

# 葉緑体タンパク質 LIL8 欠損株の光合成と機能

加藤 由佳子<sup>1</sup>、千貝 健<sup>1</sup>、森 章一<sup>1</sup>、  
横野 牧生<sup>2</sup>、高林 厚史<sup>2</sup>、田中 歩<sup>2</sup>、田中 亮一<sup>2</sup>

1. 技術部先端技術支援室
2. 生物環境部門生物適応分野

## はじめに

植物は光合成によって光エネルギーから生命を維持するのに必要なエネルギーを得ている。光合成は大きく分けて、光を受けて化学エネルギーに変換する光化学反応と、生じた化学エネルギーを用いて二酸化炭素と水から糖を作るカルビン回路からなる。

光合成には多くのタンパク質が関与する。複合体の組み立て、集光、反応の触媒など、様々なタンパク質が働く複雑な機構によって光合成は成り立っている。光化学反応では光化学系 II と光化学系 I の主に 2 つのタンパク質が中心となって働く。アンテナの働きをするタンパク質が光エネルギーを受け取ることから反応が始まる。光合成は光が当たらなくては反応が起こらないが、過剰な光では反応が阻害される（光阻害）。一般的に、寒冷域では特に植物が光阻害を受けやすい。また、流れる雲や周囲の障害物によって、植物に照射される光の量は時々刻々と変化する。そのような環境の変化に対し、植物は適応メカニズムをいくつか備えている。

光化学反応を研究する上で、Walz 社製のパルス変調蛍光測定（PAM）という測定器が広く用いられている。PAM では、光を植物に照射し、光合成に利用されなかった励起エネルギー由来のクロロフィル蛍光を測定する。発生した蛍光量で光合成効率等を測るほか、瞬時的な蛍光量を連続測定し変化を追うことで、光合成における生理的变化も見る事が出来る。連続データの分解能が高いほど、より精密に変化を追うことが可能となる。現在、生物適応分野では PAM-2000 を使用しているが、PAM-2000 では、最大で約 32000 ポイントのデータしか取ることが出来ず、30 ms/point でデータを取得した場合、連続測定可能時間は 16 分程度である。

今回、過去の論文（Lunde *et al.*, 2000）と同条件で PAM 測定をするために、50 分程度の連続測定が必要となった。PAM のペンレコーダの購入は高価であり、またデータロガーも安価とは言えず、使い勝手も機種により様々である。そこで、技術部にデータを取得するための装置の作成を依頼した。作成した装置（USB-AD 変換器）と得られた実験結果について報告する。

## 実験に使用した植物と研究の背景

実験には LIL8 と呼ばれるタンパク質をコードする遺伝子に変異をもつシロイヌナズナの変異体をアメリカのストックセンター（ABRC）から取り寄せた。それらの変異体

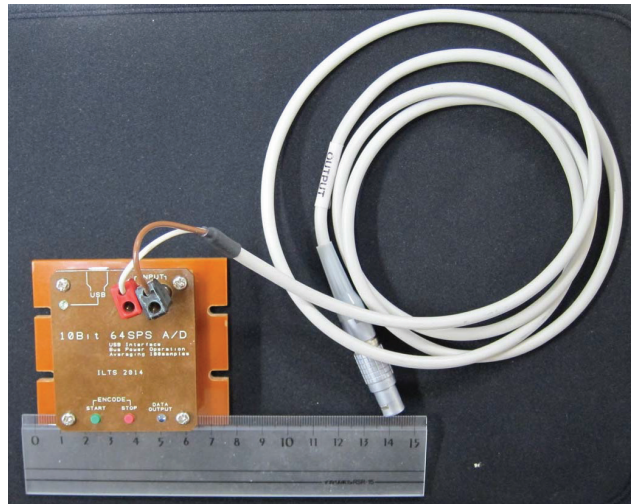


図1 USB-AD変換器。

を *lil8-1* と *lil8-2* と呼ぶ。実験にはこれら2種類の変異体と野生型 (WT) を用いた。また、ステート遷移 (植物が光阻害を避けるために持っている機構の1つ) 関連タンパク質である *STN7* と呼ばれるタンパク質を作らない変異体 (*stn7*) をコントロールとして用いた。LIL8の2つの変異株と野生型で成長過程における外見上の違いは見られない。

LIL8に関する実験については2012年度と2013年度の技術報告でも報告している。LIL8の機能は未だ分かっていないが、これまでのPAMを用いた生理学的な実験結果から、LIL8欠損株が持ついくつかの特徴が分かっている。LIL8欠損株では、葉が通常の生育条件にある時に、野生型よりもクロロフィル蛍光が強く観察される。また、光合成効率の指標の1つであるクロロフィル蛍光の最大量子収率  $F_v/F_m$  が低くなっている。この理由について、LIL8欠損株では、光化学系の集光タンパク質が野生形に比べて多く遊離していることが考えられる (加藤ら、2013)。また、LIL8欠損株では野生型に比べて、より強光条件に弱く、強光条件では野生型よりも光合成効率が低下することも分かっている。

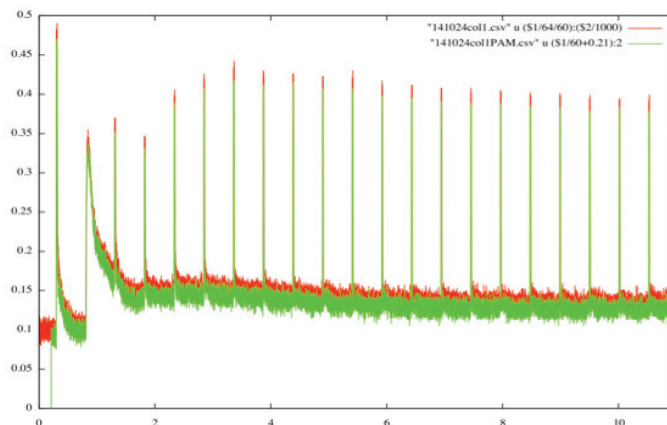


図2 PAM本体とUSB-AD変換器で得られたデータの比較。赤線がUSB-AD変換器で取得したデータ、緑線がPAM本体で取得したデータ。PAM本体で測定できる約10分間のデータを比較した。

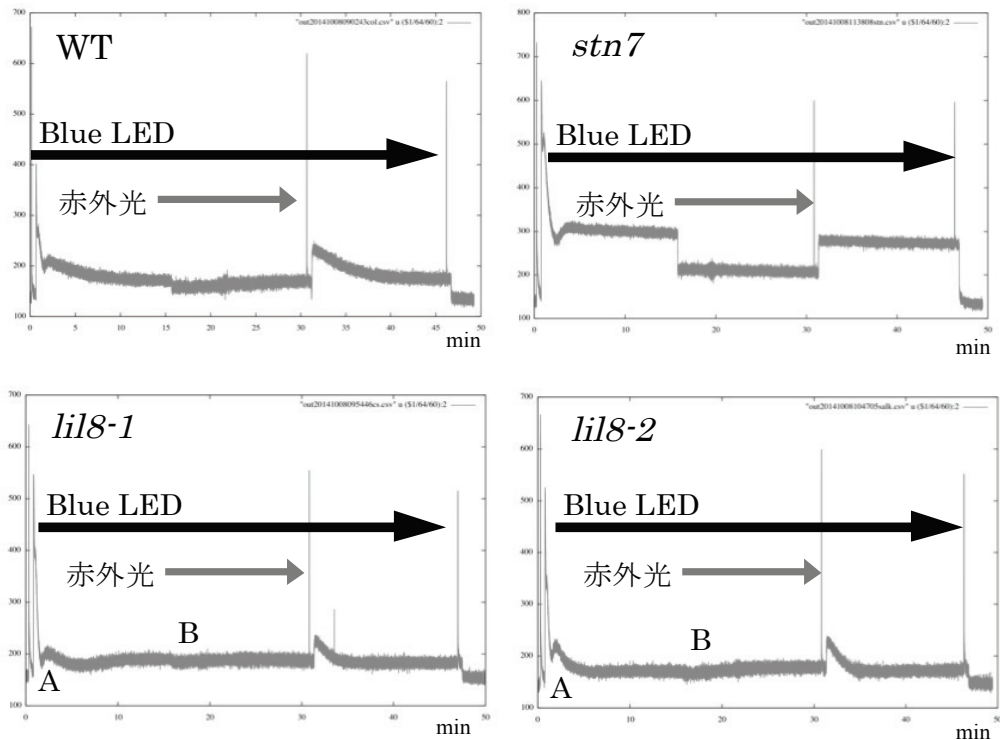


図3 USB-AD変換器で記録したPAMの測定波形。

## USB-AD変換器

USB-AD変換器を図1に示す。本体は8cm四方ほどの大きさである。USB接続とデータ転送時には本体のLEDランプがそれぞれ点灯し、状態が容易に判断できる。

PAMで測定された蛍光量は、電圧として出力されている。USB-AD変換器はPAMに既存のペンレコーダ出力を利用し、出力電圧値を10bitで1/64秒毎にパソコンへ転送する。転送されたデータはcsv形式でパソコンに保存される。PAM本体で保存されるデータとUSB-AD変換器を利用して得られたデータを比較すると図2のようになり、高い一緻性を示した。

## PAMとUSB-AD変換器を用いた測定結果

植物は、光合成反応に使用できなかった励起エネルギーを、熱として放出する。励起エネルギーが熱に変換されると、結果として、観測される蛍光強度は弱くなる。PAMでは放出された蛍光量を測定することで、光の利用効率を見ることができる。等量の光を照射した時に、蛍光量が少なくなるほどその植物は光合成を効率よく行なっていることになる。過去の論文に従い、次のようなスケジュールにおける蛍光量を連続的に調べた。

- (1) 暗所に置いた葉に、青色LED(470nm)の光を15分間照射
- (2) 青色LEDに加えて、赤外光(720nm)を15分間照射
- (3) 再度青色LEDのみを15分間照射

光化学反応では、前半部分の光化学系 II タンパク質（以下 PSII）と後半部分の光化学系 I タンパク質（以下 PSI）が主に働く。(1)と(3)の青色 LED の照射では、PSII が優先的に励起され、後半部分の反応は進まない。そのため、照射開始時には一時的に光合成反応が先詰まりとなり利用できない励起エネルギー由来の蛍光が強く観察されるが、徐々に植物が励起エネルギーを他の方法で消費する機構を働かせるため、蛍光量は減少する。一方、赤外光の照射では、PSI が選択的に励起される。(2)で青色 LED と赤外光を同時に照射すると、光合成反応全体が進む。そのため照射開始時にはそれまでの先詰まりが解消され、一瞬で蛍光量が減少する。

PAM-2000 と USB-AD 変換器を用いて測定した結果を図 3 に示す。野生型と *stn7* では、既に論文で報告されている通りの結果が得られた。一方、LIL8 欠損株では、両者とは異なる波形が得られた。青色 LED を照射した時に見られる蛍光量の減少は野生型よりも速かった (図 3A)。また赤外光を照射した時に野生型や *stn7* で見られた蛍光量の減少は LIL8 欠損株ではほとんど見られなかった (図 3B)。

今回、USB-AD 変換器の使用により PAM の長時間測定が可能となり、光合成の生理的変化を詳細に追うことができた。得られた結果から、LIL8 は光化学系 II と光化学系 I のアンテナサイズの制御に関与することが示唆された。他の実験結果とも合わせ、まだ解明されていない LIL8 の機能について、明らかにしていきたい。

## 参考文献

Lunde C., Jensen P. E., Haldrup A., Knoetzel J., and Scheller H. V., 2000. The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis. *Nature* **408**, 613 – 615.

加藤 由佳子、田中 亮一、高林 厚史、田中 歩 「葉緑体新規タンパク質 LIL8 の解析」北海道大学低温科学研究所技術部技術報告、**18**、1 – 4、2012 年 12 月。

加藤 由佳子、岸本 純子、横野 牧生、高林 厚史、田中 歩、田中 亮一 「葉緑体タンパク質 LIL8 欠損株の光合成」北海道大学低温科学研究所技術部技術報告、**19**、1 – 4、2013 年 12 月。