

論文内容の要旨

論文題目 Study of the photosystem II photoinhibition: Analyses of repair processes

(光化学系 II 光阻害の研究：修復過程の精査)

氏名 宮田 一範

はじめに

葉への入射光が強いとき、光合成系 II が光阻害を受けることはよく知られている。光化学系 II のみかけの光阻害の程度は、光化学系 II 反応中心を擁する D1 タンパク質の光損傷と修復とのバランスによって決まる。D1 タンパク質のターンオーバー速度は速く、その半減期は強光下では 30 min 程度という短さである。したがって、D1 タンパク質のターンオーバーには大きなエネルギーコストがかかるはずであり、それを定量的に解析することは葉のエネルギー収支を知る上で重要である。私は修士課程において、強光 (HL) と弱光 (LL) 下で栽培したホウレンソウの D1 タンパク質の損傷と修復の速度定数を求めた。博士課程の研究では、まず、D1 タンパク質ターンオーバーにかかるコストを詳細に計算した。葉の光合成系が生育光環境に馴化することはよく知られている。損傷と修復速度にも栽培光環境の影響がみられたので、修復速度定数が光環境によって異なる最適値になっている可能性がある。本研究では、これをシミュレーションによって確かめ、さらに野外の植物にも当てはまるか否かを検討した。

これまで、光化学系 II 光阻害は、過剰エネルギーによって D1 タンパク質が損傷されることによって起こると考えられてきた (過剰エネルギー説)。しかし、2005 年に提出された 2 ステップ説によれば、まず、酸素発生複合体中の Mn クラスターから Mn イオンが解離し、酸素発生活性が失われ、これが原因となって D1 タンパク質が損傷されるという。Mn クラスターの不活性化は Mn による光吸収がきっかけとなるため、著しい光波長依存性を示す。また、Mn クラスターの再活性化には ATP などの化学エネルギーではなく、光が必要であることがわかっている。本研究では、不活性化した Mn クラスターの再活性化の光条件を詳細に解析した。

1. 光化学系 II D1 タンパク質を修復するためのエネルギーコストの定量

光化学系 II D1 タンパク質ターンオーバーのコストの定量には、ホウレンソウ成熟葉を実験に用いた。HL と LL 下で水耕栽培した葉に、異なる光量子束密度 (PPFD) の白色光を照射して光阻害を起こした。D1 タンパク質の損傷 (k_{pi}) と修復 (k_{rec}) の反応速度定数は、損傷と修復を一次反応式で表現したモデルによって算出した。修復を阻害するために、70S 型タンパク質合成阻害剤リンコマイシンを用いた。コストとして、D1 タンパク質の修復にかかった ATP 量を計算した。蛍光法で光合成電子伝達速度を測定し、光合成において生産さ

れる ATP 量と比較した。

光化学系 II D1 タンパク質ターンオーバーのコストは、HL 葉、LL 葉ともに光合成産生 ATP 量に対して 0.5% 以下であった。光化学系 II の他のタンパク質もターンオーバーしていると仮定した場合でも約 1.5% 以下であった。HL 葉は LL 葉に比べ、修復にかかるコストが大きかった。また、HL 葉は LL 葉に比べ、葉面積当りの光化学系 II の量が多かった。さらに、HL 葉は LL 葉に比べ、損傷速度定数 (k_{pi}) は小さいものの、修復速度定数 (k_{rec}) が大きかった。損傷を受ける光化学系 II の絶対量が多くても、それを速やかに修復することによって損傷している D1 タンパク質の割合を抑えることは、光合成活性の維持に有効である。すなわち、HL 葉では、LL 葉に比べ、おもに修復速度を高めることによって、光阻害への感受性を低くしていることが明らかになった。

これらの結果をもとに、修復速度定数 (k_{rec}) が日積算光合成量に及ぼす影響をシミュレーションした。修復速度定数 (k_{rec}) を半減させれば日積算光合成量は大きく低下するが、修復速度定数 (k_{rec}) を倍加させても日積算光合成量はそれほど変わらなかった。

2. 野外植物における光阻害と光環境の関係性の解析

修復速度定数 (k_{rec}) は光馴化によって最適値となるという仮説を立て、野外の植物を用いて検証を試みた。

野外植物の修復速度定数 (k_{rec}) を定量するために、東京大学構内において 50 cm × 50 cm にまとまって群生している植物 6 種を用いた。修復速度定数 (k_{rec}) の測定は、本研究 1 と同じ方法を用いた。野外の光強度は、全天写真による開空度 (%) で定量した。全天写真を Nikon COOLPIX 4500 に Nikon LC-ER1 を装着して撮影した。画像を CanopOn2 と LIA32 で解析し、開空度 (%) と生育光環境 (PPFD) を算出した。

修復速度定数 (k_{rec}) は、開空度 (%) および生育光環境 (PPFD) が上昇するに伴い増加した。このことから、修復速度定数 (k_{rec}) が光環境に依存するのは、普遍的な現象であることが予想される。

また、野外植物は栽培植物に比べ、高い非光化学消光 (NPQ) を示すことが明らかになった。これは、野外植物は変動光下にあり、普段から強光に曝される機会があるためであろう。

3. キュウリを用いた光化学系 II Mn クラスターの光再活性化の解析

光化学系 II Mn クラスターの光再活性化の解析には、キュウリの本葉第 1 葉を用いた。キュウリの葉を氷水に浮かべ暗所に 48 時間置くと、Mn クラスターから Mn イオンが解離する。この Mn クラスターから Mn イオンが解離したキュウリ葉に、異なる PPFD の白色光、青色光、緑色光、赤色光を 30 min 照射した。光再活性化後のキュウリ葉から葉緑体を単離し、光化学系 II における電子伝達系の還元速度を測定した。電子受容体には dichlorophenol indophenol (DCIP) を用いた。DCIP は青色を呈するが、還元されると無色となる。Mn ク

ラスターを介さない DCIP 光還元速度の測定には、光化学系 II 反応中心への電子供与体である diphenylcarbazide (DPC) を用いた。DCIP のみで測定した DCIP 光還元速度は水を電子供与体とする電子伝達反応を示し、DPC と DCIP を加えて測定した DCIP 光還元速度は DPC を電子供与体にしたときの電子伝達反応を示す (Fig. 1)。

不活性化状態の Mn クラスターの光再活性化に最適な PPFD はどの色の光でも $5 - 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の弱光であった (Fig. 2)。特に、 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の緑色光で Mn クラスターが最も光再活性化された (Fig. 2C)。 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ より強光では、Mn イオンが再結合し難くなっていたが、他の色の光に比べて、DCIP 光還元速度の低下は緩やかだった (Fig. 2C)。緑色光は Mn クラスターとクロロフィルのどちらにも吸収され難いためであると考えられる。しかし、青色光では、 $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のような弱光でも不活性化状態の Mn クラスターが存在した (Fig. 2D)。また、他色光に比べて、DCIP 光還元速度が低く、特に、 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ より強光では、活性のある Mn クラスターの割合が他色光より著しく低かった (Fig. 2D)。これは、クロロフィルに青色光が吸収されるのみならず、Mn クラスターの不活性化の光波長が青色光から紫外線域において高いことによると考えられる。赤色光は緑色光と青色光の中間の傾向を示した (Fig. 2B)。赤色光はクロロフィルによく吸収されることが原因であろう。どの色の光でも、 $100 - 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強光で DCIP 光還元速度と活性のある Mn クラスターの割合の両方が低下した。このことは、酸素発生系が機能しない状態の葉に強光が当たり、D1 タンパク質の損傷が起きたことを示している (Fig. 2)。

以上から、青色光は Mn クラスターの光再活性化に不向きであり、緑色光が Mn クラスターの光再活性化に最も有効であるといえる。

まとめ

本研究 1, 2 によって、葉のエネルギー収支の推定に重要な D1 タンパク質のターンオーバーコストが明らかになった。特に、光阻害における修復速度定数 (k_{rec}) と生育光強度との間には高い相関があった。また、野外環境において植物は、過剰なエネルギーを熱として散逸する能力の指標である NPQ が顕著に高かった。野外の植物は、高い NPQ 能をもつことによって損傷速度定数 (k_{pi}) を減少させるとともに、修復速度定数 (k_{rec}) の減少を防いでいると考えられる。

これまで光化学系 II D1 タンパク質のターンオーバーと光化学系 II Mn クラスターの光再活性化は別個に解析されてきた。今後、①Mn クラスターの光再活性化、②D1 タンパク質ターンオーバー、③D1 タンパク質ターンオーバーの後の Mn クラスターの光再活性化の 3 つの修復プロセスを慎重に検討する必要がある。特に、③では、Mn クラスターの光再活性化中にターンオーバーで修復した D1 タンパク質が、再度光によって損傷する可能性が高い。このようなことが生体内で起きているのか、起きているなら、その頻度と詳細なプロセスはどうなっているのか。今後の解明が待たれる。

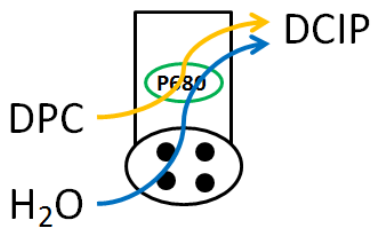


Fig. 1 Electron transfer to DCIP. In the absence of DPC (blue arrow), the electron donor is H₂O. Electrons are transferred through the oxygen evolving complex including the Mn cluster (○) to the reaction center (P680) in D1 protein (□). In the presence of DPC (orange arrow), the electron donor is DPC. Electrons are transferred to the reaction center in D1 protein (□) by passing the oxygen evolving complex (○).

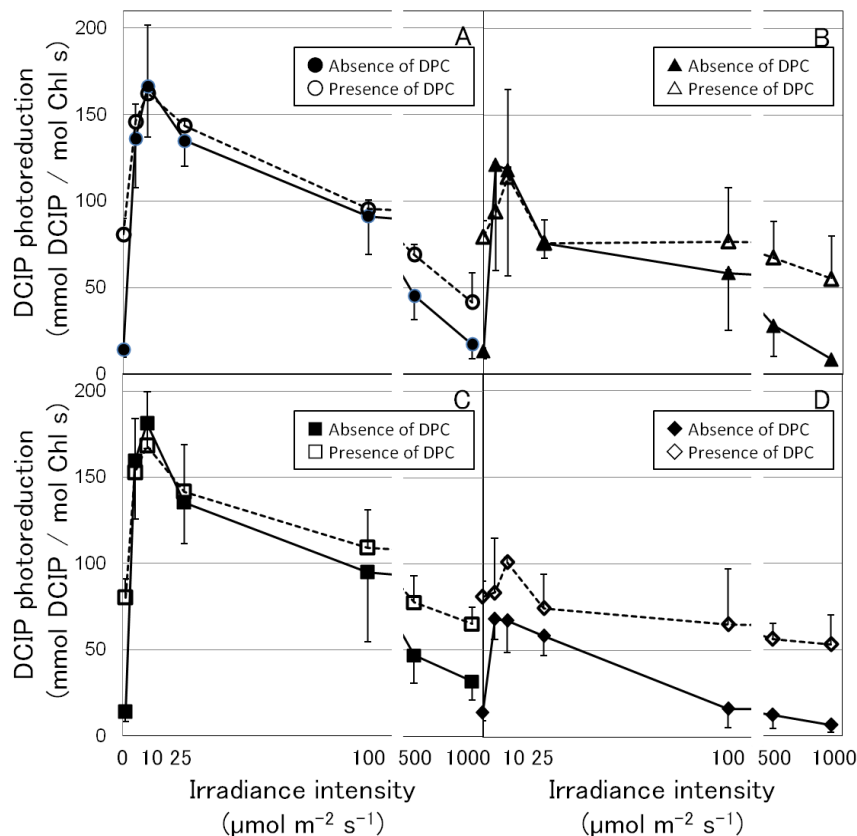


Fig. 2 DCIP photoreduction rates in the absence and presence of DPC of the thylakoid membranes after reactivation treatment.

DCIP photoreduction rates in the absence and presence of DPC of the thylakoid membranes isolated from cucumber leaves that were dark chilled and then reactivated at PPFD of 0, 5, 10, 25, 100, 500 or 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 30 min. The filled and open symbols denote absence and presence of DPC, respectively. The leaves were photoreactivated with white LED (A), red LED (B), green LED (C) or blue LED (D). The means \pm SD ($n \geq 3$) are shown.