

解説

ラン藻のテトラピロール生合成系の嫌気環境適応と進化的視点[‡]

名古屋大学 大学院 生命農学研究科
青木 里奈、藤田 祐一*

1. はじめに

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

され嫌気環境にさらされる³⁾。このように、ラン藻の生育環境は酸素レベルという観点で非常に多様である。酸素分子（O₂）は有用な電子受容体として呼吸で用いられているほか、多くのオキシゲナーゼ反応で使われ、生物の代謝ネットワークの多様化に大きく寄与している⁴⁾。嫌気環境では酸素に依存したさまざまな代謝が酸素不足のために停滞するかもしれない、ラン藻は嫌気環境に応答した何らかの適応機構を有することが想定される。しかし、ラン藻は、光合成により自らO₂を発生する生物であるため、嫌気的環境を要求する窒素固定という観点以外での嫌気環境適応についての知見は乏しかった。

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

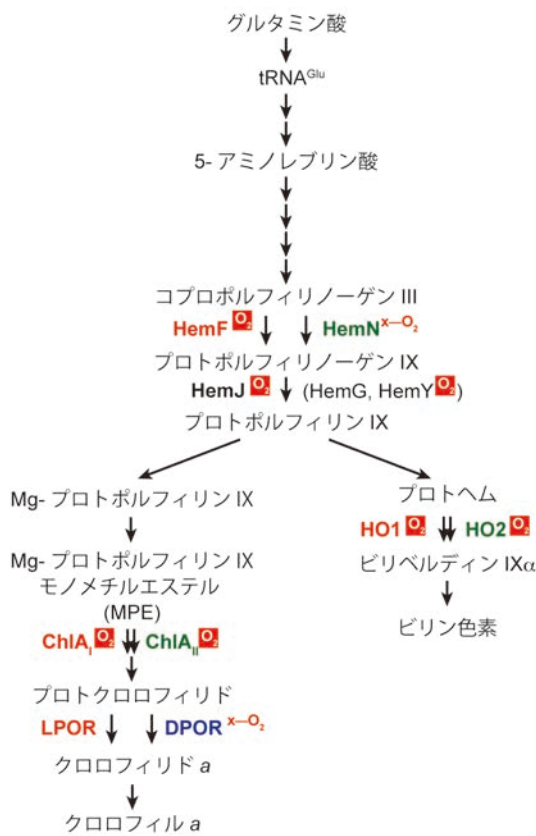


図1 ラン藻のテトラピロール（クロロフィル・ビリル）生合成系

主要な中間体名のみ記す。本論文で言及している反応に関与する酵素のみを記載した。ビリベルディンIX_α以降の生成物は、ビリル色素とのみ記載している。複数の酵素が関与している段階は2つの矢印で示し、離れた2つの矢印は構造的に類縁性のない2つの酵素の関与を、重なった2つの矢印は2つのアイソフォームの関与を表している。また、主に好気条件で唯一の酵素として機能する酵素を赤、主に微好気条件で機能し、転写が低O₂で誘導される酵素を緑、主に微好気条件で機能するが発現がO₂レベルで変化しない酵素を青色で示した。あわせて、反応にO₂を要求するO₂依存型酵素は赤い背景で白字のO₂を、酵素がO₂によって容易に不活性化されてしまうO₂感受性酵素は“x-O₂”を付して表している。なお、プロトポルフィリノーゲンIXをプロトポルフィリンIXに変換する酵素PPOについては、*Synechocystis* 6803ではHemJのみを有するため、好気型・嫌気型という機能分化は認められない。ただし、*Gloeobacter violaceus* PCC7421のみHemJとHemYを有するので、このラン藻では何らかの機能分化が推察される¹³⁾。

[‡] 解説特集「光合成を支えるテトラピロール代謝の多様性」

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

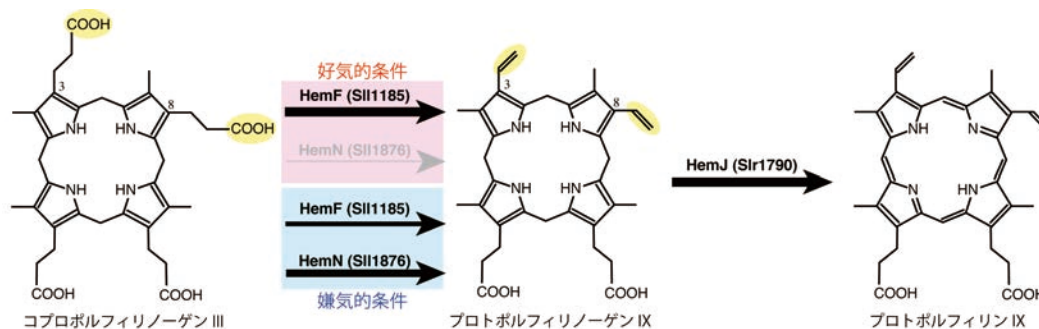


図2 コプロポルフィリノーゲンIII酸化・プロトポルフィリノーゲンIX酸化反応

コプロポルフィリノーゲンIII酸化反応において、HemFでは、O₂が電子受容体となる。HemNでは、S-アデノシルメチオニンの還元により生成する5'-デオキシアデノシルラジカルによって反応が進行する。*Synechocystis* 6803では、好気条件ではHemFが唯一のCPOとして機能し、嫌気条件ではHemNがHemFと同等に機能すると推定される。プロトポルフィリノーゲンIX酸化反応によって、共鳴構造をもつポルフィリン環が形成される。*Synechocystis* 6803では、PPOはO₂依存型酵素HemJ単独であると推定される¹³⁾。

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

2. 好気型酵素と嫌気型酵素の併存

テトラピロール色素にはクロロフィル、ヘム、ビリル色素などが含まれ、光合成や呼吸など生体内の様々な反応に関与している。これらの生合成経路は、グルタミン酸からプロトポルフィリンIXまでの共通経路を共有する19段階以上の酵素反応から構成されている⁹⁾が、そのうち少なくとも4段階の反応で基質としてO₂を要求する(図1)。したがって、これらの反応は、嫌気環境下ではO₂不足のため反応が滞ってしまうことが想定される。逆に、好気環境ではO₂によって不活性化される酵素も存在する。このため、*Synechocystis* 6803などのラン藻は、これらの反応に対し、好気環境下で主に機能する好気型酵素と嫌気環境下で主に機能する嫌気型酵素を併存させ、それらを環境のO₂レベルに応じて使い分けることによって多様なO₂レベルの環境に適応していることが明らかにされてきた。以下、*Synechocystis* 6803のテトラピロール生合成においてO₂が反応に関与する酵素とその機能分化について順に述べる。

2-1. コプロポルフィリノーゲンIII酸化反応

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

が酸化的脱炭酸によりビニル基に変換されてプロトポルフィリノーゲンIXが生成する。この反応を触媒するCPgen酸化酵素(CPO)として、進化的類縁性のない2つの酵素HemFとHemNが知られている。HemFは、モノオキシゲナーゼファミリーに属する酵素であり、O₂を電子受容体とする酸化反応を行う。一方、HemNは、O₂に依存せずにこの反応を触媒し、正確にはCPgen脱水素酵素と称すべき酵素である¹⁰⁾。HemNは、ラジカルSAMとよばれる大きな酵素ファミリー¹¹⁾に属し、反応中心として[4Fe-4S]型鉄硫黄クラスターを保持し、O₂にさらされると急速に不活性化されてしまう高い酸素感受性を示す。*Synechocystis* 6803のゲノムには、HemFとHemNをコードすると推定される遺伝子 *sll1185* と *sll1876* が存在する。私たちは、これらSll1185、Sll1876を大腸菌で発現させ、その精製タンパク質においてどちらもCPgen酸化活性を有することを確認した⁶⁾。

Synechocystis 6803におけるこれら2つの酵素の機能分化を検討するため、2つのCPOの欠損株 ($\Delta hemF$ 、 $\Delta hemN$) を単離した。これら欠損株の形質解析から、好気環境下ではHemFが唯一のCPOとして機能しており、嫌気環境下ではHemFとHemNがほぼ同等の寄与でCPgen酸化反応を行っていることが示唆された(図2)。HemFは、嫌気環境下では基質であるO₂レベルが低下するため、活性が大きく低下するはずであるが、光合成で発生する内生のO₂を基質として反応を行っていると考えられる。

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

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

2-2. プロトポルフィリノーゲンIX酸化反応

CPOによって生じたプロトポルフィリノーゲンIXは、プロトポルフィリノーゲンIX酸化酵素 (PPO) により酸化され共通経路の最終産物プロトポルフィリンIXに変換される。PPOとして、これまでO₂を電子受容体とするO₂依存性PPO (HemY) とO₂非依存性PPO (HemG) が知られていたが¹²⁾、これらに加えてO₂依存性PPOとして最近*Synechocystis* 6803から新たにHemJ (Slr1790) が同定された¹³⁾。ほとんどのラン藻はこれら3つの異なるPPOのうち1つだけを有し、その分布はモザイク状である¹³⁾。なお、*Synechocystis* 6803の*hemJ*は、後述する転写因子ChlRの制御下になく、構成的に発現している (青木、未発表データ)。

2-3. Mg-プロトポルフィリンIXモノメチルエステル環化反応

Mg-プロトポルフィリンIXモノメチルエステル (MPE) 環化反応では、クロロフィルに特有の5番目の環状構造E環が形成される (図3)。この反応を触媒する酵素は、MPEシクラゼと呼ばれ、E環形成によりMPEをプロトクロロフィリドに変換する。光合成細菌 *Rubrivivax gelatinosus* においてO₂依存的なE環形成に関わる遺伝子として *acsF* (aerobic cyclization

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

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

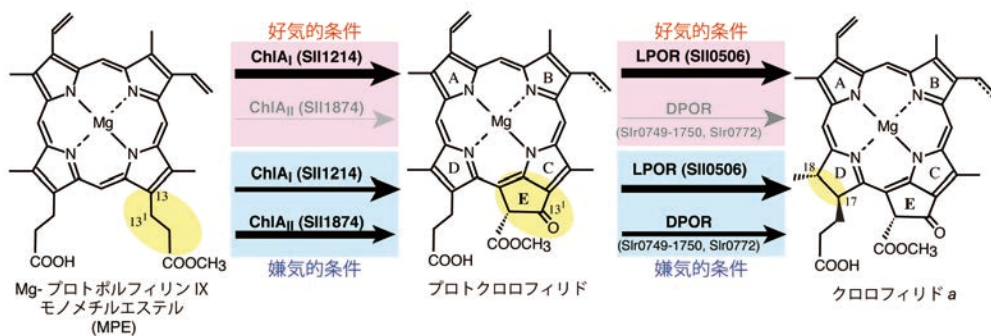


図3 E環形成・D環還元反応

クロロフィル特有のE環は、C13位のプロピオン酸メチルの環化反応によって形成され、その際C13'位にオキシ基が導入される。このオキシ基の酸素原子は、好気型酵素 ChlA と嫌気型酵素 BchE ではそれぞれ O₂ と H₂O と由来が異なる。*Synechocystis* 6803は、好気型酵素 ChlA のみをもち、そのアイソフォーム ChlA_I と ChlA_{II} を環境の O₂ レベルに応じて使い分けている。Pchlide還元では、D環C17=C18二重結合が立体特異的に還元され、クロロフィルaの直接の前駆体クロロフィリドaが生成する。なお、8位のビニル基は、Pchlideまたはクロロフィリドaの段階でエチル基に還元されるため、ここでは特定していない。

る。*Synechocystis* 6803 には BchE と有意な相同性を示すタンパク質をコードする3つの遺伝子 (*slr0905*、*slr1242*、*slr0309*) が認められるが、これらの欠損株を用いた生理学的解析では、これらがラン藻細胞内でMPE環化反応に関与しているという証拠は得られなかった。したがって、*Synechocystis* 6803ではMPE環化反応は完全にO₂依存型酵素ChlA_I/ChlA_{II}に依存していると考えられる⁵⁾。

なお、MPE環化反応は、ChlAについてもBchEについてもいまだに精製タンパク質で酵素活性が再構成された例がない。植物における酸素依存型MPE環化反応は、可溶性画分と不溶性画分の両方とNADPHが活性に必要とされ¹⁶⁾、2-CysペルオキシレドキシニンとNADPHチオレドキシニン還元酵素C (NTRC) が活性を促進する¹⁷⁾。一方、BchEについては、*Rhodobacter capsulatus*の細胞を使った*in-vivo*アッセイによりMPEシクラーゼ活性がビタミンB₁₂またはアデノシルコバラミンに依存することが示されているのみである¹⁸⁾。極端に言う、ChlAやBchEがMPEシクラーゼ酵素の本体であるのかどうかははっきり示されていないのが現状である。E環形成は、クロロフィル生合成において生化学的研究が最も困難な反応の一つである。

2-4. プロトクロロフィリド還元反応

MPEシクラーゼにより生成したプロトクロロフィリド (Pchl_{id}) は、Pchl_{id}還元酵素によりD環 (C17=C18二重結合) が立体特異的に還元され、クロロフィリド_aとなり、環構造がポルフィリン環からクロリン環へ変換される¹⁹⁾。Pchl_{id}還元酵素として光依存型Pchl_{id}還元酵素 (LPOR) と光に依存しない暗所作動型Pchl_{id}還元酵素 (DPOR) が存在する。DPORは、ニトロゲナーゼと進化的起源を共有し、互いに類似した構造と反応機構をもつ²⁰⁾。DPORはニトロゲナーゼと同様にO₂に曝されると急速に不活性化されるという特徴を示す。一方、LPORは、短鎖脱水素酵素/還元酵素ファミリーとよばれる大きなピリジンヌクレオチド依存性酵素群に属し、O₂耐性をもつ一方、反応自体に光を要求するという特異な特徴をもつ²¹⁾。ラン藻ではこれら2つの酵素が併存しており、環境の光とO₂レベルによって機能分化している²²⁾。ただし、これらの酵素系遺伝子の発現はChlRに制御されていない。

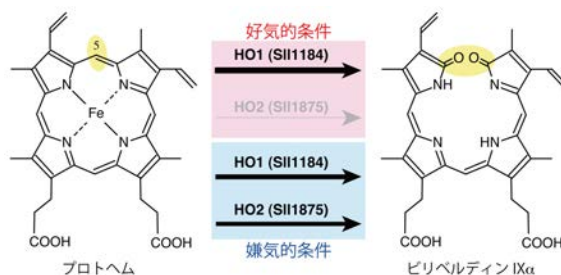


図4 ヘムオキシゲナーゼ (ヘム開裂) 反応

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

2-5. ヘムオキシゲナーゼ反応

ヘムオキシゲナーゼ (HO) は、ヘムの酸化的開裂によりビリベルディンIX α を生成し、フィコビリソームの色素 (フィコシアノビルリン) やフィトクロムの発色団 (フィトクロモビルリン) などのピリン色素の前駆体を供給する (図4)。HOは、酵素名が表すようにO₂を取り込む酸素依存性酵素である。*Synechocystis* 6803では、HOとしてHO1 (Slr1184)、HO2 (Slr1875) という互いにアミノ酸配列で約50%の相同性を示すアイソフォームが併存しており、いずれもHO活性を有することが確認されている^{23,24)}。

2つのHOのラン藻細胞における機能分化を検討するため、2つのHO欠損株 ($\Delta ho1$ 、 $\Delta ho2$) を単離し、その形質を検討した。その結果、 $\Delta ho1$ は、 $\Delta hemF$ や $\Delta chlA_I$ と同様に嫌気条件でのみ生育可能という条件的致死形質を示し、 $\Delta ho2$ は好気・嫌気両条件ともに良好に生育した。したがって、好気環境下ではHO1が唯一のHOとして機能し、嫌気環境下ではHO2がHO1を補助するように機能していると推察される^{7,25)}。なお、HO反応では、CPgen酸化反応におけるHemNやMPE環化反応におけるBchEのような、O₂非依存的な酵素はこれまで見つかっていない。

3. 転写制御因子ChlR

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

の嫌気型酵素 (HemN、ChlA_{II}、HO₂) は、それぞれ発現パターンが異なっている。好気型酵素は環境の酸素レベルによらず構成的に発現しており、嫌気環境下でも光合成によって発生する内生のO₂を用いて、速度は低下しながらも各反応を触媒していると推察される。一方、嫌気型酵素をコードする3つの遺伝子は、ゲノム上で一つのオペロン*chlA_{II}-ho2-hemN*を形成しており、好気環境下ではmRNAの発現はほとんど検出されないが、嫌気環境下でその発現量が増大する⁵⁻⁷⁾。このような制御は、嫌気環境下で嫌気型酵素を誘導発現させてO₂依存型酵素の活性を代替または補完することにより各反応速度を維持し、クロロフィルやビリリン色素の供給を一定に保とうとする嫌気環境適応機構の一つであると考えられる。これまでこの転写制御メカニズムは全く未知であったが、最近私たちはこれらの嫌気型酵素遺伝子の発現制御を担う新規転写制御因子ChIRを発見した⁸⁾。以下に発見の経緯および、ChIRの性質について述べる。

3-1. 新規転写制御因子ChIRの発見

ChIR発見のきっかけとなったのが、2-5.で述べたHO反応である。

好気環境下で唯一のHOであるHO1を欠損させた株 ($\Delta ho1$) は、好気環境下で致死形質を示す。研究の過程で $\Delta ho1$ から好気環境下で生育可能となった偽復帰変異株 $\Delta ho1R$ を偶然発見し、これを単離した。 $\Delta ho1R$ について*ho2*の発現量を確認したところ、野生株では嫌気環境下でのみ発現誘導される*ho2*が、 $\Delta ho1R$ では構成的な発現パターンを示した。好気環境下でも*ho2*が発現するようになったことで*ho1*の欠損が相補され、 $\Delta ho1R$ は好気環境下でも生育可能になったと考えられる。また、この発現パターンの変化は、*ho2*を含むオペロン*chlA_{II}-ho2-hemN*に含まれる3つに遺伝子すべてで認められた。

このような発現パターンの変化を引き起こした原因を明らかにするために、 $\Delta ho1R$ の全ゲノム配列を、次世代シーケンサーを用いて明らかにし、野生株の配列と比較した。その結果、*sll1512*がコードするタンパク質 (135残基) の35番目のアスパラギン酸 (GAT) がヒスチジン (CAT) に置換される一塩基置換が見出された。*Sll1512*は原核生物に広く分布するMarRファミリーと呼ばれる転写制御タンパク質と有意な相同性を示すことから、*Sll1512*はラン藻細胞内

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

3-2. ChIRの機能解析

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

次に、ChIRが実際にDNA結合能を有するタンパク質であるかを確かめるため、ゲルシフトアッセイによる解析を行った。解析には、大腸菌で発現させ精製した野生型ChIRと $\Delta ho1R$ における一アミノ酸置換を含むChIR-D35Hを用いた。*chlA_{II}*上流DNA断片に対してゲルシフトアッセイを行ったところ、野生型ChIRはDNAとの結合が認められなかったが、ChIR-D35Hでは明瞭なシフトバンドが得られ、DNA結合能が確認された。この実験では全ての操作を好気環境下で行ったため、この結果は好気環境下での細胞内の状態を反映していると考えられる。これらの結果から私たちは、ChIRは好気環境下ではDNAとの結合能を示さない不活性型であり、嫌気環境への移行に伴って活性型に変換され、*chlA_{II}*の上流領域に結合して遺伝子の発現を活性化するという機能モデルを提唱した (図5)⁸⁾。また、ChIR-D35Hはアミノ酸置換の影響により恒常的に活性型となったため、 $\Delta ho1R$ で嫌気型酵素遺伝子が構成的な発現パターンを示したと考えられる。

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



図5 ChIRの機能モデル

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

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

4. ラン藻における嫌気型酵素の分布

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

関わっている可能性が考えられる。

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

また、窒素固定を行うラン藻の多くがChIRおよび嫌気型酵素を保持している。窒素固定を行うニトロゲナーゼは金属中心を持つO₂感受性酵素であることから、嫌気環境適応機構と窒素固定の間には何らかの関わりがあることが推察される。

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

5. 大酸化イベントと酸素危機

現在の地球の大気に21%含まれるO₂は、反応性が高く、継続的な供給源がなければ急速に消失する²⁸⁾。酸素供給源である酸素発生源型光合成の成立以前、生命誕生当時の地球の大気環境は、O₂をほとんど含まない嫌気的環境であった。すなわち、生命誕生とそれに続く黎明期の生物進化は嫌気的環境下で進行した。その後の生命進化を決定づける最も重要な地球史的イベントは、約22億年前に起こった酸素レベルの急上昇（大酸化イベントGOE; Great Oxidation Event）である²⁹⁾。この酸素レベル上昇はもちろん酸素発生源型光合成生物の誕生と繁殖に起因する³⁰⁾。O₂は呼吸鎖に代表されるように有用な電子受容体であり、O₂を電子受容体とすることにより生物のエネルギー生産は飛躍的に増大した。さらに、O₂の存在により生物の代謝系の多様性が爆発的に増加したと考えられている⁴⁾。一方、O₂に由来する活性酸素種は生体にとって高い毒性を示し³¹⁾、嫌気的環境で誕生・進化してきた生物にとってGOEは、生存に関わる重大な選択圧として作用したと考えられる。

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

表1 ラン藻における好気型酵素/嫌気型酵素とChlRの分布

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

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

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

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

^d窒素固定能の有無を+, -で示す。

^e*Anabaena* PCC 7120では、*hemF*と*chlA_{II}*が2コピー存在し、そのうち1コピーが隣接して存在する。

^fKEGGのOrtholog結果で、ChlA_IとChlA_{II}のいずれともほぼ同じ程度の相同性を示したため、中間的なChlAと判断した。

合成によって発生するO₂により、真っ先に障害を受けたはずである。ラン藻は、そのような“酸素危機”を克服してきた最初の生物と考えられ、現生ラン藻のゲノムには、その適応進化の痕跡が刻印されているに違いない。光合成に必須の色素を供給するテトラピロール生合成系は、酸素発生型光合成の成立以前に確立されていたはずである。ラン藻のテトラピロール生合成系にはそのような進化の痕跡が、他の代謝系に

比べて特に色濃く残されているかもしれない。クロロフィルaの生合成は酸素発生型光合成の成立に必要な不可欠なものであったにも関わらず、その成立に伴って生合成系自体がO₂による障害により停滞してしまうという進化のアイロニーも興味深い。

6. テトラピロール生合成系の適応進化

私たちの研究によって明らかにされたこの適応進化

表2 ラン藻のテトラピロール生合成系に残された適応進化の痕跡

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

^a*は酸素依存型酵素であることを示す。

^bラン藻*Synechocystis* sp. PCC 6803の例。

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

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

^e光合成細菌にのみ分布する。

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

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

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

ⁱ被子植物ではDPORが欠失しており、LPORに完全に“置換”されている。

^j未発見。

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

を表2に要約した。嫌気環境で誕生した始源光合成生物は、当初嫌気環境に適応した嫌気型酵素（HemN、BchE、DPOR）を用いてクロロフィルを生合成していたと考えられる。これら嫌気型酵素は共通してO₂に対し非常に脆弱な鉄硫黄クラスターを活性中心に用いる。このため、酸素発生型光合成の創出による内生のO₂の産生に加え環境中の酸素レベルが上昇していく中で、これら嫌気型酵素は不可逆に不活化され、クロロフィル供給が滞る局面が頻出したと推察される。このような“酸素危機”に対して酸素耐性酵素群を創出したラン藻が生き延びることができたと推察される。そのような酸素耐性酵素が、HemNの代替としてHemF、BchEの代替としてChlA、そしてDPORの代替としてLPORである²²⁾。

GOEによる酸素レベルの上昇は、テトラピロール生合成系のみならず好気環境により適応した酵素（O₂を基質として利用するオキシゲナーゼなども多数含まれる）を新たに創出し、新規な代謝ネットワークを生み出した⁴⁾。さらに、嫌気型酵素の淘汰と好気型酵素への置換を促し、まさに“代謝大再編”を通して現在の代謝系へと進化を導いたと考えられる。しかし、大気中の酸素レベルが好气的であっても、微生物マットや富栄養湖などの低酸素環境は常に存在し、また、光合成が停止する夜間には定期的に嫌気環境にさらされる³⁾。このため、嫌気型酵素は全て淘汰されたわけではなく、現在も多くのラン藻で嫌気環境適応機構として保存され、嫌気環境での適応度の

維持に貢献している。

私たちはこれまでの研究で対象としたChlR制御下の3つの反応（CPgen酸化反応、MPE環化反応、HO反応）とPchlide還元における好気型酵素/嫌気型酵素の機能分化²²⁾から、それらの適応様式を2つのカテゴリーに分類した⁸⁾。一つは、2つの酵素が酸素耐性酵素と酸素感受性酵素という組み合わせの場合である（カテゴリーI）。このカテゴリーには、CPgen酸化反応（HemF/HemN）とPchlide還元反応（LPOR/DPOR）が属し、酸素耐性酵素が酸素依存性か否かによりサブカテゴリーIaとIbに分けられる。このような機能分化は、酸素レベルの上昇に伴い酸素感受性酵素（嫌気型酵素）が不活化してしまったため、酸素耐性酵素（好気型酵素）がその活性を補うために新たに創出され、その後嫌気型酵素が発現調節を受けるようになり、成立したものと考えられる。もう一つの様式は、酸素依存型酵素のアイソフォームを用いている場合であり（カテゴリーII）、MPE環化反応とHO反応が属する。これら2つのアイソフォームの機能分化の分子基盤は未解明だが、嫌気環境下で特別なアイソフォームが発現誘導されることによって、酵素含量が増加し、O₂濃度が低下しても生成物の供給速度を保てるようにしているのではないかと考えられる。あるいは、嫌気誘導型のアイソフォーム（嫌気型酵素）は、構成的発現のアイソフォーム（好気型酵素）に比べ、O₂との親和性が高く、嫌気環境下でも効率良く酸素を利用できるという質的な差異があるのかもしれない。

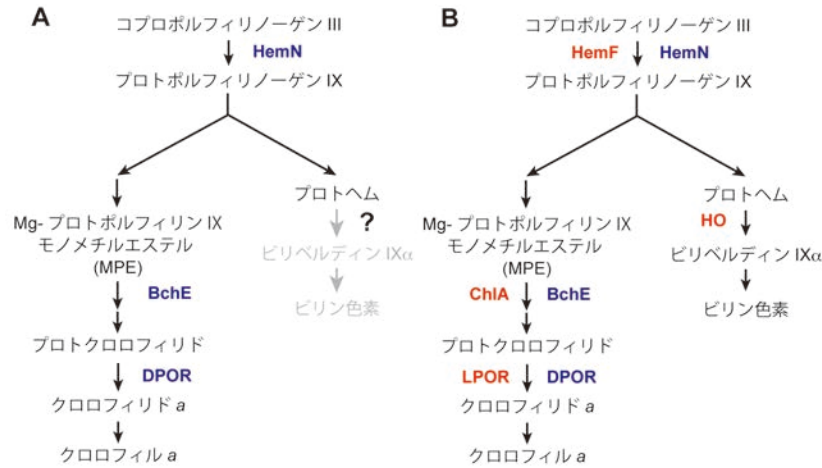


図6 ラン藻のテトラピロール（クロロフィル・バクテリオクロロフィル）生合成系の適応進化

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

れない。カテゴリIIのような機能分化は、光条件下では光合成によるO₂が生成するので、細胞内では完全な嫌気条件になることはほとんどないことを反映しており、内生O₂を最大限利用することで、環境の幅広い酸素レベルに対し適応しようとするメカニズムと解釈される。なお、DPORは、ChlRではなくLuxRファミリーに属するPedRによって光強度に応じて制御されることが報告されている³²⁾。PedRは、光合成電子伝達活性が低いときにDPOR遺伝子の転写を活性化する。DPORの代替酵素LPORは、光を活性に要求する酵素であることを考えると、O₂よりも光を主な制御要因とすることは合目的である。

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

7. おわりに

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

のテトラピロール生合成系で発見されたような嫌気環境適応機構が他の代謝系にも普遍的に分布しているのではないかと考えている。実際に、O₂を基質として用いている反応は他にも多数存在する。それらの反応ではO₂供給が停滞する嫌気環境で何らかの調節が行われているはずである。また、O₂に脆弱な鉄硫黄クラスターを有する酵素も多数存在する。その代表ともいえるラジカルSAMをコードする遺伝子は*Synechocystis* 6803のゲノムに28個も存在する。これらの中には、上記のカテゴリ分けには属さない、新たな適応の様式を採用しているものも存在しているかもしれない。

ラン藻を含む微細藻類は、近年、バイオ燃料生産、水素生産などのバイオエネルギー源として大きな期待がよせられている³⁴⁻³⁶⁾。その中で、ヒドロゲナーゼやニトロゲナーゼというO₂に感受性の高い嫌気型酵素を、いかにO₂を発生する光化学系IIと共存させて効果的に利用できるかが実用化の一つのカギとなるかもしれない³⁷⁻⁴⁰⁾。このような高いポテンシャルの酵素群を擁するラン藻を工業的により有効に活用する上で、嫌気環境下でラン藻がどのように適応しているか、というきわめて重要な知見が非常に限られていた。私たちの研究により、ラン藻の嫌気環境適応機構の一端を明らかにすることができた。今後は対象とする代謝系を拡大し、ラン藻の嫌気環境適応の全体像を明らかにし、大酸化イベントによって導かれた

代謝再編の全貌の解明を目指したい。

謝辞

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

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

参考文献

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

- in angiosperms, *Photosynth. Res.* 81, 1-29.
22. Yamazaki, S., Nomata, J. and Fujita, Y. (2006) Differential operation of dual protochlorophyllide reductases for chlorophyll biosynthesis in response to environmental oxygen levels in the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*, *Plant Physiol.* 142, 911-922.
 23. Cornejo, J., Willows, R. D. and Beale, S. I. (1998) Phytobilin biosynthesis: cloning and expression of a gene encoding soluble ferredoxin-dependent heme oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant J.* 15, 99-107.
 24. Zhang, X., Migita, C. T., Sato, M., Sasahara, M. and Yoshida, T. (2005) Protein expressed by the *ho2* gene of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is a true heme oxygenase, Properties of the heme and enzyme complex, *FEBS J.* 272, 1012-1022.
 25. Yilmaz, M., Kang, I. and Beale, S. I. (2010) Heme oxygenase 2 of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is induced under a microaerobic atmosphere and is required for microaerobic growth at high light intensity, *Photosynth. Res.* 103, 47-59.
 26. Summerfield, T. C., Toepel, J. and Sherman, L. A. (2008) Low-oxygen induction of normally cryptic *psbA* genes in cyanobacteria, *Biochemistry* 47, 12939-12941.
 27. Summerfield, T. C., Nagarajan, S. and Sherman, L. (2011) Gene expression under low oxygen conditions in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 demonstrates Hik31-dependent and Hik31-independent responses, *Microbiology* 157, 301-312.
 28. Falkowski, P. G. and Godfrey, L. V. (2008) Electrons, life and the evolution of Earth's oxygen cycle, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363, 2705-2716.
 29. Holland, H. (2006) The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361, 903-915.
 30. 伊藤 繁 (2012) 光合成の進化, 光合成研究 22, 14-30.
 31. ニック・レーン, 西田睦監訳 遠藤圭子訳 (2006) 生と死の自然史～進化を統べる酸素, 東海大学出版会
 32. Nakamura, K. and Hihara, Y. (2006) Photon flux density-dependent gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is regulated by a small, redox-responsive, LuxR-type regulator, *J. Biol. Chem.* 281, 36758-36766.
 33. Russell, M. J. and Martin, W. (2004) The rocky roots of the acetyl-CoA pathway, *Trends Biochem. Sci.* 29, 358-363.
 34. 増川一・櫻井英博 (2006) シアノバクテリアを用いた水素生産 遺伝11月号, 46-51.
 35. 小俣達男・藤田祐一・前田真一 (2010) 光合成微生物は資源・エネルギー分野で人類に貢献できるか?～生産性を規定する諸要因の分析～, 光合成研究 20, 65-71.
 36. ビエツロ, D. (2011) 期待はずれのバイオ燃料, 日経サイエンス11月号, 98-107.
 37. Masukawa, H., Inoue, K., Sakurai, H., Wolk, C. P. and Hausinger, R. P. (2010) Site-directed mutagenesis of the *Anabaena* sp. PCC 7120 nitrogenase active site to increase photobiological hydrogen production, *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6741-6750.
 38. Lenz, O. *et al.* (2010) H₂ conversion in the presence of O₂ as performed by the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha*, *Chemphyschem* 11, 1107-1119.
 39. Shomura, Y., Yoon, K. S., Nishihara, H. and Higuchi, Y. (2011) Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase, *Nature* 479, 253-256.
 40. Bandyopadhyay, A., Stöckel, J., Sherman, L. A. and Pakrasi, H. B. (2010) High rates of photobiological H₂ production by a cyanobacterium under aerobic conditions, *Nat. Commun.* 1, 139.
 41. Bandyopadhyay, A. *et al.* (2011) Novel metabolic attributes of the genus *Cyanothece*, comprising a group of unicellular nitrogen-fixing cyanobacteria, *MBio* 2, e00214-11.
 42. Yu, T., *et al.* (2012) Codon usage patterns and adaptive evolution of marine unicellular cyanobacteria *Synechococcus* and *Prochlorococcus*, *Mol. Phylog. Evol.* 62, 206-213.

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

Rina Aoki and Yuichi Fujita*

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University