

# 光合成研究

第22巻 第2号 (通巻64号) 2012年8月

NEWS LETTER Vol. 22 NO. 2 August 2012  
THE JAPANESE SOCIETY OF PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

---

トピックス RNA編集による暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素の活性制御	山本 治樹 (名大)	62
解説 果実の光合成	園池 公毅 (早大)	70
解説特集「光合成を支えるテトラピロール代謝の多様性」 序文	田中 亮一 (北大)	77
解説 新しく発見されたクロロフィルf	大久保 智司 (京大)	80
解説 ラン藻のテトラピロール生合成系の嫌気環境適応と進化的視点	青木 里奈、藤田 祐一 (名大)	87
解説 クロロフィル合成系の多様性はいかにして生まれたか?	伊藤 寿、田中 歩、田中 亮一 (北大、CREST/JST)	98
解説 代謝工学による新たなクロロフィル分子の合成	土屋 徹 (京大)	106
解説 植物細胞におけるヘム代謝研究の新展開	増田 建 (東大)	115
解説 高等植物のクロロフィル合成系の制御	小林 康一 (東大)	125
報告記事 第3回日本光合成学会 (年会・公開シンポジウム) 開催報告	皆川 純 (基生研)、寺島 一郎 (東大)	139
報告記事 日本光合成学会特別賞「光と緑の賞」授賞式		141
報告記事 第3回日本光合成学会優秀ポスター賞受賞者		142
報告記事 若手の会活動報告 ～第六回セミナー開催報告、第七回セミナー告知など～	成川 礼 (東大)	143
報告記事 光合成学会若手の会第六回セミナーに参加して	佐藤 諒一 (東工大)	144
集会案内 Okayama University International Symposium Structure and Dynamics of Photosynthetic Systems		145
書評 森のバランスー植物と土壌の相互作用ー (森林立地学会編)	篠原 健司 (森林総研)	147
事務局からのお知らせ		148
日本光合成学会会員入会申込書		149
日本光合成学会会則		150
幹事会名簿		152
編集後記		153
記事募集		153
賛助法人会員広告		

RNA編集による暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素の活性制御<sup>§</sup>

名古屋大学 大学院 生命農学研究科

山本 治樹\*

## 1. はじめに

光合成生物は、クロロフィルもしくはバクテリオクロロフィルを用いて光エネルギーを受容し光合成を行う。1990年代以降の分子生物学、生化学的研究により、(バクテリオ)クロロフィルの生合成に関わる酵素群の実態が明らかにされつつある<sup>1,2)</sup>。その中で筆者は生合成後期の律速段階であるプロトクロロフィリド(Pchl<sub>id</sub>)還元反応を触媒する酵素、光依存型 Pchl<sub>id</sub>還元酵素(LPOR)と暗所作動型Pchl<sub>id</sub>還元酵素(DPOR)に焦点を当て研究を行ってきた(図1)。LPORは、単一のポリペプチドからなる酵素であり、NADPH及び光エネルギーを用いてPchl<sub>id</sub>からクロロフィリドへの還元を行う<sup>3)</sup>。一方、DPORは、ChL、ChIN、ChIBと呼ばれる3つのサブユニットから構成され、フェレドキシンなどからの還元力とATPを用いて光非依存的にPchl<sub>id</sub>の還元を行う<sup>4,7)</sup>。DPORは、保持する金属中心(4Fe-4S型鉄硫黄クラスター)が酸素に対し不安定であるため、空気にさらされることで速やかに失活する<sup>6,8)</sup>。これらの2つの酵素は、進化的に起源が異なり、

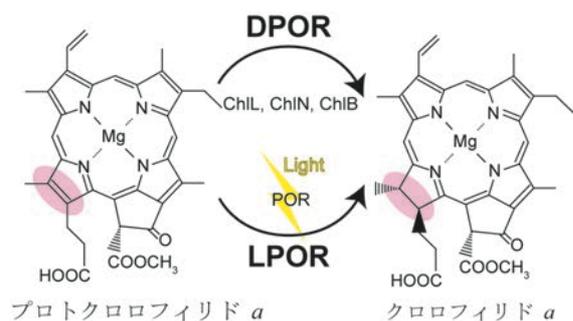


図1 プロトクロロフィリド還元反応

クロロフィル生合成後期の律速段階であるプロトクロロフィリド還元反応には進化的起源の異なる2つの酵素DPORとLPORが存在する。

LPORが短鎖デヒドロゲナーゼ/レダクターゼ(SDR)ファミリーに属するのに対し、DPORは窒素固定酵素ニトロゲナーゼと共通の祖先をもつと考えられている。DPORは、その酵素化学的性質だけでなく、最近明らかとなった立体構造においてもニトロゲナーゼと高い類似性を示した<sup>9,10)</sup>。本稿では、RNA編集という転写後修飾によりDPORの活性が制御されているという結果について報告、議論したい。

## 2. DPORの分布

クロロフィル生合成の後期の律速段階であるPchl<sub>id</sub>還元は、バクテリオクロロフィルおよびクロロフィル生合成において共通の反応であり、光合成生物が光合成を行うために必須の酵素反応の1つである。この反応を触媒する酵素として前述のLPORとDPORが報告されており、光合成生物はこれら2つの酵素のうち、片方もしくは両方を有する<sup>11)</sup>(図2)。進化的により早く分岐したと考えられる酸素非発生型光合成を行う光合成細菌は、DPORのみを保持している。それに対し、酸素発生型光合成を行うシアノバクテリア、緑藻、コケ植物、シダ植物、裸子植物などではLPORとDPORが併存する。進化的に最も最近分岐した被子植物はLPORのみをもち、現在のところ明らかにされた被子植物のいずれのゲノムにおいてもDPORをコードする遺伝子は見つかっていない。これらの分布から、生命の黎明期に最初に出現した光合成生物は、DPORのみを用いてPchl<sub>id</sub>の還元を行っていたが、酸素発生型光合成を行うシアノバクテリアの出現に伴い環境中の酸素濃度が上昇し、酸素によってDPORの不活性化が起こるようになったため、酸素に対し安定なLPORがSDRファミリーから進化してきたと考えられる<sup>12)</sup>。

<sup>§</sup> 第2回日本光合成学会シンポジウム 発表賞受賞論文(ポスター発表)

\* 連絡先 E-mail: yamamoto.haruki@h.mbox.nagoya-u.ac.jp

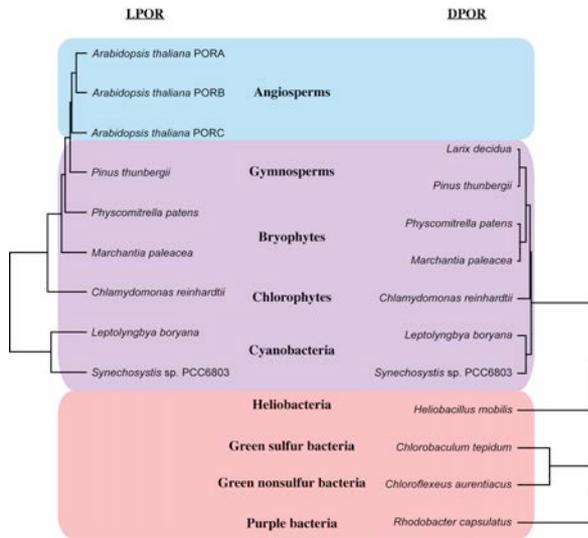


図2 LPORとDPORの分子系統樹および光合成生物における分布

LPOR及びDPORのサブユニットの1つChlL/BchLのアミノ酸配列を元に作った分子系統樹。光合成細菌(赤)はDPORのみを、被子植物(青)はLPORのみを、シアノバクテリア・緑藻・コケ植物・裸子植物など(紫)は両酵素を保持している。

この仮説は、全ての酸素発生型光合成生物がLPORをもつことから裏付けられる。そして被子植物へと進化する段階で、DPORを喪失し、LPORのみを用いてPchl<sub>id</sub>e還元反応を行うようになったと考えられる。このDPORの喪失の理由は明確ではないが、筆者は以下の考えを博士論文にまとめている。「被子植物は、DPOR喪失によりPchl<sub>id</sub>e還元反応が完全に光依存的となる。これにより光強度や光質の変化に応じてPchl<sub>id</sub>e還元反応の速度が変化することとなり、弱光や暗所においてPchl<sub>id</sub>eの蓄積が引き起こされる。この関係を利用してPchl<sub>id</sub>e蓄積を暗所(もしくは弱光)のシグナルとして捉え、クロロフィルなどの光合成色素合成や光化学系の構造などを外界の光環境に適応させる系を進化させてきたと考えている<sup>13)</sup>。」被子植物においてDPORは失われたものの、裸子植物をはじめとする維管束植物やコケ植物、緑藻、シアノバクテリアにおいてはDPORとLPORが併存しており、シアノバクテリアでは光や酸素環境に応じた機能分化がなされているようである<sup>12,14)</sup>。筆者は、酸素に対し不安定な酵素DPORが、酸素発生型光合成生物においてどのように活性を維持しているか、また生理学的にどのような役割を担っているのかという点に興味を持ち研究を進めてきた<sup>8,15,16)</sup>。

### 3. 葉緑体におけるRNA編集

続いてRNA編集という現象について紹介をする。真核生物では転写されたmRNAに様々な修飾がなされ、成熟mRNAとなる。mRNAの成熟に関するプロセスとしてイントロンを除去するRNAスプライシングや、3'末端にアデニンを付加するポリアダニル化などのRNAプロセッシングがよく知られている。RNA編集は塩基の置換や挿入、欠失を生じるプロセスであり、RNAプロセッシングとは異なるRNA成熟過程として認識されている<sup>17)</sup>。高等植物では、RNA編集はミトコンドリアや葉緑体といった細胞内小器官において観察される<sup>17)</sup>。RNA編集は、mRNAの特定の部位において塩基の挿入や置換が起こるため、遺伝子のコード領域で起こるとコドンの変更を引き起こすことが多い(図3)。また、開始コドンの生成や終止コドンの変更等、翻訳の開始や終結の変更をもたらす例も報告されており<sup>18)</sup>、RNA編集は、正常な長さの蛋白質が発現するために必須の過程となっている。また、コドンの変更によるアミノ酸残基の置換を引き起こすRNA編集は、置換により進化的に保存性の高いアミノ酸残基に変化する例が多い<sup>18,19)</sup>。このように、RNA編集により翻訳の正常化、保存性アミノ酸残基への置換が起こるため、正常

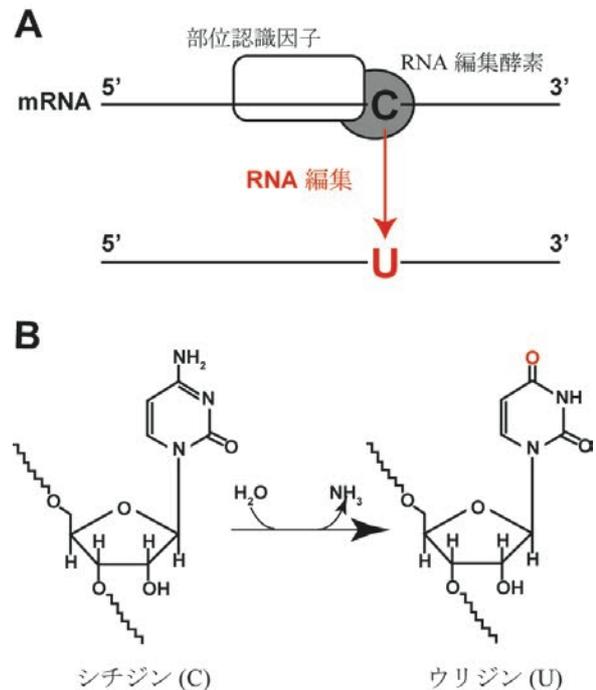


図3 RNA編集による塩基置換

RNA編集では部位認識因子によりmRNAの特定部位が認識され、RNA編集酵素によりその特定部位がCからUに置換される(A)。CからUの置換は、RNA編集酵素によって触媒される脱アミノ反応を介して行われる(B)。

な活性を示す酵素の発現にはRNA編集による塩基置換が必要である。高等植物のRNA編集において塩基置換の種類はCからUが圧倒的に多く、全体の90%以上を占める<sup>18)</sup>。また、置換の対象となるCの5'側に隣接する塩基は、T (約60%)かC (約30%)であり、90%以上の確率でピリミジン塩基である。DNA上で連続するピリミジン塩基は、紫外線照射により高頻度にピリミジン二量体形成する<sup>20)</sup>。特にチミン二量体の形成が最も頻度が高い。このためDNA中の5'-XTTX-3'配列においてチミン二量体形成を防ぐため、DNA上ではT→C置換によって5'-XTCX-3'配列として保存し、C→U置換を行うRNA編集により本来のDNA配列に対応するRNA配列、5'-XUUX-3'にRNAレベルで再置換することによって翻訳に影響が出ないようにする。この過程によって、紫外線によるDNA損傷を最小限に抑えつつ、正常な翻訳産物を生合成できると考える説が有力である<sup>19)</sup>。なかばやむなく導入したDNA上の置換変異をRNAの段階で元に戻しているという考えである。ゲノム上でTからCに置換しても蛋白質の機能に影響が出ないような配列部位では、次第にRNA編集が行われなくなり消失していったと考えられている。そのため、現在報告されているRNA編集部位には、遺伝子のコード領域内で保存性が高く、機能的に重要なアミノ酸残基の置換を伴うものが多い。実際にいくつかの酵素で、RNA編集によるアミノ酸置換が活性に与える影響について報告されている。エンドウの葉緑体DNAにコードされるアセチルCoAカルボキシラーゼβサブユニットAccDでは、RNA編集により267番目のSer (UCG)が保存性の高いLeu (UUG)に置換される。組換え酵素を用いた実験により、この置換が酵素活性に必須であることが示された<sup>21)</sup>。また、ハウレンソウの葉緑体DNAにコードされる光化学系IIのサブユニットの1つPsbFにおいても、RNA編集によりSer (UCU)が保存性の高いPhe (UUU)に置換されることが知られている。この置換が起こらない形質転換体では*in vivo*でクロロフィル含量の低下や高いクロロフィル蛍光を示し、光合成の変異で見られる典型的な表現型を示した<sup>22)</sup>。これらの結果からもRNA編集によるアミノ酸の置換は、酵素活性に重要な影響を与えられ、蛋白質の立体構造におけるアミノ酸置換部位が必ずしも活性部位付近に存在するというわけではない<sup>18)</sup>。むしろ、一般的に疎水性アミノ酸残基で構成されるフォールディングの中心部分や、親水性アミノ酸残基が多

く配置される蛋白質の表層といった一見活性とは無関係な位置にアミノ酸置換部位が存在することが多い。しかし、RNA編集によって引き起こされるアミノ酸置換はアミノ酸残基の性質を変えるもの多く、Ser (UCG)→Leu (UUG)、Ser (UCU)→Phe (UUU) や Arg (CGG)→Trp (UGG) などの置換ではアミノ酸の性質が親水性から疎水性に変わる。また、ヘリックスブレイカーとして知られるProが関わる置換も多く、活性部位周辺に位置しなくとも重要な構造変化を引き起こす可能性が高い。筆者が研究するDPORでも、クロマツなどの裸子植物の葉緑体においてRNA編集によるアミノ酸残基の置換が報告されている<sup>23-25)</sup>。DPORのサブユニット遺伝子*chlB*のコード領域において206番目のPro (CCG)と213番目のArg (CGG)のコードがそれぞれLeu (CUG)とTrp (UGG)に変換される。本稿ではこれらのアミノ酸置換がDPORの活性に与える影響について報告をしたい。

#### 4. DPORにおけるRNA編集

真核光合成生物においてDPORを構成する3つのサブユニットの全ての遺伝子*chlL*、*chlN*、*chlB*は葉緑体DNAにコードされている<sup>11)</sup>。その中で、クロマツ

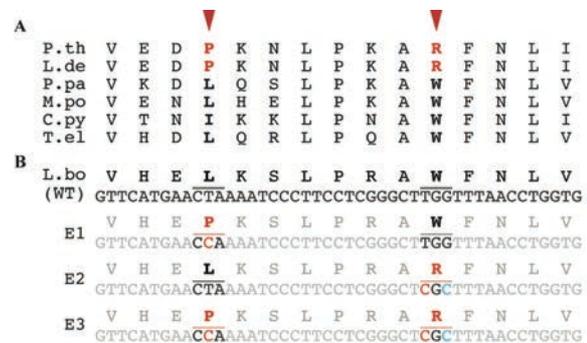


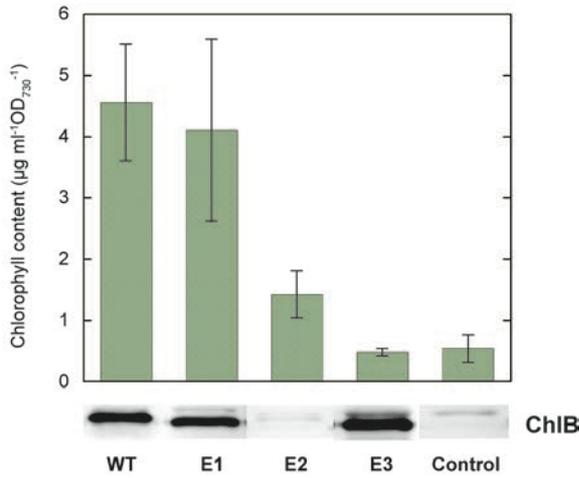
図4 裸子植物のChlBにおいてRNA編集によりアミノ酸置換が起きる領域のアライメント及びシアノバクテリアChlBへのアミノ酸置換導入

上からクロマツ *Pinus thunbergii*、カラマツ *Larix decidua*、ヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens*、ゼニゴケ *Marchantia polymorpha*、緑藻 *Chlorella pyrenoidosa*、シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* のChlBをアライメントした。クロマツおよびカラマツにおいてRNA編集により置換される部位を赤矢印で示す(A)。シアノバクテリア*L. boryana*のChlBにおいて、クロマツのRNA編集前のアミノ酸配列を再現するような2種類のアミノ酸置換を導入した。クロマツのChlBでRNA編集前にArgをコードするコドンはCGGとなっているが、シアノバクテリアのChlBにArg置換変異を導入するときにはコドン出現頻度を考慮して、CGCを使用した(シアノバクテリアでの特殊な置換を青で示す)(B)。

(*Pinus thunbergii*)では*chlN*に1箇所、*chlB*に2箇所のRNA編集部位があることが報告されている<sup>24)</sup>。特に、*chlB*における2箇所のRNA編集部位は、カラマツ (*Larix decidua*)やドイツウヒ (*Picea abies*)の*chlB*でも共通していることから、クロマツ以外の針葉樹でも同様のRNA編集が行われていると考えられる<sup>25)</sup>。この2箇所のRNA編集部位では前述のように塩基置換によりコドンが変わり、それぞれの箇所で保存性の高いアミノ酸残基へと置換される(図4A)。このRNA編集とDPORの活性の関係性は針葉樹の芽生えを用いた実験により検証が試みられてきた<sup>23,25)</sup>。針葉樹はDPORを保持するため原理的には暗所におけるクロロフィル合成、すなわち緑化が可能である。しかし、暗所では黄化してしまう種や暗所でのクロロフィル含量が明所に比べきわめて低い種も存在しており、暗所における緑化能の程度は種によって大きく異なる<sup>24,25)</sup>。この緑化能の違いは、DPORの遺伝子*chlB*におけるRNA編集の効率に起因する可能性がある。Demkoらの報告では、暗所で生育させた芽生えから経時的にサンプリングし、クロロフィル含量及びRNA編集された*chlB*のmRNA分子の比率が調べられた。常緑針葉樹であるドイツウヒは、暗所においても一定のクロロフィル含量を維持し、調べられた全期間において*chlB*のmRNAはほぼ完全にRNA編集されていた。一方、落葉針葉樹であるカラマツでは、暗所初期ではRNA編集されたmRNAの比率が高く、クロロフィル含量も維持されているが、暗所後期(14日以降)ではRNA編集されたmRNAの比率の減少に伴ってクロロフィル含量も大きく低下した<sup>25)</sup>。この報告の中でDemkoらは、*chlB*のRNA編集効率と暗所におけるクロロフィル合成能が相関していると主張した。この結果は*chlB*のRNA編集効率の変化がDPORの活性に影響を与えていることを示唆しているが、DPORの活性を直接関係づけることはできなかった。筆者は、楠見淳子博士(九州大学)と共同でカラマツの芽生えにおける*chlB*のRNA編集効率の解析を行った。その結果、暗所における発芽初期においてRNA編集されたmRNAの比率が有意に高く、暗期の継続によりその比率が低下することが確認された。この結果から、カラマツのRNA編集効率の変化はドイツウヒよりもカラマツと類似していることが明らかとなった。

## 5. RNA編集によるアミノ酸置換とDPOR活性の関係

筆者は、これまでの研究でDPOR遺伝子を破壊したシアノバクテリアの変異株で、他の生物由来のDPOR遺伝子を発現させ暗所での緑化能の相補によりDPORの活性の評価する系を確立した<sup>8,13,15)</sup>。このシアノバクテリアを用いたDPOR活性評価系は葉緑体DNAにコードされるDPORにも適用が可能で、ヒメツリガネゴケの葉緑体DNAにコードされるDPORが活性を有することを実証した<sup>15)</sup>。そこで、この系を活用してカラマツの*chlB*におけるRNA編集によるアミノ酸置換とDPOR活性の関係を直接評価しようと考えた。RNA編集により置換される2つのアミノ酸残基は広い生物間で保存されているため、カラマツ以外の生物の持つDPORにおいてもこのアミノ酸置換の効果が検証可能と思われる。まず、すでに活性測定系が確立しているシアノバクテリア *Leptolyngbya boryana* のDPORを用いてこれらのアミノ酸置換の活性への影響を調べた。RNA編集機構をもたないシアノバクテリアでは、ChlBの該当部位はすでにLeu、Trpであり、カラマツにおけるRNA編集後の残基と一致している(図4B)。これらLeuとTrpをそれぞれProとArgに置換することにより、シアノバクテリアのChlBにおいてカラマツにおけるRNA編集前のアミノ酸配列を再現させるという試みを行った。2箇所の置換部位があるので、それぞれ一方の置換と両方の置換という計3種類の変異ChlBをコードする発現シャトルベクターを構築し、シアノバクテリア *L. boryana*の*chlB*欠損株に導入した(図4B)。*L. boryana*の*chlB*欠損株はDPORの機能を失っているため、暗所においてPchlide還元が起らずクロロフィルが合成できない<sup>26)</sup>。導入した変異ChlBがDPORサブユニットとしての活性を有する場合、暗所におけるクロロフィル合成能が相補される。この *in-vivo* DPOR 相補系では、細胞のクロロフィル含量の定量により簡便に対象遺伝子のDPOR活性を調べることができる<sup>8,15)</sup>。その結果、Leu→Pro変異をもつE1株は、野生型の*chlB*を導入したポジティブコントロール(WT)とほとんど変わらないクロロフィル含量 ( $4.1 \mu\text{g ml}^{-1}$  OD<sub>730</sub><sup>-1</sup>)を示したが、Trp→Arg変異をもつE2株は、WTの1/3程度のクロロフィル含量 ( $1.4 \mu\text{g ml}^{-1}$  OD<sub>730</sub><sup>-1</sup>)を示し、両方の変異をもつE3株は、コントロールベクターを導入したネガティブコントロールとほとんど変わらない僅かなクロロフィル含量しか示さなかった(図5)。また、これら



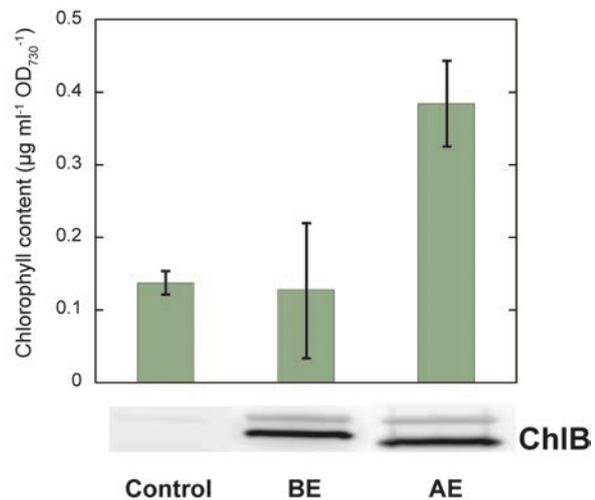
**図5 シアノバクテリアを用いた変異DPOR相補実験**  
各変異*chlB*遺伝子を*L. boryana*の*chlB*変異株に導入し、DPOR活性の相補、すなわち暗所におけるクロロフィル生合成能を評価した。各株を暗所、従属栄養条件で2週間培養し、その細胞から色素を抽出しクロロフィル含量を定量した。また、各細胞抽出液におけるChlBを抗ChlB抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。

の相補株におけるChlBの含量をウェスタンブロッティングで確認した。E2株以外の2株はWTとほぼ同程度のChlB含量を示すことが確認された。これらの結果から、E3株においてはChlBの含量はWTと変わらないにも関わらずDPORとしての機能を示さないことから、2つの変異をもつChlBは質的にDPORの機能を失っていると示唆された。E2株においてウェスタンブロッティングでChlBのシグナルが検出されなかった。これはTrp→Arg変異によりChlBの安定性が低下し細胞内で分解されたためと考えられる。そのためE2におけるクロロフィル含量の低下はChlBの量的な減少によるものと推察される。これらの結果から、ChlBのこれら2つのアミノ酸残基の両方が置換されるとDPORの活性がほとんど失われることが示された。ここまでは、RNA編集によるアミノ酸置換を模倣したシアノバクテリアの変異ChlB蛋白質の活性の評価であった。続いて、実際にクロマツ自身のDPORを用いて実験を行った。クロマツの葉緑体DNAから*chlB*、*chlN*の各遺伝子をクローニングし、シアノバクテリアでのDPOR相補系による活性評価を行った。クロマツ葉緑体DNAから増幅した遺伝子はRNA編集前の配列であるため、RNA編集による塩基置換は部位特異的変異導入により人為的に導入した。この際、*chlN*についても1箇所のRNA編集が報告されていたため、ChlNの284番目のPro (CCU)をSer (UCU)に置換する変異も同時に導入した。これら

の遺伝子を*L. boryana*の*chlB*欠損株に導入し、暗所におけるクロロフィル生合成能を評価した。その結果、RNA編集前の配列をもつクロマツ*chlN-chlB*を導入したBE株は、コントロールベクターを導入したネガティブコントロールと同様の僅かなクロロフィル含量しか示さなかったが、RNA編集後の配列をもつ*chlN-chlB*を導入したAE株では有意なクロロフィル含量の増加が確認された(図6)。この結果から、RNA編集がDPORの活性調節に関与していることが直接的に裏付けられた。

## 6. DPORにおけるRNA編集の生理学的意義

針葉樹における*chlB*のRNA編集の効率の変化、そしてそれに伴うDPORの活性変化の生理学的な意義について議論したい。これまでの結果からRNA編集によるアミノ酸置換がDPORの活性の有無を決定づけていると考えられる。したがって、RNA編集活性が高い時期に生合成されるDPORは活性型であり、これはDemkoらの報告にあるRNA編集の効率と暗所でのクロロフィル生合成能の関係とよく符合する。カラマツの暗所芽生えにおいては発芽初期では*chlB*のRNA編集効率が高かったものの、暗期が長期にわたるとその効率が下がり、それに伴ってクロロフィルの生合成がほぼ停止した。それに対し、ドイツトウヒでは長期の暗所処理においても*chlB*のRNA編集効率が低下せず、DPORによ



**図6 クロマツの*chlN-chlB*を用いたDPOR相補実験**  
クロマツ葉緑体DNAからクローニングした*chlN-chlB* (Before editing, BE)及び、RNA編集による塩基置換を導入した*chlN-chlB* (After editing, AE)を*L. boryana*の*chlB*変異株に導入し、暗所におけるクロロフィル生合成能を評価した。また抗ChlB抗体を用いたウェスタンブロッティングで各株の抽出液中のChlBの含量を確認した。

るクロロフィルの生合成が安定に継続する<sup>25)</sup>。カラマツは長期の暗期に対し*chlB*のRNA編集効率を下げることでDPORの機能をオフにし、あえてクロロフィル生合成を停止するという戦略を取っているのかもしれない。この戦略はDPORをもたない被子植物のそれと近いものになっている。このようにDPORを保持する針葉樹の間で、暗所におけるクロロフィル生合成能に大きな違いが見られる。この違いは、それぞれの種の光強度と光合成活性の関係性に反映している。カラマツは陽樹で、弱光では光合成活性が低い、強光下では高い光合成活性を示す。それに対し、ドイツトウヒは陰樹で、弱光下での光合成に適している<sup>25)</sup>。一般的に陰樹は弱光の効率的な利用に優れ、日陰でも十分に生育することができる。陰樹は、僅かな光を最大限に利用するため常に効率的な集光系を準備し、一時的な僅かな光でも光合成に利用する。そのため弱光や暗所においても光化学系および集光系を準備するため光の有無に関わらずクロロフィルの生合成を行うように適応してきたと解釈できる。一方で、カラマツの様な陽樹は、光合成の効率がよくない弱光下や光合成のできない暗所では、光合成を行わず、光が十分に強いときのみ光合成活性を最大限まで引き上げる戦略をとる。そのため暗所では、あえてクロロフィルを作らないように適応してきたのかもしれない。暗所におけるクロロフィル生合成の必要性は、弱光や暗所に対する針葉樹の適応戦略に依存していると考えられる。*chlB*のRNA編集効率変化は、DPORの活性制御を通して各々の戦略に合うような集光系の最適化に寄与しているのかもしれない (図7)。なお弱光下におけるクロロフィル生合成では光依存的な酵素LPORの寄与についても解析する必要がある。もともとはDNA損傷を防ぐために導入した塩基置換を相補するためにRNA編集機構が成立したが、進化の過程で、RNA編集による機能的に重要なアミノ酸置換を酵素活性の制御系として利用するようになったと考え、RNA編集の進化は実に興味深い。

## 7. おわりに、そして今後の展開

本稿では、クロロフィル生合成系の酵素DPORが、転写後mRNA成熟プロセスの1つであるRNA編集を紹介してその活性が調節されるという新しい制御機構を紹介した。今後の課題として、光の環境に応じてRNA編集効率を調節している未知の因子を明らかにして、そ

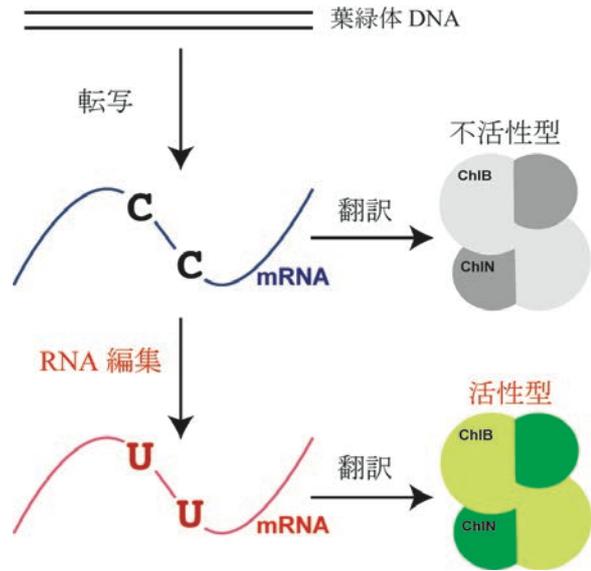


図7 RNA編集によるDPOR活性制御のモデル

クロマツやカラマツのDPORは*chlB*のmRNAのRNA編集効率の変化によりDPORの機能を制御し、暗所におけるクロロフィル生合成をコントロールしている。

の制御メカニズムを解明する必要がある。最近、RNA編集に関わる蛋白質が多数報告され、その特異的なmRNA配列認識機構に注目が集まっている<sup>27-29)</sup>。今回の報告では、DPORに焦点を当て、RNA編集と暗所でのクロロフィル生合成能との関係性を議論したが、RNA編集前のmRNAから生合成される不活性なChlBの機能についても考察する点が多い。まず、RNA編集の有無に関わらず*chlB*のmRNAレベルが保たれることから、不活性型のChlBが発現していると考えられる。この“非編集”ChlBがDPORのサブユニットとは異なる別の機能を担っている可能性も考えられる。実際にトウモロコシのミトコンドリアDNAにコードされるリボソーム蛋白質 S12 (Rps12) ではRNA編集を受けていないmRNAの翻訳が確認されている<sup>30)</sup>。また、ヒトのDNA修復酵素NEIL1では、RNA編集後のmRNAに由来する蛋白質と未編集のmRNAに由来する蛋白質とで認識配列特異性や活性が異なるという報告がある<sup>31)</sup>。遺伝子の転写自体を抑制するのではなく、あえて未編集のmRNAから蛋白質を発現させているとすれば、別の機能を担っていてもなんら不思議はない。RNA編集前のmRNAに由来するChlBについて、その機能解析を行っていききたい。今後、次世代シーケンサーの普及に伴い、様々な生物で多様なRNA編集が発見されていくに違いない。その中で今回の報告のような環境に回答したRNA編集効率の変化を介し酵素の機能を調節する

例が新たに見つかることが期待される。本研究が、それらの先駆けとなれるように精進していきたい。

## 謝辞

裸子植物の芽生えを用いたRNA編集効率の解析は九州大学の楠見淳子博士に行っていただきました。また本研究は名古屋大学の藤田祐一准教授のもとで行われたものです。最後に本研究の紹介の機会を与えていただいた「光合成研究」編集委員の皆様にも深く感謝致します。

Received July 15, 2012, Accepted August 7, 2012,  
Published August 31, 2012

## 参考文献

1. Tanaka, R., and Tanaka, A. (2007) Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 321-346.
2. Masuda, T., and Fujita, Y. (2008) Regulation and evolution of chlorophyll metabolism, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1131-1149.
3. Heyes, D. J., and Hunter, C. N. (2005) Making light work of enzyme catalysis: protochlorophyllide oxidoreductase, *Trends Biochem. Sci.* 30, 642-649.
4. Fujita, Y., and Bauer, C. E. (2000) Reconstitution of light-independent protochlorophyllide reductase from purified BchL and BchN-BchB subunits. In vitro confirmation of nitrogenase-like features of a bacteriochlorophyll biosynthesis enzyme, *J. Biol. Chem.* 275, 23583-23588.
5. Nomata, J., Swem, L. R., Bauer, C. E., and Fujita, Y. (2005) Overexpression and characterization of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus*, *Biochim. Biophys. Acta* 1708, 229-237.
6. Nomata, J., Kitashima, M., Inoue, K., and Fujita, Y. (2006) Nitrogenase Fe protein-like Fe-S cluster is conserved in L-protein (BchL) of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus*, *FEBS Lett.* 580, 6151-6154.
7. Nomata, J., Ogawa, T., Kitashima, M., Inoue, K., and Fujita, Y. (2008) NB-protein (BchN-BchB) of dark-operative protochlorophyllide reductase is the catalytic component containing oxygen-tolerant Fe-S clusters, *FEBS Lett.* 582, 1346-1350.
8. Yamamoto, H., Kurumiya, S., Ohashi, R., and Fujita, Y. (2009) Oxygen sensitivity of a nitrogenase-like protochlorophyllide reductase from the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*, *Plant Cell Physiol.* 50, 1663-1673.
9. Sarma, R., Barney, B. M., Hamilton, T. L., Jones, A., Seefeldt, L. C., and Peters, J. W. (2008) Crystal structure of the L Protein of *Rhodobacter sphaeroides* light-independent protochlorophyllide reductase with MgADP bound: a homologue of the nitrogenase Fe protein, *Biochemistry* 47, 13004-13015.
10. Muraki, N., Nomata, J., Ebata, K., Mizoguchi, T., Shiba, T., Tamiaki, H., Kurisu, G., and Fujita, Y. (2010) X-ray crystal structure of the light-independent protochlorophyllide reductase, *Nature* 465, 110-114.
11. Fujita, Y., and Bauer, C. E. (2003) The light-independent protochlorophyllide reductase: a nitrogenase-like enzyme catalyzing a key reaction for greening in the dark, in *Chlorophylls and Bilins: Biosynthesis, Synthesis, and Degradation* (Kadish, K., Smith, K.M., and Guilard, R., Eds.) pp 109-156, Academic Press, Amsterdam.
12. Yamazaki, S., Nomata, J., and Fujita, Y. (2006) Differential operation of dual protochlorophyllide reductases for chlorophyll biosynthesis in response to environmental oxygen levels in the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*, *Plant Physiol.* 142, 911-922.
13. Yamamoto, H. (2011) Comparative biochemical analysis of protochlorophyllide reductases, PhD. thesis, Nagoya University, Japan.
14. Fujita, Y., Takagi, H., and Hase, T. (1998) Cloning of the gene encoding a protochlorophyllide reductase: the physiological significance of the co-existence of light-dependent and -independent protochlorophyllide reduction systems in the Cyanobacterium *Plectonema boryanum*, *Plant Cell Physiol.* 39, 177-185.
15. Yamamoto, H., Kurumiya, S., Ohashi, R., and Fujita, Y. (2011) Functional evaluation of a nitrogenase-like protochlorophyllide reductase encoded by the chloroplast DNA of *Physcomitrella patens* in the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*, *Plant Cell Physiol.* 52, 1983-1993.
16. Yamamoto, H., Nomata, J., and Fujita, Y. (2008) Functional expression of nitrogenase-like protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus* in *Escherichia coli*, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1238-1242.
17. Knoop, V. (2011) When you can't trust the DNA: RNA editing changes transcript sequences, *Cell Mol. Life Sci.* 68, 567-586.
18. Yura, K., and Go, M. (2008) Correlation between amino acid residues converted by RNA editing and functional residues in protein three-dimensional structures in plant organelles, *BMC Plant Biol.* 8, 79.
19. Tillich, M., Lehwark, P., Morton, B. R., and Maier, U. G. (2006) The evolution of chloroplast RNA editing, *Mol. Biol. Evol.* 23, 1912-1921.
20. Häder, D. P., and Sinha, R. P. (2005) Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact, *Mutat. Res.* 571, 221-233.

21. Sasaki, Y., Kozaki, A., Ohmori, A., Iguchi, H., and Nagano, Y. (2001) Chloroplast RNA editing required for functional acetyl-CoA carboxylase in plants, *J. Biol. Chem.* 276, 3937-3940.
22. Bock, R., Kössel, H., and Maliga, P. (1994) Introduction of a heterologous editing site into the tobacco plastid genome: the lack of RNA editing leads to a mutant phenotype, *EMBO J.* 13, 4623-4628.
23. Karpinska, B., Karpinski, S., and Hällgren, J. (1997) The *chlB* gene encoding a subunit of light-independent protochlorophyllide reductase is edited in chloroplasts of conifers, *Curr. Genet.* 31, 343-347.
24. Kusumi, J., Sato, A., and Tachida, H. (2006) Proceedings of the SMBE Tri-National Young Investigators' Workshop 2005. Relaxation of functional constraint on light-independent protochlorophyllide oxidoreductase in *Thuja*, *Mol. Biol. Evol.* 23, 941-948.
25. Demko, V., Pavlovic, A., Valková, D., Slovák, L., Grimm, B., and Hudák, J. (2009) A novel insight into the regulation of light-independent chlorophyll biosynthesis in *Larix decidua* and *Picea abies* seedlings, *Planta* 230, 165-176.
26. Fujita, Y. (1996) Protochlorophyllide reduction: a key step in the greening of plants, *Plant Cell Physiol.* 37, 411-421.
27. Ohtani, S., Ichinose, M., Tasaki, E., Aoki, Y., Komura, Y., and Sugita, M. (2010) Targeted gene disruption identifies three PPR-DYW proteins involved in RNA editing for five editing sites of the moss mitochondrial transcripts, *Plant Cell Physiol.* 51, 1942-1949.
28. Uchida, M., Ohtani, S., Ichinose, M., Sugita, C., and Sugita, M. (2011) The PPR-DYW proteins are required for RNA editing of *rps14*, *cox1* and *nad5* transcripts in *Physcomitrella patens* mitochondria, *FEBS Lett.* 585, 2367-2371.
29. Fujii, S., and Small, I. (2011) The evolution of RNA editing and pentatricopeptide repeat genes, *New Phytol.* 191, 37-47.
30. Phreaner, C. G., Williams, M. A., and Mulligan, R. M. (1996) Incomplete editing of *rps12* transcripts results in the synthesis of polymorphic polypeptides in plant mitochondria, *Plant Cell* 8, 107-117.
31. Yeo, J., Goodman, R. A., Schirle, N. T., David, S. S., and Beal, P. A. (2010) RNA editing changes the lesion specificity for the DNA repair enzyme NEIL1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 20715-20719.

## RNA Editing Regulates the Activity of Dark-Operative Protochlorophyllide Oxidoreductase

Haruki Yamamoto\*

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

## 果実の光合成<sup>§</sup>

早稲田大学 教育・総合科学学術院  
園池 公毅<sup>\*</sup>

### 1. はじめに

筆者は、ちょうど十年前から中学・高校の生徒や一般の人を対象に光合成の実験を体験してもらう体験教室を続けている。その中で人気の高いのが光合成の可視化実験である。カメラのシャッターを連続的に切ることによって植物のクロロフィル蛍光の時間変化をとらえると、いろいろな植物の「光合成活性」の二次元分布を簡単に見積もることができる。測定にかかる時間は1回につき5分程度であるから、必要に応じて材料・条件を変えて何度でも測定が可能である。一般的な科学の体験教室では、決められた実験を行ない、それについて考察あるいは解説をして終わる例が多いが、光合成可視化実験では、生徒自身が考察した結果を踏まえてさらに新たな実験を考案・実施できる点ができる点が味噌である。「仮説の設定—実験—考察—新たな仮説の設定—実験—考察—・・・」という研究のサイクルを疑似体験できることからなかなか評判がよい。

そればかりではなく、筆者自身にとっても発見があった。さまざまな材料で光合成を測定してみると、今まで葉の光合成を中心にしか考えてこなかった不勉強がひしひしと感じられる。例えば、アカカタバミの葉、ナスの実の表面、八百屋で買ってきたムラサキキャベツの葉はいずれも紫色に見えるが、この中でどれが光合成活性を持っていてどれが持っていないかわかりだろうか。正解は、順に、「光合成する」、「場合による」、「光合成しない」である。アカカタバミの葉はたとえ紫色であっても、その葉で生育している以上光合成をしているのは当然で、これを間違える人はいないだろう。一方、果実でも緑色のものは一般に光合成をしているのだが、ナスなどは判断が難しい。色は同じ紫色に見えても成熟の段階によって実際には

結果が異なり、一般に若い実ではクロロフィルを持って光合成をしているが、成熟に伴って光合成活性は失われるようである。最後のムラサキキャベツは、アカカタバミ同様、その葉の光合成により生きていのであれば、光合成をしているはずである。しかし、実際には八百屋で買ってきたムラサキキャベツの葉を測定しても光合成活性を検出できない。正直なところ、これは全く予想外だった。ムラサキキャベツの場合は八百屋で売っている結球部には光合成活性がないのである。現実の畑では、結球部の周りに広がった葉が存在するので、そこの光合成により生育が維持される。ごく当たり前のことではあるが、生き物の働きを考えるためには、常に自然の環境を考慮する必要があるというのが教訓である。ちなみに普通のキャベツでは結球部においても光合成活性が認められるので、なかなか一筋縄ではいかない。

さて、そのような実験をしているうちに、葉以外の光合成もなかなか面白いぞと思い始め、いろいろ過去の研究を調べたり、少しずつまじめな実験を進めたりしてきた。以下は、いわばその勉強の成果である。

### 2. 葉以外の器官における光合成

植物は光合成器官として光合成に特化した葉を持つが、光合成の場は葉緑体であり、葉緑体が存在すれば葉以外の器官でも光合成をすることは古くから知られていた。葉緑体のクロロフィルは赤色部と青色部の光を吸収するため、組織の色は葉緑体の存在のよい指標となる。紅藻やシアノバクテリアなどのフィコビルンを含む生物においては、青色のフィコビルンと黄色いカロテノイドが存在するとクロロフィル量が少なくても緑色に見える場合があるが、陸上植物においては花卉以外に大量の青色色素が蓄積する例は少ないため、

<sup>§</sup> 第2回日本光合成学会シンポジウム 発表賞受賞論文（ポスター発表）

<sup>\*</sup> 連絡先 E-mail: sonoike@waseda.jp



図1 緑色を帯びた花弁を持つクリスマスローズ

基本的には緑色に見える組織は光合成をすると考えてよい。

多くの草本の茎は緑色であり、木本においても若い枝は緑色であることが多く、いずれの場合においても光合成の電子伝達活性が検出される。草本の茎では葉と同様に光合成による正味の二酸化炭素吸収が見られるが、木本の枝の場合は正味の二酸化炭素吸収は見られないことが多く、後述する果実の光合成においてと同様、枝の内部組織の呼吸で発生する二酸化炭素を樹皮の光合成により再固定する側面が強いと考えられる<sup>1)</sup>。

生殖器官である花についても、緑色の萼は光合成を行なう。昆虫の誘因に大きな役割を果たす花弁の場合は、葉と見分けられることが必要なため一般的には緑色のものは少ないが、例えばクリスマスローズの一種は緑色を帯びた花弁を持つ(図1)。クリスマスローズ (*Helleborus viridis* L. agg.) の花弁をクロロフィル蛍光とガス交換で解析した結果によれば、光化学系IIの最大量子収率の指標であるFv/Fmおよびクロロフィルa/b比は、葉でも花弁でも果実でもあまり変わらない。クロロフィル蛍光でみると果実は葉の8割程度の電子伝達活性を示すが、花弁面積当たりのガス交換速度(二酸化炭素吸収速度)は葉の1/4程度にとどまる<sup>2)</sup>。それでも、この植物の場合、早春には葉よりも花弁の面積の方が大きな割合を占めるので、個体の光合成に対する寄与は花弁の方が葉よりも多い場合がある。コムギの花柄を止葉(最上位葉)と比較した実験においては、チラコイド膜の構造、光化学系IIの最大量子収率の指標Fv/Fm、電子伝達の収率の指標ΦIIいずれも、発達段階の初期には差が見られず、むしろ止葉で先に老化がみられる<sup>3)</sup>。花柄に光を当てないと種

子の生育が遅れることから、コムギの花柄は物質生産にとって意味のあるものであることがわかる<sup>3)</sup>。

根の場合は上記の例とは異なり、1) 地中では光が当たらなければ光合成ができず、2) 被子植物においてはクロロフィル合成に光が必要なためそもそも地中では葉緑体が形成されないことから、通常の根においては光合成の活性は認められない。しかし、マングローブの気根や着生ランのように、自然の状態では地上に存在する根においては、緑化が認められ、葉緑体が発達することが報告されている<sup>4,5)</sup>。自然の状態で地中にある根においては光を当てても顕著な緑化は起こらない場合が多く、シロイヌナズナにおいては根の緑化が地上部からの植物ホルモンのシグナルによって抑制されていることを東大の増田建先生のグループがごく最近報告されている<sup>6)</sup>。増田先生のご研究では、強制的に緑化させた根では正味の二酸化炭素吸収がみられるとのことであるから、根でも潜在的には光合成の能力を持つと結論できる。なお、青首大根で顕著に緑化する「青首」の部分は、実際には根ではなく下胚軸に相当するようであり、光合成をしていると思われる。

### 3. 果実の気孔と光合成色素

赤や黄色、青など色とりどりの果実をつける植物においても、未熟な段階での果実は緑色である場合が多い。前述したように、ナスのように小さいうちから紫色であって緑には見えない果実の場合でも、多量の紫色の色素(この場合はナスニン)によってクロロフィルの色が隠蔽されて緑色に見えないだけで、若い果実から色素を有機溶媒で抽出すればクロロフィルを検出することができ、また光合成活性も確認することができる。

生殖器官を持つことは植物の生長にとって一種のコストとなる。花や果実に葉緑体を持たせることは、そのコストの一部を光合成によって賄うことを目的としていると解釈できる。温帯の樹木15種において花や果実の光合成を解析した結果においては、花や果実の光合成が実際に生殖コストの軽減に寄与していることが示されている<sup>7)</sup>。

果実には気孔が存在し(図2)、その数は発生段階を通して一定であって、果実の表面積の増大とともに気孔密度は低下するとされている<sup>8)</sup>。若い果実の気孔は閉鎖を行なうが、発生段階が進むにつれて気孔が皮目に変化することも多いということなので、表皮の透

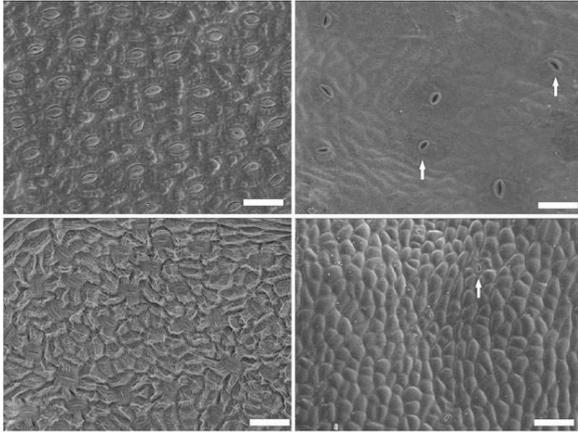


図2 葉(左)と果皮(右)のSEM画像(Ref. 9より許可を得て転載)

上段はアカシア、下段はキョウチクトウ、白棒は50 μmを示す。

過性は果実の成熟とともに徐々に低下していくと考えられる。アカシア、キョウチクトウ、ニワウルシの果皮の場合、気孔密度は葉の1/4から1/10程度と報告されている<sup>9)</sup>ことから、外部からの正味の二酸化炭素吸収速度はそれほど大きくないことが予想される。

果皮は緑色である場合にも、そのクロロフィル濃度は葉に比べると低いことが多い<sup>9)</sup>。ヒヨコマメでは面積当たりでも生重量当たりでもクロロフィル量に莢(さや)・種子・胚の間で大きな違いはないが、果実が熟していくにつれて低下する<sup>10)</sup>。クロロフィル $a/b$ 比は葉に比べて果皮や種子では低く、発生段階の進行とともにさらに低下するのが一般的である<sup>9,11-13)</sup>。トマトの果実のクロロフィル $a/b$ 比は発生初期には2.44だったものが発生後期には1を切ると報告されている<sup>12)</sup>。ダイズの種子の $a/b$ 比が低下する際には、これに対応して葉緑体のグラナスタックが増加することも観察されている<sup>13)</sup>。セイヨウアブラナの果実においても、グラナスタックの割合の多いチラコイド膜が観察されているが、不思議なことに非変性PAGEでみたクロロフィルタンパク質複合体の比率は葉と同程度と報告されている<sup>14)</sup>。クロロフィルタンパク質複合体の単離のためには、まず果実からのチラコイド膜の単離が必要であるが、果実は多量のデンプンとポリフェノールを含む場合が多く、クロロフィルの濃度が薄いこともあってチラコイド膜の収量は極めて低いことが多い。電子顕微鏡観察の結果と生化学的な解析結果の食い違いは、特定の性質を持つチラコイド膜が選択的に単離されてきた結果である可能性が考えられる。

果実のカロテノイド量は、クロロフィルあたりで見

たときには葉よりも高いことが多く、厚みを持つ果実では内部まで光が届きにくいいため、クロロフィルの吸収が少ない領域の光を利用する目的でカロテノイドが働いているのではないかと議論がなされている<sup>9,11)</sup>。

#### 4. 果実の光合成

では、果実は実際にどの程度の光合成活性を持つのだろうか。果実のように、厚みがあり、内部では呼吸によって正味の二酸化炭素発生が起こっているような組織で、光合成による二酸化炭素の収支を正確に測定することは簡単ではないが、<sup>14</sup>Cでラベルした二酸化炭素を利用することによりある程度の情報を得ることができる。ヒヨコマメについてラベルした二酸化炭素によって光合成を測定した結果においては、莢と種皮と胚は全て光合成能を持つが、莢だけが正味の二酸化炭素固定を行っていた<sup>10)</sup>。逆にいえば、種皮と胚は光合成をする組織ではあるものの、光合成産物を生み出すソースにはなっていないことが分かる。セイヨウアブラナの種子でも<sup>14</sup>Cの取り込みで見た光合成速度は葉より低く、液相酸素電極でみた酸素発生速度は呼吸速度と同程度でソースにはなっていない<sup>14)</sup>。

一方、電子伝達活性をクロロフィル蛍光で測定した場合には、果実表面でも葉に匹敵する活性を示すことが多い。クロロフィル蛍光測定においては、呼吸活性が大きくても光合成の測定に影響を及ぼさないため、果実のような組織を測定対象とした場合に威力を発揮する。トマトの実をクロロフィル蛍光によって測定した例では、その光-光合成曲線は多少弱光馴化した特徴を示すが、物質生産に対する寄与は小さくないことが示されている<sup>15)</sup>。同じくトマトにおいて、果実全体としては二酸化炭素の正味の放出を示す場合でも、クロロフィル蛍光からは電子伝達活性が認められ、発生初期には $F_v/F_m$ は0.8を超えることが報告されている<sup>12)</sup>。二酸化炭素固定活性に関しては、RuBisco活性、PEPCase活性が共に認められ、後者の活性の方が高いと報告されている<sup>12)</sup>。一般的に果実においては、PEPCaseによる二酸化炭素のリンゴ酸への固定がみられ、 $C_4/CAM$ 植物のような二酸化炭素濃縮・蓄積系の役割を果たしている可能性があり、RuBisco活性はそれほど重要でないとの指摘もある<sup>8)</sup>。コムギの花柄においても、PEPCase活性が果実の成熟後期には葉より高くなることが報告されている<sup>3)</sup>。しかし、ダイズの

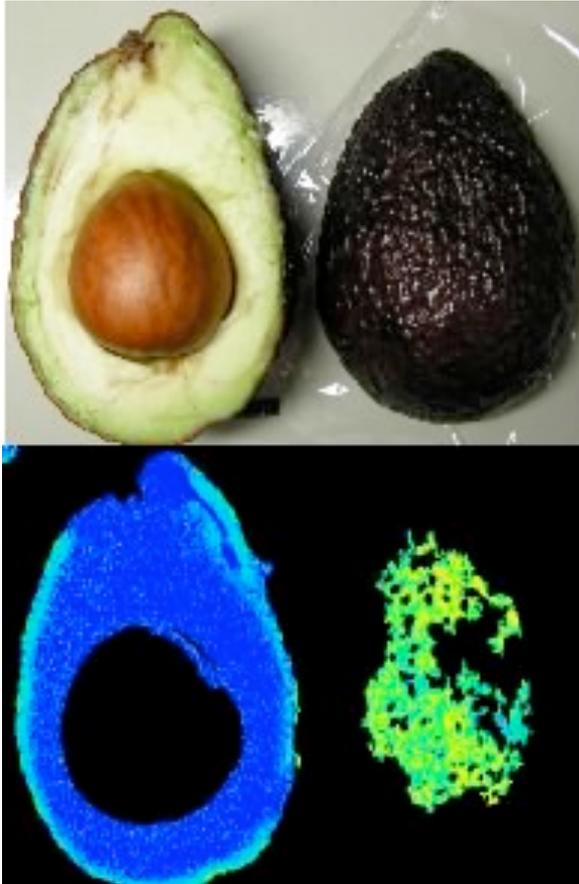


図3 アボガドの断面と表面の写真とクロロフィル蛍光変化の疑似カラー画像

種子ではRuBiscoが働いていると報告されており<sup>16)</sup>、ナタネとダイズの種子で明暗周期を通して調べた結果においても、RuBiscoは明暗に関わらず活性を持っていることが報告されている<sup>11)</sup>。果実が特殊な炭素同化経路を持っているという主張が正しいかどうかについては、今後も研究が必要であると考えられる。

クロロフィル蛍光による光合成測定においては、カメラを用いた二次元測定が簡単にできるため、果実の断面における光合成の分布の解析も容易である。例えば、図3には、アボガドの断面と表面について、写真（上段）とクロロフィル蛍光画像（下段）を対比させて示している。下段に示す蛍光画像においては、励起光の照射を開始した時の蛍光強度（ $F_0$ ）と、蛍光が極大値に達した時の蛍光強度（ $F_p$ ）から計算される蛍光変化の相対比 $(F_p - F_0) / F_p$ を疑似カラーにより示している。疑似カラーでは相対蛍光変化が大きくなるにつれて、青から緑を経て黄色になるように示しており、これを光合成の収率の大雑把な指標として扱うことが可能である。写真の右側の果皮は、見た目は真黒であるが、下段の蛍光変化の画像から、ある程度の光

合成能をもつことがわかる。また、中央の種子は光合成をしていない（クロロフィルを持たない）ものの、いわゆる果肉の部分は光合成をしており、特に果皮の直下では中央近くに比べて蛍光変化が大きいことが見てとれる。このような測定は極めて簡便であるため、1990年代の初頭から行なわれており、15種類の果実を比較した例<sup>17)</sup>や、エンドウとオオムギの種子の断面の光合成をパルス変調クロロフィル蛍光イメージングで観察した例<sup>18)</sup>がある。エンドウでは電子伝達速度が弱光で飽和し、果実の内側になるほど同じ励起光で測定した場合の電子伝達の収率が低下する一方、非光化学消光が大きくなる<sup>18)</sup>。これらの結果は、果実の内部には光環境の大きな勾配があり、異なる光環境に応じて光合成装置が馴化していることを示しているのだろう。オオムギでは果皮の特定の薄い層にのみクロロフィルがみられるが、この部分の葉緑体は葉のものと見分けがつかず、比較的高い電子伝達速度を示す<sup>18)</sup>。オオムギの果皮の電子伝達は、葉ほどではないが、エンドウの種子と比べるとより強光まで飽和しない。同様にクロロフィル蛍光イメージングと電子顕微鏡により発達段階の異なるダイズの種子を解析した例によれば、発達初期には種子表面近くと種子内部の光合成の差は少ないが、中期から後期にかけて内部の電子伝達速度が大きく低下することが報告されている<sup>19)</sup>。この場合は、発達段階における光環境の変化を反映しているというよりは、代謝自体が種子の発達に伴って変化し、その変化が内部でより早く進行すると解釈するのが自然であると思われる。

### 5. 果実の光合成の生理的意義

果実であっても最外層は外界に面しており、光環境は葉の場合と変わらない。パルス変調クロロフィル蛍光法により測定した果実表面の電子伝達速度の光飽和曲線は、葉と変わらない例<sup>1)</sup>、葉より弱光で飽和する例<sup>15)</sup>、など必ずしも一定ではないが、若い果実表面の場合は、基本的には葉と同等の電子伝達活性を示すと考えてよいだろう。一方で、気孔密度が低く、内部で盛んな呼吸が起こることから、二酸化炭素環境は葉と大きく異なる。果実の光合成において、その主要な役割が外界からの二酸化炭素吸収なのか、それとも内部で発生した呼吸による二酸化炭素の再固定なのかについては、古くから議論があった。トマトおよびアボガドの表面の光合成をパルス変調クロロフィル蛍光によ

り測定した結果においては、外気から二酸化炭素を除いたのちも光合成の電子伝達活性は長く維持される。果実の外側部分だけにした場合には二酸化炭素濃度を低下させると短時間で電子伝達活性が落ちることを考え合わせると、トマトやアボガドの果実表面の光合成の主要な目的は、主に果実内部で発生する二酸化炭素の再固定であると考えられる<sup>17)</sup>。ヒヨコマメの莢全体を高濃度の二酸化炭素にさらした場合には光合成活性は上昇しないが、莢の中に二酸化炭素を注入するとその80%以上が固定される<sup>10)</sup>との実験結果も上記の仮説を支持する。莢のどの部分で光合成を行なっているかをさらに細かく調べると、莢の内側部分の葉緑体量は全体の15%以下であり、二酸化炭素固定活性も全体の40%以下であることから、莢の内側などの特定の部位で二酸化炭素の再固定が行なわれているわけではなく、莢全体が再固定を担っていると考えられる<sup>10)</sup>。

一方で、莢の中の種子を考えた場合は、外側の緑色部分によって光の大部分が吸収され、内部は極端な弱光条件になっている。例えば莢の透過率は緑色の光の領域でもダイズで30%程度<sup>16)</sup>、ナタネでは20%程度<sup>11)</sup>、ソラマメにいたっては数%である。当然そのような環境下の光合成は弱光に馴化していると考えられる。ダイズ種子の成熟の過程において電子伝達が低下していく際には、種子内部の電子伝達活性が光飽和しづらくなっているとの報告もあるものの<sup>19)</sup>、一般的には、果実内部は弱い光で電子伝達が飽和する弱光馴化型の光合成を示すとの報告が多い<sup>9,18)</sup>。いずれにせよ、果実の表面とは異なり、内部の種子・子葉の光合成速度の絶対値はかなり小さく、その光合成に生理的な意義があるかどうかについては古くから議論の対象であった。

ナタネやダイズの果実は莢を持ち、種子はその内部に作られる。ナタネの胚を放射性炭素でラベルした炭素源を加えて組織培養した実験においては、炭素取り込み効率は光照射により上昇し、DCMU添加で暗所レベルに戻った<sup>20)</sup>。ナタネとダイズの種子で代謝に対する光の影響を検討した例では、脂肪酸の種子への蓄積は莢を部分的に暗くすると低下し、レドックス制御を受けるリンゴ酸脱水素酵素の活性を種子で調べると、光条件では活性化され暗所で不活化されていた<sup>11)</sup>。これらの結果は、内部の種子においても光環境の変化に应答して代謝の状態を調節していることを示している。ダイズを用いた代謝物ラベル実験によれば、

光はATP合成に寄与するが、還元力の正味の生成は見られず<sup>16)</sup>、ナタネの種子の光合成速度はスクロース添加で上がることから、光合成の主要な役割は、母体から供給された糖を油脂に変換するためのATPとNADPHの供給にある<sup>14)</sup>との指摘がなされている。ただし、ダイズの種子の光合成と脂質合成の間には負の相関がみられる<sup>21)</sup>との報告もある。

これらの考え方とは異なり、果実内における光合成の意義を、果実内の活発な呼吸による低酸素状態を酸素発生によって緩和することに求める考え方もある<sup>4)</sup>。扁平な葉と比べて、丸い果実は体積当たりの表面積が小さいうえに、先にも述べたように果実表面の気孔密度は低い。酸素プローブによって種子内の酸素濃度を直接測定すると、酸素濃度は表面から中心へと低下し、この酸素濃度は暗所ではさらに低下する。また、低酸素が果実内のさまざまな代謝活性を制限していること自体については多くの報告がある<sup>21)</sup>。ナタネの脂質への炭素取り込みが外気の酸素濃度を60%にまで増加させても変化しなかったというデータも報告されている<sup>20)</sup>ので、実際の物質代謝に対する酸素の重要性は必ずしも確定的ではない。しかし外部の酸素濃度を上げた実験においては、莢の透過性をも考慮に入れる必要があることを考えると、光合成の酸素発生が低酸素状態の緩和に働いている可能性は高いように思われる。

## 6. 果実の光合成装置の特殊性

上述のように、若い果実の表面(果皮)の光合成は、葉の光合成とそれほど大きな違いを持たないように思われる。一方、果実の内部、種子や胚、子葉などの光合成に関しては、外部から透過する弱光に馴化するため、アンテナサイズを増大させると考えられる。これは、クロロフィル*a/b*比が葉などに比べて低いこととよく対応する。もともと、一般的に果実は多量のデンプンとポリフェノールを含むため、チラコイド膜の単離も困難な場合が多く、生化学的な仕事は皆無と言ってよい。実際にどのような変化が起こっているのかという点については、必ずしも明確ではない。

単に弱光に馴化しているというだけでなく、光合成装置自体に違いがある場合もみられる。これまで、光合成のメカニズムに踏み込んで果実を研究した例はほとんどないが、クロロフィル蛍光の立ち上がり速度をアカシア、キョウチクトウ、ニワウルシの果皮と果実

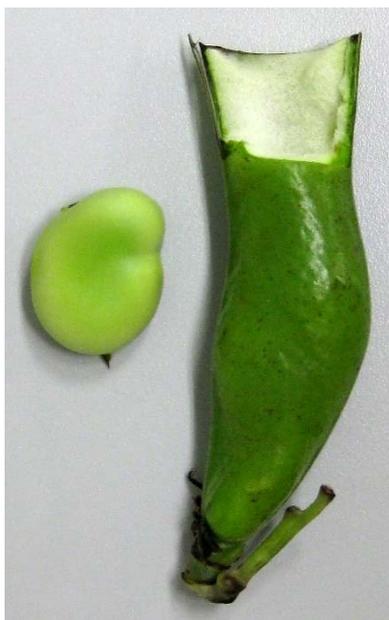


図4 ソラマメの莢と豆

で比較した例がある<sup>9)</sup>。蛍光の立ち上がり速度は葉よりも果皮で高く、果実ではさらに高い。蛍光上昇速度の解析、いわゆるJIPテストの結果からは、果皮および果実において酸素発生系の異常に加え、系Iの電子受容プールが小さくなっていることが示唆されている<sup>9)</sup>。系Iの電子受容プールに関しては、低酸素下の呼吸活性低下から来るATP要求を満たすためにサイクリック電子伝達が動いているのではないかと議論がなされているが、酸素発生系の異常については、生理的な解釈が難しい。

筆者らが行ったソラマメの実験においても光合成の異常が豆において認められている。ソラマメの場合、ダイズなどに比べて莢の厚みが極端に厚く、しかも内側が白い毛でおおわれているため(図4)、莢の透過率は緑色の領域の光でも数%程度にしかならない。電子伝達の光強度依存性をみると、種皮の光合成は莢の光合成に比べて一桁低い光量で飽和する。これについては、極端な弱光馴化として解釈可能であるが、他にも光化学系IIの最大量子収率の指標Fv/Fmが低いなどの異常が認められる。Fv/Fmは、果実の成熟とともに低下するが、種皮においてはごく若い時期においても莢や葉に比べて低い。弱光で光合成が飽和する場合は、測定光によるFv/Fmの見かけ上の低下がみられるが、測定光を十分に弱くしてもFv/Fmは莢のレベルには達しないため、この低下は光化学系II自体の異常に起因していると結論できる。さらに、光化学系Iについても、低温蛍光スペクトルの極大が短波長に

シフトしており、アンテナ系に異常を持つと考えられる。残念ながら現時点ではこのような光合成装置自体の異常に対して適応的な意義を見いだすことはできていない。

## 7. おわりに

葉が光合成の場であることは小学生から教えられる。一方で、葉以外の部位が光合成をすることは必ずしも一般に広く知られているとは言い難い。果実表面の光合成は、内部で発生した二酸化炭素の再吸収を通して果実の生長に必要なプロセスであり、また果実内部の光合成も、おそらくは低酸素状態の緩和などを通して重要な役割を果たしている。また、果実の光合成装置は、特に果実内部においては、一般的な葉の光合成とは異なる特殊な状態を取っている可能性がある。果実の光合成の研究は、生化学的な実験手法が制約されることもあり、現在まで主に放射性炭素の取り込み、光学・電子顕微鏡による観察、そしてクロロフィル蛍光測定により解析が進められてきた。今後は技術的な工夫により、光合成装置の実態についての情報を得ることが必要となると思われる。

筆者は、一般向けの公開実験などにおいて、光合成のさまざまな実験を行ってきた経験から、一般の人の素朴な好奇心を満たすような研究が、科学に対する一般社会の理解を増進させ、ひいては「仕分け」に代表されるような基礎科学に対する逆風の防波堤となるものであると考えるようになった。果実の光合成の研究は、そのような好奇心を満たす研究としての条件を満たしている。さらに「葉」という一つの視点から行なわれがちな光合成研究に、別の視点を導入する点でも意味があるのではないかと考えている。

Received July 15, 2012, Accepted July 24, 2012, Published August 31, 2012

## 参考文献

1. Aschan, G., and Pfanz, H. (2003) Non-foliar photosynthesis - a strategy of additional carbon acquisition, *Flora* 198, 81-97.
2. Aschan, G., Pfanz, H., Vodnik, D., and Batič, F. (2005) Photosynthetic performance of vegetative and reproductive structures of green hellebore (*Helleborus viridis* L. agg.), *Photosynthetica* 43, 55-64.

3. Kong, L., Wang, F., Feng, B., Li, S., Si, J., and Zhang, B. (2010) The structural and photosynthetic characteristics of the exposed peduncle of wheat (*Triticum aestivum* L.): an important photosynthate source for grain-filling, *BMC Plant Biol.* 10, 141.
4. Gill, A.M., and Tomlinson, P.B. (1977). Studies of the growth of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) 4: The adult root system. *Biotropica* 9, 145-155.
5. Benzing, D.H., Friedman, W.E., Peterson, G., and Renfrow, A. (1983) Shootlessness, velamentous roots, and the pre-eminence of Orchidaceae in the epiphytic biotope. *Am. J. Bot.* 70,121-133.
6. Kobayashi, K., Baba, S., Obayashi, T., Sato, M., Toyooka, K., Keränen, M., Aro, E.-M., Fukaki, H., Ohta, H., Sugimoto, K., and Masuda, T. (2012) Regulation of root greening by light and auxin/cytokinin signaling in Arabidopsis, *Plant Cell* 24, 1081-1095.
7. Bazzaz, F.A., Carlson, R.W., and Harper, J.L. (1979) Contribution to reproductive effort by photosynthesis of flower and fruits, *Nature* 279, 554-555.
8. Blanke, M.M., and Lenz, F. (1989) Fruit photosynthesis, *Plant Cell Environ.* 12, 31-46.
9. Kalachanis, D., and Manetas, Y. (2010) Analysis of fast chlorophyll fluorescence rise (O-K-J-I-P) curves in green fruits indicates electron flow limitations at the donor side of PSII and the acceptor sides of both photosystems, *Physiol. Plant.* 139, 313-323.
10. Furbank, R.T., White, R., Palta, J.A., and Turner, N.C. (2004) Internal recycling of respiratory CO<sub>2</sub> in pods of chickpea (*Cicer arietinum* L.): the role of pod wall, seed coat, and embryo, *J. Exp. Bot.* 55, 1687-1696.
11. Ruuska, S.A., Schwender, J., and Ohlrogge, J.B. (2004) The capacity of green oilseeds to utilize photosynthesis to drive biosynthetic processes, *Plant Physiol.* 136, 2700-2709.
12. Carrara, S., and Pardossi, A., Soldatini, G.F., Tognoni, F., and Guide, L. (2001) Photosynthetic activity of ripening tomato fruit, *Photosynthetica* 39, 75-78.
13. Saito, G.Y., Chang, Y.C., Walling, L.L., and Thompson, W.W. (1989) A correlation in plastid development and cytoplasmic ultrastructure with nuclear gene expression during seed ripening in soybean, *New Phytol.* 113, 459-469.
14. Asokanathan, P., Johnson, R.W., Griffith, M., and Krol, M. (1997) The photosynthetic potential of canola embryos, *Physiol. Plant.* 101, 353-360.
15. Hetherington, S.E., Smillie, R.M., and Davies, W.J. (1998) Photosynthetic activities of vegetative and fruiting tissues of tomato, *J. Exp. Bot.* 49, 1173-1181.
16. Allen, D.K., Ohlrogge, J.B., and Shachar-Hill, Y. (2009) The role of light in soybean seed filling metabolism, *Plant J.* 58, 220-234.
17. Smillie, R.M. (1992) Calvin cycle activity in fruit and the effect of heat stress, *Sci. Hortic.* 51, 83-95
18. Tschiersch, H., Borisjuk, L., Rutten, T., and Rolletschek, H. (2011) Gradient of seed photosynthesis and its role for oxygen balancing, *BioSystems* 103, 302-308.
19. Borisjuk, L., Nguyen, T.H., Neuberger, T., Rutten, T., Tschiersch, H., Claus, B., Feussner, I., Webb, A.G., Jakob, P., Weber, H., Wobus, U., and Rolletschek, H. (2005) Gradients of lipid storage, photosynthesis and plastid differentiation in developing soybean seeds, *New Phytol.* 167, 761-776.
20. Goffman, F.D., Alonso, A.P., Schwender, J., Shachar-Hill, Y., and Ohlrogge, J.B. (2005) Light enables a very high efficiency of carbon storage in developing embryos of rapeseed, *Plant Physiol.* 138, 2269-2279.
21. Borisjuk, L., and Rolletschek, H. (2009) The oxygen status of the developing seed, *New Phytol.* 182, 17-30.

## Photosynthesis of Fruits

Kintake Sonoike\*

Faculty of Education and Integrated Arts and Sciences, Waseda University

## 解説特集

# 「光合成を支えるテトラピロール代謝の多様性」

Editor

田中 亮一

(北海道大学 低温科学研究所)

序文

田中 亮一

(北海道大学 低温科学研究所)

P. 78

新しく発見されたクロロフィル

大久保 智司

(京都大学 大学院 人間・環境学研究科)

P. 80 ~ 86

ラン藻のテトラピロール生合成系の嫌気環境適応と進化的視点

青木 里奈、藤田 祐一

(名古屋大学 大学院 生命農学研究科)

P. 87 ~ 97

クロロフィル合成系の多様性はいかにして生まれたか？

伊藤 寿、田中 歩、田中 亮一

(北海道大学 低温科学研究所、CREST/JST)

P. 98 ~ 105

代謝工学による新たなクロロフィル分子の合成

土屋 徹

(京都大学 大学院 人間・環境学研究科)

P. 106 ~ 114

植物細胞におけるヘム代謝研究の新展開

増田 建

(東京大学 大学院 総合文化研究科)

P. 115 ~ 124

高等植物のクロロフィル合成系の制御

小林 康一

(東京大学 大学院 総合文化研究科)

P. 125 ~ 138

## 解説

序文<sup>‡</sup>

北海道大学 低温科学研究所

田中 亮一\*

Samuel I. Bealeというアメリカ人の研究者がいる。彼は1970年代から2000年代前半にかけて、クロロフィル代謝研究の基礎をなす数々の発見をし、2000年代半ばに研究室をたたんだ。彼は研究者として優れていただけでなく、数々の卓越した総説を執筆し、当時の若いクロロフィル代謝研究者は、彼の総説から多くを学んだ。Bealeの（おそらく）最後の総説が2005年に出版された、“Green genes gleaned”（緑の遺伝子がすべて収集された）であり、この中で、彼はクロロフィル合成に関する「遺伝子ハンティング」が終了したことを述べたり。実際、植物において、クロロフィル合成の酵素をコードするすべての遺伝子がこの年までに同定されたと考えられており、一見すると植物のクロロフィル合成に関して、酵素、代謝経路などすべての基礎的な知見はすでに得られたように見えた。「クロロフィル合成」に関する重要な研究は既に終わったのだろうか？

その一つの答えを解説特集「光合成を支えるテトラピロール代謝の多様性」に見いだしていただければ幸いである。本特集では、クロロフィル、ヘムなど、光合成において中心的な役割を担うテトラピロールの代謝に関して、最新の研究を解説する。解説特集の最初の記事は、大久保（京大）の chlorophyll (Chl) *f* に関する記事である。一昨年、60年ぶりに新しいクロロフィル、Chl *f* がストロマトライトのラン藻から単離され、大きな話題になった<sup>2)</sup>。この Chl *f* は特殊なラン藻が合成する特殊なクロロフィルではないかと誰しも考えたが、驚いたことに、大久保らは琵琶湖に生息するラン藻を含めて、さまざまな環境に生息する12種類のラン藻がこの Chl *f* を合成することを明らかにした。ラン藻という生物の可塑性、環境適応能力をあらためて感じさせてくれる発見である。

本特集の2番目の記事では、青木、藤田（名大）が、「酸素を発生するラン藻に嫌気型の代謝経路は必要なのだろうか」という問題に迫った。もともと酸素に弱い代謝経路を持っていた生物が、自らが発生させた酸素による弊害を克服するために、新しい酵素を利用した、という洞察が大変興味深い。

続いて、3番目の記事では、伊藤ら（北大）もやはりクロロフィル代謝の酵素の多様性について論じている。この記事では、相同性情報の全くないところから、（それを逆手にとって）新規の酵素遺伝子を同定した研究が紹介され、同一の酵素反応を担う異なるタイプの酵素がさまざまなラン藻に混在すること、そして、その酵素の一つが緑色植物において「進化」して、新しい代謝経路を担うようになったことが解説されている。これらの研究は、多様な酵素の遺伝子が、遺伝子の水平移動を通じて、一つの「遺伝子プール」として機能し、新しい代謝系の出現につながった可能性を示唆している。

さらに、土屋（京大）は、*Acaryochloris marina* という Chl *d* を合成する特異な生物において、遺伝子導入系を開発し、さらに、*A. marina* が本来もっていない酵素の遺伝子を導入する事によって、この生物において新しい光合成色素、[7-formyl]-chlorophyll *d* を作り出したことを報告している。ラン藻間で頻繁に遺伝子の水平移動がおこったことを考えると、自然界において、同様な遺伝子の水平移動によって、新しい光合成色素が生まれてきたということが想像される。このような現象によって、次々と新しい色素が生まれ、自然界において試されたことが光合成の進化の大きな原動力になったのではないだろうか？

上記4編の解説記事とは対照的に、増田（東大）の記事は長い間、未解決であった問題に正面から取り組んだ研究を解説している。未解決の問題とはすなわち、細胞の中でどの程度の割合のヘムがどのような状態で存在す

<sup>‡</sup> 解説特集「光合成を支えるテトラピロール代謝の多様性」

\* 連絡先 E-mail: rtanaka@lowtem.hokudai.ac.jp

るのか、そして、ヘムを細胞内の正しい場所に的確に輸送するメカニズムは何かという問題である。植物を例にとると、ヘムは葉緑体、ミトコンドリア、核、小胞体、液胞、細胞質、細胞膜、アポプラストとあらゆる場所に存在する。植物の遺伝子のうち、2%以上はテトラピロール結合タンパク質をコードしていると予想されるが、その大半はヘム結合タンパク質である<sup>3)</sup>。増田らは、かつてない感度と正確さをあわせもつヘム定量法を開発し、細胞内のヘムの状態について新たな知見を提供しただけでなく、ヘムを細胞内の正しい局在に運ぶメカニズムに迫った。

最後の小林（東大）の記事でも、やはり「多様性」が解説されているが、その「多様性」は他の解説記事とは異なり、「代謝経路」ではなく「制御」の多様性である。テトラピロール合成は、酵素タンパク質の転写、翻訳、輸送、分解など、さまざまな段階で制御されていることが明らかになっているが、その分子機構は未解明な部分が多い。前述の青木・藤田の記事ではラン藻における転写制御についての知見を記載しているが、小林は高等植物に焦点を絞り、現段階で明らかになっている制御機構の全体像を記載している。和文だけでなく、英文においても、テトラピロール合成制御をここまで網羅した総説は少なく、多岐にわたる制御機構の研究の最前線を理解するために、貴重な解説文である。

これら6編の解説文から、光合成生物のテトラピロール代謝研究の現状と未来を感じていただければ幸いである。

#### 参考文献

1. Beale, S. (2005) Green genes gleaned, *Trends Plant Sci.* 10, 309–312.
2. Chen, M. et al. (2010) A red-shifted chlorophyll, *Science* 329, 1318–1319.
3. Mochizuki, N. et al. (2010) The cell biology of tetrapyrroles: a life and death struggle, *Trends Plant Sci.* 15, 488–498.

新しく発見されたクロロフィル<sup>‡§</sup>京都大学大学院 人間・環境学研究所  
大久保 智司\*

## 1. 光合成色素の多様性

光合成とは光エネルギーを化学エネルギーに変換する反応である。そして、光合成ではクロロフィル、カロテノイド、フィコピリンといった光合成色素が光を吸収する役割を担っている。ほとんど全ての酸素発生型光合成生物 (陸上植物、藻類、シアノバクテリア) において、反応中心色素はクロロフィル (Chl) *a* に限られている (例外として、シアノバクテリアの *Prochlorococcus* 属ではジビニルクロロフィル (DVChl) *a*, *Acaryochloris* 属では Chl *d*)。一方、光エネルギーを捕集し反応中心色素に伝達するアンテナ色素は、種々のクロロフィルやカロテノイド、フィコピリンであり、アンテナ色素の種類や組成は生物種によって異なっている。

Chl *a* (図1A) はほとんど全ての酸素発生型光合成生物がもっており、その大半がアンテナ色素として機能している。これに加え、緑色植物、ユーグレナ植物、クロララクニオン植物、一部のシアノバクテリア

(*Prochloron*, *Prochlorothrix*) は Chl *b* を、クリプト植物、不等毛植物、渦鞭毛植物、ハプト植物は Chl *c* (*c*<sub>1</sub>, *c*<sub>2</sub>, *c*<sub>3</sub>) をそれぞれアンテナ色素として利用している。また *Prochlorococcus* 属のシアノバクテリアは DVChl *a* および DVChl *b* を、*Acaryochloris* 属のシアノバクテリアは Chl *d* をそれぞれアンテナ色素としてもっている。アンテナとしてはたらくカロテノイドとしては、緑色植物、紅色植物のもつルテイン、一部の緑藻がもつシフォナキササンチン、一部の渦鞭毛植物がもつペリジニン、褐藻、珪藻がもつフコキササンチンなどが知られている。これらのカロテノイドは、クロロフィルとともにカロテノイド-クロロフィル結合タンパク質に結合し、吸収した光エネルギーを高効率で Chl *a* に渡すことができる。また、シアノバクテリア、灰色植物、紅色植物、クリプト植物はフィコピリンタンパク質をアンテナ色素として用いる。これらの生物の多くのものにおいて、フィコピリンタンパク質はフィコピ

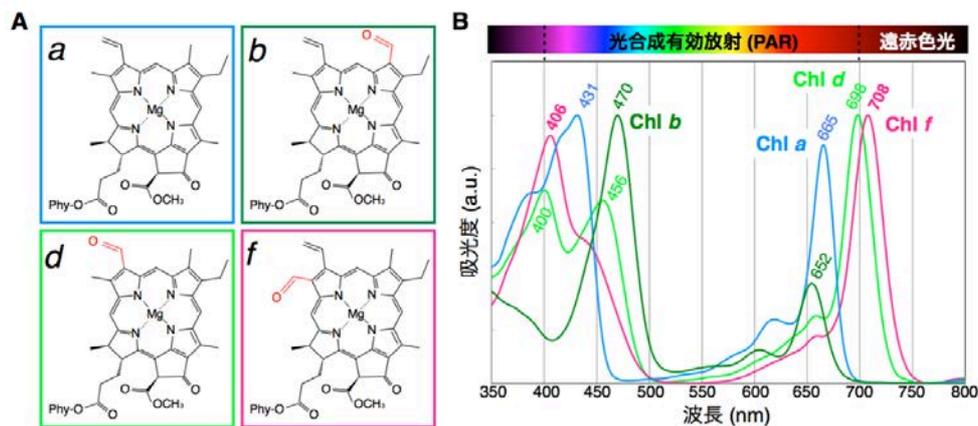


図1 クロロフィル*a*, *b*, *d*, *f*の化学構造(A)と吸収スペクトル(B)

A: Chl *b*, *d*, *f*については、Chl *a*と異なっている部分を赤で示している。Phyはフィトール基。B: 各色素の、メタノール中における吸収スペクトル。ピークの近傍に示した数字は、それぞれのピーク波長を示す。

<sup>‡</sup> 解説特集「光合成を支えるテトラピロール代謝の多様性」

<sup>§</sup> 第2回日本光合成学会シンポジウム 発表賞受賞論文 (口頭発表)

\* 連絡先 E-mail: s\_ohkubo@me.com

リソームという超複合体を形成し、光化学系IIにエネルギーを渡すことが知られている。

これらの多様なアンテナ色素は、その種類によって吸収する光の波長が異なっている。生体内において、Chl *a* は波長 400-450 nm の青色光と 650-700 nm の赤色光を主に吸収することができる。Chl *b* は Chl *a* に比べて Q<sub>y</sub> 帯の吸収ピークが短波長側に、ソーレー帯の吸収ピークが長波長側にシフトしている(図1B)。そのため、Chl *b* をもつことによって、Chl *a* だけの場合よりも広範囲の波長の光を吸収することが可能になる。また、Chl *c* やシフォナキサンチン、フコキサンチンといったカロテノイドは波長 450-550 nm の青-青緑色の光を吸収することができる。一般に、水中では深くなるにつれて青緑色の光 (500-550 nm) が残る性質があり、これらの色素は水中の深い所で光を吸収するのに役立っている。フィコビリタンパク質は波長 500-650 nm の光を吸収することができるが、これは Chl *a* の吸収できない波長領域をほぼ相補している。これらの多様なアンテナ色素が吸収できる光の波長域は、可視光線とほぼ同じ 400-700 nm の領域である。この波長域の光は光合成有効放射 (P A R : Photosynthetically Active Radiation) と呼ばれ、かつては酸素発生型の光合成に利用できる光はこの波長域に限られると考えられていた。

しかし、Chl *d* をもつシアノバクテリアが発見されたことにより、必ずしもそうではないことがわかってきた。Chl *d* の吸収スペクトルを Chl *a* と比較すると、Q<sub>y</sub> 帯の吸収ピークが約 30 nm 長波長側にシフトしており、遠赤色光と呼ばれる波長 700 nm 以上の光を吸収することができる(図1B)。この色素は1943年、紅藻に含まれる第2の色素として最初に報告されたが<sup>1)</sup>、天然中における存在が長い間疑問視されてきた。しかし、1996年に発見されたシアノバクテリア *Acaryochloris marina* は Chl *d* を主要色素としてもち、Chl *d* が確かに天然に存在することが確かめられた<sup>2)</sup>。そして、*A. marina* は波長 700-750 nm の遠赤色光を吸収して光合成に利用できることがわかっている<sup>3, 4)</sup>。

*Acaryochloris* は熱帯の沿岸域に生息する群体ボヤから発見され<sup>2)</sup>、群体ボヤに共生するシアノバクテリアであり、Chl *d* は限られた環境にしか存在しないと考えられた。しかし、日本沿岸で採られた紅藻の表面にも付着していることがわかり、かつて紅藻から検出

された Chl *d* の真の生産者であることがわかった<sup>5)</sup>。その後、*Acaryochloris* 属シアノバクテリアは岩の表面<sup>6)</sup>や内部<sup>7)</sup>にも分布すること、他の海藻類にも付着していること<sup>8)</sup>、様々な群体ボヤやカイメンに宿主を選ばず付着していること<sup>9)</sup>などがわかってきた。さらに、世界中の海底コアや日本沿岸の海藻からは Chl *d* が Chl *a* の数%の割合で検出された<sup>10)</sup>。したがって、Chl *d* を用いて遠赤色光を光合成に利用する生物は世界中に広く分布し、環境中にそれなりに多く存在することが明らかとなってきた。

そして近年、遠赤色光を吸収することのできるもう1つのクロロフィル、Chl *f* が新たに発見された。本稿では、この新規色素 Chl *f* についてその特徴と発見の経緯、筆者らの研究で明らかになってきたことについて解説する。

## 2. Chl *f* の発見

Chl *f* はChenらによって、オーストラリア沿岸で採取されたストロマトライトから発見された<sup>11)</sup>。ストロマトライトのメタノール抽出液を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析すると、Chl *a* やバクテリオクロロフィル *a* に加えて微量の Chl *d* と新規な色素が検出され、Chl *f* と名付けられた (Chl *e* は1940年代に報告されたことがあるが、その詳細については現在まで不明<sup>11)</sup>)。Chl *f* は、Q<sub>y</sub> 帯の吸収ピークが他のクロロフィルよりもレッドシフトしており (メタノール中でのピーク波長 706 nm)、ソーレー帯の吸収ピークはブルーシフトしていた (406 nm)。また、室温における蛍光極大は 722 nm (励起波長は 407 nm) で、やはり他のクロロフィルよりもレッドシフトしていた。質量スペクトル分析と水素核磁気共鳴スペクトル分析により、Chl *f* は Chl *a* の2位の炭素に結合したメチル基 (-CH<sub>3</sub>) がフォルミル基 (-CHO) に置換した構造 (すなわち [2-formyl] Chl *a*) であるとされた (図1A)。

Chenらはストロマトライトをすり潰したものを、ピーク波長720 nmの遠赤色発光ダイオード (LED) 下で培養した。培養前のストロマトライト中からは Chl *f* は総クロロフィルの1%未満しか検出されなかったが、継代培養を繰り返すと10%程度まで増加した。これは、ストロマトライト中に存在した Chl *f* をもつ生物が増殖したためと考えられ、Chl *f* は自然界に確かに存在することが確かめられた。培養によって増えた

生物を顕微鏡観察すると主な構成生物はシアノバクテリアであった。顕微鏡下での *in situ* 蛍光スペクトル測定 (励起波長: 543 nm) により、糸状体細胞と楕円球形細胞の蛍光スペクトルには波長 730-735 nm 辺りにシヨルダーが観測され、この波長域の蛍光は Chl *d* や Chl *f* に由来すると考えられた。このうち、糸状体細胞だけを色素組成分析すると Chl *a* と Chl *f* だけしか検出されなかったため、この糸状シアノバクテリアが Chl *f* 含有生物の1つであるとされた。この糸状体シアノバクテリアについて 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の一部を決定し、データベース上の配列と比較すると、類似性が高い生物はシアノバクテリアであった。しかし、彼らの報告では系統的位相については述べられていない。既知の配列との類似性が88%と低いことから、この株は新種のシアノバクテリアであると考えられる。

筆者らは上記の Chl *f* の発見とほぼ同時期に琵琶湖沿岸から Chl *f* 含有シアノバクテリアを分離した (未発表)。最初は琵琶湖に存在する Chl *d* 含有生物の分離を目的とし、遠赤色LED (ピーク波長: 727 nm) を用いて沿岸の岩に付着するバイオフィーム中に存在するシアノバクテリアの培養を行っていた。その結果、Chl *d* をもつ *Acaryochloris* sp. が1株分離されたのに加え、シアノバクテリア KC1 株が分離された。HPLC によって KC1 株の色素組成分析を行うと、主要色素である Chl *a* に加えて、少量のもう一つのクロロフィルを含んでいた。このクロロフィルは、HPLC における他のクロロフィル (Chl *a*, Chl *b*, Chl *d*) との溶出順、100%メタノール中における吸収スペクトルともに Chen らの報告した Chl *f* のものとほぼ一致したことから、Chl *f* であると考えられた。

KC1 株は単細胞球形のシアノバクテリアで、静置培養下では複数の細胞が凝集して不定形なコロニーを形成した。また、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を用いた系統解析の結果、KC1 株は *Aphanocapsa muscicola* や *Cyanothece* sp. といった単細胞シアノバクテリアと近縁であり、Chen らが報告した糸状体シアノバクテリアとは形態的にも系統的にも異なる生物であった (未発表)。

上記の2つの Chl *f* の発見を比べると、それぞれ見つけた場所 (オーストラリアと日本) や環境 (海と淡水湖)、Chl *f* を含んでいた生物 (糸状シアノバクテリアと単細胞シアノバクテリア) が全く異なっていた。しか

し、2つの例に共通していたのは、どちらも培養に遠赤色LEDを利用していた点である。筆者らはそもそも Chl *d* 含有生物を分離することを目的として遠赤色LEDを培養に用いた結果、偶然 Chl *f* が見つかった。Chen らがどのような意図を持って遠赤色LEDを用いたかは定かでないが (おそらく同じような目的と考えられるが)、Chl *f* の発見に大きな影響を与えたのは確かであろう。

### 3. Chl *f* による新奇な補色順化

琵琶湖沿岸から分離した KC1 株は Chl *f* に関する様々な研究に利用可能な生物であり、筆者らはその細胞を大量に得るため白色蛍光灯による大量培養を試みた。ところが、白色光で増殖した細胞の色素組成分析を行うと、Chl *f* が全く検出されなくなってしまった。その理由として、「Chl *f* は白色光培養下では合成されなくなる」という可能性が考えられた。しかし同時に、「培養の過程で混入した他のシアノバクテリアと入れ替わった」、「突然変異により Chl *f* 産生能を失った細胞に入れ替わった」という可能性も考えられた。

そこで、Chl *f* の消失が可逆であることを確かめるため、Chl *f* の誘導実験を行った。遠赤色光で培養した細胞を白色光で、白色光で培養した細胞を遠赤色光でそれぞれ培養し、細胞中の Chl *f*/Chl *a* 比を経時的に測定した (ただし、これは HPLC において Chl *f* と Chl *a* をそれぞれ波長 706 nm と 665 nm の吸光で検出したときのピーク面積比であり、分子の量比を表したのではない)。遠赤色光で培養していた細胞は最

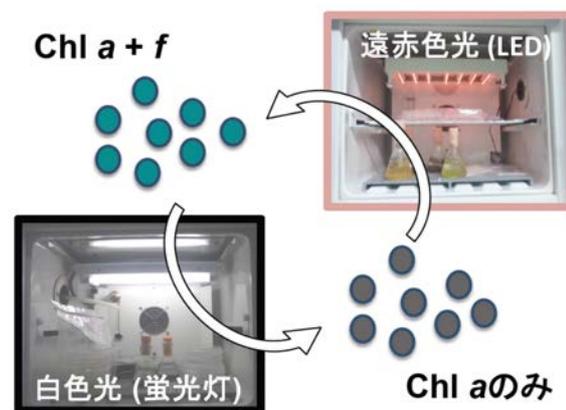


図2 遠赤色光と白色光で培養したときのKC1株の色素組成変化

遠赤色LED下で培養すると Chl *f* をつくるようになるが、白色蛍光灯下で培養すると Chl *f* が無くなる。

初  $Chl f/Chl a$  比の値が約0.10であったが、白色光下に移した後2日でその約60%、4日で約30%に低下した。その後も徐々に減り続け、30日以上培養した細胞では  $Chl f$  が全く検出されなくなった。一方、白色光で培養して  $Chl f$  が検出されなくなった細胞を再び遠赤色光下に移すと、 $Chl f/Chl a$  比は直線的に上昇した。その後1ヶ月程度培養を続けると  $Chl f/Chl a$  比は約0.09まで上昇した (未発表)。したがって、KC1株において  $Chl f$  は遠赤色LED下で培養した時に合成が誘導され、白色光下培養では合成されなくなる「誘導クロロフィル」であることが明らかとなった (図2)。

これまで、クロロフィルが特定の条件下でつくられなくなるという現象は知られていない。例えば緑色植物は  $Chl a$  と  $Chl b$  をもち、 $Chl a/b$  結合アンテナである LHCII の量の変動することで  $Chl b$  の量が変化しますが、 $Chl b$  だけが無くなることはない。また、珪藻や褐藻などのアンテナに含まれる  $Chl c$  も光が強くなると減少するが、完全に消失することはない。 $Chl d$  を主要色素とするシアノバクテリア *Acaryochloris marina* には少量の  $Chl a$  が含まれており、 $Chl a/d$  比は光条件によって変動するが  $Chl a$  は細胞内に常に存在している。今回の結果は、クロロフィルの合成が特定の条件でのみ誘導される初めての例であり、この点で  $Chl f$  は他のクロロフィルと大きく異なる。

筆者らは今までに様々な光条件でKC1株を培養しているが、現在のところ  $Chl f$  をつくるのは遠赤色LEDだけを照射して培養したときだけであった。赤色LED (ピーク波長: 655 nm) や青色LED (470 nm) だけを用いて培養しても  $Chl f$  は検出されなくなった (図3)。また、赤色LEDと遠赤色LEDを、それぞれのピーク波長の光量子束密度が同じになるように混ぜて培養したときも  $Chl f$  はつくられなかった。「 $Chl f$  の合成が遠赤色光しか無い条件で誘導されること」と、「 $Chl f$  が遠赤色光を吸収できること」、そして「KC1株が遠赤色光下で生育できること」から、 $Chl f$  は遠赤色光を利用した光合成に寄与していると考えられた。また、遠赤色光下で培養したKC1株の色素組成を詳細に分析しても  $Chl f'$  や  $Phe f$  は検出されず、 $Chl a'$  や  $Phe a$  が存在することから、反応中心色素が  $Chl f$  に置き換わっているわけではないと考えられた<sup>12)</sup>。したがって、KC1株では  $Chl a$  から成る反応中心はそのままに、 $Chl f$  が付加的にアンテナ色素として遠赤色光の吸収に寄与していると予想される。しかし通常、光合

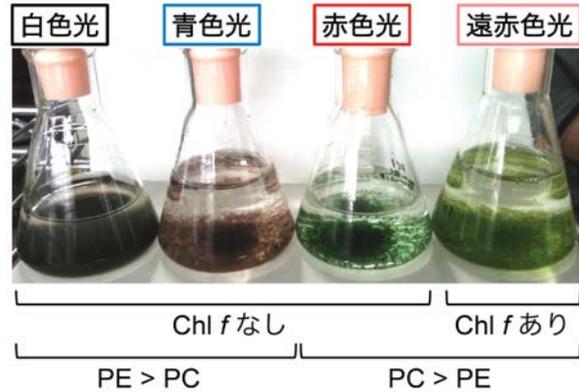


図3 白色、青色、赤色、遠赤色光でそれぞれ培養したKC1株の細胞

成アンテナ系ではエネルギー準位の高い色素から低い色素へエネルギーを伝達しており、 $Chl f$  が吸収した遠赤色光のエネルギーを、よりエネルギー準位の高い  $Chl a$  に伝達するのは困難であると考えられる。 $Chl f$  がどのように遠赤色光のエネルギーを反応中心に伝達しているのかは現在のところ不明である。

光色の変化によるアンテナ色素の変化として、シアノバクテリアでは補色順化という現象が知られている。一部のシアノバクテリアは、フィコビリソームを構築するアンテナ色素タンパク質として赤色光を吸収するフィコシアニン (PC) と緑色光を吸収するフィコエリスリン (PE) をもつ。これらのシアノバクテリアの多くは、赤色光照射下ではPCの量を増やし、逆に緑色光照射下ではPEの量を増やすことで、それぞれの色の光を効率的に利用して光合成をおこなう。KC1株でもこの補色順化が起こっており、培養に用いた光色によって細胞の色が変化した (図3)。細胞の吸収スペクトルを比較すると遠赤色光と赤色光ではPCが多く、青色光と白色光ではPEが多くなっていった。これに加えて、遠赤色培養下では  $Chl f$  の合成が誘導され、遠赤色光領域の吸収が増加した。この変化はまさに補色順化であり、クロロフィルの合成を誘導することによる新奇的な補色順化であると言える。

多くの光合成生物ではアンテナとしてもつ色素の組成が分類群ごとに異なっており、各色素の量比は変化するが含まれる色素の種類は変化しない。そのため、これらの生物が光合成に利用できる光の波長領域は、ほぼ決まっている。しかし、一部のシアノバクテリアは、光色の変化に対応して一時的にフィコビリソームの色素組成を変えることで、光合成の効率を上げることができる。この従来の補色順化に加え、KC1

株は新奇な補色順化をおこなうことで、さらに広い範囲の光色の変化に対応することが可能になったと考えられる。

#### 4. Chl *f* 産生シアノバクテリアの多様性

クロロフィルという言葉は1818年にPelletierとCaventouによって作られ、Tswettがカラムクロマトグラフィーによって初めてChl *a* と *b* を分離したのは1906年である<sup>13)</sup>。その後、様々な生物から種々のクロロフィルが発見され、微量なものも含めると50種類以上のクロロフィルの分子種が知られている。しかし、Chl *f* の発見には Tswett から実に100年以上の時間を要することとなった。

その原因の1つとして、Chl *f* が遠赤色光下で合成される色素だからであると考えられた。通常、シアノバクテリアや藻類、植物の培養には光源として太陽光、白熱電球、蛍光灯などの「白色光」が用いられてきた。もしKC1株が白色光培養で分離されていたら、Chl *a* だけをもつ普通のシアノバクテリアと見なされていたはずである。また、ストロマトライトの粗培養が白色光で行われていたら、Chl *f* のピークは消えていたかもしれない。Chl *f* の発見には遠赤色光が重要な役割を果たしたと上述したが、むしろ遠赤色光だけを用いた培養が必須だったと言えるのではないだろうか。

逆に考えると、これまでの一般的な白色光培養では Chl *f* 産性能をもつ生物が見過ごされてきた可能性もある。よって、これまでに発見された2株以外にも Chl *f* 産生シアノバクテリアが存在するのではないかと考えられた。そこで筆者らは、遠赤色LEDを用いた培養によって環境中から Chl *f* をつくる生物の分離を試みた。サンプルには琵琶湖沿岸で採取したバイオフィーム、霞ヶ浦の湖水、伊勢湾および太平洋の海水、タンガニイカ湖湖底のシアノバクテリアマットを用いた。これらを培地に入れて遠赤色LED下で培養を行うと、多くの光合成生物の生育が見られた。それらのうち、色素分析によって Chl *f* をもつことが確認されたものとして、琵琶湖から4株、霞ヶ浦から1株、タンガニイカ湖から3株、伊勢湾から4株の計12株のシアノバクテリアが得られた(未発表)。

12の分離株は全て主要色素として Chl *a* をもち、Chl *f* は総クロロフィルの10%以下であった。また、どの株もKC1株と同様に白色光下で培養すると Chl *f*

をつくらなくなった。それぞれの形態を顕微鏡で観察すると、単細胞性のもの、内生孢子を生じるもの、糸状体を形成するものと多様であった。各株について16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定、比較すると、琵琶湖から分離された2株(LB-A2、LB-E3株)はKC1株と近縁(類似性99%以上)であったが、他の株は全て互いに塩基配列の類似性が97%以下だったことから、それぞれ種レベルで異なる生物であると考えられた。また今回分離されたどの株も、ストロマトライトから見つかった Chl *f* を含む糸状体シアノバクテリアとの配列類似性は97%以下であった。したがって、Chl *f* 産生能をもつシアノバクテリアが少なくとも12種存在することが明らかとなった(未発表)。

16S rRNA 遺伝子の塩基配列を用いて系統解析を行うと、Chl *f* 産生能をもつ株はシアノバクテリアの系統樹内で広範囲に散在した(未発表)。したがって、限られた系統群の生物にのみ見られる DVChl *a*, *b* や Chl *d* とは異なり、Chl *f* 産生能は多くのシアノバクテリアに普遍的に見られる性質であると考えられた。しかし、全てのシアノバクテリアが Chl *f* 産性能をもつわけではなく、少なくとも *Synechocystis* sp. PCC 6803、*Gloeobacter violaceus* PCC 7421、*Acaryochloris marina* MBIC 11017の3株については遠赤色LED下で培養しても Chl *f* をつくらなかった。また、同じサンプルを白色光と遠赤色光でそれぞれ培養すると、明らかに白色光下でしか生育しないシアノバクテリアも存在した。よって、Chl *f* 産性能をもつシアノバクテリアは多系統であると言える。

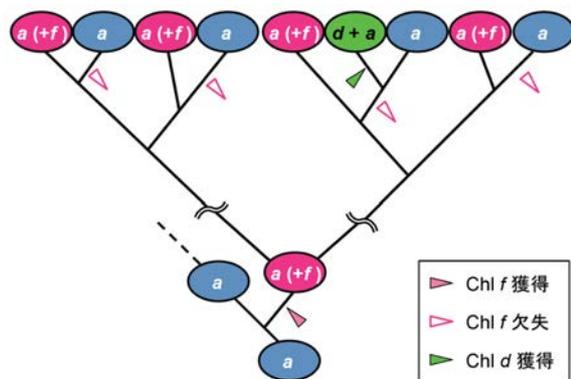


図4 多系統なシアノバクテリアによる Chl *f* 獲得の仮説  
 図中、*a* で示したのは Chl *a* だけをもつ種を表し、*d + a* は Chl *d* を主要色素とする種、*a (+f)* は Chl *a* を主要色素とし遠赤色光下で Chl *f* の合成が誘導される種をそれぞれ表す。

同様に多系統なシアノバクテリア (および葉緑体) がもつ Chl (DVChl) *b* は、共通祖先によって獲得され、その後多くのシアノバクテリアで複数回失われたと考えられている<sup>14)</sup>。Chl *f* 産生能は Chl (DVChl) *b* に比べて遥かに多様で多系統な生物に見られるため、同様に進化の比較的早い段階で獲得されたと予想される。すなわち、シアノバクテリアの進化の過程で Chl *f* 産生能は一度だけ獲得され、その後 Chl *f* 産生能を失ったもの、新たなクロロフィルを得たもの、Chl *f* 産生能をもち続けているものに分かれて現在に至ると考えられる (図4)。そして、Chl *f* 産生能をもつシアノバクテリアは他にもまだ存在しており、遠赤色光を用いた培養を行うことで新しく見つかるものと期待される。

かつて酸素発生型光合成に利用できるのは波長 400-700 nm の光であると考えられていた。Chl *d* をもつシアノバクテリアの発見により、波長 700-750 nm の遠赤色光領域も利用可能であることが示されたが、それはあくまで *Acaryochloris* という限られた生物のもつ変わった特性であった。ところが、多様なシアノバクテリアが Chl *f* 産生能をもつことが明らかとなったことで、遠赤色光を光合成に利用できる生物はこれまで考えられていたよりもずっと多いということがわかってきた。

## 5. おわりに

Chl *f* は近年見つかったばかりの色素であり、まだまだわかっていないことが多い。今後の研究によって明らかにすべき課題がたくさん残っている。

一つは、この色素が生体内でどのように機能しているかである。Chl *f* をもつシアノバクテリアが遠赤色光下で独立栄養的に生育できること、Chl *f* が遠赤色光下でのみ誘導されることから、Chl *f* が遠赤色光を吸収することで光合成に寄与していることは想像に難くない。しかし、Chl *f* が細胞内のどこに分布しているのか、遠赤色光を吸収した後、エネルギー準位の高い Chl *a* 反応中心にどうやってエネルギーを渡しているのかはわかっていない。

また、Chl *f* の合成経路についても興味深いテーマである。現在、Chl *a* と Chl *b* がどうやって合成されるかはわかっているが、Chl *c*、Chl *d*、Chl *f* については未解明である。Chl *b*、Chl *d*、Chl *f* は全て Chl *a* の側鎖が一箇所フォルミル基に置換されているという点

で共通しているが、それぞれ異なる部位が置換されており、合成に関与する酵素は全く異なるかもしれない<sup>15)</sup>。Chl *f* 合成酵素を決定することができれば、どれくらい多様なシアノバクテリアが Chl *f* 合成能をもっているのか、多様なシアノバクテリアにおける Chl *f* の獲得がどのように起こったのかを解明することができると期待できる。また、Chl *f* の合成が誘導されるメカニズムの解明にもつながるであろう。フィコビリソームによる補色順化には光受容体タンパク質が関与しており、緑色光と赤色光によって誘導されることがわかっている。Chl *f* の誘導にも同様に光受容体タンパク質が関与しているかもしれないが、全く異なるメカニズムで起きているかも知れない。

Chl *f* が環境中においてどこに存在し、どんな役割を果たしているのかについても非常に興味深い。多様な Chl *f* 産生シアノバクテリアが分離されたことから、“Chl *f* 産生能をもつ”シアノバクテリアは様々な環境中に分布することができると考えられる。しかし、Chl *f* は特定の条件下でしか誘導されない色素であり、“Chl *f* を含んでいる”シアノバクテリアの分布場所は限られると考えられる。現状でわかっている Chl *f* の合成が誘導される条件は「光が遠赤色光しかない」ことである。自然環境中でそのような光条件になる場所として、微生物マットの内部が知られている<sup>16)</sup>。これは上層に存在する光合成生物によって可視光領域の光が吸収されるからであり、細胞がこのような環境に置かれた時、残存する遠赤色光を利用して光合成を行うために Chl *f* を合成するのではないかと考えられる。実際、Chl *f* が最初に報告されたストロマトライト中でもシアノバクテリアが層状に分布している。しかし、環境中での Chl *f* の分布はほとんどわかっておらず、実際に環境中でどのように分布しているかを明らかにする必要がある。

本文中でも述べたように、Chl *f* の発見にはおそらく遠赤色LEDを用いた培養が必要であった。これは Chl *f* が白色光培養では合成されないという特徴をもつためである。この特徴によって、(実は多様なシアノバクテリアがつくれるにも関わらず) Chl *f* は長い間科学者たちの目から隠れることができたと考えられる。“隠れた”色素は他にもまだ存在するかもしれない。培養条件の工夫や分析技術の発展によって、そんな“隠れた”色素たちに光が当たる日も遠くないのではないだろうか。

Received July 25, 2012, Accepted August 1, 2012,  
Published August 31, 2012

### 参考文献

- Manning, W.M. and Strain, H.H. (1943) Chlorophyll *d*, a green pigment of red algae, *J. Biol. Chem.* 151, 1-19.
- Miyashita, H., Ikemoto, H., Kurano, N., Adachi, K., Chihara, M. and Miyachi, S. (1996) Chlorophyll *d* as a major pigment, *Nature* 383, 402-402.
- Miyachi, S., Strassdat, K., Miyashita, H. and Senger, H. (1997) Quantum requirement of photosynthesis in the primarily chlorophyll *d* containing prokaryote *Acaryochloris marina*, *Z. Naturforsch., C: Biosci.* 52, 636-638.
- Miyashita, H., Adachi, K., Kurano, N., Ikemoto, H., Chihara, M. and Miyachi, S. (1997) Pigment composition of a novel oxygenic photosynthetic prokaryote containing chlorophyll *d* as the major chlorophyll, *Plant Cell Physiol.* 38, 274-281.
- Murakami, A., Miyashita, H., Iseki, M., Adachi, K., Mimuro, M. (2004). Chlorophyll *d* in an epiphytic cyanobacterium of red algae, *Science* 303, 1633.
- Miller, S.M., Augustine, S., Olson, T.L., Blankenship, R.E., Selker, J., Wood, A.M. (2005) Discovery of a free-living chlorophyll *d*-producing cyanobacterium with a hybrid proteobacterial/cyanobacterial small-subunit rRNA gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 850-855.
- Behrendt, L., Larkum, A. W. D., Norman, A., Qvortrup, K., Chen, M., Ralph, P., Sørensen, S. J., Trampe, E., and Kühl, M. (2011) Endolithic chlorophyll *d*-containing phototrophs, *ISME. J.* 5, 1072-1076.
- Ohkubo, S., Miyashita, H., Murakami, A., Takeyama, H., Tsuchiya, T., and Mimuro, M. (2006) Molecular detection of epiphytic *Acaryochloris* spp. on marine macroalgae. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7912-7915.
- Ohkubo, S., and Miyashita, H. (2012) Selective detection and phylogenetic diversity of *Acaryochloris* spp. that exist in association with didemnid ascidians and sponge. *Microb. Environ. In press.*
- Kashiyama, Y., Miyashita, H., Ohkubo, S., Ogawa, N.O., Chikaraishi, Y., Takano, Y., Suga, H., Toyofuku, T., Nomaki, H., Kitazono, H., Nagata, T. and Ohkouchi, N. (2008) Evidence for global chlorophyll *d*, *Science* 321, 658.
- Chen, M., Schliep, M., Willows, R. D., Cai, Z.-L., Neilan, B. A., and Scheer, H. (2010) A red-shifted chlorophyll, *Science* 329, 1318-1319.
- Akutsu, S., Fujinuma, D., Furukawa, H., Watanabe, T., Ohnishi-Kameyama, M., Ono, H., Ohkubo, S., Miyashita, H., and Kobayashi, M. (2011) Pigment analysis of a chlorophyll *f*-containing cyanobacterium strain KC1 isolated from Lake Biwa, *Photomed. Photobiol.*, 33, 35-40.
- Scheer, H. (2006) An overview of chlorophylls and bacteriochlorophylls: biochemistry, biophysics, functions and applications, in *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications. Advances in Photosynthesis and Respiration, vol 25* (Grimm, B., Porra, R.J., Rüdiger, W. and Scheer, H., Eds.) pp 1-26, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Tomitani, A., Okada, K., Miyashita, H., Matthijs, H. C., Ohno, T. and Tanaka, A. (1999) Chlorophyll *b* and phycobilins in the common ancestor of cyanobacteria and chloroplasts, *Nature* 400, 159-162.
- Chen, M. and Blankenship, R. E. (2011) Expanding the solar spectrum used by photosynthesis, *Trends Plant Sci.* 16, 427-431.
- Boomer, S. M., Pierson, B. K. Austinhirst, R., and Castenholtz, R. W. (2000) Characterization of novel bacteriochlorophyll-*a*-containing red filaments from alkaline hot springs in Yellowstone National Park, *Arch. Microbiol.* 174, 152-161.

## Newly Discovered Chlorophyll *f*

Satoshi Ohkubo\*

Graduated School of Human and Environmental Studies, Kyoto University

解説

ラン藻のテトラピロール生合成系の嫌気環境適応と進化的視点<sup>‡</sup>

名古屋大学 大学院 生命農学研究科  
青木 里奈、藤田 祐一\*

1. はじめに

ラン藻（シアノバクテリア）は、地球上に最初に誕生した酸素発生型光合成生物であると考えられており、葉緑体の進化的起源であると推定されている。その分布域は非常に多様であり、海洋や河川、湖沼を始め、陸上や温泉などを生育環境とするものも存在する。そのような環境には、水田や河口の泥、富栄養湖といったような酸素レベルの低い嫌気環境も含まれる<sup>1,2)</sup>。また、環境の酸素レベルは一日の中でも著しく変動する。日中は光合成による酸素発生のため、生育環境は非常に好氣的である一方、夜間は共存する微生物と自身の呼吸により酸素が急速に消費

され嫌気環境にさらされる<sup>3)</sup>。このように、ラン藻の生育環境は酸素レベルという観点で非常に多様である。酸素分子（O<sub>2</sub>）は有用な電子受容体として呼吸で用いられているほか、多くのオキシゲナーゼ反応で使われ、生物の代謝ネットワークの多様化に大きく寄与している<sup>4)</sup>。嫌気環境では酸素に依存したさまざまな代謝が酸素不足のために停滞するかもしれず、ラン藻は嫌気環境に応答した何らかの適応機構を有することが想定される。しかし、ラン藻は、光合成により自らO<sub>2</sub>を発生する生物であるため、嫌気的環境を要求する窒素固定という観点以外での嫌気環境適応についての知見は乏しかった。

私たちは、これまでラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis* 6803) を材料として、テトラピロール生合成系における嫌気環境適応機構の研究を行ってきた<sup>5-8)</sup>。本解説では、ラン藻の主にクロロフィルとビリル色素の生合成系酵素の機能分化に関する

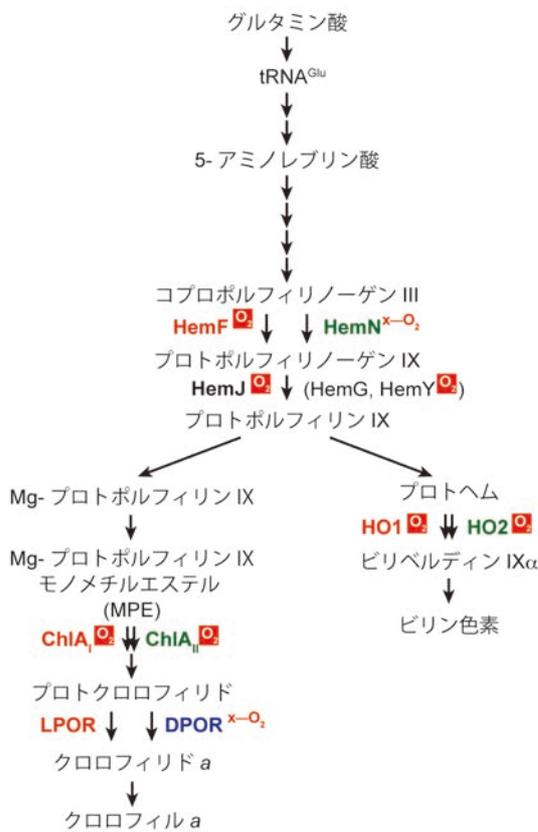


図1 ラン藻のテトラピロール（クロロフィル・ビリル）生合成系

主要な中間体名のみ記す。本論文で言及している反応に関する酵素のみを記載した。ビリベルディンIX<sub>α</sub>以降の生成物は、ビリル色素とのみ記載している。複数の酵素が関与している段階は2つの矢印で示し、離れた2つの矢印は構造的に類縁性のない2つの酵素の関与を、重なった2つの矢印は2つのアイソフォームの関与を表している。また、主に好気条件で唯一の酵素として機能する酵素を赤、主に微好気条件で機能し、転写が低O<sub>2</sub>で誘導される酵素を緑、主に微好気条件で機能するが発現がO<sub>2</sub>レベルで変化しない酵素を青色で示した。あわせて、反応にO<sub>2</sub>を要求するO<sub>2</sub>依存型酵素は赤い背景で白字のO<sub>2</sub>を、酵素がO<sub>2</sub>によって容易に不活性化されてしまうO<sub>2</sub>感受性酵素は“x-O<sub>2</sub>”を付して表している。なお、プロトポルフィリノーゲンIXをプロトポルフィリンIXに変換する酵素PPOについては、*Synechocystis* 6803ではHemJのみを有するため、好気型・嫌気型という機能分化は認められない。ただし、*Gloeobacter violaceus* PCC7421のみHemJとHemYを有するので、このラン藻では何らかの機能分化が推察される<sup>13)</sup>。

<sup>‡</sup> 解説特集「光合成を支えるテトラピロール代謝の多様性」

\* 連絡先 E-mail: fujita@agr.nagoya-u.ac.jp

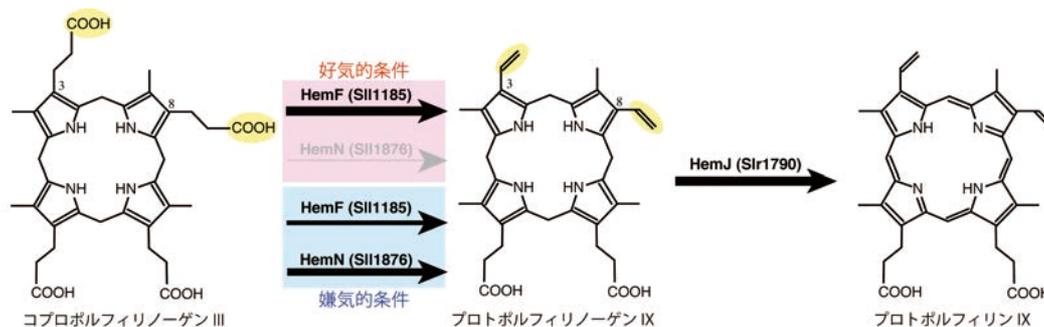


図2 コプロポルフィリノーゲンIII酸化・プロトポルフィリノーゲンIX酸化反応

コプロポルフィリノーゲンIII酸化反応において、HemFでは、O<sub>2</sub>が電子受容体となる。HemNでは、S-アデノシルメチオニンの還元により生成する5'-デオキシアデノシルラジカルによって反応が進行する。*Synechocystis* 6803では、好気条件ではHemFが唯一のCPOとして機能し、嫌気条件ではHemNがHemFと同等に機能すると推定される。プロトポルフィリノーゲンIX酸化反応によって、共鳴構造をもつポルフィリン環が形成される。*Synechocystis* 6803では、PPOはO<sub>2</sub>依存型酵素HemJ単独であると推定される<sup>13)</sup>。

生理学的知見および、嫌気環境応答において重要な役割を担う新規転写制御タンパク質 ChIR についての研究を紹介する。また最後に、地球環境における酸素レベル上昇に応じた代謝再編という観点でラン藻のテトラピロール生合成系の適応進化について考察する。

## 2. 好気型酵素と嫌気型酵素の併存

テトラピロール色素にはクロロフィル、ヘム、ビリル色素などが含まれ、光合成や呼吸など生体内の様々な反応に関与している。これらの生合成経路は、グルタミン酸からプロトポルフィリンIXまでの共通経路を共有する19段階以上の酵素反応から構成されている<sup>9)</sup>が、そのうち少なくとも4段階の反応で基質としてO<sub>2</sub>を要求する(図1)。したがって、これらの反応は、嫌気環境下ではO<sub>2</sub>不足のため反応が滞ってしまうことが想定される。逆に、好気環境ではO<sub>2</sub>によって不活性化される酵素も存在する。このため、*Synechocystis* 6803などのラン藻は、これらの反応に対し、好気環境下で主に機能する好気型酵素と嫌気環境下で主に機能する嫌気型酵素を併存させ、それらを環境のO<sub>2</sub>レベルに応じて使い分けることによって多様なO<sub>2</sub>レベルの環境に適応していることが明らかにされてきた。以下、*Synechocystis* 6803のテトラピロール生合成においてO<sub>2</sub>が反応に関与する酵素とその機能分化について順に述べる。

### 2-1. コプロポルフィリノーゲンIII酸化反応

コプロポルフィリノーゲンIII (CPgen) 酸化反応(図2)では、CPgenのC-3位とC-8位のプロピオン酸

が酸化的脱炭酸によりビニル基に変換されてプロトポルフィリノーゲンIXが生成する。この反応を触媒するCPgen酸化酵素(CPO)として、進化的類縁性のない2つの酵素HemFとHemNが知られている。HemFは、モノオキシゲナーゼファミリーに属する酵素であり、O<sub>2</sub>を電子受容体とする酸化反応を行う。一方、HemNは、O<sub>2</sub>に依存せずにこの反応を触媒し、正確にはCPgen脱水素酵素と称すべき酵素である<sup>10)</sup>。HemNは、ラジカルSAMとよばれる大きな酵素ファミリー<sup>11)</sup>に属し、反応中心として[4Fe-4S]型鉄硫黄クラスターを保持し、O<sub>2</sub>にさらされると急速に不活性化されてしまう高い酸素感受性を示す。*Synechocystis* 6803のゲノムには、HemFとHemNをコードすると推定される遺伝子 *sll1185* と *sll1876* が存在する。私たちは、これらSll1185、Sll1876を大腸菌で発現させ、その精製タンパク質においてどちらもCPgen酸化活性を有することを確認した<sup>6)</sup>。

*Synechocystis* 6803におけるこれら2つの酵素の機能分化を検討するため、2つのCPOの欠損株 ( $\Delta hemF$ 、 $\Delta hemN$ ) を単離した。これら欠損株の形質解析から、好気環境下ではHemFが唯一のCPOとして機能しており、嫌気環境下ではHemFとHemNがほぼ同等の寄与でCPgen酸化反応を行っていることが示唆された(図2)。HemFは、嫌気環境下では基質であるO<sub>2</sub>レベルが低下するため、活性が大きく低下するはずであるが、光合成で発生する内生のO<sub>2</sub>を基質として反応を行っていると考えられる。

*Synechocystis* 6803のゲノムには、HemN (Sll1876) の他にもう一つHemNと有意な相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子 *sll1917* が存在する。Sll1917

は、大腸菌での組換え体の吸収スペクトル特性から鉄硫黄クラスターを保持していることが示唆されたが、CPO活性は検出されず、その欠損株も顕著な形質を示さなかった。このため、現在のところSll1917の機能は不明のままである<sup>6)</sup>。

### 2-2. プロトポルフィリノーゲンIX酸化反応

CPOによって生じたプロトポルフィリノーゲンIXは、プロトポルフィリノーゲンIX酸化酵素 (PPO) により酸化され共通経路の最終産物プロトポルフィリンIXに変換される。PPOとして、これまでO<sub>2</sub>を電子受容体とするO<sub>2</sub>依存性PPO (HemY) とO<sub>2</sub>非依存性PPO (HemG) が知られていたが<sup>12)</sup>、これらに加えてO<sub>2</sub>依存性PPOとして最近*Synechocystis* 6803から新たにHemJ (Slr1790) が同定された<sup>13)</sup>。ほとんどのラン藻はこれら3つの異なるPPOのうち1つだけを有し、その分布はモザイク状である<sup>13)</sup>。なお、*Synechocystis* 6803の*hemJ*は、後述する転写因子ChlRの制御下になく、構成的に発現している (青木、未発表データ)。

### 2-3. Mg-プロトポルフィリンIXモノメチルエステル環化反応

Mg-プロトポルフィリンIXモノメチルエステル (MPE) 環化反応では、クロロフィルに特有の5番目の環状構造E環が形成される (図3)。この反応を触媒する酵素は、MPEシクラゼと呼ばれ、E環形成によりMPEをプロトクロロフィリドに変換する。光合成細菌 *Rubrivivax gelatinosus* においてO<sub>2</sub>依存的なE環形成に関わる遺伝子として *acsF* (aerobic cyclization

system Fe-containing subunit) が同定された<sup>14)</sup>。*Synechocystis* 6803のゲノムには、*acsF*と高い相同性を示す2つの遺伝子 *sll1214* と *sll1874* が存在し、これらは互いに推定アミノ酸配列で57%の相同性を示す<sup>5)</sup>。これら2つの相同遺伝子が*Synechocystis* 6803においてMPE環化反応に関与するかどうかを検討するために、各遺伝子の欠損株 ( $\Delta$ *sll1214*,  $\Delta$ *sll1874*) を単離した。興味深いことに $\Delta$ *sll1214*は好気条件では生育できず、嫌気条件では生育可能という条件の致死形質を示した。また、細胞に大量のMPEの蓄積が認められた。一方、 $\Delta$ *sll1874*は好気嫌気いずれでも生育可能であるが、嫌気条件では有意に生育が遅延し、MPEを蓄積した。この結果は、これら2つに遺伝子のいずれもMPE環化反応に関わっていることを示しており、クロロフィル合成に関わる遺伝子として *sll1214* を *chlA<sub>I</sub>*、*sll1874*を *chlA<sub>II</sub>*と名付けた<sup>5)</sup>。これら欠損株の形質から、好気環境下ではChlA<sub>I</sub>が唯一のMPEシクラゼとして機能し、嫌気環境下ではChlA<sub>I</sub>とChlA<sub>II</sub>の両方が反応に寄与し、ChlA<sub>II</sub>の方がChlA<sub>I</sub>に比べ寄与が大きいことが示唆された<sup>5,15)</sup>。

MPEシクラゼは、真核光合成生物や一部の光合成細菌が有する酸素依存型酵素ChlA (生物によりAcsF, CHL27, Crd1などの多様な名称が与えられているが、本稿ではChlAと称する) と、光合成細菌が有するBchEという2つのアナログ酵素の存在が知られている。ChlAが二核Fe中心モノオキシゲナーゼファミリーに属する酵素である一方、BchEはHemNと同様にラジカルSAMファミリーに属し、鉄硫黄クラスターを保持していることから、酸素感受性酵素と想定され

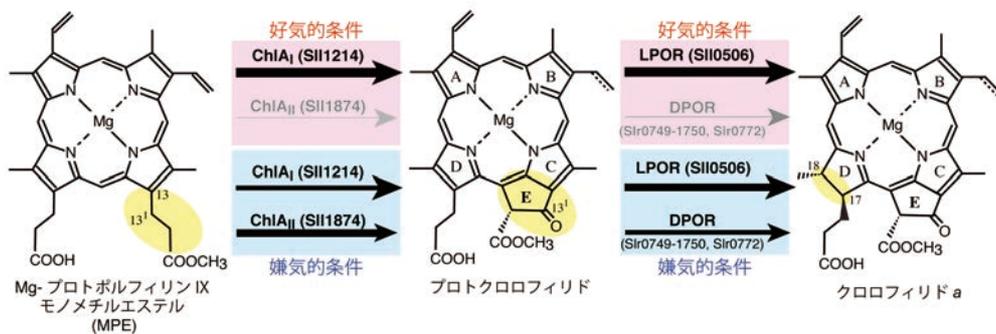


図3 E環形成・D環還元反応

クロロフィル特有のE環は、C13位のプロピオン酸メチルの環化反応によって形成され、その際C13'位にオキシ基が導入される。このオキシ基の酸素原子は、好気型酵素 ChlA と嫌気型酵素 BchE ではそれぞれ O<sub>2</sub> と H<sub>2</sub>O と由来が異なる。*Synechocystis* 6803は、好気型酵素 ChlA のみを持ち、そのアイソフォーム ChlA<sub>I</sub> と ChlA<sub>II</sub> を環境の O<sub>2</sub> レベルに応じて使い分けている。Pchlide還元では、D環C17=C18二重結合が立体特異的に還元され、クロロフィルaの直接の前駆体クロロフィリドaが生成する。なお、8位のビニル基は、Pchlideまたはクロロフィリドaの段階でエチル基に還元されるため、ここでは特定していない。

る。*Synechocystis* 6803 には BchE と有意な相同性を示すタンパク質をコードする3つの遺伝子 (*slr0905*、*slr1242*、*slr0309*) が認められるが、これらの欠損株を用いた生理学的解析では、これらがラン藻細胞内でMPE環化反応に関与しているという証拠は得られなかった。したがって、*Synechocystis* 6803ではMPE環化反応は完全にO<sub>2</sub>依存型酵素ChlA<sub>I</sub>/ChlA<sub>II</sub>に依存していると考えられる<sup>5)</sup>。

なお、MPE環化反応は、ChlAについてもBchEについてもいまだに精製タンパク質で酵素活性が再構成された例がない。植物における酸素依存型MPE環化反応は、可溶性画分と不溶性画分の両方とNADPHが活性に必要とされ<sup>16)</sup>、2-CysペルオキシレドキシソとNADPHチオレドキシソ還元酵素C (NTRC) が活性を促進する<sup>17)</sup>。一方、BchEについては、*Rhodobacter capsulatus*の細胞を使った*in-vivo*アッセイによりMPEシクラーゼ活性がビタミンB<sub>12</sub>またはアデノシルコバラミンに依存することが示されているのみである<sup>18)</sup>。極端に言う、ChlAやBchEがMPEシクラーゼ酵素の本体であるのかどうかははっきり示されていないのが現状である。E環形成は、クロロフィル生合成において生化学的研究が最も困難な反応の一つである。

#### 2-4. プロトクロロフィリド還元反応

MPEシクラーゼにより生成したプロトクロロフィリド (Pchl<sub>id</sub>) は、Pchl<sub>id</sub>還元酵素によりD環 (C17=C18二重結合) が立体特異的に還元され、クロロフィリド<sub>a</sub>となり、環構造がポルフィリン環からクロリン環へ変換される<sup>19)</sup>。Pchl<sub>id</sub>還元酵素として光依存型Pchl<sub>id</sub>還元酵素 (LPOR) と光に依存しない暗所作動型Pchl<sub>id</sub>還元酵素 (DPOR) が存在する。DPORは、ニトロゲナーゼと進化的起源を共有し、互いに類似した構造と反応機構をもつ<sup>20)</sup>。DPORはニトロゲナーゼと同様にO<sub>2</sub>に曝されると急速に不活性化されるという特徴を示す。一方、LPORは、短鎖脱水素酵素/還元酵素ファミリーとよばれる大きなピリジンヌクレオチド依存性酵素群に属し、O<sub>2</sub>耐性をもつ一方、反応自体に光を要求するという特異な特徴をもつ<sup>21)</sup>。ラン藻ではこれら2つの酵素が併存しており、環境の光とO<sub>2</sub>レベルによって機能分化している<sup>22)</sup>。ただし、これらの酵素系遺伝子の発現はChlRに制御されていない。

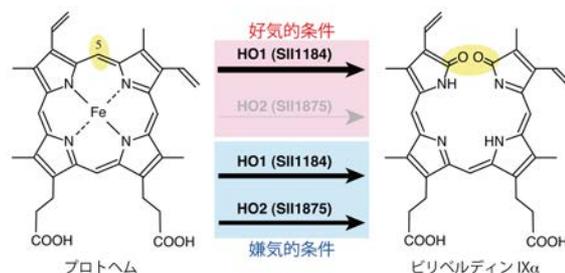


図4 ヘムオキシゲナーゼ (ヘム開裂) 反応

メソ $\alpha$ 炭素 (C5位) が一酸化炭素として遊離し、ヘムが開裂、ビリベルディンIX $\alpha$ が生成する。*Synechocystis* 6803 では、2つのアイソフォームHO1とHO2が存在し、好気条件ではHO1が唯一のHOとして機能し、嫌気条件においてはHO2が誘導され、HO1のはたらきを補助する。

#### 2-5. ヘムオキシゲナーゼ反応

ヘムオキシゲナーゼ (HO) は、ヘムの酸化開裂によりビリベルディンIX $\alpha$ を生成し、フィコビリソームの色素 (フィコシアノビルリン) やフィトクロムの発色団 (フィトクロモビルリン) などのピリン色素の前駆体を供給する (図4)。HOは、酵素名が表すようにO<sub>2</sub>を取り込む酸素依存性酵素である。*Synechocystis* 6803では、HOとしてHO1 (Slr1184)、HO2 (Slr1875) という互いにアミノ酸配列で約50%の相同性を示すアイソフォームが併存しており、いずれもHO活性を有することが確認されている<sup>23,24)</sup>。

2つのHOのラン藻細胞における機能分化を検討するため、2つのHO欠損株 ( $\Delta ho1$ 、 $\Delta ho2$ ) を単離し、その形質を検討した。その結果、 $\Delta ho1$ は、 $\Delta hemF$ や $\Delta chlA_I$ と同様に嫌気条件でのみ生育可能という条件的致死形質を示し、 $\Delta ho2$ は好気・嫌気両条件ともに良好に生育した。したがって、好気環境下ではHO1が唯一のHOとして機能し、嫌気環境下ではHO2がHO1を補助するように機能していると推察される<sup>7,25)</sup>。なお、HO反応では、CPgen酸化反応におけるHemNやMPE環化反応におけるBchEのような、O<sub>2</sub>非依存的な酵素はこれまで見つかっていない。

#### 3. 転写制御因子ChlR

2.で述べた5つの反応のうちPPOを除く4つの反応における酵素の機能分化は、各酵素の生化学的特性を反映したものと解釈される。最近、これらの遺伝子が環境の酸素レベルに応じて転写段階で制御されていることが明らかになってきた。*Synechocystis* 6803において好気環境下で主に機能する3つの好気型酵素 (HemF、ChlA<sub>I</sub>、HO1) と嫌気環境下で機能する3つ

の嫌気型酵素 (HemN、ChlA<sub>II</sub>、HO<sub>2</sub>) は、それぞれ発現パターンが異なっている。好気型酵素は環境の酸素レベルによらず構成的に発現しており、嫌気環境下でも光合成によって発生する内生のO<sub>2</sub>を用いて、速度は低下しながらも各反応を触媒していると推察される。一方、嫌気型酵素をコードする3つの遺伝子は、ゲノム上で一つのオペロン*chlA<sub>II</sub>-ho2-hemN*を形成しており、好気環境下ではmRNAの発現はほとんど検出されないが、嫌気環境下でその発現量が増大する<sup>5-7)</sup>。このような制御は、嫌気環境下で嫌気型酵素を誘導発現させてO<sub>2</sub>依存型酵素の活性を代替または補完することにより各反応速度を維持し、クロロフィルやビリリン色素の供給を一定に保とうとする嫌気環境適応機構の一つであると考えられる。これまでこの転写制御メカニズムは全く未知であったが、最近私たちはこれらの嫌気型酵素遺伝子の発現制御を担う新規転写制御因子ChIRを発見した<sup>8)</sup>。以下に発見の経緯および、ChIRの性質について述べる。

### 3-1. 新規転写制御因子ChIRの発見

ChIR発見のきっかけとなったのが、2-5.で述べたHO反応である。

好気環境下で唯一のHOであるHO1を欠損させた株 (*Δho1*) は、好気環境下で致死形質を示す。研究の過程で*Δho1*から好気環境下で生育可能となった偽復帰変異株*Δho1R*を偶然発見し、これを単離した。*Δho1R*について*ho2*の発現量を確認したところ、野生株では嫌気環境下でのみ発現誘導される*ho2*が、*Δho1R*では構成的な発現パターンを示した。好気環境下でも*ho2*が発現するようになったことで*ho1*の欠損が相補され、*Δho1R*は好気環境下でも生育可能になったと考えられる。また、この発現パターンの変化は、*ho2*を含むオペロン*chlA<sub>II</sub>-ho2-hemN*に含まれる3つに遺伝子すべてで認められた。

このような発現パターンの変化を引き起こした原因を明らかにするために、*Δho1R*の全ゲノム配列を、次世代シーケンサーを用いて明らかにし、野生株の配列と比較した。その結果、*sll1512*がコードするタンパク質 (135残基) の35番目のアスパラギン酸 (GAT) がヒスチジン (CAT) に置換される一塩基置換が見出された。*Sll1512*は原核生物に広く分布するMarRファミリーと呼ばれる転写制御タンパク質と有意な相同性を示すことから、*Sll1512*はラン藻細胞内

で転写制御タンパク質として機能していることが推察された。私たちはこの遺伝子を“*chlR*”と命名しさらに解析を進めた<sup>8)</sup>。

### 3-2. ChIRの機能解析

まず、*chlR*欠損株 (*ΔchlR*) を単離し、遺伝子発現解析を行ったところ、嫌気型酵素遺伝子 (*chlA<sub>II</sub>-ho2-hemN*) の嫌気環境下での発現誘導が消失していた。この結果は、ChIRが嫌気環境下で嫌気型酵素遺伝子の転写を活性化するタンパク質であることを強く示唆している。

次に、ChIRが実際にDNA結合能を有するタンパク質であるかを確かめるため、ゲルシフトアッセイによる解析を行った。解析には、大腸菌で発現させ精製した野生型ChIRと*Δho1R*における一アミノ酸置換を含むChIR-D35Hを用いた。*chlA<sub>II</sub>*上流DNA断片に対してゲルシフトアッセイを行ったところ、野生型ChIRはDNAとの結合が認められなかったが、ChIR-D35Hでは明瞭なシフトバンドが得られ、DNA結合能が確認された。この実験では全ての操作を好気環境下で行ったため、この結果は好気環境下での細胞内の状態を反映していると考えられる。これらの結果から私たちは、ChIRは好気環境下ではDNAとの結合能を示さない不活性型であり、嫌気環境への移行に伴って活性型に変換され、*chlA<sub>II</sub>*の上流領域に結合して遺伝子の発現を活性化するという機能モデルを提唱した (図5)<sup>8)</sup>。また、ChIR-D35Hはアミノ酸置換の影響により恒常的に活性型となったため、*Δho1R*で嫌気型酵素遺伝子が構成的な発現パターンを示したと考えられる。

ChIRは、テトラピロール生合成系の3つの遺伝子以外に、*psbA1*遺伝子の発現制御にも関わっている。

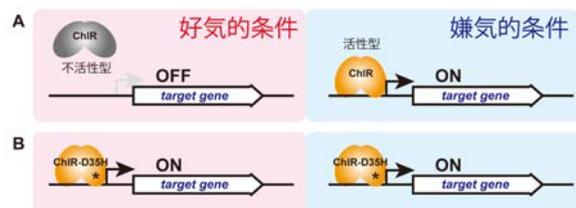


図5 ChIRの機能モデル

ChIRは、好気条件では不活性型として存在し、DNAと相互作用しない (A左)。嫌気条件では活性型に変換され、ターゲット遺伝子の近位に結合し、転写を活性化する (A右)。ChIR-D35H変異タンパク質は、そのアミノ酸置換により恒常的に活性化状態を保つようになった。このため、好気条件下でもターゲット遺伝子の転写を活性化する (B左)。

*Synechocystis* 6803には光化学系IIのD1タンパク質をコードする*psbA*が3つ (*psbA1*, *psbA2*, *psbA3*) 存在する。このうち*psbA2*と*psbA3*にコードされるD1タンパク質はアミノ酸配列がまったく同一で、通常の培養条件においてはこのD1タンパク質が光化学系IIで機能している。*psbA1*にコードされるタンパク質は、それらとのアミノ酸配列の相同性が85%とやや異なり、D1'タンパク質と呼ばれる。*psbA2*, *psbA3*が構成的に発現しているのに対し、*psbA1*は嫌気誘導型の発現パターンを示すことから、D1'タンパク質は嫌気条件下での光化学系IIで機能すると推察される。自然界では嫌気環境はしばしば高い硫化水素レベルを伴う。硫化水素はD1タンパク質に障害を与えることから、D1タンパク質のターンオーバーをより円滑に行うため、特別なD1'タンパク質を嫌気環境で誘導していると解釈されている<sup>26)</sup>。また、ゲルシフトアッセイにおいてChIR-D35Hは*psbA1*の上流領域と結合することを確認している<sup>8)</sup>。このように、ChIRはテトラピロール生合成系以外の嫌気環境適応にも関与していることから、ChIRの制御する未同定の遺伝子群が他にも存在することが推測される。なお、*Synechocystis* 6803の低酸素誘導に関わるタンパク質としてこれまでにHik31が報告されているが、その制御下にある遺伝子群はChIRとはまったく異なる<sup>27)</sup>。また、嫌気条件に応答して制御される遺伝子の中には、Hik31やChIRで制御されていないものも多数存在しており (*hox*, *flv*など)<sup>26)</sup>、これらの遺伝子はChIRやHik31以外の未同定の情報伝達系によって制御されていると推察される<sup>8)</sup>。

#### 4. ラン藻における嫌気型酵素の分布

これまでの研究により、テトラピロール生合成系における好気型酵素と嫌気型酵素の機能分化と転写レベルでの発現制御から成る*Synechocystis* 6803の嫌気環境適応機構が明らかとなった。しかしながら、このシステムは全てのラン藻に保存されているものではない。表1に代表的なラン藻36種における好気型・嫌気型酵素の分布とChIRの有無を示す。好気型酵素はほぼ全てのラン藻に保存されているが、嫌気型酵素は保持していないラン藻も多い。また、嫌気型酵素を保持している場合、その多くがChIRを保持している。ただし、嫌気型酵素を保持していないにもかかわらず、ChIRを保持しているラン藻種も存在していることから、ChIRが嫌気型酵素の発現制御以外の制御にも

関わっている可能性が考えられる。

生育環境に着目すると、淡水性のラン藻の多くが嫌気型酵素を保持している一方、海水性のラン藻は好気型酵素のみを保持しているものが多い。これは、より閉鎖的な環境に富む淡水の方が嫌気環境にさらされる機会が多いことを反映しているのかもしれない。

また、窒素固定を行うラン藻の多くがChIRおよび嫌気型酵素を保持している。窒素固定を行うニトロゲナーゼは金属中心を持つO<sub>2</sub>感受性酵素であることから、嫌気環境適応機構と窒素固定の間には何らかの関わりがあることが推察される。

なお、*Synechocystis* 6803ではCPO活性を示さなかったSII1917オルソログは、表1に挙げた全てのラン藻に保存されている。枯草菌のHemNはSII1876よりもSII1917と高い相同性を示すことから、SII1876をもたないラン藻ではSII1917型HemNがCPOとして機能しているのかもしれない。

#### 5. 大酸化イベントと酸素危機

現在の地球の大気に21%含まれるO<sub>2</sub>は、反応性が高く、継続的な供給源がなければ急速に消失する<sup>28)</sup>。酸素供給源である酸素発生型光合成の成立以前、生命誕生当時の地球の大気環境は、O<sub>2</sub>をほとんど含まない嫌気的環境であった。すなわち、生命誕生とそれに続く黎明期の生物進化は嫌気的環境下で進行した。その後の生命進化を決定づける最も重要な地球史的イベントは、約22億年前に起こった酸素レベルの急上昇（大酸化イベントGOE; Great Oxidation Event）である<sup>29)</sup>。この酸素レベル上昇はもちろん酸素発生型光合成生物の誕生と繁殖に起因する<sup>30)</sup>。O<sub>2</sub>は呼吸鎖に代表されるように有用な電子受容体であり、O<sub>2</sub>を電子受容体とすることにより生物のエネルギー生産は飛躍的に増大した。さらに、O<sub>2</sub>の存在により生物の代謝系の多様性が爆発的に増加したと考えられている<sup>4)</sup>。一方、O<sub>2</sub>に由来する活性酸素種は生体にとって高い毒性を示し<sup>31)</sup>、嫌気的環境で誕生・進化してきた生物にとってGOEは、生存に関わる重大な選択圧として作用したと考えられる。

祖先ラン藻は、酸素発生型光合成の創出によって電子供与体として無限に存在する水を利用することが可能となりその繁殖域を地球全体に広げていったと推察されるが、その一方、それまでの嫌気的環境で進化させてきた多くの酸素感受性酵素群は、自らの光

表1 ラン藻における好気型酵素/嫌気型酵素とChlRの分布

環境 <sup>a</sup>	種 <sup>b</sup>	chlR <sup>c</sup>	CPgen酸化 <sup>c</sup>			MPE環化 <sup>c</sup>		へム開裂 <sup>c</sup>		窒素固定 <sup>d</sup>
			hemF	hemN	sl11917	chlA <sub>I</sub>	chlA <sub>II</sub>	ho1	ho2	
F	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	+	+	-	+	+	-	+	-	-
F	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	+	+	-	+	+	-	+	-	-
F	<i>Nostoc punctiforme</i>	+	+	+•	+	+	+	+	+•	-
F	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	+	+ <sup>oe</sup>	+•	+	+	+ <sup>oe</sup>	+	+•	+
F	<i>Anabaena variabilis</i>	+	+	+•	+	+	+	+	+•	+
M	<i>Trichodesmium erythraeum</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	+
F	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7424	+	+	+•	+	+	+•	+	+•	+
F	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822	+	+	+•	+	+	+•	+	+•	+
M	<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	-	+	+•	+	+	+	+	+•	-
F	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 8801	+	+	+•	+	+	+	+	+•	+
F	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 8802	+	+	+•	+	+	+	+	+•	+
F	<i>Microcystis aeruginosa</i>	-	+	-	+	+	-	+	-	-
F	<b><i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803</b>	+	+ <sup>o</sup>	+•	+	+	+•	+ <sup>o</sup>	+•	-
M	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	+	+	+•	+	+	+•	+	+•	-
M	<i>Acaryochloris marina</i>	+	+	+•	+	+	+•	+	+•	-
F	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425	+	+	+•	+	+	+•	+	+•	+
F	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	-	+	+•	+	+	+•	+	+•	-
F	Cyanobacteria Yellowstone A-Prime	-	+	-	+	+	-	+	-	+
F	Cyanobacteria Yellowstone B-Prime	-	+	-	+	+	-	+	-	+
F	<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	+	+	-	+	+	-	+	-	-
M	<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT 9301	-	+	-	+	+	-	+	-	-
M	<i>Prochlorococcus marinus</i> AS9601	-	+	-	+	+	-	+	-	-
M	<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT 9312	-	+	-	+	+	-	+	-	-
M	<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT 9515	-	+	-	+	+	-	+	-	-
M	<i>Prochlorococcus marinus</i> MED4	-	+	-	+	+	-	+	-	-
M	<i>Prochlorococcus marinus</i> NATL2A	-	+	-	+	-	+	+	-	-
M	<i>Prochlorococcus marinus</i> NATL1A	-	+	-	+	-	+	+	-	-
M	<i>Prochlorococcus marinus</i> SS120	-	+	-	+	-	+	+	-	-
M	<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT 9313	-	+	-	+	-	+	+	-	-
M	<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT 9303	-	+	-	+		+ <sup>f</sup>	+	-	-
M	<i>Synechococcus</i> sp. WH 7803	-	+	-	+	+	-	+	-	-
M	<i>Synechococcus</i> sp. CC 9311	+	+	-	+	+	-	+	-	-
M	<i>Synechococcus</i> sp. WH 8102	+	+	-	+	+	-	+	-	-
M	<i>Synechococcus</i> sp. RCC 307	-	+	-	+	+	-	+	-	-
M	<i>Synechococcus</i> sp. CC 9902	-	+	-	+	+	-	+	-	-
M	<i>Synechococcus</i> sp. CC 9605	-	+	-	+	+	-	+	-	-

<sup>a</sup> ラン藻の主な生息環境を示す。F, 淡水性 (黄緑で色づけした); M, 海洋性。

<sup>b</sup> ゲノム情報が取得できるラン藻 (36種) を分子系統樹<sup>41,42)</sup>をもとに配列した。

<sup>c</sup> 各遺伝子オルソログの有無を各々+, -で示す。オルソログの判断は、KEGG (<http://www.kegg.jp/>) のOrtholog検索結果に基づいた。●は互いに遺伝子クラスターを形成する遺伝子セットを示す。また、○は別の座位に互いに遺伝子クラスターを形成する遺伝子セットを示す。

<sup>d</sup> 窒素固定能の有無を+, -で示す。

<sup>e</sup> *Anabaena* PCC 7120では、*hemF*と*chlA<sub>II</sub>*が2コピー存在し、そのうち1コピーが隣接して存在する。

<sup>f</sup> KEGGのOrtholog結果で、ChlA<sub>I</sub>とChlA<sub>II</sub>のいずれともほぼ同じ程度の相同性を示したため、中間的なChlAと判断した。

合成によって発生するO<sub>2</sub>により、真っ先に障害を受けたはずである。ラン藻は、そのような“酸素危機”を克服してきた最初の生物と考えられ、現生ラン藻のゲノムには、その適応進化の痕跡が刻印されているに違いない。光合成に必須の色素を供給するテトラピロール生合成系は、酸素発生型光合成の成立以前に確立されていたはずである。ラン藻のテトラピロール生合成系にはそのような進化の痕跡が、他の代謝系に

比べて特に色濃く残されているかもしれない。クロロフィル*a*の生合成は酸素発生型光合成の成立に必要な不可欠なものであったにも関わらず、その成立に伴って生合成系自体がO<sub>2</sub>による障害により停滞してしまうという進化のアイロニーも興味深い。

## 6. テトラピロール生合成系の適応進化

私たちの研究によって明らかにされたこの適応進化

表2 ラン藻のテトラピロール生合成系に残された適応進化の痕跡

反応	嫌気型酵素	好気型酵素 <sup>a</sup>	現生ラン藻 <sup>b</sup>	適応進化様式 <sup>c</sup>	カテゴリー <sup>d</sup>	転写制御タンパク質	文献
CPgen酸化	HemN	HemF*	HemN/HemF	併存	Ia	ChlR	6
E環形成	BchE <sup>e</sup>	ChlA*	ChlA <sub>I</sub> /ChlA <sub>II</sub>	置換・分化 <sup>f</sup>	II	ChlR	5,15
D環還元	DPOR <sup>g</sup>	LPOR <sup>h</sup>	DPOR/LPOR	併存 <sup>i</sup>	Ib	PedR	22
ヘム開裂	n.d. <sup>j</sup>	HO*	HO1/HO2	分化 <sup>k</sup>	II	ChlR	7,25

<sup>a</sup>\*は酸素依存型酵素であることを示す。

<sup>b</sup>ラン藻*Synechocystis* sp. PCC 6803の例。

<sup>c</sup>併存、両方の酵素が機能分化して使われている；置換、嫌気型酵素が存在せず、好気型酵素に置換されたと推察される；分化、好気型酵素が酸素レベルによって機能分化した複数のアイソフォームを有する。

<sup>d</sup>カテゴリーI、嫌気型酵素と好気型酵素の併存（Ia、好気型酵素が酸素依存性；Ib、好気型酵素が酸素非依存性）；II、好気型酵素のアイソフォームの併存<sup>7)</sup>。

<sup>e</sup>光合成細菌にのみ分布する。

<sup>f</sup>アイソフォームをもたないラン藻も存在する。また、*Arabidopsis thaliana*などの植物もアイソフォームをもたない。

<sup>g</sup>暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素（ニトロゲナーゼに類似した酸素感受性酵素）。

<sup>h</sup>光依存型プロトクロロフィリド還元酵素（酸素に依存しないが光に依存する）。

<sup>i</sup>被子植物ではDPORが欠失しており、LPORに完全に“置換”されている。

<sup>j</sup>未発見。

<sup>k</sup>アイソフォームをもたないものや3つ以上のアイソフォームを有するラン藻も存在する。

を表2に要約した。嫌気環境で誕生した始源光合成生物は、当初嫌気環境に適応した嫌気型酵素（HemN、BchE、DPOR）を用いてクロロフィルを生合成していたと考えられる。これら嫌気型酵素は共通してO<sub>2</sub>に対し非常に脆弱な鉄硫黄クラスターを活性中心に用いる。このため、酸素発生型光合成の創出による内生のO<sub>2</sub>の産生に加え環境中の酸素レベルが上昇していく中で、これら嫌気型酵素は不可逆に不活化され、クロロフィル供給が滞る局面が頻出したと推察される。このような“酸素危機”に対して酸素耐性酵素群を創出したラン藻が生き延びることができたと推察される。そのような酸素耐性酵素が、HemNの代替としてHemF、BchEの代替としてChlA、そしてDPORの代替としてLPORである<sup>22)</sup>。

GOEによる酸素レベルの上昇は、テトラピロール生合成系のみならず好気環境により適応した酵素（O<sub>2</sub>を基質として利用するオキシゲナーゼなども多数含まれる）を新たに創出し、新規な代謝ネットワークを生み出した<sup>4)</sup>。さらに、嫌気型酵素の淘汰と好気型酵素への置換を促し、まさに“代謝大再編”を通して現在の代謝系へと進化を導いたと考えられる。しかし、大気中の酸素レベルが好气的であっても、微生物マットや富栄養湖などの低酸素環境は常に存在し、また、光合成が停止する夜間には定期的に嫌気環境にさらされる<sup>3)</sup>。このため、嫌気型酵素は全て淘汰されたわけではなく、現在も多くのラン藻で嫌気環境適応機構として保存され、嫌気環境での適応度の

維持に貢献している。

私たちはこれまでの研究で対象としたChlR制御下の3つの反応（CPgen酸化反応、MPE環化反応、HO反応）とPchlide還元における好気型酵素/嫌気型酵素の機能分化<sup>22)</sup>から、それらの適応様式を2つのカテゴリーに分類した<sup>8)</sup>。一つは、2つの酵素が酸素耐性酵素と酸素感受性酵素という組み合わせの場合である（カテゴリーI）。このカテゴリーには、CPgen酸化反応（HemF/HemN）とPchlide還元反応（LPOR/DPOR）が属し、酸素耐性酵素が酸素依存性か否かによりサブカテゴリーIaとIbに分けられる。このような機能分化は、酸素レベルの上昇に伴い酸素感受性酵素（嫌気型酵素）が不活化してしまったため、酸素耐性酵素（好気型酵素）がその活性を補うために新たに創出され、その後嫌気型酵素が発現調節を受けるようになり、成立したものと考えられる。もう一つの様式は、酸素依存型酵素のアイソフォームを用いている場合であり（カテゴリーII）、MPE環化反応とHO反応が属する。これら2つのアイソフォームの機能分化の分子基盤は未解明だが、嫌気環境下で特別なアイソフォームが発現誘導されることによって、酵素含量が増加し、O<sub>2</sub>濃度が低下しても生成物の供給速度を保てるようにしているのではないかと考えられる。あるいは、嫌気誘導型のアイソフォーム（嫌気型酵素）は、構成的発現のアイソフォーム（好気型酵素）に比べ、O<sub>2</sub>との親和性が高く、嫌気環境下でも効率良く酸素を利用できるという質的な差異があるのかもしれない。

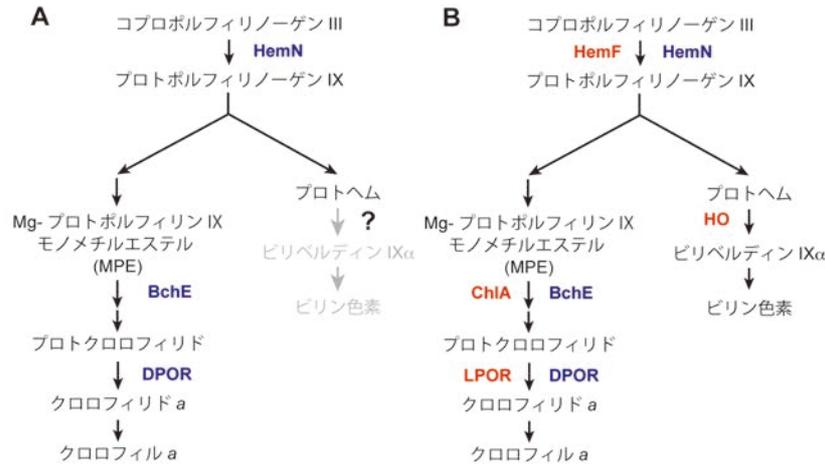


図6 ラン藻のテトラピロール（クロロフィル・ビリニン色素）生合成系の適応進化

CPgen以降で好気/嫌気環境により機能分化している反応のみ記載した。A. 始源ラン藻で成立していたと推定される生合成系。すべて嫌気型酵素（青）でのみ成立している。B. 大酸化イベント直後の遷移的な生合成系。新たに酸素を利用するまたは、酸素に耐性を示す好気型酵素（赤）が創出されている。現生ラン藻の生合成系は図1の通り。この間、BchEの喪失、ChIAとHOの分化というイベントが起こったと推察される。なお、PPOの段階は、現生ラン藻においてモザイク状分布を示し、また、緑色細菌*Chlorobaculum tepidum*（旧名*Chlorobium tepidum*）TLSなど3つのPPOのどの遺伝子も見つからない生物も多数残されているため、今後新たなPPOが同定される可能性が高い<sup>13)</sup>。このため、PPOの進化を推察することは現時点ではむずかしい。

れない。カテゴリIIのような機能分化は、光条件下では光合成によるO<sub>2</sub>が生成するので、細胞内では完全な嫌気条件になることはほとんどないことを反映しており、内生O<sub>2</sub>を最大限利用することで、環境の幅広い酸素レベルに対し適応しようとするメカニズムと解釈される。なお、DPORは、ChIRではなくLuxRファミリーに属するPedRによって光強度に応じて制御されることが報告されている<sup>32)</sup>。PedRは、光合成電子伝達活性が低いときにDPOR遺伝子の転写を活性化する。DPORの代替酵素LPORは、光を活性に要求する酵素であることを考えると、O<sub>2</sub>よりも光を主な制御要因とすることは合目的である。

これらの進化的考察を踏まえ、GOE前後でのテトラピロール生合成系の進化シナリオを図6に示す。GOE以前、嫌気的環境下で成立した生合成系の3つの反応はすべて鉄硫黄クラスターを有する嫌気的酵素によって担われていた（A）。GOEによって生じた好気的環境に適応するため、酸素耐性酵素群が創出され（B）、さらに進化が進み、BchEの欠失、ChIAとHOのアイソフォーム形成が起こり、現在の生合成系（図1）に至ったと推察される。

## 7. おわりに

鉄硫黄クラスターを有する嫌気型酵素群は、生命の誕生当初に創出され黎明期の生命の根幹を成す反応を触媒していたと推察される<sup>33)</sup>。私たちは、ラン藻

のテトラピロール生合成系で発見されたような嫌気環境適応機構が他の代謝系にも普遍的に分布しているのではないかと考えている。実際に、O<sub>2</sub>を基質として用いている反応は他にも多数存在する。それらの反応ではO<sub>2</sub>供給が停滞する嫌気環境で何らかの調節が行われているはずである。また、O<sub>2</sub>に脆弱な鉄硫黄クラスターを有する酵素も多数存在する。その代表ともいえるラジカルSAMをコードする遺伝子は*Synechocystis* 6803のゲノムに28個も存在する。これらの中には、上記のカテゴリ分けには属さない、新たな適応の様式を採用しているものも存在しているかもしれない。

ラン藻を含む微細藻類は、近年、バイオ燃料生産、水素生産などのバイオエネルギー源として大きな期待がよせられている<sup>34-36)</sup>。その中で、ヒドロゲナーゼやニトロゲナーゼというO<sub>2</sub>に感受性の高い嫌気型酵素を、いかにO<sub>2</sub>を発生する光化学系IIと共存させて効果的に利用できるかが実用化の一つのカギとなるかもしれない<sup>37-40)</sup>。このような高いポテンシャルの酵素群を擁するラン藻を工業的により有効に活用する上で、嫌気環境下でラン藻がどのように適応しているか、というきわめて重要な知見が非常に限られていた。私たちの研究により、ラン藻の嫌気環境適応機構の一端を明らかにすることができた。今後は対象とする代謝系を拡大し、ラン藻の嫌気環境適応の全体像を明らかにし、大酸化イベントによって導かれた

代謝再編の全貌の解明を目指したい。

## 謝辞

*Synechocystis* 6803 の併存酵素の生理生化学的解析は、ChlA<sub>I</sub>/ChlA<sub>II</sub>については主に南崎啓と川尻安志、HemF/HemNについては後藤武知によって行われた。次世代シーケンサーは井原邦夫博士（名大遺伝子実験施設）、ゲルシフトアッセイは武田誠也・小俣達男博士（名大院生命農）に協力をいただいた。

Received June 24, 2012, Accepted July 19, 2012, Published April 31, 2012

## 参考文献

- 藤田善彦・大城香（1989）ラン藻という生きもの、東京大学出版会。
- Stal, L. J. and Zehr, J. P. (2008) Cyanobacterial nitrogen fixation in the ocean: diversity, regulation and ecology, in *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution* (A. Herrero and E. Flores Eds.) pp 423-446, Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Steunou, A. S. *et al.* (2006) In situ analysis of nitrogen fixation and metabolic switching in unicellular thermophilic cyanobacteria inhabiting hot spring microbial mats, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2398-2403.
- Raymond, J. and Segrè, D. (2006) The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life, *Science* 311, 1764-1767.
- Minamizaki, K., Mizoguchi, T., Goto, T., Tamiaki, H. and Fujita, Y. (2008) Identification of two homologous genes, *chlA<sub>I</sub>* and *chlA<sub>II</sub>*, that are differentially involved in isocyclic ring formation of chlorophyll *a* in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *J. Biol. Chem.* 283, 2684-2692.
- Goto, T., Aoki, R., Minamizaki, K. and Fujita, Y. (2010) Functional differentiation of two analogous coproporphyrinogen III oxidases for heme and chlorophyll biosynthesis pathways in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant Cell Physiol.* 51, 650-663.
- Aoki, R., Goto, T. and Fujita, Y. (2011) A heme oxygenase isoform is essential for aerobic growth in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Modes of differential operation of two isoforms/enzymes to adapt to low oxygen environments in cyanobacteria, *Plant Cell Physiol.* 52, 1744-1756.
- Aoki, R., Takeda, T., Omata, T., Ihara, K. and Fujita, Y. (2012) MarR-type transcriptional regulator ChlR activates expression of tetrapyrrole biosynthesis genes in response to low-oxygen conditions in cyanobacteria, *J. Biol. Chem.* 287, 13500-13507.
- Masuda, T. and Fujita, Y. (2008) Regulation and evolution of chlorophyll metabolism, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1131-1149.
- Cornah, J. E. and Smith, A. G. (2009) Transformation of uroporphyrinogen III into protoheme, in *Tetrapyrroles: Birth, Life and Death*, (M. J. Warren and A. G. Smith Eds.) pp. 74-88, Landes Bioscience, Texas, U. S. A. and Springer Science+Business Media, New York, U. S. A.
- Dowling, D. P., Vey, J. L., Croft, A. K. and Drennan, C. L. (2012) Structural diversity in the AdoMet radical enzyme superfamily, *Biochim. Biophys. Acta* in press.
- Boynton, T. O., Daugherty, L. E., Dailey, T. A. and Dailey, H. A. (2009) Identification of *Escherichia coli* HemG as a novel, menadione-dependent flavodoxin with protoporphyrinogen oxidase activity, *Biochemistry* 48, 6705-6711.
- Kato, K., Tanaka, R., Sano, S., Tanaka, A. and Hosaka, H. (2010) Identification of a gene essential for protoporphyrinogen IX oxidase activity in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16649-16654.
- Pinta, V., Picaud, M., Reiss-Husson, F. and Astier, C. (2002) *Rubrivivax gelatinosus* *acsF* (previously orf358) codes for a conserved, putative binuclear-iron-cluster-containing protein involved in aerobic oxidative cyclization of Mg-protoporphyrin IX monomethylester, *J. Bacteriol.* 184, 746-753.
- Peter, E. *et al.* (2009) Differential requirement of two homologous proteins encoded by *sll1214* and *sll1874* for the reaction of Mg protoporphyrin monomethylester oxidative cyclase under aerobic and micro-oxic growth conditions, *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 1458-1467.
- Rzeznicka, K. *et al.* (2005) *Xantha-1* encodes a membrane subunit of the aerobic Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase involved in chlorophyll biosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5886-5891.
- Stenbaek, A. *et al.* (2008) NADPH-dependent thioredoxin reductase and 2-Cys peroxiredoxins are needed for the protection of Mg-protoporphyrin monomethyl ester cyclase, *FEBS Lett.* 582, 2773-2778.
- Gough, S. P., Petersen, B. O. and Duus, J. O. (2000) Anaerobic chlorophyll isocyclic ring formation in *Rhodobacter capsulatus* requires a cobalamin cofactor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6908-6913.
- Reinbothe, C. *et al.* (2010) Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction, *Trends Plant Sci.* 15, 614-624.
- Muraki, N. *et al.* (2010) X-ray crystal structure of the light-independent protochlorophyllide reductase, *Nature* 465, 110-114.
- Masuda, T. and Takamiya, K. (2004) Novel insight into the enzymology, regulation and physiological functions of light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase

- in angiosperms, *Photosynth. Res.* 81, 1-29.
22. Yamazaki, S., Nomata, J. and Fujita, Y. (2006) Differential operation of dual protochlorophyllide reductases for chlorophyll biosynthesis in response to environmental oxygen levels in the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*, *Plant Physiol.* 142, 911-922.
  23. Cornejo, J., Willows, R. D. and Beale, S. I. (1998) Phytobilin biosynthesis: cloning and expression of a gene encoding soluble ferredoxin-dependent heme oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant J.* 15, 99-107.
  24. Zhang, X., Migita, C. T., Sato, M., Sasahara, M. and Yoshida, T. (2005) Protein expressed by the *ho2* gene of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is a true heme oxygenase, Properties of the heme and enzyme complex, *FEBS J.* 272, 1012-1022.
  25. Yilmaz, M., Kang, I. and Beale, S. I. (2010) Heme oxygenase 2 of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is induced under a microaerobic atmosphere and is required for microaerobic growth at high light intensity, *Photosynth. Res.* 103, 47-59.
  26. Summerfield, T. C., Toepel, J. and Sherman, L. A. (2008) Low-oxygen induction of normally cryptic *psbA* genes in cyanobacteria, *Biochemistry* 47, 12939-12941.
  27. Summerfield, T. C., Nagarajan, S. and Sherman, L. (2011) Gene expression under low oxygen conditions in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 demonstrates Hik31-dependent and Hik31-independent responses, *Microbiology* 157, 301-312.
  28. Falkowski, P. G. and Godfrey, L. V. (2008) Electrons, life and the evolution of Earth's oxygen cycle, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363, 2705-2716.
  29. Holland, H. (2006) The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361, 903-915.
  30. 伊藤 繁 (2012) 光合成の進化, 光合成研究 22, 14-30.
  31. ニック・レーン, 西田睦監訳 遠藤圭子訳 (2006) 生と死の自然史～進化を統べる酸素, 東海大学出版会
  32. Nakamura, K. and Hihara, Y. (2006) Photon flux density-dependent gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is regulated by a small, redox-responsive, LuxR-type regulator, *J. Biol. Chem.* 281, 36758-36766.
  33. Russell, M. J. and Martin, W. (2004) The rocky roots of the acetyl-CoA pathway, *Trends Biochem. Sci.* 29, 358-363.
  34. 増川一・櫻井英博 (2006) シアノバクテリアを用いた水素生産 遺伝11月号, 46-51.
  35. 小俣達男・藤田祐一・前田真一 (2010) 光合成微生物は資源・エネルギー分野で人類に貢献できるか?～生産性を規定する諸要因の分析～, 光合成研究 20, 65-71.
  36. ビエツロ, D. (2011) 期待はずれのバイオ燃料, 日経サイエンス11月号, 98-107.
  37. Masukawa, H., Inoue, K., Sakurai, H., Wolk, C. P. and Hausinger, R. P. (2010) Site-directed mutagenesis of the *Anabaena* sp. PCC 7120 nitrogenase active site to increase photobiological hydrogen production, *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6741-6750.
  38. Lenz, O. *et al.* (2010) H<sub>2</sub> conversion in the presence of O<sub>2</sub> as performed by the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha*, *Chemphyschem* 11, 1107-1119.
  39. Shomura, Y., Yoon, K. S., Nishihara, H. and Higuchi, Y. (2011) Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase, *Nature* 479, 253-256.
  40. Bandyopadhyay, A., Stöckel, J., Sherman, L. A. and Pakrasi, H. B. (2010) High rates of photobiological H<sub>2</sub> production by a cyanobacterium under aerobic conditions, *Nat. Commun.* 1, 139.
  41. Bandyopadhyay, A. *et al.* (2011) Novel metabolic attributes of the genus *Cyanothece*, comprising a group of unicellular nitrogen-fixing cyanobacteria, *MBio* 2, e00214-11.
  42. Yu, T., *et al.* (2012) Codon usage patterns and adaptive evolution of marine unicellular cyanobacteria *Synechococcus* and *Prochlorococcus*, *Mol. Phylog. Evol.* 62, 206-213.

## Adaptation to Anaerobic Environments and Evolutionary Aspects of Tetrapyrrole Biosynthesis in Cyanobacteria

Rina Aoki and Yuichi Fujita\*

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

## 解説

クロロフィル合成系の多様性はいかにして生まれたか？<sup>‡</sup>北海道大学 低温科学研究所<sup>1</sup>, CREST/JST<sup>2</sup>伊藤寿<sup>1,2</sup>, 田中歩<sup>1,2</sup>, 田中亮一<sup>1,2\*</sup>

## 1. はじめに

光合成生物はchlorophyll (Chl) *a*, *b*, *c*, *d*, *f* や bacteriochlorophyll *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *g* といった多様なクロロフィルやバクテリオクロロフィルを合成する。これらのクロロフィル類は、それぞれ異なった吸収波長を持ち、光合成生物が多様な光環境に適応する原動力となっている。これらのクロロフィル類のうち、Chl *a* は、すべての酸素発生型の光合成を行う生物にとって必須の光合成色素である。酸素発生型の光合成がラン藻から真核型光合成生物のプラスチドへと受け継がれたのと同様に、クロロフィル生合成を担う酵素群もラン藻から真核型光合成生物へと受け継がれた。しかし、意外なことにクロロフィル合成経路の一部の反応は、ラン藻と真核型光合成生物において、全く違う酵素が担っていることが明らかになってきた。「なぜ」違う酵素が存在するのか、という問に対しては現状では明快な答えはない。しかし、クロロフィル合成系の「酵素の」多様性は、クロロフィルの多様性が「いかに」生まれたのか、という問に対しては、ヒントを与えるかもしれない。本稿では、protoporphyrinogen IX oxidase (PPOX) と divinyl chlorophyllide reductase (DVR) の2つの酵素の多様性を通じて、クロロフィルの多様性が「いかに」生まれたのか、という点について考察を試みる。

## 2. 高等植物のクロロフィル合成

Chl *a* は、高等植物においては、glutamyl-tRNAを出発物質として、15段階の酵素反応によって合成される(図1にその前半の反応経路の概略が、図2に後半の反応経路が記載されている)。これらの酵素は2005年までにすべて同定された<sup>1)</sup>。(高等植物が持つ、もう一つのクロロフィル、Chl *b* の代謝経路は、後述するように、ようやく2012年に同定された。)さまざま

な光合成生物のゲノム情報を調べてみると、高等植物のChl *a* 合成経路の酵素は、その大半がラン藻由来であることが明らかとなった<sup>2)</sup>。しかし、予想に反して、大部分のラン藻のゲノムには、植物のPPOXとDVRの2つの酵素はコードされていないことが明らかになった<sup>1,2)</sup>。当時、ゲノム情報の公開されていた約30種類のラン藻のゲノムのうち、植物型のPPOX遺伝子のホモログを有するラン藻は、*Trichodesmium erythraeum*と*Thermosynechococcus elongatus*のみであり<sup>3)</sup>、植物型のDVRを有するラン藻は5種類の*Synechococcus*のみであった<sup>4)</sup>。これらの結果は、大部

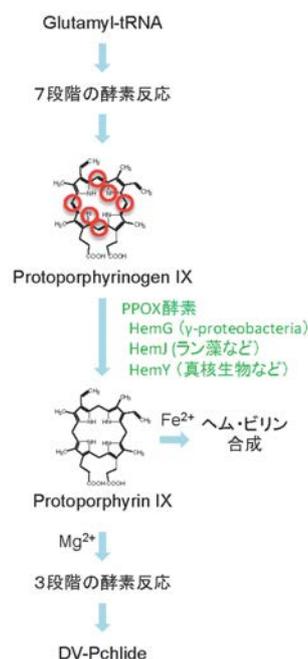


図1 クロロフィル代謝経路 (前半部分)

Protoporphyrinogen IXの酸化は、ヘム合成経路とクロロフィル合成経路に共通な反応である。HemY, HemG, HemJという3つのタイプのPPOXが同定された。Protoporphyrin IXにFe<sup>2+</sup>がキレートするとヘムが合成され、Mg<sup>2+</sup>がキレートされるとクロロフィル合成経路へと反応が進む。Protoporphyrinogen IXの酸化される部位を赤で示した。

<sup>‡</sup> 解説特集「光合成を支えるテトラピロール代謝の多様性」

\* 連絡先 E-mail: rtanaka@lowtem.hokudai.ac.jp

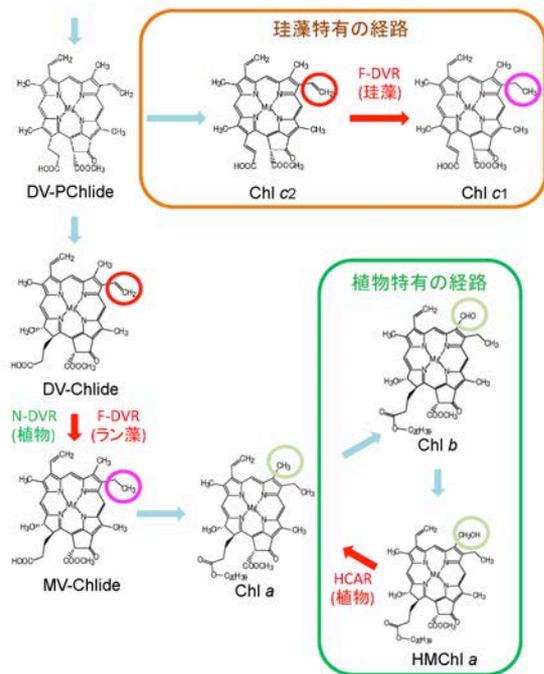


図2 Chl aの代謝経路（後半）およびChl b、Chl cの代謝経路

Mg-Protoporphyrin IX monomethylester以降、Chl a、Chl bおよびChl cの代謝経路の概略図を示した。Chl aおよびChl bの相互転換の経路（緑色の枠内）は、緑色植物に存在すると考えられる。Chl cの代謝経路は珪藻や褐藻などに存在するが、図に茶色の枠で示した、F-DVRによって触媒される経路は、珪藻のみに存在すると考えられる（本文参照）。

分のラン藻が植物型とは異なるPPOXやDVRを有することを示唆している。もし、この仮説が正しければ、大部分のラン藻はどのようなPPOXやDVRを有しているのだろうか？これらの酵素は、なぜ植物に受け継がれなかったのだろうか？これらの疑問に答えるとともに、ラン藻のテトラピロール代謝への理解を深めるために、われわれは、ラン藻のPPOXとDVRの酵素の同定を目指した。

### 3. 新しいスクリーニングのストラテジーで、ラン藻 PPOX 酵素を同定する

我々がラン藻のPPOX酵素の同定を目指して研究を始める前に、2種類のPPOX酵素が別の生物で同定されていた。1つは*hemY*遺伝子にコードされる55 kD前後のフラビン結合タンパク質で<sup>5)</sup>、phytoene desaturase などと同じFADを結合するタンパク質のsuperfamilyに属する<sup>1,6)</sup>。植物、緑藻、枯草菌などがこのタイプのPPOXを持つことが知られていた。この酵素は、特に農業としてよく使われているacifluorfenなどの標的化

合物であることで有名である。もう一つは、*hemG*遺伝子にコードされる20 kD程度のタンパク質で、やはりフラビン結合タンパク質であり、Flavodoxinと構造上の類似性が見られる<sup>1,2,7)</sup>。このタイプのPPOX酵素は、主に大腸菌などγ-proteobacteriaに見られる。

我々は当初、大腸菌*hemG*欠損株の機能的相補による、ラン藻PPOX遺伝子のスクリーニングを行ったが、一年近い試行錯誤にも関わらず、大腸菌*hemG*欠損株を相補するラン藻ゲノムDNAクローンは得られなかった。そこで、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 (*Synechocystis*)を用いた遺伝学的手法によってラン藻 P P O X 遺伝子を同定しようと方針を変更した。

*Synechocystis*は複数コピーのゲノムを持っているが、トランスポゾンを用いたin vitroで導入したゲノム断片を用いて、組換えを起こさせることによって、ランダムに遺伝子を破壊することができる。しかし、単純にPPOX遺伝子を破壊してしまうとその株はヘムやクロフィルを合成できずに死滅してしまうと予想された。そこで、我々はランダムな遺伝子破壊に先立って、シロイヌナズナの*hemY*遺伝子を*Synechocystis*のゲノムに導入し、PPOX遺伝子の破壊にも耐えられる（と予想された）株を作成した。その上で、シロイヌナズナのPPOX酵素の阻害剤であるacifluorfenを培地に混ぜ、ランダムな遺伝子破壊を行った*Synechocystis*の変異体プールをスクリーニングした。PPOX遺伝子以外の必須遺伝子が破壊された株は、acifluorfenの有無に関わらず死滅し、必須でない遺伝子が破壊された株は、acifluorfenの有無に関わらず生育すると予想された。そして、ラン藻本来のPPOX遺伝子が破壊された株は、acifluorfenの存在下では死滅し、acifluorfenがなければ、(シロイヌナズナの*hemY*遺伝子のおかげで) 無事に生育できると予想された。果たして、6,686株の変異株をスクリーニングしたところ、acifluorfenに感受性を示す7株を単離することができた。これらの株はすべて *slr1790* 遺伝子の21 bp 上流にトランスポゾンタグが挿入されていた。*slr1790* 遺伝子は機能未知の24 kDの5回膜貫通タンパク質をコードしていた<sup>1-3)</sup>。

我々は*slr1790*遺伝子がPPOXをコードしていると考え、野生型の*Synechocystis*でカナマイシン耐性遺伝子カセットにより、*slr1790*遺伝子の破壊を試みた。しかし、この遺伝子はラン藻にとって必須であるようで、完全に*slr1790*遺伝子が破壊された株を分離することはできなかった。複数コピーのゲノムのうち、一

部のコピーで *slr1790* 遺伝子が破壊された株は、protoporphyrin IX の異常な蓄積が観察された（細胞中では protoporphyrinogen IX が蓄積していたが、色素の抽出時に空気中の酸素で酸化され、protoporphyrin IX として検出されたと考えられる。）この結果は、*slr1790* 遺伝子が PPOX の反応に関わっていることを示す。そこで、我々は、*slr1790* 遺伝子を *hemJ* 遺伝子と命名した<sup>1-3</sup>。しかし、*hemJ* 遺伝子がコードするタンパク質が単独で PPOX として機能しうるので、それとも、PPOX に必須なコンポーネントの一部であるのかはこの時点では明らかではなかった。

そこで、我々は、*in vitro* での *hemJ* 遺伝子産物の PPOX 活性を調べようと試みた。しかし、いくつかの発現系を用いた試みはタンパク質発現がうまくいかなかったり、あるいは、活性を検出できなかったり、すべて失敗に終わったため、我々は、次に紅色硫黄細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の *hemJ* 遺伝子ホモログの組換えタンパク質を大腸菌で発現しようと試みた。*hemJ* 遺伝子ホモログの発現は成功し、我々は精製した *R. sphaeroides* の HemJ タンパク質が PPOX 活性を持つことを示すことができた。HemJ タンパク質はアッセイ系に電子受容体を加えなくても、活性を示したことから、我々は、HemJ タンパク質が酸素を電子受容体とするのではないかと考えているが、この点に関しては、今後のさらなる研究が必要である。

#### 4. *hemJ* 遺伝子の分布

*hemJ* 遺伝子ホモログのラン藻のゲノムにおける分布を調べてみたところ、興味深い事実が明らかとなった<sup>3,5</sup>。現在、Microbial Genome Database に登録されている 40 種類のラン藻ゲノムのうち、*Gloeobacter violaceus* PCC 7421 のみ *hemJ* と *hemY* の 2 種類のホモログを持つが、他の 39 種類は、*hemJ*, *hemY*, *hemG* のうち、いずれか一つのみを持つことがわかった。*hemJ* ホモログを持つものが、34 種類、*hemY* ホモログを持つものが 5 種類、*hemG* ホモログを持つものが 2 種類存在する。*hemJ*, *hemY*, *hemG* のいずれも持たないラン藻は存在しなかった。この結果は、HemJ, HemY, HemG が同じ酵素活性を有し、これらのうち一つが存在すれば、テトラピロール合成には十分である、ということを示唆しているように思われる。また、ラン藻のゲノム上で、*hemY* ホモログ、*hemG* ホモログと排他的に分布している遺伝子は、*hemJ* のみであった。この

結果もやはり、HemJ が HemY, HemG と重複する機能を有することを示唆している。

さらに、バクテリアゲノムにおける *hemJ* 遺伝子の分布を調べてみると、 $\alpha$ -proteobacteria,  $\epsilon$ -proteobacteria, bacteroidetes などの門においても、*hemJ* ホモログが見つかった<sup>3,4</sup>。特に、bacteroidetes においては、ラン藻と同様に *hemJ*, *hemY*, *hemG* ホモログとの排他的な分布が見られた<sup>3,4</sup>。しかしながら、bacteroidetes では、さらに *hemJ*, *hemY*, *hemG* のいずれのホモログ遺伝子も持たない生物種が見つかった<sup>3,4</sup>。Bacteroidetes では、未同定の第 4 のタイプの PPOX が存在すると考えられる。

#### 5. なぜ 3 種類以上の異なるタイプの PPOX が存在するのか

HemJ, HemY, HemG という異なるタイプの PPOX が存在する理由は明らかではない。一つの仮説は、最も古いタイプの PPOX は嫌気的な酵素であり、好気的な環境には適していなかったが、ラン藻の出現によって地球上の酸素濃度が上昇することによって、新しいタイプの PPOX、すなわち、HemJ, HemY, HemG が同時発生的に出現した、とする考えである。(HemJ, HemY, HemG は好気的な環境でも、微好気環境でも機能すると考えられる<sup>3,7,8</sup>)。HemJ, HemY は酸素を電子受容体とすると考えられるので、絶対的嫌気環境では機能できないと予想される<sup>3,5</sup>。) この仮説によれば、遺伝子の水平移動によって *hemJ*, *hemY*, *hemG* はその後バクテリア界に広まった、と考えられる。この仮説の問題点は、ラン藻の大半は、*hemJ* 遺伝子 (ホモログ) を有する、ということである。この事実は、ラン藻が多様化する以前に *hemJ* 遺伝子が出現したことを示唆しており、地球上の酸素濃度が上昇した結果、新しいタイプの PPOX が出現したとする仮説と矛盾するように見える。しかしながら、現存するラン藻が地球上の酸素濃度上昇のあとで多様化した種である可能性も考えられるので、上記の仮説は十分に検討に値すると思われる。この仮説を検討するためには、想定されている古いタイプの PPOX を同定し、このタイプの PPOX が生物界にどのように分布しているのか、を調べる必要がある。なお、上記の 40 種類のシアノバクテリアのうちで、最も古いと考えられている *G. violaceus* が *hemJ*, *hemY* ホモログを持つことか

ら、ラン藻にはもともと2種類のPPOX遺伝子が存在したと考えることもできるが、そう考えると、なぜ、*G. violaceus* 以外のラン藻には2種類のPPOX遺伝子が受け継がれなかったのか、疑問が残る。筆者らは、今のところ、*G. violaceus* が遺伝子の水平移動によって、比較的新しい時代に*hemY*ホモログを獲得したのではないかと考えている。

### 6. ラン藻の3,8-divinyl chlorophyllide a 8-vinyl reductase (DVR) の同定

クロロフィルの合成過程において、3位と8位のビニル基を持つ中間体 (3,8-divinyl chlorophyllide) の8位のビニル基がエチル基に還元される (3-vinyl 8-ethyl chlorophyllide、図2)。前者がビニル基を2つ持ち、後者がビニル基を1つ持つことから、前者がdivinyl (DV)-chlorophyllide、後者がmonovinyl (MV)-chlorophyllideと呼ばれている。3,8-divinyl chlorophyllide a 8-vinyl reductase (DVR) がDV-chlorophyllideをMV-chlorophyllideに還元する。冒頭にあげたすべてのクロロフィルにおいて、8位は必ずエチル基なので、クロロフィルを合成する生物はすべてDVR活性を持つと考えられる。しかしその遺伝子は高等植物のクロロフィル合成系の遺伝子の中では同定されたのが最も遅く、2005年にシロイヌナズナの変異体を利用して報告された<sup>1)</sup>。ところがシロイヌナズナのDVRと相同な遺伝子が多くのラン藻には存在しなかった。ラン藻もChl aを持つため、当然DVRを持つはずである。このことからラン藻にはシロイヌナズナのDVRとは相同性のない新規なDVRが存在すると予想された。

そこで、ゲノム情報を利用することによりラン藻特有のDVRの探索を行った。ラン藻はゲノムサイズが小さく、全ゲノム配列の読まれている種が多い。クロロフィルを光合成色素として利用するほとんどすべての光合成生物はモノビニル型のクロロフィルを利用して、ラン藻の中には例外的にジビニル型のクロロフィルを持つ*Prochlorococcus*と呼ばれるラン藻が存在する。*Prochlorococcus*は貧栄養な外洋では主要な光合成生物であり、地球上での二酸化炭素の固定への寄与も大きいことから、そのゲノムが精力的に調べられている。*Prochlorococcus*はDV-ChlをMV-Chlに還元できないため、そのゲノム上にはDVRが存在しないはずである。全ゲノム配列が読まれている通常のラン藻

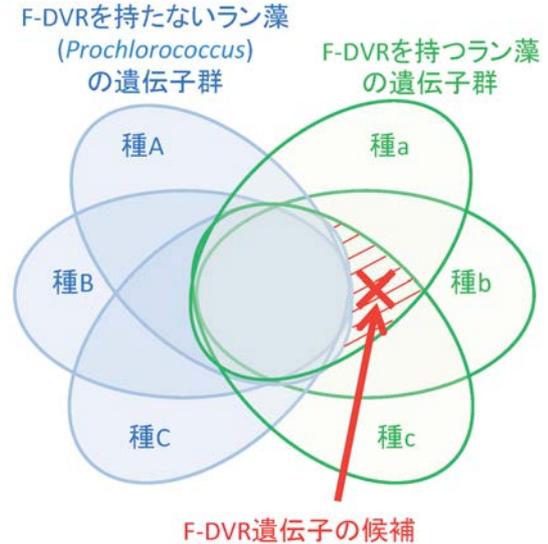


図3 ゲノムの比較による遺伝子の選抜

ラン藻のゲノム比較によるF-DVR遺伝子の選抜のストラテジーの概念をベン図で表した。ラン藻DVRを同定するために、ゲノム配列が解読されている20種類のラン藻の遺伝子(群)について、遺伝子の配列同士の総当たりのBLAST検索を行い、ホモログの有無によって、一つずつの遺伝子を分類した。F-DVRを持たないと予想されるラン藻*Prochlorococcus* (種A, B, Cと表記)のゲノムに存在せず、かつ、F-DVRを持つと予想されるラン藻 (種a, b, cと表記)のゲノムに存在する遺伝子群は図のXの集合で表記される。実際の選抜の際には、この図のように単に遺伝子群を分類するだけでなく、BLAST検索の際の期待値 (E-value)をもとに、予想される分布パターンにどれだけ近いかを(実際のパターンと予想されるパターンの)相関係数によって、比較した<sup>4)</sup>。

20種類と、全ゲノム配列が読まれている11種類の*Prochlorococcus*の遺伝子を比較し、通常のラン藻、つまりジビニル型のクロロフィルをモノビニル型のクロロフィルに還元できるラン藻にだけ共通して含まれる遺伝子の集合の中にラン藻特有のDVRが存在すると予測した (図3)。その結果、その遺伝子の集合に存在する遺伝子として、モデル型のラン藻である*Synechocystis*において*slr1923*と呼ばれる遺伝子が候補として挙げられた。*slr1923*はF-420 reducing hydrogenaseと相同な遺伝子として登録されていた。そこでこの遺伝子の破壊株を作製したところ、DV-Chlが蓄積したことから*Slr1923*がラン藻特有のDVRであると推測され<sup>4)</sup>、組換えタンパク質がDV-ChlをMV-Chlに還元できたことから (未発表)、この遺伝子がラン藻特有のDVRであることが示された。

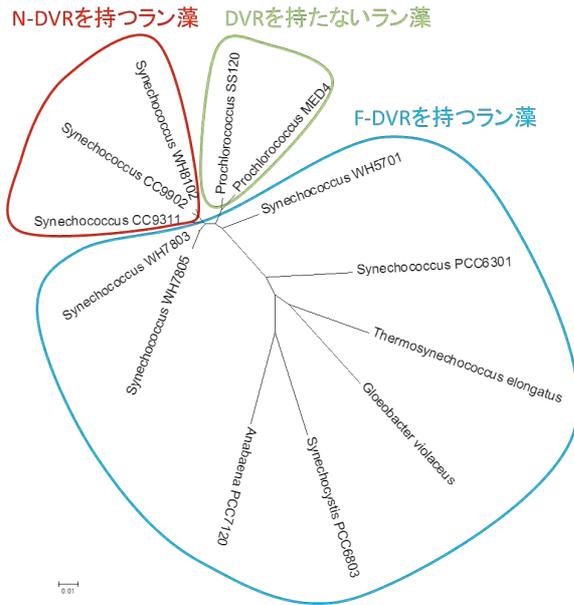


図4 ラン藻における二種類のDVRの分布  
16S rRNAによりラン藻の系統樹を作製した。*Gloeobacter*が最も古いラン藻であると考えられている。ラン藻はDVRにより、F-DVRを持つもの、N-DVRを持つもの、DVRを持たないものの三つに分類できる。N-DVRを持つものは系統的には遅く出現したものであることがわかる。また *Prochlorococcus* はN-DVRではなくF-DVRを失って出現したと考えられる。

### 7. DVRの多様性

シロイヌナズナのDVRがNADPHを還元剤として利用していたのに対し<sup>1)</sup>、*Synechocystis*のDVRはフェレドキシンを還元剤として利用することが示された(未発表)。そこで、シロイヌナズナのDVRを還元剤のNADPHに基づいてN-DVR、*Synechocystis*のDVRをフェレドキシンに基づいてF-DVRと呼ぶこととする。F-DVRはN-DVRとは全くアミノ酸配列の相同性がなく、F-DVRはフラビンのFADが結合し、鉄硫黄センターを持つと予測される点もN-DVRと異なる。

多くのラン藻はF-DVRを持つが、一部の海洋性ラン藻 *Synechococcus* はN-DVRを持つ。それらの中の一つ *Synechococcus* WH8102のN-DVRの組換えタンパク質を調べたところ、確かにDVR活性が検出された(未発表)。よって、ラン藻の中には二種類のDVRが存在することになる。なお、これまで全ゲノムが解読されたラン藻の中にはF-DVRとN-DVRの両方を持つものではなく、逆に *Prochlorococcus* 以外は必ずどちらか一方を持つ。ラン藻の系統樹の上では、N-DVRを持つラン藻は最近進化してきたと考えられる<sup>8)</sup>(図4)。これらのラン藻が出現したときには、海洋中に

はN-DVRを持つ緑藻類が存在していたと考えられることから、それらのN-DVRを取り込んだものと予測される。F-DVRに対してN-DVRの方が構造が単純であり、還元剤として安定なNADPHを使うという点だけから判断すると、N-DVRの方が酵素として優れていると考えられる。

### 8. 7-hydroxymethyl chlorophyll a 還元酵素(HCAR)の同定

ラン藻のF-DVRが同定されたときに、シロイヌナズナのゲノム上に相同な遺伝子(AT1G04620)が存在することがわかった。シロイヌナズナN-DVR破壊株はMV-Chlを合成できないことから、N-DVRがシロイヌナズナのDVR反応を担っていると考えられており、シロイヌナズナのF-DVRホモログの機能は不明であった。そこでF-DVRホモログの破壊株のクロロフィルを調べたところ、7-hydroxymethyl Chl a (HM-Chl a)が蓄積していた。HM-Chl aとはChl bがChl aに変換されるときの中間体であり、Chl bの7位のフォルミル基がヒドロキシメチル基に還元されることによって合成される。Chl bは分解されるときにChl aに変換される必要があり、また光環境適応においてはChl bがChl aに変換されて光化学系の集光装置の大きさを調節していると考えられている。このようにChl bからChl aへの変換系は植物の生存に重要な役割を果たしていると考えられている。Chl bはChl b還元酵素によりHM-Chl aに還元され、さらにHM-Chl a還元酵素(HCAR)によりChl aに還元される。HCARは単離プラスチドを用いた生化学的な実験からその存在が知られていたが<sup>9)</sup>、その遺伝子は同定されていなかった。F-DVRホモログの破壊株がHM-Chl aを蓄積したことから、F-DVRホモログがHCARの遺伝子であると予測しその組換えタンパク質を作製し酵素活性を測定した。その結果HM-Chl aがChl aに還元され、AT1G04620がHCARであることが示された<sup>10)</sup>。HCARもラン藻のF-DVRと同じくフラビンを持ち、フェレドキシンを還元剤として使用する。

DVRはビニル基をエチル基に還元し、HCARはヒドロキシメチル基をメチル基に還元する。F-DVRとHCARはアミノ酸配列の相同性が高いにもかかわらず、なぜ、この2つの酵素の行う反応は異なるのだろうか。F-DVRとHCARの詳細な反応機構が明らかになると新規な知見が得られると期待される。なお、

*Synechocystis*のF-DVRの組換えタンパク質はDVR活性だけでなくHCAR活性も持つが、シロイヌナズナのHCARの組換えタンパク質にはDVR活性は検出されていない(未発表)。

### 9. DVRからHCARへの進化

大部分のラン藻はクロロフィルとしては Chl *a* しか持たないため、Chl *b*の分解物であるHM-Chl *a*をChl *a*に還元する反応は必要ない。進化の過程で、一部のラン藻がChl *b*を利用するようになり、Chl *b*を分解しなければならなくなった時、F-DVRをHCARとして使いまわし、DVRとしては新たにN-DVRを獲得したのではないだろうか。(このように2種類のDVRを持つラン藻はあくまで遷移的に出現し、現存しないのではないかと考えている。) Chl *b*を持つ真核型の緑藻はすべてHCARとN-DVRを持っている。Chl *b*の分解の最初の反応はChl *b*のフォルミル基をヒドロキシメチル基に還元することである。この反応を行うChl *b*還元酵素はshort-chain dehydrogenase/reductaseドメインを持つ酵素である<sup>11)</sup>。このドメインを持つ酵素は多数存在するため、Chl *b*還元酵素を作り出すことは必ずしも困難ではなかったと考えられる。Chl *b*還元酵素ができれば、次のヒドロキシメチル基からメチル基への還元はもともと持っていたF-DVRが行うことができた。このことから、Chl *b*の分解経路を獲得することは比較的容易であったと考えられる。Chl *b*を光合成色素として使い始めたとき、光環境の変化に対応してChl *b*を分解しなければならなかったと考えられるが、Chl *b*の分解経路の獲得が比較的容易であったことはChl *b*を光合成色素として使う点においても有利であったと考えられる。また、現在Chl *b*の分解経路を持たない緑藻が見つかっていない理由も、Chl *b*の分解経路の獲得が容易であり、Chl *b*合成能の獲得後速やかにその分解能も獲得したためであると推測できる。

### 10. 珪藻のF-DVRと相同な遺伝子

珪藻は、紅藻が真核生物に共生して誕生したと考えられている<sup>12)</sup>(図5)。Chl *b*は持たないが、Chl *a*とともに補助色素としてChl *c*を持つ。Chl *c*は17-18位が還元されずに二重結合のままであること、および17位にフィチル基がついていないことが特徴である。Chl *c*にはいくつかの種類があり、全ゲノム配列の報告され

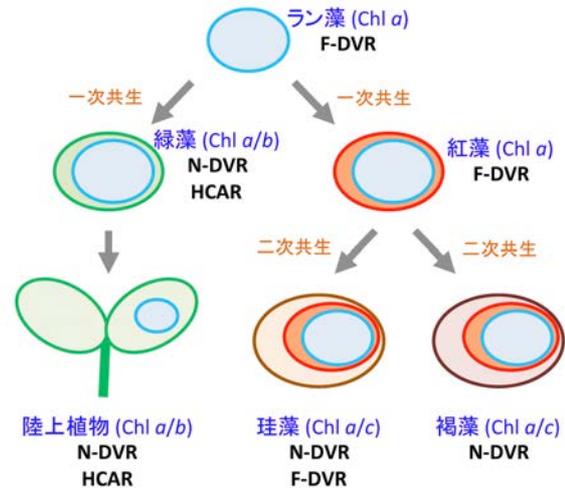


図5 ラン藻および真核光合成生物におけるDVRの分布  
生物のあとのカッコ内に、その生物がもつ代表的なクロロフィルを示した。

ている*Thalassiosira pseudonana*はChl *c*<sub>1</sub>とChl *c*<sub>2</sub>を持つ。Chl *c*<sub>1</sub>はChl *c*<sub>2</sub>の8位のビニル基がエチル基に還元されることにより合成される。この部分は通常のDVRによる反応と同じである。この珪藻のゲノム上にN-DVRとともにF-DVRと相同な遺伝子が見いだされる。珪藻のF-DVRはアミノ酸配列の系統樹を描くとラン藻のF-DVRと植物等のHCARの間にある<sup>10)</sup>。珪藻はChl *b*を持たないためヒドロキシメチル基をメチル基に還元する必要がなく、珪藻の持つF-DVRがHCARであるとは考えられない。珪藻のN-DVRがDV-Chlは還元できるがChl *c*<sub>2</sub>は還元できないこと、およびラン藻のF-DVRはChl *c*<sub>2</sub>の還元もできることが、それぞれの組換えタンパク質によって確認されている(未発表)。よって、珪藻においてはN-DVRがChl *a*の合成、F-DVRがChl *c*<sub>1</sub>の合成に利用されていると推測される。ただし、褐藻の*Ectocarpus siliculosus*など、全ゲノムが読まれているChl *c*<sub>1</sub>を持つ藻類の中にはF-DVRと相同な遺伝子が存在しないものもある。これまでのところChl *c*の合成にかかわる遺伝子については何も報告がなく、多様性に富む可能性もある。

### 11. 残された課題

ラン藻が真核生物に共生して葉緑体となり、Chl *b*を獲得したときにそれまでChl *a*の合成のために使っていたF-DVRをChl *b*の分解のために使いまわしたことが明らかとなった。また、Chl *c*を獲得したときは、その合成に使われるようになったことが推測さ

れた。どちらの場合も、もともとF-DVRが行っていた反応は新たに獲得したN-DVRが代用するようになったと考えられる。これらの結果より、クロロフィル代謝系の進化の一部が明らかになったと考えられる。

しかし、これらの結果において、以下のような課題が残されている。

#### (1) なぜ2種類のDVRが存在するのか

DVRにN-DVRとF-DVRが存在することが明らかとなったが、このような多様性のある理由が不明である。現時点ではDVRの行う反応が、クロロフィル合成の律速段階であったり、調節を受けているという報告はない。ラン藻においては、系統樹からはもともとはF-DVRを持っていたものが、後発的にN-DVRを獲得したと推測されるが、N-DVRを持つラン藻に特徴的な点は見られない。なお、F-DVRの欠損した*Synechocystis*にシロイヌナズナのN-DVRを導入したところ、F-DVRの欠損を相補した。通常の培養条件下ではN-DVR導入株は成長速度などに野生株との差異は見られていない(未発表)。

#### (2) なぜ光合成細菌のDVRは光合成関連遺伝子のクラスターに入っていないのか

光合成細菌のDVRにおいても特徴的な点が見られる。クロロフィル合成系の遺伝子の同定は、光合成細菌の研究が中心となって進められた。光合成細菌においてはクロロフィル合成系の遺伝子がクラスターを作っていることがあるため、クラスター内の遺伝子の破壊株を作製することにより合成系の遺伝子が同定できるためである<sup>13)</sup>。光合成細菌はクロロフィルではなくバクテリオクロロフィルを持つが、Chl *a*までの合成系はほとんど共通している。そのため、光合成細菌の遺伝子の情報を利用して高等植物のクロロフィル合成系の遺伝子が同定されていった。しかし光合成細菌において、DVRはバクテリオクロロフィル合成系の遺伝子のクラスターの中に存在しなかった。DVRに関しては植物が先行し、その後光合成細菌のDVRが同定された理由の一つはこの点にある<sup>14,15)</sup>。なぜDVRが他の光合成関連の遺伝子と挙動が異なるのか不明である。また、光合成細菌においてもN-DVRを持つものとF-DVRを持つものが存在する。嫌気性、好気性のような酵素の特性としての相違は見出されていない

い。このように現時点では特徴がないと考えられるDVRになぜこのような多様性があるのか謎である。

#### (3) なぜラン藻は自分の持っていない色素を代謝できるのか

ラン藻はChl *b*を持たないにもかかわらず、Chl *b*関連色素であるHM-Chl *a*を代謝できることが明らかとなった。なぜラン藻にこのような能力があるのか謎である。ラン藻のF-DVRがHCAR活性を有していたことは単なる偶然かもしれないが、緑藻や高等植物が補助色素としてChl *b*を選択する過程にF-DVRが間接的にかかわっていた可能性も考えられる。

#### (4) なぜ褐藻はF-DVRを使わないのか

珪藻のChl *c*の合成にはF-DVRと相同性のある遺伝子がかかわっていると推測される。珪藻は、紅藻が二次共生して誕生したと考えられている。紅藻はクロロフィルとしてはChl *a*しか持たない。全ゲノム配列の報告されている原始紅藻*Cyanidioschyzon*のゲノム上にはF-DVRと相同な遺伝子が存在し、N-DVRと相同な遺伝子はない。このことより、ラン藻が一時共生により紅藻になった時、F-DVRをそのまま使い続けたと考えられる。しかし、紅藻が共生して誕生したと考えられる、Chl *c*を持つ褐藻はN-DVRのみを持つ。珪藻や褐藻のN-DVRの組換えタンパク質からはChl *c*<sub>2</sub>を還元してChl *c*<sub>1</sub>を合成する活性は検出されていない。褐藻がなぜChl *c*を代謝できるF-DVRを失いN-DVRを獲得したのか不明である。

## 5. おわりに

ラン藻のPPOXとDVRの同定をきっかけとして、多様なタイプのPPOXとDVRが存在することが明らかになった。F-DVRは広い基質特異性を有し、このことが、植物のChl *b*代謝、珪藻のChl *c*合成を可能にしたと考えられる。PPOXやDVRについては、現在は、一つの生物は一つのタイプのみを持っているケースが多い。しかし、遺伝子の水平移動が非常に頻繁に起こっていることを考えると、遺伝子を交換できる生物間において、複数のタイプの酵素の存在は、一種の「酵素のレポジトリ」と言えるのではないだろうか？そして、その酵素が水平移動を通じて他の生物に移動しうることが、代謝経路の選択肢を広げ、代謝の多様化につながったのではないかと。PPOXやDVRの研究は、

クロロフィル代謝についての知見を提供するのみでなく、代謝経路の進化について新しい知見を与えてくれるのではないだろうか？

## 謝辞

本稿で紹介したラン藻の protoporphyrinogen IX oxidaseの研究は、日本曹達株式会社の保坂秀夫博士、加登一成博士との共同研究である。また、6節で解説したラン藻ゲノムの比較アルゴリズムは横野牧生博士（現神戸大学）によって開発された。

Received July 3, 2012, Accepted July 27, 2012, Published August 31, 2012

## 参考文献

1. Nagata, N., Tanaka, R., Satoh, S. and Tanaka, A. (2005) Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana* and implications for the evolution of *Prochlorococcus* species, *Plant Cell* 17, 233–240.
2. Oborník, M. and Green, B. (2005) Mosaic origin of the heme biosynthesis pathway in photosynthetic eukaryotes, *Mol. Biol. Evol.* 22, 2343–2353.
3. Kato, K., Tanaka, R., Sano, S., Tanaka, A. and Hosaka, H. (2010) Identification of a gene essential for protoporphyrinogen IX oxidase activity in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16649–16654.
4. Ito, H., Yokono, M., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2008) Identification of a novel vinyl reductase gene essential for the biosynthesis of monovinyl chlorophyll in *Synechocystis* sp. PCC6803, *J. Biol. Chem.* 283, 9002–9011.
5. Koch, M. *et al.* (2004) Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: a key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis, *EMBO J.* 23, 1720–1728.
6. Dailey, T.A. and Dailey, H.A. (1998) Identification of an FAD superfamily containing protoporphyrinogen oxidases, monoamine oxidases, and phytoene desaturase, *J. Biol. Chem.* 273, 13658–13662.
7. Boynton, T.O., Daugherty, L.E., Dailey, T.A. and Dailey, H.A. (2009) Identification of *Escherichia coli* HemG as a novel, menadione-dependent flavodoxin with protoporphyrinogen oxidase activity, *Biochemistry* 48, 6705–6711.
8. Swingle, W.D., Blankenship, R.E. and Raymond, J. (2008) Integrating markov clustering and molecular phylogenetics to reconstruct the cyanobacterial species tree from conserved protein families, *Mol. Biol. Evol.* 25, 643–654.
9. Ito, H., Ohtsuka, T. and Tanaka, A. (1996) Conversion of chlorophyll b to chlorophyll a via 7-hydroxymethyl chlorophyll, *J. Biol. Chem.* 271, 1475–1479.
10. Meguro, M., Ito, H., Takabayashi, A., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2011) Identification of the 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase of the chlorophyll cycle in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 23, 3442–3453.
11. Kusaba, M. *et al.* (2007) Rice NON-YELLOW COLORING1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence, *Plant Cell* 19, 1362–1375.
12. Falkowski, P.G. *et al.* (2004) The evolution of modern eukaryotic phytoplankton, *Science* 305, 354–360.
13. Bollivar, D., Suzuki, J., Beatty, J., Dobrowolski, J. and Bauer, C. (1994) Directed mutational analysis of bacteriochlorophyll a biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus*, *J. Mol. Biol.* 237, 622–640.
14. Chew, A. and Bryant, D. (2007) Characterization of a plant-like protochlorophyllide a divinyl reductase in green sulfur bacteria, *J. Biol. Chem.* 282, 2967–2975.
15. Liu, Z. and Bryant, D.A. (2011) Multiple types of 8-vinyl reductases for (bacterio)chlorophyll biosynthesis occur in many green sulfur bacteria, *J. Bacteriol.* 193, 4996–4998.

## How Did the Chlorophyll Biosynthetic Pathways Get Diversified?

Hisashi Ito<sup>1,2</sup>, Ayumi Tanaka<sup>1,2</sup> and Ryouichi Tanaka<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University

<sup>2</sup>Core Research for Evolutionary Science and Technology, Japan Science and Technology Agency

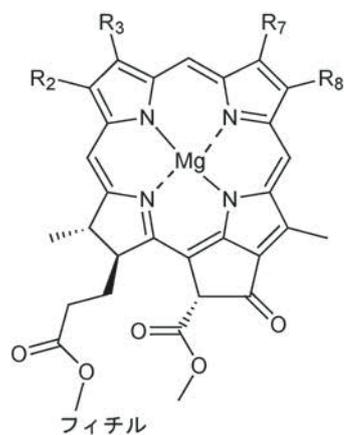
代謝工学による新たなクロロフィル分子の合成<sup>‡</sup>京都大学大学院 人間・環境学研究所  
土屋 徹<sup>¶</sup>

## 1. はじめに

クロロフィルは光合成反応において、光エネルギーの捕集および反応中心での電荷分離反応に機能する。クロロフィルは生体内でアポタンパク質と結合して存在している。ゆえに、光合成反応ではタンパク質中でのクロロフィルの性質が重要となるが、その性質は、たとえば吸収極大波長のように、溶液中のクロロフィルの性質とは大きく異なることが常である。これは、クロロフィルの周囲を取り巻く環境に違いがあるためだが、このような要因を加味しても「クロロフィル-タンパク質複合体の性質は、クロロフィルの特性に大きく依存している」と考えて良いだろう。なぜなら、タンパク質中のあるクロロフィルを別のクロロフィルに置換した場合でも、置換したクロロフィルにも同様の作用がはたらくと考えられるからである。よって、クロロフィルの構造の一部を変えて、新奇な光吸収特性を持つ多様なクロロフィルを得ることができれば、それらは生体内で光合成反応に使用できる光の波長域の拡大に貢献できると思われる。

光合成生物は、進化の過程でさまざまなクロロフィ

ルを生み出してきたと考えられている。我々が現在認識している種々のクロロフィルの名称では、シアノバクテリア、藻類および植物に含まれるクロロフィルを「クロロフィル」とし、酸素発生をおこなわない光合成細菌に含まれるクロロフィルを「バクテリオクロロフィル」としている。一方、構造による分類では、クロロフィルはB環とD環の還元の有無により大別される。クロロフィル生合成経路で最初に合成されるのは両環が還元されていないポルフィリンであるが、ポルフィリンのD環が還元されたものをクロリン（ジヒドロポルフィリン）、クロリンのB環がさらに還元されたものをバクテリオクロリン（テトラヒドロポルフィリン）とよぶ。ほとんどすべての酸素発生型光合成生物の光化学系反応中心で電荷分離反応をおこなうクロロフィル *a* はクロリン型のクロロフィルであり、光合成細菌で同様の機能を担っているバクテリオクロロフィル *a* やバクテリオクロロフィル *b* はバクテリオクロリン型のクロロフィルである。このように、基本的に酸素発生の有無により構造と性質の異なるクロロフィルが使い分けられているのだが、光合成細菌にも



	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>
クロロフィル <i>a</i>	メチル	ビニル	メチル	エチル
ジビニル-クロロフィル <i>a</i>	メチル	ビニル	メチル	ビニル
クロロフィル <i>b</i>	メチル	ビニル	ホルミル	エチル
ジビニル-クロロフィル <i>b</i>	メチル	ビニル	ホルミル	ビニル
クロロフィル <i>d</i>	メチル	ホルミル	メチル	エチル
クロロフィル <i>f</i>	ホルミル	ビニル	メチル	エチル
[7-ホルミル]-クロロフィル <i>d</i>	メチル	ホルミル	ホルミル	エチル

図1 クロリン型のクロロフィルおよび人工的に合成した新奇クロロフィルの構造

クロロフィル *a* に対して違いのある側鎖を赤い文字で示した。ポルフィリン型のクロロフィルであるクロロフィル *c* は含んでいない。

<sup>‡</sup> 解説特集「光合成を支えるテトラピロール代謝の多様性」

<sup>¶</sup> 連絡先 E-mail: tsuchiya.toru.8e@kyoto-u.ac.jp

クロリン型のクロロフィルも持つ種もいることから、クロロフィルの名称と構造については慣れないと混乱することがある。

上記のように、光合成生物全体で見れば天然に存在するクロロフィルの種類は決して少なくはない。しかし、種々のクロロフィルの生物間での分布は、限られているように見え、それは機能的な制約が原因であるのか、進化の過程での新しい遺伝子を獲得する機会の有無が原因であるのか、それともこれら2つの要因が重なったものであるのかは不明である。ある光合成生物に、本来その生物が持っていないクロロフィルを導入したらどのようなことになるのか？また、その生物が持っているクロロフィルを、他の生物が持っているクロロフィルと置換したらどうなるのか？天然には存在しないクロロフィルを生体内で合成させることは可能なのか？以上のような疑問に興味を抱くのは、筆者だけでなく、クロロフィル研究者の多くの方々もそうであろうと思う。このような動機をもとに、単離した光化学系複合体やアンテナタンパク質から色素分子を取り除いたのち、他の色素分子で置換するという実験がおこなわれてきた。それらの実験は、部品としての複合体の機能解析という目的には十分であるのかもしれない。しかし、クロロフィル組成の改変について生体内での影響を調べるためには、遺伝子組換えの力を借りる必要がある。そして、遺伝子組換えによるクロロフィル組成の改変実験の最終的な目的は、進化では得られなかった光合成生物を創り出し、光合成に利用できる光の波長域の人工的制御を可能とすることである。そこで本稿では、最近筆者らがシアノバクテリアの細胞内で天然には存在しない新たなクロロフィルを合成させることに成功した結果を紹介するとともに、代謝工学による新奇クロロフィル分子のさらなる合成に向けた今後の展望についても考察したい。

## 2. クロロフィル組成改変の試み

これまで、遺伝子組換えによりその生物が本来持たないクロロフィルを合成させた例がいくつかある。それらは、基礎研究の結果であるものも多いが、意図的にクロロフィル組成を変えようとした研究として挙げられるのは、2001年の佐藤らによるクロロフィル *b* 合成酵素遺伝子のシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以下、*Synechocystis*) への

導入であろう<sup>1)</sup>。ここで、酸素発生型光合成生物に見いだされるクロロフィルの種類と構造について概説したい。主要なクロロフィルとして、これまでに名付けられてきたのは、クロロフィル *a*、クロロフィル *b*、クロロフィル *c* およびクロロフィル *d* の4種類であった。しかし最近、新奇な天然のクロロフィルが発見され、クロロフィル *f* と名付けられた<sup>2)</sup>。これらの構造は、クロロフィル *a* の構造をもとに比較すると、側鎖の一部が置換されたものになっている (図1)。また、クロロフィル *a* やクロロフィル *b* の8位のエチル基がビニル基のままである、ジビニル-クロロフィルを持つシアノバクテリアも例外的に存在している<sup>3)</sup>。クロロフィル *b* は、クロロフィル *a* の7位のメチル基がホルミル基に変換された構造をしている。生体内ではクロロフィリド *a* オキシゲナーゼ (CAO) がクロロフィル *a* の前駆体であるクロロフィリド *a* に作用し、クロロフィリド *b* を生成することで、最終的にクロロフィル *b* が合成される<sup>4)</sup>。CAO遺伝子は、クラミドモナスのクロロフィル *b* 欠損変異体から初めて同定された<sup>5)</sup>。佐藤らは、シロイヌナズナから単離した CAO 遺伝子<sup>4)</sup>を *Synechocystis* へ導入した。得られた形質転換体は、最大約10%のクロロフィル *b* の蓄積を示した。また、蓄積したクロロフィル *b* は光化学系Iでのエネルギー移動に機能していた。同様の研究が光化学系Iを欠いた変異体についておこなわれ、エンドウのLHCIIをコードする *lhcb* 遺伝子を CAO 遺伝子と共発現した株では、クロロフィル *b* が全クロロフィルの約60%に達することが報告された<sup>6)</sup>。ただし、この形質転換体は光化学系Iを持たないため、クロロフィル含量が野生型と比較してかなり低く、光独立栄養条件で培養できないことに注意されたい。

クロロフィル *b* の合成が CAO 遺伝子という外来遺伝子の導入によって達成されるのに対して、ジビニル-クロロフィルは、クロロフィル生合成経路の中で本来8位のビニル基が酵素により還元されてエチル基に変換されるところを変換されないことで生じる。天然では、シアノバクテリアである *Prochlorococcus* にのみ存在が確認されているクロロフィルであるが、進化的には *Prochlorococcus* はもととなった海洋性の *Synechococcus* から8-ビニル還元酵素 (DVR) 遺伝子が欠失して誕生したと考えられている<sup>7)</sup>。ジビニル-クロロフィルを蓄積する変異体は、DVR 遺伝子の分子遺伝学的解析による同定の際に得られた。植物では、

表1 酸素発生型光合成生物におけるクロロフィルの分布と形質転換系の確立・酵素遺伝子の同定の有無

クロロフィル組成	生物種	形質転換系が確立された種	特異的クロロフィル合成酵素遺伝子の同定
クロロフィル <i>a</i>	シアノバクテリア・紅藻など	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (シアノバクテリア) など	---
クロロフィル <i>alb</i>	植物・緑藻・シアノバクテリア (原核緑藻)	シロイヌナズナ (植物) など クラミドモナス (緑藻) など	同定済み (CAO)
クロロフィル <i>alc</i>	珪藻・褐藻など	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (珪藻)	未同定
クロロフィル <i>ald</i>	<i>Acaryochloris</i> 属	<i>Acaryochloris marina</i> * (シアノバクテリア)	未同定
クロロフィル <i>alf</i>	<i>Halomicronema hongdechloris</i> <sup>14)</sup>	なし	未同定

クロロフィル *a* とともに存在するクロロフィルを生物種特異的クロロフィルとした。

クロロフィル *a* のみを持つ生物には、特異的クロロフィルの合成酵素遺伝子は無い。

\*筆者らにより最近開発された。

シロイヌナズナで変異体が得られDVR遺伝子が同定された<sup>7,8)</sup>。また、*Synechocystis*では植物型のDVR遺伝子は存在しなかったが、逆遺伝学的解析の結果としてジビニル-クロロフィル化した*Synechocystis*が得られた<sup>9,10)</sup>。この変異体は、*Prochlorococcus*が海洋性の*Synechococcus*からDVR遺伝子を失って誕生したという進化過程を人工的に模倣したものと思えることができ、これまでに光化学系の解析やアポタンパク質との共進化についても報告されている<sup>11,12,13)</sup>。詳細については、本特集号の伊藤らの記事を参照されたい。

### 3. 新奇なクロロフィルを合成するためには

これまでに紹介したのは、既知のクロロフィルを本来そのクロロフィルを持たない光合成生物に合成させた例であった。ここで、天然には存在しない新奇なクロロフィルをいかに生物に合成させるのかについて考えてみたい。DVR遺伝子の欠失により合成されるジビニル-クロロフィル以外の既知のクロロフィルは、クロロフィル *a* の生合成経路から分岐して合成されると考えられている。したがって、ある光合成生物がクロロフィル *a* 生合成経路の中間体あるいはクロロフィル *a* そのものに作用して修飾する新奇な酵素の遺伝子を獲得すれば、その生物にとっては、「新奇なクロロフィル」合成能を獲得したことと同義である。ゆえに、自然界では確認されていない遺伝子の組み合わせを人工的に作り出すことによって、理論的には新たなクロロフィルを創出することが可能である。ゆえに、遺伝子組換えをおこなう宿主と導入する酵素遺伝子の組み合わせについて検討したい。まず、クロロフィル組成の異なる生物ごとに、形質転換が可能な生物種が存在するのかどうかと、生物種に特異的なクロ

ロフィル合成酵素遺伝子の同定の有無を表1にまとめた。この中で、既知の合成酵素遺伝子はCAO遺伝子しかない。これまでの研究例では、クロロフィル *a* しか持たない *Synechocystis* での遺伝子組換えが多かったが、仮に未だ同定されていないクロロフィル *c*、クロロフィル *d* およびクロロフィル *f* の合成酵素遺伝子が同定されても、*Synechocystis*への導入では既知のクロロフィルがでるだけで、新奇クロロフィルの合成は見込めない。そこで、クロロフィル *a* 以外のクロロフィルもあわせ持つ宿主での遺伝子導入が必要とされる。植物や緑藻は、既にクロロフィル *b* を持っているため、実現可能な組み合わせとしては、クロロフィル *c* を持つ珪藻とCAO遺伝子の組である。しかし、CAOはプロトクロロフィリド *a* を基質にしないことが、*in vitro*の活性測定によって示されているので<sup>4)</sup>、プロトクロロフィリド *a* と同様にポルフィリンであるクロロフィル *c* には作用しないと予想される。このように、本来は存在しない組み合わせを試みる場合、利用する合成酵素の基質特異性が問題とされるが、クロリン型のクロロフィルを合成する酵素の組であれば、クロロフィル *c* 合成系との組み合わせと比較すると、問題が起きにくいのではないと思われた。残された組み合わせの中で、クロロフィル *f* については存在も含有する生物も発見されたばかりで知見が限られている<sup>14)</sup>。そこで、クロロフィル *d* とクロロフィル *b* が試すに値する組み合わせであると考えられたが、クロロフィル *d* 合成酵素遺伝子の同定、またはクロロフィル *d* を持つ生物での形質転換系を確立のどちらかが成されなければ、試みることは不可能であった。

### 4. *Acaryochloris marina*での形質転換系の開発

ここで少し話題を変えて、クロロフィル *d* について言及したい。クロロフィル *d* は、1943年に紅藻から発見されたクロロフィル<sup>15)</sup>、長らく紅藻を特徴づけるクロロフィルとされてきた。しかし、常に紅藻から検出されるわけではないなど再現性の問題から、クロロフィル調製時のアーティファクトではないかとの見方もされた。しかし、1996年に宮下らによって、クロロフィル *d* を主要なクロロフィルとして持つシアノバクテリア *Acaryochloris marina* がパラオの群体ホヤから発見されたことが報告され<sup>16)</sup>、クロロフィル *d* が自然界に存在するクロロフィルであることが確定した。さらに、2004年には村上らによって紅藻に *Acaryochloris* が付着していることも判明し<sup>17)</sup>、それまで紅藻から検出されていたクロロフィル *d* は、実は *Acaryochloris* 由来であったことが推定された。よって、現在ではクロロフィル *d* 合成能を持つことが示されている生物は、*Acaryochloris* だけである。クロロフィル *d* はクロロフィル *a* と比較して、Q<sub>y</sub>帯の極大波長が約30 nm長波長側にシフトしている。ゆえに、遠赤色光をも光合成に利用可能な *A. marina* は、最初の報告から15年あまり経った今日に至るまで、光合成研究者の興味を引く対象として、光化学系の研究を主として進められてきた。クロロフィル *d* がクロロフィル *b* やクロロフィル *c* と大きく異なる点は、光化学系反応中心のスペシャルペアのクロロフィルとして生体内でクロロフィル *a* を置換している点である<sup>18,19)</sup>。クロロフィル *a* で駆動する光化学系と比較してクロロフィル *d* をもちいる *A. marina* の光化学系は、利用する光のエネルギーが低い。そこで、光化学系IIの電子移動成分であるフェオフィチン *a* や Q<sub>A</sub> の酸化還元電位が測定されたが、*A. marina* ではそれらの電位は少し高くなっており、利用する光エネルギーが低下した分のギャップをうまく埋め合わせるように変化していた<sup>20,21)</sup>。このように、クロロフィル *d* を利用した光合成系のうち、光化学系の解析は進んだが、ゲノム配列が決定されている<sup>22)</sup> 現在に至ってもクロロフィル *d* 合成系についての理解はほとんど進んでいない。

筆者が京大に赴任した2003年当時は、紅藻に付着する *Acaryochloris* の論文が公表される前で、ゲノムプロジェクトの話が持ち上がる前でもあった。そのような状況の中で、新たな研究テーマの一つとして、クロロフィル *d* 合成酵素の探索を開始した。しかし、誰しもが考えるような手法で進めてはみたものの、長ら

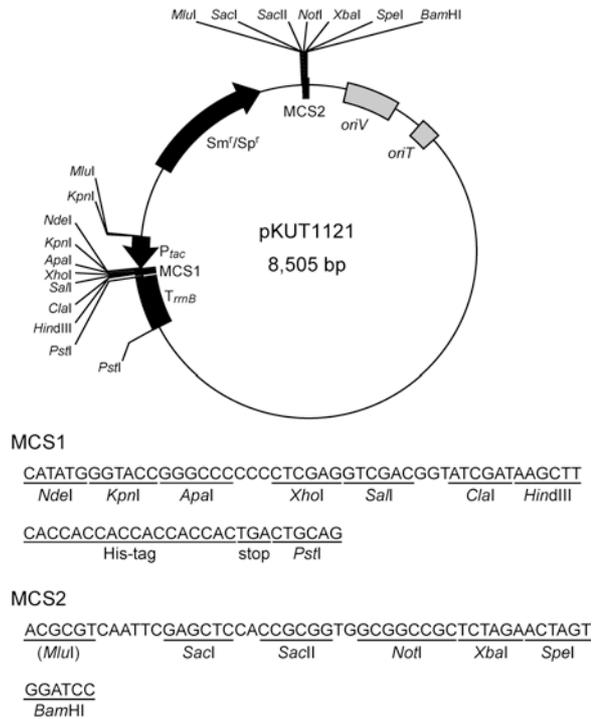


図2 発現ベクターpKUT1121のマッ

Sm<sup>r</sup>/Sp<sup>r</sup>はストレプトマイシンおよびスペクチノマイシン耐性遺伝子、oriVは複製起点、oriTは接合伝達の起点、P<sub>tac</sub>はtacプロモーター、T<sub>rrnB</sub>はrrnBターミネーターを示す。MCS1はP<sub>tac</sub>と同方向、MCS2はSm<sup>r</sup>/Sp<sup>r</sup>と同方向の配列で示した。

く全く成果が上がらなかった。そして最終的に、*A. marina*での形質転換系を開発し、順遺伝学的解析をおこなうしか解決策はないのではないかという結論に至った。筆者はもともとシアノバクテリアを取り扱った経験が無かったため、京都に来てからはゼロからの出発で、論文等を参考にしながら見よう見まねで開発を進めてきた。形質転換系を開発目的は、外来遺伝子の導入、相同組換えによる遺伝子ターゲティング、トランスポゾンタギングによる変異体の作出の3つの手法を確立することであった。本音をいえば、遺伝子破壊などをおこなう遺伝子ターゲティングの系を最初に開発したいと思うところだが、細胞内への遺伝子導入だけでなく、その後の相同組換えの効率が実験結果に反映されてしまうと考えると、条件検討には要因の少ない方法を選んだ。このような理由により、形質転換系を開発では保持型のプラスミドをもちいて抗生物質耐性を示す株を得る条件を探すことにした。

一般にバクテリア内で保持させるためのプラスミドベクターとしては、そのバクテリアが持つプラスミドの複製起点と、大腸菌の複製起点の両方を合わせ持

つシャトルベクターを作製して利用する。ゲノム配列が解明された現在では、*A. marina*に9つのプラスミドが存在し、一番小さいものでは2133 bpのプラスミドも存在することが判明しているが<sup>22)</sup>、当時はそのような情報はなかったため、汎用性の高い発現ベクターを作製することにした。そこで注目したのが広宿主域プラスミドであるRSF1010で<sup>23,24)</sup>、本プラスミドより作製されたベクターは、グラム陰性細菌で広く保持されることが報告されていた。それら宿主の中には、シアノバクテリアや光合成細菌も含まれていたため、RSF1010をもとにしたベクターであれば、光合成をおこなう原核生物全般で広く利用可能なベクターとなるであろうと考えた。これまでの報告を調べて既存のRSF1010由来のベクターを検討したが、ベクター上の抗生物質耐性遺伝子の種類に限りがあった。また、プロモーターなどが簡便に置換できるベクターを希望していたが、見いだすことができなかった。そこで、制限酵素処理により構成成分を容易に置換できるベクターを自分で作製することにした。こうして作製した発現ベクターがpKUT1121である(図2)。本ベクターは、抗生物質耐性遺伝子カセットを*Mlu*I処理で容易に置換することができるため、pKUT1121をもとに抗生物質耐性遺伝子の異なるいくつかのベクターを作製した。プロモーターも*Kpn*I処理で置換することが可能であるので、さらに、プロモーターを置換したベクターも作製した。これにより、導入する遺伝子の発現量を変えることができる。例えば、大腸菌で強発現に利用される*tac*プロモーターや*trc*プロモーターは、シアノバクテリア内でも有効にはたらくことがわかっている。また、*Synechocystis*で主要なD1タンパク質をコードしている*psbA2*のプロモーターも、*Synechocystis*以外のシアノバクテリアでの強発現に有効である。さらに、必要であれば敢えて活性がそれほど高くないプロモーターを選択することで、過剰発現による生物への悪影響を防ぐことができる。しかし、同じベクターを使用しても、導入するシアノバクテリアによってプロモーター活性は異なるので、自分の実験目的に適したプロモーターを決めるためには、実際に使用する生物での活性を検証する必要がある。プロモーターの評価は、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いれば容易におこなうことができる。

上記のように、筆者自らRSF1010より作製した

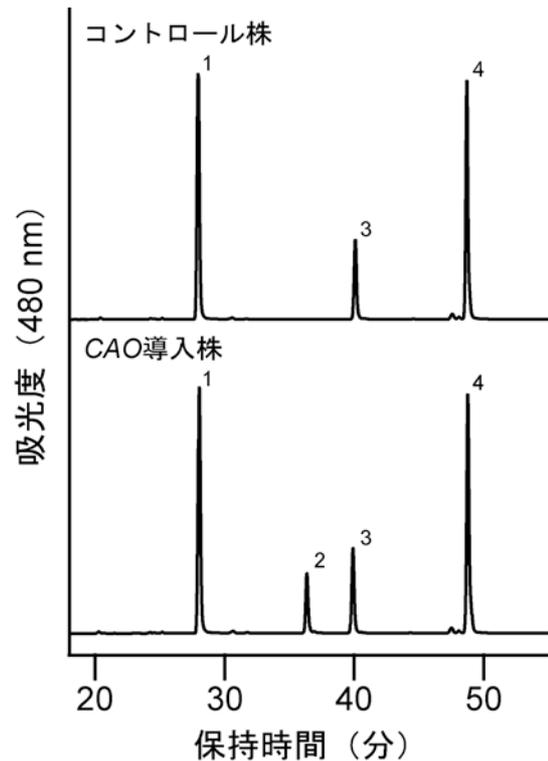


図3 CAO遺伝子を導入した*A. marina*の色素組成

CAO遺伝子を含む発現ベクターを導入した形質転換体と、コントロールとして発現ベクターを導入した形質転換体の色素組成をHPLCで分析した結果。クロマトグラムは480 nmの吸収でモニターしたもの。微量のクロロフィル *a*のピークは検出されていない。1, ゼアキサンチン; 2, 新奇色素; 3, クロロフィル *d*; 4,  $\alpha$ -カロテン。

pKUT1121を利用して形質転換系を開発することを決めたが、次に形質転換法を選択する必要があった。シアノバクテリアの形質転換法には3つの方法がある。*Synechocystis*など一部のシアノバクテリアでは、細胞と混ぜるだけでDNAが細胞内に取り込まれる「自然形質転換法」が利用されている。しかし、*A. marina*で自然形質転換が起きる保証は全くなかったため、この方法は選択しなかった。エレクトロポレーション法は、シアノバクテリアでも広く適用されているが、海洋性の *A. marina* を一時的とはいえ脱塩した状態に曝したくはなかったため、結局大腸菌をもちいた接合法<sup>25)</sup>により条件検討をおこなった。*Synechocystis*をもちいた予備実験では、接合により容易にpKUT1121を導入することができたのだが、*A. marina*で同様の実験ができるようになるにはしばらく時間がかかった。培養条件や感受性を示す抗生物質の探索など、さまざまな条件検討の結果、何とか抗生物質耐性を示すコロニーが得られる条件が確立し、得られた株を解析したところpKUT1121を保持し

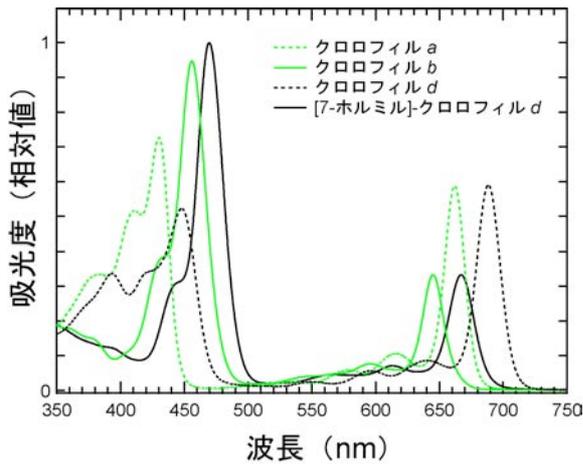


図4 クロリン型のクロロフィルおよび[7-ホルミル]-クロロフィル *d* の吸収スペクトル

精製した各クロロフィルのアセトン中での吸収スペクトル。クロロフィル *a* (緑色破線)、クロロフィル *b* (緑色実線)、クロロフィル *d* (黒色破線)、[7-ホルミル]-クロロフィル *d* (黒色実線)。

ていた<sup>26)</sup>。これでようやく、*A. marina*での形質転換系の開発に成功したという段階まで達した。

### 5. *A. marina*での新奇クロロフィルの合成

接合により *A. marina* への発現ベクターの導入が可能となったので、早速CAO遺伝子の導入を試みた。CAOまたはクロロフィル *d* 合成酵素のどちらかが厳密な基質特異性を示さなければ、両方の酵素が作用したクロロフィルが合成されるであろうと考えたからだ。導入する遺伝子には、いわゆる「原核緑藻」である *Prochlorothrix hollandica* 由来のCAO遺伝子<sup>27)</sup>を選択した。*P. hollandica* のCAOには触媒ドメインしかなく、真核生物由来のCAOに存在する葉緑体への移行ペプチドなどが存在しないためである。CAO遺伝子を導入した形質転換体を作製し、色素組成をHPLCで測定したところ、野生株やコントロール株にはない色素が蓄積していることが判明した<sup>26)</sup> (図3)。その新奇色素を精製し、吸収スペクトルを測定した結果、アセトン中の吸収スペクトルの極大値はSoret帯で470 nm、 $Q_y$ 帯で667 nmであり、既知のクロロフィルの値とは全く異なっていた (図4)。そこで、この色素の構造を決定したところ、3位と7位の両方の側鎖がホルミル基である[7-ホルミル]-クロロフィル *d* であった (図1)。この構造は、本色素がCAOとクロロフィル *d*合成酵素の双方の作用を受けて合成されたことを意味する。ここで再び吸収スペクトルを比較して

みると、[7-ホルミル]-クロロフィル *d* の吸収スペクトルはクロロフィル *b* のスペクトルと形状は似ているが、全体的に長波長側にシフトしたように見える (図4)。この違いは、クロロフィル *a* とクロロフィル *d* の吸収スペクトルの関係と類似している。以上のように、新たに合成された[7-ホルミル]-クロロフィル *d* は、構造を反映した分光学的性質を示すことが判明した。なお、[7-ホルミル]-クロロフィル *d* のSoret帯の吸収極大波長が、他のクロロフィルの極大波長よりもさらに長波長側にあることは特筆すべきことである。

遺伝子導入により、*A. marina*に新奇なクロロフィルとして[7-ホルミル]-クロロフィル *d* を合成させることに成功したので、次に[7-ホルミル]-クロロフィル *d* が光化学系に挿入されているのかどうかを調べた。CAO遺伝子導入株から光化学系II複合体を調製し、色素組成を解析したところ、コントロール株から調製した複合体の色素組成と比較して、1分子のフェオフィチン *a* あたり、約5分子のクロロフィル *d* が減った代わりに、約3分子の[7-ホルミル]-クロロフィル *d* が存在していた<sup>28)</sup>。電気泳動により、ポリペプチド組成を分析したところ、[7-ホルミル]-クロロフィル *d*の有無による差は見いだされなかった。次に、それらの低温吸収スペクトルを測定し、差スペクトルをとると、[7-ホルミル]-クロロフィル *d* 含有光化学系II複合体では、[7-ホルミル]-クロロフィル *d* に特徴的な482 nmと675 nmでの増加が見られた。さらに、低温励起スペクトル、低温蛍光スペクトルの測定により、[7-ホルミル]-クロロフィル *d* 分子からクロロフィル *d*分子へのエネルギー移動も観測された<sup>28)</sup>。しかし、時間分解蛍光スペクトルおよび蛍光減衰曲線では、差が見られなかったことから、[7-ホルミル]-クロロフィル *d* 分子は反応中心の電子移動成分のクロロフィル分子は置換していないことが推定された。以上のように、一遺伝子の導入で光合成生物が容易に新奇なクロロフィルを合成することが可能で、さらにその分子が光化学系に取り込まれてアンテナ色素として機能することが明らかとなった。クロロフィル代謝系酵素の進化を考えると、偶然新たなクロロフィルを合成する酵素の遺伝子を獲得した際に、まずは複合体中の一部の色素の置換が起き、次いでアポタンパク質のアミノ酸配列の変異というチューニングが施されるのであろうと推定される。また、光化学系タンパク質複合体の色素組

成の柔軟性はこれまでの研究でも論じられてきたが、自然界から検出されていない人工的なクロロフィル分子ですら容易に利用可能であるという事実は、我々が未だ発見していない、未知のクロロフィルを持つマイナーな生物が、地球上のどこかに存在しているもおかしくはないという考えを導く。

## 6. 今後の展望

我々の最近の研究により、自然界に存在しない(あるいは未だに見つかっていない)クロロフィルを合成するためには代謝工学的アプローチが非常に有効であることが示された。ただし、今後改善が望まれる問題も残されている。一つは、新たなクロロフィルの蓄積量を増やすことができないのかという問題である。今回の[7-ホルミル]-クロロフィル *d* は、形質転換体中で最大で10%程度しか蓄積しなかった<sup>26)</sup>。これは、*Synechocystis*で合成させたクロロフィル *b* の値と同様の値である<sup>1)</sup>。ジビニル-クロロフィル *a* を持つ *Synechocystis*の変異体では、全てのクロロフィルがジビニル化していたこととあわせて考えると、クロロフィルの分子種によってはアポタンパク質側の制約で置換に限りがあるように見える。置換対象を反応中心に存在するクロロフィルにまで広げて、さらにクロロフィル組成改変の自由度を上げるためには、今後解決すべき問題であり、アポタンパク質への変異導入といった改変が必要とされるであろう。また、新たなクロロフィルをさらに創り出すためには、未だ同定されていないクロロフィル合成酵素遺伝子の探索が必要である。すなわち、クロロフィル *c*、クロロフィル *d* およびクロロフィル *f* の合成酵素遺伝子についてである。これらのうち、クロロフィル *d* についてChenらはシトクロムP450が合成酵素であると主張しているが<sup>29)</sup>、証拠となるデータが論文として公表されていない状況であり、その真偽は今後の検証が待たれる。また、本稿では触れていないが、バクテリオクロロフィルの合成酵素遺伝子を組み合わせの候補として活用することも有効であると思われる。バクテリオクロロフィル合成に関与する酵素の中には、酸素に感受性を示す酵素も少なくないので、ハードルはより高い可能性があるが、挑戦的な試みであると考えられる。さらに、今後未知のクロロフィルを有する新たな光合成生物が発見されれば、その合成酵素遺伝子もおおいに利用価値があるだろう。加えて、利用する遺伝子

については、変異導入をおこない基質特異性や反応産物を改変するといった、工学的な手法も積極的に取り入れる必要があるだろう。今日までに、クロロフィル代謝に関わる酵素遺伝子の大半が同定され、残りの酵素遺伝子も遠からず全て同定されると予想される。その後の展開を考えると、得られた酵素遺伝子をいかに利用してゆけばよいのかといった研究が発展するのではないかと期待している。

## 7. おわりに

本稿では、光合成生物が利用できる光の波長域を人工的に制御することを目指して、代謝工学によるクロロフィル組成の改変の潜在力と可能性について、筆者なりの考えを記した。見直してみると、当たり前のようなことばかり書いてあるようにも思えるが、今後のクロロフィル代謝研究について、方向性の一つを示すことができたとすれば幸いである。

## 謝辞

本稿で紹介した研究成果の多くは、京都大学大学院人間・環境学研究科の三室守研究室でおこなわれました。また、本誌に出版の機会を与えていただいた、北海道大学低温科学研究所の田中亮一先生に深く感謝いたします。

Received July 12, 2012, Accepted August 1, 2012,  
Published August 31, 2012

## 参考文献

1. Satoh, S., Ikeuchi, M., Mimuro, M., and Tanaka, A. (2001) Chlorophyll *b* expressed in cyanobacteria functions as a light-harvesting antenna in photosystem I through flexibility of the proteins, *J. Biol. Chem.* 276, 4293-4297.
2. Chen, M., Schliep, M., Willows, R. D., Cai, Z.-L., Neilan, B. A., and Scheer, H. (2010) A red-shifted chlorophyll, *Science* 329, 1318-1319.
3. Partensky, F., Hoepffner, N., Li, W. K. W., Ulloa, O., and Vaultot, D. (1993) Photoacclimation of *Prochlorococcus* sp. (Prochlorophyta) strains isolated from the North Atlantic and the Mediterranean Sea, *Plant Physiol.* 101, 285-296.
4. Oster, U., Tanaka, R., Tanaka, A., and Rüdiger, W. (2000) Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll *b* biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana*, *Plant*

- J. 21*, 305-310.
5. Tanaka, A., Ito, H., Tanaka, R., Tanaka, N., Yoshida, K., and Okada, K. (1998) Chlorophyll *a* oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll *b* formation from chlorophyll *a*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 12719-12723.
  6. Xu, H., Vavilin, D., and Vermaas, W. (2001) Chlorophyll *b* can serve as the major pigment in functional photosystem II complexes of cyanobacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 14168-14173.
  7. Nagata, N., Tanaka, R., Satoh, S., and Tanaka, A. (2005) Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana* and implications for the evolution of Prochlorococcus species, *Plant Cell* *17*, 233-240.
  8. Nakanishi, H., Nozue, H., Suzuki, K., Kaneko, Y., Taguchi, G., and Hayashida, N. (2005) Characterization of the *Arabidopsis thaliana* mutant *pcb2* which accumulates divinyl chlorophylls, *Plant Cell Physiol.* *46*, 467-473.
  9. Islam, M. R., Aikawa, S., Midorikawa, T., Kashino, Y., Satoh, K., and Koike, H. (2008) slr1923 of *Synechocystis* sp. PCC6803 is essential for conversion of 3,8-divinyl(proto)chlorophyll(ide) to 3-monovinyl(proto)chlorophyll(ide), *Plant Physiol.* *148*, 1068-1081.
  10. Ito, H., Yokono, M., Tanaka, R., and Tanaka, A. (2008) Identification of a novel vinyl reductase gene essential for the biosynthesis of monovinyl chlorophyll in *Synechocystis* sp. PCC6803, *J. Biol. Chem.* *283*, 9002-9011.
  11. Tomo, T., Akimoto, S., Ito, H., Tsuchiya, T., Fukuya, M., Tanaka, A., and Mimuro, M. (2009) Replacement of chlorophyll with di-vinyl chlorophyll in the antenna and reaction center complexes of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Characterization of spectral and photochemical properties, *Biochim. Biophys. Acta* *1787*, 191-200.
  12. Ito, H., and Tanaka, A. (2011) Evolution of a divinyl chlorophyll-based photosystem in *Prochlorococcus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 18014-18019.
  13. Yokono, M., Tomo, T., Nagao, R., Ito, H., Tanaka, A., and Akimoto, S. (2012) Alterations in photosynthetic pigments and amino acid composition of D1 protein change energy distribution in photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta* *1817*, 754-759.
  14. Chen, M., Li, Y., Birch, D., and Willows, R. D. (2012) A cyanobacterium that contains chlorophyll *f* – a red-absorbing photopigment, *FEBS Lett.* [http:// dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.06.045](http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.06.045).
  15. Manning, W. M., and Strain, H. H. (1943) Chlorophyll *d*, a green pigment of red algae, *J. Biol. Chem.* *151*, 1-19.
  16. Miyashita, H., Adachi, K., Kurano, N., Ikemoto, H., Chihara, M., and Miyachi, S. (1996) Chlorophyll *d* as a major pigment, *Nature* *338*, 402.
  17. Murakami, A., Miyashita, H., Iseki, M., Adachi, K., and Mimuro, M. (2004) Chlorophyll *d* in an epiphytic cyanobacterium of red algae, *Science* *303*, 1633.
  18. Tomo, T., Okubo, T., Akimoto, S., Yokono, M., Miyashita, H., Tsuchiya, T., Noguchi, T., and Mimuro, M. (2007) Identification of the special pair of photosystem II in a chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 7283-7288.
  19. Tomo, T., Kato, Y., Suzuki, T., Akimoto, S., Okubo, T., Noguchi, T., Hasegawa, K., Tsuchiya, T., Tanaka, K., Fukuya, M., Dohmae, N., Watanabe, T., and Mimuro, M. (2008) Characterization of highly purified photosystem I complexes from the chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina* MBIC 11017, *J. Biol. Chem.* *283*, 18198-18209.
  20. Allakhverdiev, S. I., Tomo, T., Shimada, Y., Kindo, H., Nagao, R., Klimov, V. V., and Mimuro, M. (2010) Redox potential of pheophytin *a* in photosystem II of two cyanobacteria having the different special pair chlorophylls, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 3924-3929.
  21. Allakhverdiev, S. I., Tsuchiya, T., Watabe, K., Kojima, A., Los, D. A., Tomo, T., Klimov, V. V., and Mimuro, M. (2011) Redox potentials of primary electron acceptor quinone molecule (Q<sub>A</sub>)<sup>-</sup> and conserved energetics of photosystem II in cyanobacteria with chlorophyll *a* and chlorophyll *d*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 8054-8058.
  22. Swingle, W. D., Chen, M., Cheung, P. C., Conrad, A. L., Dejesa, L. C., Hao, J., Honchak, B. M., Karbach, L. E., Kurdoglu, A., Lahiri, S., Mastrian, S. D., Miyashita, H., Page, L., Ramakrishna, P., Satoh, S., Sattley, W. M., Shimada, Y., Taylor, H. L., Tomo, T., Tsuchiya, T., Wang, Z. T., Raymond, J., Mimuro, M., Blankenship, R. E., and Touchman, J. W. (2008) Niche adaptation and genome expansion in the chlorophyll *d*-producing cyanobacterium *Acaryochloris marina*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 2005-2010.
  23. Guerry, P., van Embden, J., and Falkow, S. (1974) Molecular nature of two nonconjugative plasmids carrying drug resistance genes, *J. Bacteriol.* *117*, 619-630.
  24. Scholz, P., Haring, V., Wittmann-Liehold, B., Ashman, K., Bagdasarian, M., and Scherzinger, E. (1989) Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010, *Gene* *75*, 271-288.
  25. Elhai, J., and Wolk, C. P. (1988) Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria, *Methods Enzymol.* *167*, 747-754.
  26. Tsuchiya, T., Mizoguchi, T., Akimoto, S., Tomo, T., Tamiaki, H., and Mimuro, M. (2012) Metabolic engineering of the chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina*: production of a novel chlorophyll species by the introduction of the chlorophyllide *a* oxygenase gene, *Plant Cell Physiol.* *53*, 518-527.

27. Nagata, N., Satoh, S., Tanaka, R., and Tanaka, A. (2004) Domain structures of chlorophyllide *a* oxygenase of green plants and *Prochlorothrix hollandica* in relation to catalytic functions, *Planta* 218, 1019-1025.
28. Tsuchiya, T., Akimoto, S., Mizoguchi, T., Watabe, K., Kindo, H., Tomo, T., Tamiaki, H., and Mimuro, M. (2012) Artificially produced [7-formyl]-chlorophyll *d* functions as an antenna pigment in the photosystem II isolated from the chlorophyllide *a* oxygenase-expressing *Acaryochloris marina*, *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 1285-1291.
29. Chen, M., and Blankenship, R. E. (2011) Expanding the solar spectrum used by photosynthesis, *Trends Plant Sci.* 16, 427-431.

## Production of Novel Chlorophyll Species by the Metabolic Engineering

Tohru Tsuchiya\*

Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University

## 植物細胞におけるヘム代謝研究の新展開<sup>‡</sup>

東京大学大学院総合文化研究科  
増田 建\*

### 1. はじめに

ヘムはポルフィリンの鉄錯体の慣用名で、ヘムタンパク質の補欠分子族として、ほとんどの生物において必須な役割を果たしている。ヘムには多くの種類が存在するが、細菌から真核生物にまで広く存在するヘムは、ヘム*a*、ヘム*b*、ヘム*c*である(図1)。特に断りがない場合、一般に「ヘム」とよぶと、生体内に存在する最も代表的なヘム*b*(プロトヘム)のことを意味し、本稿でもそのように扱う。アポタンパク質の構造、ヘムの種類、ヘムとタンパク質の結合様式によって多種類のヘムタンパク質が存在するが、機能的には、1)カタラーゼやオキシダーゼなどの酸化還元酵素、2)シトクロム*b5*や*c*などの電子伝達体、3)ヘモグロビンやミオグロビンなどの酸素運搬体の3種類に分類することができる。また、ヘム鉄に酸素や一酸化炭素、一酸化窒素などのガス性シグナルが結合したり、あるいはヘム分子そのものがタンパク質に結合・解離したりすることで、細胞内のさまざまな生理作用に機能するヘムセンサータンパク質も存在する。光

合成生物においても、ヘムは必須の役割を果たし、またピリン色素合成の基質としても使われる。本解説では、植物細胞におけるヘム代謝研究の最近の展開について、筆者らのこれまでの研究および関連する研究を交えて解説する。紙面の都合上、全てを網羅することは出来ないため、興味を持たれた読者は最近の総説などを参照して頂きたい<sup>1-5)</sup>。

### 2. 古くて新しいヘム代謝研究

ヘムは色素として知られ、赤血球のヘモグロビンや筋肉中のミオグロビンの補欠分子族として、酸素運搬の機能を担っている。実験材料として入手しやすく、また色を持つことから、生化学におけるヘム研究の歴史は古い。ヘムタンパク質であるシトクロムについては、1886年に Mac Munn 博士によりその存在が指摘され<sup>6)</sup>、1925年に Keilin 博士によってその機能が実証され、名付けられた<sup>7)</sup>。これはシトクロム(cytochrome)が色素であるヘムを結合することで、その名の通り「細胞の(cyto)色素(chrome)タンパ

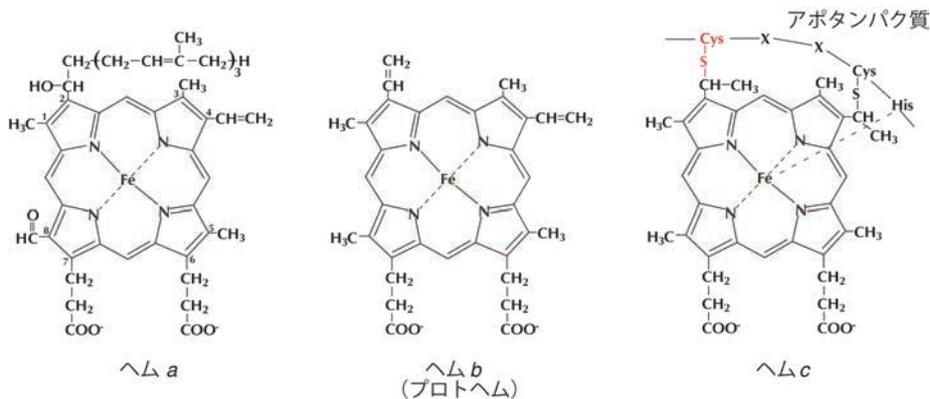


図1 代表的なヘムの構造

ヘム*a*は3位に1-ヒドロキシ-2-*trans,trans*-ファルネシルエチル基を持ち、8位にホルミル基を持つ。ヘム*b*(プロトヘム)はプロトポルフィリンIX骨格を持つ。ヘム*c*は4つのメチル基を持ち、通常2つのチオピニルエーテル基がヘムタンパク質のシステイン残基と共有結合をしている。生物種によっては、赤で示したシステイン残基は置換されており、単一の結合をしているものもある。ヒスチジン残基は中心の鉄と配位する。

<sup>‡</sup> 解説特集「植物、藻類等を利用した物質生産の新しい展開とその課題」

\* 連絡先 E-mail: ctmasuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

ク質」として容易に見つけられたこと、そしてその高い安定性による。ヘムタンパク質は生化学研究初期の中心的な研究対象となり、その後のミオグロビンの結晶化やヘモグロビンの酸素結合のアロステリック性などの解明に結びついていった。一方、近年、ヘムが動物、植物、微生物を問わず、多様な生理作用を調節する細胞内シグナルとしての機能することが明らかとなってきた。実際ヘムは、動物細胞や酵母において、転写<sup>8)</sup>、翻訳<sup>9)</sup>、翻訳後のジスルフィド結合の形成<sup>10)</sup>、翻訳後のタンパク質輸送<sup>11)</sup>の制御に関わることが報告されている。さらに近年、microRNAのプロセシング<sup>12)</sup>、概日リズム<sup>13)</sup>やイオンチャネルの制御<sup>14)</sup>など、さらに幅広い生理現象を調節することが見出された。また後述のように、光合成生物においても、ヘムが転写調節シグナルとして機能する可能性が提唱されて

いる。ヘム代謝を研究していると、言う、「今更ヘムの何を研究することがあるの?」と聞かれることがあるが、往年のスーパースターが再び表舞台にカムバックしてきた感があり、本稿で述べるように、まだまだその機能の詳細は明らかでなく、解明すべき点が多く残されている。

### 3. 植物におけるヘム合成系

植物におけるヘム合成系は、プロトポルフィリン IX (Proto IX) に至るまでは、クロロフィル合成系と共通の代謝系で合成される (図2A)。その第1段階は5-アミノレブリン酸 (ALA) の生合成であり、生合成系全体の律速段階であることが知られている。動物

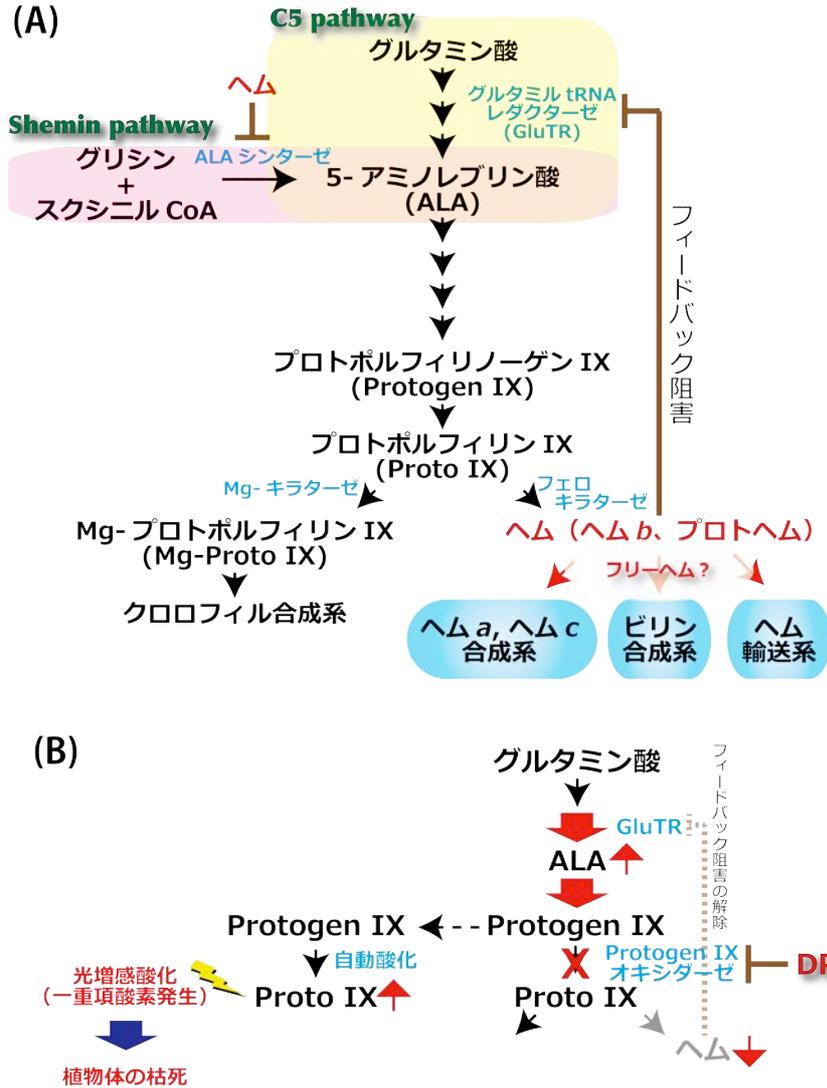


図2 ヘム生合成系の概略

(A) ヘム生合成の第1段階はALAの合成で、高等植物などではグルタミン酸を出発物質とするC5 pathway で合成される。一方、動物細胞などでは、ALAはグリシンとスクシニルCoAの縮合による1段階反応で合成される (Shemin pathway)。いずれのALA合成系も、ヘムによるフィードバック阻害を受けることが知られている。ヘム (ヘムb、プロトヘム) はフェロキアラターゼによる Proto IX への鉄の配位反応により触媒される。生成したヘムはヘムタンパク質の補欠分子族としての他、他のヘムやビリリン合成系の基質として、また多様な生理作用のために輸送されると考えられる。これら代謝の中間的な状態にあるフリーヘムの存在が想定されている。(B) DPEによる光に依存した除草機構。DPEは Proto IX オキシダーゼを阻害する。蓄積した Proto IX は代謝系から外れ、自動的な酸化を受けて Proto IX に変換される。一方、ヘム合成に使われる Proto IX の生成は阻害されるため、ヘム含量は減少し、フィードバック阻害の解除によりALA合成も活性化される。このような連鎖反応により、DPE処理により多量の Proto IX の蓄積が引き起こされる。Proto IX は光増感酸化能により、活性酸素 (一重項酸素) を発生し、植物を枯死に至らしめる。

や酵母、ある種の細菌では、ALAはALAシンターゼによるスクシニルCoAとグリシンとの縮合反応により1段階で合成される (Shemin pathway)。一方、植物やシアノバクテリア、多くの細菌では、ALAはグルタミン酸を出発物質とする3段階の酵素反応により合成される (C5 pathway)。その後、2分子のALAが縮合

して1つのピロール環を形成し、これが4つ連なってテトラピロールを形成する。さらに環状化してポルフィリン環を形成後、側鎖の修飾や環全体の共鳴系が完成し、Proto IXが生成する。ヘム（ヘム $b$ 、プロトヘム）の合成は、フェロキラーターゼにより Proto IX に  $Fe^{2+}$ が配位することで合成される。またヘムはピリン合成の基質であり、フィトクロム発色団のフィトクロモビルンやフィコビリソームのピリン色素は、ヘムオキシゲナーゼによるヘムの酸化の開裂により合成が開始される。一方、Mg-キラーターゼによりProto IXに  $Mg^{2+}$ が配位するとクロロフィル合成系へと流れる。

ヘムはALA合成系のALAシンターゼやC5 pathwayの第2番目の酵素である glutamyl-tRNA reductase (GluTR) をフィードバック阻害する代謝産物であることが知られている（図2A）。さらに酵母では、ヘムはALAシンターゼ遺伝子（*ALAS1*）の転写やmRNA安定化、翻訳、タンパク質輸送に対して、負のフィードバック制御を行なうことが知られている<sup>15)</sup>。植物細胞においては、ヘムはGluTR活性をフィードバック阻害するが、その他の制御機構の存在については明らかではない。

#### 4. ヘム代謝研究との出会い

著者は1988～90年度に神戸大学大学院農学研究科の修士課程で、光要求性除草剤の作用機作に関する研究を行っていた。ジフェニルエーテル系除草剤（DPE）はその殺草効果に光を要求することが知られており、DPEが阻害する標的酵素の同定と光に依存した殺草作用を調べるのが研究目的であった。残念ながら、フランスのMatringe博士のグループに先を越され、DPEがポルフィリン合成系のプロトポルフィリノーゲン酸化酵素を阻害することで、蓄積したプロトポルフィリノーゲンIXが自動酸化により Proto IX に変換されること、また光照射により Proto IX が活性酸素種である一重項酸素を生成して植物を枯死させることが報告された（図2B）<sup>16)</sup>。当時、著者らのグループは、DPE処理により植物細胞の膜画分にある物質が蓄積すること、この物質を含む膜画分に光を当てると膜脂質の過酸化が起こり、急激な酸素消費活性を示すことを突き止めていたが、その物質が Proto IX であることが後から確認できた<sup>17)</sup>。その後、DPE処理によりProto IXが蓄積するメカニズムを調べたところ、ALA合成が活性化していること、さらにこの活性化はヘム含量の減少によるALA合成のフィードバック阻

害の解除によることを見出した（図2B）<sup>18)</sup>。この時、ヘム定量実験に大変苦労した経験が、後述の高感度ヘム定量系の開発に結びついている。また植物が、このような危険な物質を中間体としながら、厳密な制御により大量のクロロフィルを合成している仕組みそのものに興味を持ったのが、現在の研究の第一歩である。

その後、京都大学大学院理学研究科の博士課程に進学し、ALA合成系の植物ホルモンによる制御機構に関する研究を行っていたが、分子生物学の手法を習いに行っていた生物物理学教室の井口研究室で、再び Proto IX と出会うこととなった。当時、井口研究室では光感受性の*visA*株の解析を行っており、なぜ光で大腸菌が死んでしまうのかを研究していた。井口研究室のセミナーでその話を聞いた著者は、これまでの経験からすぐに Proto IX の蓄積によるものではないかと考え、調べてみると、*visA*株において Proto IX が顕著に蓄積していた<sup>19)</sup>。そして、*visA*株では大腸菌のフェロキラーターゼ遺伝子（*hemH*）に変異を持つことが明らかとなった<sup>19)</sup>。その後、*visA*株は、サプレッサー株の単離や機能的相補により、多くのポルフィリン合成系遺伝子の同定に貢献した。また植物（キュウリとオオムギ）のフェロキラーターゼ遺伝子もこの株の機能的相補により初めて単離された<sup>20)</sup>。丁度同じ年に、酵母のフェロキラーターゼ変異体の機能的相補により、イギリス・ケンブリッジ大のSmithらのグループがシロイヌナズナのフェロキラーターゼ遺伝子のクローニングに成功した<sup>21)</sup>。さらにシロイヌナズナやキュウリにおいて、フェロキラーターゼには2つのアイソフォーム（FC1とFC2）が存在することが明らかとなった<sup>22)</sup>。興味深いことに、FC2のC末端には、FC1には認められない、LHC（Light harvesting chlorophyll *a/b* protein complex）と相同な1回膜貫通型のドメインを有していた<sup>23)</sup>。

#### 5. 植物のフェロキラーターゼの局在性解析

動物細胞のフェロキラーターゼはミトコンドリアに存在しており、肝臓のミトコンドリアにおけるフェロキラーターゼについては古くから生化学的な研究が成されてきた。一方、植物のフェロキラーターゼについては、色素体に局在する事が示されていたが、動物細胞同様にミトコンドリアにも局在する可能性が考えられていた。特にフェロキラーターゼの前段階を触媒す

る、DPEの標的酵素でもあるプロトポルフィリノーゲン酸化酵素が、ホウレンソウ<sup>24)</sup>とタバコ<sup>25)</sup>において色素体とミトコンドリアの双方に存在するとの報告が成されていたため、ミトコンドリア型のフェロキラーゼの存在が予想されていた。この問題は、光合成光化学系および呼吸鎖のヘムが、それぞれどのオルガネラから供給されるかという点で重要である。Smithらは、エンドウより単離した葉緑体およびミトコンドリアを用いて *in vitro* 輸送実験を行ない、フェロキラーゼのFC2は葉緑体のみ輸送されるが、FC1は葉緑体とミトコンドリアの双方に輸送されると報告した<sup>26)</sup>。著者らもSmithらと共同研究を行い、キュウリFC1が葉緑体とミトコンドリアの双方に輸送されることを報告した<sup>23)</sup>。しかしその後、エンドウの単離ミトコンドリアは輸送ペプチドの認識に対する特異性が低く、プラストシアニンなどの葉緑体タンパク質を*in vitro*で受容すること、そしてシロイヌナズナの単離ミトコンドリアにはFC1が輸送されないことが報告された<sup>27)</sup>。筆者らはキュウリのフェロキラーゼの局在性を解析し、GFP融合タンパク質の局在性観察および免疫学的な解析から、2つのフェロキラーゼ・アイソフォームが色素体のみ局在することを報告した<sup>28)</sup>。以上の結果から、緑色植物ではフェロキラーゼは色素体のみ存在し、ミトコンドリアを含む全てのオルガネラのヘムは、色素体から供給されると考えられている。しかし、実はこの問題は未だ完全に決着していない。未報告ながら、タバコにはミトコンドリア型フェロキラーゼが存在すると考えている研究者もいる。果たしてその解析結果がどのようなになるか、その研究成果を待っている段階である。

分子系統樹から考えると、緑色植物の2つのフェロキラーゼ・アイソフォームは明らかにシアノバクテリア由来である<sup>29)</sup>。また緑藻のクラミドモナスにはフェロキラーゼとプロトポルフィリノーゲン酸化酵素の遺伝子が1コピーずつ存在し、どちらの遺伝子産物も葉緑体のみ局在する<sup>30)</sup>。一方、紅藻シアニジウムやアピコンプレクサのフェロキラーゼは、 $\alpha$ -プロテオバクテリアを起源としており、ミトコンドリアに局在している<sup>29)</sup>。テトラピロール代謝系ではこのようなモザイク進化が良く見られるのは面白い特徴である。

### 6. ヘム定量系の開発

さて話は変わるが、ヘム代謝系を研究する上で、植物中のヘム含量を定量することは重要である。筆者は、分子遺伝学的解析が容易なシロイヌナズナを用いて、ヘム代謝を研究したいと考えていたが、微小な実験材料を用いてヘムを正確に定量することはこれまで非常に困難であった。従来、ヘムの定性・定量には、ヘムの第5、第6配位座にピリジンなどのN塩基が配位したフェロヘモクロムを生成させ、その可視光域での吸収や酸化還元差スペクトルにより行なう方法が一般的であった。しかし、この測定には相当量の実験材料が必要で、精製操作も煩雑であった。そこで、微小な実験材料からでも、簡便かつ高感度にヘムを定量する方法を開発することとした。この方法は、ThomasとWeinstein<sup>31)</sup>が行なった、ヘム抽出液と西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) のアポタンパク質を混合し、ホロHRPを自発的に再構成させ、その活性を発色法により検出するという手法を応用したもので、HRP活性をルミノールの化学発光検出により、

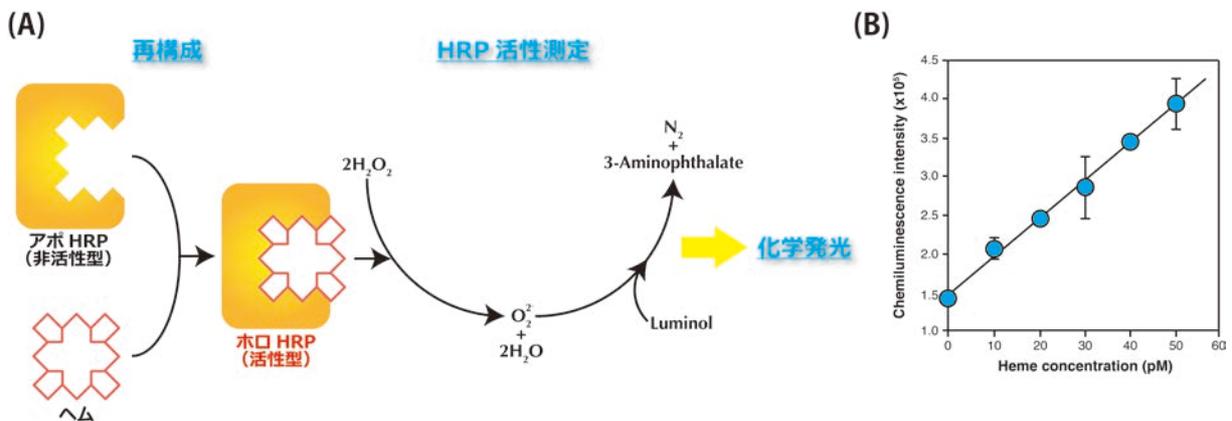


図1 HH法によるヘム定量の原理

(A) 不活性型のアポHRPをヘムと混合すると、活性型のホロHRPに自発的に再構成する。HRP活性はルミノールを用いた化学発光検出により、高感度に測定することが可能である。(B) HH法におけるヘム検量線の一例。

さらに高感度かつ簡便に測定するという方法である (図3)<sup>32)</sup>。HRP-based Heme assay (HH assay)と名付け、その至適化を行なった<sup>33)</sup>。現在では、市販の高感度なウェスタンブロット検出試薬と化学発光検出可能なマルチプレートリーダーを用いることで、検出限界は1 pM以下に達し、数mgのサンプル中に含まれるヘムを1時間程度で定量することを可能にしている (図3)。測定法の詳細については、筆者らの論文を参考にされたい<sup>5,32-34)</sup>。

近年、ヘムは植物、動物、微生物を問わず、多様な生理作用を調節することが明らかとなってきた。またヘムはマラリア診断<sup>35)</sup>や抗がん剤<sup>36)</sup>のターゲットとしても注目をあびている。おかげさまで、筆者たちが開発した HH assay は、植物分野だけでなく、様々な分野の研究者から多くの問い合わせを頂いている。今後、ヘム代謝研究の有用なツールとなってくれることを願っている段階である。

## 7. 植物細胞においてヘムやMg-Proto IXはシグナルとして機能する

植物細胞において、ヘムやクロロフィル中間体である Mg-Proto IX が葉緑体の機能状態を核に伝えるシグナル (レトログレードシグナル) として機能していることが提案されてきた。緑藻クラミドモナスにおいて、Mg-Proto IX<sup>37)</sup>およびヘム<sup>38)</sup>が HSP70A や LHC などの核遺伝子の転写制御に関わることが報告された。その後、クラミドモナスにおける、これらテトラピロールによる遺伝発現の誘導は一過的であり、主に光合成とは関係しない遺伝子の発現の誘導に関わることが示されている<sup>39)</sup>。また、紅藻シアニジオンゾンにおいて、Mg-Proto IX が葉緑体由来のシグナルとして核のDNA複製を誘導し、細胞周期を調節することが報告され<sup>40)</sup>、さらにその受容体が単離された<sup>41)</sup>。高等植物では、Choryらのグループにより、シロイヌナズナを材料として、分子遺伝学的にレトログレードシグナルに異常を来したと考えられる *genome uncoupled (gun)* 変異体が単離された<sup>42)</sup>。カロテノイド合成阻害剤であるノルフルラゾン (NF) を処理し、葉緑体の機能を欠損させると野生株では Mg-Proto IX が蓄積し、*gun*変異体ではこの蓄積が認められないことから、Mg-Proto IX がレトログレードシグナルの実体であると提案された<sup>43)</sup>。しかし近年、著者を含む複数のグループにより、Mg-Proto IXの蓄積レベルが*gun*

表現型と相関しない事が明らかにされた<sup>44,45)</sup>。昨年、Choryらのグループは、FC1の過剰発現株が*gun*表現型を示すことを報告し、葉緑体においてFC1により合成されるヘムがシグナルとして機能しているとの報告を行った<sup>46)</sup>。興味深いことにFC2はシグナル生成には関与しておらず、2つのアイソフォーム間で異なる機能を果たすことが予想された。本研究結果は非常に興味深いのが、これまでの分子遺伝学的な解析と同様、シグナルの実体を直接明らかにしたのではなく、今後も更なる研究が必要であると考えられる。

## 8. フェロキラーゼ・アイソフォームの機能解析

実際、FC1およびFC2は、その遺伝子発現様式が大きく異なっている。興味深いことに、これらの発現様式は、ALA合成系の律速段階であるGluTRのアイソフォーム (HEMA1とHEMA2) と類似していた。FC1とHEMA2は主に根や茎などの非光合成器官で発現が認められ光にตอบสนองしないのに対し、FC2とHEMA1は光合成器官で発現しており光応答性を示す<sup>23,47)</sup>。さらに、筆者らはタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド処理により、光合成器官においてFC1とHEMA2の発現が劇的に誘導されることを見出した。このことから、これらの発現は通常、リプレッサータンパク質により抑制されており、何かの条件で解除されるのではと考えた。実際、FC1とHEMA2の発現は、ウイルス感染による過敏反応や傷害、オゾン処理などのストレス条件下で顕著に誘導を受けることが明らかとなった<sup>48,49)</sup>。傷害によるFC1 mRNAレベルの誘導は一過的で、他の傷害誘導性遺伝子と似た発現プロファイルを示した。これらの中には、細胞質型アスコルビン酸ペルオキシダーゼや二次代謝に関わるシトクロムP450が含まれていたため、FC1はこれら葉緑体外のヘムタンパク質にヘムを供給している可能性が考えられた<sup>49)</sup>。

筆者らはさらにFC1とFC2の機能の違いに着目して、変異体の解析を行なった (Ninoら、論文準備中)。FC1のノックアウト変異体は致死性を示すことが報告されている<sup>46)</sup>。そこで、シロイヌナズナのFC1のノックダウン変異体 (*fc1-1*)<sup>49)</sup>とFC2のノックアウト変異体 (*fc2-1*) の解析を行なった。その結果、*fc2-1*の初期芽生えが *pale green* の表現型を示すことが分かった。この株では、ヘム含量の低下や葉緑体シ

トクロム*f*の欠損が認められた。また興味深いことに、光化学系IIのCP43およびCP47蓄積が野生株に比べ大きく減少していた。シアノバクテリアでは、CP47部位特異的の変異体におけるCP47蓄積が、*fc2*型フェロキラーゼの変異により安定化することが報告されている<sup>50</sup>。FC2のC末端に存在するLHC相同領域へのクロロフィル結合が、クロロフィル分配による光化学系IIのCP47アセンブリに関与する可能性が議論されている。このメカニズムの詳細は明らかではないが、FC2が主に葉緑体内にヘムを供給し、さらに光化学系IIのアセンブリに関与することについて、今後さらに研究を進めていきたいと考えている(図4)。

一方*fc1-1*は、見た目は野生株と変わらなかったが、ミトコンドリア・シトクロム*c*含量の低下や、ミクロソーム画分においてヘム染色されるタンパク質の低下が認められた(Ninoら、論文準備中)。以上の結果は、FC1が葉緑体外のオルガネラへヘムを供給しているという仮説と一致している。通常の生育条件下、光合成器官におけるFC1の発現レベルは非常に低い、ストレス条件下での防御機構以外に、FC1は細胞内のヘム供給においてハウスキーピングな役割を果たしている可能性が考えられる(図4)。

### 9. 植物細胞中にフリーのヘムは存在するか?

ヘムは、ヘム*a*やヘム*c*、そしてピリン合成の基質として、ヘムタンパク質の補欠分子族として、さらに細胞内シグナルとしてなど、多様な消長を辿ることから(図2A)、特定のタンパク質に結合していないフリーの状態のヘムが細胞中に存在するのではないかと考えられてきた。しかし、フリーのヘムはフェントン反応により活性酸素を生成し、細胞に毒性を与えることから、動物細胞では細胞内におけるフリーヘムのレベルは

非常に低く抑えられている(<0.1 μM)ことが知られている<sup>51</sup>。

一般にヘムを抽出するには、pHの異なるアセトン抽出法が行なわれる<sup>52</sup>。この方法では、まず、植物サンプルのホモジネートを、アンモニアを含む塩基性アセトンで抽出し、クロロフィルやカロテノイドなどの色素を取り除く。次に残渣を中性のアセトンで洗浄後、塩酸を含む酸性アセトンで残渣中のヘムを抽出するという手順で、この方法により、クロロフィルなどの吸収に邪魔されずにヘムを分光学的に測定することを可能にしている。ThomasとWeinsteinは、植物細胞中でルーズに結合したヘム(フリーヘム)が塩基性アセトン中に抽出されると考え、色素体中のフリーヘムの定量を行なった<sup>31</sup>。その結果、色素体の総ヘム量中のおよそ23~28%がフリーヘムであると見積もられた。また近年、シロイヌナズナの*gun*変異体より、塩基性アセトンにより抽出し、HH assayで定量したフリーヘムのレベルが、*gun*表現型と相関しないことが報告されている<sup>53</sup>。

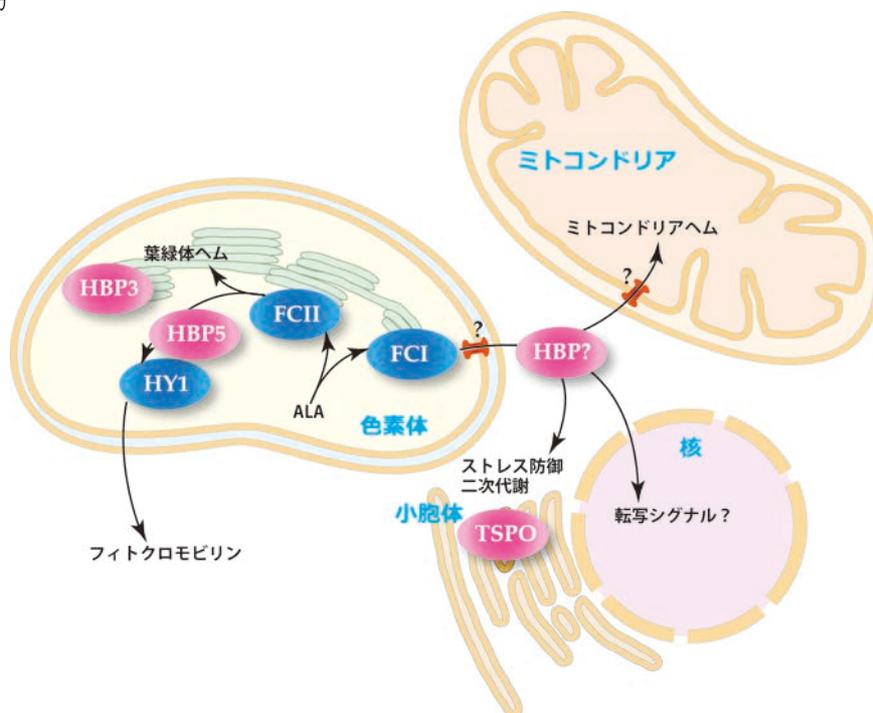


図4 想定される植物細胞でのヘム輸送系

高等植物ではヘム合成関わるフェロキラーゼは色素体に局在する。多くの植物ではフェロキラーゼには2つのアイソフォームが存在する。C末端にLHCモチーフを有するFCIIは主に色素体にヘムを供給する。また色素体内で、ヘムはHBP5を介してHY1に輸送される。一方、FCIは主に色素体外のヘム供給に機能する。ヘム輸送に関わるトランスポーターは未だ同定されていないが、HBPなどのキャリアタンパク質によりヘムは輸送されると考えられる。ヘムはミトコンドリアや核、小胞体などに輸送され、多様な生理機能を果たす。また小胞体・ゴルジ体にはヘム輸送に関わると考えられるTSPOが局在している。

筆者らは、植物細胞中のフリーヘムのレベルに興味を持ち、まず標準ヘムタンパク質を用いて、上記のアセトン抽出法によるヘム定量を行なった<sup>34)</sup>。その結果、塩基性アセトンはヘモグロビンやミオグロビンなどを溶解させることで、ヘムを抽出出来ることを見出した。一方、酸性アセトンはヘムタンパク質の溶解度に関係なく、全ての非共有結合性ヘムを定量的に抽出できた。また異なる親和性で2分子のヘムを結合することが知られているBSAとヘムの複合体を形成させ、抽出を行なった結果、塩基性アセトンはタンパク質に低い親和性で結合したヘムを抽出できることが明らかとなった。一方、中性アセトンはタンパク質結合性のヘムは全く抽出出来なかったが、非結合性のヘムを抽出出来ることが分かった。従って、中性アセトンにより抽出されるヘムが、植物細胞中のフリーヘムを示す1つの指標となると考えられた。実際、植物ホモジェネートから中性アセトンで抽出を行ない、HH assayによりヘム定量を行なうと、非常に低いレベルながらヘムを検出することができた<sup>34)</sup>。シロイヌナズナ、パセリ、ホウレンソウの葉で実験を行なったが、いずれにおいても、そのレベルは総ヘム量の約3%であった。またALA添加を行なうと総ヘム量は増加したが、中性アセトンに抽出されるフリーヘム量は変化しなかった。一方、NFを処理し、葉緑体の内部構造を破壊すると、フリーヘム量の増加が認められた。このことから、葉緑体の内部膜構造がヘムのリザーバーとして機能している可能性が考えられた。しかし、NF処理によるフリーヘム量の変化と*gun*表現型には相関が認められなかったことから、増加したフリーヘムが直接シグナルとして機能している可能性は低い。以上の結果から、ヘムがレトログレードシグナルとして機能すると仮定すれば、それらは遊離したヘムではなく、制御された輸送系で運ばれる必要があると考えられた。

## 10. ヘムを輸送するメカニズム

動物細胞や細菌におけるヘム輸送に関しては、いくつかのトランスポーターが単離され、その輸送機構が解析されている<sup>51)</sup>。その多くはABCトランスポーターであるが、植物細胞においてヘム輸送に関わるABCトランスポーターは未だ同定されていない。また、植物細胞において、色素体で合成されたヘムがどのように他のオルガネラに輸送されるかについては、

これまで殆ど知られていない。最近、植物ではTSPO (Tryptophan-rich sensory protein) がヘム輸送に関与しているとの報告が成された<sup>54)</sup>。TSPOのホモログは、哺乳類のミトコンドリア外膜に存在し、ポルフィリンなどをリガンドとすることが知られている。シロイヌナズナでは、TSPOは小胞体やゴルジ体に局在し、ヘム依存的にオートファジーによる分解を受ける(図4)。さらにアブシジン酸処理により、一過的にTSPO発現の誘導とヘム含量の上昇が起こることや、TSPO過剰発現体ではALA添加によるポルフィリン蓄積が引き起こす植物体の白化が抑制されていることから、TSPOはヘム結合を介してストレスを抑制していると提案されている<sup>54)</sup>。しかし、色素体から小胞体やゴルジ体にヘムがどのように輸送されるかについては、未だ不明である。

筆者らは、疎水性分子であるヘムの輸送にはキャリアタンパク質が必要であると考え、植物のヘム結合性タンパク質 (Heme Binding Protein: HBP) の解析を行なった。このタンパク質は、動物細胞に存在するp22HBP/SOULと相同なタンパク質で、ポルフィリン結合性を有し、その輸送に関与すると考えられている。シロイヌナズナには5つのHBPが存在し、その2つはN末端に葉緑体への transit peptide を有していた。筆者らはまず transit peptide を有しない2つのHBP (HBP1とHBP2)について生化学的解析を行なった。その結果、これらは可溶性タンパク質であり、ヘムを含むポルフィリン類と可逆的に結合出来ることを明らかにした<sup>55)</sup>。また最近、transit peptideを持ち、葉緑体型HBPと考えられるHBP3およびHBP5について検討したところ、HBP5のみがヘムに特異的に結合することが分かった<sup>56)</sup>。さらにHBP5がヘム分解に関わるヘムオキシゲナーゼ (HY1) と葉緑体内で相互作用することを、酵母ツーハイブリッド法とbimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法により明らかにした。HBP5ノックアウト変異体では*hy1*変異体に見られるフィトクロム欠損の表現型が認められないため、ヘム分解に必須ではない。しかし、メチルジャスモン酸の過剰処理により過酸化水素の生成を誘導すると、野生株に対しHBP5変異体では過酸化水素の蓄積上昇が認められた<sup>56)</sup>。このことは、ヘム代謝の効率低下が酸化ストレスと関係していることを示しているが、その詳細については今後の研究が必要である。本研究成果は植物体内におけるヘムの動態を知る上で、初めてその

実体に迫るものであり、今後HBP全体の機能を含めて、解析を進めていきたいと考えている段階である。現在までに明らかに成ってきている、植物細胞におけるヘム輸送系について図4にまとめている。

## 11. おわりに

以上、植物細胞における最近のヘム研究の展開について、筆者の研究の変遷も交えながら総括した。生化学研究初期の花形スターであったヘムは、近年、その多様な機能が再び注目を浴びるようになってきた。しかし、その細胞内の動態を含めて、未だに多くが不明のままである。今後、様々な切り口で、その実体に迫っていききたいと考えている。

## 謝辞

本稿をまとめるにあたり、協力して頂いた大学院生ならびに共同研究者に謝辞を申し上げる。また、共同研究者であり、本論文を纏める上でコメントを頂いた東京大学の小林康一先生に感謝申し上げる。最後に、本解説特集の Guest Editor を引き受けて下さり、また執筆の機会を与えて下さった、北海道大学の田中亮一先生に心から感謝申し上げる。

Received June 26, 2012, Accepted July 18, 2012, Published August 31, 2012

## 参考文献

- Mochizuki, N., Tanaka, R., Grimm, B., Masuda, T., Moulin, M., Smith, A. G., Tanaka, A., and Terry, M. J. (2010) The cell biology of tetrapyrroles: a life and death struggle, *Trends Plant Sci.* 15, 488-498.
- Masuda, T., and Fujita, Y. (2008) Regulation and evolution of chlorophyll metabolism, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1131-1149.
- Tanaka, R., Kobayashi, K., and Masuda, T. (2011) Tetrapyrrole metabolism in *Arabidopsis thaliana*, *The Arabidopsis Book* 9, e0145.
- Kobayashi, K., and Masuda, T. (2012) Tetrapyrrole Biosynthesis in Plant Systems, in *The Handbook of Porphyrin Science* (Kadish, K. M., Smith, K. M., and Guillard, R., Eds.) Vol 16-20, pp 143-212, World Scientific, Singapore.
- 高橋重一, 増田建 (2008) ヘムの分析, in 光合成研究 (「光合成研究法」編集委員会, Ed.) pp 327-337.
- Mac Munn, C. A. (1886) Researches on myohaematin and the histohaematin, *Philos. T. Roy. Soc. Lond. B* 177, 267-298.
- Keilin, D. (1925) On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants, *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 98, 312-339.
- Guarente, L., and Mason, T. (1983) Heme regulates transcription of the *CYC1* gene of *S. cerevisiae* via an upstream activation site, *Cell* 32, 1279-1286.
- Joshi, B., Morley, S. J., Rhoads, R. E., and Pain, V. M. (1995) Inhibition of protein synthesis by the heme-controlled eIF-2 alpha kinase leads to the appearance of mRNA-containing 48S complexes that contain eIF-4E but lack methionyl-tRNA(f), *Eur. J. Biochem.* 228, 31-38.
- Chen, J. J., Yang, J. M., Petryshyn, R., Kosower, N., and London, I. M. (1989) Disulfide bond formation in the regulation of eIF-2 alpha kinase by heme, *J. Biol. Chem.* 264, 9559-9564.
- Lathrop, J. T., and Timko, M. P. (1993) Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif, *Science* 259, 522-525.
- Faller, M., Matsunaga, M., Yin, S., Loo, J. A., and Guo, F. (2007) Heme is involved in microRNA processing, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 23-29.
- Yin, L., Wu, N., Curtin, J. C., Qatanani, M., Szwegold, N. R., Reid, R. A., Waitt, G. M., Parks, D. J., Pearce, K. H., Wisely, G. B., and Lazar, M. A. (2007) Reverbalpha, a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways, *Science* 318, 1786-1789.
- Wang, S., Publicover, S., and Gu, Y. (2009) An oxygen-sensitive mechanism in regulation of epithelial sodium channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2957-2962.
- Furuyama, K., Kaneko, K., and Vargas, P. D. (2007) Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis, *Tohoku J. Exp. Med.* 213, 1-16.
- Matringe, M., Camadro, J. M., Labbe, P., and Scalla, R. (1989) Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target for diphenyl ether herbicides, *Biochem. J.* 260, 231-235.
- Kouji, H., Masuda, T., and Matsunaka, S. (1988) Action mechanism of diphenyl ether herbicides: Light-dependent O<sub>2</sub> consumption in diphenyl ether-treated tobacco cell homogenate, *J. Pestic. Sci.* 13, 495-499.
- Masuda, T., Kouji, H., and Matsunaka, S. (1990) Diphenyl ether herbicide-decreased heme contents stimulate 5-aminolevulinic acid synthesis, *Pestic. Biochem. Physiol.* 36, 106-114.
- Miyamoto, K., Nishimura, K., Masuda, T., Tsuji, H., and Inokuchi, H. (1992) Accumulation of protoporphyrin IX in light-sensitive mutants of *Escherichia coli*, *FEBS Lett.* 310, 246-248.
- Miyamoto, K., Tanaka, R., Teramoto, H., Masuda, T., Tsuji, H., and Inokuchi, H. (1994) Nucleotide sequences of cDNA clones encoding ferrochelatase from barley and cucumber, *Plant Physiol.* 105, 769-770.

21. Smith, A. G., Santana, M. A., Wallace-Cook, A. D. M., Roper, J. M., and Labbe-Bois, R. (1994) Isolation of a cDNA encoding chloroplast ferrochelatase from *Arabidopsis thaliana* by functional complementation of a yeast mutant, *J. Biol. Chem.* 269, 13405-13413.
22. Chow, K. S., Singh, D. P., Walker, A. R., and Smith, A. G. (1998) Two different genes encode ferrochelatase in *Arabidopsis*: mapping, expression and subcellular targeting of the precursor proteins, *Plant J.* 15, 531-541.
23. Suzuki, T., Masuda, T., Singh, D. P., Tan, F. C., Tsuchiya, T., Shimada, H., Ohta, H., Smith, A. G., and Takamiya, K. (2002) Two types of ferrochelatase in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues of cucumber: their difference in phylogeny, gene expression, and localization, *J. Biol. Chem.* 277, 4731-4737.
24. Watanabe, N., Che, F. S., Iwano, M., Takayama, S., Yoshida, S., and Isogai, A. (2001) Dual targeting of spinach protoporphyrinogen oxidase II to mitochondria and chloroplasts by alternative use of two in-frame initiation codons, *J. Biol. Chem.* 276, 20474-20481.
25. Lermontova, I., Kruse, E., Mock, H.-P., and Grimm, B. (1997) Cloning and characterization of a plastidal and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 8895-8900.
26. Chow, K.-S., Singh, D. P., Roper, J. M., and Smith, A. G. (1997) A single precursor protein for ferrochelatase-I from *Arabidopsis* is imported *in vitro* into both chloroplasts and mitochondria, *J. Biol. Chem.* 272, 27565-27571.
27. Lister, R., Chew, O., Rudhe, C., Lee, M. N., and Whelan, J. (2001) *Arabidopsis thaliana* ferrochelatase-I and -II are not imported into *Arabidopsis* mitochondria, *FEBS Lett.* 506, 291-295.
28. Masuda, T., Suzuki, T., Shimada, H., Ohta, H., and Takamiya, K. (2003) Subcellular localization of two types of ferrochelatase in cucumber, *Planta* 217, 602-609.
29. Obornik, M., and Green, B. R. (2005) Mosaic origin of the heme biosynthesis pathway in photosynthetic eukaryotes, *Mol. Biol. Evol.* 22, 2343-2353.
30. van Lis, R., Atteia, A., Nogaj, L. A., and Beale, S. I. (2005) Subcellular localization and light-regulated expression of protoporphyrinogen IX oxidase and ferrochelatase in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* 139, 1946-1958.
31. Thomas, J., and Weinstein, J. D. (1990) Measurement of heme efflux and heme content in isolated developing chloroplasts, *Plant Physiol.* 94, 1414-1423.
32. Masuda, T., and Takahashi, S. (2006) Chemiluminescent-based method for heme determination by reconstitution with horseradish peroxidase apo-enzyme, *Anal. Biochem.* 355, 307-309.
33. Takahashi, S., and Masuda, T. (2009) High throughput heme assay by detection of chemiluminescence of reconstituted horseradish peroxidase, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 12, 532-535.
34. Espinas, N. A., Kobayashi, K., Takahashi, S., Mochizuki, N., and Masuda, T. (2012) Evaluation of unbound free heme in plant cells by differential acetone extraction, *Plant Cell Physiol.* 53, 1344-1354.
35. Ferreira, A., Balla, J., Jeney, V., Balla, G., and Soares, M. P. (2008) A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link?, *J. Mol. Med.* 86, 1097-1111.
36. Zhang, S., and Gerhard, G. S. (2009) Heme mediates cytotoxicity from artemisinin and serves as a general anti-proliferation target, *PLoS One* 4, e7472.
37. Kropat, J., Oster, U., Rüdiger, W., and Beck, C. F. (1997) Chlorophyll precursors are signals of chloroplast origin involved in light induction of nuclear heat-shock genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 14168-14172.
38. von Gromoff, E. D., Alawady, A., Meinecke, L., Grimm, B., and Beck, C. F. (2008) Heme, a plastid-derived regulator of nuclear gene expression in *Chlamydomonas*, *Plant Cell* 20, 552-567.
39. Voss, B., Meinecke, L., Kurz, T., Al-Babili, S., Beck, C. F., and Hess, W. R. (2011) Hemin and magnesium-protoporphyrin IX induce global changes in gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* 155, 892-905.
40. Kobayashi, Y., Kanesaki, Y., Tanaka, A., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., and Tanaka, K. (2009) Tetrapyrrole signal as a cell-cycle coordinator from organelle to nuclear DNA replication in plant cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 803-807.
41. Kobayashi, Y., Imamura, S., Hanaoka, M., and Tanaka, K. (2011) A tetrapyrrole-regulated ubiquitin ligase controls algal nuclear DNA replication, *Nat. Cell Biol.* 13, 483-487.
42. Susek, R. E., Ausubel, F. M., and Chory, J. (1993) Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear *CAB* and *RBCS* gene expression from chloroplast development, *Cell* 74, 787-799.
43. Strand, A., Asami, T., Alonso, J., Ecker, J. R., and Chory, J. (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX, *Nature* 421, 79-83.
44. Moulin, M., McCormac, A. C., Terry, M. J., and Smith, A. G. (2008) Tetrapyrrole profiling in *Arabidopsis* seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15178-15183.
45. Mochizuki, N., Tanaka, R., Tanaka, A., Masuda, T., and Nagatani, A. (2008) The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15184-15189.
46. Woodson, J. D., Perez-Ruiz, J. M., and Chory, J. (2011) Heme synthesis by plastid ferrochelatase I regulates

- nuclear gene expression in plants, *Cur. Biol.* 21, 897-903.
47. Tanaka, R., Yoshida, K., Nakayashiki, T., Masuda, T., Tsuji, H., Inokuchi, H., and Tanaka, A. (1996) Differential expression of two *hema* mRNAs encoding glutamyl-tRNA reductase proteins in greening cucumber seedlings, *Plant Physiol.* 110, 1223-1230.
  48. Singh, D. P., Cornah, J. E., Hadingham, S., and Smith, A. G. (2002) Expression analysis of the two ferrochelatase genes in Arabidopsis in different tissues and under stress conditions reveals their different roles in haem biosynthesis, *Plant Mol. Biol.* 50, 773-788.
  49. Nagai, S., Koide, M., Takahashi, S., Kikuta, A., Aono, M., Sasaki-Sekimoto, Y., Ohta, H., Takamiya, K., and Masuda, T. (2007) Induction of isoforms of tetrapyrrole biosynthetic enzymes, AtHEMA2 and AtFC1, under stress conditions and their physiological functions in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 144, 1039-1051.
  50. Sobotka, R., Komenda, J., Bumba, L., and Tichy, M. (2005) Photosystem II assembly in CP47 mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803 is dependent on the level of chlorophyll precursors regulated by ferrochelatase, *J. Biol. Chem.* 280, 31595-31602.
  51. Khan, A. A., and Quigley, J. G. (2011) Control of intracellular heme levels: heme transporters and heme oxygenases, *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 668-682.
  52. Stillman, L. C., and Gassman, M. L. (1978) Protoheme extraction from plant tissue, *Anal. Biochem.* 91, 166-172.
  53. Voigt, C., Oster, U., Bornke, F., Jahns, P., Dietz, K. J., Leister, D., and Kleine, T. (2009) In-depth analysis of the distinctive effects of norflurazon implies that tetrapyrrole biosynthesis, organellar gene expression and ABA cooperate in the GUN-type of plastid signalling, *Physiol. Plant.* 138, 503-519.
  54. Vanhee, C., Zapotoczny, G., Masquelier, D., Ghislain, M., and Batoko, H. (2011) The Arabidopsis multistress regulator TSPO is a heme binding membrane protein and a potential scavenger of porphyrins via an autophagy-dependent degradation mechanism, *Plant Cell* 23, 785-805.
  55. Takahashi, S., Ogawa, T., Inoue, K., and Masuda, T. (2008) Characterization of cytosolic tetrapyrrole-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1188-1195.
  56. Hye-Jung, L., Masuda, T., and Buckhout, T. (2012) Disrupting the bimolecular binding of the heme binding protein 5 (AtHBP5) to heme oxygenase 1 (HY1) leads to oxidative stress in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.*, in press

## Recent Advances in Heme Research in Plant Cells

Tatsuru Masuda\*

Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

## 高等植物のクロロフィル合成系の制御<sup>‡</sup>

東京大学 大学院 総合文化研究科

小林 康一\*

### 1. はじめに

植物の先祖となる細胞が太古の昔にシアノバクテリアと共生して以来、植物は細胞内共生体である色素体が行う光合成に依存することで大いなる発展を遂げてきた。単細胞藻類では、色素体は光合成を行う葉緑体として専ら機能し、宿主細胞の生命活動の根拠を担っている。一方、高等植物では、色素体は葉緑体だけでなく、様々な機能を持つ形態へと分化することで、多様な細胞の機能を支えている。実際、葉肉細胞では葉緑体が活発に発達する一方、根や花卉では葉緑体形成は抑制され、色素体はアミロプラストやクロモプラストなどの非光合成色素体に分化する。このように植物は高度な多細胞系へと進化する過程で、細胞や組織の役割に応じて葉緑体の分化を誘導または抑制する機構を獲得してきたと考えられる。特に、葉緑体の発達に伴い活発に合成されるクロロフィルやその前駆体は、光増感酸化作用により活性酸素を発生させ、植物に深刻な光酸化ダメージを与えることから、その合成は光合成系の構築と連動して厳密に制御されている。最近の研究から、発達段階や光環境、ストレス条件に応じて、様々な調節因子や制御機構がクロロフィルの合成をコントロールしていることが明らかとなってきた。そこで、本稿では被子植物、とくにモデル植物のシロイヌナズナで明らかになってきたクロロフィル合成の制御機構について紹介したい。

### 2. 植物におけるクロロフィル合成経路

最初に、植物のクロロフィル合成経路について、鍵となる酵素や制御段階に沿って概説したい。各ステップの詳細や酵素の特性、進化、多様性などについては、本特集の他の記事や最近の総説を参照されたい<sup>1-4)</sup>。

植物では、クロロフィル合成は色素体内で行われ

る。クロロフィルを含むテトラピロールの合成はグルタミン酸から始まり、グルタミルtRNA<sup>Glu</sup>の還元によりテトラピロール代謝に独自の合成経路へと入る(図1)。この反応はHEMA遺伝子にコードされるグルタミルtRNA還元酵素(GluTR)によって触媒され、テトラピロール合成全体を調節する律速段階となっている。シロイヌナズナの場合、GluTRの3つのアイソフォームが存在することが知られており、そのうち、HEMAI遺伝子がコードするGluTR1がクロロフィル合成に主要な役割を果たす。さらにアミノ基の転移を経て、5-アミノレブリン酸(ALA)が合成される。その後、2分子のALAが縮合しピロール環を形成した後、さらにそれが4分子縮合し閉環することで、最初のテトラピロールであるウロポルフィリノーゲンIIIが合成される。シロヘムはウロポルフィリノーゲンIIIから分岐する経路により合成される。ウロポルフィリノーゲンIIIは脱水酵素(ALAD)による反応の後、脱炭酸を含む2段階の酸化反応を受け、プロトポルフィリンIX(Proto IX)へと変換される。Proto IXはクロロフィルとヘム合成の共通の基質であり、Fe<sup>2+</sup>が配位するとヘム(ヘムb)が作られる一方、Mg<sup>2+</sup>が配位するとMg-Proto IXが合成され、その後クロロフィル合成経路へと進む。Fe<sup>2+</sup>の配位はシングルペプチドのフェロキラーゼ(FeCh)により触媒されるのに対し、Mg<sup>2+</sup>の配位は3つのサブユニット(CHLD、CHLH、CHLI)から構成されるMg-キラーゼ(MgCh)によって触媒される。また、葉緑体タンパク質であるGUN4が、このMgChの酵素活性に必要なことが分かっている。Mg-Proto IXはメチル化を受けた後、Mg-Proto IX monomethylester cyclase(MgCY)に触媒される反応によって5番目の環状構造が形成され、プロトクロロフィリドへと変換される。CHL27は、MgCYの膜結合型サブユニットをコードする。そ

<sup>‡</sup> 解説特集「光合成を支えるテトラピロール代謝の多様性」

\* 連絡先 E-mail: kkobayashi@bio.c.u-tokyo.ac.jp

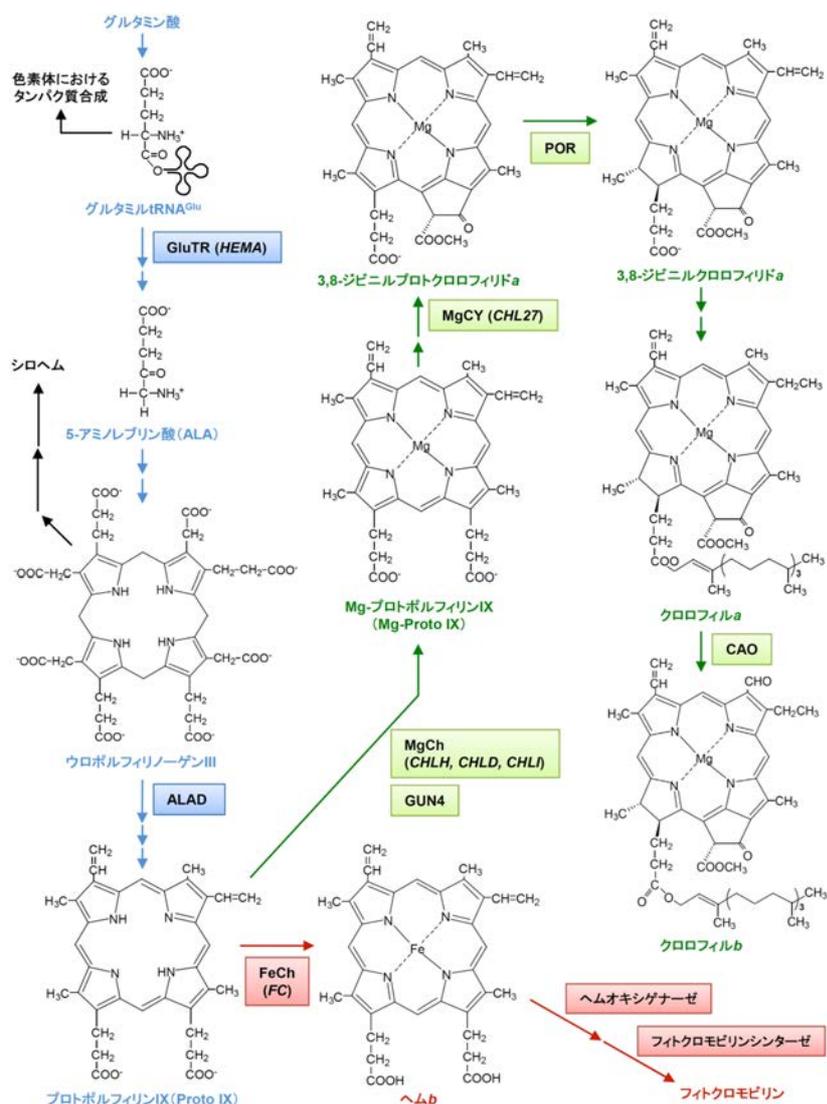


図1 高等植物におけるクロロフィル合成経路

青字と青矢印は、テトラピロール合成に共通する経路、赤字と赤矢印はヘム合成・分解経路、緑字と緑矢印はクロロフィル合成経路を示す。制御上重要なステップには、反応を触媒する酵素名（括弧内は酵素名と異なる場合の遺伝子名）を記した。

の後、プロトクロロフィリドはプロトクロロフィリド還元酵素 (POR) によってクロロフィリドaとなる。PORには、酵素反応に光を必要とするLPORと、必要としないDPORの二種の異なった酵素が知られている。シアノバクテリアを含め、藻類から裸子植物まではLPORとDPORを両方保持しており、その多くが暗所でクロロフィルを合成できるのに対し、被子植物はDPORを進化の過程で失ったため、暗所ではプロトクロロフィリドから先の合成は起らない。クロロフィリドaの合成後は、フィトール鎖が付加されることでクロロフィルaとなる。フィトール鎖の合成は、別経路において、CHLPの触媒するゲラニルゲラニルピロリン酸の還元によって行われる。クロロフィルa (ク

ロロフィリドa)の一部はオキシゲナーゼ (CAO) によってクロロフィルb (クロロフィリドb) に変換される。

### 3. 被子植物の生活環における、クロロフィル合成制御の変化

制御機構の詳細な解説に入る前に、被子植物の生活史に沿って、クロロフィル合成制御の変化を以降の章の構成とともに簡単に紹介したい。

休眠中の種子では、色素体は原色素体の形に退化しており、クロロフィル合成は起らない。休眠を打破し、地中 (暗所) で発芽した芽生えは、暗所特有の形態変化を行う (暗形態形成)。すなわち、黄化した子葉を閉じ、先端はフックを形成し、胚軸は著しく伸長する。この時、黄化子葉では、色素体は光合成能を持たないエチオプラストとして分化する。エチオプラスト内には、プロトクロロフィリドとPORの複合体がプロラメラボディの形で蓄積し、光を受けたら直ちにクロロフィルを合成できるように準備をしている。過剰なプロトクロロフィリドの蓄積

は光酸化の危険性も伴うため、この複合体形成は厳密な制御の下に行われる。第4章では、暗形態形成時における転写レベルでの制御を、第5章では酵素活性レベルでの制御を解説する。

黄化芽生えが地上 (明所) に出て光を受けると、胚軸の伸長は抑制され、フックは伸び子葉が展開する (光形態形成)。子葉の細胞内では、エチオプラストが速やかに葉緑体へと変換する。この時、葉緑体の発達に伴い多量のクロロフィルが光合成タンパク質と共に合成される。まず、エチオプラスト内に蓄積されたプロトクロロフィリドは共に蓄積したPORによってクロロフィリドへと変換され、プロラメラボディが崩壊するとともにチラコイド膜の形成が起こる。

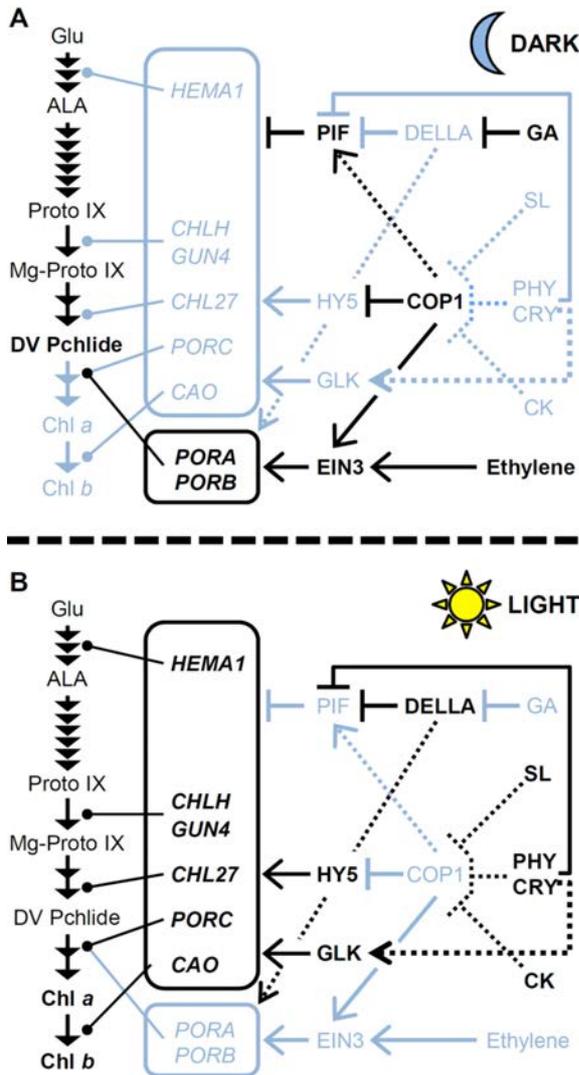


図2 暗形態形成 (A) および光形態形成時 (B) におけるクロロフィル合成遺伝子の転写制御モデル

暗所 (A) では、COP1がHY5の分解を引き起こすとともに、PIFの蓄積を誘導する。さらにジベレリン (GA) が、DELLAの分解を通してPIFを活性化する。正の制御因子であるHY5の分解と、負の制御因子であるPIFの活性化により、光誘導性のクロロフィル合成遺伝子 (*HEMA1*、*CHLH*、*GUN4*、*CHL27*、*PORC*、*CAO*) の発現は抑制される。一方、COP1の作用により蓄積したEIN3は、*PORA*と*PORB*のプロモーターに結合し、その発現を誘導する。明所 (B) では、フィトクローム (PHY) とクリプトクローム (CRY) がCOP1の機能を阻害することで、HY5の蓄積が起こる。サイトカイニン (CK) とストリゴラクトン (SL) もCOP1の抑制を介して、HY5の蓄積に寄与する。それに対し、PIFはDELLAによる阻害を受けるとともに、フィトクローム依存的な分解を受ける。*GLK*の遺伝子発現もPHYを介した光情報伝達によって誘導される。その結果、HY5、*GLK*の活性化とPIFの不活性化により、光誘導性のクロロフィル合成遺伝子の発現が上昇する。一方、EIN3はCOP1の不活性化とエチレンシグナルの減少により分解を受け、*PORA*と*PORB*の発現は減少する。DELLAも*PORA/B*の発現に対して促進的に働くことが示唆されているが<sup>8)</sup>、その意義は不明である。矢印とT字はそれぞれ正の制御と負の制御を表す。また、点線は間接的な制御を意味する。黒色と淡青色はそれぞれ、活性化された状態と不活性化された状態を示す。

フィル合成制御機構についての著者らの最近の研究を紹介し (第10章)、今後の課題について考えたい (第11章)。

#### 4. 暗形態形成におけるクロロフィル合成の転写制御

暗所におけるクロロフィル合成の転写制御には、転写抑制因子であるphytochrome-interacting basic helix-loop-helix transcription factors (PIF) が大きな役割を担っている。PIFは暗所で核内に蓄積し、クロロフィル合成に関わる遺伝子の発現を抑制する。6種のPIFタンパク質のうち、少なくとも4種 (PIF1, 3, 4, 5) が暗所におけるクロロフィル合成抑制に関わっており<sup>6,7)</sup>、特にPIF1とPIF3は*HEMA1*、*CHLH*、*GUN4*などの鍵となる段階を担う遺伝子の発現抑制に重要であることが示されている<sup>8)</sup> (図2)。興味深いことに、*HEMA1*、*CHLH*、*GUN4*の転写産物は暗所で周期的な増減を繰り返すが、PIF1やPIF3はこれらの遺伝子の周期的発現に関わる<sup>8)</sup>。以上のようなPIFによる暗所抑制の重要性は、PIFを欠いた変異体が光照射後の酸化ストレスにより枯死 (photobleaching) することから明らかである。また、このPIFによる転写抑制には、植物ホルモンであるジベレリンが、負の制御因子で

それと同時に、*de novo*のクロロフィル合成が活性化し、光合成タンパク質とともに光合成装置を作り上げる。この光によるクロロフィル合成の誘導も、転写レベル (第6章) と酵素レベル (第9章) での活性化を両輪として行われる。その後、クロロフィル合成系は日周期に同調した形で制御される。クロロフィル合成の鍵遺伝子が概日時計にしたがってリズムを刻む一方 (第7章)、ヘム合成とクロロフィル合成の分岐点では明暗サイクルに応じてフローの切り替えが起こると考えられている (第9章)。さらに、強烈な光などのストレスによって葉緑体や光合成の機能が損なわれた時には、クロロフィル合成は遮断され、光酸化による傷害を防ぐ。これは主にクロロフィル合成系の転写抑制によって起こると考えられる (第8章)。その後、葉の老化に伴い、クロロフィルは合成から分解のステージへと移るが、分解については他の総説を参照されたい<sup>4,5)</sup>。本稿の最後に、器官分化に応じたクロロ

あるDELLAを介して関与することが明らかとなった<sup>9,10)</sup>。DELLAはPIFに直接結合することで、その転写抑制活性を阻害する機能を持つ。しかし暗所芽生えでは、DELLAはジベレリンの作用によりユビキチン化を受け分解されるため、PIFは阻害されることなく、クロロフィル合成遺伝子の発現を抑制する。つまり、ジベレリンはPIFの活性化を通して、暗所でクロロフィル合成遺伝子の発現を抑制する。

暗所では、PIFの働きにより光誘導性のクロロフィル合成遺伝子の発現が抑制される一方、*POR*のアイソフォーム (*PORA*および*PORB*) は活発に発現し、プロトクロロフィリドとともにプロラメラボディを形成する<sup>11)</sup>。暗所における*POR*の発現には、ユビキチンE3リガーゼであるCOP1が強く関与する (図2)。COP1は光情報伝達系の抑制因子であり、暗所で光形態形成を抑制する<sup>12)</sup>。COP1を欠損した変異体では、暗所でも光形態形成が進行するとともに、*PORA*と*PORB*の発現が大幅に減少し、色素体のプロラメラボディが消失する<sup>13)</sup>。このCOP1を介した*POR*の発現誘導機構の詳細はまだ良く分かっていないが、少なくともその一つとしてエチレンシグナリングが関与することが示されている。エチレンシグナルの正の制御因子であるEIN3/EIL1は、エチレンとCOP1の作用により暗所で蓄積し、*PORA*と*PORB*のプロモーター領域に直接結合することで発現を誘導する<sup>14)</sup>。また、新規の植物ホルモンとして注目されているストリゴラクトンも、COP1の核への局在を阻害することで、暗所での*POR*の発現を減少させることが示されている<sup>15)</sup>。

さらに最近、フィトクロームAの下流で働く転写因子であるFAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL3 (FHY3) およびFAR-RED-IMPAIRED RESPONSE1 (FAR1) が、ALA脱水酵素 (ポルフォビリノーゲン合成酵素) をコードする*ALADI* (*HEMB1*) の発現に関与することが示された<sup>16)</sup>。これらの因子を共に欠く二重変異体では、黄化子葉における*ALADI*の発現が減少し、暗所でのポルフォビリノーゲン合成活性が低下すると共に、プロトクロロフィリドの蓄積も減少した。これらの因子は*ALADI*のプロモーターに直接結合し発現を誘導するが、その活性はPIF1によって抑制される。その一方で、その他のテトラピロール合成遺伝子、特に鍵遺伝子に対する影響は小さく、これらの因子が、暗形態形成時のテトラピロール合成全体にどれほど関わって

いるのかは、今のところ不明である。

## 5. 暗所におけるクロロフィル合成のフィードバック制御

クロロフィル合成経路にはいくつかの重要な制御ポイントが知られているが、中でも、GluTRの触媒する反応は、グルタミルtRNA<sup>Glu</sup>からテトラピロール独自の合成経路に入るステップであり (図1)、テトラピロール合成全体を制御する律速段階となっている。実際、暗所芽生えにALAを与えこの律速段階をバイパスさせると、プロトクロロフィリドやクロロフィル合成の中間体が顕著に蓄積することから<sup>17)</sup>、GluTRを介したALA合成制御の重要性が明らかである。

このステップでは、主要なGluTRをコードする*HEMAI*の発現制御に加え、酵素活性レベルでも負の制御を受ける。特に、プロトクロロフィリドの蓄積とALA合成には強い負の相関が見られることから、プロトクロロフィリドを介したGluTRのフィードバック阻害が考えられている<sup>18-20)</sup>。この負の制御で最も重要な役割を果たす因子が、FLUである。FLUはプロトクロロフィリドやその他のクロロフィル前駆体の蓄積に応じて、*HEMAI*のコードするGluTR1と直接結合することで、この反応を阻害すると考えられている<sup>21-23)</sup>。さらに最近、FLUはCHL27やPOR、CHLPと複合体を形成することが分かり、この複合体がプロトクロロフィリド依存的にGluTR1と結合することで、ALA合成を制御するモデルが示されている<sup>24)</sup> (図3)。FLUを欠いた変異体では、暗所でプロトクロロフィリドを過剰に蓄積し、その後の光照射により枯死することから、この因子は、黄化子葉が光照射後に過剰な光酸化傷害を受けないように、暗所でのプロトクロロフィリド蓄積を適切に保っていると考えられる。

テトラピロール合成経路の最終産物の一つであるヘムも、GluTRのフィードバック阻害を引き起こすことが示されている。*in vitro*での解析から、ヘムはGluTRの触媒中心やFLU結合部位とは異なった部分に結合し、この酵素の活性を阻害することが明らかとなった<sup>21,25-27)</sup>。さらに、ヘムオキシゲナーゼの欠損などのヘム分解が阻害された変異体では、GluTRの活性が抑制されることから、実際に*in vivo*でもヘムによるGluTRのフィードバック阻害が働くことが示唆された<sup>17)</sup>。また、ヘムオキシゲナーゼの欠損が*flu*変異によるプロトクロロフィリドの過剰蓄積を抑制したことか

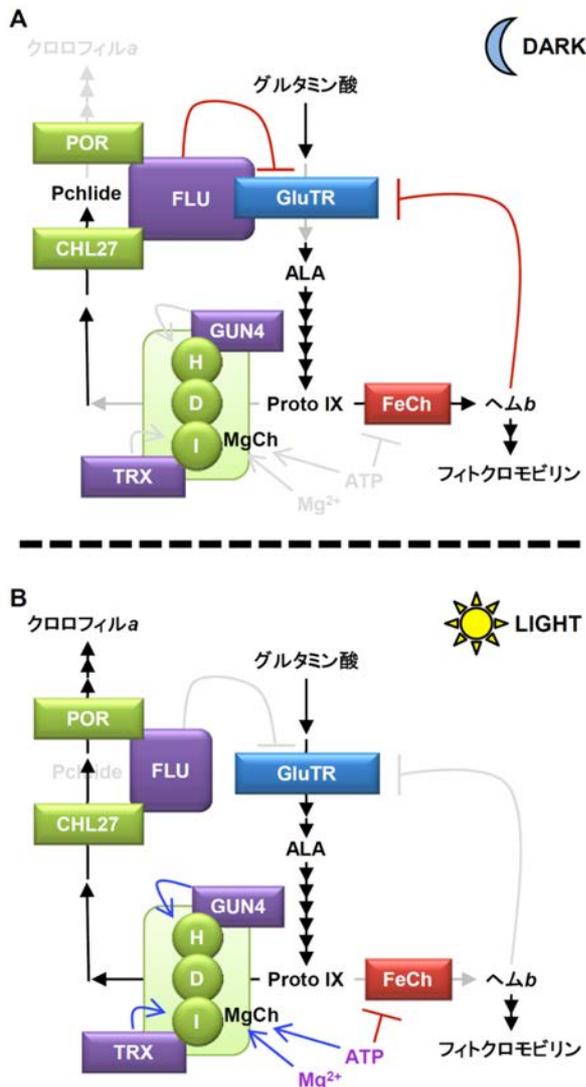


図3 暗所 (A) および明所 (B) における活性レベルでのクロロフィル合成制御モデル

暗所 (A) では、光依存性のPORによる酵素反応が起これず、プロトクロロフィリド (Pchlide) が蓄積する。Pchlideと結合したPORはFLUやCHL27と複合体を形成し、さらにGluTRが結合することでALAの合成が阻害される。一方、ヘムとクロロフィル合成の分岐点では、色素体内のATPやMg<sup>2+</sup>の濃度低下により、MgChの抑制とFeChの活性化が起こる。また、暗所では色素体内の還元力も低下し、チオレドキシン (TRX) によるCHL1サブユニットの還元が減少し、MgChの活性が低下する。これによりヘム合成のフローが増加し、ヘムによるGluTRのフィードバック阻害が起こる。一方、明所 (B) では、PORが活性化しPchlideの変換が行われる。それによりGluTRがFLU複合体から解離し、活性化される。ヘム/クロロフィル合成の分岐点では、ATPとMg<sup>2+</sup>濃度の上昇や、TRXによるCHL1の還元、GUN4によるCHLHへの基質の供給により、MgChが活性化される。一方でFeCh活性はATPにより抑制され、ヘムによるGluTRのフィードバック阻害も抑えられる。その結果、ALA合成の活性化とともにクロロフィル合成経路へのフローが増加し、クロロフィルの合成が大幅に活性化される。矢印とT字はそれぞれ正の制御と負の制御を表す。また、黒色と灰色は、その制御が活性化された状態と不活性化された状態を示す。

ら、ヘムによるGluTRのフィードバック阻害は、FLUとは独立した形で、暗所でのプロトクロロフィリド量の調節に関わっていると考えられる<sup>21)</sup>。

## 6. 光形態形成におけるクロロフィル合成の転写制御

暗所で発芽した黄化子葉が光を受けると、それまでクロロフィル合成遺伝子の発現を抑制していたPIFが、フィトクローム依存的に分解される。それに加え、光照射によりジベレリンの作用が弱まることで、蓄積したDELLAがPIFに結合し、その転写抑制活性を阻害する。結果として、PIFによるクロロフィル合成遺伝子の発現抑制が解除される。それと同時に、フィトクロームやクリプトクロームを介した光情報伝達系による正の制御を受け、これらの遺伝子の発現は急激に誘導される。この正の制御には、LONG HYPOCOTYL5 (HY5) とGOLDEN-LIKE (GLK) の二種の転写因子が少なくとも関与している (図2)。そのほか、FHY1やFHY3、FAR1などもフィトクロームの下流において、HEMA1やCHLH、GUN4の光誘導に関与することが示されているが<sup>28,29)</sup>、その詳細な制御機構は明らかでない。

ゲノムワイドなクロマチン免疫沈降解析により、HY5は多くのクロロフィル合成関連遺伝子 (*GluRS*, *URO2*, *PPO1*, *CHLH*, *GUN4*, *CHL27*, *DVR*, *PORC*, *CAO*, *CHLP*, *HO1*) のプロモーターに結合することが示されている<sup>30)</sup>。実際、*hy5*変異体では光による*CHLH*の発現誘導が低下したことから、HY5はこれらの遺伝子の光誘導に強く関与していると考えられる (小林ら、未発表)。HY5は光形態形成を正に制御する転写因子であり、暗所ではCOP1を介したユビキチン化により分解される<sup>12)</sup>。一方、光照射下でフィトクロームやクリプトクロームによりCOP1が不活性化されると、HY5は核内に蓄積し、光形態形成と共にクロロフィル合成遺伝子の転写を誘導する。また、葉緑体の発達に関わる植物ホルモンであるサイトカイニンも、COP1によるHY5の分解を阻害することが示されている<sup>31)</sup>。実際、サイトカイニンは暗所でプロトクロロフィリドの蓄積や*CHLH*や*CHL27*の遺伝子発現を誘導する一方、サイトカイニンレセプターの変異により、これらの遺伝子の光誘導が低下したことから<sup>32)</sup> (小林ら、未発表)、サイトカイニンはHY5の安定化を介してクロロフィル合成遺伝子の光誘導に寄与している可

能性が考えられる。

緑化を正に制御するもう一つの転写因子が、GLK (GLK1およびGLK2) であり、クロロフィル合成系や集光性アンテナタンパク質の遺伝子発現を特異的に誘導する。GLKアイソフォームを共に欠いた変異体 (*glk1 glk2*) では、クロロフィルやアンテナタンパク質が減少し、pale greenの表現型を示す<sup>33)</sup>。この二重変異体に誘導型GLK遺伝子を導入した植物体では、*HEMA1*、*CHLH*、*GUN4*、*CHLM*、*CHL27*、*PORA*、*PORB*、*PORC*、*CAO*の発現がGLK1やGLK2の誘導後に直ちに上昇したことから、これらの転写因子の直接のターゲットとして見出された<sup>34)</sup> (図2)。さらに、GLK1については、クロマチン免疫沈降解析から、実際にこれらの遺伝子のプロモーター領域に結合することが確認された。黄化芽生えへの照射によりGLK2の遺伝子発現が急激に増加することから<sup>35)</sup>、光により誘導されたGLK2がそれに続くターゲット遺伝子の発現を上昇させると考えられる。このGLK2の光誘導はフィトクロームを介して起こることが分かっており<sup>35)</sup>、HY5タンパク質の安定化と共に、フィトクロームが光形態形成時のクロロフィル合成に重要な役割を果たしている。実際、フィトクロームの変異体では*HEMA1*や*CHLH*、*GUN4*の光応答性が大幅に減少し<sup>28,29,36)</sup>、クロロフィル合成が強く抑制されることが明らかとなっている<sup>37)</sup>。

## 7. 恒常的なクロロフィル合成に関わる転写制御

光形態形成後は、クロロフィル合成の鍵遺伝子は概日リズムに応じてその発現が制御され、クロロフィル合成の恒常性を維持する。クロロフィル合成遺伝子のミニアレイ解析から、*HEMA1*、*CHLH*、*CHL27*、*CAO*の発現は、昼間高く夜間低いという概日リズムで振動することが分かった<sup>38)</sup>。これらの遺伝子の発現は、集光性アンテナ遺伝子とよく同調していたことから、アンテナの形成とクロロフィル合成を協調させる制御ポイントとなっていると考えられる。さらに、大規模データを用いた遺伝子の共発現ネットワーク解析から、*GUN4*や*CHLP*、*CLA1* (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthaseをコードし、フィトール鎖の合成に関与する) が、核コードの光合成遺伝子と共に上記の鍵遺伝子と強く共発現することが明らかとなった<sup>2,39)</sup>。また、*PORA*と*PORB*も、上記の遺伝子とは若干異なる周期の概日リズムで振動することから<sup>38)</sup>、クロ

ロフィル合成のリズム制御に関与していると思われる。

明暗による光周サイクルにおいては、フィトクロームとクリプトクロームが概日時計への光シグナルの入力を行う。フィトクロームの制御下にあるGLK2の発現も概日時計に従ったリズムを刻むことから<sup>33)</sup>、光シグナルはGLK2の日周変化を介して、クロロフィル合成や集光アンテナに関わる遺伝子の概日リズムに関与すると考えられる。さらに、PIF1やPIF3の機能欠損により、*HEMA1*や*CHLH*、*GUN4*の暗所における概日リズムが乱れることから<sup>8)</sup>、これらの転写因子もフィトクロームを介したクロロフィル合成系の光周期的な遺伝子発現に関与する可能性が考えられる。これらの因子は概日時計の中心振動体には影響を及ぼさないことから、時計シグナルの出力に関わっていると予想されている。さらに興味深いことに、概日リズムの中心振動体の一つであるTIMING OF CAB EXPRESSION1 (TOC1) が、*CHLH*のプロモーターに直接結合することで、その概日リズムを制御することが明らかとなった<sup>40)</sup>。TOC1の発現を抑制した変異体では、*CHLH*の発現が本来周期的に減少するタイミングで逆に上昇し、過剰発現体では、*CHLH*の発現が高くなる時間帯でも常に抑制された表現型を示した。この結果は、最近報告されたTOC1の転写抑制因子としての性質とよく一致する<sup>41)</sup>。

また最近、GATA結合型の転写因子、GNC (GATA, NITRATE-INDUCIBLE, CARBON METABOLISM-IN V O L V E D) とそのパラログであるCGA1 (CYTOKININ-RESPONSIVE GATA TRANSCRIPTION FACTOR1) がクロロフィル合成に関わることが報告された<sup>42,43)</sup>。GNCとCGA1を共に欠損すると*HEMA1*、*GUN4*、*PORB*や*PORC*の発現が減少する一方、これらの転写因子の過剰発現により上記遺伝子の発現が上昇することが示された。しかし、GNCとCGA1は共に上記遺伝子のプロモーター領域には直接結合しないことから、クロロフィル合成遺伝子の発現に対しては、間接的に関わっていると考えられる<sup>43)</sup>。GNCとCGA1の遺伝子発現は光や窒素、サイトカニンにより上昇する一方、ジベレリンやその下流のPIF3により抑制されることが知られている<sup>42-44)</sup>。また、これらの因子は、クロロフィル量だけでなく、発芽率や葉の大きさ、葉緑体の分裂、開花時期や老化など、植物の生長に多様な影響を与えること

が分かっており<sup>42-45)</sup>、これらにおける変化が、二次的にクロロフィル合成遺伝子の発現に影響しているのかもしれない。

## 8. プラスチドシグナルによるクロロフィル合成の転写制御

環境の日周変動に加え、自然界では植物は様々な環境変化に対応しなければならない。光合成において光は毒にもなるため、葉緑体の機能を損なうような環境下では、植物は核内で光合成関連遺伝子の発現を抑制する仕組みを発達させている。この際、核は葉緑体からのシグナル（プラスチドシグナル）により葉緑体の機能状態をモニターし、光合成関連遺伝子の発現をその機能状態に合わせて調節すると推測されている<sup>46)</sup>。実際、ノルフルラゾンなどの除草剤処理によって葉緑体の機能を欠損させても、核の光合成関連遺伝子の発現抑制が起こらなくなった変異体が単離されたことから、色素体から核への逆行性制御（レトログレードシグナリング）の存在が強く支持された<sup>47)</sup>。これらの変異体は*genomes-uncoupled* (*gun*) と名付けられ、*gun1*から*gun5*までが単離された。*gun1*以外の4つはテトラピロール代謝に関与し、特にMgChの機能に関わる*gun4*とCHLHに変異を持つ*gun5*が発見されたことから、MgChとプラスチドシグナルの関わりが示唆された<sup>48-51)</sup>。未だにその詳細は明らかでない一方<sup>3)</sup>、最近、FeChのアイソフォームであるFC1やHEMA2にコードされるGluTRの過剰発現株が*gun*表現型を示すことが報告され<sup>52)</sup>、ヘムがレトログレードシグナリングに関与する可能性が示された。実際、*gun1*と*gun2*はそれぞれヘムオキゲナーゼとフィトクロモビルシンターゼに変異を持ち、これらはともにヘム代謝に関わる酵素であることから、レトログレードシグナリングにおけるヘムの役割が注目されている。レトログレードシグナリングに関しては、詳しくは最近の総説などを参照されたい<sup>3,46,53,54)</sup>。

核にコードされた光合成関連遺伝子と同様に、大部分のクロロフィル合成遺伝子は、ノルフルラゾンによる葉緑体の機能欠損によって、その発現が強く抑制される<sup>50)</sup>。このことは、クロロフィル合成経路が葉緑体の機能状態に応じて、遺伝子発現のレベルで統合的に制御されていることを示している。しかし、これらの抑制は、*gun1 gun5* 二重変異体では軽減される。特に、HEMA1やCHLHなどの鍵段階の遺伝子で顕著に

軽減されることから<sup>50)</sup>、プラスチドシグナルは主にこれらの遺伝子の抑制を介して、クロロフィル合成経路を制御していると考えられる。これらのクロロフィル合成遺伝子と同様に、GLK1とGLK2の発現も葉緑体の発達阻害剤で減少するが、*gun*変異体ではその抑制が解除された<sup>34)</sup>。さらに、GUN1はGLK1の遺伝子発現を抑制することで、クロロフィル合成や光合成関連遺伝子の発現を抑制することが示された<sup>55)</sup>。これらの結果から、GLKはレトログレードシグナリングの下流で、葉緑体の機能状態に応じてクロロフィル合成を転写レベルで制御していると考えられる。

また、LHCB遺伝子の発現解析から、HY5もレトログレードシグナリングにおける抑制因子として働くことが示唆されている<sup>56)</sup>。HY5は光シグナルの正の制御因子と考えられているが、このモデルによれば、葉緑体の機能が阻害された時には、HY5は正の制御因子から負の制御因子へと変わることで、ターゲット遺伝子の発現を抑制する。実際、クリプトクロームの変異体や*hy5*変異体ではこの発現抑制が働かないため、強光ストレスに弱くなることが示されている。このモデルでは、光シグナルはGUN1とは独立な経路で働き、葉緑体の機能阻害時にこの二つの制御系が働くことが、核における光合成関連遺伝子の抑制に重要なことが示されている。プラスチドシグナルがどのようにHY5の機能を転換するのかは現時点では不明であり、今後の解明が期待される。

## 9. 明所における酵素活性レベルでのクロロフィル合成制御

暗所におけるGluTR1の活性は、それをコードするHEMA1遺伝子の発現抑制に加え、活性阻害因子であるFLUやヘムによって低く抑えられている。FLUは暗所で蓄積するが、光照射後もそのタンパク質量は大きく変わらない。実際、*flu*変異体では光照射下でもALA合成活性が野生株より高いことから<sup>19,21)</sup>、明所でもある程度ALA合成制御に寄与していることが分かる。それに対し、GluTR1のタンパク質量はHEMA1の誘導に伴い光照射で大幅に上昇する<sup>21)</sup>。その結果、大量に合成されたGluTR1がFLUによる抑制を上回り、光形態形成時のテトラピロール合成を活性化させると考えられている。さらに、最近の研究によると、光照射によるプロトクロロフィリドの減少も、FLUによるGluTRの活性抑制の解除に寄与する可能性が示され

ている。すなわち、暗所などのプロトクロロフィリドが蓄積した条件では、PORやCHL27と複合体を形成したFLUがGluTRと結合しその活性を抑制するが、光によりプロトクロロフィリドが代謝されると、GluTRのみが複合体から解離し、ALA合成を活性化するというモデルが提案されている<sup>24)</sup>(図3)。この考えは、GluTRが暗所でのみFLUと結合することや<sup>24)</sup>、ALA合成の抑制が、FLU依存的にPORと結合したプロトクロロフィリドによって引き起こされること<sup>19)</sup>などに基づいている。プロトクロロフィリド量とALA合成活性は、明暗に従って逆相関した形で増減することから<sup>19)</sup>、この制御機構は、昼夜の日周リズムに対しても働いていると考えられる。

これらの仕組みに加え、光照射後には、クロロフィル合成へのフローが一気に増加すると考えられる。それによりヘム経路へのフローが相対的に減少することで、ヘムによるGluTRのフィードバック阻害が解除されることも、光形態形成時のクロロフィル合成の活性化に寄与するかもしれない。実際、FeChの過剰発現がクロロフィル含量を低下させることが報告されており<sup>52)</sup>、過剰発現したFeChにより合成されたヘムが、GluTRのフィードバック阻害を引き起こしている可能性も議論されている。光照射によりクロロフィル合成フローが増加する一つの要因としては、*CHLH*や*GUN4*などのクロロフィル経路の鍵遺伝子の発現が*HEMAI*と共に急激に上昇することが挙げられる<sup>38)</sup>。さらに以下に述べるように、酵素活性のレベルでクロロフィル合成フローを活性化する仕組みが働くと考えられる。

Proto IXにFe<sup>2+</sup>が配位するとヘムが、Mg<sup>2+</sup>が配位するとMg-Proto IXが合成されクロロフィル合成経路へと進む。クロロフィルとヘムの合成はそれぞれ、発達段階や環境、組織によって異なる制御を受けること、また一方、基質であるProto IXは非常に強い光増感酸化能を持ち、細胞内にプールしておけないことから、Proto IXのヘムおよびクロロフィル合成系への振り分けは、FeChとMgChによって厳密な制御を受けると考えられる。MgChの活性は光照射により上昇し、日周期や概日リズムにより変動する。すなわち、明期後すぐに最大となり、その後暗期に向けて減少する。この変化は、*CHLH*の発現パターンとよく一致することから、*CHLH*の発現がその活性変化に大きく影響すると考えられる<sup>57)</sup>。それに加え、活性化のレベルでも

日周期による制御を受けている可能性も示唆されており、その一つとして、葉緑体ストロマにおけるATPとMg<sup>2+</sup>量の変動が関与すると考えられている。ATPやMg<sup>2+</sup>は共にMgChの活性に必要であるが<sup>58,59)</sup>、その葉緑体内での濃度はどちらも、暗期に低く、明期に高くなる<sup>60,61)</sup>。そのため、日周期においては、これらの補因子の増減を介してMgChの酵素活性を調節すると考えられる(図3)。特に、Mg<sup>2+</sup>は*CHLH*の葉緑体内での局在に影響することも分かっており、Mg<sup>2+</sup>濃度の増加により*CHLH*は可溶性画分から膜画分へ移行する<sup>62,63)</sup>。この局在の変化もMgChの活性調節に寄与しているのかもしれない。さらに、*CHLH*はポルフィリンの濃度依存的に膜へ局在することも示されている。*GUN4*も*CHLH*と同様の挙動を示し、これらはお互いの局在に影響しあうことから<sup>64,65)</sup>、*GUN4*はMgChの酵素活性調節だけでなく、膜における複合体形成にも関与する可能性が考えられる。シアノバクテリアの*Synechocystis* sp. PCC6803 (*Synechocystis*)では、Mg<sup>2+</sup>による*CHLH*の活性化に*GUN4*が関与することも示されており<sup>66)</sup>、MgChの活性調節機構におけるこれらの因子の動態の詳細な解明が待たれる。

一方で、FeCh活性はMgCh活性とは正反対の日周変化を示し、明期の後半から暗期の始まりにかけて高くなり、その後減少することが報告されている<sup>57)</sup>。興味深いことに、FeChの活性はATPによって阻害されることが示されており<sup>67)</sup>、ストロマにおけるATP濃度の変化が、MgChとFeChの切り替えに関与している可能性も考えられる。

ATPやMg<sup>2+</sup>による活性化に加え、酸化還元状態がMgChの活性に影響を与えることも明らかとなっている。*Synechocystis*の組み換えタンパク質を用いた*in vitro*での実験から、還元剤であるdithiothreitolがMgChの活性を大幅に上昇させることが示された<sup>68)</sup>。さらに、*CHLI*や*CHLH*のチオール基における修飾がMgChの活性に必須であった。特に、*CHLI*はATPase活性を持ち、Mg<sup>2+</sup>の配位に必要な加水分解エネルギーを供給すると考えられているが、システイン残基がその活性に寄与していることが示された。また、同様に組み換えタンパク質を用いた研究により、高等植物の*CHLI*は葉緑体型のチオレドキシンのターゲットであり<sup>69)</sup>、チオレドキシンを介したシステイン残基の還元により、シロイヌナズナの二つのIサブユニット(*CHLI1*および*CHLI2*)のATPase活性が顕著に上昇

することが分かった<sup>70,71</sup>). さらに*in vivo*でも、CHLIは葉緑体型チオレドキシシンと相互作用し還元を受けることが、エンドウを用いた解析により示された<sup>72</sup>). ATPase活性だけでなく、MgCh複合体の活性もIサブユニットの還元により大幅に上昇したことから、CHLIの還元がMgChの活性化に重要であることが明らかとなった(図3)。一方で、チオレドキシシンドメインを持つNADPH依存型チオレドキシシン還元酵素(NTRC)は葉緑体ストロマに局在し、CHLIのATPaseを活性化するが、MgChの全体としての活性には寄与しないことが未発表データの形で報告されている<sup>73</sup>). しかし、Luoら<sup>72</sup>)の報告によると、NTRCはCHLIと相互作用せず、またMgChの活性化もしないことから、CHLIはNTRCの直接のターゲットではない可能性も示されている。光合成電子伝達を介して還元を受けるチオレドキシシンは、酵素タンパク質に光シグナルを伝達する因子として働くことが知られている。実際、数多くの葉緑体酵素タンパク質がチオレドキシシンの還元によりそのスイッチが調節されている<sup>74</sup>). CHLIに見られるようなチオール基を介したMgChの活性調節も、光照射に応答したクロロフィル合成経路の活性化に寄与していると考えられる。

## 10. 器官分化に応じた色素体分化とクロロフィル合成制御

発芽前の植物の種子では、色素体は原色素体と呼ばれる未分化な形態に退化している。その後、植物の器官分化に伴い、葉では葉緑体へと分化する一方、根などの非光合成組織では光合成能力を持たない白色体などの色素体へと分化する。これらの色素体の分化は一方通行ではなく、発達過程や生育環境に応じて相互変換できることが知られているが、その分子制御メカニズムはまだよく分かっていない。特に、光増感酸化作用をもつクロロフィルおよびその前駆体の合成は、色素体の分化と協調して厳密な制御を受ける必要がある。これまで、クロロフィル合成制御は専ら光合成器官において、特に光形態形成の過程において盛んに研究されてきたが、非光合成器官における制御機構に関しては、ほとんど謎のままだった。そこで著者らは、非光合成組織ではどのように葉緑体分化が抑制されているのか、という視点から根におけるクロロフィル合成制御機構の解明を試み、最近その成果を報告したので<sup>39,75</sup>)、最後にこの場を借りて簡単に紹介し

たい。

シロイヌナズナの根は、光が当たる環境においても、葉緑体の分化はほとんど起こらず、クロロフィルの合成は低く抑えられている。しかし、地上部を切り離した根では、クロロフィル合成が活性化し、緑化が引き起こされることが分かった<sup>75</sup>)。この切除根の緑化は、オーキシンの添加により抑制された。さらにオーキシンの極性輸送における変異やオーキシンシグナルの変異も根の緑化を引き起こしたことから、通常は、根では地上部から輸送されるオーキシンの作用によって、クロロフィルの合成が抑制されていると考えられた。一方、根でのクロロフィル合成がサイトカイニン添加により上昇したのに対し、サイトカイニンレセプターの変異体では減少したことから、オーキシンとは反対に、サイトカイニンはクロロフィル合成に促進的に働くことが分かった。また、これらの緑化した根では、*HEMA1*や*CHLH*、*CHL27*、*CHLP*などのクロロフィル合成における鍵遺伝子の発現が強く誘導され、さらに発現レベルの変化が、根におけるクロロフィル量の変化とよく一致したことから、根の緑化はクロロフィル合成遺伝子の発現上昇によって引き起こされていることが示された。

そこで次に、これらの植物ホルモンが根でのクロロフィル合成を調節する仕組みについて詳しく調べた。その結果、根でのクロロフィル合成遺伝子の発現にはHY5が必須であり、植物ホルモンはHY5を介して緑化制御に関与することが分かった。オーキシンシグナル欠損により緑化した根では、HY5タンパク質の蓄積が見られたことから、これらのホルモンは、HY5の蓄積を介して根の緑化を調節している可能性が考えられる。*cop1*<sup>76</sup>)や*det1*<sup>77</sup>)といった、HY5の分解が阻害された変異体で根の緑化が顕著に起こることも、この結果とよく一致する。一方で、ホルモンシグナリングの改変により緑化した根では、*GLK2*の発現が上昇していることも明らかとなった。さらに、*GLK1*や*GLK2*を過剰発現した植物体では、根でのクロロフィル蓄積が強く誘導されたことから、これらの因子の発現上昇により直接クロロフィル合成が活性化されることが分かった。シロイヌナズナの野生株の根では*GLK1*はほとんど発現しないことから<sup>33</sup>)、根でのクロロフィル合成にはHY5とGLK2の働きが重要であり、植物ホルモンは少なくともこれらの二つの転写因子を介して、遺伝子の発現制御を行っていることが

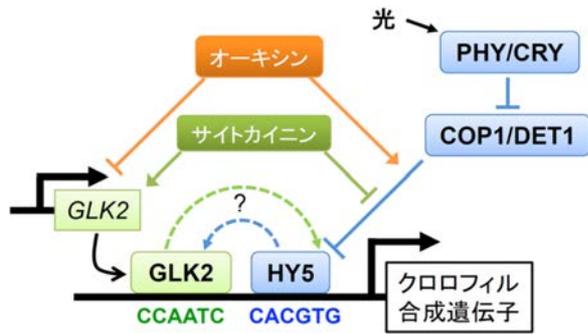


図4 根における転写レベルでのクロロフィル合成制御モデル (79より改変)

光はフィトクローム (PHY) やクリプトクローム (CRY) に受容され、COP1によるHY5の分解を抑制する。サイトカイニンもHY5の安定化を誘導するのに対し、オーキシシンは反対に働く。蓄積したHY5はプロモーター上のG-box (CACGTG) に結合し、クロロフィル合成遺伝子の発現を誘導する。サイトカイニンはGLK2の遺伝子発現も誘導し、オーキシシンはそれを抑制する。GLK2は推定認識配列 (CCAATC) を介し、クロロフィル合成遺伝子の発現を上昇させる。G-boxとCCAATC配列は、クロロフィル合成を含む光合成共発現遺伝子のプロモーター上に有意に高頻度で共存することから<sup>40)</sup>、これらの配列を介したHY5とGLKの相互作用が想定される。

明らかとなった (図4)。これらの結果は、通常は光合成を行わない根の細胞も、環境に応じて葉緑体を分化させる能力を持っており、それが植物ホルモンを介した器官分化と協調した形で制御されていることを示している。

さらに、HY5とGLKの遺伝学的な相互作用を調べるため、*hy5*変異体でGLK1およびGLK2を過剰発現させたところ、それらの個体は*hy5*とGLK過剰発現株との中間的な表現型を示した。この結果は、HY5はGLKの機能に必須ではないが、重要であることを意味している。GLKの過剰発現により根でのHY5のタンパク質量が増加していたことから、直接的な相互作用をしている可能性も考えられる<sup>75)</sup>。HY5はプロモーター上のG-boxと名付けられたシス配列に結合する一方、GLKはCCAATCという新規のシス配列と相互作用すると推測されている。プロモーターのシス配列解析から、クロロフィル合成の鍵遺伝子である*CHLH*、*CHL27*、*CHLP*と、これらと強く共発現する光合成関連遺伝子のプロモーター上には、上記のG-boxとCCAATC配列が有意に共存していることが明らかとなった<sup>39)</sup> (図4)。この結果は、これらのシス配列が、クロロフィル合成および光合成関連遺伝子の共発

現制御に重要な役割を果たす可能性を示唆している。さらに、*CHLH*のプロモーター解析から、G-boxは特に根で*CHLH*の転写活性に強い影響を与えることが明らかとなった<sup>39)</sup>。HY5の機能欠損は、根でのクロロフィル合成を完全に阻害する一方<sup>75,78)</sup>、葉では大きな影響を与えない<sup>79)</sup>。それに対し、GLKの機能欠損は、根では大きな影響を与えない一方<sup>75)</sup>、葉ではクロロフィル合成を強く阻害する<sup>33)</sup>。これらの結果は、HY5、GLKと、それらが結合するシス配列における作用機構が、葉と根では大きく異なることを示している。特に、地上部では関わる因子やそれによる制御機構がより複雑になっていると思われる、クロロフィル合成に関わる遺伝子発現の制御機構の解明に向け、さらなる解析が必要である。

## 11. おわりに

約35億年前にシアノバクテリアで酸素発生型光合成が誕生して以来、光化学系システムそのものはほとんど変化せずに、今日の植物まで受け継がれてきたと言われている。同様に、クロロフィル*a*および*b*も、葉緑体獲得の際に植物に持ち込まれて以来、その構造は一切変わることなく光合成に使われてきた。その一方で、クロロフィルの代謝制御レベルでは、生物の生活史や生育環境に適応する形で、生物種ごとに大きな変化を遂げてきたのだろう。その中でも、ここでは、被子植物、それも主にモデル植物であるシロイヌナズナで分かってきたことを紹介した。近年の解析技術の進歩やデータの蓄積により、多くのことが明らかとなったが、依然として未解明な部分も数多く残されている。クロロフィル合成に直接関与することが明らかとなった転写因子はまだ片手で数えるほどであり、協調的な遺伝子発現がどのように維持されているかは謎である。タンパク質レベルでは、プロトクロロフィリドなどの合成中間体によるフィードバック制御について、ようやくその仕組みに迫り始めたところである。Proto IX以降のクロロフィル合成中間体は、どれも強い光増感酸化作用を持っており、合成量の微調整や基質の正確な受け渡しが必要となるが、その制御についてもほとんど明らかでない。また、光合成組織と非光合成組織でのクロロフィル合成制御の違いについても、今後の大きな研究課題として残っている。

ここまで紹介してきたことは特定の植物種におい

て実験室で明らかとなったことであり、実際の自然環境ではその制御もまた大きく異なるかもしれない。自然界では、多様な植物種が様々な環境下で固有の生活を営んでおり、クロロフィル合成制御機構の多様性もまた、様々に存在していると想像される。クロロフィル合成制御の研究は、まだ始まったばかりである。

Received June 30, 2012, accepted July 30, 2012, Published August 31, 2012

### 参考文献

- Masuda, T. (2008) Recent overview of the Mg branch of the tetrapyrrole biosynthesis leading to chlorophylls, *Photosynth. Res.* 96, 121-143.
- Masuda, T. and Fujita, Y. (2008) Regulation and evolution of chlorophyll metabolism, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1131-1149.
- Mochizuki, N., Tanaka, R., Grimm, B., Masuda, T., Moulin, M., Smith, A. G., Tanaka, A. and Terry, M. J. (2010) The cell biology of tetrapyrroles: a life and death struggle, *Trends Plant Sci.* 15, 488-498.
- Tanaka, R., Kobayashi, K. and Masuda, T. (2011) Tetrapyrrole metabolism in *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis Book* 9, e0145.
- Hörtensteiner, S. (2012) Update on the biochemistry of chlorophyll breakdown, *Plant Mol. Biol.* in press.
- Leivar, P., Tepperman, J. M., Monte, E., Calderon, R. H., Liu, T. L. and Quail, P. H. (2009) Definition of early transcriptional circuitry involved in light-induced reversal of PIF-imposed repression of photomorphogenesis in young *Arabidopsis* seedlings, *Plant Cell* 21, 3535-3553.
- Shin, J., Kim, K., Kang, H., Zulfugarov, I. S., Bae, G., Lee, C. H., Lee, D. and Choi, G. (2009) Phytochromes promote seedling light responses by inhibiting four negatively-acting phytochrome-interacting factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7660-7665.
- Stephenson, P. G., Fankhauser, C. and Terry, M. J. (2009) PIF3 is a repressor of chloroplast development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7654-7659.
- Cheminant, S., Wild, M., Bouvier, F., Pelletier, S., Renou, J. P., Erhardt, M., Hayes, S., Terry, M. J., Genschik, P. and Achard, P. (2011) DELLAs regulate chlorophyll and carotenoid biosynthesis to prevent photooxidative damage during seedling deetiolation in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 23, 1849-1860.
- Lau, O. S. and Deng, X. W. (2010) Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones, *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 571-577.
- Armstrong, G. A., Apel, K. and Rüdiger, W. (2000) Does a light-harvesting protochlorophyllide *a/b*-binding protein complex exist?, *Trends Plant Sci.* 5, 40-44.
- Bae, G. and Choi, G. (2008) Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins, *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 281-311.
- Sperling, U., Franck, F., van Cleve, B., Frick, G., Apel, K. and Armstrong, G. A. (1998) Etioplast differentiation in *Arabidopsis*: both PORA and PORB restore the prolamellar body and photoactive protochlorophyllide-F655 to the *cop1* photomorphogenic mutant, *Plant Cell* 10, 283-296.
- Zhong, S., Zhao, M., Shi, T., Shi, H., An, F., Zhao, Q. and Guo, H. (2009) EIN3/EIL1 cooperate with PIF1 to prevent photo-oxidation and to promote greening of *Arabidopsis* seedlings, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 21431-21436.
- Tsuchiya, Y., Vidaurre, D., Toh, S., Hanada, A., Nambara, E., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. and McCourt, P. (2010) A small-molecule screen identifies new functions for the plant hormone strigolactone, *Nat Chem Biol* 6, 741-749.
- Tang, W., Wang, W., Chen, D., Ji, Q., Jing, Y., Wang, H. and Lin, R. (2012) Transposase-derived proteins FHY3/FAR1 interact with PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 to regulate chlorophyll biosynthesis by modulating HEMB1 during deetiolation in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 24, 1984-2000.
- Terry, M. J. and Kendrick, R. E. (1999) Feedback inhibition of chlorophyll synthesis in the phytochrome chromophore-deficient *aurea* and *yellow-green-2* mutants of tomato, *Plant Physiol.* 119, 143-152.
- Huang, L. and Castelfranco, P. A. (1989) Regulation of 5-aminolevulinic acid synthesis in developing chloroplasts : I. Effect of light/dark treatments in vivo and in organello, *Plant Physiol.* 90, 996-1002.
- Richter, A., Peter, E., Pörs, Y., Lorenzen, S., Grimm, B. and Czarniecki, O. (2010) Rapid dark repression of 5-aminolevulinic acid synthesis in green barley leaves, *Plant Cell Physiol.* 51, 670-681.
- Stobart, A. K. and Ameen-Bukhari, I. (1986) Photoreduction of protochlorophyllide and its relationship to delta-aminolaevulinic acid synthesis in the leaves of dark-grown barley (*Hordeum vulgare*) seedlings, *Biochem. J.* 236, 741-748.
- Goslings, D., Meskauskiene, R., Kim, C., Lee, K. P., Nater, M. and Apel, K. (2004) Concurrent interactions of heme and FLU with Glu tRNA reductase (HEMA1), the target of metabolic feedback inhibition of tetrapyrrole biosynthesis, in dark- and light-grown *Arabidopsis* plants, *Plant J.* 40, 957-967.
- Meskauskiene, R. and Apel, K. (2002) Interaction of FLU, a negative regulator of tetrapyrrole biosynthesis, with the glutamyl-tRNA reductase requires the tetratricopeptide repeat domain of FLU, *FEBS Lett.* 532, 27-30.
- Meskauskiene, R., Nater, M., Goslings, D., Kessler, F.,

- op den Camp, R. and Apel, K. (2001) FLU: a negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12826-12831.
24. Kauss, D., Bischof, S., Steiner, S., Apel, K. and Meskauskiene, R. (2012) FLU, a negative feedback regulator of tetrapyrrole biosynthesis, is physically linked to the final steps of the Mg(++)-branch of this pathway, *FEBS Lett.* 586, 211-216.
25. Pontoppidan, B. and Kannangara, C. G. (1994) Purification and partial characterisation of barley glutamyl-tRNA(Glu) reductase, the enzyme that directs glutamate to chlorophyll biosynthesis, *Eur. J. Biochem.* 225, 529-537.
26. Vothknecht, U. C., Kannangara, C. G. and von Wettstein, D. (1996) Expression of catalytically active barley glutamyl tRNA<sup>Glu</sup> reductase in *Escherichia coli* as a fusion protein with glutathione S-transferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9287-9291.
27. Vothknecht, U. C., Kannangara, C. G. and von Wettstein, D. (1998) Barley glutamyl tRNA<sup>Glu</sup> reductase: mutations affecting haem inhibition and enzyme activity, *Phytochemistry* 47, 513-519.
28. McCormac, A. C. and Terry, M. J. (2002) Light-signalling pathways leading to the co-ordinated expression of HEMA1 and Lhcb during chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 32, 549-559.
29. Stephenson, P. G. and Terry, M. J. (2008) Light signalling pathways regulating the Mg-chelatase branchpoint of chlorophyll synthesis during de-etiolation in *Arabidopsis thaliana*, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1243-1252.
30. Lee, J., He, K., Stolz, V., Lee, H., Figueroa, P., Gao, Y., Tongprasit, W., Zhao, H., Lee, I. and Deng, X. W. (2007) Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development, *Plant Cell* 19, 731-749.
31. Vandenbussche, F., Habricot, Y., Condiff, A. S., Maldiney, R., Van der Straeten, D. and Ahmad, M. (2007) HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 49, 428-441.
32. Hedtke, B., Alawady, A., Albacete, A., Kobayashi, K., Melzer, M., Roitsch, T., Masuda, T. and Grimm, B. (2012) Deficiency in riboflavin biosynthesis affects tetrapyrrole biosynthesis in etiolated *Arabidopsis* tissue, *Plant Mol. Biol.* 78, 77-93.
33. Fitter, D. W., Martin, D. J., Copley, M. J., Scotland, R. W. and Langdale, J. A. (2002) GLK gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species, *Plant J.* 31, 713-727.
34. Waters, M. T., Wang, P., Korkaric, M., Capper, R. G., Saunders, N. J. and Langdale, J. A. (2009) GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic apparatus in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 21, 1109-1128.
35. Tepperman, J. M., Hwang, Y. S. and Quail, P. H. (2006) phyA dominates in transduction of red-light signals to rapidly responding genes at the initiation of *Arabidopsis* seedling de-etiolation, *Plant J.* 48, 728-742.
36. McCormac, A. C., Fischer, A., Kumar, A. M., Söll, D. and Terry, M. J. (2001) Regulation of HEMA1 expression by phytochrome and a plastid signal during de-etiolation in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 25, 549-561.
37. Strasser, B., Sánchez-Lamas, M., Yanovsky, M. J., Casal, J. J. and Cerdán, P. D. (2010) *Arabidopsis thaliana* life without phytochromes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4776-4781.
38. Matsumoto, F., Obayashi, T., Sasaki-Sekimoto, Y., Ohta, H., Takamiya, K. and Masuda, T. (2004) Gene expression profiling of the tetrapyrrole metabolic pathway in *Arabidopsis* with a mini-array system, *Plant Physiol.* 135, 2379-2391.
39. Kobayashi, K., Obayashi, T. and Masuda, T. (2012) Role of the G-box element in regulation of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis* roots, *Plant Signal Behav.* in press.
40. Legnaioli, T., Cuevas, J. and Mas, P. (2009) TOC1 functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought, *EMBO J.* 28, 3745-3757.
41. Gendron, J. M., Pruneda-Paz, J. L., Doherty, C. J., Gross, A. M., Kang, S. E. and Kay, S. A. (2012) *Arabidopsis* circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 3167-3172.
42. Richter, R., Behringer, C., Müller, I. K. and Schwechheimer, C. (2010) The GATA-type transcription factors GNC and GNL/CGA1 repress gibberellin signaling downstream from DELLA proteins and PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS, *Genes Dev.* 24, 2093-2104.
43. Hudson, D., Guevara, D., Yaish, M. W., Hannam, C., Long, N., Clarke, J. D., Bi, Y. M. and Rothstein, S. J. (2011) GNC and CGA1 modulate chlorophyll biosynthesis and glutamate synthase (GLU1/Fd-GOGAT) expression in *Arabidopsis*, *PLoS One* 6, e26765.
44. Naito, T., Kiba, T., Koizumi, N., Yamashino, T. and Mizuno, T. (2007) Characterization of a unique GATA family gene that responds to both light and cytokinin in *Arabidopsis thaliana*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1557-1560.
45. Chiang, Y. H., Zubo, Y., Tapken, W., Kim, H. J., Lavanway, A., Howard, L., Pilon, M., Kieber, J. and Schaller, G. E. (2012) Functional Characterization of the GATA Transcription Factors GNC and CGA1 Reveals Their Key Role in Chloroplast Development, Growth, and Division in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* in press.
46. Larkin, R. M. and Ruckle, M. E. (2008) Integration of

- light and plastid signals, *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 593-599.
47. Susek, R. E., Ausubel, F. M. and Chory, J. (1993) Signal transduction mutants of Arabidopsis uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development, *Cell* 74, 787-799.
  48. Mochizuki, N., Brusslan, J. A., Larkin, R., Nagatani, A. and Chory, J. (2001) Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2053-2058.
  49. Mochizuki, N., Tanaka, R., Tanaka, A., Masuda, T. and Nagatani, A. (2008) The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in Arabidopsis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15184-15189.
  50. Moulin, M., McCormac, A. C., Terry, M. J. and Smith, A. G. (2008) Tetrapyrrole profiling in Arabidopsis seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15178-15183.
  51. Strand, A., Asami, T., Alonso, J., Ecker, J. R. and Chory, J. (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX, *Nature* 421, 79-83.
  52. Woodson, J. D., Perez-Ruiz, J. M. and Chory, J. (2011) Heme synthesis by plastid ferrochelatase I regulates nuclear gene expression in plants, *Curr. Biol.* 21, 897-903.
  53. Inaba, T., Yazu, F., Ito-Inaba, Y., Kakizaki, T. and Nakayama, K. (2011) Retrograde signaling pathway from plastid to nucleus, *Int Rev Cell Mol Biol* 290, 167-204.
  54. Nott, A., Jung, H. S., Koussevitzky, S. and Chory, J. (2006) Plastid-to-nucleus retrograde signaling, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 739-759.
  55. Kakizaki, T., Matsumura, H., Nakayama, K., Che, F. S., Terauchi, R. and Inaba, T. (2009) Coordination of plastid protein import and nuclear gene expression by plastid-to-nucleus retrograde signaling, *Plant Physiol.* 151, 1339-1353.
  56. Ruckle, M. E., DeMarco, S. M. and Larkin, R. M. (2007) Plastid signals remodel light signaling networks and are essential for efficient chloroplast biogenesis in Arabidopsis, *Plant Cell* 19, 3944-3960.
  57. Papenbrock, J. and Grimm, B. (2001) Regulatory network of tetrapyrrole biosynthesis--studies of intracellular signalling involved in metabolic and developmental control of plastids, *Planta* 213, 667-681.
  58. Gibson, L. C., Willows, R. D., Kannangara, C. G., von Wettstein, D. and Hunter, C. N. (1995) Magnesium-protoporphyrin chelatase of Rhodospirillum rubrum: reconstitution of activity by combining the products of the bchH, -I, and -D genes expressed in Escherichia coli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 1941-1944.
  59. Reid, J. D. and Hunter, C. N. (2004) Magnesium-dependent ATPase activity and cooperativity of magnesium chelatase from Synechocystis sp. PCC6803, *J. Biol. Chem.* 279, 26893-26899.
  60. Ishijima, S., Uchibori, A., Takagi, H., Maki, R. and Ohnishi, M. (2003) Light-induced increase in free Mg<sup>2+</sup> concentration in spinach chloroplasts: measurement of free Mg<sup>2+</sup> by using a fluorescent probe and necessity of stromal alkalization, *Arch. Biochem. Biophys.* 412, 126-132.
  61. Usuda, H. (1988) Adenine Nucleotide Levels, the Redox State of the NADP System, and Assimilatory Force in Nonaqueously Purified Mesophyll Chloroplasts from Maize Leaves under Different Light Intensities, *Plant Physiol.* 88, 1461-1468.
  62. Gibson, L. C., Marrison, J. L., Leech, R. M., Jensen, P. E., Bassham, D. C., Gibson, M. and Hunter, C. N. (1996) A putative Mg chelatase subunit from Arabidopsis thaliana cv C24. Sequence and transcript analysis of the gene, import of the protein into chloroplasts, and in situ localization of the transcript and protein, *Plant Physiol.* 111, 61-71.
  63. Nakayama, M., Masuda, T., Bando, T., Yamagata, H., Ohta, H. and Takamiya, K. (1998) Cloning and expression of the soybean chlH gene encoding a subunit of Mg-chelatase and localization of the Mg<sup>2+</sup> concentration-dependent ChlH protein within the chloroplast, *Plant Cell Physiol.* 39, 275-284.
  64. Adhikari, N. D., Froehlich, J. E., Strand, D. D., Buck, S. M., Kramer, D. M. and Larkin, R. M. (2011) GUN4-porphyrin complexes bind the ChlH/GUN5 subunit of Mg-Chelatase and promote chlorophyll biosynthesis in Arabidopsis, *Plant Cell* 23, 1449-1467.
  65. Adhikari, N. D., Orlor, R., Chory, J., Froehlich, J. E. and Larkin, R. M. (2009) Porphyrins promote the association of GENOMES UNCOUPLED 4 and a Mg-chelatase subunit with chloroplast membranes, *J. Biol. Chem.* 284, 24783-24796.
  66. Davison, P. A., Schubert, H. L., Reid, J. D., Iorg, C. D., Heroux, A., Hill, C. P. and Hunter, C. N. (2005) Structural and biochemical characterization of Gun4 suggests a mechanism for its role in chlorophyll biosynthesis, *Biochemistry* 44, 7603-7612.
  67. Cornah, J. E., Roper, J. M., Pal Singh, D. and Smith, A. G. (2002) Measurement of ferrochelatase activity using a novel assay suggests that plastids are the major site of haem biosynthesis in both photosynthetic and non-photosynthetic cells of pea (Pisum sativum L.), *Biochem. J.* 362, 423-432.
  68. Jensen, P. E., Reid, J. D. and Hunter, C. N. (2000) Modification of cysteine residues in the ChlI and ChlH subunits of magnesium chelatase results in enzyme inactivation, *Biochem. J.* 352 Pt 2, 435-441.
  69. Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schürmann, P. and Buchanan, B. B. (2003) Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast

- thioredoxins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 370-375.
70. Ikegami, A., Yoshimura, N., Motohashi, K., Takahashi, S., Romano, P. G., Hisabori, T., Takamiya, K. and Masuda, T. (2007) The CHLI1 subunit of *Arabidopsis thaliana* magnesium chelatase is a target protein of the chloroplast thioredoxin, *J. Biol. Chem.* 282, 19282-19291.
71. Kobayashi, K., Mochizuki, N., Yoshimura, N., Motohashi, K., Hisabori, T. and Masuda, T. (2008) Functional analysis of *Arabidopsis thaliana* isoforms of the Mg-chelatase CHLI subunit, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1188-1195.
72. Luo, T., Fan, T., Liu, Y., Rothbart, M., Yu, J., Zhou, S., Grimm, B. and Luo, M. (2012) Thioredoxin redox regulates ATPase activity of magnesium chelatase CHLI subunit and modulates redox-mediated signaling in tetrapyrrole biosynthesis and homeostasis of reactive oxygen species in pea plants, *Plant Physiol.* 159, 118-130.
73. Stenbaek, A. and Jensen, P. E. (2010) Redox regulation of chlorophyll biosynthesis, *Phytochemistry* 71, 853-859.
74. Buchanan, B. B. and Balmer, Y. (2005) Redox regulation: a broadening horizon, *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 187-220.
75. Kobayashi, K., Baba, S., Obayashi, T., Sato, M., Toyooka, K., Keränen, M., Aro, E. M., Fukaki, H., Ohta, H., Sugimoto, K. and Masuda, T. (2012) Regulation of root greening by light and auxin/cytokinin signaling in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 24, 1081-1095.
76. Deng, X. W. and Quail, P. H. (1992) Genetic and phenotypic characterization of *cop1* mutants of *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 2, 83-95.
77. Chory, J. and Peto, C. A. (1990) Mutations in the DET1 gene affect cell-type-specific expression of light-regulated genes and chloroplast development in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 8776-8780.
78. Usami, T., Mochizuki, N., Kondo, M., Nishimura, M. and Nagatani, A. (2004) Cryptochromes and phytochromes synergistically regulate *Arabidopsis* root greening under blue light, *Plant Cell Physiol.* 45, 1798-1808.
79. Oyama, T., Shimura, Y. and Okada, K. (1997) The *Arabidopsis HY5* gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl, *Genes Dev.* 11, 2983-2995.

## Regulation of Chlorophyll Biosynthesis in Higher Plants

Koichi Kobayashi\*

Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

報告記事

第3回日本光合成学会（年会・公開シンポジウム）開催報告

シンポジウム・オーガナイザー：皆川 純（基礎生物学研究所）

シンポジウム・オーガナイザー：寺島 一郎（東京大学 大学院 理学系研究科）

第3回日本光合成学会（年会・公開シンポジウム）が、2012年6月1日~2日の2日間にわたって東京工業大学のすずかけホールで行われました。参加者は約190名で、懇親会には136名が参加しました。今回の公開シンポジウムは、初日に「光合成と藻類バイオテクノロジー」（皆川担当）、2日目に「植物とCO<sub>2</sub>」（寺島担当）を行いました。また、初日に各ポスターの発表者が1分間で概要を紹介しました（全51件）。2日目には、一般口頭発表6件も行われました。

シンポジウム「光合成と藻類バイオテクノロジー」では、昨今ブームの兆しもある真核藻類をとりあげました。光合成研究者が扱う

生物は、光合成細菌、シアノバクテリア、真核藻類、高等植物に大きく分けることができます。初期光合成反応の詳細な解析によく用いられる光合成細菌、分子生物学が高度に応用されるシアノバクテリア、そして我々の生活にもっとも身近な、そして食糧に直結する高等植物、これらと比較すると真核藻類の存在意義はやや曖昧でした。その真核藻類が、今、バイオ燃料等のプラットフォームとして注目されています。もともと真核藻類を用いて光合成関連分野の研究を行ってきた研究者は、高い藻類エンジニアリングの技術を用いて研究を展開しているにもかかわらず、そうした動きとはやや距離を置いてきました。しかし、「藻類を用いることで何をどこまで研究できるのか」議論してみる機会を持つべきではないかというねらいで、最先端で活躍されている研究者の方々にご講演いただきました。まず、京都大学の福澤秀哉先生に「緑藻クラミドモナスにおけるCO<sub>2</sub>の濃縮とセンシングならびに代謝変換」というタイトルで、真核藻類特有のCO<sub>2</sub>濃縮機構であるCCMの話をしていただきました。クラミドモナスは分子生物学、遺伝学技術が進んでいます。変異株の解析からみつかった包括的制御因子CCM1やその制御下の遺伝子、さらには解明が進む無機炭素の輸送体やリサイクル機構が紹介されました。同じくCCM機構について、次に関西学院大の松田祐介先生に「珪藻エンジニアリングによるCO<sub>2</sub>固定研究」というタイトルでお話いただきました。珪藻はゲノム情報を始め分子生物学ツールも揃いつつあり、また地球上のCO<sub>2</sub>固定の20%を担う重要な一次生産者です。緑藻とはまた異なる炭酸脱水酵素の分子レベルの解析などが紹介されました。次に、東京工業大学の田中寛先生に「紅藻シゾン*Cyanidioschyzon merolae*における代謝制御」についてご講演いただきました。ゲノム完全解読されたこの原始紅藻において急速に分子遺伝学手法が整いつつある状況やその応用について、またシゾンを使って進められているバイオマス生産が紹介されました。最後に中央大学の原山重明先生に「バイオエネルギー生産と藻類バイオテクノロジー」というタイトルで、企業とタッグを組んで展開されている緑藻*Pseudochoricystis*による軽油生産と、その品種改良についてお話いただきました。4人の

演者それぞれが真核藻類の最高峰の技術を駆使して研究を展開されていること、また扱っている藻類それぞれの特徴が良くわかるシンポジウムになったと思います。

6月2日の午前中におこなわれた「植物とCO<sub>2</sub>」では、まず寺島が、大気中のCO<sub>2</sub>濃度の上昇が植物におよぼす影響と、それに対する植物科学の取り組みを概観しました。光合成の基質であるCO<sub>2</sub>濃度の上昇は植物にとって都合のよいことのように思えます。しかし、産業革命以降の急速なCO<sub>2</sub>濃度上昇は、変異体が自然選択されるという「適応」によるCO<sub>2</sub>環境への適合が、まったく追いつけな



いスピードで起こっており、現生の植物は、まだ、最終氷期以降産業革命までの1万年以上にわたって260~280 ppmで安定していたCO<sub>2</sub>濃度に適応していると考えられます。しばらくCO<sub>2</sub>濃度の上昇が続くことはまず間違いないので、種々の手法によって、植物を高CO<sub>2</sub>条件に適合させる必要があります。まずこの分野のパイオニアである東北大学の牧野周先生に、「高CO<sub>2</sub>環境とC3光合成の窒素利用」というタイトルでお話いただきました。高CO<sub>2</sub>の効果のうち、最も重要な光合成のダウンレギュレーションのメカニズムがまだ解明



されていないこと、イネの葉の光合成のダウンレギュレーションにおけるRubisco量減少は葉の窒素含量の減少によるが、これは単純な窒素含量の希釈ではなく、根や葉鞘への積極的な窒素配分をとまなうことなどが、よくわかりました。ダウンレギュレーションの全貌の解明は今後の重要な課題です。また、超多収米品種「秋田63号」の、Free air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE)における3年間にわたる栽培実験の結果にもとづいて、高CO<sub>2</sub>環境下の増収の可能性についても言及していただきました。農業環境技術研究所の長谷川利拡先生には、「つくばみらいFACE 実験によるイネの高CO<sub>2</sub> 応答の検証」というタイトルで、1998年以来、雫石、そして、2009年からはつくばみらい市で行われているイネFACEについて解説していただきました。高CO<sub>2</sub>環境における、品種間差、施肥法などの栽培法の影響、加温処理や気孔閉鎖にとまなう高温の影響などが、生理学的、微気象学的、thermographyなどのリモートセンシング、モデリングなど多面的なアプローチを用いた学際的研究で徐々に解明されつつあることがよくわかりました。水田は、温室効果ガスであるメタンの発生源となっています。FACEでは、メタンの発生抑制についても研究が進められています。最後に、神戸大学の深山浩先生には「高CO<sub>2</sub> 環境に適したRubiscoの導入によるイネの光合成能力の改良」について話していただきました。自然界にもRubiscoキネティクスのvariationがあります。その傾向は、high kcat/high Km、low kcat/low Km というものです。CO<sub>2</sub>固定速度が高い酵素はCO<sub>2</sub>へのaffinityが低く、固定速度が低い酵素はaffinityが高いという顕著な傾向です。CO<sub>2</sub>濃縮機構をそなえたC4植物の酵素は典型的な high kcat/high Km タイプです。高温で育つC3植物は液相のCO<sub>2</sub>濃度が低くなるためか、low Km が選択され、低温で育つ植物では、液相のCO<sub>2</sub>濃度が十分に高いためか、high kcatが選択されます。高CO<sub>2</sub>環境では、Kmが問題になる場面が少なくなるので、イネのRubiscoをC4植物ソルガムのRubiscoに置き換える試みを紹介していただきました。葉緑体の形質転換を試みてはいるが、まだ難しいので、まず、核コードのsmall subunitを導入したところ、ハイブリッドRubiscoは見事にイネとソルガムの中間の性質を示すようになりました。高CO<sub>2</sub>環境下では、C4化よりもっと早い高効率化かもしれません。イネの葉緑体の形質転換法の早期確立が望まれます。いずれの講演に多くの質問の手があがり、質疑応答も活発なシンポジウムでした。



## 日本光合成学会特別賞「光と緑の賞」授賞式

本誌の4月号でもお知らせしましたように、第3回日本光合成学会年会において、日本光合成学会特別賞「光と緑の賞」の授賞式を執り行い、光合成酸素発生系「光化学系II反応中心複合体の立体構造」を決定された4名の方々に、日本光合成学会特別賞「光と緑の賞」を贈呈しました。

尚、ご都合により出席出来なかった、岡山大学の沈建仁先生には、事前に賞状と賞品を贈呈させて頂きました。

### 受賞者

梅名 泰史 (大阪市立大学 複合先端研究機構 特任准教授)

川上 恵典 (大阪市立大学 複合先端研究機構 特任准教授)

沈 建仁 (岡山大学大学院自然科学研究科 教授)

神谷 信夫 (大阪市立大学・複合先端研究機構 教授)

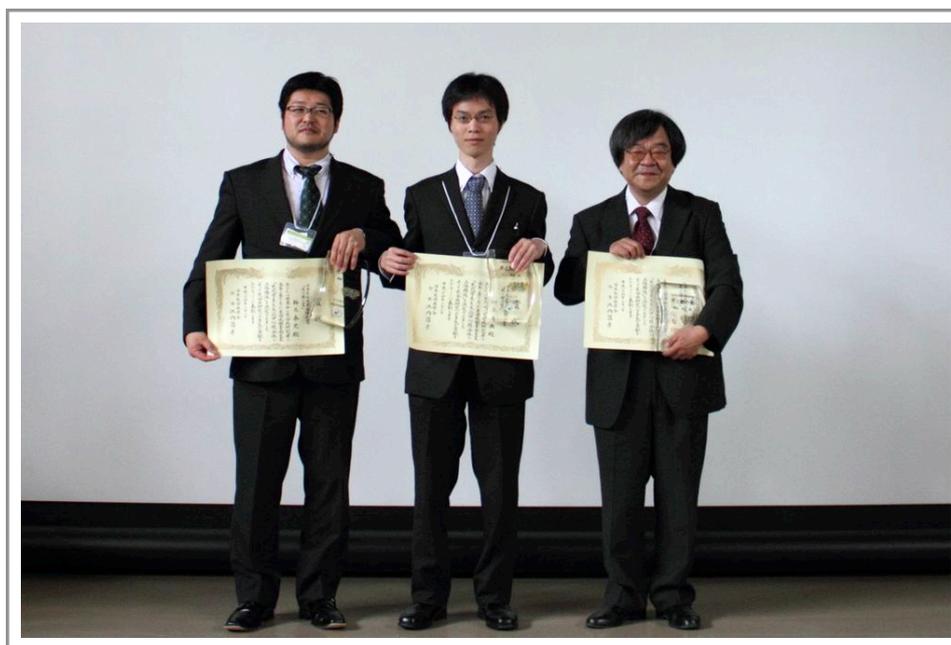
### 研究成果

「酸素発生光化学系IIの1.9 Å分解能における結晶構造」の決定

Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å

発表雑誌：Nature 473, 55–60 (05 May 2011)

Umena, Y., Kawakami K., Shen J.-R., Kamiya N.



日本光合成学会特別賞「光と緑の賞」受賞者の皆さん

## 報告記事

### 第3回日本光合成学会優秀ポスター賞受賞者

第3回の日本光合成学会シンポジウムにおける優秀ポスター賞は、参加者による投票の結果、以下の方々（五十音順）が受賞されました。今回は合計5名の受賞者が選ばれました。受賞者の方々の研究については、順次、「光合成研究」において、紹介していく予定です。

浅井 智広（名古屋大）

緑色硫黄細菌の光合成反応中心の部位特異的変異体：  
一次電子供与体P840周辺の水素結合構造の改変を例として

得平 茂樹（中央大学）

シアノバクテリアにおいてチオレドキシンの転写を制御するレドックス応答性

田島 直幸（東京大学）

単細胞紅藻チノリモ（*Porphyrisium purpureum*）の葉緑体ゲノム解析

溝上 祐介（東京大学）

葉肉コンダクタンス低下へのABAの関与

渡邊 麻衣（東京大学）

新規フィコビリソーム・光化学系I超複合体は窒素固定を駆動する



優秀ポスター賞受賞者の皆さん

（中央大学の得平さんをご都合により授賞式に出席されませんでした。）

## 報告記事

### 若手の会活動報告

#### ～第六回セミナー開催報告、第七回セミナー告知など～

東京大学 大学院 総合文化研究科

成川 礼

6月1-2日にかけて開催された日本光合成学会シンポジウムに合わせて、若手の会第六回セミナーも6月2日に東京工業大学にて開催し、40名近くの参加がありました。今回は人工光合成や生態学に関連した講演をしていただき、自己・研究紹介では、系外惑星における光合成の可能性について討論しました。内容の詳細は、佐藤諒一さん（東京工業大学）にご執筆いただいた参加報告記事をご覧ください。また、第七回セミナーも例年同様宿泊形式で10月に開催予定です。これまでは本郷キャンパスにて開催してきましたが、今年はフィールドでの観察活動も視野に入れて、温泉地での開催を企画中です。*Roseiflexus castenholtzii*という有名な光合成細菌が単離された微生物マットがある中房温泉を第一候補として、現在、日時などを検討しています。詳細が決まり次第、皆様にご連絡致します。モデル生物を材料としている研究者の皆様は、生物が生きている本来の現場を中々見ることができないと思います。このような機会を利用し、今後の研究活動にフィードバックしていただけることを期待しています。また、昨年同様、サイエンスアゴラにもエントリーしております。昨年の経験を踏まえ、より来場者の方々と対話的な交流ができるような出展を考えています。



セミナーの集合写真

## 光合成学会若手の会第六回セミナーに参加して

東京工業大学 大学院 生命理工学研究科

佐藤 諒一

平成24年6月2日に東京工業大学すずかけ台キャンパスにて光合成学会若手の会第六回セミナーが行われました。私にとって今回の若手の会は3回目の参加となりましたが、過去二回と変わらず、オープンで自由な雰囲気を持つ、活発なセミナーだと感じました。初めて参加したのは学部4年の時でしたが、光合成研究とはこんなにもさまざまな形があるのかと驚いた覚えがあります。あの当時と変わらず、若手の会のセミナーには様々な研究を行っている人々が参加しており、気軽かつ活発な議論がなされており、非常に良い刺激になると感じました。

今回のセミナーは人工光合成や生態をテーマに、2人の方にご講演いただきました。どちらの講演も私の専門からは離れていましたが、私の分かる範囲で報告させていただきます。

一つ目の講演は阿部竜先生（京都大学工学研究科）による「光合成を模倣した2段階励起型光触媒水分解系」についての発表でした。従来の光触媒水分解系は一種類の半導体を用いて紫外光により水の分解（酸素と水素の生成）を行うものでしたが、可視光を利用して水の分解を行えるものはあまり報告されていませんでした。これは紫外光に比べて可視光のエネルギーが低いことに起因するものですが、阿部先生のグループでは光合成のZ機構を模して二種類の半導体を組み合わせることにより、長波長の光を水分解に利用できることを初めて実証なさいました。発表では、二種類の半導体を組み合わせるに至った経緯や今後の光触媒水分解系の展望なども紹介され、中でも光触媒開発のための工夫や着眼点は興味深いものでした。光合成研究において、人工光合成は一つの大きなテーマであり私自身も興味がありましたが、私の中では光触媒は触媒化学のイメージが強く、あまり関連のない分野だと考えていました。しかし、今回の講演における触媒化学と光合成の組み

合わせは非常に印象的で、今後の自身の研究にも生かせる部分があるのではないかと考えさせられました。

二つ目の講演は柴加田知幸先生（瀬戸内海区水産研究所）による「赤潮鞭毛藻の日周鉛直移動」についての発表でした。微細藻類の増殖には栄養塩や光の確保が重要であるために、それらを豊富に含む場所を求めて種間競合が起こっています。そのような種間競合では各々の藻類が持つ様々な能力や生存戦略が重要だと考えられていますが、それらの現象を連続的に観察することはサンプリング等の問題で非常に難しく、報告例もほとんどありませんでした。柴加田先生のグループでは赤潮の原因ともなるラフィド藻シャットネラを材料に、鞭毛藻の持つ日周鉛直移動を実験室レベルで経時的かつ自動で観察するシステムを開発なさいました。発表では、このシステムを用いて得られた知見をもとに日周鉛直移動を引き起こすメカニズムや調節機構についても紹介され、実際の生育環境との関連性についても解説していただきました。今回紹介していただいた微細藻類が見せる様々な生存戦略は実に巧妙なものでしたが、「生態」に重点を置かなければ見えてこない部分だと感じました。普段扱っている生物の元々の生活環境や生存戦略に考えを巡らせることが重要であるとあらためて実感しました。

講演の後は、恒例の自己紹介と基礎生物学研究所の滝澤謙二先生による話題提供をもとにした自由討論が行われました。自己紹介では研究内容のほか、趣味や経歴、近況など個性とユーモアに溢れた内容でした。また、今回が初参加の方がいらっしゃるなど、まだまだコミュニティが広がっていることが感じられました。

自己紹介の後に行われた自由討論は非常に活気あるものになりました。話題を提供していただいたのは

基礎生物学研究所の滝澤謙二先生、テーマは「太陽系外惑星における光合成の可能性について」。初めはこんな雲をつかむような話どこまで議論できるのかとも思いましたが、ふたを開けてみれば実にサイエントイストらしい、熱い議論が繰り広げられました。全体的には、近年の研究で、系外惑星に関するいくつかの知見が得られるようになった事を受け、それらをもとに系外惑星における光合成の存在について議論をするというものでした。残念ながらすべての討論についてここで触れることはできませんが、各々のバックグラウンドから導かれる様々な推論や証明法等が飛び交い、楽しくも非常に印象深い討論でした。

「宇宙人はいるのか」子供の頃にこんな話に興奮を覚えた記憶があります。宇宙人の話はまさしく雲をつかむような話ではありましたが、地球以外の星で光合成が存在するのとなれば話は変わって来るようです。よもや光合成の研究が地球外生命体とこのような形で繋がっていくとは思いませんでしたが、非常に興味深い、夢のある話だと思いました。最後にこの場をお借りして、セミナーを主催していただき、本稿を執筆する機会を与えてくださいました会長の成川礼先生(東京大学)ならびに運営の皆さまに、深く御礼申し上げます。

## 集会案内

### Okayama University International Symposium Structure and Dynamics of Photosynthetic Systems

Okayama University is organizing an international symposium entitled “Structure and Dynamics of Photosynthetic Systems” on October 22-23, 2012, in Okayama, Japan. This symposium will focus on discussions on the structure, assembly, and dynamics of photosynthetic protein complexes including photosystem I, photosystem II, light-harvesting complexes, and related proteins, as well as their responses to various environmental stresses. The basis of our knowledge on these topics has been provided by the recent crystallographic analyses of Photosystem I and II super-complexes from cyanobacterial and chloroplast thylakoids. Importantly, this research area is now expanding beyond the basic science to various applications for innovative technologies, in particular in relation to approaches that may help to solve the environmental and energy problems that we face.

We have invited numerous internationally recognized scientists from all around the world as well as from Japan to discuss our current status and future perspectives of photosynthesis. We believe that this symposium will provide a wonderful occasion for all the scientists working in this field, in particular for young scientists, to gain new information, to communicate directly with each other, and to feel the dynamic progress of photosynthesis research.

We would cordially invite you to attend this international symposium to share the exciting moment of discussions at both the invited lectures and poster sessions.

Date of the symposium: October 22 (Monday)-23 (Tuesday), 2012

The venue: Okayama University, the 50th Anniversary Hall, Tshushima-naka, Kita-ku, Okayama city, Okayama, Japan.

Both the oral and poster sessions will be held in the same building.

No registration fee is required.

Invited speakers (confirmed):

E.J. Boekema (Univ. Groningen, Holand)	G. Brudvig (Yale Univ. USA)
G. Garab (Hungarian Academy of Science, Hungary)	M. Li (Chinese Academy of Sciences, China)
J. Messinger (Umeå univ., Sweden)	N. Nelson (Tel Aviv Univ., Israel)
P. Nixon (Imperial College, UK)	K.K. Niyogi (UC Berkeley, USA)
D.J. Rochaix (Univ. Geneva, Switzerland)	F.A. Wollman (CNRS, France)
L.-X. Zhang (Chinese Academy of Sciences, China)	M. Ikeuchi (Univ. Tokyo, Japan)
W. Sakamoto (Okayama Univ., Japan)	J.-R. Shen (Okayama Univ., Japan)
Y. Takahashi (Okayama Univ., Japan)	A. Tanaka (Hokkaido Univ., Japan)
T. Noguchi (Nagoya Univ., Japan)	Y. Yamamoto (Okayama Univ. Japan)
H. Wada (Univ. Tokyo, Japan)	

We invite you for poster presentations. The deadline for participation and presentations is September 1, 2012. For details, please see [http://www.okayama-u.ac.jp/en/tp/cooperation/inter\\_sympto.html](http://www.okayama-u.ac.jp/en/tp/cooperation/inter_sympto.html).

On October 21 (Sunday), public lectures on “Solar Energy and Photosynthesis” will be held at Okayama University. These lectures are open to the public, and the lecturers will highlight the general aspects of photosynthesis, as well as the recent progress of photosynthesis research.

“Solar Energy and Photosynthesis”

Date of the public lectures: October 21 (Sunday) , 2012, 14 : 00-16 : 30

The venue: Okayama University, the 50th Anniversary Hall, Tshushima-naka, Kita-ku, Okayama city, Okayama, Japan.

Lecture 1 : Prof. N. Nelson (Tel Aviv Univ., Israel): Life under the sun -

past, present and future (with Japanese translations)

Lecture 2 : Prof. J.-R. Shen (Okayama Univ., Japan): 光合成に学ぶ-未来 エネルギー源としての太陽光エネルギーの高効率人工利用

Organizing committee of the Okayama University International Symposium:

S. Yamamoto (Vice President, Okayama University)  
S. Takahashi (Dean of Faculty of Science, Okayama University)  
J.-R. Shen (Professor, Okayama University)  
Y. Takahashi (Professor, Okayama University)  
Y. Yamamoto (Professor, Okayama University)  
W. Sakamoto (Professor, Okayama University)  
M. Nishimura (Research associate, Okayama University)

Inquiry:

J.-R. Shen: [shen@cc.okayama-u.ac.jp](mailto:shen@cc.okayama-u.ac.jp)

Y. Takahashi: [taka@cc.okayama-u.ac.jp](mailto:taka@cc.okayama-u.ac.jp)

Y. Yamamoto: [yasusiya@cc.okayama-u.ac.jp](mailto:yasusiya@cc.okayama-u.ac.jp)

## 森のバランス－植物と土壌の相互作用－（森林立地学会編）

森林総合研究所

篠原 健司

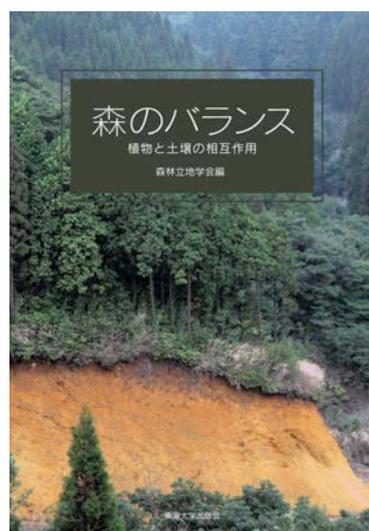
森林の物質循環を網羅した最新のガイドブックが、森林立地学会創立50周年を記念して、東海大学出版会から出版されました。「地球温暖化により森林はどうなるのか、土がなくても森は育つのか、森林は何回も繰り返し伐採できるのか、人類は将来にわたって森の恵みを受け取れるのか」という疑問を一般の方々から投げかけられますが、森林の物質循環のバランスを保つことが鍵を握っていると本誌はまとめています。

第I部は森林と環境についてまとめています。森林生態系の物質循環を調べることは、森林生態系の現状を理解し、将来を予測するための強力なツールになります。地球温暖化、大気汚染、熱帯林の減少など地球規模の環境変動のほか、里山や人工林の利用、都市緑化など身近な環境を具体例にとり、森林環境の変化や森林利用が生態系のバランスにどのように影響しているか解説しています。

第II部は森林の有機物動態についてまとめています。森林は陸上最大の有機物の貯蔵庫であり、地球全体の炭素収支に影響を及ぼしています。森林が分布する環境や土壌の特性、二酸化炭素を固定して有機物を蓄積する光合成など樹木の生理的メカニズム、落葉など枯死有機物の腐朽分解の仕組みなど、森林生態系の成立と炭素循環について解説しています。

第III部は森林生態系における主要な物質の循環についてまとめています。森林生態系の養分物質は気象学的、地理学的、あるいは生物学的な輸送によって流入したり、流出したりします。特に、水、炭素、窒素、リン、ミネラル、イオウ、重金属の循環のメカニズムを示し、個々の元素は単純に循環しているのではなく、生物を介してお互いに関わりを持って生態系を巡っていることを解説しています。

本誌は以上の三部構成からなり、森林生態系のバランスの全体像からその構成単位へという記述により、専門外の方にも理解しやすいように工夫されています。大学生や大学院生はもとより、先生方にもお勧めの解説書です。また、光合成を研究する皆様には、知識の整理に役立つと思います。是非、ご一読下さい。



## 事務局からのお知らせ

### ★入会案内

本会へ入会を希望される方は、会費（個人会員年会費：¥1,500、賛助法人会員年会費：¥50,000）を郵便振替（加入者名：日本光合成学会、口座番号：00140-3-730290）あるいは銀行振込（ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキュウと入力)、当座、0730290 名前：ニホンコウゴウセイガクカイ）にて送金の上、次ページの申し込み用紙、または電子メールにて、氏名、所属、住所、電話番号、ファックス番号、電子メールアドレス、入会希望年を事務局までお知らせください。

### ★会員名簿管理方法の変更と会費納入のお願い

学会の運営は、皆様に納めていただいております年会費によりまかなわれております。昨年度、会費滞納者を名簿から削除するの願いをいたしました。当該年度の会費が未納の場合、光合成研究が送られてくる封筒に、会費未納が印字されています。ご都合のつくときに、会費を納入下さい。1年間会費を滞納された場合、次年度よりお名前が会員名簿から削除され、光合成研究は届かなくなります。再入会される場合は、未納の分もあわせてお支払いいただきます。2011年1月に名簿の変更を行いましたので、複数年度の会費滞納者はおられなくなりました。会費納入状況などにつきましては、ご遠慮なく事務局（shikanai@pmg.bot.kyoto-u.ac.jp）までお問い合わせください。会員の皆様のご理解とご協力をお願い申し上げます。

## 日本光合成学会会員入会申込書

平成 年 月 日

日本光合成学会御中

私は日本光合成学会の趣旨に賛同し、平成 年より会員として入会を申し込みます。

]内に会員名簿上での公開承諾項目に○印をつけてください

] 氏名 (漢字) (必須)

氏名 (ひらがな)

氏名 (ローマ字)

] 所属

] 住所1

〒

] 住所2 (自宅の方または会誌送付先が所属と異なる場合にのみ記入)

〒

] TEL1

] TEL2 (必要な方のみ記入)

] FAX

] E-mail

個人会員年会費 1,500円 (会誌、研究会、ワークショップなどの案内を含む)

賛助法人会員年会費 50,000円 (上記と会誌への広告料を含む)

(振込予定日：平成 年 月 日) (会員資格は1月1日～12月31日を単位とします)

\* 複数年分の会費を先払いで振り込むことも可能です。その場合、通信欄に (何年度～何年度分) とお書き下さい。

### 連絡先

〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1

東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

池内・成川研究室 日本光合成学会

TEL: 03-5454-6641, FAX: 03-5454-4337

E-mail: photosyn@bio.c.u-tokyo.ac.jp

ホームページ: <http://photosyn.c.u-tokyo.ac.jp>

郵便振替口座 加入者名：日本光合成学会 口座番号：00140-3-730290

銀行振込の場合 ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキョウと入力)、当座、0730290

名前：ニホンコウゴウセイガツカイ

## 日本光合成学会会則

### 第1条 名称

本会は日本光合成学会（The Japanese Society of Photosynthesis Research）と称する。

### 第2条 目的

本会は光合成の基礎および応用分野の研究発展を促進し、研究者相互の交流を深めることを目的とする。

### 第3条 事業

本会は前条の目的を達成するために、シンポジウム開催などの事業を行う。

### 第4条 会員

#### 1. 定義

本会の目的に賛同する個人は、登録手続を経て会員になることができる。また、団体、機関は、賛助会員になることができる。

#### 2. 権利

会員および賛助会員は、本会の通信および刊行物の配布を受けること、本会の主催する行事に参加することができる。会員は、会長を選挙すること、役員に選出されることことができる。

#### 3. 会費

会員および賛助会員は本会の定めた年会費を納めなければならない。

### 第5条 組織および運営

#### 1. 役員

本会の運営のため、役員として会長1名、事務局長1名、会計監査1名、常任幹事若干名をおく。役員任期は2年とする。会長、常任幹事は連続して二期を越えて再任されない。事務局長は五期を越えて再任されない。会計監査は再任されない。

#### 2. 幹事

幹事数名をおく。幹事任期は4年とする。幹事の再任は妨げない。

#### 3. 常任幹事会

常任幹事会は会長と常任幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。常任幹事会は本会の運営に係わる事項を審議し、これを幹事会に提案する。事務局長と会計監査は、オブザーバーとして常任幹事会に出席することができる。

#### 4. 幹事会

幹事会は役員と幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。幹事会は、常任幹事会が提案した本会の運営に係わる事項等を審議し、これを決定する。

#### 5. 事務局

事務局をおき、事務局長がこれを運営する。事務局は、本会の会計事務および名簿管理を行う。

#### 6. 役員および幹事の選出

会長は会員の直接選挙により会員から選出される。事務局長、会計監査、常任幹事は会長が幹事の中から指名し、委嘱する。幹事は常任幹事会によって推薦され、幹事会で決定され

る。会員は幹事を常任幹事会に推薦することができる。

#### 第6条 総会

1. 総会は会長が招集し、出席会員をもって構成する。議長は出席会員から選出される。
2. 幹事会は総会において次の事項を報告する。
  - 1) 前回の総会以後に幹事会で議決した事項
  - 2) 前年度の事業経過
  - 3) 当年度および来年度の事業計画
3. 幹事会は総会において次の事項を報告あるいは提案し、承認を受ける。
  - 1) 会計に係わる事項
  - 2) 会則の変更
  - 3) その他の重要事項

#### 第7条 会計

本会の会計年度は1月1日から12月31日までとする。当該年度の経理状況は、総会に報告され、その承認を受ける。経理は、会計監査によって監査される。本会の経費は、会費および寄付金による。

#### 付則

- 第1 年会費は個人会員1,500円、賛助会員一口50,000円とする。
- 第2 本会則は、平成14年6月1日から施行する。
- 第3 本会則施行後第一期の会長、事務局長、常任幹事にはそれぞれ、第5条に定める規定にかかわらず、平成14年5月31日現在の会長、事務局担当幹事、幹事が再任する。本会則施行後第一期の役員および幹事の任期は、平成14年12月31日までとする。
- 第4 本会則の改正を平成21年6月1日から施行する。

#### 日本光合成学会の運営に関する申し合わせ

1. 幹事会：

幹事は光合成及びその関連分野の研究を行うグループの主催者である等、日本の光合成研究の発展に顕著な貢献をしている研究者とする。任期は4年とするが、原則として再任されるものとする。
2. 事務局：

事務局長の任期は2年とするが、本会の運営を円滑に行うため、約5期（10年）を目途に再任されることが望ましい。
3. 次期会長：

会長の引き継ぎを円滑に行うため、次期会長の選挙は任期の1年前に行う。
4. 常任幹事会：

常任幹事会の運営を円滑におこなうため、次期会長は常任幹事となる。

## 幹事会名簿

秋本誠志*	神戸大学大学院理学研究科	高市真一	日本医科大学生物学教室
池内昌彦	東京大学大学院総合文化研究科	高橋裕一郎	岡山大学大学院自然科学研究科
池上 勇	帝京大学	田中 歩	北海道大学低温科学研究所
泉井 桂	近畿大学生物理工学部生物工学科	田中 寛*	東京工業大学資源化学研究所
伊藤 繁	名古屋大学	民秋 均*	立命館大学総合理工学院
井上和仁	神奈川大学理学部	都筑幹夫	東京薬科大学生命科学部
白田秀明	帝京大学医学部	出羽毅久*	名古屋工業大学大学院工学研究科
榎並 勲	東京理科大学	寺島一郎	東京大学大学院理学系研究科
遠藤 剛*	京都大学大学院生命科学研究科	徳富(宮尾)光恵	農業生物資源研究所
大岡宏造	大阪大学大学院理学研究科		光合成研究チーム
大杉 立	東京大学大学院農学生命科学研究科	輒 達也	東京理科大学理学部
太田啓之	東京工業大学	仲本 準*	埼玉大学大学院理工学研究科
	バイオ研究基盤支援総合センター	永島賢治*	首都大学東京大学院理工学研究科
大友征宇*	茨城大学理学部	南後 守	大阪市立大学大学院理学研究科
大政謙次	東京大学大学院農学生命科学研究科	西田生郎	埼玉大学大学院理工学研究科
小川健一	岡山県農林水産総合センター	西山佳孝	埼玉大学大学院理工学研究科
	生物科学研究所	野口 巧	名古屋大学理学研究科
小野高明	茨城大学工学部生体分子機能工学科	長谷俊治	大阪大学蛋白質研究所
小俣達男	名古屋大学大学院生命農学研究科	林 秀則	愛媛大学
垣谷俊昭	名古屋大学		無細胞生命科学工学研究センター
菓子野康浩*	兵庫県立大学理工学部	原登志彦	北海道大学低温科学研究所
金井龍二	埼玉大学	彦坂幸毅	東北大学大学院生命科学研究科
神谷信夫*	大阪市立大学大学院理学研究科	久堀 徹	東京工業大学資源化学研究所
熊崎茂一*	京都大学大学院理学研究科	日原由香子*	埼玉大学大学院理工学研究科
栗栖源嗣*	大阪大学蛋白質研究所	檜山哲夫	埼玉大学
小池裕幸	中央大学理工学部	福澤秀哉	京都大学大学院生命科学研究科
小林正美	筑波大学大学院数理物質科学研究科	藤田祐一	名古屋大学大学院生命農学研究科
坂本 亘	岡山大学資源生物科学研究所	前 忠彦	東北大学
櫻井英博	早稲田大学	牧野 周	東北大学大学院農学研究科
佐藤和彦	兵庫県立大学	増田真二*	東京工業大学
佐藤公行	岡山大学		バイオ研究基盤支援総合センター
佐藤直樹	東京大学大学院総合文化研究科	増田 建	東京大学大学院総合文化研究科
佐藤文彦	京都大学大学院生命科学研究科	松浦克美	首都大学東京都市教養学部
鹿内利治	京都大学大学院理学研究科	松田祐介*	関西学院大学理工学部
重岡 成	近畿大学農学部	真野純一*	山口大学農学部
篠崎一雄*	理化学研究所植物科学研究センター	皆川 純	基礎生物学研究所
島崎研一郎	九州大学大学院理学研究院	宮下英明*	京都大学大学院地球環境学堂
嶋田敬三	首都大学東京	宮地重遠	海洋バイオテクノロジー研究所
白岩義博*	筑波大学生物科学系	村田紀夫	基礎生物学研究所
沈 建仁	岡山大学大学院自然科学研究科	山谷知行	東北大学大学院農学研究科
杉浦昌弘	名古屋市立大学	横田明穂	奈良先端科学技術大学院大学
	大学院システム自然科学研究科		バイオサイエンス研究科
杉田 護	名古屋大学遺伝子実験施設	和田 元	東京大学大学院総合文化研究科
杉山達夫	名古屋大学		
鈴木祥弘	神奈川大学理学部		
園池公毅	早稲田大学教育学部		

\*平成23年より新幹事

## 編集後記

夏学期の授業や試験、会議が終わった7月の最終週に、早めの夏休みをとり、家族で八丈島を訪れました。水平線を臨む海のパノラマに生命が誕生した原始海洋に思いを馳せたり、満点の星を見て地球外生命を想像したりと、十分に楽しんで参りました。島は濃い緑に包まれ、森の中を散策しても、樹木の幹や岩肌に地衣類やコケ、シダ類が茂る独特の生態系で、植物の旺盛な生命力を感じさせてくれました。また植物の緑色には、人の心を癒し、落ち着かせる効果があることを改めて感じました。さて今号では、この植物の緑色であるクロロフィルを中心とした解説特集「光合成を支えるテトラピロール代謝の多様性」を掲載しました。私の専門分野でもあるので、私が編集担当をしている間に一度はやりたいと暖めていた特集でした。お忙しい中にも関わらず、快く(?)本特集のGuest Editorをお引き受け頂き、編集の労をとって頂いた、北海道大学の田中亮一先生に心から感謝を申し上げます。手前味噌ながら、最新のテトラピロール研究が紹介され、代謝系の多様性と進化との関わりなど、これまでにない日本語の総説がまとまったのではないかと考えています。毎回、自転車操業を続けながらも、現編集体制での本誌の発行は残す1号のみとなりました。気を抜かずにゴールラインを切りたいと思います。

＜東京大学 増田 建＞

## 記事募集

日本光合成学会では、会誌に掲載する記事を会員の皆様より募集しています。募集する記事の項目は以下の通りです。

- トピックス：光合成及び関連分野での纏まりのよいトピックス的な記事。
- 解説：光合成に関連するテーマでの解説記事。
- 研究紹介：最近の研究結果の紹介。特に、若手、博士研究員の方々からの投稿を期待しています。
- 集会案内：研究会、セミナー等の案内。
- 求人：博士研究員、専門技術員等の募集記事。
- 新刊図書：光合成関係、または会員が執筆・編集した新刊図書の紹介。書評も歓迎いたします。

記事の掲載を希望される方は、会誌編集担当、増田 (ctmasuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp) まで御連絡下さい。

\*\*\*\*\*

「光合成研究」編集委員会

編集担当 増田 建 (東京大学)  
 発行担当 和田 元 (東京大学)  
 編集委員 栗栖源嗣 (大阪大学)  
 編集委員 野口 航 (東京大学)  
 編集委員 増田真二 (東京工業大学)

\*\*\*\*\*

日本光合成学会 2011-2012年役員

会長 池内昌彦 (東京大学)

事務局 鹿内利治 (京都大学)

常任幹事	田中 歩 (北海道大学)	(次期会長)
常任幹事	沈 建仁 (岡山大学)	(日本光生物学協会)
常任幹事	和田 元 (東京大学)	(会誌担当)
常任幹事	増田 建 (東京大学)	(会誌担当)
常任幹事	佐藤直樹 (東京大学)	(ホームページ担当)
常任幹事	寺島一郎 (東京大学)	(企画担当)
常任幹事	西田生郎 (埼玉大学)	(企画担当)
常任幹事	小林正美 (筑波大学)	(企画担当)
常任幹事	原登志彦 (北海道大学)	(企画担当)
常任幹事	牧野 周 (東北大学)	(企画担当)
常任幹事	伊藤 繁 (名古屋大学 名誉教授)	(企画担当)
常任幹事	太田啓之 (東京工業大学)	(企画担当)
常任幹事	皆川 純 (基礎生物学研究所)	(企画担当)

会計監査 田中 歩 (北海道大学)

\*\*\*\*\*

光合成研究 第22巻 第2号 (通巻64号) 2012年8月31日発行

日本光合成学会

〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1

東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

池内・成川研究室 日本光合成学会

TEL: 03-5454-6641, FAX: 03-5454-4337

E-mail: photosyn@bio.c.u-tokyo.ac.jp

ホームページ: <http://photosyn.c.u-tokyo.ac.jp>

郵便振替口座 加入者名: 日本光合成学会 口座番号: 00140-3-730290

銀行振込の場合 ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキュウと入力)、当座、0730290

名前: ニホンコウゴウセイガッカイ