

学位論文

ピコ秒時間分解蛍光スペクトル測定法による、
コケ植物が乾燥下で発現する
過剰励起エネルギー消滅機構の研究

(要約)

名古屋大学院 理学研究科 物質理学専攻

山川 壽伯

1. 序論

生体光合成系は 100%近い高効率で光子を捕獲し、光エネルギーを酸化還元力という化学的なエネルギーに変換し、CO₂ を固定する。これを実現するために、光合成色素タンパク質複合体上では色素分子の配置と励起エネルギー準位が巧妙に調整されている。X 線結晶構造解析法の進歩により、原子レベルでの光合成色素タンパク質複合体の構造が明らかにされ、構造に基づいた理論計算による光捕集過程のシミュレーションなども試みられているが、この高効率な光捕集過程を実現するメカニズムは完全には解明されてはいない。

一方、正常な生化学的反応の多くが停止する状態では、この高効率な光捕集機構が仇となり、過剰な光エネルギー吸収により光化学系に障害が起き、冷害や光阻害が生じる。しかし、一部の乾燥耐性を持つ光合成生物は強い乾燥状態におかれても枯死することなく、吸水することで復活し生育できる。これらの乾燥・強光耐性の光合成生物は過剰な光エネルギーを散逸させる機構を有すると考えられる。強い乾燥耐性を持つ地衣類(菌類と藻類の共生生物)での低温蛍光解析研究では、乾燥状態で光化学系 II 反応中心近傍に過剰な励起エネルギーを高速に散逸する機構が働くことが示されている(Veerman et al. 2007, Komura et al. 2010, Miyake et al. 2011)。

本研究では強い乾燥・強光耐性を持つコケ植物に着目した。湿潤状態では高等植物も種々の非光学的消光(NPQ)によって過剰な光エネルギーを散逸させることができるが、乾燥状態ではこれらのタンパク質移動やチラコイド膜のプロトン勾配を変化させるような機構は働かない。このため乾燥状態におかれた高等植物は枯死する。これに対して、コケ植物は高等植物と同様の光化学系を持ちながら、強い乾燥に晒されても枯死せず、吸水によって直ちに光合成能を復活する。この乾燥状態で働く過剰光エネルギー散逸機構を、分光学的に詳細に解析し、分子機構を明らかにすることを試みた。

2. 材料と方法

2-1. 材料

コケ植物(蘚類)*Rhytidium rugosum*(フトゴケ)、*Rhytidiadelphus squarrosus*(フサゴケ)、*Hylocomium splendens*(イワダレゴケ)、*Physcomitrella patens*(ヒメツリガネゴケ)、*Ceratodon purpureus*(ヤノウエノアカゴケ)を試料に用いた。これらはそれぞれ程度の差はあれ乾燥耐性がある事が知られている。露地に繁茂している葉状体コロニーを採取し乾燥させ、測定に用いる。ヒメツリガネゴケのみ寒天培地上で培養した原糸体のコロニーを用いた。

2-2. ストリークカメラによる低温ピコ秒時間分解蛍光測定

試料をフェムト秒のパルスレーザー光で励起し、蛍光をストリークカメラで分析して時間分解蛍光像を得る。分光器で波長分解された蛍光は光電面に衝突し光電子に変換される。変換された光電子は加速電圧によって加速し、真空中を飛行する。この際、励起光とタイミングを合わせて掃引電圧を下向きに印加する。電圧は時間と共に増加させる。その結果、遅れて発生した光電子ほど大きく下方に軌道を曲げられる。このように縦方向に引き延ばされた光電子がマイクロチャンネルプレートの各素子に衝突し、光電子が 1000 倍以上に増倍される。増倍された電子流が蛍光面に衝突し、発した蛍光が 480×640 の画素数の CCD で検出される。低温測定の際は、液体窒素フロー型クライオスタットにより 77 K まで冷却して行う。

ストリークカメラで得られるピコ秒時間分解蛍光は波長、時間、蛍光強度の 3 次元情報を持つ。これを(1)各波長での蛍光寿命、(2)励起からの各経過時点での蛍光スペクトルについて分析することで、蛍光特性を詳細に解析できる。また、Multi exponential 関数を用いた減衰曲線のグローバル解析によって、全波長域に対して共通する時定数成分を抽出し、各波長成分に対する寄与を求める事ができる。

2-3. パルス変調クロロフィル蛍光測定による光合成活性と NPQ の解析

光合成生物の生体組織や生細胞、単離した葉緑体、チラコイド膜、精製した光化学系 I、II に光を照射するとクロロフィルの蛍光が観測される。光合成の量子効率是非常に高いため、色素が吸収した光エネルギーの大部分は光合成に利用される。光化学系 I の光反応の量子効率は室温ではほぼ 100%と極めて高く、蛍光はほとんど観測されない。一方、光化学系 II の量子効率は光化学系 I と比べると低く 85%程度である。そのため、生体組織や生細胞など光化学系 I、II が混在した試料の室温での測定で観測されるのは主に光化学系 II の蛍光であり、光化学系 I の蛍光はほとんど無視できる。

光化学系 II に吸収された光エネルギーは、(1)光反応に利用される、(2)蛍光となる、(3)熱となる、のいずれかの経過を辿る。それぞれの反応速度を k_p 、 k_f 、 k_d 、とすると、蛍光強度はこれらの比で決まるので、蛍光強度を測定することで光化学系 II の電子伝達系の状態変化をモニターすることができる。このとき、測定光に弱い変調パルス光を使うことで、得られる蛍光から測定光の影響を排することができる。これにより乾燥・強光などにストレス下にある試料について、非破壊・連続的に光化学系 II の電子伝達系の光量子効率をモニターし、光エネルギーの収支を解析できる。

3. 結果・考察

3-1. 乾燥耐性コケ *Rhytidium rugosum* (フトゴケ) で光化学反応中心の光酸化を防ぐために働く、3 種の異なる過剰励起エネルギー消光機構; 乾燥状態での過剰励起エネルギー散逸過程の室温での研究

Three different mechanisms of energy dissipation in a desiccation-tolerant moss serve one common purpose: to protect reaction centers against photo-oxidation. (副論文 1)

R. rugosum は極度の強光下でも光阻害を受けない。乾燥状態の *R. rugosum* の PS II 蛍光は F_m、F_o レベルともに極度に下がる。この低下は蛍光減衰速度の増加(寿命減少)による。すなわち、光化学系アンテナクロロフィルの量的変化だけではなく、光エネルギー利用の質的变化であり、乾燥状態で働くエネルギー散逸機構の存在を強く示唆する。また湿潤状態では *R. rugosum* の蛍光収率は強光に対して敏感であり、高等植物と同様の一般的な NPQ 機構を備えている。

これらの結果から、*R. rugosum* は PS II 反応中心を過剰な光エネルギーから保護する 3 つの機構を持つと考えられる。第 1 は湿潤状態でのみ働く機構で、膜タンパク質のプロトン化で制御されるゼアキサンチンの増加によるものである。第 2 は乾燥により誘導される機構である。この一部は乾燥地衣類で発見された d-NPQ 機構 (Veerman et al., 2007; Komura et al., 2010; Miyake et al., 2011) と似ている。この機構のエネルギー消光効率は光化学系反応中心の電荷分離反応よりもさらに高い。第 3 は光反応によるもので、これは湿潤状態だけでなく乾燥状態でも働く (Heber et al., 2006a)。800 nm 近辺の吸収変化を示すおそらくクロロフィルラジカルが PS II 反応中心に生じ、励起エネルギーを受け取り消光すると考えられる。そしてこれら 3 種の機構はそれぞれに独立かつ並列して働き、乾燥と強光に同時に晒されるとき、その光エネルギー消光効率は最大になる。

3-2. 乾燥状態でのコケ植物の過剰励起エネルギー散逸機構の蛍光寿命解析による検討

Dissipation of Excess Excitation Energy by Drought-Induced Nonphotochemical Quenching in Two Species of Drought-Tolerant Moss: Desiccation-Induced Acceleration of Photosystem II Fluorescence Decay (副論文 2)

2 種の乾燥耐性コケ植物葉状体中に働く、乾燥で誘導される過剰励起エネルギー散逸機構をピコ秒時間分解蛍光スペクトル測定法で解析した。乾燥状態のコケ *Rhytidium rugosum* と *Ceratodon purpureus* は、室温および低温 77 K で測定された光

化学系 II (PS II) のクロロフィル蛍光 (F685, F695) に特異的な消光を示した。その室温蛍光寿命は、湿潤状態から乾燥状態にすることで 200 ps から 50 ps へと減少した。この消光機構は再吸水によって直ちに復活した。

低温での各波長の蛍光減衰成分のグローバル解析により、PS II のアンテナクロロフィルから 740~760 nm の長波長蛍光バンドへの 47 ps 以下の高速励起エネルギー移動が示された。この消光機構は、通常の湿潤状態で強光に晒された際に起こる光化学的と非光化学的励起エネルギー消光 (NPQ) の光量子効率よりも強い消光能力を持つ。これにより光化学反応中心の電荷分離反応は大きく低下し、アンテナクロロフィルが捕集した光エネルギーのほとんどを熱として散逸させており、有害なラジカル生成を抑制できることを示した。この結果は、乾燥で新規の消光サイト (740 nm 近辺の蛍光を発する低エネルギーレベルの色素状態) が形成され、それが CP43 や CP49 などとも近い PS II 反応中心の近傍にある事を示している。

この乾燥状態で過剰な励起エネルギーを熱放散し PS II の光障害を抑える機構は、地衣類内部に共生する緑藻の持つ乾燥誘導型消光 (d-NPQ) と似ており、類似の機構によると考えられる。

3-3. 乾燥耐性コケ植物 5 種の乾燥誘導性励起エネルギー消光応答の比較

3-1 では乾燥耐性コケ植物の持つ乾燥ストレスに対するクロロフィル蛍光収率の変化を湿潤状態と乾燥状態の繰り返しの中で包括的に調べ、3-2 ではそのうち乾燥状態で誘導される新たに見出された励起エネルギー散逸機構 (d-NPQ) について詳細に検討した。3-3 では、d-NPQ の乾燥耐性コケ植物中での分布と多様性を明らかにする。5 種類のコケ植物について、室温と低温 (77 K) でクロロフィル蛍光のスペクトルと寿命を測定し、検討した。*Rhytidium rugosum* (フトゴケ)、*Ceratodon purpureus* (ヤノウエノアカゴケ) に加え、*Rhytidiadelphes squarrosus* (フサゴケ)、*Hylocomium splendens* (イワダレゴケ)、*Physcomitrella patens* (ヒメツリガネゴケ) 3 種を試料とした。

5 種の乾燥耐性コケはいずれも乾燥により PS II 蛍光を特異的に減少させた。しかしその蛍光減少の特性には大きな違いがあった。乾燥状態、特に 77 K での蛍光寿命解析から、少なくとも 3 タイプのかなり違う機構によって PS II の蛍光が減少することがわかった。5 種いずれも乾燥状態では室温光照射下で蛍光収率、寿命が減少し、PS II 反応中心への過剰な励起エネルギーの流入が抑えられ、熱への変換が起こることがわかった。77 K での解析はさらに、A タイプの 2 種では、前章で見られたように乾燥により PS II 蛍光減衰が促進され、励起エネルギーは速やかに熱に変換され、光化学反応が強く抑制された。B タイプ 1 種では、励起エネルギーの PS II 反応中心への流入が抑制され、見かけの蛍光収率は減るが、蛍光寿命の促進は全くなかった。おそ

らく、湿潤条件下で起こることが知られている状態遷移と似た機構が乾燥で誘導され、PS II へのアンテナ色素からの励起エネルギー流入が抑制されると考えられる。これにはアンテナ色素タンパク質が PS II から PS I へと移動する必要があり、未知の乾燥適応機構である。C タイプでも PS II 蛍光収率は大きく減少したが、A タイプに比べて蛍光減衰速度の増加は小さく、A と B タイプの中間型とも言える応答が見られた。コケ類が乾燥時に発動させる過剰励起エネルギー抑制機構は、種によって異なり多様なことが示された。

4. 結論

乾燥・強光耐性コケ植物 *R. rugosum*, *C. purpureus* は通常湿潤状態での強光下で発動されるキサントフィル回路や状態遷移などの消光機構とは独立に、乾燥下でのみ誘導される非光化学的励起エネルギー消光機構 (d-NPQ) を併せ持つことが示された。これらが湿潤状態と乾燥状態で、独立に強光や乾燥に応答することで高い耐性を実現し、光障害を防いでいる。これは高等植物のように発達した維管束による水分供給、蒸散機構を持たないコケ植物にとっては、極めて重要な機能である。この機能により、コケ植物の一部は、多様に変化した丈の高い高等植物との競争においても、負けずに共存繁栄してきたといえる。この機能は地衣類や、地上藻類とも共通性を持ち、生命進化史上重要な、植物の地上進出において必須だったであろう。

また、乾燥耐性コケ植物 5 種の比較により、地衣類でもみられる d-NPQ 機構だけでなく、PS II のアンテナサイズを小さくする乾燥誘導性の消光機構も見出された。B タイプの種では乾燥により、LHC 結合が変化すると考えられる。さらに多様な乾燥応答機構が地衣類や高等植物にあるかもしれない。緑藻共生型だけでなく、シアノバクテリア共生型の地衣類でも強い乾燥耐性を持つ種がいる。これは光捕集アンテナタンパク質が違っても、似た機能を実現される可能性があることを示している。

コケ植物は葉緑体を持ち、高等植物や緑藻共生型の地衣類と似た光化学系を持つ。しかし共生系ではない点で地衣類とは異なり、発達した維管束系を持たない点で高等植物と異なる。コケ細胞内部には乾燥・低温のストレス下で糖が蓄積されることが知られており、これが乾燥耐性を誘導するとも考えられている (Roser et al., 1992)。地衣体から単離した藻類には d-NPQ 活性が無い (Kranter et al 2005, Kosugi et al 2010) が、糖を再添加すると復活するとの報告もある (Kosugi et al 2013)。本研究のような分光学的解析と、生理学的な操作を組み合わせ、より深く d-NPQ の分子的機構の解明に努めたい。地衣類と比べて、コケ植物は生育が早く、葉緑体の単離も容易で、遺伝子操作も可能であり、多様な研究展開が期待できる。