

地衣共生藻の分離培養法の確立と地衣成分による光合成阻害

The development of separation and culture method of lichen photobionts and photoinhibition by lichen secondary metabolites

2014年9月

高萩 敏和

Toshikazu Takahagi

目 次

概要	4
発表論文リスト	7
略語	8
序論	9
1. 地衣類	
2. 地衣類が生合成する地衣成分	
3. 地衣成分（地衣酸）の働き	
4. 地衣成分の生物活性についてのこれまでの研究の課題と本研究について	
第1章 地衣培養組織を用いた地衣共生藻の分離培養法の確立	12
1. 実験材料と実験方法	
1) 実験材料	
2) 組織培養法	
3) 地衣共生藻の分離培養法	
2. 実験結果	
1) 外部形態	
2) 内部構造	
3) 共生菌、共生藻の出現（CRF）	
4) 共生藻の分離	
3. 考察	
1) 組織培養法	
2) 地衣共生藻の分離培養法	
第2章 植物の光合成電子伝達系への地衣成分の影響 ～人工的電子伝達系を用いて～	22
1. 実験材料と実験方法	
1) チラコイド膜の調製	
2) PSII 膜の調製とトリス処理	
3) 地衣成分の準備	
4) クロロフィル蛍光測定	
2. 実験結果	
1) barbatic acid による光合成電子伝達の阻害	
2) P680 の還元側の阻害	
3) P680 の酸化側の阻害	
4) 他の地衣成分による阻害	

3. 考察

- 1) 地衣成分の化学構造と阻害の関係
- 2) クロロフィル蛍光測定法の優位性

第3章 光合成電子伝達系での地衣成分による阻害部位・阻害様式

～atrazine 耐性タバコ培養細胞 PSII 膜を用いて～ 38

1. 実験材料及び実験方法

- 1) タバコ培養細胞（野生株、atrazine 耐性株）
- 2) チラコイド PSII 膜
- 3) barbatic acid および除草剤 Dinoseb
- 4) PAM 蛍光測定装置を用いた測定

2. 実験結果

- 1) barbatic acid による光合成阻害
- 2) 除草剤 Dinoseb による光合成阻害

3. 考察

- 1) atrazine 耐性タバコ細胞 *psbA* 遺伝子の変異と阻害
- 2) barbatic acid および除草剤の結合様式のモデル
- 3) barbatic acid の除草剤としての可能性

第4章 地衣成分による阻害の影響 植物種による違い

～地衣共生藻と他の植物種との違いについて比較検討～ 45

1. 実験材料及び実験方法

- 1) 植物の材料と細胞培養
 - ① タバコ培養細胞、苔類培養細胞
 - ② *Chlamydomonas reinhardtii* 培養細胞
- 2) 地衣類材料と細胞培養
- 3) チラコイド膜の準備
- 4) 地衣成分
- 5) クロロフィル蛍光の測定

2. 実験結果

- 1) クロロフィル蛍光クウェンチング分析法による光合成電子伝達系での地衣成分の効果
- 2) P680 の還元側での阻害
- 3) 細胞レベルでの阻害とチラコイドレベルでの阻害の比較
- 4) P680 の酸化側での阻害

3. 考察

- 1) 光合成系 II は、地衣成分による植物の生長抑制の主な標的になるか？
- 2) 地衣成分はアレロパシーとして機能するか？

補 予備実験 地衣体からの地衣成分の溶出実験・・・・・・・・・・ 54
～地衣成分の水への溶出、土壌地衣成分の分析～

1. 実験材料と実験方法

1) トゲシバリからの地衣成分溶出実験

- ①トゲシバリの採集
- ②トゲシバリがつくる地衣成分
- ③地衣成分溶出のための buffer の作成
- ④地衣体の振盪
- ⑤疎水性物質の吸着と調整
- ⑥HPLC による解析

2) 地衣体下の土壌中地衣成分の検出実験

- ①地衣体下の土壌の採取
- ②土壌中疎水性物質の溶出
- ③HPLC による解析

2. 実験結果

- 1) 地衣体から水への地衣成分の溶出
- 2) 土壌中の地衣成分の検出

3. 考察

- 1) 地衣成分の水への溶出
- 2) 土壌中の地衣成分の検出

総括	61
要旨	64
謝辞	70
引用文献	71

概 要

藻類と菌類が共生して一つの体が作られる地衣類は、自然界において特異な存在である。地球上には、生物が共生関係にある例は多くある。共生の例としては、マメ科植物とその根に共生する根粒菌の関係がある。その関係はマメ科植物が根粒菌に栄養分を与え、一方、根粒菌が自ら固定する窒素化合物を植物に与える相利共生である。地衣類では地衣体を構成している共生菌（主に子嚢菌類）が藻類に住む場所と水分を与え、一方、藻類（主に緑藻の *Trebouxia* 類）は光合成で作ったソルビトールなどのポリオール類などをエネルギー源として菌類に与える関係がある。その関係はマメ科植物と根粒菌の例と同じように栄養面での共生関係と言える。地衣体の大部分は菌類で占められ、藻類は地衣体の表面近くに層を成して集合する。地衣体を構成している菌類と藻類はその対応する種が決まっている（一対一対応）。地衣体を形成する過程において、藻類が何らかの関わりを持っていることが指摘されている。

地衣類は、地衣成分を二次代謝産物として合成する。地衣成分は地衣体表層や地衣菌の細胞表面に集積する。地衣成分の働きについては、実験室内で他の生物（藻類、菌類、植物、微生物など）の増殖や生長に及ぼす影響について多く研究されてきた。私が特に関心を持ったのは、近接して生育する藻類、蘚苔類、高等植物の光合成に対する影響である。本研究では、地衣成分の光合成電子伝達系での影響を調べるため、PAM 蛍光測定装置を使い、①人工的電子伝達系を用いた実験系の確立と②地衣成分の阻害様式のモデル化を試みた。また、③地衣成分の影響について、地衣共生藻と他の植物種（藻類、苔類、高等植物）での違いについて比較検討を行った。

序論では、自然界での地衣類の生態について説明を行った。また、私たちの生活との関わりについても紹介した。つぎに地衣類特有の二次代謝産物である地衣成分についてその生合成経路および地衣体での地衣成分の局在性について説明した。これまでの地衣成分の研究をもとに、今後の研究の方向性について述べた。

第1章では、地衣類の分離培養方法について述べた。地衣類は他の菌類、藻類、植物と違って、生長が非常に遅い。例えば葉状地衣の *Parmotrema sulcata* では、1年で地衣体の直径が2 mm程度大きくなることが報告されている (Degelius 1964)。培養でも同じで、共生藻類、共生菌類ともに増殖が非常に遅い。それに対して、地衣体に付着している他の菌類、藻類、細菌は増殖が速い。このため地衣類を培養する場合、共生藻、共生菌以外のそれらが増殖するため培養が難しい。これまでの分離培養は、共生菌では、子器から放出される子嚢胞子を培養する方法が取られていた。しかしこの方法は子器を付けない地衣類では不可能であった。一方、共生藻では地衣体をすり潰し、共生藻（主に単細胞）を取り出して培養する方法が取られていた。1980年代、地衣組織を培養する方法が開発された。本研究では、地衣組織培養法(山本法(2002b))

を發展させて、組織培養法で得た地衣培養組織から共生藻を簡便に分離培養する方法を確立した。

第2章では、はじめに光合成電子伝達系での地衣成分の影響について、PAM 蛍光測定装置を用いた測定方法の原理について述べた。植物が太陽からの光エネルギーを用いて光合成を行う場合、LHCII により吸収された光エネルギーは反応中心に集められ、電子伝達系に伝えられるが、光合成に使われなかったエネルギーは、LHCII で熱として放出されたり、蛍光（赤色）として放出されたりする。そのとき放出された蛍光を測定することにより光合成活性を調べることができる。1980年代までは、蛍光光度計、燐光光度計などを用いた研究が行われていたが、Shreiberが1993年、パルス変調した光を用いた測定方法(PAM 蛍光測定法)を発表した。簡便であり、実験室だけでなく、野外での植物の光合成活性を測定できるようになった。このPAM 蛍光測定法を用いた実験法の原理についてまとめ、つぎに、本研究ではPAM 蛍光測定法を用いて地衣成分による植物の光合成への影響について調べた。地衣成分の生物への作用については、植物の発芽、生長への影響などが主に研究され、光合成については酸素電極を用いた研究が成されてきた。しかし光合成電子伝達系でどのように地衣成分が作用しているか、具体的には電子伝達系のどの部位に結合し、電子伝達を阻害しているかの研究は、あまり行われていない。本研究では、実験に多く用いられるハウレンソウの葉緑体チラコイド PSII 膜を用いて人工的電子伝達系を製作し、PAM 蛍光測定装置により蛍光の特性を調べ、電子伝達系における阻害部位について検討を行った。このとき酸素電極を用いた実験も合わせて行った。つぎに、barbatic acid 以外の7種の地衣成分についても実験を行い、地衣成分の化学構造と阻害の程度の関係についても検討を行った。

第3章では、アトラジン耐性タバコ培養細胞を用い、地衣成分のチラコイド電子伝達系での阻害部位・阻害様式について検討を行った。除草剤の atrazine に耐性を持つタバコ培養細胞は、D1タンパク質の *psbA* 遺伝子の264番目がセリン (AGT) からスレオニン (ACT) に変異している。Atrazine 耐性株は野生株に比べて barbatic acid に対して P680 の還元側がより高い感受性を示した。フェノールタイプの除草剤である Dinoseb についても、atrazine 耐性株では P680 の還元側が高い感受性を示した。このことからバルバチン酸は除草剤の Dinoseb と同じタイプの阻害を示すことが考えられる。Shigematsu *et al.* (1989b) が明らかにした atrazine 耐性タバコ培養細胞での phenylurea に関する結合モデルを参考に、barbatic acid の結合様式について検討を行った。

第4章では、地衣成分による阻害の影響について、地衣共生藻と他の植物種との間での違いについて比較検討した。地衣類は、自然界に於いて、藻類、蘚苔類、菌類、バクテリア、高等植物などと近接して生育している。近接する生物との競合の中で、二次代謝産物である地衣成分がアレロパシーとして作用する可能性がある。Molisch (1937) はアレロパシーについて「ある植物が生産する化学物質によって、他の植物（微生物を含む）が何らかの作用を受ける現象」（原義）と定義している。アレロパシー物質として報告されているのはほとんど

どが二次代謝産物である。二次代謝産物は、アミノ酸やタンパク質、DNA、脂質や糖などの生命に不可欠な物質である一次代謝産物とは異なり、特定の植物にのみ存在する物質であり、ときには大量に存在する。このような物質の存在意義はこれまで不明で、老廃物や貯蔵物質であると説明されてきた。ところが近年このような物質の意義は、動くことができない宿命を持つ植物が自らの身を守るために進化の途上で身につけた防御物質であるとする「アレロパシー仮説」が提唱されている（藤井 2000）。地衣共生藻と単細胞藻類、苔類、タバコ培養細胞で、5種の地衣成分について光合成電子伝達系での阻害の程度を調べ、地衣共生藻と他の植物種について比較検討を行いアレロパシーの可能性を探った。

発表論文リスト

本学位論文の一部は、以下の原著論文として公表済み

1. Takahagi T., Yamamoto Y., Kinoshita Y., Takeshita S. & Yamada T. 2002. Inhibitory effects of sodium chloride on induction of tissue cultures of lichens of *Ramalina* species. *Plant Biotechnology* 19: 53-55. (第1章)
2. Endo T., Takahagi T., Kinoshita Y., Yamamoto Y. & Sato F. 1998. Inhibition of photosystem II of spinach by lichen-derived depsides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 2023-2027. (第2章)
3. Takahagi T., Ikezawa N., Endo T., Ifuku K., Yamamoto Y., Kinoshita Y., Takeshita S. & Sato F. 2006. Inhibition of PSII in atrazine-tolerant tobacco cells by barbatic acid, a lichen-derived depside. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 266-268. (第3章)
4. Takahagi T., Endo T., Yamamoto Y. & Sato F. 2008. Lichen photobionts show tolerance against lichen acids produced by lichen mycobionts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 3122-3127. (第4章)

参考文献

5. Takahagi T., Yamamoto Y., Kinoshita Y. & Yamada T. 2000. Influence of NaCl concentration on spore germination and hyphal growth of lichens. *J. Hattori Bot. Lab.* 88: 69-77.
6. Yamamoto Y., Takahagi T., Sato F., Kinoshita Y., Nakashima H. & Yoshimura I. 2001. Screening of halophilic or salt tolerant lichen mycobionts cultured on sodium chloride enriched media. *J. Hattori Bot. Lab.* 90: 307-314.
7. 山本好和, 高萩敏和, 坂東誠, 吉村庸. 2005. 分布資料(10). トガシアワビゴケ *Tuckneraria togashii*. *Lichenology* 4: 33-36.
8. 山本好和, 高萩敏和, 坂東誠, 吉村庸. 2006. 京都市大原の地衣類. *Lichenology* 5: 83-85.
9. 坂東誠, 高萩敏和, 山本好和, 岡本達哉. 2003. 京都市高雄の地衣類. *Lichenology* 1: 17-18.

略 語

AL	作用光
CP24,CP26,CP29	周辺集光装置
CP43,CP47	中心集光装置
Chl	クロロフィル
DCMU	dichlorophenyldimethylurea
DMBQ	2,6-dimethylbenzoquinone
DMSO	Dimethyl sulfoxide
D1	D1 タンパク質
D2	D2 タンパク質
DPC	diphenylcarbazide
F	作用光照射時の蛍光レベル
FeCN	フェリシアン化物
F _m	飽和閃光による最大蛍光レベル
F _m '	飽和閃光による蛍光レベル (作用光照射下)
F _o	測定光照射下の蛍光レベル
F _o '	作用光 off にした時の F _o レベル
F _v	飽和閃光による蛍光増加量(F _v =F _m -F _o)
I ₅₀	半阻害濃度
ML	測定光
OEC	酸素発生複合体
P680	光化学系 II の反応中心
PAM	パルス変調増幅法
Phe	pheophytin
<i>psbA</i>	光化学系 II 反応中心である D1 タンパク質をコードする 遺伝子
PSI	光化学系 I
PSII	光化学系 II
PQ	plastoquinone
Q _A	一次電子受容体
Q _B	二次電子受容体
SiMo	Silico-molybdate
SL	飽和閃光
Yz	チロシン残基

序論

1. 地衣類

地衣類は、藻類と菌類のユニークな共生生物であり、樹木、岩、地面に広がっている。普通、地衣共生藻と地衣共生菌が特別なペアを組んで地衣体を形成する (Ahmadjian 1993b)。地衣共生藻の大部分 (約 60%) は単細胞緑藻類である *Trebouxia* 属に属す。またシアノバクテリア (藍藻類) が共生藻の場合もある。主な地衣共生菌は子囊菌類である (Ahmadjian 1993a)。世界では、約 2 万種が報告されて、その内日本では 1600 種あまりが確認される (Harada 2004)。地衣類はその形態から、高等植物の葉のように扁平で基物に水平に広がる葉状地衣、腹面全体で木や岩などの基物などに広がる痂状地衣 (固着地衣)、樹状・糸状・紐状の地衣体が基部で基物につくか垂れ下がる樹枝状地衣などに分類される (吉村 1974)。地衣類は、都会でも公園の樹木の樹皮に付着する小隣片状の地衣 (*Phaeophyscia limbata*)、ブロック塀の赤茶のさびのよう見える *Caloplaca flavovirescens* などを見ることができる。郊外へ行けば、桜の木や梅の木の樹皮に付着している葉状の *Parmotrema tinctorum*、高山の針葉樹に付着し垂れ下がっている *Usnea longissima* などを見ることができる。

また、地衣類は、地球上の過酷な環境でも生育する。例えば、1 年の大半が雪で覆われる南極大陸、乾燥が厳しい砂漠地帯、他の植物が生育できない高山や火山活動している火口付近などである。また、地衣類は普段の生活の中で見ることができるが、学校教育ではほとんど触れられていないため、気付くことが少ない。

地衣類の研究は、これまで分類学的、生態学的な研究にはじまり、二次代謝産物である地衣成分についての他の生物に及ぼす影響などの研究、遺伝子解析を用いた系統分類の研究などが行われている。

2. 地衣類が生合成する地衣成分

地衣類の生産する物質を総称して地衣成分というが、この中で有機酸類に地衣特有のものが多く、これらを特に地衣酸と呼ぶ。地衣成分は、大きく脂肪族地衣成分と芳香族地衣成分に分類される (山田 1993)。脂肪族地衣成分は、①酸類、②リーベルマン反応を呈する中性物質 (zeorine 系化合物)、③多価アルコール類があり、芳香族地衣成分は、①pulvinic acid 誘導体、②depside 類、③depsidone 類、④quinone 類、⑤xanthone 類、⑥diphenyleneoxide 誘導体 (dibenzofurane 類) ⑦含窒素化合物がある (朝比奈ら 1949)。

地衣特有の二次代謝産物である地衣成分は、地衣体を構成している地衣共生藻と地衣共生菌の共同作業で生合成される。つまり地衣共生藻において光合成により生じたグルコースやリビトールなどが、地衣共生菌に送られ、それをもとに地衣共生菌の細胞内で地衣成分が生合成される。Lawrey (1995) は、地衣成分についてまとめ、1600 種類の二次代謝産物のうち 350 種類が特異的な物質 (地衣成分) であると報告している。その多くはフェノール系の物質であり、

地衣菌の外側や地衣体の表層部分に数%からときには 20%にも達する量が蓄積される。地衣成分は、シキミ酸を基原とするシキミ酸経路、メバロン酸を基原とするメバロン酸経路、アセテート・マロネートを基原とするアセテート・マロネート経路を経て生合成される (Mosbach 1973)。

地衣成分の検出には、先ず地衣成分をアセトンで抽出した後、特殊な溶液で再結晶させ、結晶の形を顕微鏡で調べる顕微化学的検出法がある。大部分の地衣成分は、結晶法で同定できる。しかしはっきりとした結晶をつくらない成分もある。このような場合の成分の同定には、薄層クロマトグラフィーを用いる。地衣成分の多くは薄層クロマトグラフィーの後、顕色と Rf 値から同定できる (吉村 1974)。近年は、液体クロマトグラフィーも研究に使用されている。

3. 地衣成分 (地衣酸) の働き

二次代謝産物は、アミノ酸やタンパク質、DNA、脂質や糖などの生命に不可欠な物質である一次代謝産物とは異なり、特定の植物にのみ存在する物質であり、時には大量に存在する。このような物質の存在意義はこれまで不明で、老廃物や貯蔵物質であると考えられてきた。地衣類の二次代謝産物である地衣成分についても、他の植物の場合と同様に、その作用については不明であった (藤井 2000)。

Monar *et al.* (2010) は、地衣二次代謝産物の生物活性の総説の中で、①地衣成分が抗酸化作用を示すこと、②重金属の汚染地域で、地衣成分が地衣体内に重金属陽イオンを吸収することをコントロールすることにより、重金属への耐性を高めていること、③地衣体内の地衣成分が紫外線を吸収することにより、共生藻を紫外線から防御すること、④微生物の増殖を阻害すること、⑤草食動物や昆虫から地衣体を防御すること、⑥人体に対して抗がん作用があること、⑦周辺の生物の生育を阻害することなどを報告している。特に微生物、蘚苔類、植物などへの生育阻害などについて、今日まで幅広く調べられている (Lawrey *et al.* 1986、1995、Cocchietto *et al.* 2002)。例えば、Yamamoto *et al.* (1998) は多くの天然地衣体や地衣類の組織培養の methanol 抽出物が 3 種のグラム陽性菌 (*Bacillus subtilis*、*Propionibacterium acnes*、*Staphylococcus aureus*) の増殖を阻害することを報告した。これに対して、Stark *et al.* (2003) は、地衣類から浸出した phenol 類は、これらの地衣の二次代謝産物に順応した土壌微生物にとっては、阻害作用を示す薬剤というよりむしろエネルギー源であると提示した。Giordano *et al.* (1999) は、*Cladonia foliacea* の地衣体が数種の蘚苔類の生長と発達を阻害することを明らかにした。Nishitoba *et al.* (1987) は *Usnea longissima* から分離した depside 類、orcinol 誘導体がレタスの苗に対して高い生長阻害活性を有することを見つけた。また、Inoue *et al.* (1986) は電子伝達システムへの地衣成分による阻害の研究で、地衣成分がホウレンソウの葉緑体で光化学系 II (PSII) の酸化側を阻害することを示した。Rojas *et al.* (2000) は lecanoric acid による阻害の最初のターゲットが水分分解酵素であることを見つけた。

4. 地衣成分の生物活性についてのこれまでの研究の課題と本研究について

上記3の *Monar et al.* (2010) の総説のように地衣成分の作用については、広範な研究が成されてきた。他の生物への生育阻害以外に、重金属の集積やUV遮蔽などの作用もあると報告しているが、生態のなかで地衣類が生きていく上で、地衣成分が何らかの作用を持つとすれば、近接する藻類、蘚苔類、植物への影響を中心に考えていかなければならない。つまり近接する藻類、蘚苔類、植物との競合において何らかの作用（生育阻害）をしていると考えられる。上記の *Inoue et al.* (1986) や *Rojas et al.* (2000) の研究は地衣成分による植物の生育阻害の主なターゲットが光合成電子伝達であることを示している。本研究では、自然環境において、生き残りのために近接する藻類、蘚苔類、植物の光合成への影響に的を絞り、光合成電子伝達系における地衣成分の阻害についてさらに研究を進め、その作用機構を明らかにすることを目指した。また、地衣共生藻が地衣体中で地衣成分の影響をどの程度受けるのか、または、受けないのかにも関心がある。生態を想定し、地衣共生藻類、単細胞緑藻類、蘚苔類、植物について、細胞レベル、チラコイドレベルでの地衣成分の影響を調べ、地衣共生藻と他の植物種について比較を行い、地衣共生藻の特異性の有無についても検討を行った。本研究では、光合成の測定にはクロロフィル蛍光を測定する蛍光測定法を用いた。

また、本研究で使用する地衣共生藻の準備は、第一段階として採集した地衣体から山本法により組織培養を行い、地衣共生藻と地衣共生菌が混在する地衣培養組織（カルス）を得た。第二段階として共生藻の分離培養を行った。地衣共生藻の分離培養について、これまで行われていたマイクロピペット法やスプレイ法ではなく、地衣組織培養法（山本法）により培養地衣組織を得、それをもとに地衣共生藻を簡便な方法で大量に分離・培養する方法を確立した。

第1章 地衣組織培養法を用いた地衣共生藻の分離培養法の確立

はじめに

植物組織培養は、植物の器官や組織・細胞を植物体から分離し、適当な培養環境条件のもとで無菌的に培養して、植物体として完全な機能を持つ個体を再生させる一連の技術を言う。植物の組織培養の研究は、1902年にドイツの植物生理学者のハーバーランドがムラサキツユクサの葉や雄ずいの細胞を培養し、器官をつくらせることを試みたことにはじまる。その後、植物の細胞や組織の培養には植物ホルモンが必要であることが明らかになった。1950年、スクーグは植物ホルモンのオーキシシンとカイネチンの組み合わせで、根、芽などの器官の分化を誘導できることを見だし、1957年にこの二つのホルモンの作用が確立された。これ以後植物の組織培養技術は急速に発展していった。組織培養の技術は、色々な植物、菌類、藻類などで試みられた（清水 1992）。

地衣類の培養方法は、地衣体の子器から放出される子嚢胞子を培養する方法と、地衣体の一部（組織）を培養する方法の2つに分けることができる。子嚢胞子の培養は100年ほど前から試みられ、以後多くの研究者が多種多様な種類の地衣類からの子嚢胞子の放出、発芽、培養を行い、1960年代に Ahmadjian (1973) によってその方法は集大成された（山本 2002a）。

組織培養は、いろいろな植物、菌類、藻類などで試みられたのと同じように、組織の増殖、器官の形成、形態形成（地衣体の形成）についての研究が多く行われた。地衣類の組織培養の特徴は、植物の培養と違い、植物ホルモンを用いない点である。地衣体の共生藻を多く含んだ藻類層から組織を取り、主に共生藻を分離培養していくマイクロピペット法、スプレイ法（中野 1987）と地衣体全体を小片に分け、共生藻と共生菌が結合した状態で培養する方法（地衣組織培養法、改良した山本法）に分けることができる。これまでの培養方法をまとめると図 1-1 のようになる。

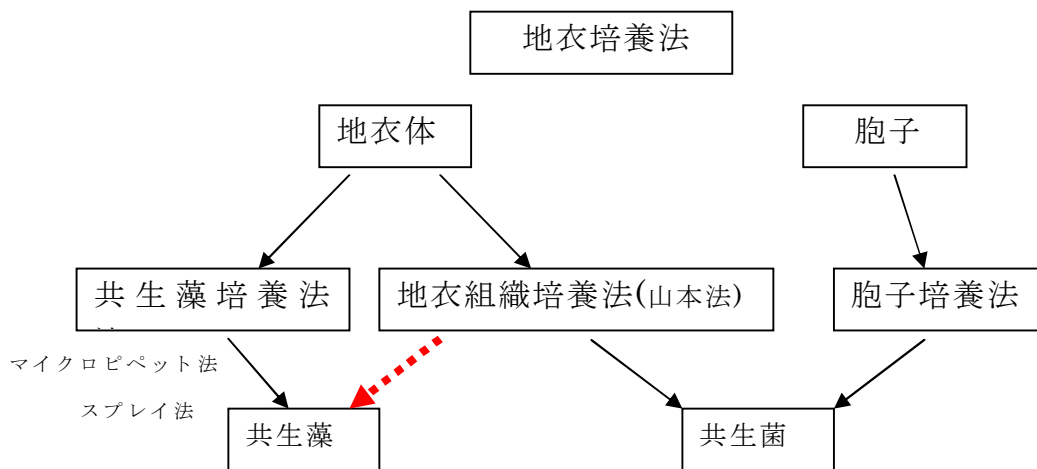


図 1-1 地衣類の培養

地衣共生藻の単離培養する方法についてこれまでのマイクロピペット法やス

プレイ法ではなく、組織培養法（山本法）で作成した地衣培養組織から共生藻を単離培養する方法を確立した。

1. 実験材料と実験方法

1) 実験材料

実験材料とした *Ramalina siliquosa* (syn. *R. crassa*) と *R. litoralis* は、和歌山県串本の海岸で採集した（図 1-2）。採集の後、標本は-20℃で約 1 ヶ月保存し、証拠標本は兵庫教育大学の標本箱で保管した。



和歌山県串本町橋杭岩



Ramalina siliquosa



Ramalina litoralis

図 1-2 採集地と採集地衣類

2) 組織培養方法

基本培地として MY 寒天培地（麦芽エキス 20 g、酵母エキス 2 g、寒天 20 g）を用いた。溶解混合後試験管に 5 ml ずつ 25 本分注し加熱滅菌処理した。地衣体の表面のゴミや埃塵を取り除いた後、先端から 1 cm 長程度の大きさに切断した。ついで、地衣片を流水により 1 時間洗浄した。以後の操作はすべてクリーンベンチ内で行った。洗浄した地衣片を滅菌処理した乳鉢に移し、無菌水 2~3 ml とともに乳棒で粉碎し、粉碎液を駒込ピペットで吸い取り、ステンレス製の一次フィルター（孔径 500 μm ）で濾過して、大きな地衣塊を取り除いた。濾液をナイロン製の二次フィルター（孔径 150 μm ）で濾過し、雑菌や細かな地衣片

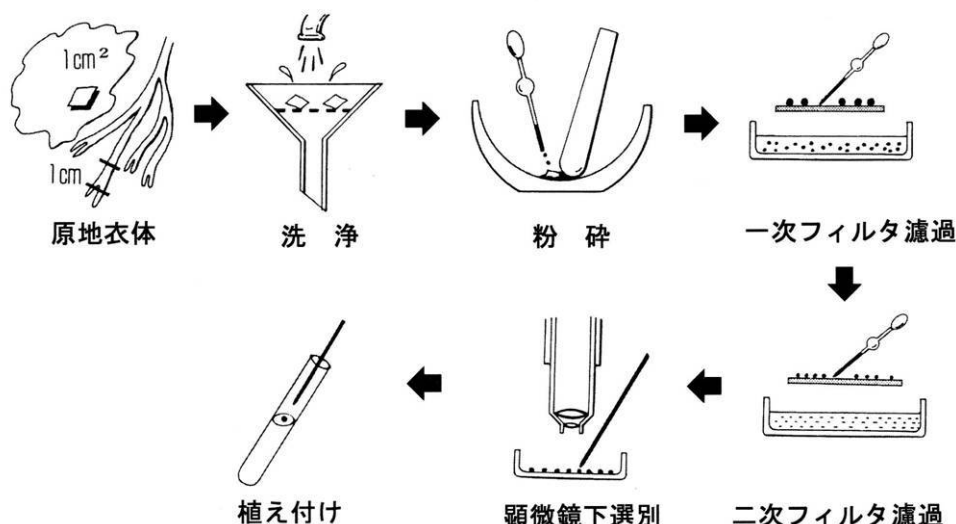


図 1-3 地衣組織培養法（山本法、山本 2002b 引用）

を除いた。フィルター上に残った地衣微小片（大きさ 150～500 μm ）を無菌水で数回洗浄した後、実体顕微鏡下（倍率 30 倍）で、藻類と菌類からなる微小片を個別に無菌竹串で拾い上げ、試験管斜面培地に植え付けた。地衣体微小片を植え付けた試験管をインキュベータに入れ、15°C 暗条件で 6 ヶ月培養した。植え付け後 1 週間おきに双眼実体顕微鏡下で培養した試験管をチェックし、共生菌、共生藻の出現を調べ記録した（図 1-3）。共生菌の出現については菌糸の確認をもって出現とし、また共生藻の場合は葉緑体のはっきりした緑色が確認できた段階で出現とした。共生菌、共生藻の出現の記録から出現率、平均出現週数を求めた。なお出現率は実験を行った試験管数からコンタミネーションした数を引いた数をもとにして算出した。発現週数は発現した週の平均で算出した。

得られた *R. siliquosa* の地衣培養組織を沸騰処理した蒸留水に入れ、真空ポンプで地衣体中の気泡を除く処理をした後、凍結マイクロトーム (Reichert-jung、Frigomobile OM 凍結装置と凍結マイクロトーム 1206) を使用して厚さ 20～40 μm に地衣体の切片を作成し、顕微鏡観察と写真で記録した。切片の一部はラクトフェノールコットンブルー液（I 液：フェノール 10 g に乳酸 8 ml を加える。II 液：蒸留水 10 ml にグリセリン 20 ml を加える。I 液と II 液を混合し、加熱しながらコットンブルー 0.05 g を加える。）で染色した。プレパラートを生物顕微鏡で観察し、また写真に撮って記録した。

3) 地衣共生藻の分離培養法

以下に操作手順を記した（図 1-4 参照）。

- i) 基本培地として MY 寒天培地を用いた。溶解混合後滅菌し、径 90 mm シャーレに 20 ml ずつ分注した。
- ii) クリーンベンチ内で、山本法により 6 ヶ月寒天培地上で培養した地衣培養組織塊の中から、共生藻が多く増殖している塊を選び、ピンセットで緑色の共生藻の部分を取り取り、滅菌した乳鉢に移した。
- iii) 滅菌水 3 ml を滅菌済み駒込ピペットにより乳鉢に注ぎ、滅菌済み乳棒によ

り培養塊を磨砕した。

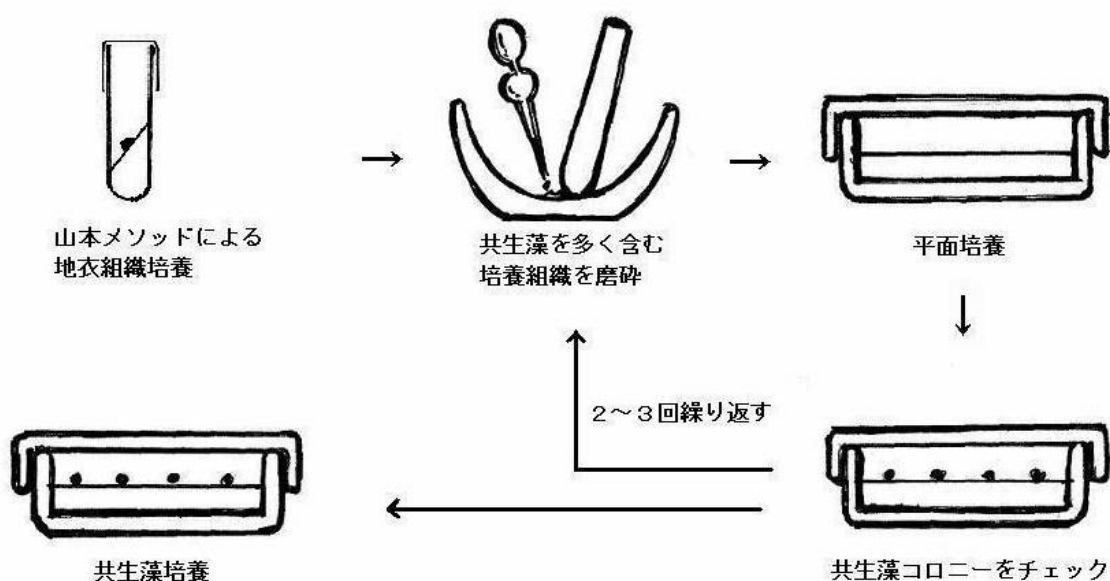


図 1-4 地衣共生藻分離培養

- iv) 磨砕液 1 ml ずつを滅菌済み駒込ピペットで 3 枚の平面 MY 寒天培地に流し込み、培地に広げ、15~20℃の暗所インキュベータ中で培養した。別の塊 2 個について同様の操作を行い、計 9 枚の培地で培養した。
- v) 1 週間毎に観察し、コンタミネーションを生じたシャーレは、オートクレーブ滅菌をして処分した。
- vi) 3 ヶ月培養し、共生菌の菌糸の増殖したコロニーが見られなかったシャーレを選び、共生菌の増殖が見られたシャーレは、オートクレーブ滅菌により処分した。
- vii) 共生藻の増殖のみ認められたシャーレについて、ピンセットで共生藻のコロニーを取り出し、ii)~vi)の操作を 2 回行い、共生藻を分離した。

2. 実験結果

1) 外部形態

図 1-5 は、*R. siliquosa* の地衣培養組織である。中央に茶褐色の共生菌の塊が見え、その表面は白色の細く短い菌糸が共生菌の塊全体を覆っている。またその周辺に、濃い緑色の共生藻の塊がみられる。その境目のところでは、暗緑色の共生藻の部分が見え、注意深く観察するとその表面から菌糸が伸びているのが確認できる。植え付け



図 1-5 *R. siliquosa* の地衣培養組織

を行った試験管のコンタミネーションしたものを除くほとんどの試験管で共生

菌、共生藻の増殖が見られた。地衣培養組織の塊は、共生藻が多く見られるもの、共生菌が多く見られるものなど様々であった。培養地衣組織の断面の写真で分かるように、共生菌の塊に見える部分でも内部は共生藻が多く混在していることが分かる（図 1-6）。*R. litoralis* についても同様のことが観察された。

2) 内部構造

図 1-6 は *R. siliquosa* の天然地衣体（左）と地衣培養組織（右）の断面である。天然地衣体の断面を顕微鏡で観察すると、上下に皮層が存在し、皮層下部に茶色に着色した菌糸層、その下に緑色の藻類層が認められた。このように天然地衣体は明らかに組織構造を有していた。一方、地衣培養組織では、共生藻細胞が組織に一様に分布した。共生藻が細胞内で自生胞子を多く内蔵して盛んに増殖している様子が観察された。

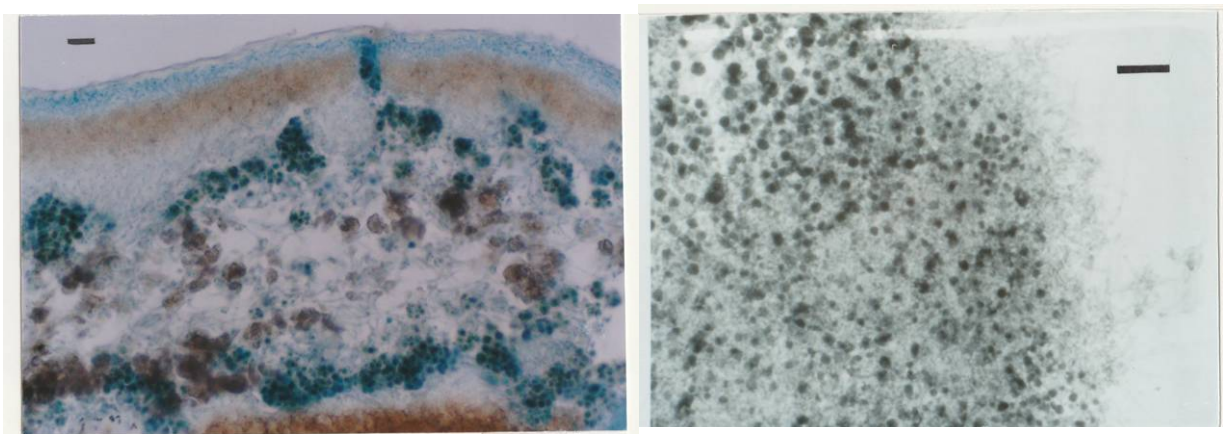
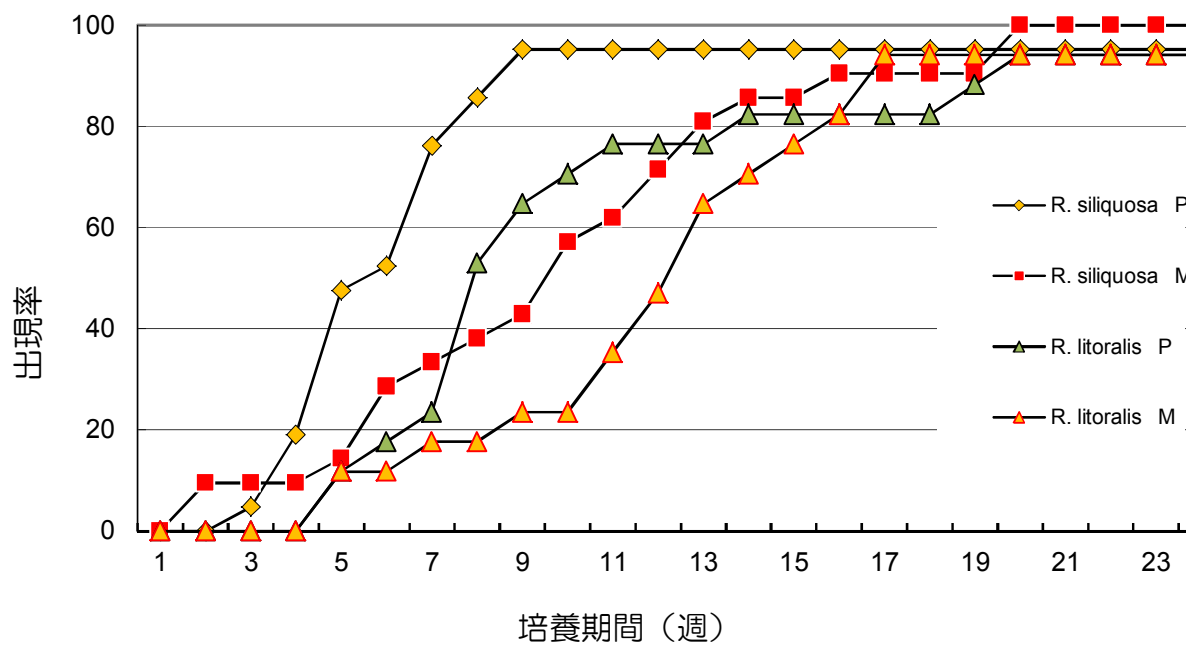
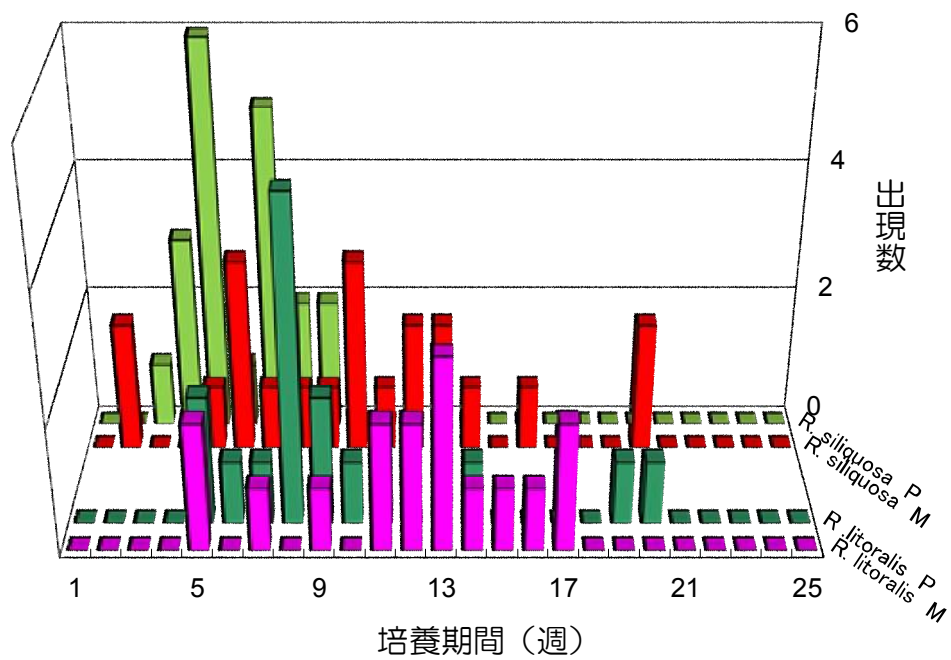


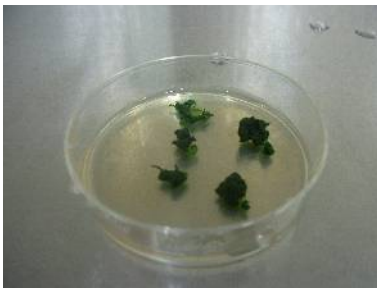
図 1-6 *R. siliquosa* の組織断面、左) 天然地衣体、右) 地衣培養組織

3) 共生菌、共生藻の出現 (CRF)

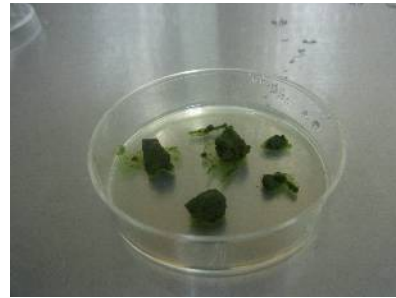
図 1-7 および図 1-8 に示すように *R. siliquosa* と *R. litoralis* の 2 種からともに共生菌、共生藻が出現した。出現率は、*R. siliquosa* では、共生菌が 100%、共生藻が 96%であった。*R. litoralis* では共生菌が 94%、共生藻も 94%であった。出現が早かったのは *R. siliquosa* であり、植え付け後 2 週間で共生菌が出現し、3 週目で共生藻が出現した。*R. litoralis* は共生菌・共生藻ともに 5 週目で出現した。平均発現週数を見ると、*R. siliquosa* の共生菌では、10 週目、共生藻では 6 週目であった。*R. litoralis* については、共生菌では 12 週、共生藻では 9.5 週であった。このことから、培養では共生藻の方が早く出現することがわかった。特に出現が早かったのは、*R. siliquosa* の共生藻で 3 週目に出現がはじまり、9 週目で終了している。この 2 種については、共生菌、共生藻ともに出現率、平均出現週数を比較した中では、同じような特徴を示した。かび、酵母にコンタミネーションした試験管の割合は、*R. siliquosa* では 16%、*R. litoralis* では 28%であった。



4) 共生藻の分離



Trebouxia impressa
(*R. siliquosa* の共生藻)



Trebouxia sp.
(*R. litoralis* の共生藻)

図 1-9 分離培養した共生藻

山本法で誘導した *R. siliquosa* および *R. litoralis* の地衣培養組織から共生藻を分離・培養した。共生藻の培地はMY培地（菌の培地）を用いた。共生藻の懸濁液を平面培地にまくと、2週間ほどすると培地全体が薄い緑色に変化し、所々に緑色の濃い部分が観察された。MY培地を使用して暗条件で培養したことで、共生菌の混入があれば、増殖により早く見分けることができた。この操作を2回繰り返すと、共生菌の出現が見られなくなった。その後、共生藻をMY平面培地に植え付けると3ヶ月ほどで共生藻の塊が見られるようになった。*R. siliquosa* の共生藻の場合は、表面は少し濃い緑色で少し硬そうな感じはするが、ピンセットの先で切り取りと、内部は柔らかく、生クリームのようにあり、内部も色の変化はなかった。*R. litoralis* でも、分離培養では2回の操作で共生藻を分離することができた。共生藻の塊は、*R. siliquosa* の場合に比べると、色は同じように濃い緑色を示したが、少し柔らかくなっていた（図1-9）。富栄養培地に於いて、地衣培養組織では共生藻と共生菌との結びつきは弱く、共生藻または共生菌を容易に分離することができることがわかった。共生藻は暗所、菌培地でも増殖可能であるので、菌が確認できないコロニーを選ぶことで、菌のコンタミネーションを避けることができる。

3. 考察

1) 組織培養法

本実験で用いた *Ramalina* 属の2種は、菌や酵母によるコンタミネーションの率が18~28%と比較的低い。葉状で表面が滑らかな地衣では割合が低く、地上生の地衣や樹皮や岩石等に付着している痂状地衣では、コンタミネーションの率が高い傾向がある。菌や酵母その他の微生物が付着しやすい環境にある。対策としては培養前の洗浄を丁寧に行うことと、植え付けの数を多くしておくことが大切である。山本法での培養では、光を用いずに藻と菌を同時に培養することができることも重要な点である。

天然地衣では、貧栄養の状態です共生関係を築き、環境の変化に対処している。

地衣の電子顕微鏡による内部構造を見ても地衣共生藻のまわりに地衣共生菌の菌糸が絡みついている様子が映し出されている。また、菌糸が共生藻の細胞を貫通している場合もある (Ahmadjian 1993b)。

本研究に使用した *R. siliquosa* および *R. litoralis* の山本法による地衣培養組織は、凍結マイクロームを使って厚さ 20~40 μm の断面を顕微鏡観察すると、図 1-6 左の天然地衣のように表層、藻類層、髓層のような組織構造を呈するのではなく、菌糸と藻類が混在した状態で増殖していることがわかる。確かに天然地衣のような組織構造を示さないが、藻と菌が混在した状態であれば、逆に次の段階の藻と菌の分離培養を行うには適しているといえる。

組織培養による形態形成については、植物については多くの種で行われている。地衣類では無栄養の寒天斜面培地で光照射により数種で成功しているが、形態形成の条件等についてはまだ、研究が充分ではない。組織培養の培地の成分、濃度、光照射の条件を変え、また湿度などを変えるなど工夫し、共生状態を分析することにより、形態形成における藻と菌の関わり、遺伝子の働き等研究を進めていくことができる。

2) 地衣共生藻の分離培養法

地衣共生菌と地衣共生藻の生理学的な研究を行うには、共生菌と共生藻の単独の培養が必要である。これまで、地衣菌の培養は子器から放出された子嚢胞子を培養して、研究が行われてきた。しかし、子器を付けない地衣では子嚢胞子を得ることができないので培養ができなかった。山本法は地衣体を利用する方法であり、理論的にはすべての地衣類の培養が可能である。従って、共生菌研究ではやはり、山本法で得られた地衣培養組織から分離した共生菌の培養が不可欠であろう。また、共生藻についても地衣体からの単離培養する方法 (マイクロピペット法、スプレイ法) はあるが、主に分類等の研究で使われてきた。生理学的な研究などで多量に共生藻を短時間で培養するには不向きである。今回確立した地衣共生藻の分離培養法では、山本法により培養した培養地衣組織から地衣共生藻を分離する方法を新しく行った。この方法のメリットは、山本法に従い大量に植え付けることで、地衣共生藻だけのカルスができる可能性が高いこと、また、大量に培養することができ、生理活性を調べるときに用いるのに適している。以上のように、組織培養法により *R. siliquosa* と *R. litoralis* の組織培養に初めて成功し、組織培養物を得た。次ぎに、地衣共生藻の分離培養では、富栄養培地において地衣培養組織では共生藻と共生菌との結びつきは弱く、共生藻または共生菌を容易に分離ができることが明らかになり、培養地衣組織から標準的な共生藻分離培養法を確立した。

共生藻の分離培養法について、組織培養法とスプレイ法を詳しく比較検討し、下記の表にまとめた。

共生藻の分離培養法の比較（操作は黒字、比較検討は赤字で示す。）

	組織培養法	スプレイ法
1.洗淨	ゴミ、埃を取り除いたのち、流水により1時間洗淨。 ・付着している多くのものが洗い流される。	水洗いを充分行う。
2.地衣体の磨砕	地衣体小片を乳鉢で滅菌水を少量加え磨砕する。フィルターを用い、150～500μの大きさに揃えると共に、滅菌水により数回洗淨を行う。 ・磨砕後の洗淨により、付着している細菌等の多くは洗淨されている。	地衣体表層を小型ナイフで削り取り、その後現れた共生藻の層を削り取る。 削り取った共生藻を2枚のスライドガラスで擦り合わせ、共生藻と共生菌を分離する。 ・細かく磨砕することができる。
共生藻分離・培養 I	1) 双眼実体顕微鏡下で共生藻と共生藻が結合した組織（共生藻が殆どの組織、150～500μ）を竹串で拾い上げ、寒天培地に植え付ける。 2) 共生藻が殆どのコロニーを選び、ピンセットで小片を取り乳鉢で少量の滅菌水により磨砕し、MY寒天培地に流し込み広げる。 ・殆どが共生藻の組織を確実に選別することができる。 ・菌培地、暗条件であるので細菌・菌類が増殖した場合、容易に見つけることができる。	共生藻と共生菌の混合液を寒天培地に流し込み、薄く広げる。 ・擦り合わせた混合液を藻培地に流し込み、光照射下で培養するので、菌類の増殖は抑えられるが、コンタミネーションは見つけにくい。
培地	MY培地（菌培地）	BBM培地（緑藻類培地）
培養条件	暗所	光照射下
4.共生藻の分離・培養 II	3. でコンタミネーションが見られないシャーレの共生藻コロニーから共生藻小片を取り、3. 2)の操作を2～3回繰り返す、共生藻だけ	1) 比較的汚染の少ないコロニーを選び、BBM寒天培地に移しコロニーが大きく発達するのを待つ。

	<p>のコロニーを得る。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・3.のところでコンタミネーションしているものの多くは確認されたので、実際分離培養では、コンタミネーションしているシャーレは少なく、共生藻の分離は容易である。 ・共生藻の分離後、MY培地での培養では、2ヶ月ぐらいでコロニーが大きくなり、多量に共生藻を得ることができる。 ・組織培養からの共生藻分離培養法は、培地に菌類の培地を用い暗所で培養しており、共生菌の分離培養も併せて行うことができる。 	<p>2) 滅菌水と Tween-80 を加え、超音波処理を行い、藻塊を解離し、共生藻に付着している細菌や菌糸を洗い落とす。</p> <p>3) 共生藻の懸濁液を遠心分離器を用いて 10 回程度水洗いをする。</p> <p>4) 有機 BBM 寒天培地にスプレイをして、2～3週間培養（培養条件は上記と同じ）し、汚染されていない共生藻のコロニーを得る。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ Tween-80 を加えた超音波処理による細菌、菌糸の解離は厳密に処理を行うことができる。
--	--	--

今回確立した地衣共生藻法の分離培養法を用いた *R. litoralis* および *R. siliquosa* の共生藻の分離培養により、第 2 章からの地衣成分による光合成阻害の研究を進める上での共生藻の準備が整った。

第2章 植物の光合成電子伝達系への地衣成分の影響～人工的電子伝達系を用いて～

はじめに

序論でも述べたように、本研究の目的は地衣類に特有の二次代謝産物である地衣成分の他の生物、特に近接して生育する藻類や蘚苔類、植物の光合成に対する影響を明らかにすることである。農作業で使用される除草剤の多くが植物の光合成を阻害することにより除草効果を示す。その他、植物の呼吸作用を阻害する除草剤、代謝機能を阻害する除草剤等があるが、植物が光合成によりグルコース等の栄養分をつくることを考えると、光合成を阻害する除草剤が多くあるのは当然と言える。このような薬剤と同じように地衣類は、古来、民間薬や毒として使われた。これまでの研究で *depside* 類や *dibenzofuran* 類のような地衣類の二次代謝産物は、地衣類の生物活性の原因であることが報告されている (Huneck *et al.* 1972, Yamamoto *et al.* 1993, Elix 1996, Shimmer *et al.* 1973, Kindaire 1970)。地衣類に特有の *depside* 類や *dibenzofuran* 類などの地衣成分は、*acetyl-polymalonyl pathway* を経て合成され、*ether*、*ester*、*C-C* 結合による2ないし3個の *orcinol* あるいは β -*orcinol* 型の *phenolic* 単位から成る (Elix 1996)。Nishitoba *et al.* (1987) は、*Usnea longissima* から数種の植物生長阻害剤を分離し、その試料には、多量の *usnic acid* や *depside* 類が含まれ、地衣成分の阻害を調べた実験でレタスの苗に対するその生長阻害活性は高濃度の場合でも低かったと報告した。これらの実験から *depside* 類のアレロパシー様作用が示唆されたが、阻害のメカニズムは明確に示すことができなかった。Inoue *et al.* (1986) は、地衣成分の一つ *usnic acid* (*dibenzofurane* 類) がホウレンソウの葉緑体で PS II の酸化側を阻害することを示した。しかし *usnic acid* の属する *dibenzofurane* 類はほんの僅かであり、多くの地衣類で見られる地衣成分は *デプシド* 類や *デプシドン* 類である (朝比奈ら 1949)。

私は、高等植物の光合成において、地衣由来の *depside* 類による光合成電子伝達系での阻害部位を明らかにするため、ホウレンソウのチラコイド膜でのクロロフィル蛍光と酸素発生を測定し、代表的な *depside* 類の一つである *barbatic acid* の阻害効果について調べた。また、*barbatic acid* 以外の8種の地衣成分についてもクロロフィル蛍光の測定を行い、それらの地衣成分の化学構造の違いと地衣成分による光合成電子伝達系での阻害の関連についても検討を行った。

本研究では、植物の光合成測定には、光合成が行われているときにクロロフィルから放射されている蛍光を測定し、光合成の状態を測定する PAM 蛍光測定装置を主に用いた。本研究の説明の前にアンテナ色素系、クロロフィル蛍光クウェンチング分析法の原理、人工的電子伝達系の作製について概略を記す。

① アンテナ色素系

1) アンテナ色素系の構成

地球上のほぼすべての生命活動は光合成のアンテナ色素で捕捉された光エネルギーによって支えられている。地上に降り注ぐ光のうち、光合成が利用でき

るのは約 400~1000 nm の光である。しかし、地球上では場所によって届く光の波長が異なるため、光合成生物は、多様な吸収特性をもった光合成色素を備えている。一方、アンテナ色素系の機能は光エネルギーを捕捉するだけではない。過剰な光エネルギーによる光化学系の損傷を避けるため、ある種の光合成色素はアンテナ色素系の中で過剰な光エネルギーを熱エネルギーに変換したり、危険なクロロフィルの励起状態を緩和したりする役割をも果たしている。

光合成の光化学系は、数百から数千分子の光合成色素と多数のタンパク質から構成されている巨大な集合体である。光合成生物によって光化学系の構成は多様であるが、基本的には、反応中心と中心集光装置、周辺集光装置の 3 つの部分から構成されている。中心集光装置は反応中心の近傍にあり、周辺集光装置は中心集光装置と機能的に会合している。光合成色素は多くの場合、色素タンパク質複合体を形成しており、タンパク質内での色素の位置が厳密に制御されている。色素タンパク質複合体には、色素やタンパク質の構成が異なる多くの種類が知られており、これらが複数会合し、反応中心複合体や中心集光装置、周辺集光装置が形成されている（田中 2000）。

2) 中心集光装置と周辺集光装置

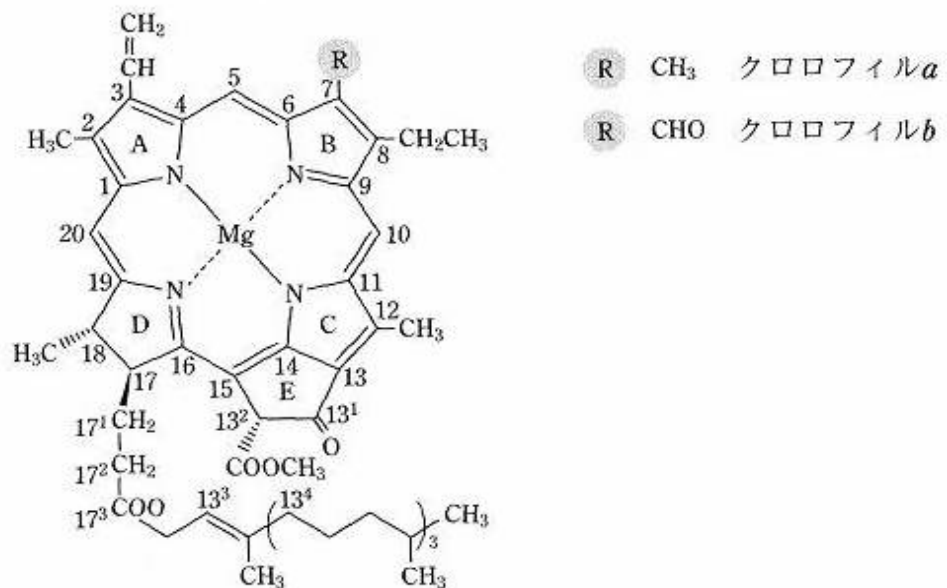


図 2-1 クロロフィル a, b （増田 2007）

陸上植物と藻類は、光合成色素としてクロロフィル a とクロロフィル b を有し、中心集光装置はクロロフィル a を、周辺集光装置は、クロロフィル a とクロロフィル b を利用している（図 2-1）（増田 2007）。

光化学系 II では、反応中心の外側に中心集光装置である CP43、CP47 があり、それぞれ約 38 kDa、39 kDa のタンパク質とクロロフィル a を約 20 個結合した色素タンパク質複合体である。この中心集光装置に CP24、CP26、CP29 の色素タンパク質複合体があり、さらに LHC II の 3 量体がある。周辺集光装置の

主要な色素タンパク質複合体である LHC II は、約 30 kDa のタンパク質に約 15 個のクロロフィルが結合し、クロロフィル a とクロロフィル b の比は、約 1 である (図 2-2) (田中 2000)。

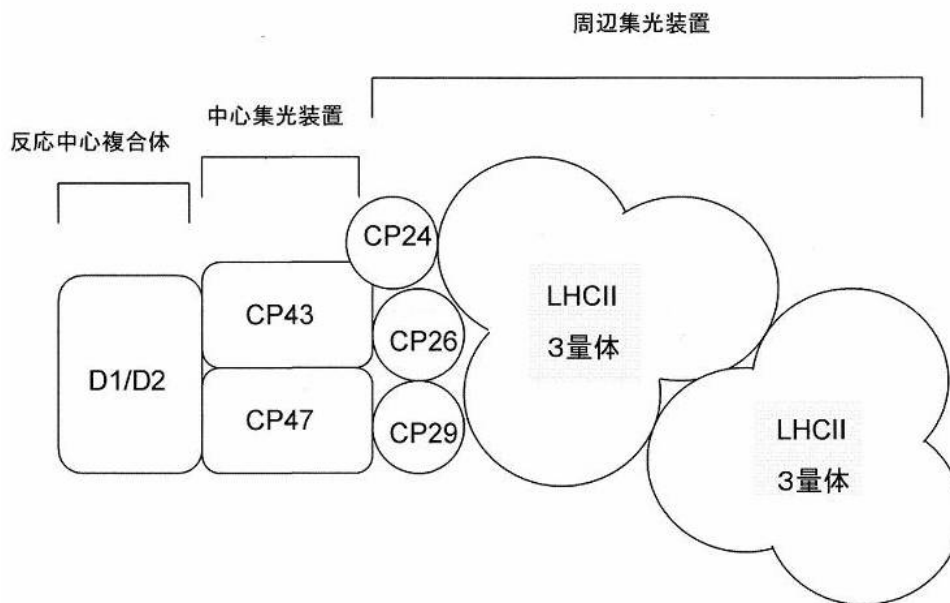


図 2-2 光化学系 II (田中 2000)

② クロロフィル蛍光クエンチング分析法の原理

1) クロロフィル蛍光

PS II で、周辺集光装置のアンテナクロロフィルが光を補足すると、基底状態にあったクロロフィルは、光のエネルギーにより励起状態になる。しかし、励起状態はエネルギー的に不安定な状態であり、隣接するクロロフィルにエネルギーを渡して、基底状態に戻る。アンテナクロロフィルは、反応中心に向かって励起レベルが低くなるように配列され、反応中心に向かって効率よく励起エネルギーが伝えられる。周辺集光装置と中心集光装置の構造や色素タンパク質内の色素の配置などが厳密に制御されている。多くの場合、短波長の光を吸収するエネルギー準位の高い色素からエネルギー準位の低い色素へ励起エネルギーの移動が起こる。周辺集光装置から中心集光装置を経て反応中心に高い効率で集められた励起エネルギーにより水を分解し、引き抜いた電子が電子伝達系に伝えられ、光合成が行われる。周辺集光装置のアンテナクロロフィルで集められた光エネルギーは、すべてが光合成に使われるのではなく、熱や蛍光としても放出される。

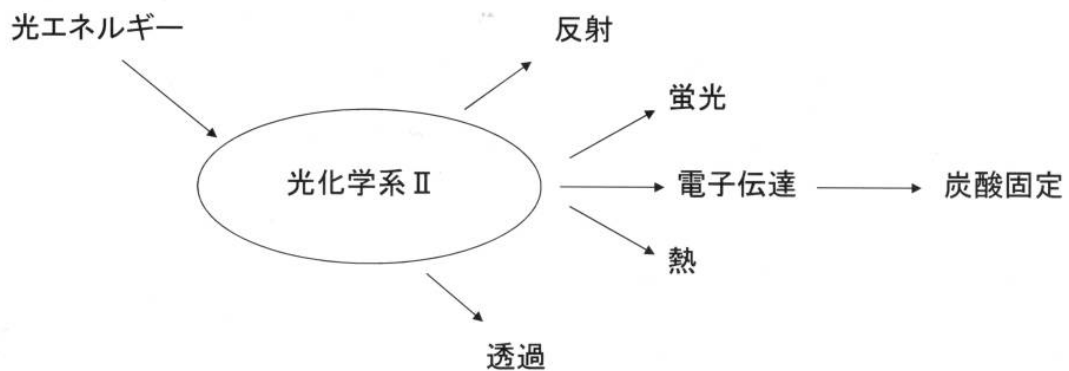


図 2-3 エネルギーの行方（遠藤 2002）

PS II 下流（還元側）の電子伝達系で障害が生じたりすると、アンテナクロロフィルでの励起エネルギーが反応中心へスムーズに伝えることができなくなり、行き場を失った励起エネルギーが、アンテナクロロフィルから蛍光や熱として放出され、蛍光が増加する。このように、クロロフィルからの蛍光を調べることにより、光合成の状態を把握できる（図 2-3）（遠藤 2002）。

2) 蛍光のパラメーターと光化学系 II の量子収率

暗所適応した植物の葉に測定光 (ML, measuring light) を照射すると、 F_0 (minimum fluorescence yield) と称される弱い蛍光が放射される。 F_0 は PSII のアンテナクロロフィルから出る蛍光で、PS II の反応中心クロロフィル (P680) は励起されず電子伝達系で P680 から電子を受け取る Q_A は完全に酸化状態にある。ここで飽和閃光 (SP, saturation pulse)、を 1 秒間ほど照射すると P680 の急速な励起とターンオーバーにより電子伝達が起こるが、電子伝達系は電子で即座に飽和状態になり、 Q_A も完全に還元状態になる。このとき放出される飽和レベルの蛍光を F_m (maximum fluorescence yield) と呼ぶ。 $F_m - F_0$ の値を

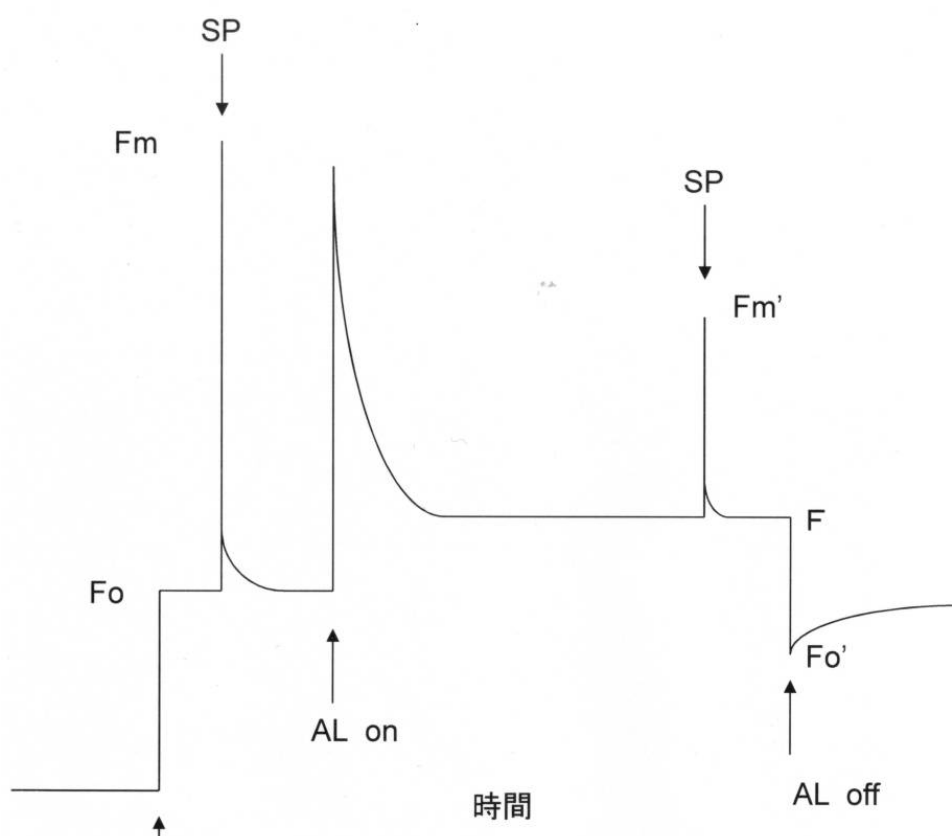


図 2-4 クロロフィル蛍光による変動パターン (遠藤 2002)

ML: 測定光、AL: 作用光、 F_0 : 測定光照射下の蛍光レベル、 F : 作用光照射下の蛍光レベル、 F_0' : 作用光照射中止時の蛍光レベル、 F_m : 飽和閃光による最大蛍光レベル、 F_m' : 飽和閃光による蛍光レベル (作用光照射下)、SP: 飽和閃光。

F_v と称し、 F_v/F_m の値は、光合成活性のポテンシャル (PS II の最大量子収率) を表し、光阻害 (photoinhibition) の指標にもなる。

つぎに、作用光 (AL, actinic light) を照射すると瞬間的に F_m レベルに近い蛍光が放出されるが、やがて 5 分ほどで電子伝達系の下流の炭酸固定系が順調に動き出すと定常状態に落ち着く。照射下での蛍光は F で表される。作用光照射下の任意の時点で飽和閃光を照射して得られる蛍光レベルは F_m' で表される。

F_m' は F_m に比べ低い値になる。照射下での $(F_m' - F)/F_m'$ (しばしば $\Delta F/F_m'$ と表記) がその光照射下での光合成活性 (光化学系 II の量子収率) を表す (図 2-4) (遠藤 2002)。

まとめると、以下のようになる。

暗所適応後 光化学系 II の最大量子収率 $\Psi = F_v/F_m$

※ 光阻害の指標になる。

照射下 光化学系 II の量子収率 $\Psi = \Delta F/F_m'$

※ その光強度での量子収率 (光合成活性) を表す。

③ クロロフィル蛍光測定装置を用いた測定方法

光合成の測定に使用する蛍光測定装置 (PAM-2000, WARZ 社製) は、持ち運びができるコンパクトな装置であり、これまで困難であった野外での植物の光合成活性を測定することができる。今回の実験では測定用セルに実験材料を入れ、PAMにより、量子収率を測定した (図 2-5)。



図 2-5 実験装置 (PAM, パソコン, 測定用セル)

④ チラコイド膜での人工的電子伝達系の作製

図 2-6 に、barbatic acid による PS II の阻害を示した。通常、PS II での電子の流れを調べる場合、電子供与体と電子受容体を利用して人工的電子伝達系を作製する。具体的には、(1) 酸素発生複合体 (OEC) から $Y_z \rightarrow P680 \rightarrow \text{pheophytin} \rightarrow Q_A \rightarrow Q_B$ までの電子伝達では、電子供与体として水を、電子受容体として dimethylbenzoquinone (DMBQ) や FeCN などを用いた。また、(2) Y_z から $P680 \rightarrow \text{pheophytin} \rightarrow Q_A \rightarrow Q_B$ までのときは、電子供与体として diphenylcarbazide (DPC)、電子受容体として DMBQ を用いた。(3) Y_z から $P680 \rightarrow \text{pheophytin} \rightarrow Q_A$ までの場合は、電子受容体として Silico-molybdate (SiMo) を用いた。(1) から (3) の人工電子伝達系を作製し、PAM 蛍光測定装置を用いて (また、酸素発生電極と併用して) 光合成阻害実験を行うことにより、電子伝達系のどの部位付近で阻害が起きているのかを推定していくことができる。

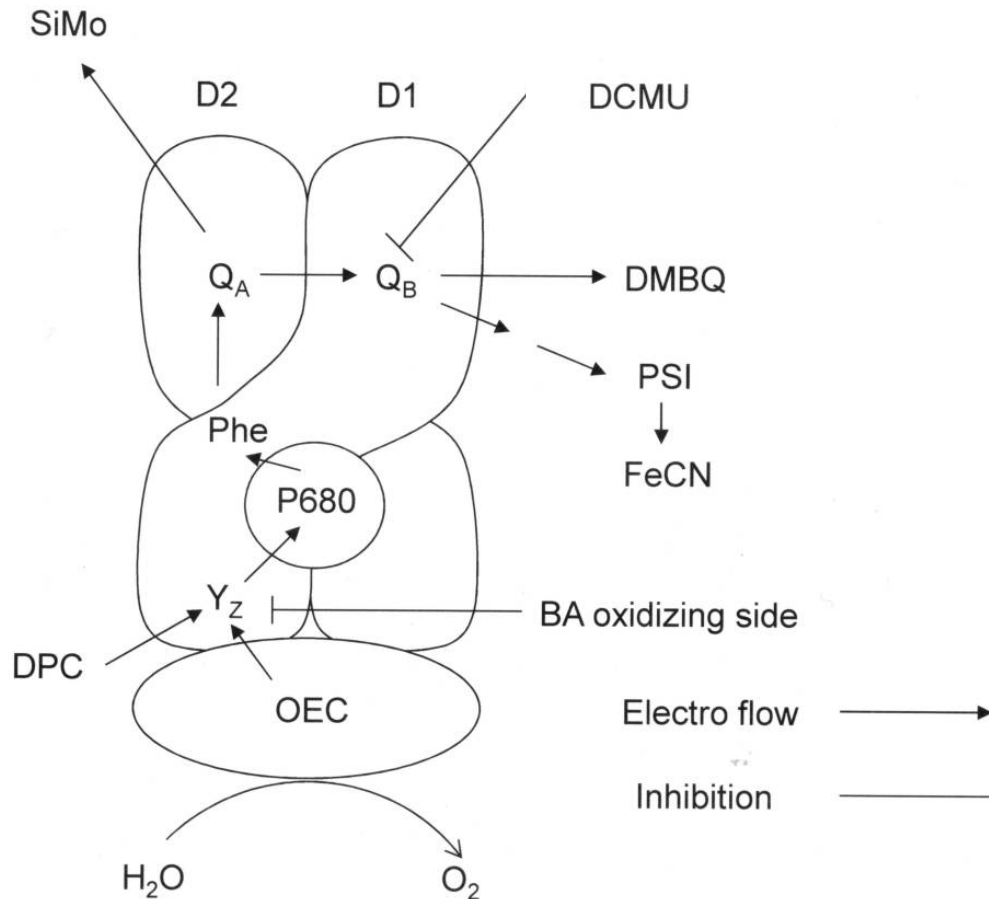


図 2-6 実験に用いた人工電子伝達系—電子の流れと阻害部位
 電子供与体と電子受容体を用いた人工電子伝達系と barbatic acid (BA) と dichlorophenyl dimethyl urea (DCMU) による阻害部位を表している。DPC : diphenylcarbazide、SiMo : silicomolibdate、DMBQ : dimethylbenzoquinone、FeCN : フェリシアン化物、OEC : 酸素発生複合体、Yz : チロシン残基、Phe : pheophytin。

1. 実験材料と実験方法

1) チラコイド膜の調製

材料として購入直後の新鮮なホウレンソウの葉を使用した。Asada *et al.* (1990) の方法により無傷葉緑体を葉から単離した。単離した葉緑体を、バッファーA (2 mM MgCl₂、1 mM MnCl₂、2 mM EDTA、30 mM KCl、0.25 mM KH₂PO₄、50 mM HEPES、pH 7.6) の液中で浸透圧により破裂させた (Endo *et al.* 1997)。遠心分離 (10000 × g, 10 分) によりチラコイド膜を沈殿させ、300 mM ソルビトールを含むバッファーA の中で再懸濁した。

2) PS II 膜の調製とトリス処理

Triton X-100 処理でチラコイド膜から PSII 膜を調製した (Ford & Evance 1983)。バッファーB (10 mM CaCl₂、0.4 M sucrose、50 mM MES-NaOH、pH 6.5) で PS II 膜 (1 mg Chl ml⁻¹) を懸濁し、0.8 M Tris-HCl、pH 9.0 のバ

ッファーの中で、30 分間低温（氷の上で）放置した。遠心分離（1000 x g、10 分）の後得られたペレットを、バッファーBの中で再懸濁した（Yamashita & Butler 1969）。

3) 地衣成分の準備

和光純薬から購入した usnic acid を使用する前に再結晶した。秋田県立大学山本教授より *Cladia aggregata* から単離した barbatic acid、*Usnea longissima* から単離した evernic acid と diffractaic acid、*Sphaerophorus melanocarpus* から単離した sphaerophorin の提供を受けた。明治薬科大学高橋教授より *Hypogymnia physodes* から単離した atranorin と *Nephroma arcticum* から単離した nephroarctin の提供を受けた。千葉大学山崎教授より *Solorina crocea* から単離した methyl gyrophorate の提供を受けた。

4) クロロフィル蛍光測定

クロロフィル蛍光測定には、PAM-2000 蛍光測定装置（Walz Effeltrich, Germany）を用いた。測光用セルの中のチラコイド懸濁液（5 $\mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ）を、測定の間穏やかに攪拌した。蛍光測定装置についている光ファイバーをセルの側面に取り付けた。クロロフィル蛍光のパラメーターには van Kooten & Snel（1990）の表記法を使用した。クロロフィル蛍光のクエンチング分析の理論的基礎は、Schreiber *et al.*の論文（1993 & 1995）に従った。酸素発生を、Clake タイプの酸素電極（Hansatech, Kings Lynn, England）で、飽和白色光（1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ）のもとで測定した。

2. 実験結果

1) barbatic acid による光合成電子伝達の阻害

クロロフィル蛍光を指標にして、水から FeCN への光合成電子伝達における barbatic acid の影響を調べた結果を図 2-7 に示した。ハウレンソウのチラコイド膜懸濁液に低濃度（10 μM ）の barbatic acid を加えた場合、光照射下で定常状態にあるクロロフィル蛍光（F）は増加した。この F の増加により、光照射下での光化学系の量子収率を表すパラメーター $(F_m' - F)/F_m'$ は減少した（Genty *et al.* 1989）。また、高濃度の barbatic acid がチラコイド膜懸濁液の中に存在する場合、暗所適応後の F_m と最大量子収率を示すパラメーター F_v/F_m もまた劇的に減少した。このタイプの変化は、P680 の酸化側が阻害されたときにしばしば観察された（Govindjee 1995、Kawamoto *et al.* 1995）。

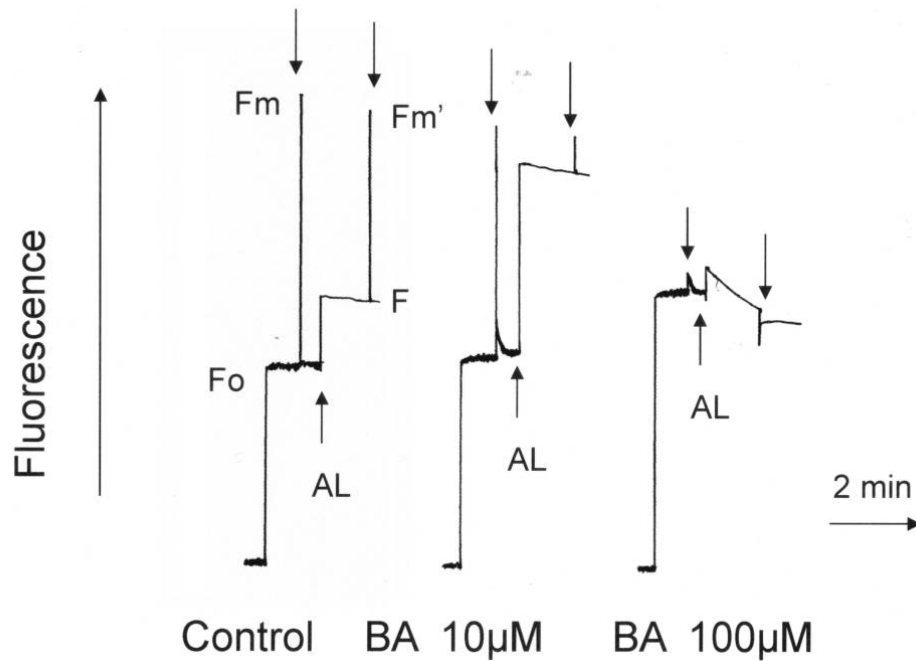


図 2-7 ホウレンソウチラコイド膜での蛍光誘導における barbatic acid の影響
 チラコイド膜 (クロロフィル 10 μg)、nigericine 1 μM 、FeCN 0.5 mM を含むバッファ-A の懸濁液 (2 ml) を用い蛍光レベルを測定した。Fo：測定光照射下の蛍光レベル、AL：作用光 (650 nm、100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$)、下向き矢印：飽和閃光 (2000 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$)、飽和閃光により Fm や Fm' を誘導する。

2) P680 の還元側の阻害

低濃度の barbatic acid による P680 の還元側での阻害が PS II 複合体の中にあるかどうか調べるため、電子受容体として FeCN の代わりに DMBQ をチラコイドに加えた。DMBQ は、PS II で 2 番目のキノン受容体 (Q_B) から電子を受け取る。10 μM の barbatic acid の添加によってクロロフィル蛍光の急速な増加が観察された (図 2-8)。これは、阻害部位が PSII 複合体の中にあることを示している。

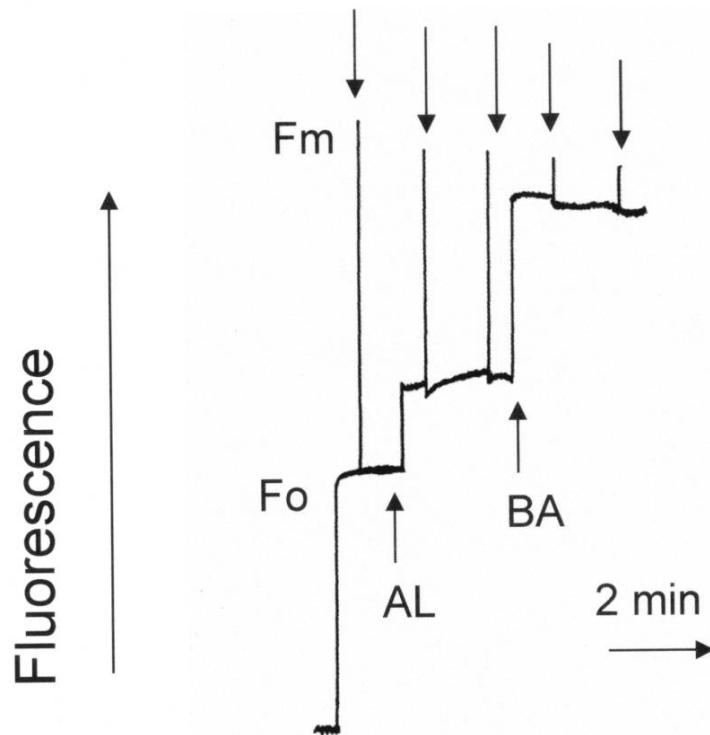


図 2-8 PSII 膜での蛍光誘導における barbatic acid (BA) の影響

実験は、基本的には図 2-7 と同じである。電子受容体として FeCN の代わりに DMBQ 0.5 mM を用いた。また、barbatic acid は 10 μM を用いた。Fo : 測定光照射下の蛍光レベル、AL : 作用光 (650 nm、100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$)、下向き矢印 : 飽和閃光 (2000 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$)、飽和閃光により Fm や Fm' を誘導する。

還元側の阻害が Q_A の上流側か下流側かを調べるため、 Q_A からのみ電子を受け取る SiMo を使って酸素発生の測定を行った結果を表 2-1 に示した。 Q_A からの電子は、SiMo を通過して FeCN に運ばれる (Giaquinta & Dilley 1975)。このとき Q_B の典型的な阻害剤である DCMU を用い、10 μM の barbatic acid を添加したとき、水から FeCN への電子伝達に関連する酸素発生は完全には阻害されなかった。DCMU 0.5 μM 存在下でも Q_B を通過する電子伝達の漏れが同程度あり、10 μM の barbatic acid 存在下で、SiMo が関係する電子の流れがかなりの量 (表 2-1 (A)-(B)) 観察されたことから、主な阻害部位は、 Q_A の下流であることが予想された。しかし、DCMU 存在下での SiMo が関与する電子の流れは、barbatic acid 存在下での電子の流れよりも大きいことから、barbatic acid では Q_A やその上流でも少し阻害があることがわかった。

表 2-1 SiMo を用いた人工電子伝達系における barbatic acid (BA) と DCMU の酸素発生活性に及ぼす影響

クロロフィル 10 μg 、nigericine 1 μM 、FeCN 0.5 mM、SiMo 20 μM を含むバッファーB の懸濁液 (1 ml) を用いた。阻害剤として barbatic acid 10 μM 、DCMU 0.5 μM を使用した。数値は 3 回の測定の前平均 \pm 標準偏差であり、Control の値を 100% ($450 \mu\text{molO}_2(\text{mgChl})^{-1} \text{h}^{-1}$) とした相対値で表す。

	-SiMo		+SiMo		(B)-(A)
	(A)		(B)		
Control	100	± 10.5	n.d.		
BA	7.7	± 2.19	33	± 3.8	25
DCMU	5.1	± 1.68	43	± 2.3	38

3) P680 の酸化側の阻害

暗所適応後の F_v/F_m に影響する阻害部位が、酸素発生複合体にあるのかあるいは D1 タンパク質の中にあるのかどうかを調べた (図 2-9) (Endo *et al.* 1998)。まず、PS II 膜をトリス処理して、酸素複合体を外し、水または DPC (Yz への電子供与体) \rightarrow Yz \rightarrow P680⁺ \rightarrow pheophytin \rightarrow Q_A \rightarrow Q_B \rightarrow DMBQ の人工電子伝達系を作製し蛍光測定を行った。DPC がいない場合、トリス処理された PSII では酸素発生複合体の欠落により、P680⁺ へ電子が供与されないため、大変低い F_v/F_m が観察された (図 2-9 control/(a)) (Yamashita & Butler 1969)。D1 タンパク質の 160 番目のチロシン残基 Yz は、酸素発生複合体と P680 の電子伝達の仲介をしており (Debus *et al.* 1988、Metz *et al.* 1989)、Yz への電子供与体 DPC を加えることによって、 F_v/F_m の値が増加した (図 2-9 control/(b))。このことから DPC は Yz を経由して P680⁺ に電子を供与したことがわかった。ここで、さらに 100 μM の barbatic acid を添加すると、再び F_v/F_m は低下した (図 2-9 control/(c))。この結果は P680⁺ への電子の供与が止まったことを示した。また、barbatic acid による阻害が Yz か Yz の下流であることがわかった (SiMo 存在下での酸素活性や蛍光を調べることにより、詳しく解析をしていくことができる)。ここで想定された 2 つの阻害部位 (P680 の還元側、酸化側) を、この研究で人工的な電子伝達物質 (DPC、SiMo) によって誘導される電子の流れと併せて図 2-6 に図解した。

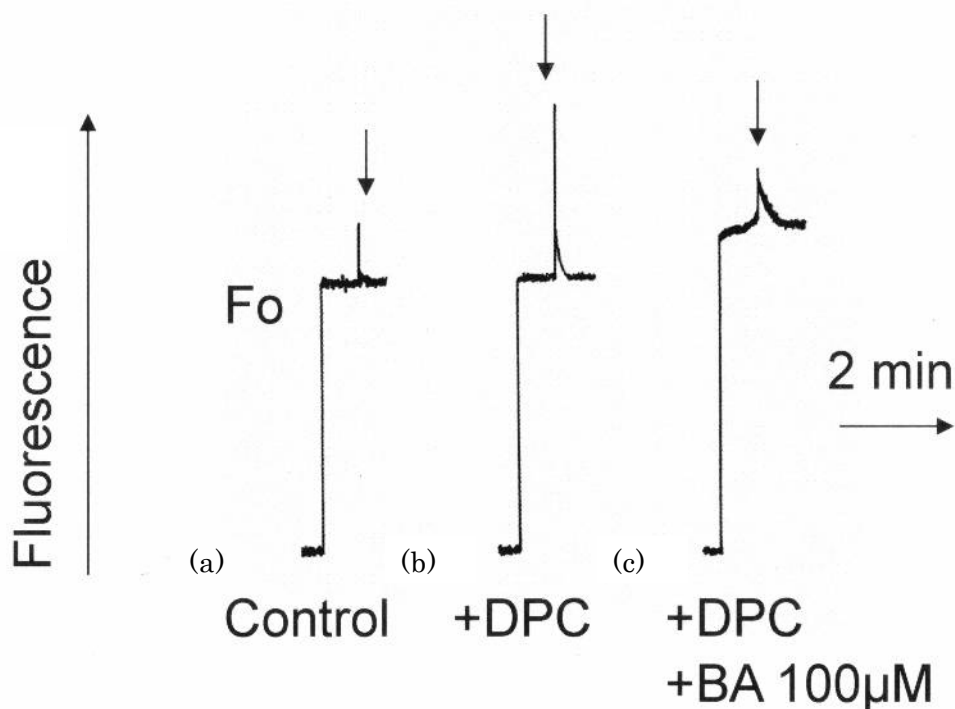


図 2-9 トリス処理した PSII 膜での蛍光誘導 DPC と barbatic acid (BA) の影響
 PSII (クロロフィル 2 µg) と DMBQ 0.4 mM を含むバッファ-B の懸濁液 (2 ml) を用いて蛍光レベルを測定した。Fo: 測定光照射下の蛍光レベル、下向きの矢印: 飽和閃光 ($2000 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$)、飽和閃光により Fm を誘導した。

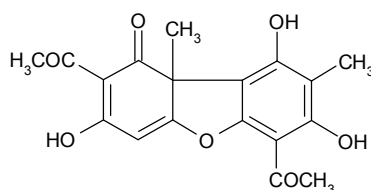
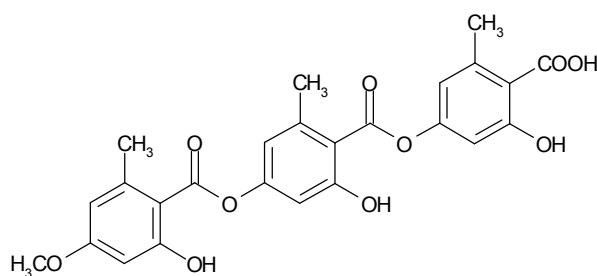
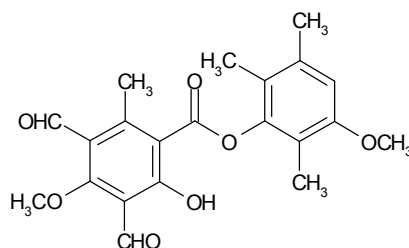
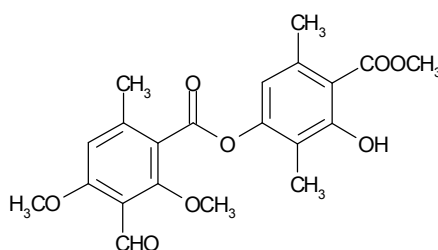
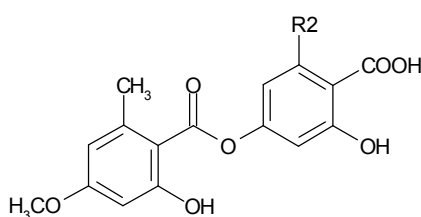
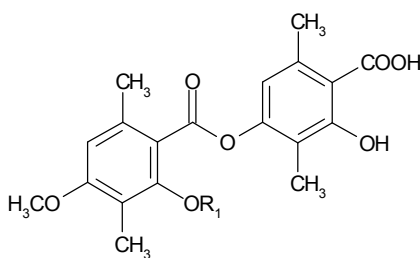
4) 他の地衣成分による阻害

種々の地衣類から単離された barbatic acid と他の関連物質 (地衣成分) の阻害効果をプローブとしてクロロフィル蛍光を使って比較した (表 2-2)。P680 の還元側の阻害を表している $(F_m' - F)/F_m'$ の I_{50} と酸化側の阻害を表している F_v/F_m の I_{50} は図 2-10 の阻害曲線から求めた。2 つの depside 類の atranorin と nephroarctin と tridepside 類の methyl gyrophorate は、どのような阻害活性も示さなかった。測定された化合物の中で、barbatic acid は P680 の還元側と酸化側での最も強い阻害剤であった。evernic acid は、還元側で強い阻害を示したが、酸化側ではより弱い阻害を示した。対照的に、sphaerophorin は還元側では中程度の阻害を示し、酸化側ではより強い阻害を示した。Usnic acid は還元側で中程度の阻害を示し、酸化側ではより弱い阻害を示した。

表 2-2 は、地衣成分による P680 の酸化側と還元側の阻害の指標となる $(F_m' - F)/F_m'$ と F_v/F_m の半阻害濃度を示す。

表 2-2 地衣成分による P680 の酸化側と還元側の阻害の指標となる(Fm-Fo)/Fm と Fv/Fm の半阻害濃度

Lichen substances	(Fm'-F)/Fm'	Fv/Fm
Barbatic acid (R ₁ =H)	2.2	25
DiffRACTAIC acid (R ₁ =CH ₃)	29	82
Evernic acid (R ₂ =CH ₃)	5.7	210
Sphaerophorin (R ₂ =C ₇ H ₁₅)	28	31
Atranorin	>400	>400
Nephroarctin	>400	>400
Methyl gyrophorate	>700	>700
Usnic acid	28	>60



3. 考察

1) 地衣成分の化学構造と阻害の関係

PAM 蛍光測定装置を使って、最初に **barbatic acid** による光合成電子伝達系での阻害を調べると、P680 の酸化側と還元側の両方が阻害を受けることがわかった。さらに阻害部位を特定していくために、人工的電子伝達系を作製し、電子供与体と電子受容体を用い実験を行うことにより、還元側では、 Q_B 部位だけでなく Q_A 部位のあたりも少し阻害を受けていること、酸化側では、Yz 付近が阻害されることがわかった。このように、**barbatic acid** により阻害される部位が 1ヶ所だけでなく、複数ヶ所にまたがっている。多くの除草剤は、植物の光合成を阻害し、その最初の標的が Q_B 部位であることは、よく知られている (佐藤 1992)。疎水性領域と窒素 (電子が不足した SP^2 原子に結合している) の 1 個の電子対は triazines、置換した尿素、triazonone、uracil などの Q_B に作用する除草剤の重要な構造的要素であることが報告されている (Shigematsu *et al.* 1989a)。しかし、**barbatic acid** はこれらの構造的要素を持っていないことから、**barbatic acid** の阻害様式は上記のようなよく知られた除草剤の阻害様式とは異なることが考えられる。

また、実験で示された還元側と酸化側の阻害は、**barbatic acid** 処理されたチラコイド膜を遠心分離し、新しいバッファーの中で再懸濁しても回復しなかった。暗所で **barbatic acid** を含むバッファーで懸濁し **barbatic acid** を含まないバッファーで洗浄した場合も、光条件下で同じ処理をした場合と同レベルの阻害を示した。これらの結果は、**barbatic acid** による阻害は標的部位への不可逆的な結合によること、そしてこの結合の過程 (作用) には、光は必要ではないことを示している。

barbatic acid を含む 8 種の地衣成分について、光合成電子伝達系での PAM 蛍光測定装置を用いた実験では、それぞれの化合物は還元側での I_{50} と酸化側の I_{50} の比が異なっていたことから、地衣成分の種類により 2 つの阻害部位での阻害様式が異なっていることが示唆された。**barbatic acid** の S リング (表 2-2 の R1) の 2 番目の位置の水素原子をメチル基に置き換えると **diffractaic acid** になり、そしてこの置換が還元側での阻害活性を劇的に変えた。**evernic acid** と **sphaerophorin** の A リングのアルキル基の鎖も長さの違い (A リングの R2 の部位) は特に、酸化側の阻害に影響しており、このことは A リングの疎水性が阻害の重要な要因であることを示している。**diffractaic acid** はレタスの幼植物では **barbatic acid** や **evernic acid** より強い阻害活性があることが報告 (Nishitoba 1987) されているが、本研究では (還元側、酸化側) 両方の側でより弱い阻害活性を示した。**usnic acid** はレタスの幼植物では重要な阻害剤ではないと報告 (Nishitoba 1987) されているが、本実験では還元側で中程度の阻害を示した。同じように、Inoue *et al.* (1987) はハウレンソウチラコイド膜を用いた光合成阻害実験で **usnic acid** (dibenzofurane 類) が Yz 付近に結合することにより PSII の酸化側で電子伝達を阻害することを報告している。これらの食い違いは、それぞれの化合物 (地衣成分) に対する細胞膜と葉緑体包

膜の透過性の違いに起因しているかもしれない。あるいは、今回の実験では見つけることができなかった阻害部位が PS II の近くにあるかもしれない。3 つ目の可能性として、植物種によって地衣成分が異なった反応をしているとも考えられる。depside 類のアレロパシー効果を評価するためには、細胞レベルや植物体での阻害実験が重要である。

2) クロロフィル蛍光測定法の優位性

上記の結果のように、barbatic acid について蛍光測定法と酸素電極を用いた実験を別々に行った場合 (図 2-10)、光照射下での量子収率を示す $\Delta F/F_m'$ と酸素発生阻害曲線が同じ範囲にあり、半阻害濃度もそれぞれ $2.2 \mu\text{M}$ 、 $1.2 \mu\text{M}$ と同程度であることから、量子収率を示す $\Delta F/F_m'$ が酸素電極を用いた酸素発生と対応していることがわかった。PS II の阻害評価において、クロロフィル蛍光クエンチング分析法が酸素発生測定より有利な点は、1 回の測定で P680 の酸化側と還元側をモニターすることができることである。

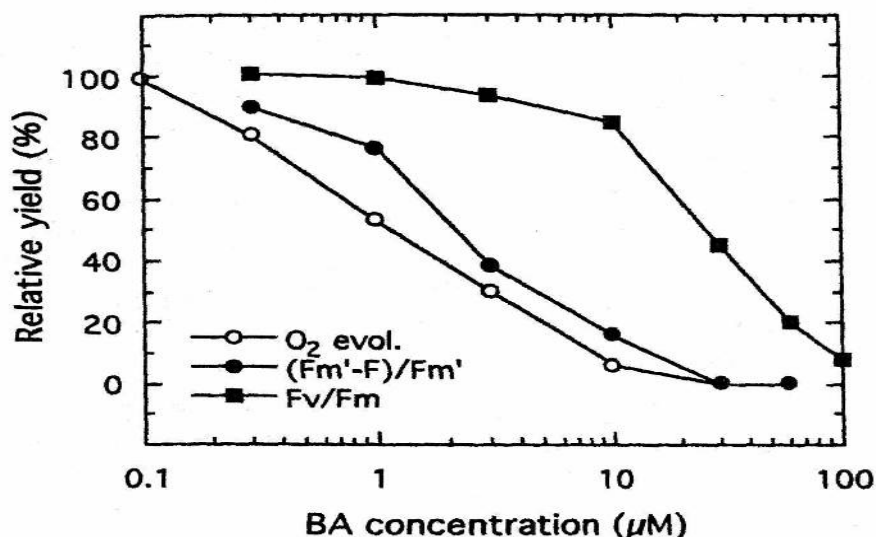


図 2-10 濃度依存性酸素発生活性およびクロロフィル蛍光量子収率に対する barbatic acid (BA) の阻害

数値は barbatic acid 無添加時の値を 100 とした相対値で表した。

$(100\%)(F_m' - F)/F_m' = 0.430$ $(100\%)F_v/F_m = 0.625$ 酸素発生 $620 \mu\text{mol O}_2(\text{mg Chl})^{-1}\text{h}^{-1}$

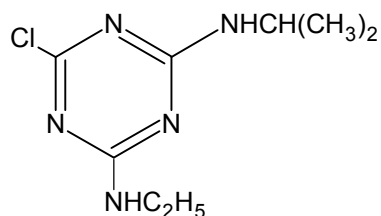
第 2 章の実験では典型的な地衣成分であるデプシド類の barbatic acid によるホウレンソウチラコイド膜を用いた光合成電子伝達系での阻害について、P680 の酸化側だけでなく還元側も含め詳しく調べてきた。その結果、電子伝達系において P680 の酸化側では usnic acid の場合と同じように Yz か Yz の下流が阻害されること、還元側では、 Q_A の下流 (Q_B まで) でおもに阻害されること、また Q_A の上流でも少し阻害されることが明らかになった。このように、電子伝達系での阻害部位については、ある程度絞り込むことができたが、barbatic acid がどのように電子伝達系に結合し阻害しているのか不明である。Shigematsu *et al.* は、*psbA* 遺伝子 (D1) に変異を持つ atrazine 耐性タバコ細胞を用い農薬の

phenylurea について研究を進め、その結合様式について解析を行い、結合モデルを発表した (1989a)。第 3 章ではこの研究を参考に atrazine 耐性タバコ細胞を用い、barbatic acid について光合成電子伝達系での結合様式について解析を進めることにした。

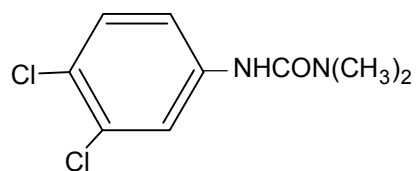
第3章 光合成電子伝達系での地衣成分による阻害部位・阻害様式の検討 ～atrazine 耐性タバコ細胞 PSII 膜を用いて～

はじめに

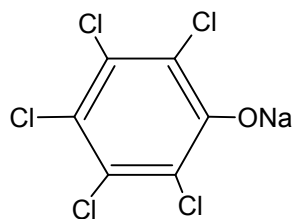
第2章では、PAM 蛍光測定装置を用いて、主要な地衣成分である **barbatic acid** やそれに関連する地衣成分が、P680 の酸化側の *psbA* ポリペプチドの 161 番目の Thr 残基 (Yz) と P680 の還元側 (電子の流れの下流) の 2 番目の電子受容体 (Q_B) あたりの電子伝達を阻害することを初めて示した。また、地衣成分の化学組成と光合成阻害の比較を行い、特に化学構造のよく似た地衣成分について半阻害濃度を調べた結果、一部の構造の違いが大きな阻害の違いを引き起こしていることを明らかにした。例えば、**barbatic acid** の S リングの 2 番目の位置の水素原子がメチル基に置き換えると **diffRACTaic acid** になり、この置換により還元側での阻害活性が劇的に変わることも明らかにした。地衣成分の他の植物種等への影響については、発芽抑制、生長阻害、光合成阻害等が研究されているが、特に光合成阻害については、光合成の低下等についての研究が主でチラコイド電子伝達系での阻害部位の記述は限られていた。その一例が **Inoue et al.** (1986) の報告で、彼らは **usnic acid** がホウレンソウ葉緑体の PS II の酸化側 (電子の流れの上流) を阻害することを明らかにした。第2章では、人工的電子伝達系を作製し、地衣成分の阻害部位について述べたが、PS II の酸化側と還元側の両方の阻害の方法はよく知られていないため、第3章では、農業に使用されている除草剤の光合成阻害剤を用い、**barbatic acid** との阻害の比較検討を行った。一般に使用されている除草剤はその生理作用により、①植物ホルモン作用の攪乱、②エネルギー代謝阻害、③細胞分裂阻害とタンパク質生合成阻害、④光合成阻害、⑤光活性化、⑥アミノ酸生合成阻の6つに分類できる。この中で除草剤として光合成阻害剤が多く使用されている(日本農薬学会 1996)。光合成阻害剤についてはトリアジン系(atrazine など)、ウレア系(DCMU など)、フェノール系(PCP、Dinoseb など)に大きく分類される(図 3-1)。



atrazine



DCMU



PCP

図 3-1 光合成阻害剤

アトラジン耐性植物のチラコイドにおける電子伝達は、トリアジン系除草剤には非感受性であるが、ウレア系除草剤には野生株と同程度の感受性を示し、フェノールタイプ系の除草剤には逆に高い感受性を示す(米山 1991)。Shigematsu *et al.*はD1タンパク質をコードする *psbA* に変異を持つアトラジン耐性タバコ培養細胞を用いて光合成阻害を持つ除草剤の阻害活性・阻害様式について研究を行った(1989a)。地衣成分の多くはベンゼン環にヒドロキシル基をもつフェノール類である。第3章では、Shigematsu *et al.*の研究を参考に、barbatic acid とフェノール系除草剤で広く研究に使用されている Dinoseb を用いて、atrazine 耐性タバコ培養細胞における阻害活性を調べ、atrazine 耐性タバコ培養細胞が barbatic acid に対して野生型より高い感受性を示したことから、barbatic acid がフェノール系除草剤の Dinoseb と同じような働きをしている可能性について検討し、また、その阻害様式についても検討を行った。

1. 実験材料及び実験方法

1) タバコ培養細胞

atrazine 耐性株 (B 株、D 株) と野生型株のタバコ培養細胞 (NI、*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) を使用した。蛍光灯 ($50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) 下、Murashige & Skoog 培地を改変した培地でタバコ培養細胞を培養した。生長期の培養細胞を実験に使用した。

2) チラコイド PS II 膜

培養細胞をミキサー (Ace Homogenizer AM-8 Nihonseiki Japan) で 1500 rpm、3 秒間で 3 回使用し、細かく破碎した。バッファーAには 2 mM MgCl_2 、20mM KCl、50mM HEPES、0.4 M sucrose (pH 7.6) を使用した。葉緑体を一連の遠心分離 (350 x g、2 分間、後 2000 x g、10 分間) によって沈殿させた。葉緑体包膜を浸透圧ショックによって破裂させた後、チラコイドを 2000 x g で 15 分間遠心により沈殿させ、10 mM の NH_4Cl を追加したバッファーA 中で再懸濁した。

3) barbatic acid および除草剤 Dinoseb (図 3-2)

Cladia aggregata から単離した barbatic acid を、秋田県立大学山本教授から提供を受けた。また、Dinoseb は和光製薬 (大阪、日本) から購入した。

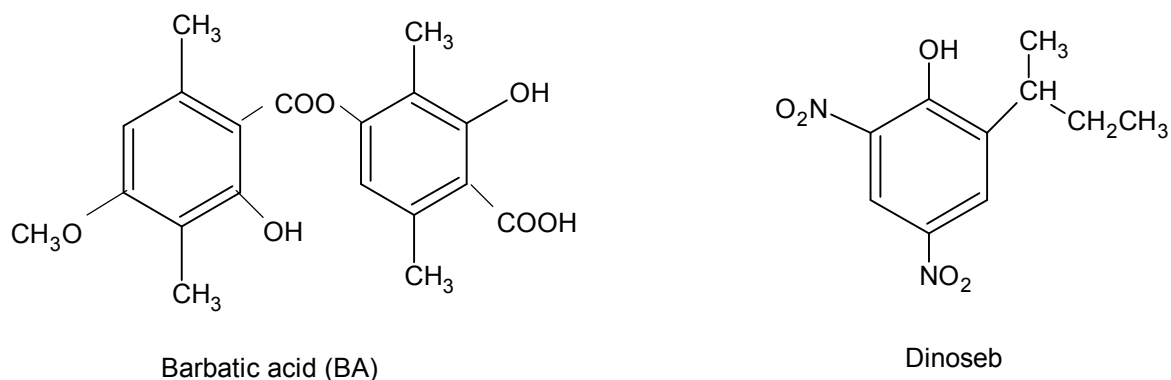


図 3-2 Barbatic acid と Dinoseb の構造式

4) PAM 蛍光測定装置を用いた測定

チラコイド ($5 \mu\text{g}$ クロロフィル/ml) を準備し、PAM2000 蛍光測定装置 (Walt 社、Effertrich、ドイツ) により光合成活性を調べた。第 2 章で説明したように、クロロフィル蛍光のクエンチング分析法を用い、PS II での阻害部位について、新しい手法を開発した。PS II の還元側の阻害の指標として、弱い光 ($5\text{-}30 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) 照射下で測定した $(F_m' - F) / F_m'$ を使用した。一方、P680 の酸化側の阻害の指標として、 F_o が一定かほんのわずかに増加した場合、暗条件で測定した F_m を使用した。さらに研究を進め、還元側の阻害部位は、 Q_B 結合部位であるのに対して、酸化側の阻害部位は、 Y_z 残基付近であることが明らかになった。

2. 実験結果

1) barbatic acid による光合成阻害

クロロフィル蛍光分析法を用いて (Endo *et al.* 1998)、atrazine 耐性タバコ細胞の 2 系統 (B 株および D 株、Sato *et al.* 1988) についてチラコイド膜電子伝達での barbatic acid の影響について調べた。図 3-3 に示されるように、高濃度の barbatic acid の添加により、タバコ培養細胞の atrazine 耐性培養細胞でも野生型株の培養細胞でも F_v / F_m ($(F_m - F_o) / F_m$) が減少した。

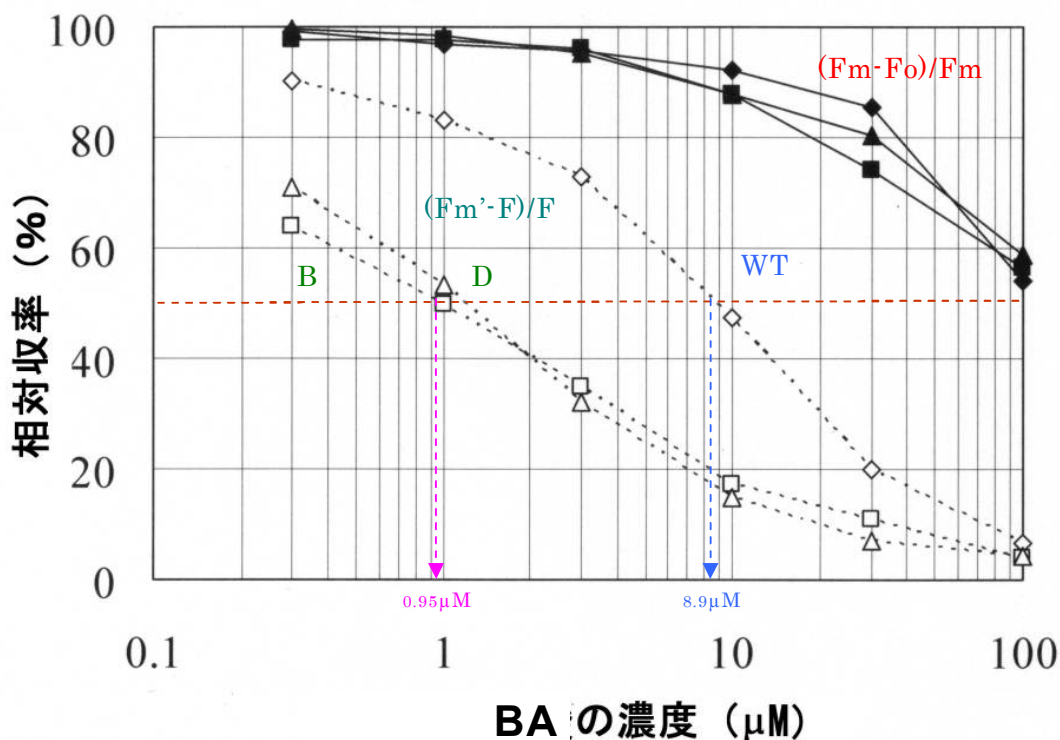


図 3-3 barbatic acid の濃度と量子収率の変化

縦軸の量子収率は、barbatic acid 無添加時の量子収率を 100 としたときの相対値で表した。◆■▲：(Fm-Fo)/Fm、◇□□：(Fm'-F)/Fm'、◆◇：タバコ野生株、■□：タバコ atrazine 耐性株 (B)、▲△：タバコ atrazine 耐性株 (D)。

阻害を調べた図 3-3 は、barbatic acid による Yz 付近の電子伝達での半阻害濃度が野生型株細胞でも atrazine 耐性細胞株でも、100 μM 以上であることを示した。対照的に、 $\Delta F/Fm'$ ((Fm'-F)/Fm') が減少したことから、Yz より Q_B で電子伝達をより強く阻害したこともわかった。あわせて、barbatic acid による Q_B 付近での阻害は、野生株での半阻害濃度は 8.9 μM、atrazine 耐性株 B、D では 0.95 μM、1.1 μM から atrazine 耐性培養細胞株では、野生型株より低い濃度で起こることが明らかになった。 Q_B 付近での半阻害濃度の比較から、atrazine 耐性細胞 B および D 株はそれぞれ野生型株より 9.4 倍、8.8 倍の感受性を示した。

2) 除草剤 (フェノール系) Dinoseb による光合成阻害

atrazine 耐性植物細胞はフェノールタイプの除草剤に対して非常に高い感受性を持つことが知られている (Shigematsu *et al.* 1989b)。barbatic acid がフェノールタイプの除草剤と同じような作用機構を持つかどうか調べるため、atrazine 耐性を持つタバコ変異株 (B 株および D 株) について、典型的なフェノールタイプ除草剤の Dinoseb による阻害を調べた。野生株での半阻害濃度は 2.2 μM、atrazine 耐性株 B、D では 0.23 μM、0.30 μM であり、両変異細胞は Dinoseb に対して、barbatic acid の場合と同様に、P680 の還元側で高い感受性を示した (図 3-4)。トリス処理されたホウレンソウの PS II 膜での DPC から

DMBQ への電子伝達の阻害結果から、P680 の酸化側での Dinoseb による阻害は、酸素発生システムの間所ではなく、むしろチロシン 161 (Yz) 近くの D1 であることを示唆した。この阻害様式は、barbatic acid の場合と同様であった。barbatic acid はフェノールタイプの除草剤のように、タバコ細胞に対して同じタイプの阻害を示すことが考えられた。

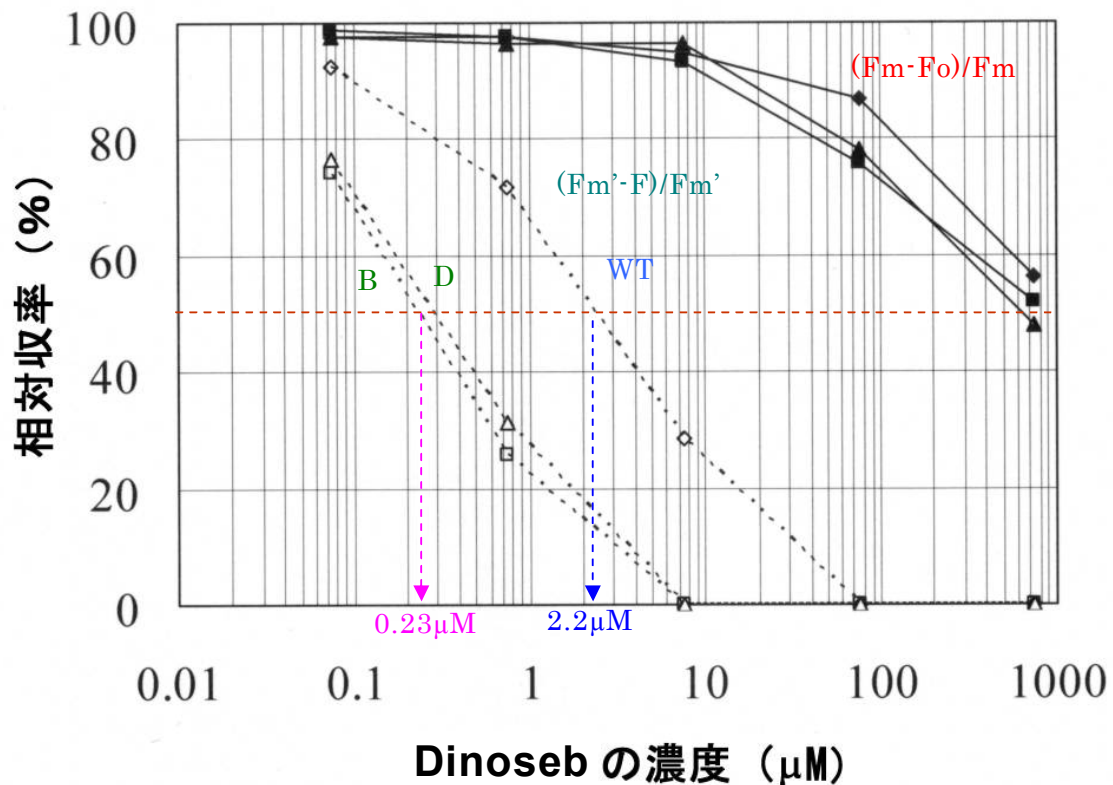


図 3-4. Dinoseb の濃度と量子収率の変化

縦軸の量子収率は、Dinoseb 無添加時の量子収率を 100 としたときの相対値で表した。◆■▲：(Fm-Fo)/Fm、◇□□：(Fm'-F)/Fm'、◆◇：タバコ野生株、■□：タバコ atrazine 耐性株 (B)、▲△：タバコ atrazine 耐性株 (D)。

3. 考察

1) atrazine 耐性タバコ細胞 *psbA* 遺伝子の変異と阻害

タバコ B 細胞株の *psbA* 遺伝子の配列は、多くの atrazine 耐性雑草がセリン (AGT) からグリシン (GGT) への変異を持つのにに対して、タバコ D 細胞株と同じ変異 (264 番目の位置がセリン (AGT) からスレオニン (ACT) に変異) を持つことが明らかである (Hirshberg & McIntosh 1983、Hirshberg *et al.* 1984、Bettini *et al.* 1987、Schoenfeld *et al.* 1987)。 *psbA* 遺伝子の 264 番目の位置にスレオニン変異をもつ atrazine 耐性タバコ細胞株は atrazine タイプの除草剤だけでなく、尿素タイプの除草剤に対して耐性を持つ (Sato *et al.* 1988) ので、これらの変異により barbatic acid に対して野生型株より高い感受性を示すことから、barbatic acid は atrazine タイプの除草剤や尿素タイプの除草剤と

は異なった作用様式を持つことが明らかになった。これらの除草剤は、barbatic acid と同じように Q_B 付近の電子伝達を阻害することが知られている。

2) barbatic acid および除草剤の結合様式のモデル

これまで P680 還元側でのフェノールタイプの除草剤の正確な結合様式は明らかにされていない。シアノバクテリア *Synechocystis* で D1 タンパク質の 266 番目のアスパラギンがスレオニンに置換している ioxynil (ニトリル系除草剤) に耐性を持つ変異種の解析から (Ajani *et al.* 1989)、 Q_B 結合部位はフェノールタイプの除草剤だけでなく、phenylurea、triazine、triazinone、そして uracil タイプの除草剤などの結合部位でもあることが示された。Shigematsu *et al.*

(1989a) が明らかにしたフェニール尿素に関するこれまでのモデルはフェノールタイプの除草剤の結合モデルを考える上で基礎となる。強い疎水性の相互作用は除草剤の結合に十分である。

第3章の実験では、先ず barbatic acid とフェノールタイプの除草剤 Dinoseb についてタバコ培養細胞を用い光合成阻害活性を調べ、barbatic acid が Dinoseb の場合と同様の阻害を示したことから、barbatic acid はタバコ細胞に対してフェノール系除草剤と同じタイプの阻害をすることが示唆された。

地衣成分による阻害様式については、Shigematsu *et al.* らの研究 (1989a) での D1 タンパク質でのフェニール尿素による阻害モデル(図 3-5)から、barbatic acid についても同様に D1 タンパク質の 214 番目の Met, 255 番目の Phe での疎水性スポットでの強い疎水相互作用と 1 つの水素結合により Q_B に結合しているモデルを考えることができる。

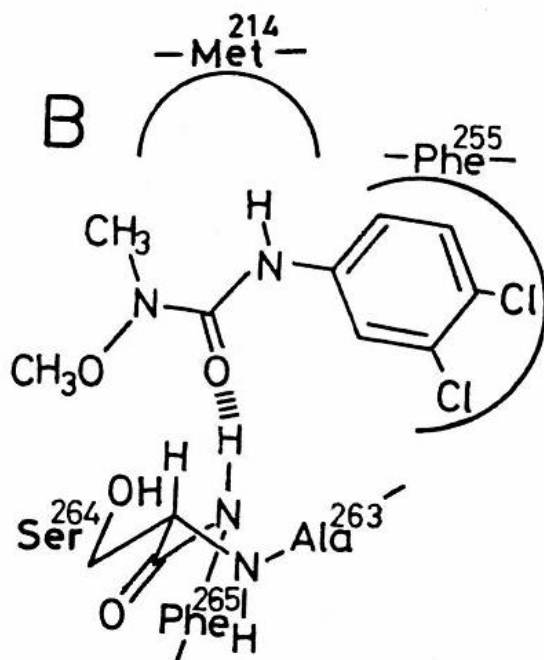


図 3-5 D1 タンパク質へのフェニール尿素の結合モデル(Shigematsu 1989a)

3) barbatic acid の除草剤としての可能性

今回の実験で使用した barbatic acid は、地衣成分の中でも usnic acid、evernic acid などと同じように代表的な地衣成分の一つである。 *Cladia aggregata* では多く含まれている。タバコ培養細胞で行った実験から、barbatic acid が除草剤の Dinoseb と同程度の光合成阻害した。Dinoseb は除草剤としては 1962 年に登録され、メヒシバ、スベリヒユ等に適用される接触型の除草剤で豆、亜麻等の畑や牧草地等で土壌処理により施用させられている（植村ら 2006）。今回の研究で barbatic acid は Dinoseb と同じようにタバコ培養細胞で光合成電子伝達系の還元側 Q_B を強く阻害することを示した。今後、作物、雑草等での阻害実験、人畜への影響調査等を行うことにより、除草剤として活用を検討して行くことも考えられる。

現在、植物が生産する二次代謝産物（天然の化学物質）が他の生物の生命現象に阻害的あるいは促進的な影響を与えることが知られており、現在多くの植物からの二次代謝産物について、作用機構の解明、農業現場での実用化に向けての研究が進められているが、実用化されているものは少ない。その問題点として、化学合成農薬に比べて、作用が弱く、また有効成分の抽出に費用がかかり、価格が高くなる等が挙げられる（多和田真吉 2004）。地衣類の二次代謝産物については、生物阻害についての基礎研究が中心で、農薬などへの応用研究は行われていない。今後、地衣類の生産する二次代謝産物が農薬の新しい可能性を切り開く可能性がある。

これまでの研究（2 章、3 章）では、地衣成分について電子伝達系での阻害部位、阻害様式について調べてきた。第 4 章では、地衣共生藻を含め色々な植物種について地衣成分による光合成電子伝達系での阻害を調べ、植物種による違いについて検討を行い、生態での地衣成分のはたらきについての解明の足がかりとした。

第4章 地衣成分による阻害の影響について 植物種による違い～ 地衣共生藻と他の植物種との違いについて比較検討～

はじめに

序論で述べたように、地衣類の二次代謝産物である地衣成分は、現在約 400 種類が報告されている。その多くは **depside** 類、**depsidone** 類、**dibenzofuran** 類に分類されている (Huneck & Yoshimura 1996)。地衣成分の生物への影響 (阻害) については、これまで多くの研究者が研究を行い報告している。対象は、微生物、昆虫、藻類、蘚苔類、高等植物などである。初期の研究は主に生物の生長への影響 (阻害) について行われた。近年になり光合成生物の光合成への影響についての研究が行われるようになってきた。その結果、光合成生物の生長阻害に大きく関係しているのが光合成電子伝達系であることがわかってきた。例えば、電子伝達システムへの地衣成分による阻害の研究では、Inoue *et al.* (1986) は、地衣成分がホウレンソウの葉緑体で **PS II** の酸化側を阻害することを示した。Rojas *et al.* (2000) は **lecanoric acid** による光合成阻害のターゲットが水分分解酵素であることを確認した。これらの研究は、地衣成分による植物での生育阻害の主なターゲットは、光合成電子伝達であることを示している。私は、自然環境において、生き残りのために近接する生物との競合で、地衣成分の影響があるかどうか関心を持っている。第2章では、地衣成分の阻害様式を決定するため、モデル化合物として典型的な **depside** 類である **barbatic acid (BA)** を使い、ホウレンソウのチラコイド膜での地衣成分による阻害を調べた。その結果、**PS II** の **Q_B** 部位が **BA** による最初のターゲットであること、**Yz (P680)** の酸化側の水分分解酵素ではない) は、また、より高い濃度の **BA** で阻害されることを見いだした。さらにクロロフィル蛍光のパラメータである **(Fm'-F)/Fm'** と **(Fm-Fo)/Fm** が、それぞれ **P680** の還元側と酸化側の **PS II** 阻害の指標として使うことができることを見いだした。このことから、構造に関連のある **depside** 類が、**P680** の還元側と酸化側を阻害することから、両サイドでの阻害は **depside** 類に共通であることが示唆された。しかし、これらの **depside** 類の化学構造は、よく知られている **PS II** の阻害剤のいずれとも関連がない。また、**depside** 類の阻害様式は明らかにされていない。そこで、第3章では、タバコ培養細胞の **atrazine** 耐性系を使って、**BA** による電子伝達システムでの阻害のメカニズムを研究した。**BA** による阻害様式はフェノール系の除草剤と同じである可能性が示唆された。これらの結果をもとに、第4章では、地衣成分による **PS II** 阻害に対する耐性について、地衣共生藻と他の光合成生物との間で比較検討を行った。

1. 実験材料および実験方法

1) 植物の材料と細胞培養

①タバコ培養細胞および苔類培養細胞



Nicotiana tabacua



Marchantia paleacea

タバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum* cv. *Sumsun NN NI*: 野生型) を $10\ \mu\text{M}$ naphthalenacetic acid、 $1\ \mu\text{M}$ kinetin、3% sucrose を追補した Murashige-Skoog 培地で培養した (Murashige & Skoog 1962)。雌の無性芽の培養物から独自に誘導した苔類細胞 (*Marchantia paleacea*) は 1M51 培地で培養した (Gamborg *et al.* 1968)。タバコと苔類の培養細胞をロータリー振盪器 (80 rpm) 上、蛍光灯 ($50\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) 下、 25°C で光従属栄養的に培養した。培養細胞を 1 mm のステンレスメッシュで大きな細胞塊を濾過し、測定に使用した。

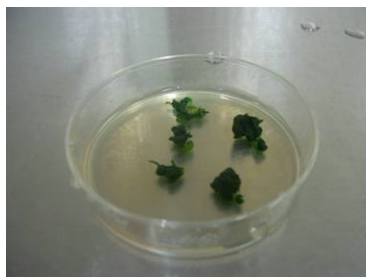
② *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii c-9 (IAM collection、東京大学) をロータリー振盪器 (100 rpm) 上、蛍光灯 ($200\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) 下、 25°C 、2% CO_2 条件のもと、Orth *et al.* (1966) の培地で光従属栄養的に培養した。

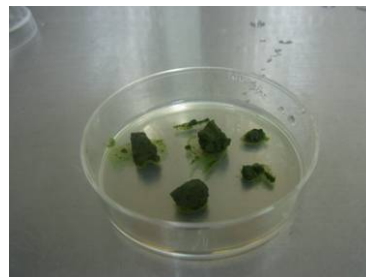


Chlamydomonas reinhardtii

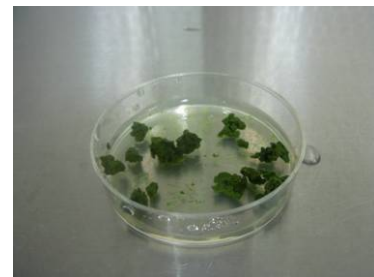
2) 地衣類材料と細胞培養



Trebouxia impressa



Trebouxia sp.



Trebouxia excentirca

材料とした *Trebouxia impressa* は *Ramalina siliquosa* から、*Trebouxia* sp. は *R. litoralis* から、各々第 1 章に述べた方法で分離された。また、秋田県立大学山本教授より、同じく山本法 (1985) によって *Cladonia vulcani* から分離した *T. excentrica* の提供を受けた。それら共生藻を、2% sucrose、1% peptone

(Ahmadjian 1993c) を加えた BBM 培地 (Deason *et al.* 1960) に移し、ロータリー振盪器 (100 rpm) 上、蛍光灯 ($40 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) 下、 25°C で、光従属栄養的に培養した。

3) チラコイド膜の準備

増殖期のタバコと苔類の培養細胞を、 20 mM KCl 、 $10 \text{ mM NH}_4\text{Cl}$ 、 50 mM HEPES-NaOH 、 0.4 M sucrose (pH 7.6) を含む懸濁液に懸濁し、ホモゲナイザー (西沢製、大阪) を用いて、 $15,000 \text{ rpm}$ で 3 秒、3 回の操作により、細胞破碎した。その後、懸濁液を $350 \times g$ で 2 分間遠心分離した。上清に含まれる葉緑体を、遠心分離 ($2,000 \times g$ 、15 分間) し、sucrose を含まない懸濁液に再懸濁した。この操作により、葉緑体包膜を浸透圧的に破裂させた。チラコイドを遠心分離 ($2,000 \times g$ 、15 分間) によって沈殿させ、チラコイドを含む沈殿物を測定のための均質化バッファーの中に再懸濁した。

増殖期の *Chlamydomonas reinhardtii* と 3 種の地衣共生藻の細胞を均質化バッファーの中に懸濁した。それらをビーズビーター (Biospec Products Bartvile, OK) で、最大スピード、 0°C 、1 分間、細かく破碎した。その後、 $2,000 \times g$ で 2 分間、遠心分離を行い、チラコイド膜を含む上清を実験に使用した。

4) 地衣成分

usnic acid は、和光薬品株式会社 (大阪) から購入し、再結晶化後使用した。秋田県立大学山本教授より *Cladia aggregata* から単離した barbatic acid、*Usnea longissima* から単離した diffractaic acid と evernic acid、*Ramalina siliquosa* から単離した salazinic acid の提供を受けた。使用した地衣成分の化学構造を図 4-1 に示した。

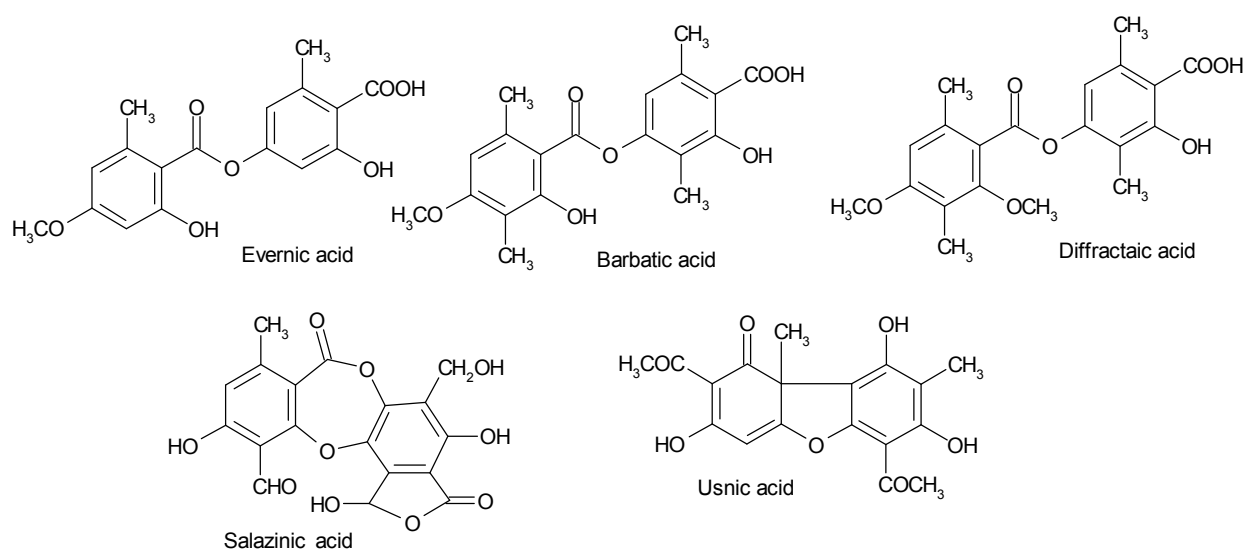


図 4-1 地衣成分の構造式

5) クロロフィル蛍光の測定

PAM2000 蛍光測定器 (Walz Efferttrich, Germany) でクロロフィル蛍光を測定した。細胞またはチラコイド膜 (5 μg クロロフィル/ml) を、地衣成分を含む 10 $\text{m}\mu\text{M}$ の nigeracine を添加した 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.1) に懸濁し、その後、少なくとも 30 分間暗所に静置し、蛍光測定した。チラコイド膜における測定では、電子受容体として 0.2 mM の 2,6-dimethylbenzoquinone (DMBQ) を使用した。

蛍光パラメータ、 $(F_m - F_o)/F_m$ と $(F_m' - F)/F_m'$ を各々暗条件、光照射下 (5-30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$) で測定した。正確な F_o レベルを決めるため、測定光を当てる際、 Q_A の光化学還元が現れないように、十分に弱くし、細心の注意を払った (Endo *et al.* 2005)。具体的には、測定前の調製で、測定光照射下で、DCMU 添加により F_o レベルの如何なる増加も誘導しないことを確かめた。地衣成分の溶解度は、細胞バッファー (pH 7.1) とチラコイドバッファー (pH 7.6) の間で変化しなかった。半阻害濃度 (I_{50}) は、図 4-2B に示すように、阻害曲線から計算した。グラフは、地衣成分の濃度を 5 段階にし、それぞれの濃度で $(F_m - F_o)/F_m$ と $(F_m' - F)/F_m'$ を 3 回測定して求めた。

2. 実験結果

1) クロロフィル蛍光クエンチング分析法による光合成電子伝達での地衣成分の効果

PS II の阻害評価において、クロロフィル蛍光クエンチング分析法が酸素発生測定より有利な点は、1 回の測定で酸化側と還元側をモニターすることができることである。この方法の信頼性を別々に行った酸素発生とクエンチング分析法によって得られた阻害曲線を比較することにより確かめた。苔類のチラコイド膜における barbatic acid の存在の有無によるクロロフィル蛍光の典型的な誘導結果を図 4-2A に示した。barbatic acid が適度な濃度 (10 μM) のとき、作用光照射下での安定したクロロフィル蛍光 (F) のレベルは、barbatic acid 無添加に比べて増加した。 F が増加したために、PS II の光化学量子収量を表しているパラメータ $(F_m' - F)/F_m'$ が減少した。このパラメータは、これまでにハウレンソウのチラコイドで確認されたように、P680 還元側の barbatic acid による阻害を示した。高濃度の barbatic acid (100 μM) を加えた場合、 F_o の増加と F_m の減少が観察された。その結果、暗条件下での PS II の光化学収量を表しているパラメータ $(F_m - F_o)/F_m$ の減少が見られた。このタイプの変化は、P680 の酸化側が阻害された場合に観察される。

ハウレンソウのトリス処理されたチラコイド膜の場合、diphenyl-carbazide から DMBQ への電子伝達が barbatic acid によって阻害された。これはドナー側の阻害の標的が D1 タンパクの Yz 残基付近であることを示している。barbatic acid による容量依存性阻害曲線を図 4-2B に示した。このことから、還元側の電子伝達は、barbatic acid に対して、酸化側より感受性が明らかに高いことがわかった。これは、光合成電子伝達全体の中で、還元側が barbatic acid 誘導の阻

害の第一の標的であることを示している。

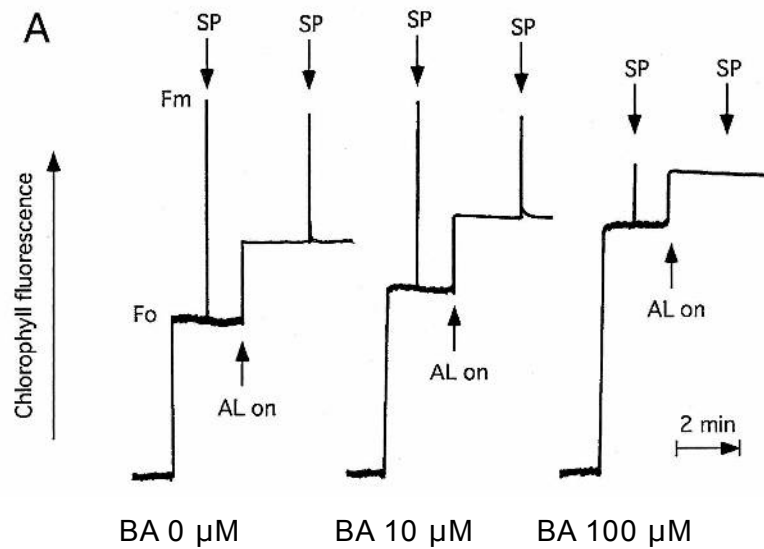


図 4-2A 苔類のチラコイド膜での蛍光誘導における barbatic acid (BA) の影響
クロロフィル蛍光の図、測定光を照射して Fo レベルの蛍光を得た。赤色作用光 (AL、 $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$) により PS II での光化学反応が誘導され、その結果 F レベルの蛍光を得た。白色飽和光 (1 秒) の照射により Fm と Fm' が得られた。

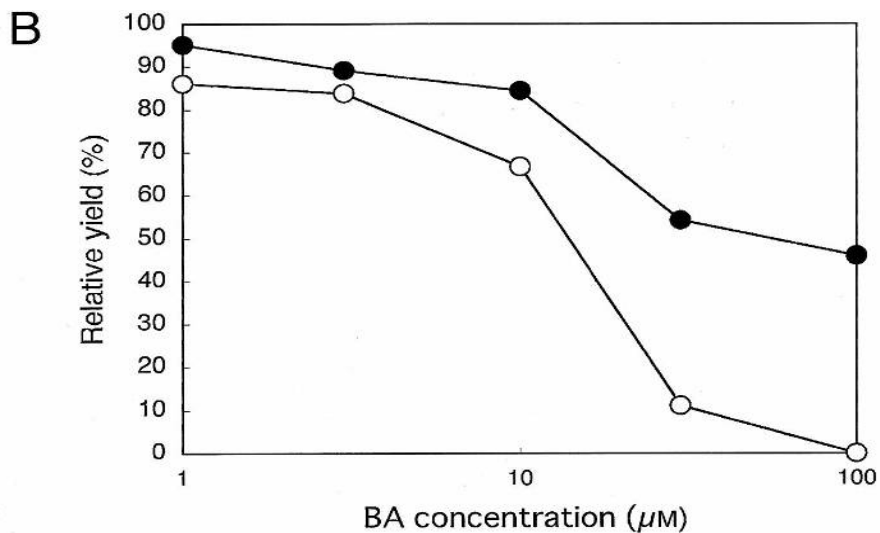


図 4-2B barbatic acid (BA) 投与の濃度と量子収率の変化

縦軸の量子収率は、barbatic acid 無添加時の量子収率を 100 としたときの相対値で表した。P680 の酸化側、還元側での barbatic acid による阻害は、光化学パラメータ $(F_m - F_o)/F_m$: (●)、 $(F_m' - F)/F_m'$: (○) の減少により表される。

2) P680 還元側における地衣成分による阻害

表 4-1 光合成生物（植物種）の P680 還元側における地衣成分による半阻害濃度（ μM ）

		Barbatic acid	Diffraetaic acid	Evernic acid	Salazinic acid	Usnic acid
<i>Nicotiana tabacum</i>	Thylakoid	8.9	100	17	>1000	170
	Cell	47	180	120	>1000	120
	Cell/Thylakoid	5.3	1.8	9.1		0.71
<i>Marchantia paleacea</i>	Thylakoid	14.0	97	45	>1000	330
	Cell	33	100	53	>1000	93
	Cell/Thylakoid	2.4	1.0	1.2		0.28
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Thylakoid	15.0	90	23	>1000	310
	Cell	>100	130	250	>1000	140
	Cell/Thylakoid	>7	1.4	11		0.45
<i>Trebouxia impressa</i>	Thylakoid	7.1	94	35	>1000	200
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	>600
	Cell/Thylakoid	>14	>11	>29		>3.0
<i>Trebouxia</i> sp.	Thylakoid	4.5	80	25	>1000	160
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	>600
	Cell/Thylakoid	>22	>13	>40		>3.8
<i>T. excentrica</i>	Thylakoid	7.5	120	30	>1000	20
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	>600
	Cell/Thylakoid	>13	>8	>33		>30

上述したように、クロロフィル蛍光クエンチング分析法を用い、5種の地衣成分による P680 の還元側の電子伝達の半阻害濃度を調べた（表 4-1）。最初、地衣共生藻、*Trebouxia* 3種と他の光合成生物 3種、free-living 緑藻の *Chlamydomonas reinhardtii*、タバコ培養細胞（*Nicotiana tabacum* cv. *Sumsun* NN NI:野生型）、苔類（*Marchantia paleacea*）培養細胞での阻害について、各々から分離したチラコイド膜で比較をした。チラコイドレベルでは、地衣成分による阻害は、酸化側と還元側の双方とも、地衣共生藻 3種と他の光合成生物 3種との間での明瞭な差異はなかった。実験結果では、barbatic acid が地衣成分の中で、最も強い阻害剤であった。その次が evernic acid であった。diffraetaic acid と usnic acid は、還元側の阻害にはさらに高い濃度が必要であった。対照的に salazinic acid は 1 mM でも阻害を示さなかった。

3) 細胞レベルとチラコイドレベルでの阻害の比較

細胞レベルで、P680 の還元側での半阻害濃度を比較した。チラコイドレベルでの阻害とは対照的に、地衣共生藻 3種と他の比較のための光合成生物 3種（*Chlamydomonas*、苔類培養細胞、タバコ培養細胞）とで著しい差異が見られた。3種の地衣共生藻での阻害効果は、反応緩衝液で溶かすことができる最も高い濃度でも観察できなかつた。しかし、比較のための他の光合成生物 3種では、salazinic acid は例外として、他の地衣成分では相当レベルの阻害を示した。

細胞レベルとチラコイドレベルでの阻害の比を表 4-1 に示した。3種すべての地衣共生藻では、細胞／チラコイドの比は、実験に使用したすべての地衣成分で 3 以上を示した。また、細胞／チラコイドの大きな比を示したのは、タバコ

培養細胞と *Chlamydomonas* で、barbatic acid と evernic acid について見られた。対照的に、苔類培養細胞では、細胞レベルとチラコイドレベルとでの差異は見られなかった。5種の地衣成分が3種の他の光合成生物に及ぼす阻害の程度を比較すると、それらの地衣成分は、4つのグループに分類された。すなわち、(i) barbatic acid と evernic acid は細胞／チラコイドの大きな比を示した。(ii) diffractaic acid では、細胞／チラコイドは約1を示した。(iii) usnic acid は、1より小さな値を示した。(iv) salazinic acid は、阻害を示さなかった。

4) P680の酸化側での阻害

表 4-2 光合成生物（植物種）の P680 酸化側における地衣成分による半阻害濃度（ μM ）

		Barbatic acid	Diffractaic acid	Evernic acid	Salazinic acid	Usnic acid
<i>Nicotiana tabacum</i>	Thylakoid	>100	430	400	>1000	>600
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	430
	Cell/Thylakoid		>2.3	>2.5		<0.72
<i>Marchantia paleacea</i>	Thylakoid	54	180	400	>1000	>600
	Cell	97	220	420	>1000	>600
	Cell/Thylakoid	1.8	1.2	1.1		
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Thylakoid	>100	160	300	>1000	560
	Cell	>100	160	350	>1000	140
	Cell/Thylakoid		1.0	1.2		0.25
<i>Trebouxia impressa</i>	Thylakoid	25	260	220	>1000	>600
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	>600
	Cell/Thylakoid	>4.0	>3.8	>4.5		
<i>Trebouxia</i> sp.	Thylakoid	25	250	130	>1000	290
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	>600
	Cell/Thylakoid	>4.0	>4.0	>7.7		>2.1
<i>T. excentrica</i>	Thylakoid	56	330	300	>1000	>600
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	>600
	Cell/Thylakoid	>1.8	>3.0	>3.3		

チラコイドレベルと細胞レベルでの P680 の酸化側での半阻害濃度を表 4-2 に示した。地衣共生藻と他の光合成生物の間では、チラコイドレベルでは半阻害濃度にはっきりとした違いは見られなかった。しかし、細胞レベルでは、地衣共生藻は、地衣成分が最も高い濃度でも地衣成分による阻害を示さなかった。しかし、比較のために行った他の種ではかなりの阻害を示した。

細胞とチラコイドでの半阻害濃度の比（細胞／チラコイド）は、地衣共生藻とタバコ培養細胞では高く、苔類や *Chlamydomonas* では1前後であった。

3. 考察

1) 光合成系 II は、地衣成分による植物の生長抑制の主な標的か？

上述したように、P680 の還元側は、細胞レベルではチラコイドレベルの場合と同じように、酸化側より地衣成分に対して感受性があった。このことから、光合成電子伝達全体の中で、阻害の最初の標的は、ハウレンソウチラコイド膜の場合と同じように P680 の還元側、おそらく Q_B あたりである。数種の depside

類によるレタスの芽生えでの生長阻害は 10^{-4} から 10^{-3} Mで生じた(Nishitoba *et al.* 1987)。これらの値は、表 4-1 に示された阻害濃度に匹敵した。それゆえ、芽生えの生長を妨げる最初の標的は、呼吸のような重要な生化学反応よりむしろ光合成電子伝達の中の Q_B であると考えられた。同様に、チラコイドレベルでの tridepside の gyrophoric acid と didepside 誘導体の lecanoric acid による光合成電子伝達の半阻害濃度は、種子の発芽や芽生えの生長での半阻害濃度より一桁小さい。このことは、光合成が高等植物での生長阻害に影響を与える最初の標的であるという仮説を支持した。これらの結果は、チラコイドレベルでの tridepside の gyrophoric acid と didepside 誘導体の lecanoric acid に加えて、didepside 類と tridepside 類は、一般に光合成電子伝達での阻害活性があることを示している。しかし、この結果は、非 deposite 型の化合物の場合には当てはまらない。例えば、フェノール酸の誘導体である methyl haematommate は生長と種苗の発芽を阻害したが、電子伝達では、ほとんど効果を示さなかった。Backor *et al.* (1998) は、dibenzofuran である usnic acid が、地衣類の *Cladonia mitis* から分離された共生藻 *Trebouxia irregularis* の生長を阻害することを見いだした。ところが、本研究では、usnic acid による光合成阻害が、細胞レベルで不明瞭であった。このことは、ある程度の量の usnic acid が *C. mitis* の細胞膜を通過し、光合成より重要な代謝を阻害することを意味する。これらの研究は、地衣化合物による生長阻害の最初の標的は、いつも光合成電子伝達であるとはかぎらないことを提示している。地衣類の二次代謝産物のアレロパシーの性質について、はっきりした全体像を得るには、生体内での生長阻害についての広範囲の比較研究が必要である。

2) 地衣成分はアレロパシーとして機能するか？

地衣共生藻は地衣成分に対して耐性があることが本研究で証明された。ところで地衣共生藻のチラコイドでは、これらの地衣化合物に対していかなる耐性も示さなかった。このことから、地衣共生藻は、共生している地衣菌がつくる有毒な deposite 誘導体から自身を守っていると予想される。この現象は、地衣共生藻の細胞膜あるいは葉緑体包膜で deposite 類に対してそれを排除または解毒する仕組みがあることを示唆している。Free-living の緑藻である *Chlamydomonas reinhardtii* は、地衣共生藻の *Trebouxia* と系統発生的に近い関係にあるが、細胞レベルでは地衣成分に対してこのようなバリアーはない。アレロパシー様機能のような細胞レベルのバリアーを考えると、そのようなバリアーが、自然界での生存に関して地衣類の潜在的な競争者である苔類の *Marchantia paleacea* にはないことは、注目すべきことである。換言すれば、地衣類によって合成された地衣成分は簡単に蘚苔類の葉緑体の中に浸透し、生長の阻害剤として作用する。

この推定される細胞バリアーの性質をさらに追求するために、この研究で得られた 2 つの結果について検討を行った。最初、ここで使われた 5 種の地衣成分の中で、唯一 usnic acid だけが、非共生光合成生物の中で、細胞／チラコイ

ドの比が 1 より小さい値を示した。このことは、usnic acid が、チラコイド膜のところで積極的に凝集されているかも知れないことを意味する。usnic acid のこのような性質は、これがアレロパシーを示す化合物として作用しているとき、有利な立場を与えている。2 つ目は、還元側と酸化側での矛盾は、*Marchantia paleacea* の場合に evernic acid について見られた。酸化側の細胞／チラコイドの比は 1.2 であるが、還元側では 11 であった。この 2 つの数値の大きな違いは、約 10^{-5} M の濃度の evernic acid では効率良く排出するが、しかしこれ以上のレベルでは排出できない。そのような細胞でのバリアーがあると考えると説明できる。(ところで、近年生体膜での ATP を利用した ABC(ATP-Binding Cassette)タンパク質の研究が進められ、バクテリアからヒトまで多くの生物において、それぞれ 50 前後の ABC タンパク質が機能していることが明らかになっている。ABC タンパク質の多くは物質の輸送に関わっている。植物が生産する二次代謝産物(アルカロイド類、テルペノイド類、フェノール類に分類)は 5 万種を超える。二次代謝産物の多くは強い生理活性や細胞毒性を持つものが多く、その多くは液胞に輸送されて蓄積する。または細胞外に排出される。このときに ABC タンパク質が関与していることが報告されている(矢崎 2005)。地衣類の共生菌がつくる二次代謝産物(多くはフェノール類)についても、共生する藻類の細胞膜、チラコイド膜において同じように ABC タンパク質(ABC-transporter)が地衣成分の輸送に関与していることが予想される。

ほとんどの地衣 depside 類の疎水的な性質から考えると、depside 類が地衣体から放出され、土壤に高い濃度で集積されると仮定するのは難しい。むしろ、これらのアレロパシー的化合物は、地衣体の表面や岩屑などに集積(Bjelland & Thorseth 2002)し、これらの化合物が地衣体の上で発芽したり、或いは地衣体に極近くで生育している光合成競争者の生育を阻害しているかも知れない(Claudia *et al.* 2013)。この意味で、地衣共生藻の細胞の周囲の濃度は、大変高いので、共生藻によって供給される地衣成分の排出のメカニズムは、生理学的に見て妥当である。

補 予備実験 地衣体からの地衣成分の溶出実験

～地衣成分の水への溶出、土壌地衣成分の分析～

はじめに

第4章では、地衣成分による光合成阻害について細胞レベルについて植物種による違いについて実験を行い、チラコイド膜レベルでは地衣共生藻はタバコ培養細胞、苔類培養細胞、クラミドモナスなど他の植物種と同程度光合成が阻害されたが、細胞レベルでは他の植物種では相当程度阻害されたのに対して地衣共生藻ではほとんど阻害されないことを明らかにした。このことから、地衣共生藻の細胞膜、または葉緑体包膜での地衣成分の排出、解毒する仕組みがあることが予想される。地衣類の二次代謝産物である地衣成分（地衣酸）が近接して生育する他の植物種に対して、その生育を阻害するアレロパシー様の物質として作用している可能性が考えられる。地衣成分は構造的には有機酸であり、その疎水的な性質から水にはほとんど溶けないとされてきた。これまでの地衣成分による発芽阻害、生長阻害の研究で実験に使用された地衣成分は、メタノール、アセトンなどの有機溶媒により抽出したものである。総括の「これからの展望」で述べるように、本研究を受け地衣類の生育地域で地衣成分が、近接して生育している他の植物種に対してその生育を阻害するアレロパシーとして作用していることを調査していく予定である。生態系での調査で地衣成分のアレロパシーとしての作用について否定的な報告(Stark *et al.* 2007)もされているが、その研究例は少ない。地衣類は、樹皮に着生するもの、岩石などに着生するもの、土壌などに見られる地上性のものなどがある。今後、それぞれの地衣類について調査を行っていく予定である。今回予備実験として、地上性の地衣類のトゲシバリ(*Cladia aggregata*)を用い、地衣体下の土壌中地衣成分を調べた。トゲシバリは、群生して生育していることが多く、地衣成分 (barbatic acid) も多く含んでおり、疎水性の強い地衣成分が繰り返しの雨水などにより溶出した場合、土壌中の疎水性物質を調べることにより確認することができる。併せて、実験室においてトゲシバリから水への地衣成分の溶出実験を行った。

1. 実験材料と実験方法

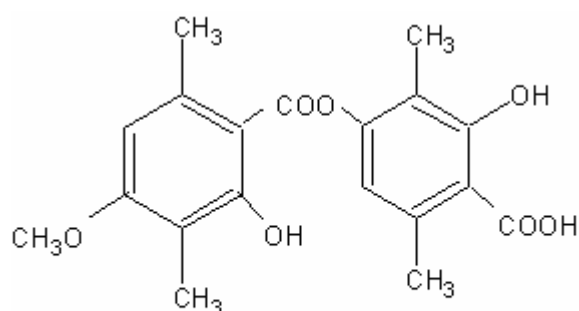
1) トゲシバリからの地衣成分溶出実験

①トゲシバリの採集

地衣成分の溶出実験に用いるトゲシバリは、三重県伊賀市市部の松林で採集した。トゲシバリは、松林の周縁の裸地の乾燥したところで群生していて、地衣体表面は褐色をしていた。採集後常温で保存し、翌日実験に供した。

②トゲシバリがつくる地衣成分

地衣類のつくる地衣成分は、**depside** 類、**depsidone** 類、**dibenzofrane** 類に分類できるが、トゲシバリは代表的な地衣成分の一つである **depside** 類の **barbatic acid** をつくる。



Barbatic acid (BA)

③地衣成分溶出のための buffer の作成

pH4~8 の 5 段階のバッファー (50mM 酢酸 pH4, 50mM Mes pH5, 50mM Mes pH6, 50mM Mes pH7, 50mM Hepes pH8) を作成し、pH の調整は、5N の NaOH を用いた。

④地衣体の振盪

バッファー150ml が入ったビーカー(300ml 用)にトゲシバリ 2g を入れ、振動盪器(30rpm)を用い、20 時間室温・暗条件で振盪させた。バッファーは pH4~8 の 5 段階を用意した。

⑤疎水性物質の吸着と調整

地衣成分は、有機酸であり、疎水的性質が強いが、地衣体の長時間の振盪により地衣成分が溶出した場合、吸着により集めることができる。今回 sep-pack18 を用いて、バッファーから疎水性の物質の吸着を試みた。吸着の操作のあと、3ml の MeOH に溶かし、その内 1ml を 10000g×10 分遠心分離を行い、浮遊物・沈殿物の除去を行い、-20℃暗所で保存した。

⑥HPLC による解析

上記⑤での吸着液 200μl(バッファーpH4~8 の 5 段階)について HPLC (Shimazu CLASS-VP V5.03)にかけて、吸着成分の分析を行った。なお Standard としてトゲシバリ (*Cladia aggregata*)から単離した barbatic acid (秋田県立大学山本教授より提供)20mM (MeOH) を 200μl 用いた。

2) 地衣体下の土壌中の地衣成分の検出実験

①地衣体下の土壌の採取

上記 1.「トゲシバリからの地衣成分溶出実験」で採集した場所の地衣下の土壌について、表面から 0.5mm ほど剥ぎとり、地衣体が混入しないようにしてその下の土壌を深さ上部(0-10mm)、中部(10-20mm)、下部(20-30mm)に分け採取、採取後は日陰で乾燥させ、粉碎後篩にかけ植物の根や小枝を除去した。

②土壌中疎水性成分の溶出

上部、中部、下部と 3 層から採取した各土壌からの土 2.5g をそれぞれ MeOH1ml に溶かし、15000g×10 分遠心分離を行い、上澄みを 20℃・暗条件で保存した。

③HPLCによる解析

上記②での各土壌からの MeOH 溶出液 20 μ l を HPLC (Shimazu CLASS-VP V5.03)にかけて、溶出成分の分析を行った。波長 276nm での吸光度を求めた。カラムに流す時間(保持時間)は 30 分とした。なお Standard としてトゲシバリ(*Cladia aggregata*)から単離した barbatic acid 20 μ M (MeOH) を 20 μ l 用いた。

2. 実験結果

1) 地衣体から水への地衣成分の溶出

トゲシバリがつくる地衣成分 barbatic acid は、吸光度は 276nm で極大になる。今回 standard として用いた HPLC の結果では、保持時間が 20.921 分のところでピークを示した(図 1)。水でのトゲシバリの振盪実験では、pH4 では保持時間が standard と同じ 20.921 分のところにほんの僅かではあるがピークが見られた。pH5,pH6,pH7 では 20.918 分,20.828 分,20.800 分と standard とほとんど同じ所にピークが見られた。pH8 では 21.333 分と standard とは少し離れたところにピークがきた。

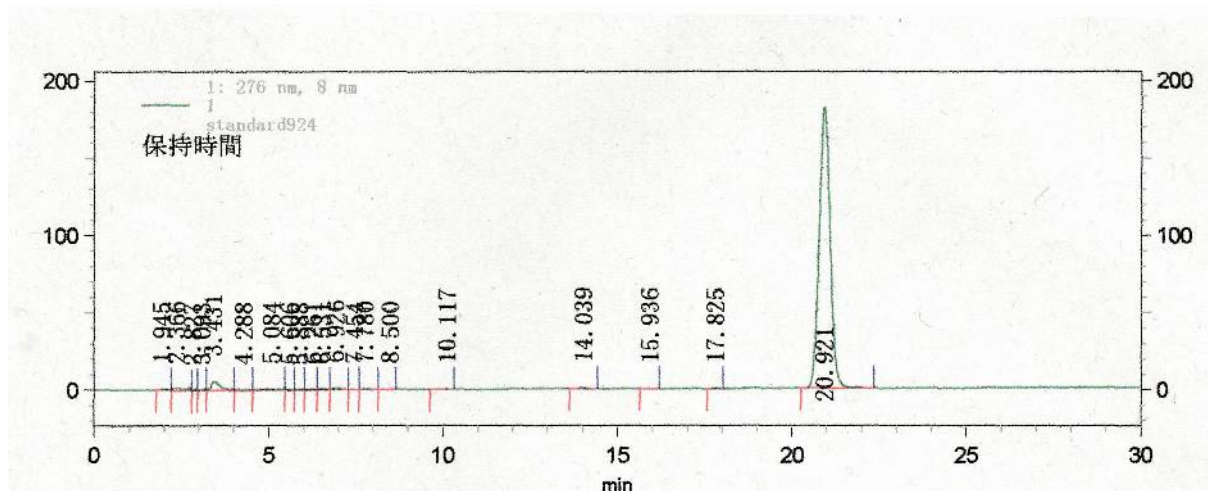


図 1 HPLC trace Standard (barbatic acid)

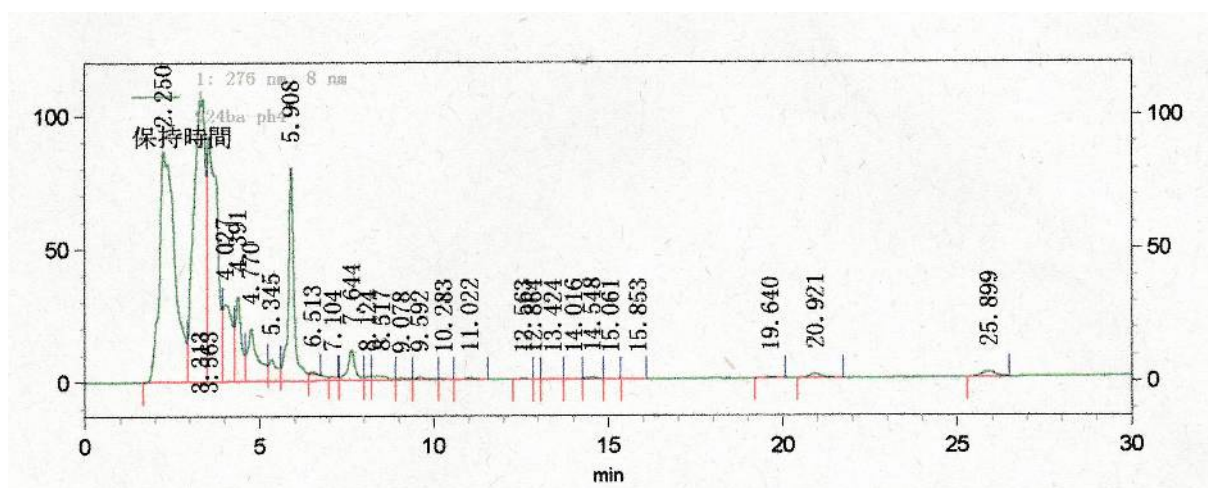


図 2 HPLC trace 水への溶出液(pH4)

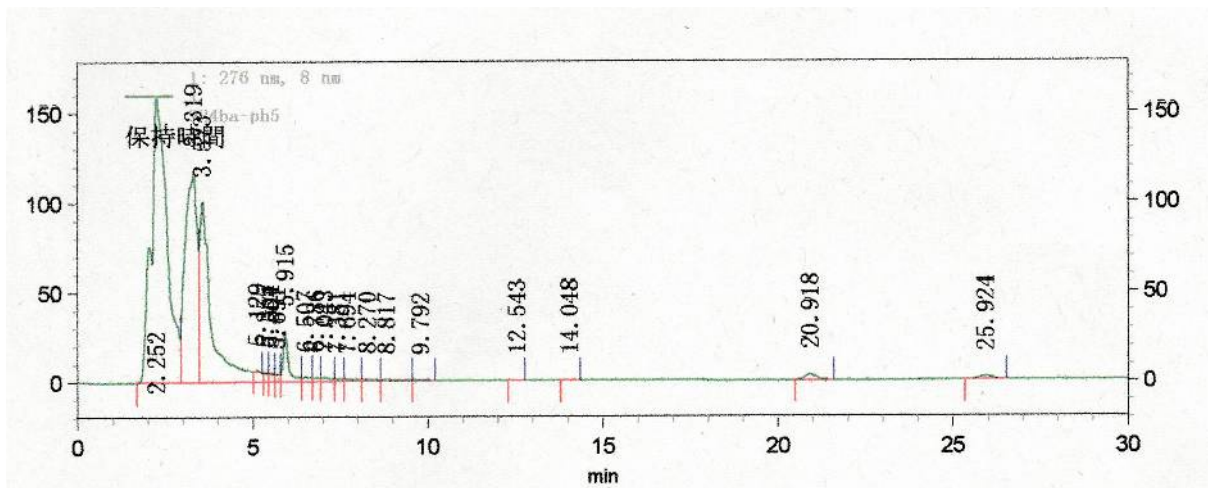


図 5 HPLC trace 水への溶出液(Ph5)

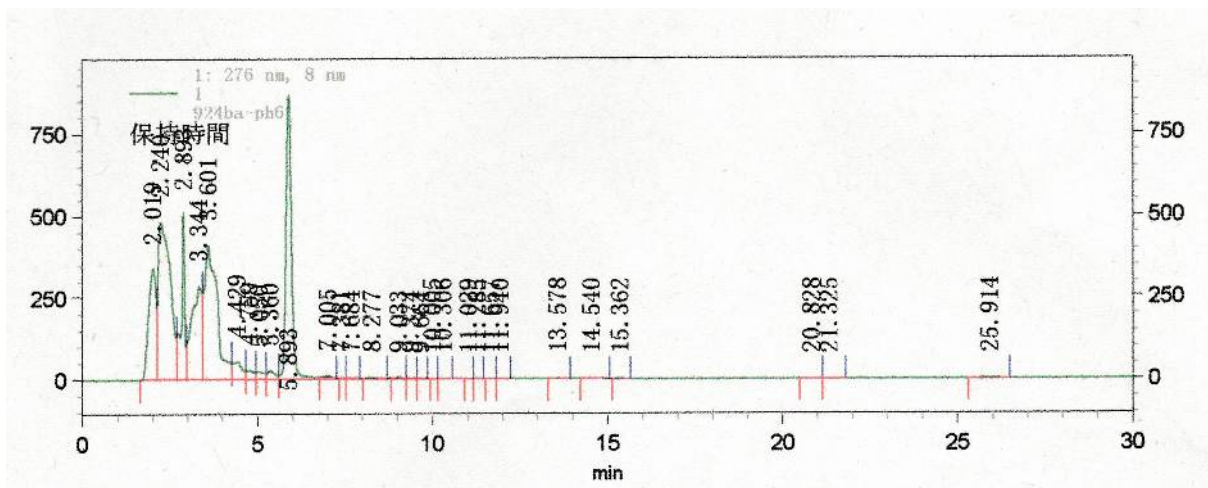


図 6 HPLC trace 水への溶出液(Ph6)

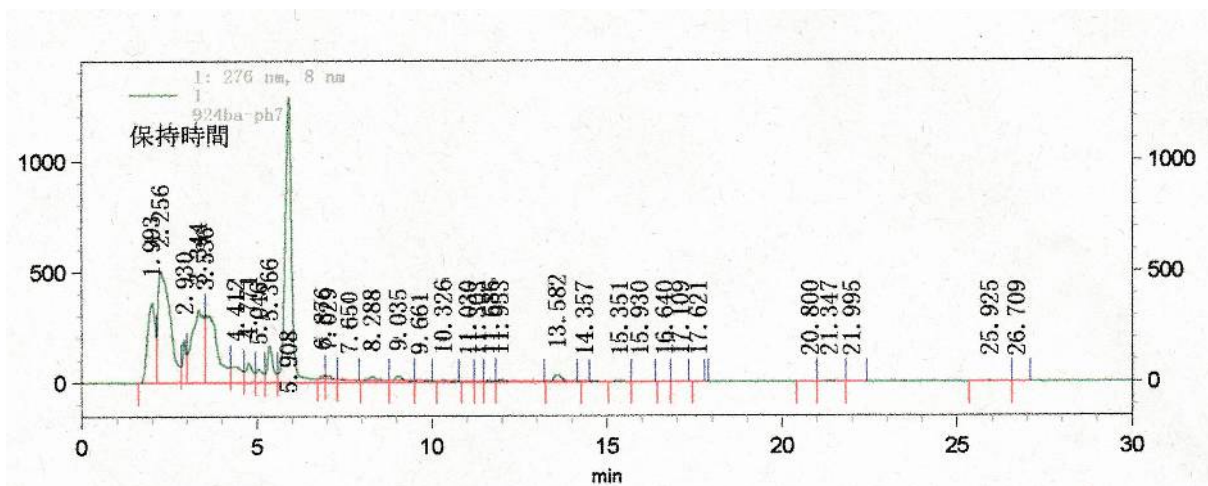


図 7 HPLC trace 水への溶出液(Ph7)

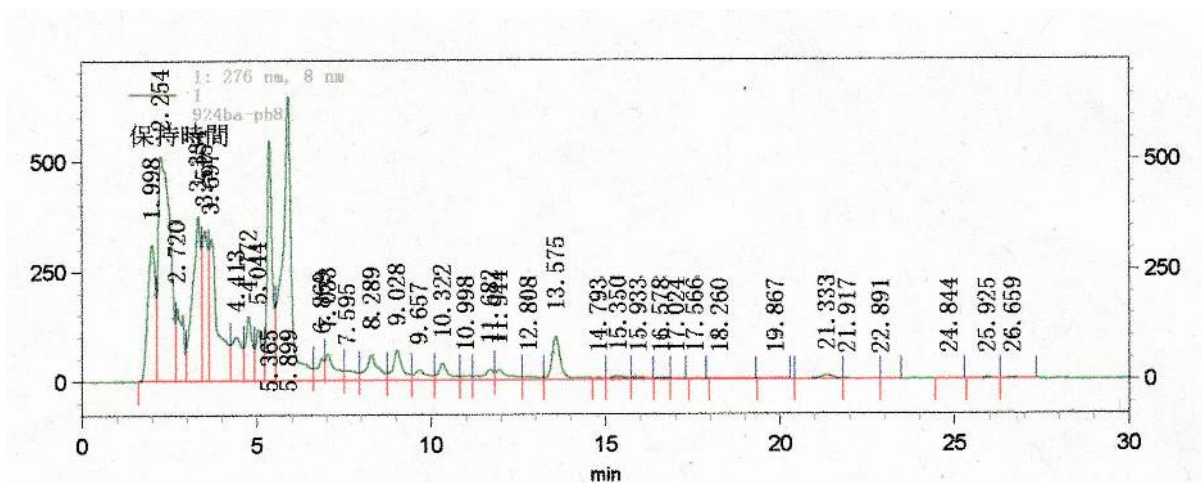


図 8 HPLC trace 水への溶出液(Ph8)

2) 土壌中の地衣成分の検出

トゲシバリの下の土壌の上部(0-10mm), 中部(10-20mm), 下部(20-30mm)では、保持時間が 20.770, 20.772, 20.755 と standard とごく近いところにピークが見られた。

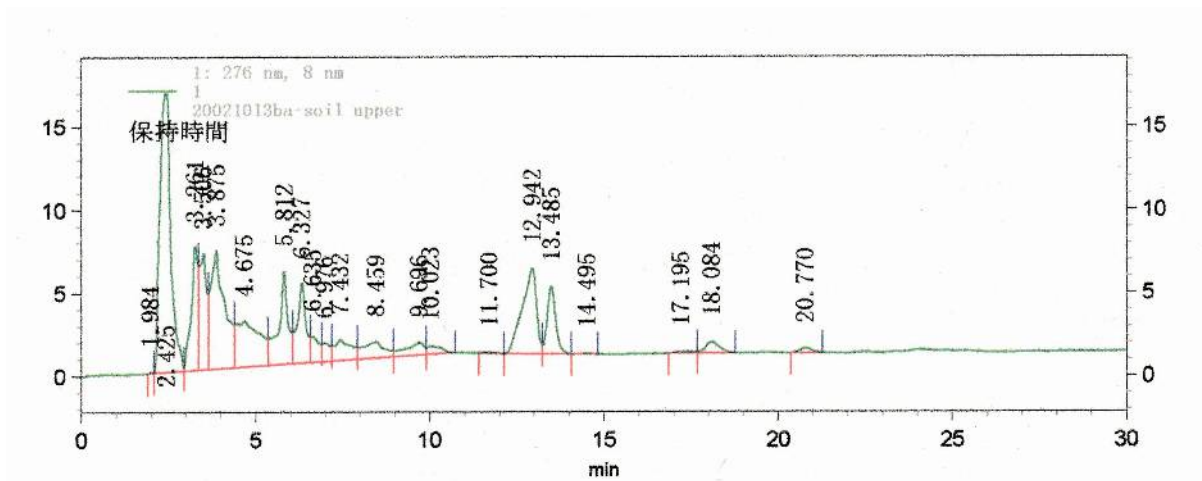


図 9 HPLC trace 土壌中の成分(上部 0-10mm)

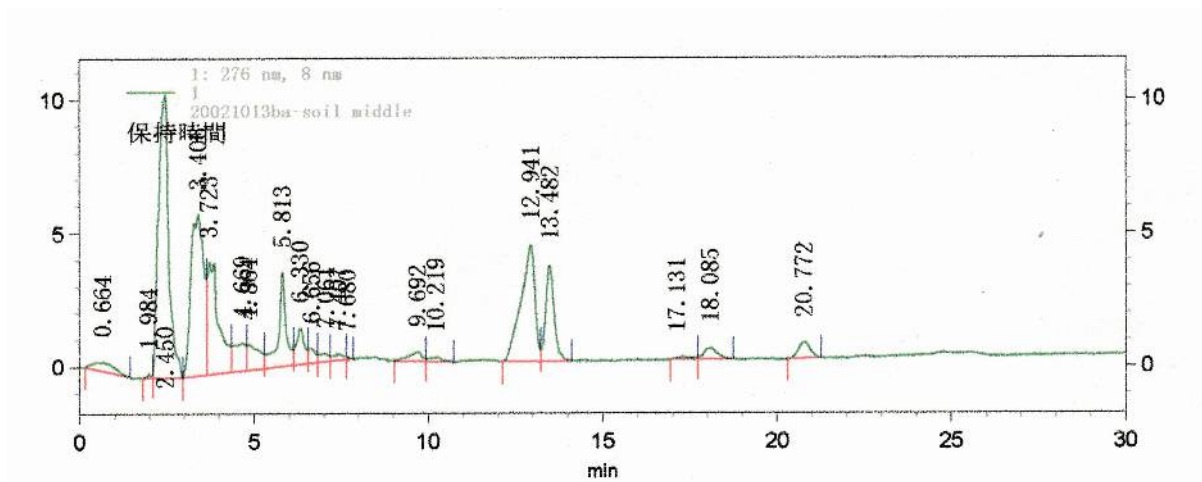


図 10 HPLC trace 土壌中の成分(中部 10-20mm)

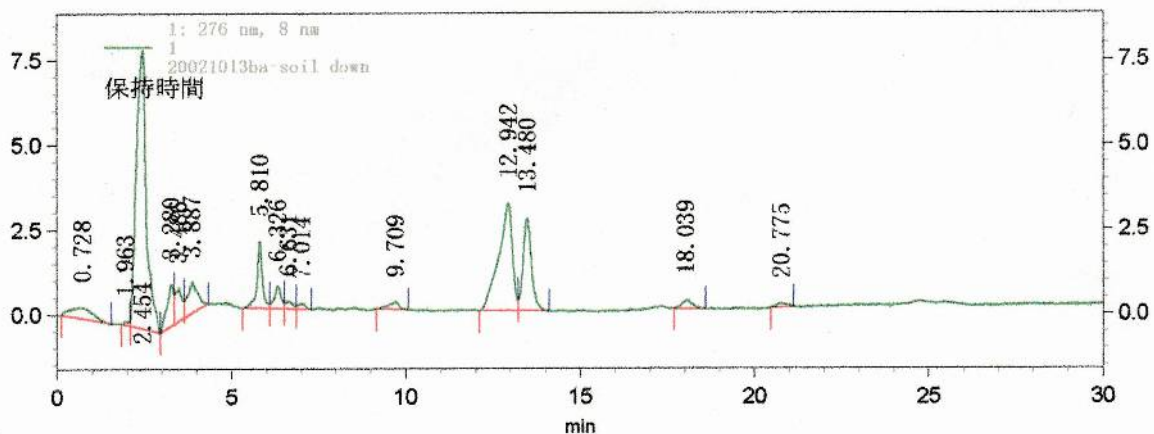


図 10 HPLC trace 土壌中の成分(下部 20-30mm)

3. 考察

1) 地衣成分の水への溶出

気象庁の気象統計（気象庁ホームページ）によれば、自然界での雨水の pH は、雨水には CO_2 が溶けているので 7.0 より下になり、雨水の長期観測では例えば東京都小笠原村南鳥島での 1996 年から 1992 年までの 17 年間の雨水の年平均 pH は 5.14～5.68 であり、岩手県大船渡市三陸町綾里では、4.53～4.96 である。水への溶出実験では、このことを踏まえ実験での地衣成分の溶出に使用する水の pH を 4～8 の 5 段階として測定を行った。HPLC を用いた測定では、276nm での吸光のピークは、pH4 では保持時間が standard と同じ 20.921 分のところにほんの僅かではあるが見られた。pH5,pH6,pH7 では 20.918 分,20.828 分,20.800 分と standard とほとんど同じ所にピークが見られた。このピークについては standard のピークと同じと見ていくことができる。また、ピークをみると pH が 6,7 の場合より pH が 4,5 の場合の方が大きく、地衣成分の溶出が多く見られることが分かる。このことから、今回の予備実験では、地衣成分 barbatic acid がほんの僅かではあるが水に溶出している可能性が示唆された。これからデータを積み重ねていくことにより、信頼できる結果を得ることができる。

2) 土壌中の地衣成分の検出

自然界での地衣体からの地衣成分の溶出を調べた結果では、トゲシバリの下の土壌の上部(0-10mm)、中部(10-20mm)、下部(20-30mm)について HPLC を用いた測定では、276nm での吸光のピークは、保持時間が 20.770,20.772,20.755 と standard とごく近いところにピークが見られた。これは、1) の場合と同じように地衣成分が雨水等により溶出している可能性が示唆された。この結果は、Bjelland *et al.*(2002)の地衣類が生育する岩石の表面から数 mm 中のところから地衣成分が検出されたことを報告していることと一致する。地衣成分が微生物(Yamamoto *et al.* 1998)、蘚苔類(Giordano *et al.* 1999)、植物の生育を阻害(Nishitoba *et al.* 1987)することは、これまでの実験

室での研究で明らかにされているが、自然界での調査・研究はあまり行われていない(Sergio *et al.* 2010)。地衣成分の水への溶解度が低く、自然環境での地衣成分の生態系での移動が難しい(Elix *et al.* 2008)ことから、地衣成分のアレロパシーとしての作用について、あまり強調されなくなっており、見直しに言及する場合も見られる(Stark *et al.* 2007)。地衣類の種類により地衣体内でつくる地衣成分の種類や量も異なり、また生育場所も樹皮、岩石、土壌など異なり、生態系での地衣成分のはたらきについての研究は、継続した地道な研究が必要である。予備実験も含めてこれまでの研究から、仮説として地衣成分が繰り返しの雨により地衣体から僅かずつ溶出し、樹皮に着生している藻類、蘚苔類や地衣類近傍の土壌の微生物・蘚苔類・小型高等植物等の生育を阻害する「微小地域でのアレロパシー」が考えられる。今後、これを検証する調査・実験等を行っていく予定である。

総括

地衣類は藻類と菌類が共生して一つの栄養体（地衣体）を形成し、人に身近な地域およびその周辺の自然の中に生育するだけでなく、過酷な自然環境の中でも生育している。地衣体の形成において、菌類だけでなく、共生藻も関わっていることが報告されている。このような、共生体として特異な存在である地衣類は興味深い存在である。地衣類は、地衣特有の二次代謝産物である地衣成分を地衣体表層や共生菌の細胞の表面に蓄積する。その作用については、実験室レベルで色々な方面からの研究が進められているが不明な点が多い。本研究では、培養地衣組織から地衣共生藻の分離培養法を確立し、得られた地衣共生藻を含め多種の植物の細胞や器官に対する地衣成分の光合成阻害を明らかにした。

第1章

Ramalina 属種の地衣類、*R. siliquosa*、*R. litoralis* の組織培養法にはじめて成功し、組織培養物を得た。組織培養物では、天然地衣のような組織構造はなく、菌類と藻類が混在した状態であり、菌類と藻類の強い結びつきは見られなかった。また、植え付けをした殆どの試験管で菌および藻の増殖が確認できた。本研究で用いたい地衣共生藻2種は、*Ramalina* 属2種 *R. siliquosa*、*R. litoralis* の組織培養物から分離・培養を行った。地衣共生藻の分離・培養については、これまでのスプレイ法やピペット法が知られていたが、近年地衣体の再形成など地衣生理学の多くの場面で、研究の複雑性を避けるため、同一の個体から共生菌と共生藻を獲得することが重要になってきている。しかしこれまで組織培養法では明確な共生藻分離培養法が明らかにされていなかった。今回、共生藻を材料とする生理学的な研究を遂行するための標準化された共生藻の分離培養法を確立することができた。

第2章

PAM 蛍光測定装置と補助的に酸素電極を用いて、ハウレンソウチラコイド膜での地衣成分の一種である *barbatic acid* による光合成阻害について調べた。量子収率 $(F_m' - F) / F_m'$ 、最大量子収率 $(F_m - F_0) / F_m$ は、それぞれ P680 の還元側、酸化側の阻害の指標になることを明らかにした。また、電子供与体、電子受容体を用いた人工的電子伝達系を作製し、*barbatic acid* の阻害部位について実験を行った結果、P680 の下流の Q_A から Q_B にかけて阻害すること、また、 Q_A の上流も少し阻害すること、酸化側では Y_z （チロシン残基）が阻害を受けることを初めて明らかにし、人工的電子伝達系を用いた実験系を築くことができた。

第3章

barbatic acid の光合成阻害について、*atrazine* 耐性タバコ細胞を用いた実験では、*barbatic acid* が、フェノールタイプの除草剤である *Dinoseb* と同じよう

な作用を示すことを初めて明らかにした。atrazine 耐性細胞では、D1 タンパク質をコードする *psbA* 遺伝子の 264 番目のセリンがスレオニンに変異している。このことにより D1 タンパク質の立体構造が変化し、Dinoseb が電子伝達系に結合、阻害すると考えられる。Dinoseb については、具体的な結合様式が明らかになっていない。Shigematsu *et al.* (1989a) が明らかにした phenylurea に関するモデルを参考に考えると、barbatic acid の電子伝達系での阻害部位では強い疎水性の相互作用による結合が予想された。

第4章

地衣成分の地衣共生藻と他の植物種（藻類、苔類、高等植物）での阻害の違いについて比較検討を行った。チラコイドレベルでは、地衣共生藻と他の植物種での違いがほとんど見られなかったのに対して、細胞レベルでは他の植物種では、相当程度の阻害が認められたが、地衣共生藻ではほとんど阻害されなかったことを初めて明らかにした。この現象から、地衣共生藻の細胞膜或いは葉緑体包膜で地衣成分に対してそれを排除または解毒する仕組みがあることが予想された。地衣類の二次代謝産物である地衣成分が近接して生育する他の植物種に対して、その生育を阻害するアレロパシー様物質としての可能性が考えられた。

これからの展望

これまでの光合成実験で、チラコイドでは共生藻も他の植物種と同程度の阻害を受けたが、細胞では耐性を示した。これを説明するために、細胞膜やチラコイド膜での取り込みを抑える仕組みや排出の仕組みを考えてきた。Backor *et al.* (1998) は、地衣共生藻が usnic acid により生長が阻害されると報告しているが、さらに研究を進め、2010 年には、地衣共生藻は、usnic acid に対して他の free-living の藻類よりかなり耐性を持つことを示した。このことから地衣共生藻が、共生菌との共進化により、適応を示すようになったのではないかと報告した (Backor *et al.* 2010)。この報告は、筆者らの実験の結果を支持している。今後、細胞やチラコイドでの地衣成分の排出の仕組みを明らかにしていくことが課題であろう。また、野外での地衣類の生態調査を行う必要がある。これまでアレロパシーについての調査の報告は少ない。地衣成分は、ほとんど水に溶解しないため、調査されることが少なかったと思われる。今後、地衣が生育する近傍での残存する地衣成分の影響を調べることにより、微小地域でのアレロパシーの可能性について探っていくことができるであろう。

また、進化の過程で菌類の一部の種と藻類の一部の種が出合い、共生により独自の形態（地衣体）を形成していったと考えられる。地衣類を構成する菌類と藻類の種を調べる研究で、原初の地衣類では共生菌に対して幾種類もの共生藻が選択的に対応していた。例えば、*Chaenotheca* では共生藻は *Dictyochloropsis*, *Stichococcus*, *Trebouxia*, *Trentepohlia* の 4 種が報告されている。現在、地衣類を構成する菌類と藻類は基本的には菌類 1 種に対して藻類

が1種対応している。このことから、菌類が藻類と共生して地衣体を形成する進化の初期の段階では、菌類に対して藻類はまだ、選択的に選ぶ段階であり、異なった共生藻を持つことにより広い範囲の生息地を開拓していくことを可能にした(Ahamadjian 1993a)。進化の過程でより相互作用の取りやすい藻類を絞り込み、また共生菌と共生藻の相互作用の中で互いの生理学的機能についても進化し(共進化)、地球上の広い範囲に生息地域を広げていったといえる。地衣類の菌類と藻類の共進化とアレロパシーを含めた生態系での役割について更に研究を進めることにより、生態系での生物の関わりについて理解を深めることができる。

地衣共生藻の分離培養法の確立と地衣成分による光合成阻害

高萩 敏和

1. 緒言

地衣類は、藻類と菌類が共生して一つの体をつくっており、自然界において特異な存在である（図1）。地衣体を構成している共生菌（主に子囊菌類）は藻類に生育場所と水分を与え、藻類（主に緑藻の *Trebouxia* 類）は光合成で作ったリピトール、ソルビトールなどをエネルギー源として菌類に与える関係である。地衣体のほとんどが菌類で占められていて、藻類細胞が地衣体の表面近くに層を成して集合している（図2）。地衣体を構成している菌類と藻類の種類が決まっており（一対一対応）、また地衣体を形成する過程に於いて、藻類が何らかの関わりを持っていることが指摘されている。ところで地衣類は、地衣成分を二次代謝産物として作っている。地衣成分は地衣体表層や地衣菌の細胞表面に集積している。地衣成分のはたらきについては、実験室内で他の生物（藻類、菌類、植物、微生物など）の生長への影響について多く研究されてきた。特に関心を持ったのは、近接して生育する藻類、蘚苔類、高等植物などの光合成への影響である。本研究では、地衣成分の光合成電子伝達系に対する影響を調べるため、PAM 蛍光測定装置を使い、①人工的電子伝達系を用いた実験系の確立と②地衣成分の光合成電子伝達系での阻害様式のモデル化を試みた。また、③地衣成分の影響について、地衣共生藻と他の藻類、苔類、高等植物との違いについて比較検討を行った。

2. 地衣培養組織を用いた地衣共生藻の分離培養法の確立

本研究で使用する地衣共生藻を準備するため、*Ramalina* 属地衣について山本法（図3）により地衣組織培養を行った。この培養方法の利点は、共生藻と共生菌を同時に培養することができること、また、子器を付けない地衣についても培養することができることである。コンタミネーションの割合も低い。培養では *Ramalina* 属の2種ともに、植え付けしたほとんどの試験管で共生藻と共生菌の増殖が見られた。培養地衣組織の断面を調べると天然地衣で見られるような組織構造をしているのではなく藻と菌が混在した状態であり、藻と菌の強い結びつきは見られなかった。地衣共生藻を分離培養する方法は、これまでマイクロピペット法、スプレー法などがあるが、主に分類等の研究で使われてきた。近年地衣体の再形成など地衣生理学の多くの場面で、研究の複雑性を避けるため、同一の個体から共生菌と共生藻を獲得することが重要になってきている。地衣共生藻の分離培養では、富栄養培地において地衣培養組織では共生藻と共生菌との結びつきは弱く、共生藻または共生菌を容易に分離ができることが明らかになり、共生藻を材料とする生理学的な研究を遂行するための標準化された共生藻の分離培養法を確立することができた（図4）。

3. 植物の光合成電子伝達系への地衣成分の影響について～PAM 蛍光測定装置を用いた測定～

太陽からの光エネルギーが植物体で光合成に使われる以外に蛍光や熱として放射される(図 5)。この蛍光強度を測定することにより光合成の状態を調べることができる。Shreiber (1993) はパルス変調した光を用いた PAM 蛍光測定装置を開発し、実験室での光合成実験以外に野外でも植物の光合成活性を簡便に測定することができるようになった。最も基本的な測定法はクエンチング分析法である。図 6 はクロロフィル蛍光による変動パターンを示している。図のように測定光、作用光、飽和光を照射し、光合成活性を表す量子収率 $(F_m' - F) / F_m'$ 、光合成活性のポテンシャルを表す最大量子収率 $(F_m - F_0) / F_m$ を求めることができる。

図 7 はチラコイド膜での人工的電子伝達系を模式的に表したものである。電子供与体として DPC や水を用い、電子受容体として SiMo や DMBQ、FeCN などを用い人工的電子伝達系を作製し、PAM 蛍光測定装置を用いた光合成阻害実験を行い電子伝達系での影響を調べた。barbatic acid(BA)については、10 μ M の低濃度において光照射下で定常状態の蛍光レベル F が増加し、光照射下の量子収率 $(F_m' - F) / F_m'$ が低下した。また、暗所適応後の F_m と最大量子収率 $(F_m - F_0) / F_m$ が劇的に減少した。このタイプの変化は、P680 の酸化側が阻害されたときにしばしば観察される(図 8)。次ぎに低濃度の barbatic acid の影響が PSII 複合体の中にあるのかどうか調べるために、電子受容体 DMBQ を用いて調べると 10 μ M の barbatic acid の添加により、クロロフィル蛍光の急速な増加が観測された(図 9)。これは、阻害部位が PSII 複合体の中にあることを示す。

還元側の阻害が、 Q_A の上流か下流か調べるため、 Q_A からのみ電子を受け取る SiMo を用い、酸素発生の測定を行った。表 1 に示すように BA と Q_B の典型的な阻害である DCMU の影響の比較から、BA の主な阻害は Q_A の下流であること、 Q_A やその上流でも少し阻害があることを初めて明らかにした。

暗所適応後の $(F_m - F_0) / F_m$ に影響する阻害部位が、OEC (酸素発生複合体) または D1 タンパク質の中にあるかどうか調べるため、トリス処理により OEC を外し、DPC を用いて、barbatic acid の阻害の影響を調べた(図 10)。その結果 barbatic acid の阻害が、 Y_z か Y_z の下流であることを明らかにした。

4. 光合成電子伝達系での地衣成分による阻害部位・阻害様式の検討～atrazine 耐性タバコ細胞 PSII 膜での地衣成分 (barbatic acid) による阻害～

atrazine 耐性タバコ細胞を用い、地衣成分のチラコイド電子伝達系での阻害部位・阻害様式について検討を行った。除草剤のアトラジンに耐性を持つタバコ培養細胞は、D1 タンパク質の *psbA* 遺伝子の 264 番目がセリン (AGT) からスレオニン (ACT) 変異している。atrazine 耐性株 (B, D) は野生株 (WT) に比べて barbatic acid に対して P680 の還元側がより高い感受性を示した(図 11)。フェノールタイプの除草剤である Dinoseb についても、atrazine 耐性株では P680 の還元側が高い感受性を示した(図 12)。このことから barbatic acid は除草剤の Dinoseb と同じタイプの阻害を示すことが考えられる。これまでフェノールタイ

プの除草剤の正確な結合様式は明らかにされていない。Shigematsu *et al.* (1989) が明らかにした atrazine 耐性タバコ培養細胞でのフェニール尿素に関するこれまでのモデルは、フェノールタイプの除草剤の結合モデルを考える上で基礎となる。このモデルを参考にすると、地衣成分と電子伝達系 Q_B 部位との結合は、強い疎水性の相互作用による結合を考えることができる。

5. 地衣成分による阻害の影響～地衣共生藻と他の植物種との違い比較検討～

地衣成分の光合成電子伝達系での影響について、地衣成分 5 種 (barbatic acid、diffractaic acid、evernic acid、salazinic acid、usnic acid) を用い、地衣共生藻 3 種 (*Trebouxia impressa*、*Trebouxia*.sp、*T. excentrica*)、*Chlamydomonas reinhardtii*、苔類培養細胞 (*Marchantia paleacea*)、タバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum*) について、P680 の酸化側・還元側での阻害をチラコイドレベル、細胞レベルで調べた (表 2、3)。チラコイドレベルでは地衣成分による阻害は P680 の還元側と酸化側のいずれでも、地衣共生藻と他の植物種との間ではっきりとした違いは見られなかった。それに対して細胞レベルでは、地衣共生藻では、反応緩衝液で溶かすことのできる最も高い濃度でも阻害効果を示さなかったのに対して、他の植物種では相当レベルの阻害を示した。

6. まとめ

ハウレンソウを用いた実験より PSII の Q_B 部位が barbatic acid による最初のターゲットであること、クロロフィル蛍光のパラメーターである (Fm'-F)/Fm' と (Fm-Fo)/Fm が、それぞれ P680 の還元側と酸化側の PSII 阻害の指標として使うことができることを明らかにした。また、atrazine 耐性タバコ細胞の実験より barbatic acid による阻害様式はフェノール系の除草剤と同じである可能性を初めて示した。さらに、地衣共生藻と他の植物種の間での地衣成分による阻害について、チラコイドレベルでは、はっきりした違いは顕れなかった。それに対して、細胞レベルでは、他の植物種では相当レベルの阻害が見られたが、地衣共生藻では、ほとんど阻害を示さなかった。ところで近年植物の二次代謝産物について、動くことのできない宿命をもつ植物が自らの身を守るために、進化の途上で身につけた防御物質であるとする「アレロパシー仮説」が提唱されている (藤井 2000)。本研究では、実験室での実験で地衣成分が他の植物種の光合成を阻害することによりアレロパシーの可能性のあることは示された。しかし、地衣成分の疎水的な性質から地衣体から放出され、土壤に高い濃度で集積すると考えるより、地衣体の表面や岩屑などに集積し、地衣体の上で発芽したり地衣体の近くで生育する藻類や苔類などの光合成生物の生育を阻害するとする方が妥当性が高い。この「微小地域でのアレロパシー」について検証するには、さらに野外での調査・研究が必要である。

【引用文献】

- 遠藤 剛. 2002. 植物の生長調節 37: 69-75.
藤井 義晴. 2000. アレロパシー, pp. 47-70. 農山漁村文化協会, 東京都.
Schreiber U. & Bilger W. 1993. Progress in Botany 54: 151-173.
Shigematsu Y. *et al.* 1989. Pestic. Biochem. Physiol. 35: 33-41.



図 1 *Ramalina siliquosa*

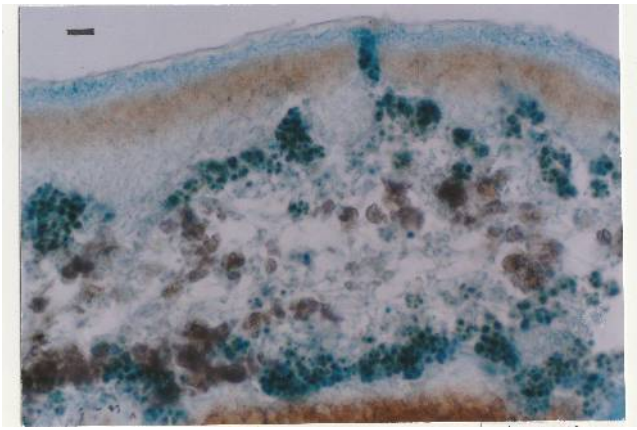


図 2 *R. siliquosa* の組織断面

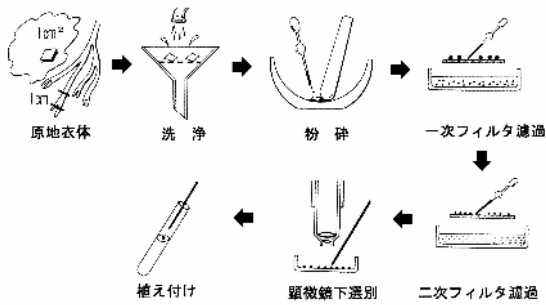


図 3 地衣組織培養法

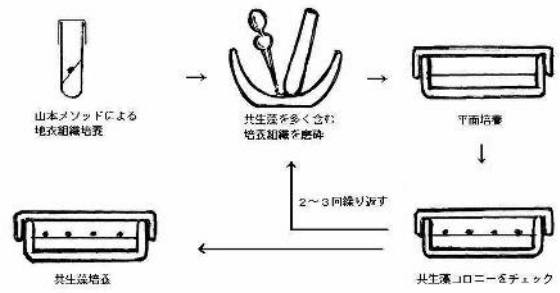


図 4 共生藻分離培養法

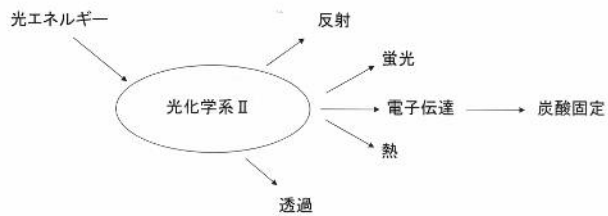


図 5 光エネルギーの行方 (遠藤 2002)

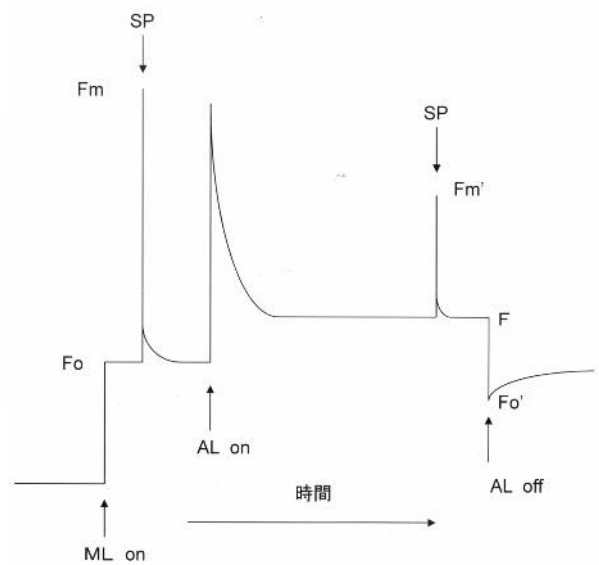


図 6 蛍光の変動パターン (遠藤 2002)

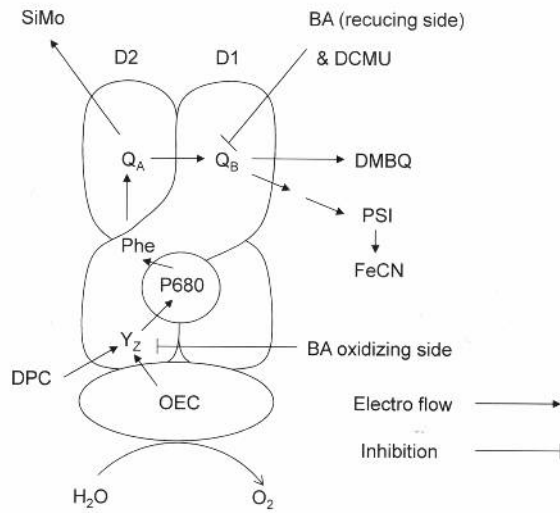


図7 人工電子伝達系 電子の流れと阻害部位

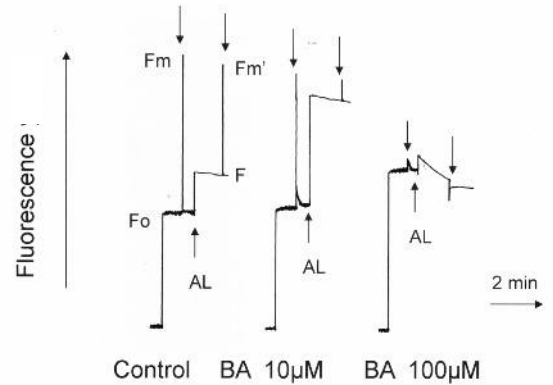


図8 蛍光誘導での BA の影響 (ハウレンソウチラコイド膜)

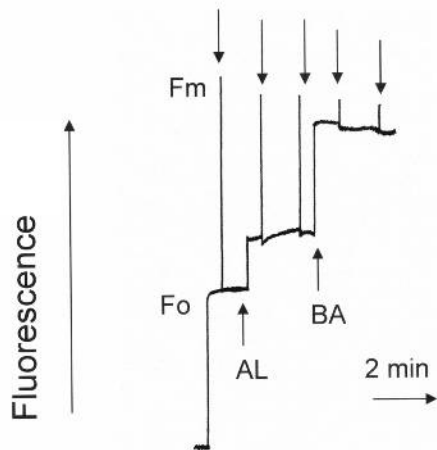


図9 PSII 膜での蛍光誘導での BA の影響

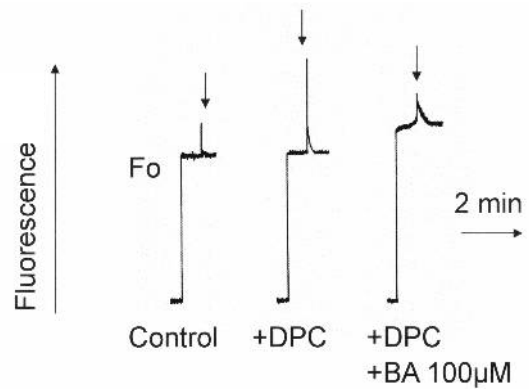


図10 トリス処理した PSII 膜での蛍光誘導 (DPC と BA の影響)

表1 SiMo を用いた人工電子伝達系におけるバルバチン酸とジクロロフェニルジメチルウレア (DCMU) の酸素発生活性に対する影響

	-SiMo (A)		+SiMo (B)		(B)-(A)
Control	100	±10.5	n.d.		
BA	7.7	±2.19	33	±3.8	25
DCMU	5.1	±1.68	43	±2.3	38

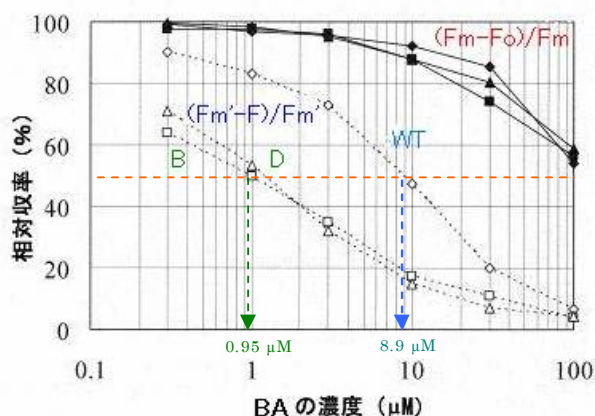


図 11 BA の濃度と量子収率の変化

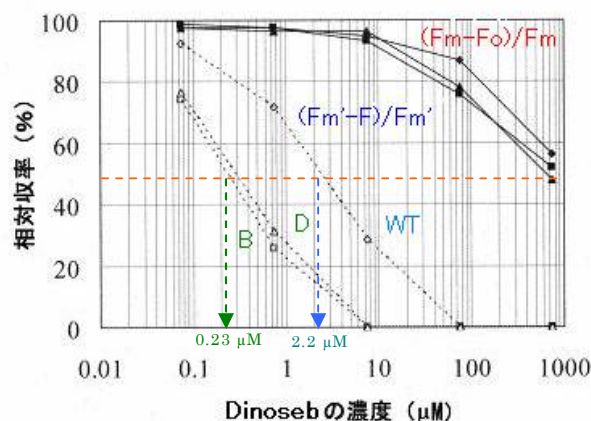


図 12 Dinoseb の濃度と量子収率の変化

表 2 光合成生物（植物種）の P680 還元側における地衣成分による半阻害濃度（ μM ）

		Barbatic acid	Diffraictaic acid	Evernic acid	Salazinc acid	Usnic acid
<i>Nicotiana tabacum</i>	Thylakoid	8.9	100	17	>1000	170
	Cell	47	180	120	>1000	120
<i>Marchantia paleacea</i>	Thylakoid	14.0	97	45	>1000	330
	Cell	33	100	53	>1000	93
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Thylakoid	15.0	90	23	>1000	310
	Cell	>100	130	250	>1000	140
<i>Trebouxia impressa</i>	Thylakoid	7.1	94	35	>1000	200
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	>600
<i>Trebouxia sp.</i>	Thylakoid	4.5	80	25	>1000	160
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	>600
<i>T. excentrica</i>	Thylakoid	7.5	120	30	>1000	20
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	>600

表 3 光合成生物（植物種）の P680 酸化側における地衣成分による半阻害濃度（ μM ）

		Barbatic acid	Diffraictaic acid	Evernic acid	Salazinc acid	Usnic acid
<i>Nicotiana tabacum</i>	Thylakoid	>100	430	400	>1000	>600
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	430
<i>Marchantia paleacea</i>	Thylakoid	54	180	400	>1000	>600
	Cell	97	220	420	>1000	>600
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Thylakoid	>100	160	300	>1000	560
	Cell	>100	160	350	>1000	140
<i>Trebouxia impressa</i>	Thylakoid	25	260	220	>1000	>600
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	>600
<i>Trebouxia sp.</i>	Thylakoid	25	250	130	>1000	290
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	>600
<i>T. excentrica</i>	Thylakoid	56	330	300	>1000	>600
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	>600

謝 辞

本研究はおもに京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻細胞全能性発現学講座で行ったものです。ご指導いただきました佐藤文彦教授、遠藤剛准教授、伊福健太郎助教に厚く御礼申し上げます。佐藤研究室の学生・職員の皆さまにも感謝申し上げます。また、御協力いただきました三菱化成科学技術研究センター研究員池澤信博博士に御礼申し上げます。地衣体からの *salazinic acid* の抽出、質量分析の指導をして頂きました京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻宮川 恒教授に御礼申し上げます。フタバゼニゴケ *Marchantia paleacea* を提供していただきました京都大学大学院生命科学研究科故大山莞爾名誉教授に御礼申し上げます。共生藻の同定では、広島大学大学院学校教育研究科竹下俊治教授に大変お世話になりました。御礼申し上げます。地衣類の同定では、高知大学理学部岡本達哉准教授にお世話になりました。御礼申し上げます。培養地衣の写真撮影・地衣成分の同定では高知学園短期大学吉村庸名誉教授にお世話になりました。御礼申し上げます。日本ペイント木下靖浩博士には地衣の培養で指導・助言を頂きました。御礼申し上げます。地衣類の研究は兵庫教育大大学院からはじまりました。指導していただいた兵庫教育大学山田卓三名誉教授に御礼申し上げます。最後に、地衣類の培養、観察、研究方法の手ほどきから今日に到るまで終始御指導いただきました秋田県立大学大学院生物資源学部生物生産科学科植物資源創成システム山本好和教授に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Ahmadjian V. 1973. Methods of isolating and culturing lichen symbionts and thalli. *In* The Lichens. V. Ahmadjian and M. E. Hale, eds., pp. 653-659. Academic Press, New York
- Ahmadjian V. 1993a. The mycobiont (fungal symbiont). *In* Lichen Symbiosis, pp. 8-29. Academic Press, New York.
- Ahmadjian V. 1993b. The photobiont (photosynthetic symbiont). *In* Lichen Symbiosis, pp. 30-52. Academic Press, New York.
- Ahmadjian V. 1993c. Culture media, *In* Lichen Symbiosis, pp. 171-174. Academic Press, New York.
- Ajlani G., Meyer I., Vernotte C. & Astier C. 1989. Mutation in phenol-type herbicide resistance maps within the *psbA* gene in *Synechocystis* 6714. *FEBS Lett.* 246: 207-210.
- Asada K., Neubauer C., Herber U. & Schreiber U. 1990. Methyl viologen-dependent cyclic electron transport in spinach chloroplasts in the absence of oxygen. *Plant Cell Physiol.* 31: 557-564.
- 朝比奈泰彦., 柴田承二. 1949. 地衣成分の科学, pp. 5-7, 河出書房, 東京都.
- Backor M., Hudak J., Repcak M., Ziegler W. & Backorova M. 1998. The Influence of pH and lichen metabolites (vulpinic acid and (+) usnic acid) on the growth of the lichen photobiont *Trebouxia irregularis*. *Lichenologist* 30: 577-582.
- Backor M., Klemova K., Backorova M. & Ivanova V. 2010. Comparison of the phytotoxic effects of usnic acid on cultures of free-living alga *Scenedesmus quadricauda* and aposymbiotically grown lichen photobiont *Trebouxia erici*. *J. Chem. Eco.* 36: 405-411.
- Bettini P., McNally S., Sevigina M., Darmency H., Gasquez J. & Dron M. 1987. Atrazine resistance in *Chenopodium album*; Low and high levels of resistance to the herbicide are related to the same chloroplast *psbA* gene mutation. *Plant Physiol.* 84: 1442-1446.
- Bjelland T., & Thorseth I.H. 2002. Comparative studies of the lichen-rock interface of four lichens in Vingen, western Norway. *Chemical Geology.* 192:81-98.
- Claudia G., Sergio E., Favero-L., Paola L. & Rosanna P. 2013. Biocidal effect of lichen secondary metabolites against rock-dwelling microcolonial fungi, cyanobacteria and green algae. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 84: 300-306.
- Cocchietto M., Skert N., Nimis P.L. & Sava G. 2002. A review on usnic acid an interesting natural compound. *Naturewissenschaften* 89: 123-146.
- Deason T.R. & Bold H.C. 1960. Phycological studies I. Exploratory studies of

- Texas soil algae. *University of Texas Publications* 6022: 70.
- Debus R.J., Barry B.A., Sithole I., Babcock G.T. & McIntosh L. 1988. Directed mutagenesis indicates that the donor to P680+ in photosystem II is tyrosine-161 of the D1 polypeptide. *Biochemistry* 27: 9071-9074.
- Degelius G. 1964. Biological studies of epiphytic vegetation on twigs of *Fraxinus excelsior*. *Acta Horti Gotoburg* 27: 11–55.
- Elix J.A., Stocker-Worgotter E. 2008. Biochemistry and secondary metabolites. *In* Nash III T.H. (Ed). *Lichen Biology*. second ed. Cambridge University press. Cambridge. pp. 104-133.
- Elix J.A. 1996. Biochemistry and secondary metabolites. *In* *Lichen Biology* ed. Nash III, T.H., pp. 154-180. Cambridge University Press, New York.
- 遠藤 剛. 2002. PAM クロロフィル蛍光計による光合成測定の実験と応用. *植物の生長調節* 37: 69-75.
- Endo T., Kawase, D. & Sato F. 2005. Stromal over-reduction by high-light stress as measured by decreases in P700 oxidation by far-red light and its physiological relevance. *Plant Cell Physiol.* 46: 775-781.
- Endo T., Mi H., Shikanai T. & Asada K. 1997. Donation of electrons to plastoquinone by NAD(P)H dehydrogenase and ferredoxin-quinone reductase in spinach chloroplasts. *Plant cell Physiol.* 38: 1272-1277.
- Endo T., Takahagi T., Kinoshita Y., Yamamoto Y. & Sato F. 1998. Inhibition of photosystem II of spinach by lichen-derived depsides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 2023-2027.
- Ford R.C. & Evance M.C.W. 1983. Isolation of a photosystem 2 preparation from higher plants with highly enriched oxygen-evolution activity. *FEBS Lett.* 160: 159-164.
- 藤井 義晴. 2000. アレロパシー, pp. 47-70. 農山漁村文化協会, 東京都.
- Gamborg O.L., Miller R.A., & Ojima K. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Genty B., Briantais J.M. & Baker N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta.* 990: 87-92.
- Giaquinta R.T. & Dilley R.A. 1975. A partial reaction in photosystem II: Reduction of silicomolybdate prior to the site of dichlorophenyldimethylurea inhibition. *Biochim. Biophys. Acta.* 387: 288-305.
- Giordano S., Alfano F., Basile A. & Cobianchi R.C. 1999. Toxic effects of the thallus of the lichen *Cladonia foliacea* on the growth and morphogenesis of bryophytes. *Cryptogamie Bryologie* 20: 35-41.
- Govindjee. 1995. Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 131-160.

- Harada H., Okamoto T. & Yoshimura I. 2004. A checklist of lichens and lichen-allies of Japan. *Lichenology* 2: 47-165.
- Hirshberg J. & McIntosh L. 1983. Molecular basis of herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. *Science* 222: 1346-1349.
- Hirshberg J., Bleecker A., Kyle D.J., McIntosh L. & Arntzen C.J. 1984. The molecular basis of triazine herbicide resistance in higher plant chloroplasts. *Z. Naturforsch.* 39: 412-420.
- Huneck S., & Schreiber K. 1972. Wachstumsregulatorische Eigenschaften von Flechten und Moos – Inhaltsstoffen. *Phytochemistry* 11: 2429-2434.
- Huneck S. & Yoshimura I. 1996. Short history of the study of lichen substances. *In* Identification of Lichen Substances, pp. 1. Springer-Verlag, Berlin.
- Inoue H., Noguchi M. & Kubo K. 1986. Site of inhibition of usnic acids at oxidizing side of photosystem 2 of spinach chloroplast. *Photosynthetica* 21: 88-90.
- Kawamoto K., Mano J. & Asada K. 1995. Photoproduction of the azidyl radical from the azide anion on the oxidizing side of photosystem II and suppression of photooxydation of tyrosine Z by the azidyl radical. *Plant Cell Physiol.* 36: 1121-1129.
- Lawrey J.D. 1986. Biological role of lichen substances. *Bryologist* 89: 111-122.
- Lawrey J.D. 1995. Lichen allelopathy-a review. *Allelopathy. ACS Symposium Series* 582: 26-38.
- 増田 健. 2007. クロロフィルが光エネルギーを吸収する. 東京大学光合成教育研究会編 光合成の化学, pp. 66-67. 東京大学出版会, 東京都.
- Metz J.G., Nixon P.J., Ronger M., Grudvig G.W. & Diner B.A. 1989. Directed alteration of the D1 polypeptide of photosystem II: evidence that tyrosine-161 is the redox component Z connecting the oxygen-evolving complex to the primary electron donor P680. *Biochemistry* 28: 6960-6969.
- Molisch H. 1937. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathie. Jena. Fischer.
- Molnar K & Farkas E. 2010. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Z. Naturforsch.* 65c: 157-173
- Mosbach K. 1973. Biosynthesis of lichen substances. *In* Ahmadjian V. & Hale M.E. (eds.), *The Lichens*, pp. 523-546. Academic Press, New York.
- Murashige T. & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- 中野武登. 1987. 共生藻の分離・培養法. ライケン Vol. 6 No. 3: 1-3.
- 日本農薬学会. 1996. 農薬とは何か, pp76-85. 日本植物防疫協会, 東京都.

- Nishitoba Y., Nishimura H., Nishiyama T. & Mizutani J. 1987. Lichen acids plant growth inhibitors from *Usnea longissima*. *Phytochemistry* 26: 3181-3185.
- Orth G.M., Tolbert N.E., & Jimenez, E. 1966. Rate of glycolate formation during photosynthesis at high pH. *Plant Physiol.* 41: 163-173.
- Rojas I.S., Lotina-Hennsen B. & Mata R. 2000. Effects of lichen metabolites on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts. *J. Nat. Prod.* 63: 1396-1399.
- 佐藤 和彦. 1992. 光合成器官の分子構築と機能. エネルギー代謝. 宮地 重遠編 光合成, pp. 18-35. 朝倉書店, 東京都.
- Sato F., Shigematsu Y. & Yamada Y. 1988. Selection of an atrazine-resistant tobacco cell line having a mutant *psbA* gene. *Mol. Gen. Genet.* 214: 358-360.
- 清水 碩. 1992. 植物組織培養入門, pp. 7-17, オーム社, 東京都.
- Shimmer O. & Lehner H. 1973. Untersuchungen zur Wirkung von Usninsäure auf die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. *Arch. Mikrobiol.* 93: 145-154.
- Schoenfeld M., Yaacoby T., Benyehuda A., Rubin B. & Hirshberg J. 1987. Triazine resistance in *Pharlaris paradoxa*: Physiological and molecular analyses. *Z. Naturforsch.* 42: 779-782.
- Schreiber U. & Bilger W. 1993. Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the past years in retrospect. *Progress in Botany* 54: 151-173.
- Schreiber U., Hormann H., Neubauer C. & Klughammer C. 1995. Assessment of photosystem II photochemical quantum yield by chlorophyll fluorescence quenching analysis. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 209-220.
- Sergio E., Favero-Longo and Rosanna Piervittori. 2010. Lichen-plant interactions. *Plant Interactions*. Vol.5.No.3: 163-177.
- Shigematsu Y., Sato F. & Yamada Y. 1989a. A binding model for phenylurea herbicides based on analysis of a Thr264 mutation in the D-1 protein of tobacco. *Pestic. Biochem. Physiol.* 35: 33-41.
- Shigematsu Y., Sato F. & Yamada Y. 1989b. The mechanism of herbicide resistance in tobacco cells with a new mutation in the Q_B protein. *Plant Physiol.* 89: 986-992.
- Stark S. & Hyvarinen M. 2003. Are phenolics leaching from the lichen *Cladonia stellaris* sources of energy rather than allelopathic agents for microorganisms? *Soil Biol. Biochem.* 35: 1381-1385.
- Stark S., Kyotoviita M.M., Neumann A.B. 2007. The phenolic compounds of *Cladonia* lichens are not antimicrobial in soils. *Oecologia.* 152: 299-306.

- Takahagi T., Yamamoto Y., Kinoshita Y. & Yamada T. 2002. Inhibitory effects of sodium chloride on induction of tissue cultures of lichens of *Ramalina* species. *Plant Biotechnology* 19: 53-55.
- Takahagi T., Endo T., Yamamoto Y. & Sato F. 2008. Lichen photobionts show tolerance against lichen acids produced by lichen mycobionts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 3122-3127.
- Takahagi T., Ikezawa N., Endo T., Ifuku K., Yamamoto Y., Kinoshita Y., Takeshita S. & Sato F. 2006. Inhibition of PSII in atrazine-tolerant tobacco cells by barbatic acid, a lichen-derived depside. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 266-268.
- 田中 歩. 2000. 光の捕獲とエネルギー変換. 佐藤公行編. 生命を支える光, pp. 58-68. 共立出版, 東京都.
- 多和田真吉. 2004. 他感作用物質. 桑野栄一., 首藤義弘., 田村廣人編. 農薬の科学, pp. 136-140. 朝倉書店, 東京都.
- 植村振作., 河村宏., 辻万千子. 2006. 農薬毒性の事典 3版, pp.491-492. 三省堂, 東京都.
- van Kooten O. & Snel J.F.H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* 25: 147-150.
- 山田 常雄編. 1993. 生物学事典 第3版 829 pp. 岩波書店, 東京都.
- 山本 好和. 2002a. 実験室における地衣子嚢胞子の放出と発芽. *Lichenology* 1 : 11-22.
- 山本 好和. 2002b. 地衣体を用いた地衣類の培養. *Lichenology* 1:57-65.
- Yamamoto Y., Kinoshita Y., Matsubara H., Kinoshita K., Koyama K., Takahashi K., Kurokawa K. & Yoshimura I. 1998. Screening of biological activities and isolation of biological active compounds from lichens. *In Recent Research Development in Phytochemistry. Vol. 2. p. 23-34. ed. Pandalai S.G. Research Signpost. India.*
- Yamamoto Y., Miura Y., Higuchi M. & Kinoshita Y. 1993. Using lichen tissue cultures in modern biology. *The Bryologist* 96: 384-393.
- Yamamoto Y., Miura Y., Kinoshita Y., Higuchi M., Yamada Y., Murakami A., Ohigashi H. & Koshimizu K. 1995. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. *Chem. Pharm. Bull.* 43: 1388-1390.
- Yamamoto, Y., Mizuguchi, R. & Yamada, Y. 1985. Tissue culture of *Usnea rubescence* and *Ramalina yasudae*. *Agric. Bio. Chem.* 49: 3347-3348.
- Yamashita T. & Butler W. 1969. Photooxydation by photosystem II of tris-washed chloroplasts. *Plant Physiol.* 44: 1342-1346.
- 矢崎一史. 2005. 植物のABC蛋白質. 植田和光編. ABC蛋白質, pp. 64-76.
- 吉村 庸. 1974. 原色日本地衣植物図鑑, pp.283-320. 保育社, 大阪市