

光合成研究

第30巻 第3号 (通巻89号) 2020年12月

Vol. 30 NO. 3 December 2020

JOURNAL OF THE JAPANESE SOCIETY OF PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

トピックス	Rubisco30%増強イネと秋田63号の栽培実験から見る増収戦略	牧野 周 (東北大)	140
トピックス	有害赤潮形成藻シャットネラ属における細胞外スーパーオキシド産生と光合成の関係	湯浅 光貴 他 (埼玉大)	149
トピックス	新発見! リンドウは花卉の緑色斑点で光合成する	高橋 重一 (生工研)	157
解説	光合成研究におけるPPR研究の幕開けと今日の隆盛: 日本からの発信	杉田 護 (名古屋大)	166
解説	“NAD World” から見た光合成: 電子受容体NADP ⁺ はどこから来る?	橋田 慎之介 (電中研)	176
表紙の紹介	イネ葉肉細胞における葉緑体の細胞内配置と立体構造に塩ストレスが与える影響	大井 崇生 他 (名古屋大)	188
若手の会特別企画	第11回「海外若手研究者の日本留学レポート!」	キム ウンチュル (基生研)	189
報告記事	「日本光合成学会オンラインミニシンポジウム ～諸刃の剣: 光合成との付き合い方～」開催報告	成川 礼 他 (静岡大)	193
報告記事	「日本光合成学会オンラインミニシンポジウム ～諸刃の剣: 光合成との付き合い方～」に参加して	鶴巻 達大 (東京工業大)	194
報告記事	第21回若手の会セミナー開催報告	清水 隆之 (東京大)	195
報告記事	光合成学会 若手の会 第21回セミナーに参加して	木下 悟 (名古屋大)	196
新刊紹介	『藻類 生命進化と地球環境を支えてきた奇妙な生き物』	村上 明男 (神戸大)	197
事務局からのお知らせ			198
	日本光合成学会会員入会申込書		199
	日本光合成学会会則		200
	「光合成研究」投稿規定		202
	幹事会名簿		203
	編集後記・記事募集		204
	「光合成研究」編集委員・日本光合成学会2020年度役員		205
	賛助法人会員広告		

トピックス

Rubisco30%増強イネと秋田 63 号の栽培実験から見る増収戦略

東北大学大学院農学研究科

牧野 周*

緑の革命と呼ばれた短稈育種の成功は、窒素の多量施肥に依存したソース能強化とシンク拡大によるものであった。しかし、今日の多肥による増収戦略が、環境に与える負荷はきわめて大きい。隔離圃場^ほを利用した栽培実験で、遺伝子組換えによる Rubisco 機能の強化で収量の向上は示されたが、多肥条件に限られていた。大粒化によりシンクが拡大したイネである秋田 63 号ではソースの改善なくして超多収が実証された。しかし、秋田 63 号の多収解析により、さらなる増収を導くためには光合成機能の改善が必須であることが示された。少肥でも十分な光合成能を保持し、同時に大きなシンクを有する革新的なイネの開発が求められる。

1. はじめに

人類は全食糧の約半分量近くをイネとコムギに依存している。イネとコムギの栽培化は、1 万年くらい前と推定されているが、おおよそ 60 年前に、「緑の革命」と呼ばれる短稈育種によって、この二種の作物の飛躍的な増収に成功した。短稈種は耐倒伏性を持つことから、窒素の多量施肥を可能とした。窒素施肥は葉の窒素含量の増加させることによって光合成を向上させ、同時に穂数や籾数をも増やした。ハーバー・ボッシュ技術の普及により、空気中の窒素から安価なアンモニア肥料が生産可能となった背景も見逃せない。窒素の多肥戦略による増収が今日の人類の人口増を支えてきたと言える。しかし、現状の増収戦略では、今後も爆発的に増加し続ける人類の食糧を確保することは難しい。同時に窒素の多量施肥は大きな環境負荷を与えるのみならず、人間の体を構成する窒素はすでに 30%がハーバー・ボッシュ窒素に由来するなど、生物界を循環する窒素の動的平衡も大きく崩れつつある。

そこで、私たちはイネを中心に、ポテンシャルとしての光合成の改善に重点を置き、合わせて可食部であるシンク機能をともに強化させる戦略

で、多量の窒素施肥に依存しない超多収イネの作出をめざす研究を展開した。

2. 光合成の律速要因としての Rubisco

光合成改善の取り組みは数多くの報告がある。一つは光合成の律速要因に関わる遺伝子の改変によるもので、もう一つは、同種間の自然変異をもたらす遺伝要因の活用である。前者で多くの研究者が注目したものは、Rubisco の量的・質的改変、光呼吸のバイパス経路導入、さらには CO₂ 濃縮経路の導入などである。その他、特定のカルビンベンソン回路酵素の量的・質的改変や光応答促進などもある。それらの報告の中には、生産性の向上や増収に結び付いたという報告例はあるが¹⁻³⁾、米国の作物学者 Sinclair ら⁴⁾が指摘するように、作物増産の基盤戦略である窒素利用の観点からの作物学的考察が行われた例はない。一方、後者の遺伝解析によって、いくつかの量的形質遺伝子座の原因遺伝子が同定されているが、必ずしも光合成に直接関連しないものも含まれる場合も報告されている^{5,6)}。表現型評価法等の進歩により、今後、成果が期待される領域である。

*連絡先 E-mail: amanemakino@tohoku.ac.jp

私たちは、いち早く Rubisco に注目した。Rubisco が単一タンパク質として葉身全窒素含量の 20-30%を占めること^{7,8)}、そしてこの Rubisco の量的質的改変を図ることが、窒素含量当たりの光合成能力を向上につながると考えたからである。まず、着葉レベルで測定される最大光合成速度が Rubisco によって律速されることを実証した。光飽和、現在の 대기 CO₂ 分圧下の最大光合成速度は、Rubisco の酵素タンパク質量とキネティクス（酵素的性質）および気孔を含めた葉内部の CO₂ の拡散伝導度によって定量的に説明された⁹⁻¹¹⁾。また、Rubisco の酵素的性質には植物種間差が存在し¹²⁾、その差が最大光合成の種間差を決定している要因であることも明らかにした¹³⁾。しかしながら、イネ栽培種間における葉身窒素含量当たりの Rubisco 量や Rubisco の酵素的性質には変異が認められず、Rubisco は交配育種によるターゲットにはならないこともわかった¹⁴⁾。

3. Rubisco 増強イネで増収、しかし依然多肥限定

私たちは、イネの遺伝子組換え技術がまだ発展途上であった 1990 年代中頃にパーティグルガン法によって、核コード支配である Rubisco の小サブユニット遺伝子 *RBCS* を *RBCS* 自己プロモーター制御で順鎖（センス）と逆鎖（アンチセンス）に導入し、後者に関して Rubisco 量を 60%まで減少させたアンチセンスイネの安定的な作製に成功した¹⁵⁾。Rubisco アンチセンスイネでは、Rubisco が光合成速度の律速要因とならない高 CO₂ 環境下など限られた条件で有利になる局面があることを実証した¹⁵⁻¹⁷⁾。一方、*RBCS* をセンス導入した過剰生産イネに関しては、稔性が悪く世代の維持ができなかったが、その後のアグロ法の導入と親品種との戻し交配によって、安定して 30%ほど過剰生産するイネの作製に成功した¹⁸⁾。Rubisco 過剰生産は、世界初の成功事例であった。しかしながら、過剰生産イネにおいては Rubisco の部分的な不活性化を生じ、Rubisco タンパク質の量的増加分に見合うだけの光合成の促進効果

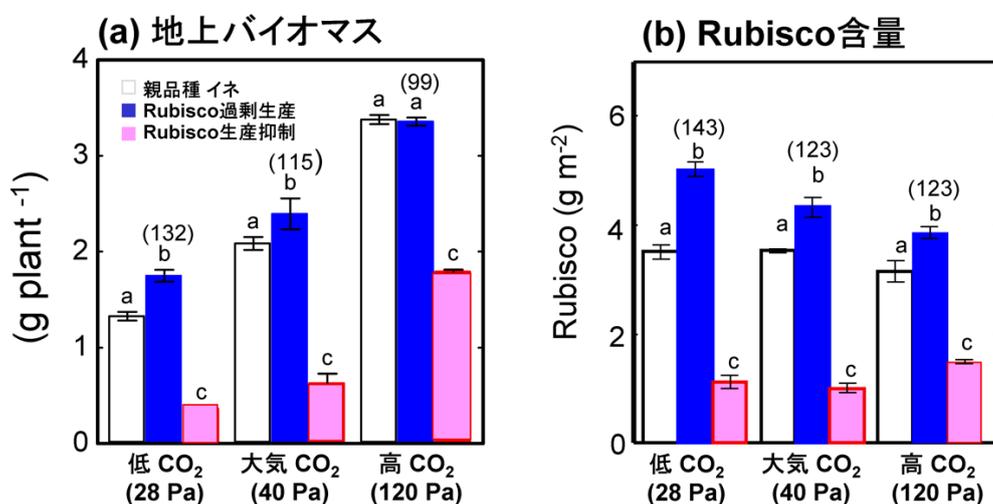


図1. 人工気象室で栽培した親品種イネ、Rubisco過剰生産イネおよびRubisco生産抑制イネの地上部バイオマス量とRubisco含量

(a) 地上部(乾物)生産量と (b) 葉面積あたりのRubisco含量。データは文献23から。イネ親品種イネ「能登ひかり」とRubiscoの形質転換体イネ（「能登ひかり」を用い作出）についてCO₂分圧(濃度)を28 Pa (280 ppm), 40 Pa (400 ppm)および120 Pa (1200 ppm)に制御した人工気象室内で、63日間水耕法により栽培を行った。カッコ内の数値はそれぞれのCO₂分圧区の親品種イネの値を100とした時のRubisco過剰生産イネのバイオマス生産量 (a) とRubisco含量 (b)。異なるアルファベットはTurkey-Kramer's HSDテストによりP<0.05で有意差ありを示す。

はなかった^{19,20)}。同じ現象は近年トウモロコシにおいても報告されている²¹⁾。この点に関しては、私たちは Rubisco の活性化を促進する酵素 Rubisco activase を同時補強することで解決している²²⁾。

一方、その Rubisco 過剰生産組換えイネを高照度グロースチャンバーで 63 日間栽培したところ、バイオマス生産量は高 CO₂ 濃度条件 (1200 ppm = $\mu\text{mol mol}^{-1}$) では組換えイネの親品種 (能登ひかり) に比べ差はなかったが、大気 CO₂ 濃度条件 (400 ppm) では 15%増産となり、低 CO₂ 濃度条件 (280 ppm) では 32%増産となった (図 1a)²³⁾。

Blackman の成長解析を行ったところ、このバイオマス増産には相対成長率の差がみられ、それは葉面積比ではなく純同化率の差によるものであることがわかった。また、Rubisco 過剰生産イネでは生育 CO₂ 濃度の低下に伴い、窒素の吸収量が増加していた。さらに、興味深いことに、組換えイネの Rubisco 過剰生産効果は低 CO₂ 濃度生育で促進され、280 ppm 生育では親品種に比べ組換えイネの Rubisco 量は 43%も増強されていた (図 1b)²³⁾。もともとイネ葉の Rubisco 量は窒素含量の増加に伴い特異的に増加する傾向にあったが²⁴⁻²⁶⁾、Rubisco 過剰生産イネではこの形質が顕著であった。

次に、私たちはこの Rubisco 過剰生産イネに関して、文部科学省と環境省から第 1 種使用規程 (国が定める生物多様性評価試験を行い、遺伝子組換え生物等の環境中への拡散を防止するため



図2. 隔離水田圃場の写真

1枚の水田圃場を縦3つ横3つの9区に区切って使用。左側から縦に3区がそれぞれ施肥窒素量0、10、および17 gN m⁻²区。手前から横に3区がRubisco生産抑制イネ、Rubisco過剰生産イネ、および親品種イネ (能登ひかり) である。施肥による葉色の違い、系統による葉色の違いがわかる (肥料むらではない!!)。Rubisco生産抑制イネでは葉色が濃く、Rubisco過剰生産イネでは葉色が薄い。前者はRubisco量減少分の窒素がクロロフィルに再分配されるため葉色が濃く、後者はRubisco量過剰生産分に窒素が取られるため葉色は薄い。2017年7月27日撮影。全景は本誌30巻2号の表紙。

の措置を執らない開放系で使用する規程)の承認を得て、東北大学附属川渡フィールドセンターの開放系隔離圃場にて収量試験を行った (図 2)²⁷⁾。4年間の繰り返し試験を通して Rubisco 過剰生産イネの玄米収量は、窒素施肥量が 10 gN m⁻² (=kgN/10a) 以上の施肥区で、親品種「能登ひかり」

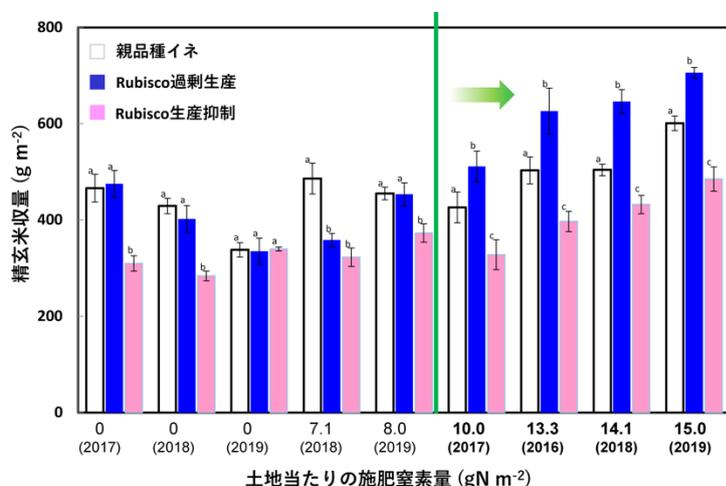


図3. 親品種イネ、Rubisco過剰生産イネおよびRubisco生産抑制イネの隔離圃場栽培での精玄米収量

10 g N m⁻² (=kg N/10a) 以上の窒素施肥区で、Rubisco 過剰生産イネの収量が増加した (図中、矢印より右側)。データは文献 27 から。8 gN m⁻² 以下の窒素施肥区では Rubisco 過剰生産イネの増収効果は認められていない。異なるアルファベットは Turkey-Kramer's HSD テストにより p < 0.05 で有意差ありを示す。カッコ内は栽培年を示す。

に比較して 16-28%増収となった (図 3)。増収の要因は生殖成長期以降の窒素吸収量の増加効果によるところが大きい、その増収効果を窒素吸収量あたりで評価しても、 10 gN m^{-2} 以上では同じ窒素吸収量に対しても有意に増収となっていた (図 4a)。この増収は総バイオマス生産の増産も伴っていた。収量構成要素について解析したところ、一般にイネの登熟歩合は施肥量に応じて低下していくことが知られているが²⁸⁾、Rubisco 過剰生産イネでは高窒素施肥下でも登熟歩合が高く維持されていた (図 4d)。このことは、Rubisco 過剰生産イネではとくに収穫後の光合成が高く維持されたことが推察され、事実、Rubisco 過剰生産イネの止葉の Rubisco 含量は特に高く、実測される光合成速度も親品種を大きく上回っていた²⁷⁾。圃場群落内の CO_2 濃度モニターを行ったところ、Rubisco 過剰生産イネの高窒素施肥区で

は、快晴・無風状態の日には外気 CO_2 濃度が 400 から 410 ppm で推移する中で、止葉基部付近での CO_2 濃度が 340 ppm 程度まで低下していることが認められた (追記：2020 年の栽培では出穂 10 日前に 315 ppm までの低下を記録)。グロースチャンパー実験の結果 (図 1b) から考察すると、圃場での低 CO_2 環境が、高窒素施肥区での Rubisco の過剰生産をさらに促進させたものと考えられる²⁷⁾。「この報告は光合成機能の改善が主要作物の増収に結び付く事実を作物科学的に実証したゲームチェンジャーとなる成果である」との評価を米国イリノイ大学 Stephen Long 教授より頂いた²⁹⁾。しかしながら、一方で図 3 や図 4b に見られるように、低窒素施肥区では Rubisco 過剰生産イネの増収効果は認められなかった。低窒素施肥条件では、Rubisco の過剰生産分に葉内窒

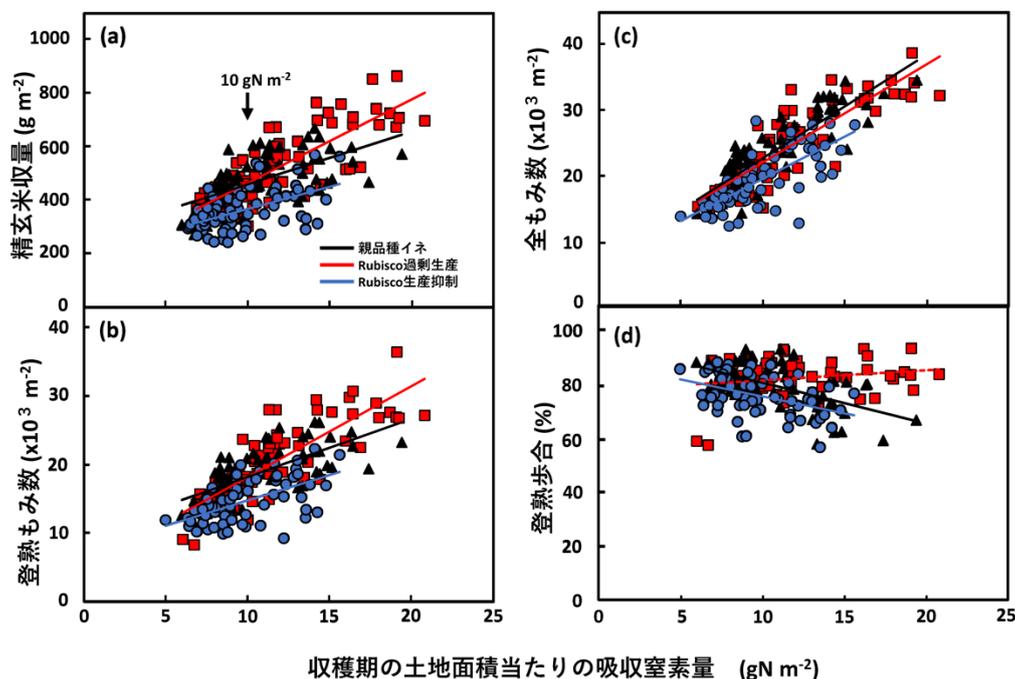


図4. 親品種イネ、Rubisco過剰生産イネおよびRubisco生産抑制イネの隔離圃場栽培での収量、収量構成要素、と吸収窒素量との関係

単位土地面積当たりの (a) 精玄米収量、(b) 登熟したもみ数、(c) 全もみ数、(d) 登熟歩合。データは文献²⁷⁾から。(黒三角) 親品種能登ひかり、(赤四角) Rubisco過剰生産イネ、(青丸) Rubisco生産抑制イネ。Rubisco過剰生産イネの玄米収量は、 10 gN m^{-2} 以上で、同じ吸収窒素量に対して収量が増加した(図中、矢印)。それぞれの回帰直線の傾きとy切片に対してBonferroni法によって有意差検定を行った。(a) と (b) において、赤線と黒線は傾きに $P<0.017$ で有意差あり。青線と黒線のy切片に $P<0.0003$ で有意差あり。

表1. 秋田農業試験場における「秋田 63 号」と「あきたこまち」の収量と収量構成因子(2009 年から 2013 年の平均データ±SE. この期間の日本の平均収量は 546 g m⁻². 文献 33 の Table 1 より抜粋)

施肥窒素	品種	精玄米収量	モミ数	登熟歩合	玄米粒重
kg N/10a		g m ⁻² =kg/10a	×10 ³ m ⁻²	%	mg
13	秋田 63 号	928 ± 31	45.4 ± 2.9	69.0 ± 5.0	30.0 ± 0.4
	あきたこまち	635 ± 25	37.5 ± 2.0	77.8 ± 5.3	22.5 ± 0.3
6	秋田 63 号	780 ± 36	35.7 ± 4.3	74.6 ± 9.0	30.8 ± 0.4
	あきたこまち	554 ± 30	28.8 ± 2.3	85.8 ± 4.7	22.9 ± 0.2
0	秋田 63 号	627 ± 23	23.7 ± 1.3	88.9 ± 1.6	30.4 ± 0.3
	あきたこまち	392 ± 28	19.1 ± 1.0	88.1 ± 2.0	22.8 ± 0.2

素が取られるため窒素不足が助長されるマイナス面があると考えている²⁷⁾。

4. シンク拡大で超多収を実現、さらなる増収には光合成改善が必須

私たちは光合成改善の研究に並行してシンク拡大による増収の試みも行った。一粒重が従来の栽培品種より約 40%大きい「秋田 63 号」(2004 年品種登録)を材料に収量解析を行った。秋田 63 号は、粒重が従来種より 80%大きい大粒品種オオチカラを母親に秋田農業試験場(秋田農試)の眞崎らによって育種された品種である。オオチカラは 1980 年代北陸農業試験場(現:中央農業研究センター北陸研究拠点)で育種(1989 年品種登録)されたが、多収には結びつかず、イネの大粒化による増収の試みは失敗であったと結論されていた。1999 年より秋田農試との共同研究を開始し、「秋田 63 号」は 3 区坪刈(3.3 m²) 精玄米最高平均収量で、983 ± 66 g m⁻²(=kg/10a) を記録した³⁰⁾。大粒育種による超多収は、イネでは世界初の事例となった。秋田 63 号の多収は、乾物生産に依存するものではなく、もっぱら収穫指数の増加であった³⁰⁾。このことは、900 kg/10a レベルの超多収は光合成機能の改善なしに、シンク拡大のみで実現できることを意味している。しかしながら、一方で秋田 63 号にはどうしても 1000 kg/10a を越えられない壁があった。収量ポテンシャル(もみ数×玄米粒重)としては楽に 1000 kg を超えてくるが、多肥にするとどうしても登熟歩合(稔実割合)

が大きく下がり、1000 kg 手前で頭打ちとなった(例えば、表 1 参照)。当初は登熟性の劣る 2 次枝梗粒が多い可能性、あるいは大粒ゆえのデンプン集積の限界などを疑った。しかし、データを改めて検証し直したところ、吸収窒素量に対してもみ数(シンクポテンシャル)は直線的に増加していくのに、収穫時の総バイオマス生産量は飽和型の曲線応答となっていることがわかった(図 5a と 5b 参照)³¹⁾。多収を狙った高窒素施肥で登熟歩合が下がる現象は、実は古くから問題視されていて、出穂 1 か月前に一旦窒素肥料を切るという松島の V 字理論稲作につながっている²⁸⁾(図 4b においても施肥に伴う登熟歩合低下が確認できるが、Rubisco 増強イネでは維持されている)。この現象はシンク拡大による育種戦略が、相対的にソース不足を生じさせた結果と考察した(高窒素施肥による過繁茂が圃場内の CO₂ 濃度低下や受光不足を促進させ、結果として登熟歩合の低下を招く)。

そこで、ソース不足の仮説を実証する目的で、秋田 63 号を開放系高 CO₂ 濃度(FACE = Free Air CO₂ Enrichment)実験に供した³²⁾。予想通り高 CO₂ 環境条件下では、秋田 63 号の増収効果は、他の従来栽培種(あきたこまち)より大きいことがわかった。あきたこまちでは 7-17%に留まる増収効果が、秋田 63 号では 20-23%の増収であった。高 CO₂ 環境は光合成を促進し、ソース能を高める効果があるので、シンクが十分に大きい秋田 63 号では、光合成を高めるとさらなる増収につながる

ことが実証された。この圃場実験（施肥：6 kgN/10a）では、対照区では秋田 63 号が 695 kg/10a で、あきたこまち 570 kg/10a に対して、20%程度の増収であったが、FACE 区では秋田 63 号が 845 kg/10a で、あきたこまち 635 kg/10a に対して、33%の増収となっていた（2 年間平均精玄米収量）³²。このように、今後のイネの増収戦略として、イネのポテンシャルとしての光合成改善とシンク拡大をセットで実現させることが、いかに重要な戦略であるかを物語っている。

大粒化で超多収が実現できるとなると、秋田 63 号より粒重が大きい母親オオチカラはなぜ多収にならなかったのであろうか。私たちは 2009 年から 2013 年にかけて、秋田農試で母方オオチカラと父方秋田 39 号を対象に比較収量解析を

行った³³。結果は、吸収窒素量との相関解析によると明解で、オオチカラには大粒ではある一方、粒数減の形質があり、秋田 63 号はそのトレードオフを完全に解消する育種に成功していたというものであった（図 5）。何より驚くべき事実は、この比較解析を行った 4 年間の多肥区（13 kgN/10a）の平均収量は 928 kg/10a であった（表 1）。日本国中のどこの農業試験場の記録を調べても、単発年として 1000 kg/10a を超える収量記録はあっても、数年間に及ぶ平均収量で 900 kg を超えるような記録はない。多収研究に関わったことのある研究者なら、誰もが驚く数値である。このことは、今回の解析が多収限界ギリギリの解析であることを証明している。秋田 63 号の解析により得られた結論は、大粒に関係なくシンク拡大

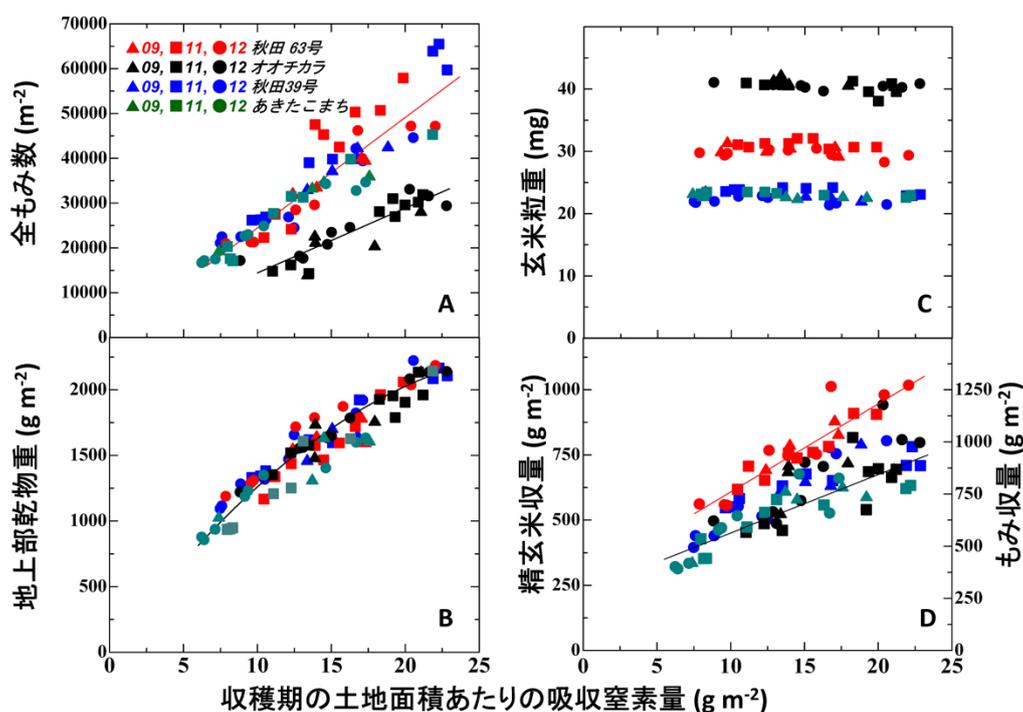


図5. 秋田63号と関連品種の全もみ数、地上部乾物重、玄米粒重、収量、と吸収窒素量との関係
 単位土地面積当たりの (a) 全もみ数、(b) 地上部乾物重、(c) 玄米一粒重、(d) 収量。データは文献33から。(赤) 秋田63号、(黒) オオチカラ (秋田63号母系)、(青) 秋田39号 (秋田63号父系)、(緑) あきたこまち。三角は2009年、四角は2011年、丸は2012年の秋田農業試験場大潟村分場での栽培。施肥窒素量は0、6、および13 gN m⁻²。それぞれの回帰直線の傾きとy切片に対してBonferroni法によって有意差検定を行った。
 (a) の赤線は $Y = 2460X, r = 0.917, P < 0.001$ 、黒線は $Y = 1420X, r = 0.898, P < 0.001$ 。オオチカラは、秋田63号とあきたこまちに対してy切片で $P < 0.00017$ で、秋田39号に対して傾きで $P < 0.00017$ でそれぞれ有意差あり。(b) 黒線は 2次回帰線 $Y = -2.31X^2 + 146X, r = 0.947$ で、1次回帰解析では $Y = 106.7X, r = 0.858$ となる (非表示)。
 (d) 赤線は $Y = 34.5X + 265, r = 0.929, P < 0.001$ 、黒線は $Y = 24.0X + 238, r = 0.830, P < 0.001$ 。秋田63号は、他の3品種に対してy切片で $P < 0.00017$ でそれぞれに有意差あり。

戦略のみでイネの増収はまだ可能であること、しかし同時に、光合成能の向上を伴わない超多収の限界が明確になったことである。イネの光合成の研究を続けてきた私にとっては大変意味ある結論であった³³⁾。

5. おわりに

二つの圃場試験を通じて、実験室レベルの研究では見出せないイネ増収の方向性が明確となった。Rubisco 機能を強化でソース能改善は可能であるが、多肥条件に限られていた。シンク拡大のみでイネの増収は可能であるが、シンク拡大による超多収を引き出すためには光合成の機能改善は必須となることがわかった。現在、秋田 63 号の大粒形質遺伝子を導入した Rubisco 過剰生産イネの作出を終え、第 1 種使用規程申請を進めている。少肥でも十分な Rubisco 機能を保持し、同時に大きなシンクを有する革新的なイネの開発をめざしたい。

謝辞

Rubisco 過剰生産イネの第 1 種使用申請から隔離圃場の再整備と管理、行政対応に関して、石山敬貴氏（東北大）に中心になって行って頂いた。秋田 63 号は眞崎聡氏ら（秋田農試）によって育種されたもので、同氏から品種登録以前に共同研究の提案を頂き、金田吉弘氏（秋田県立大）の多大なる協力のもと多収解析を進めた。また、本研究を通して、全面協力頂いた前忠彦東北大名誉教授と鈴木雄二氏（岩手大）に感謝申し上げる。なお、本研究をまとめるにあたり、科学研究費基盤研究(S) JSPS JP16H06379 の助成を頂いた。

Received Oct 24, 2020; Accepted Nov 18, 2020; Published Dec 31, 2020.

参考文献

1. Köhler, I.H., Ruiz-Vera, U.M., VanLoocke, A., Thomey, M.L., Clemente, T., Long, S.P., Ort, D.R. and Bernacchi, C.J. (2016) Expression of cyanobacterial FBP/SBPase in soybean prevents yield depression

under future climate conditions. *J. Exp. Bot.* 68, 715–726.

2. Lopez-Calcagno, P.E., Fisk, F., Brown, K.L., Bull, S.E., South, P.F. and Raines, C.A. (2019) Overexpressing the H-protein of the glycine cleavage system increases biomass yield in the glasshouse and field grown transgenic tobacco plants. *Plant Biotech. J.* 17, 141–151.

3. South, P.F., Cavanagh, A.P., Liu, H.W. and Ort, D.R. (2019) Synthetic glycolate metabolism pathways stimulate crop growth and productivity in the field. *Science* 363, eaat9077.

4. Sinclair, T.R., Rufty, T.W. and Lewis, R.S. (2019) Increasing photosynthesis: Unlikely solution for world food problem. *Trends in Plant Sci.* 24, 1032–1039.

5. Takai, T., Adachi, S., Taguchi-Shiobara, F., Sanoh-Arai, Y., Iwasawa, N., Yoshinaga, S., Hirose, S., Taniguchi, Y., Yamanouchi, U., Wu, J., Matsumoto, T., Sugimoto, K., Kondo, K., Ikka, T., Ando, T., Kono, I., Ito, S., Shomura, A., Ookawa, T., Hirasawa, T., Yano, M., Kondo, M. and Yamamoto, T. (2013) A natural variant of NAL1, selected in high-yield rice breeding programs, pleiotropically increases photosynthesis rate. *Sci. Rep.* 3, 2149.

6. Adachi, S., Yoshikawa, K., Yamanouchi, U., Tanabata, T., Sun, J., Ookawa, T., Yamamoto, T., Sage, R.F., Hirasawa, T. and Yonemaru, J. (2017) Fine mapping of carbon assimilation rate 8, a quantitative trait locus for flag leaf nitrogen content, stomatal conductance and photosynthesis in rice. *Front. Plant Sci.* 8, 60.

7. Makino, A., Mae, T. and Ohira, K. (1984) Relation between nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in rice leaves from emergence through senescence. *Plant Cell Physiol.* 25, 429–437.

8. Evans, J.R. and Seemann, J.R. (1984) Differences between wheat genotypes in specific activity of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase and the relationship to photosynthesis. *Plant Physiol.* 74, 759–765.

9. Makino, A., Mae, T. and Ohira, K. (1983) Photosynthesis and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in rice leaves. Changes in photosynthesis and enzymes involved in carbon assimilation from leaf development through senescence. *Plant Physiol.* 73, 1002–1007.

10. Makino, A., Mae, T. and Ohira, K. (1985) Photosynthesis and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in rice leaves from emergence through senescence. Quantitative analysis by carboxylation/oxygenation and regeneration of ribulose 1,5-bisphosphate. *Planta* 166, 414–420.

11. Evans, J.R. (1986) The relationship between carbon-dioxide-limited photosynthetic rate and ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase content in two nuclear-cytoplasm substitution lines of wheat, and the coordination of ribulose-bisphosphate-carboxylation and electron-transport capacities. *Planta* 167, 351–358.
12. Makino, A., Mae, T. and Ohira, K. (1985) Enzymic properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase purified from rice leaves, *Plant Physiol.* 79, 57–61.
13. Makino, A., Mae, T. and Ohira, K. (1988) Differences between wheat and rice in the enzymic properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the relationship to photosynthetic gas exchange. *Planta* 174, 30–38.
14. Makino, A., Mae, T. and Ohira, K. (1987) Variations in the contents and kinetic properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylases among rice species, *Plant Cell Physiol.* 28, 799–804.
15. Makino, A., Shimada, T., Takumi, S., Kaneko, K., Matsuoka, M., Shimamoto, K., Nakano, H., Miyao-Tokutomi, M., Mae, T. and Yamamoto, N. (1997) Does decrease in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by antisense *rbcS* lead to a higher N-use efficiency of photosynthesis under saturating CO₂ and light in rice plants? *Plant Physiol.* 114, 483–491.
16. Makino, A., Harada, M., Kaneko, K., Mae, T., Shimada, T. and Yamamoto, N. (2000) Whole-plant growth in transgenic rice plants with decreased content of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase under different CO₂ partial pressures. *Aust. J. Plant Physiol.* 27, 1–12.
17. Makino, A., Nakano, H., Mae, T., Shimada, T. and Yamamoto, N. (2000) Photosynthesis, plant growth and N allocation in transgenic rice plants with decreased Rubisco under CO₂ enrichment. *J. Exp. Bot.* 51, 383–389.
18. Suzuki, Y., Ohkubo, M., Hatakeyama, H., Ohashi K, Yoshizawa, R., Kojima, S., Hayakawa, T., Yamaya, T., Mae, T. and Makino, A. (2007) Increased Rubisco content in transgenic rice transformed with “sense” *rbcS* gene. *Plant Cell Physiol.* 48, 626–637.
19. Makino, A. and Sage, R.F. (2007) Temperature response of photosynthesis in transgenic rice transformed with “sense” or “anti-sense” *rbcS*. *Plant Cell Physiol.* 48, 1472–1483.
20. Suzuki, Y., Miyamoto, T., Yoshizawa, R., Mae, T. and Makino, A. (2009) Rubisco content and photosynthesis at different positions in transgenic rice with an overexpression of *RBCS*. *Plant Cell Environ.* 32, 417–427.
21. Salesse-Smith, C.E., Sharwood, R.E., Busch, F.A., Kromdijk, J., Bardal, V. and Stern, D.B. (2018) Overexpression of Rubisco subunits with RAF1 increases Rubisco content in maize. *Nat. Plants* 4, 802–810.
22. Suganami, M., Suzuki, Y., Tazoe, Y., Yamori, W. and Makino, A (2020) Co-overproducing Rubisco and Rubisco activase enhances photosynthesis in the optimal temperature range in rice. *Plant Physiol.* in press. doi:10.1093/plphys/kiia026
23. Sudo, E., Suzuki, Y. and Makino, A. (2014) Whole-plant growth and N utilization in transgenic rice plants with increased or decreased Rubisco content under different CO₂ partial pressures. *Plant Cell Physiol.* 55, 1905–1911.
24. Makino, A. and Osmond, B. (1991) Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. *Plant Physiol.* 96, 355–362.
25. Makino, A., Sakashita, H., Hidema, J., Mae, T., Ojima, K. and Osmond, B. (1992) Distinctive responses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and carbonic anhydrase in wheat leaves to nitrogen nutrition and their possible relationships to CO₂ transfer resistance. *Plant Physiol.* 100, 1737–1743.
26. Makino, A., Nakano, H. and Mae, T. (1994) Responses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, cytochrome *f*₂ and sucrose synthesis enzymes in rice leaves to leaf nitrogen and their relationships to photosynthesis. *Plant Physiol.* 105, 173–179.
27. Yoon, D-K., Ishiyama, K., Suganami, M., Tazoe, Y., Watanabe, M., Imaruoka, S., Ogura, M., Ishida, H., Suzuki, Y., Obara, M., Mae, T. and Makino, A. (2020) Transgenic rice overproducing Rubisco exhibits increased yields with improved nitrogen use efficiency in an experimental paddy field. *Nat. Food* 1, 134–139.
28. Matsushima, S (1993) Researches on the requirements for achieving high yields in rice, in *Science of the Rice Plant, Vol. 2. Physiology* (Matsuo, T., Kumazawa, K., Ishii, R., Ishihara, K., Hirata, H. Eds) pp 737–747, Nobunkyo, Tokyo, Japan.
29. Long, S.P. (2020) Photosynthesis engineered to increase rice yield. *Nat. Food* 1, 105.
30. Mae, T., Inaba, A., Kaneta, Y., Masaki, S., Sasaki, M., Aizawa, M., Ohkawa, S., Hasegawa, S. and Makino, A. (2006) A large-grain rice cultivar, Akita-63,

- exhibits high yield with high physiological N use-efficiency. *Field Crops Res.* 97, 227–237.
31. Makino, A. (2011) Photosynthesis, grain yield and N utilization in rice and wheat. *Plant Physiol.* 155, 125–129.
32. Hasegawa, T., Sakai, H., Tokida, T., Nakamura, H., Zhu, C., Usui, Y., Yoshimoto, M., Fukuoka, M., Wakatsuki, H., Katayanagi, N., Matsunami, T., Kaneta, Y., Sato, T., Takaka, F., Sameshima, R., Okada, M., Mae, T. and Makino, A. (2013) Rice cultivar responses to elevated CO₂ at two free-air CO₂ enrichment (FACE) sites in Japan. *Func. Plant Biol.* 40, 148–159.
33. Makino, A., Kaneta, Y., Obara, M., Ishiyama, K., Kanno, K., Kondo, E., Suzuki, Y. and Mae, T. (2020). High yielding ability of a large-grain rice cultivar, Akita 63. *Sci. Rep.* 10, 12231.

Strategies for increasing rice yield. Field experiments with Rubisco-overproduced rice and large-grain rice cultivar Akita63

Amane Makino

Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

トピックス

有害赤潮形成藻シャットネラ属における細胞外スーパーオキシド産生と光合成の関係[‡]¹ 埼玉大学大学院理工学研究科生命科学コース² 国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所湯浅光貴^{1,*}、紫加田知幸²、西山佳孝¹

ヒトから微細藻類を含む多くの真核生物は、細胞外へスーパーオキシド (O_2^-) を産生する NADPH oxidase (NOX) を有しており、NOX は免疫機構や病疫応答の一つとして機能する。動物や陸上植物では、NOX の O_2^- 産生機序や生理的役割が詳細に研究されているが、真核藻類ではその研究例は極めて少ない。著者らは、 O_2^- 産生レベルが極めて高い赤潮形成ラフィド藻 *Chattonella* 属を使用して、赤潮形成時の環境適応における O_2^- 産生の生理的役割について研究を進めてきた。本稿では、細胞外 O_2^- 産生と光合成の関係について最新の知見を紹介する。

1. はじめに

ラフィド藻 *Chattonella* 属 (シャットネラ) は、世界中の沿岸域で赤潮を形成し、魚を死滅させる有害な微細藻類である (図 1)。シャットネラによる赤潮 (以降、シャットネラ赤潮) は高い魚毒性を有しており、水産養殖業に深刻な被害を及ぼしている¹⁾。被害軽減策を開発するための基盤として、シャットネラ赤潮の形成・衰退メカニズムや赤潮による魚類斃死機構を解明することが強く求められている。

シャットネラ赤潮の形成・衰退にはさまざまな環境要因が影響することが知られており、特に光と栄養塩はシャットネラの増殖に大きく影響する。実際に、シャットネラ赤潮は強光下で急速に発達することが報告されている²⁾。海水表層の強光環境は光合成の光阻害を引き起こし、増殖に悪影響を及ぼす可能性があるにもかかわらず³⁻⁵⁾、シャットネラは日中、光合成によって太陽光からエネルギーを獲得するために遊泳を行い、表層に集積する⁶⁾。したがって、シャットネラは他の微細藻類と比較して光合成の強光耐性が高いと考えられる。また、シャットネラ赤潮は沿岸域への

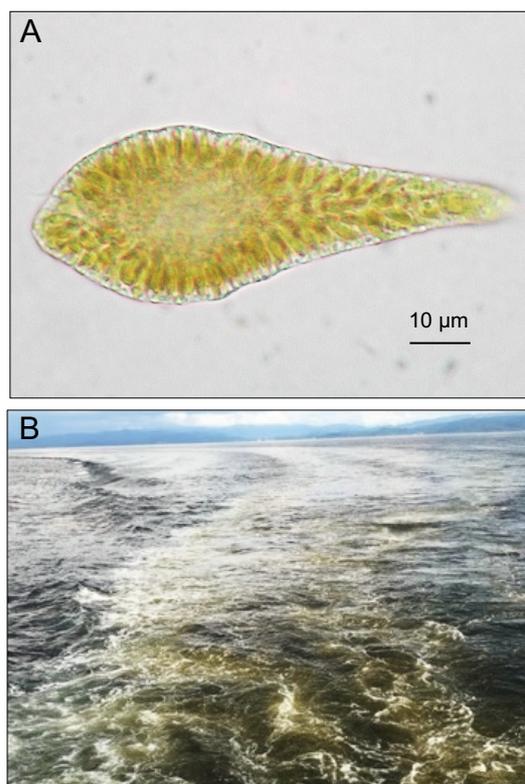


図1. (A) 有害赤潮ラフィド藻 *Chattonella antiqua* と (B) 八代海で発生した *C. antiqua* の赤潮

[‡]第 10 回日本光合成学会年会 ポスター発表受賞論文

*連絡先 E-mail: k.yuasa.608@ms.saitama-u.ac.jp

窒素やリン等の流入直後に発達する傾向があり、栄養塩濃度もシャットネラ赤潮の形成に大きな影響を与える要因と考えられている⁷⁾。さらに、貧栄養環境はシャットネラの休眠細胞の形成や細胞の死滅を誘導することが知られている。これまでにシャットネラの栄養塩取り込み特性に関する研究が数多く行われ、栄養塩の取り込みや代謝に関連する遺伝子も特定されてきた⁸⁾。しかし、栄養環境の変化に対する細胞内の代謝の変化や生理応答はほとんど不明である。

シャットネラは活性酸素の一種であるスーパーオキシド (O_2^-) を細胞外へ大量に産生することが知られており、 O_2^- はシャットネラの魚毒性に関わる因子として注目されている⁹⁾。 O_2^- はシャットネラの細胞表面に局在する NADPH oxidase (NOX) が細胞内の還元力である NADPH を利用して産生されると考えられている。著者らは、光合成電子伝達が NADPH の主要な産生場所であることに着目して、一見独立した生理機能と思われる細胞外 O_2^- 産生と光合成の関係性について研究を進めた。本稿では、シャットネラの環境適応における光合成と O_2^- 産生の役割について最新の研究成果を紹介する。

2. 細胞外 O_2^- 産生

NOX の生理学および生化学的特性は動物や植物でよく研究されている。動物において、NOX は血液中の好中球やマクロファージに多く発現しており、NOX による O_2^- 産生は免疫系やシグナル伝達機構で機能する。植物では、NOX のホモログである Respiratory burst oxidase homolog (RBOH) が存在し、植物の病害応答やシグナル伝達による生理活性の調節に働く。一方、過剰な O_2^- は自らの細胞にとって有害であるため、NOX 活性は活性化因子によるタンパク質相互作用やリン酸化シグナル、NADPH/NADP⁺ バランスなどによって厳密に制御されている¹⁰⁻¹²⁾。藻類では、緑藻やラフィド藻、珪藻などの微細藻類や褐藻などの大型藻類でも NOX に関する報告がある¹³⁻¹⁵⁾。緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* では RBOH が存在し、光照射で微弱な O_2^- 産生が誘導されることが示唆されている¹³⁾。ラフィド藻の O_2^- 産生活性

は極めて高く、珪藻の 1,000 倍にも達する¹²⁾。近年、シャットネラの RNA-seq 解析から、シャットネラのゲノム中に NOX と推定される酵素をコードする遺伝子が複数存在することが明らかとなった⁸⁾。さらに、シャットネラにおけるウエスタンブロット解析では、ヒト好中球の NOX である cytochrome *b558* に特異的な抗体と反応するタンパク質がシャットネラに存在することが示されている¹⁶⁾。また、シャットネラの O_2^- 産生は対数増殖期に上昇し、定常期に入ると減少することが報告されている¹⁷⁾。さらに、 O_2^- 産生と並行して、魚毒性や光化学系 II (PSII) 活性も対数増殖期に増加し、定常期に減少することが示されている^{18,19)}。しかし、動物や植物と比較すると藻類における NOX の活性化機構は未解明な点が多い。

3. 細胞外 O_2^- 産生と光合成の関係

これまでの研究から、シャットネラの O_2^- 産生は明期に上昇し、暗期に低下することが報告されている²⁰⁾。しかし、暗期にはシャットネラの細胞分裂が生じるなど副次的な影響も考えられるため、 O_2^- 産生に対する光環境の影響は不明瞭であった。そこで著者らは、シャットネラの細胞外への O_2^- 産生に対する光の影響を詳細に調べるために、 $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 12 h 明期/12 h 暗期の条件で前培養したシャットネラを、様々な光強度下で培養し、 O_2^- 産生レベルの変化を化学発光法によりモニターした。その結果、 O_2^- レベルは強光下 ($400\sim 1,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で上昇し、弱光下 ($0\sim 10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で低下することを見出した²¹⁾。この時、光合成パラメーターをクロロフィル蛍光測定器 (Water-PAM, waltz 社) で測定し、 O_2^- レベルとの相関を解析した。その結果、PSII の最大量子収率 (F_v/F_m) と PSII の実効量子収率 (Φ_{II}) は、 O_2^- レベルの推移と相関しなかったが、光化学的消光 (qP) は光強度の増大に伴って上昇しており、 O_2^- レベルと高い正の相関があった (図 2)。qP は、PSII のキノン受容体である Q_A のレドックス状態を表し、PSII より下流の電子伝達速度が低下して Q_A が還元状態になると値が低下するパラメーターである。この結果

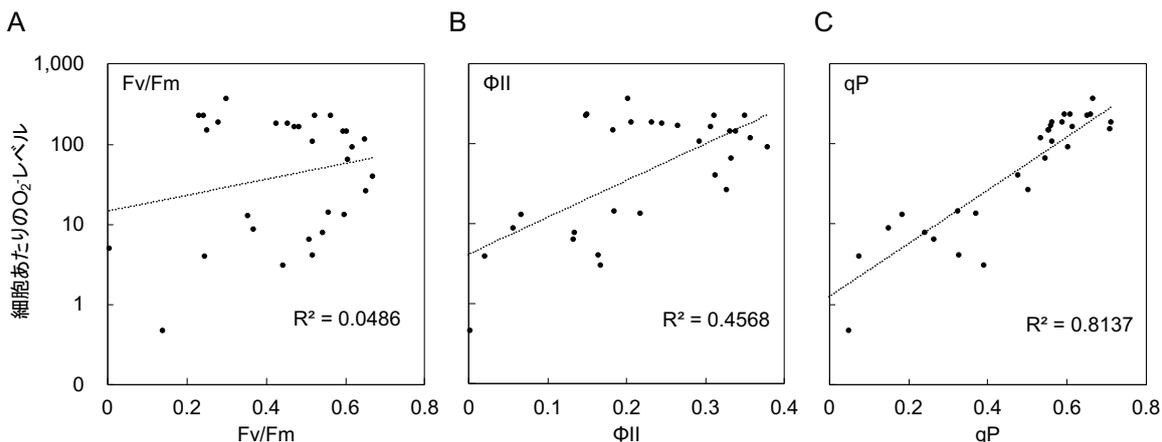


図2. 様々な強度の光で培養した時の生育とO₂⁻レベル

シャットネラを0, 10, 50, 100, 400, 1000 μmol photons m⁻² s⁻¹の光強度で培養した時の (A) Fv/Fm, (B) ΦII, (C) qPの値とO₂⁻レベルの相関関係を比較した。O₂⁻レベルは化学発光検出による半定量的な値を示しており、対数目盛で表示されている。Yuasa et al.²¹⁾を改変。

から、PSII より下流の電子伝達速度が O₂⁻産生に関連することが示唆された。

次に、光合成電子伝達を DCMU によって停止させた時の O₂⁻レベルを解析した。過去にもシャットネラの O₂⁻レベルは DCMU 存在下で有意に低下することが報告されているが²²⁾、DCMU を溶解させるために有機溶媒が用いられているにもかかわらず、O₂⁻産生に対する有機溶媒の影響は確認されていなかった。著者らは、O₂⁻産生は低濃度の有機溶媒によっても影響を受け、

0.1% (v/v) DMSO や 0.1% (v/v) エタノールの存在下でも低下することを見出した。しかし、0.1% (v/v) DMSO に 10 μM の DCMU を溶解させると、O₂⁻産生は DMSO 単独で添加した場合よりも大きく低下することを明らかにした (図 3A)。したがって、細胞外の O₂⁻産生には光合成電子伝達が必要であることがわかった。NOX は NADPH を基質とするため、光合成電子伝達から生成される NADPH が O₂⁻産生に使われていることが示唆される。一方、カルビンベンソン回路は NADPH を

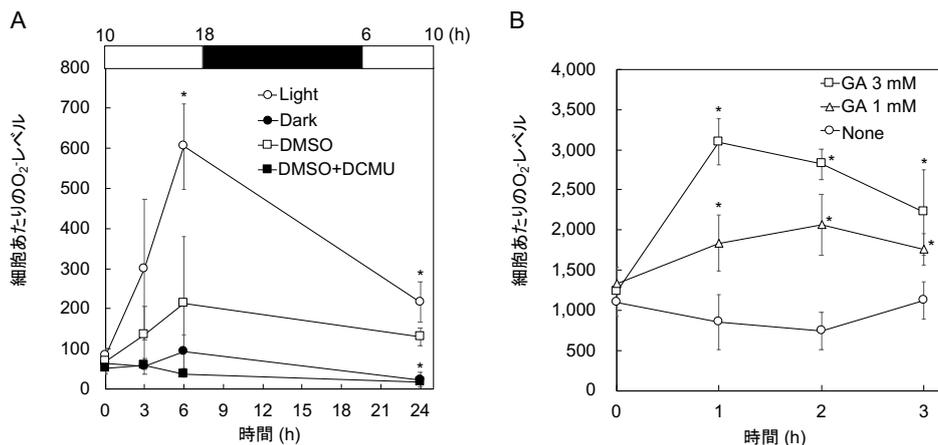


図3. O₂⁻産生に及ぼす光合成阻害剤の影響

(A) DCMU存在下でのO₂⁻レベルの変化。同時にDMSO非存在下で明暗条件もしくは暗条件で培養した培養株の測定も行った。統計的な有意差はLightとDark間およびDMSOとDMSO+DCMU間で比較した。(B) GA存在下でのO₂⁻レベルの変化。エラーバーは標準偏差を表し、アスタリスクは統計的な有意差を示している (P<0.05; Student t検定)。Yuasa et al.²¹⁾を改変。

消費する。そこで、グリコールアルデヒド (GA) を用いてカルビンベンソン回路を阻害した際の O_2 -産生への影響を調べた。その結果、 O_2 -レベルは GA 存在下で1時間以内に急激に上昇した (図 3B)。したがって、カルビンベンソン回路での NADPH の消費によっても O_2 -産生が制御されることが示唆された。 O_2 -産生による NADPH の消費は光合成の余剰な還元力を細胞外へ排出する役割があることが推測される。

さらに、著者らの研究から、天然から単離されたシャットネラの O_2 -産生能が極めて低い株に GA を投与すると細胞内の NADP⁺が減少し、強光下で光合成活性が著しく低下することがわかった (Yuasa et al. 投稿準備中)。これらの結果から、シャットネラにおける O_2 -産生が NADPH を NADP⁺へと再生することによって強光による光合成電子伝達の過還元状態を緩和していることが示唆される。すなわち、細胞外に O_2 -を産生することによって光合成の強光耐性を高めていることが推察される。これはシャットネラが強光下で赤潮を形成するための生存戦略であると考えられる。

4. O_2 -産生に及ぼす栄養欠乏の影響

赤潮が発生する沿岸域では、窒素 (N) やリン (P) の濃度が植物プランクトンの増殖を制限す

る場合が多い。同様に、シャットネラを N 欠乏培地または P 欠乏培地で培養すると、増殖が停止し、光合成活性が著しく低下する¹⁸⁾。また、著者らは、N 欠乏あるいは P 欠乏によってシャットネラの O_2 -産生が促進されることを見出した。さらに、栄養欠乏による O_2 -産生の促進は、明暗培養下の暗期に生じ、DCMU の影響も受けないという興味深い結果が得られた (図 4)²³⁾。これらのことは、栄養欠乏条件で光合成機能が低下する一方、他の代謝経路によって O_2 -産生が誘導されていることを示唆している。動物では、酸化的ペントースリン酸 (OPP) 回路で生成される NADPH が還元力として利用され、NOX により O_2 -が産生される²⁴⁾。また、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 では栄養欠乏条件で炭素代謝を維持するために OPP 経路が活性化される^{25,26)}。さらに、*Synechocystis* sp. PCC 6803 では、OPP 経路が暗期に活性化され、細胞内の NADPH 量が増大する²⁷⁾。以上の知見を考慮すると、シャットネラでは栄養欠乏条件で暗期に O_2 -産生レベルが上昇したことから、OPP 経路が暗期に駆動したためであると推測される。したがって、シャットネラでは、栄養欠乏条件で光合成活性が低下しても、OPP 経路によって NADPH/NADP⁺比が上昇することによって O_2 -産生が活性化されることが考えられる。実際に、シャットネラにおいても、N 欠乏および P

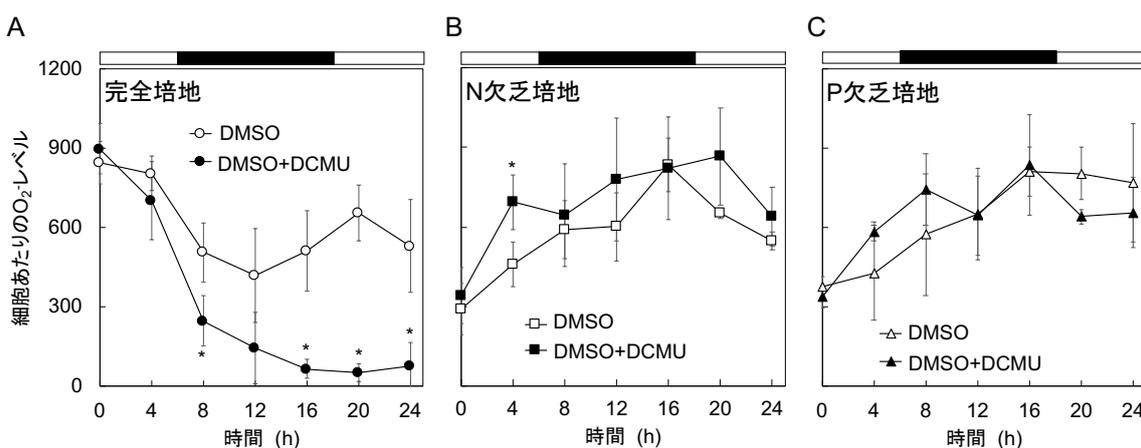


図4. DCMU存在下での O_2 -産生の経時変化

(A) 完全培地、(B) N欠乏培地、(C) P欠乏培地において、2日間培養した細胞に10 μ M DCMUもしくは0.1%DMSO (v/v) を添加したときの O_2 -レベルを測定した。エラーバーは標準偏差を表し、アスタリスクは統計的な有意差を示している ($P < 0.05$; Student t検定)。Yuasa et al.²³⁾を改変。

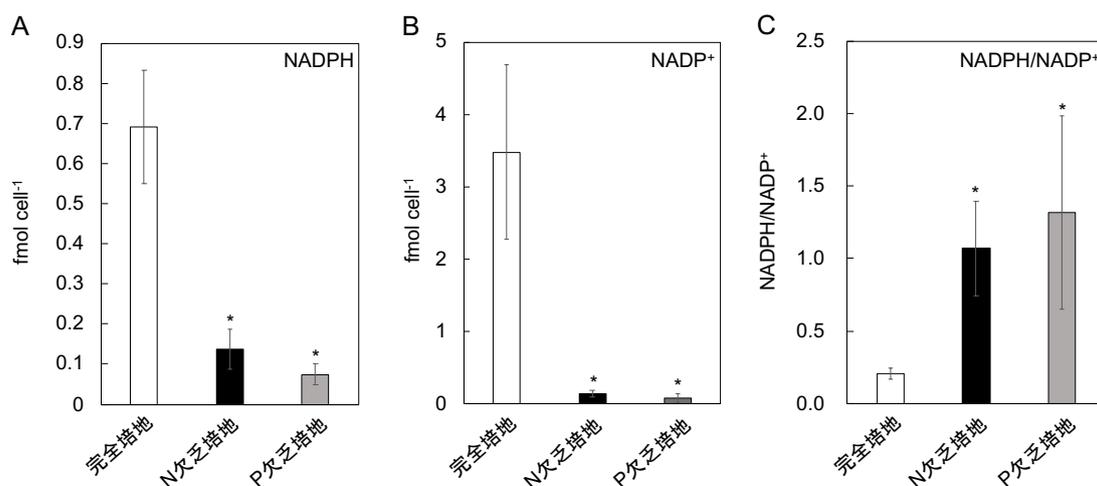


図5. 細胞内NADPHおよびNADP⁺の存在量に対する栄養欠乏の影響

異なる栄養条件の培地で2日間培養した細胞の (A) NADPHおよび (B) NADP⁺をサイクリングアッセイで定量した。(C) NADPHとNADP⁺の定量値から計算したNADPH/NADP⁺比。エラーバーは標準偏差を表し、アスタリスクは統計的な有意差を示している (P < 0.05; Student t検定)。Yuasa et al.²³⁾を改変。

欠乏条件で NADP⁺と NADPH の双方が大幅に減少したが、NADPH/NADP⁺比は上昇した (図 5)。動物では、OPP 経路で NADPH の生成に関与する Glucose-6-phosphate dehydrogenase の活性化により、NADPH/NADP⁺比が上昇し、NOX が活性化されることが示されている^{24,28)}。したがって、シャットネラの NOX の活性が NADPH/NADP⁺比に依存しており、栄養欠乏による O₂⁻産生の促進は細胞内のレドックスバランスを調節する役割があることが示唆された。赤潮は栄養環境の変動が激しい沿岸海域で形成されるため、O₂⁻産生によるレドックスバランスの調節は貧栄養環境への適応に重要であることが推測される。

5. O₂⁻産生の生態学的役割

光合成の光阻害は植物プランクトンの生存にとって脅威である。しかしながら、シャットネラの赤潮は晴天が継続した期間に発達する傾向があり²⁹⁾、日中細胞は海面に集積するため、強光 (晴天時 1,000~2,000 μmol photons m⁻² s⁻¹) に曝されるが⁶⁾、シャットネラは高い強光耐性によって、そのリスクを和らげている。本研究が示した O₂⁻産生による強光耐性の獲得は強光環境でも赤潮を形成するための生存戦略であることが考えられる。

また、シャットネラは栄養欠乏環境では増殖能力が著しく低下する³⁰⁾。さらに、海水中には微細藻類を死滅させる殺藻細菌が存在しており、殺藻細菌の大量発生がシャットネラの赤潮を衰退に導くという仮説もある³¹⁾。一方、シャットネラにより産生される活性酸素は殺菌効果を有するため、貧栄養環境における O₂⁻産生の促進は殺藻細菌からの防御戦略の一つとして捉えることができる。したがって、シャットネラの細胞外への O₂⁻産生は、熾烈な種間競争に打ち勝つための高度な生存戦略として備わった機能であると考えられる。

6. 今後の展望

近年、シャットネラの O₂⁻産生が強光や栄養欠乏によって促進され、悪環境への適応に重要な役割を持ち、シャットネラの魚毒性や赤潮の形成メカニズムを明らかにする上で極めて重要であることが分かってきた (図 6)。しかしながら、実環境中では、様々な環境条件が赤潮プランクトンへ複合的な影響を及ぼす。そのため、O₂⁻産生の役割を正確に理解するためには、分子レベルで O₂⁻産生の制御機構を解明する必要がある。近年、シャットネラを用いた RNA-seq 解析が行われ⁸⁾、シャットネラの分子生物学的な情報が蓄積して

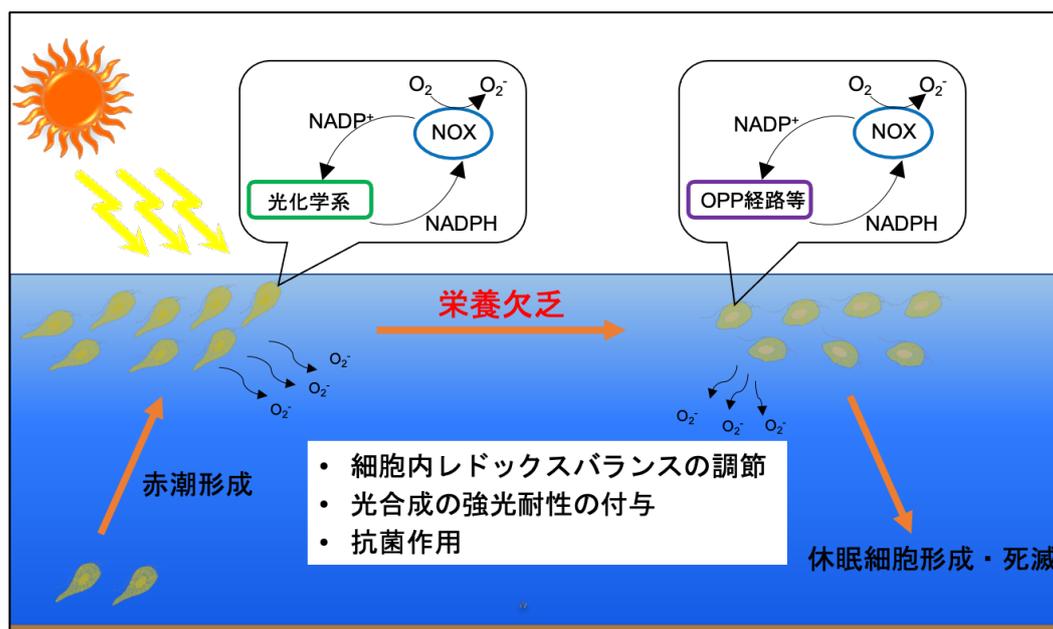


図6. シャットネラ赤潮の形成・衰退における O_2^- 産生

シャットネラは強光下および栄養欠乏下で異なるメカニズムで O_2^- 産生を活性化することが示唆された。 O_2^- 産生は海域の優占および翌年以降の赤潮形成に有利に働くと考えられる。

きた。今後は、上記の研究成果に基づいて分子生物学や生化学の手法を用いた研究が進展することによって、より詳細なシャットネラの O_2^- 産生機構が解明されることが期待される。

赤潮プランクトンの野外調査は長年世界中で実施されてきたため、その方法論は充実している。そのため、赤潮プランクトンについて室内研究で明らかとなった事象を実環境で検証することは比較的容易である。今後、本研究で明らかとなった強光や栄養欠乏による O_2^- 産生の促進が、実環境中のシャットネラ赤潮の形成にどれほど寄与するのか実証していく予定である。

Received Nov 16, 2020; Accepted Dec 5, 2020; Published Dec 31, 2020.

参考文献

1. Imai, I. and Yamaguchi, M. (2012) Life cycle, physiology, ecology and red tide occurrences of the

fish-killing raphidophyte *Chattonella*. *Harmful Algae* 14, 46–70.

2. Yamaguchi, M., Imai, I. and Honjo, T. (1991) Effects of Temperature, Salinity and Irradiance on the Growth Rates of the Noxious Red Tide Flagellates *Chattonella antiqua* and *C. marina* (Raphidophyceae). *Nippon Suisan Gakk.* 57, 1277–1284.

3. Murata, N. and Nishiyama, Y. (2018) ATP is a driving force in the repair of photosystem II during photoinhibition. *Plant Cell Environ.* 41, 285–299.

4. Vass, I. (2012) Molecular mechanisms of photodamage in the Photosystem II complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 209–217.

5. Yuasa, K., Shikata, T., Kuwahara, Y. and Nishiyama, Y. (2018) Adverse effects of strong light and nitrogen deficiency on cell viability, photosynthesis, and motility of the red-tide dinoflagellate *Karenia mikimotoi*. *Phycologia* 57(5), 525–533.

6. Katano, T., Yoshida, M., Yamaguchi, S., Yoshino, K., Hamada, T., Koriyama, M., and Hayami, Y. (2014) Effect of nutrient concentration and salinity on diel

- vertical migration of *Chattonella marina* (*Raphidophyceae*). *Mar. Biol. Res.* 10(10), 1007–1018.
7. Shikata, T., Sakurada, K., Jomoto, Y., Oyama, N., Onji, M., Yoshida, M. and Ohwada, K. (2011) Growth dynamics of *Chattonella antiqua* in relation to nutrients in the Yatsushiro Sea, *Nippon Suisan Gakk.* 77, 40–52.
 8. Shikata, T., Takahashi, F., Nishide, H., Shigenobu, S., Kamei, Y., Sakamoto, S., Yuasa, K., Nishiyama, Y., Yamasaki, Y. and Uchiyama, I. (2019) RNA-seq analysis reveals genes related to photoreception, nutrient uptake, and toxicity in a noxious red-tide raphidophyte *Chattonella antiqua*. *Front. Microbiol.* 10, 1764.
 9. Oda, T., Nakamura, A., Shikayama, M., Kawano, I. and Muramatsu, T. (1997) Generation of reactive oxygen species by raphidophycean phytoplankton. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 1658–1662.
 10. Glian'ko, A. K. and Ishchenko, A. A. (2010) Structural and functional characteristics of plant NADPH oxidase: a review. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 46, 509–518.
 11. Ma, M. W., Wang, J., Dhandapani, K. M., Wang, R. and Brann, D. W. (2018) NADPH oxidases in traumatic brain injury – Promising therapeutic targets? *Redox Biol.* 16, 285–293.
 12. Vignais, P. V. (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1428–1459.
 13. Anderson, A., Anuphon, L., Ian, K.B., Paolo, B., Christopher, J.H., Sabecha, S.M., Julia, M.D. and Alison, G.S. (2016) Exploiting algal NADPH oxidase for biophotovoltaic energy. *Plant Biotechnol. J.* 14, 22–28.
 14. Diaz, J. M. and Plummer, S. (2018) Production of extracellular reactive oxygen species by phytoplankton: past and future directions. *J. Plankton Res.* 40, 1–12.
 15. McDowell, R. E., Amsler, M. O., Li, Q., Lancaster, J. R. and Amsler, C. D. (2015) The immediate wound-induced oxidative burst of *Saccharina latissima* depends on light via photosynthetic electron transport. *J. Phycol.* 51, 431–441.
 16. Kim, D., Nakamura, A., Okamoto, T., Komatsu, N., Oda, T., Iida, T., Ishimatsu, A. and Muramatsu, T. (2000) Mechanism of superoxide anion generation in the toxic red tide phytoplankton *Chattonella marina*: Possible involvement of NAD(P)H oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1524, 220–227.
 17. Oda, T., Moritomi, J., Kawano, I., Hamaguchi, S., Muramatsu, T. and Ishimatsu, A. (1995) Catalase- and superoxide dismutase-induced morphological changes and growth inhibition in the red tide phytoplankton *Chattonella marina*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(11), 2044–2048.
 18. Qiu, X., Shimasaki, Y., Tsuyama, M., Yamada, T., Kawaguchi, M., Honda, M., Gunjikake, H., Tasmin, R., Shimizu, M., Sato, Y., Kato-Unoki, Y., Nakashima, T., Matsubara, T., Yamasaki, Y., Ichinose, H., Wariishi, H., Honjo, T. & Oshima, Y. (2013) Growth-phase dependent variation in photosynthetic activity and cellular protein expression profile in the harmful raphidophyte *Chattonella antiqua*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 77, 46–52.
 19. Shen, M., Xu, J., Tsang, T. Y. and Au, D. W. T. (2010) Toxicity comparison between *Chattonella marina* and *Karenia brevis* using marine medaka (*Oryzias melastigma*): Evidence against the suspected ichthyotoxins of *Chattonella marina*. *Chemosphere* 80, 585–591.
 20. Kim, D., Watanabe, M., Nakayasu, Y. and Kohata, K. (2004) Production of superoxide anion and hydrogen peroxide associated with cell growth of *Chattonella antiqua*. *Aquat. Microb. Ecol.* 35, 57–64.
 21. Yuasa, K., Shikata, T., Kitatsuji, S., Yamasaki, Y. and Nishiyama, Y. (2020) Extracellular secretion of superoxide is regulated by photosynthetic electron transport in the noxious red-tide-forming raphidophyte *Chattonella antiqua*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 205, 111839.
 22. Marshall, J.A., Hovenden, M., Oda T. and Hallegraef, M.G. (2002) Photosynthesis does influence superoxide production in the ichthyotoxic alga *Chattonella*

- marina* (Raphidophyceae). *J. Plankton Res.* 24, 1231–1236.
23. Yuasa, K., Shikata, T., Ichikawa, T., Tamura, Y. and Nishiyama, Y. (2020) Nutrient deficiency stimulates the production of superoxide in the noxious red-tide-forming raphidophyte *Chattonella antiqua*. *Harmful algae* 99, 101938.
24. Tang, B. L. (2019) Neuroprotection by glucose-6-phosphate dehydrogenase and the pentose phosphate pathway. *J. Cell. Biochem.* 120, 14285–14295.
25. Forchhammer K. and Selim A. K. (2020) Carbon/nitrogen homeostasis control in cyanobacteria. *FEMS Microbiol.* 44, 33–53.
26. Lattanzio, V., Cardinali, A., Ruta, C., Fortunato, M.I., Lattanzio, T.M.V., Linsalata, V. and Cicco, N. (2009) Relationship of secondary metabolism to growth in oregano (*Origanum vulgare* L.) shoot cultures under nutritional stress. *Environ. Exp. Bot.* 65, 54–62.
27. Shinde, S., Zhang, X., Singapuri, P.S. Kalra, I., Liu, X., Morgan-Kiss, M.R. and Wang, X. (2020) Glycogen metabolism supports photosynthesis start through the oxidative pentose phosphate pathway in cyanobacteria. *Plant Physiol.* 182, 507–517.
28. Peiro, C., Romacho, T., Azcutia, V., Villalobos, L., Fernandez, E., Bolanos, P. J., Moncada, S. and Sanchez-Ferrer, F. C. (2016) Inflammation, glucose, and vascular cell damage: the role of the pentose phosphate pathway. *Cardiovasc. Diabetol.* 15, 82.
29. Marshall, J.A. and H. G. M. (1999) Comparative ecophysiology of the harmful alga *Chattonella marina* (Raphidophyceae) from South Australian and Japanese waters. *J. Plankton Res.* 21, 1809–1822.
30. Nakamura, Y., Watanabe, M. M., (1988) Growth characteristics of *Chattonella antiqua* Part 2. Effects of nutrients on growth. *J. Oceanogr. Soc. Jpn.* 39, 151–155.
31. Imai, I., Ishiba, Y., Sakaguchi, K., Hata, Y., (1995) Algicidal marine bacteria isolated from Northern Hiroshima bay, *Japan. Fish. Sci.* 61, 628–636.

Relationship between the extracellular secretion of superoxide and photosynthesis in noxious red-tide-forming raphidophyte *Chattonella* spp.

Koki Yuasa¹, Tomoyuki Shikata² and Yoshitaka Nishiyama¹

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Graduate School of Science and Engineering, Saitama University

²Fisheries Technology Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency

トピックス

新発見！リンドウは花卉の緑色斑点で光合成する

公益財団法人岩手生物工学研究センター 園芸資源研究部

高橋 重一*、西原 昌宏

リンドウは世界に広く分布する植物である。日本では切り花や鉢花が仏花や観賞用として広く流通しており、主要な園芸花き作物の一つに挙げられる。そのため、花の色や形といった形質や開花期などに着目した品種改良が精力的に進められている。リンドウの花をよく観察すると、緑色斑点の存在に気付くであろう。これまでリンドウ花卉の斑点に着目した研究事例はなく、そもそも斑点とはなんぞや？という疑問の下に形態観察から研究を開始した。これまでに当該斑点は葉緑体を保持する表皮細胞で構成されることが明らかになり、顕微イメージング PAM を用いたクロロフィル蛍光測定から機能的な光合成を行っていることを支持する結果が得られた。また、斑点は蕾の発達に伴って出現し、構築されることを見出した。本稿では研究に至る経緯を踏まえつつ、これまでに得られた成果を紹介する。

1. はじめに

リンドウと聞くと何を思い浮かべるだろうか？ 先ずは青紫色の花を思い浮かべるだろうか、「半沢直樹の最終回で登場したリンドウ」^{※1} や「吉川英治の小説の表紙」^{※2}を思い描く人もいるだろう。中には「我遅咲きのリンドウとならん」^{※3} という文句を思いついた傾奇者もいるかもしれない。しかしながら、「光合成」と答えた人はまずいないだろう。実際、リンドウを材料に行われた光合成に関する研究はこれまでのところほとんどない。「光合成研究」の読者においてリンドウに馴染みのある人は少なく、なぜリンドウの花を材料にしたのか？と疑問に思われる方も多いただろう。そこで本稿では植物としてのリンドウと今回のトピックスとなるリンドウ花卉の緑色斑点に着目した経緯を簡単に紹介した後、研究の内容と今後の展望について述べる。

2. リンドウと今回紹介する研究に至る経緯について

リンドウはリンドウ科リンドウ属 (*Gentiana*) に属する植物である。アフリカ大陸を除く世界各地に広く分布しており、400 種余りが存在すると考えられている¹⁾。日本では観賞用の園芸品として親しまれているが、西洋では *Enzian-Schnaps* として知られる蒸留酒の原料として利用されている。尚、*Enzian-Schnaps* には黄花リンドウ (*G. lutea*) の根が用いられる。黄花リンドウは非トランペット型の花をつけるが、*Enzian-Schnaps* のポトルラベルにはしばしばトランペット型の青花が描かれており、これはミスリーディングである¹⁾。また、中国では長年に渡り健胃薬や抗炎症薬として利用されてきた²⁾。リンドウを漢字で「竜胆 (リュウタン)」と書くが、これは熊肝 (ユウタン) をも超える最上級の苦みを表現したものである。良薬口に苦しといったところか。現在、日

*連絡先 E-mail: s-takahashi@ibrc.or.jp

※1 ここでいう『半沢直樹』は2020年7月19日から9月22日にかけてTBS系列で放映されたTVドラマのこと。最終回で主人公の奥さんが主人公にリンドウを手渡し励ますシーンがある。リンドウの花言葉である「正義」を知っているとぐっとくる。

※2 日本を代表する歴史小説作家として名高い吉川英治は

リンドウをトレードマークとして小説の表紙によく使用していた。このリンドウは草丈が低く花が開いていることからエゾリンドウではないと思われる。

※3 90年代初期に週刊少年ジャンプで連載された『花の慶次 -雲のかなたに-』に登場する村井若水の文句。漫画愛好家にはよく知られている。遅咲きということからこちらもエゾリンドウのことではないと思われる。

本ではリンドウを用いた漢方薬「竜胆瀉肝湯」が一般のドラッグストアで気軽に購入できる。

さて、日本には13~18種余りのリンドウが自生すると考えられている³⁾。園芸品目としてリンドウに価値を見出したのは日本であり、これまでに300を超える多くの品種が作出されてきた⁴⁾。現在市場で流通している大抵のリンドウはエゾリンドウ (*G. triflora*) とササリンドウ (*G. scabra*) および両者のF₁雑種である。エゾリンドウは早生で花冠がほとんど開かないが、ササリンドウは晩生で花冠が開きやすいという特徴がある。雑種はその中間の性質を示すものが多い。主にエゾリンドウは切り花として仏花に、ササリンドウは鉢花として敬老の日のギフトなどに利用されている。以降、特に断りなく「リンドウ」と記述する場合はこれら園芸品として流通しているものを指す。また、リンドウの花冠は合弁花冠

であり、5つの大きな裂片とその間の小さな副裂片から成る。裂片という表記はあまり馴染みがないと思われるので、これより裂片を「花弁」と記述する。

岩手県は市場の約60%を占める全国一のリンドウ生産県であり、年間5,000万本以上を出荷している⁵⁾。筆者が所属する岩手生物工学研究センターは岩手県の農林水産業、食品工業等の産業振興に寄与することを目的に設立された公益財団法人である。我々の研究部では県のリンドウ産業を盛り上げるべく、品種改良や品質向上につながる基礎研究に取り組んでおり、花色^{6,9)}、花形^{10,11)}、花成¹²⁾および越冬性¹³⁾などの形質について分子レベルでの研究を進めている。

リンドウの花弁をよく観察してみると緑色の斑点の存在に気づかれるだろう(図1)。この斑点はアブラムシや病斑と間違えやすいことから、育

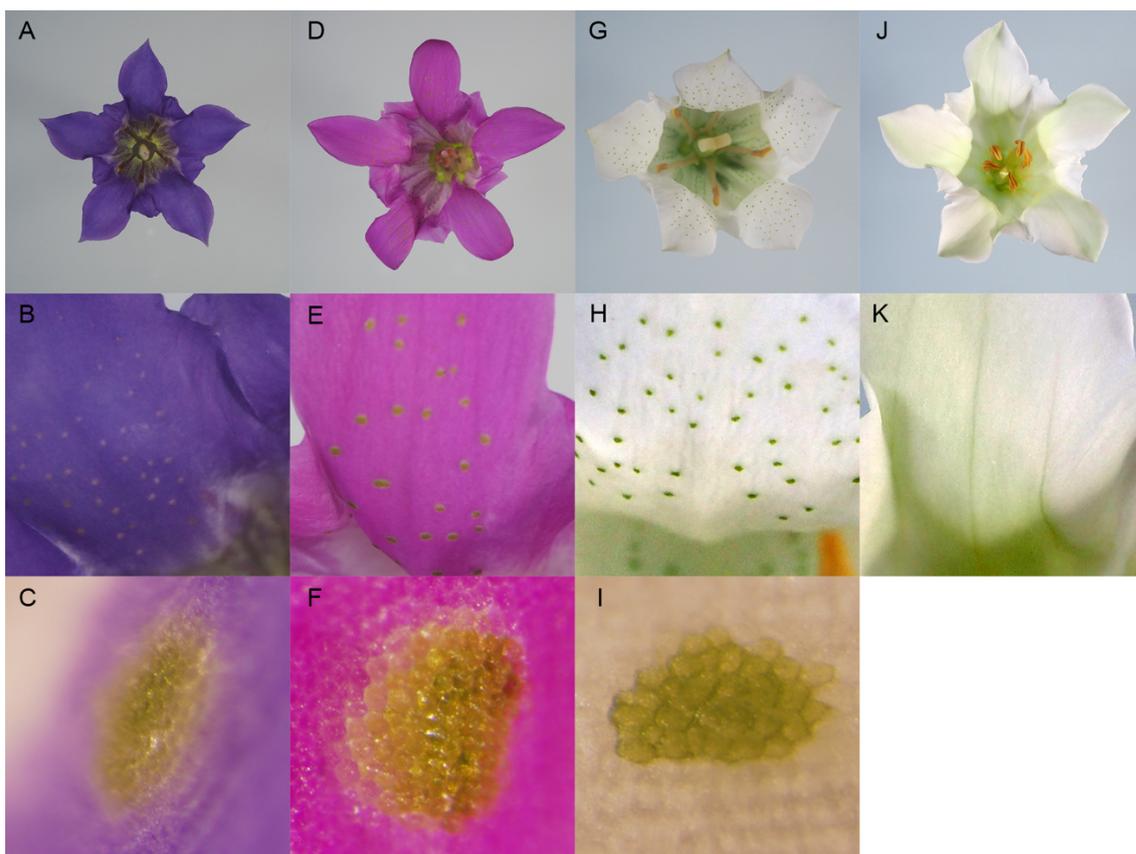


図1. リンドウの花の緑色斑点

青花 (A-C)、ピンク花 (D-F)、白花 (G-I)で緑色斑点を保持する系統および白花で斑点が目立たない系統 (J-K) の写真。上段は花全体の、中段、下段はそれぞれ花弁および斑点の拡大画像。

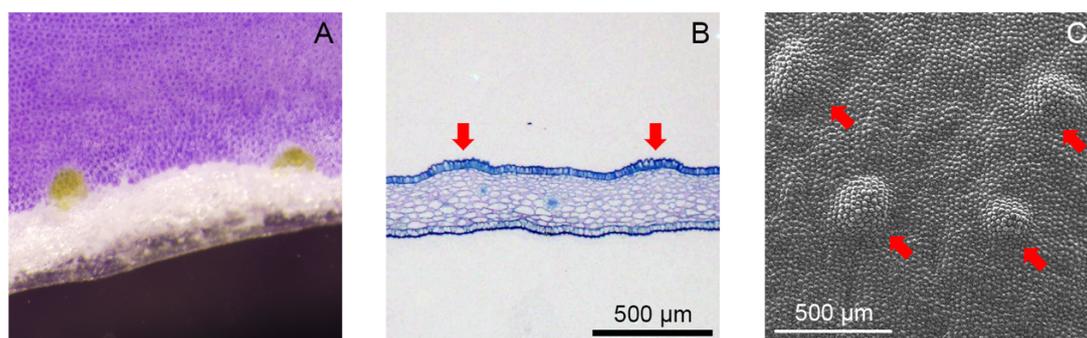


図2. 斑点の形態的な特徴

(A) 花卉断面の実体顕微鏡画像。(B) 花卉断面の薄層切片の組織染色後の画像。(C) リンドウ花卉表面の走査電子顕微鏡画像。赤矢印は斑点を示す。

種や生産の現場では好まれていない形質であり、なるべく斑点が目立たない系統が選抜されている。事例としては極めて限定的であるが、筆者が岩手をはじめ、東京・千葉・埼玉の花屋で流通しているリンドウの花弁を観察したところ、容易に判別される斑点は見当たらなかった。リンドウは多年生植物であり、一般的に開花に至るまで少な

くとも2年を要するため、開花前の苗の段階で斑点の有無を判定できる遺伝子マーカーの開発が望まれていた。しかしながら、リンドウの斑点に着目した研究はこれまで一切行われていなかった。そこで、筆者は斑点の有無を判別できる DNA マーカーの開発を目指して、まずは斑点の形成に関わる分子機構の解明を目的に研究を開始した。

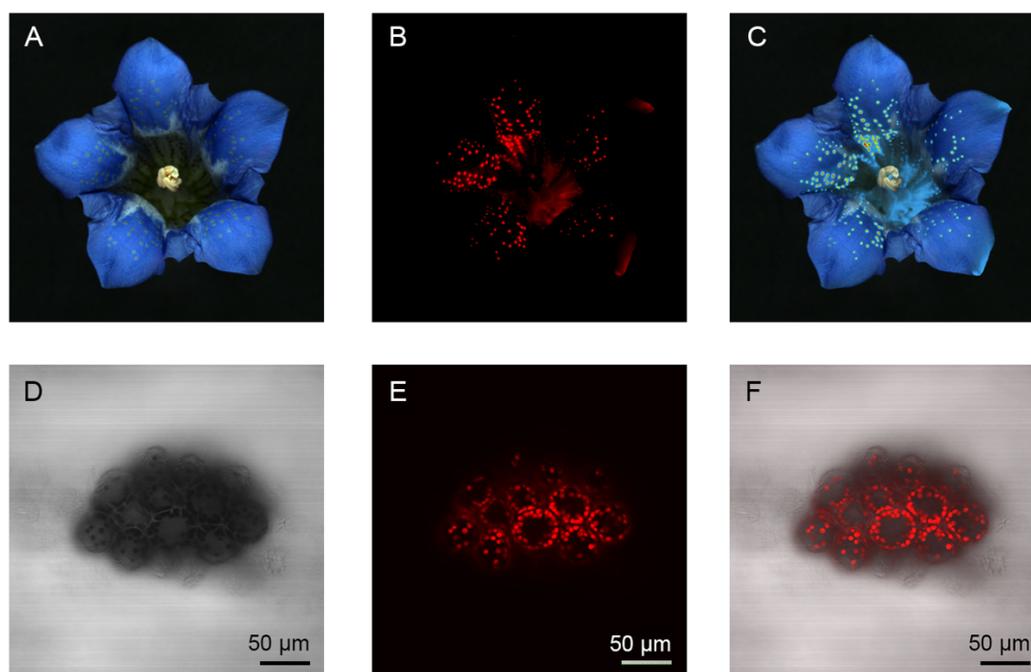


図3. リンドウ花と斑点におけるクロロフィル蛍光の検出

花(A-C)と斑点(D-F)はそれぞれFUSION FX7 EDGEとFLUOVUEW FV1000で撮影した。(A) 花のデジタル画像。(B) 花のクロロフィル蛍光。(C) クロロフィル蛍光の強度をグラデーション(低レベルが青で高レベルが赤)で表示し、Aと重ね合わせた画像。(D) 斑点の微分干渉顕微鏡画像。(E) 斑点のクロロフィル蛍光。(F) DおよびEを重ね合わせた画像。

3. 研究内容の紹介

リンドウ花卉の緑色斑点の研究を開始するにあたり、まず形態観察を行った。リンドウの花色は青をはじめピンクや白など多様であるが、花色に関わらず斑点が認められた (図 1. A-D)。また、一部のリンドウでは斑点はほとんど目立たないか見られない (図 1. J, K)。なお、花卉あたりの斑点の数と斑点を構成する細胞数は品種ごとに大きく異なっていた。さらに、花卉を切片にし、断面を観察すると緑色の斑点は一部の表皮細胞で構成されることがわかった (図 2. A)。また、斑点はドーム状に隆起した構造を持つことも明らかとなった (図 2. B, C)。

リンドウの花に対して 480 nm の青色光を照射し、700 ~ 750 nm の波長領域の蛍光を計測したところ、斑点から強い蛍光シグナルが得られた (図 3. A-C)。さらに共焦点レーザー顕微鏡 (励起光 488 nm、650 nm ハイパスフィルター) を用いて観察を行ったところ、斑点細胞内に存在する数

十個の 5 μm 程度のサイズの顆粒状の構造体から蛍光シグナルが検出された (図 3. D-F)。この検出された蛍光はクロロフィル蛍光と考えられ、斑点細胞は葉緑体を有する可能性が高まった。そこで、斑点細胞が葉緑体を保持するか否かを明らかにするために、透過型電子顕微鏡解析を行った。その結果、斑点細胞は内部に多くの葉緑体を持つことが明らかになった (図 4. A)。これらの葉緑体ではチラコイドおよびグラナがよく発達しており、一般的な葉に見られる葉緑体と同様の形態を有していた (図 4. B)。一方、斑点細胞以外の表皮細胞には葉緑体はみられず (図 4. C)、グラナがなくチラコイドが崩壊し、プラスト顆粒が肥大した色素体が観察された (図 4. D)。次に、斑点細胞の葉緑体が光合成を行うのか否かについて評価を行った。光合成を行うためには、気孔を介して空気を入れ替える必要がある。花卉の表面構造を観察したところ、背軸側に気孔が確認された (図 4. E)。なお、向軸側には気孔は存在しなかった。斑

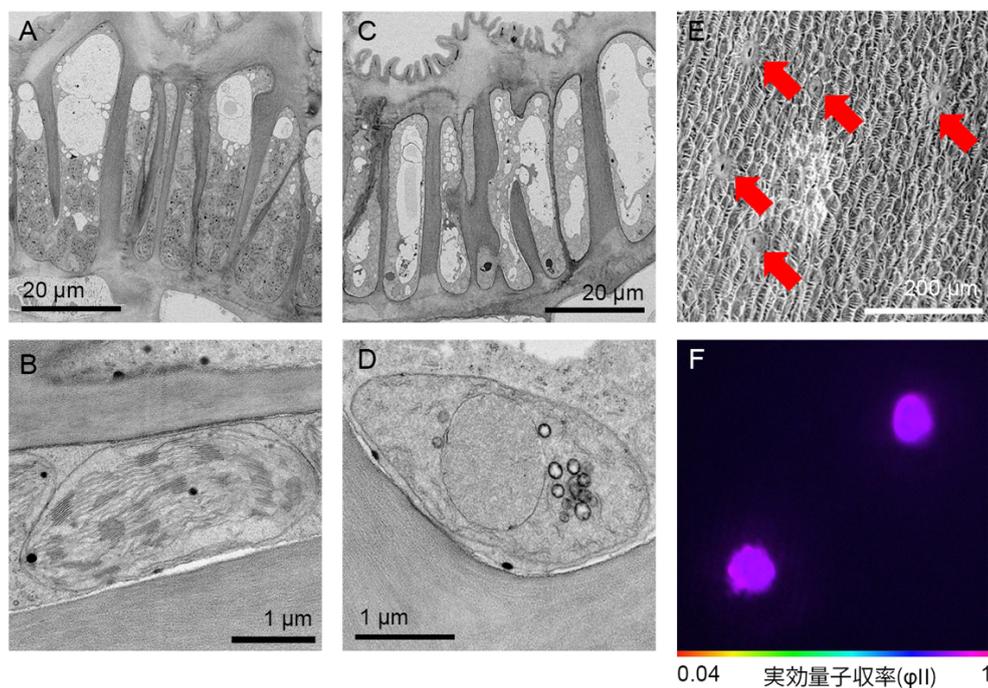


図4. 斑点細胞の葉緑体の構造および光合成能の評価

(A) 斑点細胞の透過型電子顕微鏡画像。(B) 斑点細胞内の葉緑体の拡大画像。(C) 花卉の斑点以外の表皮細胞の透過型電子顕微鏡画像。(D) 花卉の斑点以外の表皮細胞の色素体の拡大画像。(E) 花卉の背軸側の表面の構造。赤矢印は気孔を示す。(F) 花卉表皮の顕微イメージングPAMを用いたクロロフィル蛍光の解析画像。青紫の領域が斑点に相当する。

点のサイズが小さいことから、顕微イメージング PAM を用いてクロロフィル蛍光測定を行った。測定にあたり試料として用いたリンドウの生育環境である温室を模し、アクチニックライトの強度を $449 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ にセットした。その結果、実効量子収率 (ϕ_{II}) = 0.50 ± 0.01 の値を得た (図 4. F)。この値は同様の光条件下におけるシロイヌナズナ等の葉と同レベルであり¹⁴⁾、斑点細胞の葉緑体の光化学系 II が機能し、下流のシトクロム *b_{6/f}* 複合体および光化学系 I も阻害を受けていないことを示している。さて、図 4F に示した顕微イメージング PAM の画像における斑点の実効量子収率の値は、実際の値より高く見積もられ表示されている。これは測定に用いたプログラム ImagingWinGigE v2.47 がゲインを変更するごとに補正係数を新たに入力しないと勝手にゲインを書き換えるという仕様 (バグと考えられる) になっているためである。そのため、正確に測定を行うには、補正係数を実験的に求め測定結果に適用する必要がある。また、花卉の表皮層をピーリングし、*N,N*-ジメチルホルムアミドでクロロフィルを抽出し Porra ら¹⁵⁾に従って Chl *a/b* 比を

求めたところ、2.5~3.5 と葉と同レベルの範囲内であった。これまでに得られた結果から、リンドウ花卉の緑色斑点では光合成が行われていると考えられる。

ところで斑点はいつ形成されるのであろうか？ 蕾の発達段階を追って、斑点の有無や形態の観察を行ったところ、発蕾直後から数 mm 程度のサイズの蕾では斑点が認められなかった (図 5. A, C)。その後、蕾の発達に伴って出現し、花卉が着色する前の発達段階の蕾では十分に発達していることが明らかになった (図 5. B, D)。また、図 5.B の発達段階の蕾の斑点以外の表皮細胞において、クロロフィル蛍光を発する無数の葉緑体より小さな顆粒状の構造物が認められたが (図 5. E-H)、これらは発達した花卉では消失していた (図 2. E)。

4. 緑色斑点は何者か

本稿で取り上げた研究内容について PLOS ONE 誌で発表し¹⁶⁾、プレスリリースを行ったところ予想だにしない大きな反響があり、一般の方から大手マスメディアに至るまで幅広い方面か

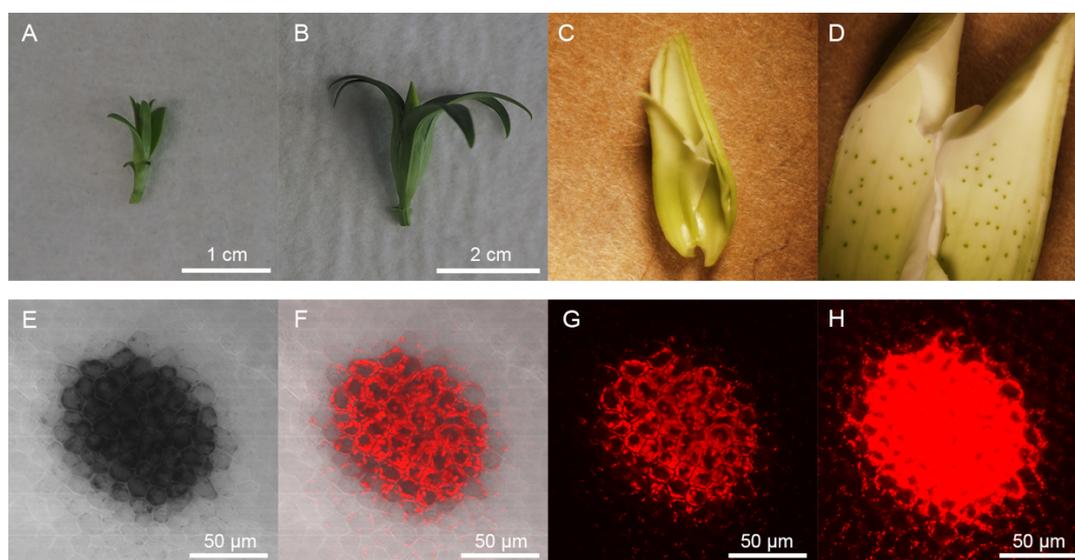


図5. 蕾の発達段階における斑点の観察

(A) 初期の発達段階の蕾。(B) 後期の発達段階の蕾。(C) 初期の発達段階の蕾 (A) の向軸側の表皮。(D) 後期の発達段階の蕾 (B) の向軸側の表皮。(E) 後期の発達段階の蕾の斑点の微分干渉顕微鏡画像。(F) EとGの重ね合わせ画像。(G) 後期の発達段階の蕾のクロロフィル蛍光画像。(H) 励起光の強度を上げて撮影した後期の発達段階の蕾のクロロフィル蛍光画像。

ら多くの問い合わせがあった。中でも「斑点はなんのためにあるのですか？」という単純な質問をよく頂戴するが、現状ではその存在理由は全く分かっていない。光合成というと、先ずはエネルギーの供給を思いつく。ところが、斑点は表皮1層の細胞で構成されており、花卉全体に占める割合は、斑点が大きく多い品種であっても数%程度であるため、産出するエネルギー量はそう多くないと思われる。ただし、リンドウ花卉が要するエネルギー量も不明であることから、現時点ではエネルギーの供給源として機能するかどうか判断することはできない。生理学的な機能の仮説として、花卉の維持(花保ち)に関わっているという可能性も考えられるので、今後解析を進める予定である。また、花は送粉者をおびき寄せるために様々な手段を用いるが、「模様」もその一つである。では、斑点が送粉者に対するポジティブなシグナルかということ、それを支持するデータも今のところ得られていない。リンドウ科に属するアケボノソウ (*Swertia bimaculata*) も花卉に黄緑色の斑点を持つが、その直径は1.5 mm程度と、リンドウの斑点よりずっと大きい。これは蜜線として機能し、アリを誘引することが知られている¹⁷⁾。一方、リンドウは蜂により虫媒されるが、斑点はそのような機能を持ち合わせていないようだ。図鑑の写真を眺めてみると、ヤクシマリンドウ (*G. yakushimensis*) などの野生種や外国種のリンドウにも斑点がみられるものが多くある。どうやらこの斑点は日本園芸リンドウ特有のものではないようだ。わざわざコストをかけて斑点を構築する以上、自然環境下において何らかの機能を果たすものと考えられる。今後の研究の進展を楽しみにお待ちいただきたい。

さて、リンドウの斑点は表皮細胞が葉緑体を構築し、維持するという点においてユニークである。葉の表皮層にある孔辺細胞が葉緑体を保持することはよく知られているが、一般に高等植物の表皮細胞は葉緑体を持たないとされる。光合成学会が運営するウェブ上の光合成辞典のシダの項目にも「裸子植物、被子植物の気孔孔辺細胞以外の表皮細胞には発達した葉緑体がみとめられないが、シダ植物は表皮細胞にも発達した葉緑体を持

つ」とある。一方、シロイヌナズナの表皮細胞に葉緑体が存在することを報告する文献もいくつかあるが¹⁸⁻²¹⁾、1細胞あたりの数が少なく、葉肉細胞の葉緑体と比較してサイズも明らかに小さいなど、リンドウ花卉の斑点細胞が保持する葉緑体の形態とは大きく異なっている。尚、リンドウの花卉には斑点も孔辺細胞もどちらも存在していることから、斑点の構築には孔辺細胞とは異なるメカニズムが働いていると考えられる。

葉緑体は原色素体から分化するというアイデアは広く一般に受け入れられている。原色素体はチラコイドやクロロフィルを持たないことから、これらの出現が原色素体から葉緑体への分化が始まったことを示す重要な判断材料になると考えてよいだろう。栄養成長下にある植物では茎頂分裂組織 (Shoot apical meristem; SAM) で形成される葉原基から新たな葉が構築される。SAMはL1、L2、L3に分類される層から成り、先端の中央ゾーンには幹細胞が含まれている²²⁾。シロイヌナズナのL2層の中央ゾーンに位置する細胞の色素体ではチラコイドの発達認められず、クロロフィル蛍光も発しないため²²⁾、これは原色素体であると考えられる。一方、L1層やL3層、中央ゾーンを外れたL2層の細胞の色素体にはチラコイドとグラナ様の構造物が存在し、クロロフィル蛍光を発することから²²⁾、これらの色素体では葉緑体への分化が始まっていると考えられる。補足すると、これらの色素体は約500 nm程度の大きさであり、チラコイドのネットワークもグラナも発達途上であるため²²⁾、成熟した葉緑体の形態とは大きく異なる。将来表皮細胞に分化するL1層の細胞にも、このような色素体がみられることは大変興味深い。尚、L1層の細胞の色素体は葉の成長に伴い、形態を変化させ最終的に無色の色素体(非葉緑体)となる²²⁾。さて、花卉は組織的に葉に近い。今回、発達中のリンドウの蕾において、斑点以外の表皮細胞の内部にある小さな顆粒状の構造物からクロロフィル蛍光を検出したが(図5.H)、この顆粒状の構造物は上述のシロイヌナズナのL1層の細胞と同様の制御で構築されたチラコイドとクロロフィルを有する色素体であると思われる。花卉の斑点以外の表皮細胞では、

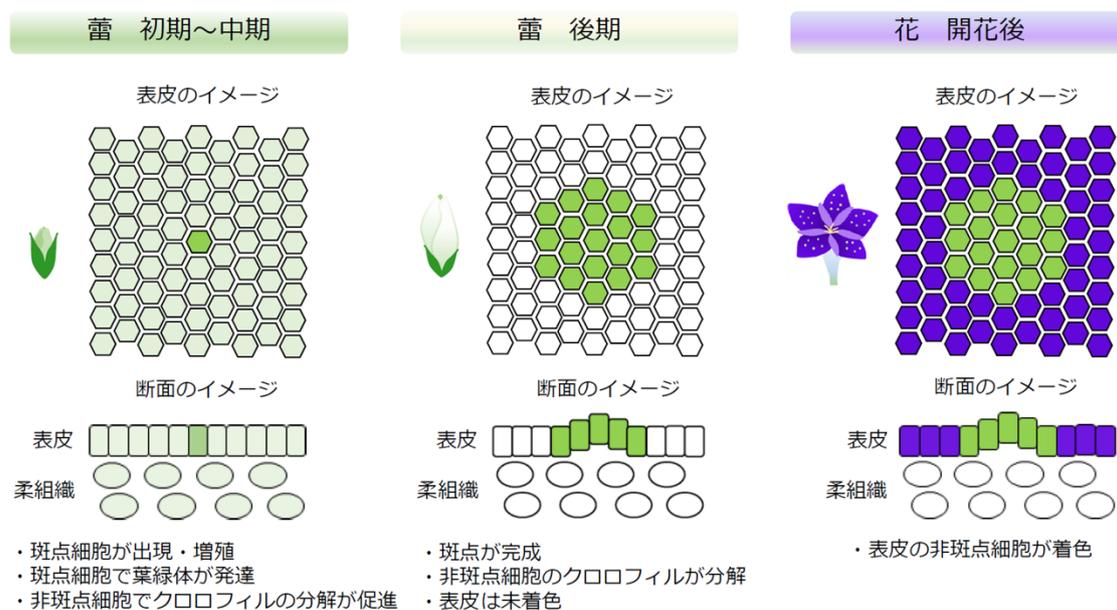


図6. リンドウ花卉における斑点形成の模式図

発達に伴ってこの葉緑体の特徴を有する色素体が分解されるが (図 3. E、図 4. D)、これも葉の表皮細胞と同様の現象のように感じられる。一方、将来斑点を構成する細胞ではこの制御システムに逆らって葉緑体を積極的に形成・維持する。これらのことは、リンドウの蕾の表皮細胞には葉緑体を形成・維持して斑点細胞を構築するメカニズムと、チラコイドやクロロフィルを分解して花色を担う斑点以外の表皮細胞を構築する真逆のメカニズムが存在することを示している。最後に、花の発達と斑点の形成に関わるイベントの要点をまとめたイラストを示す (図 6)。

表皮において、斑点になる細胞とそれ以外の細胞の運命がどのように決定づけられているのか、そのメカニズムを解明することで葉緑体の形成に関わる新たな知見を得ることができるのではないかと期待している。筆者らは斑点形成の分子メカニズムに迫るための基盤整備を進めており、重粒子線照射により斑点が少なくなった変異株を既に取得している。また斑点の多い系統と少ない系統の交配実験も計画しており、斑点形成に関わる遺伝子の同定を目指した研究を進めている。

これらを通じた研究の進展についてもご期待いただきたい。

5. おわりに

そもそも本研究は斑点の少ない品種を効率よく育種するための DNA マーカー開発のプロジェクトとして開始したが、その途中で植物学の常識を覆すような思わぬ成果を得ることになった。そして、今後得られるデータは葉緑体発達のメカニズムの新展開に繋がるのが大いに期待される。冒頭で「リンドウと聞くと何を思い浮かべるだろうか？」との問いを投げかけたが、ゆくゆくは「実は○○のために花で光合成をするんだよね！」や「葉緑体発達のメカニズムの解明に一翼を担った研究材料となったもの」などと答えて頂くことができるよう研究に取り組みたい。

謝辞

本稿で紹介した研究で用いたリンドウは、岩手県農業研究センターの小澤傑博士より提供頂いた。また、顕微イメージング PAM によるクロロフィル蛍光測定は早稲田大学の園池公毅教授、SEM 解析は農研機構野菜花き研究部門の佐々木克友

博士のご助力を得て行った。この場を借りて感謝申し上げる。最後に、本稿の執筆の機会を与えて下さった、光合成研究の編集長である静岡大学の成川礼博士に御礼申し上げます。

Received Nov 8, 2020; Accepted Nov 25, 2020; Published Dec 31, 2020.

参考文献

- Köhlein F. (1991) *Gentians*. Timber Press, Portland, Oregon, U.S.A.
- Pan, Y., Zhao, Y.L., Zhang, J., Li, W.Y. and Wang, Y.Z. (2016) Phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Gentiana* (Gentianaceae). *Chem. Biodivers.* 13, 107–150.
- 高橋由衣, 日影孝志, 若目田圭祐, 斎藤靖史, 堤賢一 (2014) エゾリンドウ (*Gentiana triflora* var. *japonica*) と亜種エゾオヤマリンドウ (*G. triflora* var. *japonica* f. *montana*) の地域集団間の形態的変異. *育種学研究* 16, 1–6.
- Nishihara, M., Tasaki, K., Sasaki, N. and Takahashi, H. (2018) Development of basic technologies for improvement of breeding and cultivation of Japanese gentian. *Breed Sci.* 68, 14–24.
- 作物統計調査 作況調査(花き) 確報 平成 30 年度 産花き生産出荷統計 切り花類 りんどう 政府統計コード 00500215.
- Nakatsuka, T., Nishihara, M., Mishiba, K., Hirano, H. and Yamamura, S. (2006) Two different transposable elements inserted in flavonoid 3',5'-hydroxylase gene contribute to pink flower coloration in *Gentiana scabra*. *Mol. Genet. Genomics* 275, 231–241.
- Nishihara, M., Hikage, T., Yamada, E. and Nakatsuka, T. (2011) A single-base substitution suppresses flower color mutation caused by a novel miniature inverted-repeat transposable element in gentian. *Mol Genet Genomics* 286, 371–382.
- Nakatsuka, T., Nishihara, M., Mishiba, K. and Yamamura, S. (2005) Two different mutations are involved in the formation of white-flowered gentian plants. *Plant Sci.* 169, 949–958.
- Nakatsuka, T., Haruta, K.S., Pitaksutheepong, C., Abe, Y., Kakizaki, Y., Yamamoto, K., Shimada, N., Yamamura, S. and Nishihara, M. (2008) Identification and characterization of R2R3-MYB and bHLH transcription factors regulating anthocyanin biosynthesis in gentian flowers. *Plant Cell Physiol.* 49, 1818–1829.
- Nakatsuka, T., Saito, M., Yamada, E., Fujita, K., Yamagishi, N., Yoshikawa, N. and Nishihara, M. (2015) Isolation and characterization of the C-class MADS-box gene involved in the formation of double flowers in Japanese gentian. *BMC Plant Biol.* 15, 182.
- Nakatsuka, T., Saito, M. and Nishihara, M. (2016) Functional characterization of duplicated B-class MADS-box genes in Japanese gentian. *Plant Cell Rep.* 35, 895–904.
- Imamura, T., Nakatsuka, T., Higuchi, A., Nishihara, M. and Takahashi, H. (2011) The gentian orthologs of the *FT/TFL1* gene family control floral initiation in *Gentiana*. *Plant Cell Physiol.* 52, 1031–1041.
- Takahashi, H., Imamura, T., Konno, N., Takeda, T., Fujita, K., Konishi, T., Nishihara, M. and Uchimiya, H. (2014) The gentio-oligosaccharide gentiobiose functions in the modulation of bud dormancy in the herbaceous perennial *Gentiana*. *Plant Cell* 26, 3949–3963.
- Wiciarz, M., Gubernator, B., Kruk, J. and Niewiadomska, E. (2015) Enhanced chloroplastic generation of H₂O₂ in stress-resistant *Thellungiella salsuginea* in comparison to *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 153, 467–476.
- Porra, R.J., Thompson, W.A. and Kriedemann, P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975, 384–394.
- Takahashi, S., Ozawa, S., Sonoike, K., Sasaki, K. and Nishihara, M. (2020) Morphological and cytological

- observations of corolla green spots reveal the presence of functional chloroplasts in Japanese gentian. *PLoS One* 15, e0237173.
17. Wang, S., Fu, W.L., Du, W., Zhang, Q., Li, Y., Lyu, Y.S. and Wang X.F. (2018) Nectary tracks as pollinator manipulators: The pollination ecology of *Swertia bimaculata* (Gentianaceae). *Ecol. Evol.* 8, 3187–3207.
 18. Barton, K.A., Schattat, M.H., Jakob, T., Hause, G., Wilhelm, C., Mckenna, J.F., Máthé, C., Runions, J., Van Damme, D. and Mathur, J. (2016) Epidermal pavement cells of *Arabidopsis* have chloroplasts. *Plant Physiol.* 171, 723–726.
 19. Fujiwara, M.T., Kojo, K.H., Kazama, Y., Sasaki, S., Abe, T. and Itoh, R.D. (2015) The *Arabidopsis minE* mutation causes new plastid and FtsZ1 localization phenotypes in the leaf epidermis. *Front. Plant Sci.* 6, 823.
 20. Pyke, K.A., and Leech, R.M. (1994) A genetic analysis of chloroplast division and expansion in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 104, 201–207.
 21. Robertson, E.J., Rutherford, S.M. and Leech, R.M. (1996) Characterization of chloroplast division using the *Arabidopsis* mutant *arc5*. *Plant Physiol.* 112, 149–159.
 22. Charuvi, D., Kiss, V., Nevo, R., Shimoni, E., Adam, Z. and Reich, Z. (2012) Gain and loss of photosynthetic membranes during plastid differentiation in the shoot apex of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 1143–1157.

**A new finding that Japanese gentians perform photosynthesis
at the green spots on the corolla**

Shigekazu Takahashi and Masahiro Nishihara

Iwate Biotechnology Research Center

解説

光合成研究における PPR 研究の幕開けと今日の隆盛：日本からの発信

名古屋大学大学院情報学研究科

杉田 護*

光合成研究に携わっている人であれば pentatricopeptide repeat (PPR)タンパク質という名前を一度は耳にしたことがあるのではないかと思います。2000年に新規の PPR モチーフをもつタンパク質ファミリーが発見されてから、光合成研究はもちろん葉緑体やミトコンドリアの分子機能研究が飛躍的に進展したといっても過言ではありません。著者も 1980~90 年代に葉緑体遺伝子の発現制御の研究を行ってきた関係で、自然のなりゆきとして PPR タンパク質と深く関わってきました。本解説では、PPR 研究の幕開けとその後の隆盛を概説し、最後に今後の研究の展望を述べさせていただきます。著者自身の周りで繰り広げられた話題が中心になる点と、登場人物名は敬称を省略させていただくことをご了承ください。

1. はじめに - PPR タンパク質ファミリーの発見

シロイヌナズナの全ゲノムがほぼ解読された頃、フランスの 2 グループがそれぞれ独立に、類似のアミノ酸配列の繰り返しからなる奇妙なタンパク質をコードする 200 個もの遺伝子を見出した。Alain Lecharny (Universite de Paris-Sud)らはこの新規のタンパク質を PCMP (Proteins characterized Combinatorial organization of Motifs with no homologues outside the Plant kingdom の略称)と命名した¹⁾。一方、Ian Small と Nemo Peeters (Station de Génétique, INRA, Versailles) は、このタンパク質の特徴である 35 アミノ酸の繰り返し配列 (PPR モチーフと命名) に因んで、PPR タンパク質とネーミングした²⁾。Small と Peeters は酵母の PET309 やアカパンカビの CYA5、およびトウモロコシの CRP1 が PPR タンパク質の一つであることを初めて明らかにした。PET309 と CYA5 はミトコンドリア mRNA の RNA プロセシングや翻訳の制御に働き、CRP1 は葉緑体の *petB-petD* mRNA のプロセシングと *petA* mRNA の翻訳制御に働いていることが知られていた³⁾。論文の

中で彼らは PPR タンパク質が RNA 編集に関わっている可能性にも言及した。Small らは詳細を 2004 年 *Plant Cell* 誌に発表し、シロイヌナズナは 450 個、イネは 477 個のメンバーからなる PPR タンパク質ファミリーをもつこと、および大多数の PPR タンパク質が葉緑体かミトコンドリアに局在すると予想した⁴⁾。また PPR モチーフ配列の特徴と C 末のモチーフ配列の有無により、PPR タンパク質を図 1 のように 5 つのタイプに大別した。

Small は 2006 年に西オーストラリア大学の ARC Center of Excellence in Plant Energy Biology に移り、現在に到るまでトップランナーとして華々しい PPR 研究を展開している。

2. 我が国における PPR 研究の事始め

2.1. 光合成に関わる PPR タンパク質

おそらく日本人で最初に PPR タンパク質の研究に携わったのは当時 Gadi Schuster ラボ (イスラエル) でポストドクをしていた中村崇裕 (現九大教授・EditForce 創設者) であろう。中村は核コー

*連絡先 E-mail: sugita@gene.nagoya-u.ac.jp

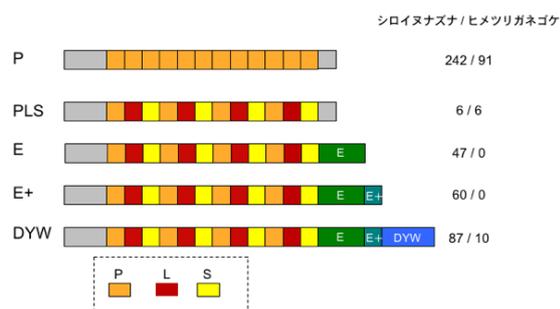


図1. PPRタンパク質は5タイプに大別される

PPRタンパク質はPPRモチーフのバリエーション (P, L, S) の構成とC末端のモチーフの組み合わせにより、P, PLS, E, E+, DYWの5タイプに分類される。右の数字はシロイヌナズナとヒメツリガネゴケに存在するそれぞれのタイプの総数を示す。C末端には91アミノ酸のE (extension)、33アミノ酸のE+、106アミノ酸のDYWの3種のモチーフが多数存在する。DYWモチーフのC末端はアスパラギン酸 (D)、チロシン (Y)、トリプトファン (W) の保存アミノ酸からなっている。

ドの葉緑体リボヌクレオプロテイン (cpRNP) の機能研究で学位を取得した後、2000年7月にイスラエルに留学した。同年10月3日彼から「If each of PPR proteins can bind to RNA specifically, it can be one solution to explain complicated RNA processing in chloroplast. We have two PPR proteins. The present goal is to demonstrate each of two proteins is RNP, and how they bind to RNA in specific manner. Now I hope we are ahead of the world!」と心躍る電子メールが届いた。高クロロフィル蛍光変異体 *hcf152* を単離した Karin Meierhoff ら (ドイツ) と共同でその原因遺伝子が PPR タンパク質をコードしていることを突き止め、その作用機作を調べているところに中村が居合わせたというわけだ。中村に限らず誰もが、PPR タンパク質が光合成機能を支える葉緑体遺伝子の発現制御の肝となるものだと言ったことは言うまでもない。鹿内利治 (奈良先端大) もその一人で、ある光合成機能変異に PPR タンパク質が関与していることをつかんでいた (2001年3月私信)。著者は中村 (2001年8月一時帰国) から PPR タンパク質のレクチャーを受け、翌年4月から卒研生の服部満 (現阪大助教) にヒメツリガネゴケの PPR タンパク

質遺伝子ファミリーを調べてもらうことにした。ヒメツリガネゴケの EST データベース (基生研・長谷部研究室) に PPR モチーフをコードする 36 個の EST 情報が含まれていた。当時の EST データ情報量から類推すると、ヒメツリガネゴケには 70~100 個の PPR 遺伝子が存在すると予想された⁵⁾。ヒメツリガネゴケを研究材料に選んだのは PPR 遺伝子の進化的観点からの興味と逆遺伝学手法 (遺伝子ターゲティング) による PPR タンパク質の機能解明に期待したからである。

表1. 植物のPPRタンパク質が関与する突然変異体

遺伝子記号	遺伝子記号の由来 (表現形質)	PPRタンパク質 ¹⁾
(光合成・葉緑体機能の異常)		
<i>hcf152</i>	high chlorophyll fluorescence	HCF152
<i>crp1</i>	chloroplast RNA processing	CRP1
<i>crr2</i>	chlororespiratory reduction	CRR2
<i>crr4</i>	chlororespiratory reduction	CRR4
<i>crr21</i>	chlororespiratory reduction	CRR21
<i>pgr3</i>	proton gradient regulation	PGR3
<i>sot1</i>	suppressor of thylakoid formation	SOT1
<i>ys1</i>	yellow seedlings	
<i>ecb2</i>	early chloroplast biogenesis	
<i>clb19</i>	chloroplast biogenesis	
<i>tha8</i>	thylakoid assembly	
<i>lpa66</i>	low psii accumulation	
<i>vac1</i>	vanille cream	
<i>svr7</i>	suppressor of variegation	
(葉緑体から核へのシグナル伝達経路の変異)		
<i>gun1</i>	genomes uncoupled	GUN1
(胚性致死・胚形成の変異)		
<i>emb175</i>	embryo-defective	
<i>dek2</i>	maize defective kernel	
<i>emp8</i>	maize empty pericarp	
<i>grp23</i>	glutamine-rich protein 23	GRP23
(イソプレノイド生成系の変異)		
<i>loi1</i>	lovastatin insensitive	
(不定根形成の温度感受性変異)		
<i>rrd2</i>	root redifferentiation defective	
<i>rid4</i>	root initiation defective	
(植物ホルモン応答の変異)		
<i>abo5</i>	ABA overly-sensitive	
<i>ahg1</i>	ABA hypersensitive germination	
<i>soar1</i>	suppressor of the ABA receptor-overexpressor	SOAR1
(生育遅延)		
<i>bir6</i>	buthionine sulfoximine-insensitive roots	
<i>slol</i>	slow growth	
<i>fgr1</i>	rice floury and growth retardation	
(その他)		
<i>mef1</i>	mitochondrial RNA editing factor	MEF1
<i>pnml</i>	PPR protein localized to the nucleus and mitochondria	PNM1
<i>ptac2</i>	plastid transcriptional active chromosome	pTAC2

注¹⁾本文中に出てくるPPRタンパク質のみを表記した。

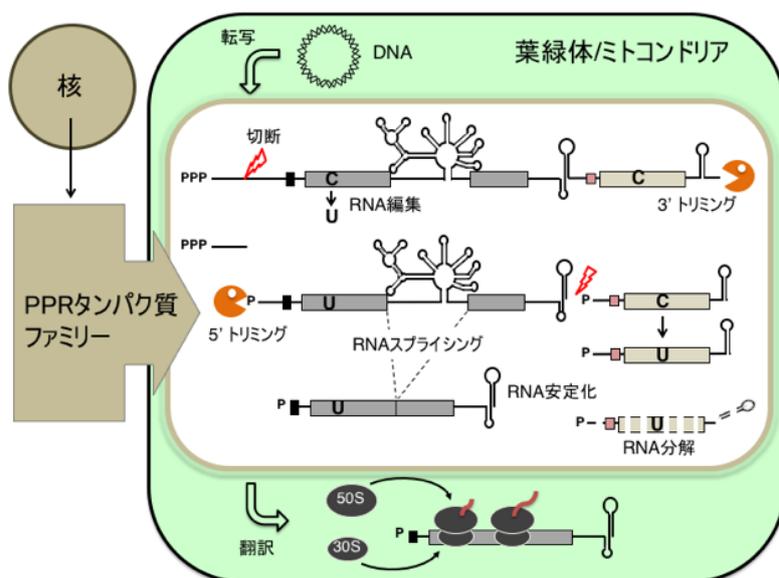


図2. 葉緑体とミトコンドリアの転写後のRNA制御とPPRタンパク質

DNA から転写された RNA 分子は様々なプロセッシングを受けて成熟 RNA になる。この転写後の RNA 制御に核コードの PPR タンパク質ファミリーが関わっている。伊藤綾花、杉田護、光合成研究 28 (1), 20-25 (2018)の図 1 を改変。

CRP1 以降の光合成に関わる PPR 研究の成果として、Meierhoff と中村らが 2003 年 *Plant Cell* 誌に HCF152 を⁶⁾、鹿内グループが 2003 年に CRR2⁷⁾を、2004 年に PGR3⁸⁾を *Plant J.*誌にそれぞれ報告した。著者らもヒメツリガネゴケの P タイプの PpPPR_38 が葉緑体 *clpP-rps12* mRNA の RNA プロセッシングに働いていることを 2007 年に報告した⁹⁾。その後、光合成や葉緑体の機能だけでなく植物の成長や代謝の調節に関わる多くの PPR タンパク質が同定された (表 1)。PPR タンパク質は特定の RNA 分子に配列特異的に結合する“遺伝子特異的 RNA 結合タンパク質”として、転写後制御や翻訳制御の様々なステップで働いていることが明らかになった¹⁰⁾ (図 2)。

2.2. 細胞質雄性不稔と稔性回復に関わる PPR タンパク質

植物で雑種を作るのに欠かせないのが花粉を作らない細胞質雄性不稔性 (cytoplasmic male sterility; CMS) という形質である。その原因遺伝子はミトコンドリアゲノムに存在する CMS 原因遺伝子 (ユニークなキメラ ORF をコード) であり、稔性を回復する核遺伝子 (*Restorer of fertility*; *Rf*) との相互作用で説明されてきた。CMS 原因遺伝子は呼吸や ATP 合成の遺伝子のすぐ近くにあることが多く、それらを阻害する働きをもってい

る。2002 年~03 年にかけて、分子実体が不明だった *Rf* 遺伝子がいくつかの作物から単離され、*Rf* 遺伝子が P タイプの PPR タンパク質をコードしていることが明らかになった。このうち、イネの *Rf-1* は風間智彦と鳥山欣也 (東北大学)¹¹⁾によって、ダイコンの *Rf* は肥塚信也 (現玉川大学教授) ら¹²⁾によって明らかにされた。その後、風間らはイネの *Rf-1* PPR タンパク質が CMS 原因遺伝子の *atp6-orf79* mRNA の遺伝子間領域に直接結合し mRNA 分解を促進することを明らかにした¹³⁾。*Rf-1* PPR タンパク質が CMS 原因遺伝子を RNA レベルで不活化するため、呼吸や ATP 合成の遺伝子が正常に働けるようになり花粉を作るためのエネルギーが作られ、稔性が回復すると説明される。

Rf 遺伝子 (核) と CMS 原因遺伝子 (ミトコンドリア) の関係は宿主と寄生虫の関係に類似していて共進化の典型的な例といえる。細胞質雄性不稔性をもたないシロイヌナズナなどの植物では *Rf* に似た *RFL* (*restorer-to-fertility-like*) を多数もっている。シロイヌナズナは 26 個の *RFL* 遺伝子をもち、その進化速度が他の PPR 遺伝子よりも速く、特に PPR モチーフ内の 3ヶ所のアミノ酸に多様化が見られることを Small ラボの藤井壮太らが明らかにした¹⁴⁾。CMS 原因遺伝子ができると

その働きを抑えるため *RFL* 遺伝子の一部が *Rf* になったと考えられる。

2.3. 3人の若手研究者が集う

Rf-1 PPR タンパク質を発見した風間が 2004 年 10 月～06 年 3 月にかけて、RNA 編集に必須な PPR タンパク質を研究していた奥田賢治（九大・鹿内研、写真 1）が 2005 年 11 月から数ヶ月間、組換え PPR タンパク質の作製と RNA 結合実験の手法（EMSA 法）を学ぶため著者の研究室に合流した。Schuster ラボでポストドクをしていた中村が彼らの技術指導に当たった。風間と奥田の実験成果が得られると、中村は 2007 年 6 月に九州大学に赴任し、独自の発想に基づく新機軸の PPR 研究を展開していった。中村が残した EMSA 法の技術は研究室の大学院生に受け継がれその後の研究に活かされた。3 人の若手研究者の研究成果が実を結んだタイミングで、2008 年 3 月第 49 回日本植物生理学会年会（札幌）でシンポジウム「オルガネラと核のクロストークに關与するタンパク質ファミリー：PPR タンパク質 – その多彩な機能を探る-」を開催することになり、肥塚信也（玉川大）、鳥山欣也（東北大）、村中俊哉（理研）、小野道之（筑波大）、鹿内利治（九大）、中村崇裕（九大）、杉田（名大）がそれぞれ最新の成果を発表した。

奥田は 2010 年に日本植物生理学会若手海外共同フェローシップの支援を受けて短期留学した Small ラボ（西オーストラリア大学）でも素晴らしい研究成果をあげたが、2013 年 11 月に突如帰らぬ人となったことは痛恨の極みである。

3. RNA 編集部位を認識する PPR タンパク質の発見

葉緑体とミトコンドリアの mRNA の特定のシチジン (C) がウリジン (U) に変換される「RNA 編集」という不可思議な現象がある。編集部位の数は種子植物の葉緑体で 30~60、ミトコンドリアで 300~600 にもなる。編集部位の数や位置は植物種によって異なり、C-to-U 編集が起こらない部位はゲノムでは T となっているケースが一般である（図 3）。ある種のシダ植物やコケ植物では C-



写真1

to-U 編集だけでなく、その逆の U-to-C 編集も起こることが知られている。

RNA 編集にどのような制御因子が働いているのであろうか。その答えは 2005 年日本発の光合成研究の成果から得られた。光合成機能変異のひとつである *chlororespiratory reduction 4 (crr4)* の原因となる核遺伝子がなんと E+タイプの PPR タンパク質をコードしていることが鹿内グループによって明らかにされた¹⁵⁾。この変異株では葉緑体 NDH 複合体サブユニットのひとつをコードする *ndhD* mRNA の NdhD-1 部位で C-to-U 編集が起こらず、そのため *ndhD* mRNA の翻訳が起こらないことがわかった。変異株に *CRR4* を入れると、

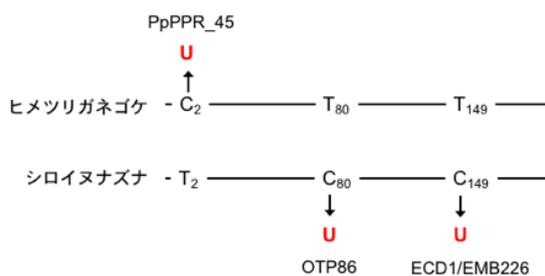


図3. ヒメツリガネゴケとシロイヌナズナの葉緑体 *rps14* 遺伝子の RNA 編集部位の比較

ヒメツリガネゴケの葉緑体 *rps14* 遺伝子の翻訳領域の 2 番目の C (C₂) は RNA 編集されるが、シロイヌナズナでは翻訳領域の 2 番目は T になっている。翻訳領域の 80 番目と 149 番目はヒメツリガネゴケでは T であるがシロイヌナズナでは C で、どちらも RNA 編集により U に変換される。それぞれの編集部位に働く PPR タンパク質を示した。

NdhD-1 部位の C-to-U 編集が回復し ACG コドンが AUG 翻訳開始コドンに変換した。CRR4 が葉緑体 *ndhD* mRNA の RNA 編集に必須な因子であり、RNA 編集因子として同定された最初のタンパク質となった。2000 年に Small が予言したとおり、PPR タンパク質が RNA 編集にも関わっていたのである。さらに翌年、CRR4 が NdhD-1 編集部位の上流に配列特異的に結合することが奥田らによって明らかにされた¹⁶⁾。その後、それぞれの RNA 編集部位に特異的に働く PPR タンパク質が次々と同定された¹⁷⁾。

4. DYW モチーフと RNA 編集のシチジンデアミナーゼ

2007年までに同定された葉緑体の RNA 編集因子は CRR4 と CRR21 の 2 種類でどちらも E+タイプの PPR タンパク質であった。次の問題は RNA 編集のシチジンデアミナーゼ反応を触媒する本体は PPR タンパク質なのか未知の因子なのかである。同年、Volker Knoop (ドイツ・ボン大学) らのグループが PPR タンパク質の DYW モチーフに着目した興味深い論文を FEBS Letters 誌に発表した¹⁸⁾。彼らは DYW モチーフにシチジンデアミナーゼに共通する Zn 結合モチーフ HxE(x)_nCxxC が含まれていること、および RNA 編集が起こる植物種は DYW モチーフをもつが、RNA 編集しないゼニゴケは DYW モチーフを持たないことを示し、「C-to-U RNA 編集のシチジンデアミナーゼは DYW モチーフである」とする仮説を提唱した。当時、ヒメツリガネゴケには E/E+タイプはないが、DYW タイプの PPR タンパク質 (PPR-DYW) が 10 種あること、及び C-to-U 編集部位が全部で 13 カ所あることをつかんでいたため、著者らは PPR-DYW タンパク質と RNA 編集の関係に着目した解析を 2008 年から集中的に行った。本解析では遺伝子ノックアウト株を作製するための遺伝子導入法としてパーティクルガン法をヒメツリガネゴケに初めて適用した。取得した *PpPPR_71* 遺伝子ノックアウト株の RNA 編集を調べたところ、ミトコンドリアの全 11 カ所の RNA 編集部位のうち *cmFc* mRNA の C122

部位の編集だけが起っていないことが判明した¹⁹⁾。さらに *PpPPR_71* がこの RNA 編集部位に配列特異的に結合することを EMSA 法で確認したので、ミトコンドリアで最初の RNA 編集因子だ! と大喜びした。しかし、論文としてはシロイヌナズナの Mitochondrial RNA Editing Factor 1 (MEF1)²⁰⁾について 2 番目になってしまったのが今でも悔やまれる。それでも最終的にミトコンドリアの全 11 カ所の編集部位に作用する 8 種の PPR-DYW タンパク質²¹⁾と、葉緑体の近接した 2 カ所の編集部位に働く DYW タイプの *PpPPR_45*²²⁾を明らかにした。これによりヒメツリガネゴケは全セットの PPR 編集因子が同定された最初の植物となったが、この成果に大学院生の一瀬瑞穂らが大きく貢献した。彼女は 10 種ある PPR-DYW タンパク質のうち残り 1 つが、RNA 編集ではなく *cox1* mRNA 前駆体のスプライシングに働くことも明らかにした²³⁾。

現在ではシロイヌナズナの葉緑体の RNA 編集部位それぞれ作用する 22 種の PPR タンパク質が同定されているが、このうち 15 種は DYW タイプで、残りは E または E+タイプである。DYW モチーフを持たない PPR タンパク質はどのようにして、標的部位を編集するのであろうか。これは E/E+タイプ PPR タンパク質が編集部位を認識し、次いで DYW モチーフのみからなるタンパク質がトランスに相互作用することにより標的部位が編集されるということによって決着がついた²⁴⁾。CRR4 (E+タイプ) と DYW1 (PPR モチーフを持たない DYW タンパク質) がその代表例である。DYW モチーフが実際にシチジンデアミナーゼ活性を有することは、ヒメツリガネゴケの *PpPPR_56* と *PpPPR_65* およびそれぞれの標的 RNA を大腸菌の中で共発現させ、RNA 編集の有無を調べた実験²⁵⁾と、組換え *PpPPR_65* タンパク質を用いた *in vitro* 実験²⁶⁾で証明された。

シロイヌナズナなど被子植物では、PPR タンパク質だけでなく様々なタンパク質と相互作用して 200 kDa の複合体 (エディトソーム) を形成している。例えば、竹中瑞樹と Axel Brennicke (ドイツ・ウルム大学) らが発見した MORF (Multiple Organellar RNA editing Factor)²⁷⁾がその代表で、そ

の他に ORRM (Organellar RRM protein)、PPO1 (ProtoPorphyrinogen IX Oxidase 1) や OZ (Organelle Zinc finger) などが相互作用因子として同定されている²⁸⁾。シロイヌナズナの *ndhD-1* 部位の編集の場合、CRR4 と DYW1 の他に少なくとも MORF2 と MORF9 の2つが働いていることになる。MORF タンパク質を介して CRR4 と DYW1 が相互作用すると考えられている。興味深いことに、シロイヌナズナで見つかった PPR タンパク質以外の編集因子はヒメツリガネゴケには存在しないようである。コケ植物では PPR-DYW タンパク質だけのシンプルな編集システムが働いていると考えられる。被子植物ではより多くの編集部位の編集に適応したシステムを進化させてきたことが伺える。

5. PPR タンパク質と標的 RNA との結合認識のしくみ

PPR タンパク質は配列特異的に結合する RNA 結合タンパク質であるが、どのように標的 RNA を認識するのであろうか。Alice Barkan (オレゴン大学) と Small らは、個々の PPR タンパク質のアミノ酸配列とその標的 RNA の塩基配列を照らし合わせた結果、PPR モチーフの 5 番目と 35(L)番目 (L は最後の残基) のアミノ酸の組み合わせで 1 塩基を認識することを見出した²⁹⁾ (図4)。この RNA 認識コードが正しいことは変異 PPR タンパク質と変異 RNA 分子を用いた EMSA 法で証明された。中村 (九大) も PPR モチーフの 2、5 と 35(L)番目の 3 アミノ酸による RNA 認識コードを提唱した³⁰⁾。P タイプの PPR10 と標的分子である *psaJ* RNA との複合体の立体構造が決定され、1 塩基が 2、5、35 番目のアミノ酸残基で囲まれていることや、5 番目の極性残基が RNA 特異性を決定するもっとも重要なアミノ酸残基であることが明らかにされた³¹⁾。今では PPR タンパク質のアミノ酸配列からターゲット配列を予測することが可能で基礎研究と応用研究の両面で利用されている。

6. 今後解決すべき課題

6.1. 機能未知の PPR タンパク質の解明

植物種によっては数百~千を超える多様な PPR タンパク質が存在するが、その機能がわかっているのはほんの一握りにすぎない。これまで解析された PPR タンパク質のほとんどが葉緑体とミトコンドリアで働くものであるが、細胞内の局在場所が不明なものや核に局在するものも存在する。例えば、PNM1 (PPR protein localized to the Nucleus and Mitochondria)³²⁾ は名前の通り核とミトコンドリアに、SOAR1 (Suppressor of the ABA Receptor-overexpressor 1)³³⁾ は核と細胞質に、GRP23 (Glutamine-Rich Protein 23)³⁴⁾ は核に局在する。PNM1 は核内でヌクレオソームアセンブリータンパク質 NAP1 と転写因子 TCP8 と相互作用しミトコンドリアタンパク質をコードする核遺伝子の発現をコントロールするだけでなく、ミトコンドリアでの翻訳に関わっていると考えられているが詳細な分子機能の解明はこれからである。

PPR タンパク質には様々な生物で保存されたアミノ酸配列ドメインをもつものがある。例えば、

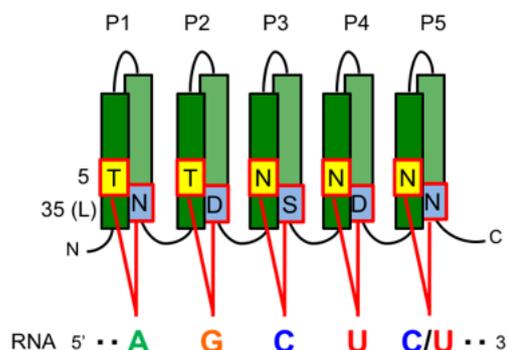


図4. PPRモチーフのRNA認識コード

PPRモチーフは2つの α ヘリックス(緑色部分と薄緑色部分)がアンチパラレルに並んだ構造を取っている。それぞれのPPRモチーフ(P1~P5)の5番目と35(L)番目のアミノ酸残基の組み合わせにより認識塩基が決まる。5番目がスレオニン(T)で35(L)番目がアスパラギン(N)だとアデニン(A)を認識し、5番目がスレオニン(T)で35(L)番目がアスパラギン酸(D)だとグアニン(G)を認識する。同様に5Nと35(L)Sでシトシン(C)を、5Nと35(L)Dでウラシル(U)を、5Nと35(L)Nだとピリミジン(C/U)をそれぞれ認識する。

SMR (Small MutS-related) や NYN (Nedd4-BP1, YacP nucleases)、RRM (RNA recognition motif)、CBS (Cystathionine- β -Synthase)などである。葉緑体の pTAC2 (plastid Transcriptional Active Chromosome2)は 2006 年に報告された PPR タンパク質で C 末に SMR ドメインをもつが詳細な分子機能は未だ不明である³⁵⁾。最近になって、SOT1 PPR タンパク質の SMR ドメインが RNA エンドヌクレアーゼ活性も持つことが報告された³⁶⁾。葉緑体から核へのレトログレードシグナリングの制御に関わる GUN1 (Genomes Uncoupled 1) が SMR ドメインをもつことは 2007 年にわかっていた³⁷⁾が、その詳細な分子機能については長い間謎であった。その分子機能をめぐって GUN1 発見者の Joanne Chory (ソーク研究所)³⁸⁾をはじめいくつかの研究グループが 2019 年に論文を出したがどれも決定打に欠いていた。同年、清水隆之と増田建(東大)らは GUN1 がヘム合成酵素の活性を調節すること、またヘムと結合してそのシグナル伝達を調節することを明らかにした³⁹⁾。ヘムが PPR モチーフにどのような様式で結合しているのか大変に興味深い。

6.2. 標的遺伝子の同定から分子レベルでの機能解明へ

E/E+タイプと DYW タイプの PPR タンパク質の多くは RNA 編集に働き、一部は RNA スプライシングに働く。これに対して、P タイプの PPR タンパク質は主に RNA の安定性やスプライシング、翻訳制御に働くものが多い。著者らも葉緑体 tRNA^{Leu} (GAU)前駆体のスプライシングに働く PpPPR_4⁴⁰⁾と *ndhA* mRNA 前駆体のスプライシングに働く PpPPR_66⁴¹⁾、*psbI-ycf12* mRNA の安定性に働く PpPPR_21⁴²⁾を同定し、それぞれの標的 RNA の結合部位を特定した。結合部位がわかれば、その PPR タンパク質の分子機能を解明する大きな手がかりとなる。しかし、ある PPR タンパク質が標的 mRNA のイントロンのある領域に結合したとして、その結合によってスプライシング反応にどのような効果を及ぼしたのかについては依然不明である。今後は標的遺伝子の同定に

とどまらず、それから先の PPR タンパク質の真の分子機能の解明が求められる。

6.3. U-to-C 編集因子も PPR タンパク質か?

RNA 編集現象が葉緑体とミトコンドリアで発見されてから 30 年となるが、C-to-U 編集の分子メカニズムに関しては多くのことが明らかにされた⁴³⁾。前に述べたように、ある種のシダ植物やコケ植物は C-to-U 編集だけでなく、その逆の U-to-C 編集も起こるが、U-to-C 編集の分子メカニズムについてはこれまで全く手つかずであった。その突破口となるべく興味深い研究成果が Knoop と Small らによって 2020 年に報告された⁴⁴⁾。彼らはツノゴケの一種である *Anthoceros agrestis* のゲノム解析とトランスクリプトーム解析を行い、葉緑体で 636 カ所の C-to-U 編集部位と 913 カ所の U-to-C 編集部位、ミトコンドリアで 496 カ所の C-to-U 編集部位と 403 カ所の U-to-C 編集部位を明らかにした。さらに、このツノゴケには 3000 余りの PPR タンパク質があり、その大半は被子植物やヒメツリガネゴケの DYW モチーフとは少し異なる”GRP タイプ”と”DRH タイプ”と名付けた DYW 相同モチーフを C 末端に持つ PPR タンパク質が 734 個存在することを突き止めた。このうち、ある GRP タイプ PPR タンパク質の PPR モチーフ RNA 認識コードから 7 カ所の U-to-C 編集部位が予想された。実際にこの PPR タンパク質が 7 カ所の U-to-C 編集部位の認識に働くのか、GRP タイプの DYW モチーフが U-to-C 編集を触媒するのかが早急に明らかにすべき課題である。

6.4. PPR ツールの開発と利用

PPR タンパク質が RNA 配列特異的に結合する特性をもつことから、PPR モチーフを改変することにより任意の標的 RNA を認識させることが可能になる。また改変 PPR タンパク質に任意の機能ドメイン (RNA 切断酵素、編集酵素、細胞内局在シグナルなど) を付加すれば、新規の機能性 PPR タンパク質を創製することができる。改変 PPR タンパク質を利用して葉緑体やアミロプラストの中で色素体ゲノムに組み込んだトランス

遺伝子の発現を活性化したり、トランス遺伝子の発現を誘導するスイッチとして PPR タンパク質を利用することが可能である⁴⁵⁻⁴⁷⁾。ミトコンドリアでも同様の研究が行われている⁴⁸⁾。CRISPR-Cas9 や TALEN が DNA 配列をターゲットにするのとは異なり、PPR タンパク質が RNA 配列をターゲットにする特性に着目して、PPR 技術を医療、産業、農業などの分野を含む広範囲なバイオ産業に応用することを目指した九大発のベンチャー企業 EditForce が 2015 年に設立された。具体的にどのような PPR ツールが飛び出すのか、今後の研究開発の進展が楽しみである。

7. おわりに

以上述べてきたように、我が国における PPR 研究レベルの高さは世界的に見ても遜色のないものと言えます。本解説では著者と関わりの深かった研究グループの話題が中心となってしまいましたが、この他にも多くの研究グループが PPR に関連したユニークな研究を行っています。著者らはヒメツリガネゴケの全 107 種の PPR タンパク質のうち、半分についてはノックアウト株またはノックダウン株を作製し解析を行ってききましたが、その成果を論文として発表できたのはさらにその半分程度でした。あともう少しと思いつつ、2020 年 3 月に定年退職を迎えてしまいました。この 10 年来よきライバルであった Knoop ラボがヒメツリガネゴケの PPR 研究を発展させてくれることを願っています。これから光合成研究を牽引していく学生や若手研究者の方がどこかで PPR 研究に足を踏み入れることがあるかもしれません。その時に本解説記事があったことを思い出していただければ幸いです。

最後に、本解説を執筆する機会を与えていただいた本誌編集委員の高林厚史先生と成川礼先生に感謝いたします。

Received Oct 20, 2020; Accepted Nov 5, 2020; Published Dec 31, 2020.

参考文献

1. Aubourg, S. et al. (2000) In *Arabidopsis thaliana*, 1% of the genome codes for a novel protein family unique to plants. *Plant Mol. Biol.* 42, 603–613.
2. Small, S. and Peeters, N. (2000) The PPR-motif – a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem. Sci.* 25, 46–47.
3. Fisk, D.G. et al. (1999) Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. *EMBO J.* 18, 2621–2630.
4. Lurin, C. et al. (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16, 2089–2103.
5. Hattori, M., Hasebe, M. and Sugita, M. (2004) Identification and characterization of cDNAs encoding pentatricopeptide repeat proteins in the basal land plant, the moss *Physcomitrella patens*. *Gene* 343, 305–311.
6. Meierhoff, K. et al. (2003) HCF152, an *Arabidopsis* RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast *psbB-psbT-psbH-petB-petD* RNAs. *Plant Cell* 15, 1480–1495.
7. Hashimoto, M. et al. (2003) A nucleus-encoded factor, CRR2, is essential for the expression of chloroplast *ndhB* in *Arabidopsis*. *Plant J.* 36, 541–549.
8. Yamazaki, H., Tasaka, M. and Shikanai, T. (2004) PPR motif of the nucleus-encoded factor, PGR3, function in the selective and distinct steps of chloroplast gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* 38, 152–163.
9. Hattori, M., Miyake, H. and Sugita, M. (2007) A pentatricopeptide repeat protein is required for RNA processing of *clpP* pre-mRNA in moss chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 282, 10773–10782.
10. Barkan, A. and Small, I. (2014) Pentatricopeptide repeat proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 12.1–12.28.
11. Kazama, T. and Toriyama, K. (2003) A pentatricopeptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant *atp6* RNA of cytoplasmic male-sterile rice. *FEBS Lett.* 544, 1873–3468.
12. Koizuka, N. et al. (2003) Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, *orf687*, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile *Kosena* radish. *Plant J.* 34, 407–415.
13. Kazama, T. et al. (2008) Suppression mechanism of mitochondrial ORF79 accumulation by Rf1 protein in

- BT-type cytoplasmic male sterile rice. *Plant J.* 55, 619–628.
14. Fujii, S., Bond, C.S. and Small, I.D. (2011) Selection patterns on restorer-like genes reveal a conflict between nuclear and mitochondrial genomes throughout angiosperm evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 1723–1728.
 15. Kotera, E., Tasaka, M. and Shikanai, T. (2005) A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* 433, 326–330.
 16. Okuda, K. et al. (2006) A pentatricopeptide repeat protein is a site-recognition factor in the plastid RNA editing. *J. Biol. Chem.* 281, 37661–37667.
 17. Takenaka, M. et al. (2013) RNA editing in plants and its evolution. *Annu. Rev. Genet.* 47, 335–352.
 18. Salone, V. et al. (2007) A hypothesis on the identification of the editing enzyme in plant organelles. *FEBS Lett.* 581, 4132–4138.
 19. Tasaki, E., Hattori, M. and Sugita, M. (2010) The moss pentatricopeptide repeat protein with a DYW domain is responsible for RNA editing of mitochondrial *ccmFc* transcript. *Plant J.* 62, 560–570.
 20. Zehrmann, A. et al. (2009) A DYW domain-containing pentatricopeptide repeat protein is required for RNA editing at multiple sites in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21, 558–567.
 21. Ichinose, M. et al. (2013) Two DYW subclass PPR proteins are involved in RNA editing of *ccmFc* and *atp9* transcripts in the moss *Physcomitrella patens*: First complete set of PPR editing factors in plant mitochondria. *Plant Cell Physiol.* 54, 1907–1916.
 22. Ichinose, M., Uchida, M. and Sugita, M. (2014) Identification of a pentatricopeptide repeat RNA editing factor in *Physcomitrella patens* chloroplasts. *FEBS Lett.* 588, 4060–4064.
 23. Ichinose, M. et al. (2012) A PPR-DYW protein is required for splicing of a group II intron of *coxI* pre-mRNA in *Physcomitrella patens*. *Plant J.* 70, 271–278.
 24. Boussardon, C. et al. (2012) Two interacting proteins are necessary for the editing of the NdhD-1 site in *Arabidopsis* plastids. *Plant Cell* 24, 3684–3694.
 25. Oldenkott, B. et al. (2019) Plant-type pentatricopeptide repeat proteins with a DYW domain drive C-to-U RNA editing in *Escherichia coli*. *Commun. Biol.* 2, 1–8.
 26. Hayes, M.L. and Santibanez, P.I. (2020) A plant pentatricopeptide repeat protein with a DYW-deaminase domain is sufficient for catalyzing C-to-U RNA editing *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 295, 3497–3505.
 27. Takenaka, M. et al. (2012) Multiple organellar RNA editing factor (MORF) family proteins are required for RNA editing in mitochondria and plastids of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 5104–5109.
 28. Sun, T., Bentolila, S. and Hanson, M. (2016) The unexpected diversity of plant organelle RNA editosomes. *Trends Plant Sci.* 21, 962–973.
 29. Barkan, A. et al. (2012) A combinatorial amino acid code for RNA recognition by pentatricopeptide repeat proteins. *PLoS Genet.* 8, e1002910.
 30. Yagi, Y. et al. (2013) Elucidation of the RNA recognition code for pentatricopeptide repeat proteins involved in organelle RNA editing in plants. *PLoS ONE* 8, e57286.
 31. Yin, P. et al. (2013) Structural basis for the modular recognition of single-stranded RNA by PPR proteins. *Nature* 504, 168–171.
 32. Hammani, K. et al. (2011) An *Arabidopsis* dual-localized pentatricopeptide repeat protein interacts with nuclear proteins involved in gene expression regulation. *Plant Cell* 23, 730–740.
 33. Jiang, S.C. et al. (2014) A hub for ABA signaling to the nucleus: Significance of a cytosolic and nuclear dual-localized PPR protein SOAR1 acting downstream of Mg-chelatase H subunit. *Plant Sig. Behav.* 9:11, e972899-1.
 34. Ding, Y.H. et al. (2006) *Arabidopsis* *GLUTAMINE-RICH PROTEIN23* is essential for early embryogenesis and encodes a novel nuclear PPR motif proteins that interacts with RNA polymerase II subunit III. *Plant Cell* 18, 816–830.
 35. Pfalz, J. et al. (2006) pTAC2, -6, and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression. *Plant Cell* 18, 176–197.
 36. Zhou, W. et al. (2017) PPR-SMR protein SOT1 has RNA endonuclease activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, E1554.
 37. Koussevitzky, S. et al. (2007) Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* 316, 715–719.
 38. Zhao, X., Huang, J. and Chory, J. (2019) GUN1 interacts with MORF2 to regulate plastid RNA editing during retrograde signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 10162–10167.
 39. Shimizu, T. et al. (2019) The retrograde signaling protein GUN1 regulates tetrapyrrole biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 24900–24906.

40. Goto, S. et al. (2016) P-class pentatricopeptide repeat protein PTSF1 is required for splicing of the plastid pre-tRNA^{Leu} in *Physcomitrella patens*. *Plant J.* 86, 493–503.
41. Ito, A. et al. (2018) An evolutionarily conserved P-subfamily pentatricopeptide repeat protein is required to splice the plastid *ndhA* transcript in the moss *Physcomitrella patens* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 94, 638–648.
42. Ebihara, T. et al. (2019) The P-class pentatricopeptide repeat protein PpPPR_21 is needed for accumulation of the *psbI-ycf12* dicistronic mRNA in *Physcomitrella* chloroplasts. *Plant J.* 97, 1120–1131.
43. Small, I.D. et al. (2020) Plant organellar RNA editing: what 30 years of research has revealed. *Plant J.* 101, 1040–1056.
44. Gerke, P. et al. (2020) Towards a plant model for enigmatic U-to-C RNA editing: the organelle genomes, transcriptomes, editomes and candidate RNA editing factors in the hornwort *Anthoceros agrestis*. *New Phytol.* 225, 1974–1992.
45. Yu, Q., Barkan, A. and Maliga, P. (2019) Engineered RNA-binding protein for transgene activation in non-green plastids. *Nature Plants* 5, 486–490.
46. Rojas, M. et al. (2019) Engineered PPR proteins as inducible switches to activate the expression of chloroplast transgenes. *Nature Plants* 5, 505–511.
47. McDermott, J.J. et al. (2019) Ribonucleoprotein capture by *in vivo* expression of a designer pentatricopeptide repeat protein in Arabidopsis. *Plant Cell* 31: 1723–1733.
48. Colas des Francs-Small, C., Pereira Sanglard, L.V. and Small, I. (2018) Targeted cleavage of *nad6* mRNA induced by a modified pentatricopeptide repeat protein in plant mitochondria. *Commu. Biol.* 1, 166.

Opening and current progress of PPR research in photosynthesis: outgoing from Japan

Mamoru Sugita

Graduate School of Informatics, Nagoya University

解説

“NAD World”から見た光合成: 電子受容体 NADP⁺はどこから来る?

電力中央研究所 環境科学研究所

橋田 慎之介*

光合成反応は光を利用し化学エネルギーを ATP と NADPH として合成する。これらは炭酸固定などの下流の反応で利用され、ADP や NADP⁺として光化学系で再利用される。強光環境におけるエネルギー供給過剰や、低温ストレスによるエネルギー消費抑制などにより、供給が需要を超え続けると NADP⁺が枯渇することでリニア電子伝達反応 (LEF) では電子流量が低下し、代替的な電子伝達反応へ電子が分配される。これまで多くの研究によって NADP の酸化還元バランスと光合成電子伝達反応の制御について明らかにされてきた。しかしながら、還元型である NADPH の測定に依存するところが大きく、光合成誘導期に電子受容体 NADP⁺がどのようにして供給されるのかほとんど評価されてこなかった。本稿では、NADP⁺供給という視点から、「NAD ワールド」と光合成との関りについて、最新の知見を交えつつ解説する。

1. はじめに

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) は、1 世紀以上前に発見された 664 Da の分子であり¹⁾、全ての生物種に存在する補酵素として、特に酸化還元反応で中心的な役割を果たしている²⁻⁶⁾。酸化型である NAD⁺から還元型の NADH への電子授受反応では NAD⁺と NADH の総量 (NAD プール) は変化しないが、実際の細胞活動において、NAD を “消費する” 様々な生化学反応によって NAD プールはダイナミックに変化する。近年ではこうした反応が種々の細胞イベントにおいて重要であることが報告されており、哺乳類では 2009 年に代謝・生物リズム・寿命制御を緊密に結ぶ全身性の統括的制御機構として、“NAD ワールド” の概念が提唱された⁷⁻⁹⁾。ここでは、NAD プールの消費反応と合成反応の連携による多重のフィードバックループを介した動的な制御システムがダイナミクスの根幹となっている。

植物においても NAD ワールドの概念を支持する結果が蓄積しつつあり、種子や花粉の休眠性、気孔形成や開閉運動、葉の老化制御等に深く重要

な役割を果たしている¹⁰⁻¹⁶⁾。ただし、植物の NAD ワールドにおいては、NAD のリン酸化型である NADP が日中の光合成反応の電子受容体として大きな役割を担うことから、NADP ダイナミクスが極めて重要なコンポーネントとして位置づけられる。NADP は NAD と同様に細胞の様々な酸化還元反応を触媒する補酵素であるが、その基本的な役割は同化反応にある。NAD が細胞のエネルギー獲得プロセスにおける有機物の酸化剤として、異化反応に専ら作用するのに対して¹⁷⁾、NADP は光合成の光化学系で保存された光還元力のサプライヤとして重要な役割を担うことから、同化反応への寄与が大きい¹⁸⁾。光条件に応じて NADP の酸化還元比が変動することは至極当然であり、これまでの光合成研究の過程で光照射条件に応答した NADP⁺から NADPH の生成動態が数多く観測されてきている。しかし、これらの研究のほとんどは NADPH 蛍光の計測であり¹⁹⁻²¹⁾、その時の NADP⁺量や NADP プール全体についての精査データは報告されてこなかった。近年、NADP⁺と NADPH を簡便かつ精密に計測する定

*連絡先 E-mail: shashida@criepi.denken.or.jp

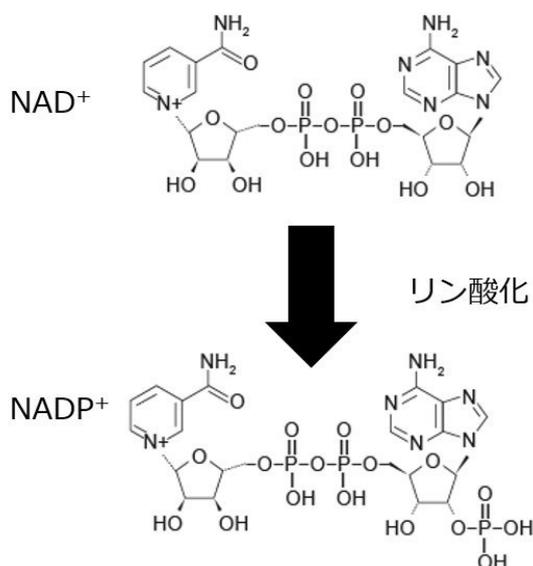


図1. NAD⁺リン酸化によるNADP⁺合成

量手法が確立され^{22, 23)}、光照射時に NADP⁺の合成が活性化され、NADP⁺と NADPH の総量 (NADP プール) が大幅に増加することが報告された²⁴⁾。ここで、NADP⁺の合成には NAD⁺と ATP が必要となることから新たな疑問が生じる。光照射直後の葉緑体にはリニア電子伝達反応 (LEF) を駆動するために十分量の電子受容体 NADP⁺が存在するのか? 明期に電子受容体としての NADP⁺はどこから来て暗期にどこへ行くのか? NADP⁺合成に必要な ATP や NAD⁺はどこから供給されるのか? 本稿では、NADP⁺供給という視点から光合成と植物の NAD ワールド関連についての知見を紹介するとともに、これらの疑問について解説する。

2. 光合成への主要な NADP⁺供給経路

NADP は NAD のリン酸化反応によって合成される²⁵⁾ (図 1)。生物種によって NAD リン酸化酵素(NADK)の遺伝子数や反応の場は様々だが、少なくとも植物では細胞質型、ペルオキシソーム型と葉緑体型の 3 タイプの存在が明らかになっている²⁶⁻²⁹⁾。NADK は歴史的には 1980 年に植物初のカルシウム/カルモジュリン (CaM) によって制御されるタンパク質として報告された酵素だ

が、40 年後の現在でもその活性制御メカニズムについては未だに結論が出ていない³⁰⁻³³⁾。シロイヌナズナの NADK2 は葉緑体型であり、CaM 結合が報告されていたことから、光合成への NADP⁺供給に CaM 制御が関与することが示唆されていた³⁴⁾。しかしながら、CaM の結合と NADK2 の活性に関連性はなく、近年新たに同定された NADK ドメインを持たない NADKc タンパク質が、CaM 制御下で NADK 活性を示すことが明らかとなった³⁵⁾。ただし、NADKc はこれまでに NADK で報告のなかったミトコンドリア型として報告されており (図 2)、現状で葉緑体での機能が推定されるのは NADK2 だけである³⁶⁾。さらに、*nadk* 欠損変異体の中で、生育遅延や矮小化、葉の黄化や光合成活性の低下など葉緑体 NADP⁺供給不全の影響と推定される表現型が認められるのは唯一 *nadk2* 変異体だけである^{37, 38)} (図 3)。葉緑体における NADP 合成活性が損なわれた変異体が生存可能という事実は、細胞質からの膜輸送を介した NADP⁺の部分的な補填や NADK2 非依存的な経路の存在も示唆するが、何れにしても NADK2 を介した NADP⁺合成が葉緑体における主要な NADP⁺供給源と考えられる。

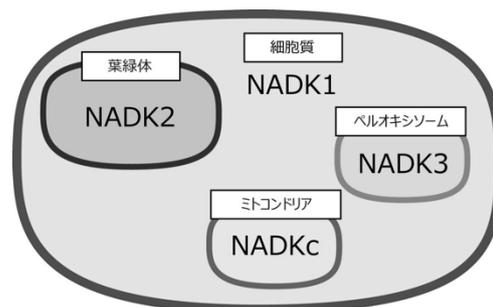


図2. 植物細胞のNADリン酸化酵素の細胞内局在 Waller et al. (2009)²⁹⁾およびDell'Aglio et al.(2019)³⁵⁾の報告をもとに、シロイヌナズナで同定されたNADリン酸化酵素の局在性について示した。各酵素の Accession No.はNADK1、NADK2、NADK3およびNADKcは、それぞれ At3g21070、At1g21640、At1g78590およびAt1g04280。



図3. シロイヌナズナ *nadk2* 変異体の表現型

3. 光環境変化に対する NADP プールサイズの変動

光合成で生成した NADPH は、炭酸同化過程を始めとした還元反応に利用されて再び NADP⁺ となり、光化学系の電子受容体として供給される (図 4 赤矢印)。当然、LEF 活性やレドックス

シャトル活性やサイクリック電子伝達反応 (CEF) の活性とのバランスによって NADPH 生成と利用が複雑に制御され、総合的な結果として葉緑体の NADPH/NADP⁺ の動的平衡が保たれ得る³⁹⁻⁴³⁾。この時、光強度や外気温などの環境変化により、NADPH 生成と利用のバランスが攪乱されると NADPH/NADP⁺ 比が変動するが、NADP の量的な変化についてはあまり着目されていない。例えば、光の当たらない夜・暗所では光化学系で NADPH が生成しない。この時、葉緑体の NADP プールはほとんどが NADP⁺ として存在するのだろうか？ 実際には 10 数分間の遮光によって NADPH だけではなく NADP⁺ も大幅に減少し、1 時間以内に基底レベルまで低下する。暗順化後に光再照射すると、生育光条件 (80 μmol m⁻²s⁻¹) では NADPH と NADP⁺ の双方の増加が観測され、1 時間程度

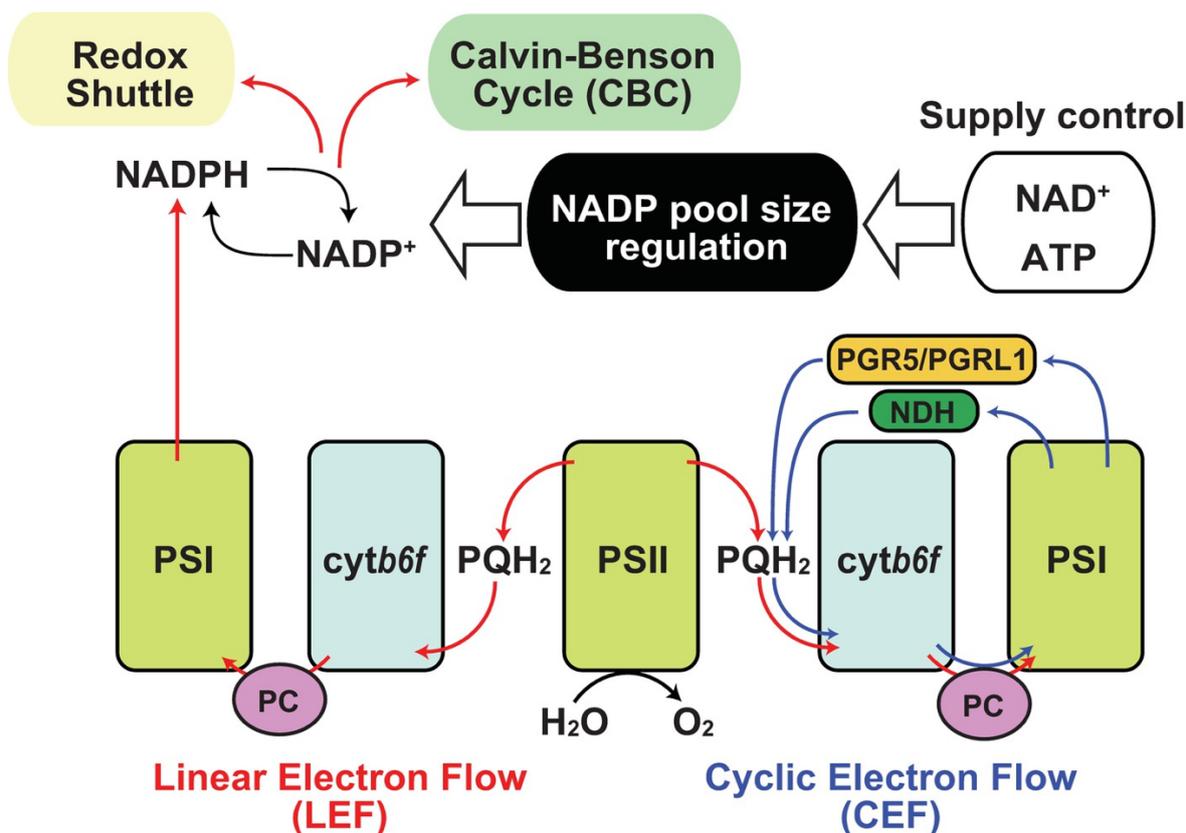


図4. 光合成における NADP プールサイズ制御の位置づけ

赤矢印はリニア電子伝達 (LEF) における電子の流れを示しており、青矢印はサイクリック電子伝達 (CEF) における電子の流れを示している。黒矢印は分子返還を示している。本図は全て Hashida et al. (2019)⁷²⁾ より引用した。

で NADP プールは飽和する²⁴⁾ (図 5)。この光環境にตอบสนองした NADP プールサイズの変動は *nadk2* 変異体では完全に消失することから、光によって制御されるのは葉緑体内の NADP プールと推定できる。この時、NADP⁺の増加は NADPH に先んじて検出されることから、*de novo* の NADP⁺供給が LEF 活性化に重要なプロセスだと分かる。言い換えると、光合成誘導期には完全な LEF 駆動に必要となる NADP⁺が不足しており、NADP⁺供給システムが電子分配に寄与しているのかもしれない。光合成誘導期にはカルビンサイクルや光呼吸が完全に活性化する前段階であることから、これまでも NADP⁺の再生が律速となって電子が CEF へと分配されると予想されてきた^{44, 45)}。光合成誘導の初期には *de novo* NADP⁺供給そのものが電子分配の決定要因となり得るであろう。

NADP⁺と NADPH 間の酸化還元状態の交換反応と、光環境に応じて電子伝達を制御するシステムの背後で NADP プールサイズが調節される事実は、葉緑体内部に NADP の合成と分解を綿密に制御するシステムが存在することを意味する (図 4)。光化学系の電子分配における NADP⁺供給の作用機序や、光合成全体における真の ATP 要求量等を考える上で、葉緑体 NADP ワールドのシステムダイナミクスを理解する試みは着目に値するのではないだろうか。

4. NADP プールサイズ減少に関わる経路

光化学系における酸化還元反応以外で、NADP はどのような反応経路に供されるのだろうか？植物の NADP プールサイズの制御因子として NADP⁺または NADPH の分解経路について研究された事例はなく、葉緑体 NADP 代謝経路については不明な点が多い (図 6)。現状で明確にその存在や意義が示されたのはシロイヌナズナの葉緑体型 Nudix Hydrolase19 (AtNUDX19) による NADPH の選択的分解に限定される⁴⁶⁾。この反応では、NADPH 分子内の NAD 骨格を加水分解する事で、NADPH 分子を反応系から除去する⁴⁷⁾。強光条件等で処理しきれない還元力の消去経路として、光合成とストレス応答/防御系のバランス制御において重要な機能を果たしている。しか

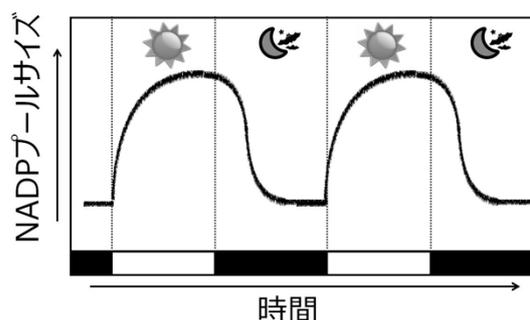


図5. 葉緑体NADPプールサイズの光応答

しながら、この系では NUDX によって分解された NADPH は葉緑体内部で容易に NADP⁺へと再生されず、同時進行する *de novo* NADP⁺合成と連携した NADPH の分解によって NADP プールサイズが維持されていると考えられる。すなわち、強光環境下の NADP プールの動的平衡に寄与する反応であり、光合成誘導過程やその逆の過程の際に生じる NADP プールサイズの増減に寄与する反応とは趣が異なる。

動物細胞の普遍的なカルシウム放出因子として知られる Nicotinate Adenine Dinucleotide Phosphate (NaADP) 分子は、植物細胞でも作用することが知られている^{48, 49)}。NADP⁺分子内のニコチンアミドがニコチン酸に置換されて生じるため NADP プールサイズの減少に寄与しうる⁵⁰⁾。NUDX による分解とは異なり、1 ステップのアミド化反応で NADP⁺を再生できる可能性がある。分子内ニコチン酸のアミド化反応は NAD⁺合成の最終反応と同様である事からも、葉緑体内部で NADP⁺を一過的に電子受容体プールから隔離する上では興味深い反応経路である。ただし、現状では植物で NaADP 合成に作用する酵素タンパク質だけでなく、葉緑体でニコチン酸のアミド化に作用する酵素タンパク質も未同定であることに加え、NaADP 分子そのものが検出されていないため NADP プールサイズ制御への関与を議論するには課題が多い。

最も単純な NADP⁺代謝反応は NADP phosphatase (NADPPase) による NADP⁺の脱リン酸化反応で NAD⁺へと戻す反応であろう。光化学

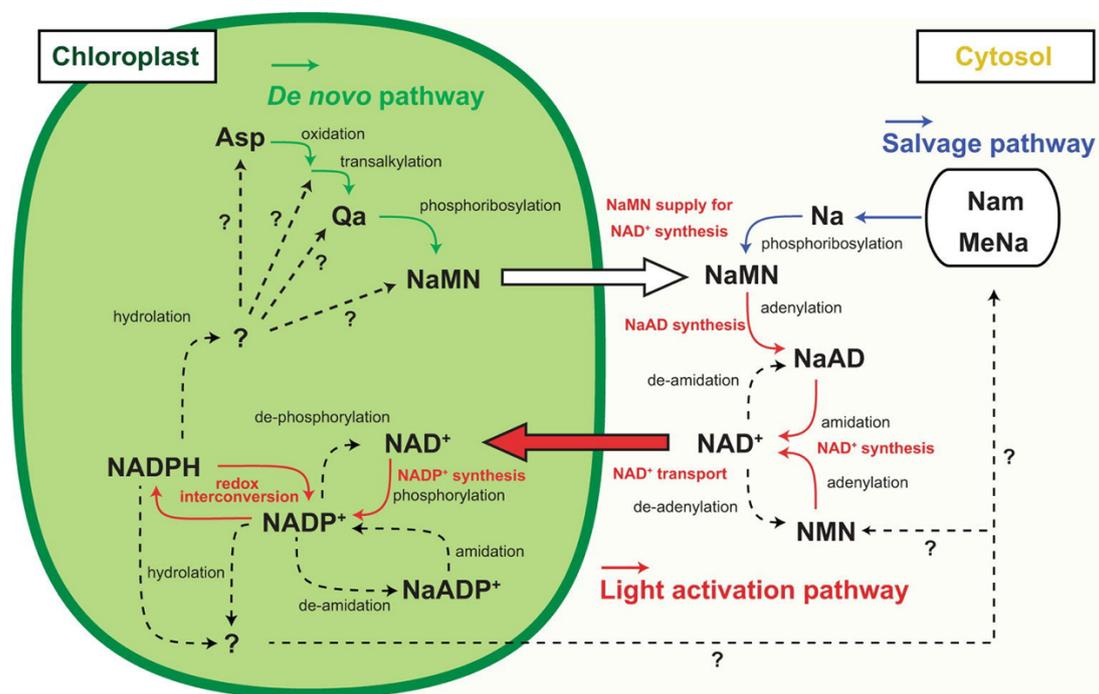


図6. 葉緑体NADPダイナミクスに関わるNAD生合成代謝

実線は同定済みの反応経路を、破線は未同定の反応経路を示している。緑線は*de novo*経路、青線は*salvage*経路、赤線は明条件での活性化が確認される経路を示している。本図は全てHashida et al.(2019)⁷²より引用した。

系が機能しない暗所では、カルビン回路の不活性化型酵素複合体の安定化に NAD^+ が寄与しており⁵¹⁾、暗期に NADP が豊富に存在すると速やかなカルビン回路の不活性化に都合が悪い。従って、カルビン回路の活性抑制には NADP/NAD 比の減少も欠かせない。植物の NADPPase 活性は古くから報告されており、休眠種子の包括的な代謝制御に関与することが示唆されている¹⁶⁾。 NADP/NAD 比をコントロールすることによって NADP 依存的な代謝反応活性を低レベルに保ち、休眠状態を維持すると考えられ、興味深いことに同様の概念が休眠花粉においても適用できる。休眠性の花粉では NADP/NAD 比が低く抑えられており、花粉管の発芽と伸長に必要な同化代謝活性を低い状態で維持している⁵²⁾。以上の例からも、 NADP/NAD 比を調節する上で NAD および NADP それぞれのプールサイズの制御が重要な役割を担うことは明らかであるが、未だに植物の NADPPase の分子実態は不明である。少なくとも、光条件変化に応答した NADP プールの減少に呼

応して NAD プールの増加は確認される(未発表)。現状では葉緑体における NADPPase 活性の報告はなく、この現象には NADP の脱リン酸化だけではなく NUDX や他の NADP 代謝反応、さらに葉緑体への NAD 輸送や NADK 活性など未解明の制御経路が複合的に関与すると考えられる。葉緑体 NADP プールサイズの制御に関わる遺伝学的な解析が進展中であり、今後新たな因子の同定が期待される。古細菌では NADK が NADPPase 活性も同時に持つことが報告されており、この領域における今後の研究のさらなる発展にも非常に興味を持たれる⁵³⁾。

5. NADP プールサイズ増大に関わる経路

葉緑体における NADP^+ 供給の大部分は NAD^+ のリン酸化反応であるため、そこには NADK 活性と同時に基質となる NAD^+ と ATP の供給も欠かせない。 NAD ワールドの概念に基づいて、光条件下における NADP 合成と消費のバランスでプールサイズの動的平衡があるとすれば、この反

応に関わる要素の1つでも欠けると NADP プールサイズは減少する。

細胞質型の NADK のアミノ酸配列は活性ドメインから構成されるシンプルな構造であり、その活性の大部分は転写制御によると考えられている²⁶⁾。一方で、葉緑体型 NADK は他の NADK とは大きく異なる特徴があり、NADK ドメインの N 末端側に 600 残基超の長いアミノ酸伸長配列を持つ⁵⁴⁾。酵素活性は保存性の高い NADK ドメイン単独で検出されることから、N 末端配列は酵素活性の制御機能を持つと推定されている。実際に、暗順化後のシロイヌナズナのロゼット葉から抽出したタンパク質では、NADK 活性は野生型 (Col-0 系統) と *nadk2* 変異体で同程度であるが、野生型では光照射あるいは還元剤処理によって NADK 活性が上昇するため²⁴⁾、葉緑体型 NADK2 では光還元制御を受ける可能性が示唆されている。葉緑体におけるレドックス制御に関する研究が精力的に進展する中で、NADK2 が標的分子候補として未だ報告されない事実から、他の酸化還元分子を介した間接的な光還元制御を受ける可能性も考慮する必要があるだろう。少なくとも細菌性の NADK では活性の発現に 4 量体化が必要であることが明らかとなっていることから⁵⁵⁾、複合体形成に N 末端側ドメインが関与する可能性が示唆される。今後の NADK2 を中心とする生化学研究の進展が期待される。

光合成誘導過程の初期段階として NADP⁺合成が駆動されるという事実は、他の分子プールの存在についても再考する価値があるのではないかと。つまり、NADP⁺を合成する材料として必要な ATP と NAD⁺について、光照射開始時に両分子の供給が律速となる可能性について検討する。光化学系によって形成された proton motive force (*pmf*) により ATP 合成が駆動されるが、光合成誘導期の NADP プールの挙動を考慮すると、初発の ATP 合成を駆動する *pmf* は LEF 由来とは考え難い。事実、光合成誘導時には CEF が光合成定常期の LEF 並みの活性を持つことが報告されており⁴⁵⁾、光合成誘導期に要求される ATP 依存性の反応系と同様に NADP⁺合成に対しても CEF の関与が考えられる。CEF 欠損変異体で観察される光合成活

性の低下や変動光環境下での生育不良の要因として NADP プールの応答遅延等も生じていたと考えるのも自然であろう⁵⁶⁾。

先述の通り、暗期のカルビン回路の活性抑制に NAD⁺が機能しているため、一定レベルの NAD⁺は常に葉緑体中に存在している。光照射に応答して NADP⁺が合成されると、その対価として NAD⁺は消費されるが、光合成誘導後の NADP プールサイズから、新たな NAD⁺供給があることは明白である。葉緑体型 NADK 遺伝子を過剰発現した実験によって、NADP⁺合成を強化して NADP プールサイズを増大させた場合でも、細胞内の NAD プールサイズが低下しないことが明らかとなっており³⁸⁾、葉緑体 NADP⁺合成あるいはこれに伴う葉緑体 NAD⁺消費が引金となって NAD⁺合成が活性化される可能性が示唆されている。逆に、NAD⁺合成を活性化して細胞内 NAD プールを増大させることによって NADP プールも増大することから¹⁵⁾、NADP⁺合成と NADP プールサイズ制御において NAD⁺供給が果たす役割は大きい。それでは、葉緑体 NADP⁺合成で消費される NAD⁺はどこから供給されるのだろうか？

NAD⁺生合成の最終反応は Nicotinate Adenine Dinucleotide (NaAD) のアミド化反応であり、この反応を触媒する NAD synthetase (NADS) は細胞質に局在することが示されている¹³⁾。各オルガネラ (葉緑体、ペルオキシソーム、ミトコンドリア) の代謝反応 (NADP⁺合成を含む) 需要に応じた、細胞質で集中的に NAD 合成が制御され、能動輸送によってそれぞれの場に供給されるシステムとなっている。従って、葉緑体における NAD⁺需要を満たすためには細胞質からの糖ヌクレオチド輸送が不可欠である。これまでに植物の NAD⁺輸送体として Mitochondria Carrier Family タイプのヌクレオチド輸送体が報告されており、ペルオキシソームでは PNX^{57,58)}、ミトコンドリアでは NDT1 および NDT2 が同定されている^{59,60)}。GFP 融合タンパク質の局在性からは NDT1 が葉緑体輸送に関与と推定されていたが⁶¹⁾、その後同一グループによってミトコンドリアでの機能が報告され⁵⁹⁾、残念ながら葉緑体の NAD⁺輸送に関する手掛かりは一旦消滅している。

6. 光合成と NAD ワールド

光合成誘導後の定常 LEF 活性は NADP プールの増大によって支えられており、NADP プールサイズは細胞質からの NAD⁺ 輸送供給によって補償されている。植物の NAD⁺ は *de novo* 合成と *salvage* 合成の 2 種の経路から供給されることが知られており、細胞質で Nicotinate Mononucleotide (NaMN) から Nicotinate Adenine Dinucleotide (NaAD) を経て NAD⁺ となる最後の 2 反応を共有している⁶²⁾。興味深いことに、NAD プールサイズに対して最後の 2 反応は影響が小さく^{13, 15)}、NaMN 合成の上流反応の強化によって NAD プールサイズが顕著に増大することが知られている。Petriacq らは、*de novo* 経路の中間体である Quinolate (Qa) の添加ならびに Quinolate Phosphorybosyltransferase (QPT) の強化を組み合わせることで顕著に NAD プールを増大させることに成功した⁶³⁾。Wu らは *salvage* 経路の中間体である Nicotinate (Na) を可逆的にメチル化する酵素を同定するとともに、Methylnicotinate (MeNA) が長距離輸送先で NAD⁺ へと合成されることを見出した⁶⁴⁾。Qa は QPT によって 1 ステップで NaMN へと変換され、Na は Nicotinate Phosphorybosyltransferase (NaPT) によって 1 ステップで NaMN へと変換されることから、NaMN 供給が NAD プールサイズ制御のボトルネックである (図 6)。従って、光合成誘導期の葉緑体 NADP⁺ 合成は NaMN 供給経路の活性化と連携する必要がある。

NaMN 供給に資する両経路の最も大きな違いは反応の場である。細胞質で進行する *salvage* 経路に対して、*de novo* 経路は葉緑体で進行する⁶⁵⁾。すなわち、合成された NaMN は非効率ではあるものの、NAD⁺ へと変換されるためには 1 度細胞質へと輸送される必要がある。ここでも輸送経路が不明であり、鍵となる NaMN 輸送体の同定が待たれる。しかしながら、興味深いことに *de novo* 経路の初反応である L-aspartate oxidase (LASPO) は光制御を受けるとともに、NADP⁺ の存在によって酵素活性が競合的に阻害されることが知られている⁶⁶⁾。さらに、次のステップを触媒する Qa synthase (QS) は還元環境で活性化され、葉緑体

レドックス制御を受ける可能性が示唆されている^{12, 67)}。このように、1) *de novo* 経路による NaMN 合成は葉緑体内部で進行する、2) 葉緑体 NADK 活性と同様に光条件で促進的に制御されるという 2 点から、NADP プール増大に寄与する NaMN 供給には *de novo* 経路が重要な役割を果たす可能性が高いと考えられる。また、作用経路については不明であるが、NADP⁺ 合成が Fd/Trx-m 経路を介して抑制的に制御される点も興味深い²⁴⁾。葉緑体の L-aspartate を始発点として、2 回の細胞質/葉緑体間の中間体輸送を介し、葉緑体で NADP⁺ が合成される一連の過程では、少なくとも 1 分子の Dihydroxyacetone phosphate (DHAP) と 5-Phosphoribosyl 1-diphosphate (PRPP) に加えて 3 分子の ATP が必要となる⁶²⁾。複雑な葉緑体レドックス制御経路によって、促進/抑制の双方向で NADP⁺ 合成を調節し、過剰な ATP の消費を巧妙に防いでいるのであろう。

7. おわりに

過剰な光環境で電子受容体である NADP⁺ が枯渇すると LEF が渋滞してしまう。この時、還元力輸送によって積極的に NADPH から NADP⁺ を再生するシステムや、CEF へと電子を流すことで LEF の渋滞を解消するシステムによって、何とかして NADP⁺ を再生供給しようとする。こうした応答は、足りない NADP⁺ を新たに生合成して NADP プールを大きくする方法が“ない”ことを意味するだろうか？実際には NADP プールを増大させることで強光条件での光合成活性が向上するなどポジティブインパクトが得られる⁶⁸⁾。それだけではなく、光環境に応答して葉緑体 NADP プールは増減を繰り返すなど、NADP ダイナミクスは光合成制御の 1 モジュールとして機能しているようである。ただし、このモジュールは NADP 合成代謝として独立した系ではなく、NADP⁺ の合成には ATP が必要であり、ATP の合成には電子伝達が必要である。すなわち NADP プールサイズによって電子伝達が制限され、電子伝達によって NADP プールサイズが制御されるという交互作用が存在している。一般的な教科書で紹介される光合成 (特に光化学系) の説明図で

は、NAD⁺が当たり前の様に供給されるがごとく記載されているが、現実では、光合成誘導期に他のシステムと連携した綿密な *de novo* 供給制御過程を経て存在しているのである。NAD や NADP といった生命の代謝反応に不可欠な酸化還元補酵素は、あまりにも重要であるため細胞が生きている限り定常的に存在するかの様に錯覚することがしばしばある。しかし、NAD、NADP プールサイズは、合成と代謝とのバランス制御によって巧妙に維持されており、代謝活性の異なる器官によってそのプールサイズも様々である⁶⁹⁾。この数十年で合成経路や合成遺伝子の同定は進み、大部分の合成経路は明らかとなったが、NAD や NADP の代謝経路・制御メカニズム・輸送システムについては未だ不明な点が多い。NAD⁺/NADPH 定量方法の改良や高度化に伴い、葉緑体NADPプールの光応答を始めとして、様々な環境変動に対する細胞のNADプールとNADPプールの応答性についても明らかになりつつある^{22, 23, 70, 71)}。目下のところ、植物のNADワールドではプールサイズや輸送系制御メカニズムの解明が期待されている⁷²⁾。

Received Oct 26, 2020; Accepted Nov 12, 2020; Published Dec 31, 2020.

参考文献

- Harden, A. and Young, W.J. (1906) The alcoholic ferment of yeast-juice. Part II. The coferment of yeast-juice. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 78, 369–375.
- Belenky, P., Bogan, K.L. and Brenner, C. (2007) NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* 32, 12–19.
- Canto, C., Menzies, K.J. and Auwerx, J. (2015) NAD⁺ metabolism and the control of energy homeostasis: A balancing act between mitochondria and the nucleus. *Cell Metab.*, 22, 31–53.
- Noctor, G., Queval, G. and Gakiere, B. (2006) NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. *J. Exp. Bot.* 57, 1603–1620.
- Hunt, L., Lerner, F. and Ziegler, M. (2004) NAD - new roles in signalling and gene regulation in plants. *New Phytol.* 163, 31–44.
- Gakiere, B., Fernie, A.R. and Petriacq, P. (2018) More to NAD⁺ than meets the eye: a regulator of metabolic pools and gene expression in *Arabidopsis*. *Free Radic. Biol. Med.* 1873–4596 (Electronic).
- Imai, S. (2009) The NAD World: a new systemic regulatory network for metabolism and aging -Sirt1, systemic NAD biosynthesis, and their importance. *Cell Biochem. Biophys.* 53, 65–74.
- Imai, S. (2010) "Clocks" in the NAD World: NAD as a metabolic oscillator for the regulation of metabolism and aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 1584–1590.
- Imai, S.I. (2016) The NAD World 2.0: the importance of the inter-tissue communication mediated by NAMPT/NAD⁺/SIRT1 in mammalian aging and longevity control. *NPJ Syst. Biol. Appl.* 2, 16018.
- Feitosa-Araujo, E., da Fonseca Pereira, P., Miranda Pena, M., Medeiros, D.B., Perez de Souza, L., Yoshida, T., Weber, A.P.M., Araujo, W.L., Fernie, A.R., Schwarzlander, M. and Nunes-Nesi, A. (2020) Changes in intracellular NAD status affect stomatal development in an abscisic acid-dependent manner. *Plant J. online ahead*
- Hunt, L. and Gray, J.E. (2008) The relationship between pyridine nucleotides and seed dormancy. *New Phytol.* 181, 62–70.
- Schippers, J.H., Nunes-Nesi, A., Apetrei, R., Hille, J., Fernie, A.R. and Dijkwel, P.P. (2008) The *Arabidopsis* onset of leaf death5 mutation of quinolinate synthase affects nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and causes early ageing. *Plant Cell* 20, 2909–2925.
- Hashida, S.N., Itami, T., Takahara, K., Hirabayashi, T., Uchimiyama, H. and Kawai-Yamada, M. (2016) Increased rate of NAD metabolism shortens plant longevity by accelerating developmental senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 67, 2427–2439
- Hashida, S.N., Takahashi, H., Takahara, K., Kawai-Yamada, M., Kitazaki, K., Shoji, K., Goto, F.,

- Yoshihara, T. and Uchimiya, H. (2013) NAD⁺ accumulation during pollen maturation in *Arabidopsis* regulating onset of germination. *Mol. Plant* 2013. 6, 216–25.
15. Hashida, S.N., Itami, T., Takahashi, H., Takahara, K., Nagano, M., Kawai-Yamada, M., Shoji, K., Goto, F., Yoshihara, T. and Uchimiya, H. (2010) Nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenyltransferase-mediated regulation of NAD biosynthesis protects guard cells from reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal movement in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 61, 3813–3825.
 16. Gallais, S., de Crescenzo, M.A. and Laval-Martin, D.L. (2000) Evidence of active NADP⁺ phosphatase in dormant seeds of *Avena sativa* L. *J. Exp. Bot.* 51, 1389–1394.
 17. Geigenberger, P. (2003) Response of plant metabolism to too little oxygen. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 247–256.
 18. Kramer, D.M., Avenson, T.J. and Edwards, G.E. (2004) Dynamic flexibility in the light reactions of photosynthesis governed by both electron and proton transfer reactions. *Trends Plant Sci.* 9, 349–357.
 19. Lim, C.Z.J., Zhang, L., Zhang, Y., Sundah, N.R. and Shao, H. (2020) New sensors for extracellular vesicles: Insights on constituent and associated biomarkers. *ACS Sens.* 5, 4–12.
 20. Mi, H., Klughammer, C. and Schreiber, U. (2000) Light-induced dynamic changes of NADPH fluorescence in *Synechocystis* PCC 6803 and its *ndhB*-defective mutant M55. *Plant Cell Physiol.* 41, 1129–1135.
 21. Schreiber, U. and Klughammer, C. (2009) New NADPH / 9-AA module for the DUAL-PAM-100: Description, operation and examples of application. *PAM Appl. Notes* 2, 1–13.
 22. Ishikawa, Y., Kawai-Yamada, M. and Hashida, S.N. (2020) Measurement of chloroplastic NAD kinase activity and whole tissue NAD kinase assay. *Bio-protocol* 10, e3480.
 23. 橋田慎之介 (2018) NADP/NADPH-Glo™ を用いた NADP 光応答性変動の検出. *プロメガ実験ノート* 5, 1–2.
 24. Hashida, S.N., Miyagi, A., Nishiyama, M., Yoshida, K., Hisabori, T. and Kawai-Yamada, M. (2018) Ferredoxin/thioredoxin system plays an important role in the chloroplastic NADP status of *Arabidopsis*. *Plant J.* 95, 947–960.
 25. McGuinness, E.T. and Butler, J.R. (1985) NAD⁺ kinase - a review. *Int. J. Biochem.* 17, 1–11.
 26. Berrin, J.G., Pierrugues, O., Brutescio, C., Alonso, B., Montillet, J.L., Roby, D. and Kazmaier, M. (2005) Stress induces the expression of *AtNADK-1*, a gene encoding a NAD(H) kinase in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* 273, 10–19.
 27. Chai, M.F., Chen, Q.J., An, R., Chen, Y.M., Chen, J. and Wang, X.C. (2005) NADK2, an *Arabidopsis* chloroplastic NAD kinase, plays a vital role in both chlorophyll synthesis and chloroplast protection. *Plant Mol. Biol.* 59, 553–564.
 28. Chai, M.F., Wei, P.C., Chen, Q.J., An, R., Chen, J., Yang, S. and Wang, X.C. (2006) NADK3, a novel cytoplasmic source of NADPH, is required under conditions of oxidative stress and modulates abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* 47, 665–674.
 29. Waller, J.C., Dhanoa, P.K., Schumann, U., Mullen, R.T. and Snedden, W.A. (2009) Subcellular and tissue localization of NAD kinases from *Arabidopsis*: compartmentalization of de novo NADP biosynthesis. *Planta* 231, 305–317.
 30. Muto, S. and Miyachi, S. (1977) Properties of a protein activator of NAD kinase from plants. *Plant Physiol.* 59, 55–60.
 31. Jarrett, H.W., Charbonneau, H., Anderson, J.M., McCann, R.O. and Cormier, M.J. (1980) Plant calmodulin and the regulation of NAD kinase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 356, 119–129.
 32. Dell' Aglio, E., Salvi, D., Kraut, A., Baudet, M., Macherel, D., Neveu, M., Ferro, M., Curien, G. and Rolland, N. (2016) No plastidial calmodulin-like proteins detected by two targeted mass-spectrometry approaches and GFP fusion proteins. *New Negative Plant Sci.* 3-4, 19–26.
 33. Tai, L., Li, B.B., Nie, X.M., Zhang, P.P., Hu, C.H., Zhang, L., Liu, W.T., Li, W.Q. and Chen, K.M. (2019)

- Calmodulin is the fundamental regulator of NADK-mediated NAD signaling in plants. *Front. Plant Sci.* 10, 681.
34. Turner, W.L., Waller, J.C., Vanderbeld, B. and Snedden, W.A. (2004) Cloning and characterization of two NAD kinases from *Arabidopsis*. identification of a calmodulin binding isoform. *Plant Physiol.* 135, 1243–1255.
 35. Dell’Aglia, E., Giustini, C., Kraut, A., Couté, Y., Costa, A., Decros, G., Gibon, Y., Mazars, C., Matringe, M., Finazzi, G. and Curien, G. (2019) Identification of the *Arabidopsis* calmodulin-dependent NAD⁺ kinase that sustains the elicitor-induced oxidative burst. *Plant Physiol.* 181, 1449–1458.
 36. Li, B.-B., Wang, X., Tai, L., Ma, T.-T., Shalmani, A., Liu, W.-T., Li, W.-Q. and Chen, K.-M. (2018) NAD kinases: Metabolic targets controlling redox co-enzymes and reducing power partitioning in plant stress and development. *Front. Plant Sci.* 9, 379.
 37. Takahashi, H., Watanabe, A., Tanaka, A., Hashida, S.N., Kawai-Yamada, M., Sonoike, K. and Uchimiya, H. (2006) Chloroplast NAD kinase is essential for energy transduction through the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 47, 1678–1682.
 38. Takahashi, H., Takahara, K., Hashida, S.N., Hirabayashi, T., Fujimori, T., Kawai-Yamada, M., Yamaya, T., Yanagisawa, S. and Uchimiya, H. (2009) Pleiotropic modulation of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis* plants overexpressing the NAD kinase2 gene. *Plant Physiol.* 151, 100–113.
 39. Thormahlen, I., Zupok, A., Rescher, J., Leger, J., Weissenberger, S., Groysman, J., Orwat, A., Chatel-Innocenti, G., Issakidis-Bourguet, E., Armbruster, U. and Geigenberger, P. (2017) Thioredoxins play a crucial role in dynamic acclimation of photosynthesis in fluctuating light. *Mol. Plant* 10, 168–182.
 40. Nikkanen, L. and Rintamaki, E. (2019) Chloroplast thioredoxin systems dynamically regulate photosynthesis in plants. *Biochem. J.*, 476, 1159–1172.
 41. Alric, J. and Johnson, X. (2017) Alternative electron transport pathways in photosynthesis: a confluence of regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 37, 78–86.
 42. Hanke, G. and Mulo, P. (2013) Plant type ferredoxins and ferredoxin-dependent metabolism. *Plant Cell Environ.* 36, 1071–1084.
 43. Selinski, J. and Scheibe, R. (2019) Malate valves: old shuttles with new perspectives. *Plant Biol. (Stuttg)* 21 Suppl 1, 21–30.
 44. Cornic, G., Bukhov, N.G., Wiese, C., Bligny, R. and Heber, U. (2000) Flexible coupling between light-dependent electron and vectorial proton transport in illuminated leaves of C3 plants. Role of photosystem I-dependent proton pumping. *Planta*, 210, 468–477.
 45. Joliot, P. and Joliot, A. (2005) Quantification of cyclic and linear flows in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 4913–4918.
 46. Maruta, T., Ogawa, T., Tsujimura, M., Ikemoto, K., Yoshida, T., Takahashi, H., Yoshimura, K. and Shigeoka, S. (2016) Loss-of-function of an *Arabidopsis* NADPH pyrophosphohydrolase, AtNUDX19, impacts on the pyridine nucleotides status and confers photooxidative stress tolerance. *Sci. Rep.* 6, 37432.
 47. Yoshimura, K. and Shigeoka, S. (2015) Versatile physiological functions of the Nudix hydrolase family in *Arabidopsis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79, 354–366.
 48. Cancela, J.M., Churchill, G.C. and Galione, A. (1999) Coordination of agonist-induced Ca²⁺-signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature* 398, 74–76.
 49. Navazio, L., Bewell, M.A., Siddiqua, A., Dickinson, G.D., Galione, A. and Sanders, D. (2000) Calcium release from the endoplasmic reticulum of higher plants elicited by the NADP metabolite nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8693–8698.
 50. Guse, A.H. and Lee, H.C. (2008) NAADP: A universal Ca²⁺ trigger. *Sci. Signal* 1, re10.
 51. Wedel, N. and Soll, J. (1998) Evolutionary conserved light regulation of Calvin cycle activity by NADPH-mediated reversible phosphoribulokinase/CP12/glyceraldehyde-3-

- phosphate dehydrogenase complex dissociation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 9699–9704.
52. Hashida, S.N., Kawai-Yamada, M. and Uchimiya, H. (2013) NAD⁺ accumulation as a metabolic off switch for orthodox pollen. *Plant Signal. Behav.* 8, e23937
 53. Kawai, S. and Murata, K. (2008) Structure and function of NAD kinase and NADP phosphatase: key enzymes that regulate the intracellular balance of NAD(H) and NADP(H). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 919–930.
 54. Li, W.Y., Wang, X., Li, R., Li, W.Q. and Chen, K.M. (2014) Genome-wide analysis of the NADK gene family in plants. *PLoS One* 9, e101051.
 55. Grose, J.H., Joss, L., Velick, S.F. and Roth, J.R. (2006) Evidence that feedback inhibition of NAD kinase controls responses to oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 7601–7606.
 56. Yamori, W., Makino, A. and Shikanai, T. (2016) A physiological role of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis under fluctuating light in rice. *Sci. Rep.* 6, 20147.
 57. Bernhardt, K., Wilkinson, S., Weber, A.P. and Linka, N. (2012) A peroxisomal carrier delivers NAD⁺ and contributes to optimal fatty acid degradation during storage oil mobilization. *Plant J.* 69, 1–13.
 58. Agrimi, G., Russo, A., Pierri, C.L. and Palmieri, F. (2012) The peroxisomal NAD⁺ carrier of *Arabidopsis thaliana* transports coenzyme A and its derivatives. *J. Bioenerg. Biomembr.* 44, 333–340.
 59. de Souza Chaves, I., Feitosa-Araujo, E., Florian, A., Medeiros, D.B., da Fonseca-Pereira, P., Charton, L., Heyneke, E., Apfata, J.A.C., Pires, M.V., Mettler-Altmann, T., Araujo, W.L., Neuhaus, H.E., Palmieri, F., Obata, T., Weber, A.P.M., Linka, N., Fernie, A.R. and Nunes-Nesi, A. (2019) The mitochondrial NAD⁺ transporter (NDT1) plays important roles in cellular NAD⁺ homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 100, 487–504.
 60. Feitosa-Araujo, E., de Souza Chaves, I., Florian, A., da Fonseca-Pereira, P., Condori Apfata, J.A., Heyneke, E., Medeiros, D.B., Pires, M.V., Mettler-Altmann, T., Neuhaus, H.E., Palmieri, F., Arai Jo, W.L., Obata, T., Weber, A.P.M., Linka, N., Fernie, A.R. and Nunes-Nesi, A. (2020) Downregulation of a mitochondrial NAD⁺ transporter (NDT2) alters seed production and germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 61, 897–908.
 61. Palmieri, F., Rieder, B., Ventrella, A., Blanco, E., Do, P.T., Nunes-Nesi, A., Trauth, A.U., Fiermonte, G., Tjaden, J., Agrimi, G., Kirchberger, S., Paradies, E., Fernie, A.R. and Neuhaus, H.E. (2009) Molecular identification and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* mitochondrial and chloroplastic NAD⁺ carrier proteins. *J. Biol. Chem.* 284, 31249–31259.
 62. Hashida, S.N., Takahashi, H. and Uchimiya, H. (2009) The role of NAD biosynthesis in plant development and stress response. *Ann. Bot. (Lond.)*, 103, 819–824.
 63. Petriacq, P., de Bont, L., Hager, J., Didierlaurent, L., Mauve, C., Guerard, F., Noctor, G., Pelletier, S., Renou, J.P., Tcherkez, G. and Gakiere, B. (2012) Inducible NAD overproduction in *Arabidopsis* alters metabolic pools and gene expression correlated with increased salicylate content and resistance to Pst-AvrRpm1. *Plant J.* 70, 650–665.
 64. Wu, R., Zhang, F., Liu, L., Li, W., Pichersky, E. and Wang, G. (2018) MeNA, controlled by reversible methylation of nicotinate, is an NAD precursor that undergoes long-distance transport in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 11, 1264–1277.
 65. Katoh, A., Uenohara, K., Akita, M. and Hashimoto, T. (2006) Early steps in the biosynthesis of NAD in *Arabidopsis* start with aspartate and occur in the plastid. *Plant Physiol.* 141, 851–857.
 66. Hao, J., Petriacq, P., de Bont, L., Hodges, M. and Gakiere, B. (2018) Characterization of L-aspartate oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 271, 133–142.
 67. Murthy, N.M., Ollagnier-de-Choudens, S., Sanakis, Y., Abdel-Ghany, S.E., Rousset, C., Ye, H., Fontecave, M., Pilon-Smits, E.A. and Pilon, M. (2007) Characterization of *Arabidopsis thaliana* SufE2 and SufE3: functions in chloroplast iron-sulfur cluster

- assembly and NAD synthesis. *J. Biol. Chem.* 282, 18254–18264.
68. Takahara, K., Kasajima, I., Takahashi, H., Hashida, S.N., Itami, T., Onodera, H., Toki, S., Yanagisawa, S., Kawai-Yamada, M. and Uchimiya, H. (2010) Metabolome and photochemical analysis of rice plants over-expressing *Arabidopsis* NAD kinase gene. *Plant Physiol.* 152, 1863–1873.
69. Wang, G. and Pichersky, E. (2007) Nicotinamidase participates in the salvage pathway of NAD biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 49, 1020–1029.
70. Lim, S.L., Voon, C.P., Guan, X., Yang, Y., Gardstrom, P. and Lim, B.L. (2020) In planta study of photosynthesis and photorespiration using NADPH and NADH/NAD⁺ fluorescent protein sensors. *Nat. Commun.* 11, 3238.
71. Blacker, T.S. and Duchen, M.R. (2016) Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. *Free Radic. Biol. Med.* 100, 53–65.
72. Hashida, S.N. and Kawai-Yamada, M. (2019) Inter-organelle NAD metabolism underpinning light responsive NADP dynamics in plants. *Front. Plant Sci.* 10, 960.

Photosynthesis from the viewpoint of “NAD world”:
Where does the electron acceptor NADP⁺ come from?

Shin-nosuke Hashida

Central Research Institute of Electric Power Industry (CRIEPI), Environmental Science Research Laboratory

表紙の紹介

イネ葉肉細胞における葉緑体の細胞内配置と立体構造に塩ストレスが与える影響

¹ 名古屋大学大学院生命農学研究科² 近畿大学大学院農学研究科大井 崇生¹、山根 浩二²、谷口 光隆¹

表紙はイネ (*Oryza sativa* L. ‘Nipponbare’) 葉身における葉肉細胞の三次元再構築像である。樹脂包埋した葉組織を集束イオンビーム加工装置-走査型電子顕微鏡 (FIB-SEM) で横断方向に連続切削・撮影した断面像を基に作成した。二次元像からは細胞の一断面の情報しか得られないが、一定間隔で薄切した断面像を積み上げれば三次元の立体像となり、細胞の全体像を把握できる。イネ葉身においても1枚の横断切片の観察では葉肉組織が複雑に入り組んだ断面を示すため、個々の細胞の形態を捉え難い。しかし、再構築した立体像を一目見れば、くびれた細胞の外形を容易に把握することができた¹⁾。その内部の葉緑体に着目すると、非ストレス条件下では細胞のくびれに沿って細胞膜直下を伸び広がるような形をしており、隣接する葉緑体どうしが隙間を埋めて細胞間隙に面した細胞内周を覆うように配置していた^{1,2)}。二次元の切片上では、葉緑体は非ストレス条件下では弓状や凸レンズ状の断面を示す一方で、塩ストレス条件下では“膨らんだような”断面に変化することが以前から観察されていた。しかし、三次元再構築した葉緑体の立体像を元に体積値を算出したところ、非ストレス条件に比べてストレス条件の葉緑体の体積が増加していたわけではなく、実際には、真球度が高まって“丸くなる”形に変化していたことが判明した²⁾。さらに、ストレス条件下の葉緑体は、局所的に陥入構造 (chloroplast pockets)³⁾ や突出構造 (chloroplast protrusions)^{3,4)} を形成することが見出された。これらの葉緑体の細胞内での配置や形状、そしてストレスに応答した構造変化を可視化し、体積や表面積などの三次元形態情報を定量比較することで、葉緑体が光合成をどのように最適化しようとしているのか、また環境ストレスにどのように適応しようとしているのかを理解することに繋がると期待される。詳細な結果と考察は本誌次号 (2021年4月) の解説記事にて紹介する予定である。

なお、本表紙は画像解析ソフトウェア (Avizo ver9.0 および Amira ver.2020.02、Thermo Fisher Scientific) で出力した図に、PowerPoint 等で補助線等を加筆して作成した。Amira での出力に関しては伊藤栄祐氏 (Thermo Fisher Scientific) にご助力頂いており、この場を借りて感謝申し上げます。

文献

- 1) Oi, T., Enomoto, S., Nakao, T., Arai, S., Yamane, K. and Taniguchi, M. (2017) Three-dimensional intracellular structure of a whole rice mesophyll cell observed with FIB-SEM. *Ann. Bot.* 120, 21–28.
- 2) Oi, T., Enomoto, S., Nakao, T., Arai, S., Yamane, K. and Taniguchi, M. (2020) Three-dimensional ultrastructural change of chloroplasts in rice mesophyll cells responding to salt stress. *Ann. Bot.* 125, 833–840.
- 3) Yamane, K., Oi, T., Enomoto, S., Nakao, T., Arai, S., Miyake, H. and Taniguchi, M. (2018) Three-dimensional ultrastructure of chloroplast pockets formed under salinity stress. *Plant Cell Environ.* 41, 563–575.
- 4) Yamane, K., Oi, T. and Taniguchi, M. (2020) Three-dimensional analysis of chloroplast protrusion formed under osmotic stress by polyethylene glycol in rice leaves. *Plant Prod. Sci.* 23, 160–171.

若手の会特別企画：若手研究者の海外留学レポート！

第11回「海外若手研究者の日本留学レポート！」

基礎生物学研究所・名古屋大学

キム ウンチュル (KIM, Eunchul)

私は韓国で博士学位を取得した後、2015年10月から皆川先生の研究室（基礎生物学研究所）で光合成生物の集光システムにおける調節機構の研究を行っています。大学院課程のうち、熊崎先生（京都大学）との共同研究のため京都で滞在した期間を含めると約6年近くを日本で過ごしました。したがって、今は、韓国での研究室生活（大学院生活）6年、そして日本での研究室生活6年のバランスをとる時期になっています。本稿では私が日本に来た経緯そして日本での留学生活を通じて感じた点を中心にお話したいと思います。

1. 日本に来る前、そして来ることになった経緯の話

私は大学で物理学を専攻し、物理、化学、材料工学、経済学分野の教授が集まって新設したエネルギー科学科という融合・複合学科で博士号を取りました。博士課程では太陽電池、光触媒のような光エネルギー変換システムにおけるエネルギー電子伝達ダイナミクスを研究し、その過程で細胞だけが持っているフィードバック調節機構に興味を持つようになりました。そんな中、私がM2であり論文がまだなかった時期であるにもかかわらず、指導教授の配慮で2010年に北京で開かれた国際光合成学会に参加することになりました。当時の私はまだ若く（22歳）、国外で学会に参加したのは初めてでとても不慣れた雰囲気を感じました。しかし、当時の指導教授は、「学会に参加した時は研究室の者同士で集まらずに別々に回りながら新しい人脈を作ることだ」と言って全然気を遣ってくれなくて、最初は非常に困った状況でした。しかしそのおかげで熊崎先生、柴田先生、浅井さん、近藤さん、野地さん及び日本の学生たちと夕飯を一緒に食べる機会を持つようになり（どのように夕飯を一緒に食べるようになったかは記憶がありません...、たぶん私がかわいそうに見えて連れて行ったのだと思います...）このような縁が今まで続いています（図1）。結果的に見ると、学会で学生を放置していた指導教授の戦略が成功したと思われま

す。また、そこで現在のポストである皆川先生のステート遷移に関する発表を通じて、博士号の主要研究アイデアを得ました。その後、ステート遷移研究を行って得た中間結果を、奈良で開かれた国際学会で発表しました。そこで熊崎先生とのディスカッションを通じて共同研究を構想するようになり、このような縁が日本で研究を始めるきっかけになりました。



図1 北京で晩ご飯中の写真
(2010年 国際光合成学会)

2. 学生として京都での話

博士の指導教授、熊崎先生、寺島先生のご配慮のおかげで、京都に住みながら実験を行う機会を得ました。このとき京都で研究した経験は、研究結果だけでなく私の考え方にも大きな転換点になりました。私が感じた最初の印象は、先生たちが学生たちにフレンドリーで遠慮なく過ごしているという感じ(韓国に比べて)を受けました。これを通じて、学生たちがより自分の意見を表出しやすい環境だと感じました。特に、私が在留した研究室の学生たちは皆積極的な感じでした。このような環境は私を変え、韓国に帰った時、指導教授は私が日本に行ってきたら自信がついたと言いました。

2.1. 研究の話

京都では熊崎先生の分光顕微鏡を使って、室温で生きている植物細胞のステート遷移を空間的に分析する研究を行いました。当時の私は **protoplast isolation** 技術を習得していたので、**protoplast** を活用することで細胞壁などによる散乱を減少させ、イメージングのクオリティを高める方法を取りました。伊福先生の協力を得て、**protoplast** 状態でもステート遷移が起こることを検証し、蛍光再吸収の量を定量化して補正する方法を開発しました。その結果、室温下における光化学系 I と光化学系 II の蛍光スペクトルを分析する数式等を開発することに成功しました。これにより、光化学系 I と光化学系 II の間にあるアンテナ分配機構の空間的、定量的な解析を可能にし、ステート遷移のメカニズムを解明しました (Kim et al. 2015 *Plant Cell Physiol.*)。

2.2. 生活の話

初めて外国に住んで過ごす生活でしたが、教授、学生たち、そして事務職員の方々がとても親切にしてくださって、大きな不便なく過ごすことができました。特に毎日の昼食を熊崎先生と一緒にとったことが記憶に残っています。この時間を通じて研究及び生活に対する話をよく交わし、日本文化および言語についてもたくさん学びました。学生たちともよく飲み会をしながら楽しい時間を過ごし、この過程を通じて居酒屋のメニューを早く読める特技を習得しました。いまさら感じますが、京都は外国人留学生が生活するにはベストな環境だったと思います。日本の雰囲気を感じられる観光地とおいしい食べ物が多く、観光客が多いため日本語ができなくても生活に大きな不便はなかったです。

3. ポスドク研究員として岡崎での話

博士学位を取得した後、岡崎にある基礎生物学研究所・皆川先生の研究室で研究を始めました。最初は短期間の契約でしたが、皆川先生のサポートで外国人学振 PD と NIBB リサーチフェローを受けることができ、現在まで研究を遂行できるようになりました。私が研究室に初めて合流した時は多様な分野(分子生物学、生化学、構造生物学、生理学など)を専攻した研究員がいて(図2)、より早く多様な分野を理解することができたと思います。



図2 皆川研のグループ写真(2017年度)

3.1. 研究の話

私は、藻類(緑藻:*Chlamydomonas reinhardtii*、紅藻:*Cyanidioschyzon merolae*)および植物(シロイヌナズナ、ホウレンソウ)の光捕集システムおよび光防御機構を研究してきました。緑藻はストレスによって誘発される集光性タンパク質(Light-harvesting complex stress related: LHCSR)を用いて光化学系 II の過剰エネルギーを散逸する光防御機構を調節しています。緑藻の LHCSR は UV で発現が誘導される LHCSR1 と青色光で発現が誘導される LHCSR3 があります。しかし、LHCSR1 と LHCSR3 がどのように光化学系 II の過剰エネルギーを散逸しているのか、またその作動メカニズムは不明でした。私たちは LHCSR1 と LHCSR3 を持っていない変異株を用いて生化学および分光分析を行い、LHCSR1 および LHCSR3 の作動メカニズムを明らかにする研究を行いました (Kim et al. 2017 *J. Biol. Chem.*、Kosuge et

al. 2018 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*)。また、光化学系タンパク質複合体のような膜タンパク質複体内結合の強さを分析するための新しい分析方法を開発し、膜タンパク質間結合の強さという新たな視点での分析を可能にしました (Kim et al. 2018 *J. Phys. Chem. B*, Kim et al. 2019 *J. Phys. Chem. Lett.*)。さらに、植物の光化学系 II 集光性タンパク質 (Light-harvesting complex II: LHClI) の特徴である正電荷を帯びた N-ターミナルが LHClI 依存光防御機構に重要な役割をしていることを明らかにしました (Kim et al. 2020 *J. Phys. Chem. Lett.*)。そして、半結晶性アレイ形態の PSII 超複合体 (PSII 超複合体の三量体) を分離することに成功し、PSII 超複合体の配列形態によって集光性質が調節されることを明らかにしました (Kim and Watanabe et al. 2020 *J. Biol. Chem.*)。

3.2. 生活の話

研究員という身分での研究室生活は、学生という身分の時と比べると少し差がありましたが、京都と同じように皆さんの親切さに支えられて早く慣れることができました。特に、人で混雑しているソウルや京都と違って、人通りが少ない岡崎の平和な生活に魅力を感じました。しかし、京都とは違って岡崎では外国人や観光客が少ないため英語だけで生活するには不便が多かったです。そこで、私は研究室の外部では英語を使わないという覚悟で生活しながら日本語を習いました。日本語を覚えるためには、子供のように聞き、噛み、習いましたが、その度に研究室の人達が親切に説明してくださって感謝しています。そういうみなさんのおかげで、今年日本語検定能力試験 1 級を獲得しました。

4. 日本での生活の中で違うと感じたこと

全世界の国を比べると、日本と韓国はかなり近くて似たような点が多いですが、それにも違いがあるので、このパートでは私が研究室の生活と日常生活で感じた違いについて話そうと思います。まず、私の経験を通じてすべてのことを一般化することはできないので、その点を考慮して見ていただきたいです。

4.1. 研究室生活で違うと感じたこと

「日本の大学院生は学生 (?), 韓国の大学院生は被雇用者 (?)」

日本と韓国の研究室生活を通じて一番先に感じたのは大学院生に対する認識の違いでした。韓国での大学院生は学科 (大学) と指導教授の研究費から給与 (理工系の場合はほとんどが) を受ける被雇用者 (?) のような立場でした。給与は指導教授の決定によって大きく左右されるので雇い人の立場のようになりますが、別にアルバイトをしなくても生活が十分に維持される程度でした。そのため、指導教授は大学院生がアルバイトをするのを良い目で見ない雰囲気でした (私はアルバイトしている大学院生は見たことはありませんでした)。一方、日本では多くの大学院生がアルバイトをして、授業料や生活費を自費で支払っているという話を聞いて驚きました。そのため、韓国の大学院生は経済的余裕があるが自由が不足し、日本の大学院生は経済的余裕が不足しているが自由があるという感じを受けました。どちらも長所と短所があると思います。

「日本ではキムさん、韓国ではキム博士」

韓国の大学院生は被雇用者のような立場で厳しい過程を歩きますが、博士号を授与すると呼称が「〇〇博士」に変更になりました。同じ研究室でも年上には〇〇博士様、年下には〇〇博士と呼びました。また、教授 (助教と准教授を含む) の場合は、助教も〇〇教授様という呼称で呼ばれていました。一方、日本では学生が博士を呼ぶときはもちろん、助教と准教授を呼ぶときも〇〇さんと呼ぶことに少し驚きました。最初は適応できず研究室の助教と准教授にも先生と呼びましたが、今はある程度システムを理解して呼ぶ方法を考えています。呼び方である程度フラットな関係を持って研究をするのは良いことだと思います。

4.2. 日常生活で違うと感じたこと

「食文化の違い」

食文化に関する話ですが、私は最初から日本の食文化にすごく早く適応しました。日本の食べ物だけ食べても生きていけるぐらい日本の食べ物が好きです (図3)。その中で、韓国に一時帰国した時、日本食文化に適応していた私に起こった変化を見つけました。私がいつも注文して食べているお弁当は辛さがほぼゼロのため、それに適応し、辛いものが食べられなくなっていました。この変化から、日本の食べ物の中では辛いものが少ないこと (私がいつも注文しているお弁当屋さんが特別かもしれませんが) を感じました。

そして、ご飯を食べる時のお茶碗の持ち方に違いがあります。日本ではお茶碗を手で持って食べるのがマナーだと学びましたが、韓国では手で持たない方がマナーで持つのはむしろ良くないと考えられます (特に年上の人の前では)。京都で熊崎先生と韓国の指導教授と一緒にご飯 (和食) を食べる時も、熊崎先生は手で持って韓国の指導教授は手で持たないままご飯を食べていましたので、私はどうした方が良いのかを少し悩んだ記憶があります。結局、ここは日本なので、日本のルールに従う方を選びました。その後は、韓国の指導教授も気づいて、同じ方法でご飯を食べました。

「カラスが多い」

京都と岡崎が特別かもしれませんが、カラスがすごく多いことに驚きました。韓国のソウルにはカラスはあまり少なく (実際に見た記憶がないです)、ハトが多いです。この点は今も適応できなくて、ちょっと怖いです。



図3 好きな日本の食べ物

5. おわりに

この原稿を執筆するのは、私が再び初心を思い浮かべる刺激になりました。韓国では光合成研究者がほとんどいなくて、光合成を研究するのはすごく孤独でしたが、日本では優秀な研究者が多く、とても楽しく研究ができました。特に、ひらがなも読めなかった私が、今まで研究を続け、日本で生活ができたのは、多くの方から配慮と支援をもらったおかげだと思います。最近は両国の政治的な関係があまり良くない状態ですが、それにかかわらず研究室の皆さんも光合成学会の皆さんもそして研究所外部の皆さんもすごく親切にしてくださって、心から感謝しています。特に、私の研究と生活にご支援くださっている皆川先生と熊崎先生に感謝の気持ちを伝えたいです。私がもらった分を光合成研究会と日本の社会に恩返しするために私の役割で貢献できるように頑張ります。最後に、この原稿を執筆するきっかけを下さった若手の会会長の清水隆之先生と渡辺麻衣先生にこの場を借りて深くお礼申し上げます。

報告記事

「日本光合成学会オンラインミニシンポジウム ～諸刃の剣：光合成との付き合い方～」開催報告

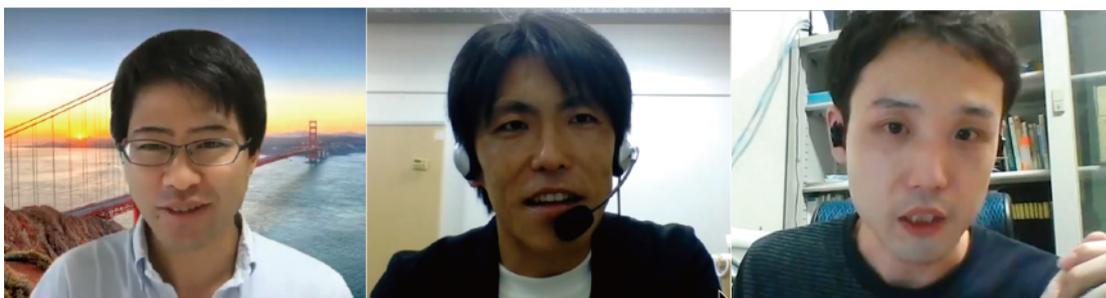
静岡大学
成川 礼、粟井 光一郎、本橋 令子

2020年9月18日（金）午後15時から、Zoom ウェビナー によって「日本光合成学会オンラインミニシンポジウム ～諸刃の剣：光合成との付き合い方～」が開催されました。このミニシンポジウムは本来であれば、5月30日から二日間に渡って開催される予定であった第11回日本光合成学会年会のシンポジウムの一つとして企画されたものです。残念ながらコロナ禍の影響で年会そのものが中止になってしまったため、このような形での開催となりました。主催者として Zoom ウェビナーを利用するのは初めてであり、不手際もあったかと思いますが、皆様のお陰で総勢144名の参加があり、盛会となりました。

今回のシンポジウムは「諸刃の剣：光合成との付き合い方」と題して、エネルギー獲得のための極めて重要な代謝でありながら、細胞への負荷も大きいという光合成の二面性に着眼し、新進気鋭の3人の研究者の方々（東大・神保晴彦さん、京大・神川龍馬さん、東大・清水隆之さん）に最先端の研究内容を紹介いただきました。対象とする生物材料はシアノバクテリアから藻類・陸上植物まで、現象としても反応中心の修復、葉緑体の縮退進化や形成制御まで幅広い内容のシンポジウムとなりました。研究会の発表の様子については、東京工業大学のXXXさんに報告記事としてまとめてもらいましたので、詳しくはそちらをご覧ください。

シンポジウム終了後は、それぞれの発表者毎に3会場に区切った Zoom 懇親会を開催し、最終的には1つの会場に集約された上で、深夜まで活発な議論が続いたようです。

来年の光合成学会年会およびシンポジウムこそは、静岡大学で開催されるべく準備を進めていますが、コロナ禍の状況に鑑みて、その開催形態については柔軟に対応したいと考えています。開催方法の如何に関わらず、皆様と議論ができるのを楽しみにしています。



Zoom ウェビナー の様子
左から神保さん、神川さん、清水さん

報告記事

「日本光合成学会オンラインミニシンポジウム
～諸刃の剣：光合成との付き合い方～」に参加して東京工業大学生命理工学院
鶴巻 達大

令和2年9月18日に開催された光合成学会オンラインミニシンポジウム「諸刃の剣：光合成との付き合い方」に参加しましたので、その参加報告をします。本年は、新型コロナウイルス感染症の拡大に伴い光合成学会年会やセミナーなどがオンサイトでの開催ができなくなるという状態でした。毎年、光合成学会年会と若手の会に参加し、諸先生方および若手研究者の方々とお話することが研究のモチベーションの一つになっていたのが今年度は本当に残念でした。そんな中でも、オンラインミニシンポジウムをオーガナイズしてくださった静岡大学の成川礼先生、栗井光一郎先生および本橋令子先生には、この場を借りて心より感謝申し上げます。

本シンポジウムでは、東京大学の神保晴彦先生と清水隆之先生そして京都大学の神川龍馬先生からご講演いただきました。以下、演題名の列挙になってしまいますが、神保先生からは「光化学系II修復におけるタンパク質と脂質の代謝回転」、神川先生からは「微細藻類における光合成能の喪失と葉緑体縮退進化」、清水先生からは「葉緑体形成の制御に関わる葉緑体から核へのシグナル伝達」と題した最新の研究成果をお話いただきました。演題名からも想像できるように、本シンポジウムではシアノバクテリア、微細藻類そしてシロイヌナズナと研究対象の生物種に多様性が富んでいたのが特徴的で、とても興味が広がるお話ばかりでした。神保先生は、以前より研究されてきたシアノバクテリア光化学系IIの光阻害および修復機構に脂質というファクターを取り入れて研究を拡張されており、私の研究につながるどころもありとても勉強になりました。神川先生のご講演ではこんな生き物がいるのかと驚くと同時に、光合成生物の進化と多様性、特に共生のプロセスは果てしなく面白いなあと感じました。最後に、清水先生のご講演では葉緑体レトログレードシグナルという大きな課題を私のような凡人では真似できないような生化学的アプローチで解明されており、勉強させていただきたいと感じてしまいました。私個人的な感想の羅列になってしまいましたが、本シンポジウムで分子レベルから進化と多様性まで大変多くのことを学ぶとともに、まだまだ未解明な部分があるなどモチベーションができました。最初に述べましたオンサイトでの開催がなくなって生じた残念な気持ちも吹き飛びました。

最後になりますが、本ミニシンポジウムの開催の提案から運営までを行っていただいた諸先生方には再度心から感謝申し上げます。新型コロナウイルス感染症の一日も早い収束を願うとともに、学会員の皆様にお会いし研究の議論ができる日を心待ちにしております。

報告記事

第 21 回若手の会セミナー開催報告

東京大学 大学院総合文化研究科
清水 隆之

「若手に発表の機会を」という思いで開催した今回のセミナーは、10月9日（金）に Zoom を利用したオンラインセミナーとして開催し、総勢 40 名以上の参加がありました。セミナーに参加して感じたことなどを名古屋大の木下悟さんに報告記事としてまとめて頂いたので、セミナーの詳しい様子はそちらをご覧ください。

コロナ禍で、光合成学会を含めた学会が軒並み中止になり、学生や若手研究者の発表・交流の機会がなくなっていました。若手の会として研究交流の機会を作りたいと考えていたところ、成川さん、栗井さん、本橋さんのご尽力で、本会のオンラインミニシンポジウムが企画・開催されました。これを受け、若手の会でもオンラインセミナーを開催することにいたしました。今回のセミナーでは、恒例企画「先輩研究者に聞いてみよう」での基礎生物学研究所の高橋俊一さんのご講演に加え、学生・若手研究者からの発表を公募いたしました。その結果、大阪大の田中謙也さん、埼玉大の湯浅光貴さん、名古屋大の木下悟さん、東工大の鶴巻達大さんに発表いただけることになりました。4 名とも、それぞれ非常に興味深い研究内容で、質疑応答では活発な議論が繰り広げられました。どの発表でも時間をオーバーしていたことから、参加者の皆さんは研究発表・交流に飢えていたんだと、都合よく感じ取りました（笑）。高橋さんのご講演も、非常に面白く、若手にとって今後の参考になるお話でした。研究者という職業は、コロナ禍のような影響は受けにくいと思いますが、アカデミックの職に就くには一般の社会人とは違う苦勞があります。今回のご講演から、研究者としてやっていくための考え方の 1 つを学ばせていただきました。セミナーの最後には、恒例の参加者全員の自己紹介を行いました。誰が何の研究をしているか知る良い機会になったと思います。セミナー後は、交流会をオンラインにて行いました（Zoom で 3 部屋用意）。20 名ほどの方が参加してくださり、研究内容やコロナ禍での研究活動などの真面目な話から他愛ない雑談まで、夜遅くまで話題は尽きませんでした。

今回のセミナーを通して、オンラインはオンラインなりに良い点もあり、このような形式のセミナー・交流会も悪くないと感じました。ただ、やはりそろそろ対面でのセミナー・交流会を開催したいところでもあります。次回のセミナーは未定ですが、世の中の情勢を見極めながら、検討していきたいと思います。今後とも、若手の会をよろしく願いいたします。最後になりますが、幹事への参加は自由ですので、一緒に運営したいという方がいらっしゃいましたら、お気軽にご連絡いただけたら幸甚です（清水：ctshimizu@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）。

報告記事

光合成学会 若手の会 第21回セミナーに参加して

名古屋大学 理学研究科 生命理学専攻 植物生理学グループ
博士課程後期2年 木下 悟

2020年10月9日にWeb会議ツールZoomでの光合成学会若手の会 第21回セミナーが開催され、有志の若手4人による研究発表、特別企画として基礎生物学研究所 准教授 高橋俊一さんによるご講演と、参加者全員の自己紹介が行われました。セミナー後には、有志での懇親会があり、オンラインながらも活発な交流をすることができました。

私は今回初めて光合成学会若手の会に参加させていただき、「葉における光合成と糖依存的な細胞膜 H^+ -ATPase 活性化機構の解析」について発表をしました。シロイヌナズナにおける光合成依存的な葉肉細胞の細胞膜 H^+ -ATPase の活性化機構について、光合成糖依存的な SAUR 転写物を介した活性化機構を中心に発表をしましたが、一部、活性化を引き起こす糖類の議論もしたところ、質問者の方から ATP を介した直接的な制御についての意見や糖代謝に関わる研究へのエールも頂くことが出来ました。懇親会でも葉肉細胞での H^+ -ATPase の生理的な役割や、シロイヌナズナでの H^+ -ATPase の素早い活性化に興味を抱いてくださり、研究室では得られない意見や反応を多く頂くことが出来ました。

特別企画では、基礎生物学研究所の高橋俊一さんが「楽しい研究ライフ」というタイトルでご講演され、現在までに行われた研究の内容や現在のポジションになるまでの波乱万丈な経験を、時折ユーモアを交えながら、お話いただきました。特に基礎生物学研究所でのポストク生活やオーストラリアの研究文化の違いなどのお話は今後の若手研究者がキャリアパスや研究生活を考えるうえで非常に貴重な経験となりました。

会の最後には、参加者40人近くで一人一枚のスライドを用いて自己紹介を行いました。この自己紹介では研究紹介を少し交えていたので、光合成と一言で言っても様々な視点から研究が行われているということを実感し、光合成に関わる研究分野の多様さと奥深さに触れられた貴重な機会となりました。オンラインならではの海外から参加している方もいらっしかったのが印象的でした。

総じて、自分とは異なる視点で光合成を研究している方々と議論を重ね、多角的に光合成という現象を捉えることが出来るようになるのが、この若手の会の強みだと強く感じました。セミナーの主催及び本稿を執筆する機会を与えて頂きました清水隆之先生を初め、セミナー関係者の方々と、セミナー参加者の皆様にこの場をお借りしてお礼申し上げます。

新刊紹介



『藻類 生命進化と地球環境を支えてきた奇妙な生き物』

著者：Ruth Kassinger、訳：井上 勲、イラスト：Shanthi Chandrasekar

装幀：吉野 愛、384 頁、築地書館、2020 年 9 月発行、3,300 円

構成：第 1 部 藻類と生命誕生 第 2 部 海藻を食べる人々 第 3 部 高まる藻類の可能性 第 4 部 藻類をとりまく深刻な事態（詳細目次は、<http://tsukiji-shokan.co.jp/mokuroku/ISBN978-4-8067-1605-1.html> を参照）

著者は、科学、園芸、歴史などの啓蒙書を執筆している作家で、本書では世界各地での取材や文献調査をもとに、一般的には掴みどころの無い存在である「藻類」にまつわる幅広い話題を紹介している。その中には、巻き寿司の海苔（紅藻）、味噌汁のワカメ（褐藻）、合鴨農法に組み込まれた窒素固定藍藻など日本の藻利用の話題も登場する。

今回紹介する『藻類』は翻訳書ということで、原著の USA 版と UK 版を取り寄せ 3 冊を並べた。カバーの装いは三者三様である。

“SLIME: How Algae Created Us, Plague Us, and Just Might Save Us”, 2019, Houghton Mifflin Harcourt Publishing Company (301 pp.)

和訳の元になった原著 USA 版（写真は Mariner Books 発行のペーパーバック版。ハードカバー版、Kindle 版、Audible 版も発売）で、カバーには海藻のモチーフが描かれている。

“BLOOM: From Food to Fuel, The Epic Story of How Algae Can Save Our World”, 2019, Elliott & Thompson Limited (380 pp.) この UK 版のカバーの表と背にはエンボス加工された微細藻が散りばめられ、佇まいの美しい本になっている。また、挿絵や扉絵として使われている藻やサンゴのイラスト（鉛筆細密画）は他 2 冊とはアレンジが異なっている。このイラストを描いた S. Chandrasekar はペン画の作品で活躍している画家で、“The 10th Annual Art of Neuroscience Contest”での Scientific American's Editor's Pick など、数々の賞を獲得している。

『藻類 生命進化と地球環境を支えてきた奇妙な生き物』 カバーには *Volvox* の博物画（スイスの植物学者 Arnold Dodel-Port & Carolina Dodel-Port の 1878 年の作品）が大胆にレイアウトされ、インパクトのある表紙デザインになっている。訳書の目次では、内容が分かり易いように言い換えやオリジナルには無い見出しの追加がされており、本選びの際には役に立つ。

光合成分野の研究で古くから活用されてきた藻類は、培養法や解析手段の積み重ねにより、水分解、電子伝達、Z-スキームモデル、カルビン・ベンソン回路など酸素発生型光合成生物に普遍的な重要知見をいくつも提供してきた。当学会員は光合成研究に役立つ藻についての基礎情報を望まれることが多いと思われるが、多くの系統群が寄せ集められている藻類の分類名や用語などの使い分けには困ることもありうる。そのような場合には、本書の訳者が執筆・編集された『藻類 30 億年の自然史 - 藻類からみる生物進化・地球・環境』（東海大学出版会）、『藻類ハンドブック』（エヌ・ティー・エス）を併せて参照することをお奨めする。

（村上明男・神戸大学）

事務局からのお知らせ

★入会案内

本会へ入会を希望される方は、会費（個人会員年会費：¥1,500、賛助法人会員年会費：¥50,000）を郵便振替（加入者名：日本光合成学会、口座番号：00140-3-730290）あるいは銀行振込（ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキュウと入力)、当座、0730290 名前：ニホンコウゴウセイガツカイ）にて送金の上、次ページの申し込み用紙、または電子メールにて、氏名、所属、住所、電話番号、ファックス番号、電子メールアドレス、入会希望年を事務局までお知らせください。

★会費納入のお願い

学会の運営は、皆様に納めていただいております年会費によりまかなわれております。当該年度の会費が未納の場合、光合成研究が送られてくる封筒に、会費未納が印字されています。ご都合のつくときに、会費を納入ください。1年間会費を滞納された場合、次年度よりお名前が会員名簿から削除され、光合成研究は届かなくなります。再入会される場合は、未納の分もあわせてお支払いいただきます。会費納入状況などにつきましては、ご遠慮なく事務局（sonoike@waseda.jp）までお問い合わせください。会員の皆様のご理解とご協力をお願い申し上げます。

日本光合成学会会員入会申込書

年 月 日

日本光合成学会御中

私は日本光合成学会の趣旨に賛同し、_____年より会員として入会を申し込みます。

[] 内に会員名簿上での公開**非承諾**項目に×印をつけてください

	振り仮名
氏名 (必須)	漢字表記
	ローマ字表記

[] 所属

[] 所属住所 (学生の方は、なるべく研究室名までお願いします)
〒

会誌送付先住所 (必須)

 所属先住所と同じ 以下の住所に送付

[] 〒

[] 連絡先電話番号

[] E-mail (必須)

 会費納入済み (振り込み年月日) 年 月 日 会費振り込み予定 (振り込み予定年月日) 年 月 日

個人会員年会費 1,500 円 (会誌、研究会、ワークショップなどの案内を含む)

賛助法人会員年会費 50,000 円 (上記と会誌への広告料を含む)

(会員資格は1月1日～12月31日を単位とします)

* 複数年分の会費を先払いで振り込むことも可能です。その場合、通信欄に (何年度～何年度分) とお書き下さい。

連絡先

〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

京都大学 理学部研究科 鹿内利治 研究室内

日本光合成学会

TEL : 075-753-4247, FAX : 075-753-4257, ホームページ: <http://photosyn.jp/>

郵便振替口座 加入者名 : 日本光合成学会 口座番号 : 00140-3-730290

銀行振込の場合 ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキュウと入力)、当座、0730290

名前 : ニホンコウゴウセイガッカイ

日本光合成学会会則

第1条 名称

本会は日本光合成学会（The Japanese Society of Photosynthesis Research）と称する。

第2条 目的

本会は光合成の基礎および応用分野の研究発展を促進し、研究者相互の交流を深めることを目的とする。

第3条 事業

本会は前条の目的を達成するために、シンポジウム開催などの事業を行う。

第4条 会員

1. 定義

本会の目的に賛同する個人は、登録手続を経て会員になることができる。また、団体、機関は、賛助会員になることができる。

2. 権利

会員および賛助会員は、本会の通信および刊行物の配布を受けること、本会の主催する行事に参加することができる。会員は、会長を選挙すること、役員に選出されることことができる。

3. 会費

会員および賛助会員は本会の定めた年会費を納めなければならない。

第5条 組織および運営

1. 役員

本会の運営のため、役員として会長1名、事務局長1名、会計監査1名、常任幹事若干名をおく。役員任期は2年とする。会長、常任幹事は連続して二期を越えて再任されない。事務局長は五期を越えて再任されない。会計監査は再任されない。

2. 幹事

幹事数名をおく。幹事任期は4年とする。幹事の再任は妨げない。

3. 常任幹事会

常任幹事会は会長と常任幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。常任幹事会は本会の運営に係わる事項を審議し、これを幹事会に提案する。事務局長と会計監査は、オブザーバーとして常任幹事会に出席することができる。

4. 幹事会

幹事会は役員と幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。幹事会は、常任幹事会が提案した本会の運営に係わる事項等を審議し、これを決定する。

5. 事務局

事務局をおき、事務局長がこれを運営する。事務局は、本会の会計事務および名簿管理を行う。

6. 役員および幹事の選出

会長は会員の直接選挙により会員から選出される。事務局長、会計監査、常任幹事は会長が幹事の中から指名し、委嘱する。幹事は常任幹事会によって推薦され、幹事会で決定される。会員は幹事を常任幹事会に推薦することができる。

第6条 総会

1. 総会は会長が招集し、出席会員をもって構成する。議長は出席会員から選出される。

2. 幹事会は総会において次の事項を報告する。

1) 前回の総会以後に幹事会で議決した事項

2) 前年度の事業経過

3) 当年度および来年度の事業計画

3. 幹事会は総会において次の事項を報告あるいは提案し、承認を受ける。

- 1) 会計に係わる事項
- 2) 会則の変更
- 3) その他の重要事項

第7条 会計

本会の会計年度は1月1日から12月31日までとする。当該年度の経理状況は、総会に報告され、その承認を受ける。経理は、会計監査によって監査される。本会の経費は、会費および寄付金による。

付則

第1 年会費は個人会員1,500円、賛助会員一口50,000円とする。

第2 本会則は、平成14年6月1日から施行する。

第3 本会則施行後第一期の会長、事務局長、常任幹事にはそれぞれ、第5条に定める規定にかかわらず、平成14年5月31日現在の会長、事務局担当幹事、幹事が再任する。本会則施行後第一期の役員および幹事の任期は、平成14年12月31日までとする。

第4 本会則の改正を平成21年6月1日から施行する。

日本光合成学会の役員選出に関する申し合わせ

平成27年5月27日 幹事会

1. 選挙管理委員会

本会の選挙を公正に実施するため、選挙管理委員会を置く。選挙管理委員2名は常任幹事会が幹事会に推薦し、決定する。選挙管理委員の互選により委員長を選出する。

2. 会長 [会則第5条第6項]

1) 幹事および常任幹事による若干名の候補者の推薦方法

幹事は、会長選挙に推薦する候補者としてふさわしい会員を3名連記で投票する。投票結果が上位の会員について、常任幹事会は、本人の意向を確認した上で、若干名を推薦候補者として決定する。選挙事務は事務局長が執り行う。

2) 会長選挙

会長選挙の実施に当たっては、会員に推薦候補者を提示し、全会員による単記無記名投票を実施する。最高得票者を、次期会長とする。得票数が同数の場合は、抽選により決定する。選挙事務は選挙管理委員会が執り行う。

日本光合成学会の運営に関する申し合わせ

1. 幹事会

幹事は光合成及びその関連分野の研究を行うグループの主催者である等、日本の光合成研究の発展に顕著な貢献をしている研究者とする。任期は4年とするが、原則として再任されるものとする。

2. 事務局

事務局長の任期は2年とするが、本会の運営を円滑に行うため、約5期(10年)を目途に再任されることが望ましい。

3. 次期会長

会長の引き継ぎを円滑に行うため、次期会長の選挙は任期の1年前に行う。

4. 常任幹事会

常任幹事会の運営を円滑におこなうため、次期会長は常任幹事となる。

「光合成研究」 投稿規定

総則

1. 「光合成研究」(本報)は光合成に関連する諸分野における記事を掲載する。
2. 1年に3回(4月、8月、12月号)冊子体として発行し、電子版を光合成学会のホームページ上に公開する。
3. 原稿がE-mailにおいて受付処理をされた日を以て受付日とし、編集委員が掲載可と判断した日を採択日とする。ただし原稿が本規定に合わない場合受け付けないことがある。
4. 編集委員は、原稿の審査に際し、原則的に適切な査読者を選んで査読を依頼し、掲載の可否を判断する。
5. 掲載論文の著作権(冊子体および電子版)は日本光合成学会に属する。
6. 図やそこで使われる写真が過去論文として発表したものもしくは発表されたものであった場合は、それらの著作権問題を著者ら自身でクリアする必要がある。
7. 投稿に当たっては、全ての著者が投稿に同意し、かつ原稿の内容について責任を持たなければならない。また、全ての著者は代表著者が全著者を代表して原稿の掲載に関する事項を執り行うことに同意するものとする。

一般的事項

- (1) Microsoft Word ファイルを基本とする。字数制限は設けないが、「解説」はA4サイズ6~8ページ、「トピックス」、「研究紹介」は4ページ程度を目安にする。1ページ当りの文字数は、図表を含めて1800字程度。日本語はMS明朝、英数字はTimes New Romanとする。
- (2) 本文の最初に、日本語および英語での論文題名、著者所属機関名、氏名を記載する。
- (3) 句読点は「、」「。」「」に統一する。
- (4) 300字程度の日本語要旨を作成すること。
- (5) 参考文献、表、図のキャプションは、本文の後ろにつける。

- (6) 本文中に図の大体の位置を指示する。(図を貼り付けてもよい。)

参考文献

- (1) 参考文献は、本文中の該当箇所に、右上付きで、1)、1,2)、1-3)のように示す。
- (2) 参考文献の表記は下記のとおりとする。

雑誌例

1. Berthold, D.A., Babcock, G.T. and Yocum, C.F. (1981) A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. EPR and electron-transport properties. *FEBS Lett.* 134, 231–234.
2. Nanba, O. and Satoh, K. (1987) Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome *b*-559. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 109–112.

書籍例

3. Diner, B.A. and Babcock, G.T. (1996) Structure, dynamics, and energy conversion efficiency in photosystem II, in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Ort, D.R. and Yocum, C.F., Eds.) pp 213–247, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.

図/写真

- (1) 図、写真はグレースケールでも良い場合には、グレースケールで作成する。カラーの図や写真を希望する場合には、カラーの図や写真を送付すること。図や写真の枚数によっては、編集委員会との相談により、PDF版ではカラーになるが、冊子体ではグレーになる場合がある。
- (2) jpgあるいはtiff形式等で本文とは別ファイルとして送付すること。解像度は300dpi程度とする。

日本光合成学会「光合成研究」編集委員会
2017年12月23日改訂

幹事会名簿

秋本 誠志	神戸大学大学院理学研究科	田中 歩	北海道大学低温科学研究所
栗井 光一郎	静岡大学大学院理学領域	田中 寛	東京工業大学化学生命科学研究所
池内 昌彦	東京大学大学院総合文化研究科	田中 亮一	北海道大学低温科学研究所
石北 央	東京大学大学院工学研究科	民秋 均	立命館大学総合理工学院
泉井 桂	近畿大学生物理工学部生物工学科	田茂井 政宏	近畿大学農学部生物機能科学科
伊藤 繁	名古屋大学	都筑 幹夫	東京薬科大学生命科学部
井上 和仁	神奈川大学理学部	出羽 毅久	名古屋工業大学大学院工学研究科
伊福 健太郎	京都大学大学院生命科学研究所	寺島 一郎	東京大学大学院理学系研究科
得平 茂樹	東京都立大学院理工学研究科	梶 達也	東京理科大学理学部
大岡 宏造	大阪大学大学院理学研究科	仲本 準	埼玉大学大学院理工学研究科
太田 啓之	東京工業大学生命理工学院	永島 賢治	神奈川大学
大友 征宇	茨城大学理学部	成川 礼	静岡大学大学院理学領域
大政 謙次	東京大学大学院農学生命科学研究科	南後 守	大阪市立大学大学院理学研究科
小川 健一	岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所	西田 生郎	埼玉大学大学院理工学研究科
小俣 達男	名古屋大学大学院生命農学研究科	西山 佳孝	埼玉大学大学院理工学研究科
垣谷 俊昭	名古屋大学	野口 航	東京薬科大学生命科学部
菓子野 康浩	兵庫県立大学理工学部	野口 巧	名古屋大学理学研究科
柏山 祐一郎	福井工業大学環境情報学部	長谷 俊治	大阪大学蛋白質研究所
金井 龍二	埼玉大学	林 秀則	愛媛大学プロテオサイエンスセンター
神谷 信夫	大阪市立大学複合先端研究機構	原 登志彦	北海道大学低温科学研究所
熊崎 茂一	京都大学大学院理学研究科	彦坂 幸毅	東北大学大学院生命科学研究所
栗栖 源嗣	大阪大学蛋白質研究所	久堀 徹	東京工業大学研究院化学生命科学研究所
小池 裕幸	中央大学理工学部	日原 由香子	埼玉大学大学院理工学研究科
小林 正美	筑波大学大学院数理物質科学研究科	福澤 秀哉	京都大学大学院生命科学研究所
坂本 亘	岡山大学資源生物科学研究所	藤田 祐一	名古屋大学大学院生命農学研究科
佐賀 佳央	近畿大学理工学理学科	古本 強	龍谷大学農学部
櫻井 英博	早稲田大学	牧野 周	東北大学大学院農学研究科
佐藤 公行	岡山大学	増田 真二	東京工業大学
佐藤 直樹	東京大学大学院総合文化研究科	増田 建	バイオ研究基盤支援総合センター
鹿内 利治	京都大学大学院理学研究科	松浦 克美	東京大学大学院総合文化研究科
篠崎 一雄	理化学研究所植物科学研究センター	松田 祐介	東京都立大学都市教養学部
嶋田 敬三	東京都立大学	真野 純一	関西学院大学理工学部
沈 建仁	岡山大学異分野基礎科学研究所	皆川 純	山口大学農学部
杉浦 昌弘	名古屋大学	宮尾 光恵	基礎生物学研究所
杉浦 美羽	愛媛大学プロテオサイエンスセンター	宮下 英明	東北大学大学院農学研究科
杉田 護	名古屋大学遺伝子実験施設	宗景 (中島) ゆり	京都大学大学院地球環境学堂
杉山 達夫	名古屋大学	村田 紀夫	関西学院大学理工学部
鈴木 祥弘	神奈川大学理学部	本橋 健	基礎生物学研究所
園池 公毅	早稲田大学教育学部	本橋 令子	京都産業大学総合生命科学部
高市 真一	東京農業大学生命科学部	矢守 航	静岡大学大学院理学領域
高橋 裕一郎	岡山大学異分野基礎科学研究所	和田 元	東京大学大学院農学生命科学研究科
高林 厚史	北海道大学低温科学研究所		東京大学大学院総合文化研究科

編集後記

この一年は世界中でコロナ禍に耐える苦渋の一年となりました。来年以降もまだまだ耐える時間は続くと思いますが、その中でも皆さんが可能な範囲で研究が進められることを願っております。今号に報告が掲載されていますように、光合成学会主催オンラインミニシンポジウムに加え、オンライン若手の会も開催されました。ともに盛会となり、このような状況においても光合成研究の勢いは、衰えていないどころか活況であると実感しています。

さて、今号は、前号の表紙を飾った牧野さんのトピックス記事、2019年光合成学会年会でポスター賞を受賞された湯浅さんのトピックス記事に加えて、1報のトピックス記事と2報の解説記事が掲載されています。今号も様々な光合成生物を対象に多彩な話題を扱った力作が揃い、素晴らしい号に仕上がったと思います。今号に関するご意見や本誌に対するご要望がございましたら、ぜひ次期編集長である宗景さんまでご連絡ください。

また、研究紹介や解説を随時受け付けておりますので、奮ってご投稿ください。表紙に適した写真もよろしくお願ひします。

伊福さんからバトンを受けてから二年間の私の編集長業務も今号が最後となります。歴代編集長が築いた素晴らしい営みを引き継ぎ、さらに宗景さんへと受け渡すことができ安堵しています。優秀な編集委員の方々に支えていただいたお陰で、充実した誌面を提供できたと思います。個人的には、専門家が執筆した総説を掲載する和文誌の存在は、分野への新規参画者や初学者の学生さんたちにとって非常に有益であり、分野の裾野を広げる上で極めて重要と考えています。「光合成研究」の編集から手は離れますが、今後も「光合成研究」が盛り上がるべく、一著者、一査読者、一読者として貢献していく所存です。

編集長・成川 礼 (静岡大学)

記事募集

日本光合成学会では、会誌に掲載する記事を会員の皆様より募集しています。募集する記事の項目は以下の通りです。

- トピックス：光合成及び関連分野での纏まりのよいトピックス的な記事。
- 解説：光合成に関連するテーマでの解説記事。
- 研究紹介：最近の研究結果の紹介。特に、若手、博士研究員の方からの投稿を期待しています。
- 集会案内：研究会、セミナー等の案内。
- 求人：博士研究員、専門技術員等の募集記事。
- 新刊図書：光合成関係、または会員が執筆・編集した新刊図書の紹介。書評も歓迎します。

記事の掲載を希望される方は、編集長の成川 (narikawa.rei@shizuoka.ac.jp) までご連絡ください。

「光合成研究」編集委員会

編集長 成川 礼 (静岡大学)
 編集委員 高林 厚史 (北海道大学)
 編集委員 宗景 ゆり (関西学院大学)
 編集委員 矢守 航 (東京大学)

日本光合成学会 2020年度役員

会長 鹿内 利治 (京都大学)
 事務局長 園池 公毅 (早稲田大学)

常任幹事 久堀 徹 (東京工業大学) 次期会長
 常任幹事 古本 強 (龍谷大学) 年会 2017年
 常任幹事 石北 央 (東京大学)
 常任幹事 伊福 健太郎 (京都大学) 前編集長
 常任幹事 牧野 周 (東北大学) 年会 2018年
 常任幹事 宮尾 光恵 (東北大学) 年会 2018年
 常任幹事 本橋 健 (京都産業大学) 年会 2019年
 常任幹事 菓子野 康浩 (兵庫県立大学)
 常任幹事 熊崎 茂一 (京都大学) 光生物学協会
 常任幹事 成川 礼 (静岡大学) 編集長、年会 2020年
 常任幹事 矢守 航 (東京大学) ホームページ
 常任幹事 藤田 祐一 (名古屋大学)
 常任幹事 沈 建仁 (岡山大学)

会計監査 高橋 裕一郎 (岡山大学)

光合成研究 第30巻 第3号 (通巻89号) 2020年12月31日発行

日本光合成学会

〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町
 京都大学 理学研究科 鹿内利治 研究室

TEL : 075-753-4247

FAX : 075-753-4257

e-mail : jspr@photosyn.jp

ホームページ : <http://photosyn.jp/>

郵便振替口座 加入者名 : 日本光合成学会 口座番号 : 00140-3-730290

銀行振込の場合 ゆうちょ銀行、019店 (ゼロイチキュウと入力)、当座、0730290

名前 : ニホンコウゴウセイガッカイ
