



Title	光化学系Iサイクリック電子伝達の活性測定
Author(s)	宗景, ゆり
Citation	低温科学, 67, 529-532 光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/39187">http://hdl.handle.net/2115/39187</a>
Type	bulletin (article)
Note	4章 分光測定 3. パルス変調蛍光 c
File Information	67-072.pdf



[Instructions for use](#)

## 3. パルス変調蛍光

### c. 光化学系 I サイクリック電子伝達の活性測定

宗景 ゆり<sup>1)</sup>

光化学系 I サイクリック電子伝達では、光化学系 I を通過した電子は、プラストキノンへ戻され、直鎖電子伝達経路を経由して再び光化学系 I へ渡される。本章ではクロロフィル蛍光測定や P 700 の酸化キネティクス測定から光化学系 I サイクリック活性を検出する方法を紹介する。

#### Measurement of PSI cyclic electron transport activity

Yuri Munekage

In cyclic electron transport around photosystem I, electrons are donated to plastoquinone from acceptor of photosystem I. In this chapter, I introduce methods for evaluating cyclic electron transport activity from chlorophyll fluorescence measurement or oxidation kinetics of P700 measurement.

##### 3.c.1 はじめに

光化学系 I サイクリック電子伝達は、光化学系 I を通過した電子がプラストキノンへ戻される電子伝達で、戻ってきた電子はシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体、プラストシアニンを経由して再び光化学系 I へ渡される。この経路には、葉緑体 NAD(P)H dehydrogenase (NDH) 複合体を介する経路と、アンチマイシン A によって阻害される Ferredoxin-plastoquinone reductase (FQR) 経路の二つの経路があることが知られている。これらの経路の詳細や生理的意義の解明は長い間手つかずのままであったが、近年これらの電子伝達に関わる分子の解析が飛躍的に進んでいる。定量的なサイクリック電子伝達活性測定法は未だ確立されていないが、ここではクロロフィル蛍光測定や P 700 の酸化キネティクス測定から間接的にサイクリック活性を検出する方法を紹介する。

##### 3.c.2 *in vitro* プラストキノン還元測定

常温でのクロロフィル蛍光は光化学系 II から発せられ、光化学系 II のキノン型電子受容体である *Q<sub>A</sub>* やプラストキノンプールの還元状態を反映する。このため測定光下で光化学系 II を励起し、サイクリック活性によるプラストキノンの還元を、クロロフィル蛍光の上昇として検出することができる。*in vitro* の系では、単離チラコイド膜に過剰量の NADPH およびフェレドキシンを加えることで、NADPH から電子がチラコイド膜上の FNR

の逆反応によりフェレドキシんにわたり、サイクリック活性によってプラストキノンが還元される様子がみられる<sup>1),2)</sup>。

測定バッファー (7 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 30 mM KCl, 0.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM HEPES pH 7.6) に低張液で破碎させた単離葉緑体または単離チラコイド膜 (10 μg Chl ml<sup>-1</sup>) を入れスターラーで攪拌する。測定光 (1.0 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) を照射し 0.25 mM NADPH 続いて、5 μM フェレドキシンを加える。図 1<sup>3)</sup> のようにシロイヌナズナ野生株 (WT) から単離した破碎葉緑体ではフェレドキシンを添加したときにクロロフィル蛍光の上昇がみられる。アンチマイシン A (2 μM) を加えた破碎葉緑体ではクロロフィル蛍光の上昇速度が著しく遅くなる。また *pgr5* 変異株<sup>4)</sup>、NDH 複合体を欠く *crr2-2* 変異株<sup>5)</sup> から単離した破碎葉緑体ではクロロフィル蛍光上昇速度が野生株より遅い。*pgr5* 変異株の破碎葉緑体にアンチマイシン A を加えたときには変化が見られないが、*crr2-2* 変異株の破碎葉緑体には

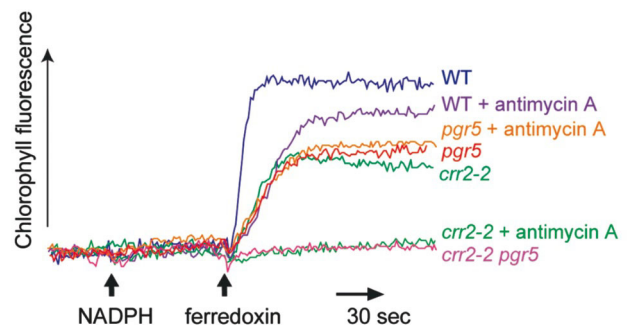


図 1: *in vitro* プラストキノン還元<sup>3)</sup>

1) 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究所

アンチマイシンAを加えたときにはクロロフィル蛍光の上昇がほとんどみられなくなる。また *pgr5 crr2-2* 二重変異株から単離した破碎葉緑体でもクロロフィル蛍光の上昇がほとんどみられない。このように *in vitro* プラストキノ還元測定ではNDHに依存する経路, FQRに依存する経路の両方の活性を検出できる。

### 3.c.3 NDH 活性に依存した一過的クロロフィル蛍光の上昇測定

光合成誘導光を消したときに測定光照射下でクロロフィル蛍光が一過的に少し上昇し山を描いて下がる様子が見られる。これは、光合成中に蓄えられた還元力により、暗黒下でプラストキノが還元されたことを反映している。NDHに依存するこのクロロフィル蛍光の上昇は *ΔndhB* 葉緑体形質転換タバコの解析より見出された<sup>6)</sup>。

図2はシロイヌナズナの生葉のNDH活性を測定したものである<sup>3)</sup>。暗順化させた葉に測定光(ML)を照射しクロロフィル蛍光のFoレベルを確認する。飽和光パルス(800 ms; SF)を照射後、光合成誘導光(50 μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>; AL)を5分間照射する。光合成誘導光を消した時、野生株(WT)では、クロロフィル蛍光が一旦Foレベルまで下がり、次に一過的に上昇した後再びFoレベルまで下がる。NDH複合体を欠損した *crr2-2* 変異株ではクロロフィル蛍光の一過的上昇がみられないが、*pgr5* 変異株では野生株と変わらずクロロフィル蛍光の一過的上昇がみられる。このようにクロロフィル蛍光の一過的上昇はNDH経路のみに依存していることがわかる。光合成誘導光(AL)が強すぎるとFoのクエン

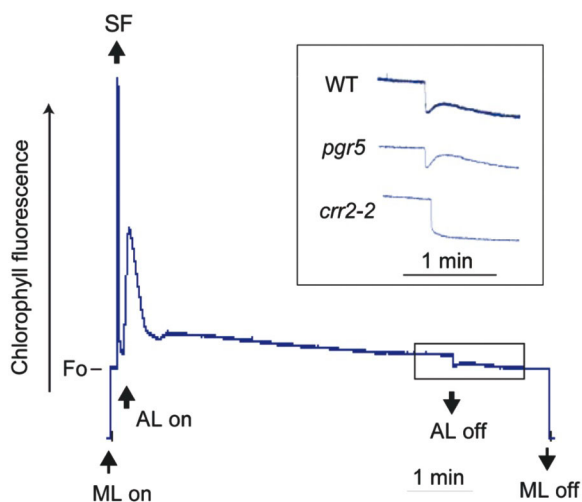


図2: NDH 活性に依存した一過的クロロフィル蛍光の上昇<sup>3)</sup>

チングが起き、クロロフィル蛍光の一過的上昇がみられなくなるため、光合成誘導光は生育光強度またはそれより弱い光を用いる。

### 3.c.4 P 700 酸化還元測定

光化学系 I サイクリック電子伝達によってプラストキノンに戻された電子は、再びシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体、プラストシアニンを経由して光化学系 I に渡される。光化学系 I の反応中心 P 700 の酸化還元に伴う 820 nm 付近の吸光度変化をモニターすることで、サイクリック活性によって光化学系 I に渡される電子の量を評価することができる。

Schreiber らは、光合成誘導光照射後に赤外光照射下で P 700 酸化速度を測定し、ストロマに蓄えられた電子がサイクリック活性によって P 700 に渡される量を見積もっている<sup>7)</sup>。図3は夾竹桃の生葉での P 700 酸化速度を調べたものである。まず、電子伝達系内の電子のプールサイズを測定する(図3A)。葉に赤外光(>700 nm, 6.8 W m<sup>-2</sup>; FR)を20秒間照射して P 700 酸化させ、電子伝達系内の電子を除去する。次に FR 照射下でキセノンランプ(1,500 W m<sup>-2</sup>)を使って、一励起エネルギーを与える single-turnover light (a half peak width 14 μs; ST)を照射する。P 700 は光化学系 II からの電子により還元されるが、すぐに FR によって酸化される。続いて電子伝達系内をすべて還元させるためにキセノンランプ(1,500 W m<sup>-2</sup>)を使って multiple-turnover light (50 ms; MT)を照射する。P 700 はほとんど完全に還元された後、再び酸化されるが、ST 照射後よりもゆっくりと酸化される。図の水色で示した部分 [ST] を青色の部分 [MT] で割ると P 700 あたりの電子伝達系内の電子のプールサイズが得られる。

今度はサイクリック活性を見積もるため、FR 照射下

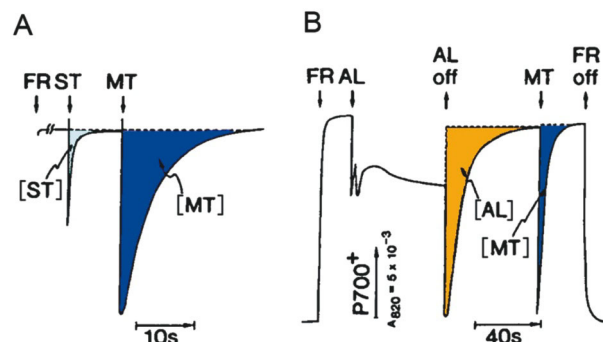


図3: Schreiber らによる P 700 酸化速度を利用したサイクリック電子伝達活性の見積もり<sup>7)</sup>

で光合成誘導光 (AL) を照射する (図 3 B)。AL を消したあと P 700 は一旦、光化学系 II から来る電子によって還元されるが、その後 FR によりゆっくりと酸化される。続いて MT を照射する。AL 照射後の P 700 酸化速度は MT 照射後の酸化速度よりも非常に遅くなっており、電子伝達系内の電子より多くの電子が P 700 に渡されていること、つまりストロマに蓄えられた電子がサイクリック活性によって電子伝達系に入ってきて P 700 に渡されていることを示している。オレンジ色で示した部分 [AL] が AL 照射下でストロマに蓄積された電子がサイクリック活性によって P 700 に渡された量を示している。従って、P 700 あたりのストロマから戻ってくる電子のプールサイズは

$$(MT\text{-area}/ST\text{-area}) \times \{(AL\text{-area}/MT\text{-area}) - 1\}$$

と見積もられる。

Shikanai らは比較的強い測定光下で FR を照射したときの P 700 酸化速度から PGR5 に依存するサイクリック活性を評価している<sup>8)</sup>。図 4 は測定光 ( $1.3 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) 照射下で FR ( $>700 \text{ nm}$ ,  $36 \text{ Wm}^{-2}$ ) を照射したときの P 700 の酸化速度を、シロイヌナズナ野生株、*pgr5* 変異株、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモータでドライブした PGR5 過剰発現体 (35S::*PGR5*) 間で比較したものである。*pgr5* 変異株では FR 照射下での酸化速度が野生株よりも速くなっており、光化学系 I に渡される電子の数が少ないことがわかる。逆に PGR5 が約 5 倍発現している 35S::*PGR5* では野生株よりも酸化速度が遅くなっており光化学系 I に渡される電子の数が多くなっていることがわかる。

Joliot らは暗順化した植物を光順化させる過程で P 700 の酸化速度が変化していく様子をとらえ、CO<sub>2</sub> 固定反応が抑制される環境下で最大活性をもっていた光化

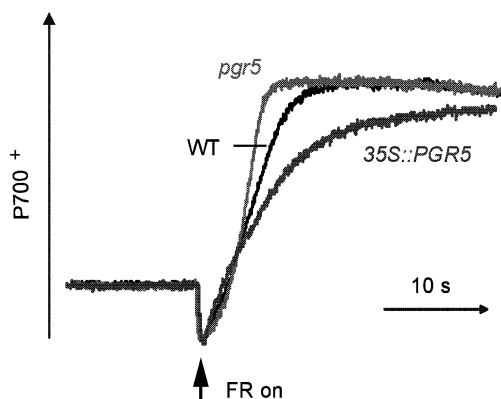


図 4 : Shikanai らによる P 700 酸化速度を利用したサイクリック電子伝達活性の評価<sup>8)</sup>

学系 I サイクリック電子伝達が CO<sub>2</sub> 固定反応の活性化に伴って低下し、直線的電子伝達に置き換わることを報告している<sup>9)</sup>。図 5 は FR 照射下での P 700 酸化キネティクスを示している。curve 1 は緑色光を 10 分以上照射して光順化させ 2 分間暗処理した葉、curve 2 は暗順化させた葉の P 700 酸化キネティクスである。暗順化させた葉では光順化させた葉よりも P 700 酸化速度は遅くなっている。P 700 の酸化が遅くなる条件下 (curve 2) でもチラコイド膜内外に電場が形成されることから、電子伝達が継続して起こっていると考えられ、光化学系 I サイクリック電子伝達によって P 700 に電子が渡されるため酸化速度が遅くなると解釈される。また curve 2 は二相性のキネティクスを描く。速い phase はストロマの電子受容体 (おそらく NADP<sup>+</sup>) へ電子が送られていることを示している。curve 3 は暗順化させた葉に緑色飽和光を 200 ミリ秒間照射し 5 秒間暗処理した葉の P 700 酸化キネティクスである。この短時間の飽和光照射は、CO<sub>2</sub> 固定反応を活性化しないが電子供与体プールを完全に還元するため、curve 2 でみられた速い phase は消え、P 700 の酸化速度はもっとも遅くなっている。P 700 酸化速度は緑色飽和光の照射時間が長くなると次第にはよくなり、完全に光順化させた curve 1 と同様のキネティクスを示すようになる。この curve 1 は methyl viologen 存在下での P 700 キネティクスと変わらないことから、直線的電子伝達による P 700 酸化速度であることが示されている。このように、暗順化させた葉では光化学系 I サイクリック電子伝達が最大活性をもち、それが光照射により直線的電子伝達に置き換わる様子がわかる。この測定方法で *pgr5* や *crr4-2 pgr5* (*crr4-2*; NDH 複合体量が 12.5-25% に減少している変

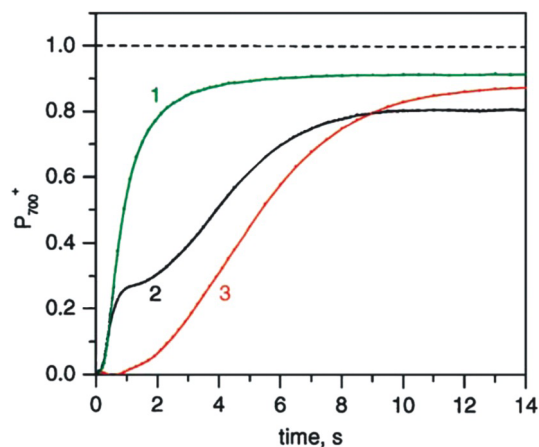


図 5 : Joliot らによる P 700 酸化速度の測定を利用した暗順化および光順化した葉におけるサイクリック電子伝達活性の見積もり<sup>9)</sup>

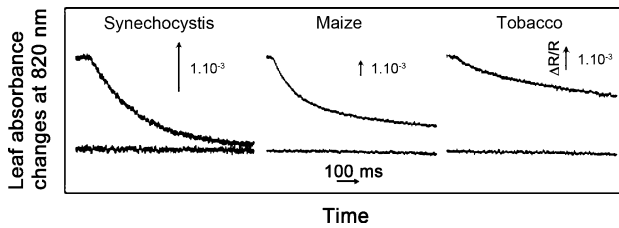


図6：赤外光照射後の暗黒下でのP700再還元速度<sup>11)</sup>

異株<sup>3)</sup>のP700酸化キネティクスを調べると、暗順化した葉、また緑色飽和光を200ミリ秒間照射した葉のP700の酸化速度は野生株よりも速くなっているが、光順化した葉と比較すると非常に遅く、*pgr5*や*crr4-2* *pgr5*においても光化学系Iサイクリック電子伝達活性が残存すると報告されている<sup>10)</sup>。

P700再還元速度もまた光化学系Iサイクリック電子伝達活性を反映することが報告されている<sup>11)12)</sup>。図6は赤外光を照射しP700を酸化させた後、赤外光を消し暗黒下でP700再還元速度を測定したものである<sup>11)</sup>。SynechocystisやC<sub>4</sub>植物であるMaizeではP700再還元速度は速く、half-time ( $t_{1/2}$ )はそれぞれ178 ms, 196 msである。これは暗黒下でサイクリック電子伝達経路を介して入ってくる還元力がP700を還元するためであると考えられる。Synechocystisでは、NDH欠損株においてP700の再還元速度が著しく遅くなる報告されている<sup>12)</sup>。一方C<sub>3</sub>植物であるtobaccoではP700再還元速度のhalf-timeは1,157 msと非常に遅い。この結果はC<sub>3</sub>植物では光化学系Iサイクリック活性が藍藻やC<sub>4</sub>植物と比べて低いことと一致する<sup>11)</sup>。しかし $\Delta ndhB$ 葉緑体形質転換タバコやAntimycin Aで処理したタバコの葉におけるP700再還元速度のhalf-timeは、未処理の

野生株の値とほとんど変わらない<sup>11)</sup>。従って、C<sub>3</sub>植物においてこの方法で光化学系Iサイクリック活性を評価することは難しいと考えられる。

## 参考文献

- 1) J. D. Mills, D. Crowther, R. E. Slovacek, G. Hind & R. McCarty *Biochim. Biophys. Acta* **767** (1979) P.127
- 2) T. Endo, T. Shikanai, F. Sato & K. Asada *Plant Cell Physiol.* **39** (1998) P.1226
- 3) Y. Munekage, M. Hashimoto, C. Miyake, K. Tomizawa, T. Endo, M. Tasaka & T. Shikanai *Nature* **429** (2004) P.579
- 4) Y. Munekage, M. Hojo, J. Meurer, T. Endo, M. Tasaka & T. Shikanai *Cell* **110** (2002) P.361
- 5) M. Hashimoto, T. Endo, G. Peltier, M. Tasaka & T. Shikanai *Plant J.* **36** (2003) P.541
- 6) T. Shikanai, T. Endo, T. Hashimoto, Y. Yamada, K. Asada and A. Yokota *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (1998) P.9705
- 7) K. Asada, U. Heber & U. Schreiber *Plant Cell Physiol.* **33** (1992) P.927
- 8) Y. Okegawa, T. A. Long, M. Iwano, S. Takayama, Y. Kobayashi, S. F. Covert & T. Shikanai *Plant Cell Physiol.* **48** (2007) P.1462
- 9) P. Joliot & A. Joliot *Biochim. Biophys. Acta* **1757** (2006) P.362
- 10) B. Nandha, G. Finazzi, P. Joliot, S. Hald & G. N. Johnson *Biochim. Biophys. Acta* **1767** (2007) P. 1252
- 11) T. Joët, L. Cournac, G. Peltier and M. Havaux *Plant Physiol.* **128** (2002) P.760
- 12) H. Mi, T. Endo, U. Schreiber, T. Ogawa and K. Asada *Plant Cell Physiol.* **33** (1992) P.1233