

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「環境変動に対する植物の頑健性の解明
と応用に向けた基盤技術の創出」
研究課題「活性酸素生成抑制システムの非破壊評
価系の確立とフィールドへの応用」

研究終了報告書

研究期間 2015年10月～2021年3月
(新型コロナウイルス感染症の影響を受け2021年9月まで延長)

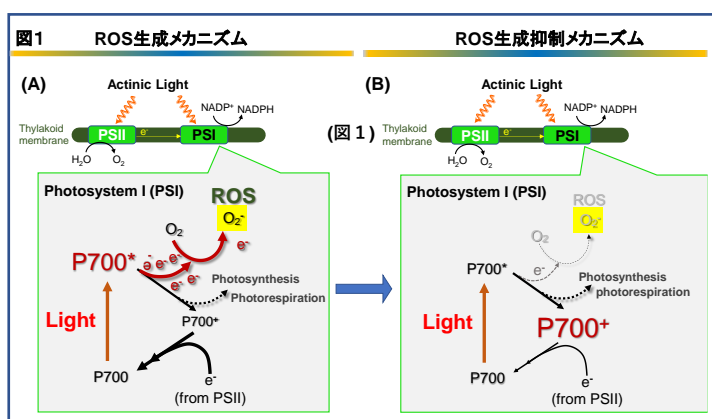
研究代表者：三宅 親弘
(神戸大学大学院農学研究科、教授)

S1 研究実施の概要

(1) 実施概要

植物が生育する地球環境は、必ずしも最適な生育環境を植物へ与えるわけではなく、むしろ生長性・生産性の低下をもたらしている。このことは、植物の潜在的生産性が 2~3 割ほどしか発揮されていないという事実からもうかがえる。生産性低下をもたらす環境要因(ストレス環境)として、植物が日常的に経験する水不足、低温・高温、さらに無機栄養素不足があげられる。これらストレス下では、植物の光合成が抑制されるために、生葉が吸収した光エネルギーは過剰となる。この状況が長期化すれば、葉緑体での活性酸素(ROS)生成そして蓄積が避けられず、生葉細胞は ROS による酸化障害を被る。この不可逆的な障害は生長性・生産性低下の主要な原因となっている。

本研究開発では、環境変動に伴うストレスによる酸化障害の危機に一早く応答する生理マーカーを提案し、その作動原理を学術的に解明すること、そしてマーカーとしての有効性をフィールドで検証すること、さらにモバイル化したマーカー検知機器の開発を行うことを課題とした。提案したマーカーは、光合成能の低下に伴い誘導される PSI 反応中心クロロフィル P700 の酸化型 P700⁺(ROS マーカーと命名)である。この提案の根拠は、2014 年の論文(Sejima et al. 2014 Plant Cell Physiol. 55: 1184-1193)である。この論文で、O₂ 発生型光合成生物に共通する ROS 生成メカニズムそして生成抑制メカニズムを解明していた(図 1)。



P700 は、光化学系 I (PSI) にて光酸化還元サイクルで光合成電子伝達反応を駆動している。基底状態の P700 は光励起され P700*が生成する。光合成が機能しているとき、P700*は CO₂ 固定するために必要な Fd, NADPH を PSI からの電子により生成する。この時 P700*は酸化され、ROS マーカーである P700⁺が生成する。P700⁺は、チラコイド膜光

化学系 II (PSII)から流れてきた電子により基底状態へ還元される。光合成が抑制されると、Fd, NADPH が利用されず、P700*が蓄積すると O₂ が一電子還元され、ROS の一つであるスーパーオキシドラジカル(O₂⁻)が生成する。これが、ROS 生成メカニズムである。これに対して、植物は P700⁺ (ROS マーカー)を蓄積し、P700*を減らす応答をする。これにより、ROS 生成を抑制する。

本課題では、ストレス環境でいち早く抑制される光合成能の低下を鋭敏に P700 酸化として検知できることを検証した。なぜなら、P700 酸化を検知できれば、光合成能低下による ROS 生成の危険な状況をすみやかに認識できるからである。そこで、(1) 光合成能を抑制するストレス環境を設定し、P700 酸化誘導の評価を行った。(2) P700 酸化を誘導するため(ROS 生成を抑制するため)の分子メカニズムの解明、(3) 人為的に ROS を生成させるパルス照射法を用いて、植物の生育環境に依存した ROS 耐性を評価した。(4) 植物生葉を用いた P700 酸化評価機器およびパルス照射装置の作成を行った。これら 4 項目について、チームを構成する各グループがそれぞれ担当し研究開発を行った。担当者名と成果概要は以下の通り。

(1) 環境ストレスによる P700 酸化誘導の検知: 三宅グループは植物生育のために必須の無機栄養素の不足、鈴木グループは乾燥(水)ストレス、野口グループは温度順化、チッソ不足、伊福グループは温度変化、それぞれの環境変動がもたらす ROS 生成の危機的状況を P700 酸化でとらえることに成功した。さらに、三宅グループは、新型コロナウイルス感染症の影響を受け 6 ヶ月間研究期間を延長し、主要作物であるコムギを用いて必須元素不足による酸化ストレス障害の危機を P700 酸化により検知できることに成功した。

(2) P700 酸化誘導メカニズム: 三宅グループは、C3 被子植物における光合成パラメータの頑健な性質を見出し、P700 酸化モデルの構築に成功し、環境変動による光合成能の変化にともなう ROS 生成の危険性評価に成功した。このモデルは、実際に生葉で観測される P700 酸化の原因を探る基盤となる (図 2)。

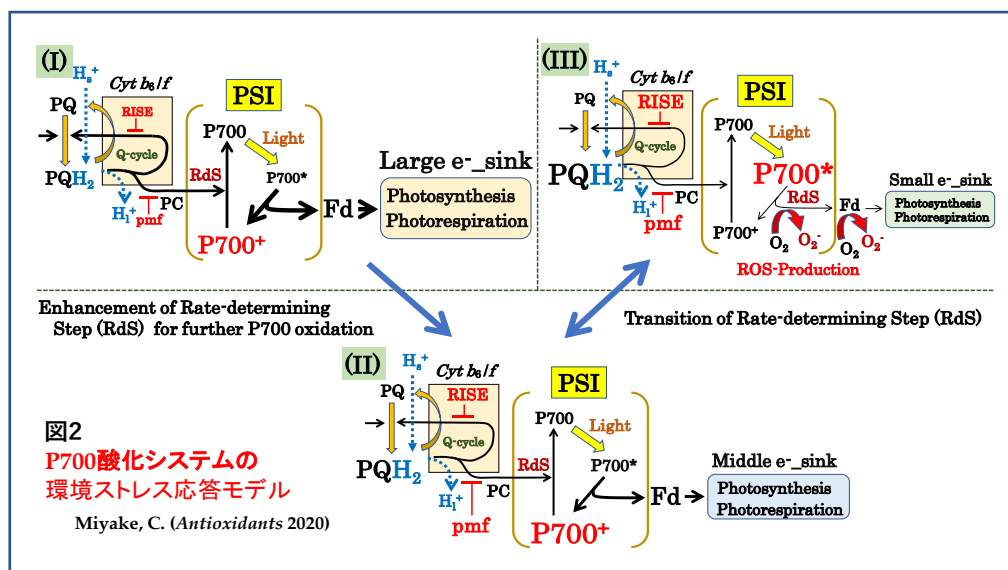
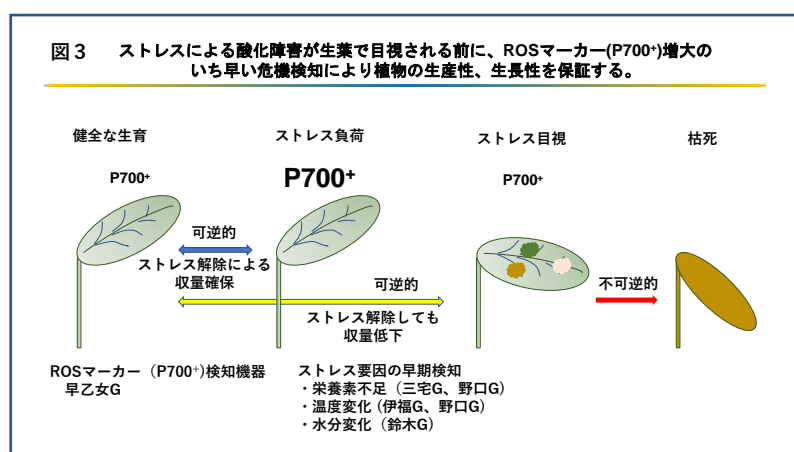


図 2 : P700 酸化状態が3つ[(I), (II), そして(III)]ある。これは、光合成の能力に応答した結果である。光合成能が大きく電子・シンク能が最大の(I)、ストレス環境により光合成が低下した(II)、さらに環境ストレスが大きく、光合成もできない(III)、3つの状態である。例えば、(I)において、黒矢印の幅は電子伝達反応速度の潜在的な大きさを示す。ROS マーカーである P700⁺の存在比率は P700⁺への電子流入速度とP700⁺生成速度に依存している。(I)では、P700⁺生成速度の矢印の幅が P700⁺への電子流入速度を反映する矢印の幅よりも大きく、P700 光酸化還元サイクルにおいて P700⁺への電子流入速度が律速段階(RdS)となって、P700⁺が蓄積している。植物が環境ストレスにさらされ、光合成能が低下すると(II)、P700⁺生成速度の矢印の幅が低下するが、P700⁺への電子流入速度は矢印の幅がさらに大きく低下し、P700 光酸化還元サイクルにおいて P700⁺への電子流入速度の律速性がさらに強化される。これにより P700⁺の存在割合がさらに増加する。この律速性の強化こそが、光合成生物に共通する頑健性であり、ROS マーカーとして使用できる根拠である。律速性を強化する分子メカニズムとして、チラコイド膜ルーメンの酸性化(pmf)によるシトクロム b₆/f 複合体によるプラストキノン酸化活性の低下およびプラストキノンの過還元によるシトクロム b₆/f 複合体の Q-サイクル抑制(RISE)であることを明らかにしてきた。(I)と比べて(II)での RISE および pmf の効果は増大し、P700⁺還元反応の律速性を強化する。さらに、ストレスのレベルが強化された状況にさらされると、RISE および pmf による P700⁺還元速度抑制を上回るほど、P700⁺生成速度の低下がもたらされる(III)。これにより、P700 光酸化還元サイクルにおいて P700⁺の生成速度が律速段階(RdS)となってくる。ここでは、光励起された P700 (P700^{*})が蓄積し、ROS 生成抑制が機能していない非常に危険な状況である。つまり、(I)および(II)の状態から RdS の遷移が生じている。このように、「P700 酸化モデル」の構築により、観測される P700⁺の動きを理論的に説明できるようになった。

(3) パルス照射による ROS 耐性評価: 三宅グループは無機栄養素不足によるパルス耐性変化をとらえることに成功した。野口グループは、シロイヌナズナの生息地間でパルス耐性が異なること、また低温ストレスへの順化能力が異なることを明らかにした。

(4) P700 酸化評価機器およびパルス照射装置: 早乙女 G は、フィールドで活用するためのモバイル化・小型化に成功した。生葉を用いた PSI 反応中心クロロフィル P700⁺の分光吸収測定と O₂ ガス交換解析の同時測定に成功し、チーム内各グループによる評価の、改良の結果、高い測定精度を達成できた。

これらの成果により、図 3 に示すように、生育不良、収量低下をもたらすストレスによる酸化障害の危機を早く検知し、ストレス緩和による潜在的成長性・生産性の確保をねらえるようになった。



(2) 顕著な成果

1. ROS マーカー誘導メカニズムの解明

概要: 本プロジェクト開始時、光合成抑制による P700 酸化(ROS マーカー誘導)の頑健性だけは確かであったが、その分子メカニズムは未解明であった。このカギを握っていたのが、光合成電子伝達反応が進む葉緑体チラコイド膜でのプロトン濃度勾配形成と電子伝達体プラストキノンの還元であった。光化学系 I の電子受容体であるフェレドキシンの酸化還元反応(Kadota et al. 2019 *Plants* 10.3390/plants8060152)、プロトン濃度勾配形成(Sejima et al. Miyake 2016 *Plant Cell Physiol.* 10.1111/pppl.12388)、光合成での明反応と暗反応が密にカップルして機能していること(Wada et al. 2020 *Plants* 10.3390/plants9030319)、プラストキノンの還元および P700 酸化が光合成と光呼吸に支配されること(Shimakawa and Miyake 2018 *Front Plant Sci* 10.3389/fpls.2018.01617. eCollection 2018)、これら頑健性のある事実の発見により ROS マーカー誘導メカニズムを P700 酸化システムとして提唱できた(Miyake 2020 *Antioxidants* 10.3390/antioxi9030230, Furutani et al. 2020 *Adv Res Bot* 10.1016/bs.abr.2020.08.001)。これまで、P700 酸化誘導のためにプロトン濃度勾配形成が不可欠とされていたが、その勾配形成をもたらす実態が未解明であった。本プロジェクト成果は、プロトン勾配形成および還元型プラストキノン蓄積の様式を解明するとともに、P700 酸化が ROS 生成抑制のみならず、葉緑体のレドックス調整を支配する新規な姿を見せるものである。

2. ストレス環境に応答する ROS マーカーの実証

概要:本プロジェクトでは、ストレス環境を早く検知する生理マーカーとして酸化型 P700 の位置づけを確立できた。そして、上述の「P700 酸化誘導メカニズム」に基づき、ストレス時(水分変化・温度変化・無機栄養塩変動)の頑健性ある P700 酸化応答の原理が理解できるようになった。さらに、「ROS マーカーの誘導」は、「P700 酸化システム」が駆動する。これは、光合成電子伝達反応(明反応)と光合成・光呼吸(暗反応)が共同で制御しあいながらもたらされる。つまり、光化学系 II および I のレドックス状態、そして光合成速度が P700 酸化に反映される。このことを利用し、ストレスを与える環境要因の特徴を反映した ROS マーカー活用の可能性を示すことができた。

3. 「植物における環境ストレス診断装置、及び、環境ストレス診断方法」

概要:ROS マーカーを利用した植物における環境ストレス診断装置(及び環境ストレス診断方法)を提案する特許申請を行った。診断法の適用例として、ウリ科作物のモデル植物であり、低温感受性の作物として知られるキュウリを用いた。キュウリは、特に冬季のハウス栽培においては、温度管理に大きなコストがかかっており、適切な温度管理と、温度変化に頑健な品種が求められている。我々は、環境ストレスによる植物の生理状態を精度良く把握できる「ROS マーカー測定(Y(ND)の測定)」が、キュウリの新しい栽培温度管理と、低温耐性品種選抜の指標として有効であることを見出した。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. ROSマーカー評価機器の開発

概要:農作物などの生産性を低下させる環境ストレスの予兆をとらえる ROS マーカー酸化型 P700 計測と共に光合成活性を同時に計測する酸素濃度測定を搭載した評価機器を開発した。これは小型でバッテリー駆動、無線通信によるタブレット端末アプリから操作可能で、屋外計測が容易となる。これまでに同様な機器はなく、本機器を用いることで屋外現場での新たな早期診断の知見を得ることが期待される。

2. パルス照射装置の開発

概要:葉緑体チラコイド膜の光化学系 I (PSI) の中で ROS を内在的に生成させることができるパルス照射法の原理を使用した専用のパルス照射装置の試作器を開発した。この試作器は野外で使用でき、一度に 6 個体の屋外植物・作物の生葉に ROS を人為的に発生させることができる。今後 ROS 耐性の診断や品種間差の探索などに使用でき、さらに計測機能を付加させることで更に応用性があるツールになると考えている。

<代表的な論文>

1. Shaku K, Shimakawa G, Hashiguchi M, Miyake C. (2016) Reduction-induced suppression of electron flow (RISE) in the photosynthetic electron transport system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiology* 57(7):1443-1453. doi: 10.1093/pcp/pcv198

概要:ROS マーカーである P700 酸化誘導の新規メカニズムをラン藻で発見した。光合成電子伝達系においてシトクロム *b₆/f* 複合体による還元型プラストキノンの酸化活性が PSI 反応中心クロロフィル P700 への電子伝達速度を決定することが定説であった。定説では、光合成が抑制された状況でルーメン酸性化(Δ pH 蓄積)により、シトクロム *b₆/f* 複合体の活性低下が生じ、P700 酸化が誘導される。本論文では、光合成が抑制された状況で還元型プラストキノンの蓄積するとシトクロム *b₆/f* 複体内の電子およびプロトンの動き(Q-サイクル)が

抑制され、P700 が酸化されることを解明した。そして、この RISE による P700 酸化は、その後、植物・作物でも機能していることが明らかになった。つまり、RISE は、光合成生物にとって「P700 酸化誘導の重要なメカニズム」として認識すべきものである。

2. Kadota K, Furutani R, Makino A, Suzuki Y, Wada S, Miyake C. (2019) Oxidation of P700 induces alternative electron flow in photosystem I in wheat leaves. *Plants* 8(6): 152 doi: 10.3390/plants8060152.

概要：本論文では、PSI 電子受容体であるフェレドキシン(Fd)の酸化還元反応速度が光合成および光呼吸により決定されることを見出した。つまり、明反応と暗反応が密にカップルして機能することを示唆する重要な成果であった。この事実は、長い間、未解明であった P700 酸化誘導のための Δ pH 形成および還元型プラストキノン蓄積の分子モデル構築の根拠となった。

3. Wada S, Suzuki Y, Miyake C. (2020) Photorespiration enhances acidification of the thylakoid lumen, reduces the plastoquinone pool, and contributes to the oxidation of P700 at a lower partial pressure of CO₂ in wheat leaves. *Plants* 9(3) 319. doi.org/10.3390/plants9030319

概要：Kadota 論文(2019)で示唆された明反応と暗反応の密なカップリングを実証するデータを獲得、このことを根拠に P700 酸化誘導メカニズムに取り組んだ。そして、チラコイド膜での Δ pH 形成および還元型プラストキノン蓄積のメカニズムにおいて、大気条件下で機能する光呼吸代謝が Δ pH 形成をもたらすことを見出した。さらに、光呼吸が機能しない状況下では RISE がメインに P700 酸化を誘導することを見出した。これらの事実が、代表者による「P700 酸化誘導モデル」の提唱をもたらした。

4. Ohnishi M, Furutani R, Sohtome T, Suzuki T, Wada S, Tanaka S, Ifuku K, Ueno D, Miyake, C. (2021) Photosynthetic parameters show specific responses to essential mineral deficiencies. *Antioxidants*, 10(7), 996. doi.org/10.3390/antiox10070996

概要：光合成の明反応および暗反応が密にカップルして機能する光合成のしくみは、植物に様々な影響を与える必須元素の不足が、光合成の明反応を反映する PSII および PSI パラメータの挙動に現れることが予想された。そこで、ヒマワリが、必須元素不足状況下で水耕栽培された。光合成誘導期のパラメータは、不足する必須元素特異的に応答することをみだし、その解析手法の考案により、独自の植物栄養診断方法を開発した。これにより、ROS マーカー増大による酸化障害の危機を与える不足元素の同定が可能となった。とくに、この方法は、主要作物であるコムギへの適用にも成功し、幅広い作物への適用の可能性が見えてきた。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「三宅」グループ

研究代表者: 三宅 親弘(神戸大学大学院農学研究科 教授)

研究項目 (ROS マーカー維持システムの非破壊評価系の確立とそのフィールド検証)

1. 評価機器開発

- a. ROS マーカー評価機器
- b. パルス照射機器

2. ROS マーカー活用法の確立

- a. 酸化障害診断(ROS 由来カルボニル解析)
- b. ROS マーカー早期検知の実践(ストレス応答解析(i)栄養素)
- d. ROS マーカー誘導とその生理的役割の解明

② 「鈴木」グループ

主たる共同研究者: 鈴木 雄二(岩手大学農学部 准教授)

研究項目

・イネの水ストレスに対する早期診断マーカーとしての ROS マーカーの活用の検証とマニュアル化

- 1. 酸化障害危機検知のための ROS マーカー活用法の確立(平成 29 年度以降)
- 2. ROS 形成分子メカニズム(平成 27-28 年度、平成 30 年度以降)

③ 「野口」グループ

主たる共同研究者: 野口 航(東京薬科大学生命科学部 教授)

研究項目

- ・ROS マーカー維持システムとしての呼吸鎖の役割の精査(平成 27-28 年度)
- ・環境ストレス下のモデル植物の早期診断マーカーとしての ROS マーカーの活用の検証とマニュアル化(平成 29 年度以降)

④ 「伊福」グループ

主たる共同研究者: 伊福 健太郎(京都大学大学院生命科学研究科 准教授)

研究項目

- ・ROS マーカー維持システムにおける酸素発生抑制機構の解明、及び、ROS マーカー変動に伴う遺伝子発現解析(平成 27-28 年度)
- ・ROS マーカー変動に伴う遺伝子発現解析と ROS マーカー活用法の探索(平成 29 年度以降)

⑤ 「早乙女グループ」

主たる共同研究者: 早乙女孝行(分光計器株式会社 副技師)

研究項目

- ・フィールド環境で使用可能な ROS マーカー評価機器の開発
- ・フィールド環境で使用可能なパルス照射装置の開発

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

三宅グループ: 2017 年度に国際共同研究を行ったフランス Anja Krieger 博士および Pierre Setif 博士とは、その後も P700 酸化に関する共同研究を継続中である。

伊福グループ: (株) タキイ種苗の農場を 2 度訪問し、意見交換した。

早乙女グループ：ROS マーカー評価機器の貸出提供をチーム内外として以下に継続的に使用頂いている。尚、使用先の先生方から機器の改善要望や計測状況など情報交換している。

CREST 三宅チーム内

神戸大 三宅親弘先生、高知大 上野大勢先生、岩手大 鈴木雄二先生、東京薬科大 野口航先生、京都大学 伊福健太郎先生

チーム外

東京農工大学 藤井 義晴先生 (CREST 杉山チーム)

京都大学 工藤先生 (CREST 工藤チーム)

兵庫県立農林水産技術総合センター・大塩哲視主任研究員