリア、植 物において、光合成膜におけるタンパク質の分布と構造 がAFMにより明らかにされてきた(Wood et al. 2018, Liu et al. 2013, Sturgis et al. 2009, Zhao et al. 2016). 膜構造は、ネ ガティブ染色やクライオ電子線トモグラフィーでも調べ られてきたが、これらの手法でin situのタンパク質構造を 見るには、多数の分子に対して画像の平均化処理が必要に なる.一方AFMは、単一の分子を比較的高い分解能で観 察できるため、個々の分子の構造的特徴や複合体形成の 違いを直接評価することが可能である. そのため, 光合 成膜内での多様な複合体形成や高次構造をとらえること に力を発揮してきた. 例えば、シロイヌナズナから単離 されたグラナ観察では、大部分のPSIIはLHCIIと複合体を 作りグラナ中でランダムに配向しているが、一部のPSII複 合体は、結晶状に規則正しく配列したアレイ構造を形成 していることが明らかになった(Tietz et al. 2015). またア レイ構造の形成が、膜脂質の脂肪酸不飽和度や光阻害の 程度、さらに、ホウレンソウのグラナでは温度に依存す ることがAFM観察により明らかになった(Tietz et al. 2015, Onoa et al. 2014, Sznee et al. 2011). グラナのタンパク質密 度は70-80%ときわめて高い. そのため膜面積の大部分を 占めるPSII複合体がランダムに配向した場合、プラストキ ノンの拡散可能距離は短く、隣接するCyt b_ofとの間でし か電子のやり取りをできない.一方.アレイ構造が形成 されるとタンパク質格子の合間を縫ったより長距離の拡 散が可能になる. そのため、グラナで観察されたPSII複合 体の高次構造化は、生理環境に応答した電子伝達制御に 関連していると考えられている (Ruban et al. 2015).

生理環境に応答した複合体高次構造の変化は、シアノ バクテリアのチラコイド膜においてもとらえられている. シアノバクテリアは集光アンテナとして水溶性タンパク 質であるフィコビリソームを有するが、鉄欠乏条件下で は膜貫通アンテナタンパク質であるIsiAが発現し、PSIの 周りにリング状の会合体として結合する. Synechococcus elongatus PCC 7942のチラコイド膜では、強光ストレスに よってもIsiAが蓄積することがAFMによる観察で確認さ れた (Zhao et al. 2020). これまで, 電子顕微鏡をもちいた 単粒子解析より、PSIは一層もしくは二層のIsiAリングを 有する構造であると報告されていたが、AFMによる詳細 な観察の結果、PSIには単層のIsiAリングを有するものか ら、四層以上のリングと極めて大きい複合体を形成して いるものまで存在することが明らかになった. またシア ノバクテリアでは、光強度だけでなく、光の波長に応答 した複合体高次構造の変化も確認されている。通常PSIに はChl aが結合するが、いくつかのシアノバクテリアでは、 遠赤色光培養により長波長光を吸収できるChl dやChl fを PSIに結合させることが知られてきた. 三種類のシアノバ クテリアChroococcidiopsis thermalis 7203, Synechococcus sp. PCC 7335, Chroococcidiopsis fritschii 9212では、単量体 や二量体といった不規則な対称性にあったPSIが遠赤色光 順応に伴い三量体化する様子がAFMによりとらえられ, シアノバクテリアがマクロな構造変化を通して光環境に 適応していることが明らかになった (MacGregor-Chatwin et al. 2022).

3-3. 高速AFMを用いた光合成反応ダイナミクスの可視化

光合成反応の多くのプロセスは、タンパク質の移動や 構造変化を伴う. 例えば、プラストシアニンによる電子 輸送、酸化損傷を受けたPSIIのグラナからストロマラメラ への水平移動とFtsHによるD1分解,励起バランスを調節 するためにLHCIIがPSIIからPSIへとシャトルされるステー ト遷移などである.近年、イメージング速度を各段に向 上させた高速AFM技術が開発され(Ando et al. 2001, Ando et al. 2024), これらの反応ダイナミクスを直接動画とし て可視化する試みが進められつつある. 光合成膜におけ るタンパク動態に関する研究は、古くから蛍光消光回復 法 (FRAP) や蛍光相関分光法 (FCS) を用いて行われてきた (Kirchhoff et al. 2014). しかし、これらの手法では、追跡 できる対象が蛍光を発する光合成タンパク質に限られる. また各タンパク質の室温下での蛍光波長は近いため、特 定のタンパク質に関する情報を抜き出すハードルは高い. 目的タンパク質にサブミクロンサイズの標識をつけ顕微 鏡で追跡する一分子追跡法 (SPT) を用いた動態評価も行わ れてきたが、標識粒子の立体障害によりタンパク質の移 動域に制限がでてしまうという問題点がある (Consoli et al. 2005). 高速AFM像として, 溶液中で非破壊かつ無修飾の 状態で、膜内での各タンパク質のふるまいを計測できれ

ば,様々な光合成反応に詳細な説明を与えることが可能 になる.

高速AFMを適用した研究例として、B. Onoaらによるホ ウレンソウ由来グラナの観察がある (Onoa et al. 2020). 分 解能の問題でCyt b₆fとPSIIの区別には至らなかったもの の、これら二量体タンパク質がグラナで拡散する様子が 動画として初めてとらえられた. 大部分のグラナにおい て二量体タンパク質は~10 nm²の局所領域内での拡散を 示したが、一部のグラナでは光応答における過渡的な状 態と予想される、極めて大きな移動性を示すことが明ら かになった。また、高速AFMはグラナにおけるPSIIの構造 変化の追跡にも用いられている (Tokano et al. 2020). PSII の膜表在性サブユニットであるPsbPとPsbOがプローブと の相互作用により段階的に乖離していく様子がとらえら れた.この膜表在性タンパク質の乖離と、さらにはMnCa クラスターの分解が、CP43のルーメン側ドメインに構造 的ゆらぎをもたらすことが高速AFMで明らかになり、こ のドメインのMnCaクラスター構築への重要性が示唆され ることとなった. 今後, 高速AFMを用いた研究が進み, 光を含めた生理環境の変化が、どのように光合成タンパ ク質の物性や構造、そしてマクロな配置の変化をもたら すのか、分子スケールで理解されることが期待される.

謝辞

本稿で紹介した研究の一部は科研費21H05040, 23H04963 の助成を受けて実施されたものです.

参考文献

- Amyot, R. and Flechsig, H. (2020) BioAFMviewer: An Interactive Interface for Simulated AFM Scanning of Biomolecular Structures and Dynamics. *PLoS Comput. Biol.* 16: e1008444
- Ando, T., Kodera, N., Takai, E., Maruyama, D., Saito, K. and Toda A (2001) A High-speed Atomic Force Microscope for Studying Biological Macromolecules. *Proc. Natl. Acad Sci.* U S A. 98: 12468-12472
- Ando, T., Fukuda, S., Ngo, K.X. and Flechsig. H., (2024)
 High-speed Atomic Force Microscopy for Filming Protein
 Molecules in Dynamic Action. *Annu. Rev. Biophys.* 53: 19-39
- Binnig, G., Quate, C.F. and Gerber, C. (1986) Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56: 930-933

Consoli, E., Croce, R., Dunlap, D.D. and Finzi, L. (2005)

Diffusion of Light-harvesting Complex II in the Thylakoid Membranes. *EMBO Rep.* 6:782–786.

- Fechner, P., Boudier, T., Mangenot, S., Jaroslawski, S., Sturgis, J.N. and Scheuring, S. (2009) Structural Information, Resolution, and Noise in High-resolution Atomic Force Microscopy Topographs. *Biophys. J.* 96: 3822-3831
- Fukuda, S. and Ando, T. (2021) Faster High-speed Atomic Force Microscopy for Imaging of Biomolecular Processes. *Rev. Sci. Instrum.* 92: 033705
- García, R. (2010) Amplitude Modulation Atomic Force Microscopy; Wiley-VCH.
- Heath, G.R., Kots, E., Robertson, J.L., Lansky, S., Khelashvili,G., Weinstein, H., et al. (2021) Localization Atomic ForceMicroscopy. *Nature* 594: 385-390
- Hu, S. and Raman, A. (2007) Analytical Formulas and Scaling Laws for Peak Interaction Forces in Dynamic Atomic Force Microscopy. *Appl. Phys. Lett.* 91: 123106
- Kirchhoff, H. (2014) Diffusion of Molecules and Macromolecules in Thylakoid Membranes. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* 1837: 495–502.
- Kodera, N., Yamashita, H. and Ando, T. (2005) Active Damping of the Scanner for High-speed Atomic Force Microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* 76: 053708
- Kubo, S., Umeda, K., Kodera, N. and Takada, S. (2023)
 Removing the Parachuting Artifact using Two-way Scanning
 Data in High-speed Atomic Force Microscopy. *Biophys. Physicobiol.* 20: e200006
- Liu, L.N. and Scheuring, S. (2013) Investigation of Photosynthetic Membrane Structure using Atomic Force Microscopy. *Trends. Plant Sci.* 18:277–286.
- Marchesi, A., Umeda, K., Komekawa T., Matsubara, T., Flechsig, H., Ando, T. et al.. (2021) An Ultra-wide Scanner for Large-area High-speed Atomic Force Microscopy with Megapixel Resolution. *Sci. Rep.* 11: 13003
- Matsunaga, Y., Fuchigami, S., Ogane, T. and Takada, S. (2023) End-to-end Differentiable Blind Tip Reconstruction for Noisy Atomic Force Microscopy Images. *Sci. Rep.* 13: 129
- Müller, D.J., Buldt, G. and Engel, A. (1995a) Force-induced Conformational Change of Bacteriorhodopsin. J. Mol. Biol. 249: 239-243
- Müller, D.J., Schabert, F.A., Büldt, G. and Engel, A. (1995b)
 Imaging Purple Membranes in Aqueous Solutions at Subnanometer Resolution by Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* 68: 1681-1686

- MacGregor-Chatwin, C., Nürnberg, D.J., Jackson, P.J., Vasilev, C., Hitchcock, A., Ho, M.Y., et al. (2022) Changes in Supramolecular Organization of Cyanobacterial Thylakoid Membrane Complexes in Response to Far-red Light Photoacclimation. *Sci. Adv.* 8: 1–16.
- Meyer, G. and Amer, N.M. (1988) Novel Optical Approach to Atomic Force Microscopy. *Appl. Phys. Lett.* 53: 1045-1047
- Onoa, B., Schneider, A.R., Brooks, M.D., Grob, P., Nogales,
 E., Geissler, P.L., et al. (2014) Atomic Force Microscopy of Photosystem II and its Unit Cell Clustering Quantitatively Delineate the Mesoscale Variability in *Arabidopsis* Thylakoids. *PLoS One*. 9: e101470
- Onoa, B., Fukuda, S., Iwai, M., Bustamante, C. and Niyogi K.K. (2020) Atomic Force Microscopy Visualizes Mobility of Photosynthetic Proteins in Grana Thylakoid Membranes. *Biophys. J.* 118: 1876–1886.
- Ruban, A.V. and Johnson, M.P. (2015) Visualizing the Dynamic Structure of the Plant Photosynthetic Membrane. *Nat. Plants* 1: 15161
- Scheuring, S., Ringler, P., Borgnia, M., Stahlberg, H., Müller, D.J., Agre, P., et al.. (1999) High Resolution AFM Topographs of the *Escherichia coli* Water Channel Aquaporin Z. *EMBO J*. 18: 4981-4987
- Sturgis, J.N., Tucker, J.D., Olsen, J.D., Hunter, C.N. and Niederman, R.A. (2009) Atomic Force Microscopy Studies of Native Photosynthetic Membranes. *Biochemistry*. 48: 3679–3698.
- Sznee, K., Dekker, J.P., Dame, R.T., van Roon, H., Wuite, G.J.L. and Frese, R.N. (2011) Jumping Mode Atomic Force Microscopy on Grana Membranes from Spinach. J. Biol. Chem. 286: 39164–39171.
- Tietz, S., Puthiyaveetil, S., Enlow, H.M., Yarbrough, R., Wood, M., Semchonok, D.A. et al. (2015) Functional Implications of Photosystem II Crystal Formation in Photosynthetic Membranes. J. Biol. Chem. 290: 14091–14106.
- Tokano, T., Kato, Y., Sugiyama, S., Uchihashi, T. and Noguchi, T. (2020) Structural Dynamics of a Protein Domain Relevant to the Water-Oxidizing Complex in Photosystem II as Visualized by High-Speed Atomic Force Microscopy. J. Phys. Chem. 124: 5847–5857
- Umeda, K., Okamoto, C., Shimizu, M., Watanabe, S., Ando, T. and Kodera, N. (2021) Architecture of Zero-latency Ultrafast Amplitude Detector for High-speed Atomic Force Microscopy. *Appl. Phys. Lett.* 119: 181602

- Viani, M.B., Pietrasanta, L.I., Thompson, J.B., Chand, A., Gebeshuber, I.C., Kindt, J.H., et al. (2000) Probing Proteinprotein Interactions in Real Time. *Nat. Struct. Biol.* 7: 644-647
- Wendel, M., Lorenz, H. and Kotthaus J.P. (1995) Sharpened Electron Beam Deposited Tips for High Resolution Atomic Force Microscope Lithography and Imaging. *Appl. Phys. Lett.* 67: 3732
- Wood, W.H.J., MacGregor-Chatwin, C., Barnett, S.F.H., Mayneord, G.E., Huang, X., Hobbs, J.K., et al. (2018)
 Dynamic Thylakoid Stacking Regulates the Balance between Linear and Cyclic Photosynthetic Electron Transfer. *Nat. Plants*, 4: 116–127.
- Zhao, L.S., Su, H.N., Li, K., Xie, B.B, Liu, L.N., Zhang, X.Y., et al. (2016) Supramolecular Architecture of Photosynthetic Membrane in Red Algae in Response to Nitrogen Starvation. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg.*, 1857, 1751–1758.
- Zhao, L.S., Huokko, T., Wilson, S., Simpson, D.M., Wang, Q., Ruban, A.V., et al. (2020) Structural Variability, Coordination and Adaptation of a Native Photosynthetic Machinery. *Nat. Plants.* 6: 869–882.

緑色系統におけるカロテノイドの分析

関 荘一郎¹⁾,藤井 律子²⁾

2024年12月3日受付, 2024年12月12日受理

近年,様々な研究手法の発展により,緑色系統(Green lineage)の光合成生物内,さらには光合成色素 蛋白質複合体内におけるカロテノイドの局在や組成,その化学構造の分析の必要性が高まっている. 本稿では,光合成色素の各複合体への蓄積パターンや生合成経路等から,緑色系統の光合成生物のカ ロテノイドの戦略的な分析方法について記載する.

Carotenoid analysis for photosynthetic organisms in green lineage

Soichiro Seki¹, Ritsuko Fujii²

Recent advancements in various research techniques have highlighted the increasing need to analyze the localization, composition, and chemical structures of carotenoids within the pigment-protein complexes of photosynthetic organisms in the green lineage. This paper outlines strategic approaches for analyzing carotenoids in these organisms, focusing on accumulation patterns within pigment complexes, biosynthetic pathways, and related aspects.

キーワード:カロテノイド,緑色植物,光合成色素蛋白質複合体,色素分析,化学構造決定 carotenoids, green plants, photosynthetic pigment-protein complexes, pigment analysis, chemical structural determination

1. はじめに

光合成生物は光合成色素としてクロロフィルとカロテ ノイドを含有する.クロロフィルは大まかに5種類が,そ の類縁体を含めると十数種類が発見されている.一方, カロテノイドは2004年に750種類以上の化学構造が体系的 にまとめられており (Britton et al. 2004),その化学構造は 比較的多様である.この中でも,光合成器官に蓄積する カロテノイドは約150種類が知られており(高市 2006),光 合成生物が進化の過程でカロテノイドの化学構造を多様

連絡先

関 荘一郎 大阪大学 蛋白質研究所 〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2 Tel: 06-6879-8605 Email: s-seki@protein.osaka-u.ac.jp 化させてきた経緯を物語る.これら既知のカロテノイド の中でも機能がよくわかっているものは数十種類程度で あり、まだまだ未解明な点が多い.

そんな中,近年の様々な技術革新により,特殊な光合 成器官や色素系を持つ光合成生物にも研究の手が広がり, これまで以上にカロテノイドの分析や構造同定の重要性 が高まっている.著者らはこれまでユニークなカロテノ イドを結合する海洋性の緑藻や陸上植物の光合成アンテ ナ,また色素そのものの構造と機能を研究してきた.本 稿ではこれらの経験を元に,緑色系統の光合成生物から

大阪大学 蛋白質研究所 Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan
 大阪公立大学 人工光合成研究センター

Research Center of Artificial Photosynthesis, Osaka Metropolitan University, Osaka, Japan



図1:カロテノイドの半体系的名称:炭素番号と代表的な末端基.

カロテノイドを抽出,分析する上で必要となる基本事項 について,カロテノイドの構造,電子状態,反応性やそ の他の特徴を概観し,具体例を含めながらその分析方法 について解説する.

2. カロテノイドの基礎

2.1 カロテノイドの基本的な化学構造と命名法

カロテノイドの化学構造は,8個のイソプレン単位(C5) が結合してできる炭素数40の骨格が基盤となる.イソプ レンに由来する飛び飛びの二重結合の間を埋めるように 不飽和化が進み,それに伴って共役鎖が長くなり,より 長波長側の光を吸収するようになる.共役二重結合数11 のリコペンを基準とし,両末端の環化,水素化/脱水素 化,酸化などを組み合わせてカロテノイドの構造を記述 する「半体系的命名法」は,正式名称として,国際化学連 合(IUPAC)や国際生化学連合(IUB)などに推奨されている (Britton et al. 1995a, https://iupac.qmul.ac.uk/carot/).

主なカロテノイドの末端構造を図1に示す.非環状のψ 末端と、六員環状のβ、ε、γ末端(環)がある.ε、γ環の場 合は、共役鎖(R)との接続部位に立体異性が生じるため、 注意が必要となる.また、非対称の場合はアルファベッ ト順に左右を決定する(右半分は炭素番号にアポストロ フィをつけて区別する)ため、β環とε環を両末端に持つα カロテン(慣用名)は、β環を左に描き、「半体系的名称」は β,ε-caroteneとなる.

このように炭化水素のみで構成されるものをカロテン と呼び、分子内に酸素原子を含有するものをキサントフィ ルと呼ぶ.植物は六員環末端構造の3位に水酸基を持つキ サントフィル類を大量に蓄積する.水酸基はアルコール なので、これは~carotene-3,3'-diolとなる.ここで3位のOH 基には立体異性体が生じる事に注意してほしい.例えばε 末端やy末端の3位にOH基を持つキサントフィルの場合、6 位と3位の立体を全て指定する必要がある。例えばルテインの半体系的名称は、(3*R*,3'*R*,6'*R*)-β,ε-carotene-3,3'-diolとなる。それぞれのカロテノイドの立体構造は、立体構造を識別できるという酵素反応の特徴より、生合成経路を推定する上での根拠の一つとなる。

カロテノイドの共役鎖骨格にかかる変異として, ラク トン環, カルボニル基, アレン基, 官能基として5,6-エポ キシ基, アシル基等がある. 末端基が対称の場合は主た る構造の変異が左に来るように構造を命名するが, どち らが主要な構造なのかの判断は困難な場合も多い. また 構造の類似性や生合成経路などの議論に応じてあえて左 右逆に図示することも多い. 図2にその例を示す.

2.2 緑色植物のカロテノイドの生合成経路とその分布

カロテノイドの生合成経路と各生物種の蓄積パターン は、目的試料に含まれるカロテノイドの化学構造や立体 配座を予測、同定、分析する上で重要な基礎的知識の一 つである.ここでは特に緑色植物が蓄積するカロテノイ ドの生合成経路について概説する.

多彩な化学構造のカロテノイドは段階的な酵素反応の 組み合わせにより生合成される.緑色植物のカロテノイ ド生合成は、共通の生合成中間体であるリコペンから分 岐する (図3). リコペンは β -サイクラーゼ (β -cyclase), も しくはε-サイクラーゼ (ε-cyclase) によって両末端が環化す る.二つの末端に対して二つの酵素が反応し、全体の化 学構造が二回回転対称軸を持つため、β-カロテン、α-カロ テン, ε-カロテンの3種類の骨格が生じる (図3). これら の基本骨格にはまず、3位へのヒドロキシ基の導入が生じ るため、それ以降は全てキサントフィルとなる. β-カロ テン, α-カロテンから始まる生合成経路をそれぞれβ-経路 (β-line), α-経路 (α-line) と呼ぶ. 植物の生育環境に依存し たカロテノイドの組成変化が生じた場合、これらの生合 成経路に基づいて議論される. ε-カロテンからの生合成経 路に関連した研究は非常に限られており、あまり一般的 な名称ではないが、本稿ではε-カロテンから始まる生合成 経路をε-経路(ε-line)と呼ぶ.以降,各経路について蓄積 する光合成生物種とともに詳細に見ていく.

α-経路について、緑藻類のα-経路はその化学構造が多彩 である(図3a).陸上植物は基本的に3,3'-ヒドロキシ化酵 素までしか持たないため、α-経路の最終生成物としてルテ インのみを蓄積する種がほとんどである.一方、クラミ ドモナスやクロレラなどの淡水の緑藻類は19位のメチル 基をヒドロキシ化する酵素を持ち、ルテインに加えて19 位がヒドロキシ化されたロロキサンチンを蓄積する.ミ





図2:カロテノイドの構造と半体系的名称の例:炭素番号を青字で、また基本骨格を決定した 考え方の概要を付記した(Britton et al., 2004; Britton et al., 1995a).

ルやウミブドウ等の海洋性の緑藻は更に多彩で、19位の ヒドロキシ化酵素に加えて、8位に共役カルボニルを導入 する酵素を持つ. そのため、ルテインの8位にカルボニル が入った19-デオキシシフォナキサンチン,あるいはロロ キサンチンを経由して、それら両方の官能基が付加した シフォナキサンチン、更に19位のヒドロキシ基に短鎖脂 肪酸がエステル結合したシフォネイン等を蓄積する(Seki et al. 2022). また. 緑色系統では初期に分岐したプラシノ 藻は更に群を抜いて多彩で、種ごとにカロテノイド組成 は多様である。例えば、ルテインから19-デオキシシフォ ナキサンチン, 5-6 エポキシルテインを経由し, プレプラ シノキサンチンから最終的にプラシノキサンチンを生合 成する種や、それに加えて、ルテインの7'-8'位が水素化 されたジヒドロルテインを持ち、そこから生合成される マイクロモナル、ウリオリド等を含有する種(図3d)が報 告されている (Egeland et al. 1997). またプラシノ藻の中に はロロキサンチンの19-アシルエステル体を含有する種(図 3e)なども報告されている(Sasa et al. 1992).

β-経路は (図3b), 基本的に全ての緑色植物に共通して, β-カロテンの3,3'-ヒドロキシ化によりゼアキサンチンが生 合成され, そこから両末端のC5=C6やC5'=C6'がエポキシ 化されることで, アンテラキサンチン, ヴィオラキサン チンが生合成される. ヴィオラキサンチン-アンテラキ サンチン-ゼアキサンチンの間は、逆反応を触媒する酵素が存在し、光環境に応じたカロテノイドの可逆的な蓄積量の変化が確認されており、キサントフィルサイクル と呼ばれる.更に生合成が進むと最終的にヴィオラキサンチンからネオキサンチンがall-trans体として生合成され るが、葉緑体内には9'-cis体で蓄積する.この9'-cis体への 構造異性化についても酵素反応的に進むと考えられるが、 その生合成過程は明らかになっていない.

ε-経路 (図3c) のカロテノイドを蓄積する種は非常に限ら れているが、レタスなどが含有するラクツカザンチンはε-カロテン両末端の3,3'-位にヒドロキシ基が結合することで 生合成される.

基本的に天然のカロテノイドの生合成反応では、中間体 によって蓄積するものとしないものがある。中間体の蓄 積が観測される場合、生合成中間体と次の反応を触媒す る酵素が何らかの要因で空間的に分離されていることに なる。カロテノイド生合成酵素は細胞質側に存在すると 考えられており、例えば、蛋白質への結合や膜脂質中へ の蓄積といったケースが考えられる。特例として、特殊 な環境下(光や栄養)でのみ生合成中間体を蓄積するケー スや、最終生合成産物の生産量を大幅に増加するケース も存在する。



図3:緑色系統の光合成生物が蓄積するカロテノイドの生合成経路図(高市 2006; Egeland 1997; Sasa 1992; Seki 2022). α-経路の主な分岐経路はa)に,その他の分岐経路は,d), e)に記載している. β-, ε-経路についてはb), c)に記載している.

2.3 葉緑体内におけるカロテノイドの局在

カロテノイドは葉緑体内では主にチラコイド膜内に存 在する色素-蛋白質複合体(Pigment-protein complex: PPC)に 結合する.現在,X線結晶構造解析に加えて,クライオ電 子顕微鏡法単粒子解析により,様々な緑色植物由来のPPC の構造が高い分解能で解明され,その色素組成の多彩さ が明らかになってきている.この多彩な色素の蓄積パター ンにはある程度の一貫性があるため,それを踏まえてお くことで,構造解析や生化学的研究がされていない未知 試料でも,カロテノイドの結合部位やその組成を予想す る上で,有効な手掛かりとなる.ここでは,これまでに 決定された緑色系統のPPCの立体構造に基づき,葉緑体内 におけるカロテノイドの局在や組成について概説する.

葉緑体内に存在するPPCのほとんどはカロテノイドを 結合するが、代表的なのは光化学系 PS (Photosystem, PS) II, PSIとそのアンテナ系LHC (Light-harvesting complex) II, LHCIである.光化学系では、反応中心部 (core) にはカロ テンのみが結合し、周辺領域に結合するLHCにはキサン トフィルが結合する傾向がある.維管束植物を例にとる と、PSII-LHCIIの単量体coreにはβ-カロテンが11分子結合 している (Su et al. 2017) 一方, 周辺領域のアンテナに該当 するCP24, CP26, CP29, LHCIIにはCP24の一ヵ所を除け ば全てキサントフィルが結合している.また,CP24以外 のLHCには単量体当たり一分子の9'-cisネオキサンチンが 結合しており、残りのサイトをルテインやヴィオラキサ ンチンが埋めている。特に、三量体のLHCIIは他のLHCと は異なり、単量体当たり四分子のキサントフィルが結合 する.一方,植物のPSI-LHCIの構造 (Qin et al. 2015) を見 ると、PSII-LHCIIと異なりほとんどβ-カロテンで構成され ている. coreが全てβ-カロテンであるのに加えて、周辺領 域のLHCIにも単量体あたり一分子のβ-カロテンが配置さ れている.LHCIにはキサントフィルも結合しており、そ


図4:二つの光化学系 [PSII-LHCII: a), PSI-LHCI: b)] に結合するカロテノイドの組成. 各カロテノイドはそれぞれ以下の通りに色づけている.(βカロテン:赤,ルテイン:黄色,9' シスネオキサンチン:青,ヴィオラキサンチン:紫)

れぞれ単量体内の三分子の内,一分子はルテイン,一分 子はヴィオラキサンチンと同定されている.

他にも近年のクライオ電顕の発展により、様々な緑藻 の光化学系やLHCの構造が解明されている. それらの構 造でも、 クライオ電顕で分解能が上がりやすい core部分に はβ-カロテンが結合していることはわかるが、分解能が向 上しにくい周辺領域にあるLHC内のカロテノイドの判別 は簡単では無い. その同定には、HPLCによる色素組成分 析やその他, 生化学的な解析が必要不可欠である, 加え て、タンパク質内へのカロテノイドの結合は、カロテノ イドと結合ポケット間の疎水性相互作用や、カロテノイ ドの官能基(主として OH基)との水素結合により制御され る. そのため、結合は比較的非特異的であり、化学構造 が少し異なっても十分に同じ位置に結合しうる. 例えば, カロテノイドの生合成量や組成が変わると、各結合ポケッ トのカロテノイド組成も変動すると予想される.構造解 析やその他生化学分析でカロテノイドの結合位置を同定 する際には、そういった様々な点を考慮したうえで、注 意深く検討,検証する必要がある.

PPCを色素と蛋白質の複合体と定義するならば、他の光 合成関連蛋白質もそれに該当するが、その中でもCytb。f 複 合体もβ-カロテンとクロロフィルを一分子ずつ含有する (Kurisu et al. 2003). 基本的にプラストキノンをベースと した電子伝達が目的の複合体であるため、これらの色素 の機能的な意義は明らかになっていない.

PPC以外に結合しうる場所としては、チラコイド膜を含む膜自体、またPPCの周辺領域に張り付くことが想定される.カロテノイドは基本的に脂溶性が高いため膜の疎水 性領域や膜内在性のPPCにも付着し得る.そのため、PPC の色素分析をする際には膜成分や周辺に付着するカロテ ノイドの除去に気を付けることをお勧めする.

3. カロテノイドの物性:光応答と化学反応

カロテノイドの物性の基礎は長鎖ポリエンという点に ある.この物性は、カロテノイド全てに共通すると考え て良く、一般的なカロテノイド試料を取扱う上での基礎 的な知見を与える.一方、特定の官能基や部分構造に依 存する物性もあり、生体内での役割を議論する上ではこ ちらの方がより重要となってくる.本節では、特にカロ テノイドの取扱いや保存方法に関連する事項について、 カロテノイドに共通する物理反応と化学反応の基盤とな る性質を概説する.

3.1 カロテノイドの電子励起状態の構造

カロテノイドはメチル基の存在により、比較的長い直鎖 共役二重結合がねじれたり会合したりせず, 安定に存在す る. この交互炭化水素の直鎖状共役系は、C2h対称性を示 す(図5a)ため、分子軌道法のπ電子近似で電子励起状態の 対称性が記述できる:基底状態は¹A₂という対称性ラベル を持つ. 左肩の上付きの1は一重項励起状態を示す. AとB, gとu, -と+, という異なる対称性を持つ状態間の遷移は許 容遷移となり、同じ対称性を持つ状態間では禁制遷移(対 称禁制)となる、カロテノイドの特徴である可視部の強い 吸収帯は、基底状態 S_0 (1¹A_s)から第二励起状態 S_2 (1¹B_u⁺) への許容な電子遷移に由来し、10万以上という大きなモ ル分子吸光係数を持つ.一方第一励起状態(S₁)は2¹A₂とい う対称性を持つため、S₀(1¹A₂)との間の遷移は禁制とな り, 蛍光を発さず内部転換 (IC, internal conversion) でエネ ルギーを熱として失活する.(現実のカロテノイド分子は 厳密にはC2h対称性を持たないため、S1状態からの超微弱 な蛍光も実測は可能である (Fujii et al. 1998).) これらの特 徴により、カロテノイドは1分子あたりに吸収するエネル



図5:カロテノイドの吸収スペクトルと電子励起状態.a)ポリ

ギーは多いが,得たエネルギーを最終的に熱として安全 に放散する能力を持つと言える(図5b,c).

カロテノイドの吸収スペクトルには、炭素-炭素の二 重結合伸縮振動(~1500 cm⁻¹)と単結合伸縮振動(~1000 cm⁻¹)による振動構造が見られる.振動構造は電子準位の 上に刻まれた振動準位(v=0,1,2,..)のそれぞれへの遷移を 示し、吸収スペクトルに現れる振動構造のエネルギー間 隔はおよそ1400 cm⁻¹である.基本構造からの逸脱が少な いリコペンなどでは、基底状態(v=0)から励起状態(v=0) への電子遷移(0-0遷移)から0-3遷移くらいまで目視で帰属 可能である.一方、この切れ込み方は末端の環化、カル ボニル化などの化学構造の違いに敏感であり、0-0遷移と 0-1遷移のピーク間の谷を原点として、0-0、0-1の高さの比 を%で表した%II/IIIがカロテノイドの同定の目安の一つと して使われる(図5b).

π電子共役系はπ電子の動ける領域が広くなるほど遷移 エネルギーは低くなる.よって、カロテノイドでは共役 二重結合数が多いほど低エネルギーとなる.吸収スペク トルから得られる遷移エネルギーは共役二重結合数(N)の 関数1/(2N+1)と直線関係にあることを利用して、同じ溶 媒中における様々なNを持つ既知カロテノイドとの比較か ら、Nの情報が得られる.また、Nの短い不純物が含まれ ていると、吸収スペクトルの短波長側が不自然に盛り上 がって見えるので、できるだけ短波長側まで取得した吸 収スペクトルは、簡易的な純度判定にも有効である.

主吸収帯の少し高エネルギー側(短波長側),350 nm付 近にみられるピークは、1Ag⁺の対称性を持つ一重項励起状 態であるが、共役系の骨格の折れ曲がりが大きくなるに つれて大きくなるため、シスピークと呼ばれる.シス体 は主吸収帯にも1-5 nmのシフトがみられたり、%II/IIIも変 化したりするため、注意が必要である.(図5b)

カロテノイドの最低三重項励起状態は、 S_1 のおよそ半分 のエネルギーを持つことが知られており、微弱燐光の観 測により実験的にも検出されている(図5c).項間交差の量 子収率が極めて低いので、カロテノイドは直接の光励起 で三重項状態を生じない、カロテノイドは三重項励起状 態を経由して異性化するので、純度の高いカロテノイド は比較的光には安定といえる、カロテノイドの三重項状 態は三重項増感剤からの三重項-三重項エネルギー伝達に より生じる.三重項励起状態のクロロフィル(³Chl*),一 重項励起状態の酸素(¹O₂ (Δ_g)*)は、カロテノイドに対する 三重項励起増感剤となる(式1,2).

$^{3}Chl^{*} + ^{1}Car \rightarrow ^{1}Chl +$	- ³ Car*	(1)
$^{1}O_{2}(\Delta_{g}) * + ^{1}Car \rightarrow ^{3}O$	$O_2 + {}^3Car^*$	(2)
$^{3}Car^{*} \rightarrow ^{1}Car + \Delta$	(3)	

酸素雰囲気下でクロロフィルと混在して光が照射され るとこれらの増感剤からのエネルギーを受けてカロテノ イドは三重項励起状態になり,異性化や分解を起こす. よって,カロテノイド試料を扱う際には,酸素とクロロ フィルと光が揃う状態はなるべく避けた方が良い.クロ ロフィルの分解物はさらに厄介な副反応を誘発するため, クロロフィルの分解を防ぐ目的でも低温が推奨される.

こうして生じたカロテノイドの三重項励起状態は, B_uの 対称性ラベルをもつ状態であり, 燐光を発さず, 項間交 差により熱的に失活する(図5c). この意味でもカロテノイ ドは有効なクエンチャーといえる.

3.2 化学反応とその他の物性に関する留意点

上述のようなエネルギーの授受という物理過程による エネルギーの散逸では、カロテノイドが分解することは稀 である.一方、カロテノイドの持つ共役二重結合は、フリー ラジカルの消去能力が高いことが知られており、一重項 酸素だけでなく、他の活性酸素種であるスーパーオキシ ドアニオンラジカル (•O₂⁻)、ヒドロキシラジカル (•OH)、 また過酸化脂質(LOO•)などの活性種と化学反応をおこし、 カロテノイド自身の分解や、*cis-trans*構造異性化などを起 こす.そのため、暗所でラジカルや過酸化物を蓄積する クロロホルムなどのハロゲン溶媒、ベンゼンなどの共役 系溶媒を利用する際には注意が必要である.NMRや分光 学に用いる安定剤が入っていない高純度クロロホルムは、



アルミナ (Merck Aluminum oxide 90 for chromatographyなど) を,綿栓を詰めたパスツールにいれた簡易カラムを通し てから用いると良い.

葉緑体にはヴィオラキサンチンやネオキサンチン等, 5,6-エポキシド構造を持つものが多い.この部分構造は酸 性条件で5,8-転移反応を起こすため、この部分構造を持つ カロテノイドを大量に調製する際には、水の代わりに緩 衝液を用いる(高市 2006), MgCO₃を添加する(Saini et al. 2018)などを行い、植物材料から出てくる酸を中和するこ とが推奨される.

また葉緑体には、9'-cisネオキサンチンのように、特定 のcis体が蓄積していることがある.構造異性体はそれぞ れの二重結合周りの回転運動の活性化エネルギーにより 熱的平衡にあるため、溶液中では様々な異性体のその温 度における平衡混合物になろうとする.ネオキサンチン は常温でall-trans体が優位となるため、温度を上げると自 然にall-trans体が増える.また、ラジカルも異性化を促進 する(これは三重項励起状態を経由しない)ので、クロロ ホルムやベンゼンなどのラジカル反応を促進する有機溶 媒を抽出溶媒に使うにはリスクがある.こういった副反 応を想定して実験条件を考える必要がある.

溶解性やカロテノイドの取り扱いについて,カロテノ イドは,有機溶媒に溶ける速度が比較的遅い.クロロフィ ルと比べると顕著である.そのため,完全に回収できて いるかをよく確認する必要がある.一方,ガラス容器を 有機溶媒で洗浄するといつまでも黄色い液が出てくるが, これは人間の目の感度が高い領域に吸収帯があることに 由来し,見た目の色の割に実際の物質量は少ない.その ため,適当なところで有機溶媒による洗浄(回収)を諦め, あとのガラス容器は通常の有機物と同様に中性洗剤で洗 浄するとよい.また,白衣や衣服に高濃度のカロテノイ ドが付着した場合,有機溶媒をつけても広がるだけで完 全には落ちないが,そのまま天日干しすれば色は見えな くなる.

4. カロテノイドの抽出,単離・精製法

4.1 基本戦略

カロテノイドの抽出,単離・精製方法は目的に応じて, 大きく異なる.分析か分取か,どの程度のスケールか,抽 出の対象は何で,どの程度の純度が必要かによって,検 討事項が異なる.以下では,各目的に応じたカロテノイ ドの抽出,単離・精製法について,実際の経験も踏まえ つつ,概説する.

4.2 分析用色素抽出

HPLCによる色素組成分析であればシステムにもよる が、サンプル自体は少量でも分析可能である.具体的に はホウレンソウの葉であれば2~3 mm四方の切片があれ ば十分に分析出来る.一方、PPCの色素分析となると抽出 方法が異なる.以下に、①葉等の組織からそのまま色素 抽出する方法と②PPCから色素抽出する方法(凍結乾燥機 がある場合)と③PPCから色素抽出する方法(分液する方 法)を紹介する.以降の実験では、基本的に部屋は暗く(照 度でいうと、1 µmol photon m⁻² s⁻¹ (PFD)程度)で、サンプ ルに触れるものは良く冷やして用いることをお勧めする.

4.2.1 具体的な抽出例① 組織(葉や藻体)からの色素抽出

- 1. 試料*1をマイクロチューブに移す.
- 良く冷やした有機溶媒^{**2}を入れ、ホモジナイザーペッスル等^{**3}で、有機溶媒と共に良くすりつぶす。
- 3. 十分に色素が抽出でき次第,遠心する(15,000×g, 5分).
- ペレットを浮かさないように気を付け、上清のみを回 収する.

<u>※1</u> 試料の状態について

試料によって,多糖が多く蓄積している等,含水率が高 い場合,また細胞が固い場合には色素抽出が難しい場合が ある.そのような場合は,凍結乾燥後,乳鉢ですりつぶし, 粉末化した上で抽出することをお勧めする.凍結乾燥は色 素系には特に影響しない上に,凍結乾燥後は乳鉢ですりつ ぶしやすくなるため,色素抽出が容易になる.

※2 抽出溶媒の選定について

抽出溶媒に関しては、分析する際の液クロの溶液と同 じか性質の近い溶媒であれば基本的に問題はない. 我々 はしばしばN,N-ジメチルホルムアミド (DMF)を用いて実 験する.理由は、① カロテノイドやクロロフィルが総抽 出物とほぼ同じ比率で等しく抽出できる点と、② 揮発し にくい点が挙げられる.特にオートサンプラーなどで大 量にサンプルを用意する際には不揮発性は有利になる.

<u>※3</u> ホモジナイザーについて

筆者らが良く使うのはプラスチック製のホモジナイ ザーペッスルで、1.5 mlと0.5 mlのマイクロチューブ用の ものがある.ペッスルは非常に簡便で扱いやすい反面、 先がなめらかで、磨り潰す力は弱い.その点、ガラスホ モジナイザーはその力が強く、少量の試料から効率的に 色素を抽出する際にはお勧めである. 4.2.2 具体的な抽出例② PPCからの色素抽出(凍結乾燥器がある場合)

- パスツールピペットの先に綿を少量詰め、その上から アニオン交換セルロースDE52 (Whatman[®])の担体を入 れ、カラムを作成する.
- 2. カラムを試験管などに立て、PPCの溶けているバッ ファーで平衡化後、試料を添加する.
- 3. ゴム球で押し出し, 試料を担体に吸着させる. バッ ファーで洗い流す.
- パスツールピペットの入り口のみをパラフィルムでふ さぎ、アルミホイル等で全体を包んで凍結乾燥する.
- 5. 凍結乾燥後, 有機溶媒(アセトン:メタノール=1:1) を入れて, 色素のみを溶かし出す.
- 6. 色素抽出物を, 窒素ガス等を用いて, 乾固させる.
- 7. 少量の有機溶媒に溶かす.

4.2.3 具体的な抽出例③ PPCからの色素抽出(分液する 方法)

- 試料をメンブレンフィルター等で100 μL程度に濃縮し, ガラス試験管に移し入れる.
- 2. 有機溶媒(アセトン:メタノール=1:1)を2~3 ml程度 加え、よく混ぜて色素を抽出する。
- 良く冷やしたジクロロメタン (クロロホルムでも可), および飽和食塩水 (濃い塩の入った水溶液)を有機溶媒 と等量ずつ入れ、良くかき混ぜる.
- 遠心(3,000×g, 5 min)した後, 飽和食塩水を添加し, 良 くかき混ぜたのち再度遠心する.
- 5. 上層をできるだけ廃棄し,残った下層のみをパスツー ルピペット等で取り出す.
- 窒素ガスを吹き付ける等,乾固させた後,目的の溶 媒に溶かす.

4.3 分取用色素抽出,及び精製

カロテノイドの研究を進めるうえで、未同定のカロテノ イドと出会ったとき、また実験的にカロテノイドの量が 必要な場合、大量に分取、精製する必要がある. その抽 出方法は上記の手法と比べて、スケールや抽出方法が大 きく異なる. 以下では具体例を挙げながら、大量に色素 を抽出するための各段階について、4.3.1 色素の抽出、4.3.2 オープンカラムによる粗精製、4.3.3 HPLCによる精製の項 目で詳細に説明する.

4.3.1 大量の色素抽出

大量に色素を抽出する場合、必要量と抽出効率および

手に入る試料の量を基に、どのように抽出するかを考え る.例えば、ホウレンソウ等の入手が容易な試料の場合、 多少抽出効率が低くても、元の量を増やすことで目的量 が得られる.一方、希少な試料から抽出する場合や、蓄 積量が微量な場合はより入念に、抽出効率をできるだけ 高めるよう実験する必要がある.今回はホウレンソウか ら効率よく色素を抽出する方法を紹介する.

具体例:ホウレンソウから色素を大量に抽出

- 1. ホウレンソウを事前に凍結乾燥する^{*1}.
- 乳鉢に液体窒素を注ぎ、平衡化した後、ホウレンソウ を入れる。崩しながらつぶし、粉末になるまですりつ ぶす*².
- 3. 良く冷やした有機溶媒 (アセトン:メタノール=1:1)を 入れ、すりつぶしながら色素を抽出する.
- ろ紙でろ過して不純物を取り除き、エヴァポレーター 等**3で有機溶媒の大部分を揮発させる.
- 5. 分液漏斗に移し入れ,ジクロロメタン,飽和食塩水を 用いて分液する^{*4}.
- ジクロロメタン層(下層)を回収し、エヴァポレーター 等で乾固する.
- 7. 目的の有機溶媒に溶解して回収する.

※1 凍結乾燥の重要性について

ホウレンソウから抽出する際に、そのまま有機溶媒を 加えるだけでは抽出効率が非常に悪い.一方、事前に凍 結乾燥しておくと、非常に効率良く抽出できる.ちなみ に凍結乾燥の有効性は種に寄らない.大型の海藻等多糖 が多く蓄積する種でも凍結乾燥により、色素抽出が容易 になる.微細藻の場合、種にもよるが遠心などでペレッ トにしたうえで、有機溶媒を加えれば抽出出来る場合が 多く、比較的抽出は容易である.

<u>※2</u> 乳鉢は消耗品

磨り潰す際の注意点として,乳鉢が良く割れる点が挙 げられる.本研究室ではコツをつかむまでは月に一度は 乳鉢を壊して,新しいものを購入していたことが記憶に 新しい.初めに乳鉢に液体窒素を入れると,表面は冷えて, 内部は暖かいままになっており,その時に衝撃を加える と割れてしまう.十分に予冷してから磨り潰すことをお 勧めする.加えて,すり潰す際に底に対して垂直に押し 込むのではなく,壁面に対して擦るようにすれば乳鉢は 消耗品ではなくなる.

<u>※3 有機溶媒を揮発させるには</u>

有機溶媒を揮発させるうえで、エヴァポレーターは有 効な装置である. しかし、そこまでの設備がないところ も多くあるだろう. その際には、窒素パージがお勧めで ある. 窒素ガスを吹き付けるだけで、時間はかかるが簡 単に有機溶媒を飛ばすことができる.

※4 分液で上手く分離しない場合

分離しない場合は、水層(今回は上層)の塩濃度が足り ないことや溶液の比率が良くないケースがほとんどであ る. その際には飽和食塩水やジクロロメタンを添加する など、溶媒の比率や塩濃度を調整しながら最適な分離条 件を検討する必要がある.

4.3.2 オープンカラムによる粗精製

基本的に、色素の単離・精製にはHPLCが必要だが、カ ラムに吸着できる量は限られている.そのため、HPLCに インジェクトする総色素の量を減らすことで、コンタミ 量を減らし、狙った色素の単離精製を容易にする.以下 に具体例とその注意点を示す.

具体例:ミル由来色素のオープンカラム精製

- 1. 100%へキサンにシリカを入れ、かき混ぜながらオープ ンカラムに流し込み、シリカが落ち着いた後、上から 海砂を5 mm程積む^{*1}.
- ヘキサンがカラムの上端周辺に来たところで100%ヘキ サンに溶かした抽出色素混合物を静かに添加する.
- 3. しばらく100%ヘキサンで流し続け, 黄色いバンドが流 れ出てくる. これがカロテン類である.
- その後,アセトンを5%ずつ増やしながらしばらく流し, バンドの様子を見る.
- > 溶出する順番はカロテン類→クロロフィル a→クロロ フィル b→キサントフィル類である^{*2}. キサントフィル 類が目的の場合,クロロフィルをできるだけ取り除い た後,100%アセトンで流し出すと良い.

<u>※1 カラムの高さについて</u>

カラムは制御が難しいので高く積みがちだが,経験的 に10 cm程度の高さがあれば十分に分離可能である.むし ろ,高く積みすぎると,有機溶媒を無駄に消費し,時間 も浪費してしまう.

<u>※2 クロロフィル bとキサントフィルの分離について</u> クロロフィル bは一部のキサントフィルと性質が近く. オープンカラムでは上手く分離しないケースがある. そ のため目的物が混入している恐れのあるフラクションは 分析し,目的物質の所在を常に確かめることに注力する 必要がある.

4.3.3 HPLCによる精製

特定のカロテノイドのみを狙って高純度で得るとなる と、HPLC等,分離能が良く目的物質の溶出をリアルタイ ムで検出しながら,分取する必要がある.ここでは一例 として,HPLCを用いた色素の精製について具体例を紹介 する.

具体例:基本的なHPLCでの精製方法

- 上記の工程を経て取得した総色素抽出物をアセトンに 溶かし、フィルター (PTFE 0.22 µm等)にかける.
- 2. 窒素パージ等で、一度、揮発させて乾固する.
- 3. HPLC^{**1}の有機溶媒^{**2}(アセトン: ヘキサン)をセット して、平衡化する.
- 平衡化に用いた比率の有機溶媒に色素を溶かし、インジェクトする。
- 5. 目的試料のフラクションを回収する**3.
- 6. 分析用のHPLCで分析し、純度を確認する.

<u>※1_HPLCのシステム</u>

著者らはShimadzuのHPLCシステム(仕様※4)をよく用 いている.かなり濃くロードするため,普通のセルでは, 色素由来の吸収が濃すぎてクロマトグラムが飽和してし まう.そのためセル長の短い,分取用のセルを用いるこ とをお勧めする.

※2 有機溶媒とその組成について

溶媒は液体クロマトグラフィーグレードのものを用い る.ほとんどのキサントフィル類については15~25%ア セトンで、極性の高いキサントフィル類を狙う際には、 30~40%程度で単離できる.流れてこない場合、更にア セトンの割合を増やして、目的試料を取得する.

<u>※3</u> 分離時間について

分離時間は短いほど,実験の都合上楽ではあるが,経 験的には目的物質が10~30分程度で出てくる条件が綺麗に 精製できる最適な溶媒条件である.保持時間が1~2時間と 長すぎる場合,目的試料が分解する事がある.

<u>※4</u> 分取用の<u>HPLC</u>システム

色素の単離に用いたシステムは以下の通りである.

HPLCシステム: (CBM-20A, SPD-M20A (分取用セルを 装着), LC-20A, DGU-20A), カラム (COSMOSIL, SL-II, 10 mmID×250 mm). カラムは常温で立てて置き, フラク ションの回収にはディスポのガラス試験管を用いている.

5. カロテノイドの分析と絶対構造の同定

5.1 基本戦略

これまでに説明してきた方法で抽出,単離・精製した カロテノイド標品を用いて構造を同定するにはどのよう な戦略が適当だろうか.

大体の場合、HPLCの分析で未同定のピークを見つけ た、興味深い蓄積挙動が新たにわかった、といった動機 で構造同定に踏み切るのではないだろうか. この場合す でにHPLCでの分析はできているため、吸収スペクトル、 HPLCの溶出順序により推定構造を提出できることが多 い. ここでは、フォトダイオードアレイ検出器 (PDA) つ きのHPLCが有効である. また, LC-MSも普及してきたた め、MSによる分子イオンの測定、最近ではLC-MSでも精 密分子量測定ができるものが多く,

一気に分子式の同定 までできることも多い.ただし、カロテノイドは同じ分 子式でも異なる構造の異性体が多く存在するため,分子 式がわかっても構造同定の決め手にはなりにくい(例えば ネオキサンチン,ビオラキサンチン,シフォナキサンチン, プラシノキサンチンは全てC40H56O4である). それよりも MS/MSで官能基ごとの分離パターンを精密に検出するテ クニックがカロテノイドの構造同定には有効である.よっ て、LC-PDA-MS/MSを整備すれば、カロテノイドの構造 同定には強い味方となる.本稿ではLC-PDAを活用した戦 略をご紹介する. 概略を図6, 図7に示した.

5.1.1 推定構造を決定する

HPLCの溶出時間や順序,吸収スペクトルからの構造の 推定:HPLCの溶出時間は官能基や全体の極性にも依存す るため,溶媒系によって時間そのものは多少変化したり 局所的に順番が入れ替わったりするが,大まかな溶出順 序は一定である. 論文を参考にしても良いが,様々な海 洋性微細藻類の網羅的な色素分析結果と主な色素のデー タが載っている海洋学の本 (Jeffrey et al. 2005) はお勧めの 一つである.

生合成経路からの構造の推定:生物種によって持って いるカロテノイドの生合成酵素が異なるため、近縁種の カロテノイド組成の報告例が参考になる場合が多い。例 えば陸上植物が蓄積するカロテノイドはβ-カロテン、ルテ



図6:未知カロテノイドの構造同定の戦略.



図7:各部分構造の同定に関係する分析方法の一例.

イン,ネオキサンチン,ヴィオラキサンチン,アンテラ キサンチン,ゼアキサンチンであり,種依存性はそこま で大きくない.しかしながら,緑藻では組成が多様であり, α-経路のカロテノイドではあるが,ルテイン以降の生合成 経路が不明瞭なカロテノイドを蓄積する傾向にある.い ずれにせよ,分類学上の近縁種の持つ色素組成を参考に して生合成経路から構造をまず予測する.

機器分析データとの比較:カロテノイドは機器分析デー タが充実している(Britton et al., 1995a, 1995b, 2004; Maoka 2016)ため、完全に既知の構造ではなくても、部分構造が 既知の場合も多い、機器分析データは、局所的な分子の 構造を反映するものが多く、それらは加算的で、部分構 造のシグナルの足し算として現れることが多い、この性 質を利用して、局所的な構造を予測することができる.

5.1.2 推定構造が既知の場合

機器分析データとの比較:既知カロテノイドの機器分析 データを参考に,同じ条件で測定した未知試料と比較す る.この時参考とするデータは,総説 (Britton et al. 2004; Jeffrey et al. 2005; Britton et al. 1995b; Maoka 2016) だけでは なく,なるべくその中の元論文を参照する.HPLCの溶出 順序,吸収スペクトル,CDスペクトル,MSによる分子式

手 法	同定ターゲット	試料について	特 徵	参考文献
HPLC の溶出順序	分子全体の極性, OH 基の数 など	少量で良い. 非破壊であるが, 分析では通常回収しない.	様々な充填材と溶媒の組み 合わせがあり、良い分離条 件を見つけることが重要.	Jeffrey et al. 2005
紫外 - 可視吸収	共役鎖長,カルボニル基,	少量で良い	簡便に測定できる.	Britton et al. 2004;
(UV-VIS)	II/III% など	非破壊測定		Jeffrey et al. 2005
円偏光二色性	不斉炭素原子周りの末端官	少量で良い	吸収スペクトルと同様のセ	Britton et al. 2004
(CD)	能基の立体	非破壊測定	ルで測定可能.	
高分解能質量分析	分子式(分子イオン, Na 付	少量で良いが高純度が必要	破壊測定なので他のデータ	Britton et al. 2004;
(HRMS)	加イオン等)		を取った後に行う.	Maoka 2016
1H-NMR	特徴的な構造,非共役二重 結合の位置など	0.01 ~ 0.1mg 必要. 高純度が 望ましい.	少量用のNMR管(SHIGEMI) もあり,汎用性が高まって いる.	Britton et al. 1995b; Maoka 2016

表1:各分析手法のまとめ

の一致でおよそ問題ないと思われる. これらに必要な量 はおよそ0.01 mg (1 cmセル光路長における吸光度OD = 0.5 の溶液が4 mL, モル分子吸光係数を10万, カロテノイド の分子量600で概算)である. 一次元(1D)の¹H-NMRまで合 致すればまず間違いない. 骨格の*cis-trans*構造異性の情報 も¹H-NMRで確定できる. CDスペクトルは, OH基やε-環 の立体によって決まり, 生合成酵素による生産物である ことを示す上では重要であるため, ぜひCDのデータも取 得して欲しい.

重ね打ち (co-chromatography):既知試料の場合,市販さ れていたり,既知の植物等から簡便に精製できたりするの で,標品と比較する方が早い場合が多い.その場合,標品 を入手して,重ね打ちを行う.HPLCの保持時間は溶媒系 や測定装置によって微妙にズレるため,未知試料と標品を 完全に同一の分析系で分析する必要がある.さらには,未 知試料と標品を1:1になるように混合して分析することに よって同一性が検証できる.ただし,異なるカロテノイド が完全に同一の溶出時間に出ることがあるため,他の手法 での同定も合わせて行うことをお勧めする.特に2液ある いは3液のグラジエント溶出を用いている場合は,ピーク 形状が参考にならないことが多く,注意を要する.

5.1.3 推定構造が未知の場合

機器分析による同定:完全に新規化合物であった場合, 覚悟を決めてある程度の量を集め,上述のHPLC,吸収 スペクトルの他,高分解能MS,¹H-NMR,CDといった機 器分析データを揃えて構造決定をする必要がある.特に ¹H-NMRは重要で,他の機器分析では得られない共役して いない二重結合の位置などの情報が得られるため,IDだ けでなく,COSY (correlation spectroscopy,直接の炭素-炭 素化学結合を介した相関), long-range COSY (ちょっと先

までの炭素-炭素化学結合を介した相関), NOESY (nuclear overhauser effect spectroscopy, 空間的に近いところの相関) といった2次元の¹H-¹H相関を用いて、帰結的に全てのシグ ナルを帰属する必要がある. これには最低でも0.1 mgくら いは必要である.また、身近に存在する物質は大概プロ トンを持つため、不純物が多いとシグナルの帰属ができ ない.特に水を除くことが重要である.¹³C-NMRの場合水 の混入は問題にならないが、桁違いに大量の試料が必要 である。代わりに不純物の少ない試料を用いて、上述の long-range COSYでメチル基とオレフィンプロトンの相関 を綺麗に検出できれば、¹H-NMRのみでも全てのシグナル を帰結的に帰属し、構造決定が可能である. 有機化合物 の物質同定には通常赤外吸収スペクトル(IR)が用いられ るが、特殊な官能基を持たないカロテノイドの場合はさ ほど重要な情報は期待できない. 逆に末端OH基の立体な どの根拠となるCDは重要な情報となる. 部分的には既知 の構造と同一であることがほとんどであるため、報告さ れているデータと比較・参照しながら部分構造を決めて いくと比較的速やかに構造決定できる.

精密化学合成による標品の入手:推定構造の標品を有機 合成で作り,標品で機器分析データを厳密に取得し,それ と比較する,という力技もある.これは非常に強力な手段 ではあるが,カロテノイドのような共役ポリエンの立体を 制御した精密有機合成には特別な技術と試薬が必要である ため,天然物合成,特に合成による天然物の立体構造の同 定に興味のある有機化学者の助力が必須である.推定構造 が有機合成の研究対象としても興味深いものであれば,共 同研究として協力してもらえる場合もある.

5.2 HPLCによる分析の条件の最適化例と分析例

表1に記載したように、HPLCは充填材、溶媒組成とも



図8:2液グラジエントのHPLC分析系の構築例.使用した色素はクラミドモナスとミル由来の総抽出色素の混合物. 左①:シフォナキサンチン、②:all-trans ネオキサンチン、③:9'-cis ネオキサンチン、④:ロロキサンチン、⑤:ヴィオラキサンチン、⑥:19-デオキシシフォナ キサンチン、右①:ε-カロテン、②:α-カロテン、③:β-カロテン.

に極めて自由度が高い分析方法であり,目的に応じた分離を実現するために、様々な系が報告されている.基本的なカロテノイドのHPLCによる分離戦略については、総説(Britton et al. 1995a; Britton 2022)が参考になる.

ここでは、基本的にアセトニトリル (AcCN) をベースに 分析方法を検討した2液のグラジエント系の例を記載する (図8). まずA液の最適化について、今回、6種類のキサ ントフィルを分離する必要があり、最初の条件(MeOH: AcCN: H₂O = 0: 80: 20, V/V/V) では56のピークが分離 していないことがわかる. そこで, MeOH: AcCN比を変 えていくことで、全体的にキサントフィルの領域の保持 時間が長くなり、MeOHの量が増える程、ピークの分離 が改善される.一方,それに伴い③と④のピーク間隔は 少し狭くなり、ピークの分離は悪くなっている、その点 から、今回の最適条件はどちらの両ピークも十分に分離 しているMeOH: AcCN: H₂O = 15:65:20 (V/V/V)と決定 している.次にB液について、ここではAcCNと酢酸エチ ル (AcOEt) の混合物を用いており、今回の試料には三種 類のカロテンが含有されているが、最初の条件ではAcCN : AcOEtでは分離が良くない. そこで, こちらも二液の組 成を変え、アセトニトリルの割合を増やして行くことで、 分離条件が改善されていることがわかる.

以上のように, 溶媒条件や組成比を変えることで, 狙っ

たカロテノイドの分離を改善でき, 色素の組成比をはっ きりと決定することができる. これでも分離できない場 合, 溶媒の組成を根本から見直す必要がある.

当時の研究目的は、未同定カロテノイドであった19-デ オキシシフォナキサンチンの構造決定にあったが、先行研 究で近くにロロキサンチンが溶出することはわかっていた ため、それとはっきりと区別することが主たる目的の一つ であった.最終的に得られた分離パターンでは、生合成経 路の中で可能性のある(疑わしい)カロテノイドがすべて、 ピークとしてきれいに分離できた.最後に今回最適化した 条件で分析した例を図9に紹介しておく.読者の目的に沿っ た分離を得る上で、ここでご紹介した戦略が少しでも参考 になれば幸いである.

※ 分析用のHPLCシステム

今回の色素分析に用いたシステムは以下の通りであ る.HPLCシステム:(CBM-20A, SPD-M40A, LC-20A×2, DGU-20A, SIL-30A, CTO-20A), カラム(COSMOSIL, 2.5C18 MS-II, 75 mm).カラムは40℃で平衡化し, 試料の入るオー トサンプラーは,4℃に設定した.カラムの温度を上げる と分離は良くなるが,上げすぎると試料によっては分解し てしまうため,注意されたし.



図9:完成した分析系を用いた分離の例. a) ミルの色素抽出物, b) 青色強い光で培養したミルの色素抽出物, c) クラミドモナス の色素抽出物.

謝辞

本稿で紹介した研究の一部は科研費23K05721,24H02091 の助成をうけて実施されたものです.

参考文献

- 高市真一編,「カロテノイド:その多様性と生理活性」, 裳 華房, 2006
- Britton, G. (2022) Chapter One Getting to know carotenoids. *Methods Enzymol.* 670: 1-56.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H. (eds.) (1995a) Carotenoids vol 1A Isolation and Analysis. Birkhäuser, Basel.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H. (eds.) (1995b) Carotenoids vol 1B Spectroscopy. Birkhäuser, Basel.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H. (eds.) (2004) Carotenoids Handbook. Birkhäuser, Basel.
- Egeland, E. *et al.* (1997) Additional carotenoid prototype representatives and a general chemosystematic evaluation of carotenoids in prasinophyceae (chlorophyta). *Phytochem.* 44: 1087–1097.
- Fujii, R., et al. (1998) The 2A_g⁻ energies of all-transneurosporene and spheroidene as determined by fluorescence spectroscopy Chem. Phys. Lett. 288: 847–853.
- Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., and Wright, S.W. (eds.), (2005) Phytoplankton Pigments in Oceanography Guidelines to Modern Methods. UNESCO Publishing, Madrid, Spain.

- Kurisu, G. *et al.* (2003) Structure of the Cytochrome b₆f Complex of Oxygenic Photosynthesis: Tuning the Cavity. *Science* 302: 1009–1014.
- Maoka, T. (2016) Structural studies of carotenoids in plants, animals, and food products. In: Kaczor, A. and Baranska, M. (eds.), "Carotenoids Nutrition, analysis and technology", Chapter 7, Wiley Blackwell, Chichester, UK, pp. 103–130.
- Qin, X. *et al.* (2015) Structural basis for energy transfer pathways in the plant PSI-LHCI supercomplex. *Science* 348: 989–995.
- Saini, R.K. *et al.* (2018) An efficient one-step scheme for the purification of major xanthophyll carotenoids from lettuce, and assessment of their comparative anticancer potential. *Food Chem.* 266: 56–65.
- Sasa, T. *et al.* (1992) A novel carotenoid ester, loroxanthin dodecenoate, from *Pyramimonas parkeae* (Prasinophyceae) and a Chlorarachniophycean Alga. *Plant Cell Physiol.* 33: 921–925.
- Seki, S. *et al.* (2022) Discovery of a novel siphonaxanthin biosynthetic precursor in *Codium fragile* that accumulates only by exposure to blue-green light. *FEBS Lett.* 596: 1544–1555.
- Su, X. *et al.* (2017) Structure and assembly mechanism of plant C₂S₂M₂-type PSII-LHCII supercomplex. *Science* 357: 815–820.

■紀要「低温科学」の変遷 -

- ·低温科學, 第1輯 (1944年)-第10輯 (1953年)
- ·低温科學. 生物篇, 第11輯 (1954年) 第35輯 (1978年)
- ·低温科学.物理篇,第11輯(1953年)-第53輯(1995年)
- ·低温科学.物理篇.資料集,第27輯(1970年)-第63輯(2005年)
- (このうち,第1輯(1944年12月)~第3輯(1950年12月)は岩波書店発行,第4輯(1948年10月)は 北方出版社発行,第5輯(1950年12月)以降は低温科学研究所発行)
- ・低温科学. 第64巻 (2005年)~
 - ※第 68 巻 (2009 年) Supplement Issue (英文増刊号発行)

■著作権 -

- ・本紀要に掲載された論文の著作権は、北海道大学低温科学研究所に属する.
- ・ただし、原著者が出典を明示して再利用することは妨げない.
- ・また,掲載論文の一部または全部を電子的に蓄積し,北海道大学低温科学研究所が行う情報提供サービス により公開することがある.

76 /	2025年3月29日 北海洋士学 低温利学研究所
発 行 者	北海道入学 低温科学研究所 〒060-0819 札幌市北区北19条西8丁目 URL:http://www.lowtem.hokudai.ac.jp
編集者	 栗栖 源 嗣 伊藤 寿 高林 厚 史 小野 清 美 田 中 亮 一
印刷・製本	柏楊印刷株式会社



ILTS 北海道大学 低温科学研究所

北海道大学低温科学研究所 小野 数也氏 撮影 Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan http://www.lowtem.hokudai.ac.jp