

<研究紹介>

光阻害とわたくし

彦坂幸毅（東北大・生命科学）

私が光阻害に興味をもつようになったのは東大植物学教室の生態研に在籍していた博士課程の頃です。その頃生態研では寺島一郎先生（現大阪大理）や園池公毅先生（現東大新領域）たちによる光化学系 I の光阻害の発見（Terashima et al. 1994, Sonoike and Terashima 1994）や、降雨下で葉の光合成能力低下の発見（Ishibashi and Terashima 1995）など光阻害関連分野で熱い展開がありました。

当時、私の研究内容は光阻害ではなく、光合成系の光順化を進化生態学的観点から解析する、というものでした。光合成系のタンパク質組成は生育光環境によって変化します（光順化）。例えば、RuBPCase/クロロフィル比やクロロフィル *a/b* 比は強光生育葉ほど高い、といったことがよく知られています。これらの変化の「生態学的意義」は窒素利用の効率化であるという仮説がありました（Evans 1989）。葉の窒素の大半は光合成系に投資され、窒素の多寡が光合成能力の高低を決めることはすでにわかっていました。さらに窒素の多寡だけではなく、窒素どのように分配するか（つまり、光合成系タンパク質の組成比を変える）も重要ではないか、と考えられはじめていたのです。この仮説を強固なものにする、というのが私の目標でした。私は各光化学系タンパク質が光合成速度にどのように貢献しているかを文献値を用いて数式とし、タンパク質組成、光環境、光合成量の関係を数理モデルによって表しました。そして、光環境によって最適なタンパク質分配が異なることを理論的に示し（Hikosaka and Terashima 1995）、さらに現実の植物のタンパク質分配をモデルの予測と比較する（Hikosaka and Terashima 1996, Hikosaka 1996）、という仕事をしていました。

私の研究に光阻害は直接関連していませんでしたが、気になることが一つありました。それはアンテナサイズと光順化の関係です。私のモデルでは強光ほど最適なアンテナサイズが小さいことが予測されます。これは光化学系における窒素利用で説明されます。弱光下では、光を多く吸収することが光合成速度の増加をもたらすため、クロロフィルの多寡が光合成速度の決定要因になります。光化学系 II のコアもアンテナ (LHCII) もある量のクロロフィルをもちます。

クロロフィルを増やすことだけが目的ならば、アンテナを増やすほうが有利です。なぜなら、アンテナを作るための窒素（クロロフィル1分子あたりの窒素量）は比較的少なく、低いコストで光合成速度を高めることができるからです。一方、強光では別の制約があります。私のモデルでは最大光合成速度を増やすためにはコア（反応中心）を増やす必要があることを仮定しています。強光環境では最大光合成速度が高いほうが一日の炭素獲得量が高くなりますから、多少窒素コストがかかったとしても反応中心を増やした方が有利で、結果的にアンテナサイズは相対的に小さくなります。こうして生育光環境によって最適なアンテナサイズが変わるわけです。このような考え方とは別に、光阻害研究では強光で過剰エネルギーが増えるのを防ぐためにアンテナサイズを小さくすることが有利であると信じられていました。強光生育の葉では光阻害耐性を高めるためにアンテナサイズが小さくなるつまり窒素利用を考えなくても光順化は説明できるのではないか？という疑問があるわけです。

そんな頃に出会ったのが Aro et al. (1993) という論文でした。この論文のテーマは光化学系 II のターンオーバーです。光阻害では光化学系 II に傷害が起こるわけですが、傷害は比較的速やかに回復されます。傷害が起こった光化学系 II の D1 タンパク質が分解され、再合成された D1 タンパク質が挿入され、活性が復活します。Aro らはリンコマイシン（葉緑体コードタンパク質の合成阻害剤）によってこの回復過程を阻害し、その光阻害耐性に対する貢献を調べました。葉に強光をあてると active な光化学系 II の割合が時間とともに減少します。この減少の程度は生育環境によって差があり、リンコマイシン処理をしない場合、強光生育の葉ほど光阻害に耐性をもちます。しかし、エンドウを使用した彼らの実験ではリンコマイシンをかまして回復を阻害すると、強光生育の葉と弱光生育の葉で光化学系 II の不活性化速度にほとんど違いが見られなくなりました。この実験結果から、二つのことがわかります。一つは、生育光条件による光阻害耐性の違いは傷害からの回復能力の違いを反映しているのだ、ということです。もう一

つは、アンテナサイズの違いは光阻害耐性の違いにあまり効いていないらしい、ということです。これは「アンテナサイズの変化の意義は（光阻害回避よりむしろ）窒素利用にある」と主張したい私にはとても興味深い結果でした。その他の論文をちらちら眺めることによって、他にも光阻害に対する防御系があること、そして、各防御系が光阻害耐性にどれだけ効いているかについては、人によって言っていることが違う—ある研究者は回復能力が重要だと言い、別の研究者はアンテナサイズが重要であると言う、等々—ということがわかってきました。

学位をとった私は運良く東北大学に就職します。就職した次の年に加藤真晴君が大学院に進学してきました。光阻害のテーマをあたためていた私は早速加藤君に光阻害研究をやってもらうことにしました。私たちは光阻害について新参者でしたし、充分知識があるわけではありませんでしたが、ある程度の勝算はありました。研究戦略として私たちが考えていたのは以下の3つでした。

1) 生育光条件と栄養条件の両方を変える

生育光条件が葉の光阻害耐性や様々な光防御系の防御能力を変えることはよく調べられていました。しかしどの防御系が光阻害耐性の違いをもたらしているのか、ということはわかっているようでわかっていませんでした。というのは、すでに述べたように光環境が変わればアンテナサイズも変わるし回復能力も変わります。熱放散能力が変わるといふ報告もありますし、古くは光合成能力の違いが光阻害耐性の違いをもたらすと考えられていました。多くの防御系が同じように変わるような状況では、たとえある防御系と防御能力の間に相関関係が見られたとしてもそれが因果関係を意味しないことは明らかです。そこで栄養条件も変えることを思いつきました。例えば、栄養条件が変わると光合成能力が大きく変化しますが、アンテナサイズはそれほど変わりません。光条件と栄養条件の影響を比べることで、各防御系の貢献の大きさが見えてくるのではないかと考えました。

2) 全ての防御系を同じ実験セットで調べる

上で述べたように、複数ある防御系の効果を比較するときには相関関係だけでは不十分です。そこで、可能なかぎり多くの種類の防御系を取り扱うこと、そして防御能力（耐性への貢献度）の定量的な見極めを目標としました。どちらも難題でしたが、後述するように加藤君が Demmig-Adams らのモデルが使えることに気づき、大きく前進しました。

3) 切り葉を使う

90年 台前半当時は、光阻害処理にリーフディスク（葉から打ち抜いたディスク）を用いることが多かったように思います。葉を水に浮かべた場合、気孔が水にふさがれてしまい、二酸化炭素が葉内に入っていかなくなる可能性があります。二酸化炭素濃度が下がると光合成によるエネルギー消費が少なくなり、光阻害の程度が大きくなる可能性があります。また、私たちは生態学的な面に興味があるので、野外の植物と結びつけて議論できるよう、可能な限り自然に近い状態で光阻害耐性を調べたいと思いました。そこで、（新しい手法というわけではありませんが）切り葉を水差しにして光阻害処理を行うことを考えました。切り葉を使えば通常の光合成・蒸散速度を測定できますし、葉柄から薬剤を加えることも可能です。また、先行研究とかわりばえのしない結果が出たとしても、切り葉を使って調べたことを新規性とすれば、どこかに論文を通すことができるかな、という保険的な面もありました。

加藤君は一年ほどかかって、様々な苦勞の末に実験系を確立しました。詳細は省きますが、彼が5年間でまとめた主な仕事は以下の通りです。

○葉とリーフディスクでは光合成特性も光阻害の起こりやすさも違う

上述の通り、リーフディスクを水に浮かべると二酸化炭素が入りにくくなり、光阻害が起こりやすくなることがあることを示しました (Kato et al. 2002a)。

○シロザ (アカザ科の一年草) における光阻害耐性への栄養条件・光条件の影響

この研究では強光富栄養、強光貧栄養、弱光富栄養の3種類の生育条件を使用しました。加藤君は強光貧栄養と弱光富栄養条件の葉が同様の光合成能力を示すよう条件を調整しました。その結果、光阻害耐性は栄養条件の影響を受けず、光条件のみの影響を受けました (図 1a)。この結果は、光合成能力だけでは光阻害耐性の違いを説明できないことを意味します。さらに、リンコマイシンを加えて調べたところ、強光生育ほど傷害からの回復能力が高いこと、回復能力は栄養条件に依存しないことがわかりました (図 1b)。ただし、回復を阻害しても傷害の起こりやすさには光条件による違いが見られるため、回復能力だけでも光阻害耐性の違いを説明できないことがわかりました (Kato et al. 2002b)。

○傷害が起こる速度は「過剰エネルギー」の量によって決まる

回復を阻害したときの傷害の起こりやすさの生育条件間の違いを調べるため、熱放散と光化学反応によるエネルギー消費を定量的に解析しました。ここで用いたのが Demmig-Adams et al. (1996) のモデルです。このモデルでは、クロロフィルが吸収した光が熱放散、光化学反応にどのように分配されているかを、クロロフィル蛍光の解析によって推定を試みたものです。クロロフィル蛍光の説明は煩雑なのでここでは省きますが、簡単に書くと、いわゆる Genty の yield (Genty et al. 1989) として光化学反応 (電子伝達) へのエネルギー分配率が求められます。さらに、 $1-F_v'/F_m'$ として熱放散へのエネルギー分配量が求められます (F_v'/F_m' は、open な光化学系 II における光化学反応の量子収率を表します。open な光化学系 II では光化学反応に使われなかったエネルギーは全て熱として放散されると考えるわけです)。そして、光化学反応へも熱放散へもいかなかったエネルギーが過剰エネルギーとして計算されます (吸収エネルギー-光化学反応-熱放散=過剰エネルギー)。こうして計算された過剰エネルギーは障害の起こりやすさをよく説明しました (図 2)。エネルギーの分配を解析すると、強光富栄養生育の葉は光化学反応で消費するエネルギーの割合が大きく、強光貧栄養生育の葉は光化学反応速度の低さを高い熱放散能力で補っていました。弱光富栄養生育の葉は光化学反応速度も熱放散能力も低く、過剰エネルギーが大きいため障害が起こりやすいと考えられました (Kato et al. 2003)。

この過剰エネルギーが定量的に正しいものかはまだ議論の余地がありますが、過剰エネルギーの大きさを比較できるようになった点は大きいと思います。これまで「光阻害は過剰エネルギーが引き起こす」と考えられていましたが、過剰エネルギーを定量的に表したパラメータはなかったと思います。なお、多くの研究では励起圧 (excitation pressure、closed な光化学系 II の

割合)が使われていますが、加藤君の実験では、励起圧は傷害の起こりやすさを説明できませんでした。

加藤君が学位を取得して卒業(現不二製油)した後は、ブルガリア科学アカデミーの TD Tsonev 博士が学振外国人招へい研究員として5ヶ月滞在し、光阻害耐性、傷害回復などの光防御機構の能力の温度依存性を調べ、発表しました(Tsonev and Hikosaka 2003)。現在は学生の小野広善君が低温順化と光阻害耐性の関係を調べています。私自身は、光阻害耐性のモデル化を試みています。環境条件をインプットするとどの程度の光阻害が起こっているかをアウトプットできるようなものが目標です。

文献

Aro et al. (1993) *Plant Physiology* 103: 835-843.

Evans (1989) *Australian Journal of Plant Physiology* 16: 533-548.

Demmig-Adams et al. (1996) *Physiologia Plantarum* 98: 253-264.

Genty et al. (1989) *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87-92.

Hikosaka 1996 (*Planta*) 198: 144-150.

Hikosaka & Terashima (1995) *Plant, Cell and Environment* 18: 605-618.

Hikosaka & Terashima (1996) *Functional Ecology* 10: 335-343

Ishibashi & Terashima (1995) *Plant, Cell and Environment* 18: 431-438.

Kato et al. (2002a) *Photosynthesis Research* 72: 65-70.

Kato et al. (2002b) *Functional Plant Biology* 29: 787-795.

Kato et al. (2003) *Plant and Cell Physiology* 44: 318-325.

Sonoike & Terashima (1994) *Planta* 194: 287-293.

Terashima et al. (1994) Planta 193: 300-306.

Tsonev & Hikosaka (2003) Plant and Cell Physiology 44: 828-835.