

解説

クロロフィル *d* を使うシアノバクテリア *Acaryochloris* の光合成と
系統発生過程の推定京都大学 大学院 地球環境学堂
宮下英明

はじめに

Acaryochloris (アカリオクロリス) は、クロロフィル *d* (以降Chl *d*と略記) を主要色素とする単細胞のシアノバクテリアである。パラオの群体ホヤ (*Lissoclinum patella*) 内に存在する微細藻類の1つとして分離され、1996年に報告された¹⁾。この生物は、Chl *d*が天然に存在すること、およびChl *d*が光合成に寄与することを初めて示した。同時に、Chl *b* やChl *c* を利用する他の光合成生物と異なり、Chl *d* というChl *a* よりエネルギー準位の低い色素をアンテナ色素として使用しているばかりでなく、少なくとも光化学系 I においては反応中心色素としても利用するという極めて特異な機能を獲得している。このことから、*Acaryochloris*の系統発生過程の解明は、単にシアノバクテリアのChlの多様化メカニズムの解明にとどまらず、酸素発生型光合成初期過程の柔軟性を考える上で非常に重要である。本稿では、*Acaryochloris*研究を概観し、*Acaryochloris*の系統発生

過程、つまりChl *d* を利用する光合成の成立過程の解明に関する今後の課題を考えてみた。

Acaryochloris とは？

*Acaryochloris*は、緑色の単細胞のシアノバクテリアである (図1)。培養液の色は、通常のシアノバクテリアにみられる藍色よりは、むしろ、クロレラやクラミドモナスなどの培養液の色に近い。これは *Acaryochloris*が、Chl *d*を主要色素としてもち、フィコビルリンをほとんどもたないことに由来する (注1)。一般に、Chl *a*、Chl *b*、Chl *c*がそれぞれ、青緑色、黄緑色、緑黄色に見えるのに対して、Chl *d*は、Chl *a*とChl *b*の中間的な色で、lawngreen (芝色) あるいはchartreuse (シャトルーズ色、明るく薄い黄緑色) に近い。このため、培養液の色は、緑藻類の培養液によく似ている。

細胞は楕円球状で、チラコイドは、細胞内膜に沿って同心円状に存在する (図2)^{1,2)}。それぞれのチ

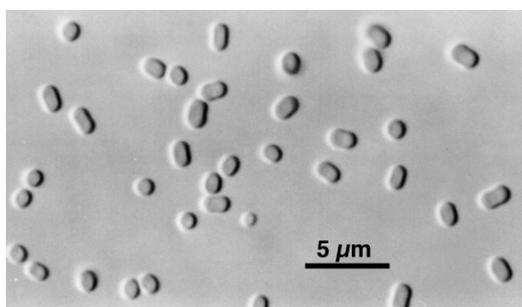
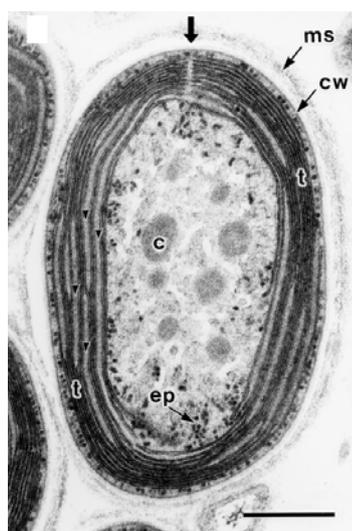


図1 *Acaryochloris marina* MBIC11017 の光学顕微鏡写真



t: チラコイド
cw: 細胞壁
ms: 細胞外多糖
c: カルボキシソーム
ep: 高電子密度粒子
矢印: ピンホール
矢尻: フィコビルリン凝集部
スケール: 0.5 μm

図2 *Acaryochloris marina* MBIC11017 のチラコイド構造

ラコイド膜上には、シアノバクテリアに特徴的なフィコビリゾームが存在しない。このためチラコイドは、互いに接している。チラコイドの数は通常 6-10 程度である。部分的にチラコイド同士が接していない場所が存在する (図2 矢尻)。これらのチラコイド間には、フィコビル色素が局在している³⁾。フィコビル色素は、フィコシアニンとアロフィコシアニンで構成され、通常シアノバクテリアフィコビリゾームにみられるロッドと同様の構造をしている⁴⁾。このフィコビル色素からのエネルギー伝達は、非常に効率よく行われている⁵⁾。しかし、このロッド構造体がどのようにチラコイド膜に結合し、また、凝集体としてどのように存在しているか、局在がどのように決まるのかなどについては、今のところ不明である。

Acaryochloris のチラコイド構造に見られる特徴の 1 つは、接した同心円上のチラコイドを細胞膜の内側から細胞質の中心部に貫通するピンホールが存在することである (図2 矢印: Marquardtらはchannel-like 構造と呼んでいる)²⁾。いまのところ、このピンホールの役割は不明である。細胞内部で合成されたタンパク質や多糖などを細胞の中心部からチラコイドの外側へ、あるいは、細胞外から取り込まれた物質を細胞の中心部へ輸送する“道”である可能性も考えられるが、憶測にすぎない。このような構造は他のシアノバクテリアには観察されていない。チラコイドが細胞膜に接する電子顕微鏡像は観察されていない。

Acaryochloris の細胞壁構造は、通常シアノバクテリアと同様、L I~L IV の 4 層からなっている (図3)。通常、細胞外に粘質物質(ms)を分泌しているため、培養容器の壁面に付着し、バイオフィルムを形成しやすい。同時に、細胞同士が凝集しやすい性質をもつ。MBI に保存されている *Acaryochloris* 8 株の中 2 株についてはこの性質をもたず、完全に分散する。

注1) *Acaryochloris marina* MBIC 11017 株は、採取・培養に成功したときに比べフィコビルン含量が大きく増大している。これは、長い間、この株が、蛍光灯下で継代培養されて、保存されてきたことに起因すると考えられる。MBI に保存されている *Acaryochloris* 株の中で唯一この株だけが突出したフィコビルン含量になっている。

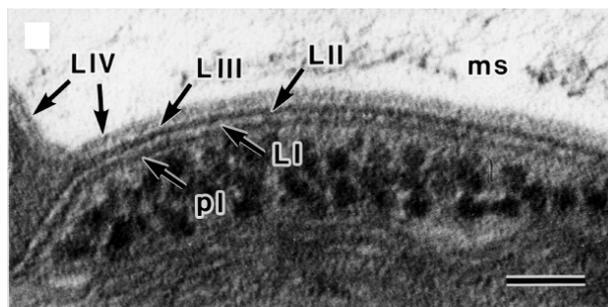


図3 *Acaryochloris marina* MBIC11017 の細胞壁および細胞外多糖
pl: 細胞膜、L I-L IV:細胞壁層、ms:細胞外多糖、
スケール: 0.5 μm

Acaryochloris の分布と多様性

最初の分離株である *A. marina* MBIC11017 は、パラオの群体ホヤ体内から分離された。その後、幾つかの *Acaryochloris* 株が、パラオの群体ホヤから分離された。結果的にはこのことが、「*Acaryochloris* は共生生物である」という認識を与え、*Acaryochloris* の分布や生態の理解に一時的な誤解を与えた原因かもしれない。

Chl *d* は、そもそもさまざまな紅藻類から微量に検出される緑色色素として報告されていた⁶⁾。しかし、筆者は、*A. marina* の分離以降も、紅藻から Chl *d* を検出することができず、*Acaryochloris* が生産する Chl *d* と紅藻類に報告されてきた Chl *d* の存在との直接的な結びつきを見いだせずにいた。しかし、村上明男氏 (神戸大) が、淡路島沿岸の海藻から Chl *d* を検出し、Chl *d* が紅藻自体ではなく、紅藻の表面に付着するシアノバクテリアによって生産されていることを見出した⁷⁾。そこで、紅藻から Chl *d* を生産するシアノバクテリアを分離することになったのであるが、幸いにもこれまでの分離経験が大いに役に立った。紅藻の表面には、シアノバクテリアを含む様々な藻類が付着しており、培養を試みた際にもさまざまな微細藻類が出現した。その中に、見慣れた *Acaryochloris* のコロニーが存在したのである。上述のように *Acaryochloris* はバイオフィルムを形成する傾向があること、細胞が凝集塊を形成しやすいこと、また、走光性をもっているため、培養ウェルの底に、光の方向にむかって細長い特殊な形態のコロニーを形成する (図4)。また、コロニーの色も、黄緑色で、他と区別可能であったことから、このコロニーを顕微鏡下で採取することによって培養株を得ることがで

きた。紅藻から分離されたこのシアノバクテリアの色素組成は、*A. marina*の特徴的な組成と一致した。また、*A. marina*の16SrDNA配列との相同性が99.0%あり、*A. marina*とほぼ同種と考えられることからこの株を*Acaryochloris* sp. Awaji-1と呼んでいる⁷⁾。この発見によって、紅藻類から検出されてきたChl *d*が、紅藻に付着する*Acaryochloris*によって生産されていること、同時に、Chl *d*を生産する生物が、*Acaryochloris*属のシアノバクテリアに限られることが明らかとなった。また、Chl *d*が世界各地の紅藻類から報告されていることから*Acaryochloris*が世界各地の沿岸に広く分布することも容易に類推可能となった。さらに、最近、カリフォルニアのSalton湖(4.1-4.5%の塩湖)の微生物マットの中から自由生活のChl *d*生産株がみいだされ、99.2%の16SrDNA配列相同性をもつ*Acaryochloris* sp.であることが報告されている⁸⁾。この株も、*A. marina* MBIC11017株および、*Acaryochloris* sp. Awaji-1株と同じ色素組成を有している。また、Kuhlらは、*Acaryochloris*が群体ホヤ本体内だけではなく、群体ホヤの被囊の下(つまり、ホヤが付着している基質とホヤの間)にもバイオフィームとして存在していることを報告しており、*Acaryochloris*が共生生物とは限らないことを指摘している⁹⁾。これらのように、*Acaryochloris*が単に共生生物ではなく、付着生物として、あるいは、自由生活生物として広く分布していることがわかってきた。

我々の最近の分子微生物生態学的手法を用いた研究では、*Acaryochloris* がパラオ沿岸の群体ホヤ体内外だけでなく、日本および世界各地の沿岸に分布すること、種あるいは属レベルで異なる幾つかの遺伝子型の*Acaryochloris*近縁生物がいること、遺伝子配列から*Acaryochloris*と通常のシアノバクテリアをつなぐ中間的な生物が存在するだろうことも示唆されている。ただ残念ながら、これまでに培養に成功しているものは極一部の遺伝子型をもつものに過ぎない。現状の*Acaryochloris*の表現形質にとらわれずに、今後もさまざまな方法を駆使して分離・培養を続けることによって、さらなる*Acaryochloris*の分布や多様性を明らかにしてゆきたいと考えている。

*Acaryochloris*の光化学系

*Acaryochloris*がもつクロロフィルの95%以上はChl

*d*である¹⁰⁾。図5は、*Acaryochloris*の光化学系におけるクロロフィル配置の模式図である。*Acaryochloris*におけるクロロフィルタンパク質複合体には、光化学系I反応中心タンパク質(PsaA, PsaB)、光化学系II反応中心タンパク質(PsbA(D1), PsbD(D2))、光化学系IIコアアンテナ(PsbC(CP43), PsbB(CP47))、光化学系IのペリフェラルアンテナのChl*d*結合型PcbA/C、および鉄欠乏によって光化学系II粒子の周辺に誘導されるChl*d*結合型PcbA/Cが知られている¹⁰⁻¹³⁾。*Acaryochloris*では、通常のシアノバクテリアにおいてChl *a*が結合しているこれらクロロフィルタンパク質のアミノ酸配列の変異が激しく、複合体内のクロロフィルが、ほぼすべて、Chl *d*に置き換えられている。

Chl *d*以外のクロロフィルには、Chl *a*、フェオフィチン(Pheo) *a*、Chl *d'*、Mg-DVPが検出されている。これらのマイナークロロフィルについては、培養条件を変えても、それぞれ化学量論的に意味ある量存在しており、それぞれが重要な意味をもっていると考えられる¹⁴⁻¹⁸⁾。このうち、Pheo *a*については光化学系IIのアクセプター、Chl *d'*についてはPSIの反応中心色素として存在していると考えられる。微量のChl *a*も常に意味ある量存在していることから、Chl *a*が依然として何らかの重要な役割を果たしていることがわかる。現在、その重要な役割を光化学系IIの反応中心色素と推測している^{16, 19-20)}。この推測は、遅延蛍光分光分析や色素配置の法則性などに基づいている。しかし、光化学系I精製標品のHPLC分析から光化学系Iにも1分子のChl *a*が結合してい

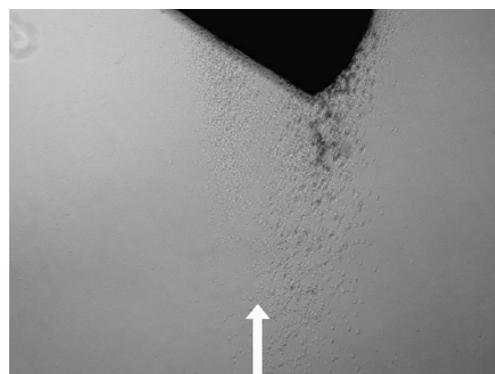


図4 海藻から分離した際の*Acaryochloris* sp. のコロニー形成
(矢印は光の方向、上の物体は海藻断片)

る可能性があることや、光化学系IIの反応中心色素については、Chl *a/d*のヘテロ2量体¹⁸⁾、あるいは、Chl *d* 2量体²¹⁾であることも示唆されている。あるいは、それらのどの組合せもとりうる可能性もあるのかもしれない。*Acaryochloris*におけるChl *a*の所在については、精製光化学系II標品の色素分析や分光学的手法等によって解明されるものと期待される。また近年、チトクロム*b₆f*複合体にクロロフィルが結合していることが示されたが²²⁾、*Acaryochloris*のチトクロム*b₆f*複合体にクロロフィルが結合しているかどうか、また、どのクロロフィルが結合しているかについてはまったくわかっていない。これらマイナークロロフィルの所在は、*Acaryochloris*のエネルギー伝達様式の全容解明および*Acaryochloris*の系統発生の仕組みを理解する上で重要な課題である。

Acaryochloris の系統進化過程解明の課題

これまでに分離・解析された*Acaryochloris*株は 16S rDNAの相同性の上でほぼ同属内の生物種と考えられる。分子系統解析結果は、*Acaryochloris*生物群が、シアノバクテリア全体の中でかなり深い位置から分岐していることを示唆している^{7, 8, 23)}。Millerらは、*Acaryochloris*系統群が、*Acaryochloris*の 16S rDNA配列に最も近い配列をもつシアノバクテリア *Synechococcus* sp. IR11 株 (河地正伸氏 (国立環境研究所) が南西諸島のタイドプールで分離した株) か

ら分岐したと仮定すると、25 億年前頃に通常のシアノバクテリアから分岐したと推計できることを報告している⁸⁾。この分岐予測ならびに分子系統解析結果などから、*Acaryochloris*系統群が通常のシアノバクテリアから分岐したのは、比較的古いイベントであった可能性が高い。

Acaryochloris は、生体内において、Chl *d*が青色光に加えて吸収する 680nm-750nm 付近の赤色光を利用することが生存に有利な環境において選択されてきたものと考えられる。実際、*Acaryochloris* は、730nm 付近をピークとする近赤外単色光 (LED 光源) 下でも、十分に光独立栄養生育することができる。また、ほぼ全ての *Acaryochloris* 分離株が、他の光合成色素との光競合環境から分離されていることから、Chl *d*を利用することによって種の維持が図られてきたものと考えられる。*Acaryochloris* がシアノバクテリアとの共通祖先から派生したことはほぼ間違いないことから、*Acaryochloris* は、そもそも Chl *a*とフィコビル色素を利用して光合成を行っていた祖先生物が、まず Chl *d*合成能を獲得し、次に、選択 (淘汰) の過程で、クロロフィルタンパク質にもともと存在していた Chl *a*を Chl *d*に置き換えたものが生残し、結果的に Chl *d*を用いる光合成系を獲得したものと考えられる。

上述のような系統発生・選択過程が成立するためには、1) Chl *d*の合成能を獲得しChl *d*を生産でき

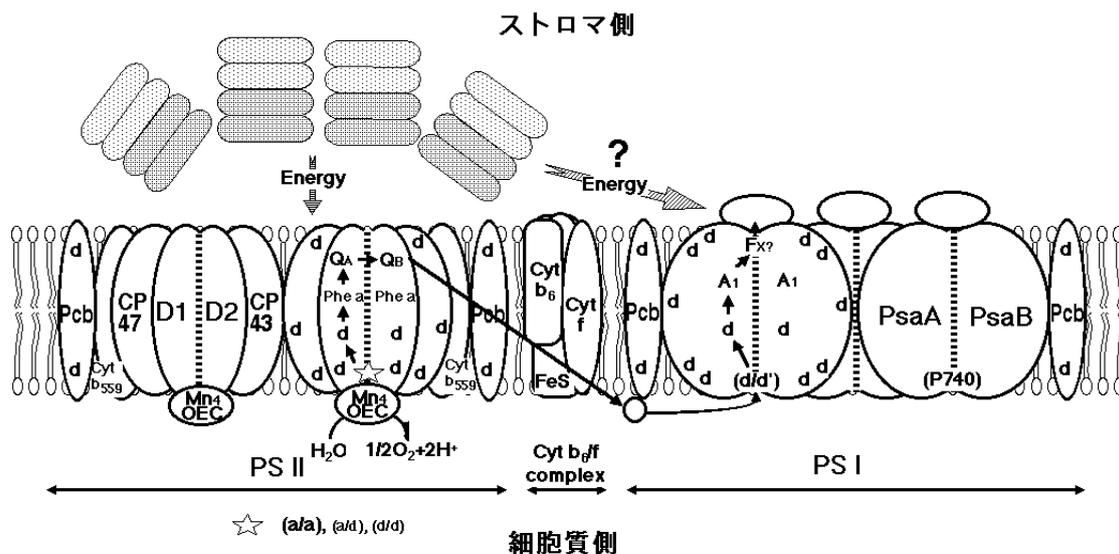


図5 *Acaryochloris* の光化学系におけるクロロフィル配置の模式図

るようになること、2) Chl *d*をアンテナ色素あるいは反応中心色素としてタンパク質内に挿入されること、3) 挿入されたChl *d*がアンテナあるいは反応中心として機能し淘汰に有利な条件をそなえること、が不可欠である。1)については、おそらく並行移動による遺伝子の獲得、あるいは、一部の内在酵素の基質選択性の変異等によって起こったもの考えることができる。これについてはいずれChl *d*合成遺伝子が明らかにされることによって説明することが可能になるであろう。2)についてはすでに、Tomoらが、ホウレンソウの光化学系II反応中心複合体にChl *d*を挿入することが可能であること、また、置換した光化学系II反応中心複合体においてPheo *a*が還元されることを示している²⁴⁾ことから、アンテナタンパク質あるいは反応中心タンパク質においてChl *a*がChl *d*に置き換わることは比較的容易であることがわかる。3)については、結果的に*Acaryochloris*が成立し、少なくとも光化学系Iにおいては反応中心色素としてもChl *d*を用いていることから、機能することは間違いない。

しかし、いったいそのChl *d*への置換は、どのような過程で行われたのであろうか？ Chl *a*へのエネルギー移動が容易なクロロフィルについては、アンテナ色素として利用することは可能である。これは、Satohらによる*Synechocystis*PCC6803 へのCAO遺伝子導入により示されている²⁵⁾。しかし、Chl *d*は、Chl *a*よりエネルギー準位が低く、溶媒系においては、Chl *d*からChl *a*へのエネルギー移動が容易に起こらないことが唆されている²⁶⁾。このためChl *a*へのエネルギー移動は、アップヒル機構に頼らざるを得ない。この点は、*Prochloron*や*Prochlorothrix*などのようにChl *b*をアンテナ色素として利用するケースと大きく異なる点である。

例えば、少なくともChl *d*を用いた光化学系Iの獲得には、まず、反応中心色素の置換が先だったのではないだろうか？ 反応中心がChl *d*に置換されてしまえば、アンテナ色素としてChl *a*を使うことに問題ないであろう。あとはChl *a*であろうが、Chl *d*であろうが単に生存に有利なアンテナ色素が選択されるにすぎない。あるいは、アンテナクロロフィルをChl *d*に置換してゆくさいに、効率的なアップヒルのエネルギー伝達機構を獲得したのであろうか？

このような筆者の邪推を明らかにしてゆくためには、Satohらの進化再現実験のようにChl *d*合成遺伝子を分離し細胞内でChl *d*を合成させることによって、合成されたChl *d*の挙動を観察することが役に立つであろう。また、Tomoらの実験のようにChl *a*を用いる光化学系反応中心のクロロフィルの部分置換を行いエネルギー移動過程を解析することも有効な知見を与えることになるのであろう。また、例えば*Acaryochloris*の光化学系のアンテナクロロフィルをChl *a*に置換し、エネルギー移動がおこり、反応が進むかどうかを検証してみるのも面白いかもしれない。

これらの検討は、単に*Acaryochloris*の系統発生機構を考える進化的な考察のみに留まらず、Chl *a*をChl *d*に置き換える際にクリアしなければならない最低限のハードル（反応が進むかどうか）を明らかにすること、さらには、光合成のクロロフィルの多様化メカニズムの解明、同時に光化学系タンパク質のChl選択性やその柔軟性を考えることと同義である。*Acaryochloris*はそれに貢献できる生物であると考えている。

ゲノム解析への期待

*Acaryochloris*は、Chl *d*を利用して光合成を行う唯一の生物である。近年、三室・宮下研究室とアリゾナ州立大学のBlankenship氏の研究室との共同でNSFのサポートのもと、ゲノム解析を行っている²⁷⁾。*Acaryochloris*がどのように系統発生したかを含め、ゲノム解析によってさまざまな情報が得られることを期待している。

文献

- 1) Miyashita H, Ikemoto H, Kurano N, Adachi K, Chihara M, Miyachi M. (1996) *Nature* 383: 402.
- 2) Marquardt J, Morschel E, Rhiel E, Westermann M. (2000) *Arch Microbiol.* 174: 181-8.
- 3) Hu Q, Marquardt J, Iwasaki I, Miyashita H, Kurano N, Morschel E, Miyachi S. (1999) *Biochim Biophys Acta.* 1412: 250-61.
- 4) Marquardt J, Senger H, Miyashita H, Miyachi S, Morschel E. (1997) *FEBS Lett.* 410: 428-32.
- 5) Miyachi S, Strassdat K, Miyashita H, Senger H.

- (1997) *Naturforsch.* 52c: 636-638.
- 6) Manning WM, Strain HH. (1943) *J. Biol. Chem.* 151: 1-19.
- 7) Murakami A, Miyashita H, Iseki M, Adachi K, Mimuro M. (2004) *Science* 303: 1633.
- 8) Miller SR, Augustine S, Le Olson T, Blankenship RE, Selker J, Wood AM. (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 850-855.
- 9) Kuhl M, Chen M, Ralph PJ, Schreiber U, Larkum AW. (2005) *Nature* 433: 820.
- 10) Miyashita H, Adachi K, Kurano N, Ikemoto H, Chihara M, Miyachi M. (1997) *Plant Cell Physiol* 38: 274-281.
- 11) Hu Q, Miyashita H, Iwasaki I, Kurano N, Miyachi S, Iwaki M, Itoh S. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13319-13323.
- 12) Chen M, Bibby TS, Nield J, Larkum AW, Barber J. (2005) *FEBS Lett.* 579: 1306-1310.
- 13) Chen M, Bibby TS, Nield J, Larkum AW, Barber J. (2005) *Biophys Acta.* 1708: 367-374.
- 14) Akiyama M, Miyashita H, Kise H, Watanabe T, Miyachi S, Kobayashi M. (2001) *Anal Sci.* 17: 205-208.
- 15) Akiyama M, Miyashita H, Kise H, Watanabe T, Mimuro M, Miyachi S, Kobayashi M. (2002) *Photosynth Res.* 74: 97-107.
- 16) Mimuro M, Akimoto S, Gotoh T, Yokono M, Akiyama M, Tsuchiya T, Miyashita H, Kobayashi M, Yamazaki I. (2004) *FEBS Lett.* 556: 95-98.
- 17) Akiyama M, Gotoh T, Kise H, Miyashita H, Mimuro M, Kobayashi M. (2004) *Jpn. J. Phycol.* 52 (suppl): 67-72.
- 18) Kobayashi M, Watanabe S, Gotoh T, Koizumi H, Itoh Y, Akiyama M, Shiraiwa Y, Tsuchiya T, Miyashita H, Mimuro M, Yamashita T, Watanabe T. (2005) *Photosynth Res.* 84: 201-207.
- 19) Mimuro M, Akimoto S, Yamazaki I, Miyashita H, Miyachi S. (1999) *Biochim Biophys Acta.* 1412: 37-46.
- 20) Mimuro M, Hirayama K, Uezono K, Miyashita H, Miyachi S. (2000) *Biochim Biophys Acta.* 1456: 27-34.
- 21) Razeghifard MR, Chen M, Hughes JL, Freeman J, Krausz E, Wydrzynski T. (2005) *Biochemistry* 44: 11178-11187.
- 22) Berry EA, Huang L-S, Saechao LK, Pon NG, Valkova-Valchanova M, Daldal F. (2004) *Photosynth. Res.* 81: 251-275.
- 23) Miyashita H, Ikemoto H, Kurano N, Miyachi S, Chihara M. (2003) *J. Phycol.* 39: 1247-1253.
- 24) Tomo T, Hirano E, Nagata J, Nakazato K. (2005) *Photosynth Res.* 84: 77-83.
- 25) Satoh S, Ikeuchi M, Mimuro M, Tanaka A. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 4293 - 4297.
- 26) Nieuwenburg P, Clarke RJ, Cai ZL, Chen M, Larkum AW, Cabral NM, Ghiggino KP, Reimers JR. (2003) *Photochem Photobiol.* 77: 628-37.
- 27) Phototrophic Procaryotes Sequence Projects, <http://genomes.tgen.org/index.html>