

博士論文概要

論文題目

Characteristics of photosynthesis in cyanobacteria
probed by chlorophyll fluorescence measurements

クロロフィル蛍光測定により明らかになった
シアノバクテリアの光合成の特徴

申請者

Takako	OGAWA
小川	敬子

生命理工学専攻 植物生理生化学研究

2016年12月

《背景》シアノバクテリアにおける代謝系間相互作用とその解析方法

真正細菌のシアノバクテリア、いわゆる藍藻は、植物細胞で光合成を担うオルガネラの葉緑体と共通祖先を持ち、陸上植物と同様に酸素発生型光合成を行う。一方で、原核生物であるシアノバクテリアはオルガネラを持たないため、細胞内には光合成のみならず全ての代謝経路が混在しており、原理的には光合成と他の代謝系とは相互に作用し得る状態にある。そのため、光合成反応のプロセスは葉緑体と同じながら、シアノバクテリアは葉緑体とは異なった光合成特性を示すことが考えられる。そのようなシアノバクテリアにおいて各代謝経路が光合成に与える影響を調べるにあたり直面する問題が、その測定方法である。代謝系間の相互作用は広範囲に渡るものであり、それが光合成にどのような影響を及ぼすか予測できない場合、例えば光化学系Ⅱにおける酸素発生といった特定の光合成反応を測定するだけでは、その全体像を把握することは困難である。

このような問題の解決の糸口となるのが、光合成色素のクロロフィルが放出する蛍光である。クロロフィルに吸収された光エネルギーは全てが光合成には使われず、余剰なエネルギーは熱や蛍光として細胞外に放出される。すなわち吸収された光エネルギーは、光合成に使われたエネルギー、熱として放散されたエネルギー、蛍光として放出されたエネルギーの和であり、励起エネルギーが一定である時のクロロフィル蛍光の増減は、励起エネルギーの内どれだけが熱となったかあるいは光合成に使われたかを反映している。クロロフィル蛍光の測定は簡便かつ非破壊的に行うことが出来るため、細胞内の代謝系の状態を変化させることなくその影響を反映した光合成の状態を測定することができる。

そこで本研究では、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における光合成と他の代謝系との相互作用に着目し、クロロフィル蛍光測定を主な手段としてそのメカニズムの解明を行った。具体的には、呼吸が光合成に与える影響（第1章）、二酸化炭素濃縮機構が光合成に与える影響（第2章）に着目し、また、そのような代謝系間の相互作用が存在するシアノバクテリアにおいて現行のクロロフィル蛍光測定法が適切であるかを検証した（第3章）。

《第1章》呼吸が光合成に与える影響

シアノバクテリアで見られる代謝系相互作用の中でも、呼吸と光合成はプラストキノン（PQ）などの電子伝達成分の一部を共有 [Peschek and Schmetterer (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108: 1188-1195] している典型的な例である。シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の500以上の遺伝子破壊株について暗所に置いた細胞に励起光を照射した時のクロロフィル蛍光の時系列変化が調べられており [Ozaki et al. (2007) *Plant Cell Physiol.* 48: 451-458]、中でも野生株と最も大きな差を示すのが、呼吸鎖でPQプールに電子を供与するNAD(P)H脱水素酵素（NDH-1）複合体のサブユニットをコードする遺伝子 *ndhF1* [Battchikova et al.

(2011) *Biochim. Biophys. Acta* 1807: 935-944] の破壊株 ($\Delta ndhF1$) である。呼吸は光合成と電子伝達鎖を共有しているものの、その電子伝達最大活性は光合成の 10 分の 1 程度と小さく、あらゆる代謝系の中で呼吸の抑制が細胞のクロロフィル蛍光に最も大きな影響を与えることは驚くべきことである。

光合成に対し活性の小さい呼吸がどのようにしてクロロフィル蛍光に影響を与えているのかを明らかにするため $\Delta ndhF1$ の解析を行ったところ、 $\Delta ndhF1$ では呼吸が優位な暗所下で PQ プールは酸化状態にあり、光合成電子伝達の影響を受ける明所下でもその酸化状態は維持されていることが分かった。PQ プールの酸化還元状態は 2 つの光化学系間のエネルギー分配機構を調節していることが知られており、このことから、 $\Delta ndhF1$ における呼吸の状態の変化を原因とする PQ プールの酸化がクロロフィル蛍光に影響を与えているのではないかと考えた。そこで呼吸鎖末端酸化酵素の阻害剤である KCN を添加したところ、 $\Delta ndhF1$ のクロロフィル蛍光の時系列変化のピークは野生株と同じレベルになったことから、PQ プールの酸化還元状態がいわば「てこ」の働きをすることによって光合成に対し低い活性の呼吸がクロロフィル蛍光に影響を与えていると考えられる。

《第 2 章》二酸化炭素濃縮機構が光合成に与える影響

呼吸は電子伝達鎖の共有を通して光合成に直接的に関与しているが、これは代謝系相互作用の中でも特殊な例である。そこで、呼吸以外の代謝系は光合成にどのようにして影響を与えているかを確かめるため、*ndhF1* 遺伝子と同じく NDH-1 複合体のサブユニットをコードするが、呼吸ではなく二酸化炭素濃縮機構に関与する *ndhF3/F4* 遺伝子の破壊株 ($\Delta ndhF3/F4$) について解析を行った。

二酸化炭素濃縮機構が阻害された $\Delta ndhF3/F4$ で生じることとして当初想定されたのは、二酸化炭素固定の還元力として使われる NADPH の消費量が低下することにより光合成電子伝達鎖が還元され、結果として明所下で PQ プールの還元が見られることである。しかし予想に反し、 $\Delta ndhF3/F4$ の PQ プールは明所で酸化されていることが明らかになった。この原因を調べたところ、 $\Delta ndhF3/F4$ において無機炭素源の枯渇を引き金とする光化学系 I 量の増加が PQ プールの酸化をもたらしていることが分かった。これらの結果から、呼吸に従事する *ndhF1* 遺伝子の破壊の影響が PQ プールの酸化を通じた光化学系間のエネルギー分配調節という短期的応答として現れたのに対し、二酸化炭素濃縮機構に従事する *ndhF3/F4* 遺伝子の破壊の影響は光化学系 I 量の増加という長期的な順化を引き起こすものであることが明らかとなった。

《第 3 章》シアノバクテリアのクロロフィル蛍光測定上の問題点とその解決法

上述のような光合成と他の代謝系との相互作用から、シアノバクテリアにおけるクロロフィル蛍光測定では光合成以外の代謝系の状態の変化が反映されている

結果を見ている可能性が考えられる。裏を返せばそれは、代謝系間の相互作用がシアノバクテリアでのクロロフィル蛍光測定による光合成の正確な評価を妨害しているということである。そこで、呼吸系の *ndhF1* 遺伝子の破壊株を用い上記の問題を検証したところ、光化学系Ⅱでの酸素発生から直接測定した光合成電子伝達速度は野生株よりも低かったにも関わらず、クロロフィル蛍光測定により見積もった光合成電子伝達速度は野生株を上回ることが分かった。このような矛盾した測定結果は、シアノバクテリアではクロロフィル蛍光測定による正確な光合成の状態の評価ができていないことを意味するものである。クロロフィル蛍光測定を用いた場合に見られた *ndhF1* 遺伝子破壊による見かけの光合成活性の増大は、シアノバクテリアにおいて光化学系Ⅰを選択的に励起する青色光を測定中にバックグラウンドで照射することによって抑制され、実際の値に近づくことが分かった。

シアノバクテリアにおけるクロロフィル蛍光測定上の問題は、上述した代謝系間相互作用の影響だけに留まらない。光化学系Ⅱの集光アンテナ色素であるフィコビリリンからの蛍光は光合成の状態によらず一定であり、それがクロロフィル蛍光測定のシグナルに上乘せされることも、シアノバクテリアでクロロフィル蛍光測定により見積もった光合成活性が実際の状態を反映しないことの原因の一つに挙げられる [Campbell et al. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 667-683]。この問題を解決するため、呼吸電子伝達が光合成に与える影響が最大となる暗所下と、最小となる青色光照射下でのクロロフィル蛍光測定におけるシグナルの大きさの変化から、蛍光シグナルのうち呼吸の状態の変化を反映しないフィコビリリン蛍光の大きさを算出する方法を考案した。この方法により算出したフィコビリリン蛍光の大きさは細胞内のフィコビリリン含量を反映していた。更に、クロロフィル蛍光測定により見積もられるシアノバクテリアの光化学系Ⅱの最大量子収率は、フィコビリリン蛍光の影響を受けて陸上植物の6割程度に低く見積もられていたのが、算出したフィコビリリン蛍光の大きさを蛍光シグナルから差し引くことによって陸上植物と同程度となった。このことから、陸上植物とシアノバクテリアの間で見られた光化学系Ⅱ最大量子収率の差は見かけのものであり、酸素発生型の光合成生物の間で、光合成の最大収率はよく保存されていることが分かった。

《 総括 》

本研究により、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 において呼吸や二酸化炭素濃縮機構の状態の変化が光合成の応答や順化を引き起こしていることが明らかとなった。これは、シアノバクテリアでは光合成機構の調節に光合成以外の代謝系が深く関与していることを意味する。また、本研究で明らかにしたシアノバクテリアにおけるクロロフィル蛍光測定上の問題とその解決策は、今後のシアノバクテリアにおける光合成研究に大きく寄与するものと考えられる。

早稲田大学 博士 (理学) 学位申請 研究業績書

氏名 小川 敬子 印

(2016年11月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む)
論文 ○	<p>[1] Takako Ogawa and Kintake Sonoike (2016) Effects of bleaching by nitrogen deficiency on the quantum yield of photosystem II in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 revealed by chlorophyll fluorescence measurements. <i>Plant & Cell Physiology</i> 57: 558-567</p> <p>[2] Yoshiki Nishijima, Yu Kanasaki, Hirofumi Yoshikawa, Takako Ogawa, Kintake Sonoike, Yoshitaka Nishiyama and Yukako Hihara (2015) Analysis of spontaneous suppressor mutants from the photomixotrophically grown <i>pmgA</i>-disrupted mutant in the cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803. <i>Photosynthesis Research</i> 126: 465-475</p> <p>[3] Takako Ogawa and Kintake Sonoike (2015) Dissection of respiration and photosynthesis in the cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 by the analysis of chlorophyll fluorescence. <i>Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology</i> 144: 61-67</p> <p>○ [4] Takako Ogawa, Tetsuyuki Harada, Hiroshi Ozaki and Kintake Sonoike (2013) Disruption of the <i>ndhF1</i> gene affects chlorophyll fluorescence through state transition in the cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, resulting in the apparent high efficiency of photosynthesis. <i>Plant & Cell Physiology</i> 54: 1164-1171</p>
講演	<p>※発表者に★印を付す。 (国際会議・口頭)</p> <p>[1] ★Takako Ogawa, Kenta Suzuki and Kintake Sonoike “Respiration affects photosynthesis through the reducing side of photosystem I in cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803” Finnish-Japanese symposium 2016 (Saariselkä, Finland), 09/2016 (国際会議・ポスター)</p> <p>[1] ★Takako Ogawa and Kintake Sonoike “Problems and its exploitation of chlorophyll fluorescence measurement in cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803” 15th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (Tübingen, Germany), 08/2015 (国内学会・口頭)</p> <p>[1] ★小川敬子、鈴木健太、園池公毅「シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 における翻訳関連遺伝子の破壊がクロロフィル蛍光に与える影響」 第 57 回日本植物生理学会年会 (岩手大学上田キャンパス)、2016 年 3 月</p> <p>[2] ★小川敬子、鈴木健太、園池公毅「クロロフィル蛍光測定から見えるシアノバクテリアの代謝系相互作用」 第 56 回日本植物生理学会年会 (東京農業大学世田谷キャンパス)、2015 年 3 月</p> <p>[3] ★小川敬子、園池公毅「クロロフィル蛍光測定によるシアノバクテリアの呼吸および CO₂ 取込み能の解析」 第 55 回日本植物生理学会年会 (富山大学五福キャンパス)、2014 年 3 月</p> <p>[4] ★小川敬子、小川晃男、池内昌彦、原田哲行、園池公毅「シアノバクテリアの NADH 脱水素酵素複合体がプラストキノンプールの酸化還元状態に与える影響」 日本植物学会第 76 回大会 (兵庫県立大学姫路書写キャンパス)、2012 年 9 月</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	<p>(国内学会・ポスター)</p> <p>[1] ★<u>小川敬子</u>、鈴木健太、園池公毅「シアノバクテリアにおける翻訳関連遺伝子の破壊の影響は光化学系 I 還元側を通してクロロフィル蛍光に反映される」 日本植物学会第 80 回大会（沖縄コンベンションセンター）、2016 年 9 月</p> <p>[2] ★<u>小川敬子</u>、鈴木健太、園池公毅「シアノバクテリアにおけるタンパク質翻訳の阻害は呼吸活性を上昇させる」 第 7 回日本光合成学会年会および公開シンポジウム（東京理科大学葛飾キャンパス）、2016 年 5 月</p> <p>[3] ★<u>小川敬子</u>、園池公毅「フィコビリニン量によらずシアノバクテリアの光化学系 II 量子収率をクロロフィル蛍光により見積もる方法」 藍藻の分子生物学 2015（かずさアカデミアホール）、2015 年 11 月</p> <p>[4] ★<u>小川敬子</u>、園池公毅「窒素欠乏条件下におけるシアノバクテリアの光合成量子収率の新しい評価法による解析」 第 6 回日本光合成学会年会および公開シンポジウム（岡山国際交流センター）、2015 年 5 月</p> <p>[5] ★<u>小川敬子</u>、園池公毅「シアノバクテリアの NPQ の光強度依存性を決める要因の解析」 第 5 回日本光合成学会年会および公開シンポジウム（近畿大学農学部奈良キャンパス）、2014 年 5 月</p> <p>[6] ★<u>小川敬子</u>、園池公毅「シアノバクテリアの <i>ndhF1</i> 遺伝子の破壊は光合成速度を見かけ上高くする」 第 4 回日本光合成学会年会および公開シンポジウム（名古屋大学）、2013 年 5 月</p>
その他	<p>(国際会議・口頭)</p> <p>[1] Masahiro Misumi, <u>Takako Ogawa</u>, Hiroshi Katoh, Tatsuya Tomo and ★Kintake Sonoike “Probing cyanobacterial redox and energy distribution by chlorophyll fluorescence” Finnish-Japanese symposium 2016 (Saariselkä, Finland), 09/2016</p> <p>[2] Masahiro Misumi, <u>Takako Ogawa</u>, Hiroshi Katoh, Tatsuya Tomo and ★Kintake Sonoike “Variation of redox state of plastoquinone pool in cyanobacteria revealed by photochemical and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence” International Conference Photosynthesis Research for Sustainability (Pushchino, Russia), 06/2016</p> <p>[3] <u>Takako Ogawa</u>, Kenta Suzuki, Ayaka Aoki, Masahiro Misumi and ★Kintake Sonoike “Effects of metabolic modification on the redox state of photosynthetic electron transfer in cyanobacteria” The German-Japanese Binational Seminar 2015 "Harvesting Light: From light to biotechnological products" (Atami, Japan), 05/2015</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
その他	<p>(国際会議・口頭)</p> <p>[4] Takako Ogawa, Teruo Ogawa, Masahiko Ikeuchi and ★Kintake Sonoike “Effect of cyanobacterial NDH complex on the redox state of plastoquinone pool” Japanese-Finnish Seminar 2012 “Photosynthetic Research for Sustainable Energy Production” (Naantali, Finland), 09/2012</p> <p>[5] ★Kintake Sonoike, Takako Ogawa, Tetsuyuki Harada and Hiroshi Ozaki “Probing metabolic interactions in cyanobacterial cells by chlorophyll fluorescence measurements” Binational Seminar Germany-Japan “Microalgal Products: From Metabolic Fundamentals to Promising Applications” (Freiburg, Germany), 10/2011</p> <p>(国際会議・ポスター)</p> <p>[1] Takako Ogawa, Masahiro Misumi and ★Kintake Sonoike “Estimation of photosynthesis by chlorophyll fluorescence measurements of cyanobacteria and eukaryotic algae” 17th International Congress on Photosynthesis Research: Photosynthesis in a Changing World (MECC Maastricht, The Netherlands), 08/2016</p> <p>(国内学会・口頭)</p> <p>[1] ★園池公毅、三角将洋、鈴木健太、小川敬子、加藤浩、鞆達也「シアノバクテリアと藻類における呼吸と光合成の相互作用」 日本植物生理学会第 57 回年会（岩手大学上田キャンパス）、2016 年 3 月</p> <p>[2] ★鈴木健太、青木彩夏、小川敬子、園池公毅「シアノバクテリアにおいて呼吸基質が光合成電子伝達に与える経路の解明」 日本植物学会第 79 回大会（新潟コンベンションセンター）、2015 年 9 月</p> <p>[3] 小川敬子、★園池公毅「NDH 複合体の変異が光合成に与える影響」 ラン藻の分子生物学 2013（かずさアカデミアホール）、2013 年 11 月</p> <p>(国内学会・ポスター)</p> <p>[1] ★鈴木健太、小川敬子、園池公毅「シアノバクテリアの呼吸鎖におけるプラストキノンへの電子供給経路の解析」 日本植物学会第 78 回大会（明治大学生田キャンパス）、2014 年 9 月</p> <p>(競争的資金)</p> <p>[1] 平成 26-28 年度 日本学術振興会特別研究員奨励費 DC1 (250 万円) 「クロロフィル蛍光を用いたシアノバクテリアの代謝系相互作用の定量的解析」</p>