

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文審査報告書

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

2017年2月

光合成の反応は、地球生態系のエネルギー的基盤をなすものであり、ほぼすべての生物の究極的なエネルギー源となっている。光合成は、現在の生態系を支えているのみならず、過去の光合成反応によって集積された有機物を通じて、化石燃料として現代文明をも支えている。一方で、近年の化石燃料の大量消費による有機物酸化は、生態系の光合成による有機物固定によって補償できるレベルを超え、結果として有機物に蓄積されていた炭素を、二酸化炭素として大気中に放出することになった。このことは地球生態系と人類の文明の存続に重大な疑念をもたらしている。このような状況を改善するための方向性として、一方で生態系の正確な把握のために地球上の光合成速度を見積もる努力がなされ、他方で、藻類などに油脂などを生産させて人類のエネルギー源とする研究が進められている。このような研究において、自然界では海洋の光合成生産のほとんどを占め、産業的には光合成的な油脂生産のプラットフォームとして期待されている藻類の光合成速度を正確に測定することは喫緊の課題となっている。

ところが、真核藻類や原核光合成生物であるシアノバクテリアの場合、光合成を適切に見積もるにあたって重大な問題点があることが指摘されてきている。従来から光合成の測定は、酸素の発生や二酸化炭素の吸収といったガス交換の手法により行われてきたが、1990年代以降、これに加えて光合成色素であるクロロフィルからの蛍光を測定することにより光合成の効率や速度を見積もる方法が急速に普及した。クロロフィル蛍光測定は、極めて簡便であり、測定対象が陸上植物の葉であっても、藻類細胞の懸濁液であっても、ほとんど測定機器のスイッチを入れるだけで光合成の測定が可能である。そこで光合成の研究者だけではなく、世界中の植物研究者や生態学研究者に広く利用されるようになった。一方で、その測定手法は主に陸上植物の葉を想定して開発されており、シアノバクテリアを含む藻類を対象とした場合には、必ずしも正確な光合成を反映した測定結果にならないことが知られている。

このような状況を鑑み、本博士論文では、材料として原核光合成生物であるシアノバクテリアを取り上げ、クロロフィル蛍光による光合成の見積もりが、原核生物に特有な細胞内の代謝の相互作用の影響をどのように受けるかを明らかとし、そのような影響を排除して光合成を正確に測定するためにはどのような手法が必要であるのかを明らかにしている。本論文は、研究成果を詳述した3つの章に、**General Introduction**と**General Discussion**が加わる形になっている。以下のそれぞれのパートに分けて審査結果を述べる。

General Introductionには、上に述べたような研究の背景が述べられている。背景の紹介はきちんとなされており、専門分野の文章としては問題ないと考えられる。博士論文の最終版では、分野外の研究者にとってもわかりやすい文章とするべく、ステート遷移の実態などの概念図を取り入れるなどの工夫がされている。

第 1 章においては、呼吸の電子伝達鎖に関わる NDH-1 複合体のサブユニットを欠損したシアノバクテリアを用いて、呼吸が光合成とクロロフィル蛍光測定に与える影響を解析している。サブユニットの一つ NdhF1 をコードする *ndhF1* 遺伝子の破壊株では、クロロフィル蛍光により測定した光合成速度が野生株より高い一方で、酸素の発生速度により測定した光合成速度は逆に野生株の方が高いことが示された。この結果は、シアノバクテリアの蛍光測定による光合成の見積もりに重大な問題があることを示している。その原因を追究した結果、野生株では、呼吸鎖の電子伝達から光合成電子伝達において、光化学系 I と光化学系 II の間をつなぐプラストキノンプールが還元され、結果として光合成の調節メカニズムの一つであるステート遷移が誘導されていることが明らかとなった。陸上植物では酸化されている暗条件下のプラストキノンプールが、シアノバクテリアでは還元されていることによりステート遷移の影響を受け、結果として光化学系 II の最大量子収率が低く見積もられるという、ステート遷移がいわば「てこ」として働くことにより呼吸の影響が光合成測定に大きな影響を与えるメカニズムが明らかとなった。第 1 章の研究成果は、Ogawa et al. (2013) *Plant & Cell Physiology* 54: 1164-1171 として公表され、すでに 10 回以上引用されている。この章についても、グラフの縦軸の説明などが光合成を専門としないものにとっては不親切であるとの指摘がなされ、博士論文は指摘に従って修正された。

第 2 章では、呼吸の電子伝達鎖のように光合成との直接的な相互作用が存在しない場合にも、細胞内の代謝反応が光合成に影響を与えるのかどうかについて検討している。第 1 章で検討した呼吸に関わる NDH-1 複合体は、一部のサブユニットが置き換わることにより、細胞外より無機炭素を細胞に取り込む無機炭素濃縮系 (carbon concentrating mechanism: CCM) として機能する。この CCM に関わる *ndhF3/F4* 遺伝子の破壊株は、*ndhF1* 遺伝子の破壊株とも、野生株とも、大きく異なるクロロフィル蛍光挙動を示した。このことは、遺伝子の変異が代謝系の間接的な相互作用を通して、光合成とクロロフィル蛍光測定に影響を与えていることを示している。逆に言えば、光合成だけではなく、他の代謝系の状態をもクロロフィル蛍光測定により見積もることができることを示唆する。実際に、クロロフィル蛍光のパラメータの一つである NPQ (non-photochemical quenching) の励起光強度依存性から、CCM の状態を推定する方法が考案された。さらに、CCM の変化がクロロフィル蛍光測定に影響を与えるメカニズムを検討し、細胞内の無機炭素の供給状態が、光化学系 I と光化学系 II の量比の変化を引き起こし、この馴化応答がプラストキノンプールのレドックス状態の変化を通してクロロフィル蛍光の変化を引き起こしていることを明らかにしている。第 2 章の研究成果は、Ogawa and Sonoike (2015) *Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology* 144: 61-67 として公表されている。

以上の結果から、細胞内の代謝が光合成の状態とクロロフィル蛍光とに影響を与えることが明らかとなったが、このことは、クロロフィル蛍光による光合成の見積もりが、細胞内の代謝などの影響によって妨害される可能性が高いことを示唆する。これを明らかにするために、第3章では、細胞内の状態がクロロフィル蛍光測定にどのような影響を与えるかを解析し、また、その影響下においても正確に光合成を見積もる測定方法の開発を行っている。具体的には、上記のステート遷移による光合成の収率の見積もりの妨害を、細胞に青色光を照射することにより除去する方法を確立し、さらに、シアノバクテリアが持つ光合成色素であるフィコビリンの蛍光によるクロロフィル蛍光測定の妨害を除去する計算式を考案している。第3章の研究成果は、**Ogawa and Sonoike (2016) Plant & Cell Physiology 57: 558-567** として公表されている。

これらの研究成果を受けて、**General Discussion** においては、呼吸の光合成への影響と **CCM** の光合成への影響について、それぞれ短期的馴化応答であるステート遷移と長期的馴化応答である光化学系量比調節という2つの異なるメカニズムに依存しているという視点から議論している。また、本研究が、今後の光合成研究および藻類研究へ与えるインパクトについても議論されている。

以上をまとめると本研究は、シアノバクテリアにおける光合成とその他の代謝反応の間の相互作用を丁寧に解析することにより、光合成の測定方法の問題点を浮き彫りにし、さらにその問題点を解決する手法を提案しており、シアノバクテリアを含む藻類の光合成研究の今後の進展に大きく寄与するものであると認められる。よって本論文は博士（理学）の学位論文として相応しいものであると認める。

2017年2月

審査員

主査 早稲田大学教授 理学博士（東京大学） 園池公毅

早稲田大学教授 理学博士（早稲田大学） 中村正久

早稲田大学教授 理学博士（早稲田大学） 伊藤悦朗

早稲田大学教授 博士（理学）（名古屋大学） 岩崎秀雄