

## <研究紹介>

### 2%酸素の光合成、今昔物語

牧野 周（東北大学 大学院農学研究科）

2%酸素という条件が、光合成の解析手段として古くから用いられている。しかし、自然界には2%酸素という環境条件は存在しない。あくまで光合成の解析手段として用いられる条件である。事実、この2%酸素という条件の光合成を解析することで、光合成に関連するさまざまな現象が解明されてきた。しかし、その一方でいまだによくわからない2%酸素の光合成でもある。

ここでは、2%酸素という条件で、どのような光合成の現象が解明されてきたのか、また2%酸素での光合成の理解は現在どこまで進んでいるのか、その歴史と現状をまとめた。

#### 2%酸素の光合成は光呼吸を抑制する真の光合成である。

1970年代から80年代中頃にかけて、酸素濃度2%で光合成測定を行うと光呼吸を抑えた真の光合成速度が測定されると考えられていた。まず、そのような解釈に至った歴史について振り返ってみよう。酸素が光合成に与える影響について調べた研究の歴史は古い。1920年ドイツの Warburg は、クロレラを用いて光合成が大気分圧の21%より高い酸素によって阻害され、逆に大気分圧より低い2%酸素では促進される現象を発見した(Warburg 1920)。いわゆる、Warburg 効果である。それから20年後、コムギを材料に McAlister らが高等植物の光合成にも酸素が同様の影響を与えることを観察した (McAlister and Myers 1940)。もちろん、これらの現象は  $\text{CO}_2$  の固定酵素である Rubisco によって触媒される carboxylase 活性と oxygenase 活性の間の拮抗反応によるものである。しかし、酸素による光合成への影響の要因については、Rubisco の oxygenase 活性が発見されるまで、さまざまな仮説が発表された。例えば、カルビン回路酵素の不活性化説 (Turner et al. 1958) や電子伝達系阻害説 (Björkman 1966) などである。そんな中、実際には1943年にすでに日本の植物学会で田宮と藤茂が Warburg 効果の酸素阻害部位が光合成の暗反応にあることを報告し (Tamiya and Hujishige 1949)、Bassham らは  $\text{CO}_2$  固定中に酸素存在下でグリコール酸が生成されることを観測し、そのグリコール酸が RuBP の酸化

によって生じている可能性を指摘していた(Bassham and Kirk 1962)。その Bassham の報告から9年後の1971年、イリノイ大学の Ogren らのグループが、光合成の炭酸固定酵素 Rubisco が酸素によって拮抗的に阻害されることを発見し(Ogren and Bowes 1971)、酸素存在下で RuBP からグリコール酸リン酸が生成されることを見出した(Bowes et al. 1971)。Rubisco の oxygenase 活性の発見である。その翌々年 Tolbert のポストドクだった Lorimer らが、マノメータを用いての酸素吸収と  $^{18}\text{O}_2$  からのグリコール酸リン酸の生成を証明した(Andrews et al. 1973, Lorimer et al. 1973)。これらの発見によって Warburg 効果が初めて酵素反応による代謝産物のレベルで説明されたわけである。Rubisco の oxygenase に始まる光呼吸経路の詳細やその意義については他を参照されたい(金井 2003 など)。余談ではあるが、その oxygenase 活性の発見をめぐって、Lorimer が Plant Physiology の前編集長(かつて Ogren のグループのポストドクであった)Somerville に宛てた抗議文は、当時の状況と Rubisco の oxygenase 活性をめぐり議論を知る意味で興味深い(Lorimer 2001)。

話をもどそう。このように、Rubisco の oxygenase 活性によって光呼吸が生じ、同時に起こる carboxylase 活性による光合成の炭酸固定を拮抗的に阻害していることが明らかとなり、低酸素で促進される光合成、すなわち 2%酸素で測定される光合成は光呼吸を除いた真の光合成である、と解釈されたわけである。その理論に基づいて、日本では、作物学者が中心になって 2%酸素等の低酸素で光呼吸を抑制させるとイネの乾物生産が上がること(Akita and Tanaka 1973)や純同化率が上昇する現象(Fukuyama et al. 1974)などを報告した。当時の日本の作物学者が世界の光合成研究の動向を見ながら質の高い研究を展開していたことを示している。また、2%酸素と 21%酸素での光合成の温度レスポンスを調べ、高温ほど光呼吸レベルがあがり光合成ロスが大きくなり、その現象が Rubisco の carboxylase や oxygenase の酵素的特性で説明されることを見出した論文なども発表された(Key et al. 1977)。

### 2%酸素の光合成は Pi の再生産によって律速される。

1980年オーストラリア国立大学の Farquhar らは、光合成の律速モデルを発表した(Farquhar et al. 1980)。当時、Farquhar の大学院生であった von Caemmerer は彼のモデルに従って、光合成の実測解析を行った。Farquhar のモデルによれば、2%酸素でも 21%酸素でも  $\text{CO}_2$  濃度を大気レベルからさらに上昇させた時、光合成は RuBP の再生産速度に律速される。したがって、RuBP 再生産の律速領域では、一定速度で Rubisco に供給

される RuBP を基質に、CO<sub>2</sub> 分圧上昇分だけ carboxylase 活性が上がり、結果としては、見かけの光合成速度は CO<sub>2</sub> 濃度の上昇に伴って増加することになる。しかし、実験では 2%酸素の時のみ CO<sub>2</sub> 濃度増加に伴い光合成速度は逆に若干の減少を示したのである (Fig. 1 in von Caemmerer and Farquhar 1981)。Farquhar らは単なる実験誤差によるものと考えたようだが、当時、同じオーストラリア国立大学のポスドクだった Sharkey は 2%酸素の条件でのみ起こるこの奇妙な現象に拘った。1985 年に同大学にポスドクとして留学した寺島さん(阪大)が、「Tom (Sharkey) がなぜそんな小さな誤差に拘るのか理解できない」と Farquhar が口にしていただけだと証言している。

やがて、Sharkey は、この 2%酸素で増加しない光合成(実際は若干の減少を示す光合成)を O<sub>2</sub>-insensitive 光合成と名付けて、その条件で観測される光合成関連の代謝産物のプール組成が、単離葉緑体を低 Pi 処理した時に生じる光合成のダウンレギュレーション時のプール組成(Heldt et al. 1978)に極似することを報告した(Sharkey et al. 1986)。そこで、彼らは、2%酸素で大気レベル以上に CO<sub>2</sub> 濃度を上げて光合成が上昇しないのは、光合成が最終産物である糖生産に伴う Pi の再生産(再利用)反応が制御され、それによって光合成全体の反応が抑えられるためである、と推測したのである。この現象はあくまで状況証拠からの推定であり、実験的に証明されたものではない。しかしながら、今日でも CO<sub>2</sub> 飽和条件を含め 2%酸素条件での光合成律速因子である、と理解されている。唯一、直接的な証明としては、細胞質に局在する酵素 FBPase(ショ糖合成の鍵酵素)を 75%以上欠損したフラベリアミュータント(C<sub>3</sub>型)では 2%酸素(実際は 3%)でより大きく光合成が抑制されることが示されたことであろう(Sharkey et al. 1988)。また、Pi の再生産による光合成のダウンレギュレーションは、後に Heineke らの葉緑体 Pi-translocator のアンチセンスジャガイモ実験によっても確認されている。Heineke らは、アンチセンス植物では、Heldt らの単離葉緑体を用いた結果とまったく同じ現象が葉でも生じることを報告した(Heineke et al. 1994)。1992 年の名古屋での国際光合成会議後のサテライトシンポ(三重県賢島)で Heineke らの報告を受けて、Heldt がまさに自分の単離葉緑体での結果と同じだと興奮気味にコメントしていたことを私は覚えている。

この Sharkey らの一連の報告が発表された 1980 年代後半頃から「2%酸素の光合成＝真の光合成」という議論はされなくなった。私事になるが、1983 年(当時大学院生)、2%酸素で測定した光合成を Rubisco のキネティクスから定量解析した論文を *Plant Cell Physiol* に投稿した(掲載は翌年、Makino et al. XXX 内容がお粗末なので余り読んで頂きたくない)。審査員の一人はオーストラリア国立大学の博士課程修了直後の John

Evans だった。「2%酸素の光合成は Rubisco に律速されるものではないが、、、云々」とのコメントをもらった。編集実行委員だった浅田先生の配慮で掲載可となったが、Skarkey らの論文が発表される3年前で、当然そのコメントの真意を知るすべもなかった。しかし、その John Evans も Pi-再生産に対する考え方に当時は否定的であったと聞いた。

## 2%酸素は Water-water cycle (Mehler 反応)を抑制した光合成である。

Water-water cycle は PSI 近傍で発生する活性酸素(Mehler 反応)をおもにアスコルビン酸ペルオキシダーゼ経路で水に変換し解毒化させる代謝で、葉緑体での活性酸素消去経路として知られている(Asada 1999)。この経路解明に大きく貢献した浅田の研究グループはおもに単離チラコイドでこの研究を行っていたため PSI 近傍で生じる Mehler 反応自体は2%酸素で飽和するとの結果を得ていた(活性酸素発生の  $K_m$  の実測値は 0.2 から 0.8%であった)。しかし、浅田グループの研究員であった三宅はフラボタンパク質を添加したチラコイド膜や生葉を用いて活性酸素発生のキネティクスを調べたところ、その発生速度は単離チラコイドで見積もられた値より 10 倍ほど高く、さらに酸素飽和濃度点 ( $K_m$  は 8%) も高いことを見出した(Miyake et al. 1998, Miyake and Yokota 2000)。生葉での活性酸素の本当の発生部位はチラコイド膜表面またはストロマ側にあるようである(彼らは現在、フェレドキシンを有力候補の一つに考えている)。彼らはさらに、クロロフィル蛍光とガス交換を同時測定することによって、2%酸素条件では water-water cycle への電子伝達をほとんど抑えた光合成の測定が可能であることを提唱した(Miyake and Yokota 2000)。彼らの解析方法は少々理論的で難解なところもあったのか、2%酸素で water-water cycle は制御されるという考え方を懐疑的に思った研究者も多いようである。実際、私が海外の研究者に尋ねたところ首を傾げる人もいた。三宅さんは「私の話はまだまだ市民権を得ていない。」と笑っていた。さっそく、私も自分流のやり方で追試を試してみた。2%酸素条件でも Pi の再生産の制御がかからない Rubisco のアンチセンスイネ(Rubisco 量だけが特異的に減少しているので、測定される光合成は常に Rubisco によって律速される)を使って、 $CO_2$  飽和の条件(150 Pa  $CO_2$ )で酸素濃度だけを 21%、2%と切りかえる実験を行った(残念ながら未発表)。その結果、21%から 2%へ酸素濃度を切りかえると  $CO_2$  の同化速度はまったく変化しないのに( $CO_2$  飽和条件であるので oxygenase 活性による光呼吸はほとんど生じていない)、PSII の量子収率だけが 10~20%ほど必ず低下したのである。三宅らの指摘どおり、Water-water cycle へ流れる分だけの

量子収率低下が見られた、と考えられる。

私たちは、この三宅理論にしたがって、2%酸素光合成解析を組み合わせ、光合成の光誘導過程では water-water cycle がまずチラコイド膜に  $\Delta pH$  を形成し、それが光合成のスタータとなっていることを明らかにした(Makino et al. 2002)。また、海外のグループでも 2%酸素では water-water cycle への電子伝達を制御した場合の光合成と捉えて解析を進めている例も出てきている(例えば、Clarke and Johnson 2001)。このように、やがては、2%酸素条件は water-water cycle を抑えた光合成であることが、一般的な解析手段として用いられる時代が来る、と確信している。しかし、実際は次に述べる PSI での循環的電子伝達の駆動に関連して、問題は単純ではないかも知れない。

### 2%酸素では循環的 PSI 電子伝達系が駆動する。

Water-water cycle は PSII での水分解に始まり、PSI 近傍での活性酸素発生、フェレドキシンより受け取った電子によりアスコルビン酸ペルオキシダーゼが活性酸素を水に変換するので、結果としてチラコイド膜に  $\Delta pH$  を形成する(Asada 1999)。したがって、2%酸素で water-water cycle を抑制すれば、 $\Delta pH$  の指標となる NPQ(クロロフィル蛍光解析で測定される non-photochemical quenching)は低下することが予想される。しかし、実際は必ず 2%酸素で NPQ は上昇する。それに着眼した三宅さんのアイディアで私たちは 2%酸素では循環的 PSI 電子伝達系(PSI cyclic)が駆動していることを見出した(Makino et al. 2002)。PSI cyclic が  $\Delta pH$  形成を促進し、NPQ を上昇させているのである。高等植物の PSI cyclic 経路は、NDH 経由か FQR 経由か、またその mediator の実態などはほとんどわかっていなかったが、ごく近年、Shikanai らのグループの優れた研究により、経路の全貌が徐々に明らかになりつつある(Munekage et al. 2002, Munekage et al. 2004)。けれども、生理的機能に関しては謎な部分が多い。高等植物の場合、PS I cyclic は、ATP と NADPH の fine-tuning というよりは、非常に多くの場合、光阻害回避のための NPQ 形成、あるいは光合成始動の  $\Delta pH$  形成のために駆動しているようである(Endo et al. 1999, Cornic et al. 2000, Makino et al. 2002, Munekage et al. 2002, Golding and Johnson 2003)。しかし、2%酸素でなぜ PSI cyclic がまわるのか？まわる必要があるのか？私にはまったく理解ができていない。嫌気的な条件(0%酸素)では PSI cyclic が駆動することは他の研究者によっても確認されている(Joët et al. 2002)。私たちは、2%酸素条件での光合成の光誘導過程においては、water-water cycle が  $\Delta pH$  形成のスタータとして機能できないので、PSI cyclic が代替駆動することを見出した。それは理解できる。しかし、光合成が定常速度

に達しても、2%酸素では PSI cyclic は常に廻りっぱなしである。しかも、NPQ の上昇割合から推察して、21%酸素で駆動している water-water cycle をしのぐ高速回転である (Makino et al. 2002)。植物は、2%酸素で PSI cyclic を駆動させ、いったい何をやっているのでしょうか？

おわりに。

2%酸素の光合成解析によって、さまざまな光合成の現象が解明されてきた。現在では、2%酸素の光合成は Pi の再生産によって律速された光合成として理解されている。しかし、2%酸素は water-water cycle の電子伝達を抑制し、PSI cyclic に大きく駆動させる。このように電子伝達系に大きな影響を与える 2%酸素であるならば、当然、カルビン回路酵素群への ATP や還元力供給に影響を与えていることが想像される。Sharkey らによって提唱された Pi の再生産制御は、炭素代謝と ATP 生産に関わる Pi の再利用のみから論じられたものである。この事実を考えると、Pi 再生産の制御も再検討が必要であるような気がしてならない。また、2%酸素では必ず PSII の量子収率低下が観測される。低酸素である分、water-water cycle への電子伝達の流れが抑制された、という考えであるが、一方で PSI cyclic は大きく駆動し、 $\Delta pH$  を上げている。したがって、その新たな  $\Delta pH$  形成による PSII の量子収率低下の可能性も考えなくてはならないのかも知れない。光合成機能の解明に大きく貢献してきた 2%酸素の光合成であるが、新たな謎を生んでいる光合成でもある。世界的に見てこの分野の研究にかつての勢いが感じられない今日この頃、多少の意地もあって 2%酸素の光合成に拘ってみた。

謝辞

原稿を金井龍二先生(埼玉大名誉教授)に精読して頂いた。Warburg 効果から光呼吸に関わる先駆的研究に対する私の不適格な引用について数多くの指摘を頂き、Warburg(1920)、田宮・藤茂(1949)および Ogren and Bowes (1971)の原論文をしっかりと読む事を勧められた(Warburg の原本はドイツ語でまだほとんど読めていない)。光合成の先駆的な研究について正しいレビューができない者に、若い光合成研究者に対して、80年代・90年代の議論をまったく知らないとは非難できるものでない、とお叱りを受けたのであろう。先生からご紹介頂いた文献や逸話から私が感じた点は、いわゆる世紀の大発見の影には、必ず忘れられた優秀な研究者による優れた報告が数多くあり、それらの議論の積み重ね上に初めて世紀の大発見があるという点である。世紀の大発見は決して

優秀な研究者一人によってある日突然成されるものではなく、同時に、世紀の大発見を逃してしまった研究者たちは、それをなし得なかった原因や背景が必ず存在していたことにも気づく。一角千金を狙うような仕事が目に付く昨今、少なくとも光合成に関する分野では、そのような研究から世紀の大発見はないということは、歴史が証明しているのかもしれない。

金井先生からは、原始地球の大気環境(低酸素時代)と光合成生物の出現、その進化を念頭においた考察が欠如している、との意見も頂いた。残念ながらこの点に関してはまったくクリアしていない。大きな宿題となった。

### 引用文献

- Akita S, Tanaka I (1973) Proc Crop Sci Soc Jpn (日作記) 42: 18-23
- Akita S, Miyasaka A (1969) Proc. Crop Sci Soc Jpn (日作記) 38: 525-534
- Andrews TJ, Lorimer GH, Tolbert NE (1973) Biochemistry 12: 11-18
- Asada K (1999) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50: 601-639
- Bassham JA, Kirk M (1962) Biochim Biophys Res Commun 9: 376-380
- Björkman O (1966) Physiol Plant 19: 618-633
- Bowes G, Ogren WL, Hageman RH (1971) Biochem Biophys Res Commun 45: 716-722
- Clarke JE, Johnson GN (2001) Planta 212: 808-816
- Cornic G, Bukhov NG, Wiese C, Bligny R, Huber U (2000) Planta 210: 468-477
- Endo T, Shikanai T, Takahashi A, Asada K, Sato F (1999) FEBS Lett 20: 5-8
- Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA (1980) Planta 149: 178-190
- Fukuyama M, Takeda T, Taniyama T (1974) Proc Crop Sci Soc Jpn (日作記) 43: 267-273
- Golding AJ, Johnson GN (2003) Planta 218: 107-114
- Heineke D, Kruse A, Flüggé U-I, Frommer WB, Riesmeier JW, Willmitzer L, Heldt HW (1994) Planta 193: 174-180
- Heldt HW, Chon CJ, Lorimer GH (1978) FEBS Lett 92: 234-240
- Joët T, Cournac L, Peltier G, Havaux M (2002) Plant Physiol 128: 760-769
- Kanai R (2003) 化学と生物 41: 403-409
- Key AJ, Sampaio EVSB, Corneleus MJ, Bird IF (1977) J Exp Bot 28: 525-533
- Lorimer GH (2001) Plant Physiol 127: 3
- Lorimer GH, Andrews TJ, Tolbert NE (1973) Biochemistry 12: 18-23
- Makino A, Miyake C, Yokota A (2002) Plant Cell Physiol 43: 1017-1026
- McAlister ED, Myers J (1940) Smithsonian Misc Coll 99: 6-26

Miyake C, Schreiber U, Hormann H, Sano S, Asada K (1998) *Plant Cell Physiol* 39: 821-829

Miyake C, Yokota A (2000) *Plant Cell Physiol* 41: 335-343

Munekage Y, Hashimoto M, Miyake C, Tomizawa K, Endo T, Tasaka M, Shikanai T (2004) *Nature* 429: 579-582

Munekage Y, Hojo M, Meurer J, Endo T, Tasaka M, Shikanai T (2002) *Cell* 110: 361-371

Ogren WL, Bowes G (1971) *Nature New Biol* 230: 159-160

Sharkey TD, Kobza J, Seemann JR, Brown RH (1988) *Plant Physiol* 86: 667-671

Sharkey TD, Stitt M, Heineke D, Gerhardt R, Raschke K, Heldt HW (1986) *Plant Physiol* 81: 1123-1129

Tamiya H, Hujishige H (1949) *Acta Phytochim* 15: 83-104

Turner JS, Turner JF, Shortman KD, King JE (1958) *Aust J Biol Sci* 11: 336-342

Von Caemerer S, Farquhar GD (1981) *Planta* 153: 376-387

Warburg O (1920) *Biochem Z* 103: 188-217