

植物の低温ストレス時の光化学系 I 光阻害の発生機構
および抑制機構の解明

竹内 航

2026

目次

序論	5
第 1 章 低温ストレス時の PSII 光阻害による PSI 光阻害の抑制	8
1-1. 結果	8
1-1-1. 低温耐性植物シロイヌナズナの低温ストレス時の光合成応答	8
1-1-2. キュウリの低温ストレス時の光合成応答	10
1-1-3. PSII 光阻害による PSI 光阻害の軽減の証明	11
1-1-4. 代替的電子伝達 (AEF) による PSI 光阻害の軽減	12
1-2. 考察	14
1-2-1. 本研究のまとめ	14
1-2-2. 本研究から見てきた PSI 光阻害における ROS 発生メカニズム	14
1-2-3. キュウリ低温ストレス時の PSI 光阻害の発生機構について	16
1-3. 実験方法	18
1-3-1. 実験材料、栽培条件および低温ストレス処理	18
1-3-2. クロロフィル蛍光、P700 シグナル、Fe-S クラスターシグナル、CO ₂ 同化解析	18
1-3-3. PSI 光阻害処理 (rSP treatment)	19
1-3-4. O ₂ ⁻ 定量	19
1-3-5. 統計解析	19
第 2 章 キュウリ低温ストレス時に PSI 光阻害が起こる要因の解明	20
2-1. 結果	20
2-1-1. キュウリ PSI 光阻害耐性の品種間差	20
2-1-2. PSI 光阻害の度合いと低温ストレス耐性との関わり	23
2-1-3. 低温耐性品種と低温感受性品種のチラコイド膜の脱共役について	25
2-1-4. 低温耐性品種と低温感受性品種の PSI 下流の電子蓄積の違いについて	27
2-1-5. 低温耐性品種と低温感受性品種の CO ₂ 制限条件での AEF 活性	30
2-1-6. 低温耐性品種と低温感受性品種の NDH 活性の比較	31
2-1-7. キュウリ NDH 活性の品種間差の裏付け	34
2-1-8. NDH の PSI 下流の電子シンクとしての新規機能の立証	36
2-2. 考察	38
2-2-1. 本研究のまとめ	38

2-2-2. 本研究から見てきた PSI-NDH 複合体の新規機能.....	40
2-2-3. PSI-NDH 複合体の機能や重要性が植物種や生育環境によって異なる可能性について	41
2-2-4. キュウリ低温耐性品種と低温感受性品種の NDH 活性の差について	42
2-3. 実験材料・方法.....	43
2-3-1. 植物材料、生育条件、低温ストレス条件	43
2-3-2. クロロフィル蛍光、P700 シグナル、Fe-S クラスターシグナル、CO ₂ 同化解析、NDH 活性測定	43
2-3-3. Electrochromic shift (ECS) 測定.....	43
2-3-4. Clear-native PAGE (CN-PAGE), Blue-Native PAGE (BN-PAGE), SDS-PAGE, immunoblot 解析	44
2-3-5. 単離チラコイドの電子伝達速度の測定	44
総括	45
引用文献	47
謝辞	59
発表論文	61

略語

AEF	Alternative electron flow
ATP	Adenosine triphosphate
CEF	Cyclic electron flow
CBB cycle	Calvin-Benson-Bassham cycle
Chl	Chlorophyll
CN-PAGE	Clear-native polyacrylamide gel electrophoresis
Cyt	Cytochrome
Fd	Ferredoxin
Fe-S	Iron (Fe)-Sulfur (S) clusters
LHC	Light-harvesting complex
LHCI (LHCA)	Light-harvesting complex I
NDH	NADH dehydrogenase-like complex
P700	PSI reaction center chlorophyll P700
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAM	Pulse Amplitude Modulation
PS	Photosystem
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
PQ	Plastoquinone
ROS	Reactive oxygen species
rSP	Repetitive saturated pulses
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SP	Saturated pulse

序論

植物は常に環境ストレスに曝され、成長が制限されている。なかでも低温ストレスは、中緯度から高緯度における主要な環境ストレスの一つであり、作物生産に大きな影響を及ぼしている (Allen and Ort, 2001)。熱帯を起源とする作物であるイネ、トウモロコシ、ダイズや、温帯起源のキュウリやトマトは低温感受性植物であり、低温ストレスによる収量低下は深刻な問題となっている。また、こうした低温感受性作物の冬季栽培には、グリーンハウス内の温度を維持するために多大なエネルギーコストを要するため、持続可能な社会の観点からも問題を抱えている。しかしながら、低温感受性植物と低温耐性植物を分かち分子的要因は未解明な部分が多く、低温耐性作物の効果的な育種を困難にしている。

低温ストレス下では、細胞の膜流動性が低下、種々の酵素活性の低下、気孔の応答阻害が起こる (Wilkinson et al., 2001; Siddiqui and Cavicchioli, 2006; Upchurch, 2008; Ding et al., 2019)。その結果、低温ストレスによって最初に阻害される主な生体反応は光合成である (Berry and Bjorkman, 1980)。低温ストレス下では、Calvin-Benson-Bassham 回路 (CBB cycle) の活性が低下するため、光エネルギーによって駆動される電子伝達反応が過剰に進行する (Mittler, 2006; Suzuki and Mittler, 2006; Sage and Kubien, 2007; Heidarvand and Amiri, 2010; Murchie and Niyogi, 2011; Bi et al., 2019)。電子伝達鎖の下流で余剰となった電子は酸素へと漏出し、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) を生成する (Asada, 1987; Asada, 1999; Asada, 2006)。生成された ROS は近傍の光化学系やチラコイド膜を攻撃し、その結果、光合成活性の著しい低下および植物成長の阻害を引き起こす (Garstka et al., 2005; Garstka et al., 2007; Takagi et al., 2016)。

温度、乾燥、塩ストレスなど多くの環境ストレスは、光化学系 II (PSII) の光阻害を引き起こす (Powles, 1984)。一方で、変動する光環境 (Tsuyama and Kobayashi, 2009; Kono et al., 2014; Terashima et al., 2021; Basso et al., 2022; Gollan et al., 2023; Sun et al., 2023; Yang et al., 2024) や、キュウリにおける低温ストレス (Havaux and Davaud, 1994; Terashima et al., 1994; Nakano et al., 2010; Sonoike, 2011; Takeuchi et al., 2022; Chen et al., 2024; Li et al., 2024; Takeuchi et al., 2024)、さらには他の多様な植物種における低温ストレス (Havaux and Davaud, 1994; Ivanov et al., 1998; Kim et al., 2005; Ivanov et al., 2012a, 2012b; Chen et al., 2024; Li et al., 2024) は、光化学系 I (PSI) の光阻害を引き起こす。PSI におけるタンパク質のターンオーバーは PSII に比べて著しく遅いため (Melis, 1999; Miyata et al., 2012; Li et al., 2018; Lima-Melo et al., 2019)、PSI 光阻害は PSII 光阻害に比べて生育に重大な影響を及ぼす。そのため植物は、ストレス条件下において植物成長への悪影響を軽減するメカニズムとして、PSI 光阻害よりも PSII 光阻害を優先的に起こすことが示唆されている (Barber and Andersson, 1992; Suzuki et al., 2021)。

光阻害の主因は活性酸素種 (ROS) である (Rutherford et al., 2012; Degen and Johnson, 2024)。光化学系からの ROS は、適切な量であれば遺伝子発現等を介して植物の順化応答を引き起

こす重要なシグナルとして機能する。しかし、ROS 発生量が制御不能なレベルに達すると、光阻害が起こる (Sadiq et al., 2019; Dorion et al., 2021; Hamada et al., 2023; Tachibana et al., 2024; Wang et al., 2024)。特に PSI においては、電子伝達体の酸化還元電位が酸素より十分に低い
ため、酸素への直接の電子伝達が可能であり、PSI における過剰な電子は酸素をスーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$) へと還元する (Mehler, 1951; Cherepanov et al., 2017; Hani et al., 2024)。生成された $O_2^{\cdot-}$ は、不均化もしくは、チラコイド膜近傍に存在するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) によって過酸化水素 (H_2O_2) に変換される。 H_2O_2 は鉄硫黄クラスター (Fe-S) 周辺で Fenton 反応を起こし、ヒドロキシルラジカル ($OH^{\cdot}$) を生成させる (Petroněk et al., 2021)。さらに、Fe-S cluster が高度に還元された状態では、 $P700^+/A_0^-$ や $P700^+/A_1^-$ のラジカル対の再結合により、一定割合で三重項 $P700$ (3P700) が生成し、これは一重項酸素 (1O_2) を発生させる (Shuvalov et al., 1986; Rutherford et al., 2012; Degen and Johnson, 2024)。これらの ROS は、Fe-S や PSI コアの損傷を引き起こし、光酸化可能な $P700$ の減少 (PSI 光阻害) をもたらす (Inoue et al., 1989; Sonoike and Terashima, 1994; Sonoike et al., 1995; Sonoike, 1996; Erling Tjus et al., 1998; Nakano et al., 2006; Kılıç et al., 2023; Shimakawa et al., 2024)。ただし、PSI 光阻害を誘発する ROS の生成部位については依然として議論が続いている (Takahashi and Asada, 1988; Kozuleva et al., 2014; Kozuleva et al., 2021; Shimakawa et al., 2024)。

PSI を光阻害から保護するためには、PSI 反応中心クロロフィル $P700$ の酸化型 ($P700^+$) の蓄積が重要である (Trissl, 1997; Shimakawa and Miyake, 2018; Miyake, 2020)。植物は環境ストレス条件下において、 $P700$ を酸化状態に維持するための多様な機構を備えている。電子受容側では、CBB 回路や光呼吸の適切な活性が、 $P700$ 酸化に不可欠な電子受容体として機能する (Hanawa et al., 2017; Furutani et al., 2020; Wada et al., 2020)。被子植物を除く光合成生物は、PSI から酸素への電子伝達を担う Flavodiiron タンパク質を有しており、 $P700$ 酸化に寄与する (Helman et al., 2003; Helman et al., 2005; Shimakawa et al., 2019; Storti et al., 2020)。さらに、water-water サイクルも $P700$ 酸化に関与する (Miyake, 2010; Huang et al., 2019)。一方、PSI の電子供与側では、チラコイド内腔の酸性化 (ΔpH) が Cyt b_6/f における電子伝達を抑制し、 $P700$ 酸化を促進する (Foyer et al., 1990; Anderson, 1992; Nishio and Whitmarsh, 1993; Hope, 2000; Baker et al., 2007; Schöttler and Tóth, 2014; Schöttler et al., 2015)。 ΔpH は主に、循環的電子伝達 (CEF) および葉緑体 ATPase の活性によって制御される (Heber and Walker, 1992; Shikanai, 2007; Kohzuma et al., 2009; Miyake, 2010; Ifuku et al., 2011; Kanazawa et al., 2017; Takagi et al., 2017a; Shikanai, 2023)。また、プラストキノンプールの過剰還元は Cyt b_6/f における Q サイクルを阻害し、 $P700$ 酸化に寄与する。この機構は還元誘導型電子伝達抑制 (reduction-induced suppression of electron transport: RISE) として知られている (Shaku et al. 2016)。加えて、plastid terminal oxidase (PTOX) も $P700$ 酸化に関わる (Messant et al., 2024)。

このように PSI 光阻害の抑制機構がよく解明されている一方で、キュウリにおいて、どのように PSI 光阻害が発生するのか、どの抑制機構が低温で機能せず低温障害を受けるのかは未だ明らかでない点が多い。加えて、シロイヌナズナなどの低温耐性植物とキュウリなど

の低温耐性植物を分かち分子的要因も未解明な点が多い。そこで本研究では、第 1 章において低温耐性植物シロイヌナズナと低温感受性植物キュウリの低温ストレス時の光阻害を比較し、低温ストレス時に PSI を守るメカニズムを調べ、第 2 章においてキュウリ PSI 光阻害の発生機構の詳細な分子メカニズムの解明を試みた。

第 1 章

低温ストレス時の PSII 光阻害による PSI 光阻害の抑制

本章では、低温耐性植物として知られるシロイヌナズナと、低温感受性植物として知られるキュウリを用いて、低温ストレス時の光阻害を比較し、低温耐性植物で PSI 光阻害を抑制する機構を明らかにすることを目的とした。

1-1. 結果

1-1-1. 低温耐性植物シロイヌナズナの低温ストレス時の光合成応答

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) における低温ストレス下での光阻害の進行を解析するために、2 種類の低温処理を行った。すなわち、4 時間未満の短期低温ストレス (short-chilling) と、60 時間以上の長期低温ストレス (long-chilling) である。低温処理後の植物は 4 °C で暗順化させ、その後 23 °C において光合成電子伝達活性を測定した。

図 1-1 (A)–(D), (H) は PSII パラメータを示す。光照射下での PSII の有効量子収率を示す $Y(II)$ は、short-chilling では光合成誘導期において増加し long-chilling では無処理 (control) 植物に比べて大きく低下した。光を熱として散逸した割合を示す $Y(NPQ)$ は、short-chilling 及び long-chilling で低下し、調節されないエネルギー散逸を表す $Y(NO)$ は、long-chilling により顕著に増加した。PSII 最大量子収率 F_v/F_m は short-chilling でわずかに低下し、long-chilling では約 0.2 にまで大きく減少した。PQ pool の還元割合を示す $1-q_L$ は short-chilling で低下した一方、long-chilling では上昇した。long-chilling で観察された低い F_v/F_m および $Y(II)$ は、SP 照射下での F_m (F_m') が極端に低下していたことに起因しており、PSII において安定した電荷分離の著しい阻害、すなわち重度の PSII 光阻害が生じていたことが明らかとなった。

図 1-1 (E)–(G), (I) に示す PSI パラメータについては、PSI 反応中心クロロフィル P700 の酸化状態の割合を示す $Y(ND)$ が、short-chilling でわずかに低下し、long-chilling で大きく増加した。この $Y(ND)$ の増減は、PSII 活性 (主に $Y(II)$) の増減によるものであり、よく知られた $Y(II)$ と $Y(ND)$ の負の相関を反映していた。アクティブな PSI 反応中心 P700 の総量を示す P_m は、short-chilling、long-chilling のいずれにおいても有意な変化を示さず、 F_v/F_m でみられた劇的な変化とは対照的であった。これらの結果から、シロイヌナズナでは long-chilling により PSII 光阻害が誘導されるが、PSI は高度に酸化された状態を維持しており、PSI 光阻害は long-chilling でも生じないことが明らかとなった。

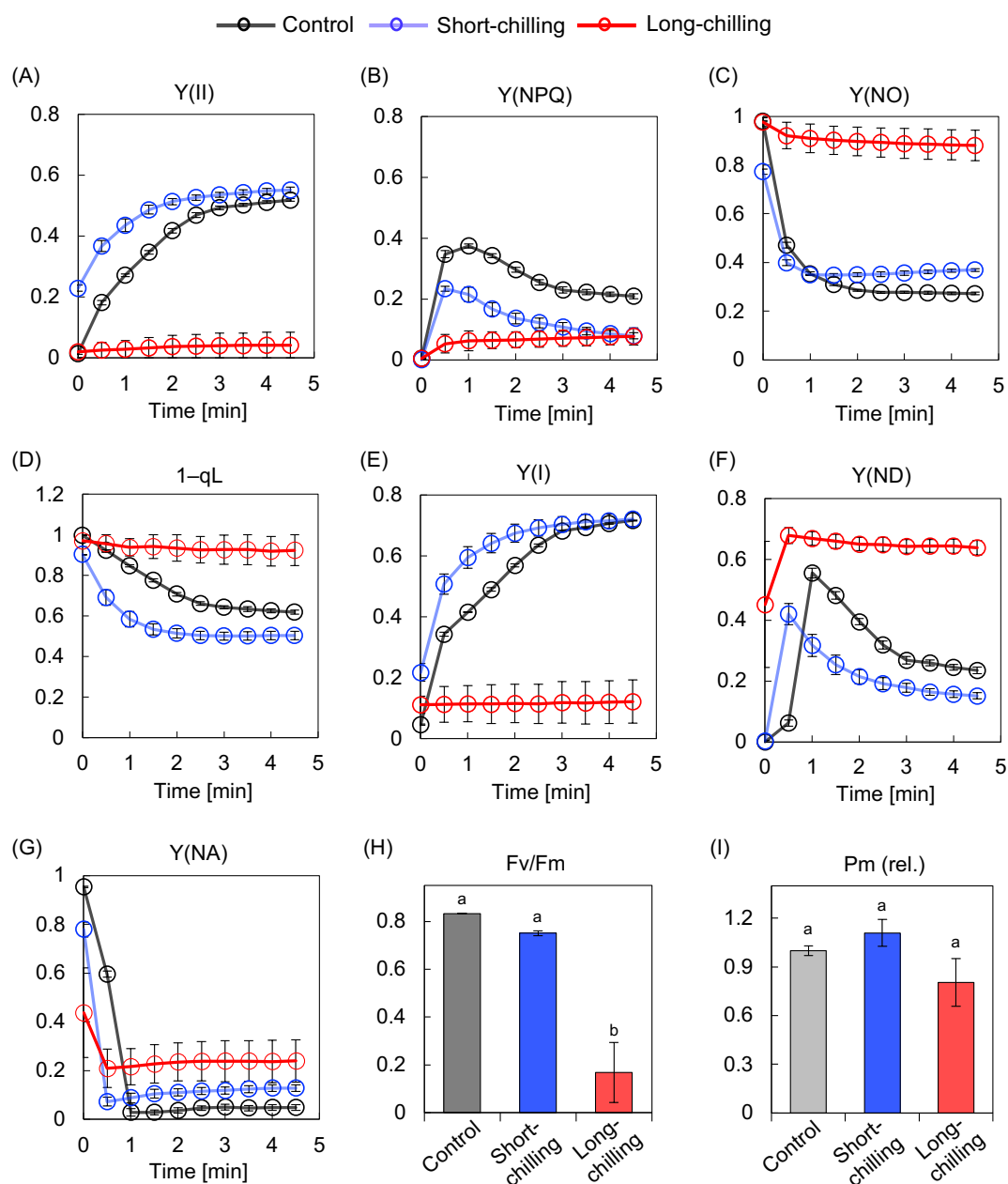


図 1-1 低温ストレスがシロイヌナズナの光合成活性に及ぼす影響

光合成誘導期における PSII クロロフィル蛍光および P700 クロロフィル吸収を Dual-PAM 100 を用いて解析した。4-6 週間生育させた *A. thaliana* 野生型植物の葉を、低温ストレス処理前 (Control)、4 時間の低温ストレス後 (Short-chilling)、および 96 時間の低温ストレス後 (Long-chilling) に解析した。(A-G) 少なくとも 20 分間暗順応した後、葉を $260 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光で 5 分間照射し、常温 (23°C) 下で以下のパラメーターを測定した：Y(I)：飽和パルス光 (SP) により酸化される P700 の割合、Y(ND)：定常光照射下における P700 酸化型の割合、Y(NA)：PSI 受容体側の電子伝達制限、Y(II)：光照射下での PSII 実効量子収率、Y(NPQ)：非光化学的消光によるエネルギー散逸割合、Y(NO)：PSII における非調節

型のエネルギー散逸、qL: Lake モデルに基づく open な PSII の割合。(H, I) 光照射前に PSII の最大量子収率 F_v/F_m および光酸化可能 PSI 反応中心クロロフィル P700 の総量 (Pm) を算出した。Pm は低温処理前の測定値を 1 として正規化した。値は平均 $\pm$ SE ($n = 3$ 、生物学的反復) で示した。異なるアルファベットは、One-way ANOVA 後の Tukey-Kramer 多重比較検定 ($p < 0.01$) により統計的に有意な差があることを示す。

1-1-2. キュウリの低温ストレス時の光合成応答

シロイヌナズナとは異なり低温感受性植物のキュウリは、低温条件下で PSI 光阻害が引き起こされることが知られている (Terashima et al., 1994; Kono et al., 2022)。ここでは、キュウリにおいて PSII および PSI の低温での光阻害の進行を 24 時間にわたり追跡した (図 1-2)。処理開始から 1.5 時間までは、 F_v/F_m および Pm の変化はわずかであった。重要なことに、処理 5 時間後において F_v/F_m は約 0.6 を維持していた一方、Pm はすでに約 0.4 まで低下していた。さらに処理 9 時間後には、 F_v/F_m は約 0.4 に減少し、Pm はほぼ 0.1 まで低下した。すなわち、キュウリではシロイヌナズナとは異なり、Pm の低下が F_v/F_m の低下よりも早期に、かつ顕著に進行した。つまり、キュウリでは PSII 光阻害が効果的に生じず、その結果 PSI が過還元な状態に陥り、PSI 光阻害が生じることが示唆された。

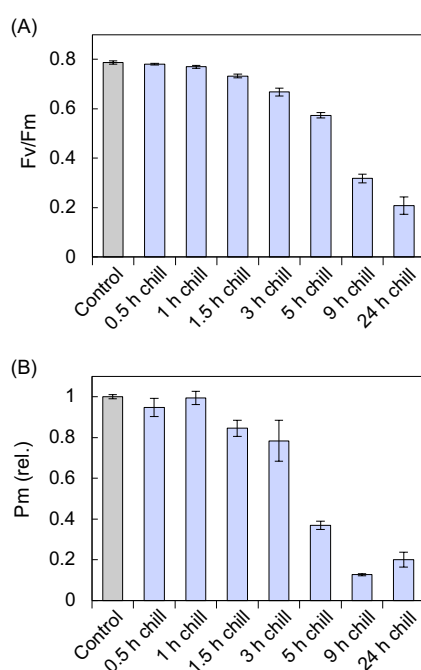


図 1-2 低温ストレスがキュウリの光合成活性に及ぼす影響

(A) F_v/F_m および (B) Pm を低温ストレス処理前 (Control) と、光照射下 ($200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) で 0.5 時間から 24 時間の低温処理後のキュウリ個体で解析した。低温処理した植物は 4°C で 30 分間暗順応させ、control 植物は室温で暗順応させた。Pm の値は低温処理前の測定値を 1 として正規化した。数値は平均 $\pm$ SE ($n = 3$ 、生物学的反復) で示した。

1-1-3. PSII 光阻害による PSI 光阻害の軽減の証明

上記の結果から、PSII 光阻害が PSI 光阻害を防ぎ、葉緑体の深刻なダメージを軽減していることが示唆された。そのことを確かめるために、低温ストレスの処理時間を変化させることで、PSII 光阻害の程度が異なるシロイヌナズナ 21 個体 (F_v/F_m が 0.2~0.8 の個体) を調製した。これらの植物に対し、PSI を選択的に阻害する変動光ストレス処理を行い、それにより生じる P_m の減少量から、PSI 光阻害の進行を評価した。図 1-3A には、変動光処理前の PSII 光阻害レベル (F_v/F_m , 横軸) と、変動光処理後の残存 PSI 活性 (P_m , 縦軸) の相関を示した。残存 PSI 活性はその植物の F_v/F_m と強い負の相関 (相関係数 $r = -0.97$) を示した (図 1-3A)。すなわち、 F_v/F_m が低い植物ほど PSI 光阻害に対する耐性が高いことが明らかとなった。変動光処理中の活性型 PSI の減少も、植物の F_v/F_m が高いほど早く、 F_v/F_m が低いほど遅かった (図 1-3B)。これらの結果は、PSII 光阻害によって PSI の過還元が抑制されること、そして PSI 光阻害に対する感受性が F_v/F_m により高精度に評価できることを示した。

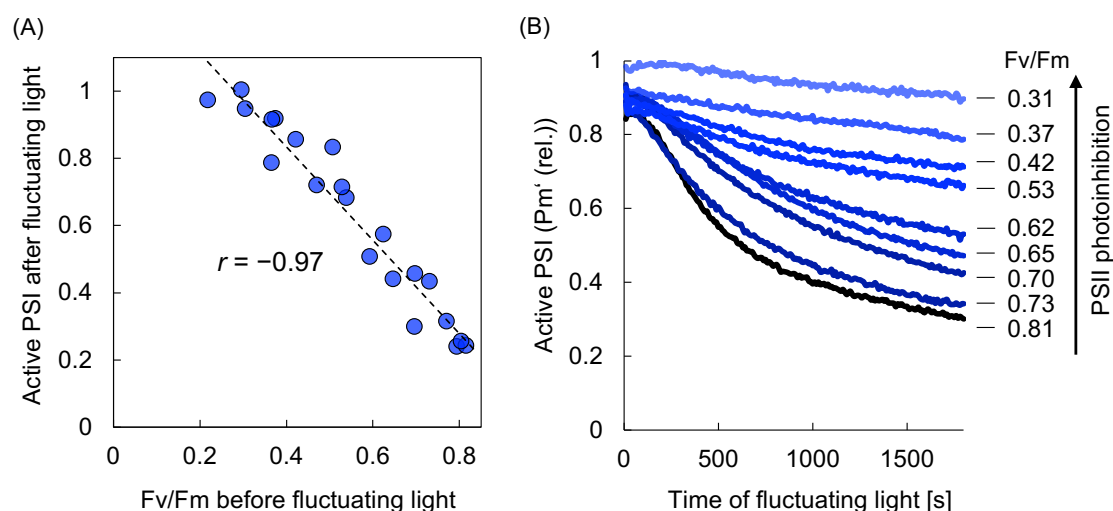


図 1-3 変動光下におけるシロイヌナズナの PSII 光阻害と PSI 光阻害の相関関係

PSII 光阻害レベルが異なる (F_v/F_m が 0.2 から 0.8) シロイヌナズナの野生型植物を、低温ストレスの処理時間を変えることで準備した。これらの植物を 23 °C で変動光 (rSP) 処理に供し、PSI 光阻害を P_m の変化をトレースすることにより解析した。(A) 変動光処理前に測定した F_v/F_m (横軸) と、変動光処理後の活性型 PSI (P_m) の相関。活性型 PSI は (rSP 処理前の P_m) / (rSP 処理後の P_m) で算出した。各点は全 21 個体の生物学的反復を示す。相関係数 $r = -0.97$ 。(B) (A) で用いた代表的な植物における rSP 処理中の活性を持つ PSI の減衰。活性型 PSI は P_m'/P_m (相対 P_m') として算出し、 P_m は rSP 処理直前に測定した。各植物サンプルの rSP 処理前 F_v/F_m をグラフ右端に示した。

1-1-4. 代替的電子伝達 (AEF) による PSI 光阻害の軽減

ここまで、シロイヌナズナでは、PSII 光阻害による PSI への電子流入量の抑制が PSI 光阻害を防いでいることを示した。これは、PSI 上流側における PSI の保護機構であった。次に我々は、PSI 下流側の PSI 保護機構についても調べた。PSI 下流側の保護機構としては主に、代替的電子伝達 (AEF) による PSI の過還元抑制機構が挙げられる。我々は、シロイヌナズナとキュウリの低温ストレス時の PSI 下流の AEF を評価した。

長時間の低温ストレスを与えたシロイヌナズナに対し、暗順化後の SP 照射時の Fd の酸化還元状態を Dual/KLAS-NIR によって測定した。光照射後の Fd の再酸化速度は、Fd からの AEF などによる電子の放出反応の活性化レベルに依存する (Schreiber 2017)。Fd は control 個体、long-chilling 個体のいずれにおいても SP 照射により大部分が還元され、300 ms の SP 照射中を通じて還元的であった (図 1-4 A)。この低温ストレス後の植物では、PSII からの電子供給が枯渇していることから (図 1-1)、この Fd の還元は P700 の電荷分離によるものであると考えられる。重要なことに、SP 照射後の暗期 (図 1-4A, 300 ms 以降) において、還元型 Fd の再酸化速度は、control 個体よりも long-chilling 個体の方が速かった (図 1-4 A)。つまり、long-chilling によって Fd に電子が溜まりにくく、ROS が生じにくいことが示唆された。Fd の電子の行方のメインである CBB cycle の活性をガス交換測定によって調べた結果、long-chilling 処理後には CO₂ 同化速度が大きく抑制されており、CBB cycle で消費される Fd の電子の割合は低いと考えられた (図 1-4 B-C)。よって、図 1-4A で見られた迅速な Fd の再酸化は、PSI 内部における電荷再結合反応の亢進、あるいは Fd 下流の AEF 反応の促進によってもたらされた可能性が高く、これらは電子の酸素への漏出 (ROS 発生) と PSI 光阻害を効果的に防いだと考えられる。

キュウリでも同様の解析を行ったところ、シロイヌナズナとは対照的に、SP 照射後の暗期 (300 ms 以降) において、還元型 Fd の再酸化速度は、control 個体よりも chilling stress 処理後の個体の方が遅かった (図 1-5)。つまり、キュウリでは低温処理により Fd の電子放出反応の促進は起こらず、むしろ Fd からの電子放出が低温ストレスにより滞っており、AEF など PSI を保護するシステムが機能していないことが示唆された。

以上の結果から、低温耐性植物のシロイヌナズナでは、低温ストレス時に PSII 光阻害と PSI 下流での電子蓄積の抑制機構がはたらき、PSI の活性は健全に保たれること、対照的に低温感受性植物キュウリでは、PSII のダウンレギュレーションが適切に起こらず、PSI 下流の電子蓄積による PSI 光阻害が生じることが明らかとなった。

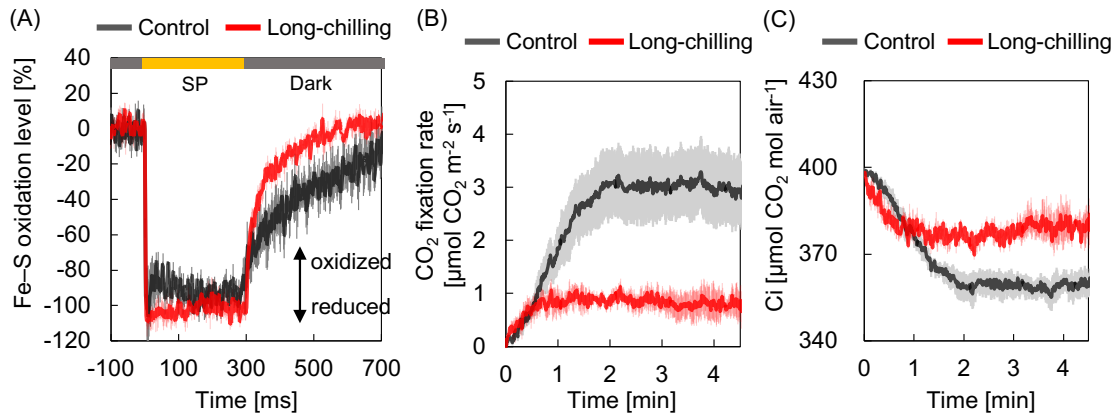


図 1-4 低温ストレス後のシロイヌナズナにおける Fd の酸化還元変化と CO₂固定速度

シロイヌナズナの WT 植物を 4-6 週間栽培し、低温ストレス処理前 (Control) および長時間低温ストレス処理後 (Long-chilling) のロゼット葉を解析した。(A) Fd の酸化還元動態を、20 分間の暗順応後、23 °C にて SP (20,000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、300 ms) の照射下で Dual/KLAS-NIR を用いて測定した。(B) CO₂固定速度および (C) 葉内 CO₂濃度 (Ci) を、25 °C にて 20 分間の暗順応後、260 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光照射開始から 4-5 分間、ガス交換測定によって求めた。値は平均 $\pm$ SE で示し、n = 3 (生物学的反復)。

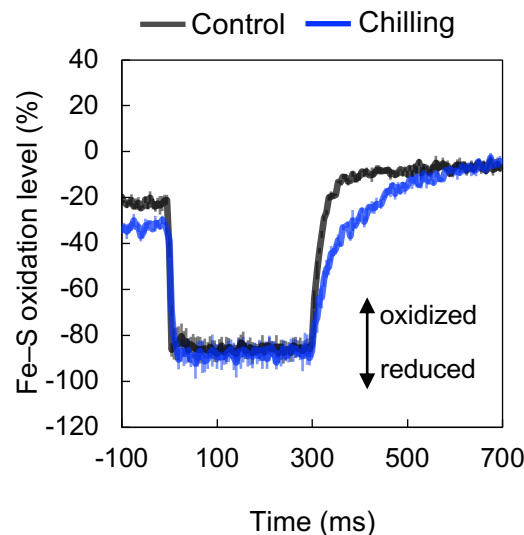


図 1-5 キュウリにおける低温ストレス前後の Fe-S クラスター酸化還元動態

キュウリを 2-3 週間生育させ、低温ストレス処理前 (Control) および 5 時間の低温ストレス処理後 (Chilling) の葉を解析した。Fd の酸化還元動態は、図 1-4 と同様の手法で測定した。

1-2. 考察

1-2-1. 本研究のまとめ

本研究では、野生型植物のみを用いて、環境ストレスによる PSII 光阻害が PSI を保護する役割があることを初めて明らかにした。シロイヌナズナにおいて、長時間の低温ストレスは F_v/F_m の著しい低下で表されるように PSII 光阻害が顕著に誘導され、P700 への電子流入の大幅な減少を引き起こした (図 1-1)。さらに、 F_v/F_m が低下したシロイヌナズナは、PSI 光阻害処理に対して非常に高い耐性を示した (図 1-3)。特筆すべきは、PSI 光阻害の感受性が F_v/F_m の値と非常に強く正に相関した点である (図 1-3)。これは、PSII 光阻害が PSI を保護することを明確に示している。一方キュウリでは、低温ストレス下において PSII 光阻害による PSI 光阻害の抑制が十分に機能せず、深刻な PSI 光阻害が生じた (図 1-2)。

1-2-2. 本研究から見てきた PSI 光阻害における ROS 発生メカニズム

PSI 光阻害は酸素存在下でのみ生じることから、その原因は ROS である (Sonoike and Terashima, 1994; Kono et al., 2014; Sejima et al., 2014; Takagi and Tani, 2023)。PSI の電子伝達経路は $P700 \rightarrow A_0 \rightarrow A_1 \rightarrow F_X \rightarrow F_A/F_B \rightarrow F_d$ の順であり、ここで A_0 は一次受容体クロロフィル a 、 A_1 は二次受容体フィロキノン、 $F_X \cdot F_A \cdot F_B$ は Fe-S クラスターである。これらすべての電子伝達成分、さらには三重項励起状態の 3P700 は ROS 生成のポテンシャルを有する (Kozuleva and Ivanov, 2010)。特に、PSI が還元状態で長時間停滞すると、酸素との反応性が高まり、ROS 生成につながる (Furutani et al., 2023)。本研究の実験条件下では、長時間の低温ストレス後に行った変動光処理により、還元型 Fe-S クラスターから酸素への電子伝達を介した $O_2^{\cdot-}$ 生成を伴う PSI 光阻害が起こり得たと考えられる。なぜならば、SP 照射中には F_d が大きく還元されていたためである (図 1-4)。しかしながら、実際には PSI 光阻害は生じなかった (図 1-3)。また、Fe-S クラスターから生じ得る $O_2^{\cdot-}$ についても、少なくとも可溶性画分において、変動光処理により増加しなかった (図 1-6) (Mubarakshina et al., 2006)。これらの結果は、PSI 光阻害に関する以下二つの考え方を支持する。第一に、変動光下での PSI 光阻害における ROS 生成は Fe-S クラスターではなく、より PSI 上流のキャリアに依存し、具体的にはフィロキノン A_1 由来の $O_2^{\cdot-}$ あるいは 3P700 を介した 1O_2 生成である (図 1-7) (Shuvalov et al., 1986; Rutherford et al., 2012; Cazzaniga et al., 2016; Kozuleva et al., 2021; Shimakawa et al., 2024); 第二に、P700 の電荷分離が安定して維持される限り、電化再結合を介して、PSI は光阻害に対して耐性を有するということである (Tiwari et al., 2024)。また、シロイヌナズナの場合、長時間の低温ストレス後には、 F_d の電子が速やかに放出され (図 1-4)、電子が酸素と反応するのに十分な時間、PSI に滞留できなかった可能性も考えられる。SP 照射下で P700 が強く酸化状態に保たれていたことから、PSI 内部での電荷再結合、または F_d 下流の AEF が、PSI 下流の電子を効果的に消去したと考えられる。電化再結合は具体的には、 $F_X/F_A/F_B$ からフィロキノン A_1 への安定した逆反応が A-branch を主にして進行し、 $A_1A^{\cdot-}$ が形成されることで、 3P700 の形成を回避しながら $P700^+$ を基底状態へ戻す反応が進行したと考えられる

(図 1-7) (Cherepanov et al., 2017; Degen and Johnson, 2024)。実際、こうした電荷分離と電荷再結合は光照射下の PSI における局所的な酸化還元サイクルを構成していることが提唱されている (Kou et al., 2015)。電荷再結合に加えて、植物は PSI 光阻害を回避するために、Fd 下流において電子の逃避経路として機能する多様な反応系を備えている。これらには、Fd から CBB 回路および光呼吸系へ電子を受け渡すフェレドキシン-NADP⁺還元酵素 (FNR)、循環的電子伝達 (CEF)、酸素依存的電子フロー (water-water サイクル, WWC)、フェレドキシン-チオレドキシン還元酵素 (FTR)、窒素同化 (NiR)、硫黄同化 (SiR)、葉緑体リンゴ酸バルブ、ミトコンドリア呼吸といった代謝経路が含まれる (図 1-7) (Schreiber, 2017; Nikkanen et al., 2018; Yamada et al., 2024)。これら多様な反応が Fd からの電子消費に果たす役割については、今後さらに詳細な検討が必要である。

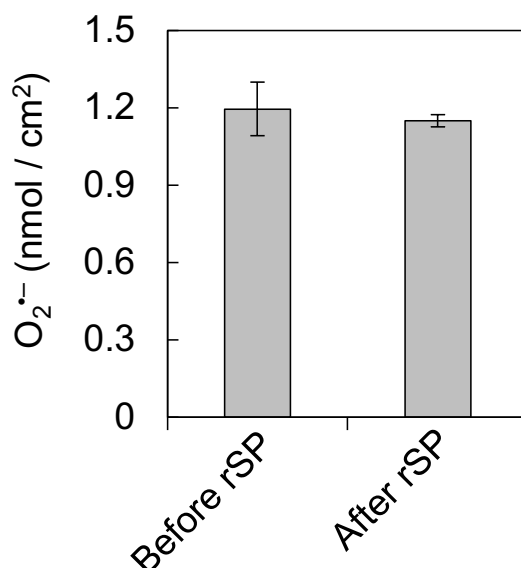


図 1-6 変動光処理前後におけるスーパーオキシドアニオンの蓄積量

低温処理を行っていない新鮮な葉を、変動光 (rSP) 処理の直前および直後に採取した。 $O_2^{\bullet-}$ 蓄積量を実験方法に記載した手法により検出した。値は平均値 $\pm$ SE (n=3、生物学的反復)。

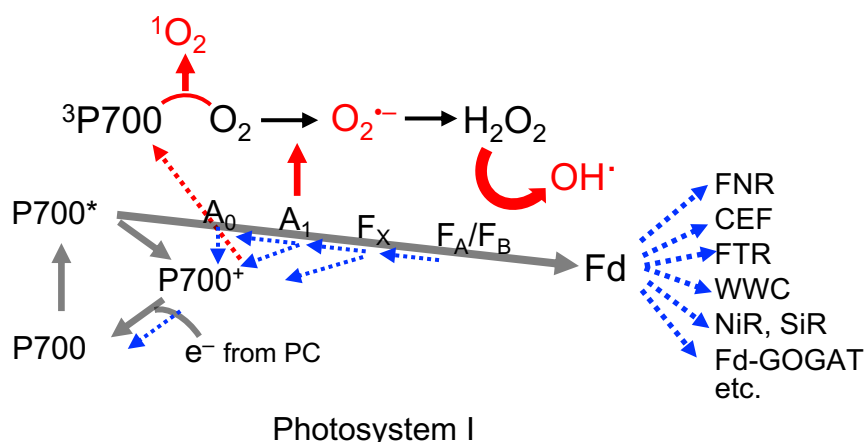


図 1-7 変動光下における PSI での電子伝達と ROS 生成の模式図

変動光下では、PSII が適切にダウンレギュレーションされていない場合、フィロキノン A_1 から酸素への直接的な電子伝達による $O_2^{\cdot-}$ の生成、あるいは 3P700 から 1O_2 が形成されることが考えられる (赤実線矢印)。P700 への電化再結合時に A_1 の B ブランチからの電荷再結合も 3P700 生成に寄与する (赤点線矢印)。生成した ROS は Fe-S クラスターと反応して $OH^{\cdot}$ を生成する可能性がある (赤矢印)。本研究結果から、変動光下で PSI における ROS 生成を抑制するには、PSII の活性低下に加え、P700 $^+$ への適切な電荷再結合反応や Fd 下流での電子伝達反応 (青点線矢印) の活性化が重要と考えられた。

1-2-3. キュウリ低温ストレス時の PSI 光阻害の発生機構について

低温ストレス下では、シロイヌナズナにおいて PSII 光阻害が誘導され、P700 の酸化が進むことで PSI 光阻害が抑制されることが明らかとなった。一方、キュウリでは、PSII 活性の十分なダウンレギュレーションが行われず、PSI 光阻害が生じた。この際、Fd の再酸化速度の低下も観察され、Fe-S の過還元および安定した電荷再結合の阻害がキュウリで生じていることが示唆された。Fe-S 過還元の原因は、低温下におけるチラコイド膜のアンカップリングによって photosynthetic control による PSII の十分なダウンレギュレーションが妨げられることに関連していることが知られている (Peeler and Naylor, 1988; Terashima et al., 1991a; Terashima et al., 1991b)。一方で、低温ストレス下において Fe-S の過還元によりどの種類の ROS が生成されるかについては、より詳細な検討が必要である。有力な候補の一つとして、Fe-S クラスターからの $O_2^{\cdot-}$ 生成が挙げられる。これは、Fe-S クラスターが酸素にアクセスしやすい可能性があるという考え方に基づくものである。今回の変動光ストレスのデータでは、Fe-S クラスターにおける ROS 生成は支持されなかったが、低温ストレスと変動光ストレスでは、PSI の阻害部位と ROS 生成部位が異なることが示唆されている (Shimakawa et al., 2024)。ROS が発生した場合、チラコイド膜内の ROS は不安定な Fe-S クラスターとのフ

ェントン反応により $\text{OH}\cdot$ を生成し、PSI に深刻な酸化ダメージを引き起こす可能性が高い (Sonoike et al., 1995; Sonoike, 1996; Erling Tjus et al., 1998; Kılıç et al., 2023)。一方で、低温 PSI 光阻害に対する $^1\text{O}_2$ の寄与についてはこれまでに十分に議論されておらず、今後の検討が必要である。PSI コア周囲での $^1\text{O}_2$ 検出には、 $^3\text{P700}$ の検出を含むナノ秒スケールの時間分解解析が求められる。

総合すると、我々の結果は PSII の光阻害が P700 の酸化を誘導し、PSI を光阻害から保護することを示している。Fv/Fm の低下は低温ストレスの主な負の結果と見なされることが多いが、植物が PSII よりも回復の遅い PSI の光阻害を防ぐ保護機構として Fv/Fm を低下させることを認識することが重要である。これは生存戦略として正の効果をもたらし得る。

1-3. 実験方法

1-3-1. 実験材料、栽培条件および低温ストレス処理

シロイヌナズナ (野生型、コロンビア-0 系統) を、土壤中で長日条件 (16 時間明期/8 時間暗期)、光強度 $80\text{--}100\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ 、 $22\ ^\circ\text{C}$ で栽培した。測定には、発芽後 4 週から 6 週齢のロゼット葉を用いた。

キュウリ (品種 High Green 21, 埼玉県原種育成会) は、プラスチック鉢で長日条件 (16 時間明期/8 時間暗期)、植物チャンバー内で温度 $27\ ^\circ\text{C}$ で栽培した。測定には、発芽後 3~4 週の完全展開葉を使用した。

低温ストレス ($4\ ^\circ\text{C}$) は、光強度は $180\text{--}250\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ の光照射下において、1 時間から 4 時間の短時間の低温ストレス、および 60 時間以上の長時間の低温ストレスを与えた。低温処理後、植物は少なくとも 20 分間 $4\ ^\circ\text{C}$ で暗順化した後、光合成パラメータを室温 ($23\ ^\circ\text{C}$ から $25\ ^\circ\text{C}$) で測定した。測定は低温ストレス後 5 分以内に行った。低温処理を行わない植物をコントロールとして使用した。

1-3-2. クロロフィル蛍光、P700 シグナル、Fe-S クラスターシグナル、 CO_2 同化解析

クロロフィル蛍光および P700 の酸化還元変化は、Dual-PAM 100 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) を用い、Induction curve 法により室温下で測定した。暗順化後の PSII の最大量子収率を F_v/F_m として算出した。光照射下での PSII の有効量子収率を、 $Y(\text{II}) = (F_m' - F_s)/F_m'$ として算出した。PSII における非調節エネルギー散逸を、 $Y(\text{NO}) = F_s/F_m$ 、調節されたエネルギー散逸を、 $Y(\text{NPQ}) = F_s/F_m' - F_s/F_m$ として計算した。また、Lake モデルにおける酸化状態の PSII の割合を、 $q_L = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o') \times F_o'/F_s$ として算出した。 F_o および F_m (それぞれ最小蛍光および最大蛍光) は、少なくとも 20 分間の暗順化後に測定した。 F_o' は、Oxborough and Baker (1997) に従い、 $F_o' = 1 / (1/F_o - 1/F_m + 1/F_m')$ として算出した。低温処理後の植物は低温室 ($4\ ^\circ\text{C}$) で少なくとも 20 分間暗順化し、対照植物は室温で暗順化した。その後、励起光 (Actinic light (AL), $172\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) を 5 分間照射し、30 秒ごとに飽和パルス光 (Satulating pulse (SP), 300 ms, $20000\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) を与え、 F_m' (光照射下での最大蛍光) および F_s (光照射下での定常蛍光) をモニターした。

P700 の酸化還元変化は、遠赤色光の吸光変化 (830 および $875\ \text{nm}$) をモニターして解析した (Klughammer and Schreiber, 2008)。SP によって酸化されうる P700 の割合を、 $Y(\text{I}) = (P_m' - P)/P_m$ として算出した。飽和パルスによって酸化されない P700 の割合を、 $Y(\text{NA}) = (P_m - P_m')/P_m$ として算出した。AL 下での酸化型 P700 の割合を、 $Y(\text{ND}) = P/P_m$ として算出した (Klughammer and Schreiber, 1994)。 P_m は遠赤色光 (FR) 照射後に SP 下で測定し、 P_m' は AL 下での P700^+ の最大値、 P は SP 直前の定常状態の P700^+ 値を示す。

フェレドキシン (Fd) の酸化還元状態は、Dual/KLAS-NIR (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) を用いて既報のように測定した (Klughammer and Schreiber, 2016)。

光合成誘導期における $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ ガス交換は、AL ($172\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) 照射開始後 4

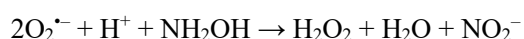
分から 5 分程度、ガス分析装置 LI-7000 (Li-COR, Lincoln, NE, USA)、および 3010-DUAL ガス交換チャンバー (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) を用いて既報の通り測定した (Ohnishi et al., 2023; Maekawa et al., 2024)。測定は、40 Pa CO₂ / 21 kPa O₂ 下で、葉温を 25 ± 0.5 °C に制御し、相対湿度 50~60% のもと行った。

1-3-3. PSI 光阻害処理 (rSP treatment)

低温ストレス前後の葉に対して、反復飽和パルス (repetitive saturating pulses, rSP) 処理による変動光処理を行った (Sejima et al., 2014; Takagi et al., 2017b)。葉は暗条件で、10 秒ごとに 20000 μmol photons m⁻² s⁻¹、300 ms の SP を 30 分間照射した (合計 180 回の SP)。rSP 処理中、葉温度は温度制御装置 (GFS-3000; Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) により 23 °C に維持した。rSP 処理後、葉を 30 分間暗順化し、Pm および Fv/Fm を測定し、残存 PSI 活性および残存 PSII 活性は、rSP 処理前の値を 1 として算出した。

1-3-4. O₂⁻ 定量

rSP 処理前後の O₂⁻ 量は、既報の通りに測定した (Zhang et al., 2010)。新鮮葉を rSP 処理前および rSP 処理直後に収穫し、液体窒素で凍結したサンプルを粉碎し、10 μM ヒドロキシルアミン塩酸塩、および 100 μM EDTA-Na₂ を含む 1.5 mL のリン酸緩衝液 (pH 7.8) と十分に混合した。得られたホモジネートを 4 °C で 5 分間 5000 rpm で遠心し、上清 500 μL を新しいチューブに移した。次に 17 mM スルファニルアミド (30% 酢酸溶液中) を 1 mL、および 7 mM ナフタレンジアミン二塩酸塩 1 mL を加え、37 °C で 10 分間インキュベートした。その後、各チューブにジエチルエーテルを 3 mL を加え、室温で 5 分間 5000 rpm で遠心し、各サンプルの 540nm の吸光度を測定した。検量線は 0 から 4 μM の NO₂⁻ 濃度範囲で作成し、O.D. = 540 と NO₂⁻ 濃度の相関係数は 0.999 であった。以下の反応式に基づき、O₂⁻ 濃度を算出した。



$$[\text{O}_2^{\cdot-}] = 2[\text{NO}_2^-] \text{ (}\mu\text{M)}$$

1-3-5. 統計解析

データの統計解析は、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) に続いて Tukey-Kramer の多重比較検定、または Student *t* 検定を用いて行った。すべての実験は、少なくとも 3 個体の独立した生物学的反復試料に基づいて行った。

第2章

キュウリ低温ストレス時に PSI 光阻害が起こる要因の解明

第1章ではシロイヌナズナにおいて PSII 光阻害が PSI を守ることを示した。一方、キュウリでは深刻な PSI 光阻害が生じた。本章では、キュウリにおける PSI 光阻害の発生メカニズムの解明に取り組んだ。キュウリの低温耐性には品種間差があることが報告されている (Shen et al., 1999; Yu et al., 2002; Zhou et al., 2004)。しかし、低温耐性の品種間差を生む要因は未解明であった。我々は、低温耐性の差は PSI 光阻害の差ではないかと仮説を立て、様々な品種の低温 PSI 光阻害を比較した。さらに本章では最終的に、低温耐性キュウリ品種と低温感受性キュウリ品種の比較を通し、PSI 光阻害の発生に至る過程や、その抑制に関与する因子を同定することを目的とした。

2-1. 結果

2-1-1. キュウリ PSI 光阻害耐性の品種間差

キュウリの低温耐性の品種間差を調べるために、日本で栽培されているキュウリ 10 品種の低温ストレス時の光合成応答を調べた。4 °C で 3 時間の低温処理を行い、室温で光合成パラメータを測定した。PSII の最大量子収率を示す F_v/F_m と PSII 電子伝達活性を表す $Y(II)$ はほとんどの品種で低下した (図 2-1)。一方、非光化学的消光の収率 $Y(NPQ)$ は多くの品種で増加傾向を示したが、品種 shimo 種および HG 種では減少傾向を示し、 $Y(NO)$ は HG 種で有意に増加した。 $Y(NPQ)$ はストレス下で光エネルギーを熱として安全に散逸させる割合を示し、 $Y(NO)$ は損傷につながる過剰光エネルギーの割合を反映する。したがって、 $Y(NPQ)$ が低下し、かつ $Y(NO)$ が増加した品種 HG では光保護機構が効率的に働いていないと考えられた。

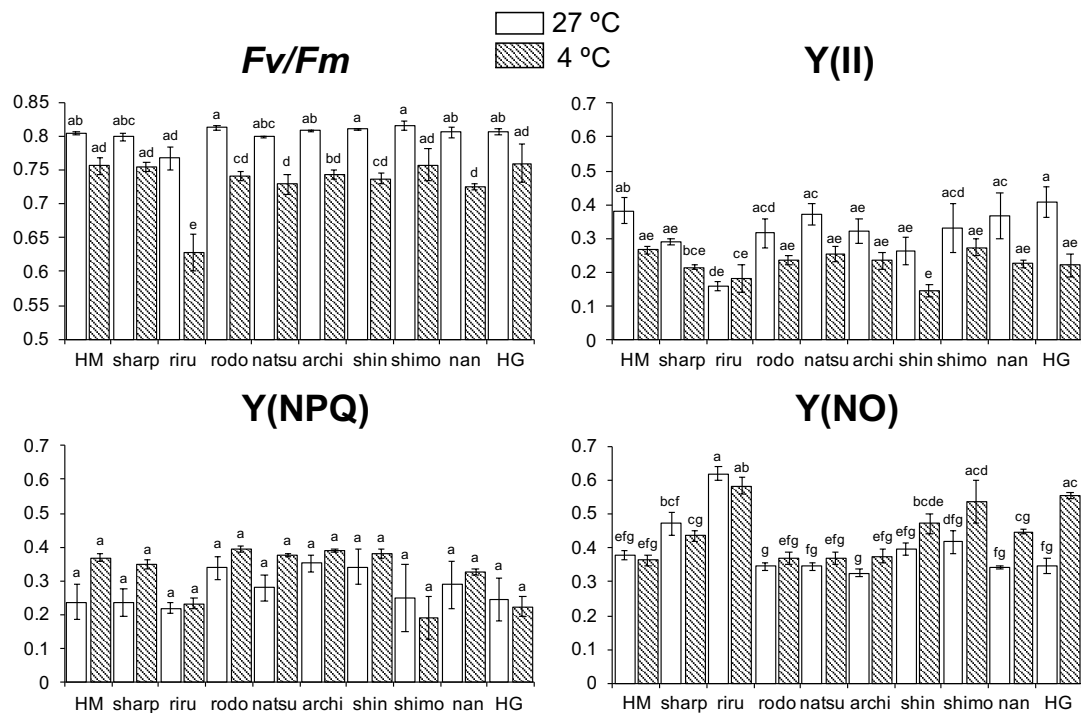


図 2-1 低温ストレスが光化学系 II に及ぼす影響

10 品種のキュウリにおけるクロロフィル蛍光の定常状態を Dual-PAM 100 により解析した。植物は 27 °C の植物チャンバーで 2–3 週間育成し、低温処理前 (open bars)、および 4 °C で 3 時間の低温処理後 (shaded bars) の葉を解析した。解析前に 15 分間暗順応させ、測定は 23 °C の環境下で、 $325 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の AL を 5 分間照射したのちに行った。横軸のキュウリ品種の略称は以下の通りである：Homi 1-gou (HM)、SHARP-1 (sharp)、Riru (riru)、V-road (rodo)、Natsusuzumi (natsu)、V-archi (archi)、Shinhokusei (shin)、Shimoshirazu-Jibai (shimo)、Nanshin (nan)、High Green 21 (HG)。値は平均 $\pm$ SE (n=3–4、生物学的反復) で示した。異なるアルファベットは、1 元配置分散分析 (one-way ANOVA, $p < 0.05$) 後の Tukey–Kramer 多重比較検定により、品種間または処理間で統計的に有意差があることを示す。

次に、PSII パラメーターと同時に測定した PSI パラメーターを示す (図 2-2)。PSI 反応中心クロロフィル P700 の総量を示す Pm は、低温処理後に全品種で低下傾向を示した。興味深いことに、PSI 反応中心クロロフィル P700 の酸化状態 (P700⁺) の割合を示す Y(ND)は、低温処理後、10 品種間で顕著な品種間差を示した (図 2-2)。HM、sharp、および riru は Y(ND)を 0.4 前後に維持したのに対し、その他の品種ではより低い値を示し、特に nan および HG では 0.1 未満まで著しく低下した。PSI アクセプター側の律速を示す Y(NA)は、Y(ND)と逆相関した。これらの結果から、HM、sharp、riru のように低温ストレス時に P700⁺を蓄積する品種では、PSI への過剰な電子蓄積が抑制され、PSI 光阻害が生じにくいと考えられる。一方、nan や HG など P700⁺が少ない品種では、PSI からの ROS 生成のリスクが高く、PSI 光阻害が起こりやすいと考えられた。

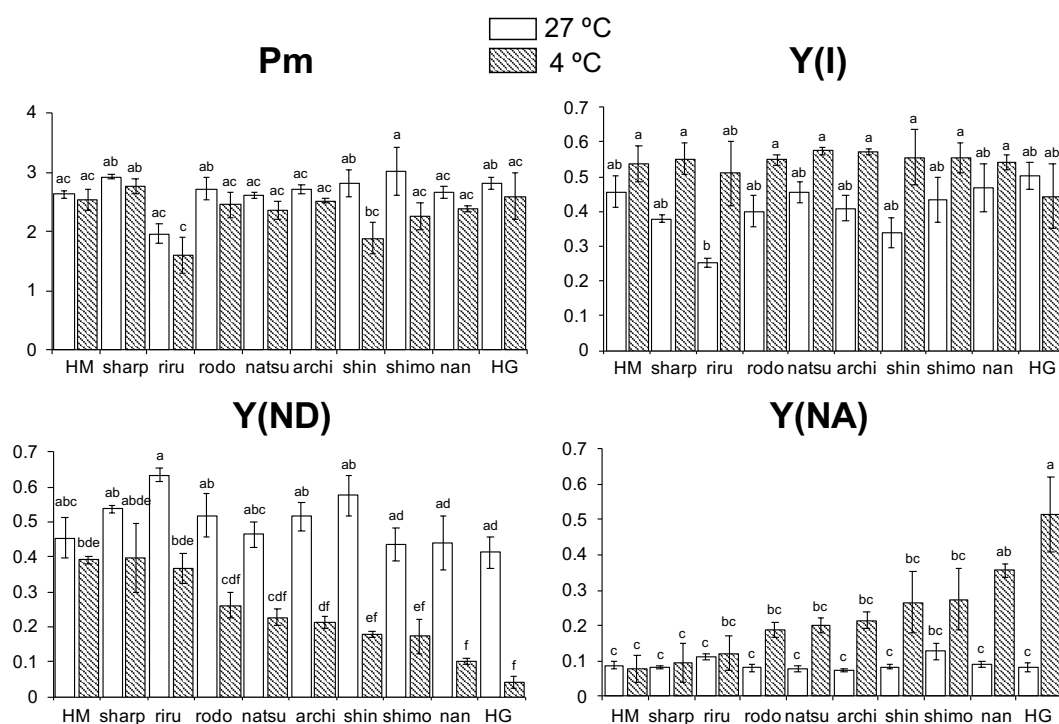


図 2-2 低温ストレスが PSI パラメーターに及ぼす影響

10 品種のキュウリについて、図 2-1 と同条件下で Dual-PAM 100 を用い P700 クロロフィル吸収を解析した。値は平均 $\pm$ SE (n=3-4、生物学的反復) を示す。異なるアルファベットは、1 元配置分散分析 (one-way ANOVA, $p < 0.05$) 後の Tukey-Kramer 多重比較検定により、品種間または処理間で統計的に有意な差があることを示す。

2-1-2. PSI 光阻害の度合いと低温ストレス耐性との関わり

2-1-1 より、P700 を酸化的に維持した品種 HM は、PSI が光阻害に強く低温ストレス耐性が高いと仮説を立て、一方、P700 が還元的であった品種 HG は PSI 光阻害に弱く、低温ストレス耐性が低いと仮説を立てた。P700 酸化と低温ストレス耐性の関係を明らかにするため、HG 種と HM 種を 24 時間の低温ストレスに曝露し、光阻害の進行と、生育への影響を調べた。その結果、HG では HM に比べて著しい葉の白化が観察された (図 2-3a)。一方、暗条件下で同様の低温処理を行った場合には、両品種とも目立った損傷は認められなかったため (図 2-3a)、低温障害は光による光化学系の過還元が要因であると考えられた。

低温ストレス時の光阻害を低温処理 0 時間から 24 時間の間で解析した結果、Fv/Fm は両品種とも最初の 5 時間で約 0.8 から 0.6 程度へと低下し、PSII 光阻害の程度に顕著な差はみられなかった (図 2-2b)。これに対し、光酸化可能な最大 P700 (Pm) で評価した PSI 光阻害は、品種 HG でより速く進行した; 低温ストレス 3 時間および 5 時間後、HG では Pm が約 60% から 70% 減少したのに対し、HM では約 20% の低下にとどまった (図 2-2b)。さらに、活性型フェレドキシンの最大シグナルも、HG では 5 時間後に約 60% まで大きく低下したが、HM では有意な低下は認められなかった (図 2-2b)。重要なことに、CO₂ 同化速度は 1 時間後に両品種でやや低下し、3 時間後には両品種で顕著な低下が確認され (図 2-2b)、CBB 回路活性の低下が両品種で同程度であった。以上の結果から、低温感受性品種 HG では PSI 光阻害が特徴的かつ顕著に進行し、その結果低温での生育阻害を受けた。一方、低温耐性品種 HM では PSI 光阻害が抑制され、低温ストレス耐性が高いことが明らかとなった。

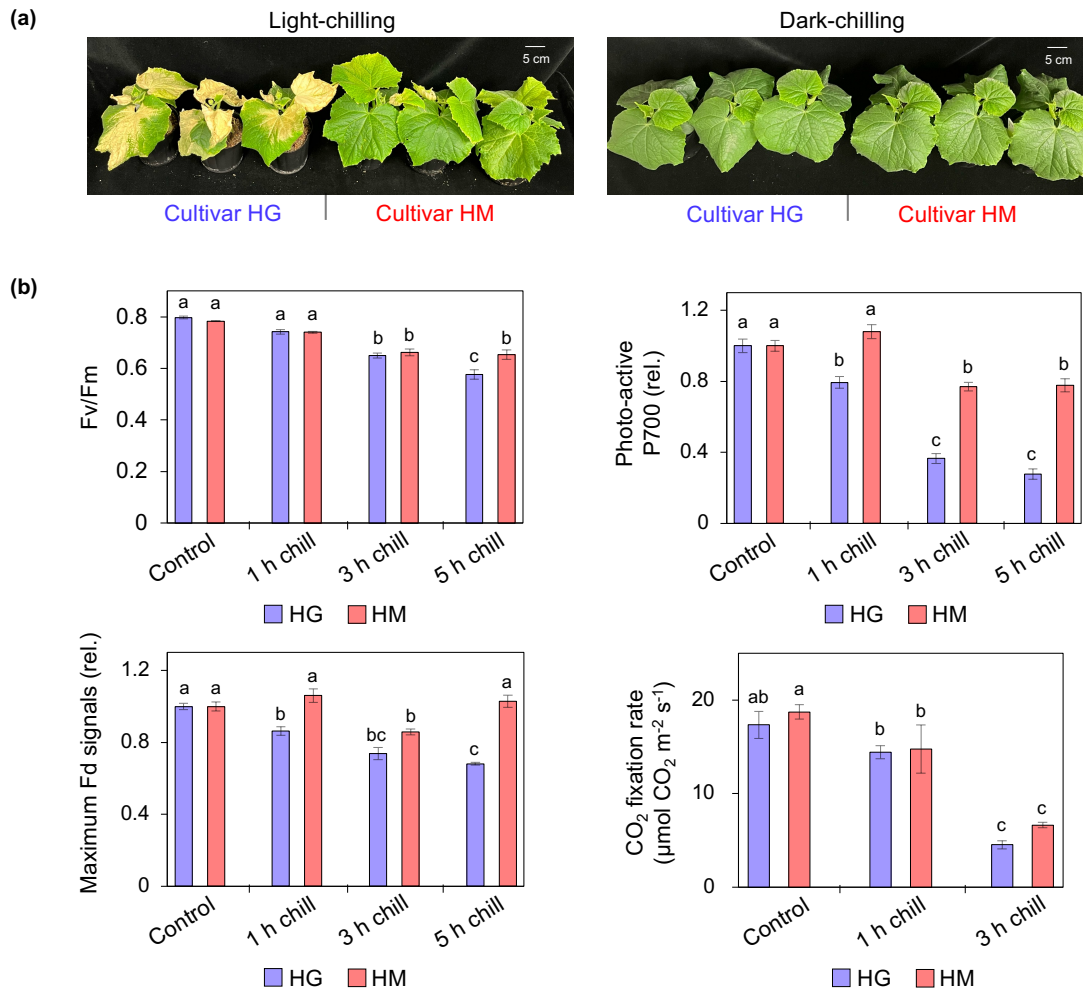


図 2-3 低温ストレス時のキュウリ 2 品種の表現型と光阻害解析

(a) 品種 HG および品種 HM を、光照射下または暗条件下で 4 °C, 24 時間の低温ストレスに処した。植物は低温処理後、元々生育させていた 27 °C の植物生育チャンバーに戻し、2 日間静置した。(b) 光化学系 II の最大量子収率 (Fv/Fm)、光化学系 I の光酸化可能な P700 の最大量 (Pm)、および最大の Fd シグナルを Dual-KLAS-NIR を用いて分光的に測定した。測定は低温ストレス処理前 (Control)、および低温処理 1 時間、3 時間、5 時間後に行った。さらに、光合成定常状態での CO₂ 固定速度を低温処理前および 低温ストレス 1 時間、3 時間後に測定した。測定前に植物を少なくとも 20 分間暗所に置いた。P700 および Fd の値は、各品種の低温処理前の値を 1 とした。値は平均 ± SE (n = 3–6、生物学的反復) で示し、異なる文字は一元配置分散分析 (one-way ANOVA) 後に Tukey–Kramer 多重比較検定で統計的有意差 ($p < 0.05$) を示す。

2-1-3. 低温耐性品種と低温感受性品種のチラコイド膜の脱共役について

キュウリ低温ストレスに関するこれまでの知見として、低温ストレスにより葉緑体 ATPase の CF₁複合体が解離してチラコイド膜が脱共役し、P700 の酸化が妨げられることが報告されている (Peeler and Naylor, 1988; Terashima et al., 1991a,b)。キュウリのチラコイド膜のカップリング状態を評価するため、クロロフィルおよびカロテノイドの吸収を反映する 515 nm の吸収シグナルを用い、23 °C で低温処理後の葉におけるプロトン駆動力 (proton motif force, *pmf*) を測定した。その結果、両品種ともに低温処理後は *pmf* が有意に低下したが、低温耐性品種 HM では HG よりも高い *pmf* を保つ傾向が見られた (図 2-4)。

チラコイド膜の脱共役をさらに確認するため、単離したチラコイドにおける電子伝達速度を、脱共役剤ナイジェリシンの存在下、および非存在下で測定した。キュウリ両品種の低温ストレス後、ナイジェリシンを加えない場合でも、電子伝達速度はナイジェリシン存在下とほぼ同等まで上昇した。つまり、少なくとも単離チラコイドレベルでは両品種ともチラコイドが脱共役していることが示唆された (表 1)。ただし、低温ストレスで損傷したチラコイドは、穏やかな単離操作でも完全に脱共役することが多く (Terashima et al., 1991b)、*pmf* のわずかな品種差を検出することは困難である点に注意が必要である。

次に、Terashima et al., (1991a,b) により示された低温ストレスによる葉緑体 ATPase の CF₁複合体の解離、および PSI コアタンパク質の安定性を調べるため、低温ストレス前後のチラコイドを CN-PAGE で分離し、さらに 2D-SDS-PAGE で ATPase の CF₁- γ 、CF₁- β 、PSI 反応中心複合体を形成する PsaA、PsaB の特異的抗体により解析した (図 2-4)。その結果、低温感受性品種 HG では、CF₁- γ シグナルが 1 時間および 3 時間の低温処理後に本来のバンド 4 の位置より低分子量側に広く検出され、低温ストレスによる CF₁- γ の膜内安定性の低下が示唆された。これは先行研究とも一致する (Terashima et al., 1991a,b)。HG で観察された CF₁- γ の不安定化は、品種間の NPQ 差の一因となった可能性がある (図 2-1)。一方、CF₁- β 、PsaA、PsaB の安定性は、3 時間の低温処理後に両品種で低下した (図 2-4)。

以上の結果から、低温耐性品種 HM は HG に比べて一定程度 CF₁の安定性を維持しているものの、P700 酸化のドナー側調節に重要な Δ pH による photosynthetic control は両品種とも低温ストレス下で低下していた。これらの知見は、従来から報告されているチラコイド脱共役に加えて、低温 PSI 光阻害に寄与する他の要因の存在を示唆した。

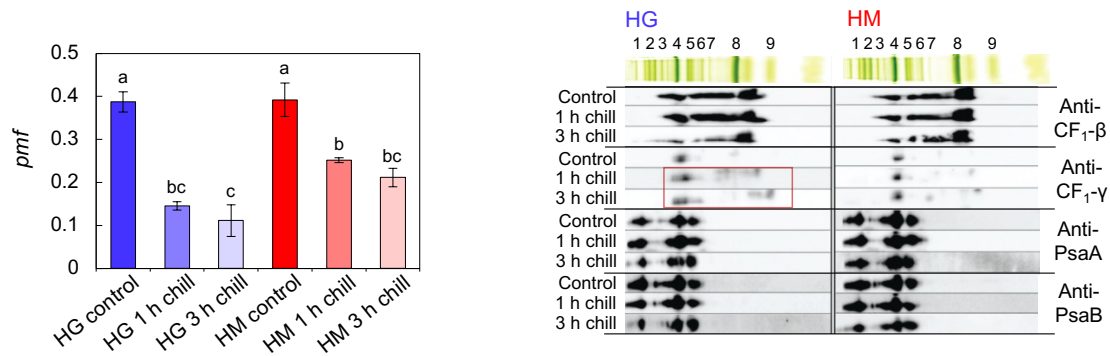


図 2-4 低温ストレス時のチラコイドの脱共役

キュウリを 1 時間 または 3 時間低温処理し、4 °C で 20 分間暗処理した (Control は 23 °C)。その後、Dual-PAM 100 (P515/535 モジュール) を用い、室温条件下で Electron chromic shift (ECS)により *pmf* を測定した。ECS は 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の AL を 1 分間照射し、暗条件でのインターバルを設けて ECS_t を算出した。ECS_t は control 植物における 515 nm の最大吸収変化で正規化した。値は平均 $\pm$ SE、n = 3 (生物学的反復)。異なる文字は、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) 後の Tukey–Kramer 多重比較検定により有意差 ($p < 0.05$) があることを示す。(d) 葉緑体 ATP 合成酵素複合体 CF_1 サブユニット ($CF_1\gamma$ 、 $CF_1\beta$)、および PSI コアサブユニット (PsaA, PsaB) の安定性。キュウリを 4 °C で 1 時間 または 3 時間処理し、単離したチラコイド膜を Clear-Native PAGE (CN-PAGE) で分離後、2D-SDS-PAGE を行い、特異的抗体を用いて免疫染色を行った。CN-PAGE 画像は各品種における 3 時間低温処理後の代表例を示す。図中赤枠は、低温ストレスにより不安定化した $CF_1\gamma$ サブユニットのシグナルを示している。1: PSI–NDH supercomplex; 2: PSII–LHCII supercomplex; 3: PSI + LHCI; 4: PSI–LHCI, PSII core dimer, and ATPase; 5: PSI core monomer; 6: PSII core monomer and Cyt *b₆f*; 7: LHCII assembly; 8: LHCII trimer; and 9: LHCII monomer.

表 1 低温ストレスが単離チラコイドにおける電子伝達速度に及ぼす影響

Cucumber cultivar	Chilling treatment	$\mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chl.} / \text{h}$		Ratio (+Nigericin/–Nigericin)
		– Nigericin	+ Nigericin	
HG	Control	82.0 $\pm$ 25.6	168.4 $\pm$ 23.5	2.2 $\pm$ 0.91
	1 h chilling	123.7 $\pm$ 28.8	132.0 $\pm$ 32.8	1.1 $\pm$ 0.06
	3 h chilling	124.6 $\pm$ 60.5	127.7 $\pm$ 68.9	1.0 $\pm$ 0.05
HM	Control	98.7 $\pm$ 22.9	183.9 $\pm$ 35.7	1.9 $\pm$ 0.29
	1 h chilling	114.1 $\pm$ 42.1	122.7 $\pm$ 36.8	1.1 $\pm$ 0.08
	3 h chilling	128.8 $\pm$ 49.2	120.5 $\pm$ 43.5	0.9 $\pm$ 0.06

チラコイド膜は、1 時間または 3 時間の低温処理後のキュウリから単離した。電子伝達速度は、Clark 型酸素電極を用いて測定した。反応系にはチラコイド膜をアンカップルするためにナイジェリシンを添加したものを含む。数値は平均値 $\pm$ SD、n = 3 (生物学的反復)。

2-1-4. 低温耐性品種と低温感受性品種の PSI 下流の電子蓄積の違いについて

PSI 光阻害に関与する新規要因を明らかにするため、Dual-KLAS-NIR を用いて Fd の酸化還元状態を測定した。通常条件下では、Fd は以下のような酸化還元 kinetics を示す; 暗処理した葉に光を照射すると、光照射後すぐは Fd に電子が蓄積し (Fd は還元型)、その後数分間をかけて Fd 下流の電子消費反応が活性化し、還元型 Fd は徐々に減少して、5 分以内に約 20% の還元型になる (図 2-5a, control) (Kadota et al., 2019)。興味深いことに、低温感受性品種 HG では、低温ストレス後、光照射を開始してから 5 分経過しても 45% 以上の Fd が還元型のままであり、PSI 下流の持続的な過還元が認められた (図 2-5a, 3 h chill)。一方、低温耐性品種 HM では、低温ストレス後でも Fd の酸化が速やかに進み、むしろ通常条件よりも酸化速度は速かった (図 2-5a, 3 h chill)。

光照射後の暗条件下での Fd の酸化速度は、Fd 下流の電子放出反応の活性レベルを反映することが知られている (Schreiber, 2017)。光照射後の暗条件下における還元型 Fd の酸化速度を測定し、低温ストレス後の Fd 下流側の電子消費反応の活性化レベルを評価した (図 2-5b)。通常条件に比べ、3 時間の低温ストレス後、HG では Fd の再酸化が明らかに遅延し、Fd からの電子放出経路が制限されていることが示唆された。これに対して、HM では Fd の再酸化の遅延は認められなかった (Fig. 3b)。

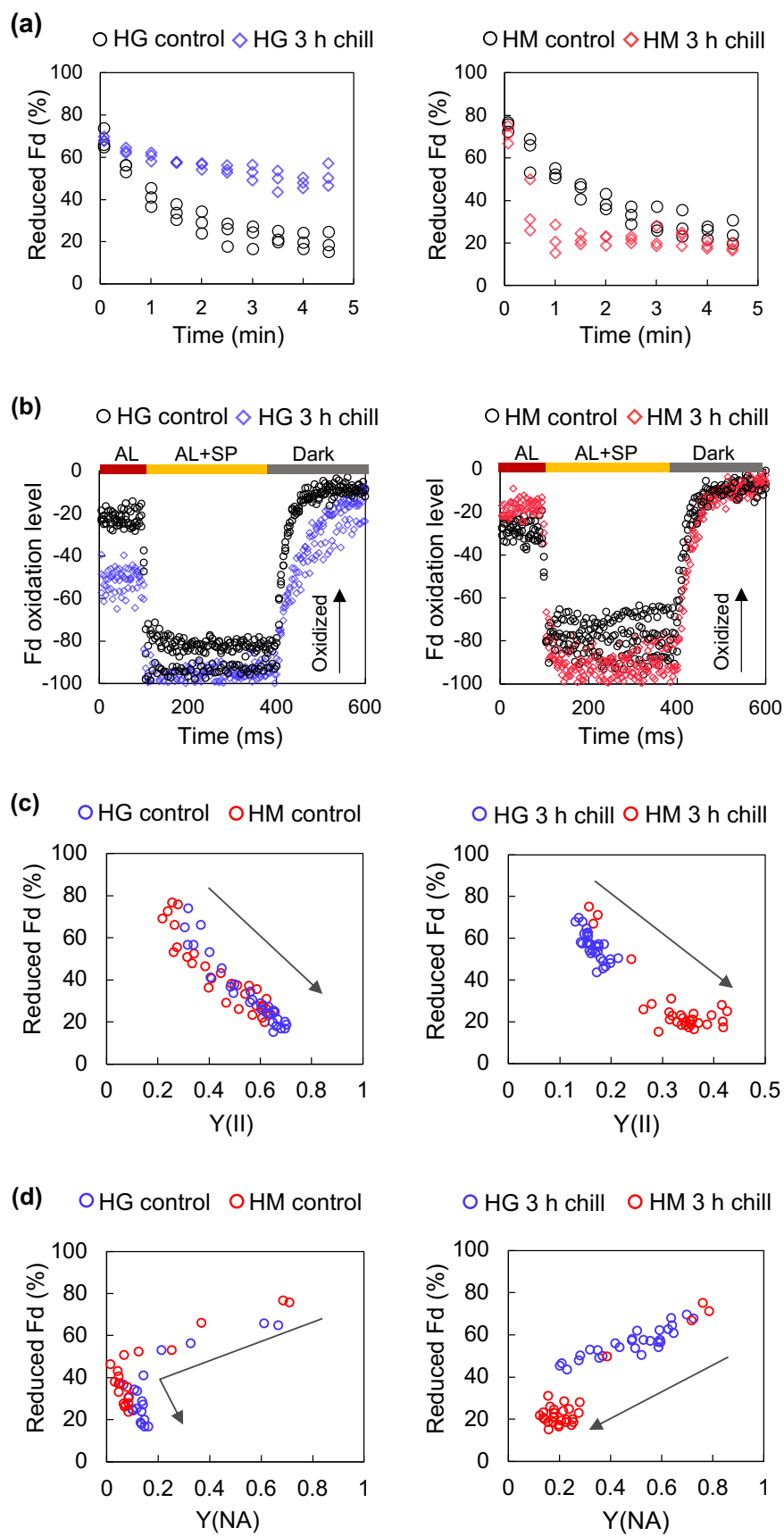


図 2-5 低温ストレス前後における Fd 解析

キュウリを 4℃ で 3 時間処理し測定前に少なくとも 20 分間、4℃ の暗所で順化させた。低温処理を行っていない植物を control とした。(a) 光合成誘導期における還元型 Fd レベルを、Dual-KLAS-NIR を用いた分光法により解析した。測定は 23℃ で、 $300\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ の AL を 5 分間照射して行った。(b) 5 分間の AL 照射後に SP を与えて Fd を完全に還元した後、暗条件 (図中 400–600 ms) で還元型 Fd の再酸化速度を測定した ($n = 3$ 、生物学的反復)。(c, d) 5 分間の光合成誘導期における還元型 Fd レベル (図 2-5) を、同時に測定した $Y(\text{II})$ と $Y(\text{NA})$ に対してプロットした。左図は control 植物 (低温処理なし)、右図は 3 時間低温処理した植物のデータを示す。矢印は 5 分間の測定における時間経過を示す ($n = 3$ 、生物学的反復)。

2-1-5. 低温耐性品種と低温感受性品種の CO₂ 制限条件での AEF 活性

低温ストレス下では CBB 回路が阻害されるため (図 2-3)、Fd の酸化に関わる主な電子受容経路は AEF であると考えられる。AEF 活性の品種間差を評価するため、光照射時に CO₂ 供給を制限し、CBB 回路の CO₂ 同化経路を抑制した状態で、PSII および P700 の酸化還元状態を測定した。低 CO₂ 条件では、予想通り CBB 回路の制限により Y(II) が大きく低下し、Y(NPQ) が両品種で上昇した (図 2-6)。注目すべきは、低温感受性品種 HG が低 CO₂ 条件下で、低温耐性品種 HM に比べて Y(ND) が低く、Y(NA) が高い値を示した点である (図 2-6)。これは、HG では HM よりも、23 °C の条件下であっても CO₂ が枯渇していると PSI が過還元となっていることを示している。Y(II)、Y(NPQ)、Y(NO) という PSII に関するパラメーターには品種間差が認められなかったことから (図 2-6)、PSI 下流の AEF 活性に品種間差が存在するということが示された。すなわち、低温感受性品種 HG は Fd 下流の AEF 活性が低く、PSI の過還元が起こりやすいことが示された。

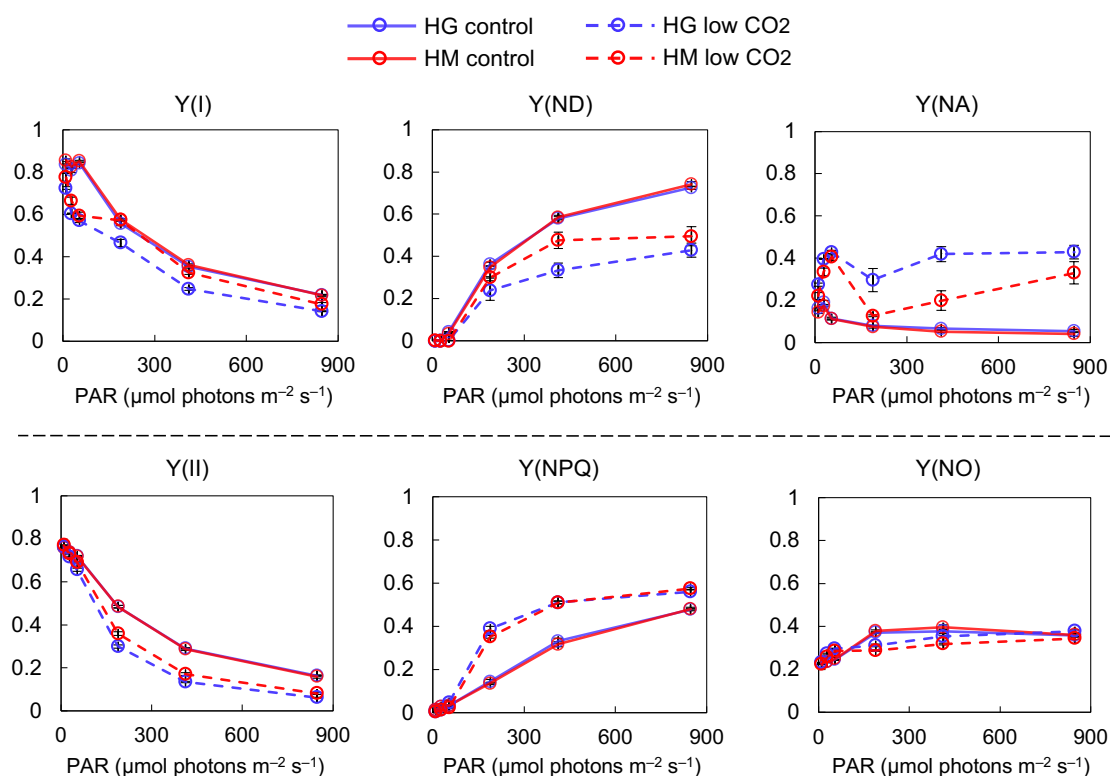


図 2-6 CO₂制限が P700 酸化に及ぼす影響

大気 CO₂ 濃度 (control) または低 CO₂ 条件 (< 3 Pa) 下で、さまざまな光強度におけるクロロフィル蛍光および P700 の酸化還元状態を Dual-PAM 100 を用いて 23 °C で測定した。値は平均 ± SE、n = 3–4 (生物学的反復)。

2-1-6. 低温耐性品種と低温感受性品種の NDH 活性の比較

葉緑体 NADH デヒドロゲナーゼ様複合体 (NDH)は、AEF の一種として Fd から電子を受け取り、PQ を還元することで P700 の酸化を促進することが知られている。NDH 活性は、AL を消灯した後に観察されるクロロフィル蛍光の一過的な上昇 (post-illumination fluorescence rise、PIFR) によって特徴的に評価できる。興味深いことに、通常条件下において、低温感受性品種 HG は低温耐性品種 HM よりも PIFR が低かった (図 2-7a)。また、低温ストレス後、両品種とも Fo を超える顕著な PIFR を示さなかったが、特に HG では PIFR が全く検出されなくなった一方、HM ではわずかではあるが PIFR が維持された (図 2-7b)。NDH 活性の測定と同じタイミングで行った光合成活性の同時測定では、HG においてのみ低温ストレス 1 時間後に P700⁺の誘導 (Y(ND)) が遅延した (図 2-8)。これは NDH 活性低下に関連する典型的な応答である (Nikkanen et al., 2018)。しかし AL 照射 5 分後には、Y(NA) は低下し、P700⁺は HM と同様に正常に蓄積した。これらの結果から、HG における NDH 活性の喪失は、PSI 光阻害の発生よりも早期に起きていることが確認された。

次に、低温ストレス下で HG における NDH 活性喪失の原因を明らかにするため、チラコイド膜タンパク質複合体を BN-PAGE で分離し (図 2-7c)、続いて 2D-SDS-PAGE および NDH サブユニット PnsL1、NdhT、NdhH に対する特異抗体による免疫染色を行った (図 2-7d)。正常に組み立てられた PSI-NDH 超複合体は、図中バンド位置「1」 (赤線) に検出される。低温ストレス前には両品種とも NDH シグナルは主にバンド 1 位置に検出されたが、低温ストレス後、HG では PnsL1 シグナルが低分子量側に広く検出された (図 2-7d)。NdhT および NdhH についても同様のシグナルがみられ、低温ストレス後に HG のみで低分子量側に NDH のシグナルが認められた (図 2-7d)。これらの結果は、低温ストレスによって HG の PSI-NDH 超複合体が部分的に解離/不安定化していることを示している。一方、HM では低温ストレス下でも PSI-NDH スーパーコンプレックスの安定性が維持された (図 2-7d)。

NDH 活性の違いが葉の酸化障害に及ぼす影響を調べるため、低温ストレス初期段階での O₂⁻生成量を調べたところ、HG では HM より有意に高蓄積であった (図 2-7e)。低温ストレス後、両品種間で SOD 活性に有意差は認められなかったことから (データは示していない)、O₂⁻発生量の差が HG 特有の PSI 過還元起因することが示唆された。以上の知見から、低温感受性品種 HG では通常条件下でも HM に比べ NDH 活性が低く、低温ストレス初期段階で PSI 過還元を引き起こしやすいこと、その結果、ROS 生成と PSI-NDH スーパーコンプレックスの不安定化が素早く進行し、最終的には NDH 活性の完全な喪失と PSI 光阻害に至ると考えられた。

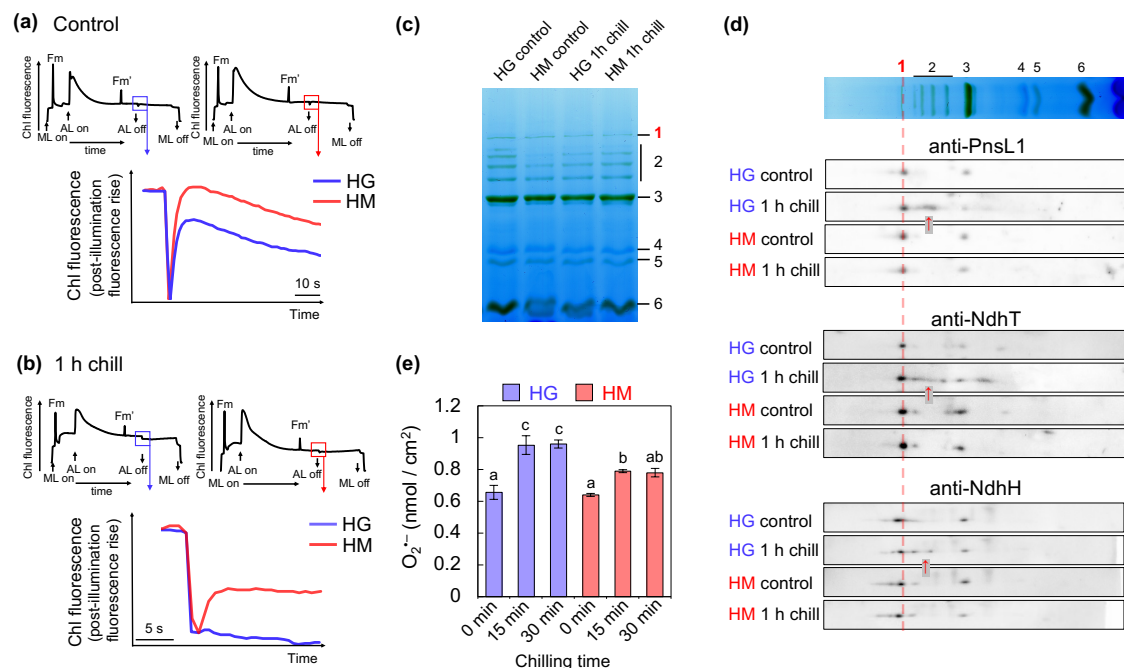


図 2-7 低温ストレスによる PSI-NDH 超複合体の不安定化

(a, b) キュウリを無処理、もしくは 4 °C で 1 時間処理し、AL 照射後の一過的クロロフィル蛍光上昇 (PIFR) を解析した。葉は測定前に少なくとも 20 分間暗順化した後、約 5 分間 AL を照射し、その後暗条件下で PIFR (図中の枠線部分) を測定した。示したデータは 3 個体の生物学的反復の代表例を示した。(c, d) 1 時間の低温ストレス処理前後における PSI-NDH 超複合体の安定性を解析した。(c) チラコイド膜複合体を Blue-Native PAGE (BN-PAGE) で分離した結果。単離チラコイドを 1.0% (w/v) n-ドデシル-β-D-マルトシドで可溶化し、クロロフィル量 5 μg 相当のタンパク質を 4-12% グラジエントゲルで分離した。(d) BN-PAGE で分離したタンパク質を 2D-SDS-PAGE で解析し、NDH のサブユニット PnsL1、NdhT、NdhH の特異的抗体で検出した。赤い破線は BN-PAGE における PSI-NDH 超複合体のバンド位置を示す。免疫染色データ上部の BN-PAGE 画像は (c) の HG control から得られた例を示す。図中赤矢印は、低温ストレスにより不安定化した NDH サブユニットのシグナルを示す。1: PSI-NDH 超複合体、2: PSII-LHCII 超複合体、3: PSI-LHCI 超複合体、PSII コアダイマー、ATPase、4: PSII コアモノマー/シトクロム *b₆f*、5: LHCII アセンブリー、6: LHCII トリマー。(e) 葉を低温ストレス前、および低温処理 15 分および 30 分直後に採取した。値は平均 ± SE (n=3-4、生物学的反復) を示し、異なる文字は一元配置分散分析後の Tukey-Kramer 多重比較検定により有意差 ($p < 0.05$) があることを示す。

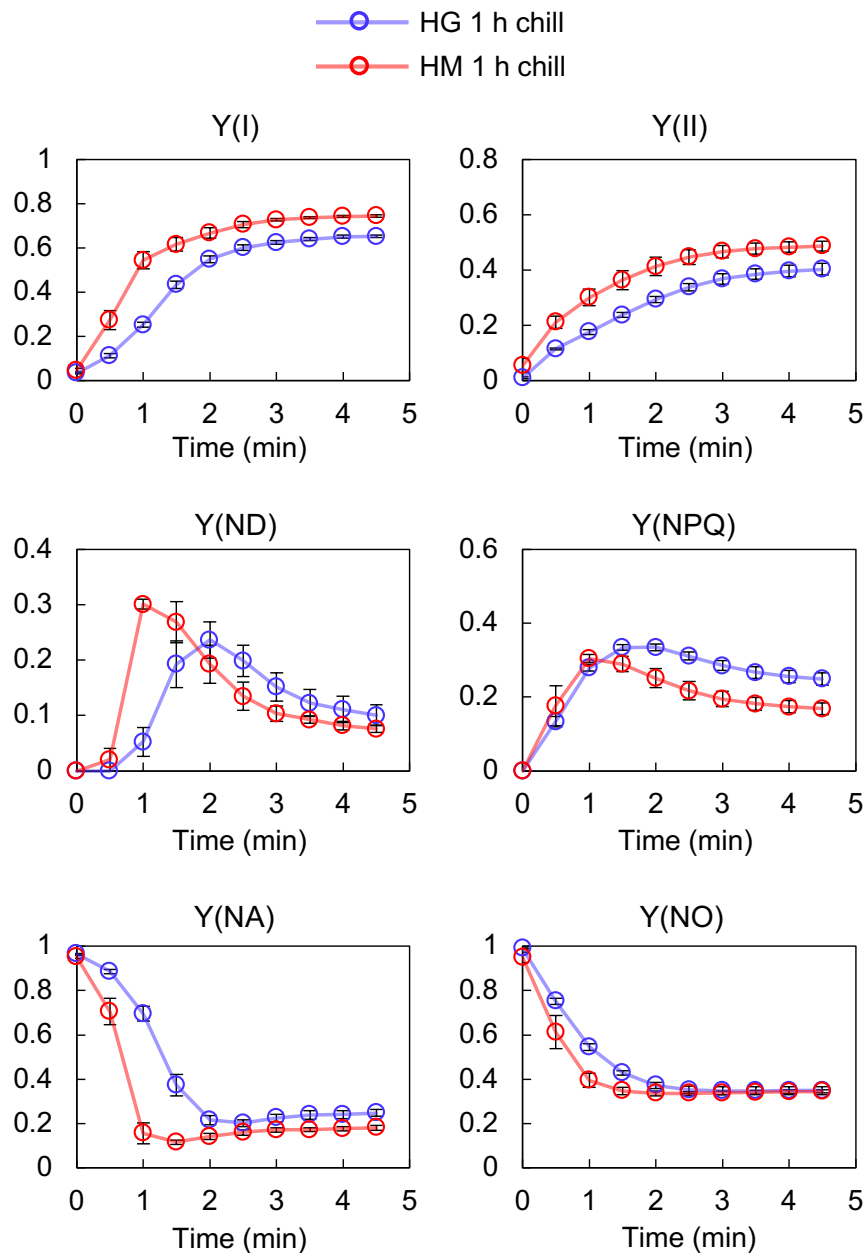


図 2-8 NDH 活性測定時 (1 時間の低温ストレス後) の光合成活性

クロロフィル蛍光および P700 の酸化還元状態を、NDH 活性の測定 (図 2-7b) と同時期に解析した (1 時間の低温処理後)。1 時間の低温処理後、少なくとも 20 分間暗順化し、光合成誘導期におけるクロロフィル蛍光および吸収を Dual-PAM 100 を用いて測定した。測定は 23°C において、AL (550 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を 5 分間照射して行った。値は平均 $\pm$ SE で示し、 $n = 3$ (生物学的反復)。

2-1-7. キュウリ NDH 活性の品種間差の裏付け

品種間における NDH 活性の違いをさらに確認するため、NDH 活性が光存在下で要求される 2 つの主要条件、すなわち「暗所からの急な光照射」、および「変動光条件下」で光合成特性を解析した。「暗所からの急な光照射」(長時間の暗処理後に 5 分間の強光を照射)では、NDH 活性が低い低温感受性品種 HG では P700 酸化が遅延し (Y(ND)の低下)、Y(NA)が増加した (図 2-9a)。これは、様々な植物種の NDH 欠損変異体において観察される一般的特徴と類似していた (Nikkanen et al., 2018; Storti et al., 2020)。実際、シロイヌナズナの NDH 欠損変異体 *pns11* は、Y(ND)の誘導の遅延と Y(NA)の上昇を示すことを確かめた (図 2-9b)。また、変動光条件下においても、低温感受性品種 HG は低温ストレス後、強光下で HM より低い Y(ND)と高い Y(NA)を示した (図 2-9c)。この特徴も、NDH 欠損変異体に一般に見られるものであり、HG では低温ストレス前および低温ストレス中のいずれにおいても NDH 活性が HM より低い (Fig. 2-7)という本研究の知見を裏付ける結果である。

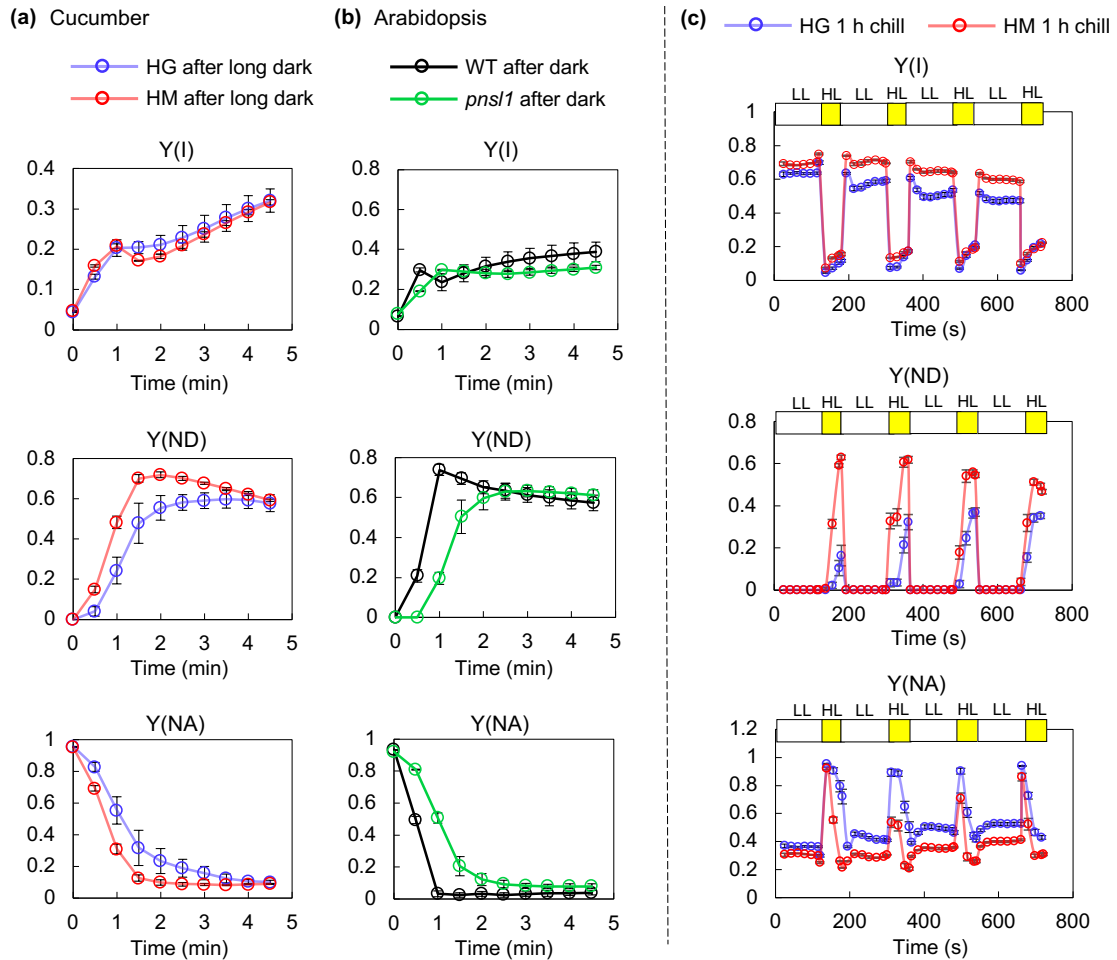


図 2-9 キュウリおよび NDH 欠損シロイヌナズナにおける P700 酸化能解析

(a) 低温感受性品種 HG および低温耐性品種 HM (いずれも無処理植物) を 23 °C で 10 時間暗所に保持した後、Dual-PAM 100 を用いて 23 °C、760 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の AL 下で 5 分間、P700 の酸化還元を解析した。(b) シロイヌナズナ野生型 (Col-0) および NDH 欠損変異体 *pns1* を 30 分間暗順化した後、Dual-PAM 100 を用いて 23 °C、550 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の AL 下で 5 分間、P700 の酸化還元を解析した。(c) キュウリを 4 °C で 1 時間低温処理した後、23 °C で弱光 (LL; 35 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 2 分、白抜きバー) と強光 (HL; 1960 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 1 分、黄色バー) を繰り返す変動光条件に曝した。測定は少なくとも 20 分の暗順化後に行った。(a)–(c)の値は平均 $\pm$ SE ($n=3-4$ 、生物学的反復) を示す。

2-1-8. NDH の PSI 下流の電子シンクとしての新規機能の立証

低 CO₂ 条件下において、低温感受性品種 HG が低温耐性品種 HM よりも PSI の過還元が生じたことから (図 2-6)、PSI-NDH 複合体は CBB サイクル以外で PSI 下流の電子受容体として機能すると仮説を立てた。電子シンクとしての NDH の役割を確認するため、低 CO₂ 条件下でシロイヌナズナ NDH 欠損変異体 *pnsII* の P700 の酸化還元状態を測定した。*pnsII* は CO₂ 制限条件において、WT よりもかなり低い Y(ND) と非常に高い Y(NA) を示し (図 2-10a)、PSI の過還元が顕著に生じた。この時、Y(II) を含め PSII パラメーターには差が認められず (図 2-10a)、WT と *pnsII* 間で PSI への電子流入レベルは同じであることが確認された。低 CO₂ 条件下で 30 分間光照射後の PSI および PSII の光阻害レベルを WT と *pnsII* で比較したところ、Fv/Fm の低下は両者で同程度であったが、*pnsII* のみで光酸化可能な P700 (Pm) が有意に減少し、低 CO₂ 条件下で PSI 光阻害が生じた (図 2-10b)。これらの結果から、PSI-NDH 複合体は CO₂ 制限下において CBB 回路に替わる PSI 下流の電子シンクとして機能することが明らかとなり、CBB 回路が阻害される低温ストレス時に、PSI を光阻害から保護する上で重要な役割を果たすことが明らかとなった。

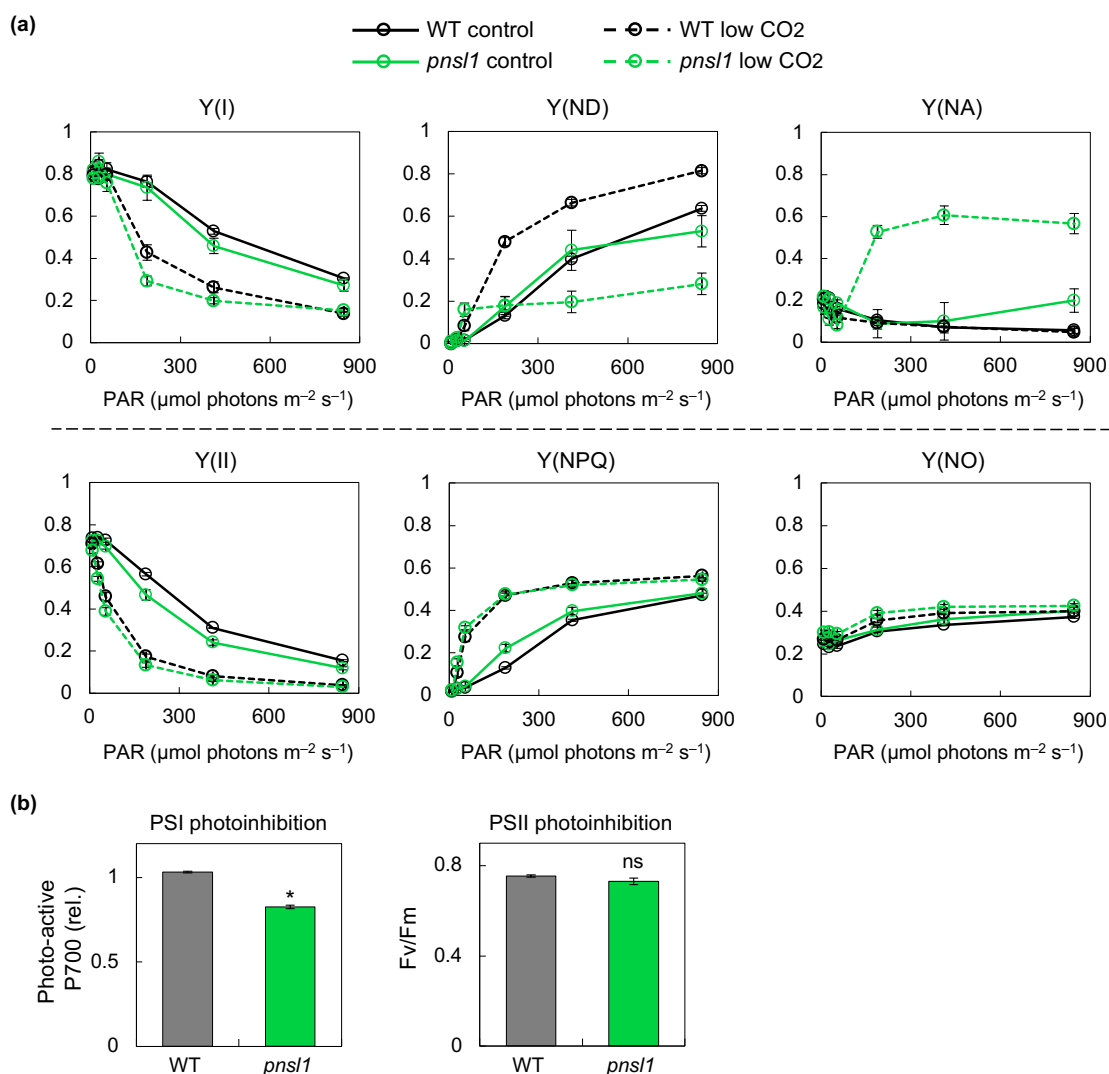


図 2-10 CO₂制限環境が NDH 欠損シロイヌナズナにおける P700 酸化および PSI 光阻害に与える影響

(a) クロロフィル蛍光および P700 酸化還元状態を、23°C の通常 CO₂ 条件 (Control)、または低 CO₂ (<3 Pa) 条件下で、様々な光強度で Dual-PAM 100 を用いて測定した。測定にはシロイヌナズナ野生型 (WT, Col-0)、および NDH 欠損変異体 *pns1* の健全な葉を用いた。値は平均 ± SE (n = 3–4、生物学的反復) を示す。(b) 低 CO₂ 条件下での Fv/Fm および光酸化可能な P700 の最大値 (Pm)。WT および *pns1* を低 CO₂ 条件下で強光 (850 μmol photons m⁻² s⁻¹) に 30 分間曝した後、30 分暗順化して Fv/Fm および Pm を測定した。Pm は各植物における強光照射前の値で正規化した。値は平均 ± SE (n = 3、生物学的反復)。アスタリスクは統計的に有意差を示し ($p < 0.05$, Student's *t*-test)、『ns』は有意差なしを示す。

2-2. 考察

2-2-1. 本研究のまとめ

本章では、低温ストレス耐性および PSI 光阻害の程度が異なる 2 つのキュウリ品種の比較を通じて、PSI 光阻害の原因、および抑制機構を明らかにした。両キュウリ品種は低温ストレス下でチラコイド膜が脱共役し、 ΔpH による Cyt *b₆f* での電子伝達活性の抑制機構「photosynthetic control」が不完全になった (図 2-4)。さらに、注目すべき点として、低温感受性品種 HG では Fd からの電子流出反応が抑制され、Fd が過還元であった (図 2-5)。さらに低温感受性品種では、低温ストレス下だけでなく CO₂制限条件下においても PSI が過剰に還元的であり (図 2-6)、Fd 下流の代替電子伝達経路 (AEF) の重要性が示唆された。我々は、特に AEF の中でも、NDH 活性に顕著な品種間差を見出した (図 2-7)。低温感受性品種では、低温ストレス前の段階から NDH 活性が低く、さらに低温ストレス下では PSI-NDH 超複合体の一部分解により完全に消失した (図 2-7)。さらに、突発的な強光下、および変動光条件下で PSI が過剰還元されたことも、低温感受性品種における NDH 活性の低下を裏付けた (図 2-9)。以上の結果から、低温感受性品種の低温ストレス時の応答は以下のように説明できる; 1. 元々 NDH 活性が低く、低温ストレス初期に ROS が発生する。2. ROS により PSI-NDH 超複合体が不安定化する。3. NDH 活性の大幅な低下により PSI 下流の Fd からの電子流出が制限される。4. PSI 受容体側が過還元されることで、さらに ROS が発生する。5. ROS が PSI を攻撃し、PSI 光阻害が引き起こされる。6. PSI 光阻害は、不可逆的なダメージなため、生育が低下する。以上、本研究は、陸上植物における低温ストレス耐性および PSI 光阻害の防御における NDH の重要な役割を示した (図 2-11)。

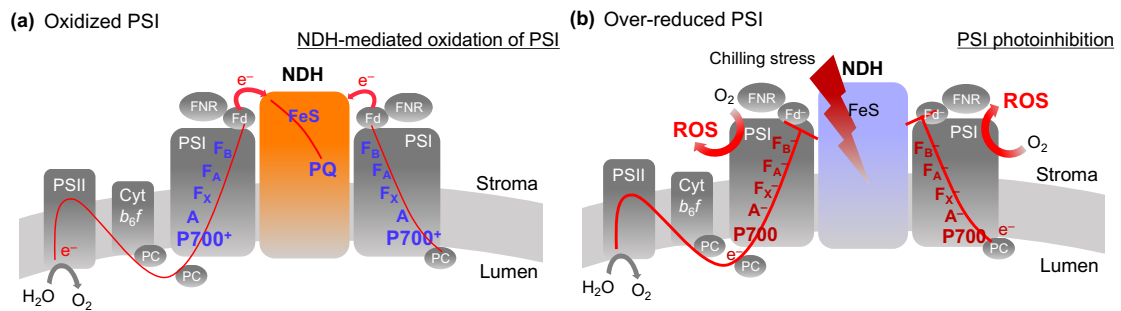


図 2-11 光化学系 I (PSI) 光阻害に対する NADH デヒドロゲナーゼ様複合体 (NDH) の重要性

(a) PSI の電子伝達経路は $P700 \rightarrow A_0 \rightarrow A_1 \rightarrow F_X \rightarrow F_A/F_B \rightarrow F_d$ 。ここで A_0 は一次電子受容クロロフィル a 、 A_1 は二次アクセプターのフィロキノン、 F_X 、 F_A 、および F_B は Fe-S クラスタである。CBB 回路が抑制される条件下、例えば低温ストレスや低 CO_2 時環境では、PSI に結合した NDH が還元型 F_d から電子を受け取ることで PSI の過還元を防ぐ。還元型 F_d はストロマ側にある NDH サブコンプレックス E に結合し、NDH 内の 3 つの Fe-S クラスタを介して電子伝達が行われる。NDH 内のプラストキノン分子は 2 つの電子を受け取ることができるため、1 分子の F_d の電子を受け取った後、もう 1 分子の還元型 F_d が追加で結合可能である。NDH によるこの電子受容により、 A_0 、 A_1 、 F_X 、および F_A/F_B は酸化状態に維持され、活性酸素種 (ROS) の生成が抑制される。(b) 低温感受性キュウリでは、PSI-NDH 超複合体が低温ストレスにより不安定化し、 F_d の電子受容体として機能できなくなる。その結果、PSI は過還元状態となり ROS が生成され PSI 光阻害が引き起こされる。この図では、1 つの NDH 複合体に対して PSI ユニット 2 つの化学量論比を例として示している。より小さいまたはより大きなアセンブリーが生体内に存在する可能性があり、独立した PSI も PSI 光阻害の標的となる。

2-2-2. 本研究から見てきた PSI-NDH 複合体の新規機能

被子植物において、NDH 複合体は少なくとも 29 種類のサブユニットから構成され、5 つのサブコンプレックスに分類される (Ifuku et al., 2011): すなわち、SubM (NdhA–NdhG)、SubA (NdhH–NdhO)、SubE (NdhS–NdhV)、SubB (PnsB1–PnsB5)、および被子植物に特有のルーメンサブコンプレックス SubL (PnsL1–PnsL5) である。PSI-NDH 超複合体は、1 つの NDH を 2 つの PSI 単量体が挟み込むサンドウィッチ型構造を基本とし (Kouřil et al., 2014; Yadav et al., 2017; Shen et al., 2022)、その形成には LHCA タンパク質、特に LHCA5 および LHCA6 が必要である (Otani et al., 2017; Kato et al., 2018; Otani et al., 2018; Opatíková and Kouřil, 2024; Introini et al., 2025)。近年、クライオ電子顕微鏡の発達により、NDH の構造に関する理解が大きく進んだ。PSI から解離した還元型 Fd は SubE に結合し、NDH 複合体内部に埋め込まれた 3 つの Fe–S クラスターを介して電子を伝達し、最終的に PQ 分子を還元する (Strand et al., 2017; Schuller et al., 2019; Pan et al., 2020; Richardson et al., 2021; Introini et al., 2025)。Fd と NDH の相互作用は、Fd と PSI との相互作用と同程度に強固であり、この相互作用と PSI と NDH 間の空間的近さにより、Fd は PSI-NDH 超複体内で PSI から NDH へ効率的に電子を伝達できると考えられる (Su et al., 2022)。また、pH による NDH の構造変化 (Pan et al., 2020) や、H₂O₂、熱、チオレドキシンによる NDH の活性化 (Casano et al., 2001; Lascano et al., 2003; Nikkanen et al., 2018; Zhang et al., 2023) は、NDH の生理的役割の重要性を示唆した。しかし、C₃植物では NDH 欠損変異体は野生型と同様の表現型を示し、NDH の生理的役割は未解明であった (Yamori et al., 2011; Urzinger et al., 2025)。

本研究では、NDH の生理的役割を新たに二つ明らかにした。第一に、CO₂制限条件下において PSI-NDH 複合体は電子シンクとして機能し、PSI の過還元を防ぐ役割を果たす。これは、CBB サイクルが制限された条件で NDH 欠損 *A. thaliana* 変異体が顕著な PSI 過還元を示したことから裏付けられた (図 2-10)。第二に、低温ストレス下で NDH が PSI 受容側の過還元を緩和し、PSI 光阻害を抑制する役割を果たす。これら二つの NDH の生理的機能は、いずれも CBB サイクルが抑制された状況で顕在化した。こうした条件下で NDH は Fd から電子を受け取り、NDH 複合体内部の 3 つの Fe–S クラスターを介してプラストキノン (PQ) を還元することで、PSI 下流の還元力再分配に寄与すると考えられる。さらに、NDH によって生成される還元型 PQ の増加は Δ pH に依存せずに Cyt *b₆f* 複合体での電子伝達を抑制し、P700 の酸化を促進する。この機構は、Reduction-Induced Suppression of Electron flow (RISE) の概念と一致する (Shaku et al., 2016)。

低温感受性品種は NDH 活性が低く、ストレス条件下で ROS の生成がより顕著であった (図 2-7)。これは、NDH 欠損のタバコやシアノバクテリア変異体でストレス下において ROS 生成が増加する報告と一致する (Zhang et al., 2023; Zheng et al., 2025)。低温ストレスより、PSI-LHCI-NDH スーパーコンプレックスが不安定化し、NDH 活性が完全に失われたことから、ストレス条件下で生成された ROS が PSI-LHCA-NDH 超複合体を攻撃し、最終的にその不安定化を引き起こしたと考えられる。これは、PSI-LHCA と NDH の相互作用がそれほ

ど強固でないこと (Su et al., 2022; Opatíková and Kouřil, 2024)、および PSI 光阻害が LHCA 損傷と関連していること (Alboresi et al., 2009; Takagi et al., 2022) と一致する。また、低温による PSI 光阻害後には遠赤光 (FR) による P700 酸化が起こらないことが知られている (Havaux and Davaud, 1994; Sonoike, 1999)。FR 光吸収に必要な LHCA 内の低エネルギークロロフィルの損傷を考慮すると、低温ストレス下で LHCA に損傷が生じていることが示唆された (Kono et al., 2017)。特に Lhca5 および Lhca6 の低温ストレス下での安定性については、今後の研究で明らかにする必要がある。加えて、NDH 内の Fe-S クラスターは ROS に対して高い反応性を示し (Petroněk et al., 2021)、光酸化ストレス下での NDH の不安定化を誘発する可能性がある。

2-2-3. PSI-NDH 複合体の機能や重要性が植物種や生育環境によって異なる可能性について

環境ストレス耐性における NDH の役割は、これまで見過ごされてきた部分が多い。というのも、NDH 欠損による表現型は、モデル植物であるシロイヌナズナでは主に変動光条件下でしか顕在化せず、通常条件では目立った影響が現れないためである。こうした見過ごしは、NDH の重要性が植物種で異なることに起因している可能性がある。シロイヌナズナでは、低温ストレス下でまず PSII のダウンレギュレーションが迅速に起こり、PSI 酸化が進行する (Takeuchi et al., 2025)。その結果、Fd は NDH を介した電子散逸を必要とするほどの還元状態には達しない。一方、キュウリでは、低温ストレス下でチラコイド膜の脱分極が生じるため、PSII が即座に不活化されず、PSI のドナー側の制限 (photosynthetic control) が不十分となる (Peeler and Naylor, 1988; Terashima et al., 1989; Terashima et al., 1991a,b)。その結果、キュウリでは Fv/Fm の低下が Pm の低下よりも遅れて生じる (Sonoike, 2011; Takeuchi et al., 2025)。したがって、PSI 受容体側の過還元を緩和する機構、すなわち NDH 活性が PSI 過還元防止のために不可欠となる。

PSI-NDH 超複合体内の PSI と NDH の化学量論は、依然として議論中である。一般的には、1 ユニットの NDH 複合体に対して 2 ユニットの PSI (PSI:NDH = 2:1)、または PSI:NDH = 1:1 が報告されている (Shikanai 2016; Su et al., 2022; Shikanai et al., 2025)。ただし、PSI 6 ユニットに対して NDH 1 ユニット (PSI:NDH = 6:1) が観察された例もある (Yadav et al., 2017)。PSI-NDH 超複合体の量比に関する定量的評価は確立されておらず、特にキュウリなどの非モデル植物において NDH 複合体付近にどの程度の PSI が集合するかは不明である。植物種や環境条件に応じて PSI-NDH スーパーコンプレックスの量や組成が変化するかを明らかにすることは、NDH の役割を明らかにするためにも、今後の重要な課題である。

総合すると、低温耐性キュウリでは、NDH は電子シンクとして効果的に機能し、P700 および Fd を酸化状態に維持することで、ROS 生成を抑制し PSI 光阻害を軽減した。一方、低温感受性キュウリでは、NDH 活性が不十分であったため、PSI 受容体側の Fd までの過還元が進行し、低温ストレス下で PSI 光阻害が生じ、生育阻害に繋がった。本結果は、PSI 光阻

害の発生機構を明らかにしたのみならず、これまで C₃ 植物において生理学的な機能が明らかでなかった NDH の役割を明らかにした。

2-2-4. キュウリ低温耐性品種と低温感受性品種の NDH 活性の差について

本章により、キュウリの低温ストレス耐性の品種間差の要因の一つが NDH 活性の違いであることが明らかとなった。低温耐性品種では、通常条件でも NDH 活性が高く、これが低温初期の ROS 発生抑制に重要であったと考えられる。今後、NDH 活性の違いを生む遺伝的背景を明らかにする必要がある。NDH 複合体サブユニット及び LHCI のアミノ酸配列を HG 種と HM 種で比較したところ、HG 種と HM 種で配列に違いがあったのは Subcomplex E を構成するサブユニットの一つである NdhT であった (データは示していない)。HM 種で A161 のコドン GCG が、HG 種で GUG となるヘテロでの一塩基置換が認められた。なお、HG、HM 種は F1 品種である。GUG は Val のコドンであり、Ala から Val へのアミノ酸置換が生じていた。キュウリの NdhT のアミノ酸配列を Alphafold2 を用いて構造予測すると、この残基はヘリックス内に存在することが推測されたが、NdhT の構造に一塩基置換による品種間の違いは見られなかった。アラニンとバリンはどちらも 疎水性で比較的小さな側鎖を持つアミノ酸であり、性質が比較的似ているため、タンパク質全体の構造や機能に大きな影響を与えない可能性が高い。よって、NDH 活性の違いは、Fd の電子をどの電子受容体に分配するかの配分の差である可能性がある。これは植物種によっても大きく異なると考えられ、Fd の還元力の行き先に関して、さらに網羅的な解析が必要であると考えられる。

キュウリではこれまで、低温ストレス耐性品種の育種選抜指標は確立されていなかった。本研究は、低温ストレス耐性品種の育種に有効と考えられるふたつの指標を提供した。一つ目は、低温で光エネルギーからの ROS 発生の危険性を判別できる P700 の酸化還元レベルの測定である。P700 は遠赤色光を吸収する性質を持つことから、その酸化還元レベルは分光手法により生きた植物の葉を挟むことで測定することができる。二つ目は、NDH 活性の測定である。低温で NDH 活性を測定し、NDH 活性が低下しない品種を選抜することで、低温耐性品種を確立できる可能性がある。NDH 活性は光化学系 II のクロロフィル蛍光をモニターする分光手法により簡便に測定可能である。キュウリのみならず、作物の低温ストレス耐性を測定する指標として NDH 活性が重要であるか、今後の検証が必要である。

2-3. 実験材料・方法

2-3-1. 植物材料、生育条件、低温ストレス条件

キュウリ (*Cucumis sativus* L. ‘High Green 21’ [‘HG’] および ‘Homi 1-gou’ [‘HM’]) の種子は、埼玉原種育成会より購入した。植物は土を入れたプラスチックポットで、光周期 16 時間明期 ($200\text{--}250\text{ }\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) / 暗期 8 時間、温度 27 °C の植物育成チャンバーで栽培した。全ての解析には、発芽後 2–3 週間で十分に展開した葉を用いた。低温ストレスは 4 °C の低温室にて、 $180\text{--}250\text{ }\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ の光照射下で与えた。光合成パラメータは、低温ストレス処理 1 時間、3 時間、および 5 時間後に測定した。低温ストレス処理を行わない植物を control として使用した。

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 野生株 (Columbia-0 系統) および NDH 欠損変異体 *pns11/pp12* (Ishihara et al., 2007) は、土壌栽培下で光周期 16 時間明期 ($80\text{--}100\text{ }\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) / 暗期 8 時間、温度 22 °C の条件で栽培した。光合成測定には、発芽後 4–6 週間のロゼット葉を用いた。

2-3-2. クロロフィル蛍光、P700 シグナル、Fe-S クラスターシグナル、CO₂ 同化解析、NDH 活性測定

クロロフィル蛍光、P700 シグナル、Fe-S クラスターシグナル、CO₂ 同化解析は第一章の 1-3-2 項の記載の方法と同様に行った。低 CO₂ 環境での光合成測定は、Dual-PAM 100 を用い、葉に通気する大気をソーダライムに通すことで CO₂ フリーな条件で測定した。NDH 活性は、AL 照射後のクロロフィル蛍光の一過的上昇 (post-illumination fluorescence rise: PIFR) により評価した。測定には MINI-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) を使用した。葉は AL 照射前に少なくとも 20 分間暗条件にした後、 $60\text{ }\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ の AL を 4–5 分間照射し、AL 照射終了直後の蛍光の一過的上昇をモニターした。

2-3-3. Electrochromic shift (ECS) 測定

ECS (Electrochromic Shift) は、P515/535 モジュールを装備した Dual-PAM 100 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) を用いて測定した。2–3 週間生育したキュウリを、1 時間または 3 時間の低温ストレスに曝した。低温ストレス後、葉は 4 °C で 20 分間暗条件に置き (control 植物は 23 °C)、その後、室温下での P515/535 の吸収変化から *pmf* を測定した。ECS は、サンプルを $200\text{ }\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ の AL で 1 分間照射し、AL 後の暗条件でのシグナル緩和時の ECS_t を測定することで記録した。ECS_t は、control 植物で観察された 515 nm での吸光度変化の最大値で正規化した。ただし、最大値は PSI および PSII の光化学反応が損傷すると低下する可能性があることに留意する必要がある。

2-3-4. Clear-native PAGE (CN-PAGE), Blue-Native PAGE (BN-PAGE), SDS-PAGE, immunoblot 解析

BN-PAGE は、Järvi et al., 2011 に従って実施した。チラコイド膜を β -DM で氷上で 1 分間可溶化した後、不溶性成分を $21,500 \times g$ で 2 分間遠心分離して除去した。チラコイド膜試料は、4–13% 勾配の Native PAGE ゲルにロードした。電気泳動は 4°C 、40 V で実施した。2 次元 BN/SDS-PAGE 解析では、BN-PAGE ゲルのレーンを切り取り、50 mM ジチオスレイトールを含む 1% SDS 溶解バッファーに 30 分間浸した。この変性タンパク質を含む各レーンを、厚さ 1.0 mm の 12% ワイドレンジゲル上にアプライし、50 mA で電気泳動した。その後、免疫染色を行った。BN-PAGE 解析には、5 μg のクロロフィルに相当するタンパク質をロードした。免疫染色では、サンプルを 12% または 15% ワイドレンジゲルで分離し、0.22 μm または 0.45 μm の PVDF 膜に転写した。PVDF 膜は 5% (w/v) スキムミルクでブロッキングした後、目的タンパク質に対する特異抗体でインキュベートした。検出は Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて行った。Anti-NdhH、PnsL1、NdhT、PsaA、PsaB、Atp β (CF1- β)、Atp γ (CF1- γ) の特異抗体は Agrisera 社より購入した。

2-3-5. 単離チラコイドの電子伝達速度の測定

電子伝達速度は、単離したチラコイドを用い、 $3000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、温度 25°C において Clark 型酸素電極で測定した。反応液には、0.33 M ソルビトール、15 mM NaCl、7.5 mM MgCl_2 、および 40 mM HEPES-KOH (pH 7.5) を含み、 H_2O からメチルビオロゲンへの全電子伝達を評価するために、0.2 mM メチルビオロゲンを添加した。さらに、チラコイド膜をアンカップルする場合、0.5 μM ナイジェリシンを反応液に添加した。

総括

低温ストレスは、中緯度から高緯度地域における主要な環境ストレスの一つであり、作物生産に深刻な影響を及ぼす。イネ、トウモロコシ、ダイズなどの熱帯起源作物や、キュウリ、トマトなどの温帯起源作物は低温に弱い「低温感受性植物」に分類され、低温による収量低下が顕著である。低温条件下では、光合成の Calvin-Benson-Bassham (CBB) 回路の活性が低下し、光エネルギーにより駆動される電子伝達反応とのバランスが崩れる。その結果、過剰な電子流によって活性酸素種 (ROS) が生成し、光化学系 II (PSII) や光化学系 I (PSI) の光阻害を誘発する。特にキュウリなどの一部の低温感受性植物種では、光阻害が主に PSI で進行し (PSI 光阻害)、一方でシロイヌナズナなどの低温耐性植物では PSII 光阻害が主に生じる。PSI 構成タンパク質のターンオーバーは PSII に比べて著しく遅いため、PSI 光阻害は PSII 光阻害に比べて植物の生育により深刻な影響を及ぼす。すなわち、キュウリでは PSI 光阻害が主要な低温障害の原因である。そこで本研究では、低温下で生じる PSI 光阻害の発生および抑制機構を明らかにし、植物の低温ストレス耐性を支える分子基盤を解明することを目的とした。

第 1 章では、低温耐性植物であるシロイヌナズナと低温感受性植物であるキュウリを用い、低温ストレス下における PSII および PSI 光阻害の進行を解析した。その結果、シロイヌナズナでは PSII 光阻害が優先的に生じ、キュウリでは PSI 光阻害が優先的に進行した。また、PSII 光阻害の程度は、PSI 光阻害の起こりやすさと非常に強い負の相関を示した。すなわち、PSII 光阻害が顕著なほど、PSI 光阻害が起きにくく、生育に影響が大きい PSI 光阻害による低温障害が緩和されていた。これらの結果は、PSII 光阻害が PSI 光阻害を防ぐ戦略的機構として機能していることを示しており、低温耐性植物に特徴的な保護戦略であると結論づけた。

第 2 章では、キュウリの品種間差を利用して、低温下で PSI 光阻害が進行する要因を解析した。キュウリには比較的低温に強い品種と、著しく感受性の高い品種が存在する。両品種ともに、PSI への電子流入を抑制する photosynthetic control 機構が十分に働かず、第 1 章で示した PSII 光阻害による PSI の保護は観察されなかった。一方で、PSI の下流で電子を消去する「葉緑体 NADH dehydrogenase-like complex (NDH)」の活性に顕著な品種間差が認められた。PSI 光阻害が起こりにくいキュウリ品種では、NDH 活性が高く、PSI-NDH 複合体が PSI の余剰電子の効率的な消去に関与していると示唆された。これに対し、PSI 光阻害が起こりやすい品種では、PSI-NDH 複合体が低温で分解され、低温下で NDH がはたらかないことで PSI 光阻害が顕著に生じた。さらに、シロイヌナズナの NDH 欠損変異体を用いて NDH による PSI 光阻害の抑制能力を検証したところ、NDH が低 CO₂ 条件下で PSI 光阻害を抑制することが実証された。これらの結果から、NDH は低温ストレス時に余剰電子を適切に受け取ることで ROS 生成を抑え、葉緑体を酸化的障害から防御していることが明らかになった。これまで、C₃ 植物における NDH の生理学的役割は未解明な部分が多く残されていたが、本

研究によって、NDH が低温ストレス時の PSI 光阻害の抑制に貢献する、という新規役割が明らかとなった。

第 1 章と第 2 章をまとめると、PSI 光阻害発生には以下の要素が統合的に関与していることが明らかになった。まず、PSI のドナー側 (PSII→PQ→Cyt *b₆f*→PC→P700)からの電子供給を抑制する機構 (PSII 光阻害、 Δ pH による Cyt *b₆f*制御、NPQ) のはたらきの低下である。キュウリでは、低温ストレス下で PSII 光阻害や Δ pH の適切な形成が起こらないため、PSI への電子流を抑制できず、PSI 過還元が生じやすい状況であった。そして、こうした状況下において PSI の電子伝達系 (P700 → A₀ → A₁ → F_X → F_A/F_B → Fd) において、Fd 下流の電子受容能が低下すると、Fe-S や A₁、³P700 から ROS が発生し、コアや Fe-S クラスター損傷とタンパク質分解へとつながるということである。キュウリの場合は、PSI 下流の電子の受け手として NDH が重要な役割を果たし、低温耐性キュウリでは NDH の活性が低温でも維持されたが、低温感受性キュウリでは、低温で NDH が不安定化した。NDH の生理学的役割は未解明な部分が多く残されていたが、本研究によって、NDH は低温ストレス時の PSI 光阻害の抑制に貢献する、という新たな役割が明らかとなった。PSI 下流の電子の受け手を担う代替的電子伝達経路 (alternative electron flow, AEF) に他にも、光呼吸、窒素同化、硫黄同化、ミトコンドリア代謝などが存在し、植物種によってはこうした経路が複合的に PSI 下流の還元過剰を防いでいると考えられる。

本研究は今後、以下の課題を明らかにする必要がある。まず、PSI-NDH 超複合体の植物種間を構造・量的に定量的に把握する研究である。特に非モデル植物 (夏作物、耐冷性作物) における超複合体の構成比・安定性の解明は、NDH の重要性をさらに明らかにする上で必要である。また、低温ストレス下で生じる ROS の種類 (O₂^{•-}、¹O₂、•OH 等) と損傷部位 (Fe-S クラスター、PsaA/B、LHCA サブユニット等) を、ナノ秒分解能や質量分析法を含めて明らかにする必要がある。また、将来的には、耐冷作物の育種改良に向けて、NDH 活性・PSI-NDH 超複合体の安定化を指標とした評価系設計と遺伝子マーカー開発を検討する必要がある。フィールド条件 (変動光・低温) における NDH の保護機構の有効性を検証し、温暖化・冷害対策の観点から応用展開を進める必要があるだろう。以上、本研究は環境ストレス条件において、PSII 活性制御および NDH 複合体を介した PSI 上流、下流の双方向の制御機構の重要性を明らかにし、低温ストレス下における植物の適応機構、特に葉緑体光化学系の保護機構の理解を深めた。

引用文献

- Alboresi A, Ballottari M, Hienerwadel R, Giacometti GM, Morosinotto T** (2009) Antenna complexes protect photosystem I from photoinhibition. *BMC Plant Biology* **9**: 1–14
- Allen DJ, Ort DR** (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science* **6**: 36–42
- Anderson JM** (1992) Cytochrome *b₆f* complex: dynamic molecular organization, function and acclimation. *Photosynthesis Research* **34**: 341–357
- Asada K** (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *Photoinhibition Topics in Photosynthesis* **9**: 227–287
- Asada K** (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology* **50**: 601–639
- Asada K** (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* **141**: 391–396
- Baker NR, Harbinson J, Kramer DM** (2007) Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves. *Plant, Cell & Environment* **30**: 1107–1125
- Barber J, Andersson B** (1992) Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences* **17**: 61–66
- Basso L, Sakoda K, Kobayashi R, Yamori W, Shikanai T** (2022) Flavodiiron proteins enhance the rate of CO₂ assimilation in Arabidopsis under fluctuating light intensity. *Plant Physiology* **189**: 375–387
- Berry J, Bjorkman O** (1980) Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **31**: 491–543
- Bi H, Li F, Wang H, Ai X** (2019) Overexpression of transketolase gene promotes chilling tolerance by increasing the activities of photosynthetic enzymes, alleviating oxidative damage and stabilizing cell structure in *Cucumis sativus* L. *Physiologia Plantarum* **167**: 502–515
- Casano LM, Martin M, Sabater B** (2001) Hydrogen peroxide mediates the induction of chloroplastic Ndh complex under photooxidative stress in barley. *Plant Physiology* **125**: 1450–1458
- Cazzaniga S, Bressan M, Carbonera D, Agostini A, Dall'Osto L** (2016) Differential roles of carotenes and xanthophylls in photosystem I photoprotection. *Biochemistry* **55**: 3636–3649
- Chen S, Zheng Q, Qi Z, Ding J, Song X, Xia X** (2024) Stress-induced delay of the IP rise of the fast chlorophyll a fluorescence transient in tomato. *Scientia Horticulturae* **326**: 112741
- Cherepanov DA, Milanovsky GE, Petrova AA, Tikhonov AN, Semenov AY** (2017) Electron transfer through the acceptor side of photosystem I: Interaction with exogenous acceptors and molecular oxygen. *Biochemistry (Moscow)* **82**: 1249–1268
- Degen GE, Johnson MP** (2024) Photosynthetic control at the cytochrome *b₆f* complex. *The Plant*

Cell **36**: 4065–4079

- Ding Y, Shi Y, Yang S** (2019) Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants. *New Phytologist* **222**: 1690–1704
- Dorion S, Ouellet JC, Rivoal J** (2021) Glutathione metabolism in plants under stress: beyond reactive oxygen species detoxification. *Metabolites* **11**: 641
- Erling Tjus S, Lindberg Möller B, Vibe Scheller H** (1998) Photosystem I is an early target of photoinhibition in barley illuminated at chilling temperatures. *Plant Physiology* **116**: 755–764
- Foyer C, Furbank R, Harbinson J, Horton P** (1990) The mechanisms contributing to photosynthetic control of electron transport by carbon assimilation in leaves. *Photosynthesis Research* **25**: 83–100
- Furutani R, Makino A, Suzuki Y, Wada S, Shimakawa G, Miyake C** (2020) Intrinsic fluctuations in transpiration induce photorespiration to oxidize P700 in photosystem I. *Plants* **9**: 1761
- Furutani R, Wada S, Ifuku K, Maekawa S, Miyake C** (2023) Higher reduced state of Fe/S-signals, with the suppressed oxidation of P700, causes PSI inactivation in *Arabidopsis thaliana*. *Antioxidants* **12**: 21
- Garstka M, Drożak A, Rosiak M, Venema JH, Kierdaszuk B, Simeonova E, van Hasselt PR, Dobrucki J, Mostowska A** (2005) Light-dependent reversal of dark-chilling induced changes in chloroplast structure and arrangement of chlorophyll–protein complexes in bean thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1710**: 13–23
- Garstka M, Venema JH, Rumak I, Gieczewska K, Rosiak M, Koziol-Lipinska J, Kierdaszuk B, Vredenberg WJ, Mostowska A** (2007) Contrasting effect of dark-chilling on chloroplast structure and arrangement of chlorophyll–protein complexes in pea and tomato: plants with a different susceptibility to non-freezing temperature. *Planta* **226**: 1165–1181
- Gollan PJ, Grebe S, Roling L, Grimm B, Spetea C, Aro E** (2023) Photosynthetic and transcriptome responses to fluctuating light in *Arabidopsis* thylakoid ion transport triple mutant. *Plant Direct* **7**: e534
- Hamada A, Tanaka Y, Ishikawa T, Maruta T** (2023) Chloroplast dehydroascorbate reductase and glutathione cooperatively determine the capacity for ascorbate accumulation under photooxidative stress conditions. *The Plant Journal* **114**: 68–82
- Hanawa H, Ishizaki K, Nohira K, Takagi D, Shimakawa G, Sejima T, Shaku K, Makino A, Miyake C** (2017) Land plants drive photorespiration as higher electron-sink: Comparative study of post-illumination transient O₂-uptake rates from liverworts to angiosperms through ferns and gymnosperms. *Physiologia Plantarum* **161**: 138–149
- Hani U, Naranjo B, Shimakawa G, Espinasse C, Vanacker H, Sétif P, Rintamäki E, Issakidis-Bourguet E, Krieger-Liszkay A** (2025) A complex and dynamic redox network regulates oxygen reduction at photosystem I in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **197**, kiae501

- Havaux M, Davaud A** (1994) Photoinhibition of photosynthesis in chilled potato leaves is not correlated with a loss of photosystem-II activity: preferential inactivation of photosystem I. *Photosynthesis Research* **40**: 75–92
- Heber U, Walker D** (1992) Concerning a dual function of coupled cyclic electron transport in leaves. *Plant Physiology* **100**: 1621–1626
- Heidarvand L, Amiri RM** (2010) What happens in plant molecular responses to cold stress? *Acta Physiologiae Plantarum* **32**: 419–431
- Helman Y, Barkan E, Eisenstadt D, Luz B, Kaplan A** (2005) Fractionation of the three stable oxygen isotopes by oxygen-producing and oxygen-consuming reactions in photosynthetic organisms. *Plant Physiology* **138**: 2292–2298
- Helman Y, Tchernov D, Reinhold L, Shibata M, Ogawa T, Schwarz R, Ohad I, Kaplan A** (2003) Genes encoding A-type flavoproteins are essential for photoreduction of O₂ in cyanobacteria. *Current Biology* **13**: 230–235
- Hope AB** (2000) Electron transfers amongst cytochrome f, plastocyanin and photosystem I: kinetics and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1456**: 5–26
- Huang W, Yang Y-J, Zhang S-B** (2019) The role of water-water cycle in regulating the redox state of photosystem I under fluctuating light. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1860**: 383–390
- Ifuku K, Endo T, Shikanai T, Aro E-M** (2011) Structure of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex: nomenclature for nuclear-encoded subunits. *Plant and Cell Physiology* **52**: 1560–1568
- Inoue K, Fujii T, Yokoyama E, Matsuura K, Hiyama T, Sakurai H** (1989) The photoinhibition site of photosystem I in isolated chloroplasts under extremely reducing conditions. *Plant and Cell Physiology* **30**: 65–71
- Introini B, Hahn A, Kühlbrandt W** (2025) Cryo-EM structure of the NDH-PSI-LHCI supercomplex from *Spinacia oleracea*. *Nature Structural & Molecular Biology* **32**: 968–978
- Ishihara S, Takabayashi A, Ido K, Endo T, Ifuku K, Sato F** (2007) Distinct functions for the two PsbP-like proteins PPL1 and PPL2 in the chloroplast thylakoid lumen of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **145**: 668–679
- Järvi S, Suorsa M, Paakkari V, Aro E-M** (2011) Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super- and mega-complexes. *Biochemical Journal* **439**: 207–214
- Kanazawa A, Ostendorf E, Kohzuma K, Hoh D, Strand DD, Sato-Cruz M, Savage L, Cruz JA, Fisher N, Froehlich JE** (2017) Chloroplast ATP synthase modulation of the thylakoid proton motive force: implications for photosystem I and photosystem II photoprotection. *Frontiers in Plant Science* **8**: 719

- Kato Y, Sugimoto K, Shikanai T** (2018) NDH-PSI supercomplex assembly precedes full assembly of the NDH complex in chloroplast. *Plant Physiology* **176**: 1728–1738
- Kılıç M, Kämpylä V, Gollan PJ, Aro E-M, Rintamäki E** (2023) PSI photoinhibition and changing CO₂ levels initiate retrograde signals to modify nuclear gene expression. *Antioxidants* **12**: 1902
- Klughammer C, Schreiber U** (2008) Saturation pulse method for assessment of energy conversion in PS I. PAM Application Notes (2008) 1: 11–14
- Klughammer C, Schreiber U** (1994) An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700⁺-absorbance changes at 830 nm. *Planta* **192**: 261–268
- Klughammer C, Schreiber U** (2016) Deconvolution of ferredoxin, plastocyanin, and P700 transmittance changes in intact leaves with a new type of kinetic LED array spectrophotometer. *Photosynthesis Research* **128**: 195–214
- Kohzuma K, Cruz JA, Akashi K, Hoshiyasu S, Munekage YN, Yokota A, Kramer DM** (2009) The long-term responses of the photosynthetic proton circuit to drought. *Plant, Cell & Environment* **32**: 209–219
- Kono M, Noguchi K, Terashima I** (2014) Roles of the cyclic electron flow around PSI (CEF-PSI) and O₂-dependent alternative pathways in regulation of the photosynthetic electron flow in short-term fluctuating light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **55**: 990–1004
- Kono M, Oguchi R, Terashima I** (2022) Photoinhibition of PSI and PSII in nature and in the laboratory: Ecological approaches. *Progress in Botany*, **84**: 241–292
- Kono M, Yamori W, Suzuki Y, Terashima I** (2017) Photoprotection of PSI by far-red light against the fluctuating light-induced photoinhibition in *Arabidopsis thaliana* and field-grown plants. *Plant and Cell Physiology* **58**: 35–45
- Kou, J, Takahashi S, D.-Y. Fan, M. R. Badger, and W. S. Chow** (2015) Partially dissecting the steady-state electron fluxes in photosystem I in wild-type and *pgr5* and *ndh* mutants of *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **6**: 758
- Kouřil R, Strouhal O, Nosek L, Lenobel R, Chamrád I, Boekema EJ, Šebela M, Ilík P** (2014) Structural characterization of a plant photosystem I and NAD(P)H dehydrogenase supercomplex. *The Plant Journal* **77**: 568–576
- Kozuleva M, Petrova A, Milrad Y, Semenov A, Ivanov B, Redding KE, Yacoby I** (2021) Phylloquinone is the principal Mehler reaction site within photosystem I in high light. *Plant Physiology* **186**: 1848–1858
- Kozuleva MA, Ivanov BN** (2010) Evaluation of the participation of ferredoxin in oxygen reduction in the photosynthetic electron transport chain of isolated pea thylakoids. *Photosynthesis Research* **105**: 51–61

- Kozuleva MA, Petrova AA, Mamedov MD, Semenov AY, Ivanov BN** (2014) O₂ reduction by photosystem I involves phyloquinone under steady-state illumination. *FEBS Letters* **588**: 4364–4368
- Lascano HR, Casano LM, Martin M, Sabater B** (2003) The activity of the chloroplastic Ndh complex is regulated by phosphorylation of the NDH-F subunit. *Plant Physiology* **132**: 256–262
- Li J, Zhang H, Yue D, Chen S, Yin Y, Zheng C, Chen Y** (2024) Endogenous serotonin induced by cold acclimation increases cold tolerance by reshaping the MEL/ROS/RNS redox network in *Kandelia obovata*. *Journal of Forestry Research* **35**: 1–13
- Li L, Aro E-M, Millar AH** (2018) Mechanisms of photodamage and protein turnover in photoinhibition. *Trends in Plant Science* **23**: 667–676
- Lima-Melo Y, Gollan PJ, Tikkanen M, Silveira JA, Aro E** (2019) Consequences of photosystem-I damage and repair on photosynthesis and carbon use in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **97**: 1061–1072
- Maekawa S, Ohnishi M, Wada S, Ifuku K, Miyake C** (2024) Enhanced reduction of ferredoxin in PGR5-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* stimulated ferredoxin-dependent cyclic electron flow around photosystem I. *International Journal of Molecular Sciences* **25**: 2677
- Mehler AH** (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts: I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **33**: 65–77
- Melis A** (1999) Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*? *Trends in Plant Science* **4**: 130–135
- Mittler R** (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* **11**: 15–19
- Miyake C** (2020) Molecular mechanism of oxidation of P700 and suppression of ROS production in photosystem I in response to electron-sink limitations in C₃ plants. *Antioxidants* **9**: 230
- Miyake C** (2010) 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
- Miyata K, Noguchi K, Terashima I** (2012) Cost and benefit of the repair of photodamaged photosystem II in spinach leaves: roles of acclimation to growth light. *Photosynthesis Research* **113**: 165–180
- Mubarakshina M, Khorobrykh S, Ivanov B** (2006) Oxygen reduction in chloroplast thylakoids results in production of hydrogen peroxide inside the membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1757**: 1496–1503
- Murchie EH, Niyogi KK** (2011) Manipulation of photoprotection to improve plant photosynthesis. *Plant physiology* **155**: 86–92

- Nakano R, Ishida H, Kobayashi M, Makino A, Mae T** (2010) Biochemical changes associated with in vivo RbcL fragmentation by reactive oxygen species under chilling-light conditions. *Plant Biology* **12**: 35–45
- Nakano R, Ishida H, Makino A, Mae T** (2006) In vivo fragmentation of the large subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species in an intact leaf of cucumber under chilling-light conditions. *Plant and Cell Physiology* **47**: 270–276
- Nikkanen L, Toivola J, Trotta A, Diaz MG, Tikkanen M, Aro E, Rintamäki E** (2018) Regulation of cyclic electron flow by chloroplast NADPH-dependent thioredoxin system. *Plant Direct* **2**: 1–24
- Nishio JN, Whitmarsh J** (1993) Dissipation of the proton electrochemical potential in intact chloroplasts (II. The pH gradient monitored by cytochrome *f* reduction kinetics). *Plant Physiology* **101**: 89–96
- Ohnishi M, Maekawa S, Wada S, Ifuku K, Miyake C** (2023) Evaluating the oxidation rate of reduced ferredoxin in *Arabidopsis thaliana* independent of photosynthetic linear electron flow: Plausible activity of ferredoxin-dependent cyclic electron flow around photosystem I. *International Journal of Molecular Sciences* **24**: 12145
- Opatíková M, Kouřil R** (2024) Unique structural attributes of the PSI-NDH supercomplex in *Physcomitrium patens*. *The Plant Journal* **120**: 2226–2237
- Otani T, Kato Y, Shikanai T** (2018) Specific substitutions of light-harvesting complex I proteins associated with photosystem I are required for supercomplex formation with chloroplast NADH dehydrogenase-like complex. *The Plant Journal* **94**: 122–130
- Otani T, Yamamoto H, Shikanai T** (2017) Stromal loop of Lhca6 is responsible for the linker function required for the NDH–PSI supercomplex formation. *Plant and Cell Physiology* **58**: 851–861
- Pan X, Cao D, Xie F, Xu F, Su X, Mi H, Zhang X, Li M** (2020) Structural basis for electron transport mechanism of complex I-like photosynthetic NAD(P)H dehydrogenase. *Nature Communications* **11**: 610
- Peeler TC, Naylor AW** (1988) A comparison of the effects of chilling on thylakoid electron transfer in pea (*Pisum sativum* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Physiology* **86**: 147–151
- Petronek MS, Spitz DR, Allen BG** (2021) Iron–sulfur cluster biogenesis as a critical target in cancer. *Antioxidants* **10**: 1458
- Powles SB** (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annual Review of Plant Physiology* **35**: 15–44
- Richardson KH, Wright JJ, Šimėnas M, Thiemann J, Esteves AM, McGuire G, Myers WK, Morton JJ, Hippler M, Nowaczyk MM** (2021) Functional basis of electron transport within photosynthetic complex I. *Nature Communications* **12**: 5387

- Rutherford AW, Osyczka A, Rappaport F** (2012) Back-reactions, short-circuits, leaks and other energy wasteful reactions in biological electron transfer: redox tuning to survive life in O₂. *FEBS Letters* **586**: 603–616
- Sadiq M, Akram NA, Ashraf M, Al-Qurainy F, Ahmad P** (2019) Alpha-tocopherol-induced regulation of growth and metabolism in plants under non-stress and stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation* **38**: 1325–1340
- Sage RF, Kubien DS** (2007) The temperature response of C₃ and C₄ photosynthesis. *Plant, Cell & Environment* **30**: 1086–1106
- Schöttler MA, Tóth SZ** (2014) Photosynthetic complex stoichiometry dynamics in higher plants: environmental acclimation and photosynthetic flux control. *Frontiers in Plant Science* **5**: 188
- Schöttler MA, Tóth SZ, Boulouis A, Kahlau S** (2015) Photosynthetic complex stoichiometry dynamics in higher plants: biogenesis, function, and turnover of ATP synthase and the cytochrome *b₆f* complex. *Journal of Experimental Botany* **66**: 2373–2400
- Schreiber U** (2017) Redox changes of ferredoxin, P700, and plastocyanin measured simultaneously in intact leaves. *Photosynthesis Research* **134**: 343–360
- Schuller JM, Birrell JA, Tanaka H, Konuma T, Wulfhorst H, Cox N, Schuller SK, Thiemann J, Lubitz W, Setif P** (2019) Structural adaptations of photosynthetic complex I enable ferredoxin-dependent electron transfer. *Science* **363**: 257–260
- Sejima T, Takagi D, Fukayama H, Makino A, Miyake C** (2014) Repetitive short-pulse light mainly inactivates photosystem I in sunflower leaves. *Plant and Cell Physiology* **55**: 1184–1193
- 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 and Cell Physiology* **57**: 1443–1453
- Shen L, Tang K, Wang W, Wang C, Wu H, Mao Z, An S, Chang S, Kuang T, Shen J-R** (2022) Architecture of the chloroplast PSI–NDH supercomplex in *Hordeum vulgare*. *Nature* **601**: 649–654
- Shen W, Nada K, Tachibana S** (1999) Effect of cold treatment on enzymic and nonenzymic antioxidant activities in leaves of chilling-tolerant and chilling-sensitive cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **68**: 967–973
- Shikanai T** (2007) Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 199–217
- Shikanai T** (2023) Molecular genetic dissection of the regulatory network of proton motive force in chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **65**: 537–550
- Shimakawa G, Miyake C** (2018) Oxidation of P700 ensures robust photosynthesis. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1617
- Shimakawa G, Müller P, Miyake C, Krieger-Liszkay A, Sétif P** (2024) Photo-oxidative damage of

- photosystem I by repetitive flashes and chilling stress in cucumber leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 149490
- Shimakawa G, Murakami A, Niwa K, Matsuda Y, Wada A, Miyake C** (2019) Comparative analysis of strategies to prepare electron sinks in aquatic photoautotrophs. *Photosynthesis Research* **139**: 401–411
- Shuvalov V, Nuijs A, Van Gorkom H, Smit H, Duysens L** (1986) Picosecond absorbance changes upon selective excitation of the primary electron donor P-700 in photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **850**: 319–323
- Siddiqui KS, Cavicchioli R** (2006) Cold-adapted enzymes. *Annual Review of Biochemistry* **75**: 403–433
- Sonoike K** (2011) Photoinhibition of photosystem I. *Physiologia Plantarum* **142**: 56–64
- Sonoike K** (1996) Photoinhibition of photosystem I: Its physiological significance in the chilling sensitivity of plants. *Plant and Cell Physiology* **37**: 239–247
- Sonoike K** (1999) The different roles of chilling temperatures in the photoinhibition of photosystem I and photosystem II. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **48**: 136–141
- Sonoike K, Terashima I** (1994) Mechanism of photosystem-I photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L. *Planta* **194**: 287–293
- Sonoike K, Terashima I, Iwaki M, Itoh S** (1995) Destruction of photosystem I iron-sulfur centers in leaves of *Cucumis sativus* L. by weak illumination at chilling temperatures. *FEBS Letters* **362**: 235–238
- Storti M, Puggioni MP, Segalla A, Morosinotto T, Alboresi A** (2020) The chloroplast NADH dehydrogenase-like complex influences the photosynthetic activity of the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany* **71**: 5538–5548
- Strand DD, Fisher N, Kramer DM** (2017) The higher plant plastid NAD(P)H dehydrogenase-like complex (NDH) is a high efficiency proton pump that increases ATP production by cyclic electron flow. *Journal of Biological Chemistry* **292**: 11850–11860
- Su X, Cao D, Pan X, Shi L, Liu Z, Dall'Osto L, Bassi R, Zhang X, Li M** (2022) Supramolecular assembly of chloroplast NADH dehydrogenase-like complex with photosystem I from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* **15**: 454–467
- Sun H, Shi Q, Liu N-Y, Zhang S-B, Huang W** (2023) Drought stress delays photosynthetic induction and accelerates photoinhibition under short-term fluctuating light in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* **196**: 152–161
- Suzuki N, Mittler R** (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* **126**: 45–51
- Suzuki Y, Nagao K, Takahashi Y, Miyake C, Makino A** (2021) Oxidation of the reaction center chlorophyll of photosystem I is induced via close cooperation of photosystems II and I with

- progress of drought stress in soybean seedlings. *Soil Science and Plant Nutrition* **67**: 662–669
- Tachibana R, Abe S, Marugami M, Yamagami A, Akema R, Ohashi T, Nishida K, Nosaki S, Miyakawa T, Tanokura M** (2024) BPG4 regulates chloroplast development and homeostasis by suppressing GLK transcription factors and involving light and brassinosteroid signaling. *Nature Communications* **15**: 370
- Takagi D, Amako K, Hashiguchi M, Fukaki H, Ishizaki K, Goh T, Fukao Y, Sano R, Kurata T, Demura T, et al** (2017a) Chloroplastic ATP synthase builds up a proton motive force preventing production of reactive oxygen species in photosystem I. *The Plant Journal* **91**: 306–324
- Takagi D, Ifuku K, Yamori W, Kono M, Ushijima T, Makino A** (2022) Light-harvesting activity is targeted by photosystem I photoinhibition in rice plants irrespective of photosystem I photoinhibitory treatments. *Authorea Preprints*. <https://doi.org/10.22541/au.166935692.25627459/v1>
- Takagi D, Ishizaki K, Hanawa H, Mabuchi T, Shimakawa G, Yamamoto H, Miyake C** (2017b) Diversity of strategies for escaping reactive oxygen species production within photosystem I among land plants: P700 oxidation system is prerequisite for alleviating photoinhibition in photosystem I. *Physiologia Plantarum* **161**: 56–74
- Takagi D, Takumi S, Hashiguchi M, Sejima T, Miyake C** (2016) Superoxide and singlet oxygen produced within the thylakoid membranes both cause photosystem I photoinhibition. *Plant Physiology* **171**: 1626–1634
- Takagi D, Tani S** (2023) Impact of growth light environment on oxygen sensitivity in rice: Pseudo-first-order response of photosystem I photoinhibition to O₂ partial pressure. *Physiologia Plantarum* **175**: e14009
- Takahashi M, Asada K** (1988) Superoxide production in aprotic interior of chloroplast thylakoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **267**: 714–722
- Takeuchi K, Che Y, Nakano T, Miyake C, Ifuku K** (2022) The ability of P700 oxidation in photosystem I reflects chilling stress tolerance in cucumber. *Journal of Plant Research* **135**: 681–692
- Takeuchi K, Ochiai K, Kobayashi M, Kuroda K, Ifuku K** (2024) Light-chilling stress causes hyper-accumulation of iron in shoot, exacerbating leaf oxidative damage in cucumber. *Plant and Cell Physiology* **65**: 1873–1887
- Terashima I, Funayama S, Sonoike K** (1994) The site of photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L. at low temperatures is photosystem I, not photosystem II. *Planta* **193**: 300–306
- Terashima I, Kashino Y, Katoh S** (1991a) Exposure of leaves of *Cucumis sativus* L. to low temperatures in the light causes uncoupling of thylakoids I. Studies with isolated thylakoids. *Plant and Cell Physiology* **32**: 1267–1274

- Terashima I, Matsuo M, Suzuki Y, Yamori W, Kono M** (2021) Photosystem I in low light-grown leaves of *Alocasia odora*, a shade-tolerant plant, is resistant to fluctuating light-induced photoinhibition. *Photosynthesis Research* **149**: 69–82
- Terashima I, Sonoike K, Kawazu T, Katoh S** (1991b) Exposure of leaves of *Cucumis sativus* L. to low temperatures in the light causes uncoupling of thylakoids II. Non-destructive measurements with intact leaves. *Plant and Cell Physiology* **32**: 1275–1283
- Tiwari A, Mamedov F, Fitzpatrick D, Gunell S, Tikkanen M, Aro E-M** (2024) Differential FeS cluster photodamage plays a critical role in regulating excess electron flow through photosystem I. *Nature Plants* **10**: 1592–1603
- Trissl H-W** (1997) Determination of the quenching efficiency of the oxidized primary donor of Photosystem I, P700⁺: Implications for the trapping mechanism. *Photosynthesis Research* **54**: 237–240
- Tsuyama M, Kobayashi Y** (2009) Reduction of the primary donor P700 of photosystem I during steady-state photosynthesis under low light in *Arabidopsis*. *Photosynthesis Research* **99**: 37–47
- Upchurch RG** (2008) Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters* **30**: 967–977
- Urzinger S, Avramova V, Frey M, Urbany C, Scheuermann D, Presterl T, Reuscher S, Ernst K, Mayer M, Marcon C** (2025) Embracing native diversity to enhance the maximum quantum efficiency of photosystem II in maize. *Plant Physiology* **197**: kiae670
- 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**: 319
- Wang P, Liu W, Han C, Wang S, Bai M, Song C** (2024) Reactive oxygen species: multidimensional regulators of plant adaptation to abiotic stress and development. *Journal of Integrative Plant Biology* **66**: 330–367
- Wilkinson S, Clephan AL, Davies WJ** (2001) Rapid low temperature-induced stomatal closure occurs in cold-tolerant *Commelina communis* leaves but not in cold-sensitive tobacco leaves, via a mechanism that involves apoplastic calcium but not abscisic acid. *Plant Physiology* **126**: 1566–1578
- Yadav KS, Semchonok DA, Nosek L, Kouřil R, Fucile G, Boekema EJ, Eichacker LA** (2017) Supercomplexes of plant photosystem I with cytochrome *b₆f*, light-harvesting complex II and NDH. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1858**: 12–20
- Yamada Y, Suzuki K, Yanagishita H, Noguchi K** (2024) Roles of mitochondrial alternative oxidase in photosynthetic electron transport in illuminated leaves of *Arabidopsis thaliana* at low temperature. *Journal of Biosciences* **49**: 1–12

- Yamori W, Sakata N, Suzuki Y, Shikanai T, Makino A** (2011) Cyclic electron flow around photosystem I via chloroplast NAD(P)H dehydrogenase (NDH) complex performs a significant physiological role during photosynthesis and plant growth at low temperature in rice. *The Plant Journal* **68**: 966–976
- Yang Q-Y, Wang X-Q, Yang Y-J, Huang W** (2024) Fluctuating light induces a significant photoinhibition of photosystem I in maize. *Plant Physiology and Biochemistry* **207**: 108426
- Yu J-Q, Zhou Y-H, Huang L-F, Allen DJ** (2002) Chill-induced inhibition of photosynthesis: genotypic variation within *Cucumis sativus*. *Plant and Cell Physiology* **43**: 1182–1188
- Zhang Y, Fan Y, Lv X, Zeng X, Zhang Q, Wang P** (2023) Deficiency in NDH-cyclic electron transport retards heat acclimation of photosynthesis in tobacco over day and night shift. *Frontiers in Plant Science* **14**: 1267191
- Zhang Y-J, Zhang X, Chen C-J, Zhou M-G, Wang H-C** (2010) Effects of fungicides JS399-19, azoxystrobin, tebuconazole, and carbendazim on the physiological and biochemical indices and grain yield of winter wheat. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **98**: 151–157
- Zheng M, Jiang Y, Ran Z, Liang S, Xiao T, Li X, Ma W** (2025) A cyanobacteria-derived intermolecular salt bridge stabilizes photosynthetic NDH-1 and prevents oxidative stress. *Communications Biology* **8**: 172
- Zhou YH, Yu JQ, Huang LF, Nogués S** (2004) The relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport and water–water cycle in chill-exposed cucumber leaves under low light and subsequent recovery. *Plant, Cell & Environment* **27**: 1503–1514

本博士論文の第 1 章に用いた図表は、以下の

Takeuchi, K., Che, Y., Nakano, T., Miyake, C., & Ifuku, K. (2022). The ability of P700 oxidation in photosystem I reflects chilling stress tolerance in cucumber. *Journal of Plant Research*, 135(5), 681-692.

の図表から一部改変して使用した。

第 1 章に用いた図表は、以下の

Takeuchi, K., Harimoto, S., Maekawa, S., Miyake, C., & Ifuku, K. (2025). PSII Photoinhibition as a Protective Strategy: Maintaining an Oxidative State of PSI by Suppressing PSII Activity Under Environmental Stress. *Physiologia Plantarum*, 177(4), e70392. <https://doi.org/10.1111/ppl.70392>.
及び

Takeuchi, K., Harimoto, S., Che, Y., Kumazawa, M., Satoh, H., Maekawa, S., Miyake, C., & Ifuku, K. (2025). The protective role of chloroplast NADH dehydrogenase-like complex (NDH) against PSI photoinhibition under chilling stress. *New Phytologist*, 248: 2262–2279, <https://doi.org/10.1111/nph.70573>

の図表から一部改変して使用した。

謝辞

はじめに、学部4年時から6年間に渡り面倒を見てくださった京都大学大学院農学研究科植物栄養学研究室 伊福健太郎教授に篤く感謝申し上げます。研究の方向性、サイエンスへの向き合い方、研究者としての生き方を含め、私の研究人生の全ての礎を築いて下さりました。学生の私の意見を尊重しつつ、適切なタイミングで研究の進め方に対して的確な助言を頂けたことで、6年間のさまざまな成果に繋がったと感じています。6年間素晴らしい研究環境を提供して下さり、植物の面白さにたくさん触れさせて頂きました。植物生理学の深い知識を学ばせていただいたのみならず、社会人としての立ち振る舞いなど、多くのことを学ばせていただきました。伊福健太郎教授のもとで研究ができたことを心より嬉しく、誇りに思います。私の研究生活、学生生活を全面的に支えて下さり、篤く感謝申し上げます。

同研究科植物栄養学研究室の小林優准教授、落合久美子助教には、植物栄養研究の魅力を存分に教えて頂き、またサイエンスへの向き合い方を多く学ばせていただきました。栄養の研究を始めるきっかけは、間違いなくお二人のご研究に興味と憧れを抱いたことによります。右も左も分からないところから、実験手法や、実験の進め方をたくさん学ばせて頂きました。また、データディスカッションも幾度となく行って頂き、研究のモチベーションとなりました。未熟な私の研究生活を支えて下さり、心より感謝申し上げます。

修士課程まで指導教員、および研究室主宰者であった同大学院生命科学研究科全能性統御機構研究室 中野雄司教授に心より感謝申し上げます。配属当初の私に研究の魅力、植物の素晴らしさをたくさん学ばせていただきました。中野教授のご指導によって、常に大きなビジョンを持って植物研究を進めることができました。卒論、修論等の節目節目のタイミングで研究へのアドバイスを下さり、研究遂行を支えて下さり、心より感謝致します。また、同分野 山上あゆみ助教には学部及び修士課程を通じて充実した研究環境と研究へのご助言、また研究手法のご支援をいただきました。心より感謝申し上げます。

神戸大学大学院農学研究科植物栄養学研究室 三宅親弘教授に心より感謝申し上げます。学部4年時から共同研究を行い、研究遂行において大変お世話になりました。また、三宅教授の研究への向き合い方には多くのことを学ばせて頂きました。研究者の魅力を存分に教えて下さり、将来の研究者像を思い描くことができました。伊福健太郎教授と三宅親弘教授には、光合成研究への向き合い方の礎を作って下さいました。伊福健太郎教授と三宅親弘教授に出会えたことは、私が研究者を志すきっかけとなったと感じています。心より感謝申し上げます。

研究室の1つ上の先輩にあたるケンブリッジ大学植物科学科 立花諒博士、北海道大学低温科学研究所 熊沢穰博士に心より感謝申し上げます。先輩として研究者としての姿、博士課程学生の在り方、研究の取り組み方を常に間近で見て、多くの刺激を頂きました。いつも気にかけて下さり、研究から私生活に至るまで、私の博士課程を支えて下さいました。お二人を尊敬し、博士後期課程を志し、無事博士論文を書くに至りました。立花諒博士、熊沢穰

博士に心より感謝申し上げます。

同大学の同じ博士課程学生として日々語り合った京都大学大学院生命科学研究科応用生物機構学研究室 松尾光次良氏、京都大学大学院生命科学研究科全能性統御機構学研究室 勝田櫻子氏に感謝申し上げます。松尾光次良氏、勝田櫻子氏と博士課程3年間、最も長く時間をともにしました。苦楽をともに過ごしてくれたこと、心より感謝申し上げます。

京都大学大学院農学研究科植物栄養学研究室の後輩、播本慎太郎氏に心より感謝申し上げます。博士過程の3年間のキュウリ研究は、常に二人三脚で進めてきました。播本氏の成果により、より多くの新規現象を捉えることができました。同じラボ内でデータを深く語り合うことができる後輩をもったことを誇りに思います。

同じ光合成研究分野から、研究内容に関して貴重な意見を度々下さった大学共同利用機関法人自然科学研究機構アストロバイオロジーセンター 河野優博士、摂南大学大学院農学研究科生産生態基盤学研究室 高木大輔先生、神戸大学大学院農学研究科植物栄養学研究室 嶋川銀河助教、国立中興大学 分子生物學研究所 寺島一郎教授に感謝申し上げます。皆様に研究を共有し、議論していただけたことが大きなモチベーションになりました。

京都大学大学院農学研究科植物栄養学研究室の加藤優太博士には研究遂行や私生活に至るまでお世話になりました。多くのデータをともに出せたことを大変嬉しく思います。感謝申し上げます。

キュウリ形質転換系の共同研究として手取り足取り丁寧に教えて下さった国立研究開発法人森林研究・整備機構森林総合研究所 七里吉彦博士に感謝申し上げます。

本研究は、京都大学大学院農学研究科植物栄養学研究室、及び、前所属の京都大学大学院生命科学研究科全能性統御機構学研究室の皆様を支えられ遂行されました。秘書の寺崎久美子氏には事務の面から多大なるご支援をいただきました。感謝申し上げます。

分野は違えど、ともに高め合ってきた友人達に心より感謝いたします。

最後に、常に支えてくれた両親に心より感謝いたします。

2026年 竹内 航

発表論文

***Takeuchi, K.**, Che, Y., Nakano, T., Miyake, C., & Ifuku, K. (2022). The ability of P700 oxidation in photosystem I reflects chilling stress tolerance in cucumber. *Journal of Plant Research*, 135(5), 681-692. <https://doi.org/10.1007/s10265-022-01404-w>

Takeuchi, K., Ochiai, K., Kobayashi, M., Kuroda, K., & Ifuku, K. (2024). Light-chilling stress causes hyper-accumulation of iron in shoot, exacerbating leaf oxidative damage in cucumber. *Plant and Cell Physiology*, 65(11), 1873-1887. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcae111>

***Takeuchi, K.**, Harimoto, S., Maekawa, S., Miyake, C., & Ifuku, K. (2025). PSII photoinhibition as a protective strategy: Maintaining an oxidative state of PSI by suppressing PSII activity under environmental stress. *Physiologia Plantarum*, 177(4), e70392. <https://doi.org/10.1111/ppl.70392>

***Takeuchi, K.**, Harimoto, S., Che, Y., Kumazawa, M., Satoh, H., Maekawa, S., Miyake, C., & Ifuku, K. (2025). The protective role of chloroplast NADH dehydrogenase-like complex (NDH) against PSI photoinhibition under chilling stress. *New Phytologist*, 248: 2262–2279, <https://doi.org/10.1111/nph.7057>

*: 本学位論文の基礎となった論文