

解説

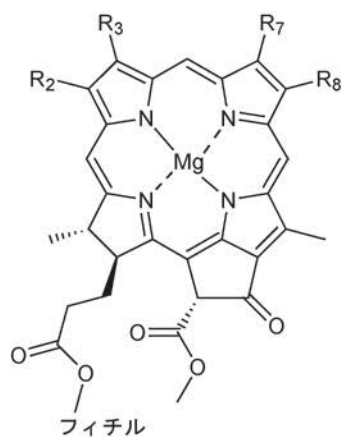
代謝工学による新たなクロロフィル分子の合成[‡]京都大学大学院 人間・環境学研究所
土屋 徹[¶]

1. はじめに

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

光合成生物は、進化の過程でさまざまなクロロフィ

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



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

図1 クロリン型のクロロフィルおよび人工的に合成した新奇クロロフィルの構造

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

[‡] 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: tsuchiya.toru.8e@kyoto-u.ac.jp

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

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

2. クロロフィル組成改変の試み

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

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

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

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

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

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

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

*筆者らにより最近開発された。

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

3. 新奇なクロロフィルを合成するためには

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

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

4. *Acaryochloris marina*での形質転換系の開発

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

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

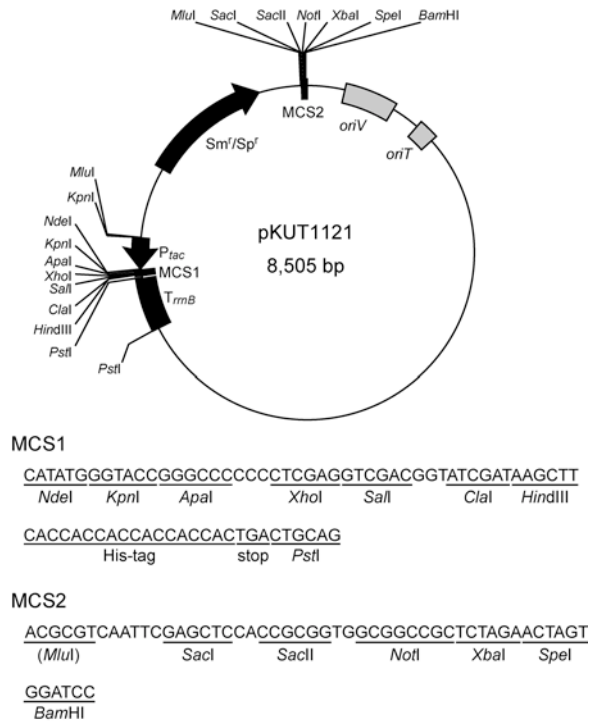


図2 発現ベクターpKUT1121のマッ

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

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

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

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

上記のように、筆者自らRSF1010より作製した

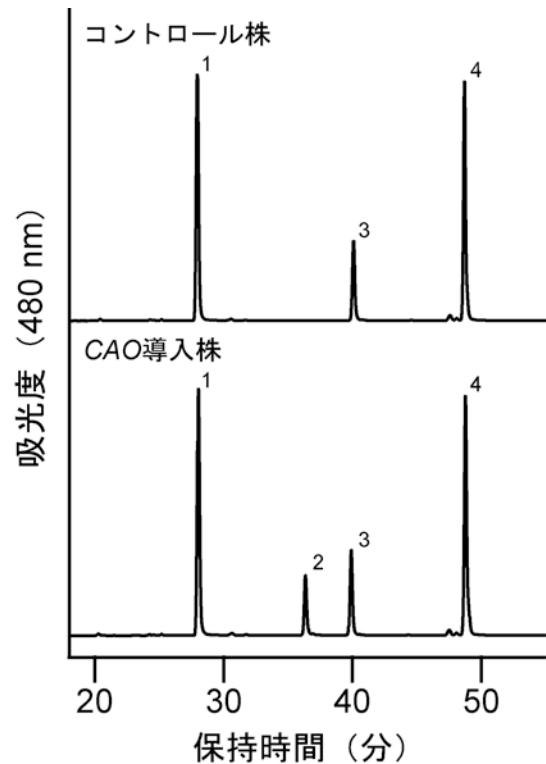


図3 CAO遺伝子を導入した*A. marina*の色素組成

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

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

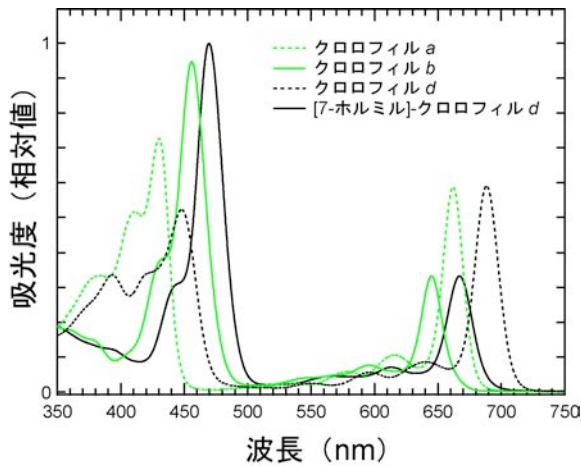


図4 クロリン型のクロロフィルおよび[7-ホルミル]-クロロフィル *d* の吸収スペクトル

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

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

5. *A. marina*での新奇クロロフィルの合成

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

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

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

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

6. 今後の展望

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

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

7. おわりに

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

謝辞

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

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

参考文献

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

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

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

Production of Novel Chlorophyll Species by the Metabolic Engineering

Tohru Tsuchiya*

Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University