

藻類における呼吸が光合成に与える影響

The influence of respiration on photosynthesis in algae

2020年2月

三角 将洋
Masahiro MISUMI

藻類における呼吸が光合成に与える影響

The influence of respiration on photosynthesis in algae

2020年2月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
生命理工学専攻 植物生理生化学研究

三角 将洋
Masahiro MISUMI

目次

目次	1
略称	2
緒言	4
1章 シアノバクテリアにおいて呼吸の光合成への影響には種間差が存在する	6
2章 ステート遷移の能力が欠損しているとされていた変異株の再検討	15
3章 真核藻類である灰色藻においても葉緑体呼吸の光合成への影響が見られる	24
総合考察	31
謝辞	33
参考文献	34
研究業績書	40

略称

略称

AOX	alternative oxidase
ApcD, ApcF	terminal phycobilisome emitters
Chl	chlorophyll (クロロフィル)
CpcG1	PC-associated, rod-core linker of PBS
Crpgr1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> proton gradient regulator-like protein 1
CYD	cytochrome <i>bd</i> quinol oxidase
Cyt <i>b₆f</i>	cytochrome <i>b₆f</i> complex
Cyt <i>c_M</i>	cytochrome <i>c_M</i>
DBMIB	2, 5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone
DCMU	3-(3, 4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea
Flv	flavodiiron protein
KCN	potassium cyanide
LHCII	light-harvesting chlorophyll protein complex II
NAD(P)H	nicotinamide-adenine dinucleotide (phosphate)
NDA2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> の type 2 NAD(P)H dehydrogenase の 1 つ
NDH-1	type 1 NAD(P)H dehydrogenase
OCP	orange carotenoid protein
OD	optical density
PAM	Pulse amplitude modulation (パルス振幅変調)
PBS	phycobilisome (フィコビリソーム)
PC	phycocyanin (フィコシアニン)
PGR5	PROTON GRADIENT REGULATION 5
PPH1	protein phosphatase 1
PQ	plastoquinone (プラストキノン)
PSI	photosystem I (光化学系 I)

略称

PSII	photosystem II (光化学系 II)
PTOX	plastid terminal oxidases
RISE	reduction-induced suppression of electron flow
RpaC	regulator of phycobilisome association C
SDH	succinate dehydrogenase
STN7	state transition 7
TAP38	thylakoid-associated phosphatase of 38 kDa
WT	wild-type (野生株)

クロロフィル蛍光測定に関する略称の説明

F _o	暗所下で測定光のみで得られる蛍光強度
F _m	PQ プールを酸化状態にして得られる最大の蛍光強度
F _m '	励起光を照射した際に得られる最大の蛍光強度
F _m ' _{dark}	暗所下で得られる最大の蛍光強度
F _s	励起光照射時における安定した状態の蛍光強度
F _v /F _m	$(F_m - F_o)/F_m$ によって算出される PSII の最大量子収率を表す光合成パラメーター
$(F_v'/F_m')_{\text{dark}}$	$(F_m'_{\text{dark}} - F_o)/F_m'_{\text{dark}}$ によって算出される暗所下での PSII の量子収率
Φ_{NPQ}	$F_s/F_m' - F_s/F_m$ によって算出される吸収したエネルギーの中で制御されて熱として放散される割合を表す光合成パラメーター
AL	励起光
ML	測定光

緒言

光合成生物は呼吸と光合成を行っており、この2つは生存において最も重要な代謝である。呼吸は有機物を二酸化炭素と水に分解してエネルギーを得る反応である一方で、光合成は色素により吸収した光エネルギーを用いて、水と二酸化炭素から有機物を作る反応である。つまり呼吸と光合成は基質と生成物が入れ替わっている反応であり、その両反応が生物内、ひいては同じ細胞内で同時に行われている以上、お互いに影響を与え得る。この関係性は少なくとも酸素発生型の光合成生物が出現した約 25 億年前 (Kopp et al. 2005) から始まる。こうした途方もなく長い時間がもたらす進化の自然選択 (Darwin 1859) の中で、呼吸と光合成はどのように相互作用してきたのだろうか。本論文における 1 章から 3 章までの研究は、原核光合成生物であるシアノバクテリアと真核光合成生物である灰色藻において呼吸が光合成に与える影響を調べることで、呼吸と光合成の相互作用の進化についての理解を深めることを目的としている。

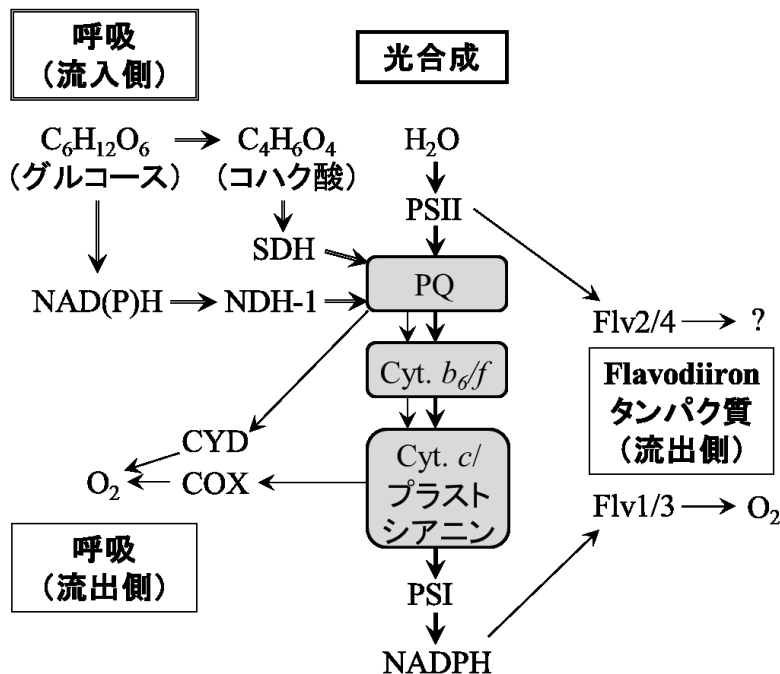


図 1: シアノバクテリア (*Synechocystis* sp. PCC6803) の呼吸と光合成の電子伝達系の模式図
矢印は電子の流れを示し、灰色に塗られている部分は呼吸と光合成が共有している部分を示す。

シアノバクテリアは真核光合成生物と同様に酸素発生型の光合成を行う。一方でオルガネラを持たず、呼吸と光合成の電子伝達鎖が 1 枚の膜上で同時に行われ、かつプラストキノン (PQ) プールを含む電子伝達成分の一部を共有している (Aoki and Katoh 1982, Peschek and Schmetterer 1982)

(図 1、Ogawa et al. 2017 を参考)。このためシアノバクテリアは、呼吸と光合成の間で直接の相互作用を示す。例えば、暗所下において、カルビン・ベンソン回路で用いられるリブローズ-1, 5-ビスリン酸が呼吸によって産生されることにより、明所に移した際の光合成の活性化が早くなることが報告されている (Shimakawa et al. 2014)。また、呼吸による PQ プールへの電子の流入により、暗所下でも PQ プールは還元状態に保たれる (Mi et al. 1992)。PQ プールは、2 つの光化学系の間に位置することから、その酸化還元状態は、光合成における様々な制御に関与し、2 つの光化学系の励起バランスの維持に貢献している。

緒言

ステート遷移と呼ばれるメカニズムも、PQプールの酸化還元状態を反映して、光合成を制御する機構の1つである。ステート遷移は、短期的な光環境の変化に対応して光合成における2つの光化学系の励起バランスを調整することで、円滑な電子伝達を支えている (Allen et al. 1981)。例えば、強光下では、光化学系II (PSII) からの過剰な電子がPQプールを還元する。このとき、PQプールの還元を反映して集光性アンテナタンパク質からのエネルギー分配が秒から分スケールの速さで調整され、PSIIより光化学系I (PSI) にエネルギーが流れるステート2と呼ばれる状態になる。その結果、光合成電子伝達鎖の最も上流に存在するPSIIの量子収率は低下し、光合成全体の効率もまた低下する。吸収した光エネルギーは、光合成の効率が低下した分、PSIにおいて熱として放散される。このステート遷移は、シアノバクテリアから陸上植物まで、幅広く光合成生物が持つ光環境応答メカニズムである。しかし陸上植物の場合は、種によらずPQプールは暗所で酸化的である (Bellafiore et al. 2005, Kruk and Karpinski 2006, Trouillard et al. 2012) のに対して、シアノバクテリアにおいてはPQプールは上記のように暗所下でも呼吸鎖の作用によって還元されている。シアノバクテリアは葉緑体の祖先と考えられており、酸素発生型の光化学系反応中心は陸上植物の葉緑体にいたるまで高度に保存されている (Renger and Renger 2008)。それにも拘わらず、暗所でのシアノバクテリアのPQプールの還元典型的にみられるように、シアノバクテリアと陸上植物の間では、光環境に対する光合成効率の制御様式には大きな差がみられる (Campbell et al. 1998)。原核生物であるシアノバクテリアから、真核生物である藻類を経て、陸上植物に至る進化の道筋においては、呼吸と光合成の相互作用は大きく変容してきたはずである。さらに、シアノバクテリアで見られる相互作用は、暗所や弱光下における光合成効率を下げる結果となる。しかし、この相互作用に生理学的意義があるのかどうかは明らかになっていない。

そこで本研究では、呼吸と光合成の相互作用の進化の解明を最終的な目的として据え、呼吸が光合成電子伝達系と共有するPQプールを還元状態にすることの重要性に着目して研究を進めた。呼吸のPQプールの酸化還元状態への影響は、ステート遷移を介して光合成効率に影響を与えるため、クロロフィル蛍光測定を用いて非破壊的に評価を行うことが可能である。1章では様々な背景を持つ複数のシアノバクテリアにおいて、呼吸の光合成に与える影響について比較を行った。その結果、呼吸がPQプールの酸化還元状態に与える影響には、大きな種間差が存在し、従来、暗所で酸化的なPQプールを持つとされてきたシアノバクテリアの中にも、陸上植物と同様に酸化的なPQプールを持つ種があることが明らかとなった。2章ではステート遷移能の欠損株として知られる $\Delta psk2$ (Fujimori et al. 2005) における呼吸の光合成への影響について調べた。その結果、 $\Delta psk2$ の表現型は実はステート遷移の欠損によるものではなく、呼吸の周辺の何らかの欠損に起因していることが明らかとなった。3章では、最もシアノバクテリアに似た葉緑体を持つ真核藻類の灰色藻を用いて、暗所でのPQプールの酸化還元状態を調べ、シアノバクテリアとの比較を行った。その結果、灰色藻においては、シアノバクテリアで見られる光合成と呼吸の間の強い相互作用が見られ、葉緑体とミトコンドリアに光合成と呼吸が局在する真核生物においても、両者の間の相互作用が保存されていることが明らかとなった。1章から3章までの結果から、呼吸と光合成の間の相互作用は、シアノバクテリアから真核藻類への進化の過程においても保存されている一方、暗い環境に生育するシアノバクテリアにおいては失われていることから、この相互作用の生理学的意義は、円滑な光環境応答にあるのではないかと結論した。

1 章 シアノバクテリアにおいて呼吸の光合成への影響には種間差が存在する

導入

シアノバクテリアにおいては、呼吸と光合成が PQ プールを含む一部の電子伝達成分を共有しており、呼吸鎖が PQ プールの酸化還元状態に影響を与える (Mi et al. 1992)。またその結果、暗所や弱光下では光合成効率が低下する (Campbell & Öquist 1996)。一方で、呼吸鎖の NAD(P)H 脱水素酵素複合体 (NDH-1) (図 1) の変異株である $\Delta ndhF1$ は、野生株 (WT) と比べて見かけ上高い光合成効率を示すことが、クロロフィル蛍光解析から示されている (Ogawa et al. 2013)。しかし酸素発生速度については、 $\Delta ndhF1$ は WT の半分程度しかないことも報告されている。呼吸鎖の NDH-1 は、解糖系や酸化的ペントースリン酸経路から生産された NAD(P)H だけでなく、明所では光合成電子伝達系の最終電子受容体である NADPH を PQ プールに電子を渡して消費するサイクリック電子伝達の径路としての役割も担う (Mi et al. 1992)。よって $\Delta ndhF1$ は、WT より、PSI の下流において NADPH が過剰になることによるストレスを受けやすくなる。このとき、電子が直接酸素に渡される Mehler 反応 (Mehler 1951) や図 1 の模式図に見られるように Flv1/3 を介して電子が酸素に渡される径路 (Allahverdiyeva et al. 2013) により酸素が消費される。これが、 $\Delta ndhF1$ において酸素発生速度が低下していた原因であると考えられる。このように呼吸系の変異体を用いて呼吸の光合成に与える影響を解析しようとする、変異の副作用により解析が困難になる場合が多い。一方シアノバクテリアは地球上で最も長い歴史を持つ生物の 1 つであり、淡水、海水、塩湖、温泉、陸上と光合成生物の中では最も地球に広く分布し、地球の 1 次生産を支え続けてきた (Badger et al. 2005)。光合成の基本的な仕組みについては、シアノバクテリアの段階でほぼ確立し、光化学系反応中心の構造や機能は、シアノバクテリアでも、真核藻類でも、さらには陸上植物でもほとんど同一といってよい。一方で、光合成の調節機構や、光合成と他の代謝系との間の相互作用は、光合成生物の間で極めて大きな多様性がみられる。このことは逆に、呼吸と光合成の間の相互作用を解析する場合に、生物種による違いを調べることによってその生理的な意義を見出すことができる可能性があることを意味している。

そこで本研究では様々な背景を持つ 6 種のシアノバクテリアを統一した光強度で培養し、呼吸が光合成に与える影響にどのような違いがあるのかを調べることで、その生理学的意義の有無について検討することにした。実験方法として、パルス振幅変調 (PAM) クロロフィル蛍光測定及び、液体窒素温度 (77 K) における低温クロロフィル蛍光スペクトル測定を用いることで、ステート遷移を介した呼吸の光合成への影響、すなわち PQ プールの酸化還元状態を定量化して種間で比較を行った。結果として、暗所や弱光下では、光合成パラメーター Φ_{NPQ} (制御された熱放散のエネルギーの割合の大きさ) (Hendrickson et al. 2004) に反映されるステート遷移の大きさが、同じシアノバクテリアでも種によって大きく異なることがわかった。特に暗所での結果には呼吸の光合成への影響の種間差が明確に表れた。このような種間差は近縁なネンジュモ科 (*Nostocaceae*) の 3 種の間においても見られたことから、系統的な分化を反映するものではなく、自然界における生育光環境を反映していることが示唆された。

1 章

試料と測定方法

使用した株と培養条件

シアノバクテリア 6 種 *Synechocystis* sp. PCC6803、*Anabaena* sp. PCC7120、*Nostoc punctiforme* ATCC29133、*Nostoc* sp. HK-01、*Arthrospira platensis* NIES-39、*Acaryochloris marina* MBIC11017 を 30°C、フィルターを通して空気を通気させ、白色蛍光灯 (200 $\mu\text{molphotons}/\text{m}^2/\text{s}$) を 24 時間の連続明期で培養を行なった。液体培地としては *Acaryochloris marina* は人工海水に IMK 培地を加えたもの (Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.)、*Arthrospira platensis* は SOT 培地 (Ogawa & Terui 1970)、そしてその他の 4 種は BG-11 培地 (Allen 1968) を用いた。細胞濃度は分光器 (V-650; JASCO) を用いて細胞濁度 (OD₇₅₀) を測定した。*Nostoc* sp. HK-01 を除く全ての種は対数増殖期のものを使用した。*Nostoc* sp. HK-01 に関しては、増殖時にワカメ様の塊を作り、細胞濁度 (OD₇₅₀) による増殖曲線の作成が出来なかったため、増殖のステージに関しては不明瞭になっている。*Nostoc* sp. HK-01 を測定に用いる際は、念入りにボルテックスを使用して、出来るだけ細胞が溶液に均一になるようにした。

クロロフィル蛍光測定

室温でのクロロフィル蛍光測定は基本的に Ogawa et al. 2013 に従い、パルス変調蛍光測定装置 (WATER-PAM; Waltz) を使用して実験を行なった。細胞液 2 ml をキュベット内部に入れ、細胞を 15 分間暗順応させた後、光合成に影響の無い非常に弱い測定光 (ピーク波長 650 nm) を照射して Fo を求める。測定光を照射した 20 秒後に熱放散系を駆動させない短い 0.8 秒の飽和パルス光を照射することで、Fm' dark を得た。その後、赤色励起光 (ピーク波長 660 nm) を各光強度 (31.5、167、562、1,190 $\mu\text{molphotons}/\text{m}^2/\text{s}$) を 5 分ずつ照射し、各々の光強度の切り替え直前に飽和パルス光を照射することによって各励起光強度下での熱放散の駆動を調べた。さらに 1,190 $\mu\text{molphotons}/\text{m}^2/\text{s}$ の励起光を切った後、10 秒後に再び飽和光を照射し 20 分間再び暗順応の間、5 分毎に飽和パルス光を照射することによって、暗所での熱放散系の推移について測定している。最後に DCMU (最終濃度 10 μM) を加え、励起光を照射することによって、最大の蛍光 Fm を得た。測定の最中は暗順応も含めスターラーによって常に細胞液を攪拌した。各光合成パラメーターは次のような式によって求めている。 $\Phi_{\text{NPQ}} = F_s/F_m' - F_s/F_m$ (Hendrickson et al. 2004) $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ 、 $(F_v'/F_m')_{\text{dark}} = (F_m' \text{dark} - F_o)/F_m' \text{dark}$

低温クロロフィル蛍光測定

液体窒素温度である 77K 下でのクロロフィル蛍光スペクトルは Ogawa et al. 2013 を参考に、低温アタッチメント (PU-830; JASCO) を装着した Fluorescence spectrometer (FP-8500; JASCO) で測定を行なった。実験前に 100%メタノールを用いたクロロフィル抽出法 (Grimme & Boardman 1972) によって 2 $\mu\text{gChl}/\text{ml}$ に細胞の濃度を調節し、15 分暗順応させた細胞液と、DCMU (最終濃度 10 μM) を添加し白色光 (560 $\mu\text{molphotons}/\text{m}^2/\text{s}$) を 4 分間照射した細胞液を、液体窒素を用いて凍らせた後、測定を行なった。試料は 625 nm の光 (スリット幅は 10 nm) を照射したときの蛍光を測定している。蛍光スペクトルは蛍光のスリット幅が 2.5 nm になっており、また解像度は 0.2 nm である。また蛍光スペクトルは photomultiplier の感度に対して修正を行なっており、二次光源は ESC-842; JASCO を使用している。クロロフィル蛍光スペクトルはそれぞれ、725 nm 付近の PSI のピークにおける最大値によってノーマライズしている。

1 章

吸収スペクトル測定

吸収スペクトルは Ogawa et al. 2013 に従い、積分球 (ISV-722; JASCO) を装着した分光器 (V-650; JASCO) を用い、室温下で測定した。細胞液の吸光度は光路長が 5 mm のセルを用いた。解像度は 0.2 nm である。それぞれのスペクトルはそれぞれの最も大きな吸光度によって、ノーマライズしている。表 I-1 の PC や Chl 量は Amon et al. 1974 を参考にして図 I-5 のスペクトルを用いて算出した。 $[PC]=138.5 \times A_{620} - 35.49 \times A_{678}$ 、 $[Chl a]=14.97 \times A_{678} - 0.615 \times A_{620}$

結果

呼吸によるプラストキノプールの酸化還元状態への影響は種間差が見られる

Campbell & Öquist 1996 によると、暗所下でも呼吸鎖により、PQ プールが還元状態になる。すると、集光性アンテナであるフィコビリソーム (PBS) が PSII より PSI にエネルギーを流すステート 2 と呼ばれる状態になる。一方で生育光強度下までは PSI へ PQ プールから電子が流出するようになるため、光強度が強くなるにしたがって PQ プールが酸化的になり、ステート 1 になる。しかし強光下では図 1 における *Cyt b₆f* が電子伝達の律速になるため、PQ プールは再び還元され、ステート 2 になると考えられている。

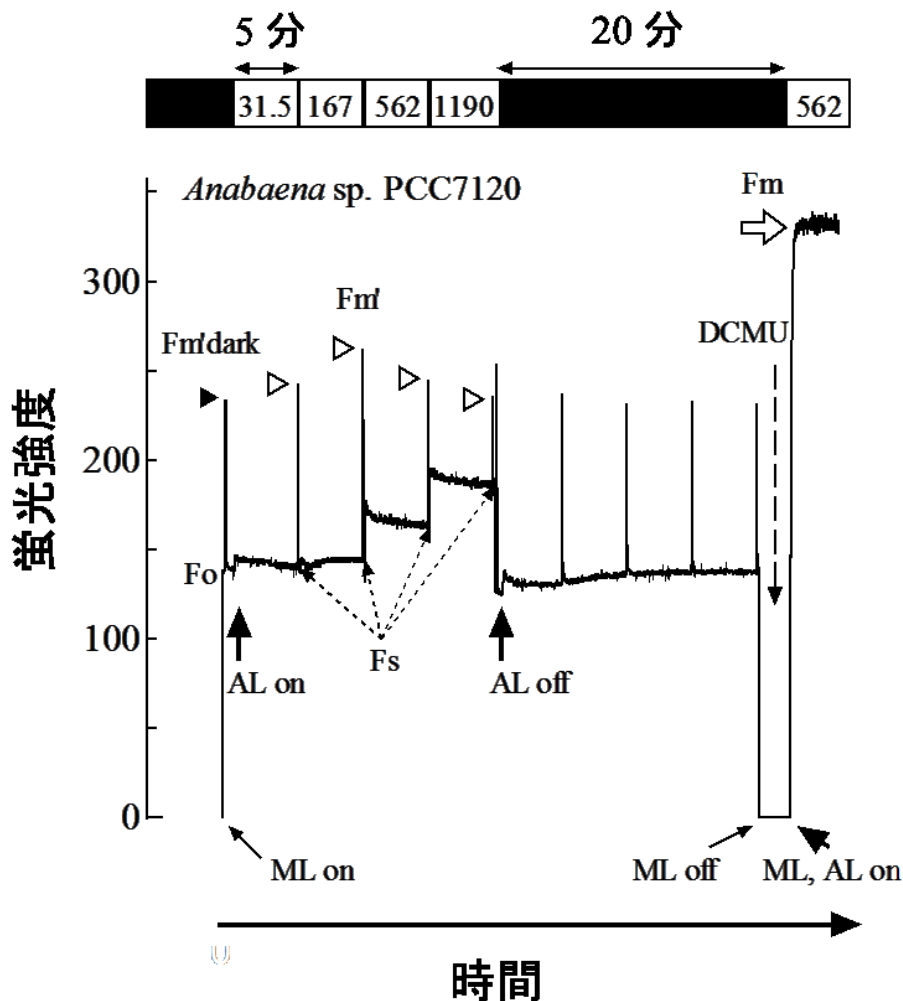


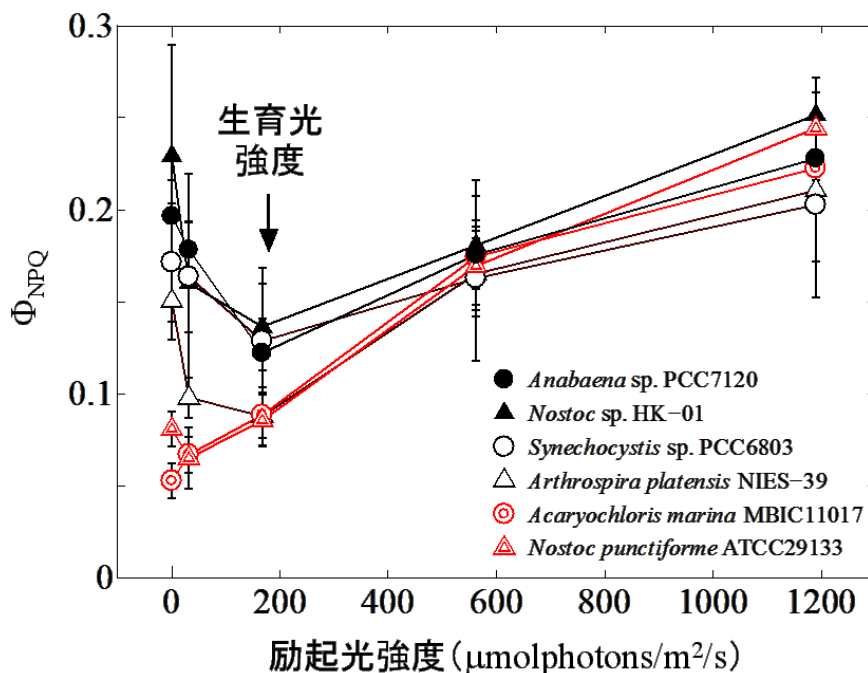
図 I-1 : 室温下での *Anabaena* sp. PCC7120 のクロロフィル蛍光挙動

1 章

ML は測定光を示し、AL は励起光を示す。右向き黒三角は Fm'dark、右向き白三角は Fm'、右向き白矢印は Fm を示す。Fs の値は点線矢印が示すように、飽和パルス照射する直前のクロロフィル蛍光強度の値を利用する。図の上部の黒いバーは暗所であることを意味し、白いバーは励起光照射時であることを示す。バーの中の数字は照射する光強度 ($\mu\text{molphotons}/\text{m}^2/\text{s}$) を示している。DCMU (最終濃度 $10 \mu\text{M}$) は下向き破線矢印の時点で添加している。

こうした PQ プールの酸化還元状態を介したステート遷移によるエネルギー制御の変化はクロロフィルからの蛍光強度を変化させる。本研究における *Anabaena* sp. PCC7120 のクロロフィル蛍光挙動の結果から、**図 I-1** が得られた。15 分の暗順応の後、暗所下で飽和パルスを照射して得られた Fm'dark (**図 I-1**、右向き黒三角) は最大の蛍光強度ではなく、DCMU を添加して光を照射することで最も PQ プールを酸化状態にした際に、最大の蛍光強度である Fm (**図 I-1**、右向き白矢印) が得られた。また各励起光強度下 (31.5 、 167 、 562 、 $1190 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) で飽和パルスを用いて得られた Fm' (**図 I-1**、右向き白三角) は生育光強度である $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ まで大きくなり、強光になるに従って小さくなった。

図 I-1 における飽和パルスで得られた Fm'dark を含む Fm' の蛍光強度は、最大の蛍光強度である Fm と比べると、エネルギーの熱放散を反映して小さくなっていた。よって制御された熱放散のエネルギーの割合の大きさを示す光合成パラメーター Φ_{NPQ} (Hendrickson et al. 2004) を使用し、細胞に照射した励起光強度との関係を示すと **図 I-2** が得られた。*Anabaena* sp. PCC7120 (**図 I-2**、黒丸) の場合、 Φ_{NPQ} は暗所下で大きく、生育光強度付近で最も小さくなり、強光下で再び大きくなるという推移が見られた。この傾向は *Nostoc* sp. HK-01 (**図 I-2**、黒三角) や *Synechocystis* sp. PCC6803 (**図 I-2**、白丸)、*Arthrospira platensis* NIES-39 (**図 I-2**、白三角) でも見ることができた。しかし一方で *Nostoc punctiforme* ATCC29133 (**図 I-2**、赤二重丸) や *Acaryochloris marina* MBIC11017 (**図 I-2**、赤二重三角) においては、励起光強度と誘導された Φ_{NPQ} との関係は一次関数的な増加を示し、暗所下で Φ_{NPQ} は小さく、励起光強度が大きくなるに従って Φ_{NPQ} は大きくなった。また Φ_{NPQ} は生育光強度から強光下にかけては種によらず似たような値を示す一方で、暗所から弱光下は種による大きな差異があることがわかった。



1 章

図 I-2 : 6 種のシアノバクテリアにおける光強度と誘導されたエネルギーの熱放散の割合を示す Φ_{NPQ} の関係

線は各種毎のデータポイントを結んだものであり、バーは標準偏差を示す。各々の種にて少なくとも 3 回以上独立して培養した株を用いて実験し、得られた結果の平均値をシンボルとして示している。

次に図 I-2 で得られた暗所、弱光下で見られる Φ_{NPQ} の種間差はステート遷移に依存されるかを確認した。シアノバクテリアにおける Φ_{NPQ} はステート遷移の他にも、オレンジカロテノイドタンパク質 (OCP) (Kirilovsky 2007)、もしくは光阻害 (Vonshak et al. 1994) から影響を与えることが知られている。しかし OCP の寄与に関しては、強青色光下で誘導される性質から、赤色の LED (ピーク波長 660 nm) を励起光として使用している本実験では無視することができる。まず暗所下での細胞のステート遷移について確かめるに、77 K での低温クロロフィル蛍光スペクトルを測定した。PBS を励起する 625 nm の光を細胞に照射すると、PSI の蛍光ピーク (725 nm) と PSII の蛍光ピーク (685/695 nm) が得られた。ここから PBS から光化学系間へのエネルギー配分を決めるステート遷移の働きを捉えることができる。図 I-3 は *Anabaena* sp. PCC7120 の結果を示しており、DCMU と光を用いて PQ プールを完全に酸化させた細胞では、PSII によりエネルギーを渡すステート 1 (図 I-3、赤線) になった。一方、暗順応させた細胞では 695 nm のピークが比べて相対的に小さくなり、ステート 2 (図 I-3、黒線) になることがわかった。つまり *Anabaena* sp. PCC7120 において、暗所下での PQ プールは還元されていることを示している。さらにこのステート 2 の程度と室温下でのクロロフィル蛍光測定で得られた暗所下での Φ_{NPQ} との関係性を 5 種類について検討すると図 I-4 が得られ、暗所でステート 2 の程度が大きくなるほど、暗所下での Φ_{NPQ} が大きくなる傾向が見られた。つまり、暗所から弱光下での種による Φ_{NPQ} の差異は、ステート遷移を通した PQ プールの酸化還元状態の違いに大きく由来されていることを示している。

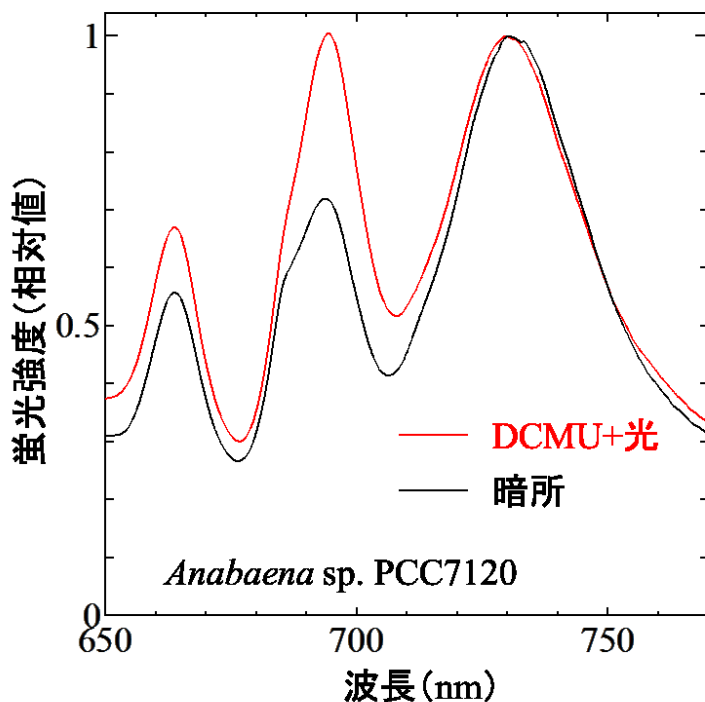


図 I-3 : *Anabaena* sp. PCC7120 の低温クロロフィル蛍光スペクトル
625 nm の赤色光を細胞に照射している。赤線は DCMU を添加し、白色光を照射した条件であり、黒線は暗順応条件を示している。3 回独立して培養した株を用いて実験し、得られた結果の平均値をスペクトルとして示している。PSI のピークを 1 として相対値を示している。

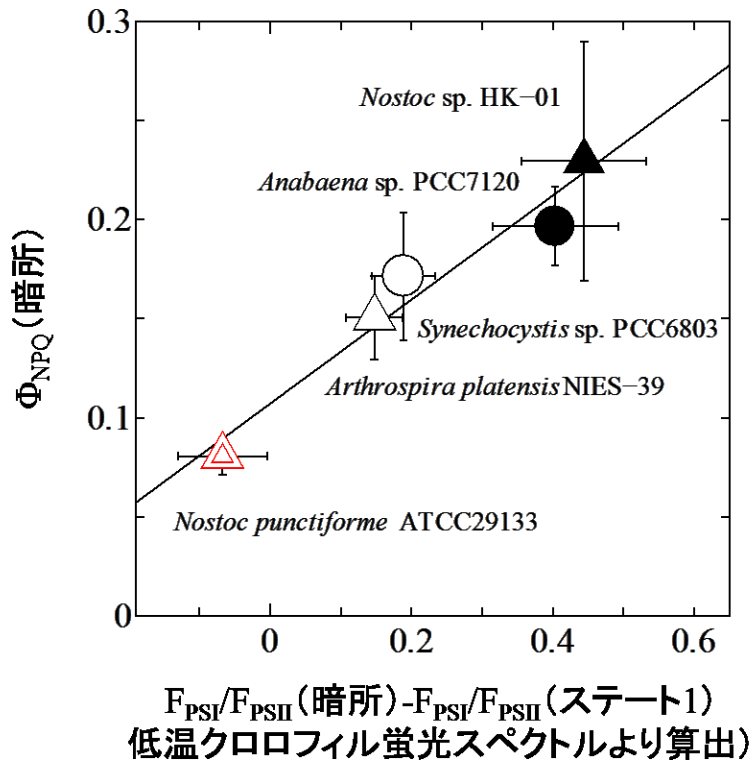


図 I-4 : 77 K における低温クロロフィル蛍光スペクトルから得られた暗所でのステート遷移の状態と室温下におけるクロロフィル蛍光挙動から得られた暗所での Φ_{NPQ} との関係

黒三角は *Nostoc* sp. HK-01、黒丸は *Anabaena* sp. PCC7120、白丸は *Synechocystis* sp. PCC6803、白三角は *Arthrospira platensis* NIES-39、二重赤三角は *Nostoc punctiforme* ATCC29133 を示す。バーは標準偏差を示す。各々の種にて 3 回以上独立して培養した株を用いている。得られた結果の平均値をシンボルとして示している。実線は近似直線を示す ($R^2=0.95$)。

次に図 I-2 で得られた暗所での Φ_{NPQ} の種間差が、細胞における光阻害の影響に依存されるかどうかを調べるために、PSII の最大量子収率を示すパラメーターである F_v/F_m が光阻害によって影響を受けることを利用した (Gentry et al. 1989, Quick and Stitt 1989)。各種について F_v/F_m を調べた結果、種による違いが見られた (表 I-1)。細胞を暗順応することで得られる PSII の量子収率である $(F_v'/F_m')_{\text{dark}}$ (表 I-1) が呼吸を介したステート遷移の影響を受ける一方で、 F_v/F_m は DCMU を用いて、細胞をステート 1 にした状態で測定を行うため、ステート遷移の影響を無視した純粋な光阻害の影響を評価できる。しかし F_v/F_m は光阻害だけでなく、細胞内のフィコビリニン量にも大きな影響を受けることが知られている (Campbell et al. 1998)。そこで各々の種の吸収スペクトルを測定し (図 I-5)、フィコシアニンとクロロフィルの比 (PC/Chl) を算出したところ、この PC/Chl と F_v/F_m の間には負の直線的な相関が見られた (図 I-6)。よって、種による F_v/F_m の種間差は各株の色素組成比の違いで説明ができ、種による F_v/F_m の違いは、光阻害に由来しているものではないことを示している。つまり、暗所下で見られた Φ_{NPQ} の種による違いは光阻害ではなく、ステート遷移を介した、呼吸による PQ プールの酸化還元状態の種による違いに由来される。

表 I-1 : 6 種のシアノバクテリアにおける光合成パラメーターと PC/Chl 比

種名	F_v/F_m	$(F_v'/F_m')_{\text{dark}}$	PC/Chl
<i>Acaryochloris marina</i>	0.669 (± 0.029)	0.617 (± 0.035)	-
<i>Arthrospira platensis</i>	0.642 (± 0.017)	0.503 (± 0.019)	4.33 (± 0.04)
<i>Nostoc</i> sp.	0.599 (± 0.010)	0.369 (± 0.054)	4.80 (± 0.27)
<i>Nostoc punctiforme</i>	0.591 (± 0.030)	0.510 (± 0.039)	5.76 (± 0.12)
<i>Anabaena</i> sp.	0.575 (± 0.009)	0.379 (± 0.023)	6.72 (± 0.46)
<i>Synechocystis</i> sp.	0.561 (± 0.022)	0.389 (± 0.035)	8.03 (± 0.64)

1 章

表の値は平均値±標準偏差であり、3回の独立した培養、実験をそれぞれ行っている。

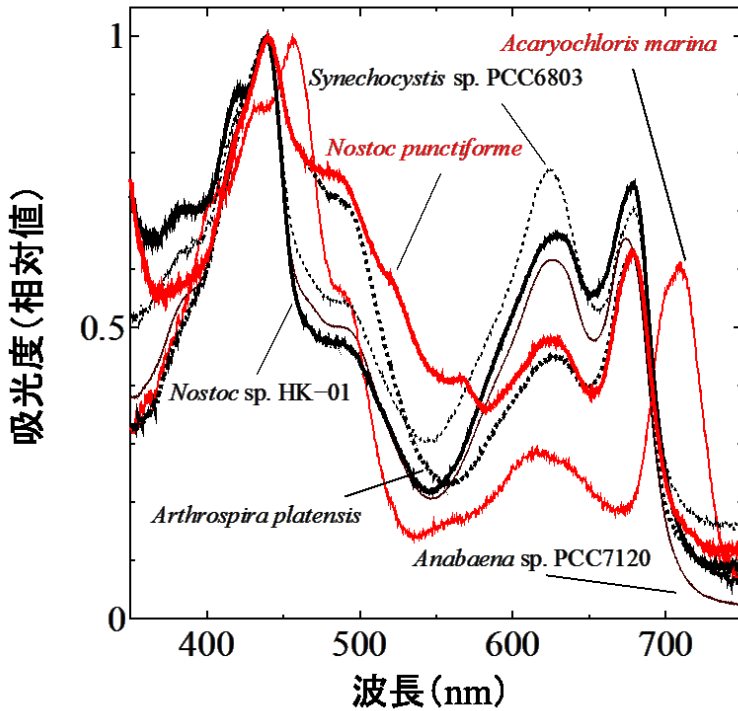


図 I-5 : 培地における 6 種のシアノバクテリアの細胞の吸収スペクトル
 吸収スペクトルはそれぞれ最も大きな値を 1 として相対値を示している。
 赤実線は *Acaryochloris marina* MBIC11017、赤太実線は *Nostoc punctiforme* ATCC29133、黒実線は *Anabaena* sp. PCC7120、黒太実線は *Nostoc* sp. HK-01、黒点線は *Synechocystis* sp. PCC6803、黒太点線は *Arthrospira platensis* NIES-39 を示している。3 回独立して培養した株を用いて実験し、得られた結果の平均値をスペクトルとして示している。

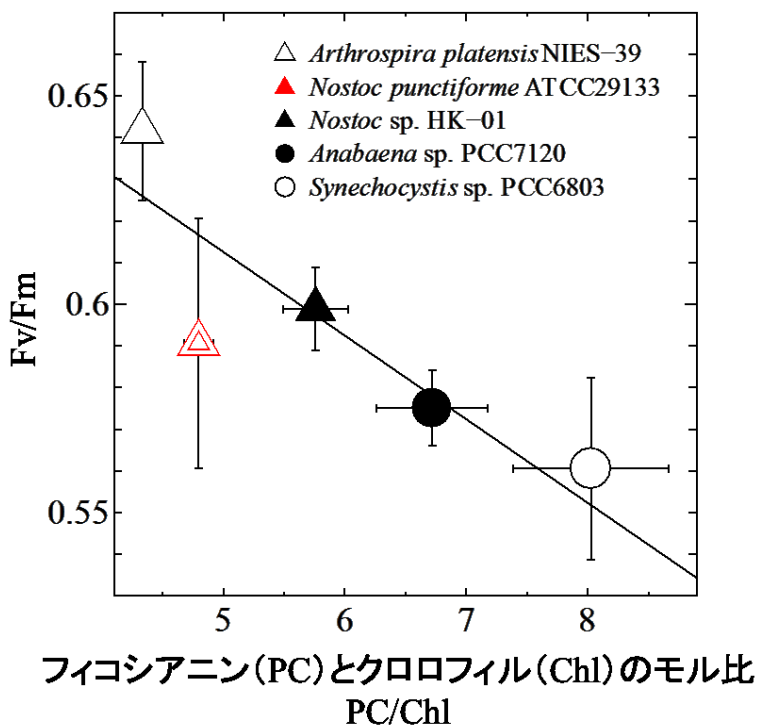


図 I-6 : Fv/Fm とフィコシアニン (PC) /クロロフィル (Chl) モル比の関係
 バーは標準偏差を示す。各々の種にて 3 回以上独立して培養した株を用いて実験し、得られた結果の平均値をシンボルとして示している。実線は近似直線を示す ($R^2=0.75$)。

考察

シアノバクテリアにおける暗所下での PQ プールの酸化還元状態の多様性について

シアノバクテリアの暗順応した細胞では、PQ プールが呼吸系の作用によって強く還元されていることが知られていたが、本研究の結果は、呼吸の光合成に与える影響には種による違いが存在することを示している。図 I-2、及び図 I-3 から、シアノバクテリア 6 種の内、4 種は暗所下で PQ プールが還元的であった一方、*Nostoc punctiforme* ATCC29133 と *Acaryochloris marina* MBIC11017 の 2 種の PQ プールは酸化状態であった。全ての種は同一の温度、光条件下で培養しているため、暗所下において呼吸が PQ プールの酸化還元状態に与える影響の種間差は、培養条件に由来するのではなく、種の性質に依存していると考えられる。*Nostoc* sp. HK-01 と *Anabaena* sp. PCC7120 は、同じネンジュモ科 (*Nostocaceae*) の *Nostoc punctiforme* ATCC29133 とは全く異なる PQ プールの酸化還元状態を示していたことから、系統的観点のみからでは呼吸が光合成に与える影響の違いは説明できないと考えられる。*Nostoc punctiforme* ATCC29133 はオーストラリアのソテツの根に共生していたものを単離した株であり (Rippka et al. 1979)、*Acaryochloris marina* MBIC11017 はホヤの体内より単離された株であり (Miyashita et al. 1996)、後者はクロロフィル *d* を持つ特徴からバイオマットの内部のような環境で生存が有利になる (Kühl et al. 2005) とされている。よって 2 種ともにその自然界での生息環境は弱光であって、光強度には大きな変動がないと考えられる。つまり暗所で酸化された PQ プールを持つことにこうした環境に対する順応の 1 つとしての役割があるか、あるいは暗所で PQ プールを還元的に保つことに強光もしくは変動光への順応としての役割があると考えられる。

Nostoc punctiforme ATCC29133 と *Acaryochloris marina* MBIC11017 の 2 種の PQ プールが、暗所で酸化状態になるメカニズムとしては 2 つの可能性が挙げられる。1 つめは呼吸鎖上流から PQ プールまでの電子の流入速度が遅い場合である。実際に、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 において細胞を飢餓状態にして細胞質の呼吸基質を不足させた場合 (Mi et al. 1994) や、NDH-1 の変異株である $\Delta ndhB$ (Mi et al. 1994) や $\Delta ndhF1$ (Ogawa et al. 2013) では、呼吸鎖上流から PQ プールまでの電子の流入が制限され、暗所下で PQ プールが酸化状態になることが報告されている。一方で本実験においては、細胞は連続光により培養しており、生育ステージの判別ができなかった *Nostoc* sp. HK-01 を除いて対数増殖期の状態の細胞を実験に使用しているため、細胞が飢餓状態には陥っていることはないと考えられる。2 つめは PQ プールより下流の呼吸鎖による電子の流出速度が速い場合である。*Nostoc punctiforme* は完全暗所における従属栄養成長が可能な性質を持っている (Rippka et al. 1979)。この性質は *Synechocystis* sp. PCC6803 では見られないが、Cyt c_M をコードする *cytM* に変異が入ると暗所下で従属栄養成長できるようになる (Hiraide et al. 2014)。Cyt c_M は COX のサブユニットである (Manna and Vermaas 1997) と考えられており、Hiraide らは Cyt c_M が COX 活性のネガティブ制御因子として働き、*Synechocystis* sp. PCC6803 での暗所下における従属栄養成長を抑制していることを示唆している。したがって、*Nostoc punctiforme* のように暗所下で従属栄養成長が可能な株では、暗所下における COX の活性が高い可能性があり、これが本研究で観察された PQ プールの酸化の原因であると考えられる。

1 章

1 章の内容は 2016 年に Oxford University Press により出版された雑誌 *Plant and Cell Physiology* に、以下に示すタイトルで論文発表したものである。"Relationship between photochemical quenching and non-photochemical quenching in six species of cyanobacteria reveals species difference in redox state and species commonality in energy dissipation.", *Plant and Cell Physiology*, 57, 1510-1517.

2 章 ステート遷移の能力が欠損しているとされていた変異株の再検討

導入

ステート遷移は2つの光化学系に対してエネルギーを適切に分配する素早い環境応答で、光合成電子伝達を円滑に進めるメカニズムである。光化学系間に存在する PQ プールの酸化還元状態がシグナルとしてステート遷移を制御する仕組みは、シアノバクテリアから陸上植物まで幅広い光合成生物で見られる。集光性アンテナとして LHCII を持つ緑藻や陸上植物におけるステート遷移については、PQ プールの酸化還元状態が LHCII に伝わるまでのシグナル伝達のカスケードの理解が進んでいる。陸上植物では還元された PQ が Cyt *b₆f* に結合すると STN7 キナーゼが活性化され、LHCII がリン酸化されてステート 2 に遷移する (Vener et al. 1997, Zito et al. 1999, Bellafiore et al. 2005)。一方で PQ プールが酸化されると、脱リン酸化酵素である PPH1/TAP38 が LHCII を脱リン酸化してステート 1 が誘導される (Shapiguzov et al. 2010, Pribil et al. 2010) ことが知られている。

一方で、集光性アンテナに PBS を用いる光合成生物におけるステート遷移については、多くの研究者がそのメカニズムの解明に努力しているにも拘わらず未だ不明瞭のままである。シアノバクテリアにおいては、PQ プールの酸化還元状態の変化がどの遺伝子の発現量に影響を与えるのかは、15分から1時間のスケールのトランスクリプトーム解析によって明らかとなっている (Hihara et al. 2004)。しかしシアノバクテリアのステート遷移は数秒から数分で起こる光応答のメカニズムであるため、遺伝子発現の変化のみからステート遷移の生化学的なメカニズムやシグナル伝達のカスケードを解明することは困難である。また Cyt *b₆f* が関与していない (Calzadilla et al. 2019 (a)) など、PBS を集光性アンテナに用いるシアノバクテリアにおけるステート遷移の仕組みは、緑藻や陸上植物で見られる LHCII を用いたステート遷移と大きく異なることが示唆されている。ステート遷移能を失ったとされるシアノバクテリアの変異株は *Synechocystis* sp. PCC6803 を中心にいくつか報告があり、PBS の変異株である $\Delta cpcG1$ (Kondo et al. 2009) や $\Delta ApcD$, $\Delta ApcF$ (Calzadilla et al. 2019 (b))、PBS-PSII の安定性に重要だとされる RpaC を欠損した $\Delta rpaC$ (Emlyn-Jones et al. 1999)、そして強光生育時に発現する PSI のサブユニットである PsaK2 を欠損した $\Delta psaK2$ (Fujimori et al. 2005) が知られている。好熱性のシアノバクテリアである *Synechococcus elongatus* の PSI の結晶構造において、PsaK は PSI 三量体の外縁部に存在している (Jordan et al. 2001) ことから、 $\Delta psaK2$ は強光下で PBS から PSI への機能的結合が起こらないステート遷移能欠損株であると考えられている。

こうしたステート遷移能に問題がある変異株の表現系を確認する方法として、WT 細胞では暗所で PQ プールが還元されステート 2 になる性質 (Campbell and Öquist 1996) が良く利用されている。暗所で変異株がステート 1 になれば、ステート遷移に異常があることを確認できる。しかし本研究の 1 章から、WT でも種によっては暗所下で PQ プールが酸化的になり、ステート 1 となる可能性があることが明らかになった以上、これまでステート遷移能に異常があるとされてきた変異株の中にも、PQ プールの酸化還元状態の変化によって説明ができるものが存在する可能性がある。

そこで我々は $\Delta psaK2$ について暗所下での PQ プールの酸化還元状態を明らかにすることを目的として研究を行った。本研究でも、確かに $\Delta psaK2$ は暗所下でステート 1 となる結果が得られたが、

2 章

COX の阻害剤である KCN を細胞に添加し、PQ プールを還元したときには、 $\Delta psalK2$ でも WT と同様にステート 2 になることが分かった。つまり $\Delta psalK2$ はステート遷移能を欠損した株ではなく、暗所で PQ プールが酸化されている変異体であることが明らかとなった。

試料と測定方法

使用した株と培養条件

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 及び $\Delta psalK2$ は 30°C、フィルターを通して空気を通気させ、弱光条件は人工気象器 (LH-241S; Nippon Medical & Chemical Instruments Co.) の白色蛍光灯 ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を用い、強光条件 ($500 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) は卓上型人工気象器 (LH-80LED-DT, NK system) の赤色 (ピーク波長 660 nm)、緑色 (ピーク波長 520 nm)、青色 (ピーク波長 445 nm) LED を用い、24 時間の連続明期で培養を行なった。液体培地は BG-11 培地 (Allen 1968) を用いた。OD₇₅₀=0.05 より培養を開始し、OD₇₅₀=1.0 までの対数増殖期の細胞を使用している。 $\Delta psalK2$ は Fujimori et al. 2005 で使用された破壊コンストラクト (Reverse タイプ) のプラスミド (埼玉大遺伝子発現制御研究室の日原 由香子教授より譲渡されたもの) を用いて作製した。相同組換えによって形質転換させており、*psalK2* 遺伝子 (*sll0629*) の AgeI 部位に Kanamycin 耐性カセットが挿入された状態になっている。 $\Delta psalK2$ は前培養の段階までは、BG-11 培地に Kanamycin (最終濃度 20 $\mu\text{g/ml}$) を添加し、変異体に選択圧をかけ続けた。特に図 II-4 におけるクロロフィル蛍光の誘導期の測定時は BG-11 培地にバクトアガー (最終濃度 15 g/L) とチオ硫酸ナトリウム (最終濃度 3 g/L) を加えた固体培地で培養を行なった。この時、1 枚のプレートに WT と $\Delta psalK2$ をそれぞれ 8 パッチずつ、OD₇₅₀=0.5 に調整した細胞液をパッチ毎に 10 μl を添加して作成し 2 日間強光条件にて培養したものを用いた。

クロロフィル蛍光測定

1 章と同様に室温でのクロロフィル蛍光測定は基本的に Ogawa et al. 2013 に従い、パルス変調蛍光測定装置 (WATER-PAM; Waltz) を使用して実験を行なった。強光培養した株を用いている。100% メタノールを用いたクロロフィル抽出法 (Grimme & Boardman 1972) によって 1 $\mu\text{gChl/ml}$ に細胞の濃度を調節した。細胞液 2 ml をキュベット内部に入れ、細胞を 15 分間暗順応させた後、光合成に影響の無い非常に弱い測定光 (ピーク波長 650 nm) を照射して F_0 を求める。測定光を照射した 20 秒後に熱放散系を駆動させない短い 0.8 秒の飽和パルス光を照射することで、 F_m' dark を得た。その後、赤色励起光 (ピーク波長 660 nm) を各光強度 (31.5、167、562、1,190 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) を 5 分ずつ照射し、各々の光強度の切り替え直前に飽和パルス光を照射することによって各励起光強度下での熱放散系の駆動を調べた。さらに 1,190 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ の励起光を切った後、速やかに DCMU (最終濃度 10 μM) を加え、赤色励起光 (799 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) を照射することによって、最大の蛍光 F_m を得た。測定の最中は暗順応も含めスターラーによって常に細胞液を攪拌した。各光合成パラメーターは次のような式によって求めている。 $\Phi_{NPQ} = F_s/F_m' - F_s/F_m$ (Hendrickson et al. 2004) $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$

またクロロフィル蛍光の誘導期の測定手法は Ozaki et al. 2007 に従い、測定装置は蛍光 CCD カメラ (FluorCam 800MF ; Photon System Instruments Ltd.) を用いた。励起光として橙色 LED (ピーク 617 nm) を用い、400 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ の光強度を約 45 秒、細胞に照射したときのクロロフィル蛍光強度の推移を測定している。データの取り込み間隔は 0.04 秒ずつである。8 パッチのうち WT は 2 つのパッチ同士が近く、1 つに結合して測定されてしまったため、データとしては 7 つとなっている。

2 章

低温クロロフィル蛍光スペクトル測定

1 章と同様に、液体窒素温度である 77K 下でのクロロフィル蛍光スペクトルは Ogawa et al. 2013 を参考に、低温アタッチメント (PU-830; JASCO) を装着した Fluorescence spectrometer (FP-8500; JASCO) で測定を行なった。弱光条件、及び強光条件で培養した株を用いている。実験前に 100% メタノールを用いたクロロフィル抽出法 (Grimme & Boardman 1972) によって 2 $\mu\text{gChl/ml}$ になるよう細胞の濃度を調節した。15 分暗順応させた細胞液、及び KCN (最終濃度 1 mM) を添加して 15 分暗順応させた細胞液と、DCMU (最終濃度 10 μM) を添加し白色光 (500 $\mu\text{molphotons/m}^2/\text{s}$)

(PICL-NRX, NIPPON P-I) を 4 分間照射した細胞液を、液体窒素を用いて凍らせ、測定を行なった。試料はフィコシアニンを励起する 625 nm の光とクロロフィルを励起する 435 nm の光 (スリット幅は 10 nm) を照射したときの蛍光を測定している。蛍光スペクトルは蛍光のスリット幅が 2.5 nm になっており、また解像度は 0.2 nm である。また蛍光スペクトルは photomultiplier の感度に対して修正を行なっており、二次光源は ESC-842; JASCO を使用している。

P700 の再還元挙動の測定

PSI の反応中心である P700 の吸収変化 (ΔA_{705}) は spectrophotometer (JTS-10; Bio-Logic, France) を用いて測定を行なった。強光培養した株を用いている。細胞液を 5 $\mu\text{g/Chl}$ に調整し、2 ml をセルの内部に入れた。DBMIB を加える場合は最終濃度は 10 μM になるように添加した。暗所下で還元されていた P700 に対して、細胞液に近赤外光 (720 nm) を 12 秒照射すると、P700 が酸化され、705 nm の吸収が起こるようになる。その後近赤外光を切ると、暗所下で P700 が再還元されていく挙動を 705 nm の吸収変化から測定することができる。解像度は 1 ms を初期値とし、指数関数的に間隔を長くしている (10 秒間で 70 データポイント)。図 II-5 は近赤外光を切った時点を 0 秒として表し、0 秒の時点における 705 nm の吸収変化 (ΔA_{705}) を 1 としてノーマライズしている。

酸素消費量の測定

酸素消費量は酸素電極 (Oxygraph Plus; Hansatech Instruments) を用いた。強光培養した株を用いている。細胞液を $\text{OD}_{750}=10$ に調整し、暗所下で 10 分間の酸素濃度の変化を測定した。その後 KCN (最終濃度 1 mM) を添加して、暗所下での酸素濃度の変化を測定し、添加前の変化と差し引くことで呼吸速度を算出した。

結果

 Δ psaK2 はステート遷移を行える株である

Fujimori et al. 2005 によると、PSI のサブユニットである PsaK2 を欠損した変異体 Δ psaK2 は、弱光生育時は WT と同様に暗所下でステート 2 を示す一方で、強光生育時は WT と違い、ステート 1 を示す。本実験においてもステート遷移を調べるために、WT と Δ psaK2 の 77 K での低温クロロフィル蛍光スペクトルを測定した。PBS を励起する 625 nm の光を細胞に照射すると、PSI の蛍光ピーク (725 nm) と PSII の蛍光ピーク (685/695 nm) が得られた (図 II-1)。

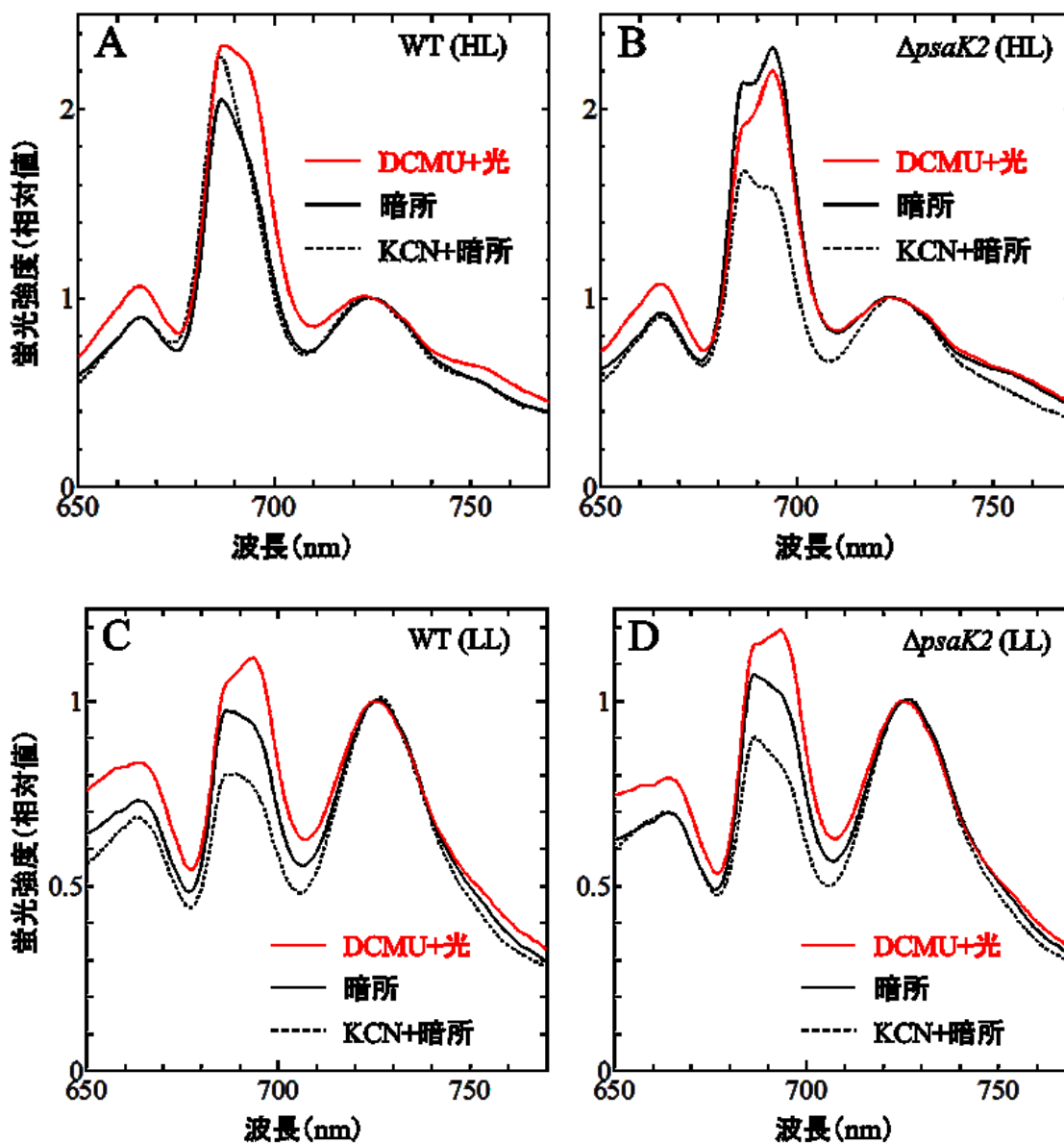


図 II-1 : WT (A, C) と Δ psaK2 (B, D) の 77 K における低温クロロフィル蛍光スペクトル
A, B は強光下 (HL, 500 μ molphotons/m²/s) で培養した株であり、C, D は弱光下 (LL, 80 μ molphotons/m²/s) で培養した株の結果を示している。励起光として 625 nm の赤色光を使用している。赤実線は細胞に DCMU を添加し、白色光を照射した条件を示し、黒実線は細胞を暗順応させた条件、黒点線は KCN を添加し、暗順応させた条件を示す。3 回独立して培養した株を用いて実験し、得られた結果の平均値をスペクトルとして示している。PSI のピークを 1 として相対値を示している。

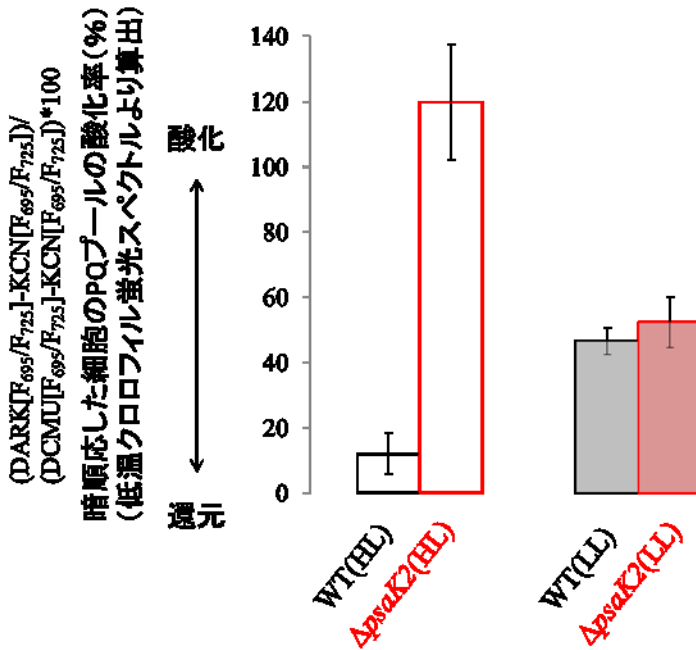


図 II-2 : 低温クロロフィル蛍光スペクトルより算出した暗順応した細胞の PQ プールの酸化率
 棒グラフは左から強光培養した WT, $\Delta psaK2$, 弱光培養した WT, $\Delta psaK2$ の順に示している。
 バーは標準偏差を示す。実験は各々3回独立して培養した株を用いて行ない、平均値を示している。

F_{685} は PSII だけでなく、PBS の terminal emitter (F_{683}) からの影響を受ける (Stadnichuk et al. 2013) ため、 F_{695} を PSII からの蛍光の基準とする。このとき $500 \mu\text{molphotons}/\text{m}^2/\text{s}$ の強光下で生育した WT においては、暗順応させた細胞 (図 II-1A、黒実線) は、DCMU を添加して光を照射することで PQ プールを酸化させた状態 1 の細胞 (図 II-1A、赤実線) より、PSII からの蛍光が小さかった (図 II-1A)。むしろ暗順応させた細胞は、呼吸阻害剤として KCN を添加し、暗順応させて PQ プールを還元させた状態 2 の細胞 (図 II-1A、黒点線) に近い状態が示された。一方強光下で生育した $\Delta psaK2$ では、暗順応させた細胞 (図 II-1B、黒実線) は、DCMU を添加し光を照射して PQ プールを酸化させた状態 1 の細胞 (図 II-1B、赤実線) に近い状態を示していた。しかし、 $\Delta psaK2$ に KCN を添加して暗順応させた場合、WT と同様に状態 2 が誘導された (図 II-1B、黒点線)。弱光下 ($80 \mu\text{molphotons}/\text{m}^2/\text{s}$) で培養した場合は WT、 $\Delta psaK2$ のどちらも暗順応させた細胞の PQ プールの酸化還元状態は、約 50% と中間的であった (図 II-1C,D、図 II-2)。しかし強光下で培養した場合、暗順応させた WT では PQ プールがほとんど還元されている一方で、 $\Delta psaK2$ では PQ プールが非常に強く酸化されていた (図 II-2)。また 1 章と同様に室温下における、各励起光強度下で誘導される Φ_{NPQ} の推移について調べると、絶対値としての大きさの違いは見られるものの、強光になるに従って WT (図 II-3、白丸) と $\Delta psaK2$ (図 II-3、赤丸) は Φ_{NPQ} が似たような上昇を示した。つまり強光下において、 $\Delta psaK2$ は WT と同様な状態遷移による光合成の制御が行われていると考えられる。またクロロフィル蛍光の誘導期を調べると、 $\Delta psaK2$ (図 II-4、赤線) は最初のピークが WT (図 II-4、黒線) と比較してより高くなった。このピークの高さは PQ プールが酸化状態から還元状態に変化するほど高くなることが知られ、NDH-1 の変異株である $\Delta ndhF1$ では WT と比べて非常に高くなることが知られている (Ogawa et al. 2013)。つまり $\Delta psaK2$ では、暗所下で PQ プールが酸化していることを示している。

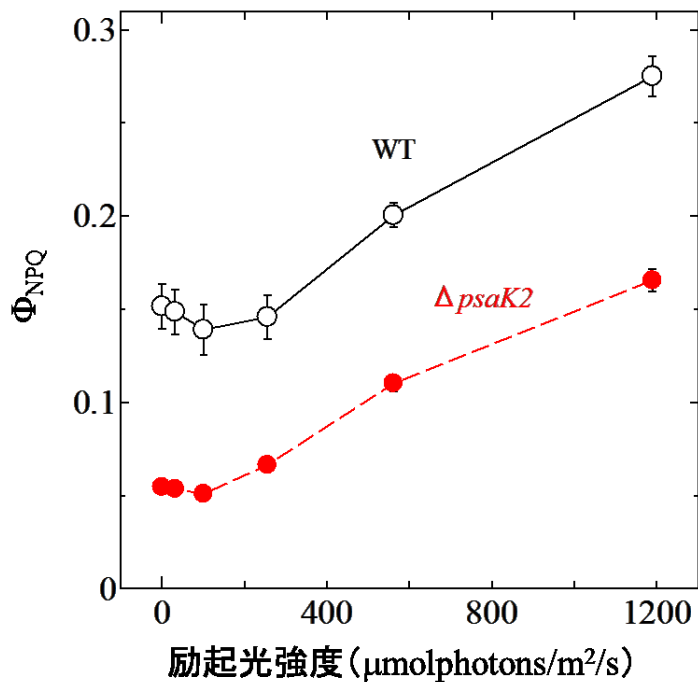


図 II-3：励起光強度と誘導された Φ_{NPQ} の関係

励起光は 650 nm の赤色 LED を使用している。白丸は WT、赤丸は $\Delta psaK2$ を示す。各々の種にて 3 回独立して培養した株を用いて実験し、得られた結果の平均値をシンボルとして示している。黒実線と赤点線はそれぞれ、WT と $\Delta psaK2$ のデータ同士を線で結んだものである。バーは標準偏差を示す。

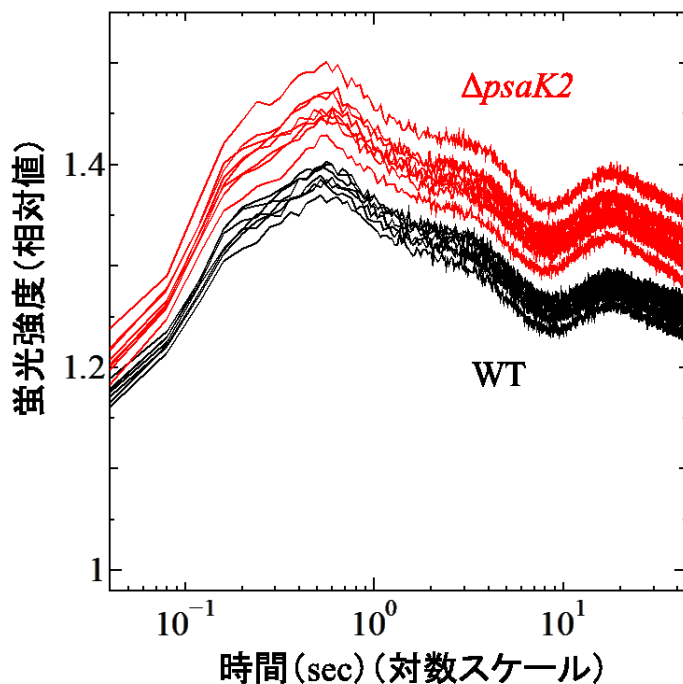


図 II-4：クロロフィル蛍光の誘導期
赤線は $\Delta psaK2$ 、黒線は WT を示している。それぞれ独立した 7 パッチ以上の結果が、7 本以上の線となって表されている。励起光は 500 $\mu\text{molphotons}/\text{m}^2/\text{s}$ の強さを使用している。それぞれ、0 秒のときの F_0 を 1 とし、ノーマライズしている。

暗所下で PQ プールが酸化的原因としては PQ プールより上流側の呼吸鎖からの電子の供給が弱くなっている。または PQ プールより下流側の呼吸鎖の活性が高くなっていることが考えられる。しかしクロロフィル蛍光の誘導期における最初のピークに到達する速さは WT (図 II-4、黒線) と $\Delta psaK2$ (図 II-4、赤線) の間で違いは見られなかった。つまり、PSI 下流のストロマ側の NADPH の供給力、NDH の活性に問題はないと考えられる。また図 II-5 が表すように、暗所における PSI の P700 の再還元の間 $\Delta psaK2$ (図 II-5、赤実線) と WT (図 II-5、黒実線) の間

2 章

で比較したところ、差は見られなかった。DBMIB を添加して Cyt *b₆/f* における電子伝達を阻害し、呼吸系からの電子流入の影響を除外した場合は、 $\Delta psalK2$ (図 II-5、赤点線) と WT (図 II-5、黒点線) で同様に再還元が遅くなった。このことは呼吸鎖において、 $\Delta psalK2$ では WT と同等なレベルで電子がプラストシアニンまで流れていることを示している。加えて表 II-1 より細胞当たりの酸素吸収量にも差が見られなかったため、末端酸化酵素側の活性が $\Delta psalK2$ で高いわけでもなかった。

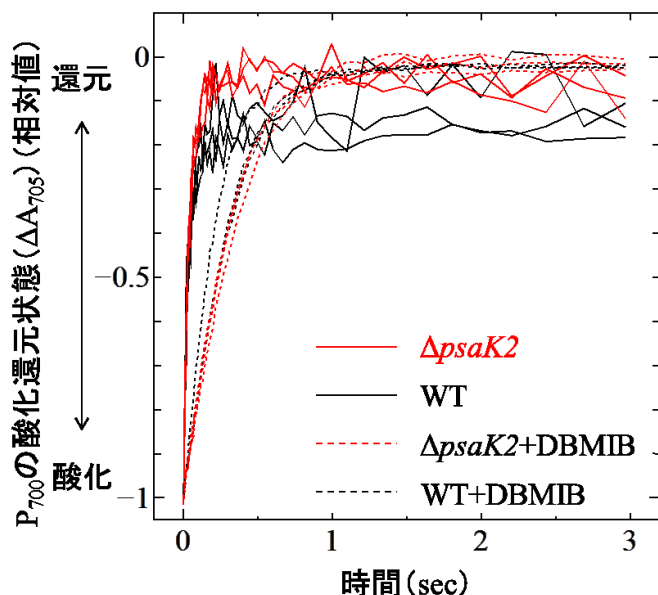


図 II-5 : P700 の暗所における再還元の推移
赤実線は $\Delta psalK2$ 、黒実線は WT、赤点線は $\Delta psalK2$ の細胞に DBMIB (最終濃度 10 μM) を添加したもの、黒点線は WT の細胞に DBMIB を添加したものである。実験は各々3回独立して培養した株を用いて行なっている。

最後に Fujimori et al. 2005 において PsaK2 は強光下での生育に必須であると報告しているが、本研究において、表 II-1 から強光培養時における $\Delta psalK2$ と WT の表現系の違いは、わずかに $\Delta psalK2$ の方が細胞当たりのクロロフィル量が少なく、光化学系量比である PSII/PSI が大きく、最大光合成効率である Fv/Fm が小さかったが、細胞の倍化時間、PC/Chl、細胞当たりの呼吸速度に変化は見られなかった。

表 II-1 : WT と $\Delta psalK2$ における細胞の状態 (倍化時間、光合成色素、光化学系量比、光合成パラメーター、呼吸速度) について

	WT	$\Delta psalK2$
倍化時間 (h)	8.17 (± 0.10)	8.02 (± 0.10)
細胞当たりのクロロフィル濃度 (Chla/OD)	1.57 (± 0.06)	1.40 (± 0.02)
光化学系量比 (PSII/PSI)	0.488 (± 0.022)	0.523 (± 0.015)
PC/Chl	8.53 (± 0.25)	8.38 (± 0.13)
Fv/Fm	0.618 (± 0.009)	0.587 (± 0.006)
細胞当たりの酸素吸収量 ($\mu\text{mol O}_2/\text{OD}_{750}/\text{h}$)	0.138 (± 0.001)	0.134 (± 0.002)

表の値は平均値 \pm 標準偏差であり、3回の独立した培養、実験をそれぞれ行っている

2 章

考察

Δ psaK2 における呼吸からの影響について

Fujimori et al. 2005 において、PSI のサブユニットである PsaK2 を合成できない Δ psaK2 は強光培養時は暗所下でステート 1 を示していること、さらにシアノバクテリアにおける PSI の結晶構造において PsaK が PSI 三量体の外縁部に存在している (Jordan et al. 2001) ことから、 Δ psaK2 はフィコビリソームから PSI への機能的結合が起こらないステート遷移能欠損株であると示唆されている。しかし本実験の結果は、 Δ psaK2 がステート遷移能を持っていることを示している。なぜなら低温クロロフィル蛍光スペクトルを測定することで、 Δ psaK2 を暗順応させるとステート 1 になる (図 II-1B、黒線) ことは確認できた一方で、呼吸阻害剤を添加して PQ プールを還元的にした条件ではステート 2 が誘導されたためである (図 II-1B、黒実線)。また、照射する励起光強度が上昇するにつれ Δ psaK2 は WT と似たような Φ_{NPQ} の上昇が見られた (図 II-3)。よって Δ psaK2 は明所下でステート遷移が WT と同様に誘導されていると考えられる。またクロロフィル誘導期現象のピーク位置が Δ psaK2 の方が WT より高く、暗所での PQ プールの酸化を支持していた (図 II-4)。つまり、 Δ psaK2 はステート遷移能を持つ一方で、PQ プールが暗所下で酸化状態になる株であることを意味する。従って、本実験の結果は光合成系に異常が起こると、呼吸の光合成に与える影響に変化が起こることがわかった。

Δ psaK2 が暗所下で PQ プールが酸化状態になるメカニズムとしては、PQ プールの過還元状態を防ぐ補償作用に由来されると考えている。なぜなら表 II-1 より、 Δ psaK2 は Fv/Fm がわずかながら減少していたためである。これは強光下で生育した Δ psaK2 において PSII が光阻害を受けることを意味する。PSII がストレスを受ける状況としては、活性酸素 (一重項酸素) の発生に由来される光阻害 (Macpherson et al. 1993, Telfer et al. 1994, Hideg et al. 1994) が考えられ、これは PQ プールを含めた、PSII より下流の光合成電子伝達系の電子の詰まりが原因とされる (Krieger-Liszka et al. 2008, Triantaphylidès and Havaux 2009)。つまり Δ psaK2 では PQ プールの過還元が明所下で起こっていると考えられる。よって暗所において PQ プールが酸化状態になるのは、こうした電子の詰まりを解消するための補償作用である可能性があり、仮説は 2 つ考えられる。1 つめは末端酸化酵素群の経路の活性化である。*Synechocystis* sp. PCC6803 は末端酸化酵素として COX の他にも cytochrome *bd* quinol oxidase (CYD) (図 1) がチラコイド膜に存在することが知られている (Howitt and Vermaas 1998, Lea-Smith et al. 2016)。COX 及び CYD はともに呼吸としての役割だけでなく、明所下での光合成による過剰な電子の受容シンクとしての働きを持つことが知られている (Lea-Smith et al. 2013)。しかし COX や CYD は親和性に違いがあるものの、いずれも KCN によって阻害を受ける (Pils and Schmetterer 2001)。よって表 II-1 において、WT と Δ psaK2 の呼吸速度に差が見られなかったことから、可能性としては低いと考えている。2 つめは、 Δ psaK2 における PQ プールのサイズが WT と比べて大きい場合である。緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* では強光に細胞を移すと PQ の全体量が増加し、さらに PQ が 1 重項酸素を処理する働きを持っていることが報告されている (Kruk and Trebst 2008)。よって、 Δ psaK2 においても PsaK2 を失うことで光合成系により負荷がかかり、補償作用として PQ プールのサイズが増大している可能性がある。

PsaK2 の実質的な役割については、我々の研究から Δ psaK2 が強光培養時もステート遷移を行えること (図 II-1B、図 II-3)、さらに強光培養時も増殖に必須ではない (表 II-1) ことから、再び不明瞭になった。Fujimori et al. 2005 においてはプレート培養にて 30 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ から 200 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ と急激な生育光強度の変更が行われた際に、 Δ psaK2 の増殖速度が大きく低下して

2 章

いた。一方で本研究においては、液体培養し、前培養により徐々に光強度を上げており、その場合は倍化時間に差は見られなかった。よって、PsaK2は強光生育時に必須なのではなく、弱光順化した株が強光に順化する過程において重要な役割を持つと考えられる。このPsaK2の役割を理解することは暗所下での呼吸の光合成への影響の変化の原因を探るために重要であるため、将来的に明らかにする必要がある。

3 章 真核藻類である灰色藻においても葉緑体呼吸の光合成への影響が見られる

導入

光合成反応中心複合体の構造やその電荷分離のメカニズムは原核光合成生物であるシアノバクテリアと真核光合成生物である真核藻類、陸上植物はほとんど変化が見られない (Renger and Renger 2008)。この理由としては進化の過程において、シアノバクテリアが真核生物と細胞内共生をすることによって、葉緑体へとオルガネラ化したためと考えられている (Margulis 1970)。さらに全ての真核光合成生物の葉緑体は、ある真核生物とあるシアノバクテリアにおける、約 10 億年前 (Douzery et al. 2004) のたった 1 度の細胞内共生を起源としている (Rodríguez-Ezpeleta et al. 2005)。その後、原始の真核光合成生物は緑藻、紅藻、灰色藻と進化が分岐する。細胞内共生の過程において、シアノバクテリアを由来とする葉緑体と宿主細胞における細胞質との間で新たな相互作用が築かれる。特に光合成と呼吸や窒素、炭素代謝との相互作用はシアノバクテリアと全く違う。シアノバクテリアでは呼吸と光合成が直接相互作用をする (Campbell and Öquist 1996)。一方で、真核光合成生物では光合成が葉緑体で行われるのに対し、呼吸はミトコンドリアが担うようになる。シアノバクテリアが葉緑体になる過程において、ゲノムは消失されるか宿主細胞の核に移行されることで、葉緑体におけるゲノムは非常に小さくなり呼吸系も失われる (Martín and Sabater 2002)。葉緑体とミトコンドリアとのオルガネラ間の相互作用も生まれ、陸上植物では葉肉細胞内においてミトコンドリアのほとんどが葉緑体に隣接している (Hatakeyama and Ueno 2016)。さらに、例えば、葉緑体において光合成で作られた過剰な還元力が、リンゴ酸/オキサロ酢酸シャトルを介して有機物としてミトコンドリアに運ばれ、呼吸によって散逸される (Raghavendra et al. 1994, Yoshida et al. 2007) ことが知られている。また光合成と呼吸鎖様の代謝との相互作用も存在し葉緑体呼吸と呼ばれている (Bennoun 1982)。

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* において、この葉緑体呼吸の経路が近年明らかとなり、Type II NAD(P)H dehydrogenase (NDA2) (Jans et al. 2008) から PQ プールに電子が渡され、ミトコンドリアの Alternative oxidase (AOX) と構造的に類似した Plastid terminal oxidase (PTOX) (Houille-Vernes et al. 2011) から電子が PQ プールから引き抜かれ、最終的に酸素に電子が渡される。つまりシアノバクテリアの呼吸と同様に、葉緑体呼吸も PQ プールの酸化還元状態に影響する。しかし真核光合成生物における暗所下の PQ プールの酸化還元状態は様々な見解に分かれている。陸上植物においては種によらず暗所で PQ プールは酸化状態を示す (Bellafiore et al. 2005, Kruk and Karpinski 2006, Trouillard et al. 2012)。しかし真核藻類においてはいくつかの種で PQ プールが暗所下で酸化的と報告される (Delphin et al. 1996, Houille-Vernes et al. 2011) 一方で、PQ プールが還元的であると報告される種 (Gibbs & Biggins 1989, Casper-Lindley and Björkman 1996, Doege et al. 2000) もある。さらに同一の種において異なる結果を異なる研究グループが報告していることもある (Iwai et al. 2007, Houille-Vernes et al. 2011)。そして灰色藻においては、未だ知見がない。

灰色藻の葉緑体は、細胞壁の成分であるペプチドグリカンからなる層が存在すること (Schenk 1970)、CO₂ 固定の場として、カルボキシソーム様の構造が見られている (Burey et al. 2007,

3 章

Fathinejad et al. 2008)。また特に集光性アンテナとして一次共生藻の中で唯一 LHC を持たず (Koike et al. 2000) PBS のみを持つ (Giddings et al. 1983) など、真核光合成生物における葉緑体の中で最もシアノバクテリアに類似した特徴を持つ。つまり葉緑体から呼吸系が失われた影響をシアノバクテリアと比較する際に灰色藻は最も適していると考えられる。

そこで我々は灰色藻である *Cyanophora paradoxa* NIES-547 (以下 *C. paradoxa*) を用いて、クロロフィル蛍光測定から葉緑体呼吸の光合成への影響について調べた。その結果、シアノバクテリアと同様な暗所下での PQ プールの還元が *C. paradoxa* で見られることがわかった。つまり灰色藻の葉緑体においては、シアノバクテリアの呼吸と同様な影響を、葉緑体呼吸が光合成に対して与えることが明らかとなった。

試料と測定方法

使用した株と培養条件

灰色藻に関しては Microbial Culture Collection of the National Institute for Environmental Studies (Tsukuba, Japan) から *Cyanophora paradoxa* NIES-547 を入手し、26°C、C 培地 (Ichimura 1971) を用いた他は 1 章で述べたシアノバクテリアと同様な条件で培養した。*C. paradoxa* の対数増殖期は $OD_{750}=0.04-1.4$ で見られ、この時の倍化時間は 22.8 h (± 0.20) であった。*Synechocystis* sp. PCC6803 は 1 章と同様な条件で培養を行い、対数増殖期の細胞を用いた。

クロロフィル測定方法

1 章及び 2 章と同様に、室温でのクロロフィル蛍光測定は基本的に Ogawa et al. 2013 に従い、パルス変調蛍光測定装置 (WATER-PAM; Waltz) を使用して実験を行なった。100%メタノールを用いたクロロフィル抽出法 (Grimme & Boardman 1972) によって 1 $\mu\text{gChl/ml}$ になるよう細胞の濃度を調節した。細胞液 2 ml をキューベット内部に入れ、細胞を 15 分間暗順応させた後、光合成に影響の無い非常に弱い測定光 (ピーク波長 650 nm) を照射して F_0 を求める。測定光を照射した 20 秒後に熱放散系を駆動させない短い 0.8 秒の飽和パルス光を照射することで、 F_m' dark を得た。その後、2 つのタイプの実験を行なった。(1) 細胞液に対して、青色励起光 (ピーク波長 640 nm) を各強度 (44.6, 72.8, 145 and 288 $\mu\text{molphotons/m}^2/\text{s}$) を 5 分ずつ、徐々に光強度を上げて照射した。各々の光強度の切り替え直前に飽和パルス光を照射することによって F_m' を測定し、各励起光強度下での熱放散の駆動を調べた。その後、暗所における F_m' dark の推移を測定するために、288 $\mu\text{molphotons/m}^2/\text{s}$ の青色光を切ったあと、10 秒、5, 10, 15, 20 分後に飽和パルス光を照射した。最後に最終濃度 10 μM の DCMU を添加し、562 $\mu\text{molphotons/m}^2/\text{s}$ の赤色励起光を照射して F_m を得た (図 III-2A)。(2) 赤色励起光 (ピーク波長 660 nm) と誘導される Φ_{NPQ} の関係を調べるために、各光強度 (31.5, 167, 562, 1,190 $\mu\text{molphotons/m}^2/\text{s}$) を 5 分ずつそれぞれ照射し、光強度の切り替え直前に飽和パルス光を照射することによって各励起光強度下での熱放散の駆動を調べた。各々の光強度の切り替え直前に飽和パルス光を照射することによって F_m' を測定することにより、各励起光強度下での熱放散系の駆動を調べた。その後、5 分間の暗順応の後、飽和パルス光を照射することで赤色光照射下から暗所への F_m' の変化を確認した。最後に後さらに 1,190 $\mu\text{molphotons/m}^2/\text{s}$ の励起光を切った後、10 秒後に再び飽和光を照射し 20 分間再び暗順応の間、5 分毎に飽和パルス光を照射することによって、暗所での熱放散系の推移について測定している。最後に最終濃度 10 μM の DCMU を添加し、562 $\mu\text{molphotons/m}^2/\text{s}$ の赤色励起光を照射して F_m を得た (図 III-3)。また図 III-3 における *Synechocystis* sp. PCC6803 の測定は *Cyanophora paradoxa* と同一の操作を行なった。測定

3 章

の最中は暗順応も含めスターラーによって常に細胞液を攪拌した。各光合成パラメーターは次のような式によって求めている。 $\Phi_{NPQ} = F_s/F_m' - F_s/F_m$ (Hendrickson et al. 2004)

低温クロロフィル蛍光スペクトル測定

1 章及び 2 章と同様に、液体窒素温度である 77K 下でのクロロフィル蛍光スペクトルは Ogawa et al. 2013 を参考に、低温アタッチメント (PU-830; JASCO) を装着した Fluorescence spectrometer (FP-8500; JASCO) で測定を行なった。実験前に 100%メタノールを用いたクロロフィル抽出法

(Grimme & Boardman 1972) によって 2 $\mu\text{gChl/ml}$ になるよう細胞の濃度を調節した。15 分暗順応させた細胞液、及び KCN (最終濃度 1 mM) を添加して 15 分暗順応させた細胞液と、DCMU (最終濃度 10 μM) を添加し白色光 (500 $\mu\text{molphotons/m}^2/\text{s}$) (PICL-NRX, NIPPON P-I) を 4 分間照射した細胞液を、液体窒素を用いて凍らせ、測定を行なった。試料はフィコシアニンを励起する 625 nm の光とクロロフィルを励起する 435 nm の光 (スリット幅は 10 nm) を照射したときの蛍光を測定している。蛍光スペクトルは蛍光のスリット幅が 2.5 nm になっており、また解像度は 0.2 nm である。また蛍光スペクトルは photomultiplier の感度に対して修正を行なっており、二次光源は ESC-842; JASCO を使用している。クロロフィル蛍光スペクトルはそれぞれ、725 nm 付近の最大値の蛍光強度を 1 としてノーマライズしている。

吸収スペクトル測定

1 章と同様に、吸収スペクトルは Ogawa et al. 2013 に従い、積分球 (ISV-722; JASCO) を装着した分光器 (V-650; JASCO) を用い、室温下で測定した。セルは光路長が 5 mm のものを用いた。スペクトルは最も大きな吸光度から、ノーマライズしている。

結果

***Cyanophora paradoxa* における暗所下での PQ プールの還元**

暗所下での葉緑体呼吸の光合成への影響は PQ プールの酸化還元状態に反映される。還元された PQ プールはステート遷移を誘導し、PSI によりエネルギーを流す。よって 1 章、2 章と同様に PQ プールの酸化還元状態を、77 K における低温クロロフィル蛍光測定によってステート遷移の働きから見積もった。*C. paradoxa* の細胞に対して、PBS を励起する 625 nm の光を照射すると、PSI の蛍光 (725 nm) と PSII の蛍光 (685/695 nm) が得られた (図 III-1)。DCMU を添加し、光を照射した細胞では PQ プールが酸化されステート 1 になる。このとき PSII(F₆₉₅)/PSI(F₇₂₅) の比率が高くなった (0.904 ± 0.025) (図 3-1A、赤線)。これは PBS から PSII に選択的にエネルギーが流れていることを意味する。一方細胞に KCN を添加しミトコンドリアの呼吸を阻害して、暗順応させると葉緑体呼吸が活性化され、PQ プールが還元されることが知られている (Bennoun 1982, Gans and Wollman 1995)。これは灰色藻にも当てはまり、*C. paradoxa* でも KCN の添加によってステート 2 が確認され、F₆₉₅/F₇₂₅ の比率は 0.697 ± 0.013 であった (図 III-1A、黒点線)。そして KCN を添加せず、単に暗順応させた細胞は F₆₉₅/F₇₂₅ の比率は 0.750 ± 0.014 (図 III-1A、黒線) であった。

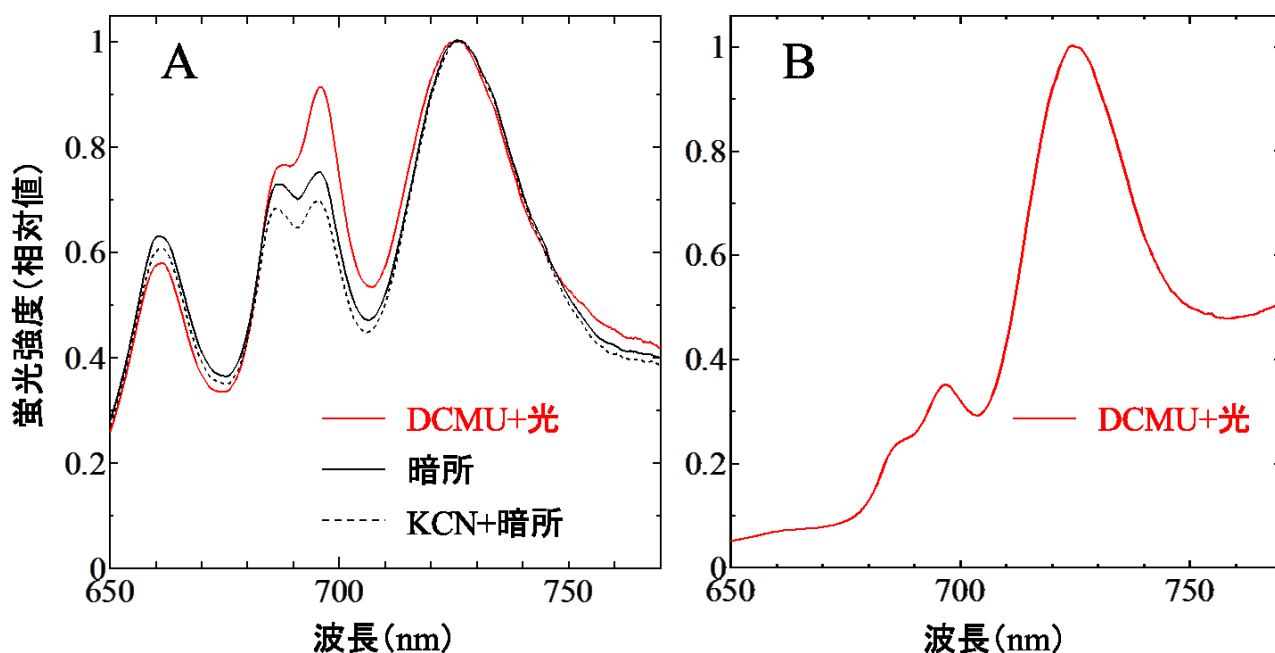


図 III-1 : 77 K にてフィコシアニンを励起する 625 nm の光を細胞に照射した場合 (A) とクロロフィルを励起する 435 nm の光を細胞に照射した場合 (B) に得られた *C. paradoxa* における低温クロロフィル蛍光スペクトル

黒線は暗順応させた細胞、黒点線は 1 mM の KCN の存在下で暗順応させた細胞、赤線は 10 μ M の DCMU の存在下で光を照射した細胞である。各スペクトルは 3 回独立して培養した株を用いて平均したものである。

また 77 K にてクロロフィルを励起させる 435 nm の青色光を細胞に照射することで得られたクロロフィル蛍光スペクトルから、*C. paradoxa* の PSI/PSII 比は非常に高いことがわかった (図 III-1B)。

3 章

つまり青色光は PSI を選択的に励起させる光となり、PQ プールを酸化させると考えられる。そこで室温下で青色光を細胞に照射した際のクロロフィル蛍光挙動を測定した。弱光の $44.6 \mu\text{molphotons/m}^2/\text{s}$ の青色光を照射した際に F_m' (図 III-2A、最も左にある右向き白三角) は暗所下での F_m' (図 III-2A、最も左にある右向き黒三角) より大きな値であり、かつ DCMU を添加し、光を照射することで得られた F_m に近い値が示された。つまり青色光の照射により、暗所で還元されていた PQ プールが酸化されていることを示していると考えられる。また青色の光強度を徐々に大きくした場合 ($72.8, 145, 288 \mu\text{molphotons/m}^2/\text{s}$) でも F_m' の値は大きいままで変化が見られなかった (図 III-2A、右向き白三角)。この挙動を 1 章や 2 章で用いた Φ_{NPQ} にて表した場合、青色光照射下では凡そ暗所下と比べて 1/3 に減少していた (図 III-2B)。青色光を切り暗所に戻すと、 F_m' は再び小さくなり、5 分間で元の暗所下の F_m' および Φ_{NPQ} の値に凡そ戻った (図 III-2A, B)。つまり、暗所下で再び葉緑体呼吸による電子が PQ プールに流入し、PQ プールが再び還元されたと考えられる。

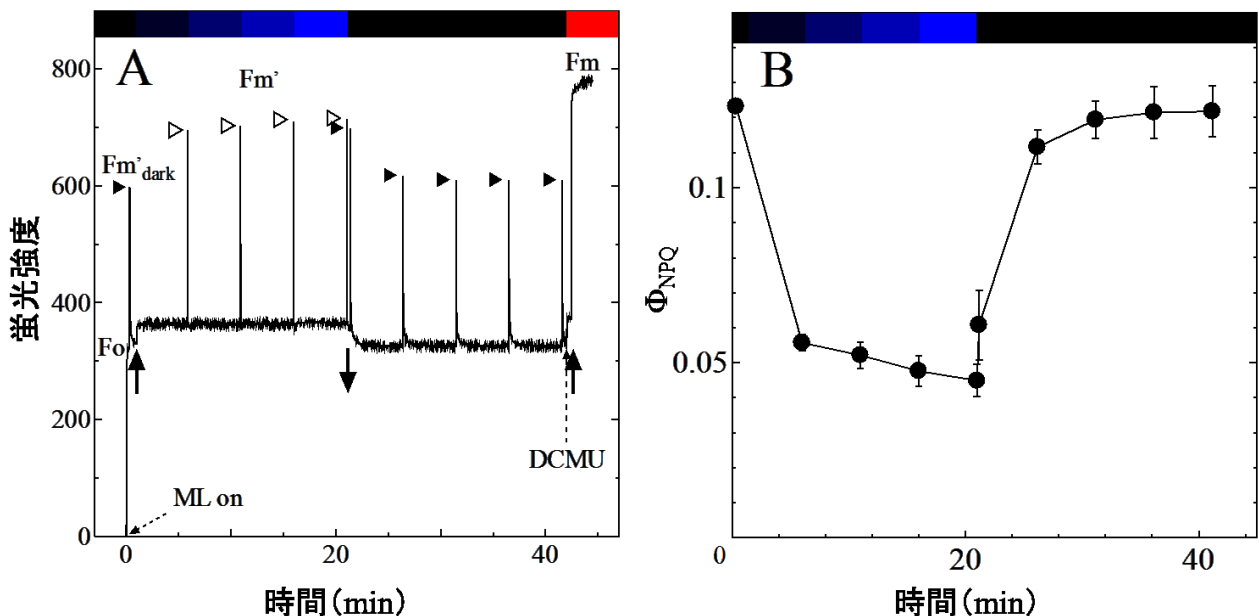


図 III-2 : *C. paradoxa* のクロロフィル蛍光挙動 (A) とクロロフィル蛍光挙動から算出した Φ_{NPQ} の変化 (B)

励起光は上向き太矢印の時点で点灯し、下向き太矢印の時点で消灯した。DCMU は上向き点線矢印の時点で添加した。図上部のバーの色は光の違いを表し、黒は暗所、青が青色光、赤が $562 \mu\text{molphotons/m}^2/\text{s}$ の赤色光を意味している。青色の濃淡は異なる光強度を示し、左から $44.6, 72.8, 145, 288.5 \mu\text{molphotons/m}^2/\text{s}$ を 5 分毎に順番に強くして照射した。B パネルにおける Φ_{NPQ} は 3 回独立して培養した株を用いて平均したものであり、エラーバーは標準偏差を示している。

1 章および 2 章と同様に、室温下で各強度の赤色の励起光を照射した際に誘導された Φ_{NPQ} の関係を調べると、 Φ_{NPQ} は暗所で大きく、弱光下で小さくなり、強光下で再び大きくなる推移が得られた (図 III-3、黒丸)。 *C. paradoxa* の Φ_{NPQ} 推移は同一の光条件で培養した *Synechocystis* sp. PCC6803 (図 III-3、点線白丸) の推移と似ていた。つまり *C. paradoxa* における Φ_{NPQ} の推移も暗所下で還元されていた PQ プールが、弱光下で酸化され、強光下で再び還元されることを反映した状態遷移に依存していると考えられる。一方で、*Synechocystis* sp. PCC6803 (図 III-3、点線白丸) で見られる生育光強度下で最も PQ プールが酸化されるシアノバクテリアの性質 (Campbell and Öquist

3 章

1996) は、*C. paradoxa* では見られなかった。*C. paradoxa* にて Φ_{NPQ} が最も小さくなったのは31.5 $\mu\text{molphotons/m}^2\text{s}$ の光強度下であった(図 III-3、黒丸)。これは *C. paradoxa* とシアノバクテリアとの、光合成色素の吸収の違いが原因である可能性がある。*C. paradoxa* の吸収スペクトルを測定すると、PBS の吸収のピークは636 nm であり、シアノバクテリアの PBS の吸収のピークである625 nm より長波長側にピークが見られた(図 III-4)。つまり励起光(赤色 LED)のピークである650 nm に、*C. paradoxa* の PBS の吸収ピークはより近かった。*C. paradoxa* の PBS の色素組成(C-phyococyanin と allophycocyanin) はシアノバクテリアと同様である(Chapman 1966) ことが知られる一方で、過去にも *C. paradoxa* の吸収スペクトル自体は報告があり(Schenk et al. 1987)、同様な長波長よりの PBS の吸収ピークが読み取れる。

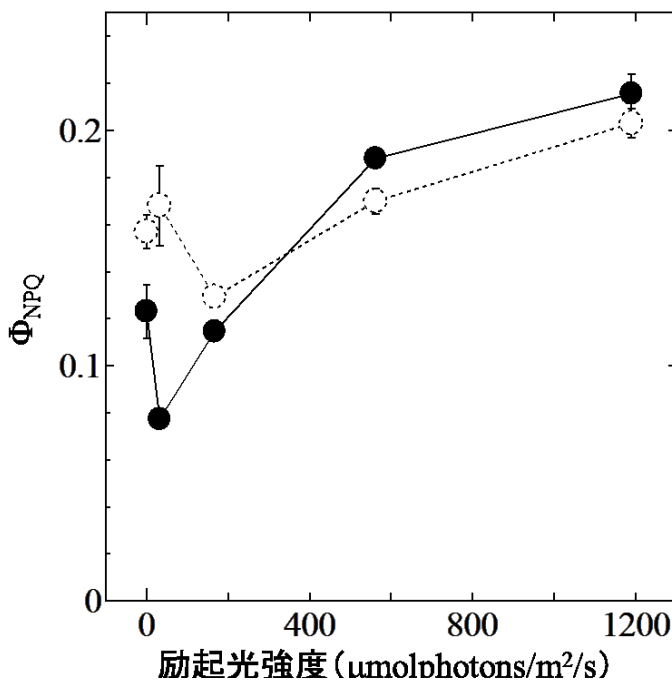


図 III-3 : 室温における赤色の励起光(ピーク波長は660 nm)を照射した際に誘導された Φ_{NPQ} との関係
黒丸は *C. paradoxa* を示し、点線白丸は *Synechocystis* sp. PCC6803 を示す。黒線と点線は黒丸(*C. paradoxa*)と点線白丸(*Synechocystis* sp. PCC6803)のそれぞれのデータポイントを結んだものである。データの値は3回独立して培養した株を用いて平均したものであり、バーは標準偏差を示している。

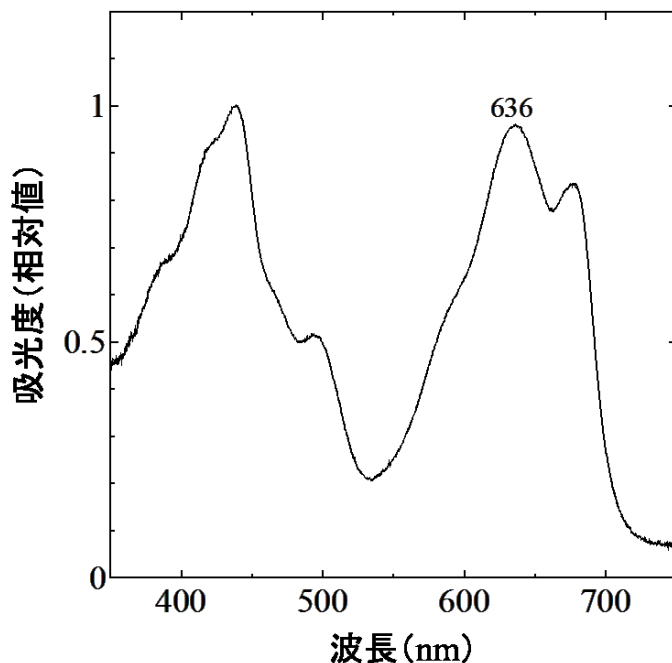


図 III-4 : 室温での培地中の *C. paradoxa* (生細胞) の吸収スペクトル
636 は *C. paradoxa* における PBS のピーク波長である636 nmを表している。スペクトルは3回独立して培養した株を用いて平均したものである。

3 章

考察

灰色藻 *Cyanophora paradoxa* は葉緑体呼吸により暗所下で PQ プールが還元状態になる

真核藻類である灰色藻 *C. paradoxa* において、低温クロロフィル蛍光スペクトル (図 III-1A) や室温でのクロロフィル蛍光挙動 (図 III-2A, B、図 III-3) の結果はいずれも PQ プールの暗所下での還元を示していた。つまり、*C. paradoxa* においても、光に依存しない代謝による光合成への影響があることを示している。PQ プールの酸化還元状態とステート遷移による F_{695}/F_{725} の比率において、一次関数的な比例関係が成り立つとして算出すると、暗所下にて *C. paradoxa* の PQ プールは約 70% が還元されていることになる (図 III-1A)。これは 2 章における図 II-2 の結果から *Synechocystis* sp. PCC6803 の WT は PQ プールが 50% から 90% まで還元されていることと、遜色ない PQ プールの強い還元が見られた。PQ プールの還元は青色光によって酸化され、再び暗所に戻すと 5 分で再還元された (図 III-2A, B)。つまり、暗所下の PQ プールに光合成以外からの電子が十分に流入していることを意味する。この *C. paradoxa* における暗所での PQ プールの還元は葉緑体呼吸 (Bennoun et al. 1982) によると考えられる。これは *C. paradoxa* の葉緑体ゲノムサイズは他の真核藻類と同様に、シアノバクテリアと比べて小さく (Herdman & Stanier 1977)、さらにシアノバクテリアの呼吸鎖をコードする遺伝子は残っていない (Stirewalt et al. 1995, Martín & Sabater 2010) ためである。また近年、緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* において葉緑体呼吸の経路が明らかになり、NDA2 (Jans et al. 2008) から PQ プールを経て、PTOX1, 2 (Houille-Vernes et al. 2011) に電子が流れることが報告されている。つまりシアノバクテリアの呼吸鎖ではない葉緑体呼吸と呼ばれる代替経路によって、シアノバクテリアと同様な暗所下での PQ プールの還元を実現している。このことは暗所下で PQ プールを還元することに、生理学的意義が存在することを示唆するものである。

真核光合成生物では、多くの種にて暗所では PQ プールが酸化状態にある (Delphin et al. 1996, Kruk & Karpinski 2006) と報告されている。緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* も通常の培養条件では PQ プールは酸化状態を示すとされ (Houille-Vernes et al. 2011)、酢酸などの有機物の添加によって、PQ プールが還元されることが報告されている (Endo & Asada 1996)。またその他にもミトコンドリアの呼吸阻害剤を添加した場合 (Bennoun et al. 1982, Gans & Wollman 1995)、窒素欠乏条件の場合 (Peltier & Schmidt 1991)、浸透圧を強く変化させた場合 (Endo et al. 1995) が知られるが、以上の条件に関しては、本研究においては有機物を含まない C 培地で空気を通気させて培養しているため、いずれも該当しない。しかし一方で緑藻 *Dunaliella tertiolecta* (Casper-Lindley and Björkman 1996) や *chrysophyte* の *Ochromonas danica* (Gibbs & Biggins 1989) や *euglenophyte* の *Euglena gracilis* (Doerge et al. 2000) では暗所での PQ プールの還元が報告されている。また *Chlamydomonas reinhardtii* においても、独立栄養条件で培養した場合でも PQ プールが暗所で還元される報告 (Iwai et al. 2007) がある。つまり同じ *Chlamydomonas reinhardtii* でも、研究グループによっては異なる結果が示されている。2 章の結果からシアノバクテリアにおいて、暗所下での PQ プールの還元の程度は生育光強度によって変化していた (図 II-2) ため、生育光強度が PQ プールの酸化還元状態に影響を与えることで、真核藻類においても同一種の間で結果の違いを生み出している可能性がある。

3 章の内容は 2017 年に以下に示すタイトルで論文発表したものである。Misumi, M. and Sonoike, K. (2017). Characterization of the influence of chlororespiration on the regulation of photosynthesis in the glaucophyte *Cyanophora paradoxa*. *Scientific reports*, 7, 46100.

総合考察

呼吸が光合成に与える影響の重要性

原核光合成生物のシアノバクテリアでは、呼吸と光合成が1枚の膜上で同時に行われ、かつPQプールを含む一部の電子伝達成分が共有されている。その結果、暗所下では、呼吸鎖の電子によってPQプールは還元されるとされてきた (Campbell and Öquist 1996)。しかし本研究による1章の結果では、そのPQプールの還元割合には種間差が見られた。特に *Nostoc punctiforme* ATCC29133 と *Acaryochloris marina* MBIC11017 の2種は、暗所下でもPQプールが酸化されていた (図 I-2、図 I-4)。この2種は、自然環境においては、弱光、または光強度が大きく変動しない場所に生息している (Rippka et al. 1979, Miyashita et al. 1996)。つまり (1) 暗所でPQプールを酸化条件に保つことには、弱光環境で有利に働き、還元条件に保つことには、強光環境で有利に働くと考えられる。2章の結果からは、*Synechocystis* sp. PCC6803 のPSIのサブユニットPsaK2の欠損株 (Δ psaK2) は、従来考えられていたようにステート遷移ができない株ではなく、PQプールが暗所で酸化されているために見かけ上ステート遷移を行うことができない表現系を示すことがわかった。暗所下でのPQプールの酸化は、細胞の飢餓や Δ ndhF1 などの呼吸系の変異株でも見られるが (Mi et al. 1992, Ogawa et al. 2013)、 Δ psaK2 の呼吸速度は、表 II-1 から明らかなようにWTと変わらない。つまり呼吸系の変異株とは異なるメカニズムでPQプールが酸化されていると考えられる。(2) Δ psaK2 における暗所でのPQプールの酸化の原因は、PsaK2の欠損により光合成系にストレスがかかり、この補償作用としてPQプールのサイズが大きくなったことにあるかもしれない。3章の結果では、真核藻類である灰色藻 *C. paradoxa* でも、シアノバクテリアと同様に葉緑体呼吸によってPQプールが還元されることが明らかとなった。(3) シアノバクテリアが葉緑体になる進化の過程において呼吸鎖が失われたにも拘わらず、代替の葉緑体呼吸によって暗所下でのPQプールの還元が維持されたことを意味している。以上の(1)および(3)から、呼吸もしくは葉緑体呼吸によって光合成電子伝達鎖であるPQプールを暗所で還元状態に保つことは、生理学的に重要な意義を持つメカニズムであると考えられる。生理学的な意義としては、以下に示すようなPSIの光阻害に対する保護機構となっている可能性が考えられる。

PSIの光阻害は、PSIの下流において電子が酸素に受け渡され、活性酸素が発生することによりPSIの鉄硫黄クラスターが破壊されて引き起こされる (Sonoike 2011)。つまり、PSIの下流で電子の流れが滞り、かつPSIIからPSIへの電子流入が抑制されない場合に、PSIの光阻害が引き起こされる。PSIはいったん破壊されると、修復に時間がかかるため (Kudoh and Sonoike 2002)、PSIの光阻害は光合成生物にとって深刻な問題である。そのため、光合成生物はPSIの光阻害を防ぐために様々な保護メカニズムを持っており、PSIの下流が過還元の状態にならないようにするFlv (図 1) やサイクリック電子伝達や、PSIIからの電子流入を抑制するPSIIの下方制御が知られている。また光合成生物にとって、暗所から明所への移行時は、光合成産物であるNADPHの消費先であるカルビン・ベンソン回路の酵素が暗所で失活しているため、PSI下流において電子の流れが滞りやすい状況である。このため変動光下では、活性酸素を発生させずにPSI下流における過剰な電子を酸素に渡して無害化するFlv1/3を欠損するシアノバクテリアの生育が阻害される (Allahverdiyeva et al. 2013)。また、シロイヌナズナにおいては、変動光下でのPSIの保護にPGR5依存のサイクリック電子伝達が必須であることが報告されている (Suorsa et al. 2012)。さらに、陸上植物や強光下で生育した緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* は、PSIIの光合成効率の下方制御の一環として、ステート遷

総合考察

移に加えて、チラコイド膜内外のプロトン濃度勾配に依存したエネルギークエンチングを行う

(Demmig-Adams and Adams 1996, Peers et al. 2009) が、サイクリック電子伝達にかかわる *Crpgr11* とエネルギークエンチングにかかわる *npq4* が共に欠損した *Chlamydomonas reinhardtii* の変異株は、PSIの光阻害を受けやすくなることが報告されている (Kukuczka, et al. 2014)。これらの結果は、光合成生物にとって光化学系 I を保護することが極めて重要であることを示している。

1章や**3章**で見られたように、PQプールが還元的になると、ステート遷移によって集光性アンテナがPSIによりエネルギーを流すようになり、光合成効率が低下する。またRISEと呼ばれる、Cyt *b₆f*における光合成電子伝達を抑制する作用もPQプールの還元によって誘導される (Shaku et al. 2015)。さらにPQプールが還元されると、チラコイド膜では呼吸鎖のNDH-1やSDHが光化学系Iに近づくように再配置され、これはサイクリック電子伝達の活性化に寄与すると考えられている (Liu et al. 2012)。サイクリック電子伝達はPSI下流の過剰な電子をPQプールに再び戻すメカニズムであり、PSIの下流における電子の詰まりを解消する (Makino et al. 2002)。これらの過去の知見と本論文の結果を考え合わせると、PSIにとってストレスとなる変動光や間欠光などの明暗が素早く切り替わるような光環境下においては、あらかじめ暗所下で呼吸や葉緑体呼吸によってPQプールを還元しておくことにより、PSIが破壊されるリスクを下げ、このことが生存において有利に働く可能性がある。**2章**においてみられたように $\Delta psak2$ のPQプールが酸化的原因は、(2)で示したようにPQプールのサイズの変化である可能性がある。暗所下でPQプールが酸化状態に保たれることは、連続明所下で光合成電子伝達にストレスがかかる状態では有利な形質である一方で、明暗が頻繁に切り替わる自然環境下では、生存に不利となると考えられる。

謝辞

本論文における研究を進めるにあたり、教育・総合科学学術院、園池公毅教授からは指導教授としてご指導、ディスカッション等、研究姿勢など終始にわたりご助力戴いた。ここに感謝の意を表する。

1章の完成にあたり、東京理科大学の靱達也教授、三重大大学の加藤浩助教には株を提供して戴くとともに実験における有益なご助言を頂いた。ここに感謝の意を表する。

2章の完成にあたり、埼玉大学の日原由香子教授からは、 $\Delta psaK2$ の作成にあたり、破壊コンストラクトを提供して戴いた。ここに感謝の意を表する。

植物生理学研究室（園池研究室）の方々との日々のディスカッションから、本研究の実験計画や考察に深みが増した。ここに感謝の意を表する。

本研究の一部は JSPS 科研費 JP17J09234 の助成を受けたものである。

参考文献

- Allahverdiyeva, Y. et al. (2013). Flavodiiron proteins Flv1 and Flv3 enable cyanobacterial growth and photosynthesis under fluctuating light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**, 4111-4116.
- Allen, J. F et al. (1981). Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature*, **291**, 25.
- Allen, M. M. (1968). Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.*, **4**, 1-3.
- Aoki, M. and Katoh, S. (1982). Oxidation and reduction of plastoquinone by photosynthetic and respiratory electron transport in a cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Biochim. Biophys. Acta*, **682**, 307-314.
- Arnon, D. I. et al. (1974). Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, **357**, 231-245.
- Badger, M. R. et al. (2005). The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *J. Exp. Bot.*, **57**, 249-265.
- Bellaïf, S. et al. (2005). State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature*, **433**, 892.
- Bennoun, P. (1982). Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 4352-4356.
- Ben-Shem, A. et al. (2003). Crystal structure of plant photosystem I. *Nature*, **426**, 630.
- Burey, S. C. et al. (2007). Acclimation to low [CO₂] by an inorganic carbon-concentrating mechanism in *Cyanophora paradoxa*. *Plant Cell Environ.*, **30**, 1422-1435.
- Calzadilla, P. I. et al. (2019) (a). The cytochrome *b₆f* complex is not involved in cyanobacterial state transitions. *The Plant Cell*, **31**, 911-931.
- Calzadilla, P. I. et al. (2019) (b). Different roles for ApcD and ApcF in *Synechococcus elongatus* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 phycobilisomes. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, 1860, 488-498.
- Campbell, D. and Öquist, G. (1996). Predicting light acclimation in cyanobacteria from nonphotochemical quenching of photosystem II fluorescence, which reflects state transitions in these organisms. *Plant Physiol.*, **111**, 1293-1298.
- Campbell, D. et al. (1998). Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 667-683.
- Casper-Lindley, C. and Björkman, O. (1996). Nigericin insensitive post-illumination reduction in fluorescence yield in *Dunaliella tertiolecta* (chlorophyte). *Photosynth. Res.*, **50**, 209-222.

参考文献

- Chapman, D. J. (1966). The pigments of the symbiotic algae (cyanomes) of *Cyanophora paradoxa* and *Glaucocystis nostochinearum* and two Rhodophyceae, *Porphyridium aerugineum* and *Asterocystis ramosa*. *Arch. Mikrobiol.*, **55**, 17-25.
- Darwin, C. (1859). *The Origin of Species by Means of Natural Selection*. (Murray, London, U.K.)
- Delphin, E. et al. (1996). State transitions or Δ pH-dependent quenching of photosystem II fluorescence in red algae. *Biochemistry* **35**, 9435-9445.
- Demmig-Adams, B. and Adams III, W. W. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.*, **1**, 21-26.
- Doege, M. et al. (2000). Chlorophyll fluorescence quenching in the alga *Euglena gracilis*. *Photosyn. Res.*, **63**, 159-170.
- Douzery, E. J. P. et al. (2004). The timing of eukaryotic evolution: does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 15386-15391.
- Emlyn-Jones, D. et al. (1999). A gene required for the regulation of photosynthetic light harvesting in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Mol. Microbiol.*, **33**, 1050-1058.
- Endo, T. and Asada, K. (1996). Dark induction of the non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence by acetate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.*, **37**, 551-555.
- Endo, T. et al. (1995). Suppression of quantum yield of photosystem II by hyperosmotic stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.*, **36**, 1253-1258.
- Fathinejad, S. et al. (2008). A carboxysomal carbon-concentrating mechanism in the cyanelles of the 'coelacanth' of the algal world, *Cyanophora paradoxa*? *Physiol. Plant.*, **133**, 27-32.
- Fujimori, T. et al. (2005). PsaK2 subunit in photosystem I is involved in state transition under high light condition in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.*, **280**, 22191-22197.
- Gans, P., & Wollman, F. A. (1995). The effect of cyanide on state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, **1228**, 51-57.
- Genty, B. et al. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, **990**, 87-92.
- Gibbs, P. B. and Biggins, J. (1989). Regulation of the distribution of excitation energy in *Ochromonas danica*, an organism containing a chlorophyll-A/C/carotenoid light harvesting antenna. *Photosyn. Res.* **21**, 81-91.
- Giddings, T. H. et al. (1983). Structure of the thylakoids and envelope membranes of the cyanelles of *Cyanophora paradoxa*. *Plant Physiol.* **71**, 409-419.
- Grimme, L. H. and Boardman, N. K. (1972). Photochemical activities of a particle fraction P1 obtained from the green alga *Chlorella fusca*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1617-1623.
- Hatakeyama, Y. and Ueno, O. (2016). Intracellular position of mitochondria and chloroplasts in bundle sheath and mesophyll cells of C₃ grasses in relation to photorespiratory CO₂ loss. *Plant Prod. Sci.*, **19**, 540-551.
- Hendrickson, L. et al. (2004). A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.* **82**, 73-81.

参考文献

- Herdman, M. and Stanier, R. Y. (1977). The cyanelle: chloroplast or endosymbiotic prokaryote? *FEMS Microbiol. Lett.*, **1**, 7-11
- Hideg, É. et al. (1994). Singlet oxygen production in thylakoid membranes during photoinhibition as detected by EPR spectroscopy. *Photosyn. Res.*, **39**, 191-199.
- Hihara, Y. et al. (2003). DNA microarray analysis of redox-responsive genes in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. bacteriol.*, **185**, 1719-1725.
- Hiraide, Y. et al. (2014). Loss of cytochrome c_M stimulates cyanobacterial heterotrophic growth in the dark. *Plant Cell Physiol.*, **56**, 334-345.
- Houille-Vernes, L. et al. (2011). Plastid terminal oxidase 2 (PTOX2) is the major oxidase involved in chlororespiration in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**, 20820-20825.
- Howitt, C. A. and Vermaas, W. F. (1998). Quinol and cytochrome oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry*, **37**, 17944-17951.
- Ichimura, T. (1971). Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum*. In *International Symposium on Seaweed Research 7th*, Sapporo.
- Iwai, M. et al. (2007). Distinct physiological responses to a high light and low CO₂ environment revealed by fluorescence quenching in photoautotrophically grown *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosyn. Res.*, **94**, 307-314.
- Jans, F. et al. (2008). A type II NAD (P) H dehydrogenase mediates light-independent plastoquinone reduction in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 20546-20551.
- Jordan, P. et al. (2001). Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, **411**, 909.
- Kirilovsky, D. (2007). Photoprotection in cyanobacteria: the orange carotenoid protein (OCP)-related non-photochemical-quenching mechanism. *Photosyn. Res.*, **93**, 7.
- Koike, H. et al. (2000) Identification of photosystem I components from a glaucocystophyte, *Cyanophora paradoxa*: The PsaD protein has an N-terminal stretch homologous to higher plants. *Photosyn. Res.*, **65**, 207-217.
- Kondo, K. et al. (2009). Distinct roles of CpcG1-phycobilisome and CpcG2-phycobilisome in state transitions in a cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosyn. Res.*, **99**, 217-225.
- Kopp, R. E. et al. (2005). The Paleoproterozoic snowball Earth: a climate disaster triggered by the evolution of oxygenic photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 11131-11136.
- Krieger-Liszkay, A. et al. (2008). Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosyn. Res.*, **98**, 551-564.
- Kruk, J. and Karpinski, S. (2006). An HPLC-based method of estimation of the total redox state of plastoquinone in chloroplasts, the size of the photochemically active plastoquinone-pool and its redox state in thylakoids of *Arabidopsis*. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, **1757**, 1669-1675.
- Kruk, J. and Trebst, A. (2008). Plastoquinol as a singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, **1777**, 154-162.

参考文献

- Kudoh, H. and Sonoike, K. (2002). Dark-chilling pretreatment protects PSI from light-chilling damage. *J. Photosci.*, **9**, 59-62.
- Kühl, M. et al. (2005). W. Ecology: a niche for cyanobacteria containing chlorophyll *d*. *Nature*, **433**, 820-820.
- Kukuczka, B. et al. (2014). Proton gradient regulation5-like1-mediated cyclic electron flow is crucial for acclimation to anoxia and complementary to nonphotochemical quenching in stress adaptation. *Plant physiol.* **165**, 1604-1617.
- Lea-Smith, D. J. et al. (2016). Photosynthetic, respiratory and extracellular electron transport pathways in cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, **1857**, 247-255.
- Lea-Smith, D. J. et al. (2013). Thylakoid terminal oxidases are essential for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to survive rapidly changing light intensities. *Plant physiol.*, **162**, 484-495.
- Li, H. and Sherman, L. A. (2000). A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.*, **182**, 4268-4277.
- Liu, L. N. et al. (2012). Control of electron transport routes through redox-regulated redistribution of respiratory complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**, 11431-11436.
- Macpherson, A. N. et al. (1993). Direct detection of singlet oxygen from isolated photosystem II reaction centres. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, **1143**, 301-309.
- Makino, A. et al. (2002). Physiological functions of the water-water cycle (Mehler reaction) and the cyclic electron flow around PSI in rice leaves. *Plant Cell physiol.* **43**, 1017-1026.
- Manna, P. and Vermaas, W. (1997). Lumenal proteins involved in respiratory electron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Mol. Biol.*, **35**, 407-416.
- Margulis, L. *Origin of eukaryotic cells* (Yale University Press, New Haven, 1970).
- Martín, M. and Sabater, B. (2010). Plastid *ndh* genes in plant evolution. *Plant Physiol. Biochem.* **48**, 636-645.
- 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.
- Mi, H. et al. (1992). Electron donation from cyclic and respiratory flows to the photosynthetic intersystem chain is mediated by pyridine nucleotide dehydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Cell physiol.*, **33**, 1233-1237.
- Mi, H. et al. (1994) NAD(P)H dehydrogenase-dependent cyclic electron flow around photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: a study of dark-starved cells and spheroplasts. *Plant Cell Physiol.* **35**, 163-173.
- Misumi, M. et al. (2016). Relationship between photochemical quenching and non-photochemical quenching in six species of cyanobacteria reveals species difference in redox state and species commonality in energy dissipation. *Plant Cell Physiol.*, **57**, 1510-1517.
- Misumi, M. and Sonoike, K. (2017). Characterization of the influence of chlororespiration on the regulation of photosynthesis in the glaucophyte *Cyanophora paradoxa*. *Sci. Rep.*, **7**, 46100.
- Miyashita, H et al. (1996) Chlorophyll *d* as a major pigment. *Nature*, **383**, 402.

参考文献

- Miyashita, H. et al. (2003). *Acaryochloris marina* gen. et sp. Nov. (cyanobacteria), an oxygenic photosynthetic prokaryote containing Chl *d* as a major pigment 1. *J. Phycol.*, **39**, 1247-1253.
- Ogawa, T. et al. (2013). Disruption of the *ndhF1* gene affects Chl fluorescence through state transition in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, resulting in apparent high efficiency of photosynthesis. *Plant Cell Physiol.*, **54**, 1164-1171.
- Ogawa, T. et al. (2017). Estimation of photosynthesis in cyanobacteria by pulse-amplitude modulation chlorophyll fluorescence: problems and solutions. *Photosyn. Res.*, **133**, 63-73.
- Ozaki, H. et al. (2007). Large-scale analysis of chlorophyll fluorescence kinetics in *Synechocystis* sp. PCC 6803: identification of the factors involved in the modulation of photosystem stoichiometry. *Plant Cell Physiol.*, **48**, 451-458.
- Peers, G. et al. (2009). An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis. *Nature* **462**, 518-521.
- Peschek G.A. and Schmetterer G. (1982) Evidence for plastoquinol-cytochrome *f/b-563* reductase as a common electron donor to P700 and cytochrome oxidase in cyanobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 1188-1195.
- Pils, D. and Schmetterer, G. (2001). Characterization of three bioenergetically active respiratory terminal oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.*, **203**, 217-222.
- Pribil, M. et al. (2010). Role of plastid protein phosphatase TAP38 in LHCII dephosphorylation and thylakoid electron flow. *PLoS Biol.*, **8**, e1000288.
- Quick, W. P. and Stitt, M. (1989). An examination of factors contributing to non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, **977**, 287-296.
- Raghavendra, A. S. et al. (1994). Interdependence of photosynthesis and respiration in plant cells: interactions between chloroplasts and mitochondria. *Plant Sci.*, **97**, 1-14.
- Renger, G. and Renger, T. (2008). Photosystem II: the machinery of photosynthetic water splitting. *Photosyn. Res.*, **98**, 53-80.
- Rippka, R. et al. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology*, **111**, 1-61.
- Rodríguez-Ezpeleta, N. et al. (2005). Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *Curr. Biol.* **15**, 1325-1330.
- Schenk, H. E. A. (1970). Notizen: Nachweis einer lysozymempfindlichen Stützmembran der Endocyanellen von *Cyanophora Paradoxa* Korschikoff. *Z. Naturforsch.* **25B**, 656-657.
- Schenk, H. E. A. et al. (1987). Nitrate assimilation and regulation of biosynthesis and disintegration of phycobiliproteids by *Cyanophora paradoxa*. Indications for a nitrogen store function of the phycobiliproteids. *Endocytobiosis Cell Res.* **4**, 167-176.
- Shaku, K. et al. (2016). Reduction-induced suppression of electron flow (RISE) in the photosynthetic electron transport system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.*, **57**, 1443-1453.

参考文献

- Shapiguzov, A. et al. (2010). The PPH1 phosphatase is specifically involved in LHCII dephosphorylation and state transitions in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 4782-4787.
- Shimakawa, G. et al. (2014). Respiration accumulates Calvin cycle intermediates for the rapid start of photosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**, 1997-2007.
- Sonoike, K. (2011). Photoinhibition of photosystem I. *Physiol. Plant.* **142**, 56–64.
- Stadnichuk, I. N. et al. (2013). Fluorescence quenching of the phycobilisome terminal emitter LCM from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 detected in vivo and in vitro. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, **125**, 137-145.
- Stirewalt, V. L. et al. (1995). Nucleotide sequence of the cyanelle genome from *Cyanophora paradoxa*. *Plant Mol. Biol. Rep.* **13**, 327–332.
- Suorsa, M. et al. (2012). Proton gradient regulation5 is essential for proper acclimation of *Arabidopsis* photosystem I to naturally and artificially fluctuating light conditions. *Plant Cell* **24**, 2934-2948
- Telfer, A. et al. (1994). Isolated photosynthetic reaction center of photosystem II as a sensitizer for the formation of singlet oxygen. Detection and quantum yield determination using a chemical trapping technique. *J. Biol. Chem.*, **269**, 13244-13253.
- Triantaphylidès, C. and Havaux, M. (2009). Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci.*, **14**, 219-228.
- Trouillard, M. et al. (2012). Kinetic properties and physiological role of the plastoquinone terminal oxidase (PTOX) in a vascular plant. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, **1817**, 2140–2148
- Vener, A. V. et al. (1997). Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome *b₆f* mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: thylakoid protein kinase deactivation by a single-turnover flash. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 1585-1590.
- Yoshida, K. et al. (2007). Up-regulation of mitochondrial alternative oxidase concomitant with chloroplast over-reduction by excess light. *Plant Cell physiol.* **41**, 606-614
- Zito, F. et al. (1999). The Qo site of cytochrome *b₆f* complexes controls the activation of the LHCII kinase. *EMBO J.*, **18**, 2961-2969.

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 三角 将洋 印

(2019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 ○	<ul style="list-style-type: none"> • Misumi, M. and Sonoike, K. (2017, April) Characterization of the influence of chlororespiration on the regulation of photosynthesis in the glaucophyte <i>Cyanophora paradoxa</i>. Scientific Reports, 7:46100 (DOI: 10.1038/srep46100)
○	<ul style="list-style-type: none"> • Misumi, M., Katoh, H., Tomo, T. and Sonoike, K. (2016, July) Relationship between photochemical quenching and non-photochemical quenching in six species of cyanobacteria reveals species difference in redox state and species commonality in energy dissipation. Plant Cell Physiology, 57, 1510-1517.
総説	<ul style="list-style-type: none"> • #Ogawa, T., #Misumi, M. and Sonoike, K. (2017, September) Estimation of photosynthesis in cyanobacteria by pulse amplitude modulation chlorophyll fluorescence: problems and solutions. Photosynthesis Research, 133, 63-73. (#equally contributed authors)
学会発表 (国内)	<ul style="list-style-type: none"> • 「暗所でも見られるクラミドモナスの非光化学消光は有機炭素源の有無よりも培養光強度により影響を受ける」、第 60 回日本植物生理学会年会、2019 年 3 月、三角将洋、園池公毅 • 「シアノバクテリアと灰色藻における呼吸が光合成に与える影響」、光合成学会若手の会第 15 回セミナー、2018 年 5 月、三角将洋 • 「灰色藻 <i>Cyanophora paradoxa</i> と紅藻 <i>Cyanidioschyzon merolae</i> の葉緑体呼吸と光順応の比較」、日本植物学会 第 80 回大会、2016 年 9 月、三角将洋、園池公毅 • 「灰色藻の葉緑体呼吸とステート遷移」、第 7 回日本光合成学会年会、2016 年 5 月、三角将洋、園池公毅 • 「クロロフィル蛍光測定が示すシアノバクテリアの多様性と普遍性」、藍藻の分子生物学 2015、2015 年 11 月、三角将洋、加藤浩、鞆達也、園池公毅 • 「シアノバクテリア、緑藻、紅藻で比較した呼吸が光合成に与える影響」、第 6 回日本光合成学会年会、2015 年 5 月、三角将洋、加藤浩、鞆達也、園池公毅 • 「呼吸および葉緑体呼吸がプラストキノプールの酸化還元状態に与える影響から見た藻類の多様性」、第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月、三角将洋、鞆達也、園池公毅
学会発表 (国際)	<ul style="list-style-type: none"> • "Reevaluation of the method to determine maximum quantum yield of photosystem II in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>", International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis 2018、November 2018, Masahiro Misumi, Kintake Sonoike • "The chlororespiration and light acclimation in Glaucophyta <i>Cyanophora paradoxa</i>", 17th International Congress on Photosynthesis Research, August 2016, Masahiro Misumi, Kintake Sonoike • "Cyanobacterial diversity and uniformity from a chlorophyll fluorescence point of view", 15th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, August 2015, Masahiro Misumi, Kintake Sonoike