

# 光合成研究

第 26 卷 第 3 号 (通巻 77 号) 2016 年 12 月  
NEWS LETTER Vol. 26 NO. 3 December 2016

THE JAPANESE SOCIETY OF PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

---

解説	チラコイド構造の多様性と生理学的意義	横山 諒 鹿内 利治 (京都大)	168
研究紹介	色素合成酵素の活性解析から考察する緑色硫黄細菌のアンテナ系クロロフィル生合成経路	寺村 美里 (立命館大)	183
解説特集	「光合成色素代謝と光化学系構築のダイナミックな関係」		
序文		田中 亮一 (北海道大) 柏山 祐一郎 (福井工業大)	191
解説	クロロフィル色素類の合成系の進化	塚谷 祐介 (東京工業大)	192
解説	酸素パラドクスの統御で収斂するクロロフィル生合成と窒素固定	藤田 祐一 辻本 良真 (名古屋大)	204
解説	光合成生物におけるカロテノイド合成系の進化	高市 真一 (日本医科大)	216
解説	クロロフィル代謝による光化学系の合成、分解の制御	伊藤 寿 (北海道大)	222
報告記事	第 17 回国際光合成学会~Photosynthesis in a Changing World~参加報告 -Are You Challenging Yourself?	神保 晴彦 (埼玉大)	233
報告記事	Finnish-Japanese Symposium 2016: Integration of Photosynthesis with Cellular Metabolism: Towards Sustainable Bioeconomy 参加報告	小川 敬子 (早稲田大)	235
報告記事	若手の会活動報告~第 13 回セミナーの開催、サイエンスアゴラ 2016 での出展	浅井 智広 (立命館大)	236
報告記事	サイエンスアゴラ 2016 出展報告「光合成をもっと知ろう!~光合成が支える私たちの暮らし~」	辻 敬典 (関西学院大) 浅井 智広 (立命館大)	237
報告記事	若手の会活動報告~第 13 回セミナーの開催~	清水 隆之 (東京工業大)	239
事務局からのお知らせ			240
日本光合成学会会員入会申込書			241
日本光合成学会会則			242
幹事会名簿			244
編集後記・記事募集			245
「光合成研究」編集委員・日本光合成学会 2016 年度役員			246
賛助法人会員広告			

---

## チラコイド構造の多様性と生理学的意義<sup>§</sup>

京都大学 大学院理学研究科

横山 諒\* 鹿内 利治

チラコイドは、葉緑体やシアノバクテリアに観察される膜構造体であり、光合成電子伝達の“場”として機能している。これまで多くの光合成生物におけるチラコイド構造が顕微鏡により観察され、その多様性や光環境に応じたダイナミックな構造変化が報告されてきた。一方で、特定のチラコイド構造をとる生理学的意義や、その構築に関わる分子機構については、最近になってようやくその一端が明らかになりつつある。本稿では、筆者らが最近報告した新規シロイヌナズナタンパク質 RIQ の解析結果<sup>1)</sup>も交えながら、現在までに明らかとなっているチラコイド構造の構築機構を中心に、その多様性と生理学的意義について紹介したい。

### 1. はじめに

チラコイドは、酸素発生型原核光合成生物や、真核光合成生物の葉緑体内に観察される袋状の膜構造体であり、細胞内共生以後も高度に保存されてきた“光合成の場”である。チラコイド膜は脂質・タンパク質・低分子有機化合物を主要構成成分とする。脂質は、ガラクト脂質のモノガラクトシルジアシルグリセロール (Monogalactosyldiacylglycerol; MGDG) とジガラクトシルジアシルグリセロール (Digalactosyldiacylglycerol; DGDG)、含硫脂質のスルホキノボシルジアシルグリセロール (Sulfoquinovosyldiacylglycerol; SQDG)、リン脂質のホスファチジルグリセロール (Phosphatidylglycerol; PG) の4種によって構成され、特にガラクト脂質は MGDG、DGDG の2種で全チラコイド膜脂質の7割以上を占める<sup>2)</sup>。チラコイド膜上には光化学系 II・I (PSII・PSI)、シトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体 (Cyt *b<sub>6</sub>f*)、ATP 合成酵素 (ATPase) などのタンパク質で構成された光合成装置が存在する。電子伝達によってチラコイド内腔 (ルーメン) に放出されたプロトンは、ルー

メンと外界 (葉緑体の場合はストロマ、シアノバクテリアの場合は細胞質) との間にプロトン駆動力を生み出し、最終的には ATPase により ATP 合成の際に解消される<sup>3,4)</sup>。脂質・タンパク質以外にも様々な低分子有機化合物がチラコイド膜内に存在し、例えばプラストキノンは電子輸送体のプールとして光合成装置間の電子伝達を仲介する<sup>5)</sup>。これら以外にも抗酸化作用を持つトコフェロールなどの二次代謝物質がチラコイド膜に含まれている<sup>6)</sup>。

チラコイド構造は電子顕微鏡の発達とともに、その構造が詳細に観察されてきた。特に透過型電子顕微鏡は現在の葉緑体研究においても頻繁に用いられ、シアノバクテリアから陸上植物における多様なチラコイド構造が明らかになっている。近年は同一視野の電子顕微鏡画像をコンピューター内で3次元再構築するトモグラフィ解析や、微小な探針と試料の間に働く原子間力を測定する原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope; AFM) が発達してきており、チラコイド構造をより高分解能で立体的に観察し、チラコイド膜上にあるタンパク質複合体の *in situ* の配置や立体構造までもが解析可能になっている<sup>7-10)</sup>。チラコイド構造の観察技術が飛躍的に進歩している一方、「チラコイド構造がなぜ光合成生物に存在し、なぜ生物種間で多様化しているのか」というチラ

<sup>§</sup>第6回日本光合成学会シンポジウム ポスター発表受賞論文

\*連絡先 E-mail: r.yokoyama@pmg.bot.kyoto-u.ac.jp

コイド構造の存在意義に関して、多くの研究者が推察してきたが、それが実証された例は決して多くない。チラコイド膜は多くの光合成電子伝達複合体が局在するが故、“電子伝達の間”として、そしてプロトン駆動力を生み出すストロマ(もしくは細胞質)とルーメンの間の“境界膜”として、重要な機能を果たすということは想像に難くない。しかし、近年盛んに研究されている非光化学的消化 (Non-photochemical Quenching; NPQ) やステート遷移といった光合成の制御機構にチラコイド構造がどのように関わっているかは、解明が求められている命題の一つである<sup>11)</sup>。そして、基本的な光合成装置のセットは高度に保存されているにも関わらず、生物種間でチラコイド構造が多様化しているという事実は、それぞれの生物で見られるチラコイド構造が何らかの生理学的意義を有していることを暗示している<sup>12)</sup>。

チラコイド構造の構築に関わる分子機構は、光合成の基本反応や調節に関わるものと比べて理解が進んでいないのが現状である。光合成電子伝達の基本経路となるZスキームは既に1960年には提唱され<sup>13)</sup>、1990年代後半からはクロロフィル蛍光イメージングを用いた正遺伝学的アプローチにより、光合成の制御や光合成装置の合成に関わるタンパク質が次々と同定された<sup>14,15)</sup>。一方で、チラコイド構造の解析は未だに電子顕微鏡というロスループットな技術に頼っているため、正遺伝学的手法がチラコイド研究に取り込めずにいる。それでも、他の目的で行っている研究の過程でチラコイド構造構築に異常のある変異体が複数単離されてきた。

本稿では、現在までに明らかとなっているチラコイド構造の構築に関わる因子について陸上植物シロイヌナズナにおける研究を中心に紹介するとともに、各生物におけるチラコイド構造の多様性と現在までに明らかとなっているその機能についてまとめる。

## 2. チラコイド構造構築における脂質の役割

陸上植物におけるチラコイド合成は、葉緑体の分化とともに協調的に進行する(図1A)。シロイヌナズナでは分裂組織の細胞に含まれる未分

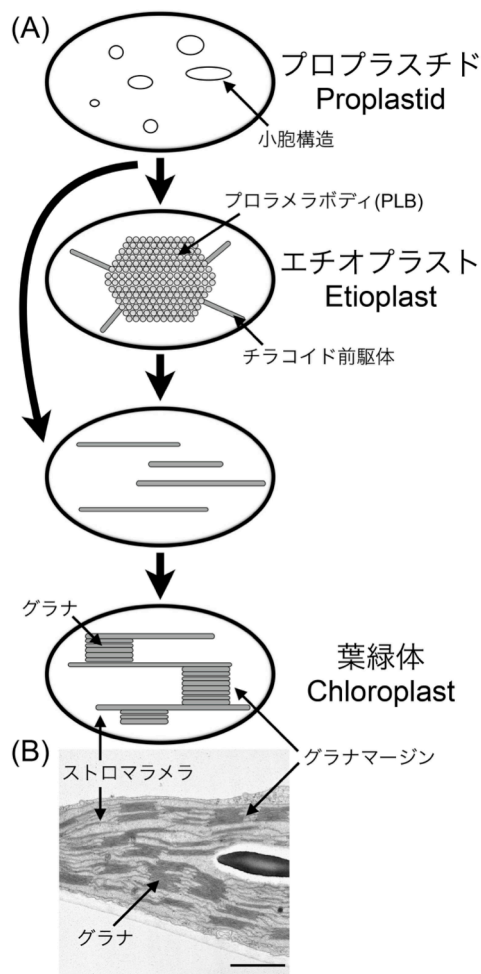


図1. 陸上植物における葉緑体の分化機構と構造 (A) 色素体分化時におけるプロプラスチド、エチオプラスチドおよび葉緑体の模式図。(B) 長日条件下 (16 時間明期/8 時間暗期、50  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で発芽後約 4 週間生育させたシロイヌナズナ野生型における葉緑体の透過型電子顕微鏡写真図。Bar=1  $\mu\text{m}$ 。未発表。

化な原色素体 (プロプラスチド) から、明所では葉緑体 (クロロプラスチド) に直接分化し、暗所においてはエチオプラスチドを経て、葉緑体へと分化する<sup>16)</sup>。未分化な原色素体では微細な膜小胞が観察され、光合成装置はほぼ存在しない<sup>17)</sup>。暗所におけるエチオプラスチド内には、テトラピロール代謝系の中間産物と代謝酵素 (特にクロロフィル a の前駆体となるプロトクロロフィリドと、その還元酵素であるプロトクロロフィリドレダクターゼ (Protochlorophyllide Reductase; POR)) が密に詰まった半結晶構造が中央部に存在し、プロ

ラメラボディ (Prolamellar Body; PLB) と呼ばれている<sup>17)</sup>。それ故、プロトクロロフィドを合成できない変異体では PLB は観察されない<sup>18)</sup>。PLB からはチラコイドの前駆構造体が伸びており、ほぼ完成形のシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体と ATPase が存在し、PSI サイクリック電子伝達を仲介する NADH デヒドロゲナーゼ様 (NADH dehydrogenase-like; NDH) 複合体も PSI に結合していない状態で既に合成されている<sup>19-21)</sup>。一方、この時点で PSII はアセンブリ過程の途中で停止し、PSI の合成はほとんど進んでいない<sup>22)</sup>。光が照射されると 1 時間から 1 日をかけて、POR によるクロロフィル合成の促進と共に PLB の分解が進み、同時にチラコイド前駆体の合成が加速されていく<sup>23)</sup>。チラコイド前駆体の合成が完了する際には PSII と PSI の合成も完了し、1 本 1 本のチラコイド前駆体の一部は重層してグラナ構造 (後述) を形成する<sup>23)</sup>。

チラコイド膜に最も多く蓄積される脂質である MGDG は、ジアシルグリセロール (Diacylglycerol; DAG) に 1 分子のガラクトースが転移されることで合成される。この転移反応を触媒する MGDG 合成酵素 (MGDG synthase; MGD) はシロイヌナズナにおいて 3 つの遺伝子によりコードされており、光合成器官における MGDG 合成は主に MGD1 が担う<sup>24)</sup>。その為、この遺伝子のシロイヌナズナノックダウン変異体 *mgd1-1* はチラコイド膜の量が減少し、ノックアウト変異体 *mgd1-2* はチラコイド合成を含めた葉緑体の分化全体が著しく阻害された<sup>25,26)</sup>。一方、2 番目にチラコイド膜に多く含まれる DGDG は、MGDG にもう 1 分子のガラクトースが DGDG 合成酵素 (DGDG synthesis; DGD) によって付加されることで合成される。シロイヌナズナゲノムにコードされている *DGD1*、*DGD2* 遺伝子のうち、*DGD1* が MGD1 とともにチラコイド膜合成を担っている<sup>27)</sup>。*dgd1* 変異体ではチラコイド膜が著しく湾曲するが、チラコイド膜自体は合成される<sup>28)</sup>。PG もチラコイド構造の構築に重要な役割を果たしており、PG の合成に関わる酵素を欠損したシロイヌナズナ変異体はチラコイド膜がほぼ合成されず、代わりに未分化な色素体に見られるような

小胞状の構造体が観察される<sup>29,30)</sup>。一方、シロイヌナズナにおいては SQDG の合成を欠損した変異体ではチラコイド構造に明確な異常は確認できない<sup>31)</sup>。クラミドモナスでの SQDG 欠損株は逆にチラコイド構造が大きく歪むことから、陸上植物におけるチラコイド構造の構築に対する SQDG の寄与は低いかもしれない<sup>32)</sup>。これらチラコイド膜の合成に必要な脂質合成は、基本的に葉緑体の分化と協調して進行する。特にチラコイド膜合成が盛んなエチオプラストから葉緑体への脱黄化 (緑化) 時には、光合成装置や色素の合成を司る遺伝子群と共に脂質合成に関わる遺伝子も発現が上昇する。これら協調的な遺伝子の発現制御は、核-色素体間のプラスチドシグナルによって仲介されている<sup>33)</sup>。チラコイド合成および葉緑体分化における脂質の役割の詳細については、小林康一博士執筆の光合成研究の解説記事を御覧いただきたい<sup>34)</sup>。

### 3. チラコイド構造構築における Vipp1 タンパク質の役割

チラコイド膜合成における脂質合成酵素について興味深いのは、脂質合成酵素の全てが色素体包膜に局在することである。「包膜で合成された脂質はどのようにしてチラコイドに供給されてくのだろうか」という問はこれまで多くの光合成・葉緑体研究者を惹きつけてきた課題である<sup>12)</sup>。一つの可能性は、内包膜とチラコイド膜が一部融合し、包膜からチラコイド膜へ直接脂質が輸送されるルートである。通常の透過型電子顕微鏡の二次元写真では包膜とチラコイド膜の結合は確認されないが、葉緑体の 3D トモグラフィー解析によりチラコイドと包膜の結合が観察された<sup>7)</sup>。しかし、この結合が本当に包膜-チラコイド間の脂質供給に役立っているのかの証拠は得られていない。

有力な可能性は、包膜で合成された脂質が小胞でチラコイドまで運ばれるという説である<sup>12)</sup>。脂質の小胞輸送に関わると想定されているのが、Vesicle-Inducing Protein in Plastids 1 (Vipp1) である<sup>35)</sup>。Vipp1 は膜貫通領域を持たない分子量約 30 kDa のタンパク質であり、葉緑体内包膜とチラコ



イドに局在する。それ故、Vipp1 は inner membrane-associated protein of 30 kDa (IM30)とも呼ばれる<sup>36)</sup>。シロイヌナズナ *vipp1* ノックダウン変異体は低温処理で誘導される小胞の形成能を欠き、チラコイドの合成に異常をきたすことから、包膜からチラコイドへの脂質の輸送に必要な小胞の形成に関わっていることが提唱された<sup>37)</sup>。Vipp1 は、タンパク質中央部に存在する $\alpha$ ヘリックス領域でリング状の多量体を形成する<sup>38)</sup>。大腸菌のホモログである Phage Shock Protein A (PspA)も同様の構造をとり、N 末端領域の $\alpha$ ヘリックスは PG と結合することが既に明らかとなっていたことから、Vipp1 も包膜やチラコイド膜において脂質と結合して膜構造の維持に関わっていることが想定されてきた<sup>39,40)</sup>。ドイツの Schneider らのグループは、チラコイド膜を模したリポソームを用い、マグネシウムイオン存在下で Vipp1 タンパク質が酸性脂質である PG と SQDG に結合し、膜を一時的に不安定化させることで膜同士の融合を引き起こすことを実証した<sup>41)</sup>。しかし、この機能は人工的なリポソームを用いて示されたものであり、*in vivo* 環境で小胞の形成とチラコイド膜への融合を引き起こすのかはさらなる研究が必要である<sup>35)</sup>。また Vipp1 タンパク質はシアノバクテリアにも高度に保存されており、シロイヌナズナと同様にシアノバクテリア *vipp1* ノックダウン変異体は深刻なチラコイド構造の異常を示すことから、Vipp1 タンパク質の機能は生物種間で高度に保存され、チラコイド構造の構築に重要な役割を果たしていることがわかる<sup>42)</sup>。

1972 年に発見されたシアノバクテリア *Gloeobacter violaceus* はチラコイド構造の進化を考察する上で重要な生物である。*G. violaceus* は光化学系を用いて他のシアノバクテリアと同様の酸素発生型光合成を行うことができるにも関わらず、チラコイド構造を持っていない種であり、光化学系などは細胞膜に存在する<sup>43)</sup>。興味深い点は、チラコイド構造構築に重要な役割果たす *Vipp1* 遺伝子が *G. violaceus* のゲノム上には存在しないことである<sup>44)</sup>。この生物が、シアノバクテリアがチラコイド構造を獲得する以前の祖先

的な種なのか、一度チラコイド構造を獲得した後に二次的にチラコイド構造を失った種なのかは現在まで明らかにされていないが、*Vipp1* 遺伝子とチラコイド構造の有無に相関があることから、チラコイド構造の起源を考察する上で重要な種であることは間違いない。

#### 4. チラコイド構造構築におけるイオンの役割

近年葉緑体における  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  や  $Mn^{2+}$  などのカチオン、 $Cl^-$  などのアニオンの恒常性に関わるトランスポーターなどが次々と同定され、光合成などの葉緑体機能の制御に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある<sup>45-51)</sup>。中でも  $Mg^{2+}$  はチラコイド構造の安定化に重要な役割を果たしていることが古くから知られており、それ故チラコイドを単離する緩衝溶液にはチラコイド膜安定化のために  $Mg^{2+}$  を入れることが多い。暗条件下でのストロマ内  $Mg^{2+}$  濃度は 0.5 mM だが、光を当てると最大 5 mM ほどまで上昇することが知られている<sup>52)</sup>。この上昇は細胞質及びブルーメンからストロマへの  $Mg^{2+}$  の流入によるものである<sup>53)</sup>。細胞質からストロマへの  $Mg^{2+}$  の流入は、バクテリアから真核生物まで広く保存される  $Mg^{2+}$  トランスポーターファミリー CorA に属している包膜局在の Magnesium Transporter 10 (MGT10) によって仲介されている<sup>54,55)</sup>。一方で、ルーメンからストロマへの  $Mg^{2+}$  の輸送を担うトランスポーターは未だ同定されていない。 $Mg^{2+}$  がどのようにしてチラコイド構造の安定化に寄与しているのかは長年謎であったが、前述の通り Vipp1 タンパク質の機能が  $Mg^{2+}$  の有無によって制御されていることから、ストロマ内の  $Mg^{2+}$  濃度が上昇することにより膜同士が融合し、チラコイド構造を頑丈にしていることが考えられる<sup>35,41)</sup>。しかし  $Mg^{2+}$  はチラコイド構造の安定化以外にも、ルビスコの活性化やクロロフィル合成に必須であるため、ストロマ内の  $Mg^{2+}$  濃度を変えることは植物の生育に大きな影響をもたらす可能性が高く、変異体を用いた  $Mg^{2+}$  濃度の攪乱によるチラコイド構造への影響は解析するのが難しいのが現状である<sup>52)</sup>。

Mg<sup>2+</sup>以外のイオントランスポーターを欠損したいくつかの変異体もチラコイド構造が歪むことが報告されている。チラコイド膜において K<sup>+</sup>の輸送を担う Tandem-pore K<sup>+</sup> 3 (TPK3)チャネルのノックダウン変異体では、チラコイド膜同士の結合が緩み、チラコイド膜が波打つ構造が観察された<sup>45)</sup>。またチラコイド膜局在の Voltage-dependent Cl<sup>-</sup> Channel (VCCN1)の変異体では、チラコイド膜が湾曲しバナナのような形をしたチラコイド構造が頻繁に観察された<sup>50)</sup>。これらのトランスポーター変異体におけるチラコイド構造の変化は、ストロマ/ルーメンにおける浸透圧差の異常、もしくはイオンバランスが崩れた結果二次的に葉緑体内の Mg<sup>2+</sup>濃度が変化したことが原因ではないかと推察される。

## 5. チラコイド構造構築における LHCII の役割

シロイヌナズナを含む陸上植物の葉緑体には、チラコイドが数枚から十数枚層状に重なったグラナと、層状には重なっていないストロマラメラと呼ばれる構造が存在し、それぞれの領域には PSII と PSI が偏在する (図 1B)。このような光化学系の分布の違いは Lateral heterogeneity と呼ばれ、各チラコイド画分の生化学的分離や免疫電子顕微鏡法により発見された<sup>4)</sup>。グラナ構造は基部陸上植物に位置する苔類ゼニゴケの葉緑体にも観察されるが、クラミドモナスやシアノバクテリアのチラコイドは重なったとしても数枚程度であり、陸上植物のようなグラナ構造は観察されない<sup>12,56)</sup>。グラナ領域には、PSII と集光アンテナタンパク質 (Light-harvesting Complex II; LHCII) からなる超複合体が密集しており、その分子間・分子内のタンパク質配置は電子顕微鏡や AFM により観察が可能である<sup>4,57)</sup>。グラナ構造が発見されて以降、多くの研究者は「なぜ、どのようにしてグラナではチラコイドが重なるのか」という問いに答えを出そうとしてきた。

グラナには多量の LHCII が存在することから、LHCII がチラコイド膜間の接着を担っているという考えが、1980 年代からある<sup>58)</sup>。この仮説は、LHCII 三量体の表面電荷を変える実験から、正電

荷を帯びている LHCII の N 末端が、反対側の膜に局在する LHCII の負電荷を帯びた領域と非特異的に相互作用することにより、チラコイド膜同士が接着するという機構によって説明された<sup>59)</sup>。またチラコイド膜接着における LHCII の重要性は、チラコイドに局在する LHCII の量や性質を *in vivo* で操作することでも実証されてきた。エンドウの Lhcb1 を恒常的に発現させた形質転換タバコ、および内在性 LhcbM を過剰蓄積させたクラミドモナスでは、チラコイド膜の重層が増加した<sup>60,61)</sup>。シロイヌナズナにおいて、クロロフィル *b* 合成酵素を欠くため Lhcb1, 2, 3, 4, 6 の蓄積が激減する *chlorina* 変異体と *lhcb5* 変異体の二重変異体では、チラコイド膜の重層が弱くなっていた<sup>62)</sup>。これらの結果は、LHCII の蓄積量とチラコイド膜のスタッキングに正の相関があることを示唆している。また、シロイヌナズナを葉緑体の翻訳阻害剤であるリンコマイシン存在下で一定期間生育させると、葉緑体ゲノムにコードされた PSII サブユニットを合成できないため、PSII 蓄積量が激減する。一方、LHCII 遺伝子は核コードであり正常に蓄積するため、LHCII/PSII 比が高くなる。このリンコマイシン処理植物では最大 100 枚以上のチラコイドが重層したグラナが観察されるほど、グラナ構造が極端に発達していた<sup>63)</sup>。一方で、PSII を欠くが LHCII は蓄積することができる *high chlorophyll fluorescence 136 (hcf136)* 変異体は、グラナを構成するチラコイドが楕円状に広がり、かつチラコイドのスタッキングが強化されていた<sup>64)</sup>。また、LHCII のアイソフォーム間でもチラコイドスタッキングへの寄与の程度は異なる。シロイヌナズナ Lhcb1 をノックダウンするとグラナ領域に含まれるチラコイドが減少するのに対し、Lhcb2 ノックダウン株では変わらない。このことは、チラコイドのスタッキングには Lhcb2 よりも Lhcb1 の方が重要な役割を果たしていることを示唆している<sup>65)</sup>。

LHCII の機能を制御する因子もチラコイド構造の構築に関わる。pale green の表現型を示す *grana-deficient chloroplast 1/ LHCP translocation defect (gdc1/ltd)* 変異体の葉緑体では、チラコイドは合成されるが、それらが結合せずにグラナ構造

を欠く。GDC1/LTD タンパク質は葉緑体包膜からチラコイドへの LHCII の輸送に関わり、変異体では特に LHCII の三量体化が阻害されることよりグラナ構造が形成されない<sup>66,67)</sup>。Thylakoid Formation 1 (THF1)を欠いた変異体の葉は斑入りになり、葉緑体内には正常なチラコイド構造の代わりに小胞構造が増え、PSII の量も減少する<sup>68,69)</sup>。THF1 と同様にチラコイドの小胞構造に関わると想定されるのが、チラコイドに局在するジスルフィドイソメラーゼ Snowy Cotyledon 2/CYO1 (SCO2/CYO1)である。シロイヌナズナ *sco2/cyo1* 変異体の子葉はアルビノであり、暗所で生育させた変異体のエチオプラストは野生型と変わらないが、明条件で光形態形成を促進させた変異体の子葉ではチラコイド膜は合成されず、代わりに小胞構造が観察される<sup>70,71)</sup>。興味深いのは THF1、SCO2/CYO1 の両者は LHCII と相互作用することが明らかとなっている点である<sup>69,71)</sup>。しかし、LHCII との相互作用がどのようにチラコイド合成における小胞輸送に関わっているのか、その詳細な機構は不明のままである。

LHCII は PSII とともにグラナ領域において超複合体を形成しているが、その機能やチラコイド膜における動態はしばしばリン酸化・脱リン酸化反応によって制御されている<sup>4,11)</sup>。PSII 及び PSI はそれぞれ異なる吸収波長をもつため、両光化学系における励起バランスの不均衡は、電子伝達速度の低下や活性酸素生成の原因となる。そのため、PSI が過励起されたステート 1 (プラストキノンプールが酸化状態) では流動的な LHCII が PSII に結合し、逆に PSII が過励起されたステート 2 (プラストキノンプールが還元状態) では流動的な LHCII が PSI に結合し、両光化学系のアンテナサイズを調節することで励起バランスを制御する<sup>11)</sup>。ステート 1 からステート 2 への移行時には、プラストキノンプールの還元状態に依存して STN7 と呼ばれるリン酸化酵素が LHCII ストロマ突出領域をリン酸化し、膜状における流動性が上がることで、その一部は PSI に結合する<sup>72)</sup>。また、PSII のサブユニット (主に D1、D2、CP43、PsbH) のストロマ突出領域をリン酸化する酵素として STN8 も同定されており、こちらも PSII

複合体の流動性制御に関わることで、光環境への順応を促進している<sup>73-75)</sup>。一方で、ステート 2 からステート 1 への移行時は、脱リン酸化酵素 Thylakoid-associated Phosphatase 38 (TAP38)により LHCII のリン酸化が解除されることで、LHCII が PSII に結合する<sup>76)</sup>。STN7、STN8 による PSII-LHCII 超複合体のリン酸化は、グラナ領域のチラコイドスタッキングにも関わっている。シロイヌナズナ *stn7* 変異体ではチラコイド構造に表現型が観察されないが、*stn8* 変異体、*stn7 stn8* 変異体のチラコイドは直径が広がり、且つスタッキングするチラコイド数が減少していた<sup>75)</sup>。しかし、なぜこのように PSII-LHCII 複合体のリン酸化状態がグラナ領域のスタッキングを制御するのか、その分子機構はまだ議論が続いている。有力な説は、LHCII などのストロマ突出領域の電荷がリン酸化によって負に帯電することでスタッキングが変わるという可能性である。しかし、近年になって STN8 によってリン酸化される新たなグラナ形成因子 (後述) が同定されたことで、PSII-LHCII のリン酸化がどの程度グラナ構造の制御に寄与しているかは未だ結論がでない。勿論「グラナ構造の構築に LHCII が重要な役割を果たす」のは間違いないが、顕著なグラナ構造が観察されないクラミドモナスも陸上植物と似た LHCII を有していることを考えると、LHCII のみで陸上植物葉緑体グラナ構造の形成機構を説明することは難しい<sup>23)</sup>。

## 6. チラコイド構造構築における CURT1 タンパク質の役割

近年のグラナ構造の構築機構研究にブレイクスルーをもたらしたのが、LHCII を介さない新規グラナ構築因子 CURVATURE THYLAKOID 1 (CURT1) タンパク質の発見である<sup>77)</sup>。シロイヌナズナには *CURTIA* から *CURTID* まで 4 つのパラログが存在し、光合成装置のサブユニット遺伝子と共発現をすることから、Armbruster らは光合成の制御に関わる因子の可能性を考え、シロイヌナズナ *curt1* 変異体の解析を行った。*curt1* 変異体の生育は正常であり、PSII や LHCII を含めた主要光合成装置も正常にチラコイドに蓄積する。

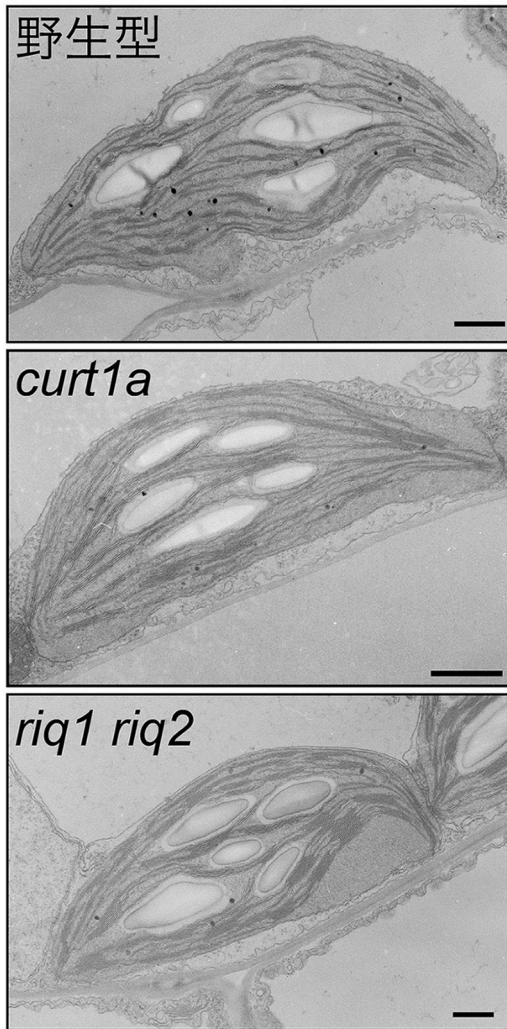


図 2. シロイヌナズナ野生型、*curt1a*、*riq1 riq2*の葉緑体構造

長日条件下 (16 時間明期/8 時間暗期、 $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で発芽後約 4 週間生育させたシロイヌナズナ野生型、*curt1a*、*riq1 riq2* における葉緑体の透過型電子顕微鏡写真図。Bar=1  $\mu\text{m}$ 。Yokoyama et al. (2016)<sup>1)</sup>より改変。

しかし、一方で、*curt1* 変異体 (特に *curt1a* 変異体) ではグラナを構成するチラコイド数が激減し、代わりにグラナの直径が増大した (図 2)。グラナのスタッキングと CURT1 タンパク質の蓄積量には正の相関があり、*CURT1A* 過剰発現体ではチラコイドのスタッキングが増加した。特筆すべきは、CURT1 タンパク質の増減は葉緑体の分化や LHCII などの光合成装置の蓄積量に全く影響を与えず、光合成に与える影響もごく僅かであった点である。このことから、CURT1 タンパク質は

今まで知られていない全く新規の機構でグラナ構造構築に関わっていることが推察された。CURT1 タンパク質はグラナを構成するチラコイドの端 (グラナマージン、図 1B) に特異的に局在する 10 kDa ほどの小さな膜タンパク質であり、既知の機能ドメインを持たない<sup>78)</sup>。しかし、Armbruster らは、全長 CURT1 タンパク質を発現させた大腸菌はほとんど生育しないことをヒントに、無細胞系で発現させた組換え CURT1A タンパク質をチラコイド膜に似せたリボソームに挿入させると、リボソーム構造が大きく歪むことを発見した<sup>77)</sup>。近年、脂質膜を曲げる機能を持つ膜タンパク質が次々と認知されるようになり、動植物細胞の内膜系構造 (小胞体や核膜孔、ミトコンドリア内膜など) の形を作り上げるのに重要な役割を果たしていることが明らかとなってきている<sup>79)</sup>。CURT1 タンパク質も同様にして、グラナマージン領域に局在しチラコイド膜を湾曲させることで、グラナのスタッキングの程度を決定していると考えられる。

一方で、同じ著者らは、CURT1 は STN8 によってリン酸化されることで CURT1 の機能が制御されていると主張している<sup>23)</sup>。もしこの主張が正しければ、*stn8* 変異体、*stn7 stn8* 変異体でチラコイドのスタッキングが減少していた理由として、少なからず CURT1 タンパク質がリン酸化されていないことが原因だと想定される。そして、チラコイドスタッキングの表現型が *stn7* 変異体では観察されなかった理由もこの仮説で説明できる。しかし、CURT1 タンパク質の膜を曲げる機能がリン酸化状態によってどう変化するかは実験的には明らかになっていない。

またさらに興味深い点は、CURT1 タンパク質はグラナ構造を構築する因子であるにも関わらず、クラミドモナスやシアノバクテリアなどグラナ構造を持たない光合成生物にも高度に保存されていることであり、それらの生物における *CURT1* 遺伝子のホモログの機能が注目されていた<sup>12,77)</sup>。Nickelsen らのグループは *Synechocystis* sp. PCC 6803 における *CURT1* 遺伝子のホモログ *CurT* の機能を近年明らかにした<sup>80)</sup>。シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 のチラコイドに

は細胞膜付近に一部収束する領域があり、そこでは PSII のアッセムブリが高頻度で行われているため、バイオジェネシスセンターと呼ばれている<sup>12)</sup>。シアノバクテリア CurT タンパク質はシロイヌナズナ CURT1A タンパク質と同様に膜を湾曲させる機能があり、CurT タンパク質はバイオジェネシスセンターに集中的に局在していた。シアノバクテリア *curT* 変異体はバイオジェネシスセンター付近のチラコイド構造が著しく歪んでいた。シロイヌナズナ *curt1* 変異体と大きく異なるのは、チラコイド構造以外にもロックアウトの影響が顕著に表現型として現れた点である。*curT* 変異体は野生型に比べて細胞の増殖が遅く、CurT タンパク質がバイオジェネシスセンターの構造維持に重要な役割を果たしているが故、PSI の蓄積量に変化はないが、PSII の蓄積量は半分に低下していた<sup>80)</sup>。シアノバクテリアとシロイヌナズナで CURT1/CurT タンパク質の機能は保存されているが、タンパク質の局在を変えることで、それぞれの生物におけるチラコイド構造の構築に寄与していることがわかった。しかしシアノバクテリアの中でも *Synechococcus* sp. PCC 7942 や *Anabaena* sp. PCC 7120 はバイオジェネシスセンターを持たない種であり、これらの種における CurT タンパク質の役割は不明である。

## 7. チラコイド構造構築における RIQ タンパク質の役割

筆者らは最近シロイヌナズナにおいて新たに同定したチラコイド構造の構築に関わる因子を報告したので、以下にその内容を紹介する<sup>1)</sup>。PSII は、過剰に吸収した光エネルギーを熱として散逸し、この機構の評価指標となるのがクロロフィル蛍光の非光化学的消光 (Non-photochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence; NPQ) である。我々はシロイヌナズナにおいて NPQ の低下を示す新規シロイヌナズナ変異体 2 系統を同定し、*reduced induction of non-photochemical quenching 1, 2 (riq1, riq2)* と名付けた。*riq1*、*riq2* 変異体では、機能未知のチラコイド膜タンパク質をコードするお互い相同な遺伝子が欠損しており、両 RIQ タンパク質は PSII とともにグラナ領

域に局在していた。強光下でルーメンの酸性化が起きると、PsbS タンパク質のプロトン化が起こり、またピオラキサンチンデエポキシダーゼの活性化によるゼアキサンチンの蓄積が起こり (キサントフィルサイクル)、最終的には PSII-LHCII 複合体から一部 LHCII が解離してクエンチングサイトを形成する<sup>81-83)</sup>。このことから、NPQ の qE 成分が誘導される。*riq* 変異体ではプロトン駆動力の形成、PsbS の蓄積量、ゼアザンチンの蓄積量に異常は見られなかったことから、qE 誘導に必要な LHCII の動態制御に RIQ タンパク質が何かしら関与していることを推察した。これと一致するように、*riq* 変異体では PSII のアンテナサイズが小さくなっており、またステート遷移活性も低くなっていた。これらの結果は、*riq* 変異体のグラナ領域においてステート遷移や qE 誘導時の LHCII の動態が阻害されていることを示唆している。そして *riq* 変異体で見られた興味深い表現型は、グラナを構成するチラコイド数の増加である (2)。*riq* 変異体では PSII や LHCII の蓄積量、及び CURT1 タンパク質の蓄積量に影響がないことから、LHCII の動態異常がチラコイドのスタッッキングにも影響しているものと考えられる。以上の結果から、RIQ タンパク質はグラナのスタッッキングなど、qE やステート遷移を効率よく誘導するのに必要なグラナの環境を作り出す因子であることが示唆された<sup>1)</sup>。一方で、RIQ タンパク質の詳細な機能についてはまだ明らかにできていない。RIQ タンパク質は PSII や LHCII と比べてチラコイドにおける蓄積量が極端に少ないため (未発表)、LHCII と相互作用して直接 LHCII の機能を制御しているとは考えがたい。おそらく RIQ タンパク質はグラナ領域における膜構造やイオン環境などを調節し、間接的に LHCII の機能を制御していることが考えられる。

両 RIQ タンパク質はグラナに関係する機能を有しているが、それと一致するように *RIQ* 遺伝子は全ての陸上植物に高度に保存されている。緑藻類以外の真核光合成生物や原核光合成生物には *RIQ* 遺伝子は保存されておらず、緑藻類でもクロレラで *RIQ1*、*RIQ2* 遺伝子が双方保存されているが配列保存性は低く、マイクロモナスでは

*RIQ1* 遺伝子は存在しない。クラミドモナスやボルボックスでは双方の *RIQ* 遺伝子を失っており、緑藻類では *RIQ* 遺伝子を失う方向性に進化していることが伺える。これらの事実から、グラナ構造を有する陸上植物で *RIQ* 遺伝子は重要な役割を果たしてきたと推察できる<sup>1)</sup>。今後より詳細な生化学的な解析を行うことで、グラナ構造維持における *RIQ* タンパク質の役割がより理解されていくと考えられる。

## 8. チラコイド構造の生理学的意義

植物がそれぞれ固有のチラコイド構造をもつ生理学的意義は何なのか？これまで多くの研究者がこの間に答えを出そうとし、特に陸上植物全般に広く保存されたグラナ構造に関しては多くの仮説が唱えられているが、現在までに実証されているものは少ない。

グラナ構造に関しては、PSII と PSI の局在をグラナとストロマラメラに分離することで、スピルオーバーを防いでいるという説がある<sup>84)</sup>。スピルオーバーとは、PSII アンテナ色素から PSI アンテナ色素へ励起エネルギーが伝達される現象であり、PSII と PSI が結合している場合のみ起こりうる。もし PSII で捕集した光エネルギーの大部分が PSI に直接流れてしまうと、プラストキノンへエネルギーが伝わらないため、プロトン駆動力を十分に形成できず、光合成の効率が落ちてしまう。植物から単離したグラナのチラコイド膜結合を人工的に不安定化させることでスピルオーバーが増加したことから、グラナ構造が PSII と PSI の結合を防ぐことによりスピルオーバーの抑制に寄与していることが伺える<sup>85)</sup>。しかし近年シロイヌナズナにおいて PSII の半数は PSI とグラナマージン領域で超複合体を形成し、むしろ積極的に PSI にエネルギーを逃がすことで PSII の光阻害を防いでいるという報告がなされた<sup>86,87)</sup>。PSII-PSI 超複合体形成がどのように制御され、その過程にグラナ構造がどれほど寄与しているのかはさらなる検証が必要である。そして、グラナ構造を持たないシアノバクテリアやクラミドモナスはどのようにして PSII-PSI 超複合体形成やスピルオーバーを制御しているのかも今

後解決すべき問題である。

もう一つのグラナ構造をもつ生理学的意義として提唱されているのは、光合成における集光・光防御の制御である。特にステート遷移時におけるチラコイド構造の動態については研究例がいくつかある。ステート1からステート2移行時には PSII-LHCII 複合体のリン酸化によってグラナ領域のチラコイド膜同士の結合が緩み、LHCII が移動しやすい環境になっていることが、シロイヌナズナで明らかとなっている<sup>9)</sup>。もう一つの重要な集光の制御機構である qE の誘導に関しては、どのようにグラナ構造が関わっているのかに関する知見は乏しい<sup>88)</sup>。しかし、qE が誘導される PSII はグラナに局在すること、そして我々が同定した *riq* 変異体ではグラナ構造と qE の双方に異常をきたしていたことから、qE 誘導時にグラナ構造が流動的に変化する可能性は十分に考えられる<sup>1)</sup>。qE 誘導が著しく阻害されるシロイヌナズナ *npq1*、*npq4* 変異体と野生型で qE 誘導時のグラナ構造を観察することで、qE 誘導時のグラナ構造のダイナミクスが今後明らかになるかもしれない。

グラナの形態は光環境によりダイナミックに変化することが知られており、この変化も植物の光環境適応に貢献していると言われている。弱光環境下ではより多くの光を集めるため、グラナに含まれるチラコイドの直径を短くし、チラコイド数を増加させる<sup>89,90)</sup>。弱光環境に適応した陰生植物は最大 100 枚にも上るチラコイドがスタッキングしている (図 3)。同時に、グラナが重なる方向性はランダムであり、葉緑体全体の構造も通常のラグビーボール状の形ではなく、歪んだ球状の形をしている葉緑体が多い。このような特異的なチラコイド構造は陰生植物が弱光環境下に適応した結果だとされている。弱光環境下に置かれた植物のクロロフィル *a/b* 比は低い、すなわち PSII 周辺に大きな集光装置を伴っていることを示しており、グラナ領域における LHCII の増加がスタッキングの増加を引き起こしている<sup>91)</sup>と推察されている。

一方で、強光環境下ではグラナに含まれるチラコイドの直径を大きくし、チラコイド数を減少さ



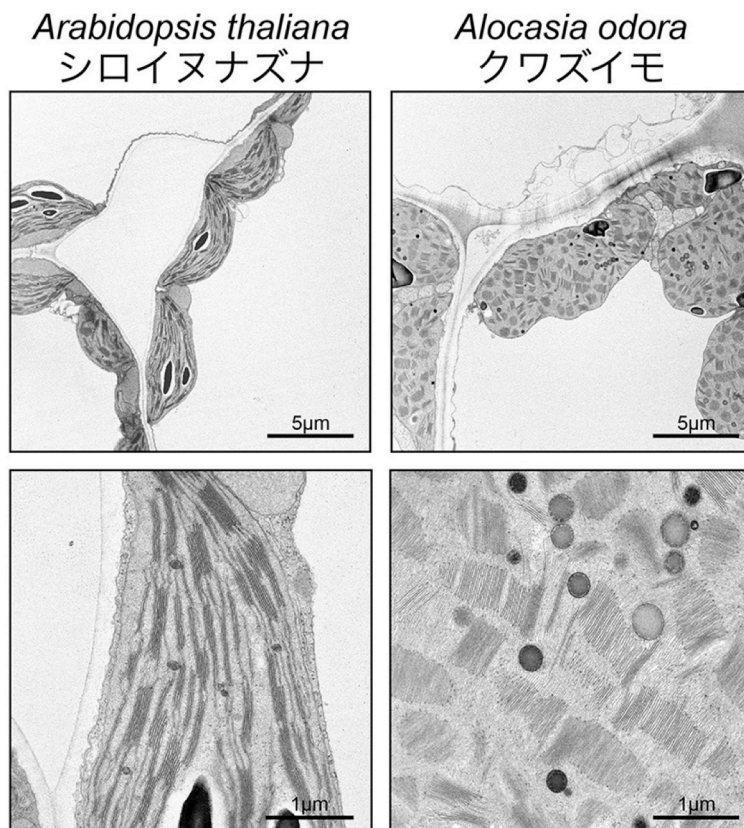


図 3. シロイヌナズナ及びクワズイモの葉緑体構造

長日条件下 (16 時間明期/8 時間暗期、 $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で生育させたシロイヌナズナ野生型 (*Arabidopsis thaliana*、陽生植物) とクワズイモ (*Alocasia odora*、陰生植物) の透過型電子顕微鏡写真図。クワズイモは東京薬科大学 野口航 博士より分与頂いた。Bar=5  $\mu\text{m}$  又は 1  $\mu\text{m}$ 。未発表。

せる<sup>90)</sup>。特に強光下では、グラナにおけるチラコイド膜同士の結合が緩み、チラコイド膜上のタンパク質の流動性が上がる<sup>92)</sup>。この流動性の上昇は、強光によって損傷を受けた PSII の D1 サブユニットの修復に寄与していると言われている。グラナにおいて損傷を受けた D1 はグラナマージン領域に移動し、そこで待ち構えている FtsH などのタンパク質によって分解され、新たに合成された D1 が再度グラナ領域に水平移動して PSII に組み込まれる<sup>93)</sup>。この D1 修復機構を効率よく実現するために、グラナの中心領域とマージン領域間のタンパク質の拡散速度が強光下で上昇すると言われている<sup>92,94)</sup>。また膜の流動性上昇は電子仲介体のプラストキノンのチラコイド膜内拡散を促進するため、効率のよい電子伝達に寄与していると言われている<sup>94)</sup>。グラナの直径が極端に増大する *curlabcd* 変異体では電子伝達速度が

若干低下するが、これはプラストキノンの拡散すべき膜内の距離が長くなり、拡散効率が落ちたことが原因だとこの論文の著者たちは推察している<sup>23)</sup>。さらに強光環境下への移行はルーメン領域の膨張を引き起こし、これは  $\text{Cl}^-$  や  $\text{Ca}^{2+}$  のルーメンへの流入による浸透圧の変化が原因だと言われている<sup>95,96)</sup>。ルーメンの膨張は、光合成装置間の電子仲介体であるプラストシアニンや、損傷を受けた D1 タンパク質を分解する Deg protease のルーメン内における拡散を促進する<sup>97,98)</sup>。

## 9. おわりに

チラコイドは光合成の基本反応が解明されるよりもずっと以前から認識されてきた構造であり、透過型電子顕微鏡を用いた観察は多くされてきたが、その背後に潜む分子機構に関しては、光合成のそれに比べて著しく遅れている。今後は、

電子顕微鏡以外のチラコイド観察技術のますますの発展が望まれるのと同時に、それを用いて分子遺伝学な研究を行うことでチラコイド構築に関わる分子機構が明らかになっていくものと予想される。そして得られた変異体の解析などを通して、チラコイド構造の多様な構造とその生理学的意義が今後明らかになっていくであろう。

## 謝辞

本稿執筆の機会を与えてくださいました日本光合成学会の先生方、原稿について格別のご配慮を賜りました埼玉大学 西山佳孝先生に厚く御礼申し上げます。

Received October 31, 2016; Accepted November 19, 2016;  
Published December 31, 2016

## 参考文献

1. Yokoyama, R., Yamamoto, H., Kondo, M., Takeda, S., Ifuku, K., Fukao, Y., Kamei, Y., Nishimura, M. and Shikanai, T. (2016) Grana-Localized Proteins, RIQ1 and RIQ2, Affect the Organization of Light-Harvesting Complex II and Grana Stacking in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 28, 2261–2275.
2. Boudiere, L., Michaud, M., Petroustos, D., Rebeille, F., Falconet, D., Bastien, O., Roy, S., Finazzi, G., Rolland, N., Jouhet, J., Block, M. A. and Marechal, E. (2014) Glycerolipids in photosynthesis: composition, synthesis and trafficking, *Biochim. Biophys. Acta*, 1837, 470–480.
3. Shikanai, T. (2014) Central role of cyclic electron transport around photosystem I in the regulation of photosynthesis, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 26, 25–30.
4. Dekker, J. P. and Boekema, E. J. (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants, *Biochim. Biophys. Acta*, 1706, 12–39.
5. Kirchhoff, H., Mukherjee, U. and Galla, H. J. (2002) Molecular architecture of the thylakoid membrane: lipid diffusion space for plastoquinone, *Biochemistry*, 41, 4872–4882.
6. Maeda, H. and DellaPenna, D. (2007) Tocopherol functions in photosynthetic organisms, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10, 260–265.
7. Shimoni, E., Rav-Hon, O., Ohad, I., Brumfeld, V. and Reich, Z. (2005) Three-dimensional organization of higher-plant chloroplast thylakoid membranes revealed by electron tomography, *Plant Cell*, 17, 2580–2586.
8. Engel, B. D., Schaffer, M., Kuhn Cuellar, L., Villa, E., Pnitzko, J. M. and Baumeister, W. (2015) Native architecture of the *Chlamydomonas* chloroplast revealed by in situ cryo-electron tomography, *eLife*, 4.
9. Chuartzman, S. G., Nevo, R., Shimoni, E., Charuvi, D., Kiss, V., Ohad, I., Brumfeld, V. and Reich, Z. (2008) Thylakoid membrane remodeling during state transitions in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 20, 1029–1039.
10. Johnson, M. P., Vasilev, C., Olsen, J. D. and Hunter, C. N. (2014) Nanodomains of cytochrome *b<sub>6</sub>f* and photosystem II complexes in spinach grana thylakoid membranes, *Plant Cell*, 26, 3051–3061.
11. Minagawa, J. (2013) Dynamic reorganization of photosynthetic supercomplexes during environmental acclimation of photosynthesis, *Front. Plant Sci.*, 4, 513.
12. Rast, A., Heinz, S. and Nickelsen, J. (2015) Biogenesis of thylakoid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1847, 821–830.
13. Hill, R. and Fay, B (1960) Function of the Two Cytochrome Components in Chloroplasts: A Working Hypothesis, *Nature*, 186, 136–137.
14. Niyogi, K. K. (1999) PHOTOPROTECTION REVISITED: Genetic and Molecular Approaches, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 333–359.
15. Shikanai, T. (2007) Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 199–217.
16. Voithknecht, U. C. and Westhoff, P. (2001) Biogenesis and origin of thylakoid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1541, 91–101.
17. Adam, Z., Charuvi, D., Tsabari, O., Knopf, R. R. and Reich, Z. (2011) Biogenesis of thylakoid networks in angiosperms: knowns and unknowns, *Plant Mol. Biol.*, 76, 221–234.
18. Von Wettstein, D., Gough, S. and Kannangara, C. G. (1995) Chlorophyll Biosynthesis, *Plant Cell*, 7, 1039–1057.
19. Reisinger, V., Hertle, A. P., Ploscher, M. and Eichacker, L. A. (2008) Cytochrome *b<sub>6</sub>f* is a dimeric protochlorophyll a binding complex in etioplasts, *FEBS J.*, 275, 1018–24.
20. Ploscher, M., Reisinger, V. and Eichacker, L. A. (2011) Proteomic comparison of etioplast and chloroplast protein complexes, *J. Proteomics*, 74, 1256–1265.
21. Peng, L., Shimizu, H. and Shikanai, T. (2008) The chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex interacts with photosystem I in *Arabidopsis*, *J. Biol. Chem.*, 283, 34873–34879.

22. Muller, B. and Eichacker, L. A. (1999) Assembly of the D1 precursor in monomeric photosystem II reaction center precomplexes precedes chlorophyll *a*-triggered accumulation of reaction center II in barley etioplasts, *Plant Cell*, 11, 2365–2377.
23. Pribil, M., Labs, M. and Leister, D. (2014) Structure and dynamics of thylakoids in land plants, *J. Exp. Bot.*, 65, 1955–1972.
24. Awai, K., Marechal, E., Block, M. A., Brun, D., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K., Ohta, H. and Joyard, J. (2001) Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 10960–10965.
25. Jarvis, P., Dormann, P., Peto, C. A., Lutes, J., Benning, C. and Chory, J. (2000) Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis MGD synthase 1* mutant, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97, 8175–8179.
26. Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M. and Ohta, H. (2007) Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104, 17216–17221.
27. Benning, C. and Ohta, H. (2005) Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants, *J. Biol. Chem.*, 280, 2397–2400.
28. Dormann, P., Hoffmann-Benning, S., Balbo, I. and Benning, C. (1995) Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol, *Plant Cell*, 7, 1801–1810.
29. Hagio, M., Sakurai, I., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. and Wada, H. (2002) Phosphatidylglycerol is essential for the development of thylakoid membranes in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.*, 43, 1456–1464.
30. Kobayashi, K., Fujii, S., Sato, M., Toyooka, K. and Wada, H. (2015) Specific role of phosphatidylglycerol and functional overlaps with other thylakoid lipids in *Arabidopsis* chloroplast biogenesis, *Plant Cell Rep.*, 34, 631–642.
31. Yu, B. and Benning, C. (2003) Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in *Arabidopsis*, *Plant J.*, 36, 762–770.
32. Sato, N., Tsuzuki, M., Matsuda, Y., Ehara, T., Osafune, T. and Kawaguchi, A. (1995) Isolation and characterization of mutants affected in lipid metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eur. J. Biochem.*, 230, 987–993.
33. Kobayashi, K., Fujii, S., Sasaki, D., Baba, S., Ohta, H., Masuda, T. and Wada, H. (2014) Transcriptional regulation of thylakoid galactolipid biosynthesis coordinated with chlorophyll biosynthesis during the development of chloroplasts in *Arabidopsis*, *Front. Plant Sci.*, 5, 272.
34. 小林康一 (2015) 植物のチラコイド膜脂質の合成と葉緑体発達における役割, *光合成研究*, 25, 126–137.
35. Heidrich, J., Thurotte, A. and Schneider, D. (2016) Specific interaction of IM30/Vipp1 with cyanobacterial and chloroplast membranes results in membrane remodeling and eventually in membrane fusion, *Biochim. Biophys. Acta*, doi: 10.1016/j.bbame.2016.09.025
36. Li, H. M., Kaneko, Y. and Keegstra, K. (1994) Molecular cloning of a chloroplastic protein associated with both the envelope and thylakoid membranes, *Plant Mol. Biol.*, 25, 619–632.
37. Kroll, D., Meierhoff, K., Bechtold, N., Kinoshita, M., Westphal, S., Vothknecht, U. C., Soll, J. and Westhoff, P. (2001) VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 4238–4242.
38. Aseeva, E., Ossenhuhl, F., Eichacker, L. A., Wanner, G., Soll, J. and Vothknecht, U. C. (2004) Complex formation of Vipp1 depends on its alpha-helical PspA-like domain, *J. Biol. Chem.*, 279, 35535–35541.
39. Kobayashi, R., Suzuki, T. and Yoshida, M. (2007) *Escherichia coli* phage-shock protein A (PspA) binds to membrane phospholipids and repairs proton leakage of the damaged membranes, *Mol. Microbiol.*, 66, 100–109.
40. Vothknecht, U. C., Otters, S., Hennig, R. and Schneider, D. (2012) Vipp1: a very important protein in plastids?!, *J. Exp. Bot.*, 63, 1699–1712.
41. Hennig, R., Heidrich, J., Saur, M., Schmuser, L., Roeters, S. J., Hellmann, N., Woutersen, S., Bonn, M., Weidner, T., Markl, J. and Schneider, D. (2015) IM30 triggers membrane fusion in cyanobacteria and chloroplasts, *Nat. Commun.*, 6, 7018.
42. Westphal, S., Heins, L., Soll, J. and Vothknecht, U. C. (2001) Vipp1 deletion mutant of *Synechocystis*: a connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis?, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 4243–4248.
43. Rexroth, S., Mullineaux, C. W., Ellinger, D., Sendtko, E., Rögner, M. and Koenig, F. (2011) The plasma membrane of the cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* contains segregated bioenergetic domains, *Plant Cell*, 23, 2379–2390.

44. Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Mimuro, M., Miyashita, H., Tsuchiya, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Kawashima, K., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Takeuchi, C., Yamada, M. and Tabata, S. (2003) Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids, *DNA Res.*, 10, 137–145.
45. Carraretto, L., Formentin, E., Teardo, E., Checchetto, V., Tomizioli, M., Morosinotto, T., Giacometti, G. M., Finazzi, G. and Szabo, I. (2013) A thylakoid-located two-pore  $K^+$  channel controls photosynthetic light utilization in plants, *Science*, 342, 114–118.
46. Kunz, H. H., Gierth, M., Herdean, A., Satoh-Cruz, M., Kramer, D. M., Spetea, C. and Schroeder, J. I. (2014) Plastidial transporters KEA1, -2, and -3 are essential for chloroplast osmoregulation, integrity, and pH regulation in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111, 7480–7485.
47. Armbruster, U., Carrillo, L. R., Venema, K., Pavlovic, L., Schmidtman, E., Kornfeld, A., Jahns, P., Berry, J. A., Kramer, D. M. and Jonikas, M. C. (2014) Ion antiport accelerates photosynthetic acclimation in fluctuating light environments, *Nat. Commun.*, 5, 5439.
48. Petroustos, D., Busch, A., Janssen, I., Trompelt, K., Bergner, S. V., Weinl, S., Holtkamp, M., Karst, U., Kudla, J. and Hippler, M. (2011) The chloroplast calcium sensor CAS is required for photoacclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell*, 23, 2950–2963.
49. Schneider, A., Steinberger, I., Herdean, A., Gandini, C., Eisenhut, M., Kurz, S., Morper, A., Hoecker, N., Ruhle, T., Labs, M., Flugge, U. I., Geimer, S., Schmidt, S. B., Husted, S., Weber, A. P., Spetea, C. and Leister, D. (2016) The Evolutionarily Conserved Protein PHOTOSYNTHESIS AFFECTED MUTANT71 Is Required for Efficient Manganese Uptake at the Thylakoid Membrane in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 28, 892–910.
50. Herdean, A., Teardo, E., Nilsson, A. K., Pfeil, B. E., Johansson, O. N., Unnep, R., Nagy, G., Zsiros, O., Dana, S., Solymosi, K., Garab, G., Szabo, I., Spetea, C. and Lundin, B. (2016) A voltage-dependent chloride channel fine-tunes photosynthesis in plants, *Nat. Commun.*, 7, 11654.
51. Wang, C., Yamamoto, H., Narumiya, F., Munekage, Y. N., Finazzi, G., Szabo, I. and Shikanai, T. (2016) Fine-tuned regulation of the  $K^+ / H^+$  antiporter KEA3 is required to optimize photosynthesis during induction, *Plant J.*, doi: 10.1111/tpj.13405.
52. Shaul, O. (2002) Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg, *Biometals*, 15, 309–323.
53. Krause, G. H. (1977) Light-induced movement of magnesium ions in intact chloroplasts. Spectroscopic determination with Eriochrome Blue SE, *Biochim. Biophys. Acta*, 460, 500–510.
54. Li, L., Tutone, A. F., Drummond, R. S., Gardner, R. C. and Luan, S. (2001) A novel family of magnesium transport genes in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 13, 2761–75.
55. Drummond, R. S. M., Tutone, A., Li, Y. C. and Gardner, R. C. (2006) A putative magnesium transporter AtMRS2-11 is localized to the plant chloroplast envelope membrane system, *Plant Sci.*, 170, 78–89.
56. Mache, R. and Loiseaux, S. (1973) Light saturation of growth and photosynthesis of the shade plant *Marchantia polymorpha*, *J. Cell Sci.*, 12, 391–401.
57. Phuthong, W., Huang, Z., Wittkopp, T. M., Sznee, K., Heinzel, M. L., Dekker, J. P., Frese, R. N., Prinz, F. B. and Grossman, A. R. (2015) The Use of Contact Mode Atomic Force Microscopy in Aqueous Medium for Structural Analysis of Spinach Photosynthetic Complexes, *Plant Physiol.*, 169, 1318–1332.
58. Day, D. A., Ryrie, I. J. and Fuad, N. (1984) Investigations of the role of the main light-harvesting chlorophyll-protein complex in thylakoid membranes. Reconstitution of depleted membranes from intermittent-light-grown plants with the isolated complex, *J. Cell Biol.*, 98, 163–172.
59. Standfuss, J., Terwisscha van Scheltinga, A. C., Lamborghini, M. and Kuhlbrandt, W. (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution, *EMBO J.*, 24, 919–928.
60. Labate, M. T., Ko, K., Ko, Z. W., Pinto, L. S., Real, M. J., Romano, M. R., Barja, P. R., Granell, A., Friso, G., van Wijk, K. J., Brugnoli, E. and Labate, C. A. (2004) Constitutive expression of pea *Lhcb 1-2* in tobacco affects plant development, morphology and photosynthetic capacity, *Plant Mol. Biol.*, 55, 701–714.
61. Musgnug, J. H., Wobbe, L., Elles, I., Claus, C., Hamilton, M., Fink, A., Kahmann, U., Kapazoglou, A., Mullineaux, C. W., Hippler, M., Nickelsen, J., Nixon, P. J. and Kruse, O. (2005) NAB1 is an RNA binding protein involved in the light-regulated differential expression of the light-harvesting antenna of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell*, 17, 3409–3421.
62. Kim, E. H., Li, X. P., Razeghifard, R., Anderson, J. M., Niyogi, K. K., Pogson, B. J. and Chow, W. S. (2009) The multiple roles of light-harvesting

- chlorophyll *a/b*-protein complexes define structure and optimize function of *Arabidopsis* chloroplasts: a study using two chlorophyll *b*-less mutants, *Biochim. Biophys. Acta*, 1787, 973–984.
63. Belgio, E., Ungerer, P. and Ruban, A. V. (2015) Light-harvesting superstructures of green plant chloroplasts lacking photosystems, *Plant Cell Environ.*, 38, 2035–2047.
  64. Meurer, J., Plucken, H., Kowallik, K. V. and Westhoff, P. (1998) A nuclear-encoded protein of prokaryotic origin is essential for the stability of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*, *EMBO J.*, 17, 5286–5297.
  65. Pietrzykowska, M., Suorsa, M., Semchonok, D. A., Tikkanen, M., Boekema, E. J., Aro, E. M. and Jansson, S. (2014) The light-harvesting chlorophyll *a/b* binding proteins Lhcb1 and Lhcb2 play complementary roles during state transitions in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 26, 3646–3660.
  66. Cui, Y. L., Jia, Q. S., Yin, Q. Q., Lin, G. N., Kong, M. M. and Yang, Z. N. (2011) The *GDC1* gene encodes a novel ankyrin domain-containing protein that is essential for grana formation in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 155, 130–141.
  67. Ouyang, M., Li, X., Ma, J., Chi, W., Xiao, J., Zou, M., Chen, F., Lu, C. and Zhang, L. (2011) LTD is a protein required for sorting light-harvesting chlorophyll-binding proteins to the chloroplast SRP pathway, *Nat. Commun.*, 2, 277.
  68. Wu, W., Elsheery, N., Wei, Q., Zhang, L. and Huang, J. (2011) Defective etioplasts observed in variegation mutants may reveal the light-independent regulation of white/yellow sectors of *Arabidopsis* leaves, *J. Integr. Plant Biol.*, 53, 846–857.
  69. Huang, W., Chen, Q., Zhu, Y., Hu, F., Zhang, L., Ma, Z., He, Z. and Huang, J. (2013) *Arabidopsis* thylakoid formation 1 is a critical regulator for dynamics of PSII-LHCII complexes in leaf senescence and excess light, *Mol. Plant*, 6, 1673–1691.
  70. Shimada, H., Mochizuki, M., Ogura, K., Froehlich, J. E., Osteryoung, K. W., Shirano, Y., Shibata, D., Masuda, S., Mori, K. and Takamiya, K. (2007) *Arabidopsis* cotyledon-specific chloroplast biogenesis factor CYO1 is a protein disulfide isomerase, *Plant Cell*, 19, 3157–3169.
  71. Albrecht, V., Ingenfeld, A. and Apel, K. (2008) *Snowy cotyledon 2*: the identification of a zinc finger domain protein essential for chloroplast development in cotyledons but not in true leaves, *Plant Mol. Biol.*, 66, 599–608.
  72. Bellafiore, S., Barneche, F., Peltier, G. and Rochaix, J. D. (2005) State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7, *Nature*, 433, 892–895.
  73. Elich, T. D., Edelman, M. and Mattoo, A. K. (1992) Identification, characterization, and resolution of the *in vivo* phosphorylated form of the D1 photosystem II reaction center protein, *J. Biol. Chem.*, 267, 3523–3529.
  74. Bonardi, V., Pesaresi, P., Becker, T., Schleiff, E., Wagner, R., Pfannschmidt, T., Jahns, P. and Leister, D. (2005) Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases, *Nature*, 437, 1179–1182.
  75. Fristedt, R., Willig, A., Granath, P., Crevecoeur, M., Rochaix, J. D. and Vener, A. V. (2009) Phosphorylation of photosystem II controls functional macroscopic folding of photosynthetic membranes in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 21, 3950–3964.
  76. Pribil, M., Pesaresi, P., Hertle, A., Barbato, R. and Leister, D. (2010) Role of plastid protein phosphatase TAP38 in LHCII dephosphorylation and thylakoid electron flow, *PLoS Biol.*, 8, e1000288.
  77. Armbruster, U., Labs, M., Pribil, M., Viola, S., Xu, W., Scharfenberg, M., Hertle, A. P., Rojahn, U., Jensen, P. E., Rappaport, F., Joliot, P., Dormann, P., Wanner, G. and Leister, D. (2013) *Arabidopsis* CURVATURE THYLAKOID1 proteins modify thylakoid architecture by inducing membrane curvature, *Plant Cell*, 25, 2661–2678.
  78. Puthiyaveetil, S., Tsabari, O., Lowry, T., Lenhert, S., Lewis, R. R., Reich, Z. and Kirchhoff, H. (2014) Compartmentalization of the protein repair machinery in photosynthetic membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111, 15839–15844.
  79. Jarsch, I. K., Daste, F. and Gallop, J. L. (2016) Membrane curvature in cell biology: An integration of molecular mechanisms, *J. Cell Biol.*, 214, 375–387.
  80. Heinz, S., Rast, A., Shao, L., Gutu, A., Gugel, I. L., Heyno, E., Labs, M., Rengstl, B., Viola, S., Nowaczyk, M. M., Leister, D. and Nickelsen, J. (2016) Thylakoid Membrane Architecture in *Synechocystis* Depends on CurT, a Homolog of the Granal CURVATURE THYLAKOID1 Proteins, *Plant Cell*, 28, 2238–2260.
  81. Li, Z., Wakao, S., Fischer, B. B. and Niyogi, K. K. (2009) Sensing and responding to excess light, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 60, 239–260.
  82. Johnson, M. P., Goral, T. K., Duffy, C. D., Brain, A. P., Mullineaux, C. W. and Ruban, A. V. (2011) Photoprotective energy dissipation involves the reorganization of photosystem II light-harvesting complexes in the grana membranes of spinach chloroplasts, *Plant Cell*, 23, 1468–1479.
  83. Ruban, A. V., Johnson, M. P. and Duffy, C. D. (2012) The photoprotective molecular switch in the

- photosystem II antenna, *Biochim. Biophys. Acta*, 1817, 167–181.
84. Trissl, H. W. and Wilhelm, C. (1993) Why do thylakoid membranes from higher plants form grana stacks?, *Trends. Biochem. Sci.*, 18, 415–9.
  85. Arntzen, C. J. and Ditto, C. L. (1976) Effects of cations upon chloroplast membrane subunit. Interactions and excitation energy distribution, *Biochim. Biophys. Acta.*, 449, 259–274.
  86. Yokono, M., Takabayashi, A., Akimoto, S. and Tanaka, A. (2015) A megacomplex composed of both photosystem reaction centres in higher plants, *Nat. Commun.*, 6, 6675.
  87. Suorsa, M., Rantala, M., Mamedov, F., Lespinasse, M., Trotta, A., Grieco, M., Vuorio, E., Tikkanen, M., Jarvi, S. and Aro, E. M. (2015) Light acclimation involves dynamic re-organization of the pigment-protein megacomplexes in non-appressed thylakoid domains, *Plant J.*, 84, 360–373.
  88. Mullineaux, C. W. (2005) Function and evolution of grana, *Trends. Plant Sci.*, 10, 521–525.
  89. Anderson, J. M. (1986) Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 37, 93–136.
  90. Rozak, P. R., Seiser, R. M., Wacholtz, W. F. and Wise, R. R. (2002) Rapid, reversible alterations in spinach thylakoid appression upon changes in light intensity, *Plant Cell Environ.*, 25, 421–429.
  91. Anderson, J. M., Goodchild, D. J. and Boardman, N. K. (1973) Composition of the photosystems and chloroplast structure in extreme shade plants, *Biochim. Biophys. Acta*, 325, 573–85.
  92. Herbstova, M., Tietz, S., Kinzel, C., Turkina, M. V. and Kirchhoff, H. (2012) Architectural switch in plant photosynthetic membranes induced by light stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109, 20130–20135.
  93. Jarvi, S., Suorsa, M. and Aro, E. M. (2015) Photosystem II repair in plant chloroplasts—Regulation, assisting proteins and shared components with photosystem II biogenesis, *Biochim. Biophys. Acta*, 1847, 900–909.
  94. Kirchhoff, H. (2014) Diffusion of molecules and macromolecules in thylakoid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1837, 495–502.
  95. Ettinger, W. F., Clear, A. M., Fanning, K. J. and Peck, M. L. (1999) Identification of a  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiport in the plant chloroplast thylakoid membrane, *Plant Physiol.*, 119, 1379–1386.
  96. Spetea, C. and Schoefs, B. (2010) Solute transporters in plant thylakoid membranes: Key players during photosynthesis and light stress, *Comm. Integr. Biol.*, 3, 122–129.
  97. Kirchhoff, H., Hall, C., Wood, M., Herbstova, M., Tsabari, O., Nevo, R., Charuvi, D., Shimoni, E. and Reich, Z. (2011) Dynamic control of protein diffusion within the granal thylakoid lumen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108, 20248–20253.
  98. Kirchhoff, H. (2013) Structural constraints for protein repair in plant photosynthetic membranes, *Plant Signal. Behav.*, 8, e23634.

## Diversity and Physiological Significance of Thylakoid Structures

Ryo Yokoyama\* and Toshiharu Shikanai

Graduate School of Science, Kyoto University



## 研究紹介

色素合成酵素の活性解析から考察する緑色硫黄細菌の  
アンテナ系クロロフィル生合成経路<sup>§</sup>

立命館大学 大学院生命科学研究科

寺村 美里\*

緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum (Cba.) tepidum* は、生体内で 3 つのクロロフィル分子種 bacteriochlorophyll (BChl) *a/c*, chlorophyll (Chl) *a* を合成する。中でも、BChl *c* はクロロソームと呼ばれる光捕集アンテナ内部で自己会合体を形成している。このクロロソームを形成するクロロフィルの分子構造の特徴として、炭素骨格の 3<sup>1</sup> 位にヒドロキシ基が存在することと、13<sup>2</sup> 位にメトキシカルボニル基が脱離していることの 2 点が挙げられる。ここでは、これら 2 点の構造形成に関わる酵素、BchF/BchV (3 位水和酵素) および BciC (13<sup>2</sup> 位脱離酵素) に着目した。In vitro における各酵素の解析から得られた基質特異性の情報に基づいて、*Cba. tepidum* 内での予想される BChl 生合成経路について議論する。

## 1. はじめに

クロロフィルは生物の光合成器官において、光エネルギーの捕集と伝達、初期電荷分離に必須な色素分子である<sup>1)</sup>。クロロフィル分子はマグネシウムを中心に配位した環状テトラピロールを基本骨格とする (図 1)。一方、その周辺置換基は光吸収特性を変化させ、光合成器官の機能や活性に大きく影響する。生体内でのクロロフィル色素の合成には多数の酵素が関与している。近年のゲノム解析の進展と分子生物学的解析により、クロロフィルの生合成に関与する多くの遺伝子が同定された<sup>2)</sup>。これまで、それらの遺伝子を欠損させた際に蓄積する色素の解析を中心に、代謝経路の議論が進められてきた。一方、in vitro において、酵素タンパク質としての機能に関する研究は少なく、その反応性や基質特異性など未だ不明な点が多く残されている。

緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum (Cba.) tepidum* は、生体内で bacteriochlorophyll (BChl) *a/c* と chlorophyll (Chl) *a* の 3 つのクロロフィル分子種

を合成する (図 1)。中でも、BChl *c* はクロロソームと呼ばれる光捕集アンテナ系の内部で自己会合体を形成している<sup>3, 4)</sup>。クロロソームの光捕集能力は光合成生物の中で最も高いとされ、細菌の微弱光下での生育を可能とする。通常、光合成器官で働く色素分子はタンパク質に固定化され、特定の空間的な配置をとることにより、その機能を果たしている。一方、クロロソーム内部の BChl *c* はタンパク質の関与なしに秩序だった超分子構造を形成している。この超分子会合体は、3<sup>1</sup> 位のヒドロキシ基と 13<sup>1</sup> 位のカルボニル基間の水素結合、3<sup>1</sup> 位のヒドロキシ基と中心金属マグネシウム間の配位結合、クロリン環同士の  $\pi$ - $\pi$  相互作用により形成されている (図 1)。クロロソーム内に存在するクロロフィルは、このような自己会合体を形成するために、他のクロロフィル類とは異なる特有の分子構造を有している。

現在、クロロソームを構成する色素として BChl *c, d, e* が天然から、また BChl *e* を合成する種の *bchU* 遺伝子 (20 位のメチル化に関与) 欠損変異株から BChl *f* が発見されている (図 2)<sup>5, 6)</sup>。これらのクロロソームを形成するクロロフィルの分子構造の特徴として以下の 2 点が挙げられ

<sup>§</sup>第 7 回日本光合成学会シンポジウム ポスター発表賞受賞論文

\*連絡先 E-mail: m.teramu18@gmail.com

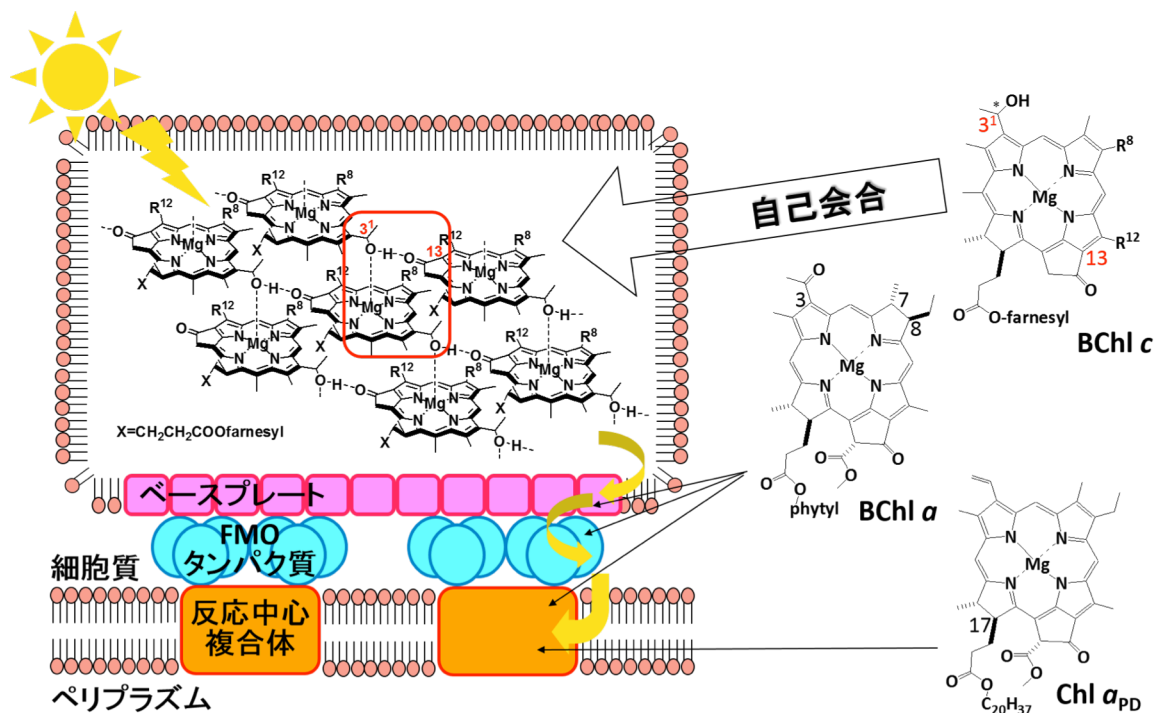


図 1. *Cba. tepidum* 由来のクロソーム (左上) の模式図と構成色素の分子構造、および反応中心への励起エネルギー移動 (黄色矢印)

BChl c の 3<sup>1</sup> 位の不斉炭素では R 体および S 体が存在し得る。R<sup>8</sup> の置換基はメチル基、エチル基、プロピル基、イソブチル基のいずれかである。R<sup>12</sup> の置換基はメチル基もしくはエチル基である。

る。一つ目は 3<sup>1</sup> 位にヒドロキシ基が存在することで、隣り合う分子との分子間相互作用の要となっており、会合体の形成において重要な働きを担う。二つ目は他の全てのクロロフィル色素にみられる 13<sup>2</sup> 位のメトキシカルボニル基が脱離している点である。これにより 13<sup>1</sup> 位のカルボニル基周辺の立体障害を軽減し、会合体の形成を容易に

していると考えられる<sup>7)</sup>。ここでは緑色硫黄細菌のモデル生物である *Cba. tepidum* を用いて、クロソーム色素に特徴的な上記 2 点の構造形成に関与する酵素の *in vitro* での活性を調べた。その結果明らかとなった各酵素の基質特異性より、*Cba. tepidum* 内での予想される BChl 生合成経路について検討したので紹介する。

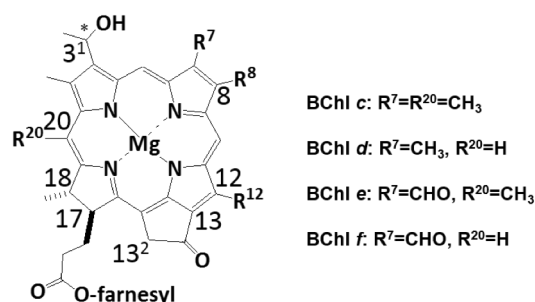


図 2. クロソーム色素の分子構造

3<sup>1</sup> 位の不斉炭素では R 体および S 体が存在し得る。R<sup>8</sup> の置換基はメチル基、エチル基、プロピル基、イソブチル基、ネオペンチル基のいずれかである。R<sup>12</sup> の置換基はメチル基もしくはエチル基である。

## 2. 13<sup>2</sup> 位メトキシカルボニル基脱離酵素 BciC の生化学的解析

クロソーム色素を特徴づける 13<sup>2</sup> 位のメトキシカルボニル基の脱離反応は、色素合成系においてクロソーム色素合成系と他のクロロフィル類の合成系の分岐点であると考えられる。本研究で用いた *Cba. tepidum* が合成する 3 種類のクロロフィルは、共通中間産物である chlorophyllide (Chlide) a から合成され、その 13<sup>2</sup> 位メトキシカルボニル基の脱離反応が、BChl c 合成経路への最初の段階であると予想されていた。先行研究において、*bciC* 遺伝子欠損株から 13<sup>2</sup> 位脱メトキシカルボニル化合物が検出されなかった<sup>8)</sup>。このことか

ら、*bciC* 遺伝子産物の脱メトキシカルボニル反応への関与が示唆されたが、酵素タンパク質の機能に関しては報告されておらず、合成経路上の何処で働くのかは不明であった。そこで、*Cba. tepidum* 由来の *bciC* を大腸菌内で発現させ、その破碎溶液を用いて酵素反応を試みた。Chlide *a* を基質として *in vitro* での活性を調べたところ、13<sup>2</sup>位のメトキシカルボニル基の脱離が観察された(図3)<sup>9)</sup>。一方、Chlide *a* の13<sup>2</sup>位立体異性体である Chlide *a'* は BciC によって脱メトキシカルボニル化されなかった。このことより、BciC による反応は13<sup>2</sup>位の立体選択性を有することが示唆された。

次に反応機構を調べるため、酵素反応溶液にメタノールを添加して検討を行った。メトキシカル

ボニル基の脱離機構として、2つのパターンが考えられる。ひとつは BciC 酵素がメチル基の脱離(加水分解)反応を触媒し、そこで生じたカルボン酸から自発的にカルボキシ基が脱離するパターンである。もうひとつは、BciC 酵素が一連のメトキシカルボニル基の脱離反応を行う場合である。前者の反応では、メタノール存在下でメチル基の脱離反応が抑制されることが知られていた<sup>10)</sup>。しかし、BciC 酵素による反応では、反応溶液中のメタノール濃度を上げててもそのような効果はみられなかった。したがって、BciC 酵素はメトキシカルボニル基の脱離反応を触媒するデメトキシカルボニラーゼであることが示された。

Chl 色素合成経路内での BciC の反応位置をさらに詳細に調べるため、13<sup>2</sup>位にメトキシカルボニル基を有する様々な Chl 誘導体を用いて基質特異性を調べた。Chlide *a* の中心金属マグネシウムが遊離した pheophorbide (Pheide) *a* を基質として用いた場合には、反応の進行はみられなかった。他の Chl 色素合成酵素と同様に、基質の認識には中心金属マグネシウムを必要とすることがわかった。さらに、Chlide *a* の前駆体であるポルフィリン骨格を持つ protochlorophyllide (PChlide) *a* でも生成物は得られなかった(図4)。このことから、BciC は17-18位が単結合のクロリン環形成後に働くことが示された。

*Cba. tepidum* の Chl *a* 合成経路では Chlide *a* の17位末端に長鎖のアルキル基が導入され、BChl *a* 合成経路では Chlide *a* の7-8位の二重結合の還元によりバクテリオクロリン環をもつ 3-vinyl-bacteriochlorophyllide [(3V-)BChlide] *a*

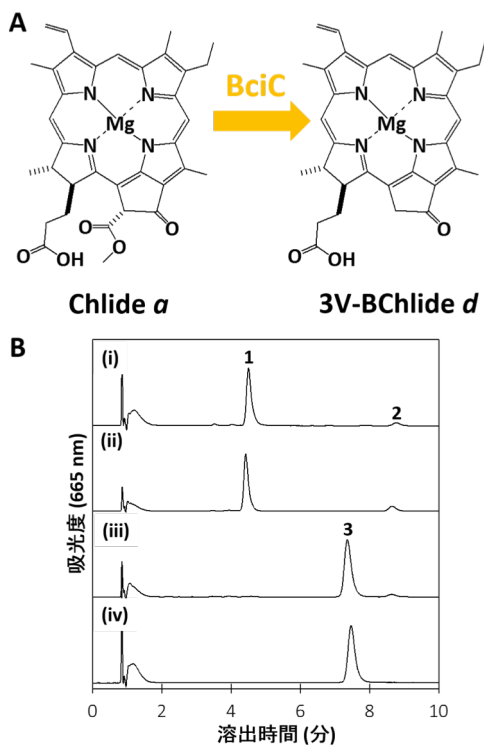


図3. BciC による Chlide *a* の13<sup>2</sup>位脱メトキシカルボニル反応

(A) BciC による脱離反応のスキーム。(B) BciC による *in vitro* 反応の逆相 HPLC 解析。それぞれ、Chlide *a* (i) に空のベクター (ii) もしくは BciC (iii) を含む大腸菌破碎液を添加後、45 °C で30分間インキュベートしたものと、3V-BChlide *d* の標品 (iv) を示している。ピーク1, Chlide *a*; ピーク2, Chlide *a'*; ピーク3, 3V-BChlide *d*。

基質色素のπ共役系	π共役系		
	ポルフィリン環	クロリン環	バクテリオクロリン環
BciC	—	+	—
BchF	—	+	+
BchV	—	+	—

図4. 基質のπ共役系が与える酵素反応への影響

+は反応の進行を、—は反応が進まなかったことを示している。

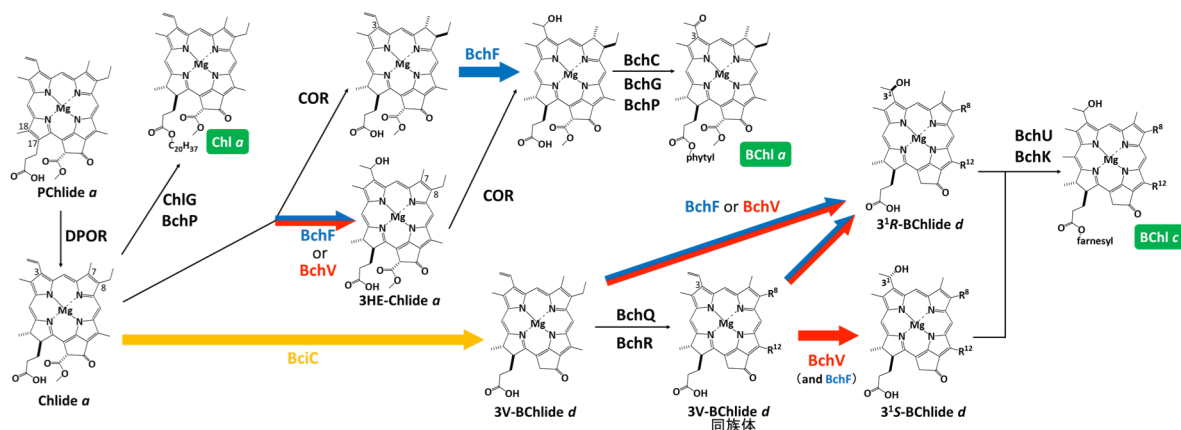


図 5. *Cba. tepidum* 内での予想される (B)Chl 合成経路

が形成される。そこで、Chl *a* と 3V-BChlide *a* をそれぞれ基質に用いて BciC による反応を試みたが、いずれも反応は進行しなかった (図 4)。このことから、クロロソーム色素である BChl *c* の合成経路は、Chlide *a* に対して BciC が反応することで分岐することが示された (図 5)。

### 3. 3 位ビニル基水和と酵素 BchF, BchV の生化学的解析

クロロソーム色素のもう一つの特徴である 3<sup>1</sup>位のヒドロキシ基は、3 位のビニル基の水和によって形成され、*bchF* と *bchV* の 2 種類の遺伝子が関与することが予想されていた<sup>11)</sup>。この水和反応によって 3<sup>1</sup>位に不斉炭素が生成し、天然では *R* 体と *S* 体の 2 種類の立体異性体が存在する。さらに、8 位と 12 位に異なるアルキル鎖を有する同族体が存在し、アルキル鎖の短いものほど 3<sup>1</sup>位 *R* 体が、側鎖の長いものほど 3<sup>1</sup>位 *S* 体が多く存在することが知られている (図 6)<sup>12)</sup>。一方、同様の水和反応は BChl *a* 合成系でもみられ、ビニル基の水和とそれに続く酸化によって 3 位にアセチル基が導入される。しかし、それぞれの遺伝子の発現酵素が 2 種類のクロロフィル合成系にどのように関与しているのか、また 3<sup>1</sup>位での異性体、8 位や 12 位での同族体をどのように合成し分けているのかなど、未だ不明な点が多く残っている。

BciC と同様に、BchF および BchV タンパク質と 3 位にビニル基を有する様々なクロロフィル

誘導体を用いて、それぞれの酵素活性の比較を行った。まず、BChl *c* 合成経路中間体として、Chlide *a* の 13<sup>2</sup> 位が脱離した 3-vinyl-bacteriochlorophyllide (3V-BChlide) *d* を基質として用いた場合、反応溶液からは 2 種類の反応生成物がみられた (図 7)<sup>13)</sup>。得られた生成物は 3 位のビニル基の水和物であることが同定され、メジャー成分が 3<sup>1</sup>位 *R* 体、マイナー成分が 3<sup>1</sup>位 *S* 体である 3 位ビニル基の水和物であった。これにより、BchF および BchV はそれぞれ 3 位ビニル基の水和能力を持つことが示された。BciC と同様に両酵素は Pheide *a*、PChlide *a*、Chl *a* を基質としなかった<sup>14)</sup>。さらに BChl *c* 合成系でのより詳しい働きを調べるため、8 位と 12 位に様々なアルキル鎖を有し、中心金属に亜鉛をもつ

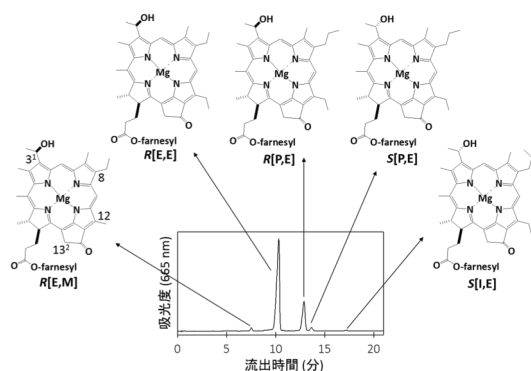


図 6. *Cba. tepidum* から抽出した BChl *c* の同族体の逆相 HPLC スペクトルとそれらの分子構造



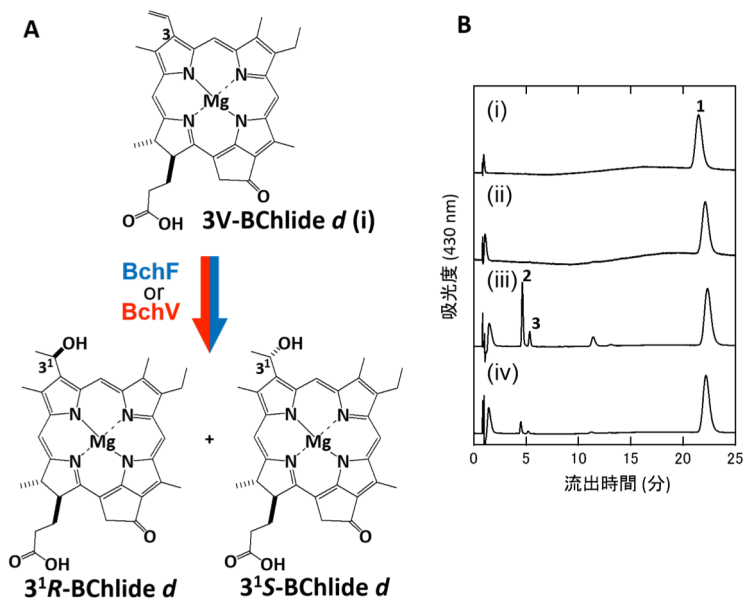


図 7. BchF/V による 3V-BChlide *d* の 3 位ビニル基の水和反応

(A) BchF/V による水和反応のスキーム。(B) BchF/V による *in vitro* 反応の逆相 HPLC 解析。それぞれ、3V-BChlide *d* (i) に空のベクター (ii)、BchF (iii)、BchV (iv) のいずれかを含む大腸菌破砕液を添加後、35 °C で 1 時間インキュベートしたものを示している。ピーク 1, 3V-BChlide *d*; ピーク 2, R[E,M]BChlide *d*; ピーク 3, S[E,M]BChlide *d*。

Zn-3-vinyl-8-ethyl-12-methyl-(Zn-3V[E,M])BPheide *c*、Zn-3-vinyl-8,12-diethyl-(Zn-3V[E,E])BPheide *c*、Zn-3-vinyl-8-propyl-12-ethyl-(Zn-3V[P,E])BPheide *c*、Zn-3-vinyl-8-isobutyl-12-ethyl-(Zn-3V[I,E])BPheide *c* をそれぞれ基質として用いた。BchF と BchV の反応溶液からは [I,E]体の 3 位のビニル基の水和生成物は検出されなかったが、3 種のクロロフィル分子[E,M]、[E,E]、[P,E]体の 3 位のビニル基を水和し、3<sup>1</sup>位 *R* および *S* 体の生成物を与えた (図 8)<sup>14</sup>。いずれの反応においても *R* 体が主生成物であった。一方で、BchV との反応に注目すると、側鎖が高度にメチル化された色素において、*S* 体が多く生成される傾向がみられた。以上の結果から、BChl *c* 合成系では、8 位と 12 位のアルキル側鎖が高度にメチル化されたクロロ

フィル群においては、主に BchV が *S* 体の合成を担っていることが示唆された (図 5)。この結果は *Cba. tepidum* の *bchV* 遺伝子欠損株の色素解析において、3<sup>1</sup>S-BChl *c* の合成量が大幅に減少したことと一致していた<sup>13</sup>。

続いて BChl *a* 合成経路での機能を調べるため、クロリン環の 7-8 位の二重結合が還元されたバクテリオクロリン環を持つ 3V-BChlide *a* を用いた反応も行った。すると、BchF 酵素の反応溶液からは対応する 3 位の水和生成物が得られた。一方で、BchV 酵素の反応溶液では生成物はみられなかった (図 4)。このことは BchV よりも BchF が BChl *a* 合成経路で優先的に機能している可能性を示している。*Cba. tepidum* の *bchF* 遺伝子欠損株における BChl *a* 合成量の大幅な減少は、この結果と矛盾しない。*bchF* 遺伝子欠損株でも少量の BChl *a* が合成されているので<sup>13</sup>、BchV が BChl *a* 合成系で機能しているはずである。そこで BChl *a* 合成の別経路から考えられる基質として Chlide *a* を用いたところ、両酵素はどちらもこれを水和した。つまり、BChl *a* 合成系において、BchF は chlorophyll oxidoreductase (COR) による 7-8 位の還元前後の色素を基質とし得るが、BchV は COR による還元が起こる前でのみ機能することとなる (図 5)。このことは BChl *a* 合成系において BchF が BchV よりも基質選択性が低いことを示唆する。

酵素	8-, 12-同族体	収率 (%)		3 <sup>1</sup> 異性体比 (%)	
		基質	生成物	R体	S体
BchF	[E,M]	78	22	91	9
	[E,E]	85	15	91	9
	[P,E]	99	1	88	12
	[I,E]	100	0	0	0
BchV	[E,M]	84	16	83	7
	[E,E]	88	12	62	38
	[P,E]	97	13	61	39
	[I,E]	100	0	0	0

図 8. 8 位および 12 位のアルキル鎖の酵素反応への影響

以上のように、BchF と BchV の基質特異性を調べた結果、両酵素は BChl *c* および BChl *a* の生合成経路で機能し得ることが示唆された。その一方で、それぞれの基質特異性に違いがみられ、生体内において別々の重要な役割を担っていることが分かった。

#### 4. おわりに

クロロフィルは生物が光合成を行うために必須の色素分子である。酵素タンパク質の *in vitro* での生化学的解析は、従来の分子生物学的な遺伝子欠損変異株の色素解析結果と併せることで、より詳細な生体内での機能を知ることができる。さらに、光合成生物が色素の量や組成を変化させることで生育環境に適応している例も多く報告されている<sup>15,16)</sup>。今回紹介した3種類のクロロフィル合成経路から、クロロソーム色素合成系への分岐点となる BciC や、BChl *a* の合成にも関与している BchF/V のように、複数の色素合成系は生体内で密接に関与しており、その制御機構は複雑なものであると予想される。色素の生合成経路を解き明かすことは、生物がどのように色素合成を調節し、環境に適応しているのかを知るためにも重要である。合成酵素の機能解明を通じて得られる光合成に関する分子レベルでの知見が、光合成研究の発展に繋がることを期待する。

#### 謝辞

本研究を通じて、手厚いご指導を賜りました立命館大学大学院生命科学研究所 民秋 均教授に深く感謝致します。また、研究全般を支えてくださいました久留米大学原田二郎講師、立命館大学溝口 正教授、東京工業大学塚谷祐介博士、ならびに本学生物有機化学研究室の皆様がこの場を借りまして、厚く感謝申し上げます。本研究の一部は、笹川科学研究助成の支援を受けて行われました。また、執筆の場を与えてくださった日本光合成学会および編集委員の皆様にご心からお礼申し上げます。

Received October 31, 2016; Accepted November 26, 2016;

Published December 31, 2016

#### 参考文献

1. 垣谷 俊昭、三室 守、民秋 均 (2011) クロロフィル、 pp 137–209、裳華房、東京。
2. Chew, A.G. and Bryant D.A. (2007) Chlorophyll biosynthesis in bacteria: the origins of structural and functional diversity. *Ann. Rev. Microbiol.* 61, 113–129.
3. Blankenship, R.E. and Matsuura, K. (2003) Antenna complexes from green photosynthetic bacteria, in *light harvesting antennas in photosynthesis* (Green, B.R. and Parson, W.W., Eds.) pp 195–217, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
4. Blankenship, R.E. (2014) Molecular mechanisms of photosynthesis second edition, pp 59–87, Wiley-Blackwell, West Sussex, UK.
5. Harada, J., Mizoguchi, T., Tsukatani, Y., Noguchi, M. and Tamiaki, H. (2012) A seventh bacterial chlorophyll driving a large light-harvesting antenna. *Sci. Rep.* 2, 671.
6. Vogl, K., Tank, M., Orf, G.S., Blankenship, R.E. and Bryant, D.A. (2012) Bacteriochlorophyll *f*: properties of chlorosomes containing the ‘forbidden chlorophyll’. *Front. Microbiol.* 3, 298.
7. Oba, T. and Tamiaki, H. (1991) Why do chlorosomal chlorophylls lack the C13<sup>2</sup>-methoxycarbonyl moiety? An in vitro model study. *Photosynth. Res.* 61, 23–31.
8. Liu, Z. and Bryant, D.A. (2011) Identification of a gene essential for the first committed step in the biosynthesis of bacteriochlorophyll *c*. *J. Biol. Chem.* 286, 22393–22402.
9. Teramura, M., Harada, J., Mizoguchi, T., Yamamoto, K. and Tamiaki, H. (2016) In vitro assay of BciC showing C13<sup>2</sup>- demethoxycarbonylase activity requisite for biosynthesis of chlorosomal chlorophyll pigments. *Plant Cell Physiol.* 57, 1048–1052.
10. Shioi, Y., Watanabe, K. and Takamiya, K. (1996) Enzymatic conversion of pheophorbide *a* to the precursor of pyropheophorbide *a* in leaves of *Chenopodium album*. *Plant Cell Physiol.* 37, 1143–1149.
11. Chew, A.G.M., Frigaard, N.-U. and Bryant, D.A. (2004) Identification of BchV, a C-3<sup>1</sup> hydratase specific for hypermethylated bacteriochlorophyll *c* in *Chlorobium tepidum*, in *Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives Research* (van der Est, A., Bruce, D., and Lawrence, K.S., Eds) pp 875–877, Allen Press, Lawrence, USA.
12. Chew, A.G.M., Frigaard, N.-U. and Bryant, D.A.



- (2007) Bacteriochlorophyllide *c* C-8<sup>2</sup> and C-12<sup>1</sup> methyltransferases are essential for adaptation to low light in *Chlorobaculum tepidum*. *J. Bacteriol.* 189, 6176–6184.
13. Harada, J., Teramura, M., Mizoguchi, T., Tsukatani, Y., Yamamoto, K. and Tamiaki, H. (2015) Stereochemical conversion of C3-vinyl group to 1-hydroxyethyl group in bacteriochlorophyll *c* by the hydratases BchF and BchV: adaptation of green sulfur bacteria to limited-light environments. *Mol. Microbiol.* 98, 1184–1198.
  14. Teramura, M., Harada, J. and Tamiaki, H. (2016) In vitro stereospecific hydration activities of the 3-vinyl group of chlorophyll derivatives by BchF and BchV enzymes involved in bacteriochlorophyll *c* biosynthesis of green sulfur bacteria. *Photosynth. Res.* 130, 33–45.
  15. Ishii, T., Kimura, M., Yamamoto, T., Kirihata, M. and Uehara, K. (2000) The effects of epimerization at the 3<sup>1</sup>-position of bacteriochlorophylls *c* on their aggregation in chlorosomes of green sulfur bacteria. Control of the ratio of 3<sup>1</sup> epimers by light intensity. *Photochem. Photobiol.* 71, 567–573.
  16. Jia, T., Ito, H. and Tanaka, A. (2016) Simultaneous regulation of antenna size and photosystem I/II stoichiometry in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 244, 1041–1053.

### Elucidation of Bacteriochlorophyll Biosynthetic Pathways Based on *in vitro* Biochemical Analyses of Enzymes Working in Chlorosomal Pigment Biosynthesis

Misato Teramura\*

Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University

**解説特集**  
**光合成色素代謝と光化学系構築のダイナミックな関係**

Editors: 田中 亮一 (北海道大学 低温科学研究所)  
柏山 祐一郎 (福井工業大学 環境情報学部)

序文	田中 亮一 (北海道大) 柏山 祐一郎 (福井工業大)	191
解説	クロロフィル色素類の合成系の進化 塚谷 祐介 (東京工業大)	192
解説	酸素パラドクスの統御で収斂するクロロフィル生合成と窒素固定 藤田 祐一 辻本 良真 (名古屋大)	204
解説	光合成生物におけるカロテノイド合成系の進化 高市 真一 (日本医科大)	216
解説	クロロフィル代謝による光化学系の合成、分解の制御 伊藤 寿 (北海道大)	222

## 解説

序文<sup>‡</sup>

北海道大学 低温科学研究所

田中 亮一<sup>1</sup>

福井工業大学 環境情報学部

柏山 祐一郎<sup>2</sup>

現在の地球には、原核生物から真核生物の様々な系統に分類される多様な光合成生物が存在し、驚くほど多様な光合成色素を駆使しています。光合成の原理はすべて共通であるにも関わらず、そこで使われる光合成色素はどうしてこのように多様なのでしょうか。もちろん、光合成生物がそれぞれの光環境に適応するため、様々な「色を使い分ける」ことができるように光合成色素を配することは、生存戦略として重要です。しかし、光合成色素の多様性をそれらの進化的な側面から考えると、既存の代謝経路からの制約や、「光合成装置との適合」という制約が、複雑な影響を与えてきたであろう点も見逃すことはできません。たとえば、光合成色素の代謝経路には分子酸素と密接な関係にある過程も多く、過去の地球で大気中の酸素分圧が上昇した際に大きな変化があったと推測されます。また、光合成色素は光合成のさまざまな反応に関わるだけでなく、光合成装置の構築においても、それらの不可欠なリガンドとして重要な役割を果たしています。さらに、光合成色素のうち、とくにクロロフィルはその光増感作用による毒性を有するがゆえに厳密な代謝制御が必要であるという点も、光合成色素とその代謝経路の進化に影響を与えてきたと考えられます。

さて、2016年5月に東京理科大学で開催された第7回日本光合成学会年会および公開シンポジウムでは、光合成色素代謝と光化学系構築のダイナミックな関係というシンポジウムを企画し、若手からベテランまで、それぞれ色素代謝研究の最先端に関わっている方々に講演をいただきました。そして本特集では、4人の講演者により踏み込んだ解説をお願いした。まず、東京工業大学地球生命研究所の塚谷祐介さんにクロロフィル分子の特徴と多様性とそれらの生合成経路の最新の知見を紹介するとともに、色素合成系に関する進化を論じていただきました。また、名古屋大学の藤田祐一さんには、酸素に弱い窒素固定系と酸素を発生する光合成がどのようにして同じ生物の中で共存するかという問題について、シアノバクテリアの窒素固定とクロロフィル生合成の研究を中心に解説していただきました。日本医科大学の高市真一さんには、光合成生物の進化の過程で、とくに細胞内共生によって組成や合成経路が大きく変化してきたと考えられるカロテノイドの進化について解説していただきました。北海道大学の伊藤寿さんには、クロロフィルの代謝と光化学系の合成・分解の制御との関わりについて解説していただきました。

光合成色素の代謝は、光合成と光合成生物の生理的動態を律する重要な要素であり、また、光合成の進化を考える上でも欠かせない、非常に興味深い研究テーマであるといえます。昨今も、クロロフィル*f*が発見され、さらにはその驚くべき合成酵素が報告されるなど、新しい発見が古い常識を覆していくことも期待できます。本特集が、「色」とは切っても切り離せない光合成の研究の中で、色素代謝の重要性を再認識していただくきっかけになれば、この上ない幸いです。

最後に、本特集の編纂に当たってご尽力いただいた光合成研究編集長の西山佳孝さんに感謝の意を申し述べます。

<sup>‡</sup>解説特集「光合成色素代謝と光化学系構築のダイナミックな関係」

<sup>1</sup>連絡先 E-mail: rtanaka@lowtem.hokudai.ac.jp

<sup>2</sup>連絡先 E-mail: ykas8787@gst.ritsumeit.ac.jp

クロロフィル色素類の合成系の進化<sup>‡</sup>

東京工業大学 地球生命研究所

塚谷 祐介\*

光合成によって生物が太陽の光エネルギーを化学エネルギーに変換できるようになったことは、歴史上最も重要な生物的発明の一つである。光合成反応において、色素であるクロロフィルやバクテリオクロロフィルは光エネルギーを捕捉するために必要なだけでなく、捉えた光エネルギーを用いた電子伝達（いわゆる電荷分離反応）における一次電子供与体等としても機能するため、それらなくして光合成反応は成立しない。クロロフィル色素と言っても、化学構造上の側鎖官能基や基本骨格の違いから、大別して 11 の分子種が現在までに発見されており、最近になってようやくほとんどの天然色素の生体内合成経路が解明された。本稿では、光合成色素であるクロロフィル分子の特徴と多様性（どんな生物がどの色素を持っているか）やその生合成経路を概説しながら、色素合成系に関する進化的考察を展開する。

## 1. はじめに

酸素発生型光合成生物であるシアノバクテリアや植物が色素としてクロロフィル (Chl) を持ち、一方で、酸素非発生型である「光合成細菌」がバクテリオクロロフィル (BChl) を持つ、というのはよく知られた事実だろう。酸素発生型光合成は酸素非発生型光合成から進化したと考えられており<sup>1,2)</sup>、その意味では Chl よりも BChl が進化的に先に誕生していたと考えるのが自然である。しかしながら、(それほど知られてはいないように感じるが) 光合成細菌の中には BChl だけでなく Chl も持つ種も存在する。それは、*Chlorobi* 門(緑色硫黄細菌)や *Acidobacteria* 門(クロラシドバクテリア)や *Firmicutes* 門(ヘリオバクテリア)に属する光合成細菌であり、どのグループも光化学反応中心複合体として光化学系 I 型のみを持つことが共通する<sup>3-7)</sup>。光化学系 I 型のほうが光化学系 II 型よりも進化的に古いとも言われており<sup>1,8,9)</sup>、つまり進化の過程で光化学系 I 型を持つ光合成生物が誕生した際には既に

BChl と Chl の両方を有していたという可能性もある。本稿では、こうした混沌とする色素合成代謝系の進化について、まずはそれぞれの色素分子種の特徴や多様性、および生合成経路を整理していきながら、そこから見えてくる色素進化過程の可能性について言及する。

## 2. 光合成生物が持つ色素分子種

## 2.1. クロロフィル

植物やシアノバクテリアが持つ Chl 類は、Chl *a*, *b*, *c*, *d*, *f* の 5 種類ある<sup>10-12)</sup>。現存する全ての酸素発生型光合成生物は Chl *a* を持ち、その他の色素分子種も持つかどうかは生物種によって異なる。例外として、海洋に優占するシアノバクテリアである *Prochlorococcus* 等は、通常の Chl *a* ではなく、8 位がビニル基 (通常はエチル基に変換される) のままの 8-vinyl-Chl *a* を有する<sup>13)</sup>。Chl *b* と Chl *c* は主に光アンテナ蛋白質で光捕集に機能し、Chl *d* は反応中心複合体で電荷分離に関わる色素として機能する。Chl *f* の局在の詳細は分かっていない。これら 5 つの Chl 色素のうち、Chl *c* を除く全ての色素分子種は、クロリン環という基本骨格を持ち (図 1)、その最長波長 ( $Q_y$ ) 吸収帯はおおむね可視光域の 660~700 nm 付近である。

<sup>‡</sup>解説特集「光合成色素代謝と光化学系構築のダイナミックな関係」

\*連絡先 E-mail: tsukatani@elsi.jp

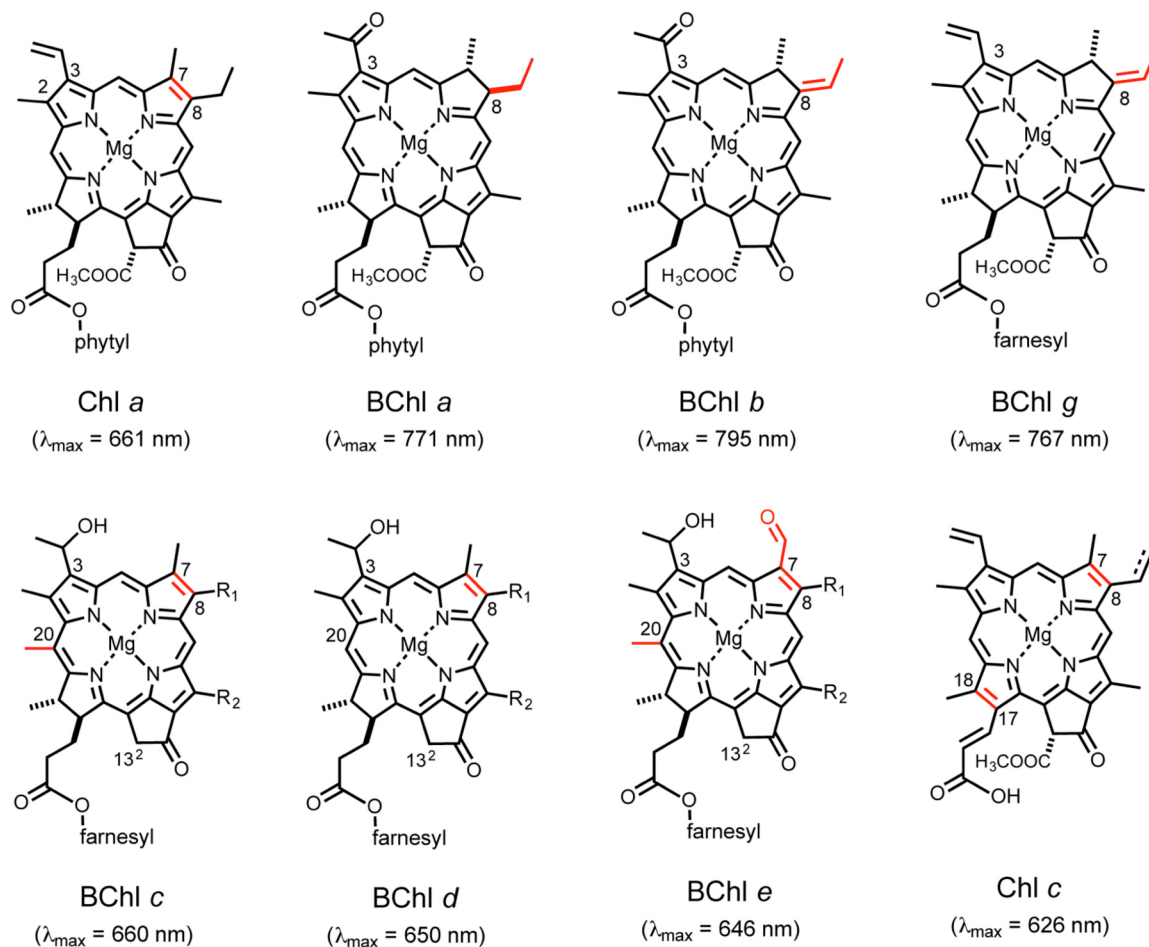


図 1. Chl a と Chl c および全 BChl の化学構造

それぞれの色素の  $Q_y$  吸収帯のピーク ( $\lambda_{\max}$ ) はジエチルエーテル中の値である。BChl c, d, e における  $R_1$  の側鎖構造はエチル基、プロピル基、イソブチル基、あるいはネオペンチル基のいずれかであり、 $R_2$  の側鎖はメチル基あるいはエチル基である。Chl c において、C8 位がエチル基のものが Chl c<sub>1</sub>、ビニル基のものが Chl c<sub>2</sub> と細分化され、さらに C7 位がメトキシカルボニル基に変換されたもの (C8 位はビニル基) が Chl c<sub>3</sub> と呼ばれる。

分子化学構造としては、Chl a の 7 位がホルミル化されたものが Chl b であり、3 位がホルミル化されたものが Chl d で、2 位がホルミル化されたものが Chl f である<sup>10-12)</sup>。また Chl c は、名称こそ“クロロフィル”であるが、その実はクロリン環ではなくポルフィリン環骨格を持つポルフィリン分子 (C17=C18 の二重結合が還元されていない) である点に注意されたい。

## 2.2. バクテリオクロロフィル

光合成細菌が合成する天然の BChl 類は、BChl a, b, c, d, e, g の 6 種類ある<sup>10)</sup>。これらのうち、基本骨格としてバクテリオクロリン環を有するのは BChl a, b, g のみであり、その他の BChl c, d, e

については細菌から発見されたために歴史的に“バクテリオクロロフィル”と名付けられてはいるが、その実はクロリン骨格を有するクロロフィル分子である (図 1)。そのため、BChl c, d, e は Chl 類と同様に、モノマーの状態では 645~660 nm 付近に吸収帯を示す。しかし BChl c, d, e は、化学構造上の特徴から蛋白質等の関与がなくても自己会合しやすく、生体内では自己会合体を形成することで吸収帯が長波長シフトし 715~750 nm に吸収極大を示すようになる (会合体の形成様式は本号の研究紹介記事を参照されたい)<sup>14)</sup>。BChl a, b, g が持つバクテリオクロリン骨格とは、クロリン骨格の C7=C8 二重結合が還元されて単結合になった状態である (図 1)。これにより Chl 類

表 1. 光合成細菌の各分類グループ別の色素と光合成装置の特徴

門	日本語慣用名	クロロフィル系色素	反応中心	周辺集光装置
<i>Proteobacteria</i>	紅色細菌	BChl <i>a</i> または BChl <i>b</i>	光化学系 II 型	LH1/2
<i>Gemmatimonadetes</i>	なし	BChl <i>a</i>	光化学系 II 型	LH
<i>Chloroflexi</i>	緑色糸状性細菌または 繊維状光合成細菌	BChl <i>a</i> と BChl <i>c</i>	光化学系 II 型	クロロソーム LH
<i>Chlorobi</i>	緑色硫黄細菌	BChl <i>a</i> と、BChl <i>c/d/e</i> のう ちどれか、および Chl <i>a</i>	光化学系 I 型	クロロソーム FMO
<i>Acidobacteria</i>	クロラシドバクテリア	BChl <i>a</i> と BChl <i>c</i> と Chl <i>a</i> と、さらに Zn-BChl <i>a</i>	光化学系 I 型	クロロソーム FMO
<i>Firmicutes</i>	ヘリオバクテリア	BChl <i>g</i> と 8-OH-Chl <i>a</i>	光化学系 I 型	なし

(クロリン骨格) と比較してπ共役系が伸長するため、より長波長側へ Q<sub>y</sub> 吸収帯を持つようになり、BChl *a, b, g* は 770~800 nm 付近に吸収極大を示す。

化学構造としては、BChl *a* の C8 位エチル基がエチリデン基に変換されたものが BChl *b* である<sup>10)</sup>。C8 位エチリデン基の存在によってπ共役系が伸長するため、BChl *b* は天然 Chl/BChl 色素類の中で最も長波長の光を吸収し、唯一モノマーの状態で近赤外光領域に吸収極大を持つ<sup>10,15)</sup>。BChl *g* も C8 位にエチリデン基を有するが、C3 位が BChl *a/b* とは異なりビニル基であるために Q<sub>y</sub> 吸収帯が短波長化して相殺されるため、結果として BChl *a* とほぼ同様の吸収極大 (Q<sub>y</sub> 吸収帯=767 nm) を示す。クロロソームの“バクテリオクロロフィル”色素である BChl *c, d, e* の化学構造については、BChl *c* の C20 位メチル基が無いものが BChl *d* であり、C7 位がホルミル化されたものが BChl *e* である<sup>16,17)</sup>。この化学構造の関係性から、BChl *c* の C20 位メチル基が無く且つ C7 位がホルミル化されたものを BChl *f* と呼ぶこととして、1970 年代にその名称が“予約”されていたが<sup>18)</sup>、未だに天然からは見つかっていない。この幻の色素として扱われてきた BChl *f* については、近年になって BChl *e* を持つ緑色硫黄細菌の遺伝子工学的な改変によって BChl *f* を合成させることに成功したことが日本と米国のグループから相次いで報告された<sup>19,20)</sup>。合成された BChl *f* はクロロソームの内部自己会合色素として機能

していたことから、天然環境中から BChl *f* を持つ光合成細菌が発見される日もそう遠くはないかもしれない。

### 2.3. バクテリオクロロフィルの系統分布・多様性

光合成細菌は 6 門の分類群に渡って単離されている (表 1)。*Proteobacteria* 門のいわゆる紅色細菌は単一の色素として BChl *a* を用いて光合成生育するものがほとんどであるが、種によっては BChl *a* ではなく BChl *b* を合成する<sup>21,22)</sup>。*Gemmatimonadetes* 門の光合成細菌は、紅色細菌と同様に、光化学系 II 型を持ち BChl *a* を使って光合成を行う<sup>23)</sup>。*Chloroflexi* 門の光合成細菌 (緑色糸状性細菌あるいは繊維状光合成細菌とも呼ばれる) は、光化学系 II 型に BChl *a* を結合するが、光アンテナ器官としてクロロソームを持ち、その内部に多数の BChl *c* の自己会合体を有する<sup>3,24)</sup>。なお、クロロソームの細胞膜接着部分は“ベースプレート”と呼ばれ、多数の BChl *a* が結合しており、クロロソーム内部色素会合体から反応中心への光エネルギー移動を担っている (図 2)<sup>25)</sup>。*Chlorobi* 門の緑色硫黄細菌もクロロソームを持つが、その内部の自己会合色素は種によって BChl *c, d, e* のうちのいずれかである<sup>3,25)</sup>。また、緑色硫黄細菌は緑色糸状性細菌とは違って、反応中心が光化学系 I 型であり、その内部で一次電子受容体として機能する色素が Chl *a* であるため、BChl *a* を含めて都合 3 種類の色素を合成する



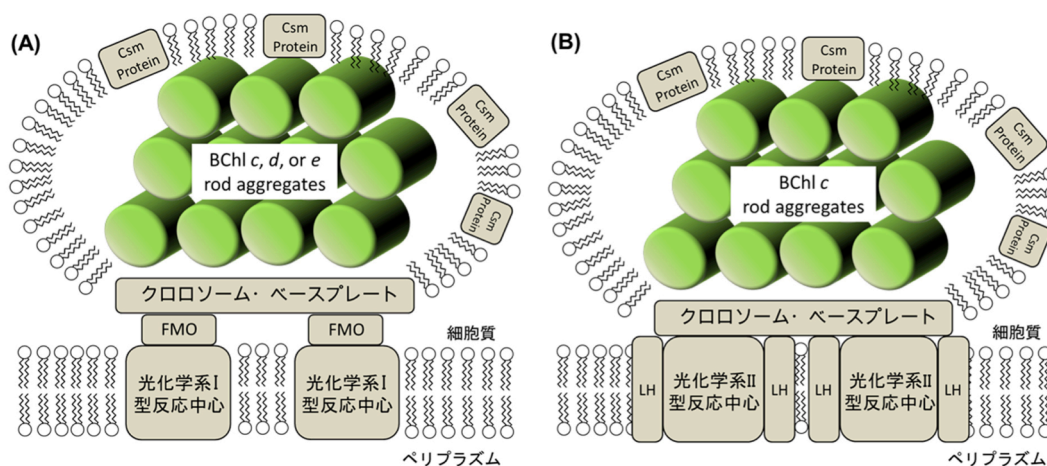


図 2. 緑色硫黄細菌 (A) と緑色糸状性細菌 (B) の光合成装置の構造模式図

緑色の筒状構造はクロロソーム BChl 色素の自己会合体を表す。緑色硫黄細菌は光化学系 I 型反応中心を、緑色糸状性細菌は光化学系 II 型反応中心を用いて電荷分離反応を行う。緑色糸状性細菌にはクロロソームと光化学系反応中心の間に FMO 蛋白質が無い。

<sup>3,4,25)</sup> *Acidobacteria* 門のクロラシドバクテリアも、緑色硫黄細菌と同様に光化学系 I 型に BChl *a* と Chl *a* を、クロロソームに BChl *c* を持つが、これらに加えてさらに中心金属に通常のマグネシウムではなく亜鉛が配位した Zn-BChl *a* を有する<sup>5,6)</sup>。クロラシドバクテリアの Zn-BChl *a* は光化学系 I 型反応中心あたり 1~2 分子結合することが分かっているが、どのように機能しているのかは不明である<sup>6)</sup>。このようにクロロソームを持つ光合成細菌は全 6 門中 3 門に存在するが、反応中心として光化学系 I 型を持つ緑色硫黄細菌とクロラシドバクテリアでは、クロロソームのベースプレート部と光化学系 I の間に FMO と呼ばれる蛋白質 (発見者の名前にちなんで Fenna-Matthews-Olson protein と名付けられた) が存在する (図 2)。FMO は三量体として機能するが、単量体あたり 8 分子の BChl *a* が結合して、クロロソームのベースプレートから光化学系 I 型への光エネルギー移動を担う<sup>26,27)</sup>。Firmicutes 門の光合成細菌であるヘリアバクテリアは BChl *g* を主要な色素として光合成生育するが、他に少量の 8-hydroxyethyl-Chl *a* も合成する<sup>7,28)</sup>。ヘリオバクテリアは光アンテナ複合体を持たないため、これらの色素は全て反応中心に結合している。

### 3. 光合成色素の生合成経路

#### 3.1. 色素生合成経路の初期段階

Chl および BChl は、5-アミノレブリン酸というグルタミン酸またはグリシンの誘導体を出発物質として生合成される (図 3)<sup>29,30)</sup>。グルタミン酸から 5-アミノレブリン酸への変換は、グルタミル t-RNA 還元酵素等によって触媒される<sup>31,32)</sup>。グルタミル t-RNA 還元酵素はセントラルドグマにおける蛋白質合成でも機能するものであり、初期生命体が自己複製機構 (self-replicating system) を獲得した頃には既に存在したと考えられることから、色素分子の生合成系も生物進化のかなり初期段階で獲得されていた可能性がある。なお、グリシンからのルートでは、グリシンとスクシニル CoA の縮合反応によって 5-アミノレブリン酸が合成される<sup>33,34)</sup>。

5-アミノレブリン酸から Uroporphyrinogen III までの経路はヘム、シロヘム、ビタミン B<sub>12</sub> (コバラミン)、および F<sub>430</sub> (メチル補酵素 M 還元酵素の補欠分子族) の生合成経路と共通している (図 3)<sup>29,30,35)</sup>。Uroporphyrinogen III からさらに 3 段階先の Protoporphyrin IX までの経路はヘム生合成と共通する経路である (図 3)。Protoporphyrin IX に対して中心金属として Fe が挿入されるとヘム合成経路へ、Mg が挿入されると Chl/BChl 生合成経路へと進む。ヘムは、全生物が持つ補酵素であり、生物の共通祖先 (LUCA: Last Universal

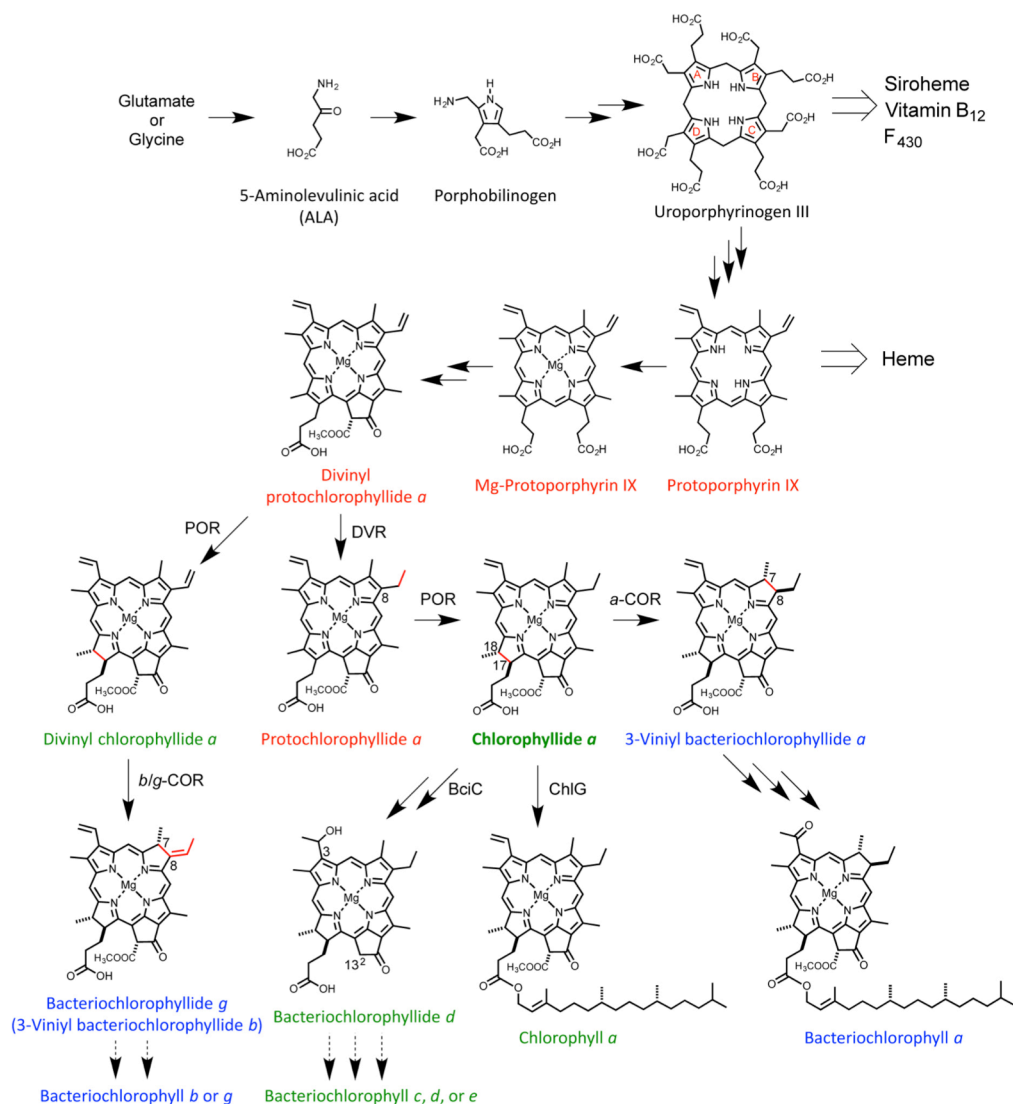


図 3. 天然光合成色素の生合成経路

化合物名の赤、緑、青色表記は、それぞれポルフィリン骨格、クロリン骨格、バクテリオクロリン骨格を持つ化合物を表す。DVRはジビニルリダクターゼ、PORはプロトクロロフィリド *a* 還元酵素、CORはクロロフィリド *a* 還元酵素の略称である。*a*-CORは BChl *a* 生産性光合成細菌の COR を、*b/g*-CORは BChl *b* あるいは BChl *g* 生産性光合成細菌の COR を表す。

Common Ancestor) もヘムを有していたと考えるのが自然である。現在のクロフィル合成系が全てヘム合成系からの分岐によって生じたかは不明ではあるものの、最初の光合成生物の誕生も生命進化の初期段階であった可能性はあるだろう。

### 3.2. 色素生合成初期経路における進化的考察

Protoporphyrin IX へのマグネシウムの挿入は、Mg-キラターゼという酵素によって触媒される。ヘム合成経路における鉄を挿入するフェロキラターゼは単一サブユニットであるのに対して、

Mg-キラターゼは3つのサブユニットで構成される<sup>36,37</sup>。フェロキラターゼが反応に還元力を必要とするのに対して、Mg-キラターゼはその反応にATPを要する<sup>36-38</sup>。ChlとBChlは通常中心金属としてマグネシウムを配位しているが、ごく一部の光合成細菌では中心金属に亜鉛を配位したZn-BChlを持つ<sup>6,39</sup>。前述のクロラシドバクテリア<sup>6</sup>以外では、*Proteobacteria* 門の *Acidiphilium* 属の光合成細菌が Zn-BChl *a* を持つ<sup>39</sup>。これらの生物では通常の(Mg-)BChlも(量の多寡こそあれ)合成はされる。Mg-キラターゼによってMgが挿

入された後に環境中の物理化学的な作用によって脱離し Zn に置換されるのか、あるいは Zn 用のキラーゼが存在して酵素触媒的に Zn-BChl が合成されるのかは未だに分かっていない<sup>40)</sup>。有機合成実験によりポルフィリン化合物に中心金属を挿入する際には、Mg 挿入では高温ピリジン中でのリフラックスが必要となるが、Zn 挿入の場合は常温付近でも可能であるため<sup>41)</sup>、酵素反応を介さずに Zn-BChl が合成されている可能性も残されている。また化学的には、特に酸性環境では、Mg-BChl よりも Zn-BChl の方が安定である。ではなぜ光合成生物がほぼ必ず色素の中心金属に Mg を利用しているかという疑問に対する答えの一つは、原始地球の地質学的性質によるかもしれない。約 44 億年前の地球表層環境では、Mg は最も豊富に存在した元素の一つであり、Zn はほとんど存在しなかったとされる<sup>42)</sup>。当時の地球に多く存在したとされる元素(Si, Ti, Na, K, Ca, Mg, Fe)のポルフィリン化合物への挿入を調べた化学実験では、その化学的性質ゆえに Mg と Fe が配位した化合物が進化的にも最も安定的に保存されてきたのだらうと結論付けられている<sup>43)</sup>。

色素分子自体にも Mg あるいは Zn が必要となるが、クロロフィルやヘムの生合成反応に Mg や Zn を要する酵素も存在する。生合成経路の初期段階で 5-アミノレブリン酸 2 分子を縮合して Porphobilinogen を合成する酵素では、酵素の活性中心に Mg か Zn を結合する<sup>44)</sup>。系統解析によると、より祖先的な Porphobilinogen 合成酵素ほど、Zn を結合するものであることが示唆されている<sup>44,45)</sup>。これを素直に解釈すると、クロロフィルやヘムが酵素生物学的に合成されるようになったのは地球上に Zn が豊富に存在し始めた時期よりも後という事になる。初期生命体を構成する有機化合物は初め非生物的に ("abiotic に") 合成されたものが用いられ、その後セントラルドグマによって生物的に合成されるようになったと言われているが、ポルフィリン化合物 (クロロフィルやヘムの前駆物質) も非生物的に合成され得るという研究は多数ある。放電<sup>46,47)</sup>や紫外線放射<sup>48)</sup>、高温等<sup>49)</sup>の条件を用いた有名なミラー・ユーリ

実験でもポルフィリンが生成されるという報告や、宇宙から飛来した隕石中にポルフィリン化合物が見つかったとする研究<sup>50)</sup>も報告されている。初期地球における生命体が非生物的に作られたポルフィリン分子を用いて黎明期の光反応を行っていた可能性も示唆されており<sup>51-53)</sup>、これがやがて酵素反応に基づく分子生産と光合成を行うようになったと仮定すると、地球上に Zn 元素が豊富に存在し始めた時期を特定できればその分岐点に関して示唆を与えることができるだろう。

### 3.3. Chl と BChl に共通の生合成経路

Protoporphyrin IX 以降は色素生合成に独自の経路となるが、そこからクロロフィリド *a* (Chlide *a*) までの段階が、Chl と BChl のどちらにも共通の生合成経路である (図 3)。つまり Chlide *a* は、それぞれの色素分子種の生合成ステップへの分岐点となる重要な中間物質である。Protoporphyrin IX に Mg が挿入された後は、メチルトランスフェラーゼとシクラーゼによって Divinyl protochlorophyllide *a* にまで至り、さらにジビニルリダクターゼによって還元されてプロトクロロフィリド *a* (PChlide *a*) が合成される (図 3)<sup>30,54)</sup>。なお、Protoporphyrin IX から PChlide *a* までの色素中間体の基本骨格はポルフィリン環である。その後、プロトクロロフィリド還元酵素 (POR) によって PChlide *a* の C17=C18 位二重結合が還元され、クロリン環構造を持つ Chlide *a* へと変換される<sup>55,56)</sup>。POR には、2つのタイプが存在する。1つは酸素発生型光合成生物のみが持つ光依存型プロトクロロフィリド還元酵素 (LPOR) であり、この酵素は反応に光エネルギーを必要とする。もう1つは、光非依存型プロトクロロフィリド還元酵素 (DPOR) であり、光合成細菌を含むほとんどの光合成生物がこれを持つ。LPOR が酸素発生型光合成生物のみに存在することや、LPOR は酸素耐性があるのに対して DPOR が酸素に対して非常に脆弱であることから、祖先型光合成生物は DPOR を用いてクロリン環化合物の合成を行っていたと考えられる。

### 3.4. Chlide *a* からの分岐経路

Chlide *a* に対してクロロフィル合成酵素 (ChlG) が作用して疎水性鎖であるフィチル基が C17 位に付加されることで、Chl *a* が合成される (図 1、図 3)。Chl *b, d, f* の合成は、ChlG の作用の前あるいは後にそれぞれ C7 位メチル、C3 位ビニル、C2 位メチル基がホルミル化されることで達成される。これらのうち、Chl *b* 合成酵素<sup>57)</sup>と Chl *f* 合成酵素<sup>9)</sup>は同定されているが、Chl *d* 合成酵素 (C3 位ホルミル化酵素) はまだ見つかっていない。

BChl *a* 生合成経路への分岐は、Chlide *a* に対してクロロフィリド還元酵素 (COR) が作用して C7=C8 位二重結合が還元されて、3-Vinyl bacteriochlorophyllide *a* が合成されることで起こる<sup>58,59)</sup>。これはクロリン環からバクテリオクロリン環への変換に相当する。その後、BchF と BchC によって C3 位がアセチル化された Bacteriochlorophyllide *a* に対して、バクテリオクロロフィル合成酵素 (BchG) が作用することで疎水性鎖であるフィチル基が C17 位上に付加されて BChl *a* が合成される<sup>54)</sup>。

Chl *a* と BChl *a* の最終合成ステップ (フィチル鎖の付加) を触媒する ChlG と BchG は、互いに相同性があるホモログ蛋白質である。つまり、BChl *a* の合成には Chl *a* の合成よりも 3 段階も余分な合成ステップが必要であり、グラニク仮説<sup>60,61)</sup>に照らし合わせると単純な合成系を持つ化合物ほど進化的に古いとされるため、Chl *a* の方が BChl *a* よりも起源が古いことになる。

Chl が進化的に古いか BChl の方が古いかという議論の発端は、1) 生合成経路を見る限り Chl の方が単純な分子である、2) 光合成細菌の中でも Chl 分子を持つものが存在する、の 2 点に集約される。この議論を実験的に証明するために著者らのグループは、DPOR と COR に注目している。ポルフィリン環は DPOR によってクロリン環に変換され (C17=C18 二重結合の還元)、さらにクロリン環は COR によってバクテリオクロリン環に変換される (C7=C8 二重結合の還元)<sup>54-56,58,59)</sup>。これらの反応をそれぞれ触媒する DPOR と COR は共にニトロゲナーゼ類似酵素ファミリーに分類され<sup>62)</sup>、互いに相同性を示すことから、共通

の祖先酵素から進化してきたと考えられている。この共通祖先酵素が DPOR 様の反応性しか持たない場合は、祖先型光合成生物は Chl までしか合成できないことになり、DPOR と COR の両方の反応性を有する (2 箇所の二重結合を還元できる) 場合は、祖先型光合成生物は既に BChl を持っていたことになるだろう。系統解析によって共通祖先酵素の一次配列を決定することができれば、その酵素活性を解析することでこの問題に実験的な証拠を提示することができるだろう。

### 3.5. 生物種による COR の反応性の違い

中間物質 Chlide *a* を経由せずに生合成される天然色素は 3 種類ある。うち 1 つは Chl *c* であり、これはそもそもポルフィリン分子なのでクロリン環構造である Chlide *a* まで至らないと考えられる。残る 2 つの色素は BChl *b* と BChl *g* であり、共に C8 位エチリデン基という側鎖構造を持つことが特徴的である (図 1)。C8 位エチリデン基の存在によってこれら 2 つの色素は  $\pi$  共役系が伸長し、(エチリデン基が無い時よりも) より長波長の  $Q_y$  吸収帯を示す。中でも BChl *b* は天然色素の中で唯一近赤外光領域に吸収極大 ( $Q_y$  吸収帯) を持つため、産業利用へも期待されているが、エチリデン形成酵素は長年の謎であった。近年のゲノム解析によって BChl *b, g* を持つ光合成細菌は共通して、色素生合成酵素群のうちジビニルリダクターゼを欠くことが分かってきた (図 3)<sup>63,64)</sup>。このため COR の基質となる Chlide *a* が生じず、これらの光合成細菌では COR は (C8 位ビニル基が還元されていない) 8-vinyl-Chlide *a* を基質として認識・作用し、C7=C8-C8<sup>1</sup>=C8<sup>2</sup> のジエン型共役二重結合のモノ還元と同時に C8 位エチリデン基が形成されることが近年明らかとなった<sup>15,65,66)</sup>。つまり、エチリデン形成のために別個の酵素が存在するわけではなく、COR の反応性 (水素付加箇所) が BChl *a* 生産性光合成細菌の COR とは異なるために、最終産物となる色素分子種が変わり、ひいては色素が結合する光アンテナ蛋白質の *in vivo* 吸収帯が 140 nm も長波長化しており、これは大変興味深い現象である。BChl *a* 生産細菌の COR と BChl *b* 生産細菌の COR を用いた系

統解析では、サンプル数が少ないものの、BChl *a* 型 COR から BChl *b* 型 COR が進化したことが示唆された<sup>15)</sup>。つまりこの結果だけを捉えると、駆動光から見た生物の進化は、可視光側からより長波長を利用する方向へ進化してきたことになる。しかし、最初に誕生した色素が BChl *a* と仮定した場合には、そこから短波長利用 (Chl 類) と長波長利用 (BChl *b*) の両方向へそれぞれ進化してきたことになる。進化的に最初に誕生した色素が何であったのかを明らかにしておくことは、生物の光波長利用が 1 つの方向性を持って進化してきたのかあるいはそれぞれの生物のニッチに沿って複雑に進化してきたのかという問題に対してのマイルストーンになるだろう。

### 3.6. クロロソーム内部 BChl 色素への生合成経路分岐

前述したように Chlide *a* は、色素生合成経路においてハブとなる重要な中間物質である。Chlide *a* に対して、ChlG が作用すると Chl 生合成へ分岐し、COR が作用すると BChl *a* 生合成へ分岐するが、BciC という酵素が作用すると BChl *c, d, e* 生合成経路へと分岐する<sup>67,68)</sup>。これらのクロソーム内部色素に共通する特徴は 2 点あり、C3<sup>1</sup>位にヒドロキシ基を有することと、C13<sup>2</sup>位の (他の色素には必ず存在する) メトキシカルボニル基が脱離していることである<sup>10,14)</sup>。C13<sup>2</sup>位メトキシカルボニル基がないために、C13<sup>1</sup>位のカルボニル基周辺の立体障害が軽減されることで、これらの色素は自己会合体を形成しやすくなる<sup>69)</sup>。BChl *c, d, e* 生合成系への分岐段階で機能する BciC は、メトキシカルボニル基の脱離を触媒する酵素であり<sup>14,68)</sup>、その後 BchF/V の作用によって C3<sup>1</sup>位ヒドロキシ基が合成される<sup>70,71)</sup>。さらにそれ以降は、BChl *c* 合成では C20 位メチル化、BChl *e* 合成ではさらに C7 位ホルミル化が起こり (BChl *d* ではどちらも起こらない)、最終的には C17 位上に疎水性ファルネシル鎖が付加されて生合成経路は完結する<sup>16,17,72)</sup>。結果として緑色硫黄細菌では、C17 位に疎水性長鎖アルキルを付加する酵素を都合 3 種類持つ (ChlG=Chl *a* 用; BchG=BChl *a* 用; BchK=BChl *c, d, e* 用)。これら

の酵素の共通祖先蛋白質が、色素の基本骨格や側鎖構造に関係なく長鎖アルキルを付加する反応性を持つかどうか大変興味深いところである。

### 4. おわりに

生命の誕生は今から 45~40 億年前の冥王代期と言われているが、それからどのくらい後になって生物が光合成能を獲得したのかはまだはっきりとしていない。初期生命体の生命維持活動に必要なエネルギー源は未だ大きな謎であり、その候補の一つとして太陽光は、遮るものさえ無ければ「すぐそこにあるエネルギー源」だったと考えられるため、生命誕生のすぐ後には光合成生物/生命体が存在していたと考える研究者は少なくない (と個人的に思う)。一方で、生命の起源は深海中の熱水鉱床付近で起こったとする説も根強く、この場合は当然深海まで太陽光は到達していない。しかし近赤外/赤外領域の波長エネルギーが地熱放射 (黒体放射) によってもたらされていたという研究もあり<sup>73)</sup>、この波長域は Chl よりも BChl が得意とするところである。こうした意味でも、進化の過程で Chl か BChl のどちらが先に存在していたのかという問題は興味深く、他の研究分野への波及効果も大きいと思われる。

BChl *c, d, e* のメトキシカルボニル脱離酵素、BChl *e* の C7 位ホルミル化酵素、そして BChl *b, g* のエチリデン形成酵素が近年相次いで発見されたことによって、全ての BChl 分子種の全ての生合成経路は既に判明している。Chl 分子種の生合成系で未だに不明なものは、Chl *d* の C3 位ホルミル化酵素、Chl *c* の C17 位アクリレート基形成酵素、Chl *c*<sub>3</sub> の C7 位メトキシカルボニル基形成に関わる酵素、およびヘリオバクテリアの 8-hydroxyethyl-Chl *a* の合成に関わる酵素である。これらの酵素が同定されて Chl 生合成系も完結することを心待ちにしているが、一方で特殊環境中から新たな光合成生物や色素分子が発見されて、また新たな生合成経路が解明されていくことに関わるのも楽しみである。新たな多様性が見つかることで光合成の進化を紐解く鍵がまた一つ増えることに期待している。

## 謝辞

本研究の一部は、文部科学省科研費(26840099, 15H01063) および科学技術振興機構さきがけ研究の補助を受けて行われました。本稿の執筆にあたり、立命館大学の民秋均先生、浅井智広先生、東京工業大学の中川麻悠子先生、増田真二先生には、貴重なご助言を頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。また、このような執筆の場を与えてくださった日本光合成学会ならびに編集委員の方々に御礼申し上げます。

Received November 21, 2016; Accepted November 28, 2016; Published December 31, 2016

## 参考文献

- Allen, J.F. and Martin, W. (2007) Evolutionary biology: out of thin air. *Nature* 445, 610–612.
- Hamilton, T.L., Bryant, D.A. and Macalady, J.L. (2016) The role of biology in planetary evolution: cyanobacterial primary production in low oxygen Proterozoic oceans. *Environ. Microbiol.* 18, 325–340.
- Frigaard, N.F. and Bryant, D.A. (2004) Seeing green bacteria in a new light: genomics-enabled studies of the photosynthetic apparatus in green sulfur bacteria and filamentous anoxygenic phototrophic bacteria. *Arch. Microbiol.* 182, 265–276.
- Hauska, G., Schoedl, T., Remigy, H. and Tsiotis, G. (2001) The reaction center of green sulfur bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1507, 260–277.
- Bryant, D.A., Costas, A.M., Maresca, J.A., Chew, A.G., Klatt, C.G., Bateson, M.M., Tallon, L.J., Hostetler, J., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F. and Ward, D.M. (2007) *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*: an aerobic phototrophic Acidobacterium. *Science* 317, 523–526.
- Tsukatani, Y., Romberger, S.P., Golbeck, J.H. and Bryant, D.A. (2012) Isolation and characterization of homodimeric type-I reaction center complex from *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*, an aerobic chlorophototroph. *J. Biol. Chem.* 287, 5720–5732.
- Oh-oka, H. (2007) Type I reaction center of photosynthetic heliobacteria. *Photochem. Photobiol.* 83, 177–186.
- Mulkidjanian, A.Y., Koonin, E.V., Makarova, K.S., Mekhedov, S.L., Sorokin, A., Wolf, Y.I., Dufresne, A., Partensky, F., Burd, H., Kaznadzey, D., Haselkorn, R. and Galperin, M.Y. (2006) The cyanobacterial genome core and the origin of photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 13126–13131.
- Ho, M.Y., Shen, G., Canniffe, D.P., Zhao, C. and Bryant, D.A. (2016) Light-dependent chlorophyll *f* synthase is a highly divergent paralog of PsbA of photosystem II. *Science* 353, aaf9178.
- 三室 守, 垣谷俊昭, 民秋 均 (2011) クロロフィル—構造・反応・機能— 裳華房, 東京, 日本.
- Miyashita, H., Ikemoto, H. and Kurano, N. (1996) Chlorophyll *d* as a major pigment. *Nature* 383, 402.
- 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.
- Chisholm, S.W., Frankel, S.L., Goericke, R., Olson, R.J., Palenik, B., Waterbury, J.B., West-Johnsrud, L. and Zettler, E.R. (1992) *Prochlorococcus marinus* nov. gen. nov. sp.: an oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll *a* and *b*. *Arch. Microbiol.* 157, 297–300.
- 寺村美里 (2016) 色素合成酵素の活性解析から考察する緑色硫黄細菌のアンテナ系クロロフィル生合成経路. 光合成研究 26, 183–189.
- Tsukatani, Y., Yamamoto, H., Harada, J., Yoshitomi, T., Nomata, J., Kasahara, M., Mizoguchi, T., Fujita, Y. and Tamiaki, H. (2013) An unexpectedly branched biosynthetic pathway for bacteriochlorophyll *b* capable of absorbing near-infrared light. *Sci. Rep.* 3, 1217.
- Harada, J., Saga, Y., Yaeda, Y., Oh-oka, H. and Tamiaki, H. (2005) In vitro activity of C-20 methyltransferase, BchU, involved in bacteriochlorophyll *c* biosynthetic pathway in green sulfur bacteria. *FEBS lett.* 579, 1983–1987.
- Harada, J., Mizoguchi, T., Satoh, S., Tsukatani, Y., Yokono, M., Noguchi, M., Tanaka, A. and Tamiaki, H. (2013) Specific gene *bciD* for C7-methyl oxidation in bacteriochlorophyll *e* biosynthesis of brown-colored green sulfur bacteria. *PLoS ONE* 8, e60026.
- Gloe, A., Pfennig, N., Brockmann, H., Jr. and Trowitzsch, W. (1975) A new bacteriochlorophyll from brown-colored *Chlorobiaceae*. *Arch. Microbiol.* 102, 103–109.
- Harada, J., Mizoguchi, T., Tsukatani, Y., Noguchi, M. and Tamiaki, H. (2012) A seventh bacterial chlorophyll driving a large light-harvesting antenna. *Sci. Rep.* 2, 671.
- Vogl, K., Tank, M., Orf, G. S., Blankenship, R.E. and Bryant, D.A. (2012) Bacteriochlorophyll *f*: properties of chlorosomes containing the "forbidden chlorophyll". *Front. Microbiol.* 3, 298.
- Hiraishi, A. (1997) Transfer of the bacteriochlorophyll *b*-containing phototrophic bacteria *Rhodospseudomonas viridis* and *Rhodospseudomonas*

- sulfovirdis* to the genus *Blastochloris* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 47, 217–219.
22. Imhoff, J.F. and Trüper, H.G. (1977) *Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll *b*. *Arch. Microbiol.* 114, 115–121.
  23. Zeng, Y., Feng, F., Medová, H., Dean, J. and Koblížek, M. (2014) Functional type 2 photosynthetic reaction centers found in the rare bacterial phylum *Gemmatimonadetes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 7795–7800.
  24. Hanada, S. (2003) Filamentous anoxygenic phototrophs in hot springs. *Microbes Environ.* 18, 51–61.
  25. Frigaard, N.U. and Bryant, D.A. (2006) Chlorosomes: antenna organelles in photosynthetic green bacteria, in *Complex structures in prokaryotes* (Shively, J.M. Ed.) vol 2, pp 79–114, Springer, Berlin, Germany.
  26. Li, Y.F., Zhou, W., Blankenship, R.E. and Allen, J.P. (1997) Crystal structure of the bacteriochlorophyll *a* protein from *Chlorobium tepidum*. *J. Mol. Biol.* 271, 456–471.
  27. Tronrud, D.E., Wen, J., Gay, L. and Blankenship, R.E. (2009) The structural basis for the difference in absorbance spectra for the FMO antenna protein from various green sulfur bacteria. *Photosynth. Res.* 100, 79–87.
  28. Brockmann, H., Jr. and Lipinski, A. (1983) Bacteriochlorophyll *g*. A new bacteriochlorophyll from *Hellobacterium chlorum*. *Arch. Microbiol.* 136, 17–19.
  29. Beale, S.I. (2005) Green genes gleaned. *Trends Plant Sci.* 10, 309–312.
  30. Masuda, T. and Fujita, Y. (2008) Regulation and evolution of chlorophyll metabolism. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1131–1149.
  31. Bruyant, P. and Kannangara, C.G. (1987) Biosynthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid in greening barley leaves. VIII: Purification and characterization of the glutamate-tRNA ligase. *Carlsberg Res. Commun.* 52, 99–109.
  32. Weinstein, J.D., Mayer, S.M. and Beale, S.I. (1987) Formation of  $\delta$ -aminolevulinic acid from glutamic acid in algal extracts separation into an RNA and three required enzyme components by serial affinity chromatography. *Plant Physiol.* 84, 244–250.
  33. Kikuchi, G., Kumar, A., Talmage, P. and Shemin, D. (1958) The enzymatic synthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid. *J. Biol. Chem.* 233, 1214–1219.
  34. Gibson, K.D., Laver, W.G. and Neuberger, A. (1958) Initial stages in the biosynthesis of porphyrins. 2. The formation of  $\delta$ -aminolaevulinic acid from glycine and succinyl-coenzyme A by particles from chicken erythrocytes. *Biochem. J.* 70, 71–81.
  35. Georgopapadakou, N.H. and Scott, A.I. (1977) On B<sub>12</sub> biosynthesis and evolution. *J. Theor. Biol.* 69, 381–384.
  36. Dailey, H.A., Dailey, T.A., Wu, C.K., Medlock, A.E., Rose, J.P. and Wang, K.F. (2000) Ferrochelatase at the millennium: structures, mechanisms and [2Fe-2S] clusters. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 1909–1926.
  37. Walker, J.C. and Willows, D.R. (1997) Mechanism and regulation of Mg-chelatase. *Biochem. J.* 327, 321–333.
  38. Jensen, P.E., Gibson, L.C.D. and Hunter, C.N. (1998) Determinants of the catalytic activity with the use of the purified I, D and H subunits of the magnesium protoporphyrin IX chelatase from *Synechocystis* PCC6803. *Biochem. J.* 334, 335–344.
  39. Wakao, N., Yokoi, N., Isoyama, N., Hiraishi, A., Shimada, K., Kobayashi, M., Kise, H., Iwaki, M., Itoh, S. and Takaichi, S. (1996) Discovery of natural photosynthesis using Zn-containing bacteriochlorophyll in an aerobic bacterium *Acidiphilium rubrum*. *Plant Cell Physiol.* 37, 889–893.
  40. Masuda, T., Inoue, K., Masuda, M., Nagayama, M., Tamaki, A., Ohta, H., Shimada, H. and Takamiya, K.-I. (1999) Magnesium insertion by magnesium chelatase in the biosynthesis of zinc bacteriochlorophyll *a* in an aerobic acidophilic bacterium *Acidiphilium rubrum*. *J. Biol. Chem.* 274, 33594–33600.
  41. Lindsey, J.S. and Woodford, J.N. (1995) A simple method for preparing magnesium porphyrins. *Inorg. Chem.* 34, 1063–1069.
  42. Maruyama, S., Ikoma, M., Genda, H., Hirose, K., Yokoyama, T. and Santosh, M. (2013) The naked planet Earth: Most essential pre-requisite for the origin and evolution of life. *Geosci. Front.* 4, 141–165.
  43. Krasnovsky, A.A. (1976) Chemical evolution of photosynthesis. *Orig. Life* 7, 133–143.
  44. Frère, F., Reents, H., Schubert, W.-D., Heinz, D.W. and Jahn, D. (2005) Tracking the evolution of porphobilinogen synthase metal dependence in vitro. *J. Mol. Biol.* 345, 1059–1070.
  45. Jaffe, E.K. (2003) An unusual phylogenetic variation in the metal ion binding sites of porphobilinogen synthase. *Chem. Biol.* 10, 25–34.
  46. Hodgson, G. and Ponnampereuma, C. (1968) Prebiotic porphyrin genesis: porphyrins from electric discharge in methane, ammonia, and water vapor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 59, 22.
  47. Simionescu, C.I., Simionescu, B.C., Mora, R. and



- Leancã, M. (1978) Porphyrin-like compounds genesis under simulated abiotic conditions. *Orig. Life* 9, 103–114.
48. Szutka, A. (1966) Formation of pyrrolic compounds by ultra-violet irradiation of  $\delta$ -aminolevulinic acid. *Nature* 212, 401–402.
49. Lindsey, J.S., Ptaszek, M. and Taniguchi, M. (2009) Simple formation of an abiotic porphyrinogen in aqueous solution. *Orig. Life Evol. Biosph.* 39, 495–515.
50. Hodgson, G.W. and Baker, B.L. (1964) Evidence for porphyrins in the Orgueil meteorite. *Nature* 202, 125–131.
51. Mauzerall, D. (1992) Light, iron, Sam Granick and the origin of life. *Photosynth. Res.* 33, 163–170.
52. Mauzerall, D.C. (1998) Evolution of porphyrins. *Clin. Dermatol.* 16, 195–201.
53. Mercer-Smith, J.A., Raudino, A. and Mauzerall, D.C. (1985) A model for the origin of photosynthesis—III. The ultraviolet photochemistry of uroporphyrinogen. *Photochem. Photobiol.* 42, 239–244.
54. Tamiaki, H., Teramura, M. and Tsukatani, Y. (2016) Reduction processes in biosynthesis of chlorophyll molecules: chemical implication of enzymatically regio- and stereoselective hydrogenations in the late stages of their biosynthetic pathway. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 89, 161–173.
55. 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.
56. Reinbothe, C., Bakkouri, M.EI., Buhr, F., Muraki, N., Nomata, J., Kurisu, G., Fujita, Y. and Reinbothe, S. (2010) Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction. *Trends Plant Sci.* 15, 614–624.
57. Tanaka, A., Ito, H., Tanaka, R., Tanaka, N. K., 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.
58. Nomata, J., Mizoguchi, T., Tamiaki, H. and Fujita, Y. (2006) A second nitrogenase-like enzyme for bacteriochlorophyll biosynthesis: reconstitution of chlorophyllide *a* reductase with purified X-protein (BchX) and YZ-protein (BchY-BchZ) from *Rhodobacter capsulatus*. *J. Biol. Chem.* 281, 15021–15028.
59. 塚谷祐介, 民秋 均 (2015) 近赤外光を吸収するバクテリアオクロフィル色素の生合成経路解明と応用. *生化学* 87, 234–238.
60. Granick, S. (1957) Speculations on the origins and evolution of photosynthesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 69, 292–308.
61. Granick, S. (1965) Evolution of heme and chlorophyll, in *Evolving Genes and Proteins* (Bryson, V. and Vogel, H.J. Eds.) pp 67–88, Academic Press, Massachusetts, USA.
62. Hu, Y. and Ribbe, M.W. (2015) Nitrogenase and homologs. *J. Biol. Inorg. Chem.* 20, 435–445.
63. Sattley, W.M., Madigan, M.T., Swingley, W.D., Cheung, P.C., Clocksin, K.M., Conrad, A.L., Dejesa, L.C., Honchak, B.M., Jung, D.O., Karbach, L.E., Kurdoglu, A., Lahiri, S., Mastrian, S.D., Page, L.E., Taylor, H.L., Wang, Z.T., Raymond, J., Chen, M., Blankenship, R.E. and Touchman, J.W. (2008) The genome of *Heliobacterium modesticaldum*, a phototrophic representative of the *Firmicutes* containing the simplest photosynthetic apparatus. *J. Bacteriol.* 190, 4687–4696.
64. Tsukatani, Y., Hirose, Y., Harada, J., Misawa, N., Mori, K., Inoue, K. and Tamiaki, H. (2015) Complete genome sequence of the bacteriochlorophyll *b*-producing photosynthetic bacterium *Blastochloris viridis*. *Genome Announc.* 3, e01006-15.
65. Tsukatani, Y., Yamamoto, H., Mizoguchi, T., Fujita, Y. and Tamiaki, H. (2013) Completion of biosynthetic pathways for bacteriochlorophyll *g* in *Heliobacterium modesticaldum*: The C8-ethylidene group formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 120–1204.
66. Tsukatani, Y., Harada, J., Nomata, J., Yamamoto, H., Fujita, Y., Mizoguchi, T. and Tamiaki, H. (2015) *Rhodobacter sphaeroides* mutants overexpressing chlorophyllide *a* oxidoreductase of *Blastochloris viridis* elucidate functions of enzymes in late bacteriochlorophyll biosynthetic pathways. *Sci. Rep.* 5, 9741.
67. Liu, Z. and Bryant, D.A. (2011) Identification of a gene essential for the first committed step in the biosynthesis of bacteriochlorophyll *c*. *J. Biol. Chem.* 286, 22393–22402.
68. Teramura, M., Harada, J., Mizoguchi, T., Yamamoto, K. and Tamiaki, H. (2016) In vitro assays of BciC showing C13<sup>2</sup>-demethoxycarbonylase activity requisite for biosynthesis of chlorosomal chlorophyll pigments. *Plant Cell Physiol.* 57, 1048–57.
69. Oba, T. and Tamiaki, H. (1991) Why do chlorosomal chlorophylls lack the C13<sup>2</sup>-methoxycarbonyl moiety? An in vitro model study. *Photosynth. Res.* 61, 23–31.
70. Harada, J., Teramura, M., Mizoguchi, T., Tsukatani, Y., Yamamoto, K. and Tamiaki, H. (2015) Stereochemical conversion of C3-vinyl group to 1-hydroxyethyl group in bacteriochlorophyll *c* by the hydratases BchF and BchV: adaptation of green sulfur



- bacteria to limited-light environments. *Mol. Microbiol.* 98, 1184–1198.
71. Teramura, M., Harada, J. and Tamiaki H. (2016) In vitro stereospecific hydration activities of the 3-vinyl group of chlorophyll derivatives by BchF and BchV enzymes involved in bacteriochlorophyll *c* biosynthesis of green sulfur bacteria. *Photosynth. Res.* 130, 33–45.
72. Frigaard, N.U., Voigt, G.D. and Bryant, D.A. (2002) *Chlorobium tepidum* mutant lacking bacteriochlorophyll *c* made by inactivation of the *bchK* gene, encoding bacteriochlorophyll *c* synthase. *J. Bacteriol.* 184, 3368–3376.
73. Nisbet, E.G., Cann, J.R, Lee, C. and Dover, V. (1995) Origins of Photosynthesis. *Nature* 373, 479–480.

## Evolution of Chlorophyll and Bacteriochlorophyll Biosynthesis

Yusuke Tsukatani\*

Earth-Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology

## 解説

酸素パラドクスの統御で収斂するクロロフィル合成と窒素固定<sup>†</sup>

名古屋大学 大学院生命農学研究科

藤田 祐一\* 辻本 良真

分子状窒素をアンモニアに変換する窒素固定反応を担うニトロゲナーゼは、酸素にさらされると直ちに不活性化されてしまう酵素である。窒素固定能を有するシアノバクテリアが、酸素に脆弱なニトロゲナーゼによる窒素固定と酸素を生じる光合成の両立という“酸素パラドクス”を、どのように統御しているのかは十分理解されていない。私たちは、窒素固定性シアノバクテリア *Leptolyngbya boryana* を材料として、窒素固定遺伝子 (*nif* 遺伝子) 群が集積する遺伝子領域を見出し、その中に *nif* 遺伝子群の発現を制御する転写制御タンパク質の遺伝子 *cnfR* を同定した。また、この遺伝子領域に、低酸素下においてクロロフィル・ヘム・ビリル色素の供給を可能とする転写制御タンパク質の遺伝子 *chlR* も同定した。本稿では、シアノバクテリアにおける酸素パラドクスの統御という観点から窒素固定と低酸素環境でのクロロフィル合成について紹介する。

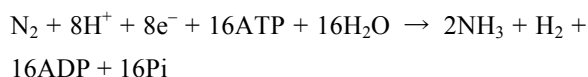
## 1. 窒素固定とニトロゲナーゼ

窒素固定は、分子状窒素 ( $N_2$ ) をアンモニアに変換する過程である。この反応により、不活性な  $N_2$  分子が、多くの生物が利用できる窒素態となることから、地球生態系の窒素循環に不可欠な反応である。現在では、工業的窒素固定が固定窒素全体の 30%程度を占めるが、ハーバー・ボッシュ法が開発される 20 世紀以前は、窒素固定は、もっぱら生物による窒素固定反応に依っていた。なお、空中での雷放電による窒素酸化物の生成も固定窒素供給への一定の寄与があり、現在は、化石燃料の燃焼による窒素酸化物生成がこれに加わり、固定窒素全体の 10%程度を占める<sup>1,2)</sup>。

生物窒素固定は、ニトロゲナーゼという酵素によって触媒される。ニトロゲナーゼには、活性中心に含まれる金属の異なる 3 種類 (Mo 型、V 型、Fe 型) が存在する。これらのニトロゲナーゼを構成するタンパク質が有意な類似性を示すことから、共通の祖先酵素から進化した一種のアイソフォームと理解することができる。このうち、

Mo 型ニトロゲナーゼが、ニトロゲナーゼとして生化学的に最もよく研究されてきたことから、以下、Mo 型ニトロゲナーゼについてその特徴を記す<sup>3)</sup>。

ニトロゲナーゼの反応は、以下の通りである。



Mo 型ニトロゲナーゼは、容易に分離される 2 つのコンポーネント、Fe タンパク質と MoFe タンパク質から構成される (図 1)。Fe タンパク質は NifH タンパク質の二量体であり、フェレドキシンなどから電子を受け取り、ATP の加水分解に共役して電子を MoFe タンパク質に送り出す“還元コンポーネント”としてのはたらきを担う。MoFe タンパク質は、NifD タンパク質と NifK タンパク質のヘテロ 4 量体であり、Fe タンパク質からの電子を利用して窒素の還元反応の場となる活性部位をもつ“触媒コンポーネント”である。この一連の電子伝達反応を担うのは、これらのコンポーネントに保持された 3 つの金属クラスターである。Fe タンパク質には 1 つの [4Fe-4S] クラスター、MoFe タンパク質には一対の P クラ

<sup>†</sup>解説特集「光合成色素代謝と光化学系構築のダイナミックな関係」

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

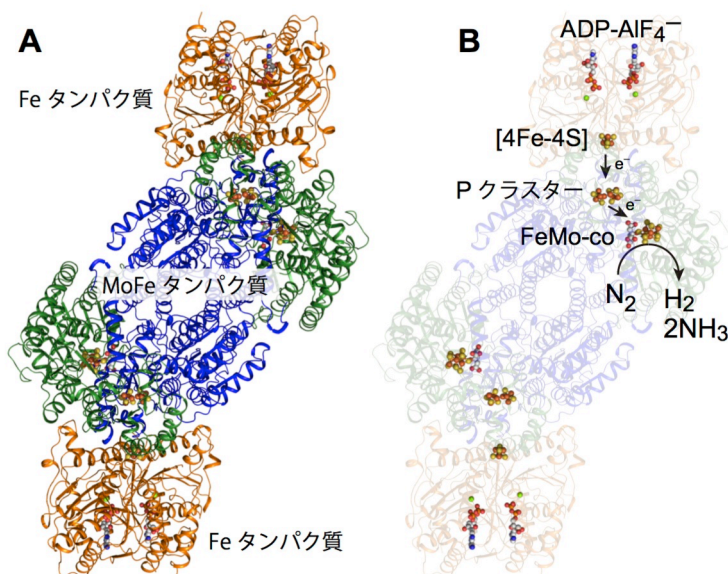


図 1. Mo 型窒素ゲナーゼの構造とその金属クラスターの配置

A. Mo 型窒素ゲナーゼ複合体の立体構造。Mo 型窒素ゲナーゼでは、還元された Fe タンパク質から MoFe タンパク質への電子伝達の際に、一時的な Fe タンパク質-MoFe タンパク質複合体が形成される。B. Mo 型窒素ゲナーゼ複合体内の 3 つの金属クラスター ([4Fe-4S]、P クラスター及び FeMo-co) と ATP (ここでは非加水分解性アナログ ADP-AIF<sub>4</sub><sup>-</sup>) の立体配置および電子伝達経路。タンパク質部分を薄く表示している。

スター ([8Fe-7S]) と鉄モリブデンコファクター (FeMo-co; [Mo-7Fe-9S-C-ホモクエン酸]) とよばれる複雑な金属中心を有し、Fe タンパク質の [4Fe-4S] クラスターからの電子は、P クラスターを経由して FeMo-co に送られ、FeMo-co 上で N<sub>2</sub> の還元反応が進行する<sup>4)</sup>。

これらの金属クラスターは酸素によって速やかに分解されるため、酸素曝露で Fe タンパク質が 30 秒、MoFe タンパク質が 10 分程度の半減期で不活性化されてしまう<sup>5)</sup>。この高い酸素感受性が、窒素ゲナーゼの大きな特徴となっている。

## 2. 窒素固定性シアノバクテリアと酸素パラドクス

窒素固定を行う生物は原核生物に限られ、系統的には多様な分類群に分散して分布する (例外的に、真核藻類である珪藻が spheroid body とよばれるシアノバクテリアに由来する細胞内共生体により窒素固定を行う例が報告されている<sup>6)</sup>)。窒素ゲナーゼが酸素に高い感受性を示すことから、好氣的もしくは微好氣的環境で窒素固定を行う生物は、窒素ゲナーゼを酸素から防御する

多様な分子機構 (高い呼吸活性や防御タンパク質など) を有する。

シアノバクテリアの約半数の種が窒素固定能を有するとされている<sup>7)</sup>。光合成により細胞内で酸素が発生することから、外環境からの酸素のみならず内生の酸素に対しても何らかの防御が必要となるはずである。窒素固定性シアノバクテリアは、窒素固定と光合成の両立という“酸素パラドクス”をどのように解決しているのだろうか。一つの戦略は、細胞分化による空間的分離である。*Anabaena* sp. PCC 7120 を始め Section IV と V に分類される糸状性シアノバクテリアは、ヘテロシストと呼ばれる窒素固定に特化した細胞を分化することで、光合成による内生酸素と外界の酸素から窒素ゲナーゼを防御している (図 2A)<sup>8)</sup>。もう一つの戦略は、窒素固定を夜間に限定することで光合成と分離するという時間的分離である。この戦略は、ヘテロシストを分化しない窒素固定性シアノバクテリアである *Synechococcus*<sup>9,10)</sup> や *Cyanothece*<sup>11)</sup>、*Leptolyngbya boryana* (*Plectonema boryanum*) (図 2B)<sup>12)</sup> など報告されている。*Synechococcus* の示す昼間光合成、夜間

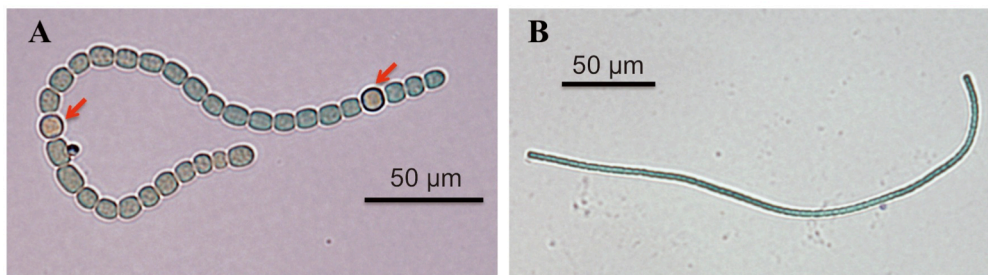


図 2. 2 種類の代表的な窒素固定性シアノバクテリア

A. *Anabaena* sp. PCC 7120 は窒素枯渇条件下で窒素固定に特化した細胞ヘテロシスト（赤い矢印）を分化する。  
 B. *Leptolyngbya boryana* は、ヘテロシストを分化することなく、一様な細胞からなる糸状体を形成し、嫌気的環境下で窒素固定的に生育する。

窒素固定という概日サイクルは、シアノバクテリアの生物時計研究の契機となったことで有名である。また、野外の微生物マットで生育するシアノバクテリアの観察から、窒素固定活性は、光合成活性が低下する日暮れと明け方に大きなピークを示すことが報告されている<sup>13)</sup>。これは、ニトロゲナーゼの稼働に要する還元力と ATP が、夜間の呼吸のみでは十分ではなく、ニトロゲナーゼを破壊しない程度の低レベルの光合成が重要なはたらきを担っていることを示唆している。

これまで、シアノバクテリアを用いた窒素固定の研究の多くは、*Anabaena* sp. PCC 7120 のヘテロシスト分化に焦点を当てて展開され、その結果、ヘテロシスト分化を制御する精緻な情報伝達ネットワークが明らかにされつつある<sup>14)</sup>。もちろん、窒素固定遺伝子 (*nif* 遺伝子) 群の発現もその細胞分化ネットワークに含まれているが、意外なことに *nif* 遺伝子群の転写を直接制御するタンパク質は未同定のまま残されていた。

筆者は、1991 年に *L. boryana* においてニトロゲナーゼの構造遺伝子 *nifH* を含むゲノム断片の塩基配列を決定し<sup>15)</sup>、*nifH* 遺伝子の破壊を指標に形質転換系を確立した<sup>16)</sup>。その後、このシアノバクテリアを用いて、主にクロロフィル生合成系の研究を展開してきたが、その過程で、ニトロゲナーゼと構造的に類似し、やはり酸素に脆弱な暗所作動型プロトクロフィリド還元酵素が、どのようにシアノバクテリアの細胞において作動できるのか、という疑問をもつようになった<sup>17)</sup>。これは、まさに光合成と窒素固定の酸素パラドク

スに対する疑問でもあった。そこで、2010 年頃から *L. boryana* を用いて窒素固定の研究を始めることにした。

なお、*L. boryana* を窒素固定的に生育させるためには、接種した寒天培地を、Gas Generating Anaerobic System (Oxoid) とともに密閉容器 (GAS-PAK, BD Biosciences) に入れて、光照射下で培養を行う<sup>18)</sup>。この容器内の酸素は、Gas Generating Anaerobic System で生成する水素とパラジウム触媒の作用で水に変換されて除去され、容器内は数時間で嫌気条件となる。光合成で生成する酸素は、細胞から出ると速やかに除去されるが、細胞内での酸素の生成は続くため、細胞は微好気 (micro-oxic) 条件におかれていると推察される。本稿では、この条件を「嫌気」条件と呼ぶ。また、「低酸素」は、酸素レベルが 3% 程度以下の状態を想定している<sup>17)</sup>が、実際にどの程度の酸素レベルでシアノバクテリアの CnfR や ChlR が活性化され *nif* や *chlA<sub>II</sub>* 遺伝子の誘導を引き起こすのかについての定量的根拠はまだ報告されていない。これに対して、「好気」条件は、大気下で培養を行ったことを示す。

### 3. *L. boryana* の窒素固定遺伝子クラスター

窒素固定の研究を始めた時点で *L. boryana* のゲノムは未決定であったため、以前に塩基配列を決定していた *nifH* 断片から染色体歩行により隣接する遺伝子群の塩基配列決定を行った。その結果、*nif* 遺伝子およびその関連遺伝子が 50 個も集積した約 50 kb におよぶゲノム領域を見出した



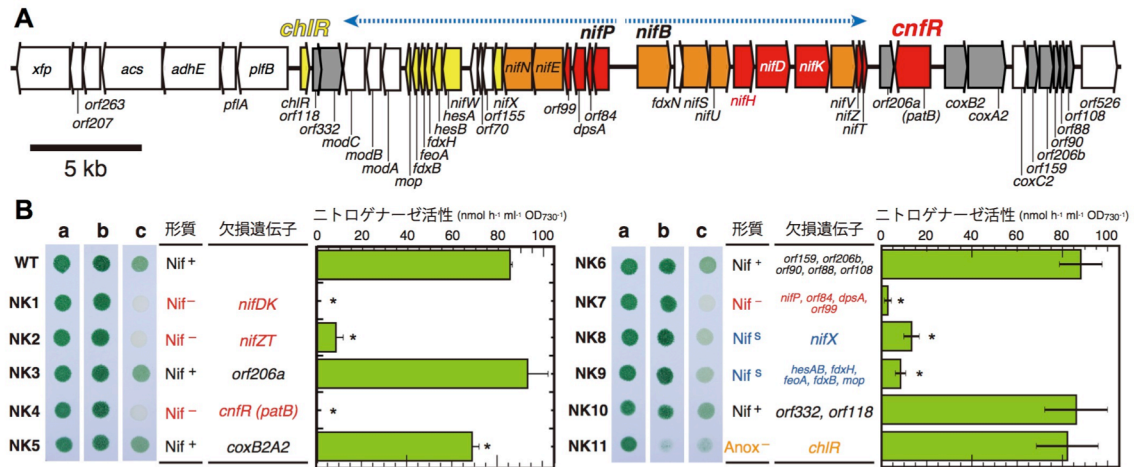


図 3. *L. boryana* の *nif* 遺伝子クラスターと欠損株の形質<sup>18)</sup>

A. *L. boryana* の *nif* 遺伝子クラスターは、*nifB* と *nifP* の遺伝子間領域で左右に二分される (青い点線矢印)。遺伝子破壊株の形質 (B) から、窒素固定に必須の遺伝子を赤、文献情報から必須と推察される遺伝子をオレンジ、窒素固定に重要な遺伝子を黄色、窒素固定に必須ではない遺伝子を灰色、窒素固定に対する役割が未確定の遺伝子を白で示した。B. 単離された遺伝子破壊株 (NK1~NK11) の生育 (a. 好気・窒素充分条件、b. 嫌気・窒素充分条件、c. 嫌気・窒素枯渇条件) とニトロゲナーゼ活性 (アセチレン還元活性)。Nif<sup>-</sup> は窒素固定の生育ができない、Nif<sup>s</sup> は窒素固定の生育が有意に遅い、Anox<sup>-</sup> は b, c 両条件で生育できない (嫌気条件で生育ができない) 形質を示す。

(図 3A)。この遺伝子クラスターは、*nifB* と *nifP* の遺伝子間領域で転写方向が両方向に二分されている。*nifB* を先頭とする右半分には、ニトロゲナーゼの 3 つの構造遺伝子 *nifH*、*nifD*、*nifK* を含む 9 個の *nif* 遺伝子とフェレドキシンの遺伝子 *fdxN* が並び、その下流には転写制御タンパク質の遺伝子 *patB* (*cnfR*)、シトクロム酸化酵素の遺伝子 *coxB2*、*coxA2*、*coxC2* が見つかった。*nifP* を先頭とする左方向のクラスターには、*nifE* と *nifN* を始めとする 5 個の *nif* 遺伝子、2 つのフェレドキシンの遺伝子 *fdxB* と *fdxH*、モリブデン輸送体をコードする *mod* 遺伝子群、もう一つの転写制御タンパク質の遺伝子 *chlR*、さらにその下流には嫌氣的代謝に関わる遺伝子群が見つかった<sup>18)</sup>。

#### 4. *nif* 遺伝子群の発現を制御する CnfR

これら 50 個の遺伝子のうち、9 個は *nif* 遺伝子としてすでに機能が明らかにされているが、その他多くの遺伝子は、アノテーションのみが記載され、それらの生理的役割についての実験的根拠が得られていない状況にあった。特に、*patB* は、*Anabaena* sp. PCC 7120 でヘテロシスト分化のパ

ターン形成が異常になるという形質から見つかった遺伝子であるが、長くその具体的な機能については明らかにされていなかった<sup>19,20)</sup>。ヘテロシストを形成しない *L. boryana* にこのホモログが見つかったことから、*patB* は窒素固定性シアノバクテリアに共通した機能を有するかもしれない、と考えた。そこで、*patB* 単独欠損を含め、一つもしくは複数の遺伝子を欠損させた変異株を 11 株単離し、窒素固定の生育と *in vivo* でのニトロゲナーゼ活性を評価した (図 3B)。その結果、4 株は窒素固定の生育能を失っており、2 株は窒素固定の生育が有意に低下していた。このうち、ニトロゲナーゼの構造遺伝子の欠損株 NK1 と *patB* 欠損株 NK4 は、ニトロゲナーゼ活性がまったく検出されないという最も重篤な形質を示した。NK4 の形質の原因を探るべく、*nif* 遺伝子群の転写物を調べたところ、NK4 では *nif* 遺伝子群の転写物がまったく検出されなかった (図 4A)。この結果は、*patB* が *nif* 遺伝子群の発現に必須であることを強く示唆するものである。

次に、*trc* プロモーターを連結し *patB* が構成的に発現するように構築したプラスミドを NK4 に

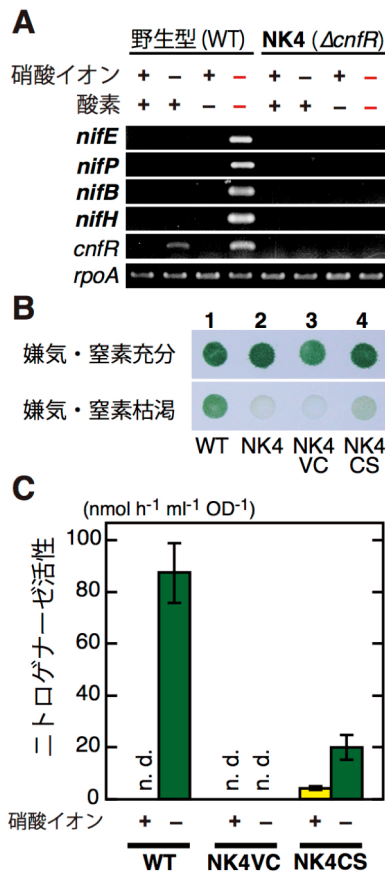


図 4. *cnfR* 欠損株とその相補実験<sup>18)</sup>

**A.** *nif* 遺伝子の転写物量の評価。野生型と NK4 を好気 (酸素+) と嫌気 (酸素-) および窒素源として硝酸イオン添加 (窒素充分) と無添加 (窒素枯渇) の 4 条件で処理した後、RNA を調製し、逆転写後、*nifE*、*nifP*、*nifB*、*nifH*、*cnfR* および *rpoA* の cDNA 量を半定量的 RT-PCR によって評価した。**B, C.** *cnfR* 欠損株 NK4 と、その相補株の生育 (**B**) とニトロゲナーゼ活性 (**C**)。 **B.** 空ベクターのみ (NK4VC) と N 末端 Strep タグ付き *cnfR* を *trc* プロモーターに連結したベクターで相補した株 (NK4CS) を嫌気・窒素充分 (硝酸イオン添加) と嫌気・窒素枯渇条件で生育を比較した。 **C.** 相補株 (NK4VC と NK4CS) を、嫌気条件下で、窒素充分と窒素枯渇条件でのニトロゲナーゼ活性をアセチレン還元活性として評価した。

導入し、形質の相補を試みたところ、窒素固定的生育が部分的に相補された (図 4B)。さらに、ニトロゲナーゼ活性を調べたところ、窒素固定条件下では活性が 30%程度まで回復していた (図 4C)。さらに驚いたことに、硝酸イオン存在下 (嫌気条件) においても低いながらも有意なニトロゲナーゼ活性が認められた。*nif* 遺伝子群は、硝酸イオン存在下では決して発現しないように厳密に制御されていることから、この活性検出は、*patB* 遺伝子が *nif* 遺伝子群の発現を直接誘導する転写活性化タンパク質をコードすることを強く示唆するものであった。これらの結果から、私たちは、*patB* と呼ばれていたこの遺伝子に *cnfR* (cyanobacterial nitrogen fixation regulator) という機能に基づく名称を付与することにした<sup>18)</sup>。なお、*cnfR* 自身は、窒素枯渇で誘導される (図 4A) ことから、*cnfR* の転写は、シアノバクテリアで広く保存されている窒素同化関連遺伝子の転写制御タンパク質 NtcA<sup>21-23)</sup> によって発現レベルで制御されていると推察される。実際、*cnfR* の上流に

は NtcA の認識配列 (TGTA-N<sub>8</sub>-TACA) が保存されている<sup>18)</sup>。ヘテロシストを分化しない *L. boryana* を使うことで、転写制御タンパク質 CnfR が *nif* 遺伝子群の発現を活性化するアクティベーターであることを明らかにすることができた。なお、*cnfR* はすべての窒素固定性シアノバクテリアで保存されており、CnfR 転写制御系はヘテロシスト分化型のシアノバクテリアでも *nif* 遺伝子群の誘導に主要な役割を果たしている<sup>24)</sup>。

### 5. CnfR による *nif* 遺伝子群の転写活性化に対する *cis* 配列の同定

*nif* 遺伝子クラスターの特徴から、*nif* 遺伝子群の転写は、*nifB* と *nifP* の遺伝子間領域から両方向に開始されると推察される。一方、多くの窒素固定性細菌では、*nif* 遺伝子群の主要なプロモーターが、最も発現レベルが高い *nifH* 遺伝子上流に存在することが知られている。そこで、窒素固定をしないシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 において、*trc* プロモーターに連結した

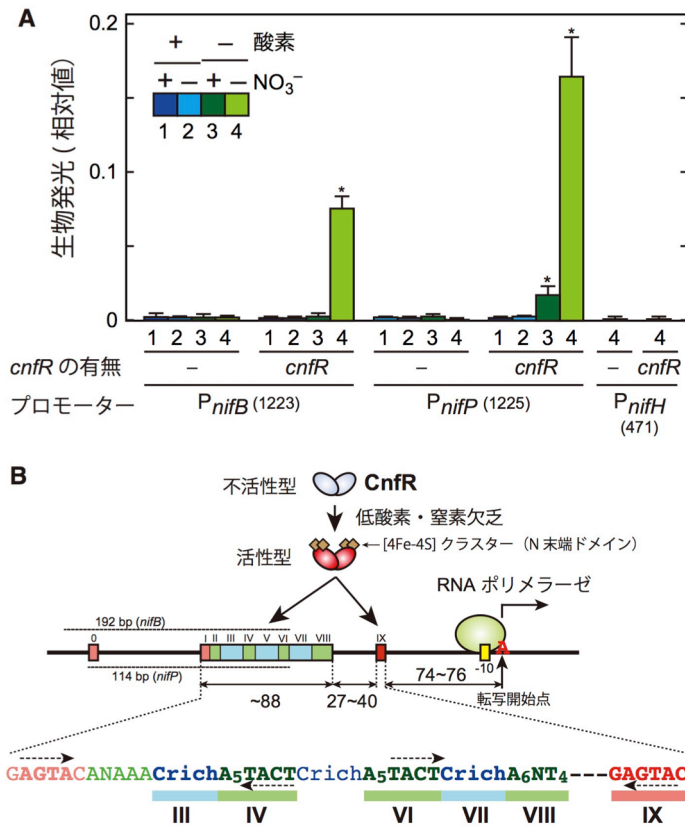


図 5. *Synechocystis* sp. PCC 6803 での *cnfR* と *nif* プロモーターによるレポーター系と CnfR によって認識される *cis* 配列<sup>27)</sup>

A. *nifB*、*nifP* 及び *nifH* の上流配列 (塩基数としてカッコ内の数字で示す) を *luxAB* に連結し、CnfR による転写活性化をルシフェラーゼによる生物発光で評価した。各株は、好気 (酸素+) と嫌気 (酸素-) および窒素源として硝酸イオン添加 (窒素充分) と無添加 (窒素枯渇) の 4 条件 (1~4) で処理し、生物発光を検出した。B. CnfR によって認識される *cis* 配列は、窒素固定性シアノバクテリアでよく保存された比較的長い配列である。便宜的にモチーフ I~IX (さらに上流に見つかったモチーフを 0 とした) に分割し、*L. boryana* の *nif* 遺伝子群の発現に必須のモチーフを下段に示す。*nifB* および *nifP* プロモーターの短縮実験で示された 192 bp および 114 bp 領域を破線で示した。

*cnfR* をエフェクターとし、ルシフェラーゼ遺伝子 *luxAB* をレポーターするレポーターアッセイ系を構築し、プロモーター活性を評価することにした。プロモーター候補として、*nifB* 上流配列 (1,223 bp,  $P_{nifB}$ )、*nifP* 上流配列 (1,225 bp,  $P_{nifP}$ ) および *nifH* 上流配列 (471 bp,  $P_{nifH}$ ) を *luxAB* に連結した一連の形質転換体を単離した (図 5A)。これらの形質転換体を、嫌気・窒素枯渇条件で処理すると、 $P_{nifH}$ -*luxAB* 株ではまったく生物発光が検出されなかったが、 $P_{nifB}$ -*luxAB* 及び  $P_{nifP}$ -*luxAB* 株は高い生物発光が認められた。このことから、*nif* 遺伝子クラスターの主要なプロモーターは *nifB*-*nifP* 遺伝子間領域に両方向に存在することが示唆された。また、*nifH* 上流 (今回調べた断片) には有意なプロモーターはなさそうである。このプロモーターの様態は、*Anabaena variabilis* ATCC 29413 でも報告されている<sup>25)</sup>。

$P_{nifB}$ -*luxAB* 及び  $P_{nifP}$ -*luxAB* 株の有意な生物発光は、好気条件や硝酸イオン添加 (窒素充分) 条件では検出されず、嫌気条件かつ窒素枯渇条件でのみ観察された (図 5A)。これらの結果は、CnfR

による *nifB* 及び *nifP* プロモーターの転写活性化が非窒素固定性シアノバクテリアでも作動することを示しており、さらに、CnfR は嫌気 (もしくは低酸素) と窒素枯渇を感知する転写活性化タンパク質であることを強く示唆している。

CnfR は、534 アミノ酸残基からなる、比較的大きな転写制御タンパク質であり、C 末端にヘリックス・ターン・ヘリックス型 DNA 結合ドメイン、N 末端に鉄硫黄クラスターを保持するための 4 個のシステイン残基を含むモチーフを 2 つ (CxxCxxCxxxCP と CxxCx<sub>8</sub>CxxxC) 有する<sup>20)</sup>。CnfR が、低酸素を感知するしくみとして、N 末端ドメインでの鉄硫黄クラスター形成が何らかの構造変化を引き起こし、CnfR 分子を活性型に変換するという可能性が考えられる。このような鉄硫黄クラスター形成を介して酸素を感知する転写制御メカニズムとして大腸菌の FNR タンパク質などが知られている<sup>26)</sup>。また、この転写活性化には、窒素枯渇のシグナル受容による何らかの構造変化も必要なようである (図 5A)。すなわち、CnfR は、低酸素と窒素枯渇という 2 つの環

境要因を感知するデュアルセンサーであると推察される。

*nif* 遺伝子クラスターの主要プロモーターが存在する *nifB-nifP* の遺伝子間領域は、1,255 bp とかなり長い。そこで、次に CnfR による転写活性化に要する *cis* 保存配列を明らかにしようとした。このために、まず、*L. boryana* において *nifB* と *nifP* の転写開始点を各々翻訳開始コドンから 279 bp 及び 39 bp 上流のアデニンと決定した<sup>27)</sup>。続いて、上記の *Synechocystis* sp. PCC 6803 のレポーター系を利用して、*nifB* 及び *nifP* の上流配列を短縮した一連のレポーター系の解析により、CnfR による転写活性化に要する上流配列を、*nifB* 及び *nifP* の転写開始点の上流の 192 bp と 114 bp の範囲にまで絞り込んだ。これらの配列をクエリーとして、互いの類似性さらに他の窒素固定性シアノバクテリアの *nif* 遺伝子上流の配列と比較したところ、85~88 bp の配列およびその 27~40 bp 下流の 6 塩基の配列 (GAGTAC) が、高い保存性を示すことを見出した (図 5B)。

この配列は、全長 121~134 bp にわたる比較的長い配列であるため、便宜的にモチーフ I~IX という 9 つのモチーフに分割し、各モチーフの重要性を、塩基置換や削除した配列をもちいたレポーター系により検討した。その結果、6 つのモチーフ (III, IV, VI, VII, VIII 及び IX) が必須であることが示唆された<sup>27)</sup>。また、モチーフ I と VI の間、VI と IX の間に TACT---AGTA という短い回文配列が認められ (図 5B)、CnfR の結合に関与している可能性がある。さらに、実際に CnfR が結合する最小エレメントを決定するため、CnfR と DNA との結合に関する生化学的解析を進めている。

## 6. クロロフィル合成と窒素固定：転写制御タンパク質 ChIR

*L. boryana* の *nif* 遺伝子クラスターの解析における、もう一つの興味深い発見は、この遺伝子クラスターにクロロフィル合成を制御する転写制御タンパク質 ChIR の遺伝子が含まれていたことである。ChIR は、*Synechocystis* sp. PCC 6803 において、クロロフィル・ヘム・ビリニン合成が低

酸素条件でも滞ることがないように、低酸素を感知して、3 つの低酸素型酵素の遺伝子クラスター (*chlA<sub>II</sub>-ho2-hemN*) の発現を誘導するアクティベーター型の転写制御タンパク質である<sup>28-30)</sup>。クロロフィル・ヘム・ビリニン合成系には、反応に酸素を要求する酵素が 3 つ存在する (図 6A)。それらは、コプロポルフィリノーゲン III 酸化酵素 (HemF)、Mg-プロトポルフィリン IX モノメチルエステル (MPE) シクラーゼ (ChlA<sub>I</sub>) およびヘムオキシゲナーゼ (HO1) である。これら好気型酵素は、低酸素環境では酸素不足で活性が低下するため、シアノバクテリアは低酸素環境に応答して、各活性を補完するために低酸素型酵素 (各々 HemN、ChlA<sub>II</sub> および HO2) を誘導する。3 つの低酸素型酵素の遺伝子は、*Synechocystis* sp. PCC 6803 では一つのクラスター *chlA<sub>II</sub>-ho2-hemN* を形成しており、ChIR によってその転写が誘導される<sup>28,29)</sup>。

実際に、*L. boryana* の推定 *chlR* が、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の *chlR* と同様の機能を果たすオルソログかどうかを確認するために、*L. boryana* の *chlR* 欠損株 NK11 を単離し、その生育とクロロフィル量を確認した。NK11 は、窒素固定条件 (嫌気・窒素枯渇条件) も含め嫌気条件下 (硝酸イオン添加条件) で生育できないという、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の *chlR* 欠損株 ( $\Delta chlR$ ) と同じ形質を示した (図 3B)。この形質は、クロロフィル含量が大幅に低下しているという点でも一致していた。さらに、HPLC により蓄積する色素を分析した結果、NK11 では野生株では検出されない多くのクロロフィル合成中間体 (プロトポルフィリン IX、Mg-プロトポルフィリン IX、MPE、3,8-ジビニルプロトクロロフィリド、プロトクロロフィリドおよび MPE から Mg が脱離した色素) が蓄積していることがわかった (図 6A)。蓄積する各中間体色素の比率は若干異なるが、その組成は、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の  $\Delta chlR$  とよく一致している<sup>31)</sup>。

*nif* 遺伝子クラスターの解析と並行して *L. boryana* のゲノムの解読を進めた結果<sup>18,32)</sup>、*Synechocystis* sp. PCC 6803 と同じく、ChIR が発現誘導するターゲット *chlA<sub>II</sub>-ho2-hemN* 遺伝子クラ



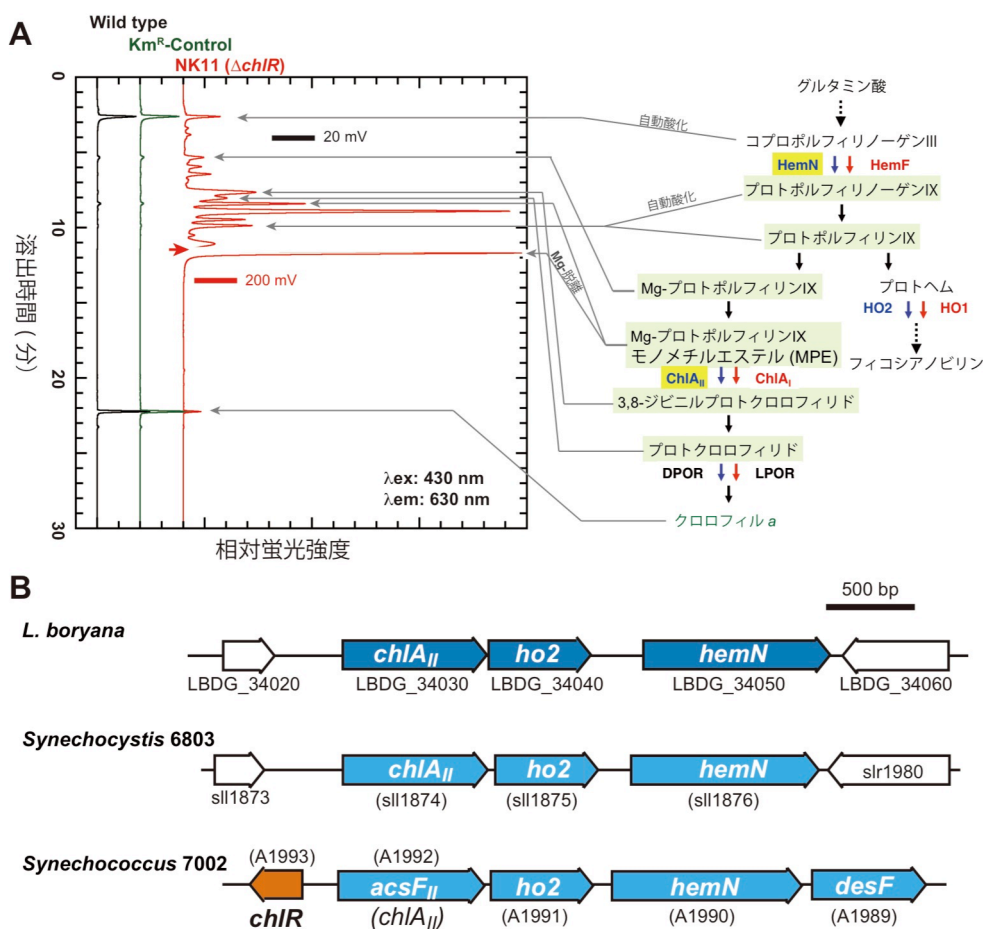


図 6. NK11 の色素分析と ChIR によって誘導される遺伝子クラスター<sup>18,30)</sup>

A. NK11 を嫌気条件で一定時間処理後、色素を抽出し HPLC により分離した。色素の溶出は、630 nm の蛍光 (430 nm 励起) で検出した。NK11 に特異的な多数のピークが検出され、それらのほとんどはすでに *Synechocystis* sp. PCC 6803 の  $\Delta chlR$  株で同定された色素中間体と一致した。右側に、クロロフィル・ヘム・ピリン合成系と各ピークの対応を示す。合成系で、2つの酵素が併存する4つの段階において、好気条件下で必須の酵素を赤、低酸素で誘導される酵素を青で示した。HPLC プロファイルにおいて、11.5 分の赤の→は、22.2 分に溶出されるクロロフィル a のピークをレンジ内に収めるために、検出器の感度を 10 倍程度低下させていることを示す。B. *L. boryana*、*Synechocystis* sp. PCC 6803 および *Synechococcus* sp. PCC 7002 における、ChIR により誘導される遺伝子クラスター *chlAII-ho2-hemN* の保存性。

スターが *L. boryana* でも保存されていることが明らかとなった (図 6B)。低酸素条件で処理した NK11 ではこれらの遺伝子群の転写物が検出されないことから、*L. boryana* においても ChIR は *chlAII-ho2-hemN* 遺伝子クラスターの発現を低酸素条件に反応して誘導していることが示唆された。したがって、*nif* 遺伝子クラスターの *chlR* は、*Synechocystis* sp. PCC 6803 で同定された *chlR* のオルソログであると結論した。

ChIR は、構造的に発現しており、クロロフィル・ヘム・ピリン合成系が窒素固定を行う低酸

素条件でも滞ることがないように、低酸素に反応して *chlAII-ho2-hemN* 遺伝子クラスターの発現を誘導する。その作用で、これらテトラピロール色素群の供給が維持され、光合成と呼吸の活性を支え、ニトロゲナーゼを駆動するための還元力と ATP が十分に供給されると推察される。このように、筆者がこれまで行ってきたクロロフィル合成系の研究が、窒素固定の酸素パラドクスの統御という観点で、窒素固定遺伝子クラスター上で収斂することとなったのは、望外の喜びであった。

## 7. ChlR の低酸素感知機構

では、ChlR はどのようにして低酸素を感知しているのだろうか？ ChlR は、原核生物に広く分布する MarR 型転写制御タンパク質ファミリーに属する。枯草菌の OhrR は、このファミリーの代表的なタンパク質としてよく研究されている。OhrR は、通常の条件下で DNA に結合し下流の遺伝子の発現を抑制するリプレッサーである。酸化ストレスとして脂質の酸化によって生じる有機ヒドロキシペルオキシドを感知すると、DNA から遊離し、その下流のチオールペルオキシダーゼ（有機ヒドロキシペルオキシドを分解する）をコードする遺伝子の発現が誘導される<sup>33)</sup>。有機ヒドロペルオキシドは、OhrR の保存されたシステイン残基がスルフェン酸 (-SOH) へと変換されることによって感知され、DNA 結合ドメインに構造変化を引き起こし、DNA から解離し、下流の遺伝子発現を誘導すると考えられている<sup>34)</sup>。ChlR においても、N 末端付近のシステイン残基 (*Synechocystis* sp. PCC 6803 では Cys25、*L. boryana* では Cys20) の保存性が認められることから、この残基が好気条件ではスルフェン酸など何らかの酸化修飾を受け、これが酸素レベル低下に伴って SH 基へと還元変換されることで低酸素を感知しているかもしれない<sup>28)</sup>。

別のシアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC 7002 において、アメリカの研究グループが私たちとは独立に *chlR* を同定した<sup>35)</sup>。*Synechococcus* sp. PCC 7002 では、*chlA<sub>II</sub>-ho2-hemN* オペロンのすぐ上流に逆方向に *chlR* 遺伝子がコードされている (図 6B)。彼らは、ChlR が嫌気条件下で [4Fe-4S] クラスタを保持していることを示している。このことから、ChlR は [4Fe-4S] クラスタが形成されることで嫌気条件 (低酸素条件) を感知して活性化され、DNA と結合して転写を誘導する。一方、好気条件では、この [4Fe-4S] クラスタが分解もしくは [2Fe-2S] クラスタに変換されることで不活性化状態となり DNA との結合能を失う、というモデルを提唱している。私たちも、大腸菌で大量発現させた *Synechocystis* sp. PCC 6803 の ChlR が、[4Fe-4S] クラスタに特徴的な吸収スペクトルを示すことを確認している。[4Fe-4S] クラ

スタの保持によって低酸素を感知しているという点で、ChlR は CnfR と共通しているのかもしれない。

## 8. まとめと今後の展望

これらの結果を統合すると、*L. boryana* における光合成と窒素固定の酸素パラドクスの統御の一端が明らかとなった (図 7)。ニトロゲナーゼが不活性化されてしまう好气的環境下では、CnfR が不活性型にとどまりニトロゲナーゼは作られない。環境の酸素レベルが一定以下になると、光合成で酸素を生成しても細胞内の酸素濃度は十分低く保たれ、CnfR 上で [4Fe-4S] クラスタが形成される。これが CnfR の構造変化を引き起こし活性化され、プロモーター上流の *cis* 配列に結合し、RNA ポリメラーゼをリクルートし、*nifB-nifP* 領域から両方向への転写が始まり、ニトロゲナーゼが作られる。なお、ニトロゲナーゼが必要とされない窒素十分条件では、*cnfR* の転写が抑制されているため、単に嫌気条件だけでは *nif* 遺伝子の発現は誘導されない。また、CnfR 自身も、完全に活性化されるためには、嫌気条件に加え、何らかの窒素枯渇シグナル受容を必要とする。すなわち、*nif* 遺伝子の誘導は、*cnfR* の発現と CnfR タンパク質の活性化という二段階で制御されている。

一方、もう一つの転写制御タンパク質 ChlR は、CnfR とは独立して構成的に発現しているが、こちら好気条件では [4Fe-4S] クラスタが形成されず不活性型に留まる。嫌気条件になると始めて [4Fe-4S] クラスタ形成を介して活性化され、*chlA<sub>II</sub>-ho2-hemN* 遺伝子クラスタの転写を活性化する。その結果、低酸素環境下でも ChlA<sub>II</sub>、HO2 および HemN の活性によりクロロフィル *a*・ヘム・ビリル色素が滞りなく作られ、光合成により十分な還元力と ATP が供給され、ニトロゲナーゼが稼働し、窒素固定的生育が可能となる。

ChlR が発現誘導する 3 つの酵素のうち、HemN は酸素に脆弱な [4Fe-4S] クラスタを有するラジカル SAM 酵素である。このことから、CnfR と ChlR はいずれも、細胞内の酸素レベルが、ニトロゲナーゼや HemN の金属クラスタに障害が

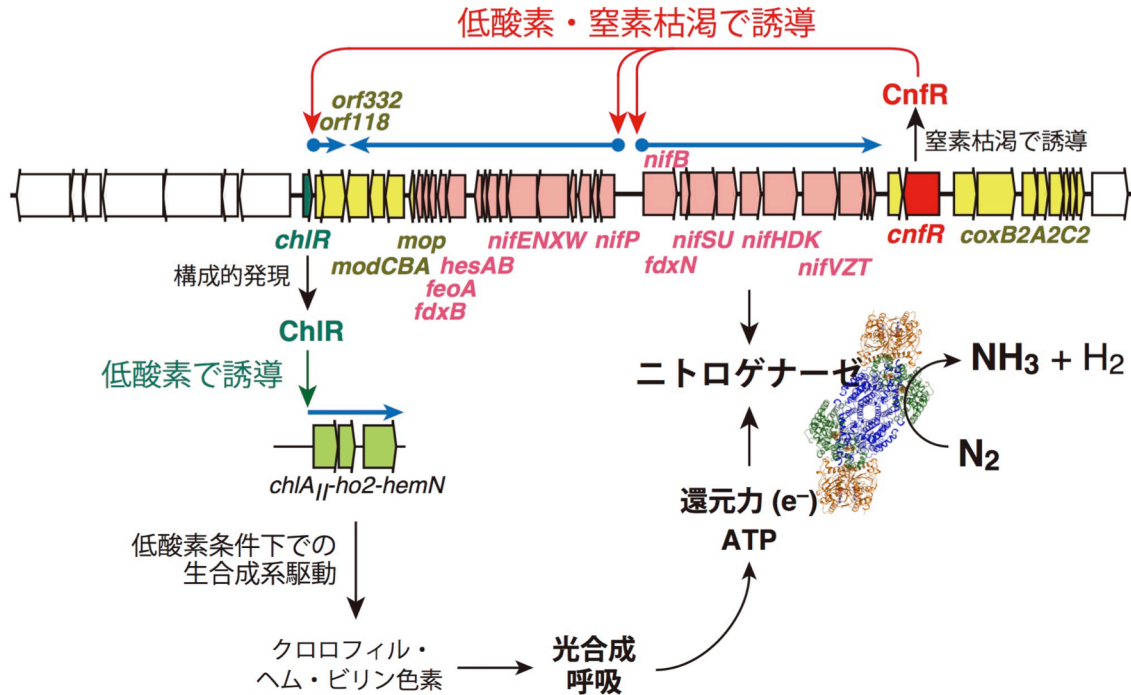


図 7. *L. boryana* における *nif* 遺伝子クラスターの発現制御機構<sup>18)</sup>

*L. boryana* の *nif* 遺伝子クラスターの主要なプロモーターは、*nifB-nifP* 間に両向きに存在し、各々の上流に CnfR が認識する *cis* 配列（転写方向を示す青い矢印の根元の青いドット）を伴う。嫌気（もしくは低酸素）と窒素枯渇という両条件が CnfR に感知されると、活性型となった CnfR により転写が誘導され、ニトロゲナーゼが作られる。*nif* 遺伝子クラスターには、CnfR が作用する *cis* 配列が *orf118* の上流にも存在する。一方、低酸素は、構成的に発現している ChIR によっても感知され、クロロフィル合成系の低酸素型酵素群をコードする *chlAII-ho2-hemN* 遺伝子クラスターの転写を誘導する。その結果、低酸素環境でもクロロフィル・ヘム・ビリリン色素が滞りなく生合成され、光合成・呼吸を介して、還元力と ATP が供給され、ニトロゲナーゼの活性が維持される。ニトロゲナーゼ生合成に直接関わる遺伝子をピンク、窒素固定に重要な遺伝子を黄色で、CnfR と ChIR の誘導の作用を赤と緑の→で示す。

生じるレベルかどうかを、酸素に脆弱な[4Fe-4S]クラスターが保持できるかどうかによって感知し、ニトロゲナーゼや HemN を作るかどうかを決定する、と解釈することができる。すなわち、酸素に弱い鉄硫黄クラスターをもつ酵素を作るか否かを、転写制御タンパク質上で[4Fe-4S]クラスターが作られるかどうかによって決定するという精妙な分子機構である。ただし、この解釈を裏付ける実験的根拠はまだ十分ではない。また、[4Fe-4S]クラスターの保持がどのように転写活性化をもたらすのか、CnfR と ChIR の生化学的研究は始まったばかりである。今後、これらの転写制御タンパク質の低酸素感知と転写活性化の生化学的機構の解明を進めていく必要がある。

また、シアノバクテリアのニトロゲナーゼにおいて、タンパク質レベルでの酸素防御機構が存在

するのではないだろうか。この点についても、研究を進めているところである。

謝辞

本研究は、JST 先端的低炭素化技術開発 (ALCA) 「有用光合成生物への窒素固定移入が導く“窒素革命”」、新学術領域（研究領域提案型）「光合成の酸素パラドクスを統御する低酸素センサー転写制御タンパク質の作動原理」(15H01397) の一環として行われました。*L. boryana* の窒素固定の生理学的解析、分子生物学的解析、CnfR の生化学的解析で、山本治樹・山川壽伯両博士、これらのテーマで学位論文で研究に取り組んでくれた神谷成美・野中葵・小谷弘哉・橋本薫槻・島知世の各氏に感謝します。

Received November 17, 2016; Accepted December 2, 2016;

Published December 31, 2016

## 参考文献

1. ヘイガー, T. 渡会圭子訳 (2010) 大気を変える錬金術～ハーバー・ボッシュと化学の世紀～ みすず書房 東京
2. 干鯛眞信 (2014) 窒素固定の科学～化学と生物学からの挑戦～ 裳華房
3. Seefeldt, L.C., Hoffman, B.M. and Dean, D.R. (2009) Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 701–722.
4. Hu, Y. and Ribbe, M.W. (2015) Nitrogenase and homologs. *J. Biol. Inorg. Chem.* 20, 435–445.
5. Yates, M. and Planqué, K. (1975) Nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*. Purification and properties of the component proteins. *Eur. J. Biochem.* 60, 467–476.
6. Nakayama, T., Kamikawa, R., Tanifuji, G., Kashiya, Y., Ohkouchi, N., Archibald, J.M. and Inagaki, Y. (2014) Complete genome of a nonphotosynthetic cyanobacterium in a diatom reveals recent adaptations to an intracellular lifestyle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 11407–11412.
7. 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* (Herrero, A., and Flores, E. Eds.), pp 423–446, Caister Academic Press, Norfolk, UK.
8. Flores, E. and Herrero, A. (2010) Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 39–50.
9. Mitsui, A., Kumazawa, S., Takahashi, A., Ikemoto, H., Cao, S. and Arai, T. (1986) Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photosynthetically. *Nature* 323, 720–722.
10. Grobbelaar, N., Huang, T.C., Lin, H.Y. and Chow, T.J. (1986) Dinitrogen-fixing endogenous rhythm in *Synechococcus* RF-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 37, 173–177.
11. Taniuchi, Y., Yoshikawa, S., Maeda, S., Omata, T. and Ohki, K. (2008) Diazotrophy under continuous light in a marine unicellular diazotrophic cyanobacterium, *Gloeothoece* sp. 68DGA. *Microbiology* 154, 1859–1865.
12. Misra, H.S. and Tuli, R. (2000) Differential expression of photosynthesis and nitrogen fixation genes in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Physiol.* 122, 731–736.
13. Steunou, A.S., Jensen, S.I., Brecht, E., Becraft, E.D., Bateson, M.M., Kilian, O., Bhaya, D., Ward, D.M., Peters, J.W., Grossman, A.R. and Kühl, M. (2008) Regulation of *nif* gene expression and the energetics of N<sub>2</sub> fixation over the diel cycle in a hot spring microbial mat. *ISME J.* 2, 364–378.
14. Kumar, K., Mella-Herrera, R.A. and Golden, J.W. (2010) Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000315.
15. Fujita, Y., Takahashi, Y., Shonai, F., Ogura, Y. and Matsubara, H. (1991) Cloning, nucleotide sequences and differential expression of the *nifH* and *nifH*-like (*frxC*) genes from the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Plectonema borynaum*. *Plant Cell Physiol.* 32, 1093–1106.
16. Fujita, Y., Takahashi, Y., Chuganji, M. and Matsubara, H. (1992) The *nifH*-like (*frxC*) gene is involved in the biosynthesis of chlorophyll in the filamentous cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Cell Physiol.* 33, 81–92.
17. 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.
18. Tsujimoto, R., Kamiya, N. and Fujita, Y. (2014) Transcriptional regulators ChlR and CnfR are essential for diazotrophic growth in nonheterocystous cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 6762–6767.
19. Liang, J., Scappino, L. and Haselkorn, R. (1993) The *patB* gene product, required for growth of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 under nitrogen-limiting conditions, contains ferredoxin and helix-turn-helix domains. *J. Bacteriol.* 175, 1697–1704.
20. Jones, K.M., Buikema, W.J. and Haselkorn, R. (2003) Heterocyst-specific expression of *patB*, a gene required for nitrogen fixation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 185, 2306–2314.
21. Frías, J. E., Flores, E. and Herrero, A. (1994) Requirement of the regulatory protein NtcA for the expression of nitrogen assimilation and heterocyst development genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 14, 823–832.
22. Herrero, A., Muro-Pastor, A.M., Valladares, A. and Flores, E. (2004) Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 469–487.
23. Ohashi, Y., Shi, W., Takatani, N., Aichi, M., Maeda, S., Watanabe, S., Yoshikawa, H. and Omata, T. (2011) Regulation of nitrate assimilation in cyanobacteria. *J. Exp. Bot.* 62, 1411–1424.

24. Pratte, B.S. and Thiel, T. (2016) Homologous regulators, CnfR1 and CnfR2, activate expression of two distinct nitrogenase gene clusters in the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Mol. Microbiol.* 100, 1096–1109.
25. Pratte, B.S., Ungerer, J. and Thiel, T. (2015) Role of RNA secondary structure and processing in stability of the *nifH1* transcript in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Bacteriol.* 197, 1408–1422.
26. Green, J. and Paget, M.S. (2004) Bacterial redox sensors. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 954–966.
27. Tsujimoto, R., Kamiya, N. and Fujita, Y. (2016) Identification of a *cis*-acting element in nitrogen fixation genes recognized by CnfR in the nonheterocystous nitrogen-fixing cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Mol. Microbiol.* 101, 411–424.
28. 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.
29. 青木里奈、藤田祐一 (2012) 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. *光合成研究* 22, 87–97.
30. Fujita, Y., Tsujimoto, R. and Aoki, R. (2015) Evolutionary aspects and regulation of tetrapyrrole biosynthesis in cyanobacteria under aerobic and anaerobic environments. *Life (Basel)* 5, 1172–1203.
31. Aoki, R., Hiraide, Y., Yamakawa, H. and Fujita, Y. (2014) A novel "oxygen-induced" greening process in a cyanobacterial mutant lacking the transcriptional activator ChlR involved in low-oxygen adaptation of tetrapyrrole biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 289, 1841–1851.
32. Hiraide, Y., Oshima, K., Fujisawa, T., Uesaka, K., Hirose, Y., Tsujimoto, R., Yamamoto, H., Okamoto, S., Nakamura, Y., Terauchi, K., Omata, T., Ihara, K., Hattori, M. and Fujita, Y. (2015) Loss of cytochrome  $c_M$  stimulates cyanobacterial heterotrophic growth in the dark. *Plant Cell Physiol.* 56, 334–345.
33. Fuangthong, M. and Helmann, J.D. (2002) The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6690–6695.
34. Panmanee, W., Vattanaviboon, P., Poole, L.B. and Mongkolsuk, S. (2006) Novel organic hydroperoxide-sensing and responding mechanisms for OhrR, a major bacterial sensor and regulator of organic hydroperoxide stress. *J. Bacteriol.* 188, 1389–1395.
35. Ludwig, M., Pandelia, M.E., Chew, C.Y., Zhang, B., Golbeck, J.H., Krebs, C. and Bryant, D.A. (2014) ChlR protein of *Synechococcus* sp. PCC 7002 is a transcription activator that uses an oxygen-sensitive [4Fe-4S] cluster to control genes involved in pigment biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 289, 16624–16639.

## Common and Unique Features of Adaptation Mechanisms to Low Oxygen Environments in Chlorophyll Biosynthesis and Nitrogen Fixation of Cyanobacteria

Yuichi Fujita\* and Ryoma Tsujimoto

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

光合成生物におけるカロテノイド合成系の進化<sup>‡</sup>日本医科大学 生物学教室  
高市 真一\*

光合成細菌からシアノバクテリアや葉緑体への光合成生物の進化を考えると、(バクテリオ)クロロフィルの構造や合成、光化学系には類似性や連続性が見られる。一方、カロテノイドは共生や進化段階が変わるごとに組成や合成経路に大きな変化が見られるので、進化・共生に伴い一部の合成経路を捨てて、一部の合成経路を共生相手とは別の生物から取り込んだと思われる。本解説では、フィトエンからリコペンへの合成経路および酵素、異種のリコペン・シクラーゼの分布などを中心に、光合成生物の進化とカロテノイド合成系の変化について紹介をする。

## 1. はじめに

光合成生物にとって、(バクテリオ)クロロフィルだけでなくカロテノイドも必須の成分で、光の捕集、強光からの防御、活性酸素種からの保護、色素タンパク複合体の形成、などの機能を担っている。光合成生物の分類と存在するカロテノイドや酵素を表 1 にまとめた。光化学系 II 型をもつ光合成細菌と光化学系 I 型をもつ光合成細菌から、酸素発生型のシアノバクテリアができ、そのシアノバクテリアが真核生物に一次共生をして灰色藻類・紅藻類・緑藻類の葉緑体になったと考えられている。その後の二次・三次共生により種々の藻類や陸上植物が出現したと考えられている。さらに光合成の光化学系を構成するペプチド、(バクテリオ)クロロフィルの構造や生合成経路、三次構造には、進化軸で見ると、一部の成分の置き換えはあるが、類似性と連続性が見られる。早い時期に三次元構造が決まり変化の余地が少なかったのであろう。一方、カロテノイドは生物分類ごとに一部に共通性が見られるが、共生段階などが変わるとともに組成に大きな変化が見られる。従って、進化や共生に伴い一部のカロテノイド合成経路を捨てて、一部の合成経路を共生

相手とは別の生物から取り込んだと思われる。結合タンパクや機能に対して柔軟性が高いためだろう。本解説ではカロテノイド合成系の変化や進化について紹介する。ただし、全体像を見るために、一部の例外的な存在は省略した。

2. フィトエンからリコペンの合成<sup>1-5)</sup>

フィトエンからリコペンの合成には 4 段階の不飽和化を必要とする。原核生物ではフィトエン不飽和化酵素 phytoene desaturase (CrtI) [注: 複数の略語をもつことがある] が担っている。紅色細菌ではこの酵素の機能が確認されている。緑色糸状性細菌とヘリオバクテリアには *crtI* に相同性がある遺伝子 *crtI* と *crtN* があるが、どちらも機能がまだ確認されていない (表 1)。紅色細菌 *Rhodobacter* などはニューロスポレンからスフェロイデンなどを合成する。これは CrtI が最後の 4 段階目の不飽和化をできないため、リコペンではなくニューロスポレンが最終産物のためである。ヘリオバクテリアでは鎖状の C<sub>30</sub>-ジアポニューロスポレンが最終産物である<sup>6)</sup>。シアノバクテリアの中では、原始的な *Gloeobacter violaceus* のみ CrtI を使うが、他のカロテノイド合成酵素はシアノバクテリアと共通性がある<sup>7)</sup>。

原核生物において、緑色硫黄細菌とシアノバクテリアのみ葉緑体と同様に、フィトエンから ζ-カロテンまでをフィトエン不飽和化酵素

<sup>‡</sup>解説特集「光合成色素代謝と光化学系構築のダイナミックな関係」

\*連絡先 E-mail: takaichi@nms.ac.jp



表 1: 光合成生物の分類とカロテノイド<sup>1-5)</sup>

光化学系	光合成生物	カロテノイド型	フィトエンから リコペン	リコペン・シク ラーゼ
II 型	紅色細菌 <sup>1)</sup>	C <sub>40</sub> -鎖状	CrtI	CrtY
	緑色糸状性細菌	β,γ-カロテン	CrtI?	CrtY?
I 型	ヘリオバクテリア	C <sub>30</sub> -鎖状	CrtN (CrtI-type)?	non
	緑色硫黄細菌	β,γ-カロテン	CrtP/Q/H + Z-iso?	CruA/P
II+I 型 (酸素発生型)	シアノバクテリア	β,γ-カロテン	CrtP/Q/H + Z-iso?	CruA/P?
	葉緑体	β,α-カロテン	CrtP/Q/H + Z-iso	CrtL

<sup>1)</sup>カロテノイド合成遺伝子はクラスターを形成

phytoene desaturase (CrtP, Pds) [注: CrtI と同じ酵素名であるが、機能は異なる] が、ζ-カロテンからリコペンまでをζ-カロテン不飽和化酵素 ζ-carotene desaturase (CrtQ, Zds) が各々2段階ずつ不飽和化する。さらに CrtQ の反応に伴い合成されるポリシス型のニューロスポレンとリコペンを、カロテン異性化酵素 carotene isomerase (CrtH, CrtISO) あるいは光照射によりトランス型に変換する。植物においてはポリシス-ζ-カロテンをモノシス-ζ-カロテンに変換するζ-カロテン異性化酵素 ζ-carotene isomerase (Z-iso) も必要である<sup>8)</sup>。それに相同性のある遺伝子が緑色硫黄細菌とシアノバクテリアにも存在するが、機能確認はされていない (表 1)。

*crtP*, *crtQ*, *crtH* は *crtI* に低い相同性があるので、*crtI* が変化したのかもしれない。この4酵素によるリコペン合成経路は、緑色硫黄細菌からシアノバクテリアに、さらに藻類や陸上植物の葉緑体に引き継がれたと考えられる。ただし細菌において1酵素が担っていた反応を、緑色硫黄細菌やシアノバクテリアや葉緑体では4酵素に分割し複雑化した原動力やメリットがどこにあったのかは不明である。

### 3. リコペンの環化 (β-カロテン、α-カロテン合成)<sup>1-5)</sup>

紅色細菌はリコペンを鎖状のまま修飾してスピロキササンなどを合成する (図 1)。紅色細菌とヘリオバクテリア以外の光合成生物はリ

コペンをγ-カロテン、β-カロテン、α-カロテンに環化して、さらに修飾を加える (表 1、図 2)。

リコペン・シクラーゼ lycopene cyclase として3種類の酵素が知られている: 細菌 CrtY と葉緑体 CrtL, CruA/CruP、一部の細菌 CrtYc+Yd とアーキア CrtYcd と菌類 CrtYB。CrtY と CrtL にはある程度の相同性が見られるので同一グループと考えているが、Bryant らは2つに分けた<sup>9)</sup>。リコペンの片方を環化したγ-カロテンしかつくりえない CrtYm と CrtLm もあるが、CrtY や CrtL の変異と考えられる。

紅色細菌である好気性光合成細菌の一部はβ-カロテンを CrtY により合成する。緑色糸状性細菌も *crtY* に相同性がある遺伝子をもっているが、まだ機能解析がなされていない。

藻類や陸上植物では、リコペンの両端をリコペン-β-シクラーゼ (CrtL-b, Lcy-b) がβ末端基にしてβ-カロテンがつくられる。一方、α-カロテンは、基質特異性のために先ずリコペン-ε-シクラーゼ (CrtL-e, Lcy-e) がε末端基を合成して、次いで反対側を CrtL-b がβ末端基にして合成される<sup>10)</sup>。2つの酵素は相同性が高く、CrtL-b から CrtL-e ができたと考えられている。α-カロテンとその誘導体は紅藻類、クリプト藻類、緑藻類、陸上植物に限られ、光合成細菌、2属を除くシアノバクテリア<sup>11)</sup>、褐藻類には見られない。

光合成細菌と葉緑体の間に位置するシアノバクテリアのリコペン・シクラーゼは未だに機能解析が充分なされていない。最初に *Synechococcus*

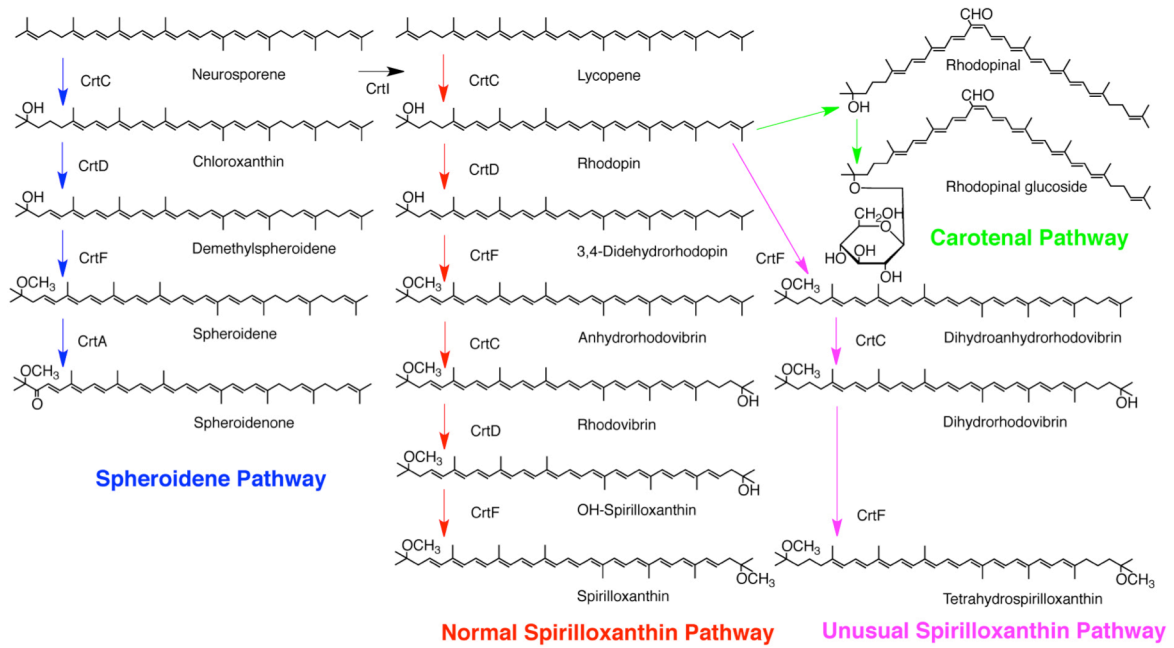


図 1. 紅色光合成細菌のカロテノイドと合成経路<sup>1,3)</sup>

sp. PCC 7942 の CrtL (1994 年)、次いで *Prochlorococcus marinus* の CrtL (2003 年)の機能が確認された。近年見いだされた酵素である CruA が緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum tepidum*、CruA と CruP が *Synechococcus* sp. PCC 7002 (2007 年)で機能が確認された<sup>9)</sup>。最近、*Arthrospira platensis* においても CruA が機能確認された(未発表)。crtL あるいは cruA/cruP に相同性のある遺伝子が多くのシアノバクテリアのゲノム上に存在するが、機能確認できていない。cruA/cruP がリコペン・シクラーゼの有力な候補と思われるが、機能確認ができないのは、酵素の機能発現の技術的な問題か、コファクターあるいは別のペプチドをさらに必要とするのか、あるいは未知の別の酵素の存在、などの理由が考えられているが、今後の問題である。

4. 紅色細菌のカロテノイドと合成経路の多様性<sup>1,3)</sup>

紅色細菌のカロテノイドには多様性が見られるが、合成酵素の基質特異性の差異により合成経路に多様性が生じたと考えられる(図 1)。上記のように CrtI の性質の違いがスフェロイデン経路とスピリロキサニン経路を作り出し、また同

じ酵素が別の経路でも働いている。

5. 緑色硫黄細菌と緑色糸状性細菌のカロテノイドと合成系<sup>1)</sup>

緑色硫黄細菌と緑色糸状性細菌の合成するカロテノイドとその合成経路は十分に解析されていない。緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum tepidum* は OH- $\gamma$ -カロテン・グルコシド・エステル、OH-クロロバクテン・グルコシド・エステル、1,2-ジヒドロ- $\gamma$ -カロテンなどをもつ<sup>12)</sup>。一部の合成酵素・遺伝子は機能解析された<sup>13)</sup>。また一部の種は  $\beta$  末端基を芳香環にしたイソレニエラテンをもつ。一方、緑色糸状性細菌 *Chloroflexus aurantiacus* は OH- $\gamma$ -カロテン・グルコシド・エステルなどをもち<sup>14)</sup>、合成酵素は解析されていない。

6. 酸素発生型光合成生物のカロテノイドと合成経路<sup>1,2,4,5)</sup>

シアノバクテリア、灰色藻類、紅藻類、緑藻類、褐藻類、陸上植物など酸素発生型光合成生物の主なカロテノイド合成経路を図 2 にまとめた。中央の経路から左右に枝分かれした経路があり、これらは生物の系統分類に関係している。



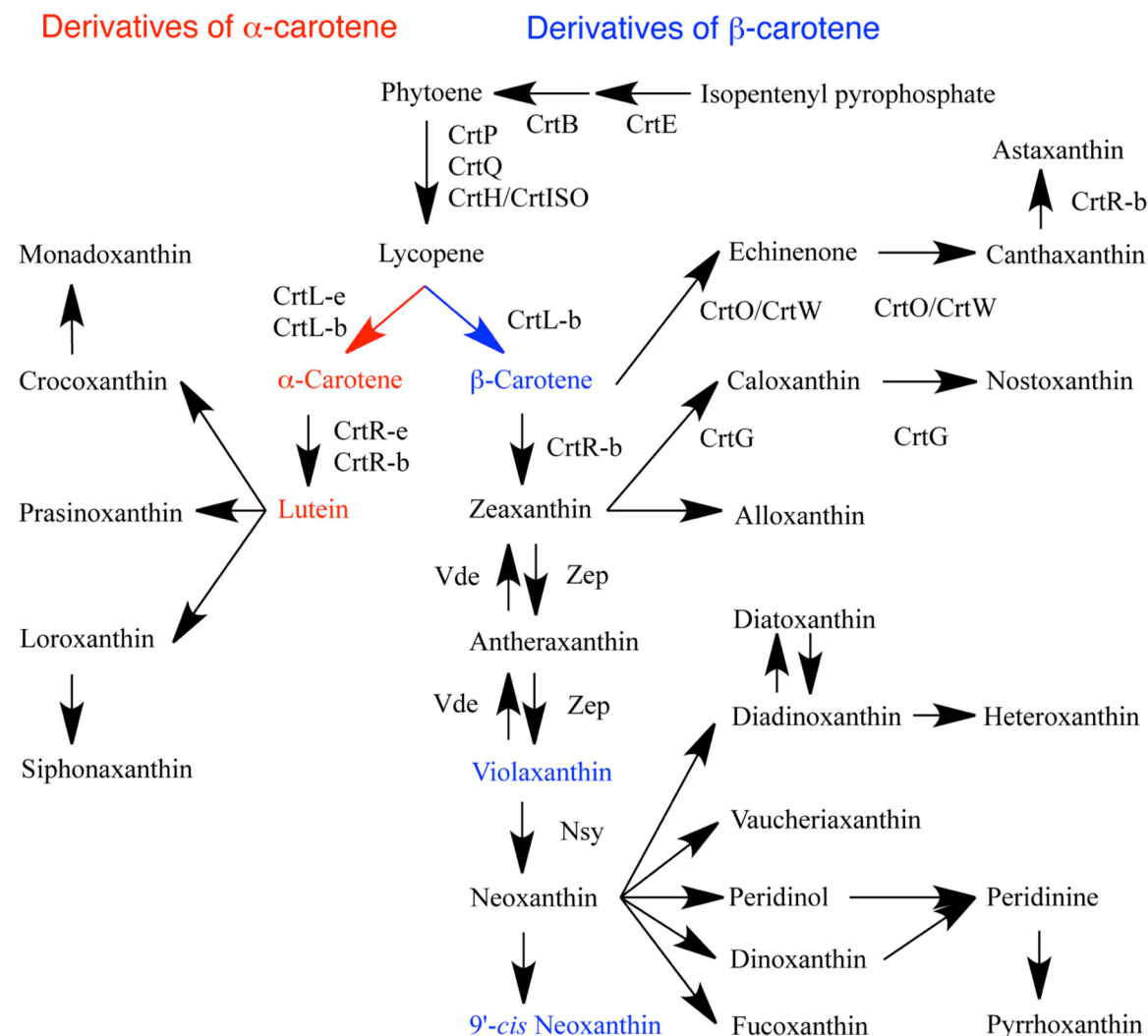


図 2：酸素発生型光合成生物の主要なカロテノイド合成経路と酵素<sup>4,5)</sup>

シアノバクテリアはβ-カロテン誘導体のみをもち、水酸化やケト化により図2の右上のエキネノンやノストキサンチンを合成し、さらにシアノバクテリアに特有なγ-カロテン誘導体のミクソール配糖体をもつ。ただしゼアキサンチンから先のエキネノンやノストキサンチンの合成経路は、葉緑体に引き継がれなかった。

シアノバクテリアにはケト化酵素として、互いに相同性のないβ-カロテンケトラーゼβ-carotene ketolaseが2種類存在する(CrtO, CrtW)。Anabaena sp. PCC 7120ではこれらの酵素が働く代謝経路が異なる<sup>15)</sup>。CrtOはDinococcusなどで、CrtWはParacoccusなどで機能確認されており、これらの遺伝子をシアノバクテリアが獲得した

と思われる。紅色細菌のスフェロイデン・モノオキシゲナーゼ spheroidene monoxygenase (CrtA)、褐藻類のフコキサンチンや緑藻類のシフォナキサンチンのケト基合成酵素もお互いに相同性がなく、由来が不明である。陸上植物にはケト化酵素がない。

シアノバクテリアが一次共生した灰色藻類は、ゼアキサンチンまでしか作ることができない。

シアノバクテリアが一次共生した紅藻類は、存在するカロテノイドから、ゼアキサンチン-、アンテラキサンチン-、ルテイン-タイプに分けられ、紅藻類の中の系統分類に対応している<sup>16)</sup>。ただし、シアノバクテリアには見られないε末端基(ルテイン)はクリプト藻類にも見られる。また

エポキシ基 (アンテラキサンチン) は褐藻類だけでなく緑藻類・陸上植物にも見られるが、酵素・遺伝子の由来は不明である。

紅藻類が二次共生をした種々の褐藻類のカロテノイドには、アレン基 (C=C=C) をもつジアジノキサンチン、フコキサンチン、ペリジニンなどがある。アレン基は生体物質としてはカロテノイドに特有の基である。陸上植物ではビオラキサンチンからネオキサンチンを合成し、アレン基を作るネオキサンチン合成酵素 *neoxanthin synthase* (Nsy) が知られている。褐藻類ではネオキサンチンが検出されないことが多いが、化学構造を比較するとアレン基をもつカロテノイドは、*trans*-ネオキサンチンから合成されると思われる (図2)。ただし系統分類や進化を考えると、どこでこのNsy 遺伝子を獲得し、どのように伝わったかは不明である (図2)。

紅藻類が二次共生をしたクリプト藻類には、アセチレン基 (C≡C) をもつアロキサンチンなどがある。褐藻類に見られるジアジノキサンチンなどにもアセチレン基はあるが、両者の合成機構は異なると思われる。

シアノバクテリアが一次共生した緑藻類は、その後種々の緑藻類に分かれ、種々のルテイン誘導体がつくられた。緑藻類ではβ-カロテンの誘導体は限られた種類しか存在しないが、α-カロテン誘導体には多様性が見られる (図2)。

以上の海産藻類に対して、全ての陸上植物のカロテノイドはほぼ同じで、図2の中心部分に位置するβ-カロテン、ビオラキサンチン、9'-*cis*-ネオキサンチン、ルテインを主成分とする。進化の結果一番単純なカロテノイドだけに落ち着いたのだろうか。陸上植物は形態的には大きな進化をしたが、光合成の機構や色素はほぼ同一で変化が見られない。

## 7. おわりに

光合成生物 (光合成細菌、シアノバクテリア、灰色藻類、紅藻類、褐藻類、緑藻類、陸上植物) のカロテノイド組成、即ちカロテノイド合成経路には多様性が見られる。これは共生や進化段階が変わるごとにカロテノイドの組成や合成経路に

大きな変化が起きたため、その時に一部の合成経路を捨てて、一部の合成経路や遺伝子を共生相手とは別の生物から取り込んだためと思われる。

紅色細菌のカロテノイド合成遺伝子はクラスターを形成しているが、他の光合成生物のカロテノイド合成遺伝子はゲノム上に点在している。そのため遺伝子の相同性からは限られた遺伝子のみしか見つけられない。また遺伝子に相同性があってもその機能を持たない例もある。その結果、遺伝子や酵素が未だに判らない合成段階も多い。光合成生物だけでなく、他のカロテノイド合成生物を含めて、系統分類とカロテノイド合成遺伝子や酵素との関係をさらに検討する必要がある。

詳しくは書籍<sup>1)</sup>や総説<sup>2-5)</sup>を参照して欲しい。また最近の情報は光合成事典 (Web 版) にもまとめられている。

## 謝辞

多くの光合成生物のカロテノイドの分析や解析をできたのは、多くの共同研究者に恵まれたためである。この場を借りて感謝を申し上げます。また、この解説を書く機会を頂きましたシンポジウムのオーガナイザーの北海道大学田中亮一博士と福井工業大学柏山祐一郎博士に謝意を表します。

Received November 21, 2016; Accepted November 29, 2016; Published December 31, 2016

## 参考文献

1. 高市真一編「カロテノイド」(2006) 裳華房
2. Takaichi, S. and Mochimaru, M. (2007) Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2607–2619.
3. Takaichi, S. (2009) Distribution and biosynthesis of Carotenoids, in *The Purple Phototrophic Bacteria* (Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C. and Beatty, J.T., Eds.) pp 97–117, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
4. Takaichi, S. (2011) Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Mar. Drugs* 9, 1101–1118.
5. Takaichi, S. (2013) Tetraterpenes: Carotenoids. in *Natural Products* (Ramawat, K.G. and Merillon, J.M.

- Eds.) pp 3251–3283, Springer, Berlin, Germany.
6. Takaichi, S., Inoue, K., Akaike, M., Kobayashi, M., Oh-oka, H. and Madigan, M.T. (1997) The major carotenoid in all known species of heliobacteria is the C<sub>30</sub> carotenoid 4,4'-diaponeurosporene, not neurosporene. *Arch. Microbiol.* 168, 277–281.
  7. Tsuchiya, T., Takaichi, S., Misawa, N., Maoka, T., Miyashita, H. and Mimuro, M. (2005) The cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 uses bacterial-type phytoene desaturase in carotenoid biosynthesis. *FEBS Lett.* 579, 2125–2129.
  8. Li, F., Murillo, C. and Wurtzel, E.T. (2007) Maize *Y9* encodes a product essential for 15-*cis*- $\zeta$ -carotene isomerization. *Plant Physiol.* 144, 1181–1189.
  9. Maresca, J., Graham, J.E., Wu, M., Eisen, J.A. and Bryant, D.A. (2007) Identification of a fourth family of lycopene cyclases in photosynthetic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 11784–11789.
  10. Cunningham, Jr., F.X. and Gantt, E. (2001) One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene  $\epsilon$ -cyclases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 2905–2910.
  11. Takaichi, S., Mochimaru, M., Uchida, H., Murakami, A., Hirose, E., Maoka, T., Tsuchiya, T. and Mimuro, M. (2012) Opposite chirality of  $\alpha$ -carotene in unusual cyanobacteria with unique chlorophylls, *Acaryochloris* and *Prochlorococcus*. *Plant Cell Physiol.* 53, 1881–1888.
  12. Takaichi, S., Wang, Z.-Y., Umetsu, M., Nozawa, T., Shimada, K. and Madigan, M.T. (1997) New carotenoids from the thermophilic green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*: 1',2'-dihydro- $\gamma$ -carotene, 1',2'-dihydrochlorobactene, and OH-chlorobactene glucoside ester, and the carotenoid composition of different strains. *Arch. Microbiol.* 168, 270–276.
  13. Frigaard, N.-U., Maresca, J.A., Yunker, C.E., Jones, A.D. and Bryant, D.A. (2004) Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *J. Bacteriol.* 187, 5210–5220.
  14. Takaichi, S., Tsuji, K., Matsuura, K. and Shimada, K. (1995) A monocyclic carotenoid glucoside ester is a major carotenoid in the green filamentous bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Plant Cell Physiol.* 36, 773–778.
  15. Mochimaru, M., Masukawa, H. and Takaichi, S. (2005) The cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 has two distinct  $\beta$ -carotene ketolases: CrtO for echinenone and CrtW for ketomyxol synthesis. *FEBS Lett.* 579, 6111–6114.
  16. Takaichi, S., Yokoyama, A., Mochimaru, M., Uchino, H. and Murakami, A. (2016) Carotenogenesis diversification in phylogenetic lineages of Rhodophyta. *J. Phycol.* 52, 329–338.

## Evolution of Carotenoid Synthesis in Phototrophs

Shinichi Takaichi\*

Department of Biology, Nippon Medical School

クロロフィル代謝による光化学系の合成、分解の制御<sup>†</sup>

北海道大学 低温科学研究所

伊藤 寿\*

陸上植物の光化学系は、コア複合体と周辺集光アンテナから構成されている。コア複合体はクロロフィルとしてはクロロフィル *a* だけが結合し、周辺集光アンテナはクロロフィル *a* とクロロフィル *b* が結合している。光化学系の構築、分解とクロロフィルの代謝は強く関連している。例えばクロロフィル *b* を合成できない変異体では周辺集光アンテナは蓄積せず、逆にクロロフィル *b* を分解できない変異体では周辺集光アンテナが分解されない。本稿では、クロロフィルの代謝による光化学系の合成、分解の制御について紹介したい。

## 1. はじめに

現在、光化学系の光環境への適応という観点からは、NPQ やステート遷移、サイクリック電子伝達などに関して精力的に研究が行われ、次々と新しい報告がなされている<sup>1)</sup>。これらの現象は植物では多くの場合、クロロフィルやタンパク質の新規合成を必要としない。そのため光化学系を光環境に迅速に最適化することができ、短期間に変動する光環境への応答として重要な役割を果たしている。その一方で、植物の一生において、光化学系を構築するクロロフィルタンパク質複合体の量は様々な局面で変動する<sup>2,3)</sup>。例えば、生育場所の光環境により、植物はクロロフィルタンパク質複合体の組成の異なる葉を形成する<sup>4)</sup>。また、植物にとってクロロフィルタンパク質のポリペプチドは主要な窒素源の一つである。そのため、植物は葉が老化すると窒素を新しく形成される器官に転流し再利用するために、クロロフィルタンパク質のポリペプチドを分解する<sup>5,6)</sup>。クロロフィルタンパク質複合体はクロロフィル、カロテノイドおよびポリペプチドなどから構成されている。植物のクロロフィルタンパク質複合体にはコア複合体と周辺集光アンテナ (LHC) の二種

類がある。クロロフィルは多段階の酵素反応を経て合成される。それに対して、クロロフィルタンパク質のポリペプチドはそれぞれの遺伝子の転写、翻訳を経て合成される。このようにクロロフィルとクロロフィルタンパク質複合体のポリペプチドは全く異なる経路で合成されることから、両者の合成量をどのように調節するかが問題となる。その調節は、植物の発達段階や環境条件によって異なる場合もあり得るが、現在、以下のように考えられている。(1) クロロフィルタンパク質複合体の形成においては、ポリペプチド合成による調節と、クロロフィル合成による調節の可能性が考えられる。この問題については、黄化芽生えを緑化させる研究などから、クロロフィルの合成による調節が示唆されている<sup>7)</sup>、また、同様に (2) クロロフィルタンパク質複合体の分解を調節するのはプロテアーゼかクロロフィルの分解かも大きな問題である。これに関しても明確な答えは出ておらず、プロテアーゼの役割を強く主張する総説もある<sup>8)</sup>。本稿ではこの問題についてクロロフィル分解による制御という立場から議論する。

クロロフィル代謝と光化学系の量的制御を調べる上で、クロロフィル代謝の変異株の解析は有効である。ただし、植物においてクロロフィル *a* は重要な光合成色素であり、その蓄積量を増やすことは難しく (後述)、また抑制株には多面的な

<sup>†</sup>解説特集「光合成色素代謝と光化学系構築のダイナミックな関係」

\*連絡先 E-mail: ito98@lowtem.hokudai.ac.jp

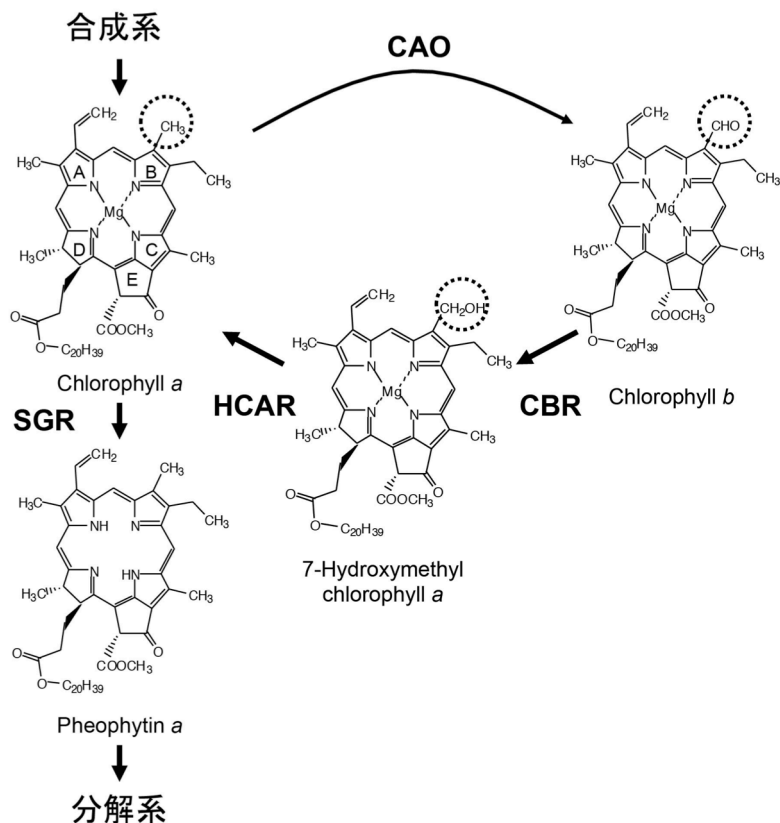


図 1. クロロフィル代謝系

クロロフィル *a* とクロロフィル *b* の相互転換系、およびクロロフィル *a* の分解の最初の段階を示す。クロロフィル *a* とクロロフィル *b* の相互転換系は 7 位の酸化、還元反応であり、該当する個所を破線で囲んである。SGR (Stay Green) がマグネシウム脱離酵素の実体である。クロロフィル *a* の構造に A 環から E 環を示している。クロロフィル *a* オキシゲナーゼはクロロフィル *a* を基質としていると考えられる。しかし、クロロフィルではなくクロロフィルドを基質としたときに組み換えタンパク質の酵素活性が検出されたことから、クロロフィルド *a* オキシゲナーゼと命名されている。ここに示した酵素の中で、CBR の二つあるアイソザイムのうち NYC1 だけが膜貫通ドメインを持ち、膜タンパク質だと考えられる。もう一つのアイソザイムの NOL、および CAO、HCAR、SGR は可溶性のタンパク質であると考えられている。CAO; クロロフィルド *a* オキシゲナーゼ、CBR; クロロフィル *b* 還元酵素、HCAR; 7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* 還元酵素。

影響が生じてしまうため、その解析は困難である。その一方で、クロロフィル *a* の分解系、クロロフィル *b* の合成系、分解系の欠損株や過剰発現株については明快な表現型が報告されている。そこで本稿では、最初にクロロフィルの代謝系の概要を紹介し、その後クロロフィル代謝から見た光化学系構築の制御をクロロフィル *b* の合成、クロロフィル *b* の分解、およびクロロフィル *a* の分解との関係に分けて順次紹介する。なお、日本語でのクロロフィル代謝系制御の解説記事としては、光合成研究 22 巻 2 号(2012)の「光合成を支えるテトラピロール代謝の多様性」の解説特集があり、参考にして頂きたい。

## 2. クロロフィル代謝経路とクロロフィルタンパク質複合体の構造

クロロフィル *a* の合成はグルタミン酸から 5-アミノレブリン酸が合成されることから始まる。この過程にかかわるグルタミル t-RNA 還元酵素によって触媒される反応はクロロフィル合成経路全体の律速段階であることから、クロロフィル代謝の制御を考える上で重要なステップである。次に、5-アミノレブリン酸を材料としてテトラピロール環が合成された後、その中央にマグネシウムイオンが挿入される。そして E 環が形成された後、クロロフィルド *a* が合成される。最後にクロロフィルシンターゼによってクロロフィルド *a* にフィトールがエステル結合されることで、ク

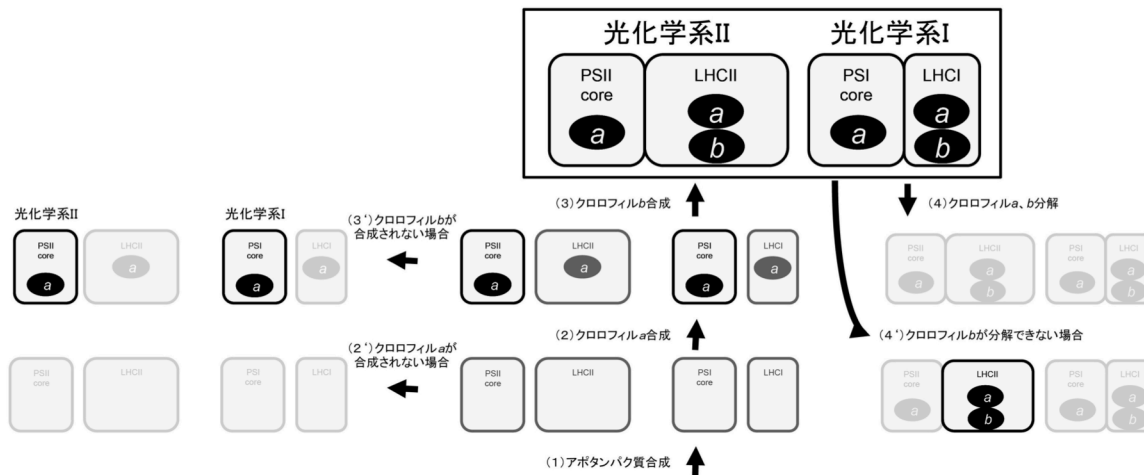


図 2. 光化学系の構築、分解の模式図

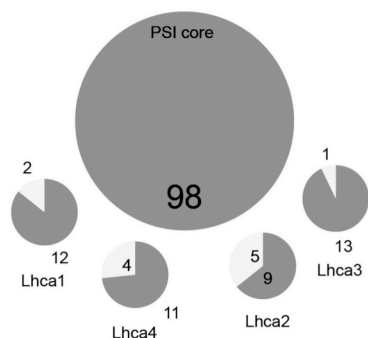
光化学系 I、II の模式図、およびそれらの構築、分解過程を示す。光化学系はコア複合体と周辺集光アンテナ (LHC) からなる。コア複合体にはクロロフィル a、LHC にはクロロフィル a とクロロフィル b が結合している。光化学系の構築は、(1) 核、あるいは葉緑体にコードされているクロロフィルタンパク質のポリペプチドの遺伝子が転写、翻訳されチラコイド膜に挿入される。この段階のポリペプチドは一過的に蓄積するものなので、薄い実線で示してある。(2) クロロフィル a が供給されると、コア複合体が構築される。クロロフィル b 欠損株はこの段階で光化学系の構築が止まる。また、クロロフィル b を持たないシアノバクテリアもこの段階で止まる。この段階の LHC は一過的に蓄積するものなので、薄い実線で示してある。(2') クロロフィル a が合成されないと、ポリペプチドは分解される。(3) さらにクロロフィル b が供給されると、LHC が構築される。(3') クロロフィル b が合成されないと、LHC は分解される。光化学系の分解は、(4) クロロフィル a とクロロフィル b が分解され、光化学系を構築していたポリペプチドも分解される。なお、クロロフィル a とクロロフィル b を分解する酵素の遺伝子は、同じ発現制御を受けていると考えられている。そのため、クロロフィル a とクロロフィル b の分解は協調して起こる。(4') クロロフィル b を分解できない変異体では LHCII が分解されずに残る。クロロフィル b が分解されないと LHCII のクロロフィル a も分解されない。なお、LHCI に関してはクロロフィル b を分解できない変異体でも分解される。その理由が、光化学系 I のコア複合体が分解されると LHCII のように単独では安定に存在できずに分解されてしまうのか、あるいは LHCI はクロロフィル b が残っていてもクロロフィル a が分解され、その結果 LHCI も分解されるのか、不明である。

クロロフィル a が完成する<sup>9)</sup>。クロロフィル a の合成過程にかかわる酵素群の中で、E 環を形成する Mg プロトポルフィリン IX モノメチルエステルシクラーゼの実体が未だに不明であるが、それ以外のクロロフィル合成系の酵素はすべて明らかになっていると考えられている<sup>10)</sup>。酸素発生型光合成生物に共通するクロロフィル a に加えて、緑色植物ではクロロフィル b も光合成色素として用いられる。その合成は、クロロフィル a を基質とした一種類の酵素によって行われる (図 1)。逆にクロロフィル b の分解は、7-ヒドロキシメチルクロロフィル a を中間体とした二段階の酵素反応によりクロロフィル a に戻ってから、クロロフィル a の分解系を利用して行われる<sup>11)</sup>。クロロフィル a の分解は中心金属のマグネシウムが脱離することにより開始される。クロロフィルの

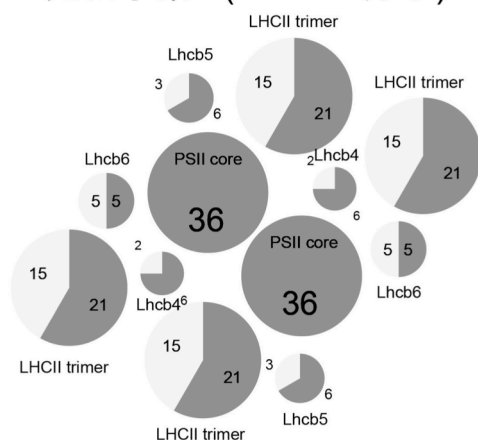
分解系については、最近マグネシウム脱離酵素が報告されたことにより、主要な部分はすべて明らかになった<sup>12,13)</sup>。

光化学系 I と II はそれぞれコア複合体、LHC からなる。クロロフィル a はコア複合体と LHC の両方に存在するのに対して、クロロフィル b は LHC にしか存在しない (図 2)。この理由としては、クロロフィル b からクロロフィル a へは励起エネルギーが効率よく伝達されるが、その逆へは伝達されにくいためではないかと考えられる。シロイヌナズナの LHC としては、光化学系 I の Lhca1 から Lhca4、光化学系 II の Lhcb1 から Lhcb6 の 10 種類が存在し、クロロフィル b はこれらすべての LHC に存在している (図 3)<sup>14)</sup>。

## 光化学系 I (Chl:155分子)



## 光化学系 II (Chl:270分子)



## 図 3. 光化学系 I、II のクロロフィル量

光化学系 I と II の文献<sup>40)</sup>を基に模式図化した。丸がクロロフィルタンパク質複合体のクロロフィルの量を示し、濃い色の部分がクロロフィル *a*、薄い色の部分がクロロフィル *b* の量を表し、数字がそれぞれのクロロフィルの数を示す。光化学系 I はコア複合体に Lhca1 から Lhca4 までそれぞれ一つずつ結合している。光化学系 II は二量体構造で、Lhcb1、Lhcb2 あるいは Lhcb3 を構成成分とする三量体がコア複合体一つに対して 2 つ結合し、Lhcb4 から Lhcb6 までの複合体が一つずつ結合している。具体的なクロロフィルの分子数は光化学系 I コア複合体がクロロフィル *a* だけが 98、Lhca1 がクロロフィル *a*、クロロフィル *b* がそれぞれ 12、2、Lhca2 は 9、5、Lhca3 は 13、1、Lhca4 は 11、4<sup>41)</sup>。光化学系 II コア複合体が単量体当たりクロロフィル *a* だけが 36、Lhcb1、2、3 はすべてクロロフィル *a*、クロロフィル *b* がそれぞれ 7、5、Lhcb4 は 6、2、Lhcb5 は 6、3、Lhcb6 は 5、5<sup>42)</sup>のクロロフィルが結合している。

3. クロロフィル *a* の合成とクロロフィルタンパク質複合体の関係

被子植物はクロロフィルを合成するために光を必要とする。そのため、暗所で発芽すると、クロロフィルを持たない黄化芽生えとなる。黄化芽生えの緑化初期ではクロロフィルの合成量に対して、クロロフィルタンパク質のポリペプチドが過剰に合成されている<sup>7)</sup>。このように、緑化初期でクロロフィルの合成量が少ないときは、クロロフィルの供給量がクロロフィルタンパク質複合体の量を決定している。つまり、クロロフィルの合成量が、光化学系の構築量を制御している。一方で成熟葉でのクロロフィル *a* の代謝とクロロフィルタンパク質複合体の構築の関係は明らかになっていない。その関係を明らかにするためには、クロロフィル *a* の合成量を変えた形質転換体を利用する方法が考えられる。クロロフィル *a* の合成は 5-アミノレブリン酸の合成にかかわるグルタミル t-RNA 還元酵素が律速段階になって

いる<sup>9)</sup>。そこでグルタミル t-RNA 還元酵素の過剰発現体が作製されたが、クロロフィル *a* はあまり増加せず、光障害が生じた<sup>15)</sup>。また、クロロフィル *a* 合成の最終段階を司るクロロフィルシクターゼを過剰発現した形質転換体においても、クロロフィル *a* の蓄積量はほとんど増加しなかった<sup>16)</sup>。これらの結果は、クロロフィル *a* の合成系にフィードバック制御がかかっている可能性や、あるいは葉緑体はもともと飽和量の光化学系を持ちそれ以上増やすのが困難なためクロロフィル量を大きく増加させることができない可能性を示唆している。

4. クロロフィル *b* 欠損変異体

クロロフィル *b* はクロロフィリド *a* オキシゲナーゼ(CAO)によりクロロフィル *a* のメチル基がフォルミル基に酸化されることによって合成される(図 1)。クロロフィル *b* は電荷分離や電子伝達には関与せず、集光性の補助色素としてしか



機能しないため、クロロフィル *b* が欠損しても植物は生育することができる。クロロフィル *b* 欠損株においては LHC の蓄積量は顕著に減少する。しかし、LHC の mRNA 自体はクロロフィル *b* 欠損株でも合成されているため<sup>17)</sup>、クロロフィル *b* を与えると LHC が蓄積する<sup>18)</sup>。これらの結果から、クロロフィル *b* 欠損株に LHC が蓄積しない理由は、LHC を構成するクロロフィルタンパク質のポリペプチドは合成されているが、クロロフィル *b* が供給されないため構造が不安定になり、分解されてしまうためであると考えられる。実際、大腸菌を使って作製した LHC の組み換えタンパク質とクロロフィルを試験管内で結合させたところ、クロロフィル *a* とクロロフィル *b* が LHC の構築には必要で、クロロフィル *a* だけでは安定な LHC が構築できなかった<sup>19)</sup>。クロロフィル *b* 欠損株において LHC タンパク質が合成されるものの蓄積しない現象は、クロロフィル代謝による光化学系構築の制御の代表的な例である。なお、クロロフィル *b* 欠損株においても、LHC は顕著に減少するものの、まったく蓄積しないわけではない。とりわけ、シロイヌナズナであれば、Lhca2 と Lhcb5 はクロロフィル *b* 欠損株において、蓄積量の減少はほとんど見られない。クロロフィル *b* 欠損株において蓄積する LHC の種類や量は光環境の影響を受けるようだが、詳細な原因は分かっていない<sup>11)</sup>。また、緑藻のクラミドモナスではクロロフィル *b* 欠損株における LHC の減少はほとんど見られない。そのような LHC ではクロロフィル *b* の位置にクロロフィル *a* が結合していると考えられている<sup>20,21)</sup>。この陸上植物と緑藻の違いの原因も現時点では不明である。

##### 5. クロロフィル *b* 欠損変異体におけるクロロフィル *b* の合成

クロロフィル *b* の合成が光化学系の構築に与える影響については、黄化芽生えに光照射を行い、クロロフィル *b* の合成を誘導する方法が用いられてきた<sup>22)</sup>。クロロフィル *b* の蓄積量が異なる植物を作製することができるためである。しかし、この時にはクロロフィル *b* 以外にもクロロフィ

ル *a* の合成量も増え、クロロフィルタンパク質のポリペプチドの遺伝子の発現量も増加する。そのため、光化学系の構築に対するクロロフィル *b* の合成の影響だけを明らかにすることはできなかった。そこで、筆者たちの研究グループでは、クロロフィル *b* の合成だけの影響を調べるために、クロロフィル *b* 欠損株で一過的にクロロフィル *b* 合成を誘導する実験が行われた<sup>23)</sup>。具体的には、クロロフィル *b* 合成酵素の CAO をデキサメタゾン (DEX) で誘導できる系をシロイヌナズナのクロロフィル *b* 欠損株に導入し、DEX 処理によりクロロフィル *b* 合成を誘導した。その結果、DEX 処理後 3 日目に、クロロフィル *b* が全クロロフィルの約 15% になるまで蓄積した。なお、野生株ではクロロフィル *b* の割合は 20% 余りのため、野生株よりは少ない。このとき LHC のタンパク質量を調べたところ、DEX 処理前は Lhca2 と Lhcb5 の蓄積のみが認められたが、クロロフィル *b* の蓄積が進むにつれてすべての LHC のタンパク質が蓄積した (図 4A)。一方で、LHC の遺伝子の発現量を調べたところ、DEX 処理によるクロロフィル *b* 合成の誘導の前後で、顕著な発現量の増加は観察されなかった (図 4B)。この結果は、LHC の蓄積量の制御は、主にクロロフィル *b* による LHC の安定化によって、タンパク質レベルで行われることを示している。

クロロフィル *b* 欠損株であっても、葉の成長が終わった段階で葉緑体は分裂を止め、内部のチラコイド膜が発達して成熟した状態になっている。そのような葉緑体であっても、後発的にクロロフィル *b* を合成した場合、光化学系が再構築されることが示された。これは光化学系の柔軟性という観点から、重要な現象だと考えられる。

##### 6. クロロフィル *b* の過剰な変異体

上記のクロロフィル *b* 欠損変異体で CAO の発現を一過的に誘導した実験では、クロロフィル *a/b* 比は 5.7 で、クロロフィル *b* の蓄積量が野生株のクロロフィル *b* 蓄積量 (クロロフィル *a/b* 比は 3 前後) に到達しなかった。そのため、この実験ではクロロフィル *b* が通常量蓄積した時でも、クロロフィル *b* が LHC の量を調節しているのか

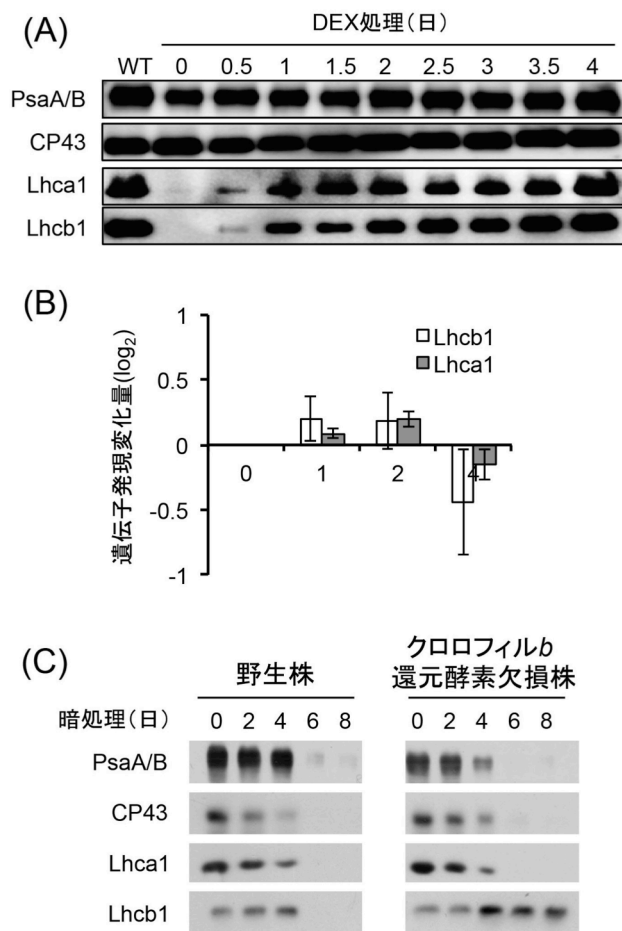


図 4. クロロフィル *b* の合成、分解とクロロフィルタンパク質の蓄積量の関係

(A) クロロフィル *b* 欠損株で DEX により CAO を誘導し、クロロフィル *b* の合成を誘導した時のクロロフィルタンパク質のポリペプチドをイムノプロットにより検出した。LHC としては、ここでは Lhca1 と Lhcb1 だけを示す。Lhca1 と Lhcb1 はクロロフィル *b* 合成誘導後蓄積を始める。

(B) Lhca1 と Lhcb1 の mRNA の量を (A) の条件の 0、1、2、4 日目でマイクロアレイを利用して測定した。マイクロアレイ上にそれぞれの遺伝子が複数スポットされているので、それらの平均値を示し、0 日目のものと比較している。Lhca1、Lhcb1 ともに遺伝子の発現量の変化はわずかなものであり、(A) のタンパク質の量の増加は遺伝子の発現量の増加によるものではないと考えられる。

(C) 暗処理により老化を誘導したときのクロロフィルタンパク質のポリペプチドをイムノプロットにより検出した。野生株では暗処理 8 日目では光化学系 I、II のコア複合体、および周辺集光アンテナがほぼ消失している。それに対してクロロフィル *b* 還元酵素欠損株、つまりクロロフィル *b* を分解できない変異体では暗処理によりコア複合体、および Lhca1 は消失しているが、Lhcb1 は分解されない。このことはクロロフィル *b* の分解が Lhcb1 の分解に必要なことを示している。なお、この条件で、マイナー Lhcb の Lhcb4 から Lhcb6 もクロロフィル *b* 還元酵素欠損株では、暗処理により分解されない<sup>31)</sup>。

不明であった。それに対してシロイヌナズナの CAO をシロイヌナズナとタバコの野生株で過剰発現したところ、クロロフィル *b* の量が増加するとともに LHC の量も増加していた<sup>24,25)</sup>。クロロフィル *a/b* 比が 3 前後で上下するのは植物が強光や弱光に適応する際に見られる応答である。このような応答では、CAO の発現量が変化することが LHC 蓄積量の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。

通常の陸上植物であれば、クロロフィル *b* の量は全クロロフィルの 20% 余りであり、その量比を維持するためには何らかの調節機構が必要である。先行研究から、そのクロロフィル *b* の合成量の制御は、クロロフィル *b* を合成する CAO のフィードバック制御によって行われていることが明らかになっている。具体的には、反応産物のクロロフィル *b* が存在すると CAO のアミノ末端

側の領域が何らかの方法でクロロフィル *b* と相互作用し、CAO タンパク質が分解されることによって、そのフィードバック制御が行われている<sup>26)</sup>。そのため、アミノ末端側の制御領域を除くことにより、クロロフィル *b* 合成のフィードバック制御が効かず、過剰にクロロフィル *b* を蓄積する形質転換体を作ることができる<sup>26)</sup>。また、シアノバクテリアの CAO を植物で発現した場合も過剰量のクロロフィル *b* が蓄積する。ほとんどのシアノバクテリアはクロロフィル *b* を持たないが、*Prochlorothrix hollandica* など、例外的にクロロフィル *b* を持つものも存在する。その *Prochlorothrix* の CAO は陸上植物の CAO と比較してアミノ末端側に制御領域を持たない。そのため *Prochlorothrix* の CAO を植物に導入した場合も過剰量のクロロフィル *b* が蓄積する<sup>27)</sup>。そのようにして作出した形質転換体で、全クロロフィ

ルの約半分がクロロフィル *b* になっている植物の光化学系を調べたところ、通常クロロフィル *a* だけが結合している光化学系 I のコア複合体にもクロロフィル *b* が存在していた。また、LHC においてもクロロフィル *b* の割合が増加していた。このことは、クロロフィル *a* とクロロフィル *b* が結合する場所はクロロフィルタンパク質上で決まっているが、クロロフィル *b* が過剰になればクロロフィル *a* の場所にもクロロフィル *b* が結合できることを示している。なお、このようにクロロフィル *b* が過剰な光化学系では、LHCII の量が増加していた<sup>25)</sup>。ただし、クロロフィル *b* の増加量に比べると、LHCII の増加量は少なかった。クロロフィル *b* の増加の主な原因は LHC の増加ではなく、上述のように、本来はクロロフィル *a* が存在する場所にクロロフィル *b* が結合したためだと思われる。実際、LHC の組み換えタンパク質を用いた再構成実験においても、クロロフィル *a* の場所にクロロフィル *b* が結合できることが知られている<sup>28)</sup>。また、自然界においても水深が深いところに生存する緑藻類にはコア複合体にクロロフィル *b* を持つものが存在することが知られている<sup>29)</sup>。これは、クロロフィル *b* がクロロフィル *a* と比較して青色の光を効率よく吸収することができ、水深が深いところに豊富に存在する青い光を有効に利用するためだと考えられている。このように、生物によってクロロフィル *b* がクロロフィルタンパク質のどこに結合するかは決まっているが、進化の過程でクロロフィル *a* の場所にクロロフィル *b* を組み込む変化は比較的容易に行われたと思われる。シロイヌナズナのクロロフィル *b* の過剰な形質転換体の解析より、クロロフィル *b* が増えてもクロロフィルタンパク質複合体の量は大きくは変わらないが、そこに結合するクロロフィルの組成を変えることができることが明らかになった。

## 7. クロロフィル *b* の分解

クロロフィル *b* の分解は、二段階の還元反応でクロロフィル *a* に戻ってからクロロフィル *a* と同じ経路で進行する。クロロフィル *b* のまま分解しないのは、7 位にフォルミル基があると、後の分

解過程を触媒するフェオフォルビド *a* オキシゲナーゼが代謝できないためであると考えられている<sup>30)</sup>。クロロフィル *b* の最初の還元反応はクロロフィル *b* 還元酵素により行われる。クロロフィル *b* 還元酵素としては、Non-Yellow Coloring 1 (NYC1) と NYC1-like (NOL) の二つのアイソザイムが緑色植物には存在する。二つの遺伝子を破壊したクロロフィル *b* 還元酵素欠損株の表現型は野生株と差が見られない。これは、生育中クロロフィル *b* はあまり分解されていないためだと思われる。しかし、植物を暗処理により強制的に老化させクロロフィルの分解を誘導すると、野生株では約一週間で大半のクロロフィルが分解されるのに対して、クロロフィル *b* 還元酵素欠損株ではクロロフィル *b* がほとんど減少せず、一定量のクロロフィル *a* も残存する<sup>31,32)</sup>。クロロフィル *b* 還元酵素欠損株はこのようにクロロフィルの分解が正常に行われぬ。そのためクロロフィル *b* の分解がクロロフィルタンパク質複合体の分解に及ぼす影響を明らかにするために適した実験材料である。そこで筆者たちの研究グループで、暗処理後のクロロフィル *b* 還元酵素欠損株におけるクロロフィルタンパク質複合体の蓄積量を調べた。その結果、野生株ではほぼすべてのクロロフィルタンパク質複合体が消失していたのに対して、クロロフィル *b* 還元酵素欠損株では LHCII を構成するクロロフィルタンパク質のみ残存していた (図 4C)。このことからクロロフィル *b* の分解が LHCII の分解に必須であることが示された。さらに、光化学系 II のコア複合体が分解されても、LHCII は安定に存在することも明らかになった。一方 LHCI を構成するクロロフィルタンパク質はすべて野生株と同様に分解されていた。このことから、光化学系 I のコア複合体が分解された際に遊離した LHCI については、クロロフィル *b* を結合しているものの、LHCII とは異なり安定には存在できず分解されてしまうと思われる。なお、クロロフィル *b* 還元酵素のアイソザイムである NOL の組み換えタンパク質は精製した LHCII のクロロフィル *b* を還元できる。このことは、LHCII がプロテアーゼによって分解されていなくても、クロロフィル *b* 還元酵素

が LHCII 上のクロロフィル *b* を分解できることを示している。以上のようにクロロフィル *b* 還元酵素はポリペプチドに結合したクロロフィル *b* を分解できること、およびクロロフィル *b* 還元酵素欠損株は LHCII を分解できないことから、LHCII の分解はクロロフィル *b* の分解によって開始されると考えられる。

### 8. 7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* の分解

クロロフィル *b* が還元されて生じる 7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* は 7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* 還元酵素によりクロロフィル *a* に還元される<sup>33)</sup>。7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* は光合成色素としては利用されることがなく、代謝中間体としてのみ存在する。この還元酵素の欠損株は、生育条件では明瞭な表現型を示さない<sup>34)</sup>。しかし暗所で強制老化を行い、クロロフィルを分解させると、様々なクロロフィル分解中間体がたまるとともに、葉が細胞死のような症状を呈する。このような症状を誘導する機構の詳細は、現時点では明らかではない。7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* はクロロフィルタンパク質にクロロフィル *a* などのように強固に結合することができず<sup>31)</sup>、7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* が直接クロロフィルタンパク質複合体の安定化などに寄与している可能性は低いと考えられる。そのため、7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* 還元酵素は LHCII の分解にかかわっていないと考えられる。

### 9. クロロフィル *a* の分解

クロロフィル *a* の分解は中心金属のマグネシウムが外れ、フェオフィチンになることにより始まる。マグネシウムが外れる反応はプロトンとマグネシウムの交換であるため、クロロフィル *a* を弱酸性の溶媒に溶かすだけで、酵素がなくても進行する<sup>35)</sup>。そのため、クロロフィルの分解過程でのマグネシウムの脱離が酵素反応なのか非酵素反応なのかはこの分野における大きな懸案事項であった。それに対して、最近、筆者らのグループではマグネシウム脱離酵素を同定し、クロロフィル *a* の分解が酵素による反応であること

を明らかにした<sup>12)</sup>。このマグネシウム脱離酵素の実体は、約 10 年前に老化後も葉の緑色を維持 (stay green) する変異体の原因遺伝子として同定されていた SGR<sup>36)</sup>であった。なお、SGR はメンデルが遺伝の法則に利用したエンドウマメの緑色の子葉の原因遺伝子でもある<sup>37)</sup>。

マグネシウム脱離酵素の欠損株はクロロフィルが分解されないため自然老化、あるいは暗処理による強制老化において、クロロフィルが残る。暗処理による強制老化の場合、LHCI、LHCII とともに分解されずに残る<sup>38)</sup>。この時、クロロフィルを持たない葉緑体の他のタンパク質、例えば Rubisco は分解される。この結果は、クロロフィル *a* の分解がクロロフィルタンパク質複合体の分解に影響を与えていることを示す顕著な例である。また、マグネシウム脱離酵素を過剰発現するとクロロフィルが分解される。そのため、恒常的に過剰発現した場合、植物が正常に生育できない。そこで DEX 処理により一過的に発現を誘導したところ、30 時間後にはほぼすべてのクロロフィルが分解されていた<sup>12)</sup>。この時、クロロフィルタンパク質複合体は分解されるが、Rubisco は分解されずに残っていた。この結果もクロロフィルの分解がクロロフィルタンパク質複合体の分解を誘導することを表している。実際、マグネシウム脱離酵素の組み換えタンパク質は、精製したクロロフィルタンパク質複合体のクロロフィル *a* を分解できる。このことはクロロフィルタンパク質複合体の分解がプロテアーゼによる分解ではなくクロロフィル *a* の分解によって開始されることを表している。

### 10. まとめ

今回、「クロロフィル代謝による光化学系の合成、分解の制御」という観点から、クロロフィル *b* の合成、分解、およびクロロフィル *a* の分解を改変した形質転換体を紹介してきた。図 2 でその結果を模式的に示している。クロロフィル *b* の代謝と LHCII の関係は以下の三点にまとめることができる。(1) クロロフィル *b* を合成すると LHCII が蓄積する。(2) LHCII を分解するためにはクロロフィル *b* を分解しなければならない。

(3) クロロフィル *b* を分解する酵素は LHCII に結合したクロロフィル *b* を分解することができる。これらのことはクロロフィル *b* の代謝が LHCII の合成、分解と密接にかかわっていることを示している。

光化学系が光を吸収し、励起エネルギーが反応中心に送られて、電荷分離が起きるまでは、クロロフィルタンパク質のポリペプチドはクロロフィルを適切な場所に配置するための足場であり、ポリペプチド自身が励起エネルギーの移動にかかわることはない。ポリペプチドが、クロロフィルタンパク質複合体の機能を発現するための補助的な役割を果たしているという観点に立つと、少なくとも周辺集光装置ではクロロフィルがクロロフィルタンパク質複合体の量を制御していることは合理的だと考えられる。

クロロフィルタンパク質のポリペプチドが分解されるときには当然プロテアーゼが関与している。本稿ではプロテアーゼには触れなかったが、LHC を分解するプロテアーゼについてはほとんど明らかになっていない<sup>39)</sup>。プロテアーゼは、光化学系の構築、分解を理解するうえで残された大きな課題である。

## 謝辞

本原稿の作成に当たり有益な御助言を下さいました田中歩教授、田中亮一准教授、高林厚史助教、並びに査読者の方に感謝いたします。

Received October 31, 2016; Accepted November 29, 2016;  
Published December 31, 2016

## 参考文献

1. Rochaix, J.-D. (2014) Regulation and dynamics of the light-harvesting system. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 287–309.
2. Bailey, S., Walters, R., Jansson, S. and Horton, P. (2001) Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta* 213, 794–801.
3. Anderson, J.M. and Andersson, B. (1988) The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. *Trends Biochem. Sci.* 13, 351–355.
4. Ruban, A.V. (2015) Evolution under the sun: optimizing light harvesting in photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 66, 7–23.
5. Hörtensteiner, S. and Feller, U. (2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J. Exp. Bot.* 53, 927–937.
6. Thomas, H. (2013) Senescence, ageing and death of the whole plant. *New Phytol.* 197, 696–711.
7. Mullet, J.E., Klein, P.G. and Klein, R.R. (1990) Chlorophyll regulates accumulation of the plastid-encoded chlorophyll apoproteins CP43 and D1 by increasing apoprotein stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4038–4042.
8. Dall'Osto, L., Bressan, M. and Bassi, R. (2015) Biogenesis of light harvesting proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1847, 861–871.
9. Tanaka, R. and Tanaka, A. (2007) Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 321–346.
10. Masuda, T. and Fujita, Y. (2008) Regulation and evolution of chlorophyll metabolism. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1131–1149.
11. Tanaka, R. and Tanaka, A. (2011) Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 968–976.
12. Shimoda, Y., Ito, H. and Tanaka, A. (2016) *Arabidopsis* STAY-GREEN, Mendel's green cotyledon gene, encodes magnesium-dechelataase. *Plant Cell* 28, 2147–2160.
13. Christ, B. and Hörtensteiner, S. (2014) Mechanism and significance of chlorophyll breakdown. *J. Plant Growth Regul.* 33, 4–20.
14. Nelson, N. and Yocum, C.F. (2006) Structure and function of photosystems I and II. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 521–565.
15. Schmied, J., Hedtke, B. and Grimm, B. (2011) Overexpression of HEMA1 encoding glutamyl-tRNA reductase. *J. Plant Physiol.* 168, 1372–1379.
16. Shalygo, N., Czarnecki, O., Peter, E. and Grimm, B. (2009) Expression of chlorophyll synthase is also involved in feedback-control of chlorophyll biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* 71, 425–436.
17. Flachmann, R. and Kühlbrandt, W. (1995) Accumulation of plant antenna complexes is regulated by post-transcriptional mechanisms in tobacco. *Plant Cell* 7, 149–160.
18. Kuttkat, A., Edhofer, I., Eichacker, L.A. and Paulsen, H. (1997) Light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein stably inserts into etioplast membranes supplemented with Zn-pheophytin *a/b*. *J. Biol. Chem.* 272, 20451–20455.
19. Kleima, F.J., Hobe, S., Calkoen, F., Urbanus, M.L.,

- Peterman, E.J.G., van Grondelle, R., Paulsen, H. and van Amerongen, H. (1999) Decreasing the chlorophyll *a/b* ratio in reconstituted LHCII: structural and functional consequences. *Biochemistry* 38, 6587–6596.
20. Bujaldon, S., Kodama, N., Rappaport, F., Subramanyam, R., de Vitry, C., Takahashi, Y. and Wollman, F.-A. (2016) The functional accumulation of antenna proteins in chlorophyll *b*-less mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Plant* 10.1016/j.molp.2016.10.001.
  21. Polle, J.E.W., Benemann, J.R., Tanaka, A. and Melis, A. (2000) Photosynthetic apparatus organization and function in the wild type and a chlorophyll *b*-less mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. Dependence on carbon source. *Planta* 211, 335–344.
  22. Tzinis, G., Argyroudi-Akoyunoglou, J.H. and Akoyunoglou, G. (1987) The effect of the dark interval in intermittent light on thylakoid development: photosynthetic unit formation and light harvesting protein accumulation. *Photosynth. Res.* 14, 241–258.
  23. Jia, T., Ito, H. and Tanaka, A. (2016) Simultaneous regulation of antenna size and photosystem I/II stoichiometry in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 244, 1041–1053
  24. Biswal, A.K., Pattanayak, G.K., Pandey, S.S., Leelavathi, S., Reddy, V.S., Govindjee and Tripathy, B.C. (2012) Light intensity-dependent modulation of chlorophyll *b* biosynthesis and photosynthesis by overexpression of chlorophyllide *a* oxygenase in tobacco. *Plant Physiol.* 159, 433–449.
  25. Tanaka, R. and Tanaka, A. (2005) Effects of chlorophyllide *a* oxygenase overexpression on light acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth. Res.* 85, 327–340.
  26. Yamasato, A., Nagata, N., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2005) The N-terminal domain of chlorophyllide *a* oxygenase confers protein instability in response to chlorophyll *b* accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 1585–1597.
  27. Hirashima, M., Satoh, S., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2006) Pigment shuffling in antenna systems achieved by expressing prokaryotic chlorophyllide *a* oxygenase in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 281, 15385–15393.
  28. Horn, R., Grundmann, G. and Paulsen, H. (2007) Consecutive binding of chlorophylls *a* and *b* during the assembly in vitro of light-harvesting chlorophyll-*a/b* protein (LHCIIb). *J. Mol. Biol.* 366, 1045–1054.
  29. Kunugi, M., Satoh, S., Ihara, K., Shibata, K., Yamagishi, Y., Kogame, K., Obokata, J., Takabayashi, A. and Tanaka, A. (2016) Evolution of green plants accompanied changes in light-harvesting systems. *Plant Cell Physiol.* 57, 1231–1243.
  30. Hortensteiner, S. (2006) Chlorophyll degradation during senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 55–77.
  31. Horie, Y., Ito, H., Kusaba, M., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2009) Participation of chlorophyll *b* reductase in the initial step of the degradation of light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complexes in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 284, 17449–17456.
  32. Kusaba, M., Ito, H., Morita, R., Iida, S., Sato, Y., Fujimoto, M., Kawasaki, S., Tanaka, R., Hirochika, H., Nishimura, M. and Tanaka, A. (2007) Rice NON-YELLOW COLORING1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence. *Plant Cell* 19, 1362–1375.
  33. Wang, X. and Liu, L. (2016) Crystal structure and catalytic mechanism of 7-hydroxymethyl chlorophyll *a* reductase. *J. Biol. Chem.* 291, 13349–13359.
  34. 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.
  35. Saga, Y. and Tamiaki, H. (2012) Demetalation of chlorophyll pigments. *Chem. Biodiv.* 9, 1659–1683.
  36. Park, S.Y., Yu, J.W., Park, J.S., Li, J., Yoo, S.C., Lee, N.Y., Lee, S.K., Jeong, S.W., Seo, H.S., Koh, H.J., Jeon, J.S., Park, Y.I. and Paek, N.C. (2007) The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. *Plant Cell* 19, 1649–1664.
  37. Sato, Y., Morita, R., Nishimura, M., Yamaguchi, H. and Kusaba, M. (2007) Mendel's green cotyledon gene encodes a positive regulator of the chlorophyll-degrading pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14169–14174.
  38. Wu, S., Li, Z., Yang, L., Xie, Z., Chen, J., Zhang, W., Liu, T., Gao, S., Gao, J., Zhu, Y., Xin, J., Ren, G. and Kuai, B. (2016) NON-YELLOWING2 (NYE2), a close paralog of NYE1, plays a positive role in chlorophyll degradation in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 9, 624–627.
  39. Wijk, K.J.v. (2015) Protein maturation and proteolysis in plant plastids, mitochondria, and peroxisomes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 75–111.
  40. Dekker, J.P. and Boekema, E.J. (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1706, 12–39.
  41. Qin, X., Suga, M., Kuang, T. and Shen, J.-R. (2015) Structural basis for energy transfer pathways in the

- plant PSI-LHCI supercomplex. *Science* 348, 989–995.
42. Sandonà, D., Croce, R., Pagano, A., Crimi, M. and Bassi, R. (1998) Higher plants light harvesting proteins. Structure and function as revealed by mutation analysis of either protein or chromophore moieties. *Biochim. Biophys. Acta* 1365, 207–214.

## Regulation of Photosynthetic Complex by Chlorophyll Metabolism

Hisashi Ito\*

Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University



## 報告記事

第 17 回国際光合成学会~Photosynthesis in a Changing World~参加報告  
-Are You Challenging Yourself?

埼玉大学 大学院理工学研究科 西山研究室 (D2)

Visiting Student Researcher at Niyogi Lab, University of California, Berkeley

神保 晴彦

International Congress on Photosynthesis Research (ICPR) は光合成に関する最も大きな国際会議です。私にとって ICPR は前回の St. Louis から 2 度目の参加でした。開催地となった Maastricht は EU 発祥の地であり、街並みからもその歴史を感じることできる非常に美しい街です。4 日目には城を改装したワイナリーでディナーパーティーが開かれ、参加者同士が交流を行いました。

私は Opening Ceremony の時に、前回の国際会議では会議の大きさに圧倒されて質問すらできなかったことが非常に悔しかったことを思い出し、リベンジを決意しました。合間のコーヒブレイクでは Niyogi lab のメンバーと、それぞれ参加したセッションで面白かった発表について議論しました。また、会期中はほぼ毎晩、街中のバーやレストランにくり出しました。Düsseldorf 大学の学生も交えて GMO を世界にどのように広めていくべきかを、深夜 2 時まで議論したことは非常に有意義な時間でした。私は国際学会に参加する醍醐味は、これまで論文でしか見たことのなかった著名な研究者と会えることだと思います。光合成におけるシグナリングのレジェンドである Jean-David Rochaix は、誠実が歩いているような人で私の研究内容について深く議論を交わしていただきました。Michael Hippler の発表は、*Chlamydomonas* における  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル経路を担う新しい Calcium-dependent thioredoxin を発見した研究で、質問をするとともに発表後に Hippler と議論を交わしました。私は Scientist として心から今回の会議を楽しみました。

これからの ICPR の在り方を議論した時、私は President に参加者がどのくらい国際会議に満足しているのかを質問しました。なぜなら、あまり議論が活発でないと感じたからです。私は学会後にアンケートを取り、参加者の意見を聞くことを提案しました。さらにいくつか意見があり、若い研究者向けのサテライトミーティングを作ることが提案されました。私は国際学会に参加して、自分が非常に Challenging な環境に置かれていることがとてもよくわかりました。それは自分が無名であるために、自ら行動しないと何も得られないからだと思います。光合成は毒ともなる酸素を用いてでも、生物界における存在意義を示しました。光合成研究者も、各々が明確な存在意義を示すべきではないでしょうか。

今回の国際会議では、特に日本人研究者の存在が薄いことがよくわかりました。これまで光合成研究に世界的に大きな貢献をしてきた日本人の存在意義が薄くなるということはとても悲しいことです。ICPR では Graduate Student の学会参加費 (数万円) を補助する制度があります。同年の 4 月には締め切るので注意が必要です。国際会議は、学部や修士の研究をまとめて発表する素晴らしい機会であるとともに、自分の価値を見出す良い挑戦だと思います。是非、活用して下さい。

最後に執筆の機会を下さった埼玉大学の西山佳孝教授に御礼申し上げます。また、読者の先生方は未熟な若年研究者の意見だと思って、どうかお許しいただければと思います。



Niyogi ラボのメンバーとマース川のほとりで (左から 2 番目が筆者)

## 報告記事

## Finnish-Japanese Symposium 2016: Integration of Photosynthesis with Cellular Metabolism: Towards Sustainable Bioeconomy 参加報告

早稲田大学 先進理工学研究科 園池研究室  
小川 敬子

2016年9月5日から10日にかけて、フィンランドはサーリセルカにて開催された Finnish-Japanese symposium 2016 に参加致しました。開催地のサーリセルカは、ヘルシンキから飛行機を乗り継いで更に北へ行ったラップランド地域にある小さな町です。ヘルシンキでも半袖では寒いくらいでしたが、サーリセルカでは9月上旬でもコート無しでは凍えるほどの気候でした。

開催地を日本とフィンランドとの交替で開催されている日本フィンランド二国間会議は、2004年にフィンランド・トゥルクでの最初の会議を皮切りに隔年で開催され、今年で7回目となるそうです。今回は発表のプログラムは5つのセッションに分かれており、全36演題の発表がありました。中でも、Yagut Allahverdiyeva が発表したシアノバクテリアの光合成電子伝達鎖における呼吸鎖末端酸化酵素のエレクトロンシンクとしての役割の話が興味深い内容でした。明所下では光合成や呼吸等、各種の酸素発生・吸収反応が混在するシアノバクテリアにおいて、明所下での各呼吸鎖末端酸化酵素の寄与の程度を明らかにしたもので、個人的には最近殊に関心のある内容であったため、既に論文にもパブリッシュされている内容ですが、直接お話を聞くことが出来たのは貴重な機会でした。また、本会議には今回初めて参加させて頂きましたが、6日間の会期中、40名弱の参加者全員が会場であるホテルで過ごすため、会議中だけでなく、食事中でも他の参加者の方と密に接し議論できる環境にあり、最初はそのような状況に圧倒され、英語力等々様々な面における自身の未熟さを改めて痛感する機会ともなりました。しかし、会議中に限らずに研究について議論できる環境には大変に刺激を受け、研究の話はもちろんのこと、フィンランドの大学の様子など多岐に渡る話題には興味が尽きませんでした。

今回はエクスカーションも特に充実していたようで、3日目の午後には Urho Kekkonen 国立公園へ、4日目の午後には Lappish Goldfields へと出掛けました。フィンランドの雄大な自然に触れるとともに、研究発表の場では見ることのできない先生方の一面を見ることが出来たのは楽しく、貴重な経験になったと思います。さらに、最終日の夜には天候に恵まれ、午前1時から3時頃にかけてオーロラを見ることができ、北欧の地にきた醍醐味を味わうことが出来ました。

最後になりますが、若輩者の私にこの会議への参加の機会を与えて下さいました田中亮一先生はじめ、会期中にお世話になりました先生方にこの場を借りて改めて御礼申し上げます。



## 報告記事

### 若手の会活動報告 ～第13回セミナーの開催、サイエンスアゴラ 2016 での出展～

立命館大学 生命科学部 生命情報学科  
浅井 智広

若手の会では、前号の会報が発行された8月から今号が発刊される12月までの秋の期間に、通算13回目となる研究セミナーの開催と、恒例となったサイエンスアゴラ 2016 での出展を通じたアウトリーチ活動行いました。今年の秋は若手の会の歴史的な区切りの一つとなると思います。というのも、本年度をもって現在の会長と幹事は退き、来年度からは新しい会長と幹事が若手の会を運営していくことを決めたためです。現在の幹事は発足時から積極的に運営に関わってきたメンバーですが、時が経つにつれ、その立場は初々しい学生から熟練の中堅研究者のようなイメージに変わってきました。若手の会の“若手研究者の集まり”というフレッシュなイメージを維持していくため、現会長である僕から幹事の総入れ替えを提案したところ、現幹事および研究セミナーの参加者から快い賛同が得られました。具体的な人選は現在まだ調整中ではありますが、中堅的な研究者を加えつつも、実質的な若さが際立つメンバーとなる予定です。次号の会報で具体的な運営体制のお知らせを行い、本会の次年度年度の総会の折に会員の皆様にご承認いただきたいと思います。

第13回の研究セミナーは、10月15日に東京工業大学・大岡山キャンパスの講義室をお借りして行いました。開催に際して、東京工業大学の清水隆之さんには多大なご協力を頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。セミナーの内容としては、来年度からの運営メンバーの一新のお知らせに始まり、次期幹事の候補者である3名の方に講演していただきました。セミナーの詳しい様子は、清水さんに開催報告記事を書いて頂いたもので、そちらをご覧ください。

サイエンスアゴラは日本科学技術振興機構(JST)が主催する大規模なサイエンスコミュニケーションのイベントで、今年も東京お台場地区を中心に11月3日から6日まで開催されました(<http://www.jst.go.jp/csc/scienceagora/> 参照)。若手の会では2011年から継続して出展しています。今年も現幹事の関西学院大学の辻敬典さんが中心になり、11月5日と6日に「光合成をもっと知ろう！ー光合成が支える私たちのくらしー」と題したブース型の出展を行いました。例年よりも出展団体が多く、限られたスペースでの出展となりましたが、新しい出展の方法や成果も得られました。辻さんに出展報告記事を書いて頂いたもので、詳しくはそちらをご覧ください。

若手の会では、実年齢や身分、所属を問わず、多くの研究者の方々の積極的な参加を歓迎します。現場の研究を推進している研究者が若い気持ちで交流することは、学際性の強い光合成研究では絶対不可欠だと思います。この記事を読んで興味を持たれた方は、お気軽にご参加ください。また、ご自身の参加はもちろんのこと、周辺の方にも参加をお勧めいただきたいと思います。ご不明な点など、遠慮無く浅井(cazai@fc.ritsume.ac.jp)までお問い合わせください。



## 報告記事

サイエンスアゴラ 2016 出展報告  
「光合成をもっと知ろう！～光合成が支える私たちの暮らし～」関西学院大学 理工学部  
辻 敬典  
立命館大学 生命科学部  
浅井 智広

## サイエンスアゴラとは

サイエンスアゴラは、JST が主催する日本最大級のサイエンスコミュニケーションイベントで、高校生、大学生、研究者、サイエンスコミュニケーション団体など、様々な人々が出展し、来場者や出展者同士で交流するイベントです。サイエンスアゴラに出展する団体は年々増加しており、昨年は約 2000 団体が出展し、今年は約 2600 団体が出展しました。それに伴い、展示ブースのサイズが 1 団体あたり 2×3 m から 2×2 m に縮小されました。今回我々は、「光合成をもっと知ろう！～光合成が支える私たちの暮らし～」と題したブース展示を行ったのですが、顕微鏡観察・クロロフィル蛍光測定装置および酸素電極による光合成測定・薄層クロマトグラフィーによる色素の分離など、盛りだくさんのデモ実験を限られたスペースで行うことに苦労しました。

## 今年の展示内容

例年行っている顕微鏡観察では、光合成細菌、シアノバクテリア、緑藻、ミドリムシ、珪藻やラフィド藻など、非常に多様な光合成生物を用意しました。一次共生や二次共生による葉緑体の獲得についても説明し、「光合成生物」というグループの多様性について知ってもらいました。健康食品として話題のミドリムシや、重油相当の炭化水素をつくる緑藻ボツリオコッカスなども来場者に見てもらい、光合成生物が私たちの暮らしを豊かにするポテンシャルを持つこともアピールしました。

光合成色素の TLC による分離実験では、藻類や野菜から抽出した色素を TLC で展開し、光合成色素の多様性と普遍性について知ってもらいました。アンテナ色素は極めて多様であり、その結果として光合成生物は様々な色を呈しますが、どの植物・藻類でも、共通してクロロフィル *a* を持っていること、光捕集と反応中心における各色素の役割についても説明をしました。緑色の葉っぱの中に、緑以外の色素があることは、意外と知らない人が多いようでした。光合成生物が呈するカラフルな色の実体と、その重要性を知ってもらえたのではないかと思います。

イメージング PAM と酸素電極を使った光合成測定実験では、目に見えない光合成の反応をリアルタイムで可視化し、光の吸収から電子伝達に至るまでの過程を解説しました。イメージング PAM の原理は極めて複雑なため、来場者への説明は難しかったですが、電子伝達系の阻害剤を使うなどの工夫をし、来場者に理解してもらえるよう努めました。少なくとも、光合成が極めて複雑な物理化学的プロセスであることは理解してもらえたと思います。

スペースの都合上、昨年まで行っていた一部のデモ実験は出来ませんでした。顕微鏡観察による細胞レベルでの光合成生物の観察、次いで色素分析により光合成の初発反応を担う色素の重要性を知ってもらい、最後に PAM と酸素電極で光合成の動的過程を知ってもらうという、一連の流れのある展示が出来たのではないかと思います。

### サイエンスアゴラは試行錯誤の場

光合成学会若手の会では、サイエンスアゴラをアウトリーチ活動の試行錯誤の場として考えています。研究者として、分かりやすさだけを重視した解説ではなく、なるべく仕組みや理論まで踏み込んだ解説をすることを重視していますが、実際にアゴラに出展してみるとその難しさを実感します。また、自分が持っている光合成の知識が、狭い分野に偏りがちであることも実感しました。人にわかりやすく説明をするためには、偏った知識ではなく、光合成の全体像を捉えていることが重要だと感じました。若手研究者同士で議論し、アゴラで実践することで、研究者としてのアウトリーチ活動のあり方を確立していきたいと考えています。大学生・大学院生・若手研究者で興味を持った方は、ぜひご参加ください。



### 謝辞

東京大学 当日の運営)	榎本元、前田海成、吉野宏明、陳泰駿、遠藤嘉一郎、藤井祥、大西亜衣（事前準備、	
東京工業大学	清水隆之（光合成細菌の提供）	
岡山大学	大西紀和博士（事前準備、当日の運営）	
基礎生物学研究所	岡島圭佑（当日の運営）	
東京大学	小林康一博士（Imaging PAM および酸素電極のデモ）	
国立環境研究所	微生物系統保存施設（藻類株の提供）	以上、敬称略



## 報告記事

## 若手の会活動報告～第 13 回セミナーの開催～

東京工業大学 生命理工学研究科

清水 隆之

近々、若手の会では幹事が一新されます。そこで、今回のセミナーは「Episode XIII —A New Hope—」と題して、若手の会の新たな幹事となるメンバーが発表を行う形式でセミナーを開催しました。2016年10月15日に東京工業大学・大岡山キャンパスで開催し、29名の参加者が集まりました。

セミナーでは、招待講演と参加者全員の自己・研究紹介を行いました。招待講演では、若手の会の次世代を担うことになった新幹事メンバーの中から3名が発表を行いました。東京大学・池内研の助教である榎本元さん、神戸大学・三宅研の博士学生である嶋川銀河さん、東京工業大学・増田研の博士学生である清水隆之がそれぞれ質疑応答を含めて50分ずつ講演しました。榎本さんは、好熱性シアノバクテリアの光応答に関して、3つのシアノバクテリオクロム型光受容体が、それぞれ異なる波長の光を認識してセカンドメッセンジャーである c-di-GMP を合成/分解することで、高感度かつ厳密に光波長に依存したかたちで c-di-GMP のシグナルを制御しているといった内容の講演を行いました。嶋川さんは、藍藻における P700 酸化メカニズムの多様性に関して、3種の藍藻において光過剰の環境下で P700 酸化が PSI 光障害を防ぎ、そのメカニズムには多様性があるといった内容の講演を行いました。清水は、硫化水素依存的な光合成を制御する転写因子 SqrR の分子機構に関する講演を行いました。いずれの講演でも、若手の会の旧・現幹事メンバーの先輩方から厳しく鋭いご意見を頂き、新幹事メンバーのさらに次を担うことが期待される学生たちからも重要な質問を頂きました。特に、生化学・生理学・生態学的な幅広い観点からの非常に活発な議論が行われました。これは集まった人の研究分野の広さを反映してのことだと思いました。講演後に、参加者全員1人1人に自由な形式で自己・研究紹介をしてもらいました。セミナー終了後は、キャンパス内の生協食堂にて懇親会を行い、参加者同士の交流を深めました。

今後、若手の会は今回の講演者3名と京都大学の横山諒さんを中心に活動をしていく予定です（詳細は現会長である浅井さんから報告があると思います）。これを機に、これまで若手の会に参加されたことのない学生さんにもどんどん参加して頂けたら幸いです。特に、学部・修士課程の学生に積極的に参加して頂きたいので（もちろん博士課程の学生やポスドク以上の方々もですが）、光合成学会会員の先生方には、ご指導されている学生さんに若手の会への参加を勧めて頂けたら幸いです。また、若手の会が開催するセミナー等への参加だけでなく、運営側への参加も大歓迎ですので、自薦他薦問わず、お気軽にご連絡いただければ幸いです（清水連絡先：shimizu.t.au@m.titech.ac.jp）。



セミナー会場の様子



講演を行う榎本さん



講演を行う嶋川さん

## 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。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、会費を納入ください。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。会費納入状況などにつきましては、ご遠慮なく事務局（sonoike@waseda.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。

### ★訃報

Hans Matthijs 博士 (アムステルダム大学) が本年4月17日にご逝去されました。ご冥福をお祈りし、哀悼の意を表します。<http://ibed.uva.nl/news-events/news/content/2016/05/hans-matthijs-passed-away.html>

## 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

〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

岡山大学 異分野基礎科学研究所

高橋裕一郎 研究室内

日本光合成学会

TEL : 086-251-7861

FAX : 086-251-7876

ホームページ: <http://photosyn.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(ゼロイチキユウと入力)、当座、0730290

名前: ニホンコウゴウセイガッカイ

## 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。役員の任期は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。幹事の任期は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。

### 日本光合成学会の役員選出に関する申し合わせ

平成27年5月27日 幹事会

#### 1. 選挙管理委員会

本会の選挙を公正に実施するため、選挙管理委員会を置く。選挙管理委員2名は常任幹事会が幹事会に推薦し、決定する。選挙管理委員の互選により委員長を選出する。

#### 2. 会長〔会則第5条第6項〕

##### 1) 幹事および常任幹事による若干名の候補者の推薦方法

幹事は、会長選挙に推薦する候補者としてふさわしい会員を3名連記で投票する。投票結果が上位の会員について、常任幹事会は、本人の意向を確認した上で、若干名を推薦候補者として決定する。選挙事務は事務局長が執り行う。

##### 2) 会長選挙

会長選挙の実施に当たっては、会員に推薦候補者を提示し、全会員による単記無記名投票を実施する。最高得票者を、次期会長とする。得票数が同数の場合は、抽選により決定する。選挙事務は選挙管理委員会が執り行う。

### 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	鈴木祥弘	神奈川大学理学部
栗井光一郎	静岡大学大学院理学領域	園池公毅	早稲田大学教育学部
池内昌彦	東京大学大学院総合文化研究科	高市真一	日本医科大学生物学教室
石北 央	東京大学大学院工学研究科	高橋裕一郎	岡山大学異分野基礎科学研究所
泉井 桂	近畿大学生物理工学部生物工学科	田中 歩	北海道大学低温科学研究所
伊藤 繁	名古屋大学	田中 寛	東京工業大学資源化学研究所
井上和仁	神奈川大学理学部	田中亮一	北海道大学低温科学研究所
伊福健太郎	京都大学大学院生命科学研究所	民秋 均	立命館大学総合理工学院
白田秀明	帝京大学医学部	都筑幹夫	東京薬科大学生命科学部
榎並 勲	東京理科大学	出羽毅久	名古屋工業大学大学院工学研究科
得平茂樹	首都大学東京大学院理工学研究科	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所	輛 達也	東京理科大学理学部
大岡宏造	大阪大学大学院理学研究科	仲本 準	埼玉大学大学院理工学研究科
大杉 立	東京大学大学院農学生命科学研究科	永島賢治	神奈川大学
太田啓之	東京工業大学	成川 礼	静岡大学大学院理学研究科
	バイオ研究基盤支援総合センター	南後 守	大阪市立大学大学院理学研究科
大友征宇	茨城大学理学部	西田生郎	埼玉大学大学院理工学研究科
大政謙次	東京大学大学院農学生命科学研究科	西山佳孝	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	野口 航	東京薬科大学生命科学部
	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
小保方潤一	京都府立大学・生命環境科学研究科	林 秀則	愛媛大学プロテオサイエンスセンター
小保達男	名古屋大学大学院生命農学研究科	原登志彦	北海道大学低温科学研究所
垣谷俊昭	名古屋大学	彦坂幸毅	東北大学大学院生命科学研究所
菓子野康浩	兵庫県立大学理工学部	久堀 徹	東京工業大学研究院化学生命科学研究所
柏山祐一郎	福井工業大学環境情報学部	日原由香子	埼玉大学大学院理工学研究科
金井龍二	埼玉大学	檜山哲夫	埼玉大学
神谷信夫	大阪市立大学大学院理学研究科	福澤秀哉	京都大学大学院生命科学研究所
熊崎茂一	京都大学大学院理学研究科	藤田祐一	名古屋大学大学院生命農学研究科
栗栖源嗣	大阪大学蛋白質研究所	古本 強	龍谷大学農学部
小池裕幸	中央大学理工学部	前 忠彦	東北大学
小林正美	筑波大学大学院数理物質科学研究科	牧野 周	東北大学大学院農学研究科
坂本 亘	岡山大学資源生物科学研究所	増田真二	東京工業大学
佐賀佳央	近畿大学理工学理学科		バイオ研究基盤支援総合センター
櫻井英博	早稲田大学	増田 建	東京大学大学院総合文化研究科
佐藤公行	岡山大学	松浦克美	首都大学東京都市教養学部
佐藤直樹	東京大学大学院総合文化研究科	松田祐介	関西学院大学理工学部
佐藤文彦	京都大学大学院生命科学研究所	真野純一	山口大学農学部
鹿内利治	京都大学大学院理学研究科	皆川 純	基礎生物学研究所
重岡 成	近畿大学農学部	宮尾光恵	東北大学大学院農学研究科
篠崎一雄	理化学研究所植物科学研究センター	宮下英明	京都大学大学院地球環境学学
島崎研一郎	九州大学大学院理学研究院	宮地重遠	海洋バイオテクノロジー研究所
嶋田敬三	首都大学東京	宗景(中島)ゆり	関西学院大学理工学部
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	本橋 健*	京都産業大学総合生命科学部
杉浦昌弘	名古屋市立大学	横田明徳	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
杉浦美羽	愛媛大学プロテオサイエンスセンター	和田 元	東京大学大学院総合文化研究科
杉田 護	名古屋大学遺伝子実験施設		
杉山達夫	名古屋大学		

\*平成 28 年度より新幹事



## 編集後記

寒さ厳しきおり、いかがお過ごしでしょうか。この2年間、編集長として精一杯がんばってきました。慣れない編集作業に戸惑いつつも、私を励ましてくれたのは多くの投稿でした。若手の方を中心に実にレベルの高い原稿をたくさん受け取りました。中堅、シニアの方々からも立派な原稿をいただきました。皆さんの情熱に後押しされたように思います。執筆者の方々には、この場を借りてあらためて御礼申し上げます。次号から伊福健太郎さんが編集長を務められます。どうぞご期待ください。

田中亮一さんと柏山祐一郎さんには、第7回光合成学会シンポジウムの特集号を組んでいただきました。光合成色素は日本が誇る研究分野だと思います。この特集号を読むだけで、光合成色素の最前線をおおよそ把握することができるのではないのでしょうか。

第6回ポスター賞受賞の横山諒さんには、ご自身の研究を紹介しつつ、チラコイド膜構築に関する最新の知見を解説していただきました。見事なレビューだと思います。また、第7回ポスター賞受賞の寺村美里さんには、緑色硫黄細菌のクロロフィル合成経路に関する新たな発見を紹介していただきました。

今号に関するご意見や本誌に対するご要望がございましたら、ぜひ編集長までお伝えください。

研究紹介や解説を随時受け付けておりますので、奮ってご投稿ください。表紙の写真も募集いたしますのでよろしくお願いたします。

最後に——学生時代に感銘を受けたハイゼンベルクの『部分と全体』（山崎和夫訳、みすず書房）を最近読み返してみました。自然科学が自然との対話でもあり、人との（「偉大な出会い」との）対話でもあることをあらためて実感しました。プラトンの対話篇から脈々と続く系譜です。実用主義全盛の時代にあって、「知」を語り合い、語り継ぐことの大切さを痛感します。

編集長・西山 佳孝（埼玉大学）

## 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。書評も歓迎します。

記事の掲載を希望される方は、次期編集長の伊福健太郎（ifuku@kais.kyoto-u.ac.jp）までご連絡ください。

「光合成研究」編集委員会

編集長 西山 佳孝 (埼玉大学)  
編集委員 田中 亮一 (北海道大学)  
編集委員 伊福 健太郎 (京都大学)  
編集委員 栗井 光一郎 (静岡大学)

---

日本光合成学会 2016年度役員

会長 高橋 裕一郎 (岡山大学)  
事務局長 園池 公毅 (早稲田大学)

常任幹事 田中 歩 (北海道大学) 前会長  
常任幹事 鹿内 利治 (京都大学) 前事務局長  
常任幹事 池内 昌彦 (東京大学)  
常任幹事 野口 航 (東京薬科大学) 前編集長  
常任幹事 西山 佳孝 (埼玉大学) 編集長  
常任幹事 久堀 徹 (東京工業大学) 渉外  
常任幹事 日原 由香子 (埼玉大学) 年会2013年  
常任幹事 熊崎 茂一 (京都大学) 年会2014年  
常任幹事 柏山 祐一郎 (福井工業大学) 年会2016年  
常任幹事 杉浦 美羽 (愛媛大学) 年会2017年  
常任幹事 松田 祐介 (関西学院大学) 年会2015年  
常任幹事 鞆 達也 (東京理科大学) 光生物学協会

会計監査 伊藤 繁 (名古屋大学)  
ホームページ 加藤 裕介 (岡山大学)

光合成研究 第26巻 第3号 (通巻77号) 2016年12月31日発行

---

日本光合成学会

〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

岡山大学 異分野基礎科学研究所

高橋裕一郎 研究室内

TEL : 086-251-7861

FAX : 086-251-7876

e-mail : jspr@photosyn.jp

ホームページ : <http://photosyn.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

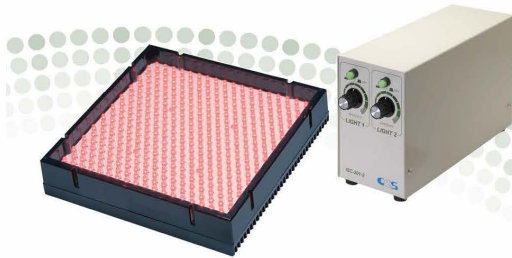
名前 : ニホンコウゴウセイガツカイ

---

# LED光による植物育成・研究支援機器

ISシリーズ

## 高光量モデル 新登場



光量や波長だけでなく、パルス発光など様々な面で光合成研究に最適な光環境を実現します。また、高光量モデルの充実化に伴い、ストレス実験などのニーズにもお応えいたします。

赤色パネルの光量を従来比約3倍に大幅アップ!

光合成量子束密度 (PPFD) 比較



赤色光(660nm) ..... 最大 1,000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>  
 青色光(470nm) ..... 最大 800 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>  
 白色光 ..... 最大 1,000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>

参考PPFD:光源パネルより100mm下にて測定

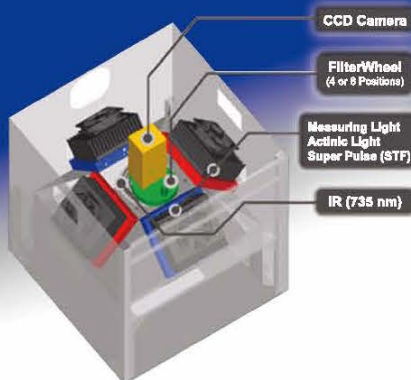
### シーシーエス株式会社

施設園芸課  
 〒602-8019 京都市上京区室町通水上ル近衛町33番地  
 TEL:075-415-2101 FAX:075-432-0101  
 URL: <http://www.ccs-inc.co.jp> / E-mail: [agri-biotech@ccs-inc.co.jp](mailto:agri-biotech@ccs-inc.co.jp)

## FluorCam 800MF

### 二次元イメージング・クロロフィル蛍光測定器

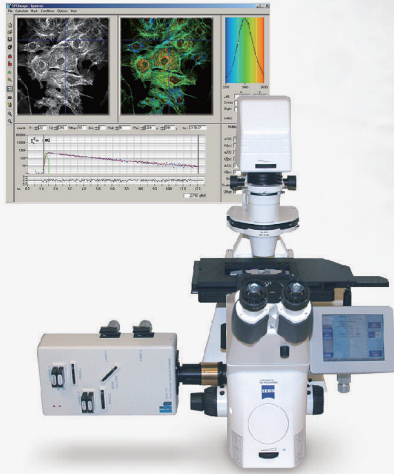
フィルターホイールを内蔵、最高8枚のバンドパスフィルターを装填可能で発光波長、検出波長を任意で切り替えが可能です。飽和光としてLEDパネルを採用、最大13cm×13cmサイズのサンプルに高輝度で均一な光を照射できます。



#### ●選択可能な光源

- ・高輝度LEDパネルの波長は任意に選択可能  
 (例: 390, 450, 470, 570, 605, 630, 735, その他任意)
- ・STFシングルターンオーバーフラッシュ
- ・高い光強度  
 励起光: 最高光強度、3,000 μmol/m<sup>2</sup>·s.  
 飽和光: 最高光強度、7,500 μmol/m<sup>2</sup>·s.





高速ガルバノスキャナーを使用した蛍光寿命イメージングシステム  
 高効率・高速測定、低価格でシステムアップグレードも可能

## 蛍光寿命イメージングシステム FLIM-DCS-120

- 時間相関単一光子計数 (TCSPC)法による蛍光寿命イメージング
- ピコ秒パルス半導体レーザー  
 405 nm, 445 nm, 473 nm, 488 nm, 515 nm, 645 nm 対応
- 励起レーザー, GaASP検出器, TCSPCモジュールは  
 最大2台まで同時搭載が可能
- 既存の共焦点顕微鏡にFLIM機能のアップグレードも可能
- FLIM, PLIM (りん光寿命イメージング), FCSに対応

**TII** 株式会社 東京インストルメンツ  
**TOKYO INSTRUMENTS, INC.**

<http://www.tokyoinst.co.jp/>

本社 〒134-0088 東京都江戸川区西葛西6-18-14 Tiビル TEL 03(3686)4711 FAX 03(3686)0831  
 大阪営業所 〒532-0003 大阪市淀川区宮原4-1-46 新大阪北ビル TEL 06(6393)7411 FAX 06(6393)7055



Mess- und Regeltechnik

### 新型ポータブル クロロフィル蛍光測定器



**Dual-PAM-100**  
P700 & Chl Fluorescence Measuring System

Simultaneous assessment of P700 and Chlorophyll Fluorescence



**MULTI-COLOR-PAM** NEW  
Multiple Excitation Wavelength  
Chlorophyll Fluorescence Analyzer

High Quality Instrumentation for Plant Sciences



**MINI-PAM-II** NEW  
Photosynthesis Yield Analyzer

Setting a New Benchmark for Photosynthesis Research in the Field

### MULTI-COLOR-PAM : 最高峰スペックでのクロロフィル蛍光解析測定

MULTI-COLOR-PAM は、これまでの PAM 製品の伝統に沿ったものです。XE-PAM PAM-100 PHYTO-PAM and DUAL-PAM の為に独自に開発された Optical Unit ED-101U と同じ光学系を用いています。MULTI-COLOR-PAM は、これら機器の主要な長所を結集したものです。例えば PAM-2500 で用いられた高時間分解能を取り入れ、かつ XE-PAM and PHYTO-PAM で採用された強い測定光の活用が採用されています。ユーザーは PAM-2500 で利用されている PamWin ソフトウェアを使うことになります。測定光・作用光・飽和パルス光 シンク・ルター・オーバー・フラッシュおよび マルティプル・ルター・オーバー・フラッシュは、それぞれ制御されることで 7つの異なる波長が利用可能になりました。MULTI-COLOR-PAM は、希釈サンプル(単細胞藻類、シアノバクテリアそして単離葉緑体)を用いた解析に最適化されています。



**ナモト 貿易株式会社**  
 〒272-0804 千葉県市川市南大野1-44-1  
 Tel: 047-338-3224 Fax: 047-338-3236  
 e-mail: mid@namoto.com  
<http://www.namoto.com>



# 長年の植物育成研究のハード&ソフトの成果を新たな発展の基盤に

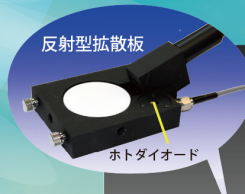


省エネ!  
植物育成に特化した  
分光分布の蛍光灯型LED  
「プラントフレック」  
を搭載!



model  
LPH-411PFD-SP

**人工気象器〈クローズド型〉**  
恒温/恒湿・恒湿 プラントフレック搭載タイプ



学術分野で、光を測定する際の標準測定器として!  
高精度・高精細な測定を可能に!  
測定を  $\mu\text{Wcm}^{-2}\text{s}^{-1}$  でも、 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  でも、%でも!  
光を瞬時に測定!

**分光放射光量子計**

**NKsystem** Bio & Clean 研究設備・機器  
**株式会社 日本医化器械製作所**  
ホームページはこちら ▶▶▶ <http://www.nihonika.co.jp>  
E-mail: [info@nihonika.co.jp](mailto:info@nihonika.co.jp)

- 本 社 〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目22番38号 ☎06-6443-0712 (代)
- 東 京 支 店 〒183-0015 東京都府中市清水ヶ丘1丁目3番地8号 ☎042-365-3245 (代)
- 札 幌 支 店 〒065-0028 札幌市東区北28条東18丁目5番5号 ☎011-786-7203 (代)
- つくば営業所 ☎029-855-7401 (代) ● 仙 台 営 業 所 ☎022-349-9525 (代)
- 福 岡 営 業 所 ☎092-611-0530 (代) ● 名 古 屋 営 業 所 ☎052-910-3275 (代)
- 広 島 出 張 所 ☎082-427-6789 (代) ● 高 松 出 張 所 ☎087-815-5105 (代)
- 羽 曳 野 工 場 ☎072-958-1919 (代)

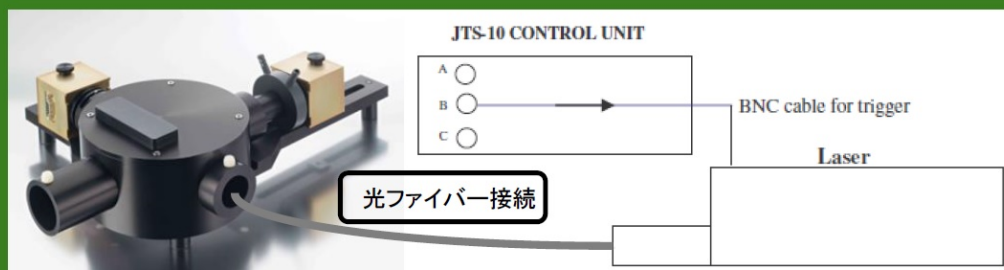
## JTS-10 光合成電子伝達反応解析装置



JTS-10 Photosynthesis Spectrometer

光学モジュールをExciting beam-Laserに変更可能です。  
精度の高いクロロフィル蛍光測定と吸光度測定が出来ます。

オプションのレーザー励起色素レーザーユニットにより早い光合成反応測定が可能になりました。  
P700他



JTS-10は安定した吸光度測定により、光化学系II以外の重要な電子伝達系の数の情報も得られます。  
温度コントロール可能なサンプルホルダーは葉だけでなく、単離葉緑体や藻類での精度良い測定も可能です。



有限会社オーリー 〒599-8112 大阪府堺市東区日置荘原寺町400-4 TEL: 072-285-0117

ホームページ: <http://www.ollie.co.jp> E-mail: [information@ollie.co.jp](mailto:information@ollie.co.jp)

世界シェアNo1の光合成基準測定システム

## LI-6400XT 植物総合解析システム

### 植物をはかる!!

光合成測定装置の決定版。植物のガス交換を直接測定することにより生理的活性を正確に把握することができます。

#### 特徴

- ・国内納入台数300台以上
- ・光・CO<sub>2</sub>・温度・湿度 フィードバック安定環境制御、環境追従制御機能
- ・ファイトロン内でのリモートWi-Fi制御できるシステム
- ・LI-6400XT内部で自動データ変換、EXCELフォーマットで記録します

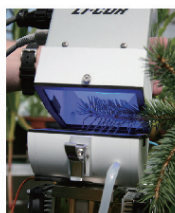


### 多彩なチャンバーアクセサリー



#### ■モデル植物個体の光合成直接測定チャンバー

シロイヌナズナの光合成活性測定を個体ごと測定することができ、ワイルドタイプとミュータントの比較を、生理的活性で行うことができます。



#### ■針葉樹などの立体状サンプルの光合成直接測定チャンバー

針葉樹など円錐型等の、立体形状の植物サンプルの光合成活性測定を行うことができます。従来は難しかったサンプルでの光合成測定ができる可能性があります。



meiwafosis.com  
メイワフォーシス株式会社

東京：〒160-0022 新宿区新宿1-14-2 KI御苑前ビル  
TEL(03)5379-0051 代 FAX(03)5379-0811  
大阪：〒558-0047 大阪市住吉区千尋 2-4-25  
TEL(06)6674-2222 代 FAX(06)6674-2323

名古屋：〒464-0075 名古屋市千種区内山 3-10-18  
TEL(052)686-4794 代 FAX(052)686-5114  
仙台：〒981-3133 仙台市泉区泉中央 3-4-1  
TEL(022)218-0560 代 FAX(022)218-0561