

GC/MS を用いた *Nostoc commune* における光合成特性の解析

楠本明日香*, 小杉真貴子**, 大森正之**, 黒岩恵**, 諏訪裕一**, 小池裕幸**

Analysis of photosynthetic properties of *Nostoc commune* by means of Gas Chromatography/Mass spectrometry

Asuka Kusumoto:*, Makiko Kosugi**, Masayuki Ohmori**, Megumi Kuroiwa**,
Yuichi Suwa** and Hiroyuki Koike**

Abstract

Photosynthetic properties of a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc commune* were investigated by means of Gas Chromatography/Mass spectrometry (GC/MS). Cyanobacteria consume oxygen and release CO₂ by respiration in the dark while they evolve oxygen and absorb CO₂ by photosynthesis in the light. Simultaneous measurement of evolved oxygen and incorporated CO₂ under the light is essential for photosynthesis research. However, the measurement of oxygen released to the atmosphere by terrestrial cyanobacteria is technically tricky, since the level of oxygen evolved by photosynthesis is much smaller than atmospheric oxygen. Since oxygen released by photosynthesis originates from the water molecule, ¹⁸O-labeled H₂O enables specific detection of oxygen evolved by photosynthesis by means of GC/MS. This method allows discrimination of dioxygen molecule level by photosynthesis from bulk oxygen in the atmosphere. The molar ratio of oxygen to incorporated CO₂ under illumination was not unity but higher by 10 to 40%. The result that more oxygen was evolved compared with incorporated CO₂ indicates that electrons extracted from water reduce not only CO₂ but also some other electron acceptor(s), including the reduction of O₂ and H₂O₂ in the Water-Water cycle.

本研究で用いた略語とその正式名称

Chl	Chlorophyll
Ci	Inorganic carbon
DCMU	3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea
Flv	Flavodiiron
GC/MS	Gas Chromatography/Mass Spectrometry
HEPES	4- (2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced form
SOD	SuperOxide Dismutase
<i>Synechocystis</i> 6803	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
WWC	Water-Water Cycle

*中央大学大学院理工学研究所生命科学研究科生命科学研究専攻, 〒112-8551 文京区春日1-13-27

**中央大学大学院理工学部生命科学研究科, 〒112-8551 文京区春日1-13-27

***現住所: 基礎生物学研究所 環境光生物学研究部門, 〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中38

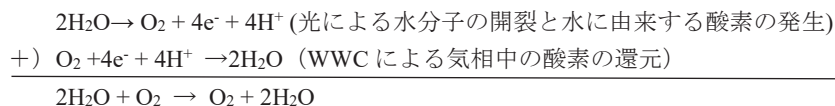
1. 序論

Nostoc commune (和名 イシクラゲ) は陸棲ラン藻の一種であり、ネンジュモ属に属する。藻体は直径4~6 μmの球形の細胞が数珠状に連なっており、所々に窒素固定を行うヘテロシストが存在する。糸状体の周りは寒天質の細胞外多糖で覆われている[1], [2]。本種は優れた乾燥耐性を有し、暗所において乾燥状態で約90年間保存された試料が吸水により代謝を回復したと報告されている[3]。吸水した状態では太陽光のエネルギーを利用して酸素発生型の光合成を行うとともに、窒素固定も行う。暗所では、呼吸活性が見られる。また、生息域は熱帯から極域にも広がっている。特に極域でも生育できることから、低温下においても代謝活性を維持し、冬期に積雪状態で凍っても融雪後に回復できるような機構を持っていると考えられている。*N. commune* は休眠中の細胞内にスーパーオキシドラジカルを除去するFe-SODを蓄えており、光合成反応の回復過程で重要な役割をしているとされている[4]。光合成反応の回復過程はSatohら[5]によって調べられているが、不活性化の途上でどのようなことが起きているかは未解明の点が多い。

一般に光合成活性は、これまで酸素電極を使って、炭酸固定に伴う酸素の発生で測定されてきた。しかし、(酸素発生量) = (炭酸固定量) とすることに議論の余地があるとされていた。炭酸固定量と光合成活動に伴うガスの出入りを正確に測定するためには、空气中に藻体を置いて、光合成に伴うCO₂の吸収とO₂発生をガスとして同時に測定する必要がある。GC/MSはガスクロマトグラフィーにより、混合気体を分離し、分離したガスは順次質量分析計で分析し、そのマスペクトルから同位体を含めた気体の定量分析を行う事ができる。既にGC/MSを用いて様々な活性が測定されており[6]、光合成の研究でも質量分析計を使って光合成活性が測定されているが[7]-[9]、ラン藻の光合成活性を測定した報告は多くはない。本研究では酸素の同位体である質量数18の¹⁸Oを含んだ水で試料を吸水させる事で、光合成の水分解によって発生する¹⁸Oを含む酸素の発生と炭酸固定によるCO₂吸収の同時測定を行った。

高等植物や緑藻、ラン藻は光合成に影響を与える環境要因の変動に対応するため、光合成電子伝達の主経路である直鎖状電子伝達系に連結して側経路をなす電子伝達経路を持つ。この経路には光呼吸、Water-Water Cycle (WWC)、光化学系IおよびIIの周りの環状電子伝達が知られている[10], [11]。

C₄植物や緑藻、ラン藻では、光呼吸の代わりにWWCが主に働いている [11]。特にラン藻はWWC活性が高い事が知られている[7]。WWCは、光過剰の環境においてCO₂固定に必要な量以上の還元力が葉緑体で生成され、光化学系Iへ供給される電子が過剰となった際、O₂がNADP⁺の代わりに電子受容体となってスーパーオキシド(O₂⁻)に還元され、最終的にH₂Oを生成する反応機構である。C₃植物における研究ではWWCの電子フラックスは光化学系IIにおけるすべての電子伝達の約10%を占めており、CO₂分圧の低下はWWCを増強することが明らかになっている[12]。一方、ラン藻では植物型の反応とは異なり、Flvタンパク質がMehler-like反応を駆動している。ラン藻は4つのFlvタンパク質(Flv 1,2,3 and 4)を持ち、CO₂飽和条件においてはFlv1とFlv3が発現して、光化学系Iを仲介して活性酸素を生成せずに直接O₂をH₂Oに還元している [13]-[17]。葉緑体やラン藻のWWCにおける電子フラックスは、正味の酸素の出入りがない。これは、2分子のH₂O分子から電子が引き抜かれた結果発生したO₂分子と同じ数のO₂分子を消費して再び2分子のH₂O分子を生成するからである。



このため、WWCの活性は通常酸素電極を用いた測定では検出できず、Chl蛍光の解析によって得られる光化学系IIの量子収率[Φ(PSII)]によって見積もられてきた[18], [19]。ただ、H₂OのOを¹⁸Oでラベルすることにより、上記の2種類のO₂を区別することが出来る。ホウレンソウの葉緑体での電子伝達に伴うH₂¹⁶Oからの¹⁶O₂の発生と¹⁸O₂の吸収を質量分析で分別的に定量化する方法[20]や、緑藻の生体内のWWCのelectron sink能を、光照射に伴う¹⁸O₂の取り込みによって測定することによって、WWCの電子フラックスが解析された例がある[21]。したがって、WWCの活性は、GC/MSを用いた¹⁶Oを含む分子種と¹⁸Oを含む分子種の出入りで測定が可能となる。

本研究では、¹⁸OでラベルしたH₂OとGC/MSを用いることにより、光合成で発生する酸素と気相中の酸

素を区別して測定した。また、*N. commune* の WWC 活性の測定方法の確立と、その評価を行った。この方法を用いて、*N. commune* における全電子流量に対する、炭酸固定と WWC の割合を明らかにした。

2. 方法

2.1 材料

野生株の *N. commune* は長野県長野市若槻，新潟県新潟市中央区，静岡県伊豆市長岡，静岡県静岡市葵区，千葉県南房総市，埼玉県熊谷市で採取した。採取したコロニーを一晩水につけて膨潤させ，不純物を取り除き，広げて風乾した。風乾後，室温で保存し，実験に使用した。

モデルラン藻として東京大学の池内教授から寄贈された *Synechocystis* 6803 SA 株を BG11 液体培地[22]で培養し，実験に使用した。

2.2 クロロフィル定量[23]

N. commune のコロニーを乳鉢にいれ乳棒ですりつぶした。そこに 2 mL のメタノールを加えてさらに乳棒ですりつぶし，ピペッターで上清を静かに吸い取りエッペンドルフチューブに移した。この操作を上清の色の緑色がなくなるまで繰り返した。分注した上清は遠心 (7,000 × g, 5 min, 25 °C CE 15RX II, HITACHI 製) を行い，上清の 350 nm~750 nm の吸収スペクトルをそれぞれ SHIMADZU MPS-2450 分光光度計 (島津製作所製) で測定した。Chl 濃度を求めるために，次の計算式を当てはめて算出した。

$$[\text{Chl}] = 13.42 \times (A_{665} - A_{750}) \text{ } [\mu\text{g/mL}]$$

2.3 GC/MS による光合成活性の測定

安定同位体でラベルされた水 (H_2^{18}O) は， ^{18}O の濃縮度が 98% のもの (大陽日酸) を超純水で 15% に希釈した。この水を吸水させ，酸素発生量の測定を GC/MS を用いて行った。*N. commune* のコロニーに十分量以上 (乾燥重量の 30 倍以上) の 15% H_2^{18}O を加え，一晩膨潤させた。翌日，十分膨潤した *N. commune* のコロニーをバイアル瓶に入れて，ゴム栓とアルミキャップで密閉した。その後，250 μL または 100 μL ガスタイトシリンジ (Valco Instruments Co. 製) を用いて，一定時間ごとにバイアル瓶内のヘッドスペースの気体を 50 μL または 20 μL GC/MS に射ち込んだ。各測定では試料を 3 回射ち込んで濃度の平均値と標準偏差を求めた。データの振れは 3% 未満であった。はじめの 4 回の測定はバイアル瓶をアルミホイルで巻いて暗条件下でサンプリングした。次に約 180 $\mu\text{mol photons/m}^2 \cdot \text{s}$ の光照射による明条件下での CO_2 吸収量と $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ 発生量を測定した。光源は，100 W のスライド映写機 (CABINCS-15) を用いた。照射光は 1 L のルーペ瓶に水を入れた水層を通して熱線を除いた後，鏡を用い，バイアル瓶の底からコロニーに万遍なく光が当たるように照射した。最後に，再び暗条件下で 4 回測定した。培養した *Synechocystis* 6803 の細胞は 15% の H_2^{18}O を含む培地に懸濁し，バイアル瓶に入れて *N. commune* の場合と同じようにガス測定をおこなった。

GC/MS の解析ソフト GCMS solution (SHIMADZU 製) を用いて CO_2 量と $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ 量の変化をモニターした。各気体の検量線は大気を使用して作成し，大気成分の割合は O_2 を 21%， CO_2 を 0.04% として計算した。同位体の天然存在比は ^{16}O を 99.75%， ^{18}O を 0.205% で計算した。

光合成の水分解 (水の開裂) に由来する酸素発生量は，測定した $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ の量を元に計算した。15% の H_2^{18}O と 85% の H_2^{16}O を含む水を使用したため，発生する酸素はそれぞれ， $^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ は $0.15 \times 0.15 = 0.0225$ ， $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ は $2 \times (0.15 \times 0.85) = 0.255$ ， $^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ は $0.85 \times 0.85 = 0.7225$ の割合で発生する。したがって，発生する $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ の量の 1/0.255 倍すなわち 3.92 倍すると，光合成による全酸素発生量となる。この値を使い，光照射条件下での酸素発生活性をグラフの傾きから求め，使用した試料の重さあたりで計算した。この活性はバイアルの気相中の CO_2 濃度が検出できなくなり，グラフ上の酸素発生量の傾きが変化する前後でそれぞれ算出した。

光照射下での炭酸固定活性は，*N. commune* の呼吸活性が明暗で変化しないと仮定し，暗条件下における呼吸による CO_2 発生速度と明条件下における見かけの CO_2 吸収速度を合計して求めた。

測定は，大気成分測定用に設定された GC/MS-qp2010 Plus (SHIMADZU 製)，キャリアガスにはヘリウムを使った[6]。

2.3.1 NaHCO_3 を含む緩衝液で膨潤させた試料の光合成活性の測定

N. commune のコロニーに十分量以上の $15\% \text{H}_2^{18}\text{O}$ を含む H_2O を加え、一晩膨潤させた（以下、吸水処理と記す）。翌日、コロニーを NaHCO_3 溶液（ 0.5 mM NaHCO_3 , 10 mM HEPES-NaOH (pH7.0)）を入れておいたエッペンドルフチューブに移し、30 分間平衡化させた。その後、2.3 と同様に GC/MS で CO_2 吸収・発生量と $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ 発生量を測定した。

2.3.2 DCMU を含む緩衝液を吸水させた試料の光合成活性の測定

吸水処理をした *N. commune* のコロニーを 1.5 ml のマイクロチューブ内で DCMU 溶液（ $10 \mu\text{M DCMU}$, 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.0)）で 30 分間平衡化させた。その後、2.3 と同様に GC/MS で CO_2 吸収・発生量と $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ 発生量を測定した。

2.4 酸素電極による光合成酸素発生速度の測定

活性測定では酸素電極を使用して光合成による酸素発生活性を測定した。測定温度は、循環冷却装置（DESAGA FRIGOSTAT (DESAGA 製)）で $25 \text{ }^\circ\text{C}$ に保った。光源にはキャビン製のプロジェクターを用い、光量は $980 \mu\text{mol photons/m}^2 \cdot \text{sec}$ になるように照射した。出力信号は R-61（理化電機工業製）で記録した。あらかじめ細かく切り刻んだ *N. commune* のコロニーを一晩膨潤させ、 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) 中で光照射に伴う試料の酸素発生量を測定し活性を測定した。

3 結果と考察

3.1 純水で膨潤させた *Nostoc commune* の光合成活性

H_2^{18}O を 15% 含む水で一晩膨潤させた *N. commune* の CO_2 吸収・発生量と $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ 発生量を、GC/MS を用いて測定した (Fig. 1)。暗所では呼吸により CO_2 濃度が上昇し、光照射を始めると炭酸固定に伴い、 CO_2 濃度は減少した。光照射後 40 分（測定開始後 120 分）で気相中の CO_2 は炭酸固定により消費されたことを示している。一方 $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ 濃度は、光照射前は一定で、光照射と共に上昇した。しかも、 CO_2 が使い切られた光照射開始後 40 分を過ぎても速度を落として上昇し続けたが、光を切ると $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ 濃度の増加はほぼ止まった。光照射に伴う酸素発生速度と炭酸固定速度を、方法 2.3 に記述した方法に従って計算し、酸素発生速度に対する炭酸固定活性の比を求めたところ、 1.8 であった。この値は採取した試料により異なったが、 $1.1 \sim 1.8$ であった（データ略）。

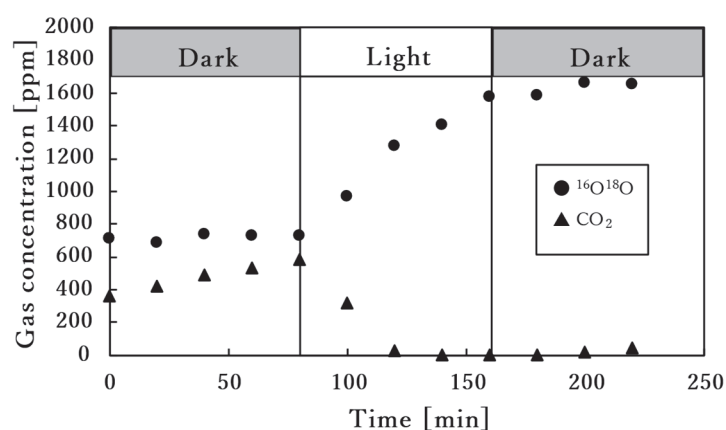


Fig. 1 CO_2 consumption/evolution and $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ evolution in *N. commune*

The sample was swollen by $15\% \text{H}_2^{18}\text{O}$ overnight. Gas concentration was monitored in the dark for 80 min, in the light for 80 min and then in the dark for 60 min. Closed circles, partial pressures of $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ and closed triangles, concentrations of CO_2 .

3.2 二酸化炭素濃度との関係

GC/MS 測定において照射に伴う炭酸固定活性の高い試料ではバイアル内の気相中に含まれる CO_2 が短時間で消費されてしまい、正確な速度が求められない可能性が考えられた。また、バイアル瓶内の気相に含まれる CO_2 分圧の低下が CO_2 の測定値に影響して、正確な炭酸固定速度も算出できていないおそれもあった。そこで、バイアル瓶内の CO_2 濃度を高くすることで、光合成速度にどのような影響があるかを調べることにした。

バイアル中の CO_2 濃度を高くして照射したときの CO_2 濃度の減少の傾き ($1.10 \mu\text{mol CO}_2/\text{mg dw} \cdot \text{h}$) は、大気中の CO_2 条件下で測定したものの ($0.93 \mu\text{mol CO}_2/\text{mg dw} \cdot \text{h}$) と大きな違いはなかった (Fig. 2)。大気圧 CO_2 濃度下で測定した場合、照射停止後 20 分程度たってから CO_2 濃度は再び上昇した (Fig. 2, 矢印)。おそらく、呼吸により細胞から放出された CO_2 はそれを取り巻く細胞外多糖に含まれる水にまず溶解出し、その水が CO_2 で飽和した後気相中に放出されたものと考えることが出来る。気相中の CO_2 濃度の上昇が照射後ある程度時間がたった後に見られるようになった理由は、この過程のためであると考えることが出来る。この濃度の上昇が始まるまでの時間は使用した試料により差が大きかった (データ略)。

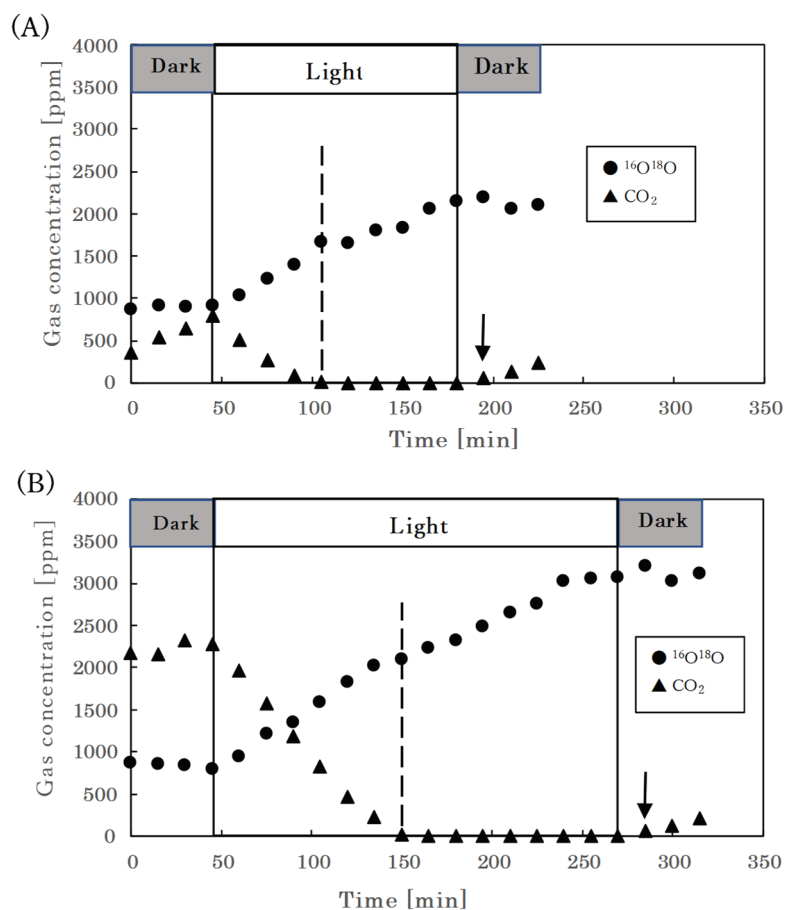


Fig. 2 Effects of CO_2 concentration on photosynthesis and respiration in *N. commune*.

$^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ evolution and CO_2 consumption/evolution under (A) atmospheric condition (21% O_2 , 400 ppm CO_2) and (B) high CO_2 condition (21% O_2 , 2000 ppm CO_2). Closed circles, partial pressures of $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ and closed triangles, concentrations of CO_2 . Arrows indicate the time at which CO_2 concentration started to increase after cessation of illumination. Broken lines indicate the time to switch from fast to slow oxygen evolution.

3.3 一晩光照射した試料の活性

これまでの測定で、炭酸固定に必要な気相中の CO_2 が見掛け上消費されているのに酸素発生が何故続くのかということが問題となった。この理由として、気相中の CO_2 が消費されても細胞外多糖が保持する水に溶けている CO_2 が細胞に供給されて炭酸固定を続けることで酸素が発生し続けるのではないかという仮説を立てた。もしそうならば、細胞外多糖中の CO_2 が消費された時点で酸素発生が止まるはずである。そこで、 H_2^{18}O を 15% 含む水で一晩膨潤させた *N. commune* 細胞塊に一晩光照射を行い、 CO_2 吸収・発生量と $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ 発生量を測定した (Fig. 3)。光照射を始めると試料は 1 時間程度で CO_2 を完全に消費したが (データ略)、 $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ の発生はそのまま止まることなく一晩続いた。一方モデルラン藻の *Synechocystis* 6803 を用いた測定では、 CO_2 を使い切った後も酸素発生は続いたが、1,500 分付近で $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ 発生は止まった。したがって、 CO_2 を完全に消費した後も O_2 を発生し続ける活性は両者とも持つが、*N. commune* でその活性が長時間継続することがわかった。この長い $^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ の発生は炭酸固定以外の理由で起こっていることを示唆している。

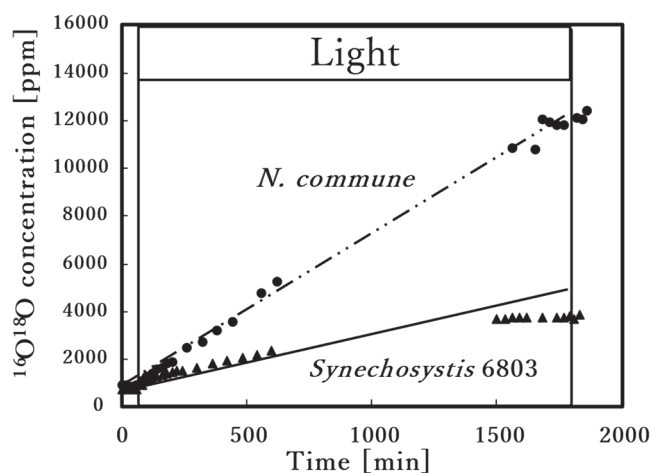


Fig. 3 $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ evolution under continuous illumination in *N. commune* and *Synechocystis* 6803. Partial pressures of $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ were monitored for *N. commune* (closed circles) and *Synechocystis* 6803 (closed triangles).

3.4 NaHCO_3 の影響

N. commune が光合成の Ci 源としてガスとしての CO_2 だけでなく、水に溶けた HCO_3^- も利用しているのであれば、 HCO_3^- を使い切ったところで酸素発生速度に影響が出るはずである。この点を検討するためにまず、*N. commune* の光合成における NaHCO_3 要求性を調べた。 HCO_3^- が *N. commune* の光合成のための有効な Ci 源である場合、細胞外多糖中に十分量の HCO_3^- を保持させれば、気相中の CO_2 よりもこれが優先的に使われるので、その分気相中の CO_2 消費は抑えられると予想される。

気相中の CO_2 と $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ の濃度の経時変化を測定したが、 $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ の発生、 CO_2 の吸収とも、細胞外多糖に純水が保持されている場合と比べて、速度の違いは見られなかった (Fig. 4)。むしろ光照射後の CO_2 濃度上昇は NaHCO_3 を添加した試料の方が速かった。呼吸で放出された CO_2 は、まず細胞外にある細胞外多糖中に溶け出す、これが添加した NaHCO_3 のために早く飽和したことにより気相中に早く放出したものと考えられる。以上の結果から、*N. commune* の光合成において NaHCO_3 添加の有無は $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ の発生速度、炭酸固定速度ともに影響しないことがわかった。

更に、酸素発生に対する NaHCO_3 添加の影響を調べるために、酸素電極によっても酸素発生速度を測定した。 NaHCO_3 を添加してもしていなくても、酸素電極を用いた炭酸固定活性には影響は見られなかった (Table 1)。また、乾燥耐性のないモデルラン藻である *Synechocystis* 6803 でも測定したが、*N. commune* と同様に酸素発生速度に違いはみられなかった。

以上の結果から Ci の供給源として NaHCO_3 を加えても加えなくても光合成活性に影響はみられなかった。これは、ラン藻は水中の Ci (CO_2 と HCO_3^-) を濃縮する活性が強いことと[24], [25], 細胞外多糖が保持する Ci の量が少ないために影響が見られなかったと考えられる。また、モデルシアノバクテリアである *Synechocystis* 6803 の結果より、GC/MS を用いた測定で得られた炭酸固定速度は、酸素電極で得られた光合成速度とほぼ一致していた (Table 1)。このことから、GC/MS で測定される $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ 発生量と CO_2 吸収量が、酸素電極を用いた炭酸固定活性を正しく反映しているということが示された。

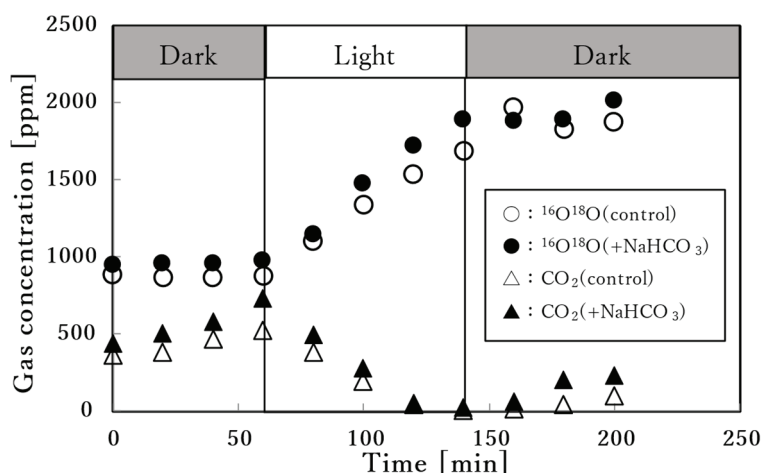


Fig. 4 Effects of NaHCO_3 on CO_2 and $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ concentration in *N. commune* under continuous illumination.

Triangles indicate partial pressures of CO_2 and circles indicate those of $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$. Open symbols indicate those in the absence of NaHCO_3 and closed symbols indicate in the presence of 0.5 mM NaHCO_3 , respectively.

Table 1 Photosynthetic activities in the presence or absence of NaHCO_3 .

	0.5 mM NaHCO_3	methods	
		GC/MS	O_2 electrode
<i>N. commune</i>	—	1.28* ¹	138* ²
	+	1.28* ¹	132* ²
<i>Synechocystis</i> 6803	—	97.59* ²	83.1* ²
	+	—	103.1* ²

*1:[$\mu\text{mol CO}_2/\text{mg dw} \cdot \text{h}$], *2:[$\mu\text{mol CO}_2$ or $\text{O}_2/\text{mg Chl} \cdot \text{h}$]

3.5 DCMU の影響

Fig. 1 や 2 で示されたように、気相中の CO_2 が消費された後も酸素発生が継続した。測定に用いるバイアル瓶に試料を入れず H_2^{18}O のみを加えた場合や、試料を熱処理して失活させた場合は、光照射による $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ の発生は見られなかった (データ略)。したがって、 CO_2 が見掛け上消費された後も続く酸素発生は非生物学的要因ではなく *N. commune* の生細胞によるものであるといえる。この CO_2 吸収と $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ 発生が光合成反応に由来するものか否かを調べるため、*N. commune* のコロニーに、光化学系 II と光化学系 I 間の電子伝達阻害剤である DCMU を加えて測定した。

この処理をした試料では、暗所から明所に切り替えても呼吸による CO_2 の発生には影響がなく、一定速度で CO_2 の発生が続いた (Fig. 5)。一方光照射に伴う CO_2 の吸収と $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ の発生は完全に阻害された。DCMU は光化学系 II のキノン結合部位に結合する事で電子伝達を阻害し、光合成反応を阻害する[25]。したがって、光照射に伴う CO_2 の吸収と $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ の発生は *N. commune* の光合成反応によるものであるといえ

る。したがって、GC/MS を用いた測定において観測される光照射に伴うガスの出入りは、炭酸固定による CO₂ 吸収と光化学系 II における水分解による ¹⁶O¹⁸O 発生を反映しているといえる。

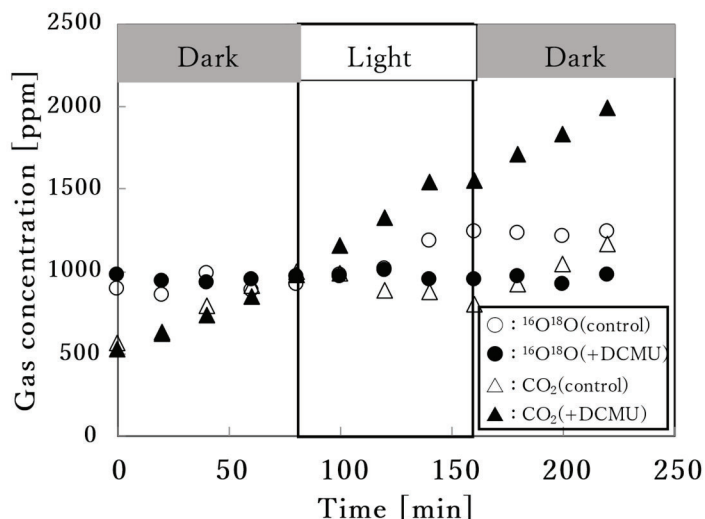


Fig. 5 Effects of DCMU on CO₂ consumption/evolution and ¹⁶O¹⁸O evolution in *N. commune*. Triangles indicate partial pressures of CO₂ and circles indicate those of ¹⁶O¹⁸O. Open symbols, partial pressures in the absence of DCMU, closed symbols, those in the presence of 10 μM DCMU.

3.6 *Nostoc commune* の Water-Water Cycle (WWC) 活性

本研究では、*N. commune* のコロニーを吸水により膨潤させるために用いる H₂O の酸素を、原子量 18 の ¹⁸O でラベルしたものをを用いた。そのため、光化学系 II における水分解により発生する酸素を、大量に存在する気相中の ¹⁶O₂ と区別して測定でき、呼吸による CO₂ の吸収ならびに炭酸固定による O₂ 発生を同時にモニターする事が可能になった。3.1 で述べたように、CO₂ 吸収量よりも O₂ 発生量の方がやや多い事や、気相中の CO₂ が消費された後も ¹⁶O¹⁸O 発生が続くことがわかった (Fig. 2, 3, Table 1)。光合成反応では CO₂ の吸収量と O₂ 発生量比は 1 : 1 となるはずであるが、本研究で使用した *N. commune* 細胞では、常に、吸収する CO₂ 以上の O₂ が発生した。また、この酸素の発生は DCMU で阻害されることから、光合成電子伝達反応に由来するという事も分かった (Fig. 5)。そうすると、固定される CO₂ 以上に発生する酸素は、水から由来する電子が CO₂ 以外のところにも流れていると考えざるを得ない。

この経路として、序論で述べたように電子伝達系で還元力が過剰になった際に駆動する WWC による可能性が高いと推定される[10],[11]。WWC は水の分解により生じた電子と H⁺により O₂ 分子を H₂O へ還元する反応である。WWC が働いている場合、正味の酸素の出入りはゼロとなるため、¹⁸O を含まない H₂O を使った場合は、GC/MS でも O₂ の変化量は測定できない。しかし、¹⁸O でラベルした H₂O を使った場合、発生する酸素 (¹⁶O¹⁸O) は光化学系 II で分解された水に由来する一方、吸収する酸素は空気中の ¹⁶O¹⁶O に由来する。そのため、同位体を使わない場合は区別できない酸素の出入りを区別してモニターすることができる。本研究で採用した測定系においても、仮に CO₂ を消費し尽くして炭酸固定が止まっても WWC が働き続けるならば、¹⁶O¹⁸O は発生し続けるように見えるはずである (Fig. 6)。

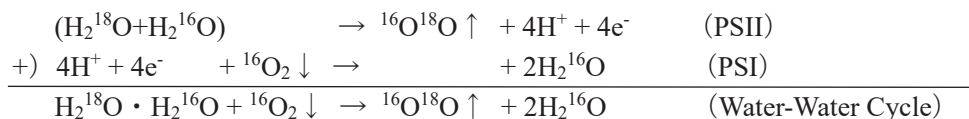


Fig. 6 Oxygen evolution and consumption by Water-Water Cycle on photosynthesis by use of H₂¹⁸O.

もし CO₂ 固定を上回る酸素発生活性が WWC によるものであるならば、この活性は気相中の O₂ 濃度に依存し (Fig. 6), それは ¹⁶O¹⁸O の発生速度に影響することになる。そこで、異なる酸素濃度で、試料の CO₂ 吸収・発生量と ¹⁶O¹⁸O 発生量を GC/MS を用いて測定し、酸素濃度との関係を調べた (Fig. 7)。

用いた *N. commune* の試料について、測定したすべての酸素濃度条件で、暗所において呼吸による CO₂ 発生が観測された (データ略)。照射を開始すると ¹⁶O¹⁸O の発生は二相に分かれた。最初は速い酸素発生が観測されたが、照射開始後 30~40 分頃 (実験開始後 80~90 分頃) 以降酸素発生は緩やかになった。

照射直後にみられる ¹⁶O¹⁸O 発生速い立ち上がりは、細胞外多糖中の H₂O に含まれる Ci 源 (水に溶けた CO₂ と HCO₃⁻) や、バイアル瓶内を完全に置換できずに残った CO₂ を利用した炭酸固定によるものであると考えられる。この速い立ち上がりの活性は、通常の大気組成下で測定された光合成活性とよくあっていた (データ略)。また、この速い ¹⁸O¹⁶O の発生が続く時間は、気相中の CO₂ 濃度が 0 になるまでの時間 (Fig. 1, 2 参照) とよく合っていた。Fig. 3 は試料に長時間光を照射した場合の結果を示しているが、この場合も、照射直後は速い酸素発生が見られたが、数十分後には速度が緩やかになり、この速度のままほぼ 1 日酸素を発生し続けていた。

長時間続く二相性の酸素発生は、モデルラン藻である *Synechocystis* 6803 においても観察された (Table 2)。したがって、この現象は陸棲ラン藻特有の現象ではなく、多くのラン藻で見られるものと考えられる。

Fig. 7 の計測値に基づいて求めた、照射後 30 分以内に見られる速い酸素発生に対する、その後の長時間続く緩やかな酸素発生速度の比を Table 2 に示した。これは、最初の立ち上がり (速い酸素発生) は CO₂ 固定と WWC の両方の反応が起きているが、CO₂ を使い尽くした後の緩やかな酸素発生は WWC の活性のみが見えていると考えて算出した値である。すなわち全酸素発生活性のうちどのくらいの割合で WWC に電子が渡っているかの指標となる値となる。この値は酸素濃度を上げていくに従って上がっていき、10,000 ppm までは酸素濃度に対してよい直線関係を示したが (データ略)、それより高濃度では 10,000 ppm の値と大きな違いはなかった (Table 2)。ラン藻では Flv1/Flv3 が電子を酸素に渡していると考えられているが [13-15], 10,000 ppm 以上では酸素への電子供与速度が律速になっている可能性と、実験に用いた光強度ではそれ以上の電子伝達は起こらない可能性が考えられる。これらの点は、今後検討していく必要がある。大気中の酸素濃度下では、この WWC の活性は、*N. commune* では測定された酸素発生活性のうちの約 25% を、*Synechocystis* 6803 では約 40% を占めると考えられる (Table 2)。

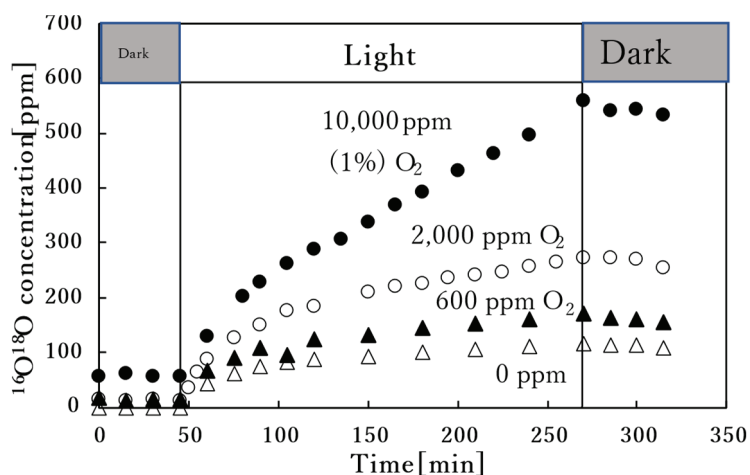


Fig. 7 Effects of ambient O₂ concentration on oxygen evolution activity in *N. commune*.

The sample was encapsulated in a vial. The air in the vial was replaced with nitrogen and O₂ was introduced. O₂ concentrations of gas phase were ● : 10,000 ppm (1%), ○ : 2,000 ppm, ▲ : 600 ppm, △ : 0 ppm, respectively.

Table 2 Relative activities of WWC under different concentrations of O₂

	O ₂ concentration (ppm)					
	0	600	1,200	2,000	10,000	ambient* ¹
<i>N. commune</i>	2.52	2.89	-	6.12	26.11	24.89
<i>Synechocystis</i> 6803	0.0	2.06	9.5	-	44.38	40.49

Ratios of oxygen evolution activities of those after 50 min illumination to those of initial activities are indicated as percentages. The relative WWC activities of *Synechocystis* were calculated from data which were not shown in the present study. *¹ : 21% (210,000 ppm) O₂

4 結語

本研究では、GC/MS を用いた測定方法を確立し、¹⁸O でラベルした H₂O を使うことにより O₂ 発生と CO₂ 吸収を同時に測定することが出来た。この方法を使い、*N. commune* の光合成特性を明らかにした。

GC/MS を用いた測定を行ったところ炭酸固定速度と O₂ 発生速度は一致せず、O₂ 発生速度の方が大きいことを見いだした。この活性は、気相中の CO₂ 濃度が 0 になっても続き、更に 1 晩以上続いた。試料を熱処理して失活させたり電子伝達反応を阻害する薬剤 (DCMU) を加えると活性は見いだされなかった。したがって、CO₂ がなくなった条件下でも続く酸素発生は、光合成に関連した活性を測定しているということが示された。この活性は Water-Water Cycle (WWC) によると考えられ[10]、等量の酸素の発生と吸収が起こるため、通常の測定系では検出できない。しかし、安定同位体 (¹⁸O) でラベルした H₂O (H₂¹⁸O) を使うことで、CO₂ が消費された後も酸素発生が継続することを GCMS による測定で示すことが出来た。そして H₂¹⁸O を用いた GC/MS 測定は、炭酸固定活性と WWC 活性の両方の同時測定が可能な測定方法であることが示された。

高等植物や緑藻は、過剰なエネルギーはカロテノイドに渡して熱に変換する(非光化学的消光)のに対し[18]、ラン藻では非光化学的消光に対応する別の機構を持つ種や、そのようなシステムが確認されていない種も存在する。これらの生物では WWC を重要なエネルギー散逸機構として利用している。ラン藻においては、光化学系 I からの電子は flavodiiron protein である Flv1/Flv3 のヘテロダイマーを介して酸素に渡されることが示された[13]-[15], [27]。

本研究で得られた *N. commune* における WWC の反応は、CO₂ 存在下での値は *Synechocystis* 6803 を用いた先行研究の結果とよく一致していたが、CO₂ が消費された状態においてはあまり一致しなかった[7]。この CO₂ が消費された状態でも長時間持続する高い WWC 活性は *N. commune* の特性であり、乾燥・膨潤過程における光合成活性の回復・不活性化に伴う光障害を防御するために重要であると考えられる。

5. 謝辞

本研究は理工学研究所共同研究第一類「安定同位体を用いた陸性ラン藻の生理活性の回復・不活性化過程のリアルタイムモニタリング」により助成を受けてなされたものである。

6. 引用文献

- [1] 広瀬 弘幸, 山岸 高旺 “淡水藻類図鑑” 内田老鶴圃 (1997)
- [2] 藤田 善彦, 大城 香 “ラン藻という生き物” 東京大学出版会 (1989)
- [3] Lipman, C., B., :*The successful revival of Nostoc commune from a herbarium specimen eighty-seven years old.* Bulletin of the Torrey Botanical Club, 68, 664-666 (1941)
- [4] Shirkey, B., Kovarcik, D., P., Wright, D., J., Wilmoth, G., Prickett, T.F., Helm, R.,F., Gregory E., M. and Potts, M. :*Active Fe-containing superoxide dismutase and abundant sodF mRNA in Nostoc commune (Cyanobacteria) after years of desiccation.* Journal of Bacteriology, 182, 189-197 (1999)

- [5] Satoh, K., Hirai, M., Nishio, H., Yamaji, T., Kashino, Y. and Koike, H. Recovery of *photosynthetic system during rewetting is quite rapid in a terrestrial cyanobacterium, Nostoc commune*. *Plant and Cell Physiology* 43,170-176 (2002)
- [6] Isobe, K., Koba, K., Ueda, S., Senoo, K., Harayama, S. and Suwa, Y. :*A simple and rapid GC/MS method for the simultaneous determination of gaseous metabolites*. *Journal of Microbiological Methods* 84, 46-51 (2011)
- [7] Badger, M., R., Caemmerer, R., Ruuska, S., and Nakano, H. :*Electron flow to oxygen in higher plants and algae: Rates and control of direct photoreduction (Mehler reaction) and rubisco oxygenase*. *Philosophical Transactions of Royal Society of London B*. 355, 1433-1446 (2000)
- [8] Beckmann, K., Messinger, J., Badger, M. R., Wydrzynski T. and Hillier, W. :*On-line mass spectrometry: membrane inlet sampling*. *Photosynthesis Research* 102, 511–522 (2009)
- [9] Dimon, B., Gans, P., and Peltier, G. :*Mass Spectrometric measurement of photosynthetic and respiratory oxygen exchange*. *Methods in Enzymology* 167, 686–691 (1988)
- [10] Asada, K.: *Radical production and Scavenging in the Chloroplasts*, Baker N. E. (ed.) “Photosynthesis and the Environment” Kluwer Academic Publishers, 123-150 (1996)
- [11] Asada, K.: *The Water-Water Cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 601-39 (1999)
- [12] Miyake, C. :*Alternative electron flows (Water–Water Cycle and Cyclic Electron Flow Around PSI) in photosynthesis: Molecular mechanisms and physiological functions*. *Plant and Cell Physiology* 51, 1951–1963 (2010)
- [13] Allahverdiyeva, Y., Ermakova, M., Eisenhut, M., Zhang, P., Richaud, P., Hagemann, M., Cournac, L. and Aro, E. M. :*Interplay between flavodiiron proteins and photorespiration in Synechocystis sp.PCC6803*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 24007-24014 (2011)
- [14] Allahverdiyeva, Y., Mustila, H., Ermakova, M., Bersanini, L., Richaud, P., Ajlani, G., Battchikova, N., Cournac, L. and Aro, E., M.: *Flavodiiron protein Flv1 and Flv3 enable cyanobacterial growth and photosynthesis under fluctuating light*. *Proceedings of National Academy of Science, U.S.A.* 110, 4111-4116 (2013)
- [15] Allahverdiyeva, Y., Isojärvi, J., Zhang, P. and Aro, E. M. : *Cyanobacterial oxygenic photosynthesis is protected by flavodiiron proteins*. *Life*, 5, 716-743 (2015)
- [16] Hayashi, R., Shimakawa, G., Shaku, K., Shimazu, S., Akimoto, S., Yamamoto, H., Amako, K., Sugimoto, T., Tamoi, M., Makino, A. and Miyake, C.: *O₂-dependent large electron flow functioned as an electron sink, replacing the steady-state electron flux in photosynthesis in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803, but not in the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7942*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 78, 384-393 (2014)
- [17] Shimakawa, G., Shaku, K., Nishi, A., Hayashi, R., Yamamoto, H., Sakamoto, K., Makino, A. and Miyake, C. : *Flavodiiron2 and Flavodiiron4 proteins mediate an oxygen-dependent alternative electron flow in Synechocystis sp. PCC 6803 under CO₂-limited conditions*. *Plant Physiology*, 167: 472–480 (2015)
- [18] Schreiber, U. and Neubauer C. :*O₂-dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence*. *Photosynthesis Research*, 25: 279-293 (1990)
- [19] Miyake, C., Shinzaki, Y., Nishioka, M., Horiguchi, S. and Tomizawa, K. : *Photoinactivation of ascorbate peroxidase in isolated tobacco chloroplasts: Galdieria partita APX maintains the electron flux through the water-water cycle in transplastomic tobacco plants* *Plant and Cell Physiology* 47, 200-210 (2006)

- [20] Asada, K. and Barger M., R. :*Photoreduction of $^{18}O_2$ and $H_2^{18}O_2$ with concomitant evolution of $^{16}O_2$ in intact chloroplasts: Evidence for scavenging of hydrogen peroxide by peroxidase.* Plant and Cell Physiology 25, 1169-1179 (1984)
- [21] Radmer, R., J., and Kok, B. :*Photoreduction of O_2 primes and replaces CO_2 assimilation.* Plant Physiology 58, 336-340 (1976)
- [22] Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., B., Herdman, M. and Stanier R., Y. :*Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria.* Journal of General Microbiology 111, 1-61 (1979)
- [23] Mackinney, G. :*Absorption of light by chlorophyll solutions.*, Journal of Biological Chemistry, 140, 315-322. (1941)
- [24] Ogawa, T., Miyano, A. and Inoue, Y. :*Photosystem-I-driven inorganic carbon transport in the cyanobacterium, Anacystis nidulans.* Biochimica et Biophysica Acta, 808, 77-84 (1985)
- [25] Burnap R.,L.,Hagemann M, and Kaplan, A.: *Regulation of CO_2 concentrating mechanism in cyanobacteria.* Life, 5, 348-371 (2015)
- [26] Trebst, A. : *Inhibitors of electron flow: Tools for the functional and structural localization of carriers and energy conservation sites.* Methods in Enzymology, 69, 675-715 (1980)
- [27] Santana-Sanchez, A., Solymosi, D., Mustila, H., Bersanini, L., Aro, E.-M. and Allahverdiyeva, Y.:*Flavodiiron proteins 1-to-4 function in versatile combinations in O_2 photoreduction in cyanobacteria.* eLife;8:e45766. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.45766> (2019)