

# 光合成研究

第 34 卷 第 2 号 (通巻 99 号) 2024 年 10 月

Vol. 34 NO. 2 October 2024

## JOURNAL OF THE JAPANESE SOCIETY OF PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

解説	時分割構造解析法を用いた光化学系 II 水分解反応機構の解明	沈 建仁、菅 倫寛 (岡山大)	96
トピックス	南極緑藻に見つかった遠赤色光捕集型アンテナ蛋白質 その構造と系統	小杉 真貴子 (自然科学研究機構)	104
解説特集	「光合成研究における最新技術と発見」		110
序文		古本 強 (龍谷大)	111
解説	X線自由電子レーザーを利用したタンパク質の時分割結晶構造解析	沈 建仁 (岡山大)	112
解説	被子植物の葉緑体ゲノム編集技術、最新の知見	中里 一星、有村 慎一 (東京大)	117
表紙の紹介	産業界における雑草成長抑制に向けた植物科学研究ニーズ	橋田 慎之介 (電力中央研究所)	126
報告記事	若手の会特別企画：若手研究者のキャリアパスレポート！		
	第 19 回 「チェコでの研究生活」	鶴巻 達大 (Centre Algatech)	127
報告記事	第 29 回 光合成学会 若手の会セミナー開催報告	田中 謙也 (神戸大)	130
報告記事	第 30 回 光合成学会 若手の会セミナー開催報告	嶋川 銀河 (神戸大)	131
報告記事	第 30 回 光合成学会若手の会セミナーに参加して	@関東会場 土田 康太 (東京大)	132
		@関西会場 藤田 雄也 (大阪大)	133
集会案内	藍藻の分子生物学 2024 の開催案内	渡辺智、榎本元 (東京農業大学) (大阪公立大)	134
事務局からのお知らせ			135
日本光合成学会会員入会申込書			136
日本光合成学会会則			137
「光合成研究」投稿規定			139
編集後記・記事募集			141
「光合成研究」編集委員・日本光合成学会 2024 年度役員			142
賛助法人会員広告			

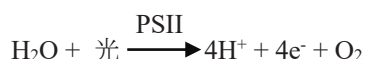
## 解説

時分割構造解析法を用いた光化学系 II 水分解反応機構の解明<sup>†</sup>

岡山大学異分野基礎科学研究所  
沈 建仁\*、菅 倫寛

## 1. はじめに

光化学系 II (photosystem II, PSII)は、光エネルギーを利用して水を分解し、電子・プロトンを放出すると同時に、分子状酸素を形成し、地球上ほぼすべての生物の生命活動を支えている。



水分解・酸素発生反応の機構を解明するため、PSII 複合体とそれに結合している水分解触媒である  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$  クラスターの結晶構造を解明しようとして、世界で主に3つのグループが取り組んできた<sup>1-3</sup>。2009年までに最高分解能 2.90 Å の結晶構造が解析されたが<sup>4</sup>、 $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$  クラスター中の Mn-O の距離が 2.0 Å 前後であるため、その詳細な構造は不明であった。

2011年に Umena らによって、1.9 Å 分解能の PSII 結晶構造が解析され<sup>5</sup>、これによって水分解

触媒は  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$  という化学組成を持ち、歪んだイス型構造であることが初めて分かった(図1)。この構造が歪んでいることは、光により簡単に構造変化が可能で、それによって水分解反応の中間状態に遷移することが可能であることが示唆された。また、この金属クラスターには6つのカルボキシル基が配位結合をしており(図1C)、そのうち5つは架橋二座配位結合(一つのカルボキシル基が2つの金属イオンに配位している)をしているが、一つだけ(D1-Glu189というアミノ酸)が単座配位結合(1つの金属にのみ配位している)をしており、そしてもう1つの His 残基が結合していることが明らかになった。さらに4つの水分子がターミナル配位子として結合しており、そのうちの1つは Mn4 に、もう2つは Ca イオンに配位していることが分かった(図1B)。

上記の高分解能構造解析、およびそれに続く、X線自由電子レーザー(X-ray free electron laser, XFEL)を用いた無損傷構造解析<sup>6</sup>によって、水

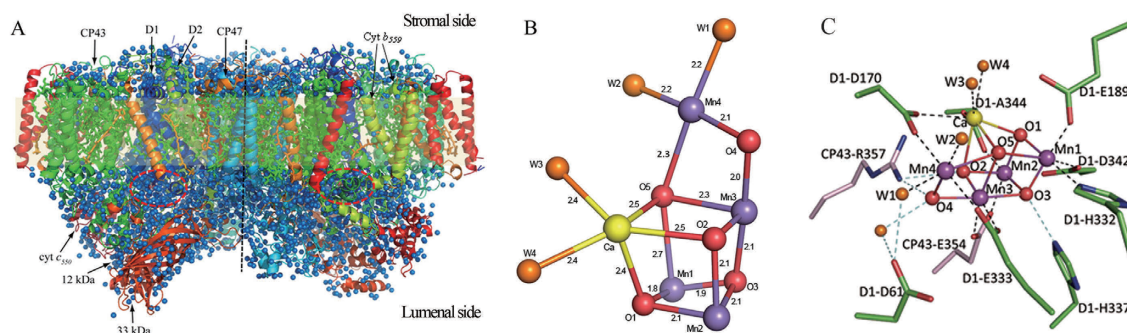


図 1. PSII と  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$  クラスターの構造。A, PSII 二量体の結晶構造。黄色で塗りつぶしている領域は膜貫通領域。B, 左側の PSII 結晶構造中に赤破線で囲まれた領域に結合している  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$  クラスターの構造。C,  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$  クラスターの配位構造。

<sup>†</sup>解説

\*連絡先 E-mail: shen@cc.okayama-u.ac.jp

分解触媒の構造が明らかになった。しかし、PSII による水分解反応は、S 状態遷移モデル<sup>7</sup>に従って、触媒の状態が  $S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$  という 4 つのステップを経て進行することが知られており (図 2)、これまで解析されたのは、暗黒で安定な  $S_1$  状態の構造であった。水分解反応の機構を解明するには、 $S_2$ ,  $S_3$  などの中間状態の構造を解明する必要がある。

## 2. $S_2$ , $S_3$ 中間状態の構造解析

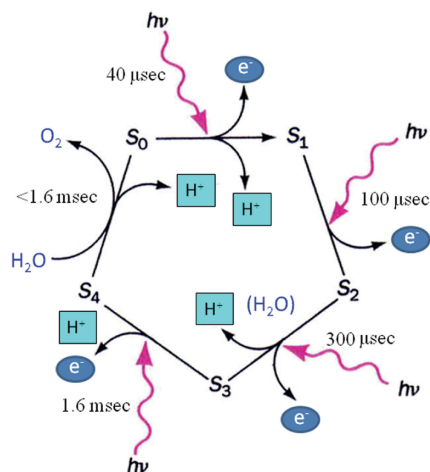


図 2. PSII における酸素発生の S-状態遷移モデル (Kok モデル)。

1 回、または 2 回の閃光照射によって、 $Mn_4CaO_5$  クラスターは暗黒で安定な  $S_1$  状態から  $S_2$ 、または  $S_2$  から  $S_3$  状態に遷移する。 $S_2$  及び  $S_3$  状態は室温で数十秒から 1 分程度の寿命があり、一種の準安定状態であるが、それらの構造を通常の X 線構造解析では解析することは不可能である。従って、XFEL を利用したポンププローブシリアルフェムト秒結晶構造解析法を利用する必要がある。この方法を利用した時分割 X 線結晶構造解析法の概要は文献<sup>8</sup>を参照していただきたいが、得られたデータの解釈について少し説明する。

ある反応を光などのトリガー (ポンプ) で起動させ、中間状態になった時に X 線回折データ (この場合は XFEL による回折データ) を収集するわけであるが、得られたデータをそのまま X 線結晶構造解析により解析すると、小さな構造変化は見えない可能性がある。そこで、「差電子密度」を計算する方法を採用すると、小さな構造変化も見えてくる。この「差電子密度」は、ポンプを受

けた、中間状態にあるタンパク質 (酵素) の電子密度からポンプ前のタンパク質の電子密度を差し引くことで計算されるが、ここで重要なのは、両者の結晶が「同型」である必要がある。同型は、結晶学上の用語で、両者の結晶が同じ形 (空間群や格子定数など) を持っており、構造変化がない場合は差し引くと、差電子密度はゼロになる、ということである。得られた差電子密度は同型差フーリエ電子密度マップといい、微小な構造変化を検出するのに使われる。

構造変化は原子レベルで見ると、3 つのケースが考えられる。1 つは、ポンプによってある原子が本来の位置から別の位置に移動することである。これは、同型差フーリエ電子密度マップ上で、一对のプラスとマイナスの差電子密度として現れる (図 3A)。もう 1 つは、本来ある原子がポンプを受けると、その位置からなくなった、あるいはディスオーダーしたことで、これは同型差フーリエ電子密度マップでマイナスの差マップとして現れる (図 3B)。最後に本来何もなかったところに新しい原子が生成されると、同型差フーリエ電子密度マップではプラスの密度として現れる (図 3C)。

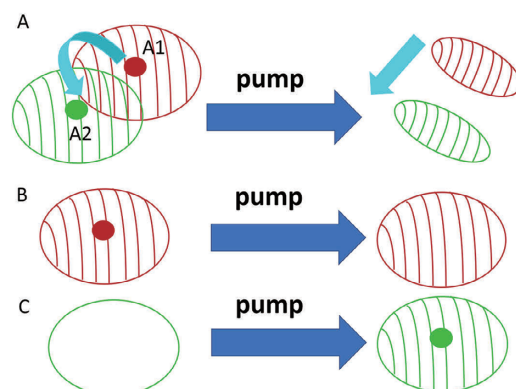


図 3. ポンププローブ実験によって得られる同型差フーリエ電子密度の 3 つのパターン。A, 一つの原子が本来ある A1 位置から A2 に移動した場合、A2-A1 は一对のプラス (緑) とマイナス (赤) の差電子密度で現れる。B, 赤い点にある原子がポンプによって消えた、またはディスオーダーした場合、同型差フーリエ電子密度はマイナス (赤) の差電子密度として現れる。C, 本来何もなかったところに新しい原子が挿入された場合、同型差フーリエ電子密度はプラス (緑) の差電子密度として現れる。



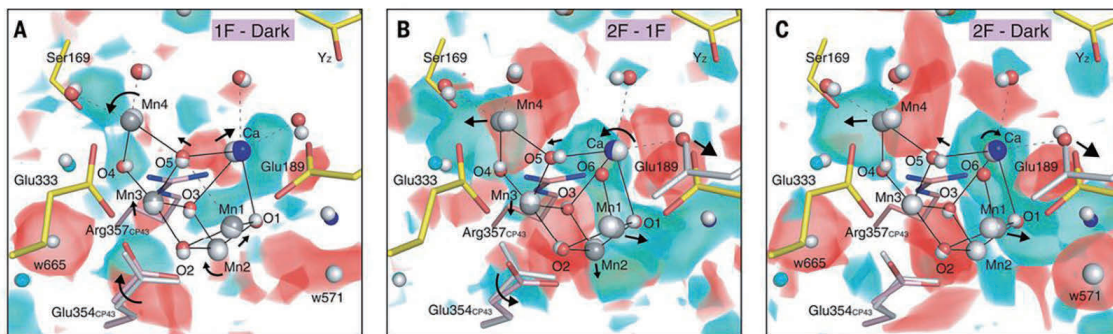


図 4. ポンププローブ XFEL 実験により得られた  $S_1 \rightarrow S_2$  (A),  $S_2 \rightarrow S_3$  遷移 (B, C) での  $Mn_4CaO_5$  クラスター及びその周辺の構造変化。シアン色はプラスの差電子密度、赤はマイナスの差電子密度を示す。矢印は構造変化を示す。

この手法を用いて、 $S_2, S_3$  状態由来の回折データを収集し、 $S_1$  状態との差フーリエ電子密度図を計算すると、 $S_1 \rightarrow S_2$  遷移では、 $O_4$  につながる水素結合ネットワーク上の  $W665$  という水分子がディスオーダーしたり、 $D1-Glu189$  等のアミノ酸や  $Ca$  イオンが構造変化したりしたが、新たな水分子（水素イオンはこの分解能の X 線結晶構造解析では見えないので、実際は酸素原子）の挿入は見られなかった（図 4A）。それに対して、 $S_2 \rightarrow S_3$  遷移では新たな酸素原子 ( $O_6$ ) が、本来ある酸素原子  $O_5$  の近傍に挿入された（図 4B, C）<sup>9,10</sup>。この酸素原子と  $O_5$  との距離を精密化したところ、 $1.9 \text{ \AA}$  の距離が両者の関係を最もよく表していることが分かり、両者が Oxyl-oxo の関係にあることが分かった（図 5A）<sup>[10]</sup>。 $O_6$  の挿入に伴い、 $Mn_4, Ca, D1-Glu189$  等の位置が変化したことも分かっ

た（図 4）。なお、 $S_3$  状態で  $O_6$  の挿入は Berkeley のグループも確認したが、彼らはこの酸素原子を  $O_x$  と命名している<sup>11</sup>。ただし、Berkeley グループの報告は、筆者らの最初の報告より 1 年遅れている。

図 5B-D から、 $S_1 \rightarrow S_2$  の遷移では、 $Mn_4CaO_5$  クラスター中の  $Mn-Mn$  距離はほとんど変化がないが、 $S_2 \rightarrow S_3$  遷移において、 $Mn1-Mn4$  の距離が  $4.90-4.97 \text{ \AA}$  から  $5.21 \text{ \AA}$  に広がったことが分かる。これは驚くべきことで、なぜなら、 $S_2 \rightarrow S_3$  遷移において、最後に残った  $Mn1(III)$  が  $(IV)$  に酸化されるので、 $Mn-Mn$  間の距離は縮むべきと考えられるからである。これに反して、 $Mn1-Mn4$  の距離が広がったことは、 $Mn1$  の近傍に新たな酸素原子  $O_6$  が挿入されたことと一致する。また、 $Mn1-Mn4$  の距離が広がったことは、 $S_2 \rightarrow S_3$  の遷移において、 $Mn$

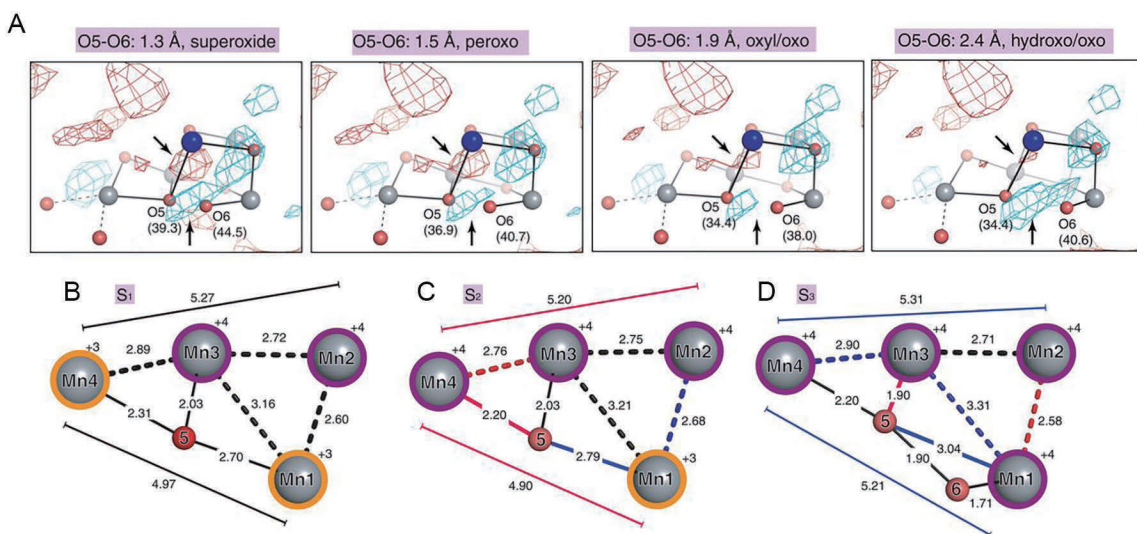


図 5.  $S_3$  状態での  $O_5-O_6$  の距離の精密化 (A) と  $S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3$  状態遷移に伴う  $Mn-Mn$  距離の変化 (B-D)。



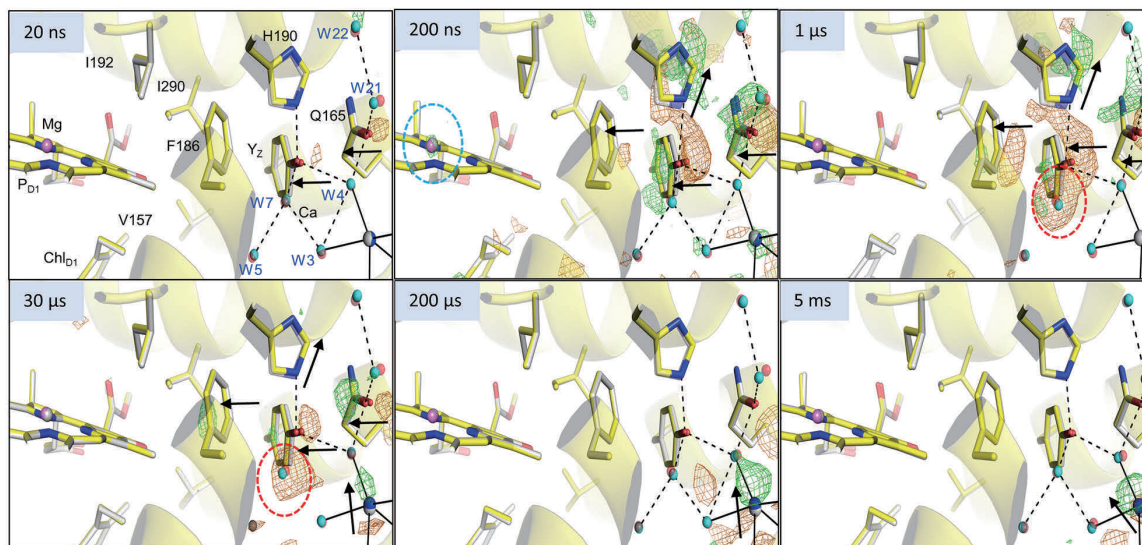


図 6. 1 閃光照射後の 20 nsec-5 msec の間での、P680 及びその付近の構造変化。1 閃光照射後の電子密度から  $S_1$  状態の電子密度を差し引いて計算した差電子密度を、緑はプラス、赤はマイナスで表示している。黒い矢印は構造変化を表す。

の酸化は起こっていないことを示唆しており、もしこれが本当であれば、この遷移ステップでリガンドの一つが酸化されたことが示唆される。ただし、実際は  $Mn_4CaO_5$  クラスター中の原子は強相関しているので（強相関系）、どれか特定の原子が酸化されることを特定することは難しいのかもしれない。

### 3. $S_2$ , $S_3$ 状態が生成されるまでの中間状態の時分割構造解析

これまで解析された  $S_2$  及び  $S_3$  状態の構造は、閃光照射後 5-10 msec 後のもので、それぞれの「準安定」な状態における構造である。このような構造ができるまでには、周りのアミノ酸環境などが閃光照射によって一時的に構造変化し、準安定状態が出来上がったら元の状態に戻る、というような構造の躍動的な変化が予想される。このような「一時的な」構造変化を検出するには、閃光照射後早い時間帯、即ち、nsec- $\mu$ sec 時間領域で X 線回折データを収集し、構造解析を行う必要がある。幸い日本が作った XFEL 施設 SACLA は 10 fsec の X 線パルスを提供するので、このパルスを利用することで、原理的には閃光照射後サブピコ秒からの構造変化を検出することが可能である。

我々は SACLA の XFEL パルスを利用して、1 または 2 閃光照射後の  $Mn_4CaO_5$  クラスターの構造

ダイナミクスを 20 nsec から 5 msec の時間範囲で回折データを収集し、解析した。構造変化の多くは極めて小さいので、これを検出するには高い分解能の回折データが必要となる。また、XFEL を利用したシリアルフェムト秒構造解析において、データの質は回折スポットの多重度（観測される回折スポットの繰り返し測定回数）に大きく依存するため、多量の良質な PSII 微結晶を用いて良質な回折データを取得し、それぞれの構造を解析する必要がある。我々は約 1g のクロロフィルに相当する精製 PSII 試料、タンパク質の重量にすると 10 g 以上の試料を用いて、それぞれの S 状態で回折データを収集し、それらの構造を 2.15~

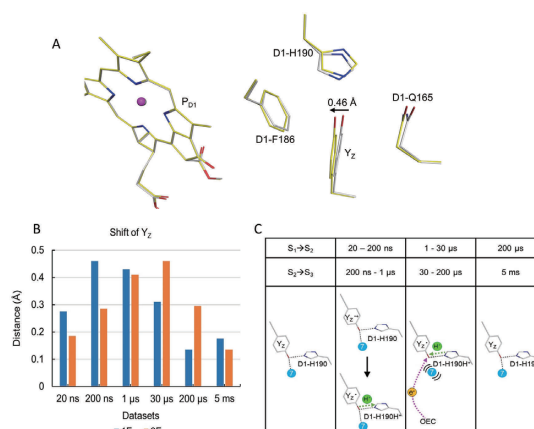


図 7. 1 または 2 閃光照射後の  $Y_z$  周辺の構造変化 (A) と  $Y_z$ -His190 の距離の変化 (B, C)。

2.30 Å 分解能で解析することに成功した<sup>[12]</sup>。この解析により、 $Mn_4CaO_5$  クラスター及びその周辺における、基質である水分子の取り込み、プロトンの放出に関わるチャンネルの構造変化だけでなく、電荷分離直後の P680 色素に電子を供給する  $Y_z$  残基とその周辺や、電子受容体側であるキノン  $Q_B$  とその周囲の構造変化が明らかになった<sup>[12]</sup>。以下いくつかの重要な構造変化について紹介する。

PSII の反応中心クロロフィル P680 (図 6 中では  $P_{D1}$  と表記) が光エネルギーを吸収すると励起され、電子を近傍のフェオフィチンに渡す。クロロフィルカチオンになった P680 は nsec 単位で  $Y_z$

と呼ばれる D1-Tyr161 から電子を受け取り、再還元される。 $Y_z$  から P680 への電子移動に伴う構造変化が 1 閃光照射後の 20-200 nsec で観察された (図 6)。まず 20-200 nsec の時間内で、P680 の Mg にプラスの差電子密度が現れ、 $Y_z$  からの電子が Mg に供給されたと思われる構造変化が観察された。それに伴い、 $Y_z$ 、P680 と  $Y_z$  の中間に位置する D1-Phe186, 及び  $Y_z$  の反対側にある D1-Gln165 残基が P680 に向かってシフトした (図 6)。これらの構造変化は、電子の供給に伴うものであると思われ、電子伝達系で初めて観察されたものである。200 nsec-1  $\mu$ sec でこれらの構造変化は最大になるが、その後徐々に小さくなり、5 msec で

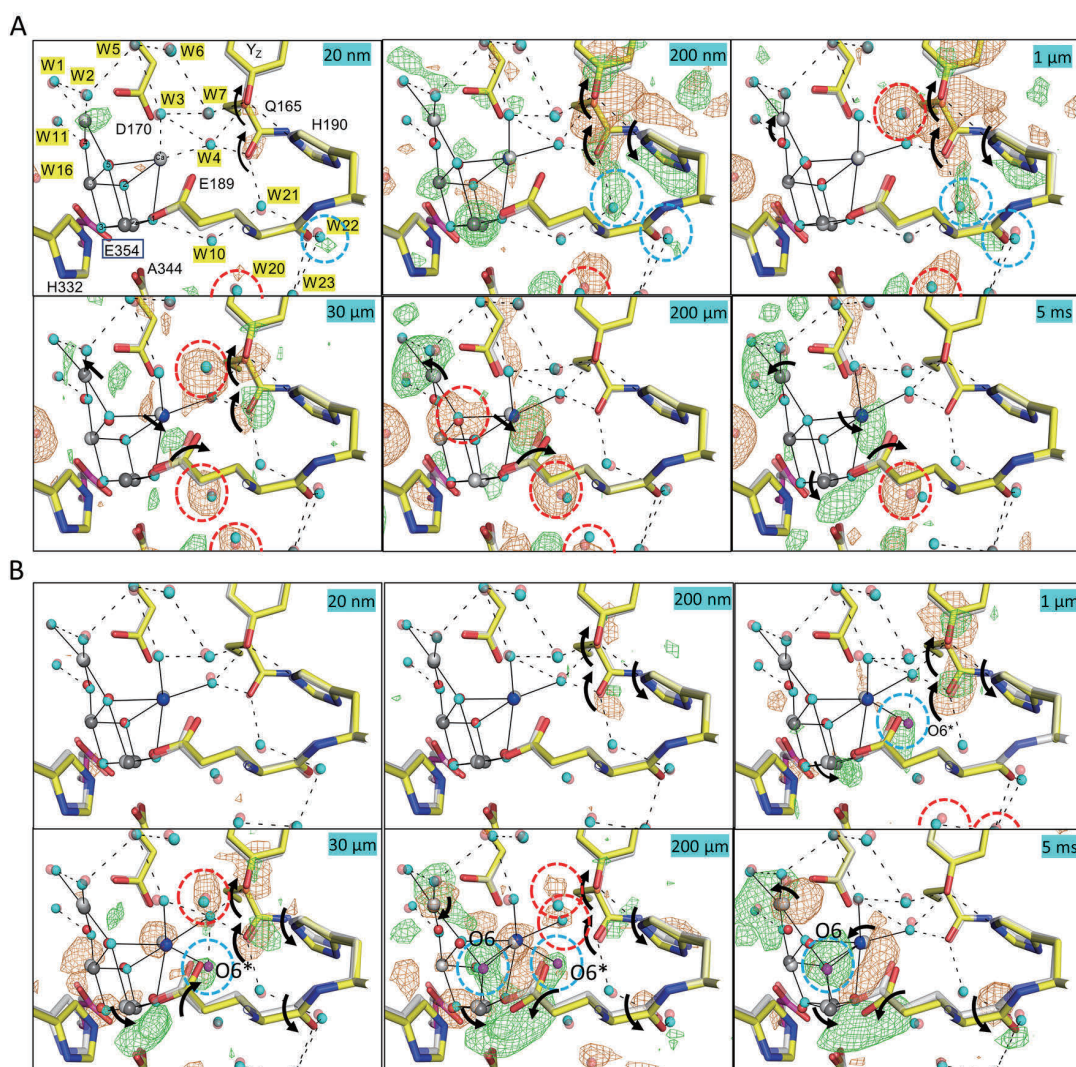


図 8.1 (A) または 2 (B) 閃光照射後、20 ns-5 ms の間における  $Mn_4CaO_5$  クラスター及びその周辺の構造変化。光照射前と比較して緑はプラス、赤はマイナスの電子密度を意味する。文字を囲んでいない残基は D1 タンパク質、囲んでいる残基は CP43 タンパク質のものである。矢印は構造変化を示す。



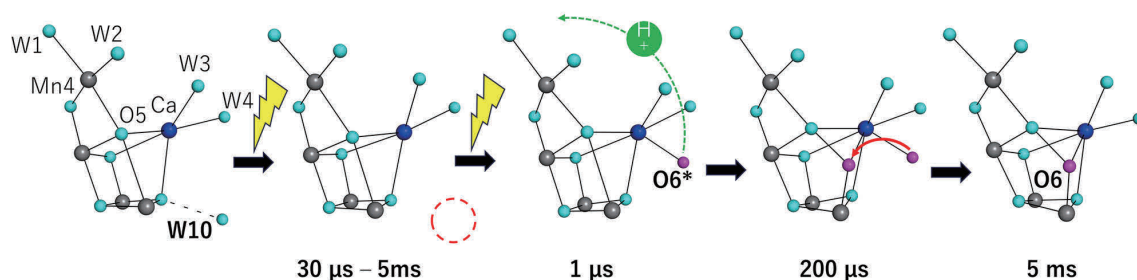


図 9. W10 は1閃光照射後不安定になり、ディスオーダーするが、2閃光照射後の早い時間帯で O6\*の位置に出現し、その後 O6 の位置に移動し、Mn<sub>4</sub>CaO<sub>6</sub>クラスターを形成する。

完全に消え、構造変化は Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> クラスター及びその周辺のアミノ酸に集中した(後述)。

S<sub>1</sub>状態の構造で、Y<sub>Z</sub>は D1-His190 と強い水素結合をしている<sup>14</sup>が、1閃光照射により水素イオンが His190 に移動し、その後また Y<sub>Z</sub>に戻るというモデルが提唱されている。我々は、1閃光照射後の早い時間帯(20 nsec-200 nsec)で、Y<sub>Z</sub>と His190 の距離が長くなることを観測し、それに伴い、His190 近傍の水分子 W7 が 1 μsec-30 μsec の時間で不安定化されることを観測した(図 6, 図 7)。これは、水素イオンが Y<sub>Z</sub>から His190 に移動した後、すぐには元の Y<sub>Z</sub>に戻らないことに起因すると思われる。そして、その後 Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> クラスターから Y<sub>Z</sub>に電子が供給され、それに伴い His190 の水素イオンが Y<sub>Z</sub>に再び戻ると、構造変化はなくなり元に戻った。これらの構造変化は、2閃光照射後も観測されたが、2閃光照射後の一連の構造変化が起きる時間は、1閃光照射よりも若干遅く、Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> クラスターが 1閃光照射によりプラスになったことで、電子伝達が遅くなったことと一致する。

重要なことは、1 μsec で D1-Glu189 の近くで水分子(あるいは脱プロトン化した水酸化物イオン、OH<sup>-</sup>) が現れたことである。O6\*と名付けられたこの水分子は時間の経過とともに弱くなり、その代わりに 200 μsec で O5 近傍に O6 が現れ、5 msec では O6\*が完全に消え、O6 のみが見られた(図 8B、図 9)。これは、O6\*が O6 の前駆体であり、S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub> 遷移の過程で D1-Glu189 付近の位置から O5 近傍の位置に移動したことを示唆している。そして O6\*の正体は、1閃光照射後に不安定になった W10 である可能性がある(図 9)。

S<sub>3</sub>状態では、O6 が Ca と Mn1 に配位しており、Ca の配位数は 7 から 8 に変わる。Ca には 5 から 8 の多様な配位数を持つことができる性質があるので、反応中に配位リガンド数を変更することを可能にしている。そして S<sub>2</sub>-S<sub>3</sub>状態で D1-Glu189 の側鎖の回転が見られ、O6 が O5 の近傍に挿入されるためのスペースを提供していることが分かる。もし D1-Glu189 の側鎖が回転しなければ、O5 と D1-Glu189 のカルボキシル酸素の距離が 2.3 Å であり、O6 は挿入できない。D1-Glu189 のシフトによりそのカルボキシル酸素と O5 との距離が 2.7 Å に拡張され、O6 の挿入が可能になる。これは D1-Glu189 のみが単座配位リガンドであり、他のカルボキシル残基のような架橋二座配位リガンドではない理由と考えられる。

CI-1 チャンネルの構造変化は 1閃光照射後と 2閃光照射後で大きな違いがあった(図 10)。1閃光照射後の早い時間で CI-1 にプラスの差電子密度が現れ、時間とともに弱くなるが、その近傍のアミノ酸残基で規則的な構造変化は見られなかった。一方、2閃光照射後の 1-200 μsec で CI-1 イオンにマイナスの差電子密度が現れ、それに伴い Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> クラスター近傍の Asp65 や Asp61 などの残基にも構造変化が見られ、最終的に 5 msec で元の状態に戻った。これは、プロトンが CI-1 チャンネルを通して外側に排出されたことを示唆している。従って、1閃光照射後と 2閃光照射後では、CI-1 チャンネルが異なった役割を果たしていることが示された。

#### 4. 今後の展望

PSII 水分解反応の機構について、これまで 1,2 閃光照射による S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> 状態までの構造と反応途中の構造ダイナミクスについて述べた。最近、3閃





Received Sep 13, 2024; Accepted Sep 26, 2024; Published Nov 10, 2024.

### 参考文献

- Kamiya, N. & Shen J.-R. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 98-103 (2003).
- Zouni, A. et al. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature* **409**, 739-743 (2001).
- Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J & Iwata, S. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* **303**, 1831-1838 (2004).
- Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A. & Saenger W. Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 334-342 (2009).
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.-R. & Kamiya, N. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* **473**, 55-60 (2011).
- Suga, M. et al. Native structure of photosystem II at 1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses. *Nature* **517**, 99-103 (2015).
- Kok, B., Forbush, B. & McGloin, M. Cooperation of charges in photosynthetic oxygen evolution. I. A linear four step mechanism. *Photochem. Photobiol.* **11**, 457-475 (1970).
- 沈建仁, 時分割 X 線結晶構造解析. *光合成研究* **34**, 113-117 (2024).
- Suga, M. et al. Light-induced structural changes and the site of O=O bond formation in PSII caught by XFEL. *Nature* **543**, 131-135 (2017).
- Suga, M. et al. An open-cubane oxyl/oxo mechanism for O=O bond formation in PSII revealed by XFEL. *Science* **366**, 334-338 (2019).
- Kern, J. et al. Structures of the intermediates of Kok's photosynthetic water oxidation clock. *Nature* **563**, 421-424 (2018).
- Li, H. et al. Oxygen-evolving photosystem II structures during S1-S2-S3 transitions. *Nature* **626**, 670-677 (2024).
- Bhowmick, A. et al. Structural evidence for intermediates during O<sub>2</sub> formation in photosystem II. *Nature* **617**, 629-636 (2023).

## Elucidation of the photosystem II water-oxidation mechanism by time-resolved structural analysis

Jian-Ren Shen, Michihiro Suga

Research Institute for Interdisciplinary Science, Okayama University

## トピックス

南極緑藻に見つかった遠赤色光捕集型アンテナ蛋白質 その構造と系統<sup>‡</sup>

自然科学研究機構 基礎生物学研究所 環境光生物学研究部門  
小杉真貴子

緑藻ナンキョクカワノリ (*Prasiola crispa*) は南極大陸に点在する露岩域に広く分布し、しばしばマット状のコロニーを形成する。ナンキョクカワノリは可視光が少なく赤外線が豊富にあるコロニー内部の環境で遠赤色光吸収型のアンテナ蛋白質 (Pc-frLHC) を合成し、Pc-frLHC に吸収された遠赤色光のエネルギーはアップヒル型の励起エネルギー移動によりバルククロロフィルへと渡され光化学系 II (PSII) を励起することが示唆されている。アップヒル型の励起エネルギー移動の詳細を明らかにするため、ナンキョクカワノリから Pc-frLHC を精製し解析を行ってきた。本稿ではこれまでに明らかになった、Pc-frLHC の分光学的特性、分子系統、そして立体構造について紹介する。

## 1. はじめに

南極大陸はそのほとんどが氷河に覆われた無機質な世界であるが、一部の海岸線には氷河の後退によって形成された露岩域が点在している。露岩域は夏期間になると積雪や氷河からの融け水が流れるため、蘚類や地衣類、藻類、シアノバクテリアといった光合成生物が生育しており、一次生産者として極域の生態系を支えている。私は 10 年ほど前に国立極地研究所で博士研究員として活動する中で、緑藻ナンキョクカワノリが 700 nm より長波長の光で PSII を励起する能力があることを発見し、以来そのメカニズム解明を目指して研究を行ってきた。光合成研究第 87 号 (30 巻第 1 号) に寄稿させて頂いた記事ではナンキョクカワノリの遠赤色光利用に関する生理生態学的特性について紹介した<sup>1</sup>。その後、遠赤色光吸収を担う光捕集蛋白質の精製と同定、構造解析まで進めることができた (アストロバイオロジーセンタープレスリリース URL : <https://www.abcnins.jp/457/>)。本記事では 2023 年に発表した論文<sup>2</sup>の内容を中心にご紹介する。

## 1. 遠赤色光利用型光合成の特徴

ナンキョクカワノリは 1 層の細胞が 2 次元に広がったシート状の形態をしており、南極の陸上環境ではシート状の個体が何層にも重なったコロニーを形成している<sup>1</sup>。コロニーの下層は紫外線によるダメージを受けにくいというメリットがある反面、可視光が届きにくく赤外線の割合が大きくなるため光合成には不利である<sup>1,2,3</sup>。ナンキョクカワノリの遠赤色光利用型光合成は下層における光合成生産量を高めることに役立っていると考えられる。ナンキョクカワノリの長波長クロロフィルは細胞の吸収スペクトルにおいて 706 nm 付近に吸収ピークを持ち (図 1)、大型スペクトログラフにより測定した酸素発生の活性スペクトルにおいても明瞭なピークとして現れた<sup>4</sup>。吸収スペクトルと活性スペクトルを重ね合わせた時にその形が綺麗に重なることから、長波長クロロフィルに吸収された光子エネルギーは可視光と同等の収率で PSII を励起している (細胞に吸収された光子のうち PSII を励起する光子の割合が同じ) ことが明らかになった<sup>4</sup>。

\*連絡先 E-mail: mkosugi@nibb.ac.jp



## 2. 遠赤色光吸収型アンテナ蛋白質の分光学的特徴

研究を開始した当時、ナンキョクカワノリは生化学的解析がほとんど行われておらず、ゲノム情報についてはオルガネラゲノムが公開されていたが光合成アンテナ蛋白質の遺伝子が存在する核ゲノムの情報は公開されていなかった。私達はクラミドモナスで用いられていた光化学系蛋白質の精製法を参考に長波長クロロフィル結合型の遠赤色光吸収アンテナ蛋白質を精製し、*Prasiola crisper* far-red light-harvesting Chl-binding protein complex (Pc-frLHC)と命名した<sup>2</sup>。Pc-frLHCの吸収スペクトル(図1)において、680 nm付近のQ<sub>y</sub>帯の他に708 nmと725 nmに吸収ピークを持つ長波長クロロフィルを確認し、それぞれLWC708, LWC725とした。吸収スペクトルにおけるQ<sub>y</sub>帯の面積から計算すると、LWC708とLWC725の割合はクロロフィル全体の22%と2%に相当する。Pc-frLHCのクロロフィル蛍光発光スペクトル解析において、長波長クロロフィルからの蛍光は713 nmと730 nmの2つの成分が存

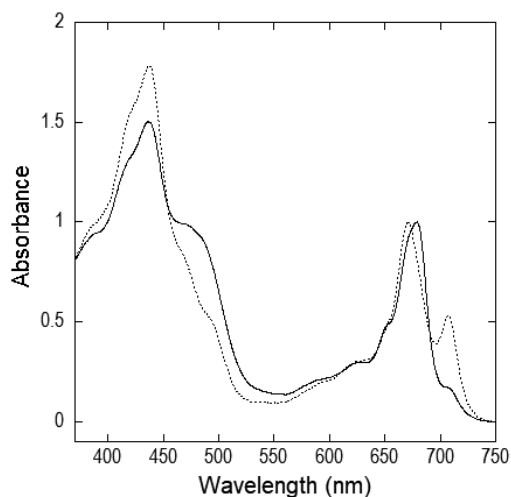


図1. ナンキョクカワノリから単離したチラコイドおよびPc-frLHCの吸収スペクトル

ナンキョクカワノリの細胞から単離したチラコイド(実線)と、チラコイドから精製したPc-frLHC(破線)の常温吸収スペクトル。吸光度は750 nmをゼロ、Q<sub>y</sub>帯の吸収ピークを1として標準化した。吸収スペクトルの測定は日本分光の分光光度計(V-650)と積分球を使用した。

在し、低温で測定するほど730 nmの蛍光の割合が増えることから、713 nmと730 nmの蛍光はそれぞれLWC708とLWC725に由来し、LWC725からLWC708へのアップヒル型エネルギー移動が温度依存的に制限されていると考えた。アレニウスプロットによる解析では、LWC708とLWC725は12:1の割合で存在することが示された<sup>2</sup>。これは吸収スペクトルの面積から計算した値とだいたい一致する。

本研究において長波長クロロフィル(LWC708, LWC725)と680 nm付近に吸収を持つバルククロロフィルの間でアップヒル型の励起エネルギー移動が起きているかどうか重要なポイントであった。740 nmのレーザーパルス光でPc-frLHCの長波長クロロフィルを励起した際の680 nmからの蛍光を測定することにより、長波長クロロフィルからバルククロロフィルへの励起エネルギー移動が25 psの時定数で生じていることが分かった(図2)。これは、長波長クロロフィルとバルククロロフィルの間のアップヒルとダウンヒルのエネルギー移動が平衡状態に達する過程を示している。

## 3. アミノ酸配列の推定

蛋白質の同定のため、精製したPc-frLHCをリシンエンドペプチターゼで断片化し、N末端アミノ酸シーケンスにより内部アミノ酸配列を3か所解読した。そしてトランスクリプトームデータの中から全てのアミノ酸配列を持つ配列を釣り上げることで、Pc-frLHCの全アミノ酸配列を推定した<sup>2</sup>。アミノ酸配列で系統解析を行ったところ、Pc-frLHCは緑藻で報告されている4回膜貫通型のLHCIに近縁であることが分かった。この4回膜貫通型LHCIは、*Chlamydomonas reinhardtii*ではLhca2(Cr\_Lhca2)<sup>5,6,7</sup>、*Bryopsis corticulans*ではLhcaJ(Br\_LhcaJ)<sup>8</sup>、*Dunaliella salina*ではLhca5(Ds\_Lhca5)<sup>9</sup>とされており互いにシノニムの関係にあり、PSIのPsaI, PsaLの側面に結合している。*C. reinhardtii*においてLhca2は最も長波長の吸収を持つLHCIとされている<sup>10</sup>。Pc-frLHCはPSIIのアンテナとして機能しているが、系統的にはLHCIに近いことが分かった。このことから、Pc-

ftLHC は緑藻の 4 回膜貫通型の LHCI が PSII のアンテナとして機能するようになる過程でより長波長に吸収を持つように進化したと考えられる。

#### 4. クライオ電子顕微鏡による構造解析

Pc-ftLHC の精製とアミノ酸配列が推定できたところで、長波長吸収やエネルギー移動の詳細を知るために次に目指したいのは蛋白質の構造解析である。ナンキョクカワノリはサンプルが希少で結晶構造解析はハードルが高すぎるため悩んでいたところ、クライオ電子顕微鏡が一般の研究者も利用できる環境になってきた。創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) の支援を受け高エネルギー加速器研究機構 (KEK) 構造生物学研究センターの千田俊哉センター長協力の元、同機構のクライオ電子顕微鏡でデータを取得することができ、分解能 3.13Å で構造を解くことに成功した (図 3)。Pc-ftLHC は 11 個のサブユニッ

トがリング状に結合した新規の複合体で、各サブユニットに 11 個のクロロフィルと 2 つのカロテノイドが結合している。HPLC による色素分析の結果から、カロテノイドはロロキサニンとピオラキサニンと同一した。クロロフィルは Chl *a* と Chl *b* が 5:1 ほどの割合で結合しているが、構造モデルでは分解能が足りず Chl *a* と Chl *b* を見分けることができなかったため、全て Chl *a* としている。サブユニットは 4 回膜貫通型 LHC で、緑藻の 4 回膜貫通型の LHCI とよく似ているが、4 回膜貫通型 LHCI よりも N 末の配列が長く、N 末が隣り合う両側のサブユニットと相互作用することでリング構造の安定化に寄与している。また、Pc-ftLHC 特有のクロロフィルとして Chl708 がアサインされた。クロロフィルはポルフィリン環同士が近接し  $\pi$ - $\pi$  スタッキングを形成することで電子軌道が安定化し吸収が長波長にシフトすることが知られている。Chl708 は Chl603-Chl609 に近接しており、励起子カップリングの

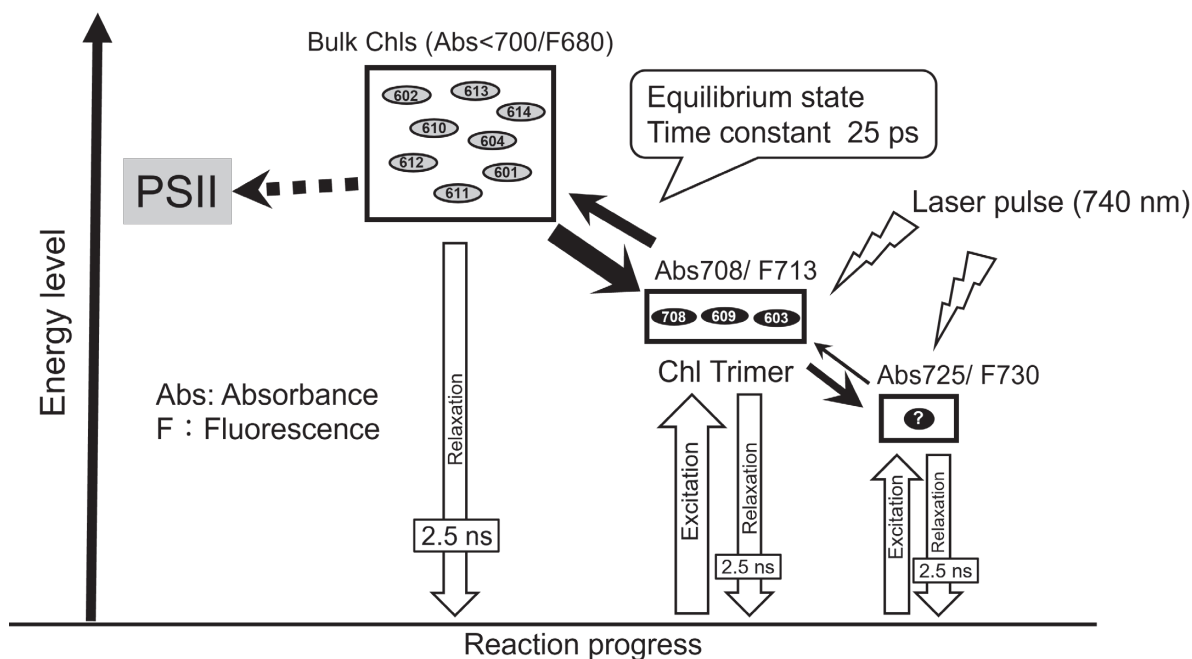


図 2. 長波長クロロフィルを励起した際の励起エネルギーの流れ

740 nm のレーザーパルスにより長波長クロロフィルを励起すると、25 ps の時定数でバルククロロフィルへのエネルギー移動が観測された。ひとつのサブユニットに結合する 11 個のクロロフィルを楕円で示した。各クロロフィルの番号は図 3 のクロロフィル番号と一致している。最長波長吸収成分である LWC725 は 11 個のクロロフィルへの帰属ができていない。白矢印はクロロフィルの励起と緩和を、黒矢印はクロロフィル間の励起エネルギー移動を示している。バルククロロフィルから PSII へのエネルギー移動が推測される。

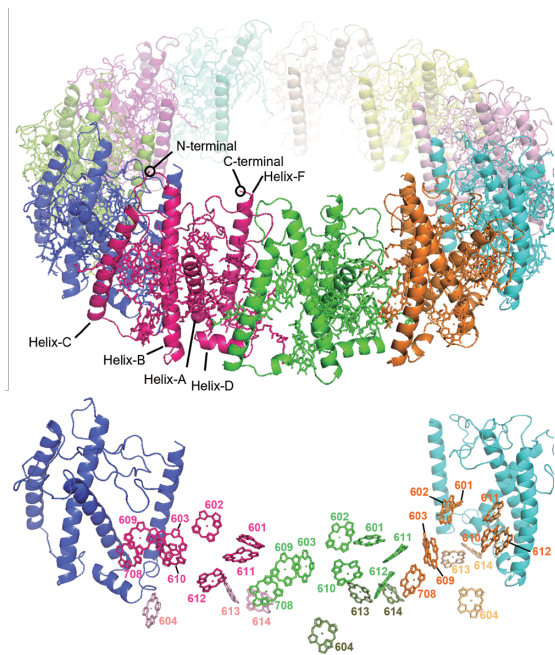


図 3. Pc-frLHC の分子構造モデル

上図は Pc-frLHC の各サブユニットとそこに結合する色素を色違いで示した。下図は、3つ分のサブユニットに結合するクロロフィルのポルフェリン環のみを表示した。ルーメン側に存在する Chl613, 614, 604 はストロマ側のクロロフィルよりも薄い色で示している。

計算結果から、Chl603、Chl609、Chl708 が 3 量体の長波長クロロフィル LWC708 としてアサインされた (図 4)。Chl603-609-708 はサブユニットの境界付近に位置し、隣のサブユニットに結合する Chl611 および Chl614 と近接しており、サブユニット間のエネルギー移動にも関わっていると予測している。一方で LWC725 は各サブユニットに結合する 1 1 個のクロロフィルにはアサインできなかった。LWC725 は Pc-frLHC を形成する 1 1 個のサブユニットのうちの 1 つに存在するくらいの割合であることがアレニウスプロットから示唆されており、1 1 個のうち 1 つだけサブユニットが異なる、あるいは Pc-frLHC のリング構造の歪みに起因している可能性がある。今回の構造解析は Pc-frLHC の 11 回転対象性を考慮しているため、リングの歪みや 1 つだけ異なるサブユニットを見分けることはできない。今後、より高い分解能で対象性を考慮しない C1 解析を目指していく。

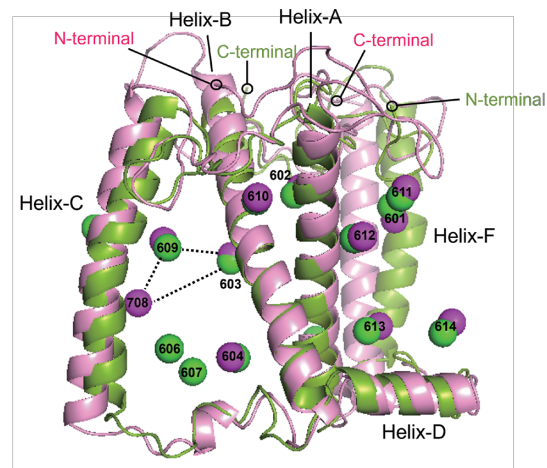


図 4. Pc-frLHC のサブユニットと 4 回膜貫通型 LHCI の比較

Pc-frLHC をマゼンタ、*Chlamydomonas reinhardtii* の 4 回膜貫通型 LHCI (PDB: 7dz8)<sup>7</sup> を緑で示した。球はクロロフィルのマグネシウムの位置を示している。球の番号は図 3 のクロロフィル番号に一致する。3 量体クロロフィルを点線で示した。

#### 4. Pc-frLHC の進化プロセス

最近、ナンキョクカワノリの培養株においてゲノム解析と遺伝子予測を行い、4 つの Pc-frLHC を含む 2 6 個の LHC 遺伝子を確認した<sup>11</sup>。アミノ酸配列による系統解析の結果、Pc-frLHC は緑藻トレブクシア藻綱の中で緑藻の 4 回膜貫通型 LHCI から進化した可能性が示唆された。4 回膜貫通型 LHCI と Pc-frLHC のアミノ酸配列を比較すると、4 回膜貫通型 LHCI において Chl606 が結合するグルタミン酸が Pc-frLHC には見られずクロロフィルが配位できないアミノ酸に置き換わっており、ひとつ隣のアミノ酸 (ヒスチジン) に Chl708 が配位している (図 5)。このことから、Chl708 は 4 回膜貫通型 LHCI の Chl606 が配位するアミノ酸がひとつ隣にずれた結果、生じたものであると考えられた。配位するアミノ酸が一つ分ずれたことで Chl603-609 との距離が近くなり、3 量体クロロフィルが形成された。Pc-frLHC と相同性が高い LHC を検索すると、ナンキョクカワノリと同じトレブクシア藻綱の *Coccomyxa* 属と *Trebouxia* 属において同じアミノ酸の変異を



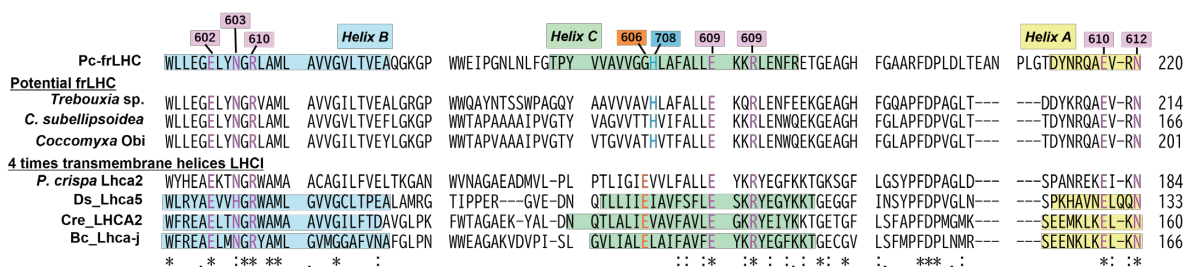


図 5. アミノ酸配列の比較

Pc-frLHC と相同性の高いアミノ酸配列を持つ *Trebouxia* sp. (KAA6421879.1)、*Coccomyxa subellipsoidea* C-169 (XP\_005646347)、*Coccomyxa* sp. Obi (BDA47009.1) の LHC、および緑藻の 4 回膜貫通型 LHCI のアミノ酸配列を Clustal omega (EMBL-EBI) によりアライメントし、長波長クロロフィルが配位する辺りのアミノ酸配列を表示した。配列上部の数字は配位するクロロフィルの番号。構造解析から膜貫通ヘリックス部分が特定されているものは色違いの影を付けた。Pc-frLHC の Chl708 はヒスチジン (H) に、4 回膜貫通型 LHCI の Chl606 はひとつ隣のグルタミン酸 (E) に配位している。

持つ LHC が見つかった。これらの LHC の構造や機能は調べられていないが、系統解析の結果では 4 回膜貫通型 LHCI と Pc-frLHC の中間のクレードに位置している。

トレブクシア藻綱は気生藻が多いグループである。*Coccomyxa* や *Trebouxia* はナンキョクカワノリ (*Prasiola crispa*) と同様に南極の砂礫からも単離されることがあり、*Trebouxia* は地衣類の共生藻としても知られている。赤外線は水に吸収されるため水中で Pc-frLHC のようなアンテナをわざわざ発達させる利点は少ないと思われるが、浅瀬や陸上環境ではナンキョクカワノリのコロニーのように可視光より赤外線が豊富にある環境が形成される。このことから、Pc-frLHC は緑藻が陸上へ進出する過程で赤外線が豊富にある微環境へ適応するために進化した可能性がある。

### 5. 今後の展望

Pc-frLHC で起きているアップヒル型の励起エネルギー移動の詳細を明らかにするためには結合するクロロフィル a/b の同定を行う必要がある。また、Pc-frLHC から PSII へのエネルギー移動について明らかにするためには、Pc-frLHC-PSII 超複合体の分光学的特性を解析する必要がある。そのために、ナンキョクカワノリの培養株を使った実験系を構築し、更に高解像度の構造解析を目指すと共に、Pc-frLHC-PSII 超複合体の精製方法を検討している。分子生物学的解析では Pc-frLHC の発現制御機構を明らかにし、ナンキョクカワノ

リが Pc-frLHC を獲得した進化プロセスについて探っていく。

Received Aug 31, 2024; Accepted Oct 22, 2024; Published Nov 10, 2024

### 参考文献

1. 小杉 真貴子, 伊藤 美空, 小池 裕幸. 南極露岩域に生育するナンキョクカワノリの光合成適応戦略. *光合成研究* **30**, 19-25 (2020).
2. Kosugi, M. et al. Uphill energy transfer mechanism for photosynthesis in an Antarctic alga. *Nat. Commun.* **14**, 730 (2023)
3. Kosugi, M. et al. A comparative study of wavelength-dependent photoinactivation in photosystem II of drought-tolerant photosynthetic organisms in Antarctica and the potential risks of photoinhibition in the habitat. *Ann. Bot.* **122**, 1263–1278 (2018).
4. Kosugi, M. et al. Red-shifted chlorophyll a bands allow uphill energy transfer to photosystem II reaction centers in an aerial green alga, *Prasiola crispa*, harvested in Antarctica. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1861**, 148139 (2020).
5. Su, X. et al. Antenna arrangement and energy transfer pathways of a green algal photosystem-I-LHCI supercomplex. *Nat. Plants* **5**, 273–281 (2019).

6. Suga, M. et al. Structure of the green algal photosystem I supercomplex with a decameric light-harvesting complex I. *Nat. Plants* **5**, 626–636 (2019).
7. Pan, X., Tokutsu, R., Li, A. et al. Structural basis of LhcbM5-mediated state transitions in green algae. *Nat. Plants* **7**, 1119–1131 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00960-8>
8. Qin, X. et al. Structure of a green algal photosystem I in complex with a large number of light-harvesting complex I subunits. *Nat. Plants* **5**, 263–272 (2019).
9. Caspy, I. et al. Structure and energy transfer pathways of the *Dunaliella Salina* photosystem I supercomplex. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1861**, 148253 (2020).
10. Mozzo, M. et al. Functional analysis of photosystem I light-harvesting complexes (Lhca) gene products of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1797**, 212–221 (2010).
11. Kosugi, M. et al. Characterization of the far-red light absorbing light-harvesting chlorophyll a/b binding complex, a derivative of the distinctive Lhca gene family in green algae. *Frontiers Plant sci.* **15**, 1409116 (2024).

**The structure and phylogeny of the far-red light harvesting protein complex in an Antarctic green alga.**

Makiko Kosugi

National Institute for Basic Biology, National Institutes of Natural Sciences

解説特集

光合成研究における最新技術と発見

序文	古本 強 (龍谷大)	111
解説 X線自由電子レーザーを利用したタンパク質の時分割結晶構造解析	沈 建仁 (岡山大)	112
解説 被子植物の葉緑体ゲノム編集技術、最新の知見	中里 一星、有村 慎一 (東京大)	117



## 解説特集

### 序文<sup>†</sup>

龍谷大学農学部  
古本 強

観察技術・実験技術の進展は言葉通り日進月歩です。研究上の困難を解決する必要性に応じて新しい技術が開発され、そしてそれによって新しい事実が発見されます。これは実験科学の一つの常です。解析技術の発展と科学の発見には相乗的な効果があります。

今回の解説特集「光合成研究における最新技術と発見」では、2つの解説記事を掲載しました。最初の解説記事は「X線自由電子レーザーを利用したタンパク質の時分割結晶構造解析」というタイトルで沈建仁氏（岡山大学）に、光化学系IIで行われる水分解を短い時間スケールで解析し、まるでコマ送りのように水分解過程を明らかにした研究の実験手法を中心に紹介していただきました。水分子から電子を取り出す過程が酸素発生型光合成の「肝」なので、これを時間分解的に可視化できたことは今後の世界的な研究の基盤になることは予想に難くありません。2本目の解説記事は「被子植物の葉緑体ゲノム編集技術、最新の知見」というタイトルで中里一星氏、有村慎一氏（東京大）に、葉緑体のゲノム編集技術について解説していただきました。現在、「ゲノム編集技術」といえば、Crispr-Cas9に代表される動物・植物で利用される核ゲノムの編集技術を意味することが多いです。周知のことでもあります。核ゲノム編集技術の開発過程では、プロトタイプゲノム編集技術としてTALEN法が開発されていました。RNAを鋳型として必要とするCrispr-Cas9によるゲノム編集法は核ゲノムの編集には適していましたが、RNAをオルガネラに運ぶことが原理上できないためオルガネラゲノムの編集には適用できませんでした。そこで、この両氏は、プロトタイプのTALEN法を利用することを思いつき、葉緑体ゲノムの編集技術の確立に成功しました。葉緑体ゲノムの編集ができるというこの技術は、今後、葉緑体やミトコンドリアなどのオルガネラゲノムの改変技術として展開されることでしょう。もちろん、今後の光合成研究を大いに進めうる革新技術です。

こうした先端技術の成功例には、その技術の「基礎」と「限界」を知り尽くした上で自身に直面している疑問を解決するのにどう用いるかを思案する、いわば研究者の醍醐味が詰まっているように思います。この2つの記事から、それぞれの研究者が、新しい科学の扉を開ける瞬間を堪能していただければと思います。

<sup>†</sup>解説特集「光合成研究における最新技術と発見」

\*連絡先 E-mail: tfurumoto@agr.ryukoku.ac.jp

## 解説

X線自由電子レーザーを利用したタンパク質の時分割結晶構造解析<sup>†</sup>

岡山大学異分野基礎科学研究所

沈 建仁

時間分解構造解析法、あるいは時分割構造解析法は、タンパク質や酵素の瞬間の構造、すなわち、反応中間体の立体構造を解析するための手法である。X線自由電子レーザー（XFEL）が開発される前にもラウエ時分割結晶構造解析法があるが、XFEL技術の使用により、中間体の結晶構造解析は劇的に変化した。本稿では、XFELの原理とそれを利用した酵素反応中間体の時分割結晶構造解析法を簡潔に紹介する。

## 1. はじめ

タンパク質などの高分子の立体構造を実験的に解析する手段として、単波長 X 線結晶構造解析は最も強力な方法である。この手法では、タンパク質の結晶に放射光施設等からの単波長 X 線を入射し、回折像を得るが、3次元立体構造を解析するため、結晶を回転させながら X 線を入射して、0–360 度、あるいは結晶の対称性によっては 0–180 度、または 0–90 度の範囲で 0.1–1 度ごとに回折像を撮影する。得られた回折像を専用のソフトウェアで統合して、回折斑点の強度をフーリエ変換により実空間での電子密度図を作成し、電子密度図に対してアミノ酸等のモデリングを行うことで、最終的な構造を得るようになる。通常の X 線は、「連続」したものであるため、1 枚の回折像を得るために最低でも 0.1 秒程度かかり、また、一つの回折データセットを取得するため、最低でも 90 度までの範囲で結晶を回転しながら回折像を撮影する必要があるため、寿命が短いタンパク

質や酵素反応の中間体の構造をこの手法で解析することは不可能である。

時間分解構造解析のため、従来の単波長（単色）X 線の代わりに、白色、またはピンク色の X 線を利用したラウエ時分割結晶構造解析法がある。この方法では、X 線波長を限定せず、あるいは一定領域に限られた波長（ピンク色）の X 線を用いることで、結晶を回転せずに、1 枚の写真から必要な回折点を取得して、それに基づき構造解析が可能である。1 枚の回折写真を撮影する時間を短くすることで、その時間内で結晶構造が解析できる。光、またはケージド化合物を利用して反応を進ませてから、一定の時間が経過した時点で回折像を撮影することで、その時点での中間体の構造が解析できる。この方法は広くポンププローブ構造解析法と呼ばれる。この方法は白色で強い X 線を出力する第 2 世代放射光が利用可能になってから初めて利用可能になったものである<sup>1-3</sup>。しかし、短い時間で 1 枚の回折像のみを撮影

<sup>†</sup>解説特集「光合成研究における最新技術と発見」

\*連絡先 E-mail: shen@cc.okayama-u.ac.jp

するという事は、強い X 線と高品質の結晶が必要であること、また、X 線損傷によるタンパク質結晶の寿命の制約があること等から、この方法で反応中間体の構造が解析された例はあまり多くない。

X 線をチョッパーで短いパルスに分けて切り出し、酵素反応中間体の結晶に照射して、回折像を撮影して構造解析を行う方法もある<sup>4</sup>。ポンプとして最も有効なのはレーザー光で、それを照射することで励起された反応中間体を短いパルス幅を持つ X 線で回折像を得ことになる。この手法の問題点も、X 線の強度と時間分解能にある。通常の X 線をチョッパーで分割した場合、例えば 1000 Hz にした場合、1 パルス当たりの X 線強度は分割前の 1000 分の 1 になる。時間分解能をあげるためには 1 パルスの時間をもっと短くする必要があるが、その分 1 パルス当たりの X 線強度は低下する。この低い強度の X 線では、1 パルスを当てただけでは十分な分解能のある回折像を撮影することができず、例えば 1000 回の回折像を撮影し、積算することで、分割前の X 線の 1 秒露光の回折像に相当する像が得られる。これは、酵素反応中間体について行う場合、反応が可逆的で、1 回反応した後、酵素が元の状態に戻って、同じポンプを与えて励起し、中間状態で回折像を取る、ということを 1000 回繰り返すことで、やっと 1 枚の回折像を得ることができる。これは、膨

大な時間と労力が必要であることは容易に想像できる。しかもこの方法で取れる中間体の時間分解能も、使用する X 線のパルス幅に制限されるので、上の例では 1000 分の 1 秒、1 ミリ秒が限界である。これらのため、この方法はタンパク質よりも回折能の高い有機小分子の構造変化を観測するのにほぼ限定されている<sup>4</sup>。

従って、X 線結晶構造解析法で酵素反応中間体の瞬間構造を解析するには、X 線のパルス幅を大きく狭め、かつ単位時間当たりの X 線強度を大きく向上させる必要がある。このような X 線はまさに「X 線自由電子レーザー (X-ray free electron laser, XFEL)」である。

## 2. X 線自由電子レーザー

XFEL は、時間が極めて短い、強度が極めて高い X 線レーザーである。その特徴は、1 パルス当たりの時間が数フェムト秒から数十フェムト秒という短い時間、1 パルス当たりの強度が SPring-8 の X 線の 10 億倍 ( $10^9$  倍) ことである。このような X 線レーザーがどのように作り出されたかを簡単に紹介する。図 1 に示したように電子銃から射出される電子ビームを線形加速器で光速に近い速度に加速し、極が交互に変更して並んでいる磁石「アンジュレータ」の中を通すと、磁場により電子の運動方向が変わり放射光 X 線が放出されることになる。この時、非常に長いアンジュ

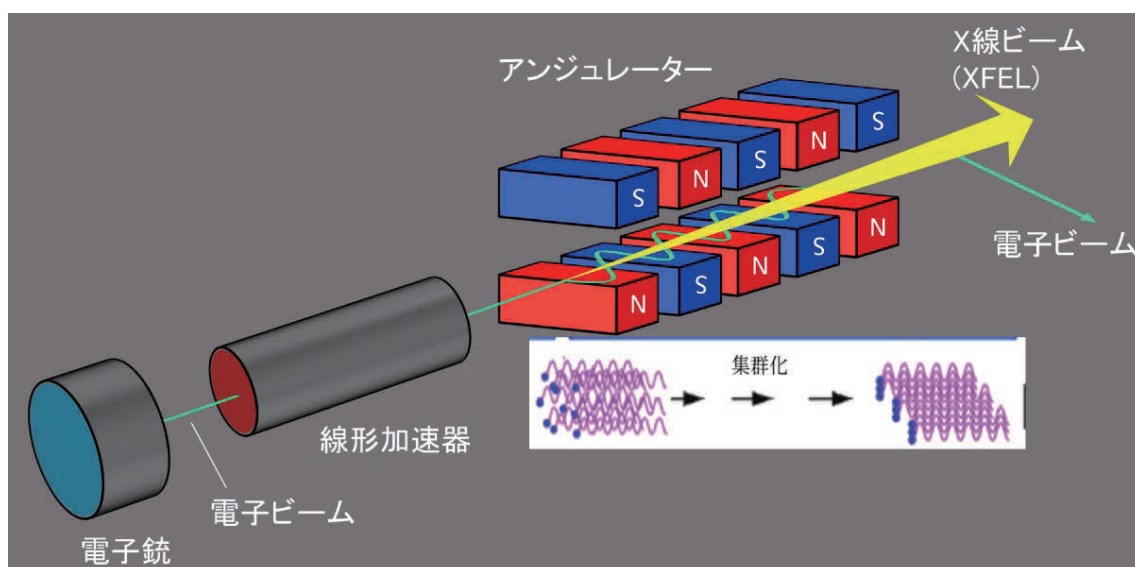


図 1. XFEL 装置の基本構造の模式図

レータに電子の塊を通して、後ろの電子から出る光と前の電子との相互作用によって電子を波長間隔に並べ、コヒーレントな X 線を発生させる自己増幅自発放射 (Self-Amplified Spontaneous Emission : SASE) 機構により、桁違いの強度と位相の揃った (コヒーレントな) X 線が生成される<sup>5,6</sup>。この機構を利用して XFEL は作られることになる。現在、世界で作られている XFEL 施設はすべてこの原理を利用している。

### 3. 世界の XFEL 施設

世界では、スタンフォードにある米国国立加速器研究所 (SLAC) で最初の XFEL 施設 LCLS (The Linac Coherent Light Source)が建設され、2009 年から稼働開始した<sup>7</sup>。この XFEL 施設は、X 線の強度を確保するため、2 キロメートルの長さの線形加速器を使っており、100 Hz で X 線を提供できるが、最近 LCLSII へのバージョンアップが計画・建設され、さらなる周波数と X 線強度の向上が図られている。日本では世界 2 番目の XFEL 施設、SACLA (SPring-8 Angstrom Compact free electron LAsEr)が建設され、2012 年に稼働開始となっている<sup>5,6,8</sup>。SACLA の特徴は、日本発の技術、真空封止型アンジュレータを使用することにより、線形加速器が 700 m という短いものになっていても、短波長・大強度 X 線を発振でき

ることである。その後スイス、ヨーロッパ、韓国で XFEL 施設が相次いで建設され、稼働している。そのうち、ヨーロッパの XFEL 施設は、ドイツのハンブルク郊外に建設され、加速器の長さが 2.1 キロメートルあり、X 線パルスの最大周波数が 27 kHz に達し、最大 X 線強度が  $5 \times 10^{33}$  (photons / s / mm<sup>2</sup> / mrad<sup>2</sup> / 0.1% bandwidth)になる、世界最大規模のものである<sup>9</sup>。さらに中国などでも新たな XFEL 施設が計画され、建設が進んでいる。

### 4. XFEL を用いた時分割結晶構造解析

XFEL はフェムト秒単位のパルス X 線であるので、1 パルスで 1 枚の回折像を撮影するためには、1 パルス当たりの X 線強度が通常の X 線で 1 枚の写真を撮影するのと同程度が必要である。SPring-8 の X 線で 1 枚の回折像を撮影するのに 0.1 sec かかるとすると、SACLA の XFEL のパルス幅は 10 fsec であるので、SPring-8 の X 線の  $10^{12}$  倍の強度が必要である。実際は SPring-8 の X 線を使えば、 $\mu$ sec 単位で回折像を撮影することが可能なので、SACLA の XFEL の単位時間当たりの強度は SPring-8 の  $10^8 - 10^9$  倍である。

ここのようなフェムト秒単位の XFEL の X 線を使えば、理論的にはサブピコ秒でのタンパク質の瞬間構造を解析することが可能である。そこで使用されるのがポンププローブ時分割結晶構造解析法 ( Pump-probe time-resolved serial

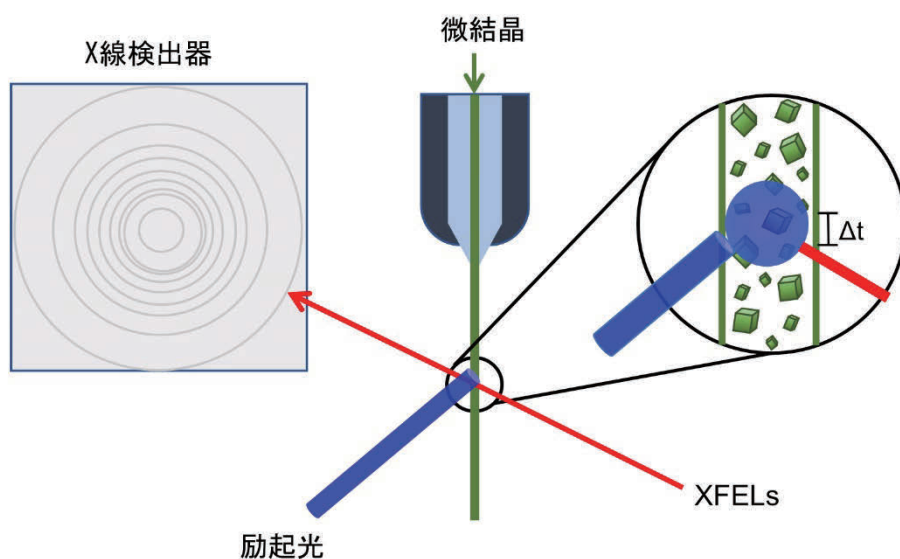


図 2. XFEL を利用したポンププローブ時分割結晶構造解析法の実験セットの模式図



femtosecond crystallography (TR-SFX)) である。この方法では、反応のトリガー(ポンプ)としてフェムト秒またはナノ秒のレーザー光、またはケージド化合物等を使用し、反応を開始させてから一定の時間(遅延時間という)をおいて、プローブとして XFEL を使用して回折データを収集し、構造解析を行う(図 2)。しかし、XFEL の 1 パルスでは回折像を 1 枚しか取れず、さらに XFEL の X 線強度が極めて高いため、1 パルスの XFEL 照射で結晶は破壊されてしまうので、1 パルス照射後結晶を交換して新しい回折像を撮影する必要がある。そこで考案されたのが微結晶(10 nm–10  $\mu\text{m}$  程度)を使用して、1 パルスの XFEL を照射した後に微結晶を連続的に交換するという方法である。この方法は Serial femtosecond X-ray crystallography (SFX)法と呼ばれ<sup>10,11</sup>、微結晶を連続的に供給することで、多数の回折像を得ることができる。典型的な実験セットアップの概念図は図 2 に示した通りであるが、上から下の方向で連続的に微結晶を一定の速度で流し、ある領域に到達した時点でナノ秒やフェムト秒のポンプ光を照射し、その後一定時間(遅延時間)をおいてから XFEL を照射する。この「一定時間」は、サブピコ秒からミリ秒まで可能で、これによってそれぞれの時点に対応する瞬間構造が得られる。

ここで問題なのは「微結晶を連続的に供給すること」である。これを解決するため、真空中で微結晶を含んだ溶液をそのまま噴射する、あるいは何らかのマトリックスに微結晶溶液を混ぜて射出する方法が考案された。SACLA では、グリースやセルロースなどの高粘度媒体に微結晶を混ぜても結晶の質を落とさないことが見つかかり、グリースあるいはセルロースと微結晶を混ぜて射出する方法が採用されている<sup>12</sup>。しかし、XFEL の照射頻度(ヘルツ数)はあらかじめ決められているので、この方法では、XFEL 照射点に微結晶が来るかどうかをコントロールすることはできない。実際、これらの方法で XFEL による照射を受けて回折像が得られる確率は 10%-50%程度である。得られる回折像のうち、解析に使える回折像はさらに少なくなるので、この方法での成功率は低いことが欠点である。LCLS では、さらにベ

ルトコンベヤーの上に微結晶溶液を載せて、XFEL の照射点に運ぶ装置も考案され、使われている<sup>13</sup>。

以上の方法で、微結晶から XFEL による回折像は得られるが、それらの処理も問題である。冒頭で述べたように、従来の結晶構造解析では、結晶方位が既知の結晶を 0–360 度、または 0–180 度、0–90 度の範囲で回転させながら X 線を照射して、回折像を撮影する必要があるが、ランダムな向きで流れてくる微結晶の結晶方位をあらかじめ知るすべはない。このため、多数のランダムな向きを持った回折像を撮影し、ソフトウェアで各回折像の角度を推定することが考案され、専用のソフトウェア、例えば、CrystFEL<sup>14</sup>などが開発され、構造解析ができるようになった。以上のような多くの技術開発によって、酵素反応中間体の瞬間構造を解析できるようになり、反応途中の酵素と基質の両方の構造変化を映画のコマのように見ることが可能になった。

## 5. おわりに

XFEL が開発される前、酵素反応の中間体構造を解析する手法はほぼラウエ法しかなく、この方法による結晶の質への要求や時間の制限等により、反応中間体の構造解析はあまり進まなかったと言わざるを得ない。一方、ポンプ-プローブ実験によるスペクトル解析は、可視-紫外光のレーザー技術の進歩等により大きく進展し、中間状態のスペクトル解析は多くの系で行われている。このようなスペクトル解析により、ある程度酵素の立体構造への対応が解析・議論されてきたが、これらはあくまでも立体構造に対する「間接的」な証拠であり、従って、実際の立体構造との対応では多くの議論がなされているのが現状である。XFEL の開発により、タンパク質の反応中間体の瞬間立体構造を実際に「目で見る」ことが可能になり、しかもこの技術は、サブピコ秒からミリ秒まで、1 Å 程度の空間分解能まで構造解析が可能で、酵素反応を研究するための極めて重要な技術を提供したと言える。一方、この技術はまだ成長途中であり、例えば、試料の供給やデータ処理などでまだ多くの改善の余地がある。特に光では励

起できず、基質の添加のみで反応が開始するような系では、基質と酵素との混合時間が構造解析の時間分解能の限界になるので、それらを克服する技術の開発が望まれている。

Received Aug 30, 2024; Accepted Oct 23, 2024; Published Nov 10, 2024

#### 参考文献

1. Moffat, K., Szebenyi, D. & Bilderback, D. X-ray Laue diffraction from protein crystals. *Science* **223**, 1423-1425 (1984).
2. Moffat, K., Bilderback, D., Schildkamp, W., Szebenyi, D. & Teng, T.Y. Laue photography from protein crystals. *Basic Life Sci.* **51**, 325-330 (1989).
3. 坂部 知平, 坂部 貴和子, ラウエ法による時分割蛋白質結晶構造解析. *生物物理* **28**, 43-46 (1988).
4. 佐藤文菜 et al. 放射光 X 線を用いた時間分解結晶構造解析法. *日本結晶学会誌* **6**, 24-30 (2021).
5. 石川哲也, X 線自由電子レーザー SACLA. *ぶんせき* **2**, 71-78 (2013).
6. 石川哲也, X 線自由電子レーザー (SACLA) が拓くサイエンス. *工学* **43**, 406-412 (2014).
7. <https://lcls.slac.stanford.edu>.
8. Ishikawa, T. et al. A compact X-ray free-electron laser emitting in the sub-ångström region. *Nature Photonics*, 540-544 (2012).
9. [https://www.xfel.eu/index\\_eng.html](https://www.xfel.eu/index_eng.html)
10. Chapman, H. N. et al. Femtosecond X-ray protein nanocrystallography. *Nature* **470**, 73-77 (2011).
11. Boutet, S. et al. High-resolution protein structure determination by serial femtosecond crystallography. *Science* **337**, 362-364 (2012).
12. Sugahara, M. et al. Grease matrix as a versatile carrier of proteins for serial crystallography. *Nat. Methods* **12**, 61-63 (2015).
13. Butryn, A. et al., An on-demand, drop-on-drop method for studying enzyme catalysis by serial crystallography. *Nat Commun.* **12**, 4461 (2021).
14. White, T.A. Processing serial crystallography data with CrystFEL: a step-by-step guide. *Acta Crystallogr D Struct Biol.* **75**, 219-233 (2019).

## Time-resolved serial femtosecond crystallography with X-ray free electron lasers

Jian-Ren Shen

Research Institute for Interdisciplinary Science, Okayama University

## 解説

## 被子植物の葉緑体ゲノム編集技術、最新の知見 †

東京大学 大学院農学生命科学研究科  
中里 一星、有村 慎一\*

葉緑体は細胞内共生で真核細胞に取り込まれたシアノバクテリアに由来するオルガネラと考えられており、独自のゲノムを有する。ゲノム編集は DNA 塩基配列を標的特異的に改変する技術であり、葉緑体ゲノム編集は 2021 年に初めて報告され、それ以降着実に発展している。本稿では、葉緑体ゲノム編集技術の最新の知見を紹介すると共に、葉緑体ゲノム改変の従来法（相同組換えを介した外来 DNA 導入）の特徴と比較する。核のゲノム編集では、ほとんどの場合 CRISPR/Cas 系のゲノム編集酵素が用いられているが、この酵素はタンパク質と RNA の二成分で構成され、後者のガイド RNA を葉緑体へ効率的に送達する手法が確立されていないため、現在のところ葉緑体ゲノム編集に使用できない。葉緑体ゲノム編集では、葉緑体への局在が容易なタンパク質成分のみで構成されるゲノム編集酵素 transcription activator-like effector nuclease (TALEN) とその派生酵素が主に用いられている。葉緑体ゲノム編集酵素は、葉緑体移行シグナル配列、TALEN の DNA 結合ドメイン、および DNA 塩基に変化を引き起こす触媒ドメインを含む。これまでに報告された葉緑体ゲノム編集技術では、標的特異的な DNA 二重鎖切断や、標的一塩基だけを狙った C:G 対から T:A 対または A:T 対から G:C 対への塩基置換が報告されている。これらの方法は、葉緑体ゲノムの基礎研究のさらなる発展に寄与し、また葉緑体ゲノムを利用した作物育種の基盤技術となることが期待される。

## 1. はじめに

被子植物の葉緑体ゲノム（多くの場合 120-160 kb、プラスチドゲノムとも呼ばれる）にコードされる遺伝子の数は多くの被子植物で 100-130 個と少ないが、光合成電子伝達系の複合体のサブユニット、Rubisco の大サブユニット、脂肪酸合成酵素等の、植物の生存・成長に不可欠な遺伝子や、これらの遺伝子の転写や翻訳を担う遺伝子が存在する<sup>1</sup>。これらは光合成をはじめとした基礎研究の対象であるだけでなく、作物増産などの応用研究に通じる改変標的にもなり得る。被子植物の葉緑体ゲノムの改変の中心技術である外来遺伝子導入技術（いわゆる葉緑体形質転換法）は、①

相同組換えによって目的遺伝子をゲノムの狙った箇所に導入できる、②一細胞に数百から数千コピー存在する葉緑体ゲノム<sup>2</sup>の全てに目的遺伝子を導入しうる（ホモプラスミーなゲノム改変を達成しうる）、③目的遺伝子をタンパク質レベルで高発現させられる<sup>1</sup>、という特長・利点がある。その一方で欠点もあり、①適用可能な種が限られ、②作出された個体（遺伝子組換え生物, genetically modified organisms, GMOs) の野外栽培において多くの国で規制や高いハードルがある。これらは葉緑体形質転換法を作物育種へ利用展開する上での障壁となっている。葉緑体形質転換法はタバコをはじめとする 20 以上の植物種で報告例がある

†解説特集「光合成研究における最新技術と発見」

\*連絡先 E-mail: arimura@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

が<sup>3</sup>、モデル植物シロイヌナズナの野生型への適用が難しいため、葉緑体ゲノムの遺伝学のほとんどはシロイヌナズナで行われていない。コムギやトウモロコシといった主要作物が属する単子葉植物では、イネでの一例<sup>4</sup>を除いて報告例がない。その原因の一つに、単子葉植物では適切な選抜マーカーが見つかっていないことが挙げられる<sup>5</sup>。その一方で、葉緑体ゲノム編集技術は、上記の難点を回避しつつ葉緑体ゲノムを改変できる。本稿では、葉緑体ゲノム編集技術について、最新の知見を含めて紹介する。

## 2. 葉緑体ゲノム編集技術

ゲノム編集とは、ゲノム中の狙った配列のみを改変する手法であり、標的配列に特異的に作用するゲノム編集酵素が遺伝情報の改変を担う。核のゲノム編集は、プラスミド構築が簡便であることや市販の Cas9 タンパク質が利用できることから CRISPR/Cas 系のゲノム編集酵素が主に用いられているが、要旨で述べたようにこの酵素を葉緑体のゲノム編集に用いることはできない。タンパク質はその N 末端側に葉緑体移行シグナル配列 (CTP) を付加することで葉緑体内部へ局在させることができるので<sup>6</sup>、葉緑体ゲノム編集には、TALEN や Zinc finger nuclease (ZFN) のような、タンパク質のみから構成される酵素を用いる必要がある。実際に、これまでのところ報告されて

いる被子植物の葉緑体ゲノム編集技術は、TALEN による DNA 二本鎖切断、あるいは TALEN を改変した塩基置換酵素による標的塩基置換のいずれかである。これらの酵素の多くは一分子あるいは二分子一対で機能し、その DNA 結合ドメイン (TALE) が標的配列 (自在に設定可能な 10-20 bp) に結合し、その間の配列 (target window) あるいは周辺において、nuclease や cytidine deaminase や adenine deaminase といった触媒ドメインの働きによって、DNA 二本鎖切断や塩基置換が生じる (図 1A)。一般に、ゲノム編集酵素を生体内に導入する方法には、①酵素を細胞に直接導入する方法、②酵素の mRNA を細胞に注入する方法、③酵素をコードするプラスミドを一過的に導入する、あるいは④酵素をコードするバイナリーベクターをアグロバクテリウムを介して核ゲノムに導入する方法などがあり、これまで報告された葉緑体ゲノム編集技術では、②~④の方法が用いられてきた。いずれの方法においても、ゲノム編集酵素が細胞質で翻訳された後、CTP の情報に基づいて葉緑体内部へ輸送され、そして標的配列が編集される (図 2)。以降の章では、これまでに報告されてきた被子植物の葉緑体ゲノム編集技術を改変の種類別に紹介する。



図 1. 葉緑体ゲノム編集酵素の概略図。(A) DNA 結合ドメイン (TALE) が緑色または紫色で表示した標的配列に結合すると、触媒ドメイン (多種類、本文参照) の働きによって target window (二分子型酵素の場合) や TALE 結合配列の近傍 (一分子型酵素の場合) に DNA 二本鎖切断や塩基置換が生じる。(B) cpDdCBE/ptpTALECD の概略図。Nakazato & Arimura<sup>36</sup> を引用。(C) mTCBE や mTCBE-T の概略図。Nakazato & Arimura<sup>36</sup> を改変。



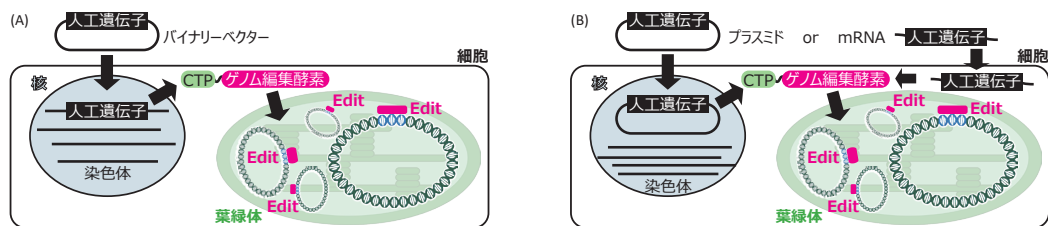


図 2. 葉緑体ゲノム編集酵素が植物細胞に導入されてから葉緑体へ輸送されるまでの概略図。(A) ゲノム編集酵素をコードする人工 DNA が核ゲノムに導入される場合の概略図。(B) ゲノム編集酵素をコードするプラスミドまたは mRNA が一過的に細胞内に導入される場合の概略図。(A), (B) いずれの場合も酵素が細胞質で翻訳された後、N 末端側の CTP の情報に従って葉緑体内部へ輸送される。Arimura & Nakazato<sup>37</sup> を改変。

### 3. DNA 二本鎖切断

Huang らは、葉緑体に局在する TALEN を用いて葉緑体ゲノムの標的配列を切断することに成功した<sup>7</sup>。TALEN の両分子の TALE がそれぞれの標的配列に結合すると、target window がヌクレアーゼドメインによって切断される。この論文が公開される以前に、他の 2 つのグループが葉緑体に局在するホーミングエンドヌクレアーゼまたは制限酵素を用いて葉緑体ゲノム上の標的配列の切断を報告していた<sup>8,9</sup>。これらのヌクレアーゼは決まった塩基配列 (約 30 または 4 bp) を認識し、その近傍しか切断することができない。また、その他の制限酵素を利用した場合でも認識配列は特定の 4-8 bp であり、葉緑体ゲノムの 100~1,000 箇所を切断するため<sup>9</sup>、標的配列を自在に選び、かつそこだけを切断することはできなかった。一方、TALEN は二分子一対で合計で最大約 40 bp の狙った配列に結合するため、葉緑体ゲノム上の任意の標的一ヶ所だけを特異的に切断できる。Huang らは、RNA polymerase  $\beta'$  サブユニットの遺伝子 *rpoB* を標的とする TALEN をコードするバイナリーベクターを作製し、これをアグロバクテリウムを介してタバコの核ゲノムに導入した形質転換体を作成した。調べた全 11 個体において、TALE 結合配列から約 250 bp 下流に一塩基置換が検出された。これらの個体はアルビノ、斑入り、クロロシスのいずれかの表現型を呈した。さらに、これらのうち 1 個体では、TALE 結合配列を含む 4 kb の欠失が見られ、短い相同配列間での組換えによる DNA 修復によってゲノム構造が変化していた。なお、上記の葉緑体ゲノム改変は非ホモプラスミーであった。これらの結果から、葉

緑体に局在する TALEN を用いて、TALE 結合配列周辺の配列を、少なくとも一部のゲノムコピーで改変できることが示された。

### 4. 標的塩基置換

現在のところ報告されている葉緑体ゲノムの標的塩基置換技術は、標的 C:G 対を T:A 対に、あるいは標的 A:T 対を G:C 対に置換する方法の 2 種類である。両者についてそれぞれ 4.1 と 4.2 で紹介する。

#### 4.1. 標的 C:G 対を T:A 対へ置換する技術

標的 C:G 対を T:A 対に置換する方法は、二本鎖 DNA (dsDNA) に作用する cytidine deaminase (CD) を用いる方法と、一本鎖 DNA (ssDNA) に作用する CD を用いる方法に大別される。これら 2 つの方法について、4.1.1 と 4.1.2 でそれぞれ紹介する。

##### 4.1.1. dsDNA に作用する CD を用いた標的 C:G-to-T:A 塩基置換

3 つのグループが dsDNA に作用する CD (DddA) を有する類似した二分子型の塩基置換酵素を用いて、葉緑体ゲノムで標的 C:G 対を T:A 対に編集することに成功した<sup>10-13</sup>。これらの塩基置換酵素では、どちらの分子においても TALE と uracil glycosylase inhibitor (UGI) の間に、二分割された DddA の片割れ (DddA half) が融合しており、一方の分子には DddA half の N 末端側半分が、他方の分子には C 末端側半分が融合している (図 1B)。UGI は、DddA がシトシンを脱アミノ化することで生成されたウラシルがその後除去されること

を防ぎ、C:G から T:A への置換を促す<sup>14</sup>。この酵素は、自身の N 末端に付加された CTP の働きによって葉緑体内部に輸送され、その後 target window 内の特定の位置にある C:G 対が T:A 対に編集される。これらの塩基置換酵素は、DddA-derived cytosine base editor (DdCBE) または TALE cytidine deaminase (TALECD) と呼ばれ、ヒトのミトコンドリア塩基置換酵素<sup>15</sup> を応用したものである。

Kang らは、葉緑体局在 DdCBE (cpDdCBE) をナタネとレタスのプロトプラストで一過的に発現させ、target window 内の C:G 対の置換頻度を次世代シーケンシング (NGS) によって調べた。NGS リードの最大 38% (レタス) および 11% (ナタネ) が置換型の塩基を呈した。また、レタスの再生シュートの葉緑体ゲノムで塩基置換を試み、NGS リードの最大 98.6% が置換型の塩基を呈した<sup>12</sup>。Li らは、cpDdCBE をコードするバイナリーベクターを作製し、これをアグロバクテリウム法を用いてイネのカルスの核ゲノムに導入した。再生シュートにおける target window 内の C:G 対の置換頻度を NGS で調べたところ、最大 97.5% のリードが置換型を呈した<sup>13</sup>。我々を含むグループは、葉緑体局在 TALECD (ptpTALECD) をコードするバイナリーベクターを作製し、これをフローラルディップ法<sup>16</sup> を用いてシロイヌナズナの核ゲノムに導入した。NGS 解析の結果、形質転換体 T<sub>1</sub> 世代と T<sub>2</sub> 世代の個体において target window 内の C:G 対が 100.0% 編集され、また一部の個体は葉緑体ゲノムにオフターゲット変異を持たないことが示された。ptpTALECD の発現を駆動するシロイヌナズナ RPS5A プロモーターが卵細胞や初期胚においても遺伝子発現を駆動すると報告されていることから<sup>17,18</sup>、T<sub>1</sub> 個体の発生初期段階で 100.0% の編集が達成された可能性がある。編集型のゲノムは T<sub>2</sub> 世代に安定遺伝し、その中には核ゲノムに ptpTALECD 遺伝子を持たない、いわゆるヌルセグリガントと考えられる個体も存在した<sup>10</sup>。ヌルセグリガントでは追加の塩基置換が導入されないため、その次世代 (T<sub>3</sub> 世代) は導入された塩基置換が表現型へ与える影響を解析するのに適している。

cpDdCBE および ptpTALECD は、T と A の 3' 側の C (以後それぞれ TC、AC と表記) を置換したが、G と C の 3' 側の C (それぞれ GC、CC) を置換できるかどうかは不明だった。ヒトのミトコンドリアゲノムにおいて、DdCBE が置換した C の大部分が T の 3' 側に位置し、AC、GC、CC の置換が容易ではないことが示唆されていた<sup>15</sup>。Mok らは DddA を *in vitro* 進化させ、元のバージョンと比較して塩基置換活性が高い改変型 DdCBE を作出した。DddA11 を有する改変型 DdCBE は、ヒトのミトコンドリアゲノムにおいて AC、CC、TC を置換することができた<sup>19</sup>。Nakazato らはこの研究に基づき、改変型 DddA11 (DddA11') を有する、改変版 ptpTALECD (ptpTALECD\_v2) を作製した。ptpTALECD\_v2 はシロイヌナズナの葉緑体ゲノムにおいて、GC、CC、TC、AC をホモプラスミック置換することに成功した。さらに、ptpTALECD\_v2 は ptpTALECD よりも target window 内の C:G 対をより効率的に置換した。その一方で、ptpTALECD\_v2 は ptpTALECD よりも葉緑体ゲノムにオフターゲット変異をより高い頻度で導入した<sup>11</sup>。Zhang らは DddA11 を有する改変型 cpDdCBE (TALE-DddA11) を用いて、イネのカルスの 3 つのうち 1 つでプラスチドゲノムの標的塩基置換に成功し、NGS リードの 96.5% が置換型のリードを呈した。また、TALE-DddA11 は GC、CC、TC を置換した<sup>20</sup>。以上をまとめると、cpDdCBE、ptpTALECD、ptpTALECD\_v2、TALE-DddA11 は葉緑体ゲノムの C:G 対をホモプラスミック置換することに成功した。また、ptpTALECD\_v2 は ptpTALECD と比べて塩基置換活性が高い上に GC や CC を置換しやすいという長所がある一方で、ptpTALECD よりも葉緑体ゲノムにオフターゲット変異を導入しやすいという短所もある。これらの酵素は、葉緑体ゲノムに導入した塩基置換と表現型との関係を調べるための強力なツールになることが期待される。

#### 4.1.2. ssDNA に作用する CD を用いた標的 C:G-to-T:A 塩基置換

ptpTALECD は、target window 内の特定の位置のシトシンを置換する傾向があるため<sup>11</sup>、標的塩

基のみが置換されるように TALE が結合する DNA 配列を設計できる場合がある。しかし、ptpTALECD と cpDdCBCE は、dsDNA の両方の鎖のシトシンを置換しうる<sup>10,12,13</sup>。Hu らは、dsDNA のうちの片鎖のシトシンを優先的に置換する塩基置換システムを開発した<sup>21</sup>。Cytidine Deaminase-Exonuclease-Nickase-TALE (CyDENT) と名付けられたこのシステムは 3 つのタンパク質が組み合わさって塩基置換が達成される。1 つ目のタンパク質は ssDNA に作用する CD、2 つ目は exonuclease、そして 3 つ目は TALE と融合した nickase (TALE-nickase) であり、いずれも N 末端側に CTP が付加されている。この酵素による塩基置換過程では、まず TALE-nickase が dsDNA の片鎖にニックを導入する。次に、exonuclease がニックの近傍のヌクレオチドを除去することで、ssDNA が生成すると、CD によってこの ssDNA 上のシトシンが置換される。Hu らは、葉緑体に局在する CyDENT (cpCyDENT) をイネのプロトプラストで一過的に発現させ、target window において複数のシトシンを片鎖優先的に置換した。NGS リードの最大 1.67% が置換型だった。cpCyDENT が 1 つのシトシンのみを置換し、また置換頻度を向上させることができれば、cpCyDENT は葉緑体ゲノム編集の強力なツールとなると考えられる。

イネの葉緑体ゲノムを編集するために、Wang らは CTP、TALE、ssDNA に作用する CD [hA3A-Y130F<sup>22</sup> または T<sub>Ad</sub>C<sup>23</sup>]、および DddA のバリエーション (DddA<sub>E1347A</sub>; 塩基置換活性を持たない) を順に繋げた単量体の塩基置換酵素を用いた<sup>24</sup>。この酵素は mTCBE または mTCBE-T と名付けられ、前者には hA3A-Y130F が、後者には T<sub>Ad</sub>C が含まれる (図 1C)。Cho らは、DddA が dsDNA をほどこくことで、ssDNA に作用する adenine deaminase TadA8e が作用できるようになると考察しており<sup>25</sup>、Wang らは DddA<sub>E1347A</sub> の働きによって同様に hA3A-Y130F や T<sub>Ad</sub>C が dsDNA へ作用できるようになると考えた<sup>24</sup>。Wang らは、mTCBE または mTCBE-T をコードするバイナリーベクターを作製し、これをアグロバクテリウムを介してイネのカルスの核ゲノムに導入した。T<sub>0</sub> 世代において

TALE 結合配列内部やその周辺の C:G 対が T:A 対に置換され、また mTCBE は mTCBE-T に比べて高い置換効率を示し、前者を導入したカルスでは、NGS リードの最大 81% が置換型を呈した<sup>24</sup>。

#### 4.2. 標的 A:T 対を G:C 対へ置換する技術

4 つのグループが、葉緑体ゲノム上の標的 A:T 対を G:C 対へ置換することに成功した<sup>24,26-28</sup>。これらのグループが用いた塩基置換酵素はいずれも、CTP、TALE、ssDNA に作用する adenine deaminase (TadA8e または T<sub>Ad</sub>AC)、DddA またはそのバリエーションを有する。Mok らは、TALED と呼ばれる二分子型の塩基置換酵素を開発した<sup>26</sup>。この酵素は、ヒトのミトコンドリアゲノムを編集するために用いられた酵素<sup>25</sup> を応用したものである。一方の分子は、CTP、TALE、二分片された DddA の C 末端側、TadA8e から構成され、もう一方の分子は、CTP、TALE、二分片された DddA の N 末端側から構成される。DddA は、TadA8e が dsDNA 上のアデニンを効率的に置換するために必要である<sup>25</sup>。Mok らは、葉緑体に局在する TALED をレタスのプロトプラストで一過的に発現させ、target window 内の A:T 対を置換することに成功した。次に、この酵素をコードするバイナリーベクターを構築し、シロイヌナズナの核ゲノムにフローラルディップ法で導入した。T<sub>1</sub> 世代において target window 内の A:T 対の置換頻度を NGS で調べたところ、最大 99.76% のリードで置換型の塩基が検出され、(ほぼ) ホモプラスミーが達成されたことが分かった。調べた T<sub>1</sub> 世代 5 個体のうち、葉緑体ゲノムでアレル頻度が 5% を超えるオフターゲット変異を持つものはいなかった。ホモプラスミックに編集された葉緑体ゲノムは T<sub>2</sub> 世代に遺伝し、その中には核ゲノムに TALED 遺伝子を持たない個体が含まれた<sup>26</sup>。Zhou らは、Cho らがヒトのミトコンドリアゲノムを編集するために開発した単量体型 TALED<sup>25</sup> を葉緑体ゲノムの塩基置換に応用した。この酵素は CTP、TALE、TadA8e、DddA<sub>E1347A</sub> から構成され、Zhou らはこの酵素を葉緑体局在単量型 TALEAD (mTALEAD) と名付けた。この酵素をコードするバイナリーベクターを作製し、シロイ



ヌナズナの核ゲノムに導入したところ、T<sub>1</sub>世代の形質転換体集団の約10%の個体でTALE結合配列周辺のA:T対が置換されたが、ホモプラスミック置換は0.98%の個体でしか検出されなかった。しかし、非ホモプラスミック置換が導入されたT<sub>1</sub>個体の次世代(T<sub>2</sub>世代)において、mTALEAD遺伝子が交配によって分離除去された30個体のうち14個体でホモプラスミック置換が検出された。これら14個体のうち3個体をNGS解析したところ、この塩基置換がNGSリードの100.0%で検出され、かつ葉緑体ゲノムでアレル頻度が5%を超えるオフターゲット変異は検出されなかった<sup>28</sup>。Wangらは、mTCABE-Tと呼ばれる単量体型の塩基置換酵素を開発した。この酵素はCTP、TALE、T<sub>AD</sub>AC、DddA<sub>E1347A</sub>から構成される。Wangらは、mTCABE-Tをコードするバイナリーベクターを作製し、イネの核ゲノムに導入した<sup>24</sup>。T<sub>AD</sub>ACは元々CRISPR/Casベースの塩基置換酵素で用いられ、ヒト核ゲノムでC:G対をT:A対に、またA:T対をG:C対に置換した<sup>23</sup>。mTCABE-TはT<sub>0</sub>個体の葉緑体ゲノムにこれら両方の塩基置換を導入し、C:G対からT:A対への置換はNGSリードの最大86%で、またA:T対からG:C対への置換は同最大61.8%で検出された。TALED、mTALEAD、mTCABE-Tは、A:T対からG:C対への置換だけでなく、C:G対からT:A対への置換も導入した<sup>24,26,28</sup>。Zhangらは、paired TALE adenine base editor\_v6 (pTABE\_v6)と呼ばれる二分子型の塩基置換酵素を用いて、イネ葉緑体ゲノムにおいてC:G対をT:A対へ置換することなく、A:T対をG:C対に置換することに成功した<sup>27</sup>。この酵素の一方の分子はCTP、TALE、TadA8e、二分割されたDddAバリエーション(DddA6)のC末端側半分から構成され、もう一方の分子はCTP、TALE、TadA8e、二分割されたDddA6のN末端側半分から構成される。DddA6はDddAよりも高いC-to-T塩基置換活性を有する<sup>19</sup>。Zhangらは、DddA6がpTABEに用いられた際に、植物の核ゲノムでA-to-G塩基置換を可能にすることを示した。彼らは、葉緑体局在pTABE\_v6をコードするバイナリーベクターを作製し、これをアグロバクテリウムを介してイネのカルスの核ゲノムに導入した。

12本の再生シュートのうち10本で塩基置換の有無をサンガー法により調べたところ、全てのシュートでtarget window内外においてA:T対がG:Cへ置換されていた。Target window内のA:T対の置換頻度をEditR webtool<sup>29</sup>で評価したところ、最大98%だった<sup>27</sup>。まとめると、TALED、mTALEAD、pTABE\_v6を用いて葉緑体ゲノムのA:T対をG:C対に(ほぼ)ホモプラスミック置換できることが明らかとなった。これらの塩基置換酵素は、C:G対をT:A対に置換する酵素と同様に、葉緑体ゲノムを改変するための強力なツールである。

## 5. おわりに

葉緑体ゲノム編集は、原理的には核ゲノムに遺伝子を導入できる植物種に適用可能であり、葉緑体ゲノムに関する基礎研究を加速させることが期待される。例えば、TALENは葉緑体DNA二本鎖切断後の修復機構の解明に役立つかもしれない。また、C-to-TまたはA-to-G塩基置換酵素を用いることで、未成熟終止コドン導入による遺伝子破壊、アミノ酸置換全380種類中64種類の置換、RNAやDNAの三次元構造変化、シスエレメントの改変が可能である。しかし、これらのゲノム編集方法で達成できるゲノム改変の種類は、葉緑体形質転換法によるものよりも少ない。例えば、葉緑体形質転換法は外来遺伝子をゲノムの狙った部位に導入すること[いわゆるgene targeting<sup>30</sup>]や、標的配列を正確に欠失させることができる<sup>31</sup>が、既存のゲノム編集技術ではこれらは達成できない。TALENを用いて葉緑体ゲノムの特定の配列を欠失させることは可能だが<sup>7</sup>、欠失する配列を正確に予測することは難しい。さらに、葉緑体形質転換法は遺伝子内の狙った塩基を任意の塩基に置換できるが、既存のゲノム編集技術は10-20 bpの範囲にある1~4つの塩基に4種類の変化を引き起こすことしかできない(CからT、GからA、AからG、TからC)。残りの8種類の塩基置換によって316のアミノ酸置換が可能となるため、これらの8つの塩基置換を引き起こす塩基置換酵素の開発が望まれる。



葉緑体ゲノムには種内レベルで一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) が存在し<sup>32,33</sup>、これらの SNPs は植物の成長や農業生産性等の表現型に影響を与えうる。しかし、葉緑体ゲノムは多くの植物種で母性遺伝し<sup>34</sup>、これらの種では特定の SNPs を有する個体を交配によって作出することができず、SNP 効果の検証が難しいため、そのような SNPs やアレルの同定が困難である。さらに、葉緑体ゲノムの全ての遺伝情報は連鎖するため、これらの SNPs やアレルが同定されたとしても、それらを交配によって集積や分離することはできない。これらの理由から、葉緑体ゲノムは作物育種に活用されてこなかったが、ゲノム編集技術、特に塩基置換技術は、優良 SNPs の同定に寄与し得るだけでなく、同定した優良 SNPs の他の品種や種への迅速な水平導入を可能にする。さらに、ゲノム中に外来 DNA を含まないヌルセグリガントは、日本などでは GMOs とは異なる規制枠組みに分類されており<sup>35</sup>、GMOs と比べて野外栽培に必要な遵守事項が少ないという利点がある。したがって、葉緑体ゲノム編集技術は、将来的に多くの国で葉緑体ゲノムを活用した作物育種の基盤技術になることが期待される。

## 謝辞

本解説記事執筆の機会をいただいた第 13 回年会シンポジウム 1 のオーガナイザーである名古屋大学の藤田祐一先生、山本治樹先生と、古本強先生をはじめとした本誌編集委員の方々に感謝いたします。本研究は JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2106 と科研費 22K06276 の支援を受けたものです。本稿の図の一つを作成してくれた稲津匡貴氏に感謝いたします。

Received Aug 27, 2024; Accepted Sep 26, 2024; Published Nov 10, 2024

## 参考文献

1. Daniell, H., Lin, C.-S., Yu, M. & Chang, W.-J. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biol* **17**, 134 (2016).
2. Zoschke, R., Liere, K. & Börner, T. From seedling to mature plant: Arabidopsis plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription are differentially regulated during leaf development. *The Plant Journal* **50**, 710–722 (2007).
3. Rascón-Cruz, Q. *et al.* Plastid transformation: Advances and challenges for its implementation in agricultural crops. *Electronic Journal of Biotechnology* **51**, 95–109 (2021).
4. Wang, Y., Wei, Z. & Xing, S. Stable plastid transformation of rice, a monocot cereal crop. *Biochemical and biophysical research communications* **503**, 2376–2379 (2018).
5. Maliga, P. Engineering the plastid and mitochondrial genomes of flowering plants. *Nature Plants* **8**, 996–1006 (2022).
6. Lao, N. T. *et al.* An Arabidopsis gene encoding a chloroplast-targeted  $\beta$ -amylase. *The Plant Journal* **20**, 519–527 (1999).
7. Huang, C.-H. *et al.* Repairing TALEN-mediated double-strand break by microhomology-mediated recombination in tobacco plastids generates abundant subgenomic DNA. *Plant Science* **313**, 111028 (2021).
8. Kwon, T., Huq, E. & Herrin, D. L. Microhomology-mediated and nonhomologous repair of a double-strand break in the chloroplast genome of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 13954–13959 (2010).
9. Sugimoto, H. *et al.* Plastid-targeted forms of restriction endonucleases enhance the plastid genome rearrangement rate and trigger the reorganization of its genomic architecture. *The Plant Journal* **102**, 1042–1057 (2020).
10. Nakazato, I. *et al.* Targeted base editing in the plastid genome of Arabidopsis thaliana. *Nature Plants* **7**, 906–913 (2021).
11. Nakazato, I., Okuno, M., Itoh, T., Tsutsumi, N. & Arimura, S. Characterization and development of a plastid genome base editor, ptpTALECD. *The Plant Journal* **115**, 1151–1162 (2023).
12. Kang, B.-C. *et al.* Chloroplast and mitochondrial DNA editing in plants. *Nature Plants* **7**, 899–905 (2021).
13. Li, R. *et al.* High-efficiency plastome base editing in rice with TAL cytosine deaminase. *Molecular Plant* **14**, 1412–1414 (2021).

14. Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A. & Liu, D. R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* **533**, 420–424 (2016).
15. Mok, B. Y. *et al.* A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. *Nature* **583**, 631–637 (2020).
16. Clough, S. J. & Bent, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal* **16**, 735–743 (1998).
17. Weijers, D. *et al.* An *Arabidopsis* Minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a RIBOSOMAL PROTEIN S5 gene. *Development* **128**, 4289–4299 (2001).
18. Maruyama, D. *et al.* Independent control by each female gamete prevents the attraction of multiple pollen tubes. *Developmental cell* **25**, 317–323 (2013).
19. Mok, B. Y. *et al.* CRISPR-free base editors with enhanced activity and expanded targeting scope in mitochondrial and nuclear DNA. *Nature Biotechnology* **40**, 1378–1387 (2022).
20. Zhang, D., Pries, V. & Boch, J. Targeted C•G-to-T•A base editing with TALE-cytosine deaminases in plants. *BMC Biol* **22**, 99 (2024).
21. Hu, J. *et al.* Strand-preferred base editing of organellar and nuclear genomes using CyDENT. *Nature Biotechnology* **42**, 936–945 (2024).
22. Ren, Q. *et al.* Improved plant cytosine base editors with high editing activity, purity, and specificity. *Plant Biotechnology Journal* **19**, 2052–2068 (2021).
23. Lam, D. K. *et al.* Improved cytosine base editors generated from TadA variants. *Nature Biotechnology* **41**, 686–697 (2023).
24. Wang, X., Fang, T., Lu, J., Tripathi, L. & Qi, Y. Broad range plastid genome editing with monomeric TALE -linked cytosine and dual base editors. *Plant Biotechnology Journal* **22**, 2441–2443 (2024).
25. Cho, S.-I. *et al.* Targeted A-to-G base editing in human mitochondrial DNA with programmable deaminases. *Cell* **185**, 1764–1776 (2022).
26. Mok, Y. G., Hong, S., Bae, S.-J., Cho, S.-I. & Kim, J.-S. Targeted A-to-G base editing of chloroplast DNA in plants. *Nature Plants* **8**, 1378–1384 (2022).
27. Zhang, D. & Boch, J. Development of TALE-adenine base editors in plants. *Plant Biotechnology Journal* **22**, 1067–1077 (2023).
28. Zhou, C., Okuno, M., Nakazato, I., Tsutsumi, N. & Arimura, S. Targeted A-to-G base editing in the organellar genomes of *Arabidopsis* with monomeric programmable deaminases. *Plant Physiology* **194**, 2278–2287 (2024).
29. Kluesner, M. G. *et al.* EditR: a method to quantify base editing from Sanger sequencing. *The CRISPR journal* **1**, 239–250 (2018).
30. Svab, Z., Hajdukiewicz, P. & Maliga, P. Stable transformation of plastids in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 8526–8530 (1990).
31. Allison, L. A., Simon, L. D. & Maliga, P. Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *The EMBO journal* **15**, 2802–2809 (1996).
32. Tang, J. *et al.* A comparison of rice chloroplast genomes. *Plant Physiology* **135**, 412–420 (2004).
33. Sabir, J. S. *et al.* Whole mitochondrial and plastid genome SNP analysis of nine date palm cultivars reveals plastid heteroplasmy and close phylogenetic relationships among cultivars. *PLoS one* **9**, e94158 (2014).
34. Zhang, Q., Liu, Y. & Sodmergen. Examination of the cytoplasmic DNA in male reproductive cells to determine the potential for cytoplasmic inheritance in 295 angiosperm species. *Plant and Cell Physiology* **44**, 941–951 (2003).
35. Sprink, T., Wilhelm, R. & Hartung, F. Genome editing around the globe: An update on policies and perceptions. *Plant Physiology* **190**, 1579–1587 (2022).
36. Nakazato, I. & Arimura, S. Genome editing in angiosperm chloroplasts: targeted DNA double-strand break and base editing. *The Plant Journal* tpj.17027 (2024) doi:10.1111/tpj.17027.
37. Arimura, S. & Nakazato, I. Genome editing of plant mitochondrial and chloroplast genomes. *Plant And Cell Physiology* **65**, 477–483 (2024).

## Updates in genome editing methods in the angiosperm chloroplast genome

Issei Nakazato<sup>1</sup>, Shin-ichi Arimura<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo



## 表紙の紹介

### 産業界における雑草成長抑制に向けた植物科学研究ニーズ

一般財団法人 電力中央研究所 サステナブルシステム研究本部 生物・環境化学研究部門  
橋田慎之介

工場立地法という法律をご存じだろうか？この法律は、緑地や環境施設を一定割合（20%以上）で工場内に設けることによって公害が発生しにくい体制を整え、周辺の生活環境の保全を図ることを目的としている。特定の条件に当てはまる工場に適用され、事業者は緑地管理に費用と労力をかけることが求められる。当然ながらこのコストは商品やサービスに反映される。本号表紙の植生土壌は簡便な施工で緑化が可能な資材だが、その後の維持管理の手間は変わらず、過繁茂や雑草の侵入、外部への拡散を防ぐためには従来通りの方法が必要となる。こうして、植物科学とは一見無関係に思える産業界でも、植物管理へのリソース投入が不可避であり、雑草の繁茂を防ぎつつ緑地を維持する「防草緑化」の実施が求められている<sup>1)</sup>。産業界では環境安全性を意識した技術ニーズが過剰ともいえるほど強く、この点で植物科学分野との密な連携は十分に進んでいるとは言い難い状況が長く続いている。さて、植物を枯れさせずに成長を抑制し、環境への影響を極力排除するためには、植物の光応答や温度感受性などを標的とした非接触型制御が候補とされる。これらを防草技術として社会に実装するには、どこからアプローチすれば良いのだろうか？特定の波長を利用した光制御や変動光制御などが、比較的応用の場面に近いと考えられる。

私たちのグループでは、エネルギー代謝に不可欠な Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) の、環境変動に応答した需要・供給バランス制御をメインテーマに研究を進めてきた<sup>2,3)</sup>。「NAD ワールド」と光合成との関連については、先に寄稿した解説も記したが<sup>4)</sup>、光化学系の電子受容体として重要な NADP<sup>+</sup>は、光依存的に NAD<sup>+</sup>から ATP を消費して供給される<sup>5)</sup>。さらに、光化学系が停止するとストロマの pH 制御と連動して NADP<sup>+</sup>は脱リン酸化されて NAD<sup>+</sup>に戻ることが明らかとなった<sup>6)</sup>。裏表紙に示したリーフディスクを用いた実験で、光のオン・オフに反応した NADP プールサイズの増減を繰り返し簡便に検出できるが、闇への反応は光への反応と比べて鈍感である。闇に対する反応が敏感過ぎると、せっかく合成した電子受容体をすぐに分解することになり、無益な ATP の消費サイクル (futile cycle) となってしまうので、鈍感性は変動光環境において有用な形質である。逆に言えば、futile cycle を積極的に誘導することで植物の成長を抑制できる可能性がある。私たちの経済活動の支障となる植物対策に光合成研究成果を積極的に活用し、今後の環境保全と産業の両立に寄与する手段とするのはいかがだろうか。

#### 参考文献

1. 伊藤操子 (2009). *草と緑* **1**, 6-9.
2. Hashida *et al.* (2009). *Ann. Bot.* **103**, 819–824.
3. Hashida & Kawai-Yamada (2019). *Front. Plant Sci.* **10**, 960.
4. 橋田慎之介 (2020). *光合成研究* **30**, 176–187.
5. Hashida *et al.* (2018). *Plant J.* **95**, 947–960.
6. Fukuda *et al.* (2023). *Nat Commun* **14**, 7148.

## 若手の会特別企画：若手研究者のキャリアパスレポート！

### 第 19 回「チェコでの研究生活」

Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Centre Algatech

鶴巻 達大

はじめに、コロナウイルスの流行により延期されていた東京オリンピック後、2021年9月にチェコ共和国の現職に移りました。この3年間で感じたことを主観的にレポートします。同じ研究所に在籍されていた増田貴子博士の海外留学レポート（2022年8月号）も併せて読んでいただくと、より一層私の滞在している研究所について知っていただけます。本記事では、私がチェコでどのように生存しているか、仕事と私生活の両方で感じ取って頂ければ幸いです。

#### きっかけ

私が現職に就いたきっかけは、当若手の会が2020年に開催されたオンラインセミナーでした。そのセミナーで、当時ポスドクを探されていた増田さんに出会い、思い切って連絡をし、現在のポストである Ondřej Prášil 博士（写真2）を含めた3名での面接の後、採用していただきました。自分からポストを取りに行くというのは初めての経験だったので、とても躊躇していたのを覚えています。ですが、「日中に光合成をして夜間に窒素固定をする単細胞シアノバクテリア」に心惹かれたのが一番の原動力でした。

#### チェコでの研究生活

現在の研究は、先に述べた単細胞性窒素固定海洋シアノバクテリア *Crocospaera* の遺伝子組み換え技術の確立と窒素固定メカニズムの分子レベルでの解明です。修士課程でシアノバクテリアと生物時計に触れて以来、時間によって光合成と窒素固定を切り替える *Crocospaera* は、いわば私にとって究極のモデル生物でした。が、一般に海洋シアノバクテリアは無菌純粋培養化、寒天による平板培養が困難…。それまで *Synechocystis* sp. PCC 6803 や *Synechococcus elongatus* PCC 7942 しか扱ったことがなかったため、未知との遭遇かつ大層な言い方をすれば生物学研究史そのものにぶち当たった感覚でした。

解決策として、所内の人たちと、その職位にかかわらずとにかく話をすることにしました。チェコ人はもちろん他ヨーロッパ圏の国々、メキシコ、インド等、インターナショナルですが国籍は全く関係なく、話好きな人が多いのは救いです（日本人は私のみ）。Algatech（写真1）には大きく5つのグループがあり、それぞれ分野は異なりますが、Algatech の名の通り光合成生物を扱っているため、理解しあうことは難しくないと感じています。また、研究所全体で共同研究を始める敷居が低い点も良いところだと感じています。例えば、光合成細菌グループの Michal Koblížek 博士および Jürgen Tomasch 博士と共に研究する機会を得られているのは、シアノバクテリアしか扱ってこなかった私にとってかけがえのない経験になっています。執筆段階では、上記問題点および遺伝子組み換えは完全に解決したわけではありませんが、研究所内の繋がりをもって日々新しいことを吸収できるのはとても恵まれていると感じます。



図 1. Algatech 外観

建物左上にはイカダモ (*Desmodemus*) のモチーフ。

しかし、チェコ国内には光合成学会のような国内学会がありません。代わりに、ヨーロッパ内の学術集会やヨーロッパ開催の国際学会に参加する機会を得られるのは言うまでもありません。ただし、そういった集会は数年おきの開催なので毎年情報交換ができないのは歯痒くも思います。また、日本の方々とお会いする機会も減っているのは残念に思います…。日本人研究者とお会いする件に関しては、ドイツマックスプランク研究所の横山諒さんにご紹介いただき年に一度ヨーロッパ在住植物研究者とオンラインミーティングに参加させていただいています。

研究環境について、到着して最初に驚かされたのはその充実した設備です。私のボス Ondřej Prášil 博士はクロロフィル蛍光の専門家で、ラボ内には手作りの装置がいくつもあります。光合成測定装置でご存じの方も多いたと思いますが、チェコ国内 Brono に拠点を構える Photon System Instruments 社との繋がりも深くラボ内には Multi-cultivator や Bioreactor が数台あります。他のグループには、共焦点レーザー顕微鏡、質量分析、HPLC、ガスクロマトグラフィー、屋外培養装置等、とにかく充実した機器たちとそのエキスパートが常駐しています。このエキスパートの常駐は、日本の大学ではあまり一般的ではないかと思えます。さらには、所内に Workshop (工作室) がありそこにもエキスパートが常駐しているので、何か自作したいときはお願いすることができます。



図 2 現ボス Ondřej Prášil 博士と到着後の研究所パーティーにて

### 生活面では

今でも全くホームシックを感じていません。私自身、博士課程のときにフィンランドの Taina Tyystjärvi 博士のラボに 1 月半滞らせていただいた経験があり、外国で生活することは今でも苦ではありません。郷に入っては郷に従え、を全うできていると思います。ただし、3 年経つ現在寂しく思うことは日本で食べられる海産物がないことです。チェコは内陸の国なので、スーパーマーケットに行っても手に入る海産物は、エビ、サーモン、白身魚です。日ごろ、お肉を使って日本食のようなものを作って生活しています。魚類に関して、私のいる Třeboň は湖 (写真 3) を使った鯉の養殖の町で、チェコのクリスマス伝統料理を支えています。日本で食べたことがなかった鯉を楽しむのは、魚が恋しくなったときの楽しみです。

外国で生活して感じるのは日本という国がどれだけ恵まれていて、かつ極東の島国であることを思い知りました。例えば、コンビニなんてものはありませんし、友人と歴史や文化の話をしていてもお互い共感できることはほとんどありません。後者に関しては、だからこそお互いの違いを知ることは楽しいですし、EU というまとまりを感じる側面もあります (例えば国が違っても、ある程度、共通の歴史に対する知識)。

### 博士課程進学を迷っている方へ (少しポストドク留学についても)

チェコに来て最も衝撃を受けたのは、博士課程の学生も給料を貰っていることです。おそらく、日本で博士課程進学を迷われている学生の皆さんはその理由の大半が経済面だと思います。私が耳にしている限り、チェコのみならずヨーロッパでは大学は学費無料、博士課程も学費無料で給料がもらえます。これは、ボスの研究費で雇われるためです。ただし、博士課程進学には面接があって、他の候補者との競争になります。さらには、ブランク、つまり修士課程卒業後企業に就労していたとしても採用され得ます。以上のことを踏まえて、博士取得後にアカデミックに残る云々はさておき (むしろずっと残りたいと意思を示す学生は少数)、博士課程で自分の興味とマッチする研究に没頭したい方にはとても良い選択肢なのではないかと考えます。もちろん、ある程度の英語力は必要になりますが、経済的な理由で情熱を捨てるのはもったいないと感じます。少なくとも、私はヨーロッパのそのような制度を知りませんでしたし、日本の研究室でやりたい研究があったことが第一にあったので進学しました。執筆段階では、諸々、まったく胸を張って言えない個人的状況ですが、可能性はあります。諦める前に、探してみるのはいかがでしょうか？

私の研究所に限って言えば、ポスドクを探しているケースをよく見ます。海外学振やマリーキュリーなど自分でグラントをとって来るのがベストですが、もしタイミング (PI のグラント獲得) が合えばポスドク留学に来るのはいかがでしょうか？

#### 最後に

私個人の“感覚”的なレポートになって恐縮ですが、Algatech での研究生活はとても充実しています。不確定要素の多い研究に四苦八苦していますが (情報提供お願いします)。博士課程進学やポスドク留学の選択肢を広げる一情報源になれば幸いです。



図 3. Algatech 横の湖、お気に入りの 1 枚 (2021)



## 報告記事

### 光合成学会 若手の会 第 29 回セミナー開催報告

神戸大学 先端バイオ工学研究センター  
田中 謙也

2024 年 3 月 16 日に神戸国際会議場にて、第 41 回植物生理若手の会に共催という形で第 29 回光合成若手の会セミナーを開催しました。オンサイトでは 60 名近くの方にご参加いただきました。植物生理若手の会と光合成若手の会とのコラボ企画という強みを活かして、若手研究者の新たな交流を生み出せるような会となりました。今回のセミナーでは、4 名の演者に「キャリア選択を支えた研究ネットワークワーキング」というテーマに関してご講演いただきました。

新潟大学の岡田萌子助教のご講演「フットワークは軽くてなんぼ！」では学会や研究会への参加を通じて留学や共同研究の実現につながったエピソードをご紹介いただきました。茨城大学の小林優介助教のご講演「博士課程、皆で渡れば怖くない」では、アカデミアでの就活や地方大学の選考で重要な事柄などについて貴重な話を伺うことができました。大阪公立大学の吉原晶子さんのご講演「やって良かったと思うこと～研究生活 5 年間の人脈形成の視点から～」では、学部時代から国際学会に勇気を出して参加したエピソードなど、多くの学生がエンカレッジされるお話をさせていただきました。奈良女子大学の清水隆之准教授のご講演「D&I とどう付き合うか」では、これまで多くの先生方にどのように支えられ、その後に繋がったのか紹介いただき、人生における縁と感謝の大切さをご教授いただきました。全体を通じて、今後の激動の時代を生き抜く上でも普遍的なエッセンスを参加者全員で共有できたのではないかと思います。お忙しい中ご講演していただいた発表者の方々に、改めまして感謝申し上げます。

最後になりましたが、共催させていただいた植物生理学会若手の会の平田 梨佳子さん、磯田 珠奈子さん、伊藤 岳洋さん、山本 千莉さん、一緒に世話人をしてくださった今泉 滉さんに今一度お礼申し上げます。



第 41 回植物生理若手の会（共催 光合成若手の会第 29 回セミナー）参加者の皆様

## 報告記事

## 第 30 回 光合成学会若手の会セミナーの開催報告

神戸大学大学院 農学研究科  
嶋川 銀河

6月1日(土)に第30回光合成若手の会セミナーを開催しました。今年は9月にアジア・オセアニア国際光合成会議が神戸で開催される都合上、例年通りの時期に本会が開かれなかったため、多くの方々にとって良い交流の機会を提供できたのではないかと思います。セミナーは、関東会場(東京大学駒場キャンパス)と関西会場(神戸大学六甲台キャンパス)をオンラインで繋いだサテライト形式で行い、計95名(関東会場23名、関西会場38名、オンライン34名)の方がご参加くださいました。また参加者の半数以上を学生が占めており、セミナーから懇親会に至るまで実に「若手の会らしく」大盛り上がりでした。

セミナーの内容として、今回は「光合成によるバイオものづくり」をテーマに基礎から応用に至る様々な領域でご活躍される方々にご講演いただきました。蓮沼誠久先生(神戸大学)からはまさにバイオものづくり研究の最前線を彩る多岐にわたる研究成果・開発技術をお話いただき、金本昭彦さん(オーピーバイオファクトリー株式会社)からは、研究で得られた成果を如何にして事業化へ結びつけるかのプロセスをかなり具体的に拝聴することができました。また玉木峻さん(理化学研究所)、村田智志さん(東京農工大学)、田畑裕さん(東京大学)、野崎翔平さん(筑波大学)、山本遥香さん(関西学院大学)は、ユーグレナのゲノム編集や珪藻のオイル生産、ホルモース反応、窒素利用に係る転写因子など、それぞれのご専門分野と研究成果を本セミナーのテーマと紐づけて大変わかりやすく話してくださいました。僕自身、光合成研究の先にある応用展望を考え直すきっかけにもなり、大変勉強させていただきました。お忙しいなか今回ご講演を引き受けてくださった演者の方々には、この場をお借りして改めて感謝申し上げます。また、世話人としてセミナーの開催に中心的に貢献してくださった三宅敬太さん(東京大学)と田中謙也さん(神戸大学)へ改めてお礼申し上げます。

## 報告記事

### 光合成学会 若手の会 第30回セミナーに参加して @関東会場

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 修士2年  
土田 康太

2024年6月1日(土)に開かれた光合成学会若手の会 第30回セミナーに参加させていただきました。関東会場と関西会場の二会場を繋いだサテライト形式で行われ、私は関東会場での参加をさせていただきました。若手の会への参加は初めてであり、若手研究者の方々のセミナーや同世代の学生の皆さんとの交流は大変刺激を受けました。

今回のセミナーのテーマは光合成研究をいかに応用に結びつけるかという内容が印象的でした。特に、金本さん(オーピーバイオファクトリー株式会社)がご講演いただいた微細藻類パロバの探索から商品化までのお話は、実験的な技術の高さに加えて、商業的な目線からも戦略的に事業を進めており、研究からお金を生み出すことの実例を学ぶよい機会になりました。また、普段ラボスケールでの研究を行っている身としては、実用化を目指したスケールアップの工夫や苦勞の話は新鮮に感じ、ラボでの研究の段階から実装を想定した計画を立てることの重要性を感じました。加えて、田畑さん(東京大学)や野崎さん(筑波大学)のセミナーでは、二酸化炭素からの糖生成や窒素固定への転写因子の機構といった一般の人が利用するにはまだ時間がかかるものの将来性を感じる研究について、発展を描きながらお話しただけでした。学会などの研究内容を細かく知る機会とは異なり、研究分野が描く未来像を知る機会となり、自身の研究分野の発展を考えるきっかけになりました。

懇親会では、同世代の学生と交流を持つ機会にも恵まれました。自分と同年の相手と専門的な研究の話をするのができ、自分ももっと研究を頑張ろうという意欲が湧きました。また、学振の申請書などの学生ならではの苦勞を共有することができ、この大変さは自分だけのものではなかったのだと安心する場面もありました。

このように光合成学会若手の会ではさまざまな良い経験を得ることができました。今回のセミナーを開催して下さった関係者様方、セミナーへ参加された方々、大変感謝申し上げます。



関東会場での集合写真



## 報告記事

## 光合成学会 若手の会 第30回セミナーに参加して @関西会場

大阪大学大学院 工学研究科 博士前期課程1年  
藤田 雄也

2024年6月1日に光合成学会若手の会、第30回セミナーが開催されました。私は、神戸大学六甲台キャンパスで開催された関西支部のセミナーに参加しました。本セミナーは、関東・関西同時開催のサテライト形式で行われ、「バイオモノづくり」に関する研究を行うPIの先生方や大学院生、企業研究者の方によるご講演があり、光合成分野における最先端の応用研究について知ることができました。関西会場では、海洋珪藻由来の油脂を用いた航空燃料(SAF)開発に取り組まれている東京農工大の村田智志先生、微生物や藻類を用いた有用物質の大量合成に取り組まれている神戸大学の蓮沼誠久先生といった、日本のバイオモノづくりをリードする先生方のご講演を拝聴することができ、大変貴重な経験を得ることができました。また、有用な微細藻の探索や大量培養による供給安定化に力を入れているオーピーバイオファクトリー株式会社の金本昭彦様のご講演を拝聴し、食品や化粧品などへの応用からブランドイメージの構築について学ぶことができました。

中でも、蓮沼先生と株式会社島津製作所が共同で開発している「自律型実験システム」には、システムの特徴に興味を持ちながらも、自分より優秀なシステムができるのではないかと感じる場面もありました。昨今、AIの急速な成長に伴い、膨大なデータベースを駆使して応用研究を進めていくためのアイデアが求められる中、自律化実験システムは非常に効果的な例だと感じました。また、このシステムを駆使することで、食料やエネルギーといった資源の枯渇問題にアプローチし、一人でも多くの生命を救える社会に期待したいと強く思いました。その中で、AIを活用し、自分ならどう貢献できるかを考えるための良い機会になりました。

またセミナー後の懇親会においても、研究だけでなく、趣味や思い出話に華を咲かせることができました。光合成学会の若手会は、年代問わず気軽に交流でき、次世代の光合成研究を担う、言わば一つの「チーム」として活動している会だと思っているため、今後のセミナーにも参加し、人一倍光合成研究を楽しんでいきたいです。最後になりますが、本会を開催していただきました鳴川銀河先生、田中謙也先生、三宅敬太先生、また関係者の皆様に心から感謝申し上げます。



関西会場での集合写真



## 集会案内

### 藍藻の分子生物学 2024 の開催案内

第 14 回目となる「藍藻の分子生物学 2024」を 12 月 13 日(金)、14 日(土)の二日間にわたり、かずさ DNA 研究所近くの「かずさアカデミアホール」で開催します。

期日: 令和 6 年 12 月 13 日(金) 13 時から 19 時 40 分、14 日(土) 9 時から 16 時まで

場所: かずさアカデミアホール(〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足 2-3-9)

(<http://www.kap.co.jp/hall/>)

開催の趣旨: 本研究会は、1996 年に藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の全ゲノム配列情報が決定されたのを契機として開始した研究会です。これまでの経緯についてはホームページに記載されていますのでご参照ください。<https://photosynthesis.jp/cyano/index.html>

主催: 公益財団法人かずさ DNA 研究所(<https://www.kazusa.or.jp/>)

内容: 1. 招待講演者による口頭発表

2. ポスター発表

3. ミキサー

申込: 参加・発表申し込み締め切り 令和 6 年 11 月 1 日(金)

研究会費: 一般 3,000 円、学生 1,000 円

申し込み・問い合わせ先: 渡辺智、榎本元 (東京農業大学)

(E-mail: [s3watana@nodai.ac.jp](mailto:s3watana@nodai.ac.jp), Tel: 03-5477-2375)

Google forms (<https://forms.gle/Y6CBtAKewQKf4TDUA>)よりお申し込みください。

下記、QR コードからアクセスできます。



## 事務局からのお知らせ

### ★発行回数の変更

本年から4月と10月の年2回発行と変更になっております。ご承知おきください。

### ★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(ゼロイチキュウと入力)、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（[awai.koichiro@shizuoka.ac.jp](mailto:awai.koichiro@shizuoka.ac.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。



## 日本光合成学会会則

### 第1条 名称及び所在地

本会は日本光合成学会（The Japanese Society of Photosynthesis Research）と称する。会の住所を会長の所属所在地とする。

### 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、学術誌の発行などの事業を行う。

### 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

本会の運営のため、幹事をおく。幹事任期は4年とする。幹事の再任は妨げない。

#### 3. 編集委員会

本会の発行する学術誌の編集のため編集委員会を置く。編集委員会については別に定める。

#### 4. 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。

#### 5. 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。

#### 6. 事務局

事務局をおき、本会の会計事務、サーバー管理および名簿管理を行う。

#### 7. 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。

#### 8. 選挙管理委員会

本会の選挙を公正に実施するため、選挙管理委員会を置く。選挙管理委員会については別に定める。

#### 9. 関連組織

学会に、光合成に密接にかかわる関連組織を置くことができる。関連組織については別に定める。

### 第6条 総会

#### 1. 招集・構成・議長

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. 報告事項

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. 承認事項

幹事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。

第5 本会則の改正を平成30年5月27日から施行する。

第6 本会則の改正を令和3年5月29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宰者である等、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。

日本光合成学会役員選出に関する申し合わせ

平成27年5月27日 幹事会

平成30年5月26日 幹事会

1. 選挙管理委員会

本会の選挙を公正に実施するため、選挙管理委員会を置く。選挙管理委員2名は常任幹事会が幹事会に推薦し、決定する。選挙管理委員の任期は2年とし、再任を妨げない。選挙管理委員の互選により委員長を選出する。

2. 会長 [会則第5条第6項]

(1) 幹事および常任幹事による若干名の候補者の推薦方法

幹事は、会長選挙に推薦する候補者としてふさわしい会員を3名連記で投票する。投票結果が上位の会員について、常任幹事会は、本人の意向を確認した上で、若干名を推薦候補者として決定する。選挙事務は事務局長が執り行う。

(2) 会長選挙

会長選挙の実施に当たっては、会員に推薦候補者を提示し、全会員による単記無記名投票を実施する。最高得票者を、次期会長とする。得票数が同数の場合は、抽選により決定する。選挙事務は選挙管理委員会が執り行う。

## 「光合成研究」 投稿規定

### 総則

1. 「光合成研究」(本報)は光合成に関連する諸分野における記事を掲載する。投稿論文として下記の3つのタイプを受け付ける。  
「解説」: 国際学術誌などに発表された該当分野の研究に関して近年の動向をより網羅的に広い視点で紹介する総説  
「トピックス」: 国際学術誌などに発表された研究内容で「解説」より狭い範囲の研究に焦点を当て紹介する総説  
「研究紹介」: 国際学術誌などの専門誌に掲載された原著論文の研究内容を原著論文の筆者が紹介する記事
2. 1年に2回(4月、10月号)冊子体として発行し、電子版を光合成学会のホームページ上に公開する。
3. 原稿がE-mailにおいて受付処理をされた日を以て受付日とし、編集委員が掲載可と判断した日を採択日とする。ただし原稿が本規定に合わない場合受け付けないことがある。
4. 投稿された原稿について、編集委員会は査読の可否を判断する。査読可と判断された原稿については、編集委員が適切な査読者を選んで査読を依頼し、査読結果に基づいて編集委員が掲載の可否を判断する。編集委員会が不適切と判断した場合には、査読なしで投稿された原稿を却下することがある。
5. 過去に査読を受けて掲載不可と判断された原稿を改訂して再投稿する場合には、編集委員と査読者宛に、各査読コメントを改訂稿にどのように反映したか、また反映しなかった場合はその理由を明確に記載し、投稿する原稿に添付する必要がある。
6. 掲載論文の著作権(冊子体および電子版)は日本光合成学会に属する。
7. 図やそこで使われる写真が過去論文として発表したものもしくは発表されたものであった場合は、それらの著作権問題を著者ら自身でクリアする必要がある。
8. 投稿に当たっては、全ての著者が投稿に同意し、かつ原稿の内容について責任を持たなければならない。また、全ての著者は代表著者が全著者を代表して原稿の掲載に関する事項を執り行うことに同意するものとする。

### 一般的事項

- (1) Microsoft Word ファイルを基本とする。字数制限は設けないが、「解説」はA4サイズ6~8ページ、「トピックス」、「研究

紹介」は4ページ程度を目安にする。1

ページ当りの文字数は、図表を含めて1800字程度。日本語はMS明朝、英数字はTimes New Roman とする。

- (2) 本文の最初に、日本語および英語での論文題名、著者所属機関名、氏名を記載する。
- (3) 句読点は「、」「。」に統一する。
- (4) 300字程度の日本語要旨を作成すること。
- (5) 参考文献、表、図のキャプションは、本文の後ろにつける。
- (6) 本文中に図の大体の位置を指示する。(図を貼り付けてもよい。)

### 参考文献

- (1) 参考文献は、本文中の該当箇所に、右上付きで、1、1,2、1-3のように示す。
- (2) 参考文献の表記は下記のとおりとする。著者が5名を超える際は、筆頭著者を記載しそれ以降の著者はet al.とすること。

### 雑誌例

1. Berthold, D. A., Babcock, G. T. & Yocum, C. F. A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. EPR and electron-transport properties. *FEBS Lett.* **134**, 231-234 (1981).
2. Nanba, O. & Satoh, K. Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome *b*-559. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 109-112 (1987).

### 書籍例

3. Diner, B.A. & Babcock, G.T. In *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (eds Ort, D.R. and Yocum, C.F.) 213-247 (Kluwer, 1996)

### 図/写真

- (1) 図、写真はグレースケールでも良い場合には、グレースケールで作成する。カラーの図や写真を希望する場合には、カラーの図や写真を送付すること。図や写真の枚数によっては、編集委員会との相談により、PDF版ではカラーになるが、冊子体ではグレイになる場合がある。
- (2) jpg あるいは tiff 形式等で本文とは別ファイルとして送付すること。解像度は300 dpi程度とする。

日本光合成学会「光合成研究」編集委員会  
2023年1月11日改訂

## 幹事会名簿

秋本 誠志	神戸大学大学院理学研究科	高橋 裕一郎	岡山大学異分野基礎科学研究所
浅井 智広	中央大学理工学部	高林 厚史	北海道大学低温科学研究所
栗井 光一郎	静岡大学学術院理学領域	田中 歩	北海道大学低温科学研究所
池内 昌彦	東京大学大学院総合文化研究科	田中 寛	東京工業大学化学生命科学研究科
石北 央	東京大学大学院工学研究科	田中 亮一	北海道大学低温科学研究所
泉井 桂	近畿大学生物理工学部生物工学科	谷口 光隆	名古屋大学大学院生命農学研究科
伊藤 繁	名古屋大学	民秋 均	立命館大学総合理工学院
井上 和仁	神奈川大学理学部	田茂井 政宏	近畿大学農学部生物機能科学科
伊福 健太郎	京都大学大学院農学研究科	都筑 幹夫	東京薬科大学生命科学部
梅名 泰史	名古屋大学シンクロトロン光研究センター	寺内 一姫	立命館大学生命科学部
		寺島 一郎	東京大学大学院理学系研究科
得平 茂樹	東京都立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
大岡 宏造	大阪大学大学院理学研究科	輅 達也	東京理科大学理学部
大友 征宇	茨城大学理学部	永島 賢治	神奈川大学
大政 謙次	東京大学大学院農学生命科学研究科	長尾 遼	静岡大学農学部
小川 健一	岡山県農林水産総合センター生物科学研究所	成川 礼	東京都立大学大学院理学研究科
		南後 守	大阪公立大学大学院理学研究科
小口 理一	大阪公立大学大学院理学研究科	西田 生郎	埼玉大学大学院理工学研究科
小俣 達男	名古屋大学大学院生命農学研究科	西山 佳孝	埼玉大学大学院理工学研究科
菓子野 康浩	兵庫県立大学理工学部	野口 航	東京薬科大学生命科学部
柏山 祐一郎	福井工業大学環境情報学部	野口 巧	名古屋大学理学研究科
加藤 裕介	摂南大学農学部	長谷 俊治	大阪大学蛋白質研究所
金井 龍二	埼玉大学	華岡 光正	千葉大学大学院園芸学研究科
神谷 信夫	大阪公立大学複合先端研究機構	原 登志彦	北海道大学低温科学研究所
木下 俊則	名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所	彦坂 幸毅	東北大学大学院生命科学研究科
		久堀 徹	東京工業大学研究院化学生命科学研究科
熊崎 茂一	京都大学大学院理学研究科	日原 由香子	埼玉大学大学院理工学研究科
栗栖 源嗣	大阪大学蛋白質研究所	広瀬 侑	豊橋技術科学大学環境生命工学系
小池 裕幸	中央大学理工学部	藤田 祐一	名古屋大学大学院生命農学研究科
小林 康一	大阪公立大学高等教育推進機構	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	牧野 周	東北大学大学院農学研究科
坂本 亘	岡山大学資源植物科学研究科	増田 真二	東京工業大学生命理工学院
佐賀 佳央	近畿大学理工学理学科	増田 建	東京大学大学院総合文化研究科
櫻井 英博	早稲田大学	松浦 克美	東京都立大学都市教養学部
鹿内 利治	京都大学大学院理学研究科	松田 祐介	関西学院大学理工学部
篠崎 一雄	理化学研究所植物科学研究センター	真野 純一	山口大学農学部
嶋田 敬三	東京都立大学	皆川 純	基礎生物学研究所
清水 隆之	奈良女子大学研究院自然科学系	宮尾 光恵	東北大学大学院農学研究科
下嶋 美恵	東京工業大学生命理工学院	宮下 英明	京都大学大学院地球環境学学
沈 建仁	岡山大学異分野基礎科学研究所	宗景 (中島) ゆり	関西学院大学生命環境学部
杉浦 美羽	愛媛大学プロテオサイエンスセンター	村田 紀夫	基礎生物学研究所
杉田 護	名古屋大学大学院情報学研究科	本橋 健	京都産業大学総合生命科学部
鈴木 祥弘	神奈川大学理学部	本橋 令子	静岡大学学術院農学領域
園池 公毅	早稲田大学教育学部	山本 義治	岐阜大学応用生物科学部
高市 真一	東京農業大学生命科学部	矢守 航	東京大学大学院農学生命科学研究科
高橋 俊一	琉球大学熱帯生物圏研究センター	和田 元	東京大学大学院総合文化研究

## 編集後記

9月には神戸で第2回アジアオセアニア光合成学会が、日本光合成学会年会と共同で開催されました。私は助手になりたての頃に3ヶ月ほどオーストラリア国立大学に滞在したことがあるのですが、その時に同じ研究室に所属した研究者たちと再会することができました。それぞれに歳をとりましたが、場所を変え研究を続けていたのですね。久しぶりの再会にどうしているのかと話が咲きました。今回の会議の前には、フィンランドでも光合成に関する国際的な会議が開催されていたので、多くの先生方は出張続きで大変だったと伺いました。本格的にコロナ禍が終わったなと思います。次回のアジアオセアニア光合成会議はオーストラリアであるそうです。ぜひ参加をご検討ください。

2024年のノーベル賞は、microRNAとAI ChatGPTと $\alpha$ -foldの開発に対してでした。AIによるDeep Learningは研究の手法を確かに大きく変えそうです。前回の表紙は、水分解の様子をコマ送りで観察したという仰天のNature論文を画像化したものでした。今回は、その表紙解説とともに、今号の特集では「光合成における最新技術と発見」と題して、X線画像撮影の最先端の状況を解説していただきました。また、有村先生のオルガネラゲノムの編集方法についても解説いただきました。今後、葉緑体ゲノムの改変によって新しい知見が見出されると期待されます。

「光合成研究」では、研究紹介や解説記事を随時受け付けておりますので、奮ってご投稿ください。また表紙の写真や絵も募集しておりますので是非ご投稿ください。みなさまに様々な話題をお届けできるよう努めてまいります。本誌に関するご意見やご要望がございましたらご連絡ください。

編集長・古本 強 (龍谷大学)

## 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：最近刊行された研究成果の紹介。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、編集長の古本 (tfurumoto@agr.ryukoku.ac.jp) までご連絡ください。



「光合成研究」編集委員会

編集長 古本 強 (龍谷大学)  
編集委員 高橋 俊一 (琉球大学)  
編集委員 小口 理一 (大阪公立大学)  
編集委員 河合 (久保田) 寿子 (山形大学)

---

日本光合成学会 2024年度役員

会長 沈 建仁 (岡山大学)  
事務局長 栗井 光一郎 (静岡大学)  
事務局 高林 厚史 (北海道大学) IT担当  
常任幹事 増田 真二 (東京工業大学) 光生物学協会  
常任幹事 彦坂 幸毅 (東北大学)  
常任幹事 野口 航 (東京薬科大学)  
常任幹事 古本 強 (龍谷大学) 編集長  
常任幹事 鹿内 利治 (京都大学)  
常任幹事 皆川 純 (基礎生物学研究所)  
常任幹事 栗栖 源嗣 (大阪大学)  
常任幹事 小口 理一 (大阪公立大学)  
常任幹事 広瀬 侑 (豊橋技術科学大学) WEB担当  
常任幹事 西山 佳孝 (埼玉大学)  
常任幹事 園池 公毅 (早稲田大学)  
  
会計監査 杉浦 美羽 (愛媛大学)  
選挙管理委員 野口 巧 (名古屋大学) ・ 三野 広幸 (名古屋大学)

---

光合成研究 第34巻 第2号 (通巻99号) 2024年11月10日発行

日本光合成学会

〒700-8530 岡山市北区津島中 3-1-1

岡山大学 異分野基礎科学研究所 沈建仁 研究室内

TEL : 086-251-8502

FAX : 086-251-8502

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 (ゼロイチキュウと入力)、当座、0730290

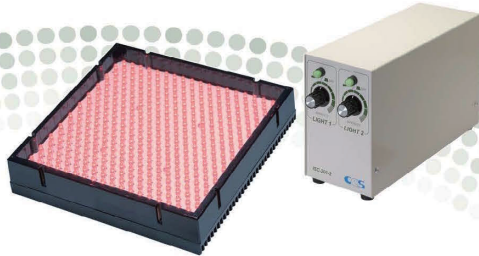
名前 : ニホンコウゴウセイガッカイ

---

# LED光による植物育成・研究支援機器

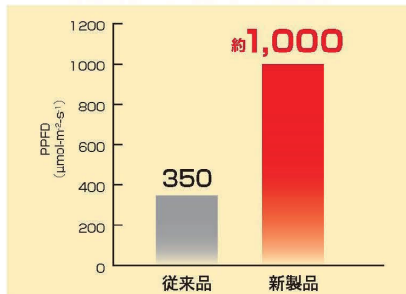
ISシリーズ

## 高光量モデル 新登場



赤色パネルの光量を従来比約3倍に大幅アップ!

光合成量子束密度(PPFD)比較



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)

さらなる革新で  
光合成測定は変わります

**NEW LI-6800**  
植物光合成総合解析システム

- 野外でも屋内でも安定制御環境下で植物の光合成測定。
- ガス交換とクロロフィル蛍光の同時測定により、わかることがあります。
- 葉温度と湿度、CO<sub>2</sub>濃度、光強度を広範囲で自在コントロールし光合成測定。
- 高速での安定環境制御を実現した革新設計。
- シンプルな操作で、どなたでも簡単測定。

従来装置(LI-6400シリーズ)からの  
改良点

チャンバー内湿度自動制御: 相対湿度0~90℃  
 葉温度での広域温度制御: 外気温±10℃  
 直感的操作が可能な、大型カラータッチスクリーン

**meiwafosis.com**  
メイワフォーシス 株式会社

東京 TEL (03)5379-0051(代) FAX (03)5379-0811  
 〒160-0022 新宿区新宿1-14-2 KI邸苑前ビル

名古屋 TEL (052)686-4794(代) FAX (052)686-5114  
 〒464-0075 名古屋市中種区内山3-10-18 PPビル

大阪 TEL (06)6674-2222(代) FAX (06)6674-2323  
 〒558-0047 大阪市住吉区千歳2-4-25

仙台 TEL (022)218-0560(代) FAX (022)218-0561  
 〒981-3133 仙台市泉区泉中央3-4-1



# CHURITSU

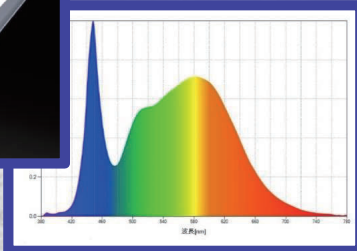
## 植物栽培用 エッジタイプLED照明

照明の均一性が高く植物の育成に最適!



1,200(W) × 392(D) × 20(H) mm  
600(W)のハーフサイズも有ります。

色温度：5,000k  
演色性：Ra85以上



### 特長

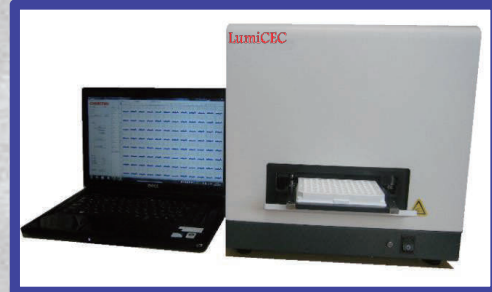
- 蛍光灯との比較では消費電力約55%ダウン!
- 導光板を採用する事でLED照明として20mmの薄さを実現!
- 拡散板によりパネル面の明るさがより均一になりました。
- 調光機能(10%~100%) タイマー機能もオプションで対応。

# LumiCEC

## 高感度生物発光測定装置

高感度を維持しつつ

クロストークが大幅に低減!



### 特長

- 数時間~1週間以上の長期間の自動測定に必要な動作安定性と耐久性を兼ね備えています。
- 誰でも簡単に操作できる測定解析ソフト「解析NINJA」が標準添付。

# CHURITSU 中立電機株式会社

本社：愛知県名古屋市中区大須4-12-8東洋殖産ビル6F  
FA事業部 バイオ機器課：愛知県豊明市新田町南山92番地の1  
TEL: 0562-92-8095, FAX: 0562-92-8097  
E-mail: bio@churitsu.co.jp  
http://www.churitsu.co.jp/products/bio/index.html



### DIVING-PAM- II

Underwater Fluorometer with Spectrometer



Measuring Aquatic Photosynthesis in its Natural Habitat

# WALZ

## 新型ポータブル クロロフィル蛍光測定器



### DUAL/KLAS-NIR

P700, Plastocyanin, Ferredoxin, Chlorophyll



High Quality Instrumentation for Plant Sciences

### WATER-PAM- II

Chlorophyll Fluorometer for Phytoplankton



Setting a New Benchmark for Photosynthesis Research in the Field

## DUAL/KLAS-NIR \*カイネティック LED アレイ分光光度計

DUAL/KLAS-NIR は、高等植物葉緑体チラコイド膜に存在する集光性色素タンパク質複合体・光化学系 I 反応中心クロロフィル蛍光測定、P700、電子伝達タンパク質プラストシアニン PC、およびフェレドキシン Fd の酸化還元を量的および質的に同時にモニターできる唯一の解析機器である。測定においては、同時に各成分に依存した吸収波長を多波長で検出し、それぞれの成分に特有の吸光度を用いて、存在比が算出される。多波長をマイクロ秒オーダーでスキャンし、かつ速やかに存在比を算出しながらモニターできるシステムであり、各成分の時間変化の追跡を可能にしている。

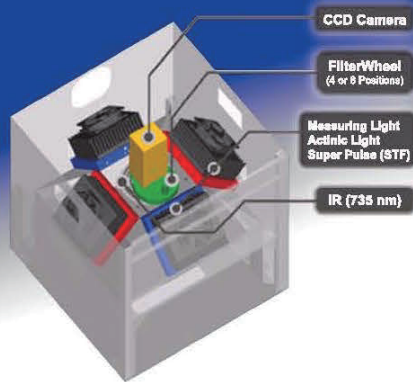
**株式会社 NAMOTO**  
〒272-0033 千葉県市川市市川南2-9-28-105  
Tel: 047-374-3240 Fax: 047-374-3241  
E-mail: mid@namoto.com



# 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  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ .  
 飽和光：最高光強度、7,500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ .



www.kyokko.com

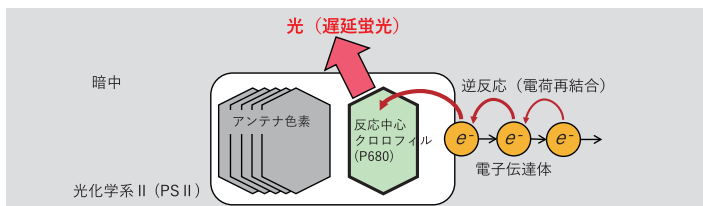
旭光通商株式会社

〒150-0012 東京都渋谷区広尾1-1-39 恵比寿プライムスクエア2F  
TEL:03-6418-6908 FAX:03-6418-6933

**HAMAMATSU**  
PHOTON IS OUR BUSINESS

## 植物・藻類の遅延蛍光を手軽に測定

### ■ 遅延蛍光による光合成評価の原理



励起光照射後の暗中で発光を測定します。発光強度は電子伝達体の量の影響を受け、アンテナ色素量や熱過程の影響は受けにくいです。

### ■ 特長

- フォトンカウンティングレベルの高感度で蛍光検出する光電子増倍管を内蔵
- 励起光から検出器を保護するシャッタ機構搭載
- 励起光は3種類の波長と、光出力・時間の設定が可能
- 試験管対応のホルダユニットとシャーレ対応の引き出し型をラインアップ



微弱発光計数装置 C17056-01  
(試験管測定タイプ)

浜松ホトニクス株式会社

WEB SITE www.hamamatsu.com

電子管営業推進部 〒438-0193 静岡県磐田市下神増314-5 TEL (0539) 62-5245 FAX (0539) 62-2205

仙台営業所 TEL (022) 267-0121

東京営業所 TEL (03) 6757-4994

中部営業所 TEL (053) 459-1112

大阪営業所 TEL (06) 6271-0441

西日本営業所 TEL (092) 482-0390

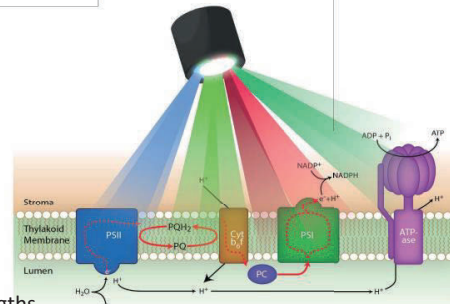


# JTS-150 光合成電子伝達反応解析装置



JTS-150 Photosynthesis Spectrometer

スマートランプかマルチLEDを使用すると、1回の実験実行中にリアルタイムで最大8つの波長の制御を提供します。複数波長制御により、単一の実験セットアップで複数の同時または多段階反応を表示できます。どちらのモジュールでも、マイクロ秒単位で波長を切り替えることができます。



8 Wavelengths

450nm,517nm,546nm,554nm,563nm,574nm,705nm,740nm

Fluorescence(NPQ,OJIP,Fv/Fm),ECS, Cyt b6/f, Plastocyanin,

P700 applications



有限会社オーリー 〒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)