

# 光合成研究

第 26 卷 第 1 号 (通巻 75 号) 2016 年 4 月  
NEWS LETTER Vol. 26 NO. 1 April 2016

THE JAPANESE SOCIETY OF PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

---

|  |    |
|--|----|
| 第 7 回日本光合成学会年会・公開シンポジウム開催のお知らせ   | 2  |
| 研究紹介 光化学系 II Mn クラスターの光活性化反応における Mn <sup>2+</sup> 結合サイトの同定<br>浅田 瑞枝 三野 広幸 (名古屋大)   | 4  |
| 解説 光合成と O <sub>2</sub> の研究から見えてきた、新たな電子伝達制御メカニズムの存在<br>釋 啓一郎 三宅 親弘 (神戸大)   | 10 |
| 解説 光合成微生物を利用した再生可能エネルギー生産実用化のための課題<br>—社会からの期待、研究の歴史、シアノバクテリアの水素生産<br>櫻井 英博 (神奈川大)                                       | 23 |
| 解説特集 「若手光合成研究者による光合成研究の新展開」  | 34 |
| 序文 高橋 裕一郎 (岡山大)  | 35 |
| 解説 光合成における強光順化メカニズム研究の新展開<br>得津 隆太郎 (基生研)  | 36 |
| 解説 酸素発生型光合成の成立過程とその実証方法の再考<br>浅井 智広 (立命館大) 塚谷 祐介 (東京工業大)   | 43 |
| 解説 緑藻の光化学系 I サイクリック電子伝達活性調節に関する考察<br>高橋 拓子 (埼玉大)   | 59 |
| 報告記事 The International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors<br>of Photosynthetic Organisms 2015 参加報告<br>高橋 重一 (東洋大) | 72 |
| 報告記事 若手の会活動報告～サイエンスアゴラ 2015 での出展報告～<br>浅井 智広 (立命館大)  | 73 |
| 報告記事 サイエンスアゴラ出展報告—若手研究者が伝えたい光合成の現在・過去・未来<br>辻 敬典 (関西学院大) 浅井 智広 (立命館大)  | 74 |
| 集会案内 第 24 回「光合成セミナー2016: 反応中心と色素系の多様性」の開催案内  | 76 |
| 集会案内 第 5 回 光合成研究者 OB/OG 会 2016 の開催案内   | 77 |
| 事務局からのお知らせ   | 78 |
| 日本光合成学会会員入会申込書   | 79 |
| 日本光合成学会会則  | 80 |
| 幹事会名簿  | 82 |
| 編集後記・記事募集  | 83 |
| 「光合成研究」編集委員・日本光合成学会 2016 年度役員  | 84 |
| 賛助法人会員広告   |    |

## 集会案内

第7回日本光合成学会年会および公開シンポジウム  
「光化学系の構造・理論解析から見えてきた光合成反応の妙」  
「光合成色素代謝と光化学系構築のダイナミックな関係」  
2016年5月27日（金）～28日（土）  
東京理科大学葛飾キャンパス

本年の第7回日本光合成学会年会では、2つのシンポジウムとポスター発表をおこないます。今回は、試みにポスター発表の時間枠を拡充しましたので、是非奮ってご参加ください。

日時： 2016年5月27日（金） 13:00 (12:00 受付開始) ～ 28日（土） 17:00

場所： 東京理科大学葛飾キャンパス 図書館ホールおよびホワイエ（JR常磐線（地下鉄千代田線）金町駅下車徒歩10分）

参加費： 一般（会員） 2,000円／一般（非会員） 3,000円／学生 1,000円

懇親会費： 一般 3,000円／学生 2,000円

5月27日（金）

◎ シンポジウム1 13:00-15:00

### 「光化学系の構造・理論解析から見えてきた光合成反応の妙」

オーガナイザー： 得津 隆太郎（基礎生物学研究所）、柏山 祐一郎（福井工業大学）

光合成の根幹の一つをなす光化学反応は、酸素発生型の光合成においては光化学系II（PSII）および光化学系I（PSI）と呼ばれる2つの光化学系を中心として駆動されています。これら光化学系の研究の歴史は古く、多くの研究者がその機能や構造に注目し、研究が進められてきました。その中でも近年の光化学系構造解析とそれらに基づく理論解析の発展は著しく、社会的にもインパクトの大きな成果が数多く発表されています。一方で、その研究分野は専門性が非常に高いものとなりつつもあり、研究成果の全てを完全に理解することは次第に容易ではなくなってきました。そこで本シンポジウムでは、構造解析・理論解析をリードしている若手研究者のトップランナーに、光化学系の最新の研究を紹介していただき、これまでに分かっていた光化学系の機構や機能、さらにはそれらの生い立ちについて議論できればと考えています。

1. 自由電子レーザーを用いたタンパク質結晶構造研究の利点 平田 邦生（理化学研究所RSC）
2. 高等植物の光化学系I-光捕集アンテナI超複合体におけるエネルギー伝達経路の構造基盤 菅 倫寛（岡山大学）
3. シアノバクテリアの光化学系Iとフェレドキシンの電子伝達複合体構造 河合（久保田） 寿子（基礎生物学研究所）
4. 光化学系の構造に基づく理論解析からわかること 斉藤 圭亮（東京大学）

◎ ポスター紹介（1） 15:40～16:20

◎ ポスターセッション（1） 16:20～18:00

◎ 懇親会 18:30～20:30

5月28日 (土)

◎ シンポジウム 2 9:20-12:25

## 「光合成色素代謝と光化学系構築のダイナミックな関係」

オーガナイザー： 田中 亮一（北海道大学）、柏山 祐一郎（福井工業大学）

光合成生物のもつ光合成色素は驚くほど多様です。光合成の原理はすべて共通であるのに、なぜ、光合成色素はこのように多様なのでしょうか？もちろん、光合成生物がそれぞれの光環境に適応した光合成色素をもつように進化したことは、生存戦略の上で重要です。しかし、光合成色素の多様性を考える上で、代謝経路からの制約や「光合成装置との適合」という制約が、光合成色素の進化に複雑な影響を与えたであろう点も見逃すことはできません。たとえば、光合成色素の代謝は、地球大気のアミノ酸濃度が上昇した際に大きく変化したと考えられます。また、光合成色素は光合成のさまざまな反応に関わっているだけでなく、光合成装置の構築にも重要な役割を果たしています。さらに、光合成色素のうち、とくにクロロフィルは光増感作用により毒性を有するために、厳密な代謝制御が必要であったという点も光合成色素の進化に影響を与えていると考えられます。本シンポジウムでは、光合成の進化や光合成装置と光合成色素のダイナミックな関わりについて、5人の演者に最新の研究成果を発表していただきます。

1. クロロフィルが先か、バクテリオクロロフィルが先か？～色素合成系の進化～  
塚谷 祐介（東京工業大学）
2. シアノバクテリアの低酸素適応機構と酸素依存的緑化 藤田 祐一（名古屋大学）
3. 光合成生物におけるカロテノイド合成系の進化 高市 真一（日本医科大学）
4. クロロフィル代謝による光化学系の集光アンテナの制御 伊藤 寿（北海道大学）
5. クロロフィル合成の最終反応はどこで起こるか？—ゲラニルゲラニルレダクターゼの働き—  
高橋 裕一郎（岡山大学）

◎ ポスター紹介（2） 13:30～14:10

◎ ポスターセッション（2） 14:10～15:50

◎ 総会・授賞式 16:00～17:00

◎ 閉会 17:00

ポスター発表は半数ずつを5月27日（金）と28日（土）の午後にコアタイムを設け、それぞれ口頭でのポスター紹介の時間を設けます（概ね1件1分）。また、ポスター発表希望者が例年を超えるようであれば、ポスターの張り替えを行います。

ポスターのパネルサイズは、A0相当（横幅90 cm厳守、縦方向は余裕有）です。

優秀ポスター賞を選出しますので、みなさんふるって研究成果を御発表ください。

**参加登録および発表申し込み締め切り：2016年5月6日**

日本光合成学会のウェブサイト(<http://photosyn.jp/>)からご登録ください。

学会会場へのアクセスの詳細は、<http://www.tus.ac.jp/info/access/katcamp.html>をご覧ください。

問い合わせ先：

年会企画委員長：柏山 祐一郎（福井工業大学） [chiro@fukui-ut.ac.jp](mailto:chiro@fukui-ut.ac.jp)

年会準備委員長：梶 達也（東京理科大学） [tomo@rs.tus.ac.jp](mailto:tomo@rs.tus.ac.jp)

## 研究紹介

光化学系 II Mn クラスターの光活性化反応における  $Mn^{2+}$  結合サイトの同定<sup>§</sup>名古屋大学大学院 理学研究科  
浅田 瑞枝\* 三野 広幸

光合成反応において酸素発生を担う光化学系 II の触媒部分である Mn クラスターは、光照射により自発的に形成される（光活性化）。本研究では、Mn クラスターの光活性化初期反応において、光化学系 II に結合する  $Mn^{2+}$  イオンの特異的な結合位置を特定した。パルス電子-電子二重共鳴（PELDOR）法を用いた電子スピン間の距離測定により、特異的に結合した  $Mn^{2+}$  と光化学系 II 内のチロシンラジカル  $Y_D^{\bullet}$  間の距離を 30.5 Å と得た。X 線結晶構造解析との比較により、 $Mn^{2+}$  結合サイトは Mn4 の位置であり、2つのカルボキシル基 Asp170 と Glu333 にあることを示した。

## 1. はじめに

光化学系 (PS) II は、光合成において酸素発生反応を担う。PS II は光を受けると反応中心クロロフィル P680 が励起され、電子を放出する。励起された P680 は D1 サブユニットにあるチロシン残基  $Y_Z$  を介して Mn クラスターを酸化する<sup>1)</sup>。Mn クラスターは水分子を酸化し酸素を発生する。D1、D2 サブユニットは相同性の高いアミノ酸配列をもち、D2 サブユニットには D1 サブユニットの  $Y_Z$  に対応するアミノ酸残基として  $Y_D$  が存在する。 $Y_D$  は酸素発生反応には直接関与しないが、 $Y_Z$  と同様に P680 に酸化され、安定なラジカル  $Y_D^{\bullet}$  を形成する。

Mn クラスターは 4 つの Mn、1 つの Ca、5 つの O 原子からなる。Mn クラスターの構造は長年不明であったが、2011 年に Umena らによる詳細な X 線結晶構造解析データが得られ、2015 年には X 線損傷の少ない PS II の結晶構造が解析されている (図 1)<sup>2, 3)</sup>。3 つの Mn 原子 Mn1、Mn2、Mn3 と Ca 原子は互いに酸素架橋により結合し、ひずんだ立方体を形成する。その外部に 4 つめの Mn 原子 Mn4 と 1 つの O 原子が結合する。Mn ク

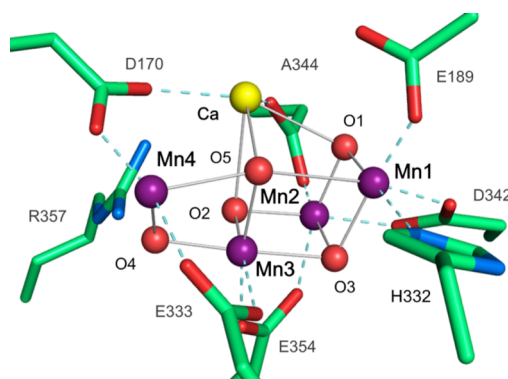


図 1. Mn クラスターの分子構造 (PDB: 4UB6)

ラスター周囲には、Mn1 に D1-His332、D1-Asp342、D1-Glu189、Mn2 に D1-Asp342、D1-Ala344、CP43-Glu354、Mn3 に D1-Glu333 と CP43-Glu354、Mn4 に D1-Glu333 と D1-Asp170、Ca に D1-Asp170 と D1-Ala344 がそれぞれ配位する<sup>3)</sup>。

Mn クラスターは不安定な触媒部分であり、強光照射や還元剤により不活性化される。Mn クラスターを除去した PS II では酸素発生活性が失われるが、Mn クラスターが除去された PS II を含む溶液に  $MnCl_2$  と  $CaCl_2$  を加え光照射すると、Mn クラスターが再構築され活性が戻る。この反応は Mn クラスターの光活性化と呼ばれ、PS II

<sup>§</sup>第 4 回日本光合成学会シンポジウム ポスター発表賞受賞論文

\*連絡先 E-mail: masada@bio.phys.nagoya-u.ac.jp



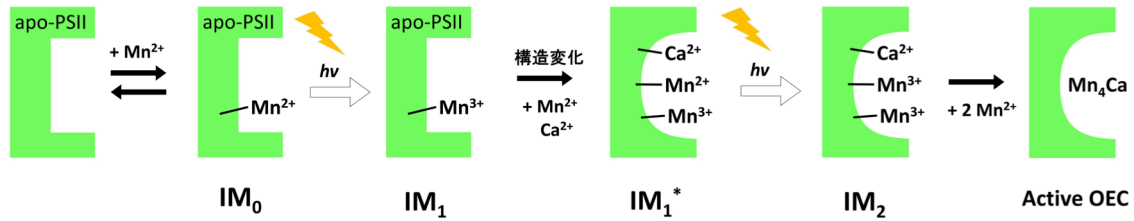


図 2. Mn クラスター光活性化の二量子モデル

形成時にも同様の反応を経て Mn クラスターが構築されると考えられている<sup>4,6)</sup>。図 2 に光活性化の二量子モデルを示す<sup>6,7)</sup>。Mn クラスターの光活性化では、まず 1 つの Mn<sup>2+</sup> が PS II に結合する (IM<sub>0</sub>)<sup>8)</sup>。PS II に結合した Mn<sup>2+</sup> は光照射により酸化され Mn<sup>3+</sup> になる (IM<sub>1</sub>)。Ca<sup>2+</sup> 存在下では構造変化が起こり、Mn<sup>2+</sup>、Mn<sup>3+</sup>、Ca<sup>2+</sup> が PS II に結合する (IM<sub>1</sub><sup>\*</sup>)。さらなる光照射により 2 つの Mn<sup>3+</sup> が結合した中間体が形成される (IM<sub>2</sub>)<sup>9)</sup>。その後さらに 2 つの Mn<sup>2+</sup> が結合し、最終的に酸素発生活性がある Mn クラスターが形成される<sup>8, 10, 11)</sup>。IM<sub>0</sub> 状態では、Mn<sup>2+</sup> が特異的に結合する親和サイトが 1 つ存在することが明らかになっているが、酸素発生系内のどの位置に Mn<sup>2+</sup> が結合し、どのように光活性化反応が進むか、詳細なメカニズムは不明である<sup>12)</sup>。

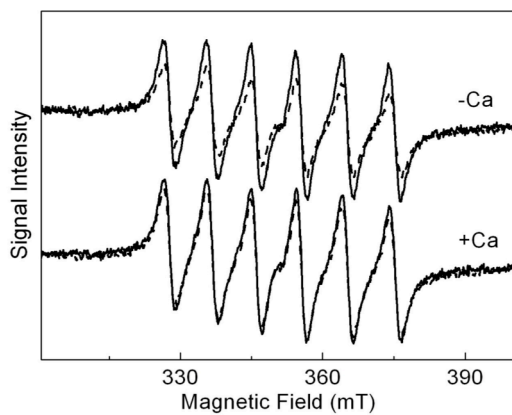


図 3. CW-ESR 測定結果

Mn クラスターを除去した PS II (1 mgChl/ml) に 20 μM MnCl<sub>2</sub> を含む緩衝液 (PS II:Mn<sup>2+</sup> = 1:4、実線) を混合し、遠心分離後の上澄み (破線) と ESR 信号強度を比較した。Ca<sup>2+</sup> を添加する測定では、同量の PS II に対し 10 mM CaCl<sub>2</sub> を混合した。

## 2. 測定手法

電子スピン共鳴 (ESR) 法は磁場中の遷移金属やラジカルの電子スピンを検出する手法であり、Mn クラスターの磁気構造の同定に利用されてきた。パルス電子-電子二重共鳴 (PELDOR) 法は、マイクロ波を短時間照射するパルス ESR 測定法を応用した手法であり、2 つの異なる周波数のマイクロ波を用いて 2 種類の電子スピン間に働く双極子相互作用を測定し、10-100Å の電子スピン間距離を精度よく決定することができる<sup>13)</sup>。PS II には、光照射により形成される安定なチロシンラジカル Y<sub>D</sub><sup>•</sup> が存在し、PELDOR 法による電子スピン間距離測定の指標として用いることができる<sup>14)</sup>。本研究では特異的な結合サイトに結合した Mn<sup>2+</sup> と Y<sub>D</sub><sup>•</sup> 間の距離測定を行うことにより、親和サイトの位置の特定を行った。

## 3. 結果と考察

Mn クラスターを還元除去したハウレンソウ由来の PS II (1 mgChl/ml) に対し PS II:Mn<sup>2+</sup> = 1:4 となるように、20 μM MnCl<sub>2</sub> を混合し PS II に Mn<sup>2+</sup> を結合させた。パルス ESR 測定では、遠心分離により濃縮した試料を用いた。図 3 は MnCl<sub>2</sub> を含む緩衝液の CW-ESR スペクトルである。6 本の ESR 信号は溶液中の Mn<sup>2+</sup> イオンに由来し、その信号強度は試料中の Mn<sup>2+</sup> 濃度に比例する。遠心分離による濃縮前の緩衝液 (図 3 実線) と、遠心分離後の上澄み (図 3 破線) に含まれる Mn<sup>2+</sup> 濃度を比較することにより、PS II に結合した Mn<sup>2+</sup> 数を定量した。MnCl<sub>2</sub> のみ加えた場合、1 つの PS II あたり 1.4 個の Mn<sup>2+</sup> が結合した。また、MnCl<sub>2</sub> の他に 10 mM CaCl<sub>2</sub> を添加すると、1 つの PS II あたり 0.4 個の Mn<sup>2+</sup> が結合することがわかった。Mn クラスターを除去した PS II には、Mn<sup>2+</sup> が特

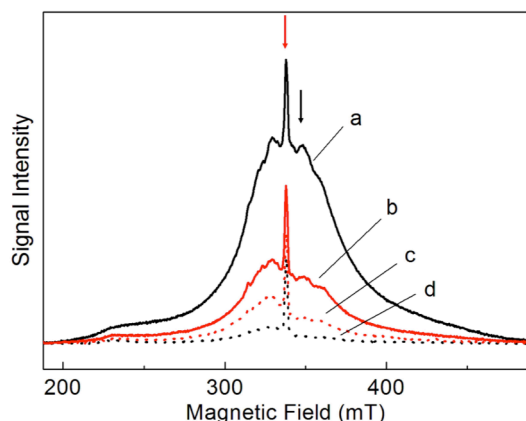


図 4. パルス ESR 法を用いた ESE 磁場掃引スペクトル

1 mgChl/ml の PS II に 20  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  を混合し、遠心分離後の沈殿を測定した。(a, d)は  $\text{Ca}^{2+}$  を含まない PS II、(b, c)は 10 mM  $\text{CaCl}_2$  を混合した PS II を用いた。(a, b)は暗状態、(c, d)は 0°C で光照射後に測定を行った。PELDOR 測定では、 $\text{Mn}^{2+}$  と共鳴する周波数を観測周波数、 $\text{Y}_D^{\bullet}$  と共鳴する周波数を励起周波数として用いた (矢印)。

異的に強く結合するサイトと、 $\text{Ca}^{2+}$  により阻害される  $\text{Mn}^{2+}$  の非特異的な結合サイトが存在することを確認できた<sup>6, 12, 15)</sup>。

$\text{Mn}^{2+}$  が結合した PS II のパルス ESR 磁場掃引スペクトルを図 4 に示す。 $g = 2$  を中心とする  $\text{Y}_D^{\bullet}$  の信号と、幅 60 mT の範囲に広がる  $\text{Mn}^{2+}$  の信号が観測された。 $\text{Mn}^{2+}$  の信号強度は、273 K で 3 分間の光照射により減少した (図 4 c, d)。このことから、光照射により Mn クラスター内の親和サイトに結合した  $\text{Mn}^{2+}$  が酸化され  $\text{Mn}^{3+}$  になったことが予想される。 $\text{Ca}^{2+}$  非存在下 (図 4 a, d) では、試料に含まれる  $\text{Mn}^{2+}$  のほとんどが光照射により酸化される。PELDOR 測定では  $\text{Mn}^{2+}$  イオンを観測し  $\text{Y}_D^{\bullet}$  を励起するため、図の矢印の位置でそれぞれ共鳴するマイクロ波周波数を用いた。

PS II の  $\text{Y}_D^{\bullet}$ - $\text{Mn}^{2+}$  間の PELDOR 測定結果を図 5 に示す。 $\text{Ca}^{2+}$  非存在下 (a)、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下 (b, c) で同じ周期の PELDOR 信号を観測した。PELDOR 信号は  $\cos$  型の関数となり、その周期は距離の 3 乗に比例する。周期から  $\text{Mn}^{2+}$ - $\text{Y}_D^{\bullet}$  間距離は  $30.5 \pm 1.6$  Å であることがわかった。 $\text{Ca}^{2+}$  存在、非存在下で PELDOR 信号の周期が同じであることから、距離 30.5 Å を示す信号は親和サイトに結合した

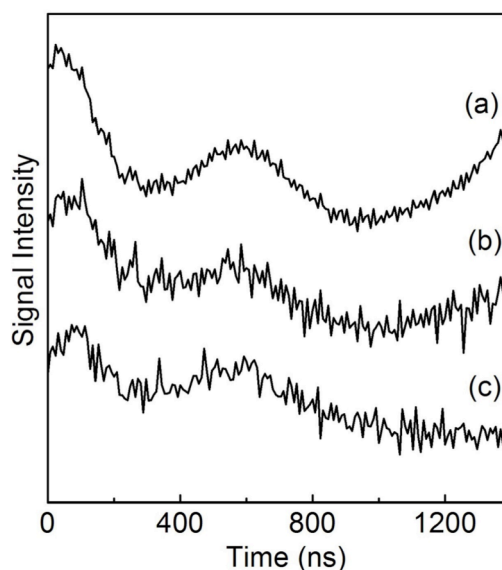


図 5.  $\text{Y}_D^{\bullet}$ - $\text{Mn}^{2+}$  間の PELDOR 測定結果

Mn クラスター除去 PS II に  $\text{MnCl}_2$  を混合し、遠心分離後の沈殿を凍結、暗状態で測定した。それぞれ、1 mgChl/ml PS II に対し (a) 20  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  を混合、(b) 40  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ 、10 mM  $\text{CaCl}_2$  を混合、(c) 20  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  と 10 mM  $\text{CaCl}_2$  を混合した。

$\text{Mn}^{2+}$  由来であると裏付けられた。距離の分布が小さいことから、親和サイトに結合した  $\text{Mn}^{2+}$  は周囲のアミノ酸残基に強く結合し、位置が固定されていると予想される。 $\text{Ca}^{2+}$  存在下で 40  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  (PS II: $\text{Mn}^{2+} = 1:8$ ) を加えた試料 (b) では、(c) の信号と比較して PELDOR 信号の振幅が大きくなり、結合する  $\text{Mn}^{2+}$  数が増加したことによると考えられる。(c) は  $\text{Mn}^{2+}$  の親和サイトが  $\text{Ca}^{2+}$  の結合と競合し、親和サイトに結合する  $\text{Mn}^{2+}$  数が減少したと考えられる<sup>6, 7)</sup>。

酸素発生系内の  $\text{Mn}^{2+}$  の親和サイト候補となる金属原子位置と  $\text{Y}_D^{\bullet}$  の原子位置、 $\text{Y}_D^{\bullet}$  の電子密度分布を用いて PELDOR 信号を計算した (図 6)。Mn クラスターの各金属イオン位置に  $\text{Mn}^{2+}$  があると仮定し (b-f)、計算を行ってみると Mn4 の原子位置に  $\text{Mn}^{2+}$  が結合すると仮定した場合 (c) のみ、信号の周期が実験値 (a) と一致した。しかし、実際の PS II は Mn クラスターが除去されているため、酸素発生系のアミノ酸残基の向きが任意の向きを向いている可能性があり、完成形の Mn クラスターの金属イオンと同じ位置に  $\text{Mn}^{2+}$  イオンが結

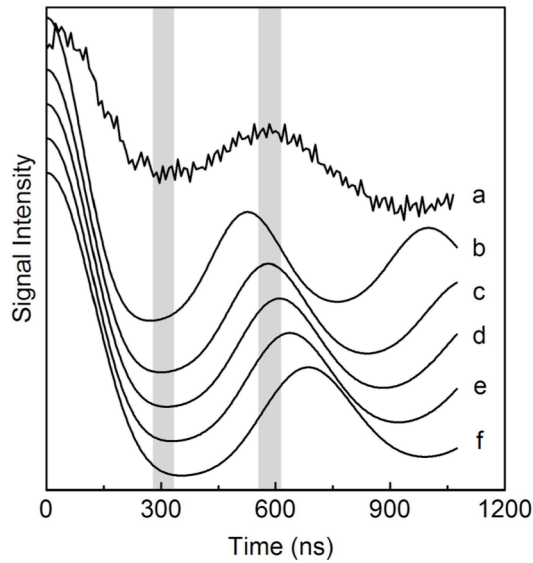


図 6.  $Y_D^{\bullet}$ - $Mn^{2+}$ 間の PELDOR 測定結果と各 Mn 原子位置を仮定した PELDOR 信号の計算結果 (a)は実験値、(b-f)は各 Mn 原子位置(b: Mn1, c: Mn4, d: Ca, e: Mn3, f: Mn2)を仮定した。

合するとは限らない。そのため、酸素発生系近傍の任意の座標に範囲を拡張し、PELDOR 信号が実験値と一致する点を探った。図 7 の灰色の点は実験値と一致する PELDOR 信号が得られる座標で、 $Y_D^{\bullet}$ を中心として Mn4 を通過する球面上に分布した。

PELDOR 測定の結果、 $Mn^{2+}$ - $Y_D^{\bullet}$ 間距離の分布が小さいことから、 $Mn^{2+}$ は周囲のアミノ酸残基により固定されると考えられる。2つのアミノ酸残基 Asp170 と Glu333 が対角に配位する Mn4 の位置は、1つのアミノ酸残基しか配位しない他の位置に比べて強く結合位置が固定されると考えられる。

変異体を用いた研究から、Asp170 を His と Glu 以外の残基に変異体導入した PS II は、Mn 除去 PS II の光活性化の過程で  $Mn^{2+}$ が PS II に結合しないことがわかっている<sup>16)</sup>。また、Asp170His、Asp170Glu 変異により、照射により形成される  $IM_1$  状態の  $Mn^{3+}$ 周辺構造が大きく変化することが明らかになっている<sup>17)</sup>。これらの結果から、Asp170 は  $Mn^{2+}$ の親和サイトに直接配位すると考えられており、本研究で得られた PELDOR 結果と矛盾しない。

以上の結果から、光活性化反応過程の  $IM_0$  状態

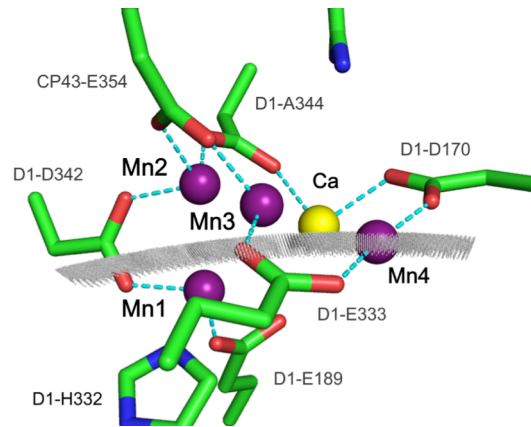


図 7. 酸素発生系近傍の  $Mn^{2+}$ の親和サイト候補位置

PELDOR 信号周期の正のピークが  $\tau = 575\text{-}595$  ns、負のピークが  $\tau = 290\text{-}320$  ns となる  $Mn^{2+}$ の座標を、X 線結晶構造(PDB: 4UB6)に重ねてプロットした。

では、1つの  $Mn^{2+}$ イオンが Asp170 と Glu333 の間にある親和サイトに結合し、2つのカルボキシル基の C=O 部分の向きを決定すると考えられる。この  $Mn^{2+}$ イオンは照射により  $Mn^{3+}$ に酸化され次の中間状態  $IM_1$  を形成し、Mn クラスターの原型になると考えられる。Asp170 に Glu を変異導入した PS II では  $IM_1$  状態における  $Mn^{3+}$ の ESR 信号が観測されず、 $Mn^{3+}$ が Asp170Glu に配位しない可能性がある<sup>17)</sup>。しかし Asp170Glu 変異体では Mn クラスターの光活性化が阻害されず、酸素発生活性を得ることができる<sup>16)</sup>。光活性化の過程で  $Mn^{3+}$ の結合サイトが別の位置に移動する可能性は否定できないため、さらなる中間構造の解析が必要である。

#### 4. おわりに

PS II の Mn クラスター光活性化反応において、 $Mn^{2+}$ が 1 つずつ酸素発生系に結合することがこれまで分かっていたが、結合サイトの位置は不明であった。本研究では、Mn クラスター光活性化反応過程における  $Mn^{2+}$ の親和サイトと  $Y_D^{\bullet}$ 間の距離を、PELDOR 法を用いて 30.5 Å と決定した。 $Mn^{2+}$ の親和サイトの位置は Mn4 の位置であることが示された。今後、Mn クラスター形成過程のより詳細なメカニズムの解明が期待される。

## 謝辞

本稿執筆の機会を与えてくださった日本光合成学会ならびに編集委員の方々に御礼申し上げます。

Received March 3, 2016; Accepted March 17, 2016;

Published April 30, 2016

## 参考文献

- Vinyard, D.J., Ananyev, G.M., and Dismukes, G.C. (2013) Photosystem II: The reaction center of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 577–606.
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.R., and Kamiya, N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* 473, 55–60.
- Suga, M., Akita, F., Hirata, K., Ueno, G., Murakami, H., Nakajima, Y., Shimizu, T., Yamashita, K., Yamamoto, M., Ago, H., and Shen, J.R. (2015) Native structure of photosystem II at 1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses. *Nature* 517, 99–103.
- Radmer, R. and Chéniaie, G.M. (1971) Photoactivation of manganese catalyst of O<sub>2</sub> evolution. 2. 2-quantum mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 253, 182–186.
- Tamura, N. and Chéniaie, G.M. (1986) Requirements for the photoligation of Mn<sup>2+</sup> in PS II membranes and the expression of water-oxidizing activity of the polynuclear Mn-catalyst. *FEBS Lett.* 200, 231–236.
- Tamura, N. and Chéniaie, G. (1987) Photoactivation of the water-oxidizing complex in photosystem II membranes depleted of Mn and extrinsic proteins. I. Biochemical and kinetic characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 890, 179–194.
- Miller, A.F. and Brudvig, G.W. (1989) Manganese and calcium requirements for reconstitution of oxygen-evolution activity in manganese-depleted photosystem II membranes. *Biochemistry* 28, 8181–8190.
- Dasgupta, J., Ananyev, G.M., and Dismukes, G.C. (2008) Photoassembly of the water-oxidizing complex in photosystem II. *Coordin. Chem. Rev.* 252, 347–360.
- Barra, M., Haumann, M., Loja, P., Krivanek, R., Grundmeier, A., and Dau, H. (2006) Intermediates in assembly by photoactivation after thermally accelerated disassembly of the manganese complex of photosynthetic water oxidation. *Biochemistry* 45, 14523–14532.
- Ono, T. (2001) Metallo-radical hypothesis for photoassembly of (Mn)<sub>4</sub>-cluster of photosynthetic oxygen evolving complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1503, 40–51.
- Becker, K., Cormann, K.U., and Nowaczyk, M.M. (2011) Assembly of the water-oxidizing complex in photosystem II. *J. Photoch. Photobio. B.* 104, 204–211.
- Ono, T. and Mino, H. (1999) Unique binding site for Mn<sup>2+</sup> ion responsible for reducing an oxidized Y<sub>Z</sub> tyrosine in manganese-depleted photosystem II membranes. *Biochemistry* 38, 8778–8785.
- Jeschke, G. (2012) DEER distance measurements on proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 63, 419–446.
- Asada, M., Nagashima, H., Koua, F.H.M., Shen, J.R., Kawamori, A., and Mino, H. (2013) Electronic structure of S<sub>2</sub> state of the oxygen-evolving complex of photosystem II studied by PELDOR. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 438–445.
- Booth, P.J., Rutherford, A.W., and Boussac, A. (1996) Location of the calcium binding site in Photosystem II: A Mn<sup>2+</sup> substitution study. *Biochim. Biophys. Acta* 1277, 127–134.
- Nixon, P.J. and Diner, B.A. (1992) Aspartate-170 of the photosystem-II reaction center polypeptide D1 is involved in the assembly of the oxygen-evolving manganese cluster. *Biochemistry* 31, 942–948.
- Campbell, K.A., Force, D.A., Nixon, P.J., Dole, F., Diner, B.A., and Britt, R.D. (2000) Dual-mode EPR detects the initial intermediate in photoassembly of the photosystem II Mn cluster: The influence of amino acid residue 170 of the D1 polypeptide on Mn coordination. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 3754–3761.

Position of the High-Affinity  $Mn^{2+}$  Site of the Oxygen-Evolving Complex in Photosystem II  
Revealed by PELDOR

Mizue Asada\* and Hiroyuki Mino

Graduate School of Science, Nagoya University

## 解説

光合成と O<sub>2</sub> の研究から見えてきた、  
新たな電子伝達制御メカニズムの存在

神戸大学 大学院 農学研究科

釋 啓一郎 三宅 親弘\*

光合成電子伝達反応において、光化学系 I からの電子によって O<sub>2</sub> を還元するメーラー反応は、 $\Delta\text{pH}$  を形成することで CO<sub>2</sub> 固定能を維持しているとされてきた。しかしながら、その仮説を *in vivo* で実証したデータは示されてこなかった。その原因は高等植物におけるメーラー反応の活性が直線的電子伝達反応に比べて小さく、ATP 供給が行えていないためであると考えられた。一方、シアノバクテリアでは、Flavodiiron protein (FLV) を介したメーラー反応が高い活性を示すことが報告された。そして *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (S. 7942) の FLV1/3 の欠損株において、光合成の O<sub>2</sub> 発生速度が低下することが判明した。解析の結果、FLV によるメーラー反応もまた ATP 供給に寄与せず、エレクトロンシンクとして直線的電子伝達反応の活性維持に関わることが示唆された。本稿では光合成に対する O<sub>2</sub> の必要性に関して従来の説をまとめ、*in vivo* で初めて示された S. 7942 での実証例と、そこから見えてきた新たな電子伝達制御機構について紹介する。

## 1. はじめに

光合成では光によってチラコイド膜上の光化学系 II (PSII) の反応中心である P680 と光化学系 I (PSI) の反応中心である P700 が酸化され、電子が放出されることで電子伝達反応が駆動する。PSII では H<sub>2</sub>O が酸化され O<sub>2</sub> が生じるとともに P680 が還元再生される。P680 から放出された電子はプラストキノン (PQ)、シトクロム (Cyt) *b<sub>6</sub>/f* 複合体、プラストシアニン (PC) を経て酸化型 P700 へ流れる。P700 から放出された電子はフェレドキシン (Fd) を経て Fd-NADPH レダクターゼにより NADP<sup>+</sup> へ流れ NADPH が生成する。この H<sub>2</sub>O から NADPH への電子の流れを直線的電子伝達反応 (Linear electron flow; LEF) と呼ぶ。LEF に伴って H<sup>+</sup> がストロマ側からチラコイド膜の内腔へと輸送され、チラコイド膜を介して  $\Delta\text{pH}$  が形成される。この  $\Delta\text{pH}$  を駆動力として ATPase が ADP から ATP を生成する。これら ATP や NADPH はカルビン回路での CO<sub>2</sub> 固定反応に利用

される。

しかし電子伝達反応において電子は常に NADP<sup>+</sup> へと流れるとは限らない。1951 年 Mehler によって PSI から O<sub>2</sub> へと電子が渡ることが明らかとなった (メーラー反応)<sup>1)</sup>。光合成電子伝達鎖から O<sub>2</sub> へと電子が流れると O<sub>2</sub><sup>-</sup> が生じる<sup>2)</sup>。O<sub>2</sub><sup>-</sup> はストロマに存在するスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) により O<sub>2</sub> と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に不均化される<sup>2)</sup>。こうして生じた O<sub>2</sub> や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) と呼ばれ、タンパク質や脂質にダメージを与える<sup>3)</sup>。そのため O<sub>2</sub> は光合成にとって有害であると考えられてきた。

一方で Mehler の発見は O<sub>2</sub> が光合成電子伝達反応における電子の受容体となることを示唆している。つまり LEF とは別に葉緑体において O<sub>2</sub> に電子が流れる電子伝達反応が駆動していることを意味している。そしてこれまでの光合成研究において、O<sub>2</sub> に電子が流れることによって駆動される電子伝達反応に対して様々な生理学的意義づけがなされてきた<sup>4)</sup>。その 1 つが、O<sub>2</sub> への電子の流れは  $\Delta\text{pH}$  を形成してカルビン回路における

\*連絡先 E-mail: cmiyake@hawk.kobe-u.ac.jp



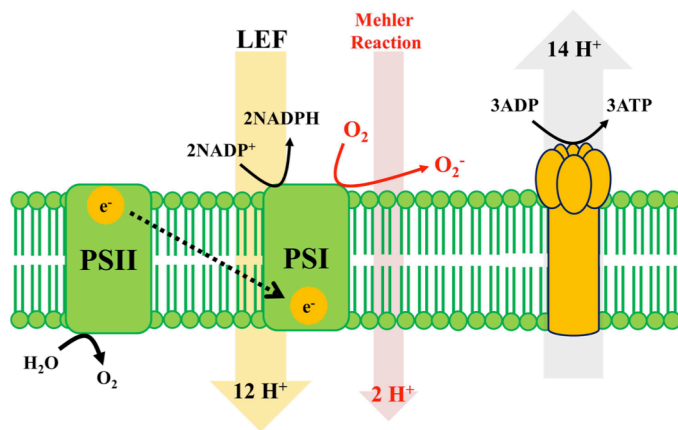


図 1. メーラー反応による ATP 供給仮説

カルビン回路が 1 分子の  $\text{CO}_2$  を固定するのに 3 分子の ATP と 2 分子の NADPH を必要とする。LEF において 2 分子の NADPH を生成する時、12 分子の  $\text{H}^+$  が輸送される。しかし ATPase において 3 分子の ATP を生成するには 2 分子の  $\text{H}^+$  が不足する<sup>10)</sup>。メーラー反応が生じ WWC が駆動することで不足した 2 分子の  $\text{H}^+$  を輸送し ATP を供給することで光合成が維持されていると考えられている。しかしながら *in vivo* における証明はなかった。

ATP 要求を満たし、 $\text{CO}_2$  固定活性を維持しているという仮説である。しかしながら、これまでの  $\text{O}_2$  と光合成の研究を通して *in vivo* においてこの仮説を示したデータは報告されていない。我々は最近、 $\text{O}_2$  への電子の流れが ATP 供給を補うという従来の説とは異なり、 $\text{O}_2$  依存的電子伝達反応はエレクトロンシンクとして LEF 活性自体を維持していることをシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (S. 7942) を用いて実証した<sup>5)</sup>。LEF は  $\text{CO}_2$  固定のための ATP や NADPH を供給することから、光合成において  $\text{O}_2$  が LEF 活性を制御することで  $\text{CO}_2$  固定能を維持している可能性があり、光合成における  $\text{O}_2$  の重要性を再考する必要があると考えた。そこで本総説においては、これまでのメーラー反応による ATP 供給とカルビン回路における  $\text{CO}_2$  固定反応の維持に関する知見をまとめ、我々のシアノバクテリア S. 7942 を用いた  $\text{O}_2$  が LEF を制御している実証データを紹介した後、そこから見えてきた新たな電子伝達制御メカニズムについて議論する<sup>5)</sup>。

## 2. 電子受容体としての $\text{O}_2$ の生理学的意義

光合成生物において、電子受容体としての  $\text{O}_2$  には様々な生理学的意義が考えられている。1 つ目にエレクトロンシンク能としての機能である<sup>4)</sup>。上記の通り  $\text{O}_2$  は電子伝達鎖から電子を受け取ることによって  $\text{O}_2^-$  になり、 $\text{O}_2^-$  はチラコイド膜上のスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) によ

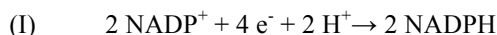
り速やかに  $\text{H}_2\text{O}_2$  と  $\text{O}_2$  に不均化される。そして生成した  $\text{H}_2\text{O}_2$  をストロマやチラコイド膜上に存在するアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) がアスコルビン酸を電子供与体として  $\text{H}_2\text{O}$  へと還元する。アスコルビン酸は光合成電子伝達鎖から還元力を受け取ることで還元型に再生される。この反応は Water-Water-Cycle (WWC) と呼ばれる<sup>2)</sup>。 $\text{O}_2$  が電子を受け取り、 $\text{O}_2^-$  や  $\text{H}_2\text{O}_2$  といった ROS をいったん生成することで SOD や APX といった ROS 代謝機構を駆動する。ROS 代謝機構はその過程で電子伝達鎖から還元力を受け取る。実際に Schreiber and Neubauer は、単離葉緑体において嫌気条件では電子伝達活性が測定されないが、 $\text{O}_2$  存在下では電子伝達活性が上昇することを報告している<sup>6)</sup>。また Miyake and Yokota は、 $\text{CO}_2$  固定速度とクロロフィル蛍光測定における PSII の実効量子収率の同時測定から、生体内でメーラー反応により  $\text{O}_2$  が還元されている可能性を示唆した<sup>7)</sup>。これらの事実から  $\text{O}_2$  はエレクトロンシンクとして電子伝達鎖を酸化していると考えられる。

2 つ目に  $\Delta\text{pH}$  形成による非光化学的消光 (non-photochemical quenching; NPQ) の誘導である<sup>4)</sup>。 $\text{O}_2$  に電子が流れ、さらに WWC が駆動されることによって  $\text{H}^+$  の取り込みが促進され  $\Delta\text{pH}$  が形成される。 $\Delta\text{pH}$  が形成されると NPQ が誘導される。NPQ は過剰なエネルギーを熱として散逸する機構であり、電子伝達鎖が過還元状態になるのを防いでいるとされる<sup>8)</sup>。ハウレンソウの単離

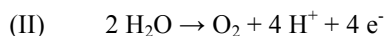
葉緑体を用いた実験において O<sub>2</sub> 存在下ではクロロフィル蛍光の消光が誘導されるが、嫌気条件ではそれが起こらない<sup>6)</sup>。またタバコの生葉において高温処理によって WWC の活性を低下させると NPQ の誘導が阻害されることが報告されている<sup>8)</sup>。これらのことから O<sub>2</sub> への電子伝達は、ΔpH を形成し NPQ を誘導して電子伝達鎖の過還元化を防いでいると考えられている。

3 つ目は、O<sub>2</sub> に電子が流れることで駆動する電子伝達反応によって不足する ATP を供給し、カルビン回路における CO<sub>2</sub> 固定能の維持を行っているというものである。光合成は電子伝達反応における化学エネルギーの供給とカルビン回路における CO<sub>2</sub> 固定反応での化学エネルギーの消費のバランスが釣り合うことで継続的に駆動することが出来る。しかし LEF により供給される ATP、NADPH とカルビン回路により消費される ATP、NADPH のストイキオメトリを考慮すると、LEF のみが駆動していると NADPH に対して ATP が不足することが予測される<sup>10,11)</sup> (図 1)。

カルビン回路が 1 分子の CO<sub>2</sub> を固定するのに使用する ATP と NADPH は、それぞれ 3 分子と 2 分子である<sup>11)</sup>。一方で LEF によって 2 分子の NADPH を生成するには 4 電子を必要とする (I)。



そのためには PSII においては 2 分子の H<sub>2</sub>O が酸化され、4 分子の H<sup>+</sup> が輸送される必要がある (II)。



Cyt *b<sub>6</sub>/f* 複合体において Q サイクルが駆動すると電子に対して 2 倍の H<sup>+</sup> が輸送されるため、さらに 8 分子の H<sup>+</sup> が輸送される<sup>12)</sup>。その結果として LEF では 12H<sup>+</sup> が輸送されることとなる。一方で葉緑体における ATP 合成を担う ATPase は、3 分子の ATP を合成するために 14 分子の H<sup>+</sup> を必要とする<sup>10)</sup>。つまり LEF のみではカルビン回路における ATP 要求を満たすことが出来ない。そのため O<sub>2</sub> が電子受容体となり電子伝達反応を駆動することで ΔpH を形成し、カルビン回路を継続

的に駆動することを可能にしていると考えられている。ATP がカルビン回路の律速になっているとすると、ΔpH が形成されることで CO<sub>2</sub> 固定反応が促進され、結果として LEF が促進されることから O<sub>2</sub> 発生速度も上昇すると考えられる。実際に *in vitro* における実験ではこの仮説を支持するデータが得られている。Takagi 等はホウレンソウの無傷葉緑体を用いて好気条件と嫌気条件における ΔpH の形成能を評価した<sup>13)</sup>。その結果好気条件では嫌気条件に比べて O<sub>2</sub> に電子が流れている分 ΔpH が形成され、3-ホスホグリセリン酸依存的な O<sub>2</sub> 発生速度が上昇していることを示している<sup>13)</sup>。しかしながら現在まで、*in vivo* において O<sub>2</sub> による ΔpH 形成が CO<sub>2</sub> 固定能や O<sub>2</sub> 発生速度に影響を与えているといった報告はなく、仮説は実証されていない。

### 3. 高等植物での *in vivo* におけるメーラー反応の活性

高等植物の *in vivo* において O<sub>2</sub> 依存的な電子伝達反応が ΔpH を形成し、カルビン回路での CO<sub>2</sub> 固定能維持に貢献しているのであろうか。そのことを考える上で、メーラー反応が *in vivo* において ATP を供給するだけの活性があるのかということ踏まえる必要がある<sup>14)</sup>。Kramer and Evans によると光合成定常状態において光呼吸を含めない CO<sub>2</sub> 固定反応のみが生じている状況におけるストイキオメトリを考えると LEF ではカルビン回路が要求する ATP の 86% しか供給出来ない<sup>15)</sup>。O<sub>2</sub> 依存的電子伝達活性が定常状態における光合成能を維持しているのであれば、残りの 14% の ATP を供給する必要がある。即ち、O<sub>2</sub> 依存的な電子伝達活性は少なくとも LEF の約 14% の活性を示すことが必要となる。O<sub>2</sub> 依存的電子伝達反応の主要経路として知られている WWC の律速反応が PSI におけるメーラー反応であることを考慮すると、メーラー反応が LEF の 14% の活性を持つ必要がある<sup>16)</sup>。しかし生葉におけるメーラー反応の活性は非常に低いとされている<sup>17)</sup>。Ruuska 等はタバコの生葉を用いてメーラー反応を測定したところ、高 CO<sub>2</sub> 濃度下の光呼吸が阻害される環境下において光に依存



した  $O_2$  吸収はほとんど見られないと報告している<sup>18)</sup>。また Driever and Baker はサヤインゲンの生葉を用いてメーラー反応を測定している<sup>19)</sup>。6,000  $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ 、3%  $O_2$  環境という光呼吸を抑制した環境下で  $^{18}O_2$  を用いてメーラー反応を測定したところ、ほとんどその活性を見ることが出来なかった<sup>19)</sup>。一方、Shirao 等は多種の被子植物や裸子植物を用いて光に依存した  $^{18}O_2$  吸収を測定することでメーラー反応を測定した<sup>20)</sup>。その値は LEF による  $O_2$  発生速度に対して裸子植物で 7~13%であったが被子植物においては 2%未満という低い値を示した<sup>20)</sup>。従って被子植物の *in vivo* におけるメーラー反応の活性は、定常状態の光合成においてほとんど検出されない程度と考えられ、 $\Delta\text{pH}$  形成に大きな影響を与えている可能性は低い<sup>17)</sup>。よって多くの高等植物において  $O_2$  に電子を流すことは  $\Delta\text{pH}$  形成に直接関与しておらず、*in vivo* における  $\text{CO}_2$  固定能に対して影響を及ぼしていないと考えられる。一方で裸子植物の中にはメーラー反応の活性が高く  $\Delta\text{pH}$  形成に部分的に貢献している可能性もあり、その点に関してはさらに検証が必要である。

#### 4. *in vivo* における循環的電子伝達反応 (Cyclic electron flow around PSI, CEF-I) の活性

メーラー反応と同様に CEF-I も  $\Delta\text{pH}$  形成に寄与していると考えられている<sup>4)</sup>。CEF-I は主に NAD(P)H デヒドロゲナーゼ複合体 (NDH) 依存的 CEF-I と PGR-5 依存的 CEF-I の 2 つが知られている<sup>21)</sup>。NDH 依存的 CEF-I における電子供与体は諸説ありまだ確定していないが<sup>21)</sup>、ストロマ側の電子供与体から電子を受け取り、PQ を還元することで  $\Delta\text{pH}$  形成に寄与している<sup>21)</sup>。野生株においては励起光照射の消灯直後にクロロフィル蛍光の一過的上昇がみられるが、NDH 複合体の活性を阻害した変異体においてはそれが認められない<sup>22)</sup>。そのことからこのクロロフィル蛍光の一過的上昇は、NDH 依存的 CEF-I による PQ プールの還元が観測されていると考えられている<sup>22)</sup>。このクロロフィル蛍光の上昇速度から見積もった NDH 依存的 CEF-I 活性は、 $1 \text{ s}^{-1}$  であることが明らかとなっている<sup>22)</sup>。1 秒間に PSI がど

れだけ酸化還元のターンオーバーを行っているかを  $\text{s}^{-1}$  は示している<sup>14)</sup>。高等植物における LEF 活性が 200~300  $\text{s}^{-1}$  程度であることから、NDH 依存的 CEF-I 活性は LEF 活性の 0.5%程度であることが予想される<sup>14)</sup>。また Shimakawa 等はシアノバクテリアを用いて NDH 依存的 CEF-I の活性を見積もっている<sup>23)</sup>。遠赤色光を 10 秒照射し、その後飽和パルス光を 300 ミリ秒照射した後の P700<sup>+</sup> の半減期から 1 秒間における PSI の酸化還元のターンオーバーを見積もったところ、DCMU 添加条件で測定された PSI の酸化還元のターンオーバー数は呼吸による PSI の酸化還元によるターンオーバー数に一致しており、NDH 依存的 CEF-I の活性は LEF における PSI 活性に比べて非常に小さいことが示唆された<sup>23)</sup>。この結果よりシアノバクテリアにおける NDH 依存的 CEF-I の活性は LEF に対して無視できるほど小さいと考えられた<sup>23)</sup>。これら高等植物とシアノバクテリアにおける知見から、NDH 依存的 CEF-I 活性は  $\Delta\text{pH}$  形成に寄与していないことが推定される。

一方、PGR5 は Fd を電子供与体とし、PQ プールを還元しているとされている<sup>22)</sup>。*in vitro* において単離チラコイド膜に還元型 Fd と PGR5 タンパク質を添加することで、クロロフィル蛍光の増加が観測される<sup>22)</sup>。これは PGR5 が Fd を電子供与体として PQ プールの還元が生じたために観測されると考えられている。しかし、この PGR5 による PQ プールの還元の *in vitro* における活性の速度は  $0.035 \text{ s}^{-1}$  であり、NDH 依存的 CEF-I よりもさらに遅いことが明らかとなっている<sup>24)</sup>。また近年 PGR5 は PQ プールではなく、PSII を還元している可能性も示唆されており、PGR5 が CEF-I の制御に寄与し、 $\Delta\text{pH}$  を形成している可能性は低いと我々は考えている<sup>24)</sup>。

以上の知見は、CEF-I の両経路の活性は全体として非常に低いことを示唆しており、それらが  $\Delta\text{pH}$  形成に寄与しているとは考えにくい。一方で分子メカニズムは明らかではないものの、LEF 活性に匹敵する CEF-I 活性が光合成の定常状態において検出されている<sup>14)</sup>。しかしながらこれらの CEF-I 活性が  $\Delta\text{pH}$  形成に寄与していることは *in vivo* において示されておらず、仮に  $\Delta\text{pH}$  を

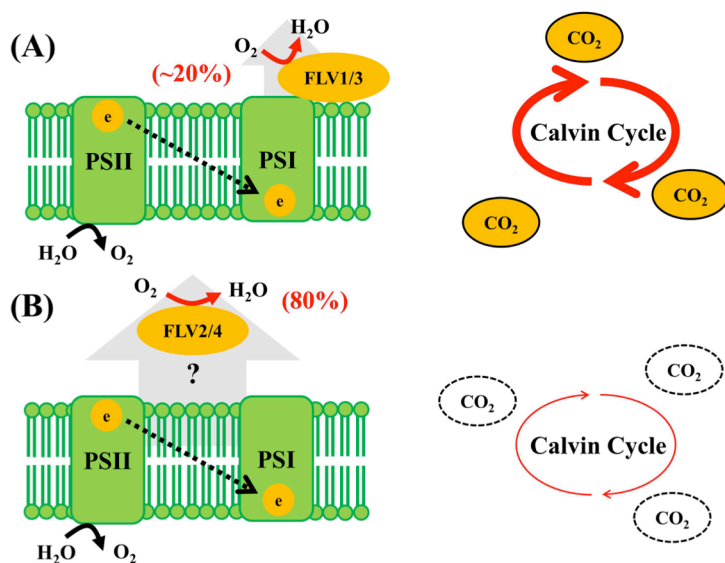


図 2. *S. 6803* の光合成電子伝達鎖における FLV の役割

(A) CO<sub>2</sub> 飽和下においては FLV1/3 が PSI においてメーラー様反応を駆動し、H<sub>2</sub>O を O<sub>2</sub> に直接還元している<sup>29,30</sup>。光合成定常状態における活性は LEF の~20%程度とされる<sup>25,26</sup>。(B) CO<sub>2</sub> 枯渇下においては FLV2/4 が O<sub>2</sub> を H<sub>2</sub>O に還元してメーラー様反応を行っている<sup>32</sup>。その活性は LEF の約 80%と高い活性を示す<sup>30,32</sup>。FLV2/4 は PSII 以降から電子を受け取っている可能性が高いが、詳細は明らかではない<sup>32,33</sup>。

形成しているとしてもいくつかの矛盾が生じる (詳しくは Takagi and Miyake, 2015 を参照されたい)<sup>14</sup>。

### 5. シアノバクテリアにおけるメーラー反応とその生理学的意義

高等植物の葉緑体の祖先と考えられているシアノバクテリアにおけるメーラー反応の活性はどの程度であろうか。 *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*S. 6803*) において<sup>18</sup>O<sub>2</sub>を用いて暗順応させた細胞に光照射を行った際の O<sub>2</sub> 吸収速度が測定されている<sup>25</sup>。光照射直後というカルビン回路が活性化していない状態、つまりメーラー反応が最大活性を示すと考えられる条件における速度は LEF の 15-30%であることが示されている。また同様の手法により 500 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> の光照射を 5 分間行い、カルビン回路が活性化している状態における O<sub>2</sub> 吸収速度を測定したところ LEF の~20%程度の活性が認められた<sup>26</sup>。このようにシアノバクテリアのメーラー反応活性は高等植物に比べて非常に高いことが知られている<sup>17</sup>。そして Helman 等によってこの O<sub>2</sub> 吸収を担う分子の実体が Flavodiiron protein (FLV) のヘテロダイマーであることが明らかとされた<sup>25</sup>。*S. 6803* においては、FLV は FLV1, 2, 3 と 4 種があり、1/3 と 2/4 がペアとなりダイマーとして機能する<sup>25,27</sup>。FLV は NADPH を電子供与体とし、O<sub>2</sub> を H<sub>2</sub>O に

4 電子還元するメーラー様反応を触媒している<sup>28</sup>。その中で FLV1/3 は CO<sub>2</sub> 飽和時において PSI で O<sub>2</sub> を還元し変動光下や光合成誘導期に電子伝達鎖を酸化していると考えられている<sup>29,30</sup>。

一方、*S. 6803* においてクロロフィル蛍光と O<sub>2</sub> 発生速度を同時にモニターすることで、CO<sub>2</sub> 枯渇時に FLV1/3 とは異なる O<sub>2</sub> 吸収が生じていることが報告された<sup>30</sup>。大気と平衡状態にある *S. 6803* は、光照射後数十分は CO<sub>2</sub> 濃縮機構によって CO<sub>2</sub> を高濃度に細胞内に溜め込み、電子伝達活性が高い<sup>31</sup>。Hayashi 等は、さらに光照射を続けることで反応溶液中の CO<sub>2</sub> を消費し尽くし、CO<sub>2</sub> 枯渇状態に陥ることを観測した。その際、*S. 6803* は CO<sub>2</sub> 枯渇下で O<sub>2</sub> を還元し、LEF の 80% の電子伝達活性を維持していることを見出した<sup>30</sup>。変異体を用いた解析を行ったところ、FLV2 と FLV4 の欠損変異株において CO<sub>2</sub> 枯渇下の O<sub>2</sub> 吸収が見られなかった<sup>32</sup>。このことから FLV2 と FLV4 が CO<sub>2</sub> 枯渇状態における O<sub>2</sub> 還元を行う分子の実体であることが明らかとなった<sup>30,32</sup>。FLV2/4 も NAD(P)H を電子供与体とし、O<sub>2</sub> を H<sub>2</sub>O に 4 電子還元しており、高 CO<sub>2</sub> 条件から大気条件に移行することで速やかに転写、発現が誘導される<sup>27,28</sup>。大気条件の FLV2/4 欠損株において DBMIB 添加時におけるクロロフィル蛍光の減衰が野生株に比べて大きく遅延していること、また同じく大気条件の野生株において、PSII の電子受

容体に DCBQ ( $Q_B$  サイトに結合) を用いた時よりも DMBQ ( $PQ$  と競合) を用いた時の方が光に依存した  $O_2$  発生速度が速いことが報告されている<sup>33)</sup>。これらの結果から PSII の  $Q_B$  サイトにおいて FLV2/4 は電子を受け取っているとされている<sup>33)</sup>。しかしながら Shimakawa 等の研究により FLV2/4 はメーラー反応を触媒することが明らかであり、FLV2/4 への電子伝達反応は  $O_2$  発生速度に影響を与えないはずである<sup>32,33)</sup>。従って  $Q_B$  サイトが FLV2/4 の作用箇所という結論に関しては疑問の余地がある。クロロフィル蛍光の挙動のみから FLV2/4 の作用箇所を推定すると、 $Q_A$  以降かつ  $PQ$  以前であると考えるのが妥当であろう。このように高  $CO_2$  条件や大気条件において  $CO_2$  濃縮機構により  $CO_2$  濃度が高く保たれている状態では FLV1/3 が、大気条件において光合成により  $CO_2$  を消費したことで  $CO_2$  濃縮機構でもカルビン回路における  $CO_2$  要求を満たせなくなった状態では FLV2/4 がそれぞれ  $O_2$  への電子伝達反応を行っていると考えられる (図 2)。

近年の研究によって FLV はエレクトロンシンクとして *in vivo* で重要な生理的役割を担っていることが明らかとなってきた。カルビン回路が活性化状態にない光合成誘導期において FLV1/3 欠損株では野生株に比べて電子伝達鎖が還元状態になり、 $Y(II)$  が低下する<sup>30)</sup>。また変動光下において野生株では PSI の反応中心である P700 が弱光から強光に変化しても速やかに酸化されるのに対して FLV1/3 欠損株では P700 の還元状態が維持され、電子伝達鎖に還元力が蓄積してしまう<sup>29)</sup>。そのため強光や変動光といった環境では ROS が生成し、光化学系がダメージを受けてしまう<sup>29,34)</sup>。FLV2/4 の欠損株では  $CO_2$  枯渇時に電子伝達鎖が過還元状態になり、 $CO_2$  枯渇下での電子伝達活性は  $CO_2$  飽和時の 5-10% 程度まで低下する<sup>32)</sup>。また FLV2/4 欠損株では大気条件での生育において、強光下における酸化ストレスによって光化学系がダメージを受ける<sup>27)</sup>。その結果、野生株に比べて生育が大きく遅延する<sup>27)</sup>。従って FLV は  $O_2$  を還元することにより、電子伝達鎖に蓄積した還元力を安全に消費するエレクトロンシンクとしてストレス環境下での生育にとっ

て重要な存在である。

一方で FLV が  $\Delta pH$  形成に寄与し、不足する ATP を供給して  $CO_2$  固定能を維持しているという報告はない。S. 6803 の FLV1/3 欠損株における  $CO_2$  飽和条件における  $O_2$  発生速度は、野生型と差が見られない<sup>25,30)</sup>。また野生株と FLV2/4 欠損株においても大気環境下での  $O_2$  発生速度に差は見られない<sup>32)</sup>。シアノバクテリアの ATPase は 3 分子の ATP を合成するために 13 から  $15H^+$  が必要であり、さらに  $CO_2$  濃縮機構を駆動するためにも ATP を必要とする<sup>35)</sup>。そのため  $CO_2$  を濃縮し、さらに  $CO_2$  固定能を維持するためには高等植物と同程度、あるいはそれ以上の ATP が要求されると考えられる。その不足分を FLV によって補っているのであれば欠損株において光合成能が低下すると予想される。しかし実際には野生株と FLV 欠損株において光合成  $O_2$  発生速度に差が見られないことから、S. 6803 において FLV は電子伝達鎖が還元されやすいような環境下では重要なエレクトロンシンクとなるが、定常状態の光合成  $O_2$  発生には影響を及ぼさないと考えられた。

興味深いことに、FLV1/3 の存在はシアノバクテリアに広く保存されている一方で、FLV2/4 は一部のシアノバクテリアのみに見られる<sup>37)</sup>。Hayashi 等は別種のシアノバクテリアである S. 7942 においては、 $CO_2$  枯渇条件において LEF に匹敵するメーラー様反応が見られないことを見出した<sup>30)</sup>。実際、S. 7942 は FLV2/4 をゲノム上に有していない<sup>32)</sup>。そのため  $CO_2$  が枯渇すると電子伝達鎖が過還元状態に陥ってしまう<sup>30,32,36)</sup>。つまり S. 7942 は S. 6803 に比べてエレクトロンシンク能が低いことになる。一方、S. 7942 は大気条件下において生育が可能であり、FLV2/4 はシアノバクテリアの生存に普遍的に不可欠なものではないと考えられる。この Hayashi 等の報告は、 $O_2$  依存的電子伝達活性の違いを FLV の多様性に結び付けた初めての報告であった<sup>30)</sup>。

## 6. *in vivo* での光合成における $O_2$ 依存性の発見

さらに Hayashi 等は S. 7942 を用いて、 $CO_2$  飽和下で窒素ガスを用いることで溶液中の  $O_2$  を取

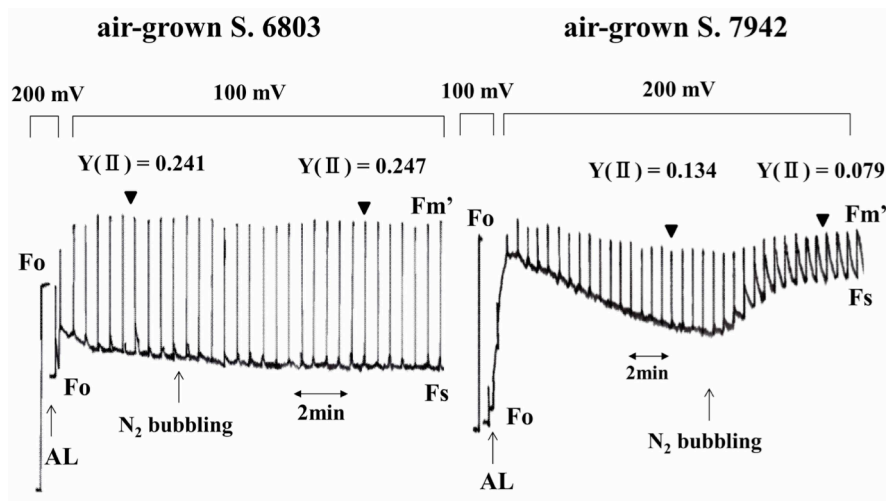


図 3. シアノバクテリアの種間における電子伝達反応の O<sub>2</sub> 依存性の違い (Hayashi et al. 2014 より引用)<sup>30)</sup>

(A) 大気条件生育の S. 6803 における O<sub>2</sub> に依存した電子伝達反応をクロロフィル蛍光によって測定した。(B) 大気条件生育の S. 7942 における O<sub>2</sub> に依存した電子伝達反応をクロロフィル蛍光によって測定した。Fs が安定してから窒素ガスを通気し溶液中の O<sub>2</sub> を取り除いた。PSII の実効量子収率を決定するために飽和パルス光を照射して決定した (逆三角)。200 mV、100 mV は縦軸のスケールを示しており、100 mV は 200 mV の 2 倍の大きさを示している。

り除き 160 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> の赤色光を照射することで光合成定常状態における O<sub>2</sub> 依存的電子伝達反応を測定した (図 3)。すると S. 6803 では窒素ガス置換により O<sub>2</sub> を取り除いてもクロロフィル蛍光や Y(II) に影響がなかった<sup>30)</sup>。一方で S. 7942 は光合成定常状態においても窒素ガス置換により Y(II) が低下するだけでなく飽和パルス光照射後のクロロフィル蛍光の消光が大きく遅延することが明らかとなった<sup>30)</sup>。このことからシアノバクテリアの種間によって光合成定常状態における O<sub>2</sub> 依存性も異なることが明らかとなった。CO<sub>2</sub> 飽和下において S. 7942 は S. 6803 に比べて光合成 O<sub>2</sub> 発生速度が低い<sup>5)</sup>。この知見はカルビン回路の電子シンクとしての機能が S. 6803 に比べて S. 7942 の方が小さいことを意味している。窒素ガスに S. 6803 が反応しなかった原因としては、Hayashi 等の実験では 160 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> の光強度で測定しており、Allahverdiyeva 等が光合成の定常状態で O<sub>2</sub> 吸収を測定した 500 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> よりも弱光であったためほとんどの電子が FLV1/3 ではなく LEF に流れたためであると考えられた<sup>26,30)</sup>。一方で S. 7942 においてはカルビン回路の電子シンク能が S. 6803 に比べて低いため、LEF 対

する FLV1/3 の活性が大きくなり、160 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> という光環境下でも窒素ガスに反応したと考えられる。これらのことから S. 6803 よりも S. 7942 において全電子伝達反応に占める O<sub>2</sub> に依存した電子伝達反応活性の割合が高いことが示唆される。つまりこれは S. 7942 において S. 6803 よりも光合成電子伝達反応の O<sub>2</sub> 依存性が高いことを意味している。そこで S. 7942 において FLV1/3 欠損株を作製し、光合成と FLV による O<sub>2</sub> 還元の関係調べたところ、光合成の定常状態において Y(II) が低下しただけでなく、O<sub>2</sub> 発生速度が大きく低下した<sup>5)</sup> (図 4)。このデータは LEF の活性が低下していることを示している。光合成は LEF によるエネルギー供給とカルビン回路によるエネルギー消費のバランスにより成り立っているため、LEF の活性低下から CO<sub>2</sub> 固定反応も低下していると考えられる。即ち、FLV1/3 は電子シンクとして機能して余剰なエネルギーを散逸するだけでなく、CO<sub>2</sub> 固定能を維持していることを示している。我々が知る限り、これは *in vivo* において O<sub>2</sub> が CO<sub>2</sub> 固定活性に影響を与えることを示唆した初めてのデータである。

では FLV1/3 欠損により生じる LEF 活性の低下

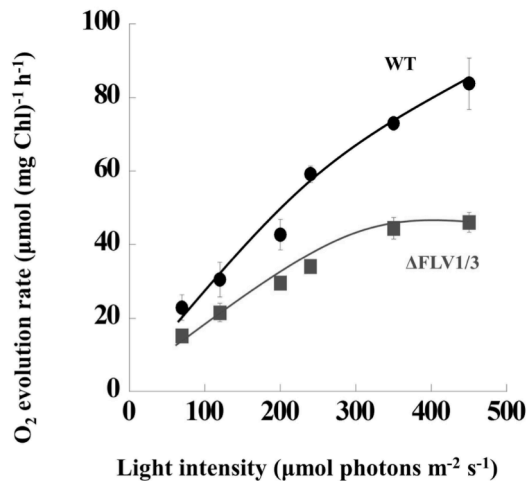


図 4. S. 7942 における光強度と O<sub>2</sub> 発生速度の関係 (Shaku et al. 2015 より引用)<sup>5)</sup> 野生型 (●) と FLV1/3 欠損変異体 (■) における O<sub>2</sub> 発生速度を測定した。

は ΔpH 形成が抑制されているために生じているのであろうか。FLV1/3 を欠損した S. 7942 は飽和パルス光照射後にクロロフィル蛍光の消光が大きく遅延していた<sup>5)</sup> (図 5A)。筆者等はこの遅延の原因は ΔpH 形成が抑制されたことによりカルビン回路におけるリブローズ-1,5-ビスリン酸 (RuBP) の再生が律速となり、電子伝達鎖が還元状態にあると考えた。そこで PSI の反応中心である P700 の酸化還元状態を測定したところ、クロロフィル蛍光が増加している時に P700 が酸化されている、一見矛盾する事実を見出した<sup>5)</sup> (図 5B)。また NAD(P)H 蛍光も同時に測定すると NADPH の生成が抑制されていた (図 5C)<sup>5)</sup>。ΔpH 形成が抑制されていることによってクロロフィル蛍光の消光が遅延しているのであれば P700 や NADPH は還元されると考えられる。しかしこれらの結果は筆者等の予想とは異なり、PSII から PSI への電子伝達反応が抑制されていることを意味している。よって ΔpH 形成が阻害されたためにクロロフィル蛍光の消光が遅延している可能性は低いと考えられる。S. 7942 の野生型において、この電子伝達抑制は CO<sub>2</sub> 飽和下では見られなかったが、CO<sub>2</sub> 枯渇下においては観測された。これらのことから PQ プールの還元状態によって PSII から PSI への電子伝達反応が抑制されていることが示唆され、この電子伝達制御

を Reduction-Induced Suppression of Electron flow (RISE) と命名した。RISE が生じてクロロフィル蛍光が上昇している時、PSII における O<sub>2</sub> 発生速度が最大 50%程度まで低下した。そしてクロロフィル蛍光が元の値に戻るに伴って O<sub>2</sub> 発生速度も元の値に戻った<sup>5)</sup>。つまり RISE が生じていると光合成における O<sub>2</sub> 発生速度を低下させていることが明らかとなった。このことから野生株に比べて FLV1/3 欠損変異体で O<sub>2</sub> 発生速度が低い理由は (図 4)、野生株に比べて FLV1/3 欠損変異体で PQ プールが還元されており、RISE が光合成の定常状態で誘導され、LEF 活性が低下しているためであると考えられる。

## 7. RISE の分子メカニズムおよび生理学的意義

著者等は、S. 7942 における光合成電子伝達反応制御は Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体での Q サイクルにより調節されていることを見出した。FLV1/3 欠損変異体において Cyt *f* の酸化還元レベルを測定したところ、RISE が生じている時に Cyt *f* が酸化されていることが分かった (図 5D)。つまり RISE は Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体で生じている可能性が示唆され、Q サイクルの活性の低下が原因と考えられた (図 6)。Q サイクルは Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体において循環的な電子伝達反応を行い、H<sup>+</sup> の取り込みを促進する機構である<sup>12)</sup>。Cyt *b<sub>6</sub>* の Q<sub>p</sub> サイトにおいて PQH<sub>2</sub> が PQ へと酸化される。その際に生じた 2 つの電子のうち 1 つは Cyt *f* を経て PC、PSI へと伝達される。一方でもう 1 つの電子は Cyt *b<sub>6</sub>* 内の Q<sub>p</sub> サイトから Q<sub>n</sub> サイトへと伝達される。もう一度 Q<sub>p</sub> サイトで PQH<sub>2</sub> が酸化されると Q<sub>n</sub> サイトに 2 つ電子が蓄積し、Q<sub>n</sub> サイトにて PQ が PQH<sub>2</sub> に還元される。この際に H<sup>+</sup> が取り込まれることで ΔpH 形成に寄与していると考えられている。FLV1/3 の欠損や CO<sub>2</sub> の枯渇が生じると PQ プールが過還元状態に陥る。すると PQH<sub>2</sub>/PQ 比が高くなり PQ の量が相対的に少なくなることで Cyt *b<sub>6</sub>* の Q<sub>n</sub> サイトにおける PQ の還元が抑制される。その結果 Cyt *b<sub>6</sub>* 内での Q<sub>p</sub> サイトから Q<sub>n</sub> サイトへの電子伝達反応も抑制され LEF も抑制される。その結果光合成が抑制される。このことから O<sub>2</sub> 依存的

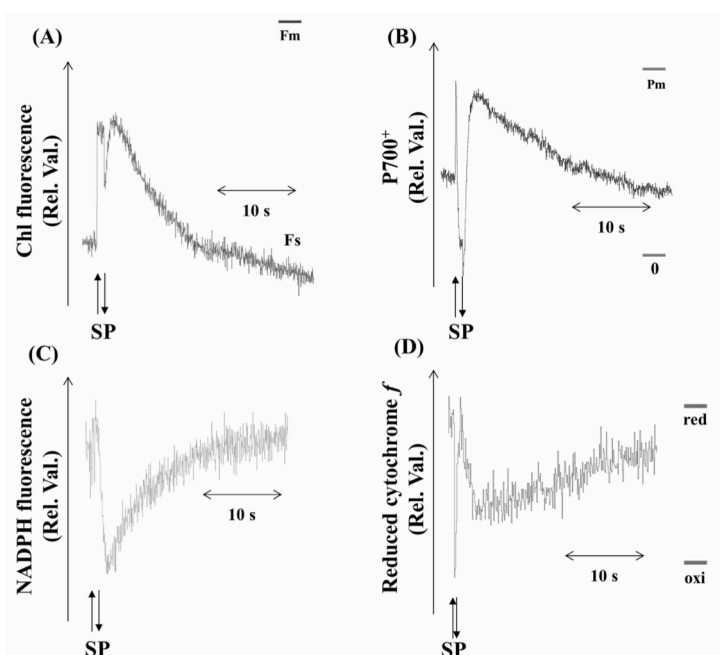


図 5. FLV1/3 欠損変異体における各レドックス因子の飽和パルス光に対する応答 (Shaku et al. 2015 より引用)<sup>5)</sup>

(A) クロロフィル蛍光、(B) P700 酸化還元、(C) NADPH 蛍光、(D) Cyt *f* の酸化還元レベルを示している。励起光 ( $200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) をバックグラウンドとして飽和パルス光 (SP) を 1 秒照射している。クロロフィル蛍光の最大レベル (Fm) は DCMU を添加して決定した。P700 の最大レベル (Pm) は遠赤色光を照射後に飽和パルス光を照射することで決定した。Cyt *f* の最大還元レベル (red) は暗所に KCN を添加して決定した。Cyt *f* の最大酸化レベル (oxi) は励起光下で DBMIB を添加して決定した。

な電子伝達反応は、 $\Delta\text{pH}$  形成に寄与しているのではなくエレクトロンシンクとして PQ プールを酸化することで RISE を抑制し、LEF 活性を維持しているといえる。つまり S. 7942 における Q サイクルは  $\Delta\text{pH}$  形成だけでなく、電子伝達制御をも担っている可能性がある。

では、RISE による電子伝達制御はどのような意義があるのか。RISE は PSI を酸化していることから PSI における  $\text{O}_2$  の生成を抑えている可能性がある。PSI において発生した  $\text{O}_2$  は PSI 光阻害の原因となる<sup>38)</sup>。PSI タンパク質の分解と生合成のターンオーバー速度は PSII での分解、生合成ターンオーバー速度に比べて極めて遅く、ダメージの程度が深刻な場合には回復できない<sup>39,40)</sup>。このことから PSI の光阻害を防ぐことは光合成生物にとって非常に重要であると考えられる。Sejima 等は暗所にある生葉に飽和パルス光を連続照射することで PSI が還元状態になり、 $\text{O}_2$  存在下で PSI の失活が生じることを見出した<sup>41)</sup>。その研究において、Y(ND) (PSI にどれだけ PSII か

らの電子が到達しづらいかを示した指標。値が高いほど PSI が酸化されている) が上昇することにより PSI の失活が抑えられることを報告しており、PSI 酸化の生理学的意義が世界で初めて示された<sup>41)</sup>。CO<sub>2</sub> 枯渇や FLV1/3 欠損では、クロロフィル蛍光解析から明らかのように PQ が過還元状態になっていることから、PSI において  $\text{O}_2$  が生成する危険性が高まっていると考えられた。そのような環境で RISE が生じることによって PSI への電子の流入が抑制され結果として PSI における  $\text{O}_2$  の生成が抑制され、PSI の失活に備えている可能性が示唆された。実際に S. 7942 においては CO<sub>2</sub> 枯渇下や FLV1/3 欠損によって Y(ND) の上昇が見られることも上記の仮説を支持している<sup>5)</sup>。

また RISE は Cyt *f* や PC の酸化も誘導する。Cyt *f* や PC は  $\text{O}_2$  を消去する能力を持つことが知られている<sup>42,43)</sup>。反応速度定数も  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  であり Cyt *f* から PC への速度定数の  $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  と比べても非常に大きいことが分かる<sup>44)</sup>。仮に PSI において

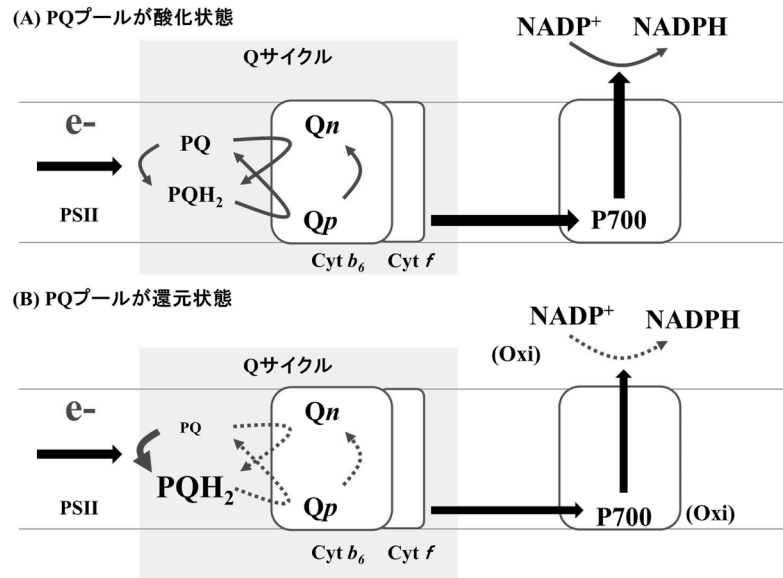


図 6. RISE の分子メカニズム (Shaku et al. 2015 改)<sup>5)</sup>

(A) エレクトロンシンク能によって PQ プールを酸化できる場合、Cyt *b*<sub>6</sub> の Q<sub>p</sub> サイトにおいて PQH<sub>2</sub> が PQ に酸化される。2つの電子のうち1つの電子は PSI へ、もう一つの電子は Q<sub>n</sub> へと伝達される。もう一度同じ反応が起こることで、Q<sub>n</sub> サイトにおいて PQ が PQH<sub>2</sub> へと還元される (Q サイクル)。(B) エレクトロンシンク能が抑制された時、PQH<sub>2</sub>/PQ 比が高くなる。その結果 Q<sub>n</sub> サイトにおける PQ の還元が抑制され、Q<sub>p</sub> サイトから Q<sub>n</sub> サイトへの電子伝達反応が抑制される。結果として LEF が抑制され、PSI や NADPH が酸化されると考えられる。

O<sub>2</sub>が生成してしまった場合でも Cyt *f* や PC が O<sub>2</sub> を消去することで ROS の危険に備えている可能性がある。つまり PSI が還元されやすい環境下において RISE は PSI 失活の危険性を軽減する電子伝達制御として機能していると考えられる。

## 8. 最後に

これまで CO<sub>2</sub> 固定能維持における O<sub>2</sub> の必要性ということに対して *in vivo* での証明がなされてこなかった。しかし筆者等の研究により、光合成にとっての O<sub>2</sub> の必要性が初めて *in vivo* において明らかとなった。その中で、O<sub>2</sub> の存在意義が従来の ΔpH 形成を行いカルビン回路の ATP 要求を満たす役割ではなく、エレクトロンシンクとして PQ プールを酸化することで LEF 活性の維持を行っていることが示された。そしてその分子メカニズムが Q サイクルによる電子伝達制御 (RISE の制御) である可能性が示唆された。これらの知見は Q サイクルに ΔpH 形成とは異なる RISE の制御という電子伝達制御機能が備わっていることを新たに示している。筆者等の研究はシアノバク

テリア S. 7942 において検証を行ったものであるが、Q サイクルは光合成生物に広く保存されている生理現象であり、RISE による LEF 活性制御機構は全ての光合成生物に保存されている可能性がある<sup>12)</sup>。光合成生物における RISE の普遍性にはさらなる検証が必要であるが、普遍性が実証されることで、CO<sub>2</sub> 固定における O<sub>2</sub> の存在意義がさらに明らかとなるであろう。

一方で LEF ではカルビン回路が要求する ATP を十分に供給することが出来ないという説に対しては、未だ十分な回答がなされていない。生化学的な知見から算出された理論値では、LEF では ATP の供給が間に合わず、別の電子伝達反応 (メーラー反応や CEF-I) によって ΔpH を供給する必要がある。しかし本総説で紹介したように、我々を含めた生理学的な立場における量的議論においては、メーラー反応や CEF-I では LEF の不足分の ΔpH を補う能力は低いと考えている<sup>14)</sup>。この両者の食い違いに対して明確な答えを出すためには、本当に LEF のみでは ATP が不足しているのか、不足しているのであればどのような機



構により補われているのかを生理学的アプローチによって明らかにする必要があると考えている。

Received January 3, 2016; Accepted February 19, 2016;  
Published April 30, 2016

## 参考文献

- Mehler, A.H. (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts: I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents. *Arch. Biochem. Biophys.* 33, 65–77.
- Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601–639.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186, 1–88.
- Miyake, C. (2010) Alternative electron flows (water–water cycle and cyclic electron flow around PSI) in photosynthesis: molecular mechanisms and physiological functions. *Plant Cell Physiol.* 51, 1951–1963.
- Shaku, K., Shimakawa, G., Hashiguchi, M. and Miyake, C. (2015) Reduction-Induced Suppression of Electron Flow (RISE) in the Photosynthetic Electron Transport System of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* Doi; 10.1093/pcp/pcv198.
- Schreiber, U. and Neubauer, C. (1990) O<sub>2</sub>-dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.* 25, 279–293.
- Miyake, C. and Yokota, A. (2000) Determination of the rate of photoreduction of O<sub>2</sub> in the water-water cycle in watermelon leaves and enhancement of the rate by limitation of photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 41, 335–343.
- Müller, P., Li, X.P. and Niyogi, K.K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125, 1558–1566.
- Hideg, É., Kós, P.B. and Schreiber, U. (2008) Imaging of NPQ and ROS formation in tobacco leaves: heat inactivation of the water–water cycle prevents down-regulation of PSII. *Plant Cell Physiol.* 49, 1879–1886.
- Allen, J.F. (2002) Photosynthesis of ATP—electrons, proton pumps, rotors, and poise. *Cell* 110, 273–276.
- Alric, J. (2010) Cyclic electron flow around photosystem I in unicellular green algae. *Photosynth. Res.* 106, 47–56.
- Kallas, T. (1994) The cytochrome *b<sub>6</sub>/f* complex, in *The molecular biology of cyanobacteria* (Bryant, A.D., Eds.) pp 259–317, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Takagi, D., Yamamoto, H., Amako, K., Makino, A., Sugimoto, T. and Miyake, C. (2012) O<sub>2</sub> supports 3-phosphoglycerate-dependent O<sub>2</sub> evolution in chloroplasts from spinach leaves. *Soil Sci. Plant Nutr.* 58, 462–468.
- Takagi, D. and Miyake, C. (2015) The evaluation of alternative electron flow (AEF) activity based on the kinetic parameters, and the physiological role of O<sub>2</sub>-dependent AEF in plants. *光合成研究* 24, 97–110.
- Kramer, D.M. and Evans, J.R. (2011) The importance of energy balance in improving photosynthetic productivity. *Plant Physiol.* 155, 70–78.
- Asada, K. (2000) The water–water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.* 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. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 355, 1433–1446.
- Ruuska, S.A., Badger, M.R., Andrews, T.J. and Von Caemmerer, S. (2000) Photosynthetic electron sinks in transgenic tobacco with reduced amounts of Rubisco: little evidence for significant Mehler reaction. *J. Exp. Bot.* 51, 357–368.
- 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 CO<sub>2</sub> assimilation is restricted. *Plant Cell Environ.* 34, 837–846.
- Shirao, M., Kuroki, S., Kaneko, K., Kinjo, Y., Tsuyama, M., Förster, B., Takahashi, S. and Badger, M.R. (2013) Gymnosperms have increased capacity for activity of photosystem I cyclic electron transport in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 49, 825–834.
- Shikanai, T. (2007) Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 199–217.
- 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.
- 23 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.
- 24 Fisher, N. and Kramer, D.M. (2014) Nonphotochemical reduction of thylakoid photosynthetic redox carriers in vitro: Relevance to cyclic electron flow around photosystem I? *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1837, 1944-1954.
- 25 Helman, Y., Tchernov, D., Reinhold, L., Shibata, M., Ogawa, T., Schwarz, R., Ohad, I. and Kaplan, A. (2003) Genes encoding A-type flavoproteins are essential for photoreduction of O<sub>2</sub> in cyanobacteria. *Curr. Biol.* 13, 230-235.
- 26 Allahverdiyeva, Y., Ermakova, M., Eisenhut, M., Zhang, P., Richaud, P., Hagemann, M., Cournac, L. and Aro, E.M. (2011) Interplay between flavodiiron proteins and photorespiration in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* 286, 24007-24014.
- 27 Zhang, P., Allahverdiyeva, Y., Eisenhut, M. and Aro, E.M. (2009) Flavodiiron proteins in oxygenic photosynthetic organisms: photoprotection of photosystem II by Flv2 and Flv4 in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One* 4, e5331.
- 28 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 multiple-component pathway in a single polypeptide chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 82-87.
- 29 Allahverdiyeva, Y., Mustila, H., Ermakova, M., Bersanini, L., Richaud, P., Ajlani, G., Battchikova, N., Cournac, L. and Aro, E.M. (2013) Flavodiiron proteins Flv1 and Flv3 enable cyanobacterial growth and photosynthesis under fluctuating light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 4111-4116.
- 30 Hayashi, R., Shimakawa, G., Shaku, K., Shimizu, S., Akimoto, S., Yamamoto, H., Amako, K., Sugimoto, T., Tamoi, M., Makino, A. and Miyake, C. (2014) O<sub>2</sub>-dependent large electron flow functioned as an electron sink, replacing the steady-state 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.
- 31 Price, G.D. (2011) Inorganic carbon transporters of the cyanobacterial CO<sub>2</sub> concentrating mechanism. *Photosynth. Res.* 109, 47-57.
- 32 Shimakawa, G., Shaku, K., Nishi, A., Hayashi, R., Yamamoto, H., Sakamoto, K., Makino, A. and Miyake, C. (2015) FLAVODIIRON2 and FLAVODIIRON4 proteins mediate an O<sub>2</sub>-dependent alternative electron flow in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under CO<sub>2</sub>-limited conditions. *Plant Physiol.* 167, 472-480.
- 33 Zhang, P., Eisenhut, M., Brandt, A.M., Carmel, D., Silén, H.M., Vass, I., Allahverdiyeva, Y., Salminen, T.A. and Aro, E.M. (2012) Operon *flv4-flv2* provides cyanobacterial photosystem II with flexibility of electron transfer. *Plant Cell* 24, 1952-1971.
- 34 Hackenberg, C., Engelhardt, A., Matthijs, H.C., Wittink, F., Bauwe, H., Kaplan, A. and Hagemann, M. (2009) Photorespiratory 2-phosphoglycolate metabolism and photoreduction of O<sub>2</sub> cooperate in high-light acclimation of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Planta* 230, 625-637.
- 35 Ogawa, T. and Kaplan, A. (1987) The stoichiometry between CO<sub>2</sub> and H<sup>+</sup> fluxes involved in the transport of inorganic carbon in cyanobacteria. *Plant Physiol.* 83, 888-891.
- 36 Miller, A.G., Espie, G.S. and Bruce, D. (1996) Characterization of the non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence that occurs during the active accumulation of inorganic carbon in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Photosynth. Res.* 49, 251-262.
- 37 Allahverdiyeva, Y., Isojärvi, J., Zhang, P. and Aro, E.M. (2015) Cyanobacterial oxygenic photosynthesis is protected by flavodiiron proteins. *Life* 5, 716-743.
- 38 Sonoike, K. (2011) Photoinhibition of photosystem I. *Physiol. Plant* 142, 56-64.
- 39 Kudoh, H. and Sonoike, K. (2002) Irreversible damage to photosystem I by chilling in the light: cause of the degradation of chlorophyll after returning to normal growth temperature. *Planta* 215, 541-548.
- 40 Zhang, S. and Scheller, H.V. (2004) Photoinhibition of photosystem I at chilling temperature and subsequent recovery in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45, 1595-1602.
- 41 Sejima, T., Takagi, D., Fukayama, H., Makino, A. and Miyake, C. (2014) Repetitive short-pulse light mainly inactivates photosystem I in sunflower leaves. *Plant Cell Physiol.* 55, 1184-1193.
- 42 Tanaka, K., Takahashi, M. and Asada, K. (1978) Isolation of monomeric cytochrome *f* from Japanese

- radish and a mechanism of autoreduction. *J. Biol. Chem.* 253, 7397–7403.
- 43 Takahashi, M., Kono, Y. and Asada, K. (1980) Reduction of plastocyanin with superoxide and superoxide dismutase-dependent oxidation of plastocyanin by hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol.* 21, 1431–1438.
- 44 Tanaka, K., Takahashi, A. and Asada, K. (1981) Oxidation rate of monomeric radish cytochrome *f* with plastocyanin. *Plant Cell Physiol.* 22, 33–39.

O<sub>2</sub> Regulates the Linear Electron Flow and Sustains Photosynthesis  
~ Proposal of the new role of O<sub>2</sub> for photosynthesis ~

Keiichiro Shaku, Chikahiro Miyake\*

Graduate School of Agricultural Science, Kobe University

## 解説

## 光合成微生物を利用した再生可能エネルギー生産実用化のための課題 社会からの期待、研究の歴史、シアノバクテリアの水素生産

神奈川大学 光合成水素生産研究所  
櫻井 英博\*

地表が受ける太陽光は人類が消費するエネルギーの 4,500 倍を超える。光合成生物を利用したバイオエネルギー生産は、1973 年の第一次オイルショック時はエネルギー安定供給の視点から、最近では地球温暖化に対する再生可能エネルギー開発の必要性の視点から、研究開発に対する期待が社会から寄せられている。約 40 年間にわたるさまざまな研究により、バイオエネルギーの経済的生産のための克服すべき課題は整理されつつあるが、いまだ大規模な実用化には至っていない。本稿は、光合成微生物を利用したバイオエネルギー生産に関するわれわれの最近の総説<sup>1)</sup>を基礎に、気候変動枠組み条約「パリ協定」(2015)、1970-80 年代の日本および米国の研究推進の状況、およびわれわれのシアノバクテリアを利用した水素生産の研究を付け加え、筆者の個人的経験と見解をまとめたものである。

### 1. 地球温暖化と再生可能エネルギーに対する社会的期待

#### 1.1. 大気中の温室効果ガス濃度増大による気候変動に対する懸念

大気中の CO<sub>2</sub> をはじめとする温室効果ガス濃度は、顕著に上昇を続けている。CO<sub>2</sub> 濃度は産業革命までは約 280 ppm 程度で安定していたが、以後次第に増加に転じ、すでに約 400 ppm に達した。CO<sub>2</sub> 濃度の増加は、主として化石燃料の燃焼、次いで森林破壊（バイオマスの燃焼のほか、土壌中に蓄えられていた腐植質の分解）等によるが、その結果、地球規模の温暖化が懸念されている<sup>2)</sup>。IPCC（気候変動に関する政府間パネル）の第 5 次報告書の 1 つのシナリオによれば、地球平均気温の上昇を産業革命時を基準として 2°C 以内の上昇に抑えるためには、温室効果ガスの排出量を 2010 年レベルから、2050 年には 25-55%、2100 年には 90-114%削減しなければならないという<sup>3)</sup>（図 1）。

温室効果ガス濃度の上昇は、地球の平均気温の上昇による気候変動を引き起こし、生態系や農業に対する影響、災害の激甚化など、全体として人

類社会にとって好ましくない影響を及ぼすことが懸念される。温室効果ガス排出抑制は一国のみで達成できるものではないので、気候変動が地球全体に及ぼす悪影響を抑制するために、1992 年に「国連気候変動枠組み条約」(UNFCCC) が採択された<sup>4)</sup>。本条約の目的は、「人類の活動によって気候システムに危険な影響をもたらされない水準で、大気中の温室効果ガス濃度の安定化を達成することにある。」とされている。わが国では「地球温暖化防止条約」という呼び方も一部にあるが、これは国際的には通用しない不適切な呼び方である。なぜなら、本当に温暖化を防止するならば、大気中の温室効果ガス濃度を産業革命当時の濃度に戻す必要があるが、これは実現不可能だと考えられるからである。

#### 1.2. 人類のエネルギー消費量と太陽光エネルギー

人類のエネルギー消費量は莫大であり、世界の社会的総エネルギー消費は、2013 年には約 13,500 x 10<sup>6</sup> toe (石油換算トン、1 toe = 41.87 GJ)、すなわち年間 5.65 x 10<sup>20</sup> J に達した<sup>5)</sup>。社会的総エネルギー消費をエネルギー源別にみると、その 81.4%は化石燃料（原油、石炭、天然ガス）で、

\*連絡先 E-mail: sakurai@waseda.jp

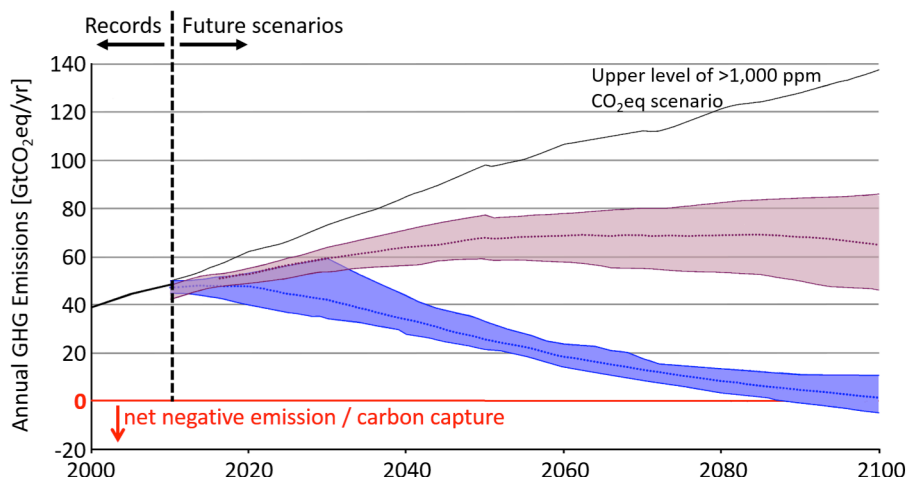


図 1. 化石燃料由来 CO<sub>2</sub> 排出とその抑制のシナリオ IPCC

地球の平均気温の予測には現状では不確実性があるので、一部は帯状の範囲で示す。パリ協定<sup>4)</sup>は 2100 年の気温上昇を 2°C 未満、できれば 1.5°C に抑えることを目標。現協定での削減はこのレベルに達しないので、協定は 5 年ごとに、より厳しく見直されることになっている。本協定で、日本は 2013 年比で、2030 年には 26%、2050 年には 80% の削減を表明。図で、正味ゼロ以下の排出には、化石燃料燃焼由来の CO<sub>2</sub> を全量回収し、岩盤等に永久的に安定貯蔵する技術の開発 (CCS: Carbon dioxide, Capture, Storage) に加えて、植林、造林等により大気中の CO<sub>2</sub> の正味の吸収が必要である。

[黒線] (一番上の線) 現在の趨勢。このままだと 2100 年には約 4°C 上昇、[あずき色] 3.1-3.7°C 上昇、[青色] 1.8-2.0°C 上昇 (パリ協定が長期目標とする現時点でのシナリオ) (作図: 北島正治)

残りは木材などの生物燃料が 10.2%、原子力 4.8%、水力 2.4% であった。人類 (71.1 億人) の年間の食物摂取エネルギー (2,000 kcal/日) は約  $5.2 \times 10^{15}$  cal ( $2.17 \times 10^{18}$  J) と見積もられるが、これとの比較から、世界の平均的な人は総エネルギーで食物エネルギーの約 26 倍 (化石燃料で 21 倍) を消費していることになる (表 1) (総エネルギーとして、米国: 95 倍、ドイツ: 53 倍、日本: 49 倍、中国: 30 倍)。地上にエネルギー作物を栽培し、動力や肥料等の投入エネルギーを差し引いた正

味で、世界の現在の食物摂取エネルギーに匹敵する量の再生可能エネルギーが新たに生産できたとしても、人類の総エネルギー消費の約 5% を賄えるに過ぎない。

地表が受ける太陽光エネルギーは莫大で、人類の社会的エネルギー消費の総量で約 4,700 倍、化石燃料消費の約 5,800 倍に達する (表 1)。なお、単位面積当たりの平均太陽光強度は、約  $1,500 \text{ kWh m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$  と見積もられる<sup>6)</sup>。

表 1. 太陽光と人類のエネルギー消費

| 項目              | エネルギー量 (強度)   | 比     |       |         | 文献/注   |
|-----------------|---|-------|-------|---------|--|
| 太陽光             |   |       |       |         |  |
| 強度              | ( $165 \text{ W m}^{-2}$ or $1450 \text{ kWh m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ ) |       |       |         | Stephens et al (2012)  |
| 地表における全太陽光エネルギー | $2,660,000 \times 10^{18} \text{ J yr}^{-1}$                            | 4,670 | 5,800 | 440,000 | Stephens et al (2012)  |
| 光合成有効放射         | $1,200,000 \times 10^{18} \text{ J yr}^{-1}$                            |       |       |         | 45% of the total   |
| 人類の社会的エネルギー消費   |   |       |       |         |  |
| 総一次エネルギー供給      | $570 \times 10^{18} \text{ J yr}^{-1}$                                  | 1     | 1.24  | 26      | IEA (2015)   |
| 化石燃料消費          | $460 \times 10^{18} \text{ J yr}^{-1}$                                  | 0.81  | 1     | 21      | IEA (2015)   |
| ヒトの食物摂取エネルギー    | $21.7 \times 10^{18} \text{ J yr}^{-1}$                                 | 0.038 | 0.047 | 1       | population: $7.1 \times 10^9$<br>$2,000 \text{ kcal capita}^{-1} \text{ d}^{-1}$ |

### 1.3. 光合成生物を利用した日米におけるバイオエネルギー生産の初期の研究史

光合成生物を再生可能エネルギー生産のために利用する組織的検討が始まったのは 1973 年である。この年 10 月に勃発した第四次中東戦争を契機に、中東の石油輸出国機構 (OPEC) は親イスラエル国に対する石油禁輸、原油 1 バレル (約 159 L) 当たりの公示価格の 3 ドル台から 5 ドル台への引き上げを発表した。原油の半分以上を中東の原油に頼るわが国に対する影響は甚大で、電力消費を少しでも抑えるために夜 11 時以降のテレビ放送の停止、総合卸売物価指数の 2 年間で約 50% の上昇 (物価狂乱) 等の大混乱が起こった。まもなく石油の禁輸は実施されないこととなったが、石油価格は高止まりし (現在の価格と比べればそれほどでもないが)、エネルギーの確保が重要な課題であることが認識された。

米国では、1973 年に光合成生物を利用した太陽光エネルギー変換研究のための Workshop が Gibbs, San Pietro らにより組織・開催され<sup>7)</sup>、その後 Lien & San Pietro による報告書<sup>8)</sup>も出て、のちに和訳された<sup>9)</sup>(図 2)。驚くべきは、この Workshop が開催されたのは第四次中東戦争開戦に先立つ同年の 9 月であったことである。米国の科学行政担当機関は、将来起こりうるリスクに備えるための研究開発を視野に入れ、研究を組織できていたことになる。それから数年後、私は 1977 年夏から約 1 年間 San Pietro の研究室 (Indiana 大学) で光化学系 I に関する研究を行い、研究室には S. Lien も居たが、生物を利用した太陽光エネルギー変換の応用的研究は全く行われていなかった。おそらく米国 NSF は、石油は価格が上昇したとはいえエネルギー確保に問題はないと判断して、この分野への補助金を大幅に削除したものと思われる。1978 年夏にはコロラド州 Golden にある SERI (Solar Energy Research Institute) を訪ねたが、J.T. Warden の説明では、建物が今は 3 棟ほどだが、近い将来は 20 棟以上に拡張される予定とのことであった。しかし、このような大構想は実現せず、その後研究所は DOE 傘下の中規模な NREL (National Renewable Energy Laboratory) となり、バイオエネルギー (M. Seibert, M. Ghirardi 等)、太

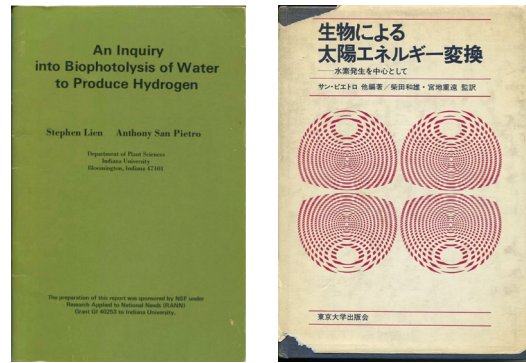


図 2. 米国の報告書 (1975 年)<sup>8)</sup> (左) と日本語の訳書<sup>9)</sup> (右)

陽光発電、風力などの研究が行われ、現在に至っている。

このような逆境下でも J.R. Benemann (Univ. California), A. Mitsui (Univ. Miami) などの限られた少数の研究者は、研究費を得て研究を続け、実用化には至らなかったものの、現在でも役に立つ多くの研究成果を残した (後述)。私は 1978 年に Miami 大学の三井旭氏を訪ねたが、彼は巨額の研究費を得て、10 人乗り以上の大きな調査船を使って湾や外洋から多数の光合成微生物を採取し、それを実験室で培養して H<sub>2</sub> 生産性の高い株等を選抜していた。

上述のように、米国の科学政策立案者側は 1970 年代後半には、光合成生物を利用した経済的エネルギー生産は当面は困難であると判断していたが、わが国では 1970 年代後半から、この分野の研究に研究費が投入されることになった。科学技術庁に属する理研では、1979 年より「日米光合成研究協力事業」が開始され、1999 年まで光合成を主目的とする研究に対する助成が行われた。1980 年には、太陽光エネルギー科学研究グループ (井上頼直主任研究員) に、初期設備費 1 億円、年間数千万円の経常研究費、10 名程度の流動研究員枠という破格の規模で太陽光利用に関する研究費が支出され、当初の研究目標としては、「太陽光エネルギーで水を分解、H<sub>2</sub> を得る人工系の設計に指針を与えること」が掲げられた<sup>10)</sup>。1984 年の研究報告書には、高分子ルテニウム錯体を用いて、H<sub>2</sub>O を光化学的に分解し、メチルビオローゲン還元し、ヒドロゲナーゼ等により H<sub>2</sub> を生産するという 1 つの想像図が紹介

表 2. 期待されるバイオエネルギーの年間総売り上げ

| エネルギー<br>変換効率 | エネルギー<br>生産              | 総売上 (円 m <sup>2</sup> yr <sup>-1</sup> ) |     |      |
|---------------|--------------------------|--|-----|------|
|               |                          | 買上げ価格 (円/kWh)                            |     |      |
| (%)           | (kWh/m <sup>2</sup> /yr) | 10                                       | 20  | 50   |
| 1             | 15                       | 150                                      | 300 | 750  |
| 2             | 30                       | 300                                      | 600 | 1500 |

(地表における受光太陽光強度を 1,500 kWh m<sup>2</sup> yr<sup>-1</sup> と仮定)

されている<sup>11)</sup>。理研では、この間、光合成に関する優れた基礎研究が行われ、多くの研究者を輩出したが、実用的研究というよりは、基礎的研究が中心であった。

1976年にはGibbsら<sup>7)</sup>、Lienら<sup>8)</sup>の2つの報告書が、「生物による太陽光エネルギーの変換」<sup>9)</sup>として翻訳出版され(図2)、文部省所管の大学等の光合成研究にも一時期、ある程度の研究費が配分された。研究費の獲得には、藤茂宏、宮地重遠、西村光男、藤田善彦ら諸氏の尽力があったと聞いている。私は、文部省科研費(特定研究)「生物生産の場における生理的・化学的制御」(研究代表者:田村三郎、1981-1983)、文部省科研費(エネルギー特別研究)「太陽光による光合成の研究」(研究代表者:本多健一、1984-1986)の研究分担者に加えてもらい、年間100万円を超える研究費を受けた。しかし、ここでも、いかにして光合成をエネルギー生産に結び付けるかのビジョンは描かれておらず、たとえば私の属した「高エネルギー物質生産」研究グループには、光化学系I、フェレドキソン、ヒドロゲナーゼ等の研究者がいたが、近い将来の実用化目指すというよりは、将来役に立つ可能性のある基礎研究をするというのが共通認識であった。

## 2. 光合成生物を利用した太陽光エネルギー変換が経済的に成り立つための条件

光合成生物を利用したバイオエネルギー生産は、陸上植物のサトウキビ、トウモロコシ等を原料とするバイオエタノール生産が大規模に実施されている。これに対し、微細光合成生物を利用したものは、未だ大規模生産の実施には至ってい

ない。しかし、この間のさまざまな研究により、バイオエネルギー生産が経済的に成り立つための必要条件に関する知識が集積されていった。

### 2.1. 大規模生産の必要性

太陽光の地表での強度は、平均して約 1,500 kWh m<sup>2</sup> yr<sup>-1</sup>程度(表1)であり、光合成のエネルギー変換効率を1%、2%と仮定したときの年間の総売り上げは表2のようになる。

効率1%、買上げ価格20円/kWhと仮定すれば、年間の総売り上げは300円/m<sup>2</sup>(3,000,000円/ha)で、大規模生産が必要である。手厚い価格支持政策があるコメでも、八郎潟の米作専業農家は約20-30haの経営規模が必要だといわれる。このような手厚い価格支持政策が期待できないバイオエネルギー生産では、従業員1人当たり1km<sup>2</sup>程度の規模は必要であろう。

単位面積当たりの収入がこの程度あるいはそれ以下であっても、光合成を利用したエネルギー生産性の可能性があることを示す例としては、米国のトウモロコシ生産の実績があげられる。トウモロコシ穀粒への光エネルギー変換効率は0.3-0.35%程度と見積もられるが、ここ20年間のシカゴ市場での価格は8-27セント/kg、すなわち1.4-6.2セント/kWhであり<sup>12)</sup>、これは、光バイオエネルギー生産が大規模に実施されれば、将来、経済的に成り立つ可能性を示す実績である。農家1戸当たりの平均耕地面積(km<sup>2</sup>)は、日本は0.025、オーストラリアは30.8、米国は1.75程度である。同じ新聞には、大規模農家の例として、20km<sup>2</sup>を耕作してコメを生産しているオーストラリアの農家が紹介されていた<sup>13)</sup>。



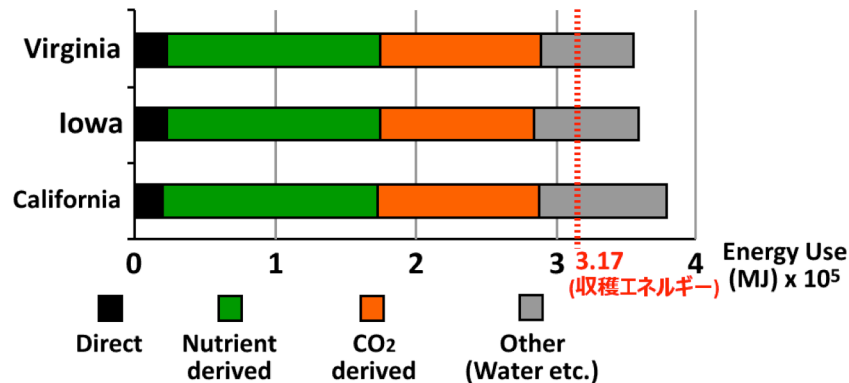


図 3. 藻類バイオエネルギー生産のライフサイクルアセスメント<sup>14)</sup>

Clarens *et al.*<sup>14)</sup>による米国の3地点(日照、水の蒸発に差がある)での評価。いずれも、藻類エネルギー $3.17 \times 10^5$  MJ (図の赤破線)を得るのに、それ以上のエネルギーが必要。最大のエネルギーコストは栄養塩類。

## 2.2. エネルギー収支がプラスであること

光合成により生産されるバイオエネルギーは、投入される総エネルギーを上回らなければならない。Clarens *et al.*<sup>14)</sup>は緑藻のバイオエネルギー生産に関するライフサイクルアセスメント (LCA) を行い、現状では投入エネルギーの方が生産物のエネルギーを上回り、正味のエネルギー生産は困難であるという結果を示した (図 3)。最もエネルギーを食うのは窒素、リン、カリウムなどの栄養塩類であり、次いで CO<sub>2</sub> (濃縮と通気)、水 (蒸発)、動力 (培養液攪拌、収穫等) である。農業においても窒素肥料のコスト削減は重要で、主食とする食品はコメ、ムギ、砂糖、油脂等はいずれも窒素含量が低い。

## 2.3. 生産装置またはバイオリクターが低廉であること

Amos<sup>15)</sup>は緑藻 *Chlamydomonas* の H<sub>2</sub> 生産のコスト分析を行い、バイオリクター価格が数 10 ドル/m<sup>2</sup>を超えると、経済的生産は困難であると結論した。表 2 の結果からも、バイオリクター価格が数 1,000 円/m<sup>2</sup>を超えると、利子の支払いがコスト要因の1つになることが分かる。

## 2.4. 経済的バイオ燃料生産に必要な条件のまとめ

バイオエネルギーの生産が、社会的に意味ある貢献をするためには、以下の条件をみたさなければ

ならない<sup>1)</sup>: ①大規模生産、②全プロセスで投入されるエネルギーを上回るエネルギー生産、特に、栄養塩類等のエネルギー消費削減、③省力生産。

光合成生物を利用した生産方式としては数多くのものが提案されている。例えば、成長の早い *Miscanthus* (ススキに似た草本) を陸地に植え、バイオマス収穫する案があるが、栽培に適した陸地面積は限られる。かつてはホテイアオイを利用することも提案されたが、成長が期待したほど高くなく、外来生物として環境問題を引き起こす危険性も指摘された。私見では、窒素栄養の消費から見て、緑藻の *Botryococcus* は経済的オイル生産の可能性もあるかもしれないが、*Euglena* は困難だと思われる。Benemann *et al.*<sup>16)</sup>は、緑藻がバイオエネルギーとして利用できるためには、バイオマスとしての年間生産性を 10 kg/m<sup>2</sup>以上に高めなければならないと結論しているが、これは太陽光→バイオマスのエネルギー変換効率約 4%以上という極めて高いハードルである。なお、光合成微生物を利用したバイオエネルギーの経済的生産の課題 (特に窒素栄養節約) については、本誌でも小俣ら<sup>17)</sup>が論じている。

## 3. シアノバクテリアを利用した光生物学的 H<sub>2</sub> 生産の研究

光合成生物を利用したバイオエネルギーの生産方式にはさまざまなものが研究されているが、本稿では、われわれが行っているシアノバクテリ

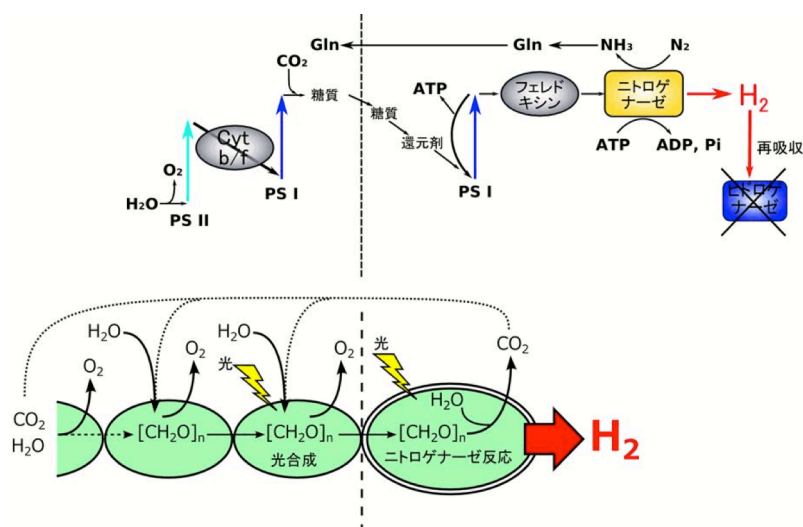


図 4. ヘテロシスト形成型シアノバクテリアの H<sub>2</sub> を中心とする代謝経路

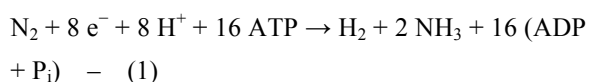
上図：2種の細胞の機能分化と光合成系及びニトロゲナーゼの局在性。下図：反応に伴う気体の動き。破線の左側は栄養細胞、右側はヘテロシスト（別名、異型細胞）。H<sub>2</sub>Oの分解により O<sub>2</sub>と H<sub>2</sub>を生じ、CO<sub>2</sub>は循環的に利用される。ヘテロシストは光化学 II 活性を欠き、呼吸活性も高く、酸素感受性ニトロゲナーゼを保護する。隣接する栄養細胞は通常の光合成により合成した糖質をヘテロシストに供給し、ヘテロシストからグルタミンを受け取る。ニトロゲナーゼ反応は不可逆的であり、H<sub>2</sub>を再吸収するヒドロゲナーゼを不活性化すれば、H<sub>2</sub>は O<sub>2</sub>があっても吸収されずに蓄積可能。

アのニトロゲナーゼを利用した H<sub>2</sub>に限定して述べる。これは他の藻類のヒドロゲナーゼを利用した H<sub>2</sub>生産やバイオマス生産の可能性を否定することを意図したものではない。

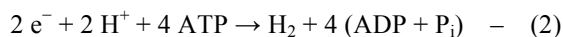
### 3.1. ニトロゲナーゼを利用した H<sub>2</sub>生産系

シアノバクテリアの一部は、酵素ニトロゲナーゼにより窒素固定を行うが、反応の必然的副産物として H<sub>2</sub>を発生する<sup>18-23)</sup>。反応は実質的に不可逆であり、H<sub>2</sub>を吸収するヒドロゲナーゼの活性を抑制すると、O<sub>2</sub>の共存下でも H<sub>2</sub>を蓄積できる。シアノバクテリアはいくつかの方法で O<sub>2</sub>発生を伴う通常の光合成と O<sub>2</sub>感受性のニトロゲナーゼ反応の共存を図っている。われわれが現在利用しているのは、糸状でヘテロシスト(異型細胞)を形成する空間的分離タイプである<sup>23)</sup>。ヘテロシストはニトロゲナーゼ反応の場で、光化学系 II の活性がほとんどなく、隣接する栄養細胞が通常の光合成により合成した糖質を電子供与体として受け取り、合成した窒素固定産物(グルタミン)を返送する(図4)。

ニトロゲナーゼの反応は、下記によりあらわされる:



気相が N<sub>2</sub>を含まない場合は(Ar ガスを主体)、全電子が H<sub>2</sub>生産に向けられる:



反応式が(2)のときの理論的最高エネルギー効率率は、ATP合成酵素(FoF1)によるATP合成に必要な H<sup>+</sup>数が確定していないため、正確な値も確定していない<sup>23-25)</sup>。H<sup>+</sup>/ATP比を4または3と仮定すると、ニトロゲナーゼによる1分子の H<sub>2</sub>生産に必要な光子数は(18-22)/3であり、入射光波長を 550 nm、水素の燃焼熱(高位発熱量:産物は液体の水)を 285.84 kJ mol<sup>-1</sup>とすると、光→H<sub>2</sub>エネルギー変換効率 16.3-13.9%が理論的最高エネルギー変換効率である<sup>19)</sup>。太陽光エネルギーの45%が光合成有効放射(PAR)だとすれば、太陽光→H<sub>2</sub>エネルギー変換効率は最高で7.3-6.3%である。なお、可視光(550 nm)および全太陽光に対する最高エネルギー変換効率は、ヒドロゲナーゼを利用した H<sub>2</sub>生産では32.9%および14.8%、C<sub>3</sub>光合成は27.6%および12.7%、C<sub>4</sub>光合成は20.7-24.5%および9.3%-11.0%と試算される。シアノバクテリアのニトロゲナーゼによる H<sub>2</sub>生産の変換効率に



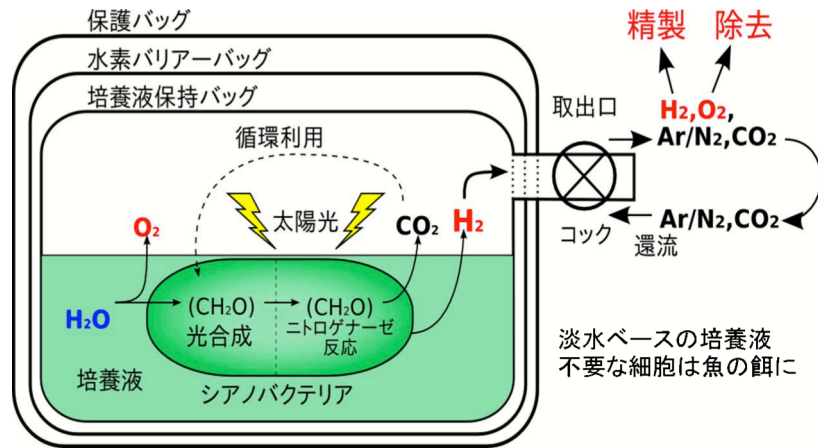


図 5. H<sub>2</sub>バリアー性バッグをバイオリクターとする H<sub>2</sub>生産の概念図

淡水ベースの培養液は、海水に浮かべたバッグ中で自発的に広がる。海面 1 km<sup>2</sup>を、例えば 25x200 m の巨大なバッグ 200 個で覆うことができる。培養液を変えずに、H<sub>2</sub>を繰り返し収穫できる。CO<sub>2</sub>は循環的に利用される。不要になったシアノバクテリア細胞は魚の餌に<sup>39)</sup>。

関しては、実験室内の弱光条件下では 2.6<sup>26)</sup>-3.7%<sup>27)</sup>という高い値が報告されているが、屋外での 2 日以上の実験で得られた最高値は 0.1%程度にとどまっております<sup>28)</sup>、その改善が重要な課題である。

### 3.2. われわれの研究 — 出発から初期の研究まで (1997-2007)

私は 1991 年に再度 Miami 大学の三井旭氏を訪ねたが、研究費は細っていたものの、研究は続いていた。興味深かったのは、光照射下で O<sub>2</sub>を発生しながら H<sub>2</sub>を蓄積できる野外から採取したシアノバクテリア株で、これはヒドロゲナーゼ活性を欠き、ニトロゲナーゼにより H<sub>2</sub>を生産するものであった<sup>29)</sup>。バイオエネルギーにける三井さんの情熱は敬服すべきものであったが、私のような植物生理学分野の者が参入できる状況ではないと感じていた。1996 年、私は緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum tepidum* の光化学反応中心の分光学的測定でフランス Saclay 研究所の P. Sétif と共同研究を行っていたが、午前中は私が嫌気操作で反応液をキュベットに詰め、彼が測定中の午後は暇であった。そのときたまたま手にした本に、ニトロゲナーゼの立体構造の X 線結晶解析<sup>30)</sup>の記事が出ていた。ニトロゲナーゼについて調べてみると、酵素反応の詳細な生化学的研究<sup>31)</sup>、シアノバクテリアのニトロゲナーゼ *nif* 遺伝子クラス

ターの塩基配列決定<sup>32)</sup>、一部のシアノバクテリアの形質転換法確立等<sup>33)</sup>、関連分野の進歩が著しいことが分かった。1997 年には、機会があって、ニトロゲナーゼを利用した光生物学的 H<sub>2</sub>生産の構想を発表した<sup>34)</sup>。私はそれまで光合成の基礎的研究しかやってこなかったが、応用的研究を始めることについて持丸真里助手(現駒沢大)と大学院生の増川一(現大阪市大)からの合意を得て、シアノバクテリアの H<sub>2</sub>生産の研究を開始した。1999 年には、RITE (地球環境産業技術研究機構) から約 1000 万円の研究費を得て、シアノバクテリアのヒドロゲナーゼの分子生物学的研究をしていた P. Tamagnini と大学院生を技術指導に招くことができた。ニトロゲナーゼによる光生物学的 H<sub>2</sub>生産活性が、取り込み型ヒドロゲナーゼ遺伝子破壊 ( $\Delta$ Hup) により著しく上昇すること<sup>35)</sup>、*Nostoc* sp. PCC 7422 ( $\Delta$ Hup)は O<sub>2</sub>の共存下でも H<sub>2</sub>を濃度 29%まで蓄積でき、実験室条件下での光→水素エネルギー変換効率が 1.7% (全太陽光換算)に達する<sup>27)</sup>等が主な成果である。RITE の審査員 (茅陽一、大山莞爾氏ら)、plasmid を恵与された C.P. Wolk にはこの場を借りて感謝の意を表したい。なお、*Anabaena/Nostoc* sp. PCC 7120 株の全ゲノム塩基配列決定の研究<sup>36)</sup>が、分子生物学的研究を進めるうえで重要な指針となった。

大規模 H<sub>2</sub>生産用のバイオリクターに関して

は、一つの可能性として H<sub>2</sub> バリアー性の柔軟プラスチックバッグを利用するという提案があったが<sup>37)</sup>、われわれはバッグにシアノバクテリアを入れ、これを海面に浮かべて大規模培養することを提案した<sup>19)</sup> (図 5)。

### 3.3. 神奈川大学光合成水素生産研究所における研究 (2007-現在)

私は 2007 年から神奈川大学光合成水素生産研究所(井上和仁所長)で研究を行っている。同研究所では、バイオリクターとして H<sub>2</sub> バリアー性プラスチックバッグの可能性を明らかにし、ガス試料採取用にガスサンプリングポート<sup>38)</sup>も開発した(なお、後者およびバッグは、Wakhy 研究所が製作し、GL サイエンスから市販されている)。また、ガス相を約 1 週間ごとに更新することにより、培地を変えることなく 60 日以上にわたり H<sub>2</sub> 生産が可能であるという結果を得ている(北島他、未発表)。これにより、Clarens ら<sup>14)</sup>の指摘した栄養塩類等のエネルギー消費削減の克服は可能だと考えている。屋外培養時には、バッグの中の培養であるから雑菌による汚染が防がれ、しかも、CO<sub>2</sub> は最初に気相に加えておけばバッグ中で循環的に利用されるので(図 4,5)、通気や培養液の攪拌も不要である。

### 4. 実用化に向けての課題

実用化のためには、**A** 屋外条件下でのエネルギー変換効率の 1%以上への改良、**B** 関連工学技術の進歩、**C** 社会的受容が必要である。

**A** に関しては、強光下でもエネルギー変換効率が低下しない株の選抜と遺伝子工学的改良が考えられる。その手段としては、アンテナ色素の削減<sup>40)</sup>、有望野生株の選抜と遺伝子工学的改良、ニトロゲナーゼの分子活性の増大、代謝工学的改良等が考えられる。**B** に関しては、H<sub>2</sub> と O<sub>2</sub> の混合気体から両者を分離することが課題であるが、光半導体触媒により H<sub>2</sub>O を分解して H<sub>2</sub> を生産する場合においても同様な課題があるので、革新的技術の開発が待たれる。**C** に関しては、わが国では実験室レベルでも遺伝子組換え生物の培養は、屋内で行わなければならない。そこで、神奈

川大学では模擬太陽光照射装置(ソーラーシミュレーター)(図 6)を設置し、世界各地の気象をシミュレートした条件下で H<sub>2</sub> 生産性を評価することが可能になった。わが国では、遺伝子組換え生物を屋外で栽培し市販することは、現時点では多くの場合禁止されているが、サントリーが開発した青いバラと青いカーネーションは栽培と切り花の販売が認められている。われわれは、遺伝子組換え生物の生態系への影響を低くするために淡水産のシアノバクテリアを海面で培養することを提案しているので、将来はプラスチックバッグ内での屋外生産が認められる可能性があるかと期待している。また、公海の利用には国際的協調が必要である。関連諸技術にも不確定要素が多々あるが、われわれは下記の極めて大雑把な仮定の下に、海面を利用したシアノバクテリアによる H<sub>2</sub> のコストを 26.4 セント/kWh と試算した：[主な仮定：1) 海面に浮遊させたバイオリクター中で H<sub>2</sub> 生産、2) エネルギー変換効率(太陽光→H<sub>2</sub>)：1.2%、3) エネルギー回収率=消費地に運ばれた H<sub>2</sub> エネルギー/海面で生産された H<sub>2</sub> エネルギー = 0.5]<sup>41)</sup>。

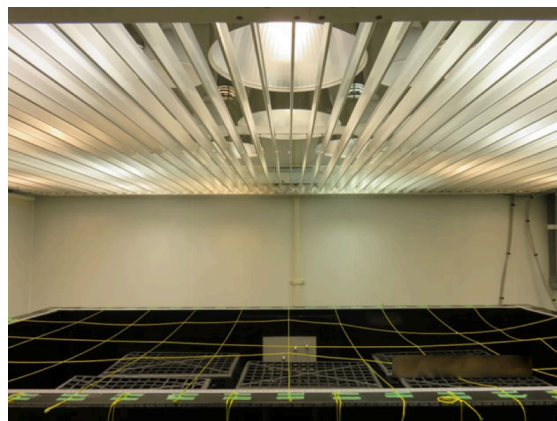


図 6. 模擬太陽光照射装置 (Solar simulator)

神奈川大学湘南ひらつかキャンパスに設置。光強度、温度はプログラミングにより可変で、世界各地の潜在的 H<sub>2</sub> 生産性評価が可能。

### 結論

生物学的側面で特に重要なのは、シアノバクテリアの野外条件下での光生物学的 H<sub>2</sub> 生産効率を 1%程度以上(対全太陽光)に高めることであ

る。これにより、この H<sub>2</sub> 生産系が地球温暖化の軽減のために有効であることを示すことができれば、関連技術の発展が促され、社会的受容も進むものと考えられる。

## 謝辞

最近の本研究の一部は、下記の支援を受けた (研究代表者: 井上和仁); 科研費: 新学術領域研究「人工光合成」(課題番号 24107004)、JSPS 科学研究費補助金基盤研究 C (課題番号 15K00642)、JSPS 二国間 (日露) 交流事業共同研究、文部科学省私立大学戦略的研究基盤支援事業「太陽光を基盤とするグリーン/ライフイノベーション創出研究拠点の形成」、(株) リテラメッド寄付金。

Received March 6, 2016; Accepted March 28, 2016;

Published April 30, 2016

## 参考文献

- Sakurai, H., Masukawa, H., Kitashima, M. and Inoue, K. (2015) How close we are to achieving commercially viable large-scale photobiological hydrogen production by cyanobacteria: A review of the biological aspect, *Life* 5, 997-1018.
- ICPP 2014 Core Writing Team, Pachauri, R.K. and Meyer, L.A. (eds.) (2014) Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva, Switzerland. (<https://www.ipcc.ch/report/ar5/>).
- ibid*, Working Group 3, Mitigation of Climate Change, Summary for Policy Makers, Fig. SPM. 4 ([http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/wg3/ipcc\\_wg3\\_ar5\\_summary-for-policymakers.pdf](http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/wg3/ipcc_wg3_ar5_summary-for-policymakers.pdf))
- UNFCCC ホームページ <http://unfccc.int/2860.php> (なお日本語の情報サイトは、EIC ネット: 環境イノベーション情報機構 [www.eic.or.jp](http://www.eic.or.jp) などがある)
- International Energy Agency (IEA) (2015) Key world energy statistics 2015. [https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/KeyWorld\\_Statistics\\_2015.pdf](https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/KeyWorld_Statistics_2015.pdf)
- Stephens, G.L., Li, J., Wild, M., Clayson, C.A., Loeb, N., Kato, S., L'Ecuyer, T., Stackhouse, P.W., Lebsock, M. and Andrews, T. (2012) An update on Earth's energy balance in light of the latest global observations. *Nat. Geosci.* 5, 691-669.
- Gibbs, M., Hollaender, A., Kok, B., Krampits, L.O., San Pietro, A. (1974) Proceedings of the Workshop on Bio-solar Conversion, Workshop (held on 5-6 Sep. 1973, Md), Indiana University.
- Lien, S. and San Pietro, A. (1975) An inquiry into biophotolysis of water to produce hydrogen. (NSF report), Indiana University.
- サンピエトロ他著、柴田和雄・宮地重遠監訳 (1976) 「生物による太陽エネルギー変換」、東京大学出版会 (Gibbs, M. *et al.*, Proc. Of the Workshop on bio-solar conversion, 1973年9月 Baltimore で行われた Workshop 報告書<sup>7)</sup>、及び Lien & San Pietro<sup>8)</sup> の翻訳)
- 理研八十八年史、第 II 編、第 5 章 光合成科学～新エネルギー創成への挑戦～(2005)理化学研究所 史 編 集 委 員 会 <http://www.riken.jp/~media/riken/pr/publications/riken88/riken88-2-5.pdf>
- 太陽光エネルギー変換研究。井上頼直、理化学研究所 ニュース No. 78 (1984) <http://www.riken.jp/~media/riken/pr/publications/news/1984/rn198412.pdf>
- Chicago corn price. <http://www.tradingeconomics.com/commodity/corn>
- 日本経済新聞 2016年2月2日
- Clarens, A.F., Resurreccion, E.P., White, M.A. and Colosi, L.M. (2010) Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1813-1819.
- Amos, W.A. (2004) Updated cost analysis of photobiological hydrogen production from *Chlamydomonas reinhardtii* green algae; NREL/MP-560-35593; NREL: Golden, CO, USA. [https://www.hydrogen.energy.gov/analysis\\_repository/project.cfm/PID=110](https://www.hydrogen.energy.gov/analysis_repository/project.cfm/PID=110)
- Benemann, J., Pedroni, P.M., Davison, J., Beckert, H., Bergman, P. (2003) Second National Conference on Carbon Sequestration. Technology roadmap for biofixation of CO<sub>2</sub> and greenhouse gas abatement with microalgae. <http://www.netl.doe.gov/publications/proceedings/03/carbon-seq/pdfs/017.pdf>
- 小俣達男、藤田裕一、前田真一 (2010) 光合成微生物は資源・エネルギー分野で人類に貢献できるか? -生産性を規定する諸要因の分析. *光合成研究* 20, 65-71.
- Benemann, J.R. and Weare, N.M. (1974) Hydrogen

- evolution by nitrogen-fixing *Anabaena cylindrica* cultures. *Science* 184, 174–175.
19. Sakurai, H. and Masukawa, H. (2007) Promoting R&D in photobiological hydrogen production utilizing mariculture-raised cyanobacteria, *Marine Biotechnol.* 9, 128–145.
  20. Tamagnini, P., Leitão, E., Oliveira, P., Ferreira, D., Pinto, F., Harris, D.J., Heidorn, T. and Lindblad, P. (2007) Cyanobacterial hydrogenases: Diversity, regulation and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 692–720.
  21. Tsygankov, A.A. (2007) Nitrogen-fixing cyanobacteria: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 43, 250–259.
  22. Bothe, H., Schmitz, O., Yates, M.G. and Newton, W.E. (2010) Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 529–551.
  23. Sakurai, H.; Masukawa, H.; Kitashima, M. and Inoue, K. (2013) Photobiological hydrogen production: Bioenergetics and challenges for its practical application. *J. Photochem. Photobiol. C* 17, 1–25.
  24. Junge, W. (2007) Structure and function of photosystem I. in *Primary Processes of Photosynthesis—Part 2: Principles and Apparatus* (Renger, G., Ed.) Volume 2, pp. 447–487. RSC Publishing: Cambridge, UK.
  25. Petersen, J., Förster, K., Turina, P. and Gräber, P. (2012) Comparison of the H<sup>+</sup>/ATP ratios of the H<sup>+</sup>-ATP synthases from yeast and from chloroplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 11150–11155.
  26. Kumazawa, S. and Asakawa, H. (1995) Simultaneous production of H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in closed vessels by marine cyanobacterium *Anabaena* sp. TU37-1 under high cell-density conditions. *Biotechnol. Bioengineer.* 46, 396–398.
  27. Yoshino, F., Ikeda, H., Masukawa, H. and Sakurai, H. (2007) High photobiological hydrogen production activity of a *Nostoc* sp. PCC 7422 uptake hydrogenase-deficient mutant with high nitrogenase activity. *Mar Biotechnol.* 9, 101–112.
  28. Tsygankov, A.A., Fedorov, A.S., Kosourov, S.N. and Rao, K.K. (2002) Hydrogen production by cyanobacteria in an automated outdoor photobioreactor under aerobic conditions. *Biotechnol. Bioengineer.* 80, 777–783.
  29. Kumazawa, S. and Mitsui, A. (1985) Comparative amperometric study of uptake hydrogenase and hydrogen photoproduction activities between heterocystous cyanobacterium *Anabaena cylindrica* B629 and nonheterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. strain Miami BG7. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 287–291.
  30. Kim, J.S. and Rees, D.C. (1992) Crystallographic structure and functional implications of the nitrogenase molybdenum–iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Nature* 360, 553–560.
  31. Thorneley R.N.F. and Lowe, D.J. (1983) Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae* – Kinetics of the dissociation of oxidized iron protein from molybdenum iron protein of nitrogenase: Identification of the rate-limiting step for substrate reduction. *Biochemistry* 215, 393–403.
  32. Mulligan, M.E. and Haselkorn, R. (1989) Nitrogen-fixation *nif* genes of the cyanobacterium *Anabaena* species strain PCC 7120. *J. Biol. Chem.* 264, 19200–19207.
  33. Elhai, J. and Wolk, C.P. (1988) Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167, 747–754.
  34. 桜井英博 (1997) 生物を利用した光–水素発生系 (1997) 日本エネルギー学会報告書「人工光合成技術の研究開発動向調査」 pp. 3–10.
  35. Masukawa, H., Mochimaru, M., Sakurai, H. (2002) Disruption of the uptake hydrogenase gene, but not of the bidirectional hydrogenase gene, leads to enhanced photobiological hydrogen production by the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp PCC 7120. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 618–624.
  36. 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.
  37. Prince, R.C. and Kheshgi, H.S. (2005) The photobiological production of hydrogen: potential efficiency and effectiveness as a renewable fuel. *Crit. Rev. Microbiol.* 31, 19–31.
  38. Kitashima, M., Masukawa, H., Sakurai, H. and Inoue, K. (2012) Flexible plastic bioreactors for photobiological hydrogen production by hydrogenase-deficient cyanobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 831–833.
  39. Murray, R.L. and Mitsui, A. (1982) Growth of hybrid tilapia fry fed nitrogen fixing marine blue-green algae in sea water. *J. World Marine Soc.* 13, 198–209.
  40. Nakajima, Y. and Ueda, R. (1997) Improvement of photosynthesis in dense microalgal suspension by

- reduction of light harvesting pigments. *J. Appl. Phycol.* 9, 503–510.
41. Sakurai, H., Masukawa, H., Kitashima, M. and Inoue, K. (2010) A Feasibility study of large-scale photobiological hydrogen production utilizing mariculture-raised cyanobacteria, *Adv. Exp. Med. Biol.* 675, 291–303.

Our Challenges for Renewable Energy Production Utilizing Photosynthetic Microorganisms –  
Expectation of Our Society, a Short History of the Research, and Hydrogen Production by  
Cyanobacteria

Hidehiro Sakurai\*

\*Research Institute for Photobiological Hydrogen Production, Kanagawa University

**解説特集**  
**「若手光合成研究者による光合成研究の新展開」**

Editor: 高橋 裕一郎 (岡山大学 大学院自然科学研究科)

|                                 |                            |    |
|---------------------------------|----------------------------|----|
| 序文                              | 高橋 裕一郎 (岡山大)               | 35 |
| 解説 光合成における強光順化メカニズム研究の新展開       | 得津 隆太郎 (基生研)               | 36 |
| 解説 酸素発生型光合成の成立過程とその実証方法の再考      | 浅井 智広 (立命館大) 塚谷 祐介 (東京工業大) | 43 |
| 解説 緑藻の光化学系Iサイクリック電子伝達活性調節に関する考察 | 高橋 拓子 (埼玉大)                | 59 |

## 解説

序文<sup>‡</sup>

岡山大学 大学院自然科学研究科

高橋 裕一郎<sup>1</sup>

学位を取る前後の若手研究者だった 30 年ほど前の頃を思い出してみると、自分の研究成果を発表する場は、主に日本植物学会や日本植物生理学会の一般発表でした。そこでの質疑応答を含めた 15 分の口頭発表は、大変貴重な機会でした。ある程度自分の研究がまとまってくると、実質 12 分の発表時間は短く、もう少し長い時間があればと感じることがしばしばありました。当時はそのような機会にはあまり恵まれていませんでしたが、現在も状況が大きく改善したとは言えないのではないのでしょうか。今も若手光合成研究者は同じような思いを抱いていると思います。

まとまった研究成果を光合成研究の専門家を前にして発表する機会は若手研究者の成長にはとても重要で、若手・中堅・ベテラン研究者から率直な評価・批判を受けると、それまで以上に研究が発展するものです。そこで、昨年（2015 年）5 月に岡山で開催された第 6 回日本光合成学会年会および公開シンポジウムでは、「若手光合成研究者による光合成研究の新展開」というシンポジウムを企画しました。若手光合成研究者が伸びてきているな、とかねがね感じていましたので、ちょうどよいタイミングであると考えました。4 名の演者に最近の研究の進展をまとめて発表することを依頼したところ、講演を快諾して頂きました。時間の関係上、限られた方にしか依頼できなかったのですが、自分の研究成果をまとめて発表したいとうずうずしている若手光合成研究者がまだまだたくさんいることでしょう。そして多くの研究者は若手光合成研究者の新しい発想と研究手法を駆使した研究成果を聞きたいと思っているはずで、今後も日本光合成学会の年会を活用して、若手研究者の研究発表の機会を広げていきたいと考えています。

「日本の光合成研究の発展は若手研究者の双肩に掛かっている」ことには異論がないと思います。光合成の若手研究者を育成していくことは日本光合成学会の重要な使命の一つです。本特集では 3 名の演者の研究を中心にまとめた解説を掲載しました。どこかの学会で彼等に会ったとき、いろいろな評価、批判、アドバイス、そして励ましをして頂くきっかけになれば幸いです。

最後に本特集の編纂に当たって、本紙編集委員長の西山佳孝さんにいつも以上のご苦勞をお掛けしてしまいました。この場を借りてお礼を申し上げます。

---

<sup>‡</sup>解説特集「若手光合成研究者による光合成研究の新展開」

<sup>1</sup>連絡先 E-mail: taka@cc.okayama-u.ac.jp



光合成における強光順化メカニズム研究の新展開<sup>†</sup>

基礎生物学研究所

得津 隆太郎\*

光合成生物にとって光は必要不可欠なものであると同時に、自らを危険にさらす原因でもある。過ぎたるは猶及ばざるがごとしという諺通り、過剰な光エネルギーは時に有害なものとなり、光合成生物そのものを滅ぼしかねない。陸上植物や藻類などの光合成生物は、こういった過剰な光から身を守る術として、光を熱へと換えて安全に捨てる強光順化メカニズムを発達させてきた。多くの先人たちの研究により、この強光順化メカニズムの仕組みが明らかになりつつあるが、その内容は未だ広く知られていないようにも思う。本稿では、これまでに分かりつつある強光順化メカニズムの仕組みと、最近の筆者らの研究を紹介しつつ、今後の光合成における強光順化メカニズム研究の展望を述べる。

## 1. はじめに

光合成の重要性に気付き、そしてその奥深さに魅せられて早十数年経過した。特に、自然界における光合成生物の強さ、しなやかさにはいつも驚かされる。あまり多くの場所を回ったわけではないが、少なくとも筆者自身が地球上で実際に足を踏み入れた場所においては、必ず光合成生物が存在していた。陸上であっても水中であっても、である。つまり光合成生物たちは、その誕生以来、地球上のあらゆる環境において独自の進化を遂げつつ、その場所で最適な光合成を行っているということを生きながらに証明している。では、私たちは彼らがどのように周辺環境に適応しているのかを理解できているだろうか。多くの方は、まだまだわからないことだらけ、と答えると思う。かくいう筆者もその一人であることは間違いない。とはいえ光合成研究の一端を担う者として、本稿の執筆を通し、先行研究および筆者のこれまでの研究から分かってきた、光合成生物の“光”環境順化メカニズムについて少しだけご紹介させていただければ、と思う。

## 2. 光を捨てるということ

時に瞬く間に変化する光に対し、光合成生物たちはどのように順化しているのだろうか？例えば、風で揺らめく木々の間や水面から差し込む光、あるいは雲の切れ間から降り注ぐ光は、数秒単位でその強度が変化する。安定した光の下で光合成反応が進んでいる場合、上記のような瞬間的な光環境変化は、時に光合成系にとって過剰な光エネルギーを供給してしまう。このような過剰な光エネルギーは、最終的に活性酸素種の発生につながり、(便宜上、損傷と修復を分けずに考えると)光化学系 II タンパク質複合体 (PSII: photosystem II) の光阻害を促進することが分かっている<sup>1,2)</sup>。光合成生物は、この PSII による水分解及び電子伝達反応過程でルーメン側に蓄積した水素イオンを利用し、ATP 合成酵素を駆動させることで生物エネルギーを生産する。また、同時に電子伝達反応では生物反応に必要な還元力の産生を行っている。最終的に、これら ATP と還元力を用いてカルビンベンソンサイクルにおいて二酸化炭素を固定し、有機物を生産する。つまり、全ては PSII での反応を起点とするため、このタンパク質複合体の損傷は、光合成の失活ひいては細胞死そのものへと繋がる恐れがある。一方で、このような危険のみを重視し、地球上に降り注ぐ太陽光の最大強度に適した光合成系を作ってしまうと、多くの条件において効率の悪い光

<sup>†</sup>解説特集「若手光合成研究者による光合成研究の新展開」

\*連絡先 E-mail: tokutsu@nibb.ac.jp



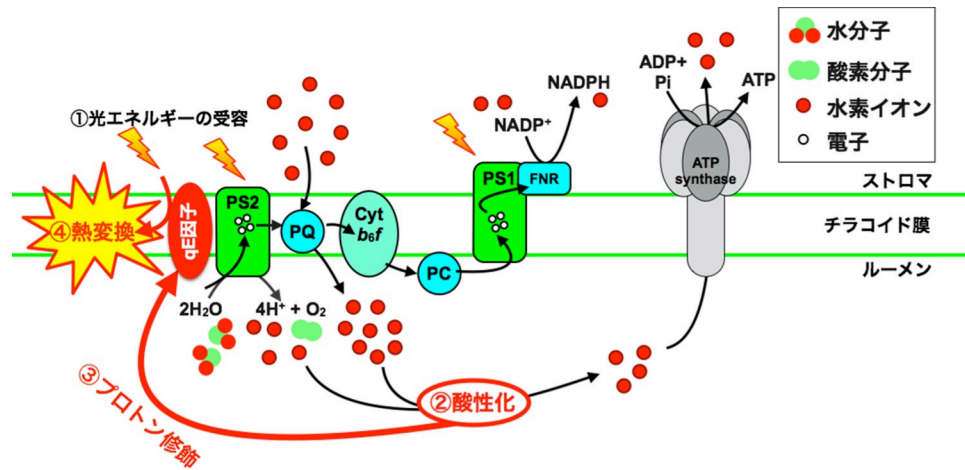


図 1. 光合成電子電反応に伴う負のフィードバック機構 (qE クエンチング) のモデル図  
 ①光エネルギーの需要、②ルーメン酸性化、③qE 関連タンパク質のプロトン修飾、④光エネルギーの熱変換、  
 はそれぞれ本文に内容を記載。

合成になってしまい、過酷な生存競争に生き残れない可能性を増やしてしまう。我々から見れば当然のことに思うかもしれないが、光合成生物はこのような板挟み状態から抜け出すために、その誕生から 27 億年もの時をかけて『過剰な光エネルギーを受け取った時だけ PSII を保護する仕組み』を持つように進化を遂げたようである。

では、PSII を保護する仕組みとは一体どのようなものなのだろうか？ひとつは、過剰な光エネルギーによって発生する活性酸素種を消去する抗酸化物質や活性酸素消去酵素の働きがある。これらの物質や酵素は、発生してしまった活性酸素を除去することから、ある意味後手・受動的な適応反応と言える。一方、もうひとつの強光防御の仕組みとして、そもそも活性酸素を発生させないために『余分な光エネルギーを消去する』反応が存在する。この仕組みは植物や緑藻では qE クエンチング (陸上植物を用いた研究では一律に NPQ と称される場合が多い) と呼ばれており、過剰な光エネルギーを受け取った際に駆動されることが分かっている。qE クエンチングは、光エネルギーそのものを熱エネルギーへと変換して消去し PSII へのエネルギー伝達を抑制することから、活性酸素の除去反応とは異なり、いわゆる先手の防御機構である。qE クエンチングの存在は 50 年近く前に認識されおり<sup>3-5)</sup>、これまでの研究によりこの反応には特定のカロテノイド色素 (キサントフィル色素の一つであるゼアキササンチン)<sup>6)</sup> お

よびタンパク質 (陸上植物では PsbS、藻類では LHCSR)<sup>7)</sup> の関与が示唆されている。読者の中には既に良くご存知の方もいると思うが、まずはこれまでに分かっている陸上植物における qE クエンチングの作動機序を紹介したい。現在までに提唱されている仮説は次の通りである (図 1)。

- ① PSII は強い光を受け取ることで電子伝達反応を強力に駆動する。
- ② 上記 1 の反応促進によりチラコイド膜の内側 (ルーメン) の酸性化を促す。
- ③ ルーメン側の酸性化によりキサントフィルサイクルが活性化し、ゼアキササンチンが蓄積する。同時に qE 関連タンパク質 (特に PsbS) がプロトン修飾されることで活性化する。
- ④ ゼアキササンチンおよび活性化 qE 関連タンパク質は、光エネルギーを熱エネルギーへと変換する。

以上の反応をもう少し詳しく説明すると、通常の光合成反応では、光エネルギーを受け取った光化学系はそのエネルギーを利用し、水の分解あるいは電子伝達を駆動することでチラコイド膜のルーメン側に水素イオンを蓄積する。ルーメン側に水素イオンが蓄積することで、その濃度勾配ポテンシャルを利用して ATP 合成酵素を駆動し、ATP を合成する。この反応は細胞内エネルギーを生産する重要な反応である一方、水素イオンを利用した qE クエンチングの駆動を制御しており、ルー

メン側の酸性化が進むほど大きな qE クエンチング (光エネルギーの消失) が起きることが分かっている。つまり、過剰な光により、ATP 合成酵素の働きが間に合わないくらい電子伝達反応が促進されると、ルーメン側へ多量に水素イオンが蓄積し、その結果、光阻害を抑制するための防御機構として受け取るべき光エネルギー量の調整 (qE クエンチング) を行うのである。この負のフィードバック制御機構は、刻々と光環境が変化する自然界の中で、光合成生物が光化学系の機能 (電子伝達反応) そのものを利用しながら光化学系を守るといふ、攻防一体の極めて合理的な適応戦略であるように思う。

このように、qE クエンチングのメカニズムは生理学的には解明されているように見えるが、一方で、光合成系における qE クエンチングの反応場や分子メカニズムは、現状よくわかっていない。その代表的なものとして、陸上植物における PsbS、藻類における LHCSR といった因子が、ルーメン側の酸性化により『どのように (単独?あるいはタンパク質間相互作用を経て?)』『チラコイド膜内のどこで』光エネルギーを熱へと変換するのかは分かっておらず、qE クエンチングの実体・反応場についての知見は十分とは言えない。

### 3. qE クエンチング関連タンパク質

これまでに、少なくとも陸上植物における PsbS 依存的 qE クエンチングに関して様々な生理・生化学的研究がなされてきた。面白いことに、現在もなお PsbS がチラコイド膜内で『他の光化学系タンパク質と相互作用して直接的に qE クエンチングを活性化させる説』と『チラコイド膜構造・光化学系間相互作用を制御することで間接的に qE クエンチングを活性化させる説』の2つの説で議論が続いている。前者を主張する報告の一つとして、*in vitro* での LHCI-PsbS 複合体形成実験が挙げられる<sup>8)</sup>。この報告では、リポソーム内に LHCI と PsbS を再構成することで明確なクエンチング効果を持つことを示している。しかしながら、これまでのところ LHCI-PsbS 複合体あるいは PSII-PsbS 複合体が安定して精製されたことはなく、上記の複合体が実際に生体内にて形

成されているのかは謎のままである。一方で、2000 年代後半より、PsbS がチラコイド膜構造の変化 (グラナスタックの解離) に関与し、これに伴いクエンチング能を持つ LHCI 凝集体の形成を促進するといった報告が多くなってきた<sup>9,10)</sup>。このように、PsbS の機能は未だ謎に満ちており、ごく最近報告された PsbS の結晶構造からは、クロロフィル *a* や *b* といった色素を持つことが示唆されたため<sup>11)</sup>、PsbS 自身がクエンチング能を持つ可能性も捨てきれない。今後 PsbS と qE クエンチングの関連性が、どのように決着が付くのが実に興味深い。

一方、緑藻では LHCSR3 と呼ばれるタンパク質が qE クエンチングに必須であることがわかっている<sup>12)</sup>。先の研究により、LHCSR3 は強光を照射することで経時的に発現誘導され、チラコイド膜に局在する膜タンパク質であることが報告されている<sup>13)</sup>。その機能に関する唯一の報告として、LHCSR3 リコンビナントの解析結果から LHCSR3 そのものがクエンチング能力を持つことが報告されたが<sup>14)</sup>、このタンパク質が生細胞内において単独で機能するのか、あるいは他の光合成タンパク質と相互作用することで qE クエンチングに寄与するのかは殆ど分かっていなかった。

このように、陸上植物における PsbS や、緑藻における LHCSR3 といった『qE クエンチングに必須であるもののチラコイド膜内局在・機能が不明』なタンパク質の存在は、多くの研究者の興味を魅きつけながらも、その実体は謎のベールに覆われた状態であった。筆者が考えるに、その最大の理由は、現在まで qE クエンチングの研究において代表的に用いられてきた陸上植物や緑藻から、光化学系反応中心およびその周辺集光タンパク質 (LHCI および LHCI) を含む光化学系タンパク超複合体を”intact”かつ”active”な状態で精製する技術が十分に確立していなかったことであろう。そもそも、qE クエンチングに関与する物質 (ゼアキサンチンや、緑藻の LHCSR) は主に強光条件下で葉緑体内に蓄積するものが多い。こういった条件下では光化学系タンパク質そのものが傷つきやすく不安定な状態になりがちなた

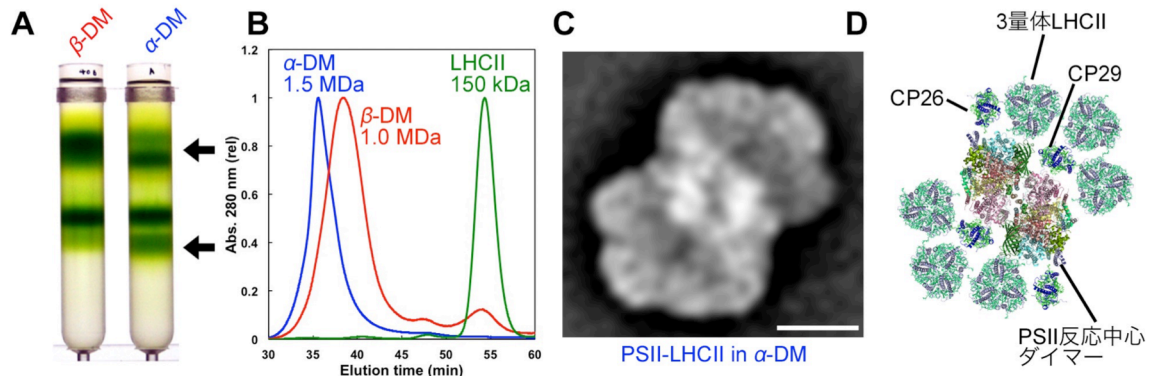


図 2. 緑藻の PSII-LHCII 超複合体の精製と構造. Tokutsu et al. (2012)<sup>24</sup>より改変

(A) 2種の界面活性剤 ( $\beta$ -DM および  $\alpha$ -DM) を用いたショ糖密度勾配超遠心による緑藻光化学系タンパク質の精製。(B) ショ糖密度勾配超遠心で得られた PSII-LHCII 画分 (A の矢印部分) のゲル濾過クロマトグラフィー。(C) PSII-LHCII 超複合体のネガティブ染色・単粒子解析像。(D) 既知の結晶構造モデル (PSII コアダイマー<sup>26</sup>) および LHCII<sup>27</sup>) を単粒子解析像上へ配置した PSII-LHCII 超複合体構造モデル. コアダイマーに対して三量体 LHCII が 6 つ、単量体 LHCII が 4 つ回転対称的に配位されていると予想される。

め、“intact & active”な状態の光化学系超複合体の単離・精製は、より困難であると想像できよう。

#### 4. qE クエンチングの実体解明へ

このような現状を打破すべく、筆者らは植物や藻類の中でも比較的強光に耐性を持つモデル緑藻クラミドモナスを用い、これまで培ってきた葉緑体の迅速な単離法や、ショ糖密度勾配超遠心分離法による光合成器官の精製技術を駆使し、強光下で培養した緑藻内から従来よりも“intact”かつ“active”な『光化学系超複合体』を取り出すことに挑戦してきた。これまでの研究では、緑藻の光化学系超複合体の精製には界面活性剤である  $\beta$ ドデシルマルトシド( $\beta$ -DM)<sup>15-17</sup>が用いられてきたが、チラコイド膜から 2 つの光化学系超複合体 (PSII-LHCII および PSI-LHCI) を同時に取り出すまでには至っていなかった。特に、緑藻 PSII-LHCII 超複合体に関しては、十分な解像度での構造解析に足る精製手法は確立されておらず、陸上植物の PSII-LHCII 構造解析<sup>18-20</sup>に完全に遅れを取るレベルであった。当時、学生であった筆者は様々な界面活性剤を用い、チラコイド膜の可溶化条件を検討したが、一向に PSII-LHCII らしき複合体を得ることが出来なかった。しかし、(研究室の試薬棚奥深くに常温保管されてあった数年ものの)  $\alpha$ ドデシルマルトシド( $\alpha$ -DM)を (ダメもとで) 用いたところ、意外にも従来見ること

のなかった新たな複合体が検出されたのである (図 2A)。

$\alpha$ -DM は、1990 年代終盤から陸上植物を用いた光合成研究に使われ始めていた界面活性剤であり、近年までに多くの光化学系タンパク質複合体の単粒子解析が報告されている<sup>20-23</sup>。ただ、 $\alpha$ -DM は高価なこともあつたか、緑藻を含めて藻類の光化学系タンパク質精製に利用された報告はなく、その効果は謎なままであった。結果的に、新鮮な  $\alpha$ -DM を用いてチラコイド膜の可溶化条件を再検討することで、緑藻から高い酸素発生活性を持つ PSII-LHCII 超複合体が得られたのである<sup>24</sup>。この PSII-LHCII 超複合体は分子量 150 万にもおぼり (図 2B)、電子顕微鏡によるネガティブ染色および単粒子解析の結果、PSII コアダイマーに対して三量体 LHCII が 6 つ含まれており、巨大なタンパク質複合体構造を持つことが分かった (図 2C, D)。このことは、陸上植物および緑藻から従来得られていた PSII-LHCII 超複合体<sup>15,20</sup>よりも“intact”な超複合体の精製に成功したことを示しており、ようやく qE クエンチング駆動条件下における光化学系超複合体の分子基盤に迫る準備が整ったのである。

このようにして確立した緑藻の光化学系超複合体精製法<sup>24</sup>を用い、qE クエンチングを駆動している緑藻から LHCSR3 の精製を試みた。ショ糖密度勾配超遠心法およびアフィニティークロ

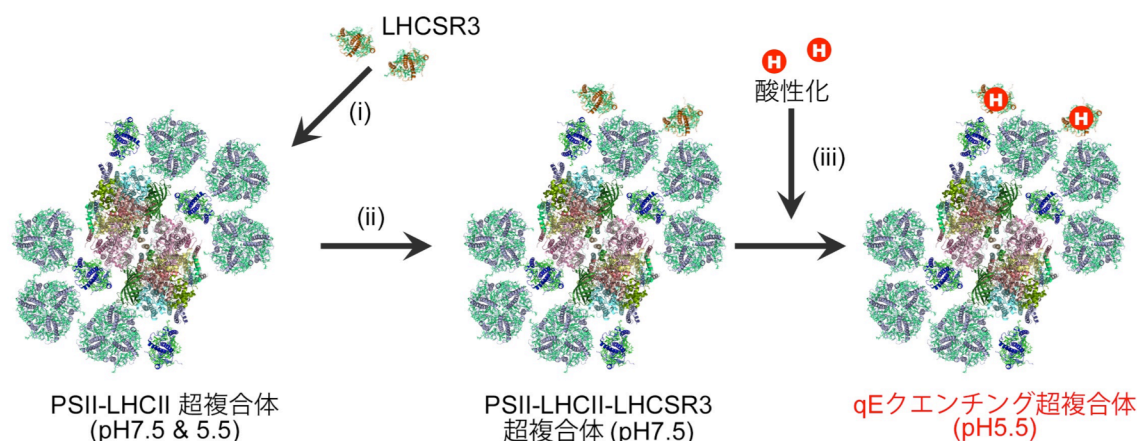


図 3. PSII 超複合体における光エネルギーのクエンチングモデル. Tokutsu & Minagawa (2013)<sup>25)</sup>より改変 (i) 強光により LHCSR3 が発現し、(ii) PSII-LHCII 超複合体に結合する。(iii) 周辺環境の酸性化に伴い、LHCSR3 がプロトン化され、PSII 超複合体は光を消去するクエンチング状態に遷移する。

マトグラフィーによる光化学系精製の結果、LHCSR3 の多くは(おそらく生化学的操作の過程で)遊離していたものの、一部は明確に PSII-LHCII 超複合体に結合していることが明らかになった。つまり、LHCSR3 は PSII へと結合することで qE クエンチングに寄与する可能性が出てきたのである。そこで、LHCSR3 を結合した PSII-LHCII 超複合体が qE クエンチング能を有するかを確認するため、クロロフィル蛍光寿命解析を行ったのだが、予想に反して、この巨大 PSII-LHCII-LHCSR3 超複合体に光を照射しただけでは、光エネルギーの消失(クロロフィル蛍光寿命の変化)は殆ど起きなかった。ところが、この超複合体を『過剰な光が当たったときのルーメン側の酸性状態』を模したバッファーに再懸濁したところ、蛍光寿命成分が変化し、平均蛍光寿命が有意に短くなる(照射した光エネルギーが消失)ことが見事に実証された(図 3)。その一方で、(精製過程で LHCII と共に遊離したと思われる)単独の LHCSR3 は、酸性条件下においても蛍光寿命が変化を示さなかったことから、qE クエンチングには PSII-LHCII-LHCSR3 超複合体の形成が必須であると考えられる。これらの結果は、PSII-LHCII-LHCSR3 超複合体こそが、これまで長らく実体が分からなかった qE クエンチング反応の場であることを意味している<sup>25)</sup>。

興味深いのは、単離された PSII-LHCII-LHCSR3

超複合体に含まれる LHCSR3 の分子数は、集光アンテナである LHCII と比較すると非常に少ない(生化学的な解析からは得られた超複合体サンプル中の LHCSR3/PSII コアダイマー比は約 0.28 であることがわかっている)にもかかわらず、明確に qE クエンチングへ寄与している点である。一体 LHCSR3 はどのように qE クエンチングに関与しているのだろうか?そして、PSII-LHCII-LHCSR3 超複合体内のどの部分で光エネルギーが熱エネルギーへと変えられるのであろうか?現在その謎を解明すべく、さらなる高速領域(フェムト秒スケール)でのクロロフィル蛍光寿命解析を試みている。今後、さらなる生化学技法の進展と生物物理学の融合により、qE クエンチングに伴う光エネルギーの移動・消失場所やその分子メカニズムの全容解明を目指すところである。

## 5. おわりに

光合成生物の光環境適応メカニズムは、まだまだ未解明な部分が多い。多くの先人たちの研究を含め、現在までの研究成果からようやく緑藻における強光適応の分子メカニズムの一端が垣間見えてきたところである。本稿で紹介した LHCSR3 は核コード遺伝子であり、強光による発現制御を受け、最終的に葉緑体チラコイド膜の中で PSII と結合して qE クエンチングに寄与する。一見、



簡単なことのように見えるが、光を受け取ってから核における転写制御、葉緑体 (PSII-LHCII 超複合体まで) へのタンパク質移行を考えると、その細胞内シグナリングは複雑かつ非常に興味深い。光合成生物が受け取った光エネルギーの過不足を『どこで (入口)』認識し、『どのようなシグナル伝達 (経路)』により遺伝子の発現制御をおこない、『何が起きるのか (出口)』を通して解明することは、長きにわたり自然界に生き続ける光合成生物の妙を理解する上で新たな視点、つまり新展開を導いてくれるのではないかと期待している。

### 謝辞

本稿で紹介した研究内容は、基礎生物学研究所の皆川純先生の研究室において行われました。また、生化学的手法の指導は、カリフォルニア大学・バークレー校の岩井優和博士、クロロフィル蛍光測定 of 指導は基礎生物学研究所の滝澤謙二博士、電子顕微鏡観察は加藤信泰氏およびポール・シェラー研究所の石川尚博士との共同研究として行われました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。最後になりますが、本稿執筆の機会を与えて下さった岡山大学の高橋裕一郎先生に心より感謝致します。

Received February 21, 2016; Accepted February 23, 2016;  
Published April 30, 2016

### 参考文献

1. Takahashi, S. and Murata, N. (2008) How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci.* 13, 178-182.
2. Nishiyama, Y. and Murata, N. (2014) Revised scheme for the mechanism of photoinhibition and its application to enhance the abiotic stress tolerance of the photosynthetic machinery. *Appl. Microbiol. Miotechnol.* 98, 8777-8796.
3. Papageorgiou, G. and Govindjee. (1968) Light-induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll a in vivo. II. *Chlorella pyrenoidosa*. *Biophys. J.* 8, 1316-1328.
4. Murata, N. and Sugahara, K. (1969) Control of excitation transfer in photosynthesis. 3. Light-induced decrease of chlorophyll a fluorescence related to photophosphorylation system in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 189, 182-192.
5. Wraight, C. A. and Crofts, A. R. (1970) Energy-dependent quenching of chlorophyll alpha fluorescence in isolated chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 17, 319-327.
6. Demmig-Adams, B. and Adams, W. W., 3rd. (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1, 21-26.
7. Niyogi, K. K. and Truong, T. B. (2013) Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 307-314.
8. Wilk, L., Grunwald, M., Liao, P. N., Walla, P. J. and Kuhlbrandt, W. (2013) Direct interaction of the major light-harvesting complex II and PsbS in nonphotochemical quenching. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 110, 5452-5456.
9. Kereiche, S., Kiss, A. Z., Kouřil, R., Boekema, E. J. and Horton, P. (2010) The PsbS protein controls the macro-organisation of photosystem II complexes in the grana membranes of higher plant chloroplasts. *FEBS Lett.* 584, 759-764.
10. Kiss, A. Z., Ruban, A. V. and Horton, P. (2008) The PsbS protein controls the organization of the photosystem II antenna in higher plant thylakoid membranes. *J. Biol. Chem.* 283, 3972-3978.
11. Fan, M., Li, M., Liu, Z., Cao, P., Pan, X., Zhang, H., Zhao, X., Zhang, J. and Chang, W. (2015) Crystal structures of the PsbS protein essential for photoprotection in plants. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 729-735.
12. Peers, G., Truong, T. B., Ostendorf, E., Busch, A., Elrad, D., Grossman, A. R., Hippler, M. and Niyogi, K. K. (2009) An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis. *Nature* 462, 518-521.
13. Allorent, G., Tokutsu, R., Roach, T., Peers, G., Cardol, P., Girard-Bascou, J., Seigneurin-Berny, D., Petroustos, D., Kuntz, M., Breyton, C., Franck, F., Wollman, F. A., Niyogi, K. K., Krieger-Liszka, A., Minagawa, J. and Finazzi, G. (2013) A dual strategy to cope with high light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 25, 545-557.
14. Bonente, G., Ballottari, M., Truong, T. B., Morosinotto, T., Ahn, T. K., Fleming, G. R., Niyogi, K. K. and Bassi, R. (2011) Analysis of LhcSR3, a

- protein essential for feedback de-excitation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS Biol.* 9, e1000577.
15. Nield, J., Kruse, O., Ruprecht, J., da Fonseca, P., Büchel, C. and Barber, J. (2000) Three-dimensional structure of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechococcus elongatus* photosystem II complexes allows for comparison of their oxygen-evolving complex organization. *J. Biol. Chem.* 275, 27940-27946.
  16. Takahashi, H., Iwai, M., Takahashi, Y. and Minagawa, J. (2006) Identification of the mobile light-harvesting complex II polypeptides for state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 477-482.
  17. Germano, M., Yakushevskaya, A. E., Keegstra, W., van Gorkom, H. J., Dekker, J. P. and Boekema, E. J. (2002) Supramolecular organization of photosystem I and light-harvesting complex I in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 525, 121-125.
  18. Nield, J. and Barber, J. (2006) Refinement of the structural model for the photosystem II supercomplex of higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 353-361.
  19. Nield, J., Orlova, E. V., Morris, E. P., Gowen, B., van Heel, M. and Barber, J. (2000) 3D map of the plant photosystem II supercomplex obtained by cryoelectron microscopy and single particle analysis. *Nat. Struct. Biol.* 7, 44-47.
  20. Caffarri, S., Kouřil, R., Kerešič, S., Boekema, E. J. and Croce, R. (2009) Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *EMBO J.* 28, 3052-3063.
  21. Boekema, E. J., van Roon, H., van Breemen, J. F. L. and Dekker, J. P. (1999) Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Eur. J. Biochem.* 266, 444-452.
  22. Yakushevskaya, A. E., Jensen, P. E., Keegstra, W., van Roon, H., Scheller, H. V., Boekema, E. J. and Dekker, J. P. (2001) Supermolecular organization of photosystem II and its associated light-harvesting antenna in *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* 268, 6020-6028.
  23. Dekker, J. P., van Roon, H. and Boekema, E. J. (1999) Heptameric association of light-harvesting complex II trimers in partially solubilized photosystem II membranes. *FEBS Lett.* 449, 211-214.
  24. Tokutsu, R., Kato, N., Bui, K. H., Ishikawa, T. and Minagawa, J. (2012) Revisiting the supramolecular organization of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 287, 31574-31581.
  25. Tokutsu, R. and Minagawa, J. (2013) Energy-dissipative supercomplex of photosystem II associated with LHCSR3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 10016-10021.
  26. Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A. and Saenger, W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9 Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 334-342.
  27. Standfuss, J., Terwisscha van Scheltinga, A. C., Lamborghini, M. and Kühlbrandt, W. (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* 24, 919-928.

## Photosynthetic Photo-Acclimation; Recent Insights and Future Impacts

Ryutaro Tokutsu\*

National Institute for Basic Biology

## 解説

酸素発生型光合成の成立過程とその実証方法の再考<sup>†</sup>

<sup>1</sup>立命館大学 生命科学部 生命情報学科 <sup>2</sup>東京工業大学 地球生命研究所  
浅井 智広<sup>1\*</sup> 塚谷 祐介<sup>2</sup>

酸素発生型光合成の成立過程は光合成研究における未解決の大きな謎である。その解決を阻んでいる最大の問題点は、酸素発生型光合成と酸素非発生型光合成の間の不連続性である。本稿では、クロロフィルの進化と Z スキーム型の光合成電子伝達系の成立過程を再考する。古くから提唱され、今なお更新され続けている進化モデルである“Selective-loss モデル”を紹介し、よく知られた“Fusion モデル”と比較しながら両者の信憑性を議論する。さらに、進化の実証を目指した合成生物学的な実験手法である、“人工的逆行進化実験”(ARE-WE)、“意図的進化駆動実験”(IF-WE)、“人工的前酸素発生型光合成生物創生”(Creap-OP)について解説する。

## 1. はじめに

光合成研究の専門分野は多岐にわたっており、光合成研究に携わるようになった経緯は人それぞれであろう。しかし、「Z スキーム」をご存知ない方はいないと思うし、その成立過程に興味をもったことのある方は多いのではないだろうか。「酸素発生型光合成は酸素非発生型光合成から進化した」、「シアノバクテリアが水を酸化するようになって地球に酸素があふれるようになった」、このようなストーリーは誰もが一度は見聞きしたことがあるはずである。ところが、シアノバクテリアが生まれるよりも以前の光合成について、いくつか文献<sup>1,2)</sup>を調べればすぐに、現時点で確定的なことは非常に少ないことに気付く。酸素発生型光合成や Z スキームの成立過程は、今でも光合成研究における未解決の大きな謎なのだ。かく言う著者の浅井は、この謎に魅せられ、その実証を目指して光合成研究の世界に飛び込んだ(無謀な人間の一人である)。もう一人の著者である塚谷は、光合成の多様性に興味を持ち、種々様々な光合成細菌を研究材料としているうちに、この問題に突き当たった(幸運な人間の一人である)。酸素発生型光合成の成立過程を謎にしている最

大の原因は、酸素発生型光合成と酸素非発生型光合成の間の不連続性である。つまり、現存する光合成生物から過去の光合成生物を推測するために必要な“中間的な性質”をもつ光合成生物(Missing link)が見つかっていないことである<sup>3)</sup>。この不連続性を解決するために、いくつかの進化モデルが提案されており、その実証を目指して新しい研究が展開されている。本稿では、酸素発生型光合成の成立過程のモデルを再考し、その実験的な証明に向けた最新の研究展開を解説する。

## 2. 酸素発生型光合成の成立に潜む不連続性

現代の酸素発生型光合成(OP, Oxygenic photosynthesis)が、シアノバクテリアの祖先に由来していることは多くの研究者が認めている<sup>1-5)</sup>。一方、地球上で初めてOPを行ったのがシアノバクテリアの祖先であることを認める限り、それ以前の光合成が酸素を発生しない酸素非発生型光合成(AP, Anxygenic photosynthesis)であったことは疑いない<sup>3,4)</sup>。現代に生きるAP生物は、シアノバクテリア以外の原核光合成生物、通称「光合成細菌」だけである<sup>6)</sup>。別なメカニズムの光合成として、光駆動性プロトンポンプであるバクテリオロドプシンによる光合成が存在するが、クロロフィルを使用する光合成とは全く異なる由来をもつため<sup>1,6)</sup>、OPあるいはZスキームの進化に直

<sup>†</sup>解説特集「若手光合成研究者による光合成研究の新展開」

\*連絡先 E-mail: cazai@fc.ritsumei.ac.jp



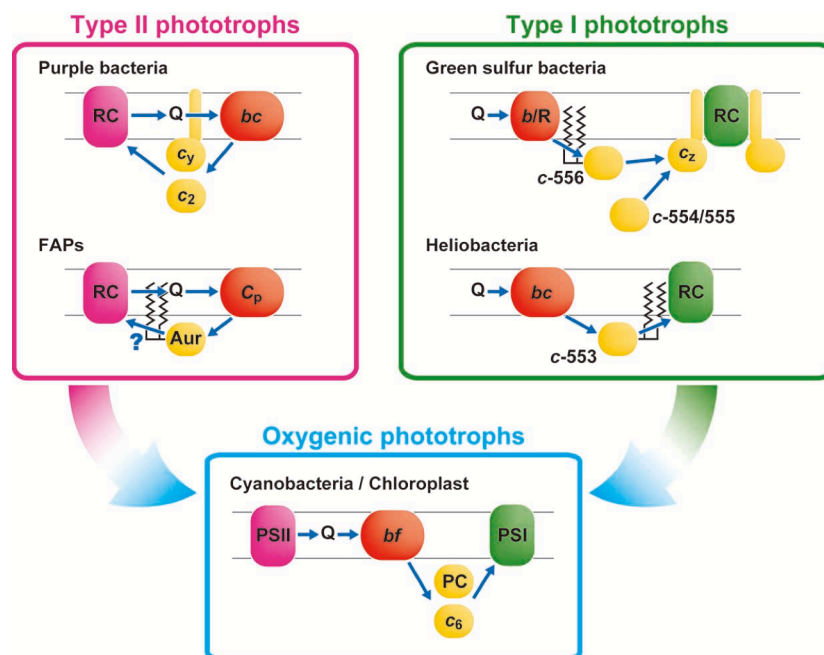


図 1. 代表的な光合成生物の光合成電子伝達系の模式図 (C. Azai *et al.* (2010)<sup>7)</sup> から抜粋)

矢印は電子の流れを表している。略語: RC, 光合成反応中心複合体; PSI, 光化学系 I; PSII, 光化学系 II; Q, キノンプール; *bc*, *b/R*, *bf*, *C<sub>p</sub>*, 各種キノール酸化還元酵素; *c<sub>2</sub>*, *c<sub>y</sub>*, *c<sub>z</sub>*, *c-554/555*, *c-556*, 各種シトクロム *c*; PC, プラストシアニン; *Aur*, オーラシアニン。This research was originally published in *Photosynth. Res.*<sup>7)</sup> © Springer Science+Business Media B.V.

接関係しているとは考えられず、本稿では議論の対象から除外する。シアノバクテリアでは、光化学系 I (PSI) と光化学系 II (PS2) という 2 種類の光合成反応中心複合体 (RC) が、キノール酸化還元酵素であるシトクロム *bf* 複合体と直鎖状の電子伝達経路を形成し、所謂 Z スキームで光合成電子伝達系を駆動している<sup>1,6,7)</sup> (図 1)。これに対し光合成細菌では、PSI (Type-1) または PS2 (Type-2) の機能的ホモログである 1 種類の RC のみが存在する。キノール酸化還元酵素と、Type-1 RC は直鎖状、Type-2 RC は環状の電子伝達経路を形成している<sup>1,6,7)</sup> (図 1)。不思議なことに、Type-1 RC と Type-2 RC の両方をもつ AP 生物は発見されておらず、これが OP あるいは Z スキームの成立過程を謎にしている最大の原因である<sup>3)</sup>。

現在までに報告されている全ての RC は生化学的性質および単結晶 X 線回折で得られた立体構造が酷似しており<sup>8)</sup>、現存する全ての RC が共通した 1 つの祖先型 RC から進化してきたことを示している<sup>1,2,8)</sup>。これは、現代の OP と AP の RC

が同じ由来をもつこと意味し、酸素発生能を獲得する以前の祖先型 OP (pre-OP) が、現存する AP 生物のもつ Type-1 RC と Type-2 RC に類似した、2 種類の RC (PS1 と PS2 の祖先分子) で構成されていたことを示唆している。従って、現在提唱されている OP の進化モデルの全てが、1 種類の RC の AP → 2 種類の RC の pre-OP → PS1 と PS2 の OP、という過程を想定している<sup>1,2)</sup>。しかし、2 種類の RC をもつ現存の AP 生物が発見されていないため、現時点で pre-OP の存在は実験的事実のない仮定である。pre-OP の存在を仮定せずに、1 種類の RC しかもたない AP と 2 種類の RC をもつ現代の OP を結びつけるためには、1) バクテリアオクロフィル (BChl) *a* からクロフィル *a* (Chl) への変化(クロフィルの進化)、2) Type-1 RC と Type-2 RC の共存 (Z スキームの進化)、3) Type-2 RC の水分解活性の獲得 (PS2 の進化)、4) Type-1 RC の酸素耐性化 (PS1 の進化)、といった飛躍的な変化が短期間 (といっても地球史レベルの時間) に一度に起こる必要がある。これら 4 つの大きな変化は、実験事実に基づいた具体的な

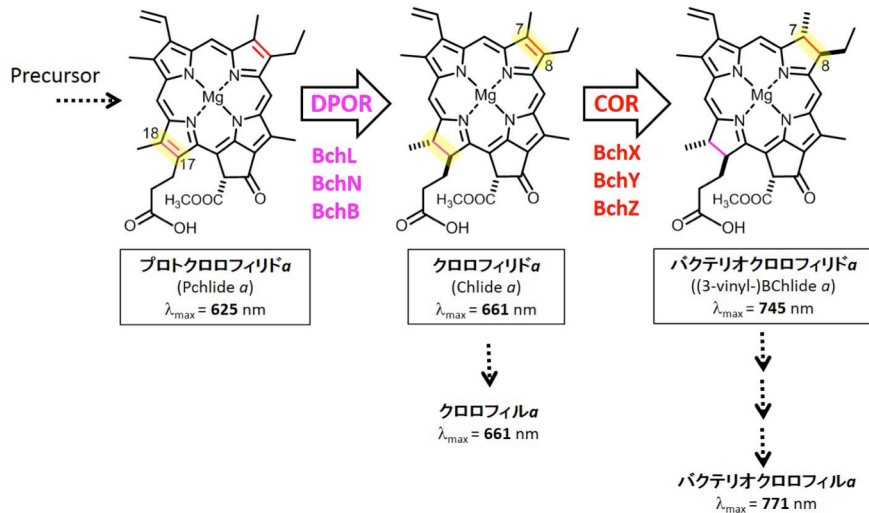


図 2. 光合成細菌における Pchl *a* からの Chl *a* と BChl *a* の生合成の概略図

DPOR は BchL、BchN、BchB から成り、ポルフィリン骨格をもつ Pchl *a* の C17=C18 二重結合を還元する。COR は BchX、BchY、BchZ から成り、クロリン骨格をもつ Chl *a* の C7=C8 二重結合を還元する。3-vinyl-BChl *a* の C3 位の vinyl 基が acetyl 基に変換されて、BChl *a* が合成される。Chl *a* と BChl *a* は C17 位に長鎖炭化水素基がエステル結合し、それぞれ Chl *a* と BChl *a* となる。 $\lambda_{\max}$  は、各分子のエーテル中での  $Q_y$  吸収帯のピーク波長を示す。

分子進化過程が判明しておらず<sup>1,2)</sup>、AP から OP への進化のストーリーを不連続なものにしてしまっている。翻って、これら 4 つの分子進化過程さえ実証されれば、OP の成立過程は解明されたと言っても過言ではなく、これらの実証研究こそが今後の光合成研究に求められている。現在、1) ~4) の実証研究は個別になされており、3) については、米国の James P. Allen 博士らが、部位特異的な多重変異の導入による、紅色光合成細菌の Type-2 RC の一次電子供与体の高電位化と人工的な Mn クラスターの付加を研究している。詳しくは彼らの研究論文<sup>9-11)</sup>と総説<sup>12-14)</sup>を参照されたい。4) については、 $F_A/F_B$  タンパク質の進化が関係すると推測される<sup>1,15,16)</sup>。著者の塚谷は、光合成アシドバクテリア (クロラシドバクテリウム)<sup>17,18)</sup> から酸素耐性を示す Type-1 RC を世界で初めて単離し、亜鉛型 BChl *a* やカロテノイドサブユニットをもつなどの新たな形質を見出したが<sup>19)</sup>、酸素耐性機構や PS1 への進化との関わりは現時点で明確ではない。本稿では、特に 1) と 2) についての実証研究に焦点を当てる。

### 3. クロロフィルの進化 :

“Chl” が先か “BChl” が先か

現代の OP と AP では、光合成の光反応において重要なクロロフィルの分子種が異なっており、OP ではクロロフィル (Chl) *a*、AP ではバクテリオクロロフィル (BChl) *a* が主に使われている<sup>1)</sup>。Chl *a* と BChl *a* 以外に側鎖構造が異なるクロロフィルも存在し、OP では divinyl-Chl *a* や Chl *d*、AP では BChl *b* や BChl *g* を使う生物種も知られている<sup>20)</sup>。しかし、OP と AP で使われているクロロフィルの本質的な違いは、側鎖の官能基ではなく、骨格であるポルフィリン環の共役二重結合にある (図 2)。OP で使われている Chl *a* は C17-C18 結合が単結合となったクロリン環、AP で使われている BChl *a* は C17-C18 結合に加えて C7-C8 結合も単結合となったバクテリオクロリン環をもち、両者は  $\pi$  電子共役系の構造が違う<sup>20,21)</sup>。この骨格構造の違いから、Chl *a* よりも BChl *a* のほうがより長波長の  $Q$  吸収帯とより短波長の Soret 吸収帯 (B 吸収帯) をもち、RC 中での BChl *a* の  $Q_y$  吸収ピークは近赤外領域、Soret 吸収ピークは紫外領域にある<sup>21,22)</sup>。この光物性の違いは、1) クロロフィルを励起できる光質、2) 基底状態と励起状態のエネルギーギャップの大きさ、の 2 点について Chl *a* と BChl *a* に大きな違いをもたらし、それぞれ 1) 光合成による生育に必要な光環

境、2) 光合成で生産できるエネルギーの最大値に制限を与える。では、OP が生まれる以前の祖先型 RC は Chl *a* と BChl *a* のどちらの (あるいはそれ以外の) 骨格構造をもつクロロフィルを利用していたのだろうか？

クロロフィルの光物性と太古の地球の光環境から、Chl *a* と BChl *a* に限って、この問題を考えてみる。光合成が生まれた当時の地球は、主に CO<sub>2</sub> と水蒸気から成る厚い雲に覆われていたと考えられており、地表には紫外線や近赤外線がほとんど届かず、微弱な可視光が降り注ぐ環境であったことが推測されている (私信)。このような光環境では、BChl *a* よりも可視光領域の吸収断面積が広い Chl *a* を使うほうが<sup>21,22)</sup>、RC での光化学反応を効率良く駆動できたと考えられる。Chl *a* の大きなエネルギーギャップは、光励起後のエネルギー移動反応と電子移動反応において始状態と終状態のポテンシャル差に広いマージンを設定でき<sup>23)</sup>、逆反応の抑制に有利であると考えられる。また、クロロフィルの光化学反応では三重項励起状態のクロロフィルと分子状酸素との副反応が問題となるが<sup>24)</sup>、そもそも分子状酸素が存在しない嫌気的環境では消光機構の必要性は生じない<sup>1,2)</sup>。CO<sub>2</sub> と水蒸気から成る厚い雲は、その後徐々に晴れ上がり、地表の紫外線や近赤外線の放射強度も高くなっていったと考えられており、Chl *a* を使う光合成生物同士が可視光を奪い合う競争の中で、BChl *a* を使う光合成生物が進化してきたというシナリオが成り立つ。しかし、太陽光の届かない海底の熱水噴出孔の付近に生育し、地熱による黒体放射で光合成していると考えられる緑色硫黄細菌が単離されており<sup>25)</sup>、初期の AP 生物が太陽光を利用していなかった可能性も考えられる。地熱の放射スペクトルは可視光領域よりも長波長に偏っていることから、この場合は Chl *a* よりも BChl *a* の方がより効率の良い光合成に適していると考えられる。つまり、BChl *a* を使う初期の AP 生物が、海の表層あるいは地表に進出していく過程で、Chl *a* を使うように進化したというシナリオである。両者のシナリオの信憑性の判断には、初期の光合成生物の起源あるいは生命自体の起源についての情報が

必要である。

クロロフィルの生合成過程から同じ問題を考えてみる。Chl *a* と BChl *a* は、ポルフィリン環をもつプロトクロロフィリド (Pchl *a*) を出発物質として生合成される<sup>20,21)</sup>。Pchl *a* の C17=C18 二重結合を Pchl *a* 還元酵素 (POR, Pchl *a* oxidoreductase) が還元して Chl *a* の前駆体であるクロロフィリド (Chl *a*) が合成され、Chl *a* の C7=C8 二重結合を Chl *a* 還元酵素 (COR, Chl *a* oxidoreductase) が還元して BChl *a* の前駆体であるバクテリオクロロフィリド (BChl *a*) (正確には 3-vinyl-BChl *a*) が合成される<sup>20,21)</sup> (図 2)。つまり、BChl *a* のバクテリオクロリン環は、Chl *a* のクロリン環を基質として合成されるため、Chl *a* の生合成反応よりも還元反応が一段階多く、生合成に必要な酵素も 1 種類多い。これは一見すると、BChl *a* よりも Chl *a* の方が原始的な分子構造をもつクロロフィルであることを示しているように見える<sup>1,2)</sup>。POR には、Pchl *a* の光励起依存的な活性を示す LPOR (Light-dependent POR) と光非依存的な DPOR (Dark-operative POR) が知られており、シアノバクテリアは LPOR と DPOR の両方をもつが、光合成細菌は DPOR しか持たない<sup>26)</sup>。例外的に LPOR をもつ紅色光合成細菌も見つかっているが、シアノバクテリアからの遺伝子の水平伝播 (後述) で獲得したと考えられている<sup>27)</sup>。BChl *a* の生合成に必要な COR は、当然ながら光合成細菌 (AP 生物) にしか存在しない<sup>20,21)</sup>。DPOR と COR は、活性中心に鉄硫黄クラスターを含むタンパク質であり、酸素に対して極端に不安定な酵素である<sup>21,28,29)</sup>。しかし、OP 生物が生まれる以前の地球には分子状酸素が存在しないため<sup>1,4)</sup>、高い酸素感受性が光合成に悪影響を与えることはない。一方、LPOR の酵素活性は酸素で阻害されないことから<sup>26,29)</sup>、DPOR よりも後、地球に酸素があふれるようになってから獲得された酵素であると考えられる。つまり、初期の AP 生物や pre-OP 生物は、DPOR で Chl *a* を合成していたと考えられる<sup>1,2)</sup>。

興味深いのは、DPOR と COR はどちらも、窒素固定酵素ニトロゲナーゼと類似した構造を持

ち、ホモダイマー構造の還元サブユニットとヘテロテトラマー（ヘテロダイマーのホモダイマー）構造をもつ触媒サブユニットから構成されており<sup>26,30,31)</sup>、同じ祖先分子から進化してきたと考えられることである<sup>32,33)</sup>。最近、様々な光合成細菌のもつ COR が、C7=C8 二重結合の還元だけでなく、C8-vinyl 基の還元をも触媒できることが示された<sup>34-36)</sup>。これは COR が広い基質特異性をもつことを意味している。また、緑色硫黄細菌の DPOR は、本来の還元サブユニット (BchL、図 2) の代わりに、COR の還元サブユニット (BchX、図 2) を使ってキメラ化しても、本来の 90%程度の活性を発揮できることが報告されている<sup>37)</sup>。また著者の最近の研究では、緑色硫黄細菌の COR の還元サブユニットは BChl *a* の生合成に必須ではなく、破壊可能な遺伝子であることがわかっており、DPOR と COR の機能が一部重複していることが示されつつある (浅井、未発表データ)。初期の AP 生物では、ニトロゲナーゼから進化した DPOR と COR の祖先型酵素が、広範なポルフィリン誘導体を基質とし、その様々な部位の共役二重結合を還元でき、1 種類の酵素でクロリン環とバクテリオクロリン環を合成できた可能性が考えられる<sup>1,2,32,33)</sup>。もしそのような祖先型酵素が存在したとするならば、BChl *a* の生合成に必要な酵素は Chl *a* と変わらず、Chl *a* と BChl *a* が同時に存在した、あるいは BChl *a* が先に存在したというシナリオも成り立つ<sup>1,2)</sup>。COR 以外の BChl *a* 生合成に特異的な酵素である BchF の分子系統樹と、全ゲノム情報を基に作成した細菌界の系統樹を比較した最新の解析結果は、シアノバクテリアの系統発生以前に BChl *a* 生合成系が確立していたことを示唆しており<sup>38)</sup>、このシナリオを支持している。また、現代の AP 生物である緑色硫黄細菌、ヘリオバクテリア、光合成アシドバクテリアの RC には、BChl *a* (ヘリオバクテリアは BChl *g*) だけでなく Chl *a* も電子伝達コファクターとして含まれており<sup>19,39,40)</sup>、Chl *a* と BChl *a* の両方を使用する AP 生物は現存している。しかし、これらの AP 生物で Chl *a* と BChl *a* が同時に存在するようになった進化過程が不明であるため、Chl *a* と BChl *a* のどちらが先でも合理的なシナリ

オを考えることができ、現状では議論の決着には至っていない。DPOR と COR の進化から考えたクロロフィル進化過程の検証には、DPOR と COR の祖先型酵素の一次構造を構造アライメントや分子系統学的解析で予測し、人工的に作製した祖先型酵素の基質や反応部位の特異性を調べるといった、“人工的逆行進化実験” (ARE-WE, Artificial reverse evolution-wise experiment) と呼ぶべき研究が有効であろう。人工的な祖先型酵素が Pchl *a* を BChl *a* まで還元する活性を示せば、初期の AP 生物は BChl *a* あるいは Chl *a* と BChl *a* の両方を使っていたが、OP 生物が進化していく過程で Chl *a* だけを使うようになったというシナリオが、実験的に支持されるだろう。

#### 4. Z スキームの進化：

##### “Fusion” か “Selective-loss” か

Z スキーム型の光合成電子伝達系は OP の大きな特徴である。そのメカニズムの本質は、PS1 と PS2 という機能の違う 2 種類の RC の協同的な共存にある (図 1)。RC の機能は、一次電子供与体 (反応中心クロロフィル) の光誘起電荷分離反応とそれに続く電子移動反応として理解でき、励起された電子を伝達するアクセプター側と、酸化した一次電子供与体を再還元するドナー側の、それぞれにおいて最終的に生成される物質で特徴付けることができる<sup>8)</sup>。Type-1 RC は、アクセプター側で鉄硫黄クラスターを介してフェレドキシンを還元し、ドナー側でプラストシアニンやシトクロム *c* などの水溶性の電子供与体を酸化する<sup>7,8)</sup>。Type-2 RC は、アクセプター側でキノンを二重還元して膜内電子伝達体であるキノールを生成し、ドナー側で水やシトクロム *c* などの水溶性の電子供与体を酸化する<sup>7,8)</sup>。Type-1 RC はフェレドキシンを介して NADP<sup>+</sup>を直接還元できるため、細胞内の代謝反応に必要な還元力を効率良く供給できる。しかし、フェレドキシンの還元には、電子励起状態の一次電子供与体クロロフィル分子が低い酸化還元電位をもつことが必要で<sup>41,42)</sup>、光子のエネルギーによる制約から基底状態の酸化還元電位も低くなり、一次電子供与体の酸化力を上げることは難しい。これは、Type-1 RC の電

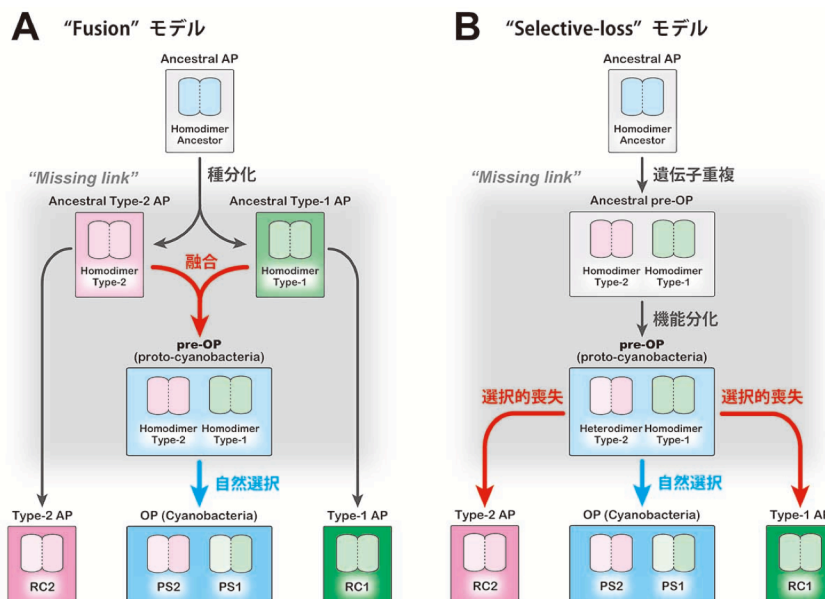


図 3. “Fusion モデル” (A) と “Selective-loss モデル” (B) の比較

矢印は生物種の進化を表し、上側から下側に行くほど現代に近づく。光合成生物を四角で表し、その中に光合成生物がもつ RC コアタンパク質を図示した。RC コアタンパク質のダイマー構造を 2 本のロッドと色で表わし、RC のタイプとともに各ロッドの下に記した。現時点で存在が確定していない “Missing link” を灰色の背景で示した。“Fusion モデル” と “Selective-loss モデル” では、AP 生物が系統発生する時点と pre-OP 生物が出現する時点が異なる。pre-OP 生物 (proto-cyanobacteria<sup>5)</sup>) から最初の OP 生物 (cyanobacteria) への進化には、どちらのモデルでも自然選択が必要である。略語：RC1, 光合成細菌型 Type-1 RC ; RC2, 光合成細菌型 Type-2 RC ; PS1, 光化学系 I ; PS2, 光化学系 II

子源となる物質が、水素や硫化物、有機酸などの還元的な物質に制限されることを意味する。一方、比較的酸化還元電位の高いキノールは、NADP<sup>+</sup>を直接還元できず(NADP<sup>+</sup>やキノールの相対量に依存した逆行的電子伝達反応<sup>43)</sup>で可能になる)、拡散範囲も膜内に限定されていることから、Type-2 RC は細胞内の還元力の供給システムには不向きである。しかし、その分、一次電子供与体クロフィル分子の酸化還元電位をより高くできるので、強い酸化力を産み出し、酸化的な環境下でも電子源となる物質が制限されにくい<sup>41,42)</sup>。OP の Z スキームでは、Type-1 RC の還元力と Type-2 RC の酸化力の高さを利用するために、両方の RC を使うことでそれぞれの酸化力と還元力の低さという互いに相補的な弱点が打ち消されている<sup>1,2,41,42)</sup>。では、なぜ現代の AP 生物は OP 生物と同じように 2 種類の RC を使わないのであろうか？

現代の AP 生物が 2 種類の RC を持たない原因をどのように設定するかによって、初期の AP か

ら pre-OP の進化過程に 2 種類の異なるモデルを考慮することができ<sup>1,2)</sup>、それぞれ “Fusion モデル”<sup>44,45)</sup> と “Selective-loss モデル”<sup>5,46,47)</sup> と呼ばれている (図 3)。Fusion モデルでは、Type-1 RC のみをもつ AP 生物と Type-2 RC のみをもつ AP 生物が「融合する」ことで pre-OP 生物が生まれたことを仮定する (図 3-A)。Selective-loss モデルでは、Type-1 RC と Type-2 RC の両方をもつ pre-OP 生物が、どちらか 1 種類の RC を「選択的に失う」ことで AP 生物が生まれたことを仮定する (図 3-B)。つまり、両モデルでは現代の AP 生物が系統発生する時点が異なっており、Fusion モデルでは pre-OP 生物の誕生よりも前、Selective-loss モデルでは pre-OP 生物の誕生よりも後である<sup>1,2)</sup>。問題はどちらのモデルが実際に起こった進化過程に近いかであるが、認知度で比較すると Fusion モデルをご存知の方は多いが、(著者の周辺だけの統計かもしれないが) Selective-loss モデルをご存知の方は非常に限定的であるように思う。Selective-loss モデルをご存知の方のほとんどが、



後に述べるホモダイマー型の Type-1 RC (RC1) の研究に関わったことがあることから、認知度の差は RC1 の研究者人口の少なさに因るところが大きく、両モデルの信憑性の高さは必ずしも相関していないと思われる。

Fusion モデル (図 3-A) は非常にシンプルな考えに基づいている。OP が進化する以前の AP 生物は、基本的に現代の AP 生物と同じ性質を持っていたとする考えである<sup>1,2,44)</sup>。OP 生物に 2 種類の RC が共存することになったのは、2 種類の AP が合わさって pre-OP 生物が生まれたからと説明される。「なぜ現代の AP 生物が 2 種類の RC を持たないのか」という問いに対しては、シアノバクテリアに進化した pre-OP 生物以外の全ての AP 生物が、誕生から現在に至るまで Type-1 RC か Type-2 RC しか持っておらず、そもそも 2 種類の RC を使うことができないからと説明される。異なる RC をもつ 2 種類の AP が融合するメカニズムとして最も有力視されているのは、遺伝子の水平伝播 (LGT, Lateral gene transfer または HGT, Horizontal gene transfer) である<sup>1,2,45)</sup>。細菌界では、ファージの感染、トランスポゾンの転移、プラスミドの接合伝達など、特定の DNA 領域が細胞分裂以外のメカニズムで種を越えて遺伝する現象は決して珍しいものではない。例えば、プロテオバクテリア門に広く分布している紅色光合成細菌は、光合成遺伝子クラスター (光合成装置と色素合成遺伝子のほとんどをコードした巨大な遺伝子クラスター) をもつことから<sup>48)</sup>、光合成をしないプロテオバクテリアの祖先が LGT によって光合成遺伝子クラスターを獲得して、紅色光合成細菌の祖先が誕生した可能性が考えられる。その逆も考えられ、紅色光合成細菌は、プロテオバクテリア門内で単系統群を形成しないこと<sup>6,49)</sup>、RC コアタンパク質遺伝子と 16S rDNA の分子系統樹が酷似していることから<sup>50)</sup>、LGT で光合成遺伝子クラスターを失った種が光合成をしないプロテオバクテリアとなったこともあり得る。紅色光合成細菌は Type-2 RC をもつ AP 生物であるが、同様の光合成遺伝子クラスターは Type-1 RC をもつグラム陽性細菌であるヘリオバクテリアのゲノムにも存在し<sup>51,52)</sup>、どちらかの遺伝子クラ

スターが LGT で他方に導入されれば、2 種類の RC の共発現が期待できる。しかしながら、細菌界において LGT が起こりやすいという事実は、同時に Fusion モデルに疑問も呈している。先述の通り、少なくとも紅色光合成細菌の光合成遺伝子クラスターは多数の細菌種間で頻繁に転移し、細菌界では常に LGT による Type-1 RC と Type-2 RC の共存が可能な状態にあると考えられる。実際、門レベルで異なる分類群の細菌種が、紅色光合成細菌由来と考えられる光合成関連遺伝子をもつ例が報告されている<sup>53)</sup>。LGT によって 2 種類の RC の遺伝子が共存した場合、各 RC の弱点を克服しやすい pre-OP が可能になるため、Type-1 RC と Type-2 RC の両方を使う AP 生物がもっと頻繁に発見されても良いはずである。仮に LGT の頻度が低いとしても、AP の歴史は 30 億年以上あり<sup>1,2)</sup>、その間に pre-OP 生物を産み出す LGT が一度しか起こらなかったとは考えにくい。また、どちらかの RC の機能的な問題で片方の遺伝子が不活性化されたとしても、偽遺伝子を含む遺伝子クラスターとしてゲノムに痕跡が残る可能性が高く、技術進歩が目覚ましい現代の比較ゲノム解析やメタゲノム解析で検出できていないという事実と矛盾してしまう。

Fusion モデルの最大の弱点は、Type-1 RC と Type-2 RC を最初から別の RC として扱い、複数種類の祖先的な AP 生物の存在を仮定する点にある。そのため、pre-OP の成立時に融合する AP 生物の性質の合致を考慮しなければならず、その検証には、融合が起こった当時の生物種のクロロフィルの分子種や電子伝達系、生理的性質などの推定が必要となる。現時点で最も新しい Fusion モデルでは<sup>45)</sup>、融合というシンプルな仮定とは裏腹に、現存の AP 生物の性質とのすり合わせのために、様々な遺伝子の獲得と喪失が入り乱れる複雑な進化過程となっている。また、Type-1 RC と Type-2 RC の成立過程を考慮していないこともモデルに矛盾を産み出す原因となっている。現存する全ての RC は、PS1、PS2、AP の Type-1 RC (RC1)、AP の Type-2 RC (RC2) の 4 種類に分けることができる<sup>8,41)</sup>。30 億年以上も前から存在しているながら、現代にはたった 4 種類しか存在し

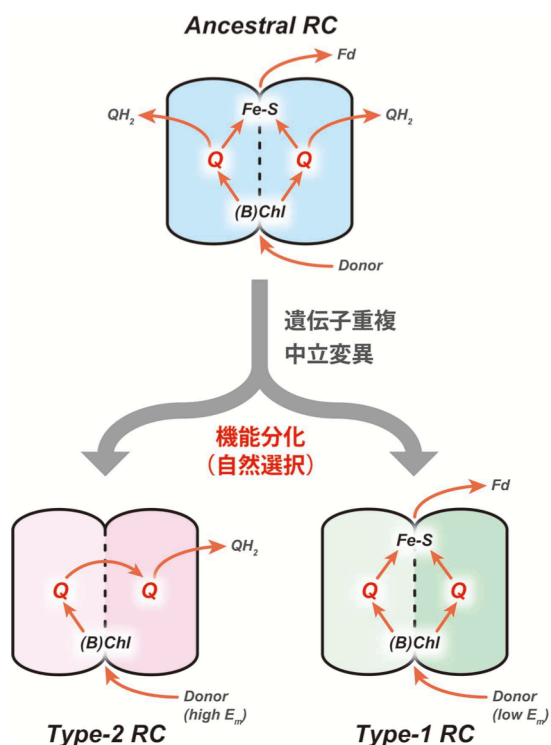


図4. 最新の Selective-lossモデル<sup>42)</sup>で仮定されている、祖先型 RC からの Type-1 RC と Type-2 RC の機能進化過程の模式図

赤色の矢印は電子移動経路を表す。灰色の矢印は分子進化を表し、上側から下側に行くほど現代に近づく。祖先型 RC はホモダイマーであるが、各 RC が機能分化すると同時にコアタンパクタンパク質がヘテロダイマー化する。Type-1 RC では、キノン電子受容体の二重還元活性を失い、フェレドキシンの還元の特化する。Type-2 RC では、鉄硫黄クラスターを失い、非対称な電子移動による、キノン電子受容体の効率的な二重還元機構“二電子ゲート”を獲得する。略語：(B)Chl, クロロフィルまたはバクテリオクロロフィル；Q, キノン；QH<sub>2</sub>, キノール；Fe-S, 鉄硫黄クラスター；Fd, フェレドキシン；E<sub>m</sub>, 酸化還元電位

ないのである。しかも先述の通り、機能的には Type-1 と Type-2 の 2 種類しかない。色素を結合している RC コアタンパク質のアミノ酸配列を多重アライメントすると、各種類の RC の中では高い配列相同性 (>50%) が見られるが、RC の種類をまたぐ配列比較では途端に相同性は低くなり (<20%)、組み合わせによっては 10%以下となる場合もある<sup>54)</sup>。一般に相同性が 25%以下になると、ホモロジーモデルでタンパク質の立体構造を予測することが困難になってくるが<sup>55)</sup>、近年解かれた PS1、PS2、RC2 の結晶構造では、色素や

タンパク質の位置や配向が酷似しており、全ての RC が同一の起源をもつことを強く示唆している<sup>8,41,54)</sup>。つまり、AP の Type-1 RC と Type-2 RC も同じ祖先から進化してきたことになり、それぞれの RC をもつ AP が融合する以前に、元々同じ AP 生物の RC だったことになる。Type-1 RC と Type-2 RC の由来が別々であるとする Fusion モデルでは、RC の構造と機能の多様性は過去を含めた全 AP 生物の種数だけ存在可能であり、現代の RC が 4 種類しかない、機能的には 2 タイプしかない原因を明確には説明出来ない。

Selective-loss モデル (図 3-B) は、最も複雑で発見頻度の低いはずの pre-OP から現代の全ての光合成が進化したと考えており、直感的には受け入れ難い考えのように思える<sup>2)</sup>。このモデルの本質は、Fusion モデルが考慮していない、Type-1 RC と Type-2 RC の機能分化のシナリオを考える点にある。最新の Selective-loss モデルでは<sup>42)</sup>、最も初期の祖先型 RC が Type-1 RC と Type-2 RC の両方の機能を有していたことを仮定する (図 4)。つまり、祖先型 RC は、末端電子受容体としてキノンと鉄硫黄クラスターの両方を持ち、キノールを生成することもフェレドキシンを還元することもできた、二機能性の RC であったと考える<sup>42)</sup>。当時の地球が嫌氣的で還元的であったことを考慮すれば、水素や硫化物、二価鉄など、電子源となる物質は豊富に存在し、一次電子供与体の酸化還元電位の低さ (酸化力の低さ) は問題にならなかった可能性が高く<sup>1,2)</sup>、むしろ還元力の生成量のほうが主な競争要因になっていたであろう。その後、遺伝子重複と中立変異および自然選択による RC の機能分化が起こり、Type-1 RC と Type-2 RC の両方をもつ pre-OP が誕生する<sup>42)</sup> (図 4)。Type-1 RC は、キノール生成の能力を捨てて還元力の生成に特化し、Type-2 RC は、徐々に枯渇していく電子源となる物質の獲得を容易にするために、フェレドキシンの還元能力を捨てた。さらに、Type-2 RC とキノール酸化還元酵素による環状の電子伝達経路が成立したことで (図 1)、過剰な光エネルギーが降り注いでも、ATP あるいはプロトン駆動力に変換できるようになり、酸化的な環境や強光環境での競争力が増したであろう<sup>42)</sup>。



pre-OP から OP への進化には、本稿第 2 節で述べた 3) Type-2 RC の水分解活性の獲得 (PS2 の進化) と 4) Type-1 RC の酸素耐性化 (PS1 の進化) が深く関わっていることは疑いない<sup>3,42)</sup>。pre-OP から現代の AP への進化は、その AP 生物の生育環境に合わせて、Type-1 RC または Type-2 RC を失った結果であると考えられる<sup>1,5,42)</sup>。鉄硫黄クラスターの酸素感受性を考慮すると、OP に進化せずに酸化的な環境で生育しようとしたものは Type-2 RC を残し、嫌気的な環境に生育場所を限定したものは Type-1 RC を残した<sup>42)</sup>。Selective-loss モデルでは、分子進化がひとつの生物個体の中で完結し<sup>1,5,42)</sup>、RC の機能進化と AP 生物と OP 生物の系統発生を分子進化と自然淘汰で理解できる。「なぜ現代の AP 生物が 2 種類の RC を持たないのか」という問いに対しては、好気環境では pre-OP は必然的に OP に進化すること、嫌気環境では pre-OP よりも Type-1 RC のみ

の AP の方が有利であり、pre-OP が淘汰されやすいことを原因とする<sup>42)</sup>。この点に Selective-loss モデルの弱点があり、単に環境の嫌気性だけが選択圧であるならば、Fusion モデルと同様、pre-OP 生物は少ないながらも現代に生き続けることができるはずであり、pre-OP に対する嫌気性以外の何らかの別の淘汰圧を考える必要がある<sup>42)</sup>(図 3-B)。

### 5. ホモダイマー RC から読み解く RC の進化過程

Fusion モデルには現存のデータとの矛盾点が多く、2002 年に最新のモデルに改訂されて以降<sup>45)</sup>、これを支持する顕著なデータは発表されていない。Selective-loss モデルは、1970 年に基となるモデルが提唱され<sup>46)</sup>、最近になってその信憑性が再評価されてきている<sup>3,5,42)</sup>。Selective-loss モデルの実証には、嫌気環境では pre-OP よりも

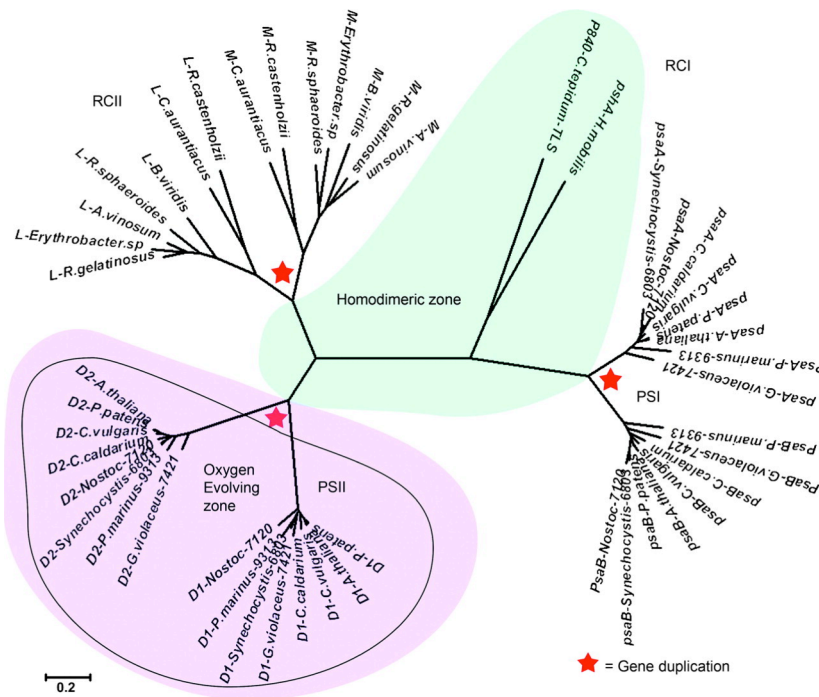


図 5. RC コアタンパク質の無根分子系統樹 (S. Sadekar et al. (2006)<sup>54)</sup> から抜粋)

RC コアタンパク質を構成する各ポリペプチドについて、PS1、PS2、RC2 の結晶構造が類似性を示す C 末端側の膜貫通ヘリックス 5 本分の領域のみのアミノ酸配列アライメントで作成された。系統樹は近隣結合法で計算され、各枝は 500 回のブートストラップ検定で存在が支持されている。星印でラベルされた分岐点は、ヘテロダイマーを構成する RC コアタンパク質の 2 本のポリペプチドが分岐している点。PS1、PS2、RC2 の結晶構造から作成した構造アライメントから、C<sub>α</sub>間の根平均二乗距離による距離行列で作成した系統樹、アミノ酸配列アライメントに変換して作成した系統樹でも、同じトポロジーが得られている<sup>54)</sup>。This research was originally published in *Mol. Biol. Evol.*<sup>54)</sup> © the Authors. (Oxford University Press より許可を得て転載)

Type-1 RC のみの AP が有利な原因の解明が必要である (図 3-B)。そのためには、まず現代の AP の Type-1 RC である RC1 の構造と機能を詳しく知る必要がある。著者は、大阪大学の大岡宏造博士と共に、RC1 の構造と機能を研究してきた。残念ながら、現時点で RC1 の結晶構造は解かれておらず、研究者人口の少なさから、機能に関する詳しい情報もまだまだ乏しい。しかし RC1 の研究を進めていくと、RC の進化に関するヒントが随所に見られることがわかってきた<sup>8,39,41</sup>。

RC1 は、緑色硫黄細菌<sup>39</sup>、ヘリオバクテリア<sup>40</sup>、光合成アシドバクテリア<sup>19</sup>がもつ Type-1 RC である。Type-1 RC であるという共通点以外の最大の特徴は、電子伝達コファクターを結合しているコアタンパク質がホモダイマー構造をとることである<sup>19,39,40</sup>。他の全ての RC はヘテロダイマー構造であるが<sup>8,41</sup>、ヘテロダイマー化は RC コアタンパク質の遺伝子重複によって容易に説明出来るため、祖先型 RC はホモダイマー構造であったと考えられている<sup>1,2,8,41,54</sup>。構造アライメントを基にした RC コアタンパク質の最新の分子系統樹は (図 5)、ヘテロダイマーを構成する各コアポリペプチドが RC の種類をまたいで系統群を形成することはなく<sup>41,54,56</sup>、PS1、PS2、RC2 の各系統で独自にヘテロダイマー化が起こったことを示している。RC1 でヘテロダイマーがホモダイマー化したという解釈も可能であるが、2 個 1 組の遺伝子が 1 個の遺伝子に縮小する分子進化的なメカニズムが考えにくい。一方、全ての RC コアタンパク質内では、ダイマーの  $C_2$  対称軸に沿って電子伝達コファクターが一見対称な 2 本の電子移動経路を形成している<sup>8</sup>。RC1 では機能的にも完全に対称と考えられているが<sup>8,39,40,57</sup>、PS2 や RC2 では対称位置にある 2 つのキノン電子受容体  $Q_A$  と  $Q_B$  の間で非対称な電子移動が起こり、 $Q_B$  のみが二重還元される<sup>8,41</sup> (図 4)。この“二電子ゲート”と呼ばれる、Type-2 RC を特徴付ける機能の獲得には、コアタンパク質のヘテロダイマー化による電子移動経路の非対称化が必須である。それにも関わらず、ヘテロダイマー化が各 RC の系統で独自に起こっているという事実 (図 5) は、二電子ゲートの獲得が収斂進化で

あり<sup>54,56</sup>、RC の進化過程で比較的起こりやすい事象であることを示唆している。興味深いことに、キノン電子受容体の物性が、同じ Type-1 RC である RC1 と PS1 では大きく異なっていることがわかってきている。これまで RC1 におけるキノン電子受容体の存在自体が謎であったが<sup>39,40</sup>、最近、ヘリオバクテリアの RC1 でメナキノンが二次電子受容体として機能していることが明らかになった<sup>56</sup>。一方、予想キノン結合部位の疎水性が低いこと<sup>47,55,58</sup>、色素分析で検出されるキノンが RC 当たり 1 分子程度であることなどから<sup>39,40</sup>、キノンの結合は弱く、強光下では二重還元されてキノールとなる可能性も指摘されている<sup>59</sup>。これは最新の Selective-loss モデル<sup>42</sup>において祖先型 RC に仮定されている二機能性 (図 4) と酷似しており、RC1 は他の RC よりも祖先型 RC の性質を色濃く残している可能性が高い<sup>39,40,56</sup>。キノン電子受容体の二重還元活性は PS1 でも観測されていることから<sup>60-62</sup>、RC1 が二機能性を持つ可能性は十分に考えられ、著者と大岡博士の研究グループをはじめ、米国の Kevin Redding 博士のグループによっても、構造機能解析による精力的な実証研究が進められている (私信)。

Selective-loss モデルでの Type-1 RC と Type-2 RC の機能分化を実証するには、二機能性を実証した上で、RC1 に二電子ゲートを人為的に獲得させる実験が有効であると考えられる。RC1 のコアタンパク質遺伝子を二倍体化 (重複) させ、片方の遺伝子にランダムあるいは部位特異的に変異を導入することで、人工的なヘテロダイマー型の RC1 を作製する実験である<sup>58,63</sup>。これは、本稿第 3 節のクロロフィルの進化の項で提案した ARE-WE とは逆の、“意図的進化駆動実験” (IF-WE, Intentional forward evolution-wise experiment) と呼ぶべき研究手法である。ホモダイマー構造の RC1 をもつ AP 生物以外では不可能な実験であるが、遺伝子操作が容易な緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum tepidum* を使用することで現実的に可能である<sup>58,63,64</sup>。最近、人工ヘテロダイマーではないものの、*C. tepidum* の RC1 の部位特異的変異体の作製と分光分析の成功例が初めて報告され<sup>57</sup>、RC1 の一次電子供与体が完全に

対称な構造をもつこと、アミノ酸配列の多様性と  
は裏腹に一次電子供与体周辺の立体構造が  
Type-1 RC で高度に保存されていることなどが  
示された<sup>57)</sup>。既に *C. tepidum* を利用した IF-WE  
は実施段階にある。*C. tepidum* 以外の RC1 をもつ  
生物での遺伝子操作系は、現時点で他の緑色硫黄  
細菌種に限定されているが<sup>64-66)</sup>、米国の Kevin  
Redding 博士のグループによって、近い将来、好  
熱性のヘリオバクテリア *Heliobacterium*  
*modesticaldum* の遺伝子操作系が報告されるだろ  
う(私信)。これらの RC1 をもつ広範な生物種の  
遺伝子操作系が整備されることで、RC1 を使った  
IF-WE がより容易に行えるようになることを期  
待したい。RC1 のキノン電子受容体や鉄硫黄クラ  
スターの推定結合部位改変する IF-WE を行い、  
Type-2 RC の Q<sub>A</sub> と Q<sub>B</sub> のようなキノン電子受容体  
の非対称な結合を産み出す構造を探索すること  
で、RC コアタンパク質のヘテロダイマー化によ  
る二電子ゲートの獲得機構を明らかに出来るだ  
ろう。

一方、Z スキームの成立過程として Fusion モデル  
あるいは Selective-loss モデルのどちらを採用  
するとしても、先述のようにモデルの信憑性は  
pre-OP の性質が握っている<sup>42)</sup>(図 3)。従って、  
pre-OP の性質を実験的に明らかに出来ない限り、  
究極的な議論の収束は望めない。最も直接的な方  
法は、pre-OP 生物と同じように Type-1 RC と  
Type-2 RC の両方をもつ AP 生物を見つけ、その  
光合成の性質を調べることである。しかし、その  
ような AP 生物がそもそも現存するのか自体が不  
明であり、現実的な問題として発見や単離が不可  
能であることも十分に考え得る<sup>42)</sup>。著者が考  
えている現状最も有効な研究手段は、現存する AP  
生物を使って pre-OP 生物を創生する実験“人工  
的 pre-OP 生物創生”(Creap-OP, Creation of  
artificial pre-OP) である。Selective-loss モデルを  
支持した場合には、人工的に創出した pre-OP 生  
物には、何らかの原因で RC1 をもつ AP 生物よ  
りも競争力で劣る特長が見出されるはずである  
<sup>3,42)</sup>(図 3-B)。Fusion モデルを支持した場合には、  
RC1 をもつ AP 生物に限らず、他の全ての AP 生  
物よりも競争力で劣る特長が見出されるはずで

ある<sup>1,2)</sup>(図 3-A)。また、多種多様な pre-OP 生物  
の創出方法を検討することで、Fusion モデルのメ  
カニズムの検証にも繋がる。ARE-WE と IF-WE  
が過去への逆行あるいは過去の進化の再現であ  
るのに対し、Creap-OP は現代での再進化という  
意味で異なる研究手法と言える。

現時点で Ceap-OP に成功例は存在せず、RC1  
と RC2 を同等量で共発現させることが当面の課  
題である。その試行錯誤の過程で、Fusion モデル  
の実現に必要な条件が浮き彫りになってくるこ  
とが期待される。Creap-OP の具体的な実現方法  
として、1) RC1 をもつ AP 生物に RC2 を導入す  
る、2) RC2 をもつ AP 生物に RC1 を導入する、  
という 2 パターンが考えられる。1) の場合、現  
時点で利用可能なホストは緑色硫黄細菌に限定  
され、*C. tepidum* が最も適当である<sup>64)</sup>。ホストで  
ある *C. tepidum* の生理的性質に合わせるため、導  
入する RC2 は、耐熱性であること、BChl *a* を利  
用していること (=BChl *b* を利用していないこ  
と)、キノン電子受容体がメナキノンであること、  
RC のサブユニット構造が単純であることなどが  
求められる。このような性質を充たす RC2 をも  
つ生物種は、ほぼ糸状性光合成細菌に絞られる  
<sup>66,67)</sup>。既に著者の浅井は、この 1) のパターン  
で Creap-OP を試みているが、現時点で RC2 の有  
意な発現には至っていない。2 種類の RC の共存  
による悪影響以前に、系統的に離れた生物種の異  
種遺伝子発現には意外な制約が多く、生物自体の  
生理的、分子遺伝学的な違いが大きな障壁となっ  
ている(浅井、未発表データ)。一方、2) のパ  
ターンでの Creap-OP は著者の塚谷が中心となっ  
て研究している<sup>68)</sup>。ホストには  $\alpha$  プロテオバクテ  
リアをもちい、導入する RC1 には *C. tepidum* の  
ものを使用しているが、RC1 は機能に BChl *a* だ  
けでなく Chl *a* を必要とするため<sup>39,40)</sup>、ホストの  
 $\alpha$  プロテオバクテリアには Chlide *a* から Chl *a* を  
合成する酵素 ChlG の発現が必要である<sup>68)</sup>。興味  
深いことに、 $\alpha$  プロテオバクテリアでの Chl *a* の  
蓄積には、RC1 と ChlG の導入だけでなく、糖脂質  
合成に関わる酵素 MgdA の導入も必要であった。  
シアノバクテリアの PS1 の結晶構造にはガラク  
ト脂質であるモノガラクトシルジアシルグリセ

ロール (MGDG) が含まれており<sup>69)</sup>、*C. tepidum* も MGDG をもつことから<sup>70)</sup>、*C. tepidum* の RC1 のアセンブリにおいても糖脂質が重要な役割を果たしているのかもしれない。やはりこれは、Fusion モデルの実現には、光合成装置の構造の違い以外にも、系統的に離れた生物種の生理的な違い (どのような脂質種を持つか等) に由来する別の障壁を乗り越える必要があることを示唆しているだろう。

機能的な RC の異種発現に関する障壁は、Creap-OP に限らず、紅色光合成細菌間の RC2 の交換実験でも確認されている。紅色光合成細菌の RC2 のコアタンパク質は、アミノ酸配列の相同性が少なくとも 70% 以上あれば、異種間で交換可能であることが実験的に示されている<sup>71)</sup>。しかし、比較的近縁な紅色光合成細菌間の交換であっても、嫌気条件で光合成を行う *Rhodobacter capsulatus* のコアタンパク質の欠失変異を、好気条件で光合成を行う *Roseobacter denitrificans* のコアタンパク質では機能相補できない<sup>72)</sup>。この原因として、RC を含む光合成電子伝達系のコファクターの酸化還元電位が、各生物種内で生育環境に合わせて調整されていることが考えられる<sup>71)</sup>。Creap-OP の進捗状況や RC2 の交換実験の結果は、Fusion モデルによる pre-OP の成立は現実的には困難あるいは不可能なプロセスであることを示唆しているのかもしれない。仮に Creap-OP が不可能であった場合、現存する AP 生物から精製した RC1 と RC2 をキノール酸化還元酵素と共に人工脂質膜上に再構成する実験が有効であろう。この場合、生物個体の生理的な情報は得られなくなるが、RC1 や RC2 の量比、キノール酸化還元酵素や電子伝達体の種類を詳細に検討することで、pre-OP の性質や Creap-OP が不可能な原因を解明できるだろう。

## 6. おわりに

酸素発生型光合成の成立過程は依然として大きな謎である。ここまですご覧いただいたように、Chl *a* が先か BChl *a* が先か、Fusion モデルか Selective-loss モデルか、このような単純な疑問に対しても、現状では断定的なことは言えない。今

回は取り上げなかったが、炭素固定反応の進化にも多くの疑問がある<sup>1,2)</sup>。光合成の進化は当然ながら過去の出来事である。その研究は歴史学や考古学ともとれるが、人類とは違い、光合成生物は生きるのに必死で歴史を明確に史料に記録してくれたりはいしない。これまで進化の研究と言えば、分岐分類学や分子系統学による推察が主であったために、進化過程の研究は机上の空論に近いものであった。近年発展している、次世代シーケンサーを利用した実験室内小進化の解析も、結局は人類が研究を始めた以後の分子進化しか追跡できない。多くの興味ある形質の進化は人類誕生よりもはるか以前の出来事である。本稿で紹介した、ARE-WE、IF-WE、Creap-OP といった合成生物学的な進化の実証方法は、この問題に対する著者なりの回答である。今後は著者自らが、この手法で酸素発生型光合成の進化過程を少しずつ解明していくことで、その有効性と適用範囲の広さを示していきたい。過去の光合成を知ることは未来の光合成を予測することにも繋がる。今後も過去の光合成生物たちが生きていた証を探り続けたい。

## 謝辞

本研究の一部は、文部科学省科研費 (11J06665, 25891025, 15H00886, 26840099, 15H01063) の補助を受けて行われました。本稿の執筆にあたり、理化学研究所の戎崎俊一先生と東京工業大学の丸山茂徳先生には、冥王代地球の光環境について有益な議論を交わして頂きました。名古屋大学の藤田祐一先生、立命館大学の笠原賢洋先生、寺内一姫先生、久留米大学の原田二郎先生には、貴重なご助言を頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。また、このような執筆の場を与えてくださった日本光合成学会ならびに編集委員の方々に御礼申し上げます。

Received March 1, 2016; Accepted April 1, 2016;  
Published April 30, 2016

## 参考文献

1. Hohmann-Marriott, M.F. and Blankenship, R.E. (2011) Evolution of photosynthesis. *Annu. Rev.*

- Plant. Biol.* 62, 515–548.
2. Olson, J.M. and Blankenship, R.E. (2004) Thinking about the evolution of photosynthesis. *Photosynth. Res.* 80, 373–386.
  3. Allen, J.F. and Martin, W. (2007) Evolutionary biology: out of thin air. *Nature* 445:610–612.
  4. Hamilton, T.L., Bryant, D.A. and Macalady, J.L. (2016) The role of biology in planetary evolution: cyanobacterial primary production in low oxygen Proterozoic oceans. *Environ. Microbiol.* 18, 325–340.
  5. Mulkidjanian, A.Y., Koonin, E.V., Makarova, K.S., Mekhedov, S.L., Sorokin, A., Wolf, Y.I., Dufresne, A., Partensky, F., Burd, H., Kaznadzey, D., Haselkorn, R. and Galperin, M. Y. (2006) The cyanobacterial genome core and the origin of photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 13126–13131.
  6. Bryant, D.A. and Frigaard, N.U. (2006) Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. *Trends Microbiol.* 14, 488–496.
  7. Azai, C., Tsukatani, Y., Itoh, S. and Oh-oka, H. (2010) C-type cytochromes in the photosynthetic electron transfer pathways in green sulfur bacteria and heliobacteria. *Photosynth. Res.* 104, 189–199.
  8. Heathcote, P., Fyfe, P.K. and Jones, M.R. (2002) Reaction centres: the structure and evolution of biological solar power. *Trends Biochem. Sci.* 27, 79–87.
  9. Lin, X., Murchison, H.A., Nagarajan, V., Parson, W.W., Allen, J.P. and Williams, J.C. (1994) Specific alteration of the oxidation potential of the electron donor in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10265–10269.
  10. Kalman, L., LoBrutto, R., Allen, J.P. and Williams, J.C. (1999) Modified reaction centres oxidize tyrosine in reactions that mirror photosystem II. *Nature* 402, 696–699.
  11. Allen, J.P., Olson, T.L., Oyala, P., Lee, W.J., Tufts, A.A. and Williams, J.C. (2012) Light-driven oxygen production from superoxide by Mn-binding bacterial reaction centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 2314–2318.
  12. Allen, J.P. and Williams, J.C. (2011) The evolutionary pathway from anoxygenic to oxygenic photosynthesis examined by comparison of the properties of photosystem II and bacterial reaction centers. *Photosynth. Res.* 107, 59–69.
  13. Olson, T.L., Williams, J.C. and Allen, J.P. (2013) Influence of protein interactions on oxidation/reduction midpoint potentials of cofactors in natural and de novo metalloproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 914–922.
  14. Olson, T.L., Espiritu, E., Edwardraja, S., Simmons, C.R., Williams, J.C., Ghirlanda, G. and Allen, J.P. (2015) Design of dinuclear manganese cofactors for bacterial reaction centers. *Biochim. Biophys. Acta*, in press.
  15. Jagannathan, B. and Golbeck, J.H. (2009) Breaking biological symmetry in membrane proteins: the asymmetrical orientation of PsaC on the pseudo-C<sub>2</sub> symmetric Photosystem I core. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1257–1270.
  16. Romberger, S.P. and Golbeck, J.H. (2010) The bound iron-sulfur clusters of type-I homodimeric reaction centers. *Photosynth. Res.* 104, 333–346.
  17. Bryant, D.A., Costas, A.M., Maresca, J.A., Chew, A.G., Klatt, C.G., Bateson, M.M., Tallon, L.J., Hostetler, J., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F. and Ward, D.M. (2007) *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*: an aerobic phototrophic Acidobacterium. *Science* 317, 523–526.
  18. Tank, M. and Bryant, D.A. (2015) *Chloracidobacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov.: an anoxygenic microaerophilic chlorophotoheterotrophic acidobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 1426–1430.
  19. Tsukatani, Y., Romberger, S.P., Golbeck, J.H. and Bryant, D.A. (2012) Isolation and characterization of homodimeric type-I reaction center complex from *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*, an aerobic chlorophototroph. *J. Biol. Chem.* 287, 5720–5732.
  20. Chew, A.G. and Bryant, D.A. (2007) Chlorophyll biosynthesis in bacteria: the origins of structural and functional diversity. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 113–129.
  21. Nomata, J., Mizoguchi, T., Tamiaki, H. and Fujita, Y. (2006) A second nitrogenase-like enzyme for bacteriochlorophyll biosynthesis: reconstitution of chlorophyllide a reductase with purified X-protein (BchX) and YZ-protein (BchY-BchZ) from *Rhodobacter capsulatus*. *J. Biol. Chem.* 281, 15021–15028.
  22. 三室 守, 垣谷 俊昭, 民秋 均 (2011) クロロフィルの吸収スペクトル, in クロロフィル—構造・反応・機能— (三室 守 Ed.) pp 282–288, 裳

- 華房, 東京都.
23. Ishikita, H., Saenger, W., Biesiadka, J., Loll, B. and Knapp, E.W. (2006) How photosynthetic reaction centers control oxidation power in chlorophyll pairs P680, P700, and P870. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 9855–9860.
  24. Telfer, A. (2014) Singlet oxygen production by PSII under light stress: mechanism, detection and the protective role of beta-carotene. *Plant Cell Physiol.* 55, 1216–1223.
  25. Beatty, J.T., Overmann, J., Lince, M.T., Manske, A.K., Lang, A.S., Blankenship, R.E., Van Dover, C.L., Martinson, T.A. and Plumley, F.G. (2005) An obligately photosynthetic bacterial anaerobe from a deep-sea hydrothermal vent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 9306–9310.
  26. Reinbothe, C., El Bakkouri, M., Buhr, F., Muraki, N., Nomata, J., Kurisu, G., Fujita, Y. and Reinbothe, S. (2010) Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction. *Trends Plant Sci.* 15, 614–624.
  27. Kaschner, M., Loeschcke, A., Krause, J., Minh, B.Q., Heck, A., Endres, S., Svensson, V., Wirtz, A., von Haeseler, A., Jaeger, K.E., Drepper, T. and Krauss, U. (2014) Discovery of the first light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in anoxygenic phototrophic bacteria. *Mol. Microbiol.* 93, 1066–1078.
  28. Nomata, J., Kitashima, M., Inoue, K. and Fujita, Y. (2006) Nitrogenase Fe protein-like Fe-S cluster is conserved in L-protein (BchL) of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus*. *FEBS Lett.* 580, 6151–6154.
  29. 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.
  30. Muraki, N., Nomata, J., Ebata, K., Mizoguchi, T., Shiba, T., Tamiaki, H., Kurisu, G. and Fujita, Y. (2010) X-ray crystal structure of the light-independent protochlorophyllide reductase. *Nature* 465, 110–114.
  31. 野亦 次郎 (2008) バクテリアオクロロフィル生合成系のニトロゲナーゼ類似酵素の生化学的解析. *光合成研究* 18, 24–29.
  32. Fujita, Y. and Bauer, C.E. (2003) The Light-Independent Protochlorophyllide Reductase: A Nitrogenase-Like Enzyme Catalyzing a Key Reaction for Greening in the Dark, in *The Porphyrin Handbook* (Kadish, K. M., Smith, K. M., and Guillard, R., Eds.) pp 109–156, Cambridge, Massachusetts, Academic Press, U.S.A.
  33. Masuda, T. and Fujita, Y. (2008) Regulation and evolution of chlorophyll metabolism. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1131–1149.
  34. Harada, J., Mizoguchi, T., Tsukatani, Y., Yokono, M., Tanaka, A. and Tamiaki, H. (2014) Chlorophyllide *a* oxidoreductase works as one of the divinyl reductases specifically involved in bacteriochlorophyll *a* biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 289, 12716–12726.
  35. Tsukatani, Y., Yamamoto, H., Mizoguchi, T., Fujita, Y. and Tamiaki, H. (2013) Completion of biosynthetic pathways for bacteriochlorophyll *g* in *Heliobacterium modesticaldum*: The C8-ethylidene group formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 1200–1204.
  36. Tsukatani, Y., Yamamoto, H., Harada, J., Yoshitomi, T., Nomata, J., Kasahara, M., Mizoguchi, T., Fujita, Y. and Tamiaki, H. (2013) An unexpectedly branched biosynthetic pathway for bacteriochlorophyll *b* capable of absorbing near-infrared light. *Sci. Rep.* 3, 1217.
  37. Watzlich, D., Brocker, M.J., Uliczka, F., Ribbe, M., Virus, S., Jahn, D. and Moser, J. (2009) Chimeric nitrogenase-like enzymes of (bacterio)chlorophyll biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 284, 15530–15540.
  38. Cardona, T. (2016) Origin of Bacteriochlorophyll *a* and the Early Diversification of Photosynthesis. *PLoS One* 11, e0151250.
  39. Hauska, G., Schoedl, T., Remigy, H. and Tsiotis, G. (2001) The reaction center of green sulfur bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1507, 260–277.
  40. Oh-oka, H. (2007) Type 1 reaction center of photosynthetic heliobacteria. *Photochem. Photobiol.* 83, 177–186.
  41. 伊藤 繁 (2012) 光合成の進化. *光合成研究* 22, 14–30.
  42. Allen, J. F. (2005) A redox switch hypothesis for the origin of two light reactions in photosynthesis. *FEBS Lett.* 579, 963–968.
  43. Klamt, S., Grammel, H., Straube, R., Ghosh, R. and Gilles, E.D. (2008) Modeling the electron transport chain of purple non-sulfur bacteria. *Mol. Syst. Biol.* 4, 156.
  44. Blankenship, R.E. (1992) Origin and early evolution

- of photosynthesis. *Photosynth. Res.* 33, 91–111.
45. Xiong, J. and Bauer, C.E. (2002) Complex evolution of photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 503–521.
  46. Olson, J.M. (1970) The evolution of photosynthesis. *Science* 168, 438–446.
  47. Vermaas, W.F. (1994) Evolution of heliobacteria: Implications for photosynthetic reaction center complexes. *Photosynth. Res.* 41, 285–294.
  48. Alberti, M., Burke, D.H. and Hearst, J.E. (1995) Structure and sequence of the photosynthesis gene cluster, in *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Blankenship, R. E., Madigan, M. T., and Bauer, C. E., Eds.) pp 1083–1106, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
  49. Gupta, R.S. (2010) Molecular signatures for the main phyla of photosynthetic bacteria and their subgroups. *Photosynth. Res.* 104, 357–372.
  50. Tank, M., Thiel, V. and Imhoff, J.F. (2009) Phylogenetic relationship of phototrophic purple sulfur bacteria according to *pufL* and *pufM* genes. *Int. Microbiol.* 12, 175–185.
  51. Xiong, J., Inoue, K. and Bauer, C.E. (1998) Tracking molecular evolution of photosynthesis by characterization of a major photosynthesis gene cluster from *Heliobacillus mobilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14851–14856.
  52. Sattley, W.M., Madigan, M.T., Swingle, W.D., Cheung, P.C., Clocksin, K.M., Conrad, A.L., Dejesa, L.C., Honchak, B.M., Jung, D.O., Karbach, L.E., Kurdoglu, A., Lahiri, S., Mastrian, S.D., Page, L.E., Taylor, H.L., Wang, Z.T., Raymond, J., Chen, M., Blankenship, R.E. and Touchman, J.W. (2008) The genome of *Heliobacterium modesticaldum*, a phototrophic representative of the *Firmicutes* containing the simplest photosynthetic apparatus. *J. Bacteriol.* 190, 4687–4696.
  53. Zeng, Y.H., Feng, F.Y., Medova, H., Dean, J. and Koblizek, M. (2014) Functional type 2 photosynthetic reaction centers found in the rare bacterial phylum Gemmatimonadetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 7795–7800.
  54. Sadekar, S., Raymond, J. and Blankenship, R.E. (2006) Conservation of distantly related membrane proteins: photosynthetic reaction centers share a common structural core. *Mol. Biol. Evol.* 23, 2001–2007.
  55. Rost, B. (1999) Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng.* 12, 85–94.
  56. Kondo, T., Itoh, S., Matsuoka, M., Azai, C. and Oh-oka, H. (2015) Menaquinone as the secondary electron acceptor in the type I homodimeric photosynthetic reaction center of *Heliobacterium modesticaldum*. *J. Phys. Chem. B* 119, 8480–8489.
  57. Azai, C., Sano, Y., Kato, Y., Noguchi, T. and Oh-Oka, H. (2016) Mutation-induced perturbation of the special pair P840 in the homodimeric reaction center in green sulfur bacteria. *Sci. Rep.* 6, 19878.
  58. 浅井 智広, 大岡 宏造 (2013) 緑色硫黄細菌の光合成反応中心への部位特異的な変異導入. *光合成研究* 23, 44–47.
  59. Hohmann-Marriott, M.F. and Blankenship, R.E. (2007) Variable fluorescence in green sulfur bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 106–113.
  60. McConnell, M.D., Cowgill, J.B., Baker, P.L., Rappaport, F. and Redding, K.E. (2011) Double reduction of plastoquinone to plastoquinol in photosystem I. *Biochemistry* 50, 11034–11046.
  61. Setif, P. and Bottin, H. (1989) Identification of electron-transfer reactions involving the acceptor-A<sub>1</sub> of photosystem I at room temperature. *Biochemistry* 28, 2689–2697.
  62. Inoue, K., Fujii, T., Yokoyama, E., Matsuura, K., Hiyama, T. and Sakurai, H. (1989) The photoinhibition site of photosystem I in isolated chloroplasts under extremely reducing conditions. *Plant Cell Physiol.* 30, 65–71.
  63. Azai, C., Kim, K., Kondo, T., Harada, J., Itoh, S. and Oh-oka, H. (2011) A heterogeneous tag-attachment to the homodimeric type I photosynthetic reaction center core protein in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 803–812.
  64. Azai, C., Harada, J. and Oh-oka, H. (2013) Gene expression system in green sulfur bacteria by conjugative plasmid transfer. *PLoS One* 8, e82345.
  65. Harada, J., Mizoguchi, T., Tsukatani, Y., Noguchi, M. and Tamiaki, H. (2012) A seventh bacterial chlorophyll driving a large light-harvesting antenna. *Sci. Rep.* 2, 671.
  66. Vogl, K., Tank, M., Orf, G.S., Blankenship, R.E. and Bryant, D.A. (2012) Bacteriochlorophyll *f*: properties of chlorosomes containing the "forbidden chlorophyll". *Front. Microbiol.* 3, 298.
  67. Yamada, M., Zhang, H., Hanada, S., Nagashima, K. V., Shimada, K. and Matsuura, K. (2005) Structural and spectroscopic properties of a reaction center complex from the chlorosome-lacking filamentous



- anoxygenic phototrophic bacterium *Roseiflexus castenholzii*. *J. Bacteriol.* 187, 1702–1709.
68. Tsukatani, Y. and Masuda, S. (2015) Elucidation of Genetic Backgrounds Necessary for Chlorophyll *a* Biosynthesis Toward Artificial Creation of Oxygenic Photosynthesis. *Orig. Life Evol. Biosph.* 45, 367–369.
69. 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 Å resolution. *Nature* 411, 909–917.
70. Mizoguchi, T., Harada, J., Yoshitomi, T. and Tamiaki, H. (2013) A variety of glycolipids in green photosynthetic bacteria. *Photosynth. Res.* 114, 179–188.
71. Nagashima, K. V., Vermeglio, A., Fusada, N., Nagashima, S., Shimada, K. and Inoue, K. (2014) Exchange and complementation of genes coding for photosynthetic reaction center core subunits among purple bacteria. *J. Mol. Evol.* 79, 52–62.
72. Kortluke, C., Breese, K., Gad'on, N., Labahn, A. and Drews, G. (1997) Structure of the *puf* operon of the obligately aerobic, bacteriochlorophyll *a*-containing bacterium *Roseobacter denitrificans* OCh114 and its expression in a *Rhodobacter capsulatus puf puc* deletion mutant. *J. Bacteriol.* 179, 5247–5258.

## Rethinking about the Evolution toward Oxygenic Photosynthesis and Experiments to Demonstrate It in the Laboratory

Chihiro Azai<sup>1\*</sup>, Yusuke Tsukatani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioinformatics, College of Life Sciences, Ritsumeikan University, <sup>2</sup>Earth-Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology

## 解説

緑藻の光化学系 I サイクリック電子伝達活性調節に関する考察<sup>†</sup>

埼玉大学 理工学研究科 生命科学部門  
高橋 拓子\*

光化学系 I サイクリック電子伝達については、シアノバクテリアから高等植物に至るまで、主にモデル生物種を用いて研究が行われており、研究の歴史も古い。その電子伝達に関与する因子など、生物種を通じて類似点が多く存在することが明らかになってきた一方、生物種で異なる点も見出されてきた。近年、緑藻クラミドモナス特異的なサイクリック電子伝達の特徴として、嫌気条件下において電子伝達活性が上昇することや活性の上昇に重要な超分子複合体が存在することが報告されている。本稿では、クラミドモナスにおいて議論されてきた、ステート遷移のサイクリック電子伝達調節への関与について検証した解析について述べるとともに、その解析で用いた電子伝達活性評価法について紹介する。さらに、クラミドモナスサイクリック電子伝達の調節における、緑藻特異的なチラコイド膜タンパク質 ANR1 と PETO の機能について考察する。

## 1. はじめに

光化学系 I サイクリック電子伝達(以下 CEF) は、光化学系 (PS) I からフェレドキシン (Fd) を経由し、NADP<sup>+</sup>へと伝達される電子の一部が再度チラコイド膜中に戻り、シトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体 (Cyt *b<sub>6</sub>f*)、PSI へと環状に伝達される反応である。二つの光化学系 (PSII、PSI) を用い、水から電子を得て NADPH を生成する直鎖型電子伝達 (図 1 青線) に対し、CEF では PSI のみを用いて電子を循環するため、NADPH の生成は起こらないが、Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体におけるプロトンの移動により、チラコイド膜を介した  $\Delta$ pH を形成し ATP 合成を駆動する<sup>1)</sup> (図 1 赤線)。炭酸固定反応は、理論値では NADPH/ATP 比=3/2 で要求するのに、対し、リニア電子伝達では NADPH/ATP=2.6/2 の比で生成するため、ATP が不足する<sup>2)</sup>が、この NADPH/ATP 比を最適化するために、ATP のみを生成する CEF は有効であると考えられている。また、 $\Delta$ pH を形成するため、 $\Delta$ pH 依存的な余剰励起エネルギーの散逸 (qE、NPQ) の誘導に必要である<sup>3-5)</sup>。これまでに主に高等植物において、

アンチマイシン A (AA) 非感受性の NDH 経路と感受性の PGR5/PGRL1 経路 (以下 PGR 経路) の 2 つの CEF 経路が同定されており<sup>4,6)</sup>、シアノバクテリアやクラミドモナスにおいても同様もしくは類似した経路があることが報告されている<sup>7,8)</sup>。高等植物では、NDH 経路はストレス下で重要であり主要な CEF 経路は PGR 経路であるが、NDH、PGR 経路の二重欠損株では著しい成長阻害を受けることから、いずれの CEF 経路も最適な光合成を行うために必要であると考えられている<sup>9)</sup>。クラミドモナスでは、嫌気条件下で CEF 活性が増加することが報告されており<sup>5,10,11)</sup>、葉緑体が還元状態になる条件や環境順化の初期過程に CEF が重要であることが予測される。また、PSI のアンテナサイズを増加させることにより PSI、PSII の間で集光能の平衡を保つステート 1-2 遷移は、CEF 活性の上昇に必須であると考えられていたが、近年ステート 1-2 遷移と CEF 活性の上昇は、これら 2 つの現象を誘導する条件は同じであるものの独立に起こることが示された。本稿では、NDH-CEF、PGR-CEF 経路について紹介するとともに、クラミドモナスの嫌気条件下での CEF 活性上昇とステート 1-2 遷移との関係、緑藻特異的チラコイド膜タンパク質 ANR1、PETO が CEF 活

<sup>†</sup>解説特集「若手光合成研究者による光合成研究の新展開」

\*連絡先 E-mail: htakahashi@mail.saitama-u.ac.jp

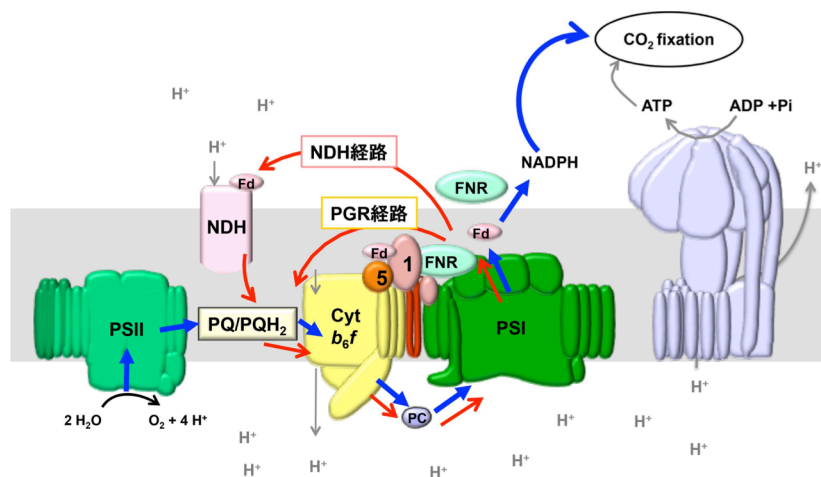


図 1. PSI 循環型電子伝達 (CEF) モデル

PSII, Photosystem II; PSI, Photosystem I; Cyt *b<sub>6</sub>f*, Cytochrome *b<sub>6</sub>f*; NDH, NADH dehydrogenase like complex; 1, PGRL1; 5, PGR5; Fd, ferredoxin; FNR, Fd:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase; PC, plastocyanin; PQ/PQH<sub>2</sub>, Plastoquinone pool. 青線は直鎖型電子伝達を示し、赤線は 2 種類の PSI 循環型電子伝達を示す。

性上昇に果たす役割について考察する。

### NDH-CEF 経路

高等植物で同定されている CEF 経路の一つは、呼吸鎖に存在する NADH dehydrogenase のホモログである、NADH dehydrogenase like (NDH) 複合体により介在される NDH 経路<sup>12,13</sup>である(図 1、NDH 経路)。葉緑体 NDH 複合体は、Fd を酸化しプラストキノンを還元することが報告されている<sup>14,15</sup>。高等植物の NDH 複合体は、30 以上のサブユニットからなる巨大な複合体であり、葉緑体特異的なサブユニットを有する<sup>13,16</sup>。NDH 複合体は、PSI アンテナ Light Harvesting chlorophyll protein Complex (LHC) I のうちマイナーなサブユニットである Lhca5、Lhca6 を介して PSI と超分子複合体を形成することにより、電子伝達複合体としての機能を果たすことが明らかになっている<sup>17</sup>。

シアノバクテリアにおける NDH-CEF 経路は、呼吸鎖電子伝達と共有する NADH-dehydrogenase (NDH-1) 複合体<sup>18</sup>により電子伝達が介在されるが、高等植物同様、葉緑体特異的なサブユニットを含むことが明らかにされている<sup>13,16</sup>。NDH 複合体は、NDH-1L、NDH-1M、NDH-1S と 3 種の会合状態が同定されており<sup>19</sup>、NDH-1L 複合体が呼吸、無機炭素輸送および CEF 駆動に関わるこ

とが明らかになっている<sup>16,20</sup>。一方、NDH-1M と NDH-1S は会合して NDH-1MS 複合体を形成し、二酸化炭素取り込みに関与していることが示されている<sup>19,21</sup>。NDH-1L 複合体が蓄積できない *ndhB* 欠損株では、大気条件での生育が著しく阻害される<sup>22</sup>。そして P700 還元速度が野生型の 6 倍程遅くなることが観測されている<sup>23</sup>ため、NDH-1 複合体による CEF 経路が主要な経路であると考えられる。また、シアノバクテリアにおいても、NDH 複合体への電子供与体が Fd であることが *in vitro* の解析から示されている<sup>24</sup>。多くの緑藻においては、葉緑体 NDH 複合体サブユニットをコードする遺伝子は同定されていない<sup>25</sup>が、クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) において、モノマータイプの NAD(P)H dehydrogenase (NDA2) が、NADPH から PQ プールへの電子伝達を介在する経路が報告されている<sup>26,27</sup>。NDA2 の電子供与体が Fd であるという証拠は現在のところ得られておらず、NAD(P)H が電子供与体であると考えられている。

### PGR-CEF 経路

もう一方の経路である AA 感受的経路は、PGR5 (Proton Gradient Regulation 5)<sup>3</sup>および PGRL1 (PGR5-Like 1)<sup>28</sup>により介在されるため、ここでは PGR 経路と呼ぶ(図 1、PGR 経路)。PGR5

は、チラコイド膜表在型タンパク質であり、その欠損変異体 *pgr5* は、強光感受性を示し NPQ 誘導能が低く、特に強光下での PSI 活性低下が著しいことが示された<sup>3)</sup>。Munekage らは CEF における PGR5 の機能を検証するために、PSI からの電子受容体容量が制限される CO<sub>2</sub>-free 条件、さらに酸素への電子伝達が起こらない CO<sub>2</sub>・O<sub>2</sub>-free 条件下で、P700 酸化能力を検証した。大気条件下、高 CO<sub>2</sub> 条件下では、野生型と *pgr5* で P700 の酸化のされやすさについて差はなかったが、CO<sub>2</sub>-free、CO<sub>2</sub>・O<sub>2</sub>-free 条件下では、*pgr5* における P700 の光酸化は大きく阻害された<sup>3)</sup>。これは、PGR5 を欠損することで、PSI 下流が過還元状態となり PSI からの電子の受容体が限られることで P700 の電荷再結合が起こり、光酸化可能な P700 の量が大きく減少したことを示唆するものである。さらに、破碎葉緑体を用いたクロロフィル蛍光測定において、NADPH、Fd 添加時に観測できる PQ プールの還元が、*pgr5* では野生型で見られた還元レベルのおよそ半分程度であり還元速度もおよそ倍になった。これに類似した結果が、野生型、AA 存在下で観測されたことから、PGR5 は、AA 感受的 CEF を介在していると結論付けられた<sup>3)</sup>。また、PGR5 と Fd および Cyt *b*<sub>6</sub> との結合が *in vitro* の解析により示されている<sup>28)</sup>。PGRL1 は、チラコイド膜タンパク質であり、*in vitro* の解析により PGR5、Fd、FNR、Cyt *b*<sub>6</sub> との結合が示されている<sup>28)</sup>。さらに、鉄を含むコファクターを持つことが示唆されている<sup>29)</sup>。PGRL1 欠損株 *pgrl1* では、PGR5 が蓄積せず、*pgr5* 様の表現型である低 NPQ 誘導、PSI 下流の過還元による P700 電荷再結合に起因する P700 光酸化の抑制が見られ、破碎葉緑体における NADPH、Fd 存在下での PQ プールの還元レベルも *pgr5* と同程度に低下していた<sup>28)</sup>。これらのことから、PGR5 と PGRL1 はヘテロダイマーを形成し CEF を介在していると考えられる<sup>28)</sup>。また、PGRL1 は高度に保存されたシステイン残基 (Cys) を持つことから、チオレドキシシン (Trx) を介した PGR-CEF 経路の制御が提唱されている<sup>29)</sup>。

シアノバクテリアでは、PGR5 のオーソログである Ssr2016 が同定されている<sup>3)</sup>。Ssr2016 欠損

株における P700 の還元速度は野生型と大きく変わらないが、6 倍遅い還元速度を示す NDH 経路欠損株に比べて、NDH 経路・*ssr2016* 二重欠損株では P700 還元速度が 10 倍遅くなっていることが示された<sup>23)</sup>。これらのことから、シアノバクテリアにおける主要な CEF 経路は NDH 経路であり、Ssr2016 を介した経路は NDH 経路が機能しない際に重要であると考えられる。

クラミドモナスでは、高等植物で同定された PGR5 と PGRL1 のオーソログが PGR 経路を介在し、嫌気条件下において活性が増加することが知られている<sup>5,8,10)</sup>。クラミドモナスにおいて qE が誘導される条件下 (強光・光独立栄養条件下) において、PGR5 欠損株では、NPQ の低下が見られ、さらに PSI の光感受性と P700 光酸化阻害、嫌気条件下での CEF 速度増加の抑制が示された<sup>5)</sup>。PGRL1 欠損株においても、NPQ の低下と嫌気条件下での CEF 速度の増加抑制が報告されている<sup>10)</sup>。また、PGRL1 欠損株では、PGR5 の蓄積は見られなかった<sup>5)</sup>。これらのことから、クラミドモナス PGR5、PGRL1 は、高等植物と同様に協調的に CEF 駆動に働き、CEF による ΔpH の形成および強光下での PSI の保護に重要であることが示唆された。さらにクラミドモナスでは、PGR5、PGRL1 に加え、Calcium Sensor (CAS)<sup>30)</sup>、Anaerobic Response 1 (ANR1)<sup>30)</sup>、PETO<sup>31)</sup> の欠損および蓄積低下の変異株において、サイクリック電子伝達速度の増加が抑制されることが報告されていることから、これらのタンパク質も CEF 活性を上昇させる因子として PGR-CEF 制御に関与すると考えられている。また、PSI、Cyt *b*<sub>6</sub>f、PGRL1、FNR を含む超分子複合体 (CEF 複合体<sup>32)</sup>) が単離されており、CAS、ANR1、PETO は CEF 複合体の構成成分として検出されている<sup>11,30,32)</sup>。単離した CEF 複合体において、光照射下での Fd 依存的な Cyt *b* の還元が観測されたことから、CEF 複合体形成により、PSI 由来の電子が Cyt *b*<sub>6</sub>f 複合体を還元すると考えられる<sup>32)</sup>。超分子複合体は FNR を含むため、Cyt *b*<sub>6</sub>f 複合体の直接の電子供与体が FNR である可能性があるが、直接的な証拠はまだ得られていない。

## クラミドモナスにおけるステート遷移と PGR-CEF の関係

高等植物と異なり、クラミドモナスは嫌気条件下での生存が可能であり、発酵や水素発生のような嫌気条件特異的な代謝が存在する<sup>33,34)</sup>。しかし、これらの代謝系路が完全に機能していないと考えられる嫌気条件の初期段階では、CEF 活性の上昇により ATP 合成能を増加させ、葉緑体内に還元当量が増加する嫌気条件下での NAD(P)H/ATP 比の最適化に関わり、細胞内の代謝反応に ATP を供給していると予測される。嫌気条件はステート遷移も誘導するため<sup>35)</sup>、これまでに、CEF の活性増加はステート遷移依存的に起こると考えられてきた<sup>36,37)</sup>。ステート遷移とは、PSI と PSII がアンテナサイズを増減し両者の間で集光量のバランスを取る機構<sup>38,39)</sup>であり、PQ プールの酸化還元状態とそれにより制御される葉緑体チラコイド膜結合型セリン・スレオニンキナーゼである Stt7<sup>40)</sup>(シロイヌナズナにおける Stt7 ホモログ、STN7<sup>41)</sup>) による PSII アンテナ LHCII のリン酸化により制御される。PQ プールが比較的酸化状態にあるときには、LHCII は PSII のアンテナとして機能する(ステート 1)。一方、PQ プールが還元状態になる際には、LHCII の一部が PSII-LHCII 複合体から脱離することで PSII アンテナサイズを減少させるとともに、脱離した LHCII の一部が PSI-LHCI 複合体に結合し集光能を増加させる(ステート 2)<sup>2)</sup>。そのため、ステート 1-2 遷移により PSI のアンテナサイズは増加する。ステート 2-1 遷移は、LHCII の脱リン酸化を担う脱リン酸化酵素<sup>42)</sup>により制御されることがわかっている<sup>2,43)</sup>。クラミドモナスでは、細胞内での ATP レベルが低下すると考えられる条件、主に呼吸鎖電子伝達阻害時には、葉緑体内での還元当量が増加し非光化学的な PQ プールの還元が起こり、ステート 1-2 遷移が起こることが示されている<sup>44,45)</sup>。呼吸阻害時の葉緑体における還元当量の増加は以下のように解釈される：呼吸阻害による ATP レベル低下時には、ATP レベルを高めるために解糖反応が活発になると予測されるが、解糖系及びクエン酸回路で生成した NADH が呼吸鎖電子伝達反応で消費されない。ここで余剰になった

NADH は、リンゴ酸-オキサロ酢酸シャトルを介して葉緑体へ NAD(P)H として輸送される<sup>46,47)</sup>。そのため、呼吸阻害時には葉緑体内の還元当量が増加すると考えられる。嫌気条件下では、呼吸鎖電子伝達が阻害されるため、同様の現象が起こると考えられる。加えて、嫌気条件下では NAD(P)H からプラストキノンプールを経て酸素を還元する葉緑体呼吸も阻害されると考えられる<sup>48,49)</sup>。そのため、PQ プールが還元状態となり、ステート 1-2 遷移が誘導される。光合成電子伝達の脱共役時は、ATP 不足による解糖反応促進に伴う NADH の発生増加と葉緑体内の還元当量の増加による PQ プールの還元が起こり、ステート 1-2 遷移が誘導されると考えられる<sup>44)</sup>。Finazzi らは、ステート 1-2 遷移の起こらない変異株 (*stt7: lacking Stt7; bf4: lower accumulation of LHCII, A-AUU: lower accumulation of Cyt b<sub>6</sub>f*) において、PSII からの電子伝達を阻害する DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) と PQ プールからの電子伝達を阻害する DBMIB (2,5-dichloro-3-methyl-6-isopropyl-*p*-benzoquinone) 存在下での Cyt *f* の光酸化測定を行い、ステート 1 とステート 2 誘導条件での Cyt *f* の光酸化レベルを比較した<sup>37)</sup>。その結果、野生株ではステート 1 において、DCMU ないし DBMIB 存在下での Cyt *f* の酸化レベルは等しかった。これは、ステート 1 条件下では、PSII 由来ではない電子すなわち CEF 経路からの電子の流入が極めて少ないため、PQ プールの上流の電子伝達阻害でも PQ プール下流の電子伝達阻害でも同等の Cyt *f* の酸化レベルが観測されたと解釈される。ステート 2 条件下では DCMU 存在下での Cyt *f* の酸化レベルは阻害剤非存在下と等しく、DBMIB 存在下に比べて小さかった。これは、ステート 2 条件下では、CEF 経路から伝達された電子が増加し、還元される Cyt *f* の量が増加したことを示すものである。一方、ステート 1-2 遷移が起こらない *stt7* 株において、ステート 2 誘導条件下では DCMU 存在下での Cyt *f* の酸化レベルは DBMIB 存在下と等しく、CEF 経路から伝達される電子による Cyt *f* の還元は見られなかった。また、LHCII の蓄積低下変異株 (*bf4*)、Cyt *b<sub>6</sub>f* の蓄積低下変異株 (A-AUU)

ではステート遷移が観測できないが、これらにおいても Cyt *f* の酸化レベルの変化は観測できなかった<sup>37)</sup>。以上のことから、ステート 1-2 遷移が、サイクリック電子伝達の駆動に必要であると結論された。Iwai らの解析では、DCMU 存在下ステート 2 細胞では、励起光照射下での P700 還元レベルが高いことが観測され、それは CEF 活性の増加によると報告されている<sup>32)</sup>。光照射下での P700 光酸化還元レベルは PSI アンテナサイズに依存するが、この解析において PSI アンテナサイズ変化の考慮はなされていないため、P700 還元レベルの違いが CEF 活性増加のみに起因するかどうかは明言できない。

上記のようにステート 1-2 遷移が CEF 活性増加に関与するという報告がある一方、ステート遷移は CEF の嫌気条件下での加速には関与しないという報告もある。嫌気条件下での CEF 速度増加を示さない欠損あるいはノックダウン変異株 (CAS 欠損株、ANR1 ノックダウン株、PETO ノックダウン株) におけるクロロフィル蛍光測定により、ステート遷移能が損なわれていないことが示されている<sup>30,31)</sup>。Takahashi らは、正常なステート遷移を示さない PTOX2 欠損株と Stt7 欠損株を用いた解析により、嫌気条件下での CEF 速度増加は、ステート遷移 1-2 に伴う PSI のアンテナサイズ増加に依存しないことを示した<sup>11)</sup>。呼吸鎖の Alternative electron transport を介在する AOX のホモログである Plastid Terminal Oxidase (PTOX) は、葉緑体呼吸鎖を介在し、PQ プールを酸化して酸素を還元する<sup>49-51)</sup>。光照射下では、Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体が主に PQ プールの酸化を担うが、暗下での PQ プールの酸化は PTOX に依存する。そのため、PTOX2 欠損株 (*ptox2*) では暗条件下において、常にステート 2 を維持する一方、DCMU 存在下光照射を行うことによりステート 1 へ遷移する。クラミドモナスの細胞懸濁液を暗下で攪拌すると、呼吸鎖での呼吸基質の消費、葉緑体呼吸による酸素の還元により PQ プールは酸化状態になるため、野生株ではステート 1 となる。一方、*ptox2* では、暗下での PQ プールの酸化が起こらないためステート 2 となる。実際に、野生株では PSI のアンテナサイズ、LHCII のリン酸化の増加

は確認されなかったが、*ptox2* では野生株のステート 2 と同程度の PSI のアンテナサイズと LHCII のリン酸化レベルが観測された。そのため *ptox2* において、CEF 活性が増加することが予想されるが、光照射中に還元される P700 の量をもとに評価を行ったところ、ステート 1 の野生株と同等の CEF 活性が観測された<sup>11)</sup>。また、嫌気条件下では、呼吸鎖および葉緑体呼吸での酸素の還元が起こらず PQ プールが還元状態であるためステート 2 であることが予測され、野生株では PSI アンテナサイズの増加と LHCII のリン酸化が検出されたが、*stt7* では LHCII のリン酸化および PSI アンテナサイズの増加は見られなかった。しかしながら、CEF 活性は野生株と同様に増加した。いずれの変異株においても、PSI アンテナサイズの変化に関わらず嫌気条件下で、CEF 速度は約 2 倍に増加した。この解析において、CEF 速度評価の基準となる光照射中の P700 の酸化還元レベルは PSI アンテナサイズに依存するため、ここで求められた CEF 速度は PSI アンテナサイズで標準化されている。この解析結果から、ステート遷移能に関わらず、ステート 1-2 遷移を誘導する条件下では PSI アンテナサイズの増加に依存せず CEF 速度が増加したということが示された<sup>11)</sup>。これらのことから、嫌気条件下での CEF 速度の増加は、ステート 1-2 遷移に依存しないという結論が導かれた。また、暗下での *ptox2* では PQ プールは還元状態であるが、PSI 下流において還元当量は蓄積していないことが考えられるため、PQ プールの還元状態よりはむしろ、PSI 下流の電子受容体が存在するストロマの還元状態が CEF 速度の増加を引き起こすことが示唆された。

ステート 1-2 遷移に必要な条件すなわち PQ プールが還元される条件では、基本的にはストロマでの還元当量の蓄積も生じる。この条件下では CEF 加速が起こるため、ステート 2 (を誘導する) 条件はサイクリック電子伝達の加速に必要であると言える。しかし、ステート 2 の特徴である PSI のアンテナサイズの増加は CEF の活性増加に必要ではないと言えるのではないだろうか。



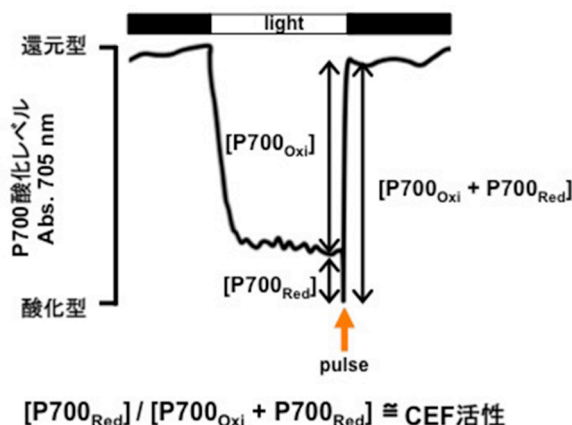


図 2. クラミドモナス細胞における DCMU 存在下の P700 光酸化キネティクス

DCMU を添加したクラミドモナス細胞懸濁液に光照射すると、P700 が酸化されて 705 nm での吸収減少が観測される。パルス光照射（オレンジ色矢印）により P700 最大酸化レベルが求められる。消灯後 P700 は速やかに還元される。[P700<sub>Oxi</sub>]は光照射により酸化される P700 の量、[P700<sub>Red</sub>]は光照射中に CEF 由来で還元される P700 の量、[P700<sub>Red</sub>+P700<sub>Oxi</sub>]は酸化可能な P700 の全量を示す。酸化可能な P700 に対する CEF により還元される P700 の割合から相対的な CEF 活性を評価する。

### P700 の光酸化レベルをもとにした CEF 活性測定

前述した、CEF 活性増加とステート 1-2 遷移による PSI アンテナサイズの増加が相関しないという結論は、光照射中の P700 酸化還元レベルの測定を用いた評価から導かれた。

高等植物などでは、P700 の光酸化に伴い 820-830 nm での吸光度増加が見られるため、その吸光度変化から PSI の活性（P700 の酸化還元状態）を評価できる。しかし、クラミドモナスでは、830 nm での吸光変化が高等植物に比べ小さいこと、赤外光吸収帯を欠くなどの理由により、820-830 nm での吸光変化で PSI 活性を評価することが難しい<sup>46)</sup>。一方、700 nm 付近で光酸化に伴う吸光度減少を観測できるため、その吸光度変化から PSI の活性を評価することができる<sup>46)</sup>。Joliot Type Spectrophotometer (JTS) を用いて測定した、DCMU 存在下でのクラミドモナス細胞における P700 光酸化に伴う 705 nm での吸光変化と消灯後の還元キネティクスの一例を図 2 に示す。DCMU 存在下では、PSII からの電子伝達が阻害されるため、光照射下での酸化型 P700 の蓄積による吸光度減少の維持と光消灯後の P700 の再還元による吸光度変化が観測できる。DCMU 存在下で任意の強度の励起光照射を行うと、P700 が光酸化される（図中[P700<sub>Oxi</sub>]）が、一部光照射中に還元される P700 量（図中[P700<sub>Red</sub>]）を観測することができる。さらに、励起光飽和消灯直前に飽和パルス光を照射し、光酸化可能な P700 の全量（図中[P700<sub>Red</sub>+P700<sub>Oxi</sub>]）を求め、[P700<sub>Red</sub>]/

[P700<sub>Red</sub>+P700<sub>Oxi</sub>]比を算出する。この際、非特異的な吸光変化を排除するために、730 nm での吸光変化も測定し 705 nm での吸光変化から差し引く。PSII からの電子伝達を阻害した条件下で PSI に伝達される電子の量は CEF に依存するため、[P700<sub>Red</sub>]/[P700<sub>Red</sub>+P700<sub>Oxi</sub>]の値が大きいほど相対的な CEF 活性が高いと言える。この場合、還元速度の絶対値 (e<sup>-</sup>s<sup>-1</sup>PSI<sup>-1</sup>) を算出するには、PSI の酸化速度を求める必要がある。また、光照射下で還元される P700 の量は PSI アンテナサイズに依存するため、変異株を用いた測定や異なる生育条件で活性を比較する場合は、PSI アンテナサイズによる標準化が必要となる。PSI 酸化速度とアンテナサイズの定量は Electrochromic shift 測定により求める<sup>11)</sup>。後述する緑藻特異的なチラコイド膜タンパク質 PETO のノックダウン株では、この P700 の還元レベルをもとにした方法により嫌気条件下での CEF 速度を評価した。その結果、野生株では嫌気条件へのシフトに伴い、約 2 倍に速度が増加していたが、ノックダウン株では 1.4 倍にとどまり、その差が有意であることが示された<sup>31)</sup>。

### 緑藻特異的な CEF 活性調節因子 PETO と ANR1

嫌気条件のように葉緑体内での還元力が増加し、CEF 活性が増加する条件下では、PSI、Cyt *b*<sub>6</sub>/FNR、PGRL1、CAS、ANR1、PETO からなる CEF 複合体が形成されることから、CEF の加速には CEF 複合体の形成が必要であると考えられてい

る<sup>11,30,32</sup>)。CEF 複合体に含まれる ANR1 と PETO は緑藻類でのみ同定されており、その蓄積量が減少した株では CEF の速度増加が抑えられることから、緑藻特異的な CEF 活性調節に関与することが予測される。

Hemel らは、クラミドモナスにおいて PETO 遺伝子を同定し、PETO は維管束植物には存在しないことを見出した<sup>52</sup>)。微細藻類における PETO のシーケンス解析により、PETO のオーソログは、緑藻植物門 (*Chlorophyta*) のうち緑藻綱 (*Chlorophyceae*) とトレボウクシア藻綱 (*Trebouxiophyceae*) にみられるが、緑藻植物門の中で最も進化的に古いプラシノ藻綱にはオーソログは存在しなかった<sup>31</sup>)。PETO は、核ゲノムにコードされる約 15 kDa のチラコイド膜タンパク質であり、N 末端はルーメン側に位置し、保存性の高い 1 つの膜貫通領域、ストロマに露出した C 末端を持つ。ストロマ側に露出する C 末端部位が、嫌気処理によるステート 1-2 遷移により可逆的にリン酸化されることがわかっている<sup>52,53</sup>)。C 末端部分にはよく保存された (K/R)(D/N)SX<sub>4,5</sub>G(Y/F)E のモチーフがあるが、この高度に保存されたセリンは、プロテオーム解析で検出された 9 箇所の PETO のリン酸化部位には含まれていなかった<sup>53</sup>)。Hamel らの報告から、PETO は、Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体欠損株では蓄積しないこと、Cyt *b<sub>6</sub>f* の粗精製段階においては他の Cyt *b<sub>6</sub>f* サブユニットと共分画されたため、Cyt *b<sub>6</sub>f* サブユニットの一つ (サブユニット V) と考えられていたが、クラミドモナス由来の Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体結晶構造中では該当する構造が得られなかったこと、PETO ノックダウン株において Cyt *f* の蓄積量に変化しないことから、現在では PETO は Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体構成サブユニットではないと考えられている<sup>31,52,54</sup>)。

ANR1 は、嫌気条件に応答して蓄積量の増加するタンパク質として同定された<sup>55</sup>)。ANR1 は、核ゲノムにコードされる約 20 kDa のチラコイド膜タンパク質で、N 末端側にストロマに露出する 2 つの ANR1 ドメインと 3 本の膜貫通ヘリクスを持つ。ANR1 ドメインは、アミノ酸 66 残基の配列で、2 つの ANR1 ドメインそれぞれに高度に保

存された GGE モチーフ:GG(W/F)(A/P)GGE を含む。主に緑藻綱にのみオーソログが同定されている PETO に対し、ANR1 は、緑藻植物門のうち緑藻綱とトレボウクシア藻綱、プラシノ藻綱 (*Prasinophyceae*)、アオサ藻綱 (*Ulvophyceae*) にオーソログが見られる。プラシノ藻綱の一部では、ANR1 の構造が異なるため、ここでは ANR1-Like を ANL1 と表記する。ANL1 は、膜貫通ヘリクスを持たないが 2 つの ANR1 ドメインを保持する<sup>31</sup>)。

### PETO と ANR1 との相互作用

Takahashi らは、PETO の機能の実態を明らかにするために、クラミドモナスにおいて PETO のノックダウン株 (PETO-KD) を作製し、PETO の結合相手について解析を行った<sup>31</sup>)。CEF 複合体の形成に PETO の蓄積量変化が及ぼす影響を調べるために、嫌気処理後、野生株と PETO-KD からチラコイド膜を単離し、n-Tridecyl-β-D-maltoside (TDM) で可溶化後ショ糖密度勾配超遠心分画を行ったところ、野生株において、もっともサイズの大きいクロロフィル結合タンパク質画分に CEF 複合体画分が得られ、PSI、Cyt *b<sub>6</sub>f* と FNR、PGRL1、ANR1 とともに PETO が共分画した。一方 PETO-KD では、これらの共分画が明確には得られず、Cyt *b<sub>6</sub>f* と FNR、PGRL1、ANR1 の分布は、軽い画分へとシフトした<sup>31</sup>)。この結果により、PETO と CEF 複合体構成因子との相互作用が考えられたため、Strep-tag を導入した PETO 過剰発現株を用いて PETO と相互作用するタンパク質の同定を試みた。TDM で可溶化したチラコイド膜を Streptactin カラムに供し、0.1% TritonX-100 を含む溶液で洗浄後、2.5 mM desthiobiotin で溶出を行った。得られたフラクションをウェスタン分析により解析した。図 3 に示すように、desthiobiotin による溶出では、PETO と共に ANR1 が同様のパターンで溶出した。さらに、かなり弱いシグナルではあるものの、PsaA、FNR、PGRL1 も溶出画分に検出されていることから、これらの CEF 複合体構成因子と PETO、ANR1 との相互作用が示唆された。Cyt *f* は、溶出画分においては検出限界以下であったが、0.1%

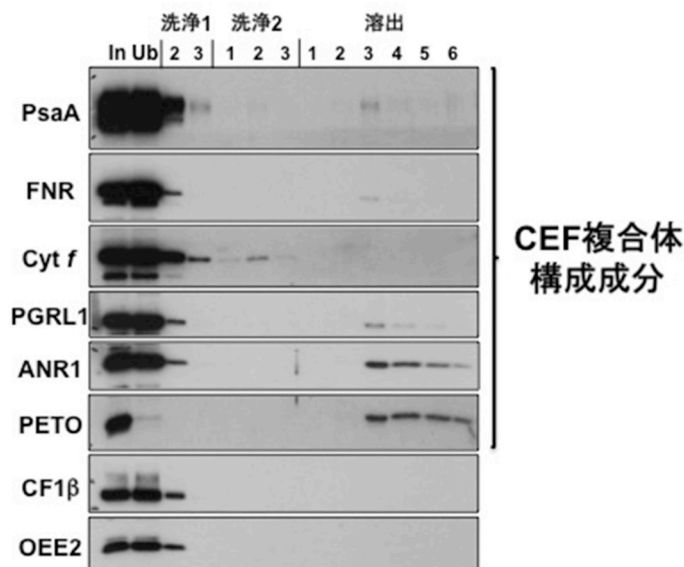


図 3. Strep-tag アフィニティクロマトグラフィによる PETO と ANR1 の相互作用

0.85 % TDM で可溶化したチラコイド膜を Strep-tag アフィニティクロマトグラフィにて精製を行った。洗淨 1 画分では (-)TritonX-100、洗淨 2 画分では (+)TritonX-100 を含む溶液で洗淨を行い、2.5 mM desthiobiotin を含む溶液で溶出した。洗淨画分は 1 mL、溶出洗淨画分は 0.5 mL ずつ分取した。得られた画分を、PsaA, FNR, *cyt<sub>f</sub>*, PGRL1, ANR1, PETO, CF1b, OEE2 抗体を用いて免疫ブロット解析した。Input (In)と Unbound (un)には 0.9 μg Chl 相当タンパク質をロードし、他のフラクションは 10 μL ずつロードした。Takahashi et al., 2016<sup>31)</sup>から改変。

TritonX-100 を含んだ溶液による洗淨 2 画分ではシグナルが検出されており、本来 CEF 複合体にゆるく結合しているものの洗淨により外れた可能性が示唆された。ネガティブコントロールである、OEE2 (PSII) と CF<sub>1</sub>β (ATPase) は溶出画分およびいずれの洗淨画分にも検出されなかった。これらの結果は、PETO と ANR1 との相互作用を示す証拠であるとともに、PETO と ANR1 が他の CEF 複合体成分と複合体を形成していることを示唆している。

### クラミドモナス PGR-CEF 活性調節機構の考察

高等植物、シアノバクテリア、緑藻を通じて PGR 経路のサイクリック電子伝達制御の詳細については議論があるが、シロイヌナズナにおいて、PGR5 と PGRL1 が *in vitro* で相互作用を示すこと<sup>28)</sup>、PGRL1 が真核光合成生物間で高度に保存されている6つのCys残基と鉄を含むコファクターを持つことから、PGR5 と PGRL1 がヘテロダイマーを形成し、Trx を介した電子伝達の制御が存在すると提唱されている<sup>29)</sup>。

クラミドモナスでは PGR 経路は嫌気条件下で CEF 活性が増加することが明らかになっている。嫌気条件下の葉緑体では、還元当量の増加により PSI 下流での電子受容能力が低下し電子が余る。この電子が Fd (もしくは FNR) を介してチラコ

イド膜中 (おそらくは Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体) へと伝達されるため、嫌気条件下で CEF 速度が増加することが考えられる。アラビドプシス PGRL1 に見出された6つのCys残基は全てクラミドモナスにおいても保存されており、高等植物同様 PGRL1 が PGR5 とヘテロダイマーを形成し、ストロマでの還元当量が増加する際に Trx を介した電子伝達の制御機構が存在すると考えられる。一方、クラミドモナスには ANR1 や PETO という緑藻特異的なタンパク質が存在し、これらも PGR-CEF の加速に関与することがわかっている。ここでは、緑藻特異的な PETO および ANR1 が PGR 経路の調節において、どのように機能するか考察したい。ANR1 および PETO のノックダウン株では嫌気条件下での CEF 加速が抑制されていた<sup>30,31)</sup>。CEF 複合体における各成分の化学量論比はまだ不明であるが、Strep-tag アフィニティ精製において PETO と ANR1 が共精製されたこと、溶出画分には PGRL1 と FNR も含まれていた。また、PETO と ANR1 は CEF 複合体が形成されない好気条件下においても相互作用し、一部の PGRL1 や FNR と CEF 複合体の前駆体 (プレコンプレックス) を形成することが示唆されている<sup>31)</sup>。この前駆体が、CEF 複合体の中核となり、PSI と Cyt *b<sub>6</sub>f* を含む CEF 複合体の形成に関与すると考えられる。そして、PETO と ANR1 が CEF 複合体を安定化することで CEF の加速に寄与する考えられる<sup>31)</sup>。

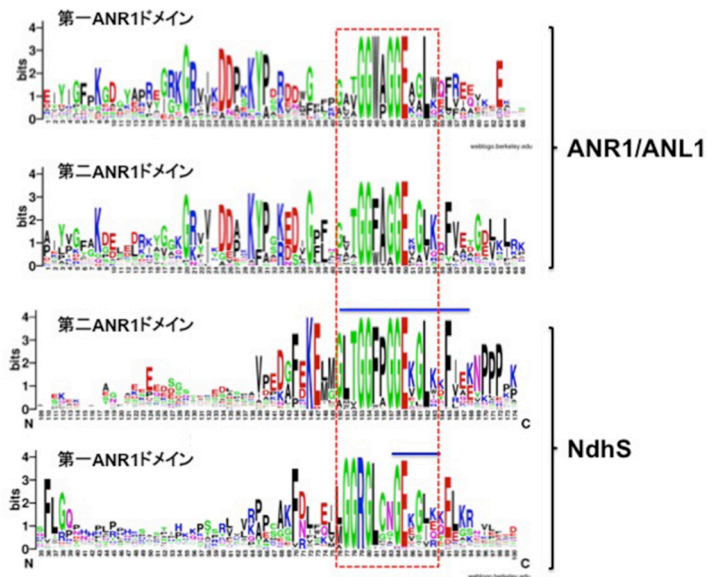


図 4. ANR1/ANL1 と NdhS における 2 つの ANR1 ドメイン

GGE モチーフを赤破線で示す。ANR1/ANL1 の配列ロゴは緑藻類からなるシーケンスセットから、NdhS の配列ロゴは陸上植物からなるシーケンスセットから作成した。

ANR1 との高い類似性を示す配列を青線で示す。Takahashi et al., 2016<sup>31)</sup>から改変。

PETO、ANR1 が CEF 複合体の形成および安定化に関する分子メカニズムとして、ANR1 ドメイン中にある GGE モチーフが関わる可能性が挙げられる。シーケンス解析により、ANR1 に存在する GGE モチーフは、維管束植物に存在する NdhS の N 末端部分に見られる繰り返し配列に類似していることが明らかになった<sup>31)</sup>。NdhS は CRR31 として同定され、PSI の Fd 結合サブユニット PsaE にも見られる Src homology 3 (SH3) domain-like 配列を C 末端部分に持つことから、NDH 複合体の Fd 結合部位であると報告されている<sup>14)</sup>。図 4 に示すように、ANR1 と NdhS の比較において、第二 ANR1 ドメインに比べて相同性は低いものの、第一 ANR1 ドメインにおいても GGE モチーフの保存が確認でき、両者はホモログであると考えられる。

緑藻植物門において進化的に最も古いプラシノ藻類の一部は、ANL1 と NdhS 両方を持っているが、その他の緑藻類は ANR1 のみを持っている。また、NdhS はシアノバクテリアと陸上植物でオーソログが同定されているが緑藻類では同定されていない。加えて、マメ科の植物には NdhS の SH3-like 配列を欠くパラログ (CRR31-like、CRL31) が見つかっており、これは ANL1 に類似している。これらのことから、NdhS は進化の過程で分岐し ANL1 を経て ANR1 へと変化したのではないかと考えられる<sup>31)</sup>。ANR1 は SH3-like 配列を持たないため、Fd の結合部位としての機

能は持たないと考えられるが、NdhS と機能的に類似している可能性は否定できない。Yamamoto らは、2 つの GGE 領域を含む NdhS の N 末端領域 (E57-L168) の切断変異が、NdhS 欠損によるプラストキノール還元能の阻害を、還元速度は遅いものの相補することから、NdhS の N 末端領域は NDH-CEF 活性に必須ではないが、最適な NDH-CEF 活性には重要であると考察している<sup>14)</sup>。そのため、クラミドモナスの PGR-CEF の加速において、GGE モチーフ : GG(F/W)(A/P)GGE が何らかの機能を担っているのではないかと推測される。2 つある GGE モチーフはストロマ側に位置するが、そのうち 2 つめのモチーフはチラコイド膜近傍に位置することが予測される<sup>31)</sup>。GGE モチーフには、芳香族アミノ酸による  $\pi$ - $\pi$  相互作用とグルタミン酸のカルボン酸を介した水素結合が可能であると考えられる。葉緑体内の還元当量増加に伴い電子伝達鎖が還元状態となると、増加したプラストキノールが膜内を拡散し、GGE モチーフに結合する可能性も排除できない。プラストキノールの結合を介して葉緑体内のレッドクスセンシングを行い、PGR1, PGR5, FNR と PSI、Cyt *b<sub>6</sub>f* と共に CEF 複合体を形成・安定化し、CEF の加速に寄与する可能性も考えられる (図 5)。PETO C 末領域のリン酸化も嫌気条件下で起こるため<sup>52,53)</sup>、この修飾も何らかの機能を果たすと考えられる。

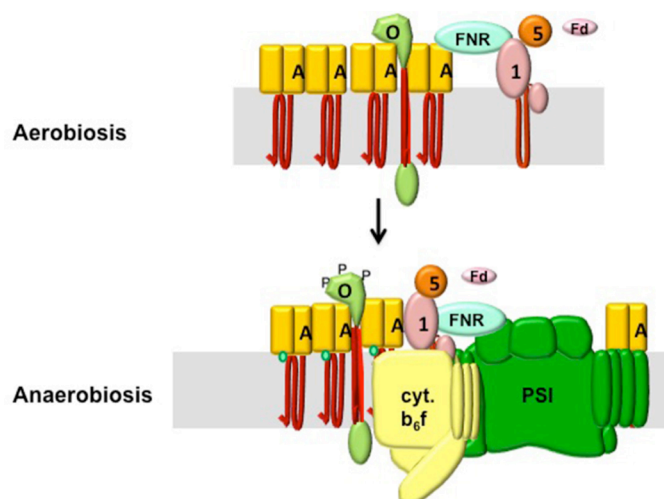


図 5. クラミドモナスにおける PETO と ANR1 の CEF 複合体における機能の仮説モデル

O, PETO; A, ANR1; FNR, Fd:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase; 1, PGRL1; 5, PGR5; Fd, ferredoxin; P, リン酸化; 緑ドット, プラストキノン分子を示す。好気条件では、FNR、一部の PGRL1, ANR1, PETO は、前駆体（プレコンプレックス）として存在しているが、嫌気条件にシフトした際に ANR1 の GGE モチーフによる何らかのセンシング（ここではプラストキノン）と、PETO のリン酸化を通じて、PSI と Cyt *b<sub>6</sub>f* 複合体を含む CEF 複合体の形成とその安定化、CEF 加速に関与していると考えられる。PGR5 は、CEF 複合体の成分としてこれまでに検出されていないが、高等植物において PGRL1 と相互作用することが報告されているため、モデル中に図示した。

#### おわりに

本稿では、クラミドモナスにおける PGR-CEF の特徴である嫌気条件下の活性増加の調節について、ステート 1-2 遷移に伴う PSI アンテナサイズの増加が CEF 活性増加に必ずしも必要ではないこと、葉緑体の還元状態が CEF 活性増加を誘導することを述べた。その活性増加の詳細なメカニズムは未だ明らかではないが、高等植物で提唱されているように PGRL1 に保存される Cys 残基と Trx を介したレドックス制御が考えられる一方、緑藻特異的なチラコイド膜タンパク質 ANR1 と PETO の関与について考察した。ANR1 と PETO のノックダウン株では、嫌気条件下での CEF 活性増加が抑制されること、両者は相互作用すること、PETO は嫌気条件下でリン酸化すること、ANR1 は NDH-CEF の機能維持に関与する可能性のある GGE モチーフを持つことから、PETO と ANR1 が協調的に働き、嫌気条件下で、PETO のリン酸化と ANR1 の GGE モチーフによる何らかのセンシングを通じて、CEF 複合体の形成および安定化、CEF 加速に寄与すると考えられる。しかしながら、この仮説を裏付ける証拠は未だ得られていないため、今後 PETO のリン酸化部位や

GGE モチーフの点変異導入などさらなる解析が必要である。また、CEF 複合体の分子集合メカニズムなども解析が求められる。さらに、緑藻の生育・生存における CEF の役割や嫌気条件特異的な代謝との相互作用についても不明な点が多く、今後の研究の進展が期待される。

#### 謝辞

本稿で紹介した著者らの研究は、フランス国立科学センター Institut de Biologie Physico-Chimique の Wollman 博士らの研究グループにて行いました。また、本稿の考察において埼玉大学の藤城貴史助教からご助言を得ました。これらの方々から心より感謝を申し上げます。また、この機会を与えてくださいました岡山大学自然科学研究科高橋裕一郎教授、査読者の先生にも心から感謝を申し上げます。

Received March 30, 2016; Accepted April 6, 2016;

Published April 30, 2016



## 参考文献

1. Tagawa, K., Tsujimoto, H.Y. and Arnon, D.I. (1963) Role of chloroplast ferredoxin in the energy conversion process of photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 49, 567–572.
2. Minagawa, J. and Tokutsu, R. (2015) Dynamic regulation of photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 82, 413–428.
3. 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.
4. Shikanai, T. (2007) Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 199–217.
5. Johnson, X., Steinbeck, J., Dent, R.M., Takahashi, H., Richaud, P., Ozawa, S., Houille-Vernes, L., Petroustos, D., Rappaport, F., Grossman, A.R., Niyogi, K.K., Hippler, M. and Alric, J. (2014) Proton gradient regulation 5-mediated cyclic electron flow under ATP- or redox-limited conditions: a study of DeltaATPase pgr5 and DeltarbcL pgr5 mutants in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 165, 438–452.
6. Shikanai, T. (2014) Central role of cyclic electron transport around photosystem I in the regulation of photosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology* 26, 25–30.
7. Allahverdiyeva, Y., Suorsa, M., Tikkanen, M. and Aro, E.M. (2015) Photoprotection of photosystems in fluctuating light intensities. *J. Exp. Bot.* 66, 2427–2436.
8. Alric, J. (2014) Redox and ATP control of photosynthetic cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*: (II) involvement of the PGR5-PGRL1 pathway under anaerobic conditions. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 825–834.
9. Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K., Endo, T., Tasaka, M. and Shikanai, T. (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* 429, 579–582.
10. Tolleter, D., Ghysels, B., Alric, J., Petroustos, D., Tolstygina, I., Krawietz, D., Happe, T., Auroy, P., Adriano, J.M., Beyly, A., Cuine, S., Plet, J., Reiter, I.M., Genty, B., Cournac, L., Hippler, M. and Peltier, G. (2011) Control of hydrogen photoproduction by the proton gradient generated by cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 23, 2619–2630.
11. Takahashi, H., Clowe, S., Wollman, F.A., Vallon, O. and Rappaport, F. (2013) Cyclic electron flow is redox-controlled but independent of state transition. *Nat. Commun.* 4, 1954.
12. Shikanai, T., Endo, T., Hashimoto, T., Yamada, Y., Asada, K. and Yokota, A. (1998) Directed disruption of the tobacco ndhB gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 95, 9705–9709.
13. Ifuku, K., Endo, T., Shikanai, T. and Aro, E.M. (2011) Structure of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex: nomenclature for nuclear-encoded subunits. *Plant Cell Physiol.* 52, 1560–1568.
14. Yamamoto, H., Peng, L., Fukao, Y. and Shikanai, T. (2011) An Src homology 3 domain-like fold protein forms a ferredoxin binding site for the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 1480–1493.
15. Yamamoto, H. and Shikanai, T. (2013) In planta mutagenesis of Src homology 3 domain-like fold of NdhS, a ferredoxin-binding subunit of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*: a conserved Arg-193 plays a critical role in ferredoxin binding. *J. Biol. Chem.* 288, 36328–36337.
16. Ma, W. and Ogawa, T. (2015) Oxygenic photosynthesis-specific subunits of cyanobacterial NADPH dehydrogenases. *IUBMB Life* 67, 3–8.
17. Peng, L., Fukao, Y., Fujiwara, M., Takami, T. and Shikanai, T. (2009) Efficient operation of NAD(P)H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCI in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 3623–3640.
18. Berger, S., Ellersiek, U. and Steinmuller, K. (1991) Cyanobacteria contain a mitochondrial complex I-homologous NADH-dehydrogenase. *FEBS Lett.* 286, 129–132.
19. Zhang, P., Battchikova, N., Jansen, T., Appel, J., Ogawa, T. and Aro, E.M. (2004) Expression and functional roles of the two distinct NDH-1 complexes and the carbon acquisition complex NdhD3/NdhF3/CupA/Sll1735 in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant Cell* 16, 3326–3340.
20. Battchikova, N., Eisenhut, M. and Aro, E.M. (2011) Cyanobacterial NDH-1 complexes: novel insights and remaining puzzles. *Biochim. Biophys. Acta* 1807,



- 935–944.
21. Zhang, P., Battchikova, N., Paakkarinen, V., Katoh, H., Iwai, M., Ikeuchi, M., Pakrasi, H. B., Ogawa, T. and Aro, E.M. (2005) Isolation, subunit composition and interaction of the NDH-1 complexes from *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Biochem. J.* 390, 513–520.
  22. Ogawa, T. (1991) A gene homologous to the subunit-2 gene of NADH dehydrogenase is essential to inorganic carbon transport of *Synechocystis* PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 4275–4279.
  23. Yeremenko, N., Jeanjean, R., Prommeenate, P., Krasikov, V., Nixon, P.J., Vermaas, W.F., Havaux, M. and Matthijs, H.C. (2005) Open reading frame *ssr2016* is required for antimycin A-sensitive photosystem I-driven cyclic electron flow in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 46, 1433–1436.
  24. He, Z., Zheng, F., Wu, Y., Li, Q., Lv, J., Fu, P. and Mi, H. (2015) NDH-1L interacts with ferredoxin via the subunit NdhS in *Thermosynechococcus elongatus*. *Photosynth. Res.* 126, 341–349.
  25. Robbens, S., Derelle, E., Ferraz, C., Wuyts, J., Moreau, H. and Van de Peer, Y. (2007) The complete chloroplast and mitochondrial DNA sequence of *Ostreococcus tauri*: organelle genomes of the smallest eukaryote are examples of compaction. *Mol. Biol. Evol.* 24, 956–968.
  26. Jans, F., Mignolet, E., Houyoux, P.A., Cardol, P., Ghysels, B., Cuine, S., Cournac, L., Peltier, G., Remacle, C. and Franck, F. (2008) A type II NAD(P)H dehydrogenase mediates light-independent plastoquinone reduction in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 20546–20551.
  27. Desplats, C., Mus, F., Cuine, S., Billon, E., Cournac, L. and Peltier, G. (2009) Characterization of Nda2, a plastoquinone-reducing type II NAD(P)H dehydrogenase in *Chlamydomonas* chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 284, 4148–4157.
  28. DalCorso, G., Pesaresi, P., Masiero, S., Aseeva, E., Schunemann, D., Finazzi, G., Joliot, P., Barbato, R. and Leister, D. (2008) A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*. *Cell* 132, 273–285.
  29. Hertle, A.P., Blunder, T., Wunder, T., Pesaresi, P., Pribil, M., Armbruster, U. and Leister, D. (2013) PGRL1 is the elusive ferredoxin-plastoquinone reductase in photosynthetic cyclic electron flow. *Mol. Cell* 49, 511–523.
  30. Terashima, M., Petroustos, D., Hudig, M., Tolstygina, I., Trompelt, K., Gabelein, P., Fufezan, C., Kudla, J., Weindl, S., Finazzi, G. and Hippler, M. (2012) Calcium-dependent regulation of cyclic photosynthetic electron transfer by a CAS, ANR1, and PGRL1 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 17717–17722.
  31. Takahashi, H., Schmollinger, S., Lee, J.H., Schroda, M., Rappaport, F., Wollman, F.A. and Vallon, O. (2016) The PETO protein interacts with other effectors of cyclic electron flow in *Chlamydomonas*. *Mol. Plant* 9, 558–568.
  32. Iwai, M., Takizawa, K., Tokutsu, R., Okamuro, A., Takahashi, Y. and Minagawa, J. (2010) Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis. *Nature* 464, 1210–1213.
  33. Catalanotti, C., Yang, W., Posewitz, M.C. and Grossman, A.R. (2013) Fermentation metabolism and its evolution in algae. *Front. Plant Sci.* 4, 150.
  34. Hemschemeier, A. and Happe, T. (2011) Alternative photosynthetic electron transport pathways during anaerobiosis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 919–926.
  35. Wollman, F.A. and Delepelaire, P. (1984) Correlation between changes in light energy distribution and changes in thylakoid membrane polypeptide phosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 98, 1–7.
  36. Finazzi, G., Furia, A., Barbagallo, R.P. and Forti, G. (1999) State transitions, cyclic and linear electron transport and photophosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1413, 117–129.
  37. Finazzi, G., Rappaport, F., Furia, A., Fleischmann, M., Rochaix, J.D., Zito, F. and Forti, G. (2002) Involvement of state transitions in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO Rep.* 3, 280–285.
  38. Murata, N. (1969) Control of excitation transfer in photosynthesis I. Light-induced change of chlorophyll a fluorescence in *Porphyridium cruentum*. *Biochim. Biophys. Acta* 172, 242–251.
  39. Bonaventura, C. and Myers, J. (1969) Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim. Biophys. Acta* 189, 366–383.
  40. Depège, N., Bellafiore, S. and Rochaix, J.D. (2003)

- Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHCII phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science* 299, 1572–1575.
41. Bellaïf, 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.
  42. 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.
  43. Rochaix, J.D., Lemeille, S., Shapiguzov, A., Samol, I., Fucile, G., Willig, A. and Goldschmidt-Clermont, M. (2012) Protein kinases and phosphatases involved in the acclimation of the photosynthetic apparatus to a changing light environment. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B. Biol. Sci.* 367, 3466–3474.
  44. Bulté, L., Gans, P., Rebéillé, F. and Wollman, F.A. (1990) ATP control on state transitions in vivo in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1020, 72–80.
  45. Cardol, P., Alric, J., Girard-Bascou, J., Franck, F., Wollman, F.A. and Finazzi, G. (2009) Impaired respiration discloses the physiological significance of state transitions in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 15979–15984.
  46. Alric, J. (2010) Cyclic electron flow around photosystem I in unicellular green algae. *Photosynth. Res.* 106, 47–56.
  47. Hoefnagel, M.H.N., Atkin, O.K. and Wiskich, J.T. (1998) Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 235–255.
  48. Bennoun, P. (1982) Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 4352–4356.
  49. 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.
  50. Houille-Vernes, L., Rappaport, F., Wollman, F.A., Alric, J. and Johnson, X. (2011) Plastid terminal oxidase 2 (PTOX2) is the major oxidase involved in chlororespiration in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 20820–20825.
  51. Cournac, L., Redding, K., Ravenel, J., Rumeau, D., Josse, E. M., Kuntz, M. and Peltier, G. (2000) Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *J. Biol. Chem.* 275, 17256–17262.
  52. Hamel, P., Olive, J., Pierre, Y., Wollman, F.A. and de Vitry, C. (2000) A new subunit of cytochrome b<sub>6</sub>f complex undergoes reversible phosphorylation upon state transition. *J. Biol. Chem.* 275, 17072–17079.
  53. Bergner, S.V., Scholz, M., Trompelt, K., Barth, J., Gabelein, P., Steinbeck, J., Xue, H., Clowez, S., Fucile, G., Goldschmidt-Clermont, M., Fufezan, C. and Hippler, M. (2015) State transition7-dependent phosphorylation is modulated by changing environmental conditions and its absence triggers remodeling of photosynthetic protein complexes. *Plant Physiol.* 168, 615–634.
  54. Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J.L. and Picot, D. (2003) An atypical haem in the cytochrome b<sub>6</sub>f complex. *Nature* 426, 413–418.
  55. Terashima, M., Specht, M., Naumann, B. and Hippler, M. (2010) Characterizing the anaerobic response of *Chlamydomonas reinhardtii* by quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics.* 9, 1514–1532.

## A Discussion on Tuning of Cyclic Electron Flow around Photosystem I in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*

Hiroko Takahashi\*

Division of Life Science, Graduate School of Science and Engineering, Saitama University

## 報告記事

# The International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors of Photosynthetic Organisms 2015 参加報告

東洋大学 生命科学部  
高橋 重一

昨年のことになりますが、10月11日から15日にかけて、イスラエルはUpper GalileeにてThe International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors of Photosynthetic Organisms (ICTPPO) 2015が開催されました。本会議は隔年ごとに開催されており、今回で12回目となるそうです。毎回多くの日本人研究者が参加する会議であり、今回も著名な先生方の講演がアナウンスされていました。ところが、イスラエルが紛争地域であるために所属機関から渡航が認められなかったようで、蓋を開けてみれば、日本人参加者は私だけ、他国でも同様なのか、全体でも40名を少し超える程度の参加者と、近年開かれた会議の中では最も小規模なものとなりました。参加者の集合写真を下に掲載します。参考まで。

初日のプログラムはWelcome receptionのみでしたので、長旅の疲れを癒すとともに、会議に向け十分な英気を養うことができました。講演会は翌日から始まり、8つのセッション(Tetrapyrroles Metabolism、Phycobiliproteins – Biosynthesis and degradation、Light adaptation and state transitions、Energy transfer and electron transfer、Chlorophyll proteins – Biosynthesis and degradation、Structure of tetrapyrrole protein、Biochemistry of tetrapyrrole proteins、Phytochromes)に分かれ、29演題の発表がありました。小さな会場でしたので演者との距離も近く、研究に対する熱を感じながら、各分野の最新の知見を学ぶことができました。また、今回は応用研究にフォーカスを当てた演題がみられず、基礎研究の分野に特化した会議になりました。全くの異分野に出会い、カルチャーショックを受けるということはありませんでしたが、尖った議論を進めるにはよい環境であり、これはこれでよいものだ、と思いました。

そうそう、大切なことを書き忘れていました。2007年に京都で開かれたICTPPOのレクリエーションタイムで活躍した「けん玉」は、今も現役で大活躍中です。ICTPPOの常連である、Prof. Willowsはかなりの腕前になっており、とてもほっこりした気分になりました。

次回のICTPPOはシカゴで2017年に開催される予定です。こういった構成になるのか、今からとても楽しみです。



集合写真 (エクスカージョンのバードウォッチ中)

## 報告記事

若手の会活動報告  
～サイエンスアゴラ 2015 での出展報告～

立命館大学 生命科学部 生命情報学科

浅井 智広

前号（2015 年 12 月）から今号の会報（2016 年 4 月）の間は、若手の会としておもだった活動をしていないため、今回の活動報告では前号の会報で報告できなかったサイエンスアゴラ 2015 の出展について報告したいと思います。

サイエンスアゴラ 2015 は日本科学技術振興機構（JST）が主催する大規模なサイエンスコミュニケーションのイベントで、東京お台場地区を中心に 11 月 13 日から 15 日の三日間で開催されました。今回のサイエンスアゴラ 2015 の全体としてのテーマは「つくろう、科学ともにある社会」でした（<http://www.jst.go.jp/csc/scienceagora/> 参照）。2015 年は国連が定めた「国際光年」であったため、3 つの主要なサブテーマのひとつは「「ひかり」を通して見る人類の歩みと未来～原始から原子まで～」という光合成研究と深く関わる話題となっていました。若手の会では、幹事の辻敬典さん（関西学院大学）に中心となって出展を企画していただき、「若手研究者が伝えたい光合成の現在・過去・未来」というタイトルで常設展示が採択されました。光合成学会若手の会としてのサイエンスアゴラでの出展は、通算 5 回目を数えます。JST が主催するイベントということもあって、サイエンスアゴラには様々な公的な機関や組織による潤沢な人員と予算を使った出展が企画・応募されます。その中で、私たち若手の会の企画がメイン会場である日本科学未来館での常設展示に選ばれたことは、社会の光合成研究に対する強い期待を反映したものであると思います。周囲のブースが大規模な出展を行う中、私たちはパネル展示、様々な光合成生物の観察、デモ実験、直接対話による自分たちの力で作り上げたアットホームな出展を行いました。例年にも増して周囲に引けをとらない盛況ぶりでした。出展の詳細な様子については後の出展報告をご覧ください。

若手の会では、実年齢や身分、所属を問わず、多くの研究者の方々の積極的な参加を歓迎します。現場の研究を推進している研究者が若い気持ちで交流することは、学際性の強い光合成研究では絶対不可欠だと思います。この記事を読んで興味を持たれた方は、お気軽にご参加ください。また、ご自身の参加はもちろんのこと、周辺の方にも参加をお勧めいただきたいと思います。毎年秋に開催している若手の会セミナーでは、学生招待講演を企画していますので、自薦他薦問わず、常時候補者を募集していますので、お気軽にご連絡いただければ幸いです。その他ご不明な点など、遠慮なく浅井（[cazai@fc.ritsumei.ac.jp](mailto:cazai@fc.ritsumei.ac.jp)）までお問い合わせください。

## 報告記事

### サイエンスアゴラ出展報告 —若手研究者が伝えたい光合成の現在・過去・未来

<sup>1</sup>関西学院大学 理工学部生命科学科 <sup>2</sup>立命館大学 生命科学部  
<sup>1</sup>辻 敬典 <sup>2</sup>浅井 智広

#### サイエンスアゴラ 2015

サイエンスアゴラは JST が毎年開催しているサイエンスコミュニケーションイベントで、研究者やサイエンスコミュニケーターなどが集い、講演や展示など様々な形で来場者と交流するイベントです。日本光合成学会若手の会では 2011 年から毎年出展しており、2015 年も継続して出展企画を応募しました。主催者により設定された今年のサブテーマのひとつは、「「ひかり」を通して見る人類の歩みと未来 ~原始から原子まで~」でした。その光合成研究と関わりの深さも追い風となり、私たちの企画は東京お台場にある日本科学未来館 1F のメイン会場での常設展示として採択されました。2015 年のサイエンスアゴラは 10 周年記念大会として開催され、若手の会も含む 169 団体が出展し、約 7000 人の方々が来場し、光合成研究の重要性を一般の方々にアピール良い機会となりました。私たち若手の会は、「若手研究者が伝えたい光合成の現在・過去・未来」と題したブース展示を行い、パネル展示やデモ実験を通して、光合成の基礎知識や地球史における重要性、未来に向けての応用研究まで幅広く紹介しました。

#### 今回の出展テーマ

バイオ燃料生産などで近年着目を集めつつある光合成ですが、そもそも光合成は人類の誕生よりもはるか以前から地球環境を劇的に変え、生産者として生態系を支えてきました。そこで今回の展示では、過去から現在にいたるまでの光合成の普遍的な重要性を強調しつつ、最新の研究成果や応用研究についても紹介することを目指しました。具体的な展示内容としては、パネルを使ったトピックス紹介に加え、光合成生物の展示と観察、光合成色素の分離・分析、Imaging PAM による光合成電子伝達の可視化などのデモ実験を行いました。

#### 出展の様子

光合成生物の展示・観察では、光合成細菌から二次共生藻類まで、研究者でも見る機会の少ない光合成生物を幅広く展示しました。バクテリアから複数の異なる真核生物群までを含む多様性は、光合成生物ならではのものです。この多様性の多くが共生によってもたらされたこと、様々な光合成生物が様々な環境下で光合成を行っていることを解説しました。珪藻の被殻を並べた「珪藻アート」のプレパレート観察は、昨年と同様に子供から大人までたくさんの人の興味を引いていました。生物学としての光合成研究の面白さを感じてもらえることが出来たと思います。

色素の分離・分析実験では、カラフルな光源と色素を扱うため、たくさんの来場者が足を止めてくれました。赤・青・緑の LED を使ってクロロフィルの吸収する波長を簡易的に調べる実験では、クロロフィルが緑色の光をあまり吸収しないこと、その特徴が葉の緑色に反映されていることを実感して貰いました。黒い海苔を焼くと緑色になるとう現象についても、フィコビルン類が壊れてクロロフィ

ルの緑が見えるようになるという解説に、多くの人が納得してくれました。光と物質の相互作用から生命現象を捉えるという、物理的・化学的な側面をもつ光合成研究の特徴を伝えることができたと思います。

今回のアゴラでは小林康一博士（東京大学）の協力を得て、新たに Imaging PAM を使ったデモ実験を行いました。この実験では、電子伝達系の阻害剤である DCMU を葉の一部に塗布し、パルス光を当てたときのクロロフィル蛍光の差異を可視化することで光合成を実感してもらうことを狙いました。当日は、油性ペンにインクとして無色透明の DCMU 溶液を詰めた「DCMU ペン」を用意し、来場者に描いてもらった絵をクロロフィル蛍光として Imaging PAM で可視化しました。特に子供たちが興味津々で、DCMU ペンで葉に書いた絵が肉眼では見えずに、Imaging PAM によって可視化されることに大いに興味を示してくれました。また、落ち葉や様々な野菜を用意し、自由にクロロフィル蛍光を観察してもらいました。小さな子供たちに、まずは「光が当たることで、葉っぱの中で何かが起こっている」ことを実感してもらえたと思います。PAM の原理は必要な仮定が多く複雑で、来場者にクロロフィル蛍光や電子伝達系の概念を伝えるには非常に苦労しましたが、出展者である私たちが光合成の直感的な理解に結びつくデモ実験やその紹介方法について考える良い機会となりました。

パネル展示では、光合成がもたらした地球環境の激変など過去の事象から、バイオ燃料生産などの未来へ向けた光合成研究まで解説しました。特にバイオ燃料生産や人工光合成などの応用研究については、多くの来場者からたくさんの質問を受けました。現代社会の光合成研究への関心の高さと、その進展への大きな期待が強く感じられました。



## 集会案内

### 第 24 回「光合成セミナー2016：反応中心と色素系の多様性」の開催案内

期日：2016年（平成28年）7月9日（土）午後2時から7月10日（日）午後4時まで

場所：龍谷大学深草キャンパス（<http://www.ryukoku.ac.jp/fukakusa.html>）

（交通）JR 京都駅から深草キャンパスの最寄り駅（JR 奈良線「稲荷」駅、地下鉄烏丸線「くいな橋」駅）までは約5分。最寄り駅から徒歩で約8分。

開催の目的：光合成に関して、物理学、化学、生物学を融合した討論を行う。光合成の進化、物質変換、人工光合成などについても討論する。第一線の研究者に最新のトピックを解説していただくとともに、参加者の口頭・ポスター発表を行う。

協賛：日本光合成学会

共催：龍谷大学革新的材料・プロセス研究センター

内容：

1. 講演会

柴田 穰（東北大学大学院理学研究科）

「光合成光捕集過程を精密科学として理解することを目指して」

（講師1名は未定）

2. 口頭発表（討論を含めて一人10分から20分を予定）

3. ポスター発表（3分程度のポスタープレビューも併せて行う）

申込：

発表申し込み締め切り 2016年（平成28年）7月1日（金）

参加申し込み締め切り 2016年（平成28年）7月1日（金）

参加費：（7月9日の懇親会費、7月10日の昼食代を含む）

一般 5,000円（予定）

学生 3,000円（予定）

世話人：秋本誠志（神戸大学）、大岡宏造（大阪大学）、大友征宇（茨城大学）、出羽毅久（名古屋工業大学）、永島賢治（神奈川大学）、宮武智弘（龍谷大学）

申し込み・問い合わせ先：龍谷大学理工学部物質化学科 宮武智弘

(e-mail: [miyatake@rins.ryukoku.ac.jp](mailto:miyatake@rins.ryukoku.ac.jp), tel: 077-543-7467, fax: 077-543-7483)

プログラムおよび今後の案内は下記ホームページにて、更新情報を随時、掲載いたします。

[http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/~ohoka/photosyn\\_seminar\\_2016/top.html](http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/~ohoka/photosyn_seminar_2016/top.html)

その他：光合成生物の進化も含めた光反応・色素系の基礎から応用までを幅広く議論し、異分野の学生・研究者が楽しく交流できる場を提供していきたいと考えています。また新しい研究テーマや方向性のヒントが得られることも期待しています。今後の運営・内容等に関してご意見等がありましたら、遠慮無くメール（上記メールアドレス宛）をいただければ幸いです。

## 集会案内

### 第5回 光合成研究者 OB/OG 会 2016 の開催案内

光合成研究者 OB/OG の皆様

光合成研究者 OB/OG の会は、日本光合成学会年会の前日に隔年で開催するのを通例としております。今年の光合成学会年会は、5月27-28日、東京理科大学葛飾キャンパスで開催されますので、当 OB/OG 会は5月26日に東京で開催いたします。OB/OG 相互の近況を知り、親睦をはかるため、皆様の参集をお待ちしております。

日時： 2016年5月26日（木）17:30~20:00

場所 ルヴェ・ソン・ヴェール 駒場（井の頭線駒場東大前駅より歩2分）

〒153-8902 東京都目黒区駒場3-1、東京大学駒場ファカルティハウス TEL. 03-5790-5931

[http://leversonverre-tokyo.com/restaurant\\_komaba/](http://leversonverre-tokyo.com/restaurant_komaba/)

会費： 8,000 円

宿泊： 宿泊は各自ご用意下さい。

第4回光合成研究者 OB/OG 会 2014（奈良）の出席者は以下の通りでした。

小川晃男、佐藤公行、嶋田敬三、辻英夫、豊島喜則、西村光雄、西村幹夫、檜山哲夫、大城香、高橋正昭、横田明穂、泉井桂、和田野晃、河盛阿佐子、和田敬四郎、伊藤繁、村田紀夫

代表世話人：檜山哲夫、小川晃男、佐藤公行、村田紀夫

---

参加申し込み

お名前：

E-メール：

電話番号：

住所：

OB/OG 会：            出席 欠席

返信先：E-mail: [nmias5373@nifty.com](mailto:nmias5373@nifty.com) Fax/Tel: 0557-85-5205

なお、光合成研究者 OB/OG の会のメンバーは65歳以上で、現役・退職を問いません。登録は不要です。

## 事務局からのお知らせ

### ★入会案内

本会へ入会を希望される方は、会費（個人会員年会費：¥1,500、賛助法人会員年会費：¥50,000）を郵便振替（加入者名：日本光合成学会、口座番号：00140-3-730290）あるいは銀行振込（ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキョウと入力)、当座、0730290 名前：ニホンコウゴウセイガクカイ）にて送金の上、次ページの申し込み用紙、または電子メールにて、氏名、所属、住所、電話番号、ファックス番号、電子メールアドレス、入会希望年を事務局までお知らせください。

### ★会費納入のお願い

学会の運営は、皆様に納めていただいております年会費によりまかなわれております。当該年度の会費が未納の場合、光合成研究が送られてくる封筒に、会費未納が印字されています。ご都合のつくときに、会費を納入ください。1年間会費を滞納された場合、次年度よりお名前が会員名簿から削除され、光合成研究は届かなくなります。再入会される場合は、未納の分もあわせてお支払いいただきます。会費納入状況などにつきましては、ご遠慮なく事務局（sonoike@waseda.jp）までお問い合わせください。会員の皆様のご理解とご協力をお願い申し上げます。

### ★新事務局からのごあいさつ

2016年度より、事務局長をお引き受けした早稲田大学の園池公毅です。現在、鹿内前事務局長の下で修行中です。10年以上前に4年間にわたって、現在の「光合成研究」になった光合成研究会会報の編集長を務めておりました。そのときの様子と比較して考えると、この10年で、日本光合成学会は大きく発展しました。このところの年会の際の若い研究者の熱気は、光合成研究の今後に明るい未来を感じさせます。一方で、これまでの家内制手工業のような学会運営は、限界に来ているようにも感じます。今後の学会をどのようにしていくのがよいのか、皆様のご意見をうかがいながら考えていきたいと思っておりますので、どうぞよろしくご協力のほどお願い申し上げます。

### 【訂正のお知らせ】

『光合成研究』25巻第3号（通巻74号）の目次および裏表紙に、高橋 重一、大槻 孝之、内田 朗、中山 克己、佐藤 浩之（東洋大）とあるのは、高橋 重一（東洋大）、大槻 孝之（東邦大）、内田 朗（東邦大）、中山 克己（東邦大）、佐藤 浩之（東邦大）の誤りでした。お詫びして訂正します。

## 日本光合成学会会員入会申込書

平成 年 月 日

日本光合成学会御中

私は日本光合成学会の趣旨に賛同し、平成 年より会員として入会を申し込みます。

[ ]内に会員名簿上での公開承諾項目に○印をつけてください

[ ] 氏名 (漢字) (必須)

氏名 (ひらがな)

氏名 (ローマ字)

[ ] 所属

[ ] 住所 1

〒

[ ] 住所 2 (自宅の方または会誌送付先が所属と異なる場合にのみ記入)

〒

[ ] TEL1

[ ] TEL2 (必要な方のみ記入)

[ ] FAX

[ ] E-mail

個人会員年会費 1,500 円 (会誌、研究会、ワークショップなどの案内を含む)

賛助法人会員年会費 50,000 円 (上記と会誌への広告料を含む)

(振込予定日:平成 年 月 日) (会員資格は1月1日~12月31日を単位とします)

\* 複数年分の会費を先払いで振り込むことも可能です。その場合、通信欄に (何年度~何年度分)とお書き下さい。

### 連絡先

〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

岡山大学 理学部生物学科

高橋裕一郎 研究室内

日本光合成学会

TEL : 086-251-7861

FAX : 086-251-7876

ホームページ: <http://photosyn.jp>

郵便振替口座 加入者名: 日本光合成学会 口座番号: 00140-3-730290

銀行振込の場合 ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキューと入力)、当座、0730290

名前: ニホンコウゴウセイガッカイ

## 日本光合成学会会則

### 第1条 名称

本会は日本光合成学会（The Japanese Society of Photosynthesis Research）と称する。

### 第2条 目的

本会は光合成の基礎および応用分野の研究発展を促進し、研究者相互の交流を深めることを目的とする。

### 第3条 事業

本会は前条の目的を達成するために、シンポジウム開催などの事業を行う。

### 第4条 会員

#### 1. 定義

本会の目的に賛同する個人は、登録手続を経て会員になることができる。また、団体、機関は、賛助会員になることができる。

#### 2. 権利

会員および賛助会員は、本会の通信および刊行物の配布を受けること、本会の主催する行事に参加することができる。会員は、会長を選挙すること、役員に選出されることことができる。

#### 3. 会費

会員および賛助会員は本会の定めた年会費を納めなければならない。

### 第5条 組織および運営

#### 1. 役員

本会の運営のため、役員として会長1名、事務局長1名、会計監査1名、常任幹事若干名をおく。役員任期は2年とする。会長、常任幹事は連続して二期を越えて再任されない。事務局長は五期を越えて再任されない。会計監査は再任されない。

#### 2. 幹事

幹事数名をおく。幹事任期は4年とする。幹事の再任は妨げない。

#### 3. 常任幹事会

常任幹事会は会長と常任幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。常任幹事会は本会の運営に係わる事項を審議し、これを幹事会に提案する。事務局長と会計監査は、オブザーバーとして常任幹事会に出席することができる。

#### 4. 幹事会

幹事会は役員と幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。幹事会は、常任幹事会が提案した本会の運営に係わる事項等を審議し、これを決定する。

#### 5. 事務局

事務局をおき、事務局長がこれを運営する。事務局は、本会の会計事務および名簿管理を行う。

#### 6. 役員および幹事の選出

会長は会員の直接選挙により会員から選出される。事務局長、会計監査、常任幹事は会長が幹事の中から指名し、委嘱する。幹事は常任幹事会によって推薦され、幹事会で決定される。会員は幹事を常任幹事会に推薦することができる。

## 第6条 総会

1. 総会は会長が招集し、出席会員をもって構成する。議長は出席会員から選出される。
2. 幹事会は総会において次の事項を報告する。
  - 1) 前回の総会以後に幹事会で議決した事項
  - 2) 前年度の事業経過
  - 3) 当年度および来年度の事業計画
3. 幹事会は総会において次の事項を報告あるいは提案し、承認を受ける。
  - 1) 会計に係わる事項
  - 2) 会則の変更
  - 3) その他の重要事項

## 第7条 会計

本会の会計年度は1月1日から12月31日までとする。当該年度の経理状況は、総会に報告され、その承認を受ける。経理は、会計監査によって監査される。本会の経費は、会費および寄付金による。

## 付則

- 第1 年会費は個人会員1,500円、賛助会員一口50,000円とする。
- 第2 本会則は、平成14年6月1日から施行する。
- 第3 本会則施行後第一期の会長、事務局長、常任幹事にはそれぞれ、第5条に定める規定にかかわらず、平成14年5月31日現在の会長、事務局担当幹事、幹事が再任する。本会則施行後第一期の役員および幹事の任期は、平成14年12月31日までとする。
- 第4 本会則の改正を平成21年6月1日から施行する。

## 日本光合成学会の運営に関する申し合わせ

### 1. 幹事会：

幹事は光合成及びその関連分野の研究を行うグループの主催者である等、日本の光合成研究の発展に顕著な貢献をしている研究者とする。任期は4年とするが、原則として再任されるものとする。

### 2. 事務局：

事務局長の任期は2年とするが、本会の運営を円滑に行うため、約5期（10年）を目途に再任されることが望ましい。

### 3. 次期会長：

会長の引き継ぎを円滑に行うため、次期会長の選挙は任期の1年前に行う。

### 4. 常任幹事会：

常任幹事会の運営を円滑におこなうため、次期会長は常任幹事となる。



## 幹事会名簿

|       |                   |          |                    |
|-------|-------------------|----------|--------------------|
| 秋本誠志  | 神戸大学大学院理学研究科      | 杉山達夫     | 名古屋大学              |
| 栗井光一郎 | 静岡大学学術院理学領域       | 鈴木祥弘     | 神奈川大学理学部           |
| 池内昌彦  | 東京大学大学院総合文化研究科    | 園池公毅     | 早稲田大学教育学部          |
| 石北 央  | 東京大学大学院工学研究科      | 高市真一     | 日本医科大学生物学教室        |
| 泉井 桂  | 近畿大学生物理工学部生物工学科   | 高橋裕一郎    | 岡山大学大学院自然科学研究科     |
| 伊藤 繁  | 名古屋大学             | 田中 歩     | 北海道大学低温科学研究所       |
| 井上和仁  | 神奈川大学理学部          | 田中 寛     | 東京工業大学資源化学研究所      |
| 伊福健太郎 | 京都大学大学院生命科学研究所    | 田中亮一     | 北海道大学低温科学研究所       |
| 臼田秀明  | 帝京大学医学部           | 民秋 均     | 立命館大学総合理工学院        |
| 榎並 勲  | 東京理科大学            | 都筑幹夫     | 東京薬科大学生命科学部        |
| 得平茂樹  | 首都大学東京大学院理工学研究科   | 出羽毅久     | 名古屋工業大学大学院工学研究科    |
| 遠藤 剛  | 京都大学大学院生命科学研究所    | 寺島一郎     | 東京大学大学院理学系研究科      |
| 大岡宏造  | 大阪大学大学院理学研究科      | 榎 達也     | 東京理科大学理学部          |
| 大杉 立  | 東京大学大学院農学生命科学研究科  | 仲本 準     | 埼玉大学大学院理工学研究科      |
| 太田啓之  | 東京工業大学            | 永島賢治     | 神奈川大学              |
|       | バイオ研究基盤支援総合センター   | 成川 礼     | 静岡大学大学院理学研究科       |
| 大友征宇  | 茨城大学理学部           | 南後 守     | 大阪市立大学大学院理学研究科     |
| 大政謙次  | 東京大学大学院農学生命科学研究科  | 西田生郎     | 埼玉大学大学院理工学研究科      |
| 小川健一  | 岡山県農林水産総合センター     | 西山佳孝     | 埼玉大学大学院理工学研究科      |
|       | 生物科学研究所           | 野口 航     | 東京薬科大学生命科学部        |
| 小野高明  | 茨城大学工学部生体分子機能工学科  | 野口 巧     | 名古屋大学理学研究科         |
| 小保方潤一 | 京都府立大学・生命環境科学研究科  | 長谷俊治     | 大阪大学蛋白質研究所         |
| 小保達男  | 名古屋大学大学院生命農学研究科   | 林 秀則     | 愛媛大学プロテオサイエンスセンター  |
| 垣谷俊昭  | 名古屋大学             | 原登志彦     | 北海道大学低温科学研究所       |
| 菓子野康浩 | 兵庫県立大学理工学部        | 彦坂幸毅     | 東北大学大学院生命科学研究所     |
| 柏山祐一郎 | 福井工業大学環境情報学部      | 久堀 徹     | 東京工業大学研究院化学生命科学研究所 |
| 金井龍二  | 埼玉大学              | 日原由香子    | 埼玉大学大学院理工学研究科      |
| 神谷信夫  | 大阪市立大学大学院理学研究科    | 檜山哲夫     | 埼玉大学               |
| 熊崎茂一  | 京都大学大学院理学研究科      | 福澤秀哉     | 京都大学大学院生命科学研究所     |
| 栗栖源嗣  | 大阪大学蛋白質研究所        | 藤田祐一     | 名古屋大学大学院生命農学研究科    |
| 小池裕幸  | 中央大学理工学部          | 古本 強     | 龍谷大学農学部            |
| 小林正美  | 筑波大学大学院数理物質科学研究科  | 前 忠彦     | 東北大学               |
| 坂本 亘  | 岡山大学資源生物科学研究所     | 牧野 周     | 東北大学大学院農学研究科       |
| 佐賀佳央  | 近畿大学理工学理学科        | 増田真二     | 東京工業大学             |
| 櫻井英博  | 早稲田大学             |          | バイオ研究基盤支援総合センター    |
| 佐藤公行  | 岡山大学              | 増田 建     | 東京大学大学院総合文化研究科     |
| 佐藤直樹  | 東京大学大学院総合文化研究科    | 松浦克美     | 首都大学東京都市教養学部       |
| 佐藤文彦  | 京都大学大学院生命科学研究所    | 松田祐介     | 関西学院大学理工学部         |
| 鹿内利治  | 京都大学大学院理学研究科      | 真野純一     | 山口大学農学部            |
| 重岡 成  | 近畿大学農学部           | 皆川 純     | 基礎生物学研究所           |
| 篠崎一雄  | 理化学研究所植物科学研究センター  | 宮尾光恵     | 東北大学大学院農学研究科       |
| 島崎研一郎 | 九州大学大学院理学研究院      | 宮下英明     | 京都大学大学院地球環境学堂      |
| 嶋田敬三  | 首都大学東京            | 宮地重遠     | 海洋バイオテクノロジー研究所     |
| 白岩義博  | 筑波大学生物科学系         | 宗景(中島)ゆり | 関西学院大学理工学部         |
| 沈 建仁  | 岡山大学大学院自然科学研究科    | 村田紀夫     | 基礎生物学研究所           |
| 杉浦昌弘  | 名古屋市立大学           | 横田明徳     | 奈良先端科学技術大学院大学      |
|       | 大学院システム自然科学研究科    |          | バイオサイエンス研究科        |
| 杉浦美羽  | 愛媛大学プロテオサイエンスセンター | 和田 元     | 東京大学大学院総合文化研究科     |
| 杉田 護  | 名古屋大学遺伝子実験施設      |          |                    |

## 編集後記

編集長を務めて一年になります。最初は編集作業に不慣れで、原稿の体裁も整わずご迷惑をおかけしましたが、多くの方々の力添えもあって体裁もずいぶん改善されてきました。今号の工夫として、文字を大きくして見やすくしました。またこの一年、若手の方を中心に積極的な投稿が数多くあり、内容も充実したものになりました。編集長をもう一年務めてまいりますので、引き続き皆様のご協力を賜れば幸いに思います。

さて今号では、2015年の第6回日本光合成学会・公開シンポジウム「若手光合成研究者による光合成研究の新展開」でご講演いただいた方の中から3名の方に原稿を執筆していただきました。高橋会長が自ら選んだ新進気鋭の若手研究者の力作には息を飲む迫力を感じます。また、第4回ポスター発表賞受賞者の浅田瑞枝さんは、マンガンクラスターの光活性化に関して詳細な解析を報告され、釋啓一郎さんは、酸素消費を介した新たな電子伝達制御機構を提唱されています。さらに、櫻井英博先生には、微細藻類を使った水素生産の現状と課題に関する解説記事の執筆をお願いしました。今回の執筆者全員に共通することですが、ひとかたならぬ“情熱”を感じさせられます。読者の方には研究の醍醐味を堪能していただけるのではないのでしょうか。今号に関するご意見や本誌に対するご要望がございましたら、ぜひ編集長までご連絡ください。

研究紹介や解説を随時受け付けておりますので、奮ってご投稿ください。表紙の写真も募集いたしますのでよろしくお願いいたします。

編集長・西山 佳孝 (埼玉大学)

## 記事募集

日本光合成学会では、会誌に掲載する記事を会員の皆様より募集しています。募集する記事の項目は以下の通りです。

- トピックス：光合成及び関連分野での纏まりのよいトピックス的な記事。
- 解説：光合成に関連するテーマでの解説記事。
- 研究紹介：最近の研究結果の紹介。特に、若手、博士研究員の方からの投稿を期待しています。
- 集会案内：研究会、セミナー等の案内。
- 求人：博士研究員、専門技術員等の募集記事。
- 新刊図書：光合成関係、または会員が執筆・編集した新刊図書の紹介。書評も歓迎します。

記事の掲載を希望される方は、会誌編集長の西山佳孝 (nishiyama@molbiol.saitama-u.ac.jp) までご連絡ください。

「光合成研究」編集委員会

編集長 西山 佳孝 (埼玉大学)  
編集委員 田中 亮一 (北海道大学)  
編集委員 伊福 健太郎 (京都大学)  
編集委員 粟井 光一郎 (静岡大学)

---

日本光合成学会 2016年度役員

会長 高橋 裕一郎 (岡山大学)  
事務局長 園池 公毅 (早稲田大学)

常任幹事 田中 歩 (北海道大学) 前会長  
常任幹事 鹿内 利治 (京都大学) 前事務局長  
常任幹事 池内 昌彦 (東京大学)  
常任幹事 野口 航 (東京薬科大学) 前編集長  
常任幹事 西山 佳孝 (埼玉大学) 編集長  
常任幹事 久堀 徹 (東京工業大学) 渉外  
常任幹事 日原 由香子 (埼玉大学) 年会 2013年  
常任幹事 熊崎 茂一 (京都大学) 年会 2014年  
常任幹事 柏山 祐一郎 (福井工業大学) 年会 2016年  
常任幹事 杉浦 美羽 (愛媛大学)  
常任幹事 松田 祐介 (関西学院大学) 年会 2015年  
常任幹事 鞆 達也 (東京理科大学) 光生物学協会

会計監査 伊藤 繁 (名古屋大学)  
ホームページ 加藤 裕介 (岡山大学)

光合成研究 第26巻 第1号 (通巻75号) 2016年4月30日発行

---

日本光合成学会

〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

岡山大学 理学部生物学科

高橋裕一郎 研究室内

TEL : 086-251-7861

FAX : 086-251-7876

e-mail : jspr@photosyn.jp

ホームページ : <http://photosyn.jp/>

郵便振替口座 加入者名 : 日本光合成学会 口座番号 : 00140-3-730290

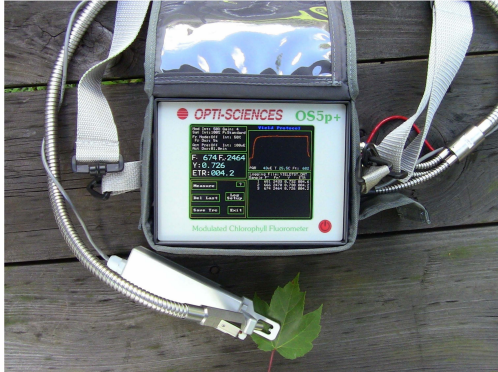
銀行振込の場合 ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキューと入力)、当座、0730290

名前 : ニホンコウゴウセイガツカイ

---

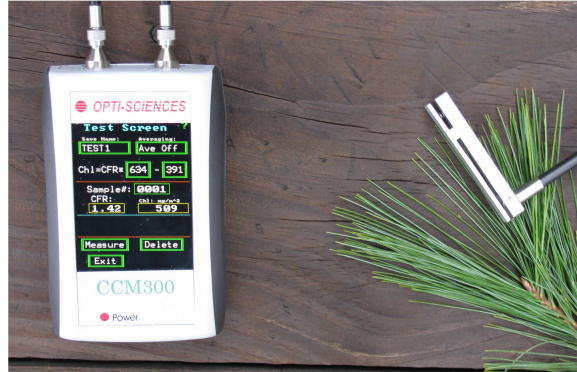
# OPTI-SCIENCES

## OS5p+ パルス変調クロロフィル蛍光光度計



- 最新鋭の携帯型システムでほぼ全タイプの植物ストレスを検出します。
- 幅広い自動プログラムの試験プロトコルで他の全ての携帯型フルオロメーターをしのぎます。
- 光合成量子収率(Y)、最大量子収率(Fv/Fm)、電子伝達速度(ETR)、光合成有効放射量(PAR)、葉の温度(T)が測定できます。
- PARクリップが標準装備になりました。

## CCM-300 極小葉用クロロフィル含有量メーター



- 極小葉のクロロフィル含有量 (mg m<sup>-2</sup>) を測定する装置です。
- 測定方法：クロロフィル蛍光比 (CFR) 法
- 測定面積：直径3 mm、外径4 mmの円形

# AINEX

アイネクス株式会社(日本総代理店)  
〒144-0035 東京都大田区南蒲田2-16-1 テクノポートカマタセンタービル  
TEL : 03-5713-0388 FAX : 03-5713-1388  
Web site : www.ai-nex.co.jp

世界シェアNo.1の光合成基準測定システム

## LI-6400XT 植物総合解析システム

### 植物をはかる!!

光合成測定装置の決定版。植物のガス交換を直接測定することにより生理的活性を正確に把握することができます。

#### 特徴

- ・国内納入台数300台以上
- ・光・CO<sub>2</sub>・温度・湿度 フィードバック安定環境制御、環境追従制御機能
- ・ファイトロン内でのリモートWi-Fi制御できるシステム
- ・LI-6400XT内部で自動データ変換、EXCELフォーマットで記録します



### 多彩なチャンバーアクセサリ



#### ■モデル植物個体の光合成直接測定チャンバー

シロイヌナズナの光合成活性測定を個体ごと測定することができ、ワイルドタイプとミュータントの比較を、生理的活性で行うことができます。



#### ■針葉樹などの立体状サンプルの光合成直接測定チャンパー

針葉樹など円錐型等の、立体形状の植物サンプルの光合成活性測定を行うことができます。従来は難しかったサンプルでの光合成測定ができる可能性があります。



meiwafofosis.com  
メイワフォーシス株式会社

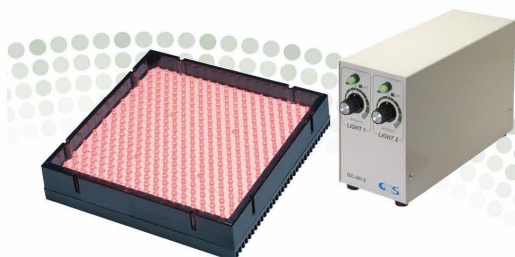
東京：〒160-0022 新宿区新宿1-14-2 K1御苑前ビル TEL(03)5379-0051 代 FAX(03)5379-0811  
名古屋：〒464-0075 名古屋市中区区内山 3-10-18 TEL(052)686-4794 代 FAX(052)686-5114  
大阪：〒558-0047 大阪市住吉区千歳 2-4-25 TEL(06)6674-2222 代 FAX(06)6674-2323  
仙台：〒981-3133 仙台市泉区泉中央 3-4-1 TEL(022)218-0560 代 FAX(022)218-0561



# LED光による植物育成・研究支援機器

ISシリーズ

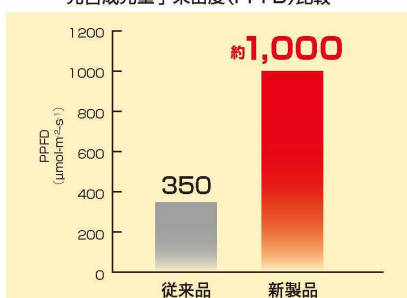
## 高光量モデル 新登場



光量や波長だけではなく、パルス発光など様々な面で光合成研究に最適な光環境を実現します。また、高光量モデルの充実化に伴い、ストレス実験などのニーズにもお応えいたします。

赤色パネルの光量を従来比約3倍に大幅アップ!

光合成光子束密度 (PPFD) 比較



赤色光(660nm) ..... 最大 1,000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>  
 青色光(470nm) ..... 最大 800 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>  
 白色光 ..... 最大 1,000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>

参考PPFD:光源パネルより100mm下にて測定

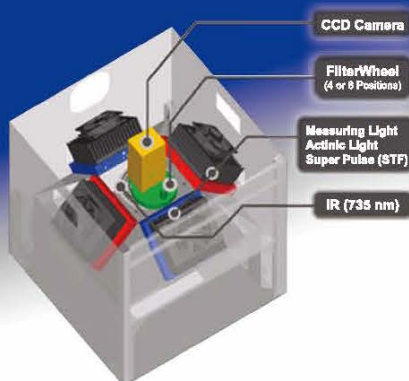
### シーシーエス株式会社

施設園芸課  
 〒602-8019 京都市上京区室町通水上上ル近衛町33番地  
 TEL:075-415-2101 FAX:075-432-0101  
 URL: <http://www.ccs-inc.co.jp> / E-mail: [agri-biotech@ccs-inc.co.jp](mailto:agri-biotech@ccs-inc.co.jp)

## FluorCam 800MF

### 二次元イメージング・クロロフィル蛍光測定器

フィルターホイールを内蔵、最高8枚のバンドパスフィルターを装填可能で発光波長、検出波長を任意で切り替えが可能です。飽和光としてLEDパネルを採用、最大13cm×13cmサイズのサンプルに高輝度で均一な光を照射できます。



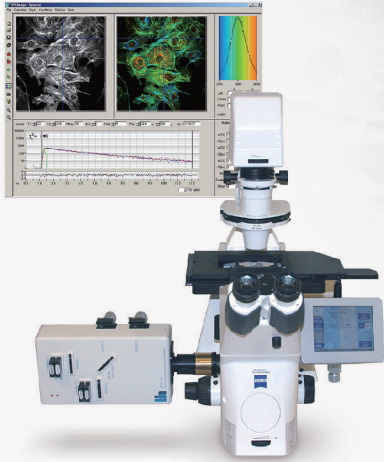
#### ●選択可能な光源

- ・高輝度LEDパネルの波長は任意に選択可能  
 (例: 390, 450, 470, 570, 605, 630, 735, その他任意)
- ・STFシングルターンオーバーフラッシュ
- ・高い光強度  
 励起光: 最高光強度、3,000 μmol/m<sup>2</sup>·s.  
 飽和光: 最高光強度、7,500 μmol/m<sup>2</sup>·s.



高速ガルバノスキャナーを使用した蛍光寿命イメージングシステム  
 高効率・高速測定、低価格でシステムアップグレードも可能

## 蛍光寿命イメージングシステム FLIM-DCS-120



- 時間相関単一光子計数 (TCSPC)法による蛍光寿命イメージング
- ピコ秒パルス半導体レーザー  
 405 nm, 445 nm, 473 nm, 488 nm, 515 nm, 645 nm 対応
- 励起レーザー, GaASP検出器, TCSPCモジュールは  
 最大2台まで同時搭載が可能
- 既存の共焦点顕微鏡にFLIM機能のアップグレードも可能
- FLIM, PLIM (りん光寿命イメージング), FCSIに対応

**TII** 株式会社 東京インストルメンツ  
**TOKYO INSTRUMENTS, INC.**

<http://www.tokyoinst.co.jp/>

本 社 〒134-0088 東京都江戸川区西葛西6-18-14 Tビル TEL 03(3686)4711 FAX 03(3686)0831  
 大阪営業所 〒532-0003 大阪市淀川区宮原4-1-46 新大阪北ビル TEL 06(6393)7411 FAX 06(6393)7055



Mess- und Regeltechnik

### 新型ポータブル クロロフィル蛍光測定器



**Dual-PAM-100**  
 P700 & Chl Fluorescence Measuring System

Simultaneous assessment of P700 and Chlorophyll Fluorescence



**MULTI-COLOR-PAM** NEW  
 Multiple Excitation Wavelength  
 Chlorophyll Fluorescence Analyzer

High Quality Instrumentation for Plant Sciences



**MINI-PAM-II** NEW  
 Photosynthesis Yield Analyzer

Setting a New Benchmark for Photosynthesis Research in the Field

**MULTI-COLOR-PAM : 最高峰スペックでのクロロフィル蛍光解析測定**

MULTI-COLOR-PAM は、これまでの PAM 製品の伝統に沿ったものです。XE-PAM PAM-100 PHYTO-PAM and DUAL-PAM の為に独自に開発された Optical Unit ED-101U と同じ光学系を用いています。MULTI-COLOR-PAM は、これら機器の主要な長所を結集したものです。例えば PAM-2500 で用いられた高時間分解能を取り入れ、かつ XE-PAM and PHYTO-PAM で採用された強い測定光の活用が採用されています。ユーザーは PAM-2500 で利用されている PamWin ソフトウェアを使うこととなります。測定光・作用光・飽和パルス光 シングルトーンオーバーフラッシュおよび マルティルトーンオーバーフラッシュは、それぞれ制御されることで 7つの異なる波長が利用可能になりました。MULTI-COLOR-PAM は、希釈サンプル(単細胞藻類、シアノバクテリア)そして単離葉緑体を用いた解析に最適化されています。



**ナモト貿易株式会社**  
 〒272-0804 千葉県市川市南大野1-44-1  
 Tel: 047-338-3224 Fax: 047-338-3236  
 e-mail: mid@namoto.com  
<http://www.namoto.com>



# 長年の植物育成研究のハード&ソフトの成果を新たな発展の基盤に

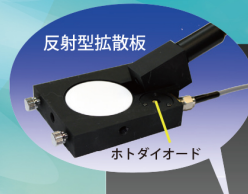


省エネ!  
植物育成に特化した  
分光分布の蛍光灯型LED  
「プラントフレック」  
を搭載!



model  
LPH-411PFD-SP

**人工気象器〈クローズド型〉**  
恒温/恒湿・恒湿 プラントフレック搭載タイプ



学術分野で、光を測定する際の標準測定器として!  
高精度・高精細な測定を可能に!  
測定を  $\mu\text{Wcm}^{-2}\text{s}^{-1}$  でも、 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  でも、%でも!  
光を瞬時に測定!

**分光放射光量子計**

**NKsystem** Bio & Clean 研究設備・機器  
**株式会社 日本医化器械製作所**  
ホームページはこちら ▶▶▶ <http://www.nihonika.co.jp>  
E-mail: [info@nihonika.co.jp](mailto:info@nihonika.co.jp)

- 本社 〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目22番38号 ☎06-6443-0712 (代)
- 東京支店 〒183-0015 東京都府中市清水ヶ丘1丁目3番地8号 ☎042-365-3245 (代)
- 札幌支店 〒065-0028 札幌市東区北28条東18丁目5番5号 ☎011-786-7203 (代)
- つくば営業所 ☎029-855-7401 (代) ● 仙台営業所 ☎022-349-9525 (代)
- 福岡営業所 ☎092-611-0530 (代) ● 名古屋営業所 ☎052-910-3275 (代)
- 広島出張所 ☎082-427-6789 (代) ● 高松出張所 ☎087-815-5105 (代)
- 羽曳野工場 ☎072-958-1919 (代)

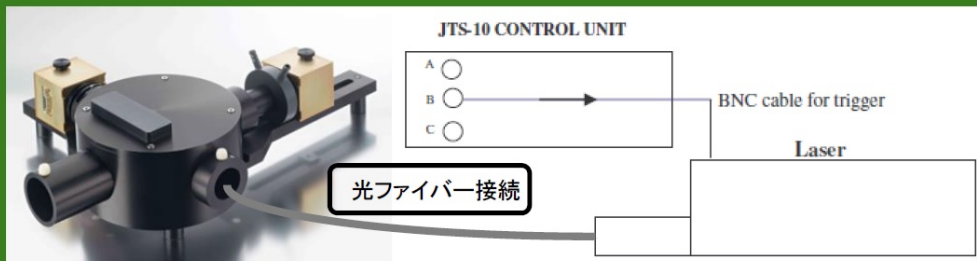
## JTS-10 光合成電子伝達反応解析装置



JTS-10 Photosynthesis Spectrometer

光学モジュールをExciting beam-Laserに変更可能です。  
精度の高いクロロフィル蛍光測定と吸光度測定が出来ます。

オプションのレーザー励起光色素レーザーユニットにより早い光合成反応測定が可能になりました。  
P700他



JTS-10は安定した吸光度測定により、光化学系II以外の重要な電子伝達系の数の情報も得られます。  
温度コントロール可能なサンプルホルダーは葉だけでなく、単離葉緑体や藻類での精度良い測定も可能です。



有限会社オリー 〒599-8112 大阪府堺市東区日置荘原寺町400-4 TEL: 072-285-0117

ホームページ: <http://www.ollie.co.jp> E-mail: [information@ollie.co.jp](mailto:information@ollie.co.jp)