光合成研究会　会報

第22号　1997年　9月

NEWS LETTER No. 22 SEPTEMBER 1997
THE JAPANESE ASSOCIATION FOR PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

****

集会の案内

集会名（会場）［連絡先］

１９９７年

１０月２日－３日：第４８回日本電気泳動学会総会（大阪・千里阪急ホテル）［TEL:0427-54-7111, ext. 231］

１０月１２日－１６日：2nd Intnatl. Conf. on Bioradicals & 5th Intnatl. Workshop on ESR (EPR) Imaging and *in vivo* ESR Spectroscopy （山形）［FAX: 0236-47-3149; E-mail: ohya@ymgt-techno.or.jp］

１０月１６日－１９日：The First Intnatl. Conf. on Material and Life Sciences in HARIMA（姫路・姫工大）［FAX: 07915-8-0132, E-mail: takagi@sci.himeji-tech.ac.jp］

１０月２３日－２４日：第６回日本バイオイメージング学会学術集会（東京・東大）［TEL: 03-3812-21111, ext. 3495, FAX: 03-5689-2704, E-mail: yousuke@m.u-tokyo.ac.jp］

１１月１日－３日：日本遺伝学会第６９回大会（横浜・横浜市大）［FAX:045-820-1901, E-mail: kohji@yokohama-cu.ac.jp］

１１月３日－４日：よこはま２１世紀フォーラム「ゲノム生物学が拓く生命科学の新局面」（横浜・浜銀ホール、横浜市大）［TEL: 045-820-1900, FAX: 045-820-1901］

１１月３日－６日：Dynamic Aspects of Lysosomal/Vacuolar System（岡崎・岡崎コンファレンスセンター）［TEL: 0564-55-7519, FAX: 0564-55-7516, E-mail: yohsumi@nibb.ac.jpp or yosimori@nibb.ac.jp］

１１月８日：１９９７年度藻類談話会（神戸大）［TEL: 075-753-6854, FAX: 075-753-6864, E-mail: hatano@gaia.h.kyoto-u.ac.jp］

１１月１５日：ユーグレナ研究会第１３回研究集会（大阪府立大）［TEL & FAX: 0722-50-7318］

１１月１５日－１６日：第１２回「大学と科学」公開シンポジウム「植物の生長－遺伝子から何が見えるか」（東京・有楽町朝日ホール）［TEL: 03-3459-0006, FAX: 03-3459-6894］

１１月２２日－２３日：第４回日本光生物学協会講演会（東京・東京都立大）［TEL; 0426-77-2563, FAX: 0426-77-2559, E-mail: photobio@comp.metro-u.ac.jp］

１２月４日－５日：第１１回カロテノイド研究談話会（山口大）［TEL &FAX: 0839-33-5725, E-mail: mimuro@sci.yamaguchi-u.ac.jp］

１９９８年

４月６日－８日：Intnatl. Meeting on Production and Uses of Starch (Edinburgh, Scotland) ［E-mail: esa216@ed.sac.ac.uk］

４月２７日－５月２日:The 3rd Asian Crop Science Conference: Regional Production Strategies to Meet Food Needs Toward The 21st Century (Taichung, Taiwan)［FAX: 886-4-2860267, E-mail: acsc@dragon.nchu.edu.tw.］

８月１３日－１７日：第１６回国際植物成長物質会議（千葉・幕張メッセ）［TEL: 048-462-9375, FAX: 048-462-4691,E-mail: ykamiya@postman.riken.go.jp ］

１９９９年

８月１日－７日：XVI Intnatl. Botanical Congress (St. Louis, America's Center)［TEL: +1-314-577-5175, FAX: +1-314-577-9589, E-mail: mail ibc16@mobot.org, Homepage: http://www.ibc99.org］

国際光合成学会と第１１回国際光合成会議について

基礎生物学研究所　　村田 紀夫

国際光合成学会（International Society of Photosynthesis Research）は１９９５年の第１０国際光合成会議（Mompelier, France）の際に設立されました。私は、President Wolfgang Junge, Secretary Donal Ort と共に Tresurer に任命され、会費の徴収や支出を扱う係りを仰せつかっております。然しながら昨年は体調を崩し、そのため会費額の決定などが遅れております。申し訳ありません。現在の状況は、正会員と学制会員の年会費はそれぞれ２０ドルと１０ドルという線が出てきております。発展途上国の会員の会費は無しとするわけですが、どの国まで発展途上国として扱うべきかなど、解決しなければならない問題が多々あります。また Photosynthesis Research を国際学会のオフィシャル・ジャーナルにすることは、ほぼ決まっています。しかし全員への配布価は未定で、６０～７５ドル間で交渉が行われているようです。

会費と Photosynthesis Research 購読料の徴収法では苦労しています。日本銀行（外資系も含めて）は各小切手当たり相当額の手数料を取ります。ヨーロッパの銀行も同様のようです。今はアメリカ合衆国内の銀行に口座を開く可能性を検討しています。いい知恵をお持ちの方がいらしたら、至急教えて下さい。

この国際学会は会費を安く抑えるかわり、サービスはあまりしない方針になると思います。通信方法としては Photosynthesis Research の各号に２ページ分の通信欄を確保すること、ホームページを開設すること、およびE-mail による連絡網を敷くことになります。ニュースレターは多分出さないことになるでしょう。国際学会から国際会議への援助もあまり期待できませんが、発展途上国からの出席者への補助等はできそうです。また会員の国際会議での登録料を安くする（会員以外の登録料を高くする）ことも検討されています。President Junge は Robin Hill 賞と Melvin Calvin 賞とを設立したい意向のようです。うまくスポンサーが見つかるといいのですが。

いろいろな問題が山積みで、限られた時間しか持たない三役がわずかの時間を使いながら進めているのが現状です。しかし、１９９８年からは制度を決めてスタートさせるつもりです。ご協力をお願いいたします。

第１１回国際光合成会議は、１９９８年8月１５～２０日にハンガリーのブタペストで開催されます。大会会長 Gyzo Garab を中心として国内委員会及び国際学会プログラム委員会で準備が進められています。

これまでで２６件のシンポジウムが計画され、数件のサテライト・ミーティングが企画されています。

詳細は以下に問い合わせて下さい。

Congress Secretariat
XIth International Congress on Photosynthesis
Biological Research Center Hungarian Academy of Sciences
H-6701 Szeged P.O. Box 521, Hungary
Tel: +36-62-433-131,　Fax: +36-62-433-434 or 432-576
E-mail: photosyn@everx.szbk.u-szeged.hu
Web-site: http://biophys.physx.u-szeged.hu/photosyn

国際光合成学会の Web-site：　http:/www.life.uiuc.edu/plantbio/ispr

Tentative list of symposia

Antenna reaction centers
1. Structure and primary functions of antenna complexes
2. Architecture and regulatory functions of antenna systems
3. Reaction centers I. Green-sulfur heliobacteria and photosystem I
4. Reaction centers II. Purple bacteria and photosystem II

Electron and proton transport
5. Oxygen evolution
6. Cytochrome complexes, soluble electron transfer proteins
7. Energy transduction, ATP synthase

Regulatory processe
8. Functions of lipids and architecture of membranes
9. Auxiliary and regulatory enzymes in chloroplasts
10. Environmental stresses and primary processes
11. Physiological plants under biotic and abiotic stress

Molecular biology
12. Light-sensory systems and signal transduction
13. Photosynthetic genes I. Prokaryotes
14. Photosynthetic genes II. Eukaryotes
15. Biosynthesis and assembly I. Proteins
16. Biosynthesis and assembly II. Pigments

Metabolism, physiology
17. Carbon, nitrogen, phosphorous and sulfur metabolism
18. CO_2 concentrating mechanisms
19. Molecular physiology, assimilate transport systems
20. Photosynthesis and agricultural production: herbicides

Ecological aspects
21. Whole plant and community photosynthesis
22. Photosynthesis and planet earth

Miscellaneous
23. Biomedical and biotechnological applications
24. Emerging techniques
25. Environmental issues in Central and Eastern Europe and developing countries
26. Educational aspects. Undergraduate and graduate training: public awareness

第１１回国際光合成会議に関する追伸

基礎生物学研究所　村田　紀夫

前記の原稿を送付した後にハンガリーを訪れました（the 8th European Congress on Biotechnology, Budapest, 出席のため）。その後、Szeged の Biological Research Center を訪れました。主催者の G. Garab には会えなかったのですが、第１１回国際光合成会議について以下のような情報を得ることができましたのでお知らせいたします。

1．今回の日程は従来のと異なり、土曜日から始まり木曜日に終わります（従来は日曜日に始まり、金曜日に終わりました）。日程表を添付します。

2．セカンドサーキュラーは１月に発行の予定だそうです。

3．サテライトミーティングと関連集会が以下のように企画されているようです。しかし、未定の部分が多いので、後日変更されるかもしれません。

(1) Antenna Structure
August 12-14, Szeged
Organizer: R. van Grondelle and G. Garab

(2) Visible and Ultraviolet Light stress
August 12-14, Szeged
Organizer: I. Vass

(3) Proton and electron transfer in bacterial reaction centers
August 12-14, somewhere in Hungary
Organizer: P. Maroti

(4) Stress effects on photosynthesis
After the Congress (August 21-), somewhere in Hungary
Organizer: G. Horvath

(5) Photosynthesis in aquatic environment
August 21-24, Tihany, Hungary
Organizer: P. Falkoffsky, C. Willhelm

(6) Herbicides affecting chloroplast functions: mechanism of action and resistance
August 21-23, Budapest, Hungary
Organizer: Z. Szigeti

(7) Summer School on biophysical aspects of photosynthesis
August 21-30, Szeged, Hungary
Organizer: Z. Gombos and P. Maroti

その他関連集会

(8) Biogenesis of chloroplasts
August 8-11, Crete (Greece)
Organizer: Akoyounoglou

(9) Protein phosphorylation
Somewhere in Sweden
Organizer: J. Allen and B. Andersson

(10) Lipids and membranes (NATO meeting)
August 23-25, Szeged
Organizer: A. Leone and L. Vigh

(11) Fluorescence techniques
時期未定、Somewhere in Mediterranean
Organizer: Nedbal (?)

原核藻類の光合成色素クロロフィルの多様性
－クロロフィルｄを主要色素とする原核藻－

（株）海洋バイオテクノロジー研究所　　宮下英明　宮地重遠

１．はじめに

海洋バイオテクノロジー研究所では、藻類の新しい能力、藻類の生産する新規 物質、生理活性物質の探索などを目的として、多彩な海洋環境から多様な微細 藻類を分離し、その培養、特性解析、保存などを行っている。それらの藻類に は、特殊な性質を示すものが多く見い出されている。たとえば、高ＣＯ２濃度 (60%)条件下でも生育する緑藻、細胞の総脂肪酸の60% 以上が高度不飽和脂肪酸（DHA およびEPA）である黄色藻、生育の至適pH が1-2 でありＳＯｘ耐性をもつ紅藻、高温耐性（至適生育温度50℃付近）もつ藻類、特殊な多糖類を生産 するプラシノ藻やラン藻などが報告されている。 今回は、クロロフィル(Chl.) *d* を主要色素としてもつ原核藻 *Acaryochloris marina*（仮称）と、原核藻類の光合成色素組成の多様性についてについて紹介 する。（注：クロロフィル *d* の構造は p.11 を参照）

２．クロロフィルｄを主要色素とする原核藻

２－１　*Acaryochloris marina* の形態および色素組成

A. marina は、パラオ沿岸で採取した群体ホヤ体内から分離された(Miyashita et al. 1996)。群体ホヤ（特にディデムニ科）は、熱帯から亜熱帯海域の水深 2-10　m に棲息する原索動物で、*Prochloron* をはじめ特殊な色素系をもつ藻類を 共生させていることで知られている(Cox et al., 1985、Larkum et al., 1987)。 *A. marina* は、直径1-2 mmの球形から楕円球形、単細胞の原核生物で、光学顕 微鏡観察ではラン藻の *Synechocystis* に似ている。チラコイド膜は細胞の内周 に沿って互いに密に詰まった状態で存在しており、膜上にフィコビリゾームは 認められない。このチラコイド膜構造は、ラン藻類(Cyanophyta)よりむしろ原 核緑色藻類(Prochlorophyta)に似ている。*A. marina* の細胞懸濁液は、クロレラ など緑藻類に近い色調である。しかし、吸収スペクトルを測定すると酸素発生 型の光合成生物に特徴的な680 nm 付近の吸収極大は見られず、30 nm 以上も 長波長側の 716 nm 付近に赤色光の吸収極大が観察される。色素をメタノール で抽出し吸収スペクトルを測定すると、Chl. *a* や *b* に由来する光吸収はみられ ず、697 nm に赤色光の吸収極大が観察される。メタノール抽出液中には MgDVP (Mg 2,4-divinyl pheoporphyrin a_5 monomethyl ester)、ゼアキサンチ ン、Chl. *d* 、Chl. *a* 、α-カロテンの５つの色素が主に存在する(Miyashita et al. 1997)。Chl. *a* 含量は 1 mg/g dry cells 未満であり、既知の光合成生物の Chl. *a* 含量(3～30 mg/g dry cells、Lee 1989)に比べはるかに小さい。これに対し、Chl. *d* は 20 mg/g dry cells 以上含まれている。Chl.*a*/*d* 比は、光条件により変動し、１分子の Chl. *a* に対して、10-40分子の Chl. *d* が存在する。ゼアキサンチンお よびα-カロテンをそれぞれ2 mg/g dry cells程度含んでいる。MgDVPは、極 く微量である。細胞を破砕したときの水溶性画分に少量のフィコビリンタンパ ク質（フィコシアニン、アロフィコシアニン）が認められる。

これらのことから *A. marina* 細胞懸濁液の 716 nm 付近の吸収極大は、Chl. *d* の吸収に由来し、Chl. *a* による光吸収はほとんどみられないものと考えられる。最近の透過型電子顕微鏡観察によれば　*A. marina* のフィコビリンタンパク質の 集合体はラン藻類や紅藻類のものと異なる４つのサブユニット集合体からなる 26.0 × 11.3 nm の桿状構造をもつという(Marquart et al. 1997)。

２－２　*A. marina* の光合成

酸素発生型の光合成には、Chl. *a* を主要色素とすることが不可欠であると信じ られてきた。これは、Chl. *a* が光合成における光エネルギーの捕獲、エネルギ ーの伝達、初期電荷分離等において最も重要な働きをしているためである。しかし、Chl. *d* を主要色素とする *A. marina* は、光照射下、光合成酸素発生を行 う。これは、Chl. *a* を主要色素としなくとも酸素発生型の光合成が可能である ことを示している。

A. marina 細胞の光吸収には、Chl. *a* の寄与がほとんどみられない。このこと から、主要色素である Chl. *d* が光エネルギー捕獲に寄与していることは想像に 難くない。酸素発生速度を指標とした作用スペクトルでは、Chl. *d* とフィコビ リンタンパク質の光吸収波長に等しい要求量子数(12 および 18)が観察された (Miyachi et al. in press)。さらに、チラコイド膜から得られた光化学系 1 に富む 標品にレーザー閃光(532 nm、10 ms)を照射すると、ドナー Chl.（P）の光酸化 にともない 740、715、695 nm に吸収減少が観察され、30 ms で回復した（図 1、岩城ら、未発表)。このことは、*A. marina* の P は、既知の酸素発生型の 光合成生物に一般的にみられる Chl. *a* (P700)ではなくむしろ、740 nm 付近に 吸収をもつ Chl. *d* (P740)である可能性が高いことを示す。また、生細胞の蛍光 観察により *A. marina* の Chl. d が、光捕獲色素として働くこと、励起エネルギ ーが高効率で光化学系 2 との間で転移されることが示されている(Schiller et al. 1997)。

３．原核藻類の光合成色素の多様性

酸素発生型の光合成生物に含まれる Chl. には、Chl. *a*、*b*、*c* (*c1*、*c2*、*c3*) が良く 知られている。1970 年代前半まで、原核の藻類として知られていたのはラン藻 類だけであった。ラン藻類は、Chl. *a* とフィコビリンタンパク質をもち他の Chl. 色素をもたない。このため、原核の藻類には Chl. 組成の多様性がないと考えら れていた。しかし近年原核の藻類の光合成色素組成に多様性があることがわか ってきた（表 1）。

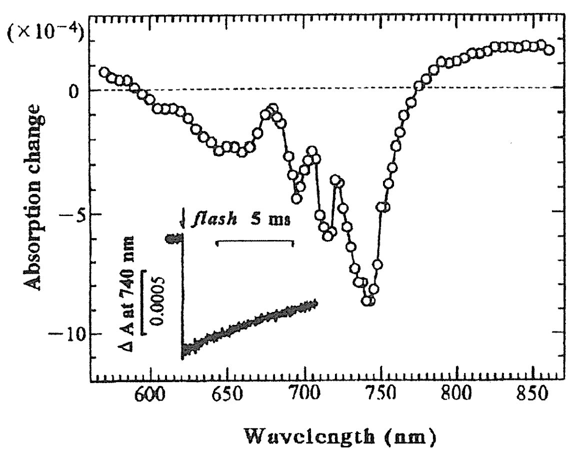


図　1.　Acaryochloris marinaの光化学系 1 標品の明・暗差スペクトル（岩城ら、未発表）

1975 年に発見された *Prochloron* は、Chl. *a* と *b* をもちフィコビリンタンパク 質をもたない(Lewin and

表1　原核藻類の色素組成

Pigment	*Acaryochloris*	*Synechococcus* (Cyanophyta)	*Prochroron* *Prochlorothrix* (Prochlorophyta)	*Prochlorococcus* (Prochlorophyta)
Chlorophyll *a*	+	+	+	-
Divinyl chlorophyll *a*	-	-	-	+
Chlorophyll *b*	-	-	+	-
Divinyl chlorophyll *b*	-	-	-	+
Chlorophyll *d*	+	-	-	-
MgDVP	+	-	+	+
Zeaxanthin	+	+/-	+	+
α-carotene	+	-	-	+
ß-carotene	-	+	+	-
Phycobiliproteins	+	+	-	-/+
Phycobilisome	-	+	-	-

Withers)。また、1986年には、オランダの淡水湖沼においてブルームを形成する原核藻(*Prochlorothrix hollandica*)もまた、Chl. *a* と *b* をもつことが見い出された(Burger-Wiersma et al.)。それまでChl. *a* と *b* をもつ光合成生物は、緑藻類と陸上植物に限られていた。しかしこれらの発見により、同様のChl. 組成をもつ原核の藻類が存在することが明かとなった。また *Prochloron* と *P. hollandica* は、生育環境（海水／淡水、共生／非共生など）や細胞体制（単細胞／糸状体）が大きく異なる。このことから、Chl. *a* と *b* をもつ原核の藻類には、生育環境や形態上での多様性があることが明かにされた。さらに1988年には、*Prochlorococcus marinus* が見い出された(Chisholm et al.)。*P. marinus* は海洋の有光層付近に広く、優勢種として分布する極小（1 μm以下）のピコプランクトンである。この原核藻はChl. *a* や *b* の8位のエ チル基がビニル基に置換したジビニル(DV)Chl. *a* および *b* をもち、Chl. *a* や *b* をもたない。つまり、Chl. *a* をもたない唯一の酸素発生型光合成生物である。今回見い出された *A. marina* は、Chl. *a* とフィコビリンタンパク質をもつ点に おいては、ラン藻類と似ている。しかし、Chl. *d* を主要色素としてもつ唯一の 光合成生物であり、この点においてラン藻類をはじめ既知の酸素発生型光合成 生物と大きく異なる。

原核藻類にはChl. *c* (c_1、c_2、c_3)が見い出されていない。しかし、*Prochloron*、*Prochlorothrix*、*Prochlorococcus*、*A. marina* はChl. c_2 と非常に良く似た MgDVP をもつ。特に *Prochloron* では、MgDVP が総 Chl. 含量の4-15％含まれ ており、光合成に寄与していることが報告されている (Larkum et al. 1994)。さらに、ラン藻類にはα-カロテンが検出されていなかったことから、原核の藻類はα-カロテンを合成できないと考えられていた。しかし、*Prochlorococcus* や *Acaryochloris* がα-カロテンをもつことから、原核の藻類にもα-カロテンの合成能力が存在することが明かにされた。

このように近年になって、Chl. *b* や DVChl. *a* & *b*、Chl. *d*、MgDVP などの Chl. 色素が原核の藻類にも存在することが明かになってきた。また原核の藻類がChl. *a* 以外の Chl. 色素を利用した光エネルギーの捕獲、伝達、電荷分離システムを もつ可能性が示されつつあり、新たな光エネルギー伝達メカニズムの発見が期 待される。

4．おわりに

最近の分子系統解析では、原核の藻類はすべて単系統群であり、Chl. *b*、DVChl. *a* & b、Chl.

d、MgDVPをもつ原核藻類が、いずれもラン藻類と同一の祖先生 物から派生した生物であることが示唆されている。それらの結果に従うと原核 の藻類における光合成色素系は、Chl. *a*とフィコビリンタンパク質を用いる系 から、Chl. *b*、DVChl. *a* & *b*、Chl. *d*、MgDVPを補助色素として、さらには それらを光合成において重要な役割を担う色素として利用する系を獲得したこ とになる。これらの系統関係や*A. marina*の発見は、光合成色素系そのものが 確立された不変の系ではなく、光合成における最低限のエネルギーを獲得でき れば、アンテナならびに中心色素には必ずしもChl. *a*を用いる必要がないこと を暗示している。今後も新たな光合成色素系をもつ原核さらには真核の光合成 生物の発見が期待される。

Gordon Research Conference on Photosynthesis : Biophysical Aspects に参加して

基礎生物学研究所　　　　岩城　雅代

場所：Plymouth State College, Plymouth New Hampshire, USA.
日程：1997年8月3日－8日
Chair： Melvin Okamura (Univ. Cal. San Diego)
Vice Chair： John Golbeck (Penn. State Univ.)

今年のGRC「光合成」では、約70名の参加者のうち日本から6名のポスター発表があった。講演とポスターは構造、エネルギー移動、電子移動、プロトン移動、酸素発生といったセッ ションに分けられ、充実した議論が展開された。以下にいくつかの興味深かったトピックス を紹介する。

1) 光化学系1複合体のさらに精密な結晶構造(3 Å 分解能)が得られた(P.Fromme)。EPRの実験からはP700とQの位置関係(中心間距離25 Å、D.Stehlik, A.Kawamori)、配向(フィロキノン のC=O軸が膜面に対し垂直な方向から27度傾斜、D.Stehlik, A.W.Rutherford)が推定され、キ ノン部位のペプチド構造が推定された。これをもとにA_0-Q間の距離が中心間で約8 Å、端-端間で6 Å と推定された(P.Fromme)。この距離は筆者らがキノン取り替え実験から推定した 値(端-端で7.8 Å)よりも少し短い。また、G.Beddardは結晶構造から得られたクロロフィルの 配置をもとに反応中心内に多量のアンテナ色素をもつ系でのエネルギー移動と電荷分離の速 度を計算した。

2) 光化学系2複合体でもいくつかのグループから結晶構造が出された(W.Kuhlbrandt, K.Nakazarto, J.Barber)。分解能が8 Å程度で、ヘリックスの並びはわかるが、詳しい構造は わからない。酸素発生に関してはいくつかの異なるMn複合体の構造が提唱され、議論が白熱した(M.Kusunoki, G.Brudvig, G.C.Dismukes)。パルスEPR法を用いてMn, Tyr, P680, Q_Aの距離関

係が明らかにされた(A.Kawamori)。また、FTIR法を用いた反応過程でのアミノ酸残基 の振動解析も進んだ(C.Berthoromieu)。Tyrを含む酸素発生部位のモデル化合物も合成された(A.Magnuson, C.Tommos)。

3) 紅色細菌では、スペシャルペア付近の変異体を使って高速分光実験を行い、アクセサリーの励起状態B*からP^+H^-への電荷分離がおこる可能性が指摘された(R.van Grondelle)。また、Q_A、Q_B部位でのプロトン移動と電子移動について変異体をつかった実験(M.Okamura, M.Schiffer)、反応中心タンパク質内電場の計算(M.Gunner)等の発表があった。また、LH2のB800-B850間の中間状態を介したエネルギー移動の理論が提唱された(T.Kakitani)。

4) 光合成ではないのだが、ミトコンドリアcyt bc_1複合体の精密なX線結晶構造が、D. Xia (Deisenhoferのグループ、ウシ)らとA.Crofts ら(ウサギ)の2グループによって発表された。この複合体には膜貫通型の1本のα-ヘリックスをもつRieske FeSタンパク質が結合して おり、2Fe2Sクラスター結合部分は膜外にとびだしている。それぞれのグループでこのFeS部分が異なる位置(状態)にある2種類の構造が得られた。これはFeS部分が揺れ動き、ユビキ ノールとcyt c間の電子移動反応をgatingしているらしいことを示唆した。

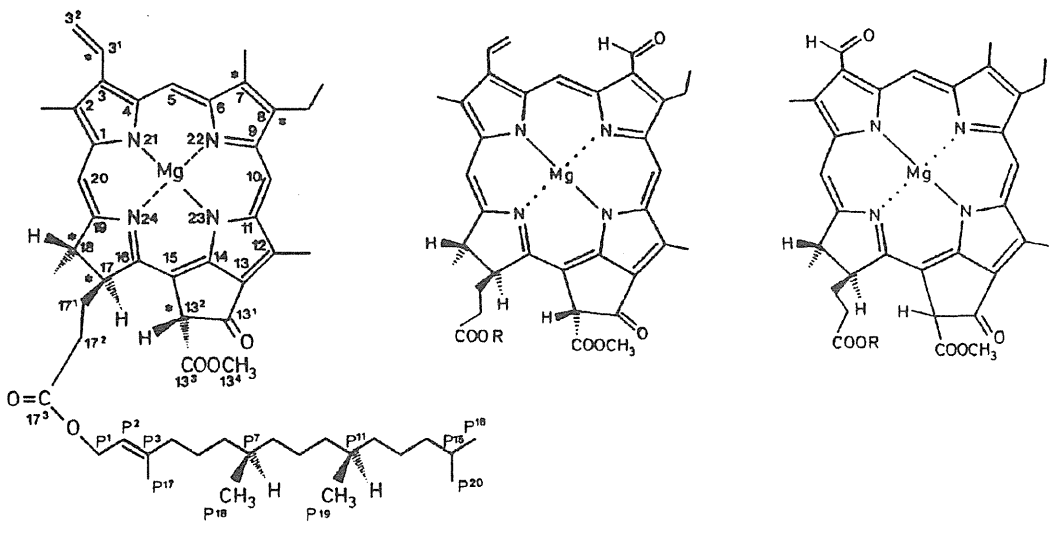
筆者らは最近、緑色光合成細菌の反応中心複合体に存在するcyt c (3本のα-ヘリックスで膜 に結合し、heme部分はとびだしている)から電子供与体であるP840への電子移動速度が反応 溶媒の粘度依存性を示す事を見い出した (Oh-oka et al. Biochemistry (1997) 36:9267)。解析の 結果、このcyt cはヘリックスで膜に固定されているが、紅色光合成細菌の結合型4heme-cytとは異なり、heme部分が揺れ動きながら電子移動するという新しい反応機構を提案した。おそらく緑色細菌のcyt cは今回発表されたcyt bc_1複合体のFeSの動きと類似しているのでは ないかと思う。X線結晶構造の講演はOHPが美しく、殊にCroftsはノートパソコンをつかっ て大画面に3D画像を映し、複合体をくるくるまわしたり、2種類のFeSタンパク質の構造を 交互に見せてくれ、観客を魅了した。

5) 工学的な側面からは、生体光合成をまねてRu錯体等を使った光電デバイスを実用化する 試みが紹介された(M.Gratzel)。ホウレンソウ光化学系1粒子を金薄膜にならべ、STMを用い て光電効果を検討した例(J.Lee)もあった。また、新しい技術として低波数域(400-800 cm^{-1})での光誘起FTIR(M.Gardner)や、高磁場EPR/ENDOR(M.Rohrer)など強力な解析手段の可能 性が示された。

6) さて、今年の"Young Investigator Talk (若いポスター発表者3名が選ばれ、最終日の夜に15分間の講演の機会がもらえる)"はR.Cogdellが選考することになり、会のはじめにChairのM.Okamuraが「...だから、若いひとはCogdellにはbe niceしてね」と冗談を言っていた。選 ばれたのは、M.G.-Kuras (Croftsのグループ、cyt bc_1複合体結晶構造とゆれるRieske FeSの役 割)とJ.Messinger (光化学系2のMnクラスターのS_{-1}状態のEPRシグナルを測定)と、なんと幸 運な!筆者であった。筆者ら(M.Iwaki, S.Itoh 基生研、Q.Hu, H.Miyashita, I.Iwasaki, S.Miyachi 海洋バイオテクノロジー研)は昨年発見されたクロロフィルdを主要色素としてもつ新規な酸素発生型光 合成原核生物*Acaryochloris marina* (H.Miyashita et al. (1996) Nature, 383:402)の光化学系

1で の電子移動を測定したので共同研究の成果を発表した。クロロフィル*d*は赤色域で吸収ピークがクロロフィル a よりも約 40 nm 長波長にずれている。したがってクロロフィル *d* をつか う光合成の吸収帯はちょうど非酸素発生型の光合成(バクテリオクロロフィル *a, b, g*)と普通の 酸素発生型光合成(クロロフィル *a*)の中間に位置し、進化の視点からも興味深い。
7) 初日に L.Dutton が「生体光合成の電子移動系はほんとうに『最適化へ向けて進化してい る』のか、なにをもって『最適化』というのか」といった哲学的な命題で講演した。生体反 応にはわれわれには理解しがたい一見不必要なスポットがあり、反応系のすみずみに至るま で optimized されたり fine-tuned された痕跡を見い出そうとすると混乱させられる。また、上 記の *A. marina*だけでなく、最近はZn-バクテリオクロロフィルを使う光合成が発見される (Wakao et al.) などして、光合成の反応系には思わぬ多様性が秘められていることが明らかと なった。最適化と多様化はどのように関連しながら進化とかかわっているのだろうか。光合 成の進化とはなんなのだろうか、とあらためて考えさせられた。

会議の間、天候に恵まれ、緑にかこまれた気持ちの良い環境で毎日熱心な議論と裏話が飛び 交った。とはいえ、キリキリがんばる!というよりも、オカムラさんのおだやかでやさしい 人柄そのままのwarm-heartedな一週間でたいへん楽しかったです。お世話になった方々に感 謝いたします。



クロロフィル *a*　　　　クロロフィル *b*　　　　クロロフィル *d*

3rd DIC Congress と Plant Biology '97 in Vancouver 一無機炭素利用，固定および代謝に関して一

新潟大学 理学部 生物学科　　白岩　善博

3rd DIC Congress は Plant Biology'97 のサテライトミーテイングとして，1997年7月28日から8月1日の夕刻までの5日間，カナダのバンクーバーにあるブリティッシュコロンビア大学において行われた。正式名称は Third International Symposium on Inorganic Carbon Utilization by Aquatic Photosynthetic Organisms（オーガナイザーはトロント大学の B. Colman 教授）で，原核および真核の微細藻類，大型藻類および水生植物による無機炭素利用に関する研究についての国際シンポジウムである。第1回は，An International Workshop on Bicarbonate Use in Photosynthesis（但，Proceedings は Inorganic Carbon Uptake by Aquatic Photosynthetic organisms）と題し，1984年8月18日-22日にカリフォルニア州のアシロマーコンフェレンスセンターで，第2回はSecond International Symposium on Inorganic Carbon Utilization by Aquatic Photosynthetic Organisms と題し，1990年8月5日-9日にカナダのクイーンズ大学（キングストン）において開催されており，今回のシンポジウムは実に7年振りの開催となった。参加者は，日本，USA，オーストラリア，イスラエル，イギリス，イタリア，ドイツ，モナコそして地元カナダを含め70数名であった。全ての参加者が学生寮 Walter Gage Residence に会期を通して宿泊し，朝から晩まで，講義室（Woodward IRC#1）に出向いて討論に明け暮れるという設定であった。学生寮はホテル形式の十数階建ての立派な建物で，一人部屋6室に対し，バス，トイレ，シャワー，炊事場付きの談話室を備えたものを1ユニットとし，外扉で区切られている。各部屋に電話がないために，仲間を訪問することは事実上不可能な状態になっており，外からの連絡も伝言板にメッセージを貼るというもので，日頃の電話攻勢から逃れ，安らかな時間をもちたい方にはお勧めである（C$33 + 15% tax）。ただし，シンポジウムの方は、参加者数や演題数から考えて，同じ人が複数講演する場合もあったことから，プログラムの編成を十分錬って3日程度の会期でやった方が，全ての面でより concentrate でき，良かったのではないかというのが印象である。正に，「過ぎたるは…………」で，大方は，楽しみ満足しつつもすっかりくたびれた、のではないかと思う。　発表は総説（講演時間50分），オリジナル論文の口頭発表（20分），ポスター発表に区別され、発表件数は各々14編，26編および25編で，以下にその概要と筆者が特に印象に残った点について紹介したい。

1　真核細胞の光合成における CO_2 濃縮機構（CCM）

M. Badger（豪）による Rubisco, plastids, ピレノイドおよびCCM の種間変異およびD. Sultemeyer（独）によるカルボニックアンヒドラーゼ（CA）に関するレビュー，更に7編の口頭発表が行われた。CCMにおけるCAの役割は非常に大きく，その細胞内局在性，分子特性，触媒活性，酵素蛋白誘導の機構の解明は非常に重要である。単細胞緑藻のクラミドモナスを中心に紹介すると，葉緑体に，ピレノイド（β-type，但単細胞紅藻 *Porphyridium*），チラコイド（α-type），ストロマ（β-type，但高等植物）包膜にCAが存在し，細胞全体では更に細胞質（β-

type, 但パルメラ状群体を形成する*Coccomyxa*), ミトコンドリア (β-type) およびペリプラズム (α-type, 低および高CO_2誘導性の2種類) に存在するが, 一種の細胞でその全てが証明されたものはない上に, 局在器官が同じでも種によりCAの分子特性が異なっている等の違いがある。また, ピレノイドの有無による違いも大きく, 更なる研究が期待される。

J. MoroneyやD. Husicら(USA)は, クラミドモナスのチラコイドにCA (CAH3, α-type) が局在することをPhotoaffinity labelling法を用いて示したが, その作用機構についてはまだ推測の域を出ていない。また, 三橋ら(MBI釜石)は, *Porphyridium*のCAをクローニングし, 遺伝子構造を明らかにした。更に, recombinant CAをもとに合成させたnative CAをもとに抗体を作成し, 免疫化学的方法によりその局在箇所を調べたところ, ピレノイドに局在していることを明らかにした。そして, それがシアノバクテリアのカルボキシゾームにおけるCAの機能との類推から, RubiscoへのCO_2供給の促進であろうと推測した。ミトコンドリアのCAに関しては, その作用機構は明らかにされなかったが, DCMUやDBMIBによりその蛋白の誘導が阻害されることがDurnfordら(USA/スエーデン) により報告された。筆者らは, クロレラのCAが, これまで主に研究されてきたクラミドモナスのペリプラズムCAとは異なる構造, 特性およびアミノ酸組成を有することを報告した (佐藤ら, 新潟大)。

第一回シンポジウムの際は, CCMにおけるCAの関与に関してすら激しい議論が戦わされたと聞いているが, 第2回シンポジウムではCAの機能に関して異論を唱えるものはなく, 主要話題はクラミドモナスのペリプラズムCAの分子特性および遺伝子の解析に関するものであった。そして, 今回は, それらの知見は既に確立したものとして議論され, それ以外のCAに関する話題が中心となっていたのが印象深い。

一方, active inorganic carbon transport系に関しては, 細胞膜あるいは葉緑体包膜のいづれかもしくは双方にトランスポーターが存在するかどうかを証明する研究に関しての進展は今回みられなかった。クラミドモナスにおける生理的データの解析から, 葉緑体包膜に能動輸送系が存在していれば, 細胞膜を単純拡散すると仮定しても, CO_2あるいはHCO_3^-の輸送速度を説明できるとの報告 (D. Sultemeyer) もあったが, 細胞膜に能動輸送系が存在しないという証明とはなっていない。能動輸送系に関与する蛋白因子の探索に関しては, gene taggingによるhigh-CO_2 requring mutantsの作成 (福沢ら, 京都大), 低CO_2条件でupregulateされるcDNAsの探索 (Moroneyら USA), 無機炭素輸送系の誘導と期を一にして合成される葉緑体包膜蛋白の同定 (Goyalら USA), クロレラの無機炭素輸送系のmutantsを用いた調節機構の研究 (松田　関西学院大) 等の研究が報告された。我々は, 低CO_2から高CO_2条件への移行にともない誘導されるクラミドモナスのペリプラズム局在のポリペプチド (43-kD) の分子特性の解析から, 低CO_2条件下で機能する無機炭素輸送系のdown-regulationと積極的な高CO_2条件への適応に関与する機構を解明しようとする研究について報告した (小林ら, 新潟大)。また, 緑藻以外の微細藻類, 特にChromophyte algaeを用いた研究の増加も目を引いた (B. Colman 加)。

2　原核生物におけるCO_2濃縮機構

シアノバクテリアにおけるCO_2固定部位であるカルボキシゾームは主にRubisco蛋白よりなるが，種々の原核生物において良く保存されたポリペプチドを有する（Shively, USA)。また，数種のシアノバクテリアのCCMの特性の変化を，遺伝子，タンパクおよびその機能と誘導機構をCCMを欠くmutantを用いての研究に関するレビューがあった（D. Price 豪，Ritchi 豪，小川 名古屋大)。低CO_2条件に適応したシアノバクテリアにおける細胞質膜を介した無機炭素輸送は，CO_2分子およびHCO_3^-イオンのいずれをも基質とするが，そのトランスポーター遺伝子は明らかではない。しかし，*cmpA*遺伝子は低CO_2誘導性42 kD蛋白をコードし，ABCトランスポーター型のオペロン構造からHCO_3^-トランスポーター遺伝子である可能性が示唆された。また，NO_3^-/NO_2^-トランスポーターをコードする*nrt*遺伝子と*ccm*遺伝子が類似していることから，traffic ATPaseの関与するHCO_3^-トランスポーターの構造が推定された（小俣，名古屋大)。これに，Na^+/HCO_3^- symport系およびCA-like moietyを加えた３種類の無機炭素能動輸送系の実態が明らかにされつつある。その他，*eca* A（α-type CA）および*eca* B（β-type CA）が*Synechococcus* PCC7942および*Synechocystis* PCC6803のCCMに関与するとの報告があった（G. Espie,　加)。また，シアノバクテリアの環境中のCO_2濃度変動に対する適応のメカニズムに関しては，A. Kaplan（イスラエル）の詳細なレビューがなされた。シアノバクテリアに*Chromatium*やice plantの酵素を入れ込み，その発現調節の研究と形質転換技術の確立を目指した報告もなされた（和田野ら，大阪府大)。

3　水性植物のCO_2濃縮機構

G. Bowes（USA）による"A Kranzless, C_4-based, chloroplastic CO_2 concentrating mechanism in the submersed monocot *Hydrilla*"と題する講演は，水中生活をする*Hydrilla*（単子葉植物）が，C_4植物の特徴であるクランツ型構造を有しないにもかかわらず，CO_2欠乏状態におかれた場合，C_4植物の生化学的な特徴であるC_4経路を構成する酵素系を誘導し，生理学的にもC_4植物としての特徴を示すことを報告するものであった。筆者はこれまでC_4植物の形態学的特徴であるクランツ型構造（２種の細胞の分化）と生化学的特徴であるC_4経路の酵素系の存在は不可分のものであると思っていただけに，強い印象を受けた。Bowesは，Plant Biology'97のシンポジウムでも同じ講演を行い，注目を集めていた。

4　その他の話題

今回新たに設けられたセッションとしてEcophysiologyおよびStable Isotopes and the CCMがある。演題数は少なかったが，シャジクモ（T. McConnaughey, USA）および単細胞石灰藻である円石藻による生物石灰化（Nimer/Merrett/Brownlee 英）および共生藻が関与するイソギンチャクのCO_2利用（Allemand モナコ）に関する口頭発表およびポスター発表があった。^{13}Cおよび^{18}Oを利用したCA活性測定法や無機炭素利用機構に関する研究は従来から行われてきたが，

今回，$^{13}C/^{12}C$-discriminationを利用した微細藻類の無機炭素利用の研究が，古海洋環境の再現など湖沼や海洋におけるグローバルな研究にも有用な情報を提供することが報告された(Erez イスラエル，Fielding 加)。筆者も，円石藻の光合成および石灰化によるCO_2固定の研究を通して，古海洋環境の推定に関する研究を行っているので，今後のこの分野の進展に期待したい。

Plant Biology '97

日，米，加，豪の４ヵ国合同の植物生理学会は，バンクーバー市内の高級ホテル（Hyatt Regency、およびHotel Vancouver）を会場として行われた。正確な参加人数は定かではないが，2000人の参加者（うち日本からはおよそ300人）を集めたと伺っている。ロビーとポスター会場はごった返していたことと，旧知の内外の研究者（ただし，3rd DIC Congress参加者は除く）とは大方会うことが出来たことから十分信じ得る数のように思えた。筆者に最も深く関係するセッションは、"疲れ果てた" 3rd DIC Congress参加者によるものが多かったため，再度大きく盛り上がるという状態ではなかったというのが正直なところである。さらに，ある口頭発表会場などは，１ターム６編の講演の中で，同じ演者が３度登場する始末で，十分にオーガナイズされたとはいえない状態であった。その分、他の関連分野の講演やポスターで十分勉強でき有意義となるではずであったが，併せて２週間にも及ぶ会期の中で疲れも出始め，本学会の参加を最初から見合わせたり，旧知の方と抜け出して風光明媚なロッキーやヴィクトリアやスタンリーパークで議論に花を咲かせている人の姿がどうしても目に浮かび集中力に欠けてしまったことは否めない。したがって，紙面の都合もあり，本学会の講演内容の詳細に関しては，他の執筆者の記事あるいは既に出されているPlant Biology '97 の Abstract (Supplement to PLANT PHYSIOLOGY Vol. 114, Number 3, July 1997) をご参照いただければ幸いである。

"誌上討論会"
光呼吸について考える

東北大学　農学部　生物化学系　　　牧野　周

泣く子も黙る前会長、金井先生からの命を受け、Plant Science永遠の謎 (?) 光呼吸について、前号(21号)の竹葉先生の続編を書くことになりました。泣くに泣けない私としては、みなさんからの厳しいご批判に脅えながら、辛うじて自分に知識のあるRubisco sideからみた一考察を加えてみたいと思います。

竹葉先生は、前号(21号)の「光呼吸についての２つの誤解」において、現在考えられている光呼吸の生理的意義として次の4つの考え方があると整理されています。(1) 光呼吸はエネルギーと物質の損失であり、光呼吸を抑制すれば光合成を増加させることができる、(2)Rubiscoのoxygenase反応は不可避であり、光呼吸系はグリコール酸の４分の３の炭素を回収する役割がある、

(3)光呼吸系は中間代謝産物であるGly、Ser、C_1-unitを他の代謝系 に供給する役割がある、(4)光阻害・光傷害を回避する役割がある。そして、先生は、(1)と(2) は誤り、(3)は正しいが、積極的な意味で(4)の役割が重要であると議論されています。

しかし、私個人としては、現在でもまだ、(1)~(4)それぞれに正解が含まれていると考え るべきだと思っています。もちろん、(2)においては、竹葉先生も指摘されていたように、光 呼吸により放出されるCO_2は、通常の条件ではRubiscoにリサイクルされているので厳密 には誤りということになります。しかし、「4分の3」という記述を削除すれば、この考え方 も必ずしも否定できるものではないのでしょう。また、たとえCO_2がリサイクルされても、物質生産のための速度論的ロス、エネルギー的ロスは確実に存在している訳です。(3)は、光 呼吸がほとんど抑制される高CO_2分圧条件(例えば、100 Pa程度)でも植物がきわめて正常 に生育し、そのライフサイクルを完結させせることを考えると積極的な意味はないのかも知れ ません。しかし、それだからといって必ずしもその役割が全面否定されるものでもないでし ょう。(4)の重要性については特に異論はありません。光呼吸がXanthophyll cycleやWater-water cycle (Asada pathway)などの代謝と並んで、光阻害・光傷害の回避機構(光エネ ルギーの供給と炭酸固定速度との間に大きなアンバランスが生じた時のbuffer action的機 構)として働いていることは大なり小なり事実だと思います。しかし、私は、ここでは、敢 えて(1)の問題にこだわってみたいと思います。なぜなら、光呼吸は、光エネルギーの積極的 な消去系として役割が強調されているにもかかわらず、実際どの程度その消去系として機能 しているのかを定量的に論じた例がほとんど見当たらないからです。さらに、super Rubiscoの作出やCO_2濃縮機構付加などによる光呼吸制御による光合成の改良が、今日でも人類の大 きな試みの一つとして考えられている中、その研究の方向性を簡単には否定できないと考え ているからです。

(a) 光呼吸はどのくらいエネルギーと還元力の消去系として機能しているのか?

現在の大気条件、36 Pa CO_2、21 kPa O_2で、植物がどれだけの光呼吸を行っているかを 定量的に測定する簡便な手段が開発されていないところに、光呼吸の理解を困難にしている 要因があるようです。ここでは、光飽和、適温(例えば、25°C)で、大気CO_2分圧以下の光 合成と光呼吸は、ともにRubiscoによって律速される事実に基づいて、Rubiscoのkineticsにより光合成速度と光呼吸速度を見積りし、それらによって消費されるエネルギー量と還元 力から、光呼吸の生理的役割について考察してみることにします。

Rubiscoのcarboxylaseによって律速される光合成速度(Vc)は式(1)で算出されます。

$$Vc = Vcmax\,[CO2]/\{[CO2] + Kc\,[1 + [O_2]/K_o]\} \qquad (1)$$

同様にoxygenaseによって律速される光呼吸速度(Vo)は、式(2)で算出されます。

$$Vo = Vomax\,[O_2]/\{[O_2] + Ko\,[1 + [CO_2]/Kc]\} \qquad (2)$$

ここで、$Vcmax$および$Vomax$は、carboxylase、oxygenaseの$Vmax$を意味し、イネの場 合は、それぞれ17.4 s^{-1}、5.7 s^{-1}、KcおよびKoは、carboxylase、oxygenaseのKmを意味 し、イネの場合は、24 Pa、28 kPaです (Makinoら Plant Phys. 1994, 105: 173)。

大気CO_2分圧下でのRubisco siteのCO_2分圧を20 Paと仮定して、式(1)と式(2)より、光合

成速度と光呼吸速度を計算すると、それぞれ5.6 s-1 および1.7 s^{-1} となり、大気 CO_2/O_2 分圧下では、光合成速度に対して、約30％の光呼吸が生じていることになります。次に、それぞれの代謝収支より、ATPと還元力の消費について算出してみると、CO_2 一分子あたり光合成によって3分子のATPと4 e^- が、O_2 一分子の取込みによって3.25分子のATPと4 e^- が消費されることになります。ただし、光呼吸によって放出される CO_2 (上記条件では、光合成 CO_2 固定速度の15％に相当)は、外気から拡散してくる CO_2 と区別なく光合成によって利用されるので、その分は光合成側の利用に含まれます。上述のRubiscoのkineticsから算出されるそれぞれの速度を考慮すると、光合成と光呼吸によるATPと還元力の消費速度を算出することができます(表1)。大気 CO_2/O_2 分圧の場合、光合成、光呼吸の合計消費のうち、光呼吸による消費は、ATPで25％、還元力で23％となります。やはり、この量(速度)は無視でき得ない大きな量(速度)と言えるのでしょう。しかし、もし、Rubiscoがoxygenase活性を持たず、つまり、O_2 による拮抗阻害もなく、現在のcarboxylase活性の能力だけで機能しているとすると、その消費速度は、ATPで、23.7 mol s^{-1}、還元力で31.6 mol s^{-1} となり、大気分圧下での光合成・光呼吸の合計の消費速度を上回ります。このことは、仮定論ではありますが、光呼吸の積極論に疑問符を打つものでもあります。一方、光呼吸によるエネルギー消費の重要性は、低 CO_2 条件、特に CO_2 補償点で光呼吸が最大となることから、そのような条件下での重要性がしばしば強調されています。表1より、CO_2 補償点(5 Paと仮定)では、確かに光呼吸によるエネルギーの消費率は、光合成との合計消費の55％と高くなっています。しかし、その合計消費そのものが、大気分圧下の消費の56％と低下しています。さらに、CO_2 補償点では、Rubiscoの活性化率が、約50～70％まで低下していることも知られており(von CaemmererとEdmondson, Aust. J. Pl. Phys. 1986, 13: 669; Sageら Plant Phys. 1990, 94: 1735)、それらの点を考慮すると光呼吸による CO_2 補償点でのエネルギー消費の貢献度は、かなり小さいものであることが予想されます。一方、CO_2 変化に伴う、クロロフィル蛍光の変化を測定した実験の結果をみると、CO_2 補償点では、qNが著しく上昇し、PSIIの量子収率の低下が観測されています(Sharkeyら Planta 1988, 176: 415; Winglerら Planta 1997, 202: 171)。これらのことを考えると、CO_2 補償点での光エネルギー消去の本質はやはり熱放出の方にあるようです。しかし、CO_2 補償点では、光呼吸が完全閉鎖のカルビン回路(ショ糖・デンプンを生産しない経路)と連結して回転することを可能としている点に重要な意味があるのかも知れません。つまり、

表1： Rubisco一分子あたりの光合成と光呼吸で消費されるATPと還元力(e^-)

	大気分圧下[a]		CO_2 補償点(5 Pa CO_2)	
	ATP	還元力(e^-)	ATP	還元力(e^-)
		mol s⁻¹		
光合成	16.8	22.4	5.6	7.4
光呼吸	5.5	6.4	7.1	8.8
計	22.3	28.8	12.7	16.2

[a] 光合成のみ(O_2 の拮抗阻害はなし)ではATP 23.7 mol s^{-1}, e^- 31.6 mol s^{-1}

光呼吸の役割として葉内にCO_2フリー の環境を与えない(光合成・光呼吸回路の完全な停止を避けるための機能)意味がある可能性 は否定できません。

(b) Super Rubiscoや炭酸濃縮機構付加による光呼吸制御や光合成の強化は可能か？

Super Rubiscoの作出や炭酸濃縮機構の付加が人類の英知で可能な作業かどうかの議論は別にして、ここでは、そのような改変によって光呼吸を制御した植物が生物として存在し得 るかどうかについて考えてみます。結論から言えば、やはりこればかりは作ってみないとわ からない、ということが正しい認識になるのでしょう。しかし、光呼吸の光エネルギー消去 系として機能は、光合成によるエネルギー消去を効率的に上回っている訳ではないのですか ら、その点だけからみると改変植物の存在は可能であると考えることが妥当であるように思 われます。問題点は、低CO_2条件下のように、光合成が効率良く機能できない場合の問題で しょうが、上でも述べたように、その条件における光呼吸の貢献度はそれほど大きいもので はなく、また、改変のねらいがその条件における光合成の強化にある訳ですから、エネルギ ーの消去系不足による光阻害・光傷害は理論的には少し考えにくいと思われます。しかし、光呼吸にカルビン回路の完全停止からの回避としての意味があるとするならば、oxygenase 活性が限りなくlessに近いsuper Rubiscoは否定されるでしょう。以上、光合成・光呼吸に対する理解がまだまだ不十分であるだけに、いろいろな意見や考 え方もあるのでしょうが、現在の段階では、光呼吸がCO_2分圧低下に伴うbuffer action的 機能として光エネルギーの消去系に大きな貢献をしていると結論するには、少しばかり疑問 が残る点がある、と言うような気がします。しかし、光呼吸にカルビン回路の完全停止を回 避する役割があることについては否定できるものではありません。そして、super Rubiscoや炭酸濃縮機構付加による光呼吸制御の方向の研究も必ずしも否定できる共通認識にはない というのが私の意見です。

(c) 光呼吸の制御、炭酸固定の強化の生理学的な評価方法の落とし穴

今日、光呼吸の制御や炭酸固定の強化をめぐっていくつかの試みがなされています。最後 にそれらの生理学的評価方法の落とし穴について触れたいと思います。

1) CO_2補償点の変化による評価

CO_2補償点を決定している主要因が、光合成・光呼吸比であることは周知のことです。しかし、やっかいなことにいわゆる呼吸がこれに深くかかわってきます。例えば、まったく同 種の植物で、しかも測定時の光条件や温度条件が同じであっても、生育温度の違い、生育した光環境の違い、極端な場合、測定直前の天気の違い、また、葉齢や葉の窒素含量の違い等 の要因によって、CO_2補償点は、4～8 Pa (at 25℃)ぐらいの範囲で変化します。これらは、 いずれの場合も光合成・光呼吸の比による変化ではなく、光合成・光呼吸の正味速度と呼吸の比の違いによって変化しています。主要因は、多くの場合炭水化物の蓄積程度の差による糖 代謝の違いにあるようです。したがって、その範囲内(4～8 Pa)でCO_2補償点が変化しても、光合成・光呼吸の比に変化があったと推定することは非常に危険であると言わざる得 ません。しかし、現存するRubiscoのkineticsからは、CO_2補償点が、3～3.5 Pa以下にな ることは考えられないので、それ以下のCO2補償点が観測された場合は、光合成・光呼吸比 に変化があったと考えていいで

しょう。

2) 2 kPa (2%) O2と21 kPa (21%) O_2分圧差による光合成速度の差による評価

一般に、強光下、25℃、大気CO_2分圧の条件で、21 kPaから2 kPaへO_2分圧を下げると光合成速度は1.25～1.35倍ぐらい上昇します。この上昇分が光呼吸であったと判断されることが多いのですが、これも必ずしも正しくありません。Sharkeyら(Plant Phys. 1986, 81: 1123)は、2 kPa O_2条件では、光合成はRubiscoによって律速されるのではなく、ATP生産のために供給されるPiの再利用によって律速されていることを指摘しています。すなわち、このことは、2 kPa O2の光合成と21 kPa O_2の光合成はまったく別の光合成であることを意味しています。現実に、クロロフィル蛍光の測定結果でも、光合成速度の増加に伴い計算されるエネルギー・還元力の消費の差がほんとんどないにもかかわらず、qNの上昇、PSIIの量子収率の低下は必ず観測されています(Sharkeyら Planta 1988, 176: 415; Hauslerら Planta 1994, 194: 418)。したがって、2 kPa O_2分圧の光合成が単に光呼吸を抑制した時の光合成ではないことを理解する必要があるのでしょう。

(d) おわりに

近年、オーストラリアのOsmondらの研究グループは、閉鎖系ガス交換装置に、マススペクトロメーターと蛍光測定の装置を組み合わせた新しい測定装置を用いて、光呼吸速度の直接的な見積もりに成功しています。彼らの結果によると、CO_2補償点における光呼吸速度は、私がここで推定議論しているものよりも高い値を観測しているようです(Osmondら Trends Plant Sci. 1997, 2: 119)。今後は、光呼吸の生理的意義を問うといった漠然とした議論をするのではなく、様々な環境変化とそれに応答する植物種の多様性を踏まえ、 Xanthophyll cycleやWater-water cycleそして炭酸固定を含め、光呼吸速度を定量的におさえて、その役割を議論することが必要な時代になるのだと思われます。やさしいご批判を頂けると幸いです。

―Penn State 留学記―「Slowly but Surely」

Department of Biochemistry and Molecular Biology,
The Pennsylvania State University　　坂本　敏夫

1995年4月よりペンシルバニア州立大学（Penn State, University Park Campus）の生化学・分子生物学科(BMB)の Dr. Don Bryantのもとでポスドクとして働いています。当地での生活は3年目に入り、ようやく、ペンシルバニアおよびUSAでの生活の年周変化がわかり、四季の行事を予定できるようになってきたところです。Penn Stateは、ペンシルバニア州の中央に位置し、その学生数および財政規模において、全米のTop 10のなかに数えられるマンモス大学です。私が滞在しているUniversity Park Campusにはおよそ4万人（Penn Stateの総学生数の52%）の

学生が集中しています。この巨大なCampusを中心として大学町にあたるState Collegeおよび周辺の町がHappy Valleyとよばれるアパラチアン山脈の東のはずれの谷間に広がっています。Penn Stateの起源は1855年設立の農業学校で、郊外には牧場がありのどかな風景が広がっています。近くの大都市（New York, Washington DC, Baltimore, Philadelphia, Pittsburgh)まで、いずれも車で3～5時間と適度な距離で離れているため、研究・教育に集中するにはたいへん良い環境だと思います。

娯楽の少ないState Collegeでは、Penn State FootballのHome Gameの日は10万人収容のBeaver Stadiumが満員となり、State Collegeが一時的にPhiladelphia, Pittsburghにつぐペンシルバニア第3位の人口に膨れ上るという熱狂をしめします。全米大学アメリカンフットボール界におけるPenn Stateの地位は、名門・強豪チームと肩を並べることのできる有力校といったところで、華麗なプレイというよりは、選手が一丸となって着実にボールを前へと押し進めていくチームです。実際にシーズンを通して試合を見ていくと、シーズンが進むにつれて名将Joe Paternoに率いられた選手たちが力と自信をつけていく様子が見て取れます。

Don Bryantという研究者はphycobilisomeとPS Iの研究で知られていますが、phycobilisomeの研究は現在のラボではlinker proteinの大腸菌での多量発現とその生化学的解析が小規模に行われているに過ぎません。研究材料としてラン藻*Synechococcus* sp. PCC 7002を使っており、細胞を壊しやすくチラコイド膜の調製やRNA・DNAの抽出がしやすい、増殖速度がきわめて速い（doubling time＝4時間）など便利な点がたくさんあり、コスミドによる整列ゲノムライブラリーやシャトルベクターなどの小道具をこのラボでたくさん開発しているので、非常に重宝しています。Vicki Stirewaltが現場のマネージメントと研究を支援する仕事を引き受けており、コンピテントセルの作成、オリゴヌクレオチドの合成、機器の管理、膨大な変異株の植え継ぎ、人の出入りがあったときの引き継ぎなどをしています。現在3つの主要プロジェクトが進行しています。

（A）ラン藻での遺伝子発現調節のメカニズムの解析。

ラン藻のRNA polymeraseは、$\alpha_2\beta\beta'$のサブユニット構成からなるコア酵素とシグマ因子からなり、プロモーター配列の認識と転写の開始がシグマ因子によって司られています。ラン藻でも大腸菌と同様、複数のシグマ因子が存在し、おそらく、環境変化に対する遺伝子発現調節に役立っているものと考えられています。後述するように、私は、温度による遺伝子発現調節を調べる、という研究テーマでこのプロジェクトに参加しました。このシグマ因子のプロジェクトには、私のほかに2人の大学院学生が参加しており、彼等は、*Synecococcus* sp. PCC 7002からシグマ因子の遺伝子を単離し、塩基配列を決定し、抗生物質耐性遺伝子を挿入して遺伝子破壊体を作成し、大腸菌で多量発現した遺伝子産物に対する抗体を作成する、という地道な作業を続けています。これまでに少なくとも7種類のシグマ因子がこのラン藻にあることが分かってきています。遺伝子破壊体は、ほとんどそれらしい表現形を示さず、ようやく、1つのシグ

マ因子はstationary phaseの細胞の維持に関与するらしいこと、トリプルミュータントにすると栄養飢餓に弱くなることが、これまでに明らかになっています。近々Ph.D.を取得する予定のTanja Gruberが、これらの解析をほぼ一人で進めてきており、cross-hybridizationとsequencingの名手である彼女は遺伝子ハンティングの対象を光合成原核生物にまで広げ、シグマ因子の推定アミノ酸配列を用いて分子進化の系統樹を作成しています（Gruber and Bryant 1997, J Bacteriol 179:1734-1747)。

(B) 光化学系I (PS I)の分子生物学的解析。

このプロジェクトは、Gaozhong Shen （Arizona State UniversityのDr. Vermassのところで Ph.D.を取り、1994年からDonのラボで働いている。彼はこの8月にState Collegeに家を新築した）の独壇場で、複数のPS I関連の遺伝子の破壊、その結果できる多数の変異の生化学・生理学的解析を一手に引き受けています。昨年、Dr. John Golbeck が Penn Stateの同じ学科に移ってきたので、親密に共同研究が進められています。大学院学生Chris Nomuraは温暖なカリフォルニアから寒さ厳しいペンシルバニアに来たことを後悔する日系6世で、cytochrome c_6 の精製、遺伝子の単離、遺伝子破壊を行っています。Chrisは<自己主張の国>USAの学生の中でもなかなかの口達者で、この1年間でポスタープレセンテーションのawardを2つも獲得しました。

(C) 光合成細菌*Chlorobium*の集光アンテナchlorosomeの構成タンパク質の解析

Chlorosomeは、緑色硫黄細菌に特有の嚢包状の集光器官で、細胞膜の内側に付着しており、ここで集められた光エネルギーが細胞膜にある反応中心に送られます。バクテリオクロロフィル、カロテノイド、糖脂質（脂質一重層の包膜と考えられており、モノガラクトシルジアシルグリセロール、MGDG、を含む）が主な成分で、タンパク質はわずかしか含まれていません。このchlorosomeタンパク質を解析するプロジェクトは、すでに卒業した大学院学生Soohee ChungのPh.D. プログラムとして進められ、彼女の卒業後はポスドクが引き継いで進めています。Sooheeは、chlorosomeを精製し、構成タンパク質のN端を次々に決定し、5つの遺伝子を単離し、RNAブロット、プライマーエクステンション、遺伝子破壊、大腸菌での遺伝子産物の多量発現、抗体の作成、イムノブロットによるchlorosomeタンパク質の配向の解析、と仕事を進め、縦にも横にも立つ分厚い学位論文を書いて卒業していきました(Chung et al. 1994, Photosynth. Res. 41:261-275; Chung and Bryant 1996, Arch. Microbiol .166:234-244; Chung and Bryant 1996, Photosynth. Res. 50:41-59)。

私がDonのラボへ来たそもそもの動機は、温度適応に対するシグマ因子の役割についての解析を行う、というものでした。それまでに私はラン藻の脂肪酸不飽和化酵素の解析を行っており、不飽和化酵素遺伝子の温度による遺伝子発現調節メカニズムの解析を次のテーマとして想定していました。Donはシグマ因子に注目しており、「温度に応答する遺伝子の発現制御にシグマ因子が関与しているかどうか検討して見よう」ということで仕事を始めました。オメガ3位不飽和化酵素遺伝子(*desB*)が低温で特異的に誘導されることが*Synechocystis* sp. PCC 6803で既に示されていたので、「このラボで使っている*Synechococcus* sp. PCC 7002から一連の不飽和化酵素遺伝

子をすべて単離せよ」ということになりました。ほぼ半年でcross-hybridization & sequencingというこのラボの必修科目（新人のほとんどすべてが、遺伝子クローニングから始める）を修了し、生理学の手始めにラン藻を低温で培養してgrowth curveを取り始めました。まず培養温度の制御を試行錯誤し、放置してあったゴミ同然の冷却水製造装置を改装して単純かつ安定した低温培養槽を作りました。ラン藻*Synechococcus* sp. PCC 7002の最適培養温度は38℃で、最適培養条件におけるdoubling timeは4時間、その他の条件はそのままにして培養温度のみを22℃に下げるとdoubling timeは10時間になります。10℃温度を下げたとき酵素反応の速度は一般に1/2になるとされるので（$Q_{10}=2$）、22℃での生長速度(doubling time=10 h)は、温度の低下によって生化学反応全体が遅くなった結果と考えられます(1)。38℃で培養したラン藻を22℃に移すと、直後およそ12時間の生長の遅いphaseが現われてから対数増殖期にはいるので、なんらかの低温適応がこの12時間に起こることが示唆されます。22℃に温度を下げてから4～12時間に膜脂質の不飽和化が進行し、オメガ3位での不飽和化が誘導されます(2)。また、*desB*遺伝子のmRNAは38℃で培養した細胞では検出されず、22℃で培養した細胞でのみ蓄積しています(1)。そこで、*desB*遺伝子の転写が低温で誘導され膜脂質がオメガ3位での不飽和化をうけて低温（22℃）に適応する、と考えてしまいがちです。*desB*遺伝子のmRNAの蓄積は22℃処理開始とほぼ同時に起こり始め、22℃処理15分で定常レベルに達するので、mRNAの蓄積は脂質の不飽和化を律速していません(1,2)。また、この*desB* mRNAの蓄積は、mRNAの安定化によって支配されており(1)、おそらく、*desB*の発現制御は、翻訳レベルでなされ、22℃の下ではmRNAがribosomeによって物理的に保護されているのではないかと推測しています。*desB*遺伝子を破壊してオメガ3位での不飽和化が進行しないようにしても、22℃での生育は野生株と変わらないので（4)、オメガ3位の不飽和化は22℃への低温適応に全く寄与していません。

「それならば、もっと低温にしてみたらどうだろう？」ということになって15℃で培養して見ると、野生株の細胞がクロロシスを起こして黄化してしまいました。<低温ストレスと強光ストレスは同義である>と広く信じられているので、もし慎重さを欠いていたなら、このクロロシスを光阻害の結果と誤って判断したかもしれません。Donの見立ては、「NitrogenかCarbonの飢餓でしかクロロシスは起こらない、どちらが原因か突き止めよ」となり、以来数週間、毎朝私の顔を見るごとに、Donは私に「Hey, Toshio, Nitrogen or Carbon ?」と尋ね続けました。培養条件を変えてgrowth curveを取ることを続けて見ると、硝酸を窒素源にして15℃で培養するとArithmetic (Linear) growthを示し、窒素源を尿素に変えると見かけの色調が藍色に戻るとともにExponential growthを示すことが分かりました(3)。光強度を下げても硝酸で培養した場合にはクロロシスすること、光合成の温度依存性は15℃から38℃の間でほぼ$Q_{10}=2$の法則に従って低下すること、クロロシスした細胞には多量のglycogenが蓄積していることから、『15℃の培養条件では窒素飢餓（硝酸代謝の低下）が生長を律速している』と結論しました(3)。*desB*遺伝子を破壊した変異株で15℃での生育を調べて見ると、15℃に温度を下げた直後しばらくの間は野生株と同様の生育を示すけれども、やがて*desB*破壊株の生育は止まってしまうことが分かりました(4)。*desB*破壊株の光合成活性の温度依存性は野生株と全く変わりないので、このgrowth curve

の違いは、*desB*破壊株は蓄えている栄養物を使い切るまでは15℃で野生株と同様に生育できるけれども15℃で長く生育を続けることはできないと考えました(4)。

不飽和化酵素遺伝子の発現パターンと不飽和化酵素遺伝子の破壊株の表現形を比較して面白いことに気がつきました。低温適応に必要な不飽和化酵素遺伝子の発現開始温度は、その遺伝子産物が本当に必要になる温度よりも高い温度に設定されているのです。1つ目の二重結合を導入するデルタ9位不飽和化酵素の遺伝子(*desC*)は38℃と22℃で同じレベルのmRNAの蓄積が見られ、おそらく*desC*遺伝子を破壊することはできないと考えられるので、デルタ9位不飽和化酵素は生育に必須であると考えられます。2つ目の二重結合を導入するデルタ12位不飽和化酵素の遺伝子(*desA*)は38℃で既に発現しており、22℃で誘導がかかりmRNAレベルの上昇が見られます。しかし、*desA*破壊株は38℃での生育は野生株と全く変わらず、22℃以下の温度で生育が低下します。3つ目の二重結合を導入するオメガ3位不飽和化酵素の遺伝子(*desB*)は、38℃では発現しておらず、22℃で誘導されます。しかし、*desB*破壊株の22℃以上での生育は野生株と全く変わりなく、15℃に培養温度を下げて初めて生育の違いが認められます。すなわち、温度が下がった場合、『余力のあるうちにさらに温度が下がった場合の備えを獲得する』という仕組になっているのです。さらに、低温適応に必要な不飽和化酵素遺伝子の発現は低温でmRNAが安定化されることによって調節されているので、浪費をさける仕組にもなっているようです。不飽和化酵素遺伝子の温度による発現調節には転写の開始は重要でないようで、当初考えていたシグマ因子による調節は関与していないと思われます。

光合成の低温適応という観点からは、22℃で培養した細胞では酸素発生能の上昇が見られ、22℃で培養し22℃で測定した酸素発生能の値が、38℃で培養し38℃で測定した酸素発生能の値に近いことが分かりました(3)。77Kの蛍光スペクトルでみると、PS IIのPS Iに対する比が22℃で培養した細胞では上昇しており(3)、おそらく、低温での光合成能を維持するための適応があるのではないかと考えています。脂質の不飽和化は、この低温で培養した細胞でのPS IIの上昇とは無関係です(4)。

③

これからの研究課題として(A)15℃での生育が硝酸代謝のどの段階で律速されているのかを特定すること、(B)低温による*desB* mRNAの安定化機構を解析すること、および(C)PS I/PS II ratioの変化が低温適応に果たす役割を解析することが残されています。今後はこれらの問いに一つづつ解答を与えていきたいと考えています。

最後にこちらで見聞した多くの事柄のなかから特に一つのことを述べたいと思います。現在、身体に目に見える障害を持つ大学院学生が同じ学科で働いています。一人は肢体不自由で車椅子、もう一人は左碗を失っていて義手です。こうした身体の差異は実験科学をするうえで不利だと思われがちです。しかしながら、こちらで暮らして３年目になると、実に多くのいわゆる障害者が普通に買い物をしていたり、働いていたり、国立公園でハイキングを楽しんでいたりすることが当り前のことと受けとめられるようになるので、障害は性差や民族の違いと同様にむしろ個人の差異ほどのものであると自然と感じられるようになります。将来日本の大学・大学院でも障害を持つ人が自然に受け入れられるような環境づくりが求められることになると思います。

(1) Sakamoto, T. and Bryant, D. A. (1997a) Temperature-regulated transcription accumulation and mRNA stabilization for fatty acid desaturases genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7002. Molec. Microbiol. 23:1281-1292.
(2) Sakamoto, T., Higashi, S., Wada, H., Murata, N. and Bryant, D.A. (1997a) Low-temperature induced desaturation of fatty acids and expression of desaturase genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. FEMS Microbiol. Lett. 152:313-320.
(3) Sakamoto, T. and Bryant D.A. (1997b) Growth at low temperature causes nitrogen limitation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. Archiv Microbiol. in press
(4) Sakamoto, T., Shen, G., Higashi, S, Murata, N. and Bryant, D.A. (1997b) Alternation of low-temperature susceptibility of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 by genetic manipulation of membrane lipid unsaturation. Archiv Microbiol. in press

謝辞：１９９４年度海外長期派遣援助を山田科学振興財団より頂いたことをここに付記し、感謝の意を表します。

(坂本敏夫氏の E-mail: txs25@psu.edu)

光合成研究会賛助会員名簿　（アイウエオ順）
株式会社　海洋バイオテクノロジー研究所 旭光通商株式会社 日本たばこ産業株式会社　アグリ事業部 日本たばこ産業株式会社　遺伝育種研究所 盟和商事株式会社 有限会社　アースサイエンス

****

光合成研究会　1997～1998年役員

会長　井上頼直　（理化学研究所）

幹事（日本光生物学会の委員を兼任）

小野高明　（理化学研究所）

幹事　都筑幹夫　（東京薬科大学生命科学部）

幹事　池内昌彦　（東京大学教養学部）

幹事　寺島一郎　（筑波大学生物科学系）

****

光合成研究会　会報　第22号　1997年9月25日発行

〒351－01 埼玉県和光市広沢2－1

理化学研究所　光合成科学研究室内

光合成研究会

TEL: 048-462-1111, FAX: -48-462-4685

E-mail: yorinao@postman.riken.go.jp

振替貯金口座　00140－3－730290　光合成研究会