

## 解説

## これまで欠けていた、速度論的評価に基づく、 オルタナティブ・エレクトロン・フロー活性の比較と光合成におけるO<sub>2</sub>の役割 ～生理的な意味が見える、本丸へ挑む～<sup>‡</sup>

神戸大学 大学院農学研究科  
高木 大輔 三宅 親弘\*

高等植物における光合成電子伝達反応にはRubiscoに依存する直線的電子伝達反応 (Linear electron flow; LEF) とは独立した代替的電子伝達反応 (Alternative electron flow; AEF) が存在している。これまで多くの研究によってAEFの活性、生理学的機能、ならびにAEFに関与するコンポーネントを欠損させた植物における表現型解析などが行われてきた。しかしながら、確立されたAEFの測定手法が存在していないことから、高等植物におけるAEFの理解に関して、現在コンセンサスが得られていない状況である。本稿は野生型高等植物において確認されるAEF活性を速度にて評価し、高等植物の光合成におけるLEFの速度と比較することで、AEFの機能、光合成における貢献を考察する。加えて、AEFの生理学的機能の解明に当たり、解決すべき問題点に関して考察する。

### 1. はじめに

高等植物の葉緑体に光が照射されると、チラコイド膜上の光化学系II (PSII)、光化学系I (PSI) 反応中心クロロフィルP680、P700の励起と電荷分離が起こり、光合成電子伝達反応が開始する。P680から放出された電子はプラストキノン (PQ)、シトクロム *b<sub>6</sub>f* (Cytb<sub>6</sub>f)、プラストシアニン (PC) を介してPSIへと伝達される。またP700から放出された電子はフェレドキシン (Fd)、フェレドキシンNADPHオキシドレダクターゼ (FNR) を介して、NADPHの生成に利用される。光合成電子伝達反応はNADPHの生成に加えて、ATPを生成する。PSIIにおけるH<sub>2</sub>Oの酸化の際、また還元型のPQ (PQH<sub>2</sub>) がCytb<sub>6</sub>fに電子を渡す際にチラコイド膜ルーメン内部にH<sup>+</sup>が放出される。チラコイド膜を介したストロマ側とルーメン側のH<sup>+</sup>勾配は、チラコイド膜上に存在するCF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>-ATPaseにおいてATP生成の駆動力として利用される。このようにして光合成電子伝達反応により生成されたNADPHとATPは、Calvin cycleにおけるCO<sub>2</sub>の固定、もしくは光呼吸に利用される。

Calvin cycleならびに光呼吸は、光合成電子伝達反応において生成されるエネルギーの主要な消費の場

であり、光合成の重要なシンクとして認識されている。一方で、光合成電子伝達反応にはRubisco依存的な光合成電子伝達反応に加えて、Rubiscoに非依存的な光合成電子伝達反応が存在している。これは代替的電子伝達反応 (Alternative electron flow; AEF) と呼ばれる<sup>1)</sup>。高等植物における代表的なAEFとして、循環的電子伝達経路 (cyclic electron flow; CEF) とPSIにおけるメーラー反応 (water-water cycle; Mehler-ascorbate peroxidase pathway; WWC) が挙げられる。CEFにおいてはArnonら、またTagawaらがチラコイド膜を用いた実験によって、PSIIからの電子の供給なしにPSIのみの電子伝達でATPの合成が起こること、つまり循環的リン酸化反応が起こることを確認したのが始まりであり、現在では大きく分けると4つの経路があることが報告されている [NAD(P)H dehydrogenase (NDH), Ferredoxin-plastoquinone reductase (FQR), FNR-Cytb<sub>6</sub>f complex (proton coupled, heme c-dependent proton uncoupled)]<sup>1-4)</sup>。一方でWWCにおいては1951年にMehlerがチラコイド膜を用いた実験においてO<sub>2</sub>がHill oxidantとして機能することを発見したのが始まりである<sup>5)</sup>。現在では、O<sub>2</sub>還元が起こるPSIでの活性酸素消去系、またアスコルビン酸 (Asc) の再生反応系の存

<sup>‡</sup> 解説特集「浅田先生を偲んで」

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

在が明らかとされている<sup>6,7)</sup>。

分子遺伝学、分子生物学の進歩により、AEFに関するコンポーネントが次々と明らかになっている。一方で、問題とすべきことは、高等植物の葉緑体内に存在する各種コンポーネントが、「真に生理学的に光合成に貢献しているかどうか」という事に対する考察である。変異体の獲得は、表現型を介した考察により、各種コンポーネントが植物内部でどのような役割を果たしているかを明らかとする非常に強力なツールである。しかし、そこには量と質の考察が軽んじられている場合が多い。つまり、各種コンポーネントの「ある」、「なし」に重きをおいて議論が展開されているとあってよい。発見された遺伝子、タンパク質の植物細胞内部における真の機能を明らかとするには、それらが質的または量的に生理現象を説明するのかという考察が必須である。今回は、高等植物の葉緑体での代表的なAEFであるCEFとWWCに焦点を当て、野生型植物において観測されるAEF活性、特に速度の面からAEFの考察を行う。

## 2. CEFの電子伝達活性評価

現在、高等植物において提唱されているCEFの生理学的機能を紹介する。CEFはPSIから出た電子を再び光合成電子伝達鎖上に戻す電子伝達経路であり、PQに電子を伝達する経路に関してはQ-cycleを活性化させる事によって、チラコイド膜ルーメン内部へのH<sup>+</sup>の取り込みを促進させ、H<sup>+</sup>依存的な非光化学的消光(NPQ: qE)やCO<sub>2</sub>固定のためのATPの合成に貢献すると考えられている<sup>8,9)</sup>。またCEFはPSIから電子を受

け取ることによって機能することから、PSI内部に電子が蓄積することを防ぐ役割もあると考えられている。これはPSIにおける活性酸素の生成を防ぐという意味で重要な防御機構である<sup>9-11)</sup>。

それでは、CEFはどれくらいの活性を持っているのであろうか？CEFにおける電子の供給源であるPSIはCEFのみならずFd, FNRを介したNADPHの生成やWWCにおけるO<sub>2</sub>還元などに電子を供給している。つまりCEFの活性はCEFに分配される電子の量によっても大きく左右される<sup>12-14)</sup>。光合成の誘導期においてはCalvin cycleや光呼吸といった光合成における大きな電子のシンクが完全に活性化する前の段階の為、電子はよりCEFに分配されることが予想される<sup>15,16)</sup>。一方で、定常状態の光合成においては多くの電子がCalvin cycleや光呼吸に供給される為、CEFの活性は誘導期に比べて低下する。このことを踏まえて光合成の誘導期と定常状態に分けてCEF活性を考察したい。

### A. 光合成誘導期におけるCEF活性

最初に光合成の誘導期、つまりCalvin cycleが活性化する前の光合成電子伝達反応におけるCEFの速度について紹介する。Joliotらは暗所に順応させた野生型のホウレンソウ並びにシロイヌナズナの葉に約7秒間、強力な励起光を照射し、その時に観測されるElectro chromic shift (ECS) のシグナルとDark interval relaxation kinetics (DIRK) analysisを組み合わせることで光合成電子伝達活性を見積もっている<sup>17-20)</sup>。その報告によると、光合成誘導期のホウレンソウの葉では、68 s<sup>-1</sup>のCEF活性と26 s<sup>-1</sup>のLEF活性が検出され、シロイヌナズナの葉においては

表1 LEF, CEF, WWCの速度比較

	ターンオーバー速度 (s <sup>-1</sup> )	植物	測定条件	参考文献
LEF	~ 300	タバコ	光合成定常状態	Laisk et al. (2001) <sup>21)</sup>
	~ 200	ヒマワリ	光合成定常状態	Laisk et al. (2001) <sup>21)</sup>
	~ 200	n.d.	personal communication	Joliot et al. (2004) <sup>18)</sup>
	~ 200	タバコ	光合成定常状態	Hald et al. (2008) <sup>22)</sup>
CEF	68	ホウレンソウ	光合成誘導期 (このときLEFは26 s <sup>-1</sup> )	Joliot & Joliot (2002) <sup>17)</sup>
	119 ~ 130	シロイヌナズナ	光合成誘導期 (このときLEFは40 s <sup>-1</sup> )	Joliot et al. (2004) <sup>18)</sup>
	~ 7	タバコ	光合成定常状態	Laisk et al. (2001) <sup>21)</sup>
	~ 15	ヒマワリ	光合成定常状態	Laisk et al. (2001) <sup>21)</sup>
	~ 200	ジャガイモ	光合成定常状態	Laisk et al. (2007) <sup>10)</sup>
	~ 306	タバコ	光合成定常状態	Miyake et al. (2005) <sup>27)</sup>
WWC	~ 9	サヤインゲン	光合成定常状態	Driever & Baker (2011) <sup>79)</sup>
	~ 2	ユーカリ	光合成定常状態	Shirao et al. (2013) <sup>80)</sup>
	~ 31	セコイア	光合成定常状態	Shirao et al. (2013) <sup>80)</sup>
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> reduction	~ 2	タバコ/ジャガイモ	光合成定常状態	Eichelmann et al. (2011) <sup>37)</sup>

119 ~ 130 s<sup>-1</sup>のCEF活性と40 s<sup>-1</sup>のLEF活性が検出されている(表1)。ここでのs<sup>-1</sup>という単位は1秒間にPSIIもしくはPSIが、どの程度電子伝達反応を行っているのかを表す(回転数 [反応中心]<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>)。また、これら植物の葉にDCMUを吸引させ、PSIIからQ<sub>A</sub>への電子伝達を阻害した葉においても117 ~ 128 s<sup>-1</sup>のCEF活性が検出されている。定常状態におけるLEF活性は~200 s<sup>-1</sup>ほどの速度で駆動することから、Joliotらが検出した光合成誘導期におけるCEF活性は定常状態のLEF活性に相当するほどの高い活性を持っていることが分かる<sup>17,18,21-23</sup>。

### B. 光合成の定常状態におけるCEF活性

非ストレス下の定常状態におけるCEF活性に関しては、未だコンセンサスが得られておらず、定常状態においてCEF活性が存在するかしないかについては明らかとなっていない。コンセンサスが得られない原因としては、確立されたCEF活性の測定方法が存在していないことが理由として挙げられる。また、報告されている定常状態のCEF活性に関しては、いくつかの解決しなくてはならない矛盾点が存在している。

CEF活性の評価として、Far-red light (FR) を照射した場合に観測されるP700<sup>+</sup>の誘導のキネティクスにより評価する解析方法が知られている(図1)<sup>16</sup>。この解析ではFRを照射した場合に確認されるP700<sup>+</sup>生成の遅延の程度からCEF活性を評価する。このP700<sup>+</sup>生成の遅延はFRにより電荷分離を起こしたP700<sup>+</sup>に、CEFによって循環してきた電子が再度P700<sup>+</sup>に供給されることにより

起きていると考えられている<sup>16</sup>。暗所に順応させた葉においてはP700<sup>+</sup>の酸化は大きく遅れるが、一方で光に順応させた葉においてFRを照射した場合には、P700<sup>+</sup>はすぐさま最大のレベルまで誘導される(図1A)。この光に順応させた葉におけるP700<sup>+</sup>の誘導のキネティクスは、葉にメチルピオロゲンを吸引した場合に確認されるキネティクスと同じであることから、光順応後の葉においてはFR照射により生成する電子のほとんどがLEFに供給されており、CEFの活性はほとんど存在しないことが見て取れる(図1B)<sup>16</sup>。このように光合成電子伝達反応においてCalvin cycleや光呼吸といった大きな電子のシンクが活性化した場合に、CEFに供給される電子が減少することでCEFの活性が低下するという報告は他にも存在している<sup>13,15,24</sup>。例えばLaiskらはLEFとCEFの活性をPSIの回転数(s<sup>-1</sup>)に換算して比較を行っている。測定光が約2,000 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>の条件下におけるCEFの活性は強光生育の植物でLEFの-5.5~7.5%、弱光生育の植物で-1.4%~12.2%であることを報告している。この時のLEF活性は強光生育の植物で約200 s<sup>-1</sup>、弱光生育で100 s<sup>-1</sup>程の速度が確認されているため、CEF活性を速度に換算すると強光生育の植物では~15 s<sup>-1</sup>、弱光生育の植物では~12 s<sup>-1</sup>程の活性となる<sup>21</sup>。またKuvykinらは光合成電子伝達反応における各種反応の見かけの速度定数を用いて*in silico*にて定常状態のCEF活性を算出しているが、その計算においてもCEF活性はLEFの10%未満であることを報告している<sup>25,26</sup>。

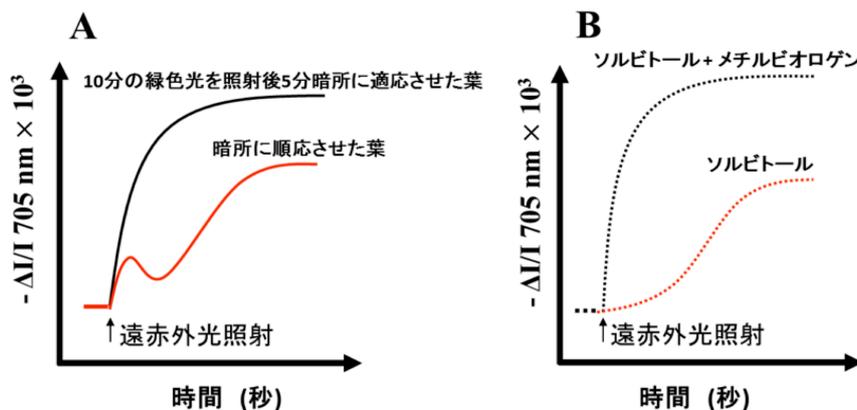


図1 FR照射によるCEF活性の評価

Joliot & Joliot (2005)をもとに作成。Aはホウレンソウの葉に150 mMソルビトールを吸引させたものと、ホウレンソウの葉に150 mMソルビトールと1 mMメチルピオロゲンを吸引させたものにおけるP700<sup>+</sup>の誘導のキネティクスを示したもの。P700<sup>+</sup>は遠赤外光の照射により誘導している。Bはエンドウの葉を暗所に順応させたものと、緑色光の照射によりCalvin cycleを活性化させた状態にし、その後5分暗所に置いたものにおけるP700<sup>+</sup>誘導のキネティクスを示す。

一方で、定常状態においても高いCEF活性が存在していることを示唆する報告もある。Laiskらがガス交換測定から算出する光合成電子伝達速度とP700<sup>+</sup>のDIRK-analysisから見積もるPSIにおける光合成電子伝達活性と比較したところ、強光条件下においてCEF活性の増加が確認され、速度にして40 ~ 100 μmol e<sup>-</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>程の活性が確認されている<sup>10</sup>。Laiskらが報告している葉面積当たりのPSIの量(0.5 ~ 1.8 μmol m<sup>-2</sup>)を参考にして、回転数に換算すると大凡20 ~ 200 s<sup>-1</sup>となる

(表1)<sup>10,21)</sup>。この値から考えると、これらの論文で報告されているCEF活性はLEFに相当することが分かる。Miyakeらはクロロフィル蛍光測定より見積もるPSIIの量子収率と830 nmにおける透過率変化から算出するPSIの量子収率からCEF活性を評価しており、その報告によると $\sim 153 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $\sim 306 \text{s}^{-1}$ ) 程のCEF活性速度が定常状態の光合成で観測されている(表1)<sup>27)</sup>。PSIIとPSIの量子収率から見積もるCEF活性に関しても、光強度の増加はCEF活性の増加を引き起こすことが確認されている<sup>28-30)</sup>。

ここに示したように光合成の定常状態におけるCEF活性の報告には、ばらつきが存在する。これは生育環境(光、窒素量、温度等)の要因によっても変化するが、やはり個々の測定法の違いが大きな原因であろう。ただし、ここで注目すべきは定常状態でCEF活性があるという報告に関しては活性のオーダーが一致している、つまりLEF活性に相当する活性を示しているという事である。

### 3. CEFはH<sup>+</sup>の取り込みに貢献しているか?

次に野生型の植物において確認されるCEF活性が光合成におけるH<sup>+</sup>の取り込みを促進し、*in vitro*で確認されたようなATPの供給に貢献することで、CO<sub>2</sub>固定をサポートしているのかを考えたい。最初にCalvin cycleを駆動させるために必要なNADPHとATPの量に関して整理する。Calvin cycleにおいて1分子のCO<sub>2</sub>を固定するためには3分子のATPと2分子のNADPHが必要となる<sup>31)</sup>。続いて、LEFにより生成されるNADPHとATPの量について考える。光合成電子伝達反応ではPSIIにおいて、2分子のH<sub>2</sub>Oが酸化されるとそれに伴って4つの電子と4つのH<sup>+</sup>の放出が行われ、1分子のO<sub>2</sub>が発生する[ $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ ]。1分子のNADPHの生成には電子を2つ必要とする[ $\text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NADPH}$ ]。したがって2分子のH<sub>2</sub>OをPSIIにおいて酸化した場合、4電子が流れるのでNADPHは2分子生成される。このことから、2分子のH<sub>2</sub>Oの酸化により駆動するLEFで3分子のATPを生成することができれば、LEFのみで1分子のCO<sub>2</sub>の固定を行うことが可能である。PSIIにおける電子のアクセプターであるPQはPSIIとCytb<sub>6</sub>/f間でQ-cycleを行っており、この機能によって電子伝達反応によるH<sup>+</sup>の取り込みが促進される。Q-cycleにおいて電子が1つ流れると2つのH<sup>+</sup>が取り込まれる(H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> = 2)<sup>32)</sup>。光合成電子伝達反応により2分子

のH<sub>2</sub>Oが酸化された場合、流れる電子の量は4電子なので、これに伴いQ-cycleにおいて取り込まれるH<sup>+</sup>の数は、 $8\text{H}^+ [4\text{e}^- \times 2\text{H}^+/\text{e}^-]$ となる。2分子のH<sub>2</sub>Oの酸化により供給される4H<sup>+</sup>と合わせると、LEFで生成されるH<sup>+</sup>は12H<sup>+</sup>となる。

問題は高等植物の葉緑体のATPaseがATPの生成にどれだけH<sup>+</sup>を必要とするかである。Seclertら(2000)の報告ではホウレンソウ葉緑体におけるATPaseのcリングは14個あることが報告されている<sup>33)</sup>。この報告にしたがって3分子のATPの生成に14H<sup>+</sup>が必要であると仮定する。その場合、LEFでは12H<sup>+</sup>しか取り込めないで2H<sup>+</sup>不足している状態となる。この考察に基づくと、CEFが存在することによって2H<sup>+</sup>が補充されるが故に、Calvin cycleは問題なく駆動しているように目的論的に理解できる。

しかしながら、定常状態において確認されるCEF活性にはいくつかの矛盾点が存在する。第一に、仮にCEFがLEFで生成するH<sup>+</sup>の不足分を補っているのであれば、CEFは光強度にかかわらず、常に駆動している必要がある。理論的には常にLEFの約14%に相当するCEF活性が確認されていなくてはならない。しかし、前述のように弱光条件下においてはCEF活性が確認されないという報告が存在している<sup>9,10,21,34)</sup>。この報告を考慮するとCEFがCalvin cycle駆動を駆動するに当たって、恒常的に不足しているATP合成をサポートしているとは考えにくい。

大気中のCO<sub>2</sub>濃度の変化は葉内、並びに葉緑体内部のCO<sub>2</sub>とO<sub>2</sub>の分圧の変化を引き起こし、Rubiscoにおけるカルボキシレーション反応とオキシゲナーゼ反応のバランスに変化をもたらす<sup>31)</sup>。光合成におけるATPとNADPHの要求量はKramerとEvans(2011)で記載されているように $3+7\Gamma^*/\text{C}$ (ATP)、 $2+4\Gamma^*/\text{C}$ (NADPH)と表現することができる<sup>35)</sup>。ここでの $\Gamma^*$ は暗呼吸を考慮しない場合の、光合成におけるCO<sub>2</sub>補償点、CはRubisco周囲におけるCO<sub>2</sub>分圧を示す<sup>36)</sup>。つまり、葉内のCO<sub>2</sub>濃度が低くなりカルボキシレーション反応が抑制され、オキシゲナーゼ反応が促進されるような条件下では、NADPHに対してATPの要求量が増加することが分かる<sup>35)</sup>。この時ATP/NADPH比は大凡1.67まで上昇するので、低CO<sub>2</sub>条件下では、現在の大気条件下において光合成を駆動する場合よりも多くのATPが要求される。このことからCEFによるH<sup>+</sup>の取り込みの貢献は、低CO<sub>2</sub>条件下で、より重要度が増すことが予想さ

れる。しかしながら、非ストレス条件下においてCEF活性を測定した論文に関しては、CO<sub>2</sub>の変化に伴うCEF活性の変化は確認されていない<sup>10)</sup>。Miyakeが2005年に報告した論文では、高い光強度の条件下(1,100 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)ではCEF活性は低CO<sub>2</sub>条件下において増加することが確認されている。しかし一方で低い光強度(150, 250 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)の条件下ではCEF活性はCO<sub>2</sub>濃度に依存しないことを見出している<sup>29)</sup>。前述のように光合成におけるATPとNADPHの要求量はΓ\*とCに依存するため、CEFがATP合成に関与するのであれば、光強度ではなくCO<sub>2</sub>の濃度の変化に応答しなくてはならないはずである。

以上の報告を含めるとCEFはH<sup>+</sup>の取り込みとカップリングしているとは考えにくい。それでは、今までとは反対の発想で、CEFが完全にH<sup>+</sup>の取り込みとカップリングしていることを仮定した場合に、矛盾は生じるのであろうか。Laiskらが2007年に報告した高CO<sub>2</sub>条件下におけるガス交換測定より算出した、LEF速度200 μmol e<sup>-</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>とその時のCEF活性約100 μmol e<sup>-</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>をもとに考察する。以下の計算は、Laiskら(2010)で用いられたものを適用した<sup>11)</sup>。LEF速度をATP要求速度に変換すると、[200 μmol e<sup>-</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> / 4 × 3 = 150 μmol ATP m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>]となる。これをATP合成の為のH<sup>+</sup>要求速度に変換すると、[150 μmol ATP m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> × 4.66 (H<sup>+</sup>/ATP) = 699 μmol H<sup>+</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>]となる。このとき、LEF活性によって達成されるH<sup>+</sup>の取り込み速度は、[200 μmol e<sup>-</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> + 200 μmol e<sup>-</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> × 2 (H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>) = 600 μmol H<sup>+</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>]となるので、Calvin cycleを駆動するためにCEFは99 μmol H<sup>+</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>の速度でH<sup>+</sup>の取り込みをサポートする必要があると考えられる。この時CEFの活性は100 μmol e<sup>-</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>であるのでH<sup>+</sup>取り込み速度に換算すると[100 μmol e<sup>-</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> × 2 (H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>) = 200 μmol H<sup>+</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>]になることが分かり、要求される速度の2倍の速度でH<sup>+</sup>の取り込みが行われていることになる。測定条件が高CO<sub>2</sub>であることを考慮すると光呼吸の駆動のためのATP合成に使われている可能性は低い。一方で葉緑体内部における窒素同化にもATPが利用されるが、そのフラックスは光合成の速度と比較すると低い為、過剰に取り込まれたH<sup>+</sup>のすべてが窒素同化を行う為のATP合成に使われているとは考えにくい(～1.0 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)<sup>37)</sup>(表1)。

また、Laiskらは低CO<sub>2</sub>、低O<sub>2</sub>条件下でFR照射により観測されるCEF活性がH<sup>+</sup>の取り込みとカップリング

していると仮定し、LEF活性から見積もるH<sup>+</sup>要求速度との比較を行っている<sup>11)</sup>。その条件下で観測されるLEF活性は5 μmol e<sup>-</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>、CEF活性は50～70 μmol e<sup>-</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>であった。上記と同様の計算をすると、LEFでATPの合成に要求されるH<sup>+</sup>取り込み速度は17.5 μmol H<sup>+</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>であり、LEFで達成されるH<sup>+</sup>取り込み速度は15 μmol H<sup>+</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>となる。つまりこの条件下で要求されるCEFによるH<sup>+</sup>の取り込み速度はわずか2.5 μmol H<sup>+</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>でよいが、観測されたCEF活性をもとに計算するとH<sup>+</sup>取り込み速度は100～140 μmol H<sup>+</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>にまで達すると報告されている<sup>11)</sup>。低O<sub>2</sub>下で光呼吸が抑制されることと、窒素同化のフラックスを考慮すると、CEFによるH<sup>+</sup>の取り込み速度は過剰であることが示唆される。

Calvin cycleで要求するATP合成速度に相当するようなATP消費経路が存在しなければ、CEFの駆動によってチラコイド膜ルーメン側に絶えずH<sup>+</sup>が流入することとなる。H<sup>+</sup>の要求量以上にH<sup>+</sup>が取り込まれるとルーメンのpHが大きく低下することが予想される。ルーメン側のpHの低下はPQとCytb<sub>6/f</sub>間の光合成電子伝達を大きく抑制する<sup>38)</sup>。さらに、ルーメン側のpHの低下はCytb<sub>6/f</sub>における光合成電子伝達のみならず、PSIIのOxygen evolving complex (OEC)、プラストシアニン(PC)の分解を誘導する<sup>39)</sup>。つまり、CEFがH<sup>+</sup>の取り込みとカップリングしているのであれば、すぐさまルーメン側のpHが低下することによって、PQ-Cytb<sub>6/f</sub>間の光合成電子伝達反応が抑制、PQ-poolにおける電子の蓄積、ならびにPSII、PCの機能が抑制されることによって、CEF自体も駆動できなくなるはずではないだろうか<sup>1,40,41)</sup>。

上記の予想は、以下の論文によってサポートされる。そもそも、葉緑体のATPaseはH<sup>+</sup>の結合するcサブユニットは14個あるが、これは必ずしも3ATP作るのに14H<sup>+</sup>が必要であることを示しているわけではない。Steigmillerら(2008)やPetersenら(2012)ではホウレンソウから単離したATPaseを利用して、H<sup>+</sup>/ATPの比を計算している。Steigmillerらは3.9±0.3、Petersenらは4.0±0.3の値を得ている<sup>42,43)</sup>。つまり、CEFがH<sup>+</sup>の取り込みに貢献しなくてもLEFの駆動によるH<sup>+</sup>の取り込みのみでCO<sub>2</sub>の固定は可能であることを意味する。実際にAvensonらの報告によると、LEFで形成されるproton motive force (*pmf*<sub>LEF</sub>)とトータルのECSシグナル(*total pmf*)の間には直線の関係があることを報告し

ている。例えば、CEFが強光下で促進し、それがH<sup>+</sup>の取り込みに貢献するのであれば、LEFで形成されるpmfに加えて、追加的にpmfが増加するはずである。つまり、定常状態において、光強度の変化に応答するCEF活性の変化はチラコイド膜を介したH<sup>+</sup>勾配の形成に関与していない可能性がある<sup>44,46</sup>。

一方で、Furbank、Badgerらがチラコイド膜を用いた実験によって算出したATP/2e<sup>-</sup>の比は1.39であり、4電子流れた場合には2.78ATPしか生成できないことを示している<sup>47</sup>。この報告は、3分子のATPの生成のためには、14H<sup>+</sup>が必要であることを示唆する結果である。この報告に基づく、光合成の駆動に当たってはCEFによる追加的なH<sup>+</sup>が必要であることが示唆される。Calvin cycleや光呼吸に必要とされるATPの合成にH<sup>+</sup>がどれだけ必要となるかについては、現在も決着のつかない難題である。

#### 4. CEFを制御するのはNDH complexとPGR5 – PGRL1 proteinか?

野生型植物で観測されるCEF活性はLEF活性に匹敵するという報告があることから、高い電子伝達活性を説明する分子メカニズムでなければCEFの機能説明に至ったとは言えない。現在、CEFに関わるコンポーネントとしてはNDH複合体とPGR5、PGRL1タンパク質が挙げられる<sup>8,9,48-50</sup>。これらのタンパク質の存在は野生型植物で観測されるCEF活性を説明できるであろうか。

NDHは複数のサブユニットからなる巨大な複合体であり、近年Fdの結合部位の存在が報告された<sup>51,52</sup>。これらの報告からNDHは光合成電子伝達反応に関与することが示唆される。しかしながら、チラコイド膜におけるNDH complexの量はチラコイド膜のタンパク質の0.2%に相当し、光合成電子伝達鎖100個につき1つの複合体がついている計算となる<sup>53</sup>。Laiskらが見積もるPSII量 (0.5 ~1.8 μmol m<sup>-2</sup>) を参考にすると、

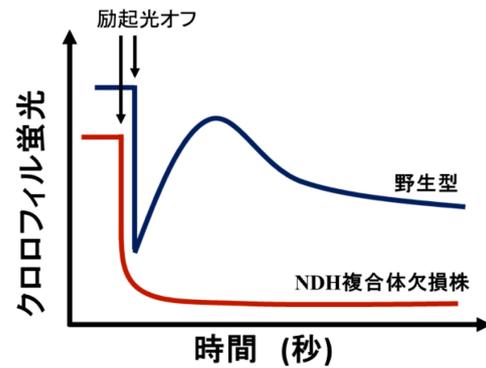


図2 クロロフィル蛍光を用いたNDH依存型CEF活性の評価 Hashimotoら (2003) <sup>48</sup>)をもとに作成。励起光の消灯後に確認されるクロロフィル蛍光のキネティクスを示す。野生型で励起光消灯後にクロロフィル蛍光の上昇が観測されるのは、励起光照射中に葉緑体ストロマに蓄積した還元力 (NADPH, Fd) が、NDHを介してPQプールに電子を伝達するためと考えられている。実際にNDH複合体の変異体においては野生型で確認されるようなクロロフィル蛍光の上昇は確認されない。

NDH複合体の量は凡そその100分の1と見積もれるので、5 ~ 18 nmol m<sup>-2</sup>となる。これがLaiskらの報告 (2007) 中の、野生型植物で確認されたCEF活性40 ~ 100 μmol e<sup>-</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>の電子伝達反応を行おうとする場合、NDH複合体のターンオーバーは [40 ~ 100 μmol e<sup>-</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> / 0.005 ~ 0.02 μmol m<sup>-2</sup> = 2,000 ~ 20,000 s<sup>-1</sup>] となり、NDHは2,000 ~ 20,000 s<sup>-1</sup>の速度で電子を伝達しなくてはならないことになる<sup>10</sup>。Joliotら (2004) でもNDHの活性は、そのタンパク質量を考慮すると理論的に約10,000 s<sup>-1</sup>の活性が必要であると提案されている<sup>18</sup>。LEFのターンオーバー速度が約 200 s<sup>-1</sup>であることから、タンパク質量に基づいて算出されたこの活性は生理学的に高すぎる。

NDHの活性は*in vivo*で測定可能であり、励起光消灯後のクロロフィル蛍光の上昇によってNDHの活性の「有無」が議論されている (図2) <sup>8,52,54</sup>)。今度は逆に、この評価系から見積もられる活性から、必要とされるNDH複合体の量を計算してみる。クロロフィルの蛍光

表2 NDH, PGR5, PGRL1, PTOXの速度比較

タンパク質	ターンオーバー速度 (s <sup>-1</sup> )	植物	測定条件	参考文献
NDH	1	シロイヌナズナ	励起光消灯後	Gotoh et al. (2010) <sup>54</sup>
	0.1	トマト	クロロフィル蛍光 Kautsky effect	Trouillard et al. (2012) <sup>55</sup>
PGR5	0.035	シロイヌナズナ	<i>In vitro</i>	Fisher & Kramer (2014) <sup>57</sup>
PGRL1	~3	リコンビナントタンパク質	<i>In vitro</i>	Hertle et al. (2013) <sup>50</sup>
PTOX	0.2~0.25	トマト	クロロフィル蛍光 Kautsky effect	Trouillard et al. (2012) <sup>55</sup>

の上昇はストロマ中のNADPHがNDHを介してPQへと移動するために光合成電子伝達鎖が還元状態となることで起こると考えられている<sup>48)</sup>。このことからクロロフィル蛍光の上昇の速度がNDHの活性であると考えられる。クロロフィル蛍光の上昇のハーフタイムから算出されるターンオーバーはGotohら(2010)では $1\text{ s}^{-1}$ と見積もられている(表2)<sup>54)</sup>。またTrouillardら(2012)ではNDHの活性は $0.1\text{ s}^{-1}$ と見積もられている(表2)<sup>55)</sup>。この活性でこれがLaiskらの報告(2007)の中で報告されているCEF活性 $40\sim 100\ \mu\text{mol e}^{-}\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ を達成しようとするに $[40\sim 1,000\ \mu\text{mol m}^{-2}]$ のNDH複合体が必要となる<sup>10)</sup>。Rubiscoの量が $\sim 7\ \mu\text{mol m}^{-2}$ 程であることを考慮すると、見積もられる量のNDHが葉内に存在しているとは考えにくい<sup>56)</sup>。これらの計算からNDH複合体の活性では野生型植物で見られるCEF活性のすべてを説明することは、不可能であることが示唆される。

PGR5, PGRL1が関与するCEF活性も*in vitro*のクロロフィル蛍光によって評価される<sup>9,49,50)</sup>。これもNDHの活性評価と同様に電子がFdを介してPQへと移動するために光合成電子伝達鎖が還元状態となり、クロロフィル蛍光の上昇が起こると考えられている。しかしこのクロロフィル蛍光の上昇の半減期は非常に遅く、回転数に換算すると約 $0.035\text{ s}^{-1}$ と見積もられる(表2)<sup>57)</sup>。一方で、大腸菌において精製したPGRL1のタンパク質の回転数は $\sim 3\text{ s}^{-1}$ であることが見積もられる(表2)<sup>50)</sup>。PGR5欠損シロイヌナズナ変異体、ならびにPGRL1AB欠損シロイヌナズナ変異体においては生育の低下、LEF活性、NPQの誘導が大きく抑制され、PSIにおいては電子の蓄積が確認されている<sup>9,49)</sup>。しかしながら、PGR5, PGRL1がもつCEF活性は、LEF活性ならびに野生型植物で観測されるCEF活性とは程遠い為、野生型シロイヌナズナと*pgr5*, *pgrllab*変異体の違いがCEF活性の違いとして説明することはできない。

またFisherとKramer(2014)は、このPGR5依存的CEF活性評価がPQへの電子の伝達ではなくPSIIへの電子の伝達を意味することを明らかとした<sup>57)</sup>。ヒドロキシアミンとDCMUを処理したサンプルはPSIIからPQへの電子伝達が抑制されている為、PQにおける電子の蓄積はPSIIから発せられるクロロフィル蛍光に何の影響も与えないことが考えられる。しかしながら、PGR5-dependent CEFと思われるクロロフィル蛍光の上昇は、それらの処理を行った単離葉緑体でも増加することを見出している。つまり、この評価方法による

クロロフィル蛍光の増加は、全くもってPQのredoxの変化ではない。この報告から考えるに、PGR5がCEFに関与する可能性は低い。この主張に関しては以下の論文も参考にしてほしい<sup>58,59)</sup>。このことを考慮すると新たなPGR5タンパク質の機能の考察が必要であることが示唆される。一方で、Okegawaらは単離葉緑体を用いた実験で、弱光下におけるPGR5依存的なCEFが、光合成定常状態の光合成速度と競合できるほどの活性を持つことを示している<sup>60)</sup>。この対立議論の解決のためにも*in vitro*並びに*in vivo*においてLEFとCEFの活性を「速度」にて同時に測定する技術の確立が必要である。また、Okegawaらの報告の中では、野生型シロイヌナズナとPGR5欠損シロイヌナズナから単離した葉緑体は、Fd、NADP<sup>+</sup>存在下で同様のO<sub>2</sub>発生速度を示すが、クロロフィル蛍光から見積もるPSIIの量子収率が両植物の間で大きく異なることを見出している<sup>60)</sup>。PGR5タンパク質の有無が見せるPSIIに関するこの事実は、PGR5が担う生理学的機能の考察を行うに当たって非常に興味深いものといえる。FisherとKramer(2014)が提唱するように、PGR5がPSIIと相互作用しているのを反映しているのかもしれない。

## 5. *In vitro*における光合成電子伝達反応とO<sub>2</sub>依存的電子伝達活性

高等植物の光合成電子伝達反応には、PSIにおいてO<sub>2</sub>が電子のアクセプターとして機能することにより光合成電子伝達反応を促進させるWWC(Mehler-Ascorbate Peroxidase pathway)が存在している<sup>6,7,61)</sup>。PSIにおいてO<sub>2</sub>に電子が供給されると反応性の高いスーパーオキシドアニオン(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)が生成されるが、チラコイド膜上または葉緑体ストロマに存在するスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)によって不均化されることによりH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>へと変換され、その後チラコイド膜、ストロマ中に存在するアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)によってH<sub>2</sub>Oへと変換されることにより、無毒化している<sup>62-65)</sup>。

このO<sub>2</sub>依存的電子伝達反応に関しては単離葉緑体を用いた実験が多くなされている。*In vitro*で観測されるO<sub>2</sub>還元速度のK<sub>m</sub>は $\sim 10\ \mu\text{M}$ と低く、非常に少量のO<sub>2</sub>でも反応は進行し、単離葉緑体や単離チラコイド膜を用いて測定されるO<sub>2</sub>還元速度は約 $20\ \mu\text{mol O}_2\ (\text{mg Chl})^{-1}\text{ h}^{-1}$ であることが過去に報告されている<sup>47,61,66-69)</sup>。この速度は単離した葉緑体において電子のアクセプターを

O<sub>2</sub>に限定した場合に観測される速度であり、NADP<sup>+</sup>やPGA、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>の存在下では、O<sub>2</sub>還元速度は低下する<sup>47,67,70</sup>。PSI以降に電子のアクセプターが存在するような条件下で、LEF活性に対してO<sub>2</sub>の還元活性を比較した場合には~10%程の活性になることが報告されている<sup>47,67,70</sup>。このことからO<sub>2</sub>還元活性はLEFに相当するような高い光合成電子伝達活性とは言えない。

しかしながら、光合成電子伝達反応に与えるO<sub>2</sub>の効果は非常に大きい。Schreiber、Neubauerらの単離葉緑体を用いた実験を見てみると、O<sub>2</sub>が十分存在する条件下では白色光照射後、葉緑体から発せられる蛍光はNPQの誘導に伴って大きくクエンチングが起こるのに対し、低O<sub>2</sub>条件下ではNPQはほとんど誘導されず、クロロフィル蛍光のクエンチングはほとんど確認されない<sup>5</sup>。NPQの大部分はチラコイド膜を介したプロトン勾配(ΔpH)に依存的なqEであることを考慮すると、O<sub>2</sub>依存的な経路はH<sup>+</sup>の取り込みに貢献していることが予想される<sup>71</sup>。実際に、単離葉緑体においてΔpHの形成を9-アミノアクリジンのクエンチングやElectrochromic shiftにて評価すると、ΔpHの形成は、O<sub>2</sub>が存在する条件下で促進されることが確認されている<sup>69,72,73</sup>。また、O<sub>2</sub>はPSIから電子を奪うことで、光合成電子伝達鎖上に電子が過剰に蓄積するのを防ぐ役割があることも報告されている<sup>67,73,74</sup>。

O<sub>2</sub>還元により生成するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の消去はAPXにより行われるが、その際に基質としてアスコルビン酸(Asc)が利用され、モノデヒドロアスコルビン酸(MDA)が生じる<sup>64,65</sup>。MDAはPSIにおいて電子のアクセプターとして機能でき、MDAの還元によるAscの再生は同時に光合成電子伝達反応の促進とH<sup>+</sup>の取り込みに貢献する<sup>75</sup>。FortiとElliの報告では、単離チラコイド膜におけるATP合成活性はO<sub>2</sub>のみをPSIの電子のアクセプターとした場合よりもAscを加えたものでは2倍になることが確認されている<sup>76</sup>。このことから葉緑体においては、PSIにおいてO<sub>2</sub>に電子を伝達することによって光合成電子伝達活性を向上させるが、さらに発生させたH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の消去に携わるAscの再生へも電子を伝達することによって、更なる光合成電子伝達活性の促進を起している。

## 6. 「浅田先生との研究の思い出」活性酸素消去系からWWCの確立へ：光合成の老廃物であり、細胞毒として有害で厄介者にすぎなかったO<sub>2</sub>

へ、光合成にとって不可欠で有益なものであるという概念を与えたUlrich Schreiber博士の功績～京都大学・浅田グループとビュルツブルグ大学・シュライバーグループの融合研究成果～

葉緑体での活性酸素生成は、過剰な光あるいは低CO<sub>2</sub>条件などで光エネルギーが余ったときにO<sub>2</sub>へエネルギーが逃げるのが原因として認識される。一方で、生成した活性酸素であるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は、APXによって継続的に消去されなければ、植物はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による酸化障害によって枯死する。この継続的なH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>消去のためにはAPXの基質であるAscが再生されなければならないが、これは過剰な光エネルギーによってなされる。このように、光によって生成した活性酸素が光によって消去されるという合理的なシステムが活性酸素消去系として葉緑体チラコイド膜上に機能していることは、90年代終わりに確立された<sup>64,65</sup>。一方で、これまで述べてきたように、PSIでのO<sub>2</sub>還元が光合成電子伝達反応を誘導し、チラコイド膜ΔpH誘導、そしてNPQ形成に不可欠であることを示し、Mehler反応とAPX反応の光合成における意味を初めて与えたのがビュルツブルグ大学のSchreiber博士であった<sup>6</sup>。事実、O<sub>2</sub>が存在すると、あるいは単離葉緑体にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加すると、クロロフィル蛍光の大幅なクエンチングが確認される<sup>6</sup>。筆者の一人・三宅は、ポスドクでビュルツブルグ大学にて研究していた時、今ではポピュラーになったPAMクロロフィル蛍光解析において、O<sub>2</sub>およびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が、ドラマティックなクロロフィル蛍光クエンチングを誘導するのを目の当たりにして、葉緑体でのO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>代謝の魅力に取りつかれた。

The Water-Water Cycleという言葉を用いた最初の論文(Schreiberグループとの共著)は幸いにもPlant Cell Physiology誌に1998年に掲載していただいた<sup>61</sup>。そこでは、まさしく、活性酸素消去系にSchreiber博士の概念を取り入れており、O<sub>2</sub>のもつ2つの側面を融合したO<sub>2</sub>代謝システムを完成させることができた。論文執筆の後半、チラコイド膜上での電子の流れを絵にすると、システムの名前を決める議論を浅田先生と熱くしたことを思い出す。三宅はO<sub>2</sub>の魅力に取りつかれていたため「O<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>サイクル」、浅田先生は「Water-Waterサイクル」の名称を提案された。その後、二人の間で多くの議論の後に、電子のオリジナルがPSIIでのH<sub>2</sub>OなのでWater-Waterサイクルで行きましょうという浅田先生の結論に至った。この経緯は、浅田先生と二人の

間でなすことができた深い議論をもつ懐かしい思い出であり、そして、Schreiber博士のコンセプトがなかったらWWCという言葉は生まれなかったものである。私こと三宅が、1993年に、浅田先生から、「ピュルツブルグへ行き、日本にはいない光合成のO<sub>2</sub>代謝の専門家になりなさい」と言われたことを今でも思い出す（このとき、なぜかしら、誰も行きたがらないので、私にその重大な責任が回ってきたのかなあという雰囲気があった。若い私は、何もわけがわからずその話に調子よく乗ったというのがこの顛末である。しかしながら、そのおかげで、PAM-Chl fluorometerの作製原理とその解析、さらに光合成電子伝達系の酸化還元成分の分光学的解析の原理とその手法をSchreiber博士に熱くご教授いただいたことは幸せなことであった。この貴重かつ稀有な経験は、これまでの私自身のサイエンスの基盤となっている）。

そして、浅田先生およびSchreiber博士の共通なサイエンスの柱は、とにかく、誰も見出していない生理現象に出会いなさいということであった。普段の研究において、三宅自身が実験結果を浅田先生に報告に行くと、「この結果は、○○年に××先生がすでに見出しており、その結果（新規に提唱されたコンセプト）を支持するだけにすぎず、それを提唱した先生が喜ぶだけである」というコメントをいただく始末であった。浅田先生のこだわりは、まさしく、新しい生理現象の発見であった。それを、直属の弟子である学生に求められていた。このような経緯、そしてピュルツブルグ大学でSchreiber博士のもとで学んだ、O<sub>2</sub>の見事な役割（これもまた、Schreiber博士が最初に見出したものである）を目の当たりにして、O<sub>2</sub>への執着、O<sub>2</sub>が関わる生理現象に出会いを求める三宅自身の研究姿勢はこのときに出来上がった。

## 7. WWCは*in vivo*で機能しているか?

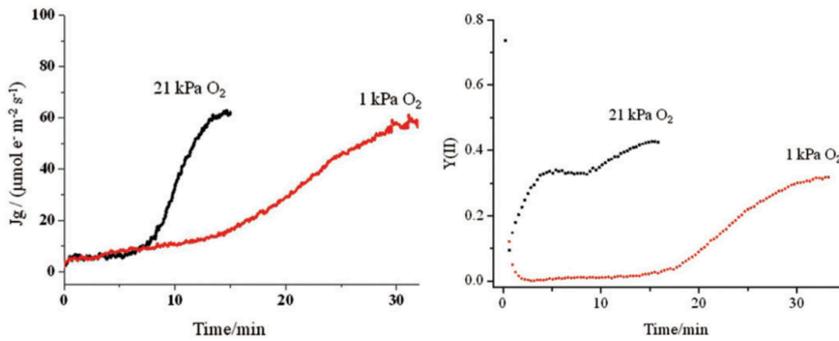
Badgerら（2000）の報告では、高等植物の*in vivo*におけるWWCは、全体の光合成電子伝達活性のわずか~10%ほどしか機能していないことを報告している<sup>77)</sup>。実際に、Ruuskaら（2000）ではCalvin cycleと光呼吸に依存した光合成電子伝達活性と、クロロフィル蛍光から見積もる全光合成電子伝達活性とが、直線的な関係となり、O<sub>2</sub>濃度を変えた環境やRubiscoの含量を変えた植物を用いた場合においても、この直線関係が維持されることを報告している<sup>78)</sup>。またDriever

とBaker（2011）では質量分析システム（MS）を利用し光合成電子伝達反応における<sup>18</sup>O<sub>2</sub>の還元を測定したが、光合成電子伝達反応におけるO<sub>2</sub>の還元はほとんど無視できる程度であり(< 5%)、ほとんど光合成電子伝達反応に寄与しない可能性が報告されている（表1）<sup>79)</sup>。Shiraoらは被子植物と裸子植物それぞれにおいてO<sub>2</sub>の吸収速度を比較し、前者では~1%程、後者は~10%程の活性であることを報告している（表1）<sup>80)</sup>。いずれの報告においても実際にO<sub>2</sub>の還元は光合成電子伝達反応中に起きていることが確認されるが、光合成電子伝達活性としては非常に小さい。3分子のATP合成において要求されるH<sup>+</sup>が14個である場合、LEFに加えてAEFは少なくとも約14%駆動しなくてはならないことが予想されるため、WWCのみでATP合成をサポートしているとは言えない。

O<sub>2</sub>を利用する光合成電子伝達経路として、Plastid terminal oxidase (PTOX) も挙げるのが可能であるが、PTOXにおける光合成電子伝達活性は0.2~0.25 s<sup>-1</sup>と見積もられているため、LEF活性と比較するとWWCよりも光合成電子伝達における寄与は低いと考えられる（表2）<sup>55)</sup>。

## 8. 高等植物の光合成電子伝達反応はO<sub>2</sub>濃度の影響を受ける ~光合成電子伝達反応におけるO<sub>2</sub>の役割は?~

前章で生葉におけるWWC活性は非常に低いという事を述べた。このことは生葉の光合成電子伝達反応におけるWWCの貢献度が低いことを意味するが、光合成電子伝達反応においてO<sub>2</sub>は何も影響を与えないわけではない。ClarkeとJohnsonらはCO<sub>2</sub>濃度1200ppm、O<sub>2</sub> 21%とCO<sub>2</sub>濃度1200ppm、O<sub>2</sub> 2%の条件下において光合成電子伝達活性を評価したところ、2%O<sub>2</sub>の条件下では21%O<sub>2</sub>の条件下に比べてPSIIの量子収率が低下することを見出している<sup>81)</sup>。また、Laiskらは1500ppm CO<sub>2</sub>条件下においてO<sub>2</sub>濃度を21%から2%へと低下させると、PSIのアクセプターサイドにおいて光合成電子伝達反応の制限がかかり、それと同時にLEF活性が低下することを見出している<sup>10)</sup>。測定時のCO<sub>2</sub>濃度が高いことを考慮するとRubiscoにおける光呼吸の影響はほとんどないことが考えられる為、PSIIの量子収率に影響を与えているのは、光呼吸以外のO<sub>2</sub>に依存的な光合成電子伝達反応であることが示唆される。またShiraoら報告を見ると、定常状態の光合成におけるO<sub>2</sub>



**図3 低O<sub>2</sub>条件下ではAEF活性が抑制され、光合成の開始が遅延する**  
 暗所に順応させたイネ（ノトヒカリ）に励起光（442 μ photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>）を照射した時のJg [Rubisco依存的電子伝達活性（カルボキシレーション速度+オキシゲネーション速度）]と光化学系IIにおける量子収率[Y(II)]の変化。測定は37 Pa CO<sub>2</sub>, 21 kPa O<sub>2</sub>（黒線）と37 Pa CO<sub>2</sub>, 1 kPa O<sub>2</sub>（赤線）の条件下において行った。測定において、励起光は測定開始30秒後に照射した（Miyake et al. 2012より引用）<sup>23)</sup>。

還元活性は低いにも関わらず、飽和光照射時のクロロフィル蛍光の減衰速度はO<sub>2</sub>の有無によって大きく変化しており、裸子植物においてはクエンチングの半減期がO<sub>2</sub>の無い条件下において約2倍遅延することが見て取れる<sup>80)</sup>。この実験は、暗所に適応させた植物に飽和光（~1 s）を照射した場合におけるクロロフィル蛍光のキネティクスを評価しているため、光合成のシンクであるCalvin cycleや光呼吸の影響は無視できると考えられる。つまりこの光合成電子伝達反応において確認されるO<sub>2</sub>の影響も、光呼吸以外のO<sub>2</sub>依存的な電子伝達反応が存在していることを示唆している。

またMiyakeらはイネを用いた実験において、低O<sub>2</sub>条件下では光合成の開始が遅延することを報告している（図3）<sup>23)</sup>。この報告では暗所に順応させた葉に赤色光を照射すると、大気条件下（40 Pa CO<sub>2</sub>, 21 kPa O<sub>2</sub>）では約7分後にCO<sub>2</sub>固定、並びにRubisco依存的な光合成電子伝達反応（Jg）の開始が確認されるが、低O<sub>2</sub>条

件下（40 Pa CO<sub>2</sub>, 1 kPa O<sub>2</sub>）ではCO<sub>2</sub>の固定とJgの開始が確認されるまで約15分かかることが見出された。またこの報告では、大気条件下においてCO<sub>2</sub>固定、Jgが開始する以前から、PSII、PSIにおける光合成電子伝達活性が見出されている。一方で低O<sub>2</sub>条件下ではCO<sub>2</sub>固定、Jg開始前の光合成電子伝達活性は見出されていない。このことから考えるとO<sub>2</sub>はRubisco依存的な光合成電子伝達反応が活性化する以前に、AEFの駆動と光合成の開始をサポートする機能があることが示唆される。

生葉におけるWWC活性がLEF活性に比べると低いことが明らかとなったが、これは同時に光合成電子伝達反応におけるO<sub>2</sub>の影響を無視しても構わないということと同義ではない（図4）。生理現象としてO<sub>2</sub>の効果が確認されているこの段階において、光合成電子伝達反応がなぜO<sub>2</sub>濃度の変化に応答するのか？という疑問に関してはまだまだ未知の領域であり、光合成電子伝達反応におけるO<sub>2</sub>の生理学的役割、O<sub>2</sub>応答の分子メカニズムの解明は、今後、光合成電子伝達反応の制御メカニズムを把握する上で重要な課題の1つであると考えられる。

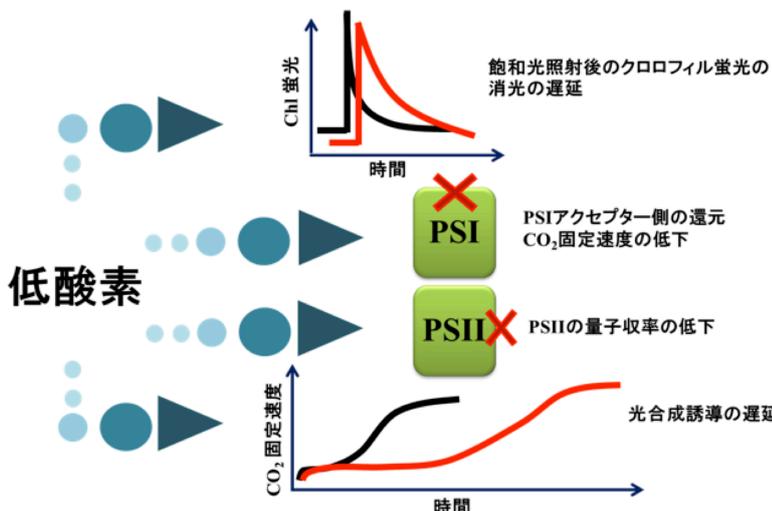
**図4 O<sub>2</sub>が高等植物の光合成に与える影響**

高等植物の生葉において観測されるO<sub>2</sub>が光合成に与える影響を取り上げた。ShiraoらはLow O<sub>2</sub>条件下では、飽和光照射時に誘導されるクロロフィル蛍光の消光が大気条件下に比べて遅延することを見出している。黒線が大気条件下のクロロフィル蛍光を示し、赤線がLow O<sub>2</sub>下のクロロフィル蛍光のキネティクスを示す（Shirao et al. 2013）<sup>80)</sup>。

Laiskらは高CO<sub>2</sub>条件下においてO<sub>2</sub>濃度を低下させるとP700の還元レベルが上昇し、それに伴うCO<sub>2</sub>固定速度の低下を見出している（Laisk et al. 2007）<sup>10)</sup>。

ClarkeとJohnsonは高CO<sub>2</sub>条件下でO<sub>2</sub>濃度を低下させるとPSIIにおける量子収率が低下することを見出している（Clarke & Johnson 2001）<sup>81)</sup>。

Miyakeらは低O<sub>2</sub>条件下ではPSIIにおける量子収率の低下、ならびに光合成の誘導が遅れることを見出している（Miyake et al. 2012）<sup>23)</sup>。黒線が37 Pa CO<sub>2</sub>, 21 kPa O<sub>2</sub>条件下のCO<sub>2</sub>固定速度を示し、赤線が37 Pa CO<sub>2</sub>, 1 kPa O<sub>2</sub>条件下のCO<sub>2</sub>固定速度のキネティクスを示す。



## 8. おわりに

葉緑体においてRubisco非依存的な光合成電子伝達反応の「存在」に関しては生理学的現象をもとにした報告を中心に、徐々に確立されたものになりつつある。しかしながら、その制御メカニズム、生理学的役割、分子メカニズムはほとんど明らかとなっていないといつてよい。今後は野生型植物において確認される各種AEF活性を説明する植物内のコンポーネントの探索が重要になると考えられる。一方で、光合成電子伝達反応の制御を明らかとする上でATP、NADPHの合成と消費のバランス、並びにATP/e-に対する考察も非常に重要である。ATPに関しては前述のように高等植物の葉緑体におけるATPaseが3分子のATPを生成するのに必要なH<sup>+</sup>の数は未だ決定されていない。ATPの合成にATPaseが要求するH<sup>+</sup>の数は、AEFが追加的なH<sup>+</sup>の取り込みをどの程度担うのかどうかに関与する要因である。それと同時にATPaseは代謝による[ATP]/[ADP][Pi]比の変化に応答して、ルーメン側からのH<sup>+</sup>の放出を調整し、光合成電子伝達反応におけるqEの制御に大きく関係する<sup>82-84</sup>)。これらの報告から光合成電子伝達反応の制御は、H<sup>+</sup>の取り込みと放出の両方のバランスを考慮しなくてはならない。

NADPHの酸化還元バランスも光合成電子伝達反応に大きく関与する<sup>21</sup>)。NADPHの消費が抑制されると葉緑体内部の代謝におけるATP/NADPHのバランスを崩すこととなり、同時にATPの消費の抑制を誘導する<sup>85</sup>)。これらの報告から、今後は光合成電子伝達反応の制御を代謝との関連を密にして考察していく必要があると考えられる。

## 謝辞

今回の総説の執筆の機会を頂きました東京大学大学院 野口航准教授に厚く御礼申し上げます。

Received November 16, 2014, Accepted December 3, 2014,  
Published December 31, 2014

## 参考文献

- 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.
- Arnon, D.I., Whatley, F.R. and Allen, M.B. (1955)

- Vitamin K as a cofactor of photosynthetic phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 16, 607-608.
- Arnon, D.I. (1959) Conversion of light into chemical energy in photosynthesis. *Nature* 184, 10-21.
- 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. USA.* 49, 567-572.
- 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.
- 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.
- 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.
- Shikanai, T. (2007) Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 199-217.
- 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.
- Laisk, A., Eichelmann, H., Oja, V., Talts, E. and Scheibe, R. (2007) Rates and roles of cyclic and alternative electron flow in potato leaves. *Plant Cell Physiol.* 48, 1575-1588.
- Laisk, A., Talts, E., Oja, V., Eichelmann, H. and Peterson, R.B. (2010) Fast cyclic electron transport around photosystem I in leaves under far-red light: a proton-uncoupled pathway? *Photosynth. Res.* 103, 79-95.
- Heber, U. and Walker, D. (1992) Concerning a dual function of coupled cyclic electron transport in leaves. *Plant Physiol.* 100, 1621-1626.
- Heber, U., Gerst, U., Krieger, A., Neimanis, S. and Kobayashi, Y. (1995) Coupled cyclic electron transport in intact chloroplasts and leaves of C<sub>3</sub> plants: Does it exist? if so, what is its function? *Photosynth. Res.* 46, 269-275.
- Heber, U. (2002) Irrungen, Wurrungen? The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C<sub>3</sub> plants. *Photosynth. Res.* 73, 223-231.
- Cornic, G., Bukhov, N.G., Wiese, C., Bligny, R. and Heber, U. (2000) Flexible coupling between light-dependent electron and vectorial proton transport in illuminated leaves of C<sub>3</sub> plants. Role of photosystem I-dependent proton pumping. *Planta* 210, 468-477.
- Joliot, P. and Joliot, A. (2005) Quantification of cyclic and linear flows in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 4913-4918.
- Joliot, P. and Joliot, A. (2002) Cyclic electron transfer in plant leaf. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 10209-10214.
- Joliot, P., Béal, D. and Joliot, A. (2004) Cyclic electron flow under saturating excitation of dark-adapted *Arabidopsis* leaves. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1656, 166-176.
- Sacksteder, C.A. and Kramer, D.M. (2000) Dark-

- interval relaxation kinetics (DIRK) of absorbance changes as a quantitative probe of steady-state electron transfer. *Photosynth. Res.* 66, 145-158.
20. Klughammer, C., Siebke, K. and Schreiber, U. (2013) Continuous ECS-indicated recording of the proton-motive charge flux in leaves. *Photosynth. Res.* 117, 471-487.
  21. Laisk, A., Eichelmann, H., Oja, V., and Peterson, R.B. (2005) Control of cytochrome *b<sub>6</sub>f* at low and high light intensity and cyclic electron transport in leaves. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1708, 79-90.
  22. Hald, S., Nandha, B., Gallois, P. and Johnson, G.N. (2008) Feedback regulation of photosynthetic electron transport by NAD(P)H redox poise. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 433-440.
  23. Miyake, C., Suzuki, Y., Yamamoto, H., Amako, K. and Makino, A. (2012) O<sub>2</sub>-enhanced induction of photosynthesis in rice leaves: the Mehler-ascorbate peroxidase (MAP) pathway drives cyclic electron flow within PSII and cyclic electron flow around PSI. *Soil Sci. Plant Nutr.* 58, 718-727.
  24. Fan, D.Y., Nie, Q., Hope, A.B., Hillier, W., Pogson, B.J. and Chow, W.S. (2007) Quantification of cyclic electron flow around Photosystem I in spinach leaves during photosynthetic induction. *Photosynth. Res.* 94, 347-357.
  25. Vershubskii, A.V., Kuvykin, I.V., Priklonskii, V.I. and Tikhonov, A.N. (2011) Functional and topological aspects of pH-dependent regulation of electron and proton transport in chloroplasts *in silico*. *BioSystems* 103, 164-179.
  26. Kuvykin, I.V., Ptushenko, V.V., Vershubskii, A.V. and Tikhonov, A.N. (2011) Regulation of electron transport in C<sub>3</sub> plant chloroplasts *in situ* and *in silico*: Short-term effects of atmospheric CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1807, 336-347.
  27. Miyake, C., Horiguchi, S., Makino, A., Shinzaki, Y., Yamamoto, H. and Tomizawa, K.I. (2005) Effects of light intensity on cyclic electron flow around PSI and its relationship to non-photochemical quenching of Chl fluorescence in tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.* 46, 1819-1830.
  28. Miyake, C., Shinzaki, Y., Miyata, M. and Tomizawa, K.I. (2004) Enhancement of cyclic electron flow around PSI at high light and its contribution to the induction of non-photochemical quenching of Chl fluorescence in intact leaves of tobacco plants. *Plant Cell Physiol.* 45, 1426-1433.
  29. Miyake, C., Miyata, M., Shinzaki, Y. and Tomizawa, K.I. (2005) CO<sub>2</sub> response of cyclic electron flow around PSI (CEF-PSI) in tobacco leaves—relative electron fluxes through PSI and PSII determine the magnitude of non-photochemical quenching (NPQ) of Chl fluorescence. *Plant Cell Physiol.* 46, 629-637.
  30. Yamori, W., Sakata, N., Suzuki, Y., Shikanai, T. and Makino, A. (2011) Cyclic electron flow around photosystem I via chloroplast NAD (P) H dehydrogenase (NDH) complex performs a significant physiological role during photosynthesis and plant growth at low temperature in rice. *Plant J.* 68, 966-976.
  31. Leegood R.C., Sharkey T.D. and Von Caemmerer, S. (2000) Photosynthesis: Physiology and Metabolism (Vol. 9) Springer, The Netherlands.
  32. Heber, U., Bukhov, N.G., Neimanis, S. and Kobayashi, Y. (1995) Maximum H<sup>+</sup>/hvPSI stoichiometry of proton transport during cyclic electron flow in intact chloroplasts is at least two, but probably higher than two. *Plant Cell Physiol.* 36, 1639-1647.
  33. Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N.A., Engel, A., Stahlberg, H. and Müller, D.J. (2000) Structural biology: proton-powered turbine of a plant motor. *Nature* 405, 418-419.
  34. Yoshida, K., Watanabe, C.K., Terashima, I. and Noguchi, K. (2011) Physiological impact of mitochondrial alternative oxidase on photosynthesis and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 34, 1890-1899.
  35. Kramer, D.M. and Evans, J.R. (2011) The importance of energy balance in improving photosynthetic productivity. *Plant Physiol.* 155, 70-78.
  36. Farquhar, G.D., von Caemmerer, S.V. and Berry, J.A. (1980) A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta* 149, 78-90.
  37. Eichelmann, H., Oja, V., Peterson, R.B. and Laisk, A. (2011) The rate of nitrite reduction in leaves as indicated by O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> exchange during photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 62, 2205-2215.
  38. Tikhonov, A.N. (2013) pH-dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts. *Photosynth. Res.* 116, 511-534.
  39. Kramer, D.M., Sacksteder, C.A. and Cruz, J.A. (1999) How acidic is the lumen? *Photosynth. Res.* 60, 151-163.
  40. Allen, J.F. (2003) Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. *Trends Plant Sci.* 8, 15-19.
  41. Johnson, G. N. (2005) Cyclic electron transport in C<sub>3</sub> plants: fact or artefact? *J. Exp. Bot.* 56, 407-416.
  42. Steigmiller, S., Turina, P. and Gräber, P. (2008) The thermodynamic H<sup>+</sup>/ATP ratios of the H<sup>+</sup>-ATP synthases from chloroplasts and *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 3745-3750.
  43. 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.
  44. Sacksteder, C.A., Kanazawa, A., Jacoby, M.E. and Kramer, D.M. (2000) The proton to electron stoichiometry of steady-state photosynthesis in living plants: a proton-pumping Q cycle is continuously engaged. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 14283-14288.
  45. Avenson, T.J., Cruz, J.A. and Kramer, D.M. (2004) Modulation of energy-dependent quenching of excitons in antennae of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 5530-5535.
  46. Avenson, T.J., Cruz, J.A., Kanazawa, A. and Kramer, D.M. (2005) Regulating the proton budget of higher plant photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 9709-9713.
  47. Furbank, R.T. and Badger, M.R. (1983) Oxygen exchange associated with electron transport and photophosphorylation in spinach thylakoids. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 723, 400-409.
  48. 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.
49. DalCorso, G., Pesaresi, P., Masiero, S., Aseeva, E., Schünemann, 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.
  50. 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. *Molecular Cell* 49, 511-523.
  51. 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.
  52. 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.
  53. Sazanov, L.A., Burrows, P.A. and Nixon, P.J. (1998) The plastid *ndh* genes code for an NADH-specific dehydrogenase: isolation of a complex I analogue from pea thylakoid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 1319-1324.
  54. Gotoh, E., Matsumoto, M., Ogawa, K.I., Kobayashi, Y. and Tsuyama, M. (2010) A qualitative analysis of the regulation of cyclic electron flow around photosystem I from the post-illumination chlorophyll fluorescence transient in Arabidopsis: a new platform for the in vivo investigation of the chloroplast redox state. *Photosynth. Res.* 103, 111-123.
  55. Trouillard, M., Shahbazi, M., Moyet, L., Rappaport, F., Joliot, P., Kuntz, M. and Finazzi, G. (2012) Kinetic properties and physiological role of the plastoquinone terminal oxidase (PTOX) in a vascular plant. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1817, 2140-2148.
  56. Makino, A., Shimada, T., Takumi, S., Kaneko, K., Matsuoka, M., Shimamoto, K., Nakano, H., Miyao-Tokutomi, M., Mae, T. and Yamamoto, N. (1997) Does decrease in ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase by antisense RbcS lead to a higher N-use efficiency of photosynthesis under conditions of saturating CO<sub>2</sub> and light in rice plants? *Plant Physiol.* 114, 483-491.
  57. Fisher, N. and Kramer, D.M. (2014) Non-photochemical reduction of thylakoid photosynthetic redox carriers in vitro: Relevance to cyclic electron flow around photosystem I? *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1837, 1944-1954.
  58. Nandha, B., Finazzi, G., Joliot, P., Hald, S., and Johnson, G. N. (2007) The role of PGR5 in the redox poisoning of photosynthetic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1767, 1252-1259.
  59. Livingston, A.K., Cruz, J.A., Kohzuma, K., Dhingra, A. and Kramer, D. M. (2010) An Arabidopsis mutant with high cyclic electron flow around photosystem I (hcef) involving the NADPH dehydrogenase complex. *Plant Cell* 22, 221-233.
  60. Okegawa, Y., Kagawa, Y., Kobayashi, Y., and Shikanai, T. (2008) Characterization of factors affecting the activity of photosystem I cyclic electron transport in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 49, 825-834.
  61. Miyake, C., Schreiber, U., Hormann, H., Sano, S. and Asada, K. (1998) The FAD-enzyme monodehydroascorbate radical reductase mediates photoproduction of superoxide radicals in spinach thylakoid membranes. *Plant Cell Physiol.* 39, 821-829.
  62. Hayakawa, T., Kanematsu, S. and Asada, K. (1984) Occurrence of Cu, Zn-superoxide dismutase in the intrathylakoid space of spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 25, 883-889.
  63. Ogawa, K.I., Kanematsu, S., Takabe, K. and Asada, K. (1995) Attachment of CuZn-superoxide dismutase to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplasts: detection by immuno-gold labeling after rapid freezing and substitution method. *Plant Cell Physiol.* 36, 565-573.
  64. Miyake, C. and Asada, K. (1992) Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiol.* 33, 541-553.
  65. Miyake, C. and Asada, K. (1994) Ferredoxin-dependent photoreduction of the monodehydroascorbate radical in spinach thylakoids. *Plant Cell Physiol.* 35, 539-549.
  66. Asada, K., Kiso, K. and Yoshikawa, K. (1974) Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination. *J. Biol. Chem.* 249, 2175-2181.
  67. Heber, U., Egneus, H., Hanck, U., Jensen, M. and Köster, S. (1978) Regulation of photosynthetic electron transport and photophosphorylation in intact chloroplasts and leaves of *Spinacia oleracea* L. *Planta* 143, 41-49.
  68. Takahashi, M.A. and Asada, K. (1982) Dependence of oxygen affinity for Mehler reaction on photochemical activity of chloroplast thylakoids. *Plant Cell Physiol.* 23, 1457-1461.
  69. Hormann, H., Neubauer, C. and Schreiber, U. (1994) An active Mehler-peroxidase reaction sequence can prevent cyclic PS I electron transport in the presence of dioxygen in intact spinach chloroplasts. *Photosynth. Res.* 41, 429-437.
  70. Egneus, H., Heber, U., Matthiesen, U. and Kirk, M. (1975) Reduction of oxygen by the electron transport chain of chloroplasts during assimilation of carbon dioxide. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 408, 252-268.
  71. Müller, P., Li, X.P. and Niyogi, K.K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125, 1558-1566.
  72. Ziem-Hanck, U. and Heber, U. (1980) Oxygen requirement of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation. *Biochem. Biophys. Acta.* 591, 266-274.
  73. 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.
  74. Hormann, H., Neubauer, C., Asada, K. and Schreiber, U. (1993) Intact chloroplasts display pH 5 optimum of O<sub>2</sub>-reduction in the absence of methyl viologen:

- indirect evidence for a regulatory role of superoxide protonation. *Photosynth. Res.* 37, 69-80.
75. Forti, G. and Ehrenheim, A.M. (1993) The role of ascorbic acid in photosynthetic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1183, 408-412.
  76. Forti, G. and Elli, G. (1996) Stimulation of photophosphorylation by ascorbate as a function of light intensity. *Plant Physiol.* 112, 1509-1511.
  77. 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.
  78. 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.
  79. 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.
  80. Shirao, M., Kuroki, S., Kaneko, K., Kinjo, Y., Tsuyama, M., Förster, B., Takahashi, S. and Badger, M.R. (2013) Gymnosperms have increased capacity for electron leakage to oxygen (Mehler and PTOX reactions) in photosynthesis compared with angiosperms. *Plant Cell Physiol.* 54, 1152-1163.
  81. Clarke, J.E., and Johnson, G.N. (2001) In vivo temperature dependence of cyclic and pseudocyclic electron transport in barley. *Planta* 212, 808-816.
  82. Kanazawa, A. and Kramer, D.M. (2002) In vivo modulation of nonphotochemical exciton quenching (NPQ) by regulation of the chloroplast ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 12789-12794.
  83. Takizawa, K., Kanazawa, A. and Kramer, D.M. (2008) Depletion of stromal Pi induces high 'energy-dependent' antenna exciton quenching (qE) by decreasing proton conductivity at CF<sub>0</sub>-CF<sub>1</sub> ATP synthase. *Plant Cell Environ.* 31, 235-243.
  84. Kohzuma, K., Dal Bosco, C., Kanazawa, A., Dhingra, A., Nitschke, W., Meurer, J. and Kramer, D.M. (2012) Thioredoxin-insensitive plastid ATP synthase that performs moonlighting functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 3293-3298.
  85. Livingston, A.K., Kanazawa, A., Cruz, J.A. and Kramer, D.M. (2010) Regulation of cyclic electron flow in C<sub>3</sub> plants: differential effects of limiting photosynthesis at ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Plant Cell Environ.* 33, 1779-1788.

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

Daisuke Takagi, Chikahiro Miyake\*

Graduate School of Agricultural Science, Kobe University