

平成 18 年度農学研究院若手支援事業（領域：その他）

研究課題：光合成機能解析法「飽和パルス法」の開発

研究者：所属 植物資源科学部門植物代謝制御学分野

氏名 津山孝人 (mtsuyama@agr.kyushu-u.ac.jp)

研究目的

光合成電子伝達において、水の分解によって生成した電子は光化学系 複合体 (PS II) から光化学系 複合体 (PS I) へと伝達される。PSI の下流で電子は NADP⁺ へ流れ、還元力 NADPH が生成する。PSI の下流での電子伝達は複雑であり、様々な電子伝達経路が存在する。例えば、炭酸固定、光呼吸、酸素還元を初発反応とするメーラー反応、PSI サイクリック電子伝達、亜硝酸還元、オキザロ酢酸還元などがある。PSI 下流での電子伝達の制御については数多くの研究があるが、未だ不明な点が多い。近年、分子生物学的手法により解析が進みつつあるものの、非破壊的な測定法が無いことが研究上の大きな障害となっている。本研究では、PSI の下流での電子の流れを解析する手法「飽和パルス法」の開発を最終目標とし、葉緑体ストロマにおける還元力の蓄積、PSI 活性、および PSII 活性の制御について解析した。

結果および考察

PS II から PS I への電子伝達はチトクロム *b₆f* 複合体 (Cyt *b₆f*) が担う。PSII から Cyt *b₆f* へはプラストキノン (PQ) により、Cyt *b₆f* から PSI へはプラストシアニン (PC) により電子が伝達される。PSII における水の酸化はチラコイド内腔の酸性化を引き起こす。加えて、PSII - Cyt *b₆f* 間の電子伝達も、チラコイド膜を介したプロトンの移動と共役するので、チラコイド膜内の酸性化の結果となる。このようにして、光合成電子伝達反応によりチラコイド膜内外に電気化学ポテンシャル差が生じる。電気化学ポテンシャル差 (主にチラコイド膜内外の ΔpH) は葉緑体における ATP 合成の駆動力となる。ATP は NADPH とともに葉緑体および細胞内の様々な代謝を支える。

光合成電子伝達反応は、各種代謝による ATP と NADPH の要求を満たすために、PSII および PSI のレベルで制御されている。比較的強い光の下では、過剰な光エネルギーを熱として散逸することにより PSII 活性は制御されている。この過程には、増加した ΔpH に伴うカロチノイドの変換 (ピオラキサンチン - ゼアキサンチン) および PSII サブユニット (PsbS) の構造変化が関与すると考えられている。一方、強光照射下で増加した ΔpH は、PQH₂ の酸化に伴うチラコイド膜内へのプロトンの放出を阻害する。これにより PSII から Cyt *b₆f* への電子伝達が抑制される。結果として、Cyt *b₆f* 以降の電子伝達成分の PC や P700 (PSI 反応中心の初期の電子受容体) は酸化型となる。酸化型 P700 は励起エネルギーを熱として散逸する。このようにして PSI 活性は制御されている。

弱光下では上記のような光合成制御は機能しないと考えられている。図2はシロイヌナズナの生葉を用いて測定した弱光 (光量子束密度 PFD 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 照射下でのクロロフィル蛍光誘導変化 (図1A) と 820 nm における吸光度 (A_{830} , 図1B) の変化を示している。 A_{830} は P700 の酸化還元状態の指標となる。暗適応させた葉に光を照射すると、クロロフィル蛍光強度および A_{830} は一時的に上昇した後、複雑な変化を経て一定のレベルに達した。光照射を開始して約 30 分後、光合成の定常状態での A_{830} は暗所におけるレベルとあまり差は無かった。これは、殆どの P700 が還元型で存在し、酸化された P700 のほぼ全てが PSII からの電子により再還元されることを意味する。還元型 P700 は 100% の効率で電荷分離を行うことができる。従って、還元型で存在する P700 の相対含量から PSI (P700) の量子収率を求めることができる。図1Bの結果は、PSI の量子収率がほぼ 1.0 であったことを示唆している。しかし、実際には一連の電子伝達反応の律速段階によって決まる速度にあわせて PSI は機能していると予想される。同様のことは PSII についても当てはまる。クロロフィル蛍光測定から求めた PSII 量子収率 (Φ_{PSII}) は約 0.65 であった (図1A, $\Phi_{\text{PSII}} = [F_m - F] / F_m$)。これは上記の見積もりによる PSI 量子収率 (1.0) よりも明らかに小さい。ここで、PSII と PSI における電子伝達速度を正しく比較するためには両光化学系における

光吸収のバランスを考慮する必要があるが、上記の結果は、還元型P700の全てが電子伝達に關与するわけではない、そのおよそ30%が電子伝達に關与していないことを示唆する。強光下での光合成の誘導期や低CO₂下では、ストロマにおける電子受容体（主にNADP⁺）の不足により、還元型でありながら電子伝達に關与しないP700（以下 還元型不活性P700）が存在する[1]。上記の結果は、シロイヌナズナにおいては弱光下の定常状態においても還元型不活性P700が高い割合で存在することを示している。

表1は、弱光下の定常状態におけるPSII量子収率、酸化型P700および還元型P700の相対含量をシロイヌナズナ野生株（WT）と突然変異体（*crr2-2*, *pgr5*, *crr2-2/pgr5*, *stn7*）において測定した結果である。酸化型P700の相対含量はA₈₃₀の最大値（A₈₃₀max）に対するA₈₃₀の比（A₈₃₀/A₈₃₀max）として求めた。A₈₃₀maxは赤外光（> 700 nm）照射下でのA₈₃₀レベルとして得ることができる。還元型P700については、飽和光のパルスを用いることで、電子伝達に關与するP700と關与しないP700を区別することが可能である。前者は飽和光のパルスにより誘導されるA₈₃₀の変化（Δ A₈₃₀）とA₈₃₀最大値（A₈₃₀max）の比（Δ A₈₃₀/ A₈₃₀max）として、後者は飽和光パルスにより酸化されない成分（[1- A₈₃₀- Δ A₈₃₀]/ A₈₃₀max）から求めることができる。後者は還元型不活性P700の割合であり、前者はPSI量子収率（ΦPSI）と見なすことができる。変異株*crr2-2*はNAD(P)H デヒドロゲナーゼ（NDH）複合体依存のPSIサイクリック電子伝達に異常を示す[2]。*pgr5*はPGR5タンパク質が關与するもう一つのPSIサイクリック電子伝達の突然変異体である[3]。PSIサイクリック電子伝達には上記の二つの経路（NDH依存およびPGR5依存の経路）があると考えられており、*crr2-2*および*pgr5*のそれぞれの変異株において欠損したサイクリック電子伝達経路の活性はもう片方の経路の活性が補うと予想される。これは、両方の経路を欠くダブルミュータント*crr2-2/pgr5*では期待できない。*stn7*はステート変化に必須のタンパク質STN7 を欠く[4]。植物はステート変化によって吸収した光エネルギーのPSIIおよびPSIへの分配すなわち反応中心の励起を調節すると考えられている。STN7タンパク質はステート変化を誘導する際の集光性クロロフィルタンパク質のリン酸化に關与する。

野生株においてPSII量子収率とPSI量子収率はおよそ一致した。還元型不活性P700の割合は約30%であった。シロイヌナズナにおいては、PSIは弱光下で受容体側の制限を受けることを示す。酸化型P700の割合は野生株と突然変異体（*crr2-2*, *pgr5*, *stn7*）との間に差は無かった。一方、いずれの変異株においても還元型不活性P700の割合が野生株においてよりも高かった。PSIサイクリック電子伝達のミュータント（*crr2-2*, *pgr5*）ではPSI量子収率（ΦPSII）がPSII量子収率（ΦPSI=ΔA₈₃₀/A₈₃₀max）よりも低かった。これらの表現型はダブルミュータント*crr2-2/pgr5*において顕著であった。すなわち、PSIサイクリック電子伝達は還元力の過剰な蓄積を回避し、PSIIおよびPSI量子収率のバランスを保つ上で重要な役割を果たすことを示している。*stn7*においてはPSI量子収率とPSII量子収率の低下が見られたが、両者のバランスは保たれていた。ステート変化も還元力の過剰な蓄積の回避に寄与するが、その欠損は両光化学系のバランスには影響を及ぼさないことを示す。

還元型不活性P700の増加はストロマにおける電子受容体の不足が原因である。PSIサイクリック電子伝達やステート変化の異常により還元型不活性P700の割合は増大した。しかし、より一般的には、還元型不活性P700の蓄積は光合成制御に関わる問題であり、ATPおよびNADPHの生成と消費を考慮する必要があると思われる。弱光下ではATPの生成が不足するが、タバコでは還元型不活性P700は殆ど検出されない。最近、葉緑体ストロマにおける還元力の蓄積は弱光下における核遺伝子の発現に大きな影響を及ぼすことが報告された[5]。今後、弱光下でのストロマ還元力の蓄積については遺伝子発現制御との関わりも含めて調節機構を明らかにする必要がある。

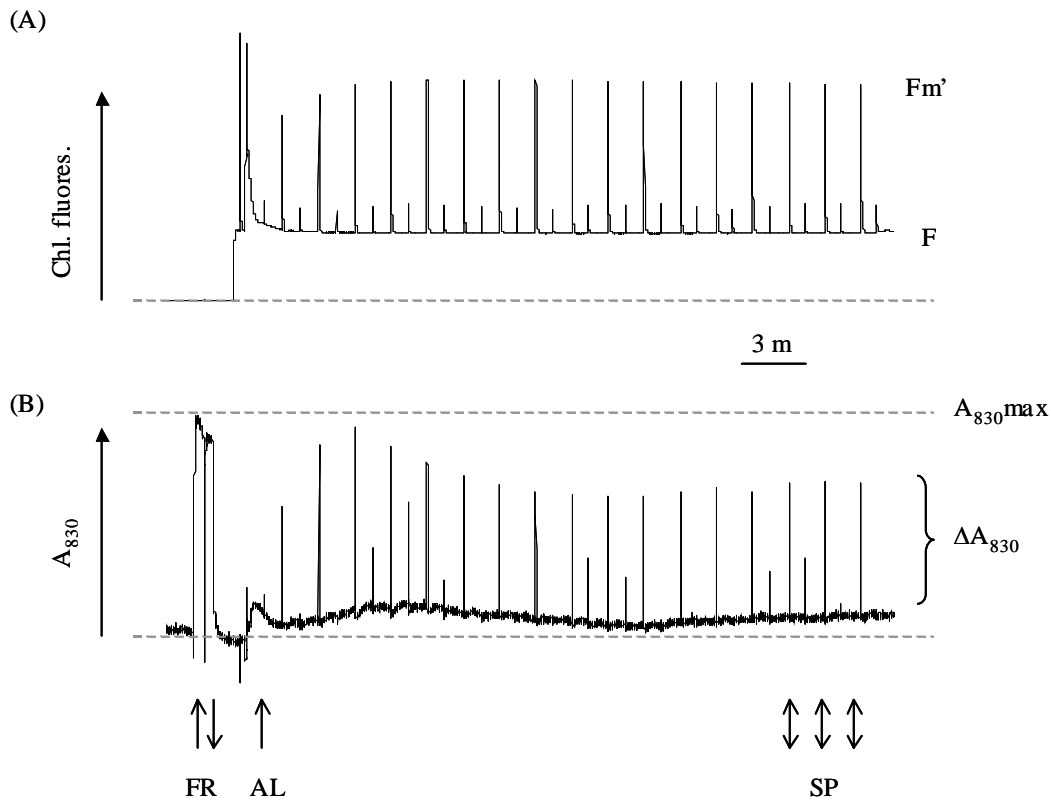


図1 クロロフィル蛍光 (A) およびP700 酸化還元状態の (B, A_{830}) の変化
FR (Far-red light) を照射し A_{830} の最大変化 (A_{830max}) を検出した。弱光のAL (Actinic light, $50 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 照射下、光合成が定常状態に達するまで、持続時間1.0秒の飽和光パルスSP (Saturating pulse, $6,000 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) を繰り返し葉に照射した。持続時間がより短いパルス光をSPと交互に葉に照射し、SPが引き起こすストロマ成分の還元に注意した。

表1 . シロイヌナズナ野生株および突然変異体における光化学系 II と光化学系 I 活性の比較

Plant	ΦPSII	A_{830}/A_{830max}	$\Delta A_{830}/A_{830max}$	$(1 - A_{830} - \Delta A_{830})/A_{830max}$
WT	0.69 ± 0.03	0.06 ± 0.05	0.66 ± 0.10	0.28 ± 0.10
<i>crr2-2</i>	0.65 ± 0.06	0.06 ± 0.06	0.54 ± 0.09	0.40 ± 0.08
<i>pgr5</i>	0.68 ± 0.02	0.08 ± 0.05	0.49 ± 0.10	0.42 ± 0.12
<i>crr2-2/pgr5</i>	0.30 ± 0.09	0.00 ± 0.00	0.21 ± 0.10	0.79 ± 0.10
<i>stn7</i>	0.59 ± 0.03	0.01 ± 0.02	0.56 ± 0.08	0.43 ± 0.08

(n=8-30)

参考文献

- [1] Klughammer C, Schreiber U (1994) An improved method, using saturating light pulses, for the determination of Photosystem I quantum yield via P700⁺-absorbance changes at 830 nm. *Planta* 192:261-268
- [2] Shikanai T, Endo T, Hashimoto T, Yamada Y, Asada K, Yokota A (1998) Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9705-9709
- [3] Munekage Y, Hojo M, Meurer J, Endo T, Tasaka M, Shikanai T (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell* 110:361-371
- [4] Bellafiore S, Barneche F, Peltier G, Rochaix JD (2005) State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature* 433:892-895
- [5] Piippo M, Allahverdiyeva Y, Paakkarinen V, Suoranta UM, Battchikova N, Aro EM (2005) Chloroplast-mediated regulation of nuclear genes in *Arabidopsis thaliana* in the absence of light stress. *Physiol Genomics* 25:142-152