

# 光合成研究

第 30 卷 第 2 号 (通巻 88 号) 2020 年 8 月

Vol. 30 NO. 2 August 2020

JOURNAL OF THE JAPANESE SOCIETY OF PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

---

ご案内	日本光合成学オンラインミニシンポジウム開催のお知らせ	72
トピックス	光合成の防御反応における細胞内シグナル伝達 得津 隆太郎 (基生研)	73
解説特集	「光合成生物に関連する分子の開発」	84
序文	成川 礼 他 (静岡大)	85
解説	光合成生物の細胞内を可視化するツールの開発秘話 久堀 徹 他 (東京工業大)	87
解説	シアノバクテリオクロムの進化的系譜から着想を得た多彩な光変換分子の合理的設計 伏見 圭司 他 (静岡大)	96
解説	非天然カロテノイド生合成経路の進化分子工学 梅野 太輔 (千葉大)	110
表紙の紹介	東北大学大学院農学研究科附属川渡フィールドセンターの「遺伝子組換え植物隔離ほ場」 牧野 周 他 (東北大)	125
特別企画	第 10 回「Krieger-Liszkay 研究室@CEA-Saclay (フランス)」 嶋川 銀河 (大阪大)	126
集会案内	光合成学会若手の会オンラインセミナー開催のお知らせ 清水 隆之 (東京大)	130
事務局からのお知らせ		131
日本光合成学会会員入会申込書		132
日本光合成学会会則		133
「光合成研究」投稿規定		135
幹事会名簿		136
編集後記・記事募集		137
「光合成研究」編集委員・日本光合成学会 2020 年度役員		138
賛助法人会員広告		

---

## 日本光合成学会オンラインミニシンポジウム開催のお知らせ

5月30-31日に静岡大学で行なわれる予定でしたシンポジウム2つのうちの1つ「諸刃の剣：光合成との付き合い方」を、9月18日（金）15時からオンラインで開催することにしました。Zoomを用いた開催を検討しております。参加申し込みは以下のリンク先からお願いします。

<https://sites.google.com/view/photosynthesis-mini-symposium/>

仮プログラム

14:45-

オンラインサイトオープン

15:00-15:45

神保晴彦（東大・総合文化）

「光化学系II修復におけるタンパク質と脂質の代謝回転」

15:50-16:35

神川龍馬（京大・農）

「微細藻類における光合成能の喪失と葉緑体縮退進化（仮）」

16:40-17:25

清水隆之（東大・総合文化）

「葉緑体形成の制御に関わる葉緑体から核へのシグナル伝達」

17:30-

オンライン懇親会

令和2年8月31日

オンラインミニシンポジウムオーガナイザー 成川 礼、栗井 光一郎、本橋 令子



## トピックス

## 光合成の防御反応における細胞内シグナル伝達

基礎生物学研究所

得津 隆太郎\*

四季が明瞭な日本において季節ごとに見られる色とりどりの花の形成は、我々が身近に感じる自然現象の一つである。被子植物たちは、花の形成とそこでの受粉を通して次世代へと遺伝子のバトンを渡している。種としての生存戦略の観点からも着目されることの多い被子植物の花成だが、光合成学会の会員の皆様には今ひとつ馴染の薄いものかと思う。かくいう筆者も、これまで一貫して藻類の光防御メカニズムの研究に従事してきており、まさか自分の研究が植物の花成とつながるとは全く予想していなかった。そこで本稿では、筆者が進めてきた緑藻の光防御の研究を振り返りつつ、この研究がどのようにして植物の花成や光合成生物の進化につながったのかを紹介したい。

## 1. はじめに

陸上植物や藻類は、地球上のあらゆる環境において独自の進化を遂げつつ、その場所に適した光合成を行っている。最適な光合成を実現するためには光を集める能力と、光を捨てる能力の最適化が必要になってくる。前者はフィコビリソームや Light Harvesting Complex (通称 LHC) と言われる集光アンテナタンパク質の量を調節することによって、後者は強すぎる光から身を守る「光防御」と呼ばれる環境適応反応によって実現される<sup>1-3)</sup>。

自然界における日中の光強度は、多くの場合光合成に利用できる量を大幅に上回っていることが知られている<sup>4)</sup>。我々が日常的に目にする陸上植物では、強すぎる光を受け取った葉の内部では光阻害と呼ばれる傷害が起き<sup>5)</sup>、その程度が大きすぎるとやがて葉は白化し、枯れてしまう。一度枯れた葉は元どおりに回復することはなく、大きな光阻害を引き起こすような強光が長期に及ぶ、あるいは新たな葉の産生速度が間に合わなければ植物は枯死する(図1)。また、肉眼では見えないような単細胞藻類にとっては、強すぎる光はより深刻な問題である。なぜならば、微細藻類は細胞内に有する光合成器官(葉緑体)が壊れてし

まうと細胞死、つまり個体の死に直結するためである。しかし、自然界に目を向けると、真夏の直射日光のもとでも草木や湖沼の藻類は死滅する

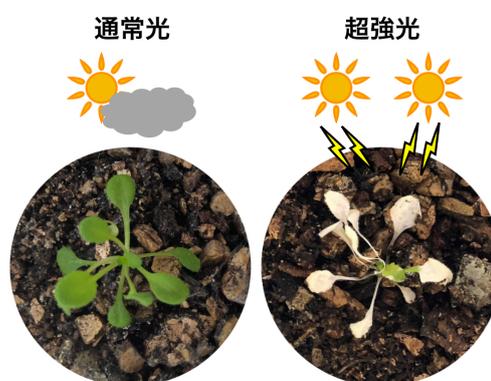


図1. 超強光による植物個体へのダメージ

同じ温度・湿度環境を維持し、通常光(左:  $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )あるいは超強光(右:  $5000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )を10時間照射した後のシロイヌナズナ野生株の写真。自然界ではあり得ない程度の超強光を照射すると、野生株であろうと色素が抜けて枯死することがわかる。シロイヌナズナ野生株は基礎生物学研究所・植物環境応答研究部門の川本望博士による提供。

\*連絡先 E-mail: tokutsu@nibb.ac.jp

ことなく旺盛に繁茂していることがわかる。これは、強光の下でなるべく光阻害を起こさないように過剰量の光エネルギーを安全に消去する光防御反応 (qE クエンチング) を駆使して強光環境に適応しているためである。

筆者が所属する基礎生物学研究所・環境光生物学研究部門では、光防御反応の全体像を解き明かすべく単細胞の緑藻であるクラミドモナスを材料として研究を進めている。2016年の光合成研究誌に紹介したように、緑藻のqEクエンチング反応にはLHCSRと呼ばれるタンパク質が必須であることがわかっている<sup>6,7)</sup>。そのため本稿では、qEクエンチングそのもののメカニズムは割愛し<sup>8)</sup>、そもそも緑藻が一体どのように光防御因子であるLHCSRの発現をコントロールしているのかに焦点を当て、光防御反応における細胞内シグナル伝達の全体像について紹介したい。

なお本稿は異なる分野の研究者あるいは一般の読者に興味を持っていただくことを第一目的とし、なるべく平易に、かつ簡潔に紹介することを心がけているので、学術的背景や専門的な説明が不足する点については容赦いただきたい。

## 2. 緑藻の光防御因子 LHCSR タンパク質

過剰な光を安全に消去するqEクエンチング反応には、LHCSRタンパク質(LHCSR1とLHCSR3)が欠かせない。しかし、LHCSRタンパク質がどのように発現制御されるのかに関しては未解明な部分が多く残されていた。我々はこの謎、つまり「緑藻がどのように過剰な光エネルギーを認識しているのか?」という点を明らかにすべく研究を進めてきた。

LHCSRは、1992年にGagneとGuertinによって光依存的に発現誘導される核遺伝子(Light Inducible; LI)の一つ、LI818として報告された<sup>8)</sup>。また、GuertinらはLI818の遺伝子配列がほかの集光アンテナ遺伝子と類似しているものの、タンパク質レベルでは集光アンテナの発現パターンと異なることを見いだした<sup>9)</sup>。2004年と2008年

には、京都大学の福澤教授らのグループにより、LI818には2つのパラログが存在し、低炭素で転写誘導される核遺伝子としても認知・報告された<sup>10,11)</sup>。その後、2000年代後半になりHipplerらにより、LI818はストレス誘導性の集光アンテナ(Light-Harvesting Complex Stress Related; LHCSR)として認識され<sup>12)</sup>、このうちの一つLHCSR3は強光条件下で発現し、qEクエンチングに必須のタンパク質であることが報告された<sup>9)</sup>。また、LHCSR3と同様にパラログのLHCSR1もqEクエンチングに必須であることが報告されている<sup>7,13)</sup>。

## 3. 光の認識～光合成と光受容体～

上述した一連の先行研究から、LHCSRは「供給される光エネルギー > 光合成反応の許容量」になった時に発現すると予想できる。つまり、クロロフィルによって吸収される青色や赤色の光エネルギーがキッカケとなりLHCSR発現がコントロールされている、と仮説立てることができる。この仮説を確かめるため、我々は基礎生物学研究所の地下に設置されている大型スペクトログラフ(通称OLS: Okazaki-Large-Spectrograph)を用い、紫外～赤色領域におけるLHCSR発現の光波長・強度依存性を調べた(図2)。その結果、LHCSR3は青色光、LHCSR1は紫外光特異的な発現を示すことがわかった。もちろん、クロロフィルの吸収波長である赤色光領域においてもLHCSR3の発現は見られたものの、その発現量は青色領域と比較しても50%以下であった。この結果は、紫外～青色領域においてクロロフィルによる光の吸収以外の作用が起きていることを示唆している。そこで、我々は植物や緑藻で保存されている青色光受容体の一つであるPhototropinを欠損した変異株を用いて、そのLHCSR発現への影響を調べた。その結果、LHCSR3の発現量は著しく低下しており、青色光受容に伴うPhototropinの活性化がLHCSR3発現へ関与することが明らかになった。一方で、DCMUを用いて光合成電子

<sup>8)</sup> 緑藻はLHCSRタンパク質を駆使して過剰な光エネルギーを安全に消去しているが、その大まかな分子メカニズムは「光合成研究 第75号(2016年4月)

/第26巻第1号:光合成における強光順化メカニズム研究の新展開、図1」に紹介している。本稿と併せてご一読いただければと思う。

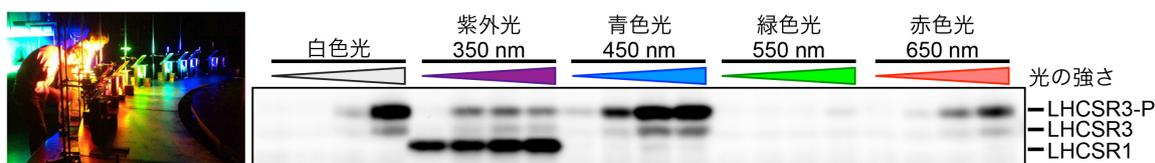


図2. 大型スペクトログラフを用いた単色光照射にともなうLHCSRタンパク質の発現パターン分析

紫外、青色、緑色、赤色領域において4段階の光強度 (10、25、50、100  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) において4時間光処理をした後の緑藻細胞からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット分析によりLHCSRタンパク質発現の波長および光強度依存性を調べた。LHCSR1は紫外光で、LHCSR3 (-P)はリン酸化産物は青色光で顕著に発現することがわかる。先行研究から、これらの表現型にはそれぞれ紫外光受容体UVR8<sup>7)</sup>、青色光受容体Phototropin<sup>14)</sup>が関与していることが明らかとなっている。左の写真は、基礎生物学研究所地下の大型スペクトログラフ内部にて筆者(奥)とフランス国立科学研究センターのFinazzi博士(手前)がサンプリングをしている様子。

伝達を阻害すると、野生株においてもLHCSR3の発現がほぼ完全に抑制されることから、Phototropinだけではなく、光合成電子伝達反応の寄与は必要不可欠であることも分った。これらの結果から、LHCSR3の発現は葉緑体における光合成反応がスイッチとなり、青色光によるPhototropin活性化がシグナルを増幅することで制御されていると考えることができる<sup>14)</sup>。

上記の研究の一方で、筆者は紫外光依存的なLHCSR1発現に着目し、2015年初冬頃より紫外光下におけるLHCSR1発現異常を示す大規模変異体スクリーニングを開始した。その結果、DSR (Deficient in LHCSR expression) と名付けた変異体シリーズの単離に成功した<sup>15)</sup>。得られたDSR変異体の中でも唯一紫外光特異的にLHCSR1発現異常を示すDSR1株の変異原因遺伝子の特定を進めたところ、2016年晩秋には陸上植物型における紫外光センサーであるUVR8のホモログが破壊されていることを突き止めた。この発見を公表すべく準備を進めていた所、残念ながら2016年初冬、スイス・ジュネーブ大学の紫外光受容体UVR8の専門家Ulm博士と同大学のクラミドモナス遺伝学の専門家Goldschmidt-Clermont博士らからなる研究タグにより「紫外光受容体UVR8が光防御を制御する」という内容の研究結果が発表されてしまった<sup>7)</sup>。このように、一馬身(いや、クビ差ほど?)のところで先を越されてしまうという個人的には悔しい研究裏事情がある。熟練の多くの研究者の方々は既に経験済み&ご存知か

と思うが、案外同じようなアイデアに基づく研究が世界中で同時進行しているということをもつて実感し、研究の進め方(実験計画)・スピード(特に論文化)の重要性について考えさせられた一件であった。話は脱線したが、これらの一連の研究の中で我々は、LHCSR1の発現変異体群の中で「LHCSR3の発現も不得手」かつ「強光下で死滅する」といった特徴をもつ光防御の変異体の取得に成功した<sup>15)</sup>。これらのDSR光防御変異体についてより詳しく調べると、代表的な光防御遺伝子・タンパク質(LHCSRとPsbS)が十分に発現しておらず、その結果として光防御が正しく駆動していないことがわかった(図3)。このことから、DSR1以外のDSR変異体では光の受容から光防御因子の発現までのシグナル経路に異常を生じたことで、強光下で生存できなくなったと予想された。つまり、光の入口は紫外光(UVR8)と青色光(Phototropin)に分かれているものの、LHCSR1とLHCSR3の発現に関わるシグナル伝達経路の出口(転写因子)は共通していると予想できる。

#### 4. 光防御因子の発現に至る細胞内シグナル伝達

これまでの研究から、LHCSR遺伝子の発現には特定の受容体による光受容が必要であること<sup>7, 14, 16)</sup>、発現したLHCSRは藻類の光防御に直接的に寄与することが明らかになった<sup>13, 17)</sup>。そこで筆

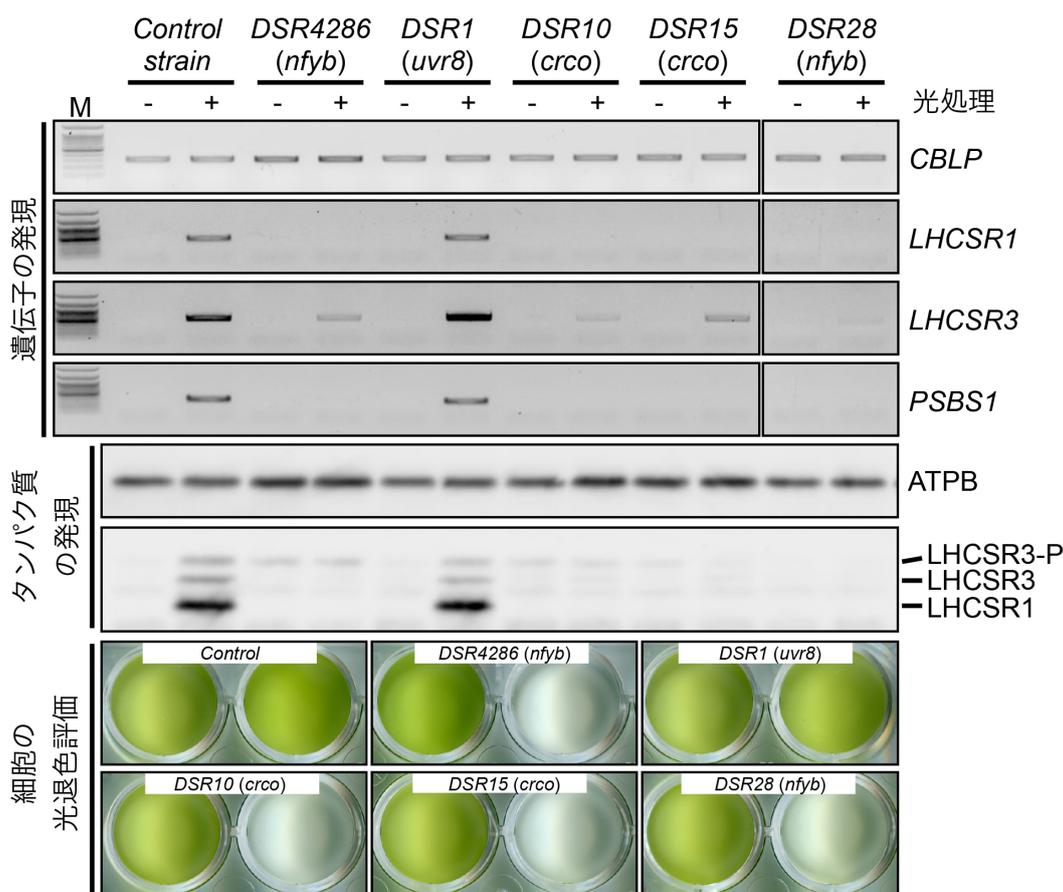


図3. *DSR*変異体シリーズの光防御表現型解析

紫外光を含む強光 ( $300 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で光処理した緑藻における光防御因子の遺伝子発現 (*LHCSR1*, *LHCSR3*, *PSBS1*の半定量的PCR分析)、タンパク質発現 (*LHCSR1*, *LHCSR3*のウェスタンブロット分析)、そして細胞のクロロフィル退色の様子を評価した。*DSR1 (uvr8)* 以外の*DSR*変異株は、強光処理後に光防御因子が十分に発現しておらず、クロロフィル色素が退色して細胞死を起こしていることがわかる。M: NEB 100 bp マーカー。Tokutsu et al. (2019) *Sci. Rep.*<sup>15)</sup>より改変。

者は次に、光の受容から光防御を担う遺伝子の発現までの間にどのように情報が伝達されるのか、その細胞内シグナル経路の全容解明を目標として、得られた *DSR* 変異体群の利用を考えた。

#### 4.1. 紫外光受容体 UVR8 はどうやって細胞内シグナル伝達を開始させるのか？

まず初めに、比較的単純な光受容経路を担う *UVR8* に着目し、紫外光照射下における *UVR8* (YFP-FLAG タグ融合) タンパク質の振る舞いを可視化した。面白いことに、*UVR8* は暗所では細胞質全体に広く拡散分布しており (図 4 上、0 min)、紫外光照射に伴い核周辺に移動・集積することがわかった (図 4 上、30 min)。次に、*UVR8*

が核周辺に集積するタイミングで FLAG タグを利用した共免疫沈降を行うと、*UVR8* はタンパク質のユビキチン化 (とそれに伴う標的タンパク質の能動的分解) を制御する E3 ユビキチンリガーゼ因子である CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (*COP1*) および SUPPRESSOR OF PHYA-105 1 (*SPA1*) と直接的に相互作用していることが明らかになった (図 4 下)。*COP1* と *SPA1* は陸上植物における光形態形成に関わる転写因子群の分解制御に深く関与すると考えられている<sup>18)</sup>。その一方で、緑藻におけるその機能は未知であり、本研究により初めて光防御シグナル伝達系への関与が認められた。以上の結果から、緑藻は紫外光の受容により、

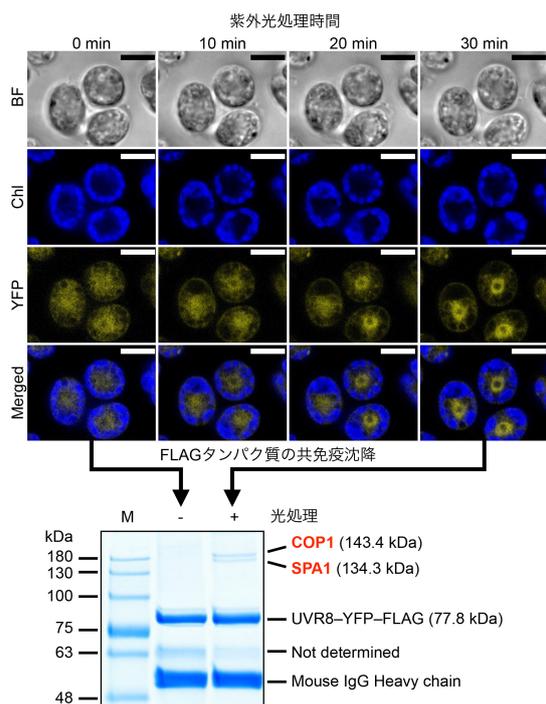


図4. 紫外光によるUVR8の細胞内局在変化

上段：紫外光で処理した緑藻におけるUVR8-YFPタンパク質のライブセルイメージング。上から明視野 (BF)、クロロフィル蛍光 (Chl)、UVR8-YFP蛍光 (YFP)、クロロフィル蛍光とYFP蛍光の重ね合わせ (Merged) 画像を示す。スケールバー: 5  $\mu\text{m}$ 。UVR8は紫外光処理に伴い核周辺へと移行することがわかる。下段：UVR8-YFP-FLAGタンパク質共免疫沈降物のSDS-PAGE。CBB染色ゲルの質量分析により、紫外光処理後の共免疫沈降物からは、E3ユビキチンリガーゼ因子であるCOP1およびSPA1が検出され、UVR8が紫外光依存的にこれらのタンパク質と相互作用することがわかった。Tokutsu et al. (2019) *Nat. Commun.*<sup>29)</sup>より改変。

UVR8 を介して COP1/SPA1 型 E3 ユビキチンリガーゼを不活化する可能性が浮かび上がってきた。

#### 4.2. COP1/SPA1 型 E3 ユビキチンリガーゼは何を制御しているのだろうか？

前述したように、COP1/SPA1 は陸上植物ではいくつかの転写因子を標的とすることが知られている<sup>18)</sup>。特に ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5) といった光形態形成に深く関わる転写因子のユビキチン修飾を担っており、UVR8 と協調して HY5 転写因子の安定化に寄与するといった興味深い報告もされている<sup>19)</sup>。他方で、

COP1/SPA1 は青色光受容 Cryptochrome や赤色光受容体 Phytochrome を起点としたシグナル伝達においても特定の転写因子の分解制御に関与していることがわかっている。その標的は、花芽の形成 (花成) タイミングの制御に直接的に関与する CONSTANS (CO) と呼ばれる転写因子である。陸上植物では、日長の情報を利用した COP1/SPA1 による CO 転写因子のタンパク質量調節と<sup>20-24)</sup>、CO の標的である *FLOWERING LOCUS T (FT)* の転写を介した花成制御が行われている<sup>25, 26)</sup>。

言うまでもないことだが、水域の微細藻類である緑藻は花を咲かせることはない。そのため緑藻における CO (以後、緑藻の CO は CrCO と表記する) は、ごく一部の研究者らによってその存在は確認されていたものの、生物学的な役割に関する研究はわずか 1 例しか報告されていなかった<sup>27)</sup>。ところが、先のスクリーニングで得られた *DSR* 光防御変異体のうち、最も表現型が強く現れていた 4 つの変異体について RESDA-PCR<sup>28)</sup>、四分子分析と全ゲノムシーケンスを組み合わせることでゲノム上の変異カ所の特定を進めたところ、驚くことに、2 つの変異体 (*DSR10* と *DSR15*) では *CrCO* 遺伝子が破壊されていることがわかった<sup>29)</sup>。この結果を踏まえ、クロマチン免疫沈降 (ChIP)-PCR 解析手法を用いて CrCO の転写標的に光防御因子 *LHCSR* が含まれるかを評価したところ、CrCO が *LHCSR* の直接的な転写因子であることを突き止めた (図 5)。つまり、CO は陸上植物では花成を、緑藻では光防御を制御していることがわかったのである。

シロイヌナズナを用いた花成の研究から、CO タンパク質は主に光によってタンパク質制御を受けることが報告されており、*FT* 遺伝子の発現に寄与することが知られている<sup>23, 25)</sup>。そのため、植物では CO が季節による日長変化などの環境情報を利用して花芽形成のタイミングを同期させることで、種ごとに同時期の花成と開花を実現していると考えられている<sup>23, 30, 31)</sup>。この花成の仕組みは、COP1/SPA1 型 E3 ユビキチンリガーゼを介した CO タンパク質分解制御メカニズムに依存することから、我々は次に、CRISPR-Cas シス

テムを利用した COP1 および SPA1 欠損緑藻の作成・機能評価を進めた。その結果、これらの E3 ユビキチンリガーゼ因子の欠損は CrCO タンパク質の安定化につながり、弱光下においても顕著に LHCSR を発現し、光防御反応が恒常的に活性化されることがわかった (図 5 下)。また、我々の研究結果を裏付けるように、カリフォルニア大学バークレー校の Niyogi 博士らの研究チームも COP1/SPA1 型 E3 ユビキチンリガーゼの本体 CULLIN 4 (CUL4) 欠損緑藻が恒常的な光防御反応を示すことを突き止めており、ほぼ同時に独立した研究成果として論文掲載された<sup>32)</sup>。これらの結果は、緑藻においても COP1/SPA1 型 E3 ユビキチンリガーゼが光依存的に転写因子である CrCO タンパク質の安定性を制御し、下流の LHCSR 遺伝子の発現をコントロールしていることを示している。

#### 4.3. 緑藻の光防御と陸上植物の花成におけるシグナル伝達系の比較

ここまでに明らかとなった COP1/SPA1 型 E3 ユビキチンリガーゼによる CrCO タンパク質制御と、紫外光依存的な UVR8 と COP1/SPA1 の相互作用を考慮すると、次のような光防御シグナル伝達の流れが浮かび上がってくる。

- 暗所・弱光下では COP1/SPA1 型 E3 ユビキチンリガーゼによる CrCO タンパク質のユビキチン修飾とプロテアソームによる能動的な分解 (ブレーキ) 反応が維持されている。
- 紫外光を含む光の下では UVR8 による COP1/SPA1 型 E3 ユビキチンリガーゼの失活 (ブレーキの解除) が起き、その結果として CrCO タンパク質の安定化、光防御因子 LHCSR の発現が誘導される。

このような緑藻の光防御におけるシグナル伝達の流れは、受け取る光の種類が異なるものの、陸上植物の花成制御におけるシグナル伝達と極めて似ていることを示唆している。この可能性を支持するように、先のスクリーニングで得られた 4 つの DSR 光防御変異体のうち、残り 2 つの変異体では NF-YB と呼ばれる遺伝子が破壊されていることが判明した。NF-YB は、全ての真核生物

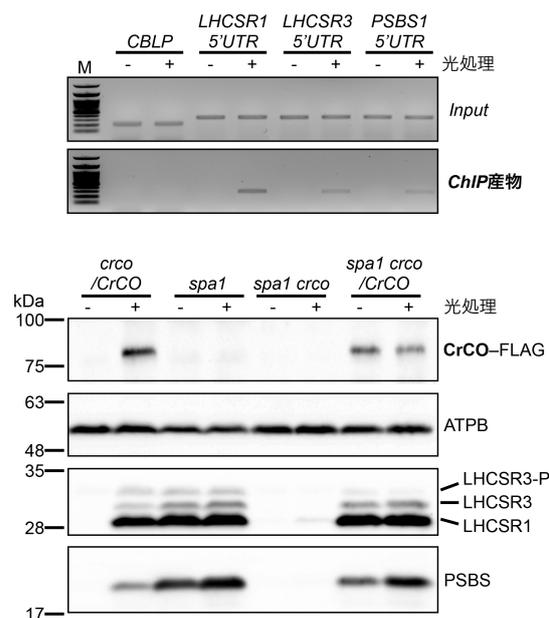


図5. CONSTANS (CrCO) のChIP-PCR解析と光処理に伴うタンパク質蓄積の挙動

上段: 強光処理の有無によるCrCO-ChIP由来の半定量的PCR評価。CrCOが強光依存的に光防御因子LHCSR1、LHCSR3、PSBS1の5'-UTR領域付近に結合することがわかる。下段: コントロール株(*crco/CrCO*)とSPA1欠損株(*spa1*シリーズ)におけるCrCO-FLAGタンパク質および光防御因子タンパク質の蓄積評価。ウェスタンブロット分析の結果から、CrCO-FLAGタンパク質はE3 ユビキチンリガーゼ因子SPA1の欠損により蓄積し、強光処理無しでも光防御因子タンパク質が蓄積することがわかる。M: NEB 100 bpマーカー。Tokutsu et al. (2019) *Nat. Commun.*<sup>29)</sup>より改変。

が持つ転写因子 Nuclear Transcription Factor (NF-Y) の一種であり<sup>33)</sup>、NF-YにはNF-YA、NF-YB、NF-YCの3つが存在することが知られている<sup>34)</sup>。面白いことに、陸上植物では3つのNF-Y全てについて10遺伝子以上のパラログが存在し<sup>35)</sup>、その組み合わせによってさまざまな遺伝子の発現を巧みに切り分けて制御することがわかっている<sup>36)</sup>。実は、このNF-Yによる遺伝子発現制御の標的の中にFTが含まれており、上述した多数のパラログ中の一部のNF-YはCOと協調して直接的に花成タイミングを制御することが報告されてきた<sup>37-42)</sup>。我々の研究からは、NF-YBの他にNF-YCも緑藻の光防御に関与することが明らかになっており<sup>29)</sup>、遺伝子発現においても緑藻の光

防御因子 *LHCSR* 制御系と陸上植物の花成因子 *FT* 制御系は酷似していると言える。

### 5. 浮き彫りになった進化の謎

本稿で紹介した研究から、これまで謎に包まれていた緑藻における光の受容から光防御を担う遺伝子の発現までのシグナル伝達の全容が明らかになってきた (図6)。図のように、陸上植物は可視光である青色の光を受け取り、E3 ユビキチンリガーゼの活性を抑制する一方、緑藻は紫外線を受け取り、E3 ユビキチンリガーゼ活性を抑

制する。E3 ユビキチンリガーゼ活性の抑制は *CONSTANS* タンパク質の安定化、そして *CONSTANS/NF-Y* 転写因子複合体の形成へとつながる。この *CONSTANS/NF-Y* 転写因子複合体は、陸上植物では花成のための *FT* 遺伝子の発現、緑藻では強光適応のための光防御遺伝子 (*LHCSR* や *PSBS*) の発現を制御する。このように我々は、陸上植物の花成をコントロールする仕組みが、全く異なる生物反応である水生緑藻の光防御をコントロールする機能を持つことを発見した。

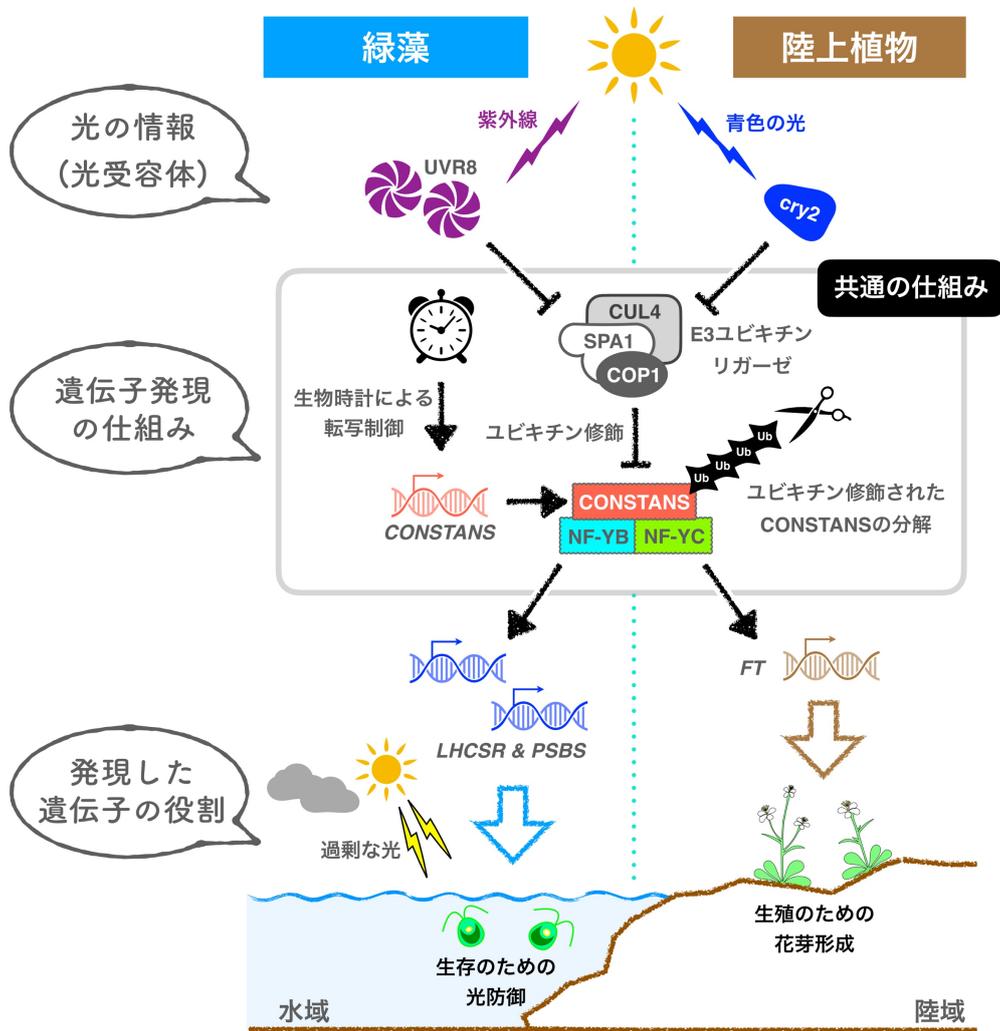


図6. 緑藻の光防御と陸上植物の花芽形成におけるシグナル伝達の比較

光の受容からE3ユビキチンリガーゼと *CONSTANS/NF-Y* 転写因子複合体を利用した遺伝子発現制御と最終的な生理的表現型を描いた。光の受容部と最終的な生理的表現型をのぞき、大部分が「共通の仕組み」で制御されていることがわかる。Tokutsu et al. (2019) *Nat. Commun.*<sup>29)</sup>より改変。

今回の研究で用いた緑藻クラミドモナスは緑藻植物門に属しており、現存する陸上植物が属するストレプト植物門とは異なる系統の生物種である(図7)。興味深いことに、緑藻クラミドモナスからは NF-YB および NF-YC のホモログが一つずつ見つかっており、NF-YA に関しては同定されていない<sup>43)</sup>。このことから、それぞれ 10 遺伝子以上のパラログを持つ陸上植物の NF-Y<sup>35)</sup> と比べて、緑藻クラミドモナスはより原始的な NF-Y を利用した遺伝子発現制御系を維持している可能性を考えることができる。これに加えて、いずれの生物種も、共通の祖先(藻類)を持つと考えられていることから<sup>44)</sup>、図6で示した「共通の仕組み」、つまり陸上植物の花成制御の仕組みは、遙か昔に水域の藻類によって確立されたものなのかもしれない。

### 5. おわりに

今日の光合成生物は、花をつける植物や緑藻だけではなく、コケやシダを含む多様な種によって構成されており、地球における生物多様性を支えていることがわかる。本研究で着目した「共通の仕組み」が多様な植物・藻類において、一体どのように生物種を越えた普遍性を獲得したのか、そして地球における生物多様性・進化をどのように運命づけたのか、まだまだ生物学的観点からの興味は尽きない。近い将来、このような研究談義に花を咲かせ、ともに研究ができる(心が若手の?)研究者との邂逅をとっても楽しみにしている。

### 謝辞

本稿で紹介した研究を遂行するにあたり、さまざまな研究リソースを提供してくださった基礎生物学研究所・環境光生物学研究部門の皆川純教授に御礼申し上げます。光防御の変異体の単離、作成には同研究室の鎌田このみ博士および高知大学の山崎朋人博士との共同研究として行われました。本稿では詳細に触れませんでした。変異体の表現型解析の一部は名古屋大学の松尾拓哉博士との共同研究として行われました。また、青色光受容体に関する研究はフランス国立科学研究センターの Dimitris Petroustos 博士、Giovanni

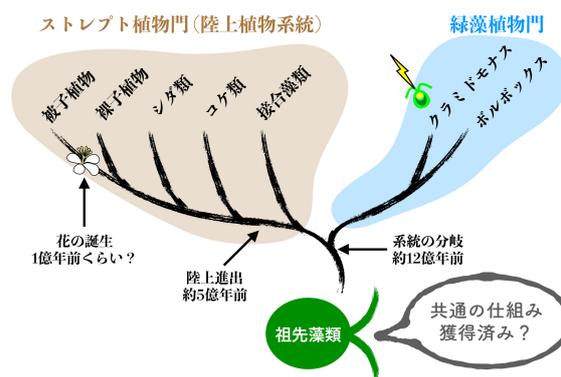


図7. 陸上植物と緑藻類の進化系統図

陸上植物系統のストレプト植物門と緑藻植物門の分岐は、おおよそ12億年前と考えられていることから、図6で示したE3ユビキチンリガーゼとCONSTANS/NF-Y転写因子を内包する「共通の遺伝子発現制御機構」は太古の共通祖先藻類で獲得されたものと予想できる。

Finazzi 博士らを中心とした国際共同研究として行われました。以上の共同研究者の方々にも深く御礼申し上げます。遺伝子マッピング、大型スペクトログラフおよび次世代シーケンス解析を遂行するにあたり法政大学の廣野雅文博士、基礎生物学研究所の光学解析室および生物情報機能分析室のスタッフの方々には多大なるご協力をいただきました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。また、末筆ではございますが、本稿を査読していただいた方々、そして最後までお読みいただいた読者の方々に御礼申し上げます。

Received Jun 5, 2020; Accepted Jun 25, 2020; Published Aug 31, 2020.

### 参考文献

- Horton, P., Ruban, A.V. and Walters, R.G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 655–684.
- Niyogi, K.K. (1999) Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 333–359.
- Niyogi, K.K. and Truong, T.B. (2013) Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 307–314.

4. 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.
5. Takahashi, S. and Murata, N. (2008) How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci.* 13, 178–182.
6. Peers, G., Truong, T.B., Ostendorf, E., Busch, A., Elrad, D., Grossman, A.R., Hippler, M. and Niyogi, K.K. (2009) An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis. *Nature* 462, 518–521.
7. Allorent, G., Lefebvre-Legendre, L., Chappuis, R., Kuntz, M., Truong, T.B., Niyogi, K.K., Ulm, R. and Goldschmidt-Clermont, M. (2016) UV-B photoreceptor-mediated protection of the photosynthetic machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 14864–14869.
8. Gagne, G. and Guertin, M. (1992) The early genetic response to light in the green unicellular alga *Chlamydomonas eugametos* grown under light/dark cycles involves genes that represent direct responses to light and photosynthesis. *Plant Mol. Biol.* 18, 429–445.
9. Richard, C., Ouellet, H. and Guertin, M. (2000) Characterization of the LI818 polypeptide from the green unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* 42, 303–316.
10. Miura, K., Yamano, T., Yoshioka, S., Kohinata, T., Inoue, Y., Taniguchi, F., Asamizu, E., Nakamura, Y., Tabata, S., Yamato, K.T., Ohyama, K. and Fukuzawa, H. (2004) Expression profiling-based identification of CO<sub>2</sub>-responsive genes regulated by CCM1 controlling a carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 135, 1595–1607.
11. Yamano, T., Miura, K. and Fukuzawa, H. (2008) Expression analysis of genes associated with the induction of the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 147, 340–354.
12. Naumann, B., Busch, A., Allmer, J., Ostendorf, E., Zeller, M., Kirchhoff, H. and Hippler, M. (2007) Comparative quantitative proteomics to investigate the remodeling of bioenergetic pathways under iron deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proteomics* 7, 3964–3979.
13. Kosuge, K., Tokutsu, R., Kim, E., Akimoto, S., Yokono, M., Ueno, Y. and Minagawa, J. (2018) LHCSR1-dependent fluorescence quenching is mediated by excitation energy transfer from LHCI to photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 3722–3727.
14. Petroustos, D., Tokutsu, R., Maruyama, S., Flori, S., Greiner, A., Magneschi, L., Cusant, L., Kottke, T., Mittag, M., Hegemann, P., Finazzi, G. and Minagawa, J. (2016) A blue-light photoreceptor mediates the feedback regulation of photosynthesis. *Nature* 537, 563–566.
15. Tokutsu, R., Fujimura-Kamada, K., Yamasaki, T., Matsuo, T. and Minagawa, J. (2019) Isolation of photoprotective signal transduction mutants by systematic bioluminescence screening in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Rep.* 9, 2820.
16. Allorent, G. and Petroustos, D. (2017) Photoreceptor-dependent regulation of photoprotection. *Curr. Opin. Plant Biol.* 37, 102–108.
17. Tokutsu, R. and Minagawa, J. (2013) Energy-dissipative supercomplex of photosystem II associated with LHCSR3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 10016–10021.
18. Lau, O.S. and Deng, X.W. (2012) The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends Plant Sci.* 17, 584–593.
19. Huang, X., Ouyang, X.H., Yang, P.Y., Lau, O.S., Chen, L.B., Wei, N. and Deng, X.W. (2013) Conversion from CUL4-based COP1-SPA E3 apparatus to UVR8-COP1-SPA complexes underlies a distinct biochemical function of COP1 under UV-B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 16669–16674.
20. Chen, H., Huang, X., Gusmaroli, G., Terzaghi, W., Lau, O.S., Yanagawa, Y., Zhang, Y., Li, J., Lee, J.-H., Zhu, D. and Deng, X.W. (2010) *Arabidopsis* CULLIN4-Damaged DNA Binding Protein 1 interacts with CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1-SUPPRESSOR OF PHYA complexes to regulate photomorphogenesis and flowering time. *Plant Cell* 22, 108–123.
21. Jang, S., Marchal, V., Panigrahi, K.C.S., Wenkel, S., Soppe, W., Deng, X.W., Valverde, F. and Coupland, G. (2008) *Arabidopsis* COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *EMBO J.* 27, 1277–1288.
22. Liu, L.J., Zhang, Y.C., Li, Q.H., Sang, Y., Mao, J., Lian, H.L., Wang, L. and Yang H.Q. (2008) COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated

- in cryptochrome regulation of flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 292–306.
23. Song, Y.H., Shim, J.S., Kinmonth-Schultz, H.A. and Imaizumi, T. (2015) Photoperiodic flowering: Time measurement mechanisms in leaves. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 441–464.
  24. Zuo, Z.C., Liu, H.T., Liu, B., Liu, X.M. and Lin, C.T. (2011) Blue light-dependent interaction of CRY2 with SPA1 regulates COP1 activity and floral initiation in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 21, 841–847.
  25. Suarez-Lopez, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F. and Coupland, G. (2001) CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410, 1116–1120.
  26. Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A. and Coupland, G. (2004) Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science*. 303, 1003–1006.
  27. Serrano, G., Herrera-Palau, R., Romero, J.M., Serrano, A., Coupland, G. and Valverde, F. (2009) *Chlamydomonas* CONSTANS and the evolution of plant photoperiodic signaling. *Curr. Biol.* 19, 359–368.
  28. Gonzalez-Ballester, D., de Montaigu, A., Galvan, A. and Fernandez, E. (2005) Restriction enzyme site-directed amplification PCR: A tool to identify regions flanking a marker DNA. *Anal. Biochem.* 340, 330–335.
  29. Tokutsu, R., Fujimura-Kamada, K., Matsuo, T., Yamasaki, T. and Minagawa, J. (2019) The CONSTANS flowering complex controls the protective response of photosynthesis in the green alga *Chlamydomonas*. *Nat. Commun.* 10, 4099.
  30. Simpson, G.G., Gendall, A.R. and Dean, C. (1999) When to switch to flowering. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 519–550.
  31. Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R. and Coupland, G. (1995) THE CONSTANS gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc-finger transcription factors. *Cell* 80, 847–857.
  32. Gabilly, S.T., Baker, C.R., Wakao, S., Crisanto, T., Guan, K., Bi, K., Guiet, E., Guadagno, C.R. and Niyogi, K.K. (2019) Regulation of photoprotection gene expression in *Chlamydomonas* by a putative E3 ubiquitin ligase complex and a homolog of CONSTANS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 17556–17562.
  33. Li, X.Y., Mantovani, R., Vanhulstuijnen, R.H., Andre, I., Benoist, C. and Mathis, D. (1992) Evolutionary validation of the CCAAT-binding transcription factor NF-Y. *Nucleic Acids Res.* 20, 1087–1091.
  34. Dolfini, D., Gatta, R. and Mantovani, R. (2012) NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 47, 29–49.
  35. Laloum, T., De Mita, S., Games, P., Baudin, M. and Niebel, A. (2013) CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? *Trends Plant Sci.* 18, 157–166.
  36. Zhao, H., Wu, D., Kong, F., Lin, K., Zhang, H. and Li, G. (2017) The *Arabidopsis thaliana* nuclear factor Y transcription factors. *Front. Plant Sci.* 7, 2045.
  37. Ben-Naim, O., Eshed, R., Parnis, A., Teper-Bamnolker, P., Shalit, A., Coupland, G., Samach, A. and Lifschitz, E. (2006) The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *Plant J.* 46, 462–476.
  38. Gnesutta, N., Kumimoto, R.W., Swain, S., Chiara, M., Siriwardana, C., Horner, D.S., Holt, B.F. and Mantovani, R. (2017) CONSTANS imparts DNA sequence specificity to the hHistone fold NF-YB/NF-YC dimer. *Plant Cell* 29, 1516–1532.
  39. Gnesutta, N., Mantovani, R. and Fornara, F. (2018) Plant flowering: Imposing DNA specificity on histone-fold subunits. *Trends Plant Sci.* 23, 293–301.
  40. Kumimoto, R.W., Zhang, Y., Siefers, N. and Holt, B.F. (2010) NF-YC3, NF-YC4 and NF-YC9 are required for CONSTANS-mediated, photoperiod-dependent flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 63, 379–391.
  41. Myers, Z.A. and Holt, B.F. (2018) NUCLEAR FACTOR-Y: still complex after all these years? *Curr. Opin. Plant Biol.* 45, 96–102.
  42. Wenkel, S., Turck, F., Singer, K., Gissot, L., Le Gourrierec, J., Samach, A. and Coupland, G. (2006) CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 2971–2984.
  43. Thiriet-Rupert, S., Carrier, G., Chenais, B., Trottier, C., Bougaran, G., Cadoret, J.P., Schoefs, B. and Saint-Jean, B. (2016) Transcription factors in microalgae: genome-wide prediction and comparative analysis. *BMC Genomics* 17, 282.
  44. Leliaert, F., Smith, D.R., Moreau, H., Herron, M.D., Verbruggen, H., Delwiche, C.F. and De Clerck, O. (2012) Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Crit. Rev. Plant Sci.* 31, 1–46.

Signal transduction of the protective response of photosynthesis

Ryutaro Tokutsu

National Institute for Basic Biology

解説特集

光合成生物に関連する分子の開発

Editor: 成川 礼 (静岡大)、高林 厚史 (北海道大)

序文

成川 礼 (静岡大) ・高林厚史 (北海道大) 85

解説 光合成生物の細胞内を可視化するツールの開発秘話

久堀 徹 他 (東京工業大) 86

解説 シアノバクテリオクロムの進化的系譜から着想を得た多彩な光変換分子の合理的設計

伏見 圭司 他 (静岡大) 95

解説 非天然カロテノイド生合成経路の進化分子工学

梅野 太輔 (千葉大) 109

## 解説特集

序文<sup>†</sup><sup>1</sup> 静岡大学 理学部生物科学科<sup>2</sup> 北海道大学 低温研究所成川 礼<sup>1\*</sup>、高林 厚史<sup>2</sup>

光合成生物は、地球上のほぼ全ての生物にエネルギーを供給する一次生産者として、地球上で成立している生態系の中で、非常に重要な位置を占めている。光合成生物は光の届くあらゆるところに生育し、それ故に多様な環境に順化・適応した様々な種が存在している。その進化の過程において、光合成生物は光合成装置そのものを多様化させるだけでなく、光合成にまつわる様々な生理現象を獲得し、それに関わる多様な分子を産み出している。光合成生物の生き様を真に捉えるには、光合成そのものだけでなく、これら周辺の現象や分子の理解も必須といえよう。近年のゲノム解析やゲノム編集技術の大幅な進展により、非モデル生物も含めた多様な光合成生物の分子基盤の理解が飛躍的に進んでいる反面、細胞や個体レベルでの生命現象の理解にはまだ道は遠いといえる。

一方、近年の生命科学においては、細胞内の分子や現象を可視化したり制御したりするための開発研究や、合成生物学的アプローチによる開発研究も盛んである。光合成とそれを取り巻く現象や分子は特異な特徴を有していることが多く、上記の開発研究において対象となることも多い。植物の赤色光センサーであるフィトクロムとその相互作用因子を哺乳類細胞で発現させて、光で特定の分子の動態を制御する研究が日本のグループから最近、報告された<sup>1)</sup>。また、近年の光合成に関わる合成生物学的アプローチとしては、大腸菌内でのクロロフィル合成経路の機能的発現が記憶に新しい<sup>2)</sup>。これらの開発研究は、光合成生物由来の分子やシステムを他の生物に導入する研究であるが、光合成生物の現象を理解するための分子開発も精力的に行われており、今後、このような開発研究がさらに発展していくことで、細胞や個体レベルで生命現象を理解するための道が拓けると期待される。

そこで我々は、光合成生物由来の分子の開発や光合成生物で利用可能な分子の開発に焦点を当てた解説特集を組むこととした。まず、東京工業大学の久堀徹氏らには、光合成生物の細胞内の酸化還元状態や酸素をモニターするセンサーの開発について紹介して頂いた。GFP などの蛍光分子やヘム結合分子を駆使し、またある時は、光合成生物のもつユニークな分子を駆使し、多種多様なセンサー分子を続々と開発した一連の研究における開発秘話を披露いただいた。続いて、静岡大学の伏見圭司氏らには、シアノバクテリア特有の光受容分子・シアノバクテリオクロムを基盤とした蛍光プローブ・光スイッチの開発について紹介して頂いた。哺乳類細胞も有する色素・ビリベルジンを結合する分子の開発から、多様な光質を感知する分子の開発まで、光と色にとことんこだわった開発を楽しめる内容となっている。最後に、千葉大学の梅野太輔氏には非天然カロテノイド生合成経路の開発について紹介して頂いた。これまで、カロテノイドの修飾酵素を改変することで、新規のカロテノイド合成に成功する報告はあったが、梅野氏らは大胆な発想と精緻な研究デザインにより、カロテノイドの基本骨格を伸ばすという天然で成し得ていない「偉業」を成し遂げた。

本解説記事で取り上げた 3 つの研究においては、それぞれ三者三様の開発戦略が読み取れる。これらの記事は、今後展開されるであろう、異なる分子を土台とした開発研究にも大きな示唆を与えるの

<sup>†</sup> 解説特集「光合成生物に関連する分子の開発」

ではないだろうか。本解説記事をきっかけに、光合成生物に関連する分子の開発が、より活性化することを期待したい。

本特集の編集にあたっては、コロナ禍の大変な状況の中、執筆者、査読者の方々には大変お世話になった。この場を借りて御礼申し上げる。

1. Uda, Y., Goto, Y., Oda, S., Kohchi, T., Matsuda, M. and Aoki, K. (2017) Efficient synthesis of phycocyanobilin in mammalian cells for optogenetic control of cell signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 11962-11967.
2. Chen, G.E., Canniffe, D.P., Barnett, S.F.H., Hollingshead, S., Brindley, A.A., Vasilev, C., Bryant, D.A. and Hunter, C.N. (2018) Complete enzyme set for chlorophyll biosynthesis in *Escherichia coli*. *Sci. Adv.* 4, eaaq1407.

## 解説

光合成生物の細胞内を可視化するツールの開発秘話<sup>‡</sup><sup>1</sup>東京工業大学 科学技術創成研究院化学生命科学研究所<sup>2</sup>大阪大学 産業科学研究所久堀 徹<sup>1\*</sup>、野亦 次郎<sup>1</sup>、杉浦 一徳<sup>1,2</sup>

「生命現象を可視化する」とは、様々な技術を駆使して、これまで見ることはできなかった生命現象を目に見える形にすることである。下村侑博士が発見した緑色蛍光タンパク質 (GFP) が種を超えて様々な生物における細胞内マーカーとして用いられるようになったことで、以前には見ることはできなかったタンパク質分子の動きまで可視化することができるようになった。生体内の酸化還元現象を主たる研究対象としている我々も、これを可視化しようと考え、これまで複数のセンサータンパク質を作成した。それぞれ、どのような設計思想に基づくものなのか、その特徴とともに紹介する。

## 1. センサータンパク質開発のきっかけ

光合成の電子伝達反応で生じる還元力の大半は、フェレドキシン (Fd) から Fd-NADP レダクターゼ (FNR) を介して NADPH の産生に用いられる。ここで生じた NADPH は、Calvin-Benson 回路において炭素固定反応が行われる際に必要な還元力として用いられている。さらに、Fd からは FNR 以外にも様々な系に還元力が伝達されており、中でも Fd-チオレドキシンレダクターゼ (FTR) -チオレドキシン (Trx) の経路は、その下流で還元力を受け取る Calvin-Benson 回路の酵素群など、いろいろな酵素の活性を調節する役割を担っているという点で、葉緑体代謝系の制御システムとして極めて重要である<sup>1)</sup>。

我々は、2001 年に Trx 親和性クロマトグラフィー (Trx が持つ活性部位の二つの Cys のうち一方を Ser に置換し、このモノシステイン Trx をゲル担体に固定することで、標的タンパク質を混合ジスルフィド結合の形成によって担体に捕捉する方法) を開発し、植物細胞内に当時はまだ知られていなかった様々な酸化還元応答性のタン

パク質が存在することを明らかにした<sup>2)</sup>。我々がこのクロマトグラフィー法を発表したのは、ちょうどシロイヌナズナの全ゲノムが解読された<sup>3)</sup>直後である。当時、質量分析技術が急速に発展したこともあり、我々の発案した網羅的な探索方法の発表を契機として、世界各国の Trx 研究者により類似の方法が様々な生物や細胞内組織を用いて試され、Trx 標的タンパク質の探索が進められた<sup>4,8)</sup>。Trx は、細菌から動植物まで極めて普遍的に生物界に存在するタンパク質であり、上記のプロテオーム解析によって種々のタンパク質の活性が酸化還元の変化で調節されている可能性があることが明らかになってきた。中でも、光合成の場である葉緑体には 300 種類以上のタンパク質が Trx と相互作用する、すなわち、Trx の Cys 変異体と混合ジスルフィド結合を形成する可能性があることがわかった<sup>9)</sup>。レドックスプロテオームやレドックスホメオスタシスという言葉が、よく使われるようになったのもこの頃からである。

<sup>‡</sup> 解説特集「光合成生物に関連する分子の開発」

\*連絡先 E-mail: thisabor@res.titech.ac.jp

こうして、葉緑体内には数多くの酸化還元応答タンパク質が存在する可能性があることが明らかになったため、次にこのようなプロテオーム解析によって同定されたタンパク質が実際に酸化還元応答するものか、あるいは、Trx との相互作用によってその活性が調節されるのか、が調べられるようになった。この研究を行うにあたり、タンパク質上のチオール基の酸化還元状態を化学修飾と電気泳動の組み合わせで調べる方法が多用された<sup>10)</sup>。しかし、当初、利用されていた AMS は分子量が 540 弱しかないため、仮にジスルフィド結合が還元されて 2 分子の AMS が取り込まれても、タンパク質分子全体の分子量変化は、1080 弱である。分子量の小さなタンパク質の場合には、酸化還元状態の変化を見分けるのに十分な分子量変化であるが、5 万、10 万と大きなタンパク質の場合には、電気泳動でそのバンドのシフトを確認するのが困難であった。そこで、我々の研究室では、人工合成した DNA の末端にマレイミド基を導入するという方法で、分子量がより大きな新規のチオール修飾剤 DNA マレイミドを開発した<sup>11,12)</sup>。これを用いることで、分子量の大きなタンパク質の持つシステインの酸化還元状態の変化を見分けることができるようになった。

このように、細胞内の個々のタンパク質の酸化還元状態を調べるツールは作ることができたが、化学修飾法は細胞を強酸や液体窒素などで瞬時に殺してタンパク質の酸化還元状態を固定したときにのみ用いることができる。すなわち、実際に細胞内で酸化還元状態がどのように変化し、それによって個々のタンパク質分子の酸化還元状態が変化するのは、明らかにすることができない。例えば、光合成生物の場合には、光条件が変動することで、光合成電子伝達系の活性は絶えず変動すると考えられるが、このような条件下で光合成生物の細胞内、あるいは、葉緑体内にある酸化還元応答タンパク質がどのように状態を変化させるのかがわからない。これらの疑問に答えたいと考えたことが、我々が細胞内の状態を探るセンサータンパク質を作成しようとしたきっかけである。

## 2. 酸化還元状態センサータンパク質 Oba-Q と Re-Q の開発

2004 年に Tsien らは、緑色蛍光タンパク質 GFP の分子表面に二つの Cys を導入し、その酸化還元状態の変化によって、蛍光の励起スペクトルが変化するタンパク質 roGFP を発表した<sup>13)</sup>。roGFP では、 $\beta$ -バレル構造を形成する  $\beta$ -ストランドの中でも特に発色団の近傍に位置する 2 本の  $\beta$ -ストランドの分子表面側に 2 つの Cys が導入されている。この 2 つの Cys は分子間距離が十分に近く、酸化条件下でジスルフィド結合を形成することができる。このジスルフィド結合の形成によって発色団近傍の構造が変化し、それによって蛍光の励起スペクトルが変化する。しかし、roGFP は発色団の核となるアミノ酸がチロシンであり、その励起スペクトルは環境の pH 変化によっても大きく変動する。また、酸化還元電位を推定するためには、異なる励起波長での蛍光スペクトル測定が必要であるなど、細胞内の酸化還元状態のダイナミクスをモニターする実験系としては不十分であった。

これらの問題点を克服するために、我々はまず青緑色の蛍光タンパク質 CFP<sup>14)</sup>、および、大阪大学産業科学研究所の永井健治教授らが作成した群青色の蛍光タンパク質 Sirius<sup>15)</sup>を用いて、roGFP と同じ位置に Cys を導入した変異タンパク質分子を作成した。CFP と Sirius は発色団の中心となるアミノ酸がそれぞれ Trp と Phe であり、pH 変化による電離状態の変化が起こらないと期待した。しかし、残念なことに、酸化還元による蛍光の変化そのものが全く観察できなかった。そこで、発色団近傍にさまざまなアミノ酸変異を導入して蛍光の変化を調べたところ、酸化状態では蛍光を出す還元状態ではほとんど蛍光を発しない新規のタンパク質を CFP と Sirius をベースとしてそれぞれ開発することに成功した。ここまでに 3 年を要した労作である。そこで、この性質をもったタンパク質を Oba-Q (Oxidation Balance sensed Quenching protein)、CFP と Sirius 由来のものをそれぞれ Oba-Qc、Oba-Qs と命名した<sup>16)</sup>。

分光学的に詳しく調べてみると、Oba-Q は酸化状態、還元状態で吸収スペクトルに変化が見られ

ず、蛍光量子収率が変化することにより、還元状態のときに消光することが分かった。酸化型 DTT と還元型 DTT の量比を変えて溶液の酸化還元電位を変化させる方法で蛍光の消光の度合いをプロットしたところ、Nernst 式に基づいて得られた中点酸化還元電位は CFP をベースとしたもので -249 mV、Sirius をベースとしたもので -232 mV であった。

この Oba-Q の分子構造をモデルとして、その後、中点酸化還元電位が異なり、発色団についても様々なバラエティのものを得ることができるようになった。さらに、変異の入れ方によっては、酸化状態で消光するものも作ることができた。このタンパク質には、**Reduction sensed Quenching protein** ということから **Re-Q** という名前を冠した<sup>17)</sup>。「Re-Q (利休) に尋ねる」と細胞内の酸化還元状態がわかる、という意図である。

分子表面のジスルフィド結合の形成に基づく構造変化が誘導する蛍光の消光の原因は、実際に蛍光タンパク質分子の構造がどのように変化するのかを調べなければわからない。そこで、大阪大学蛋白質研究所の栗栖源治教授、田中秀明准教授との共同研究によって酸化還元により最も大きく蛍光強度が変化する YFP をベースとした変異体 (Re-Qy) について、酸化型 Re-Qy、および、還元型 Re-Qy の構造をミミックする Re-Qy<sub>C147S</sub> (酸化還元応答する Cys の一方を Ser に置換した変異体) の結晶構造解析を行った。その結果、分子表面のジスルフィド結合の形成によって、発色団部分の構造が変化し、近くにある Tyr203 との  $\pi$ - $\pi$  相互作用ができたり、できなかつたりすることがわかった。この構造変化によって、蛍光強度が大きく変化するわけである。

Oba-Q、Re-Q とともに単一の励起波長で蛍光強度を測定することで、系の内部の酸化還元状態を知ることができる、という点では、極めて簡便に測定を行うことができる分子ツールではあるが、その蛍光強度は当然このセンサータンパク質の細胞内での発現量に依存することになる。すなわち、同じ細胞を連続観察して蛍光の変化をみることで細胞内の酸化還元電位の変動はわかるが、最大値がどこにあるのかはわからない。そこで、酸化

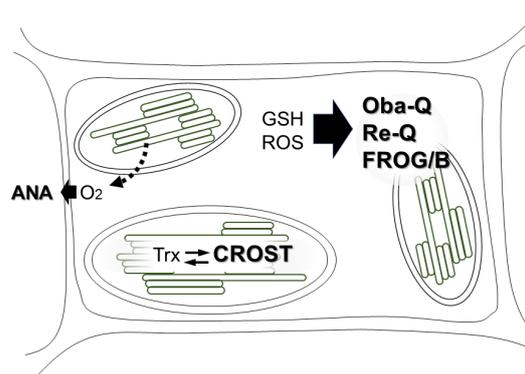


図1. 我々が作成したセンサータンパク質

還元電位の変化に応答しない GFP と Oba-Q や Re-Q を接続したタンパク質を作成した。これによって GFP 蛍光をレファレンスとしてセンサータンパク質のシグナル強度を評価することができるようになった。

また、すでに roGFP で行われているが、Grx やペルオキシダーゼとの融合タンパク質を作成すると、グルタチオン (GSH) や過酸化水素など基質の酸化還元と共役して蛍光が変化するタンパク質を作成することも可能である (図 1)。この方法で、すでに様々な酸化還元物質に対するセンサーが開発されつつある。

### 3. 酸素モニタータンパク質 ANA の開発

光合成が行われると、葉緑体内やシアノバクテリアの細胞内には分子状酸素が生じる。実際に、この酸素は、強光条件など過剰な電子が生じる条件下では、電子を受け取って一重項酸素となり、いわゆる酸化ストレスの原因となる。ところが、これまで葉緑体内やシアノバクテリア細胞内の酸素濃度は直接測定されたことはなく、葉緑体内で生じた酸素分子がどのくらいの速度で細胞質や他の細胞内オルガネラに拡散するのかもわかっていない。光合成生物以外でも、生体内の酸素濃度や酸素の動態は、生命現象を理解する上で必須の情報であるが、これまでに開発された酸素濃度の検出手段は細胞を侵襲する、あるいは溶液中の酸素濃度を測定する酸素電極のようなものであり、細胞内で機能するものはまだ作られていない。

そこで、我々がまず着目したのは、酸素を基質として発光する海洋性発光バクテリアが持っているルシフェラーゼである。よく知られているのは、*Photobacterium phosphoreum* というバクテリアである。新鮮なイカを購入して塩水が少し入ったトレイに入れて冷蔵庫に数日置くと、イカの体表に光るスポットが現れる。この海洋性の発光バクテリアは、このようなスポットから簡単に採取することができる。発光バクテリアのルシフェラーゼは、遺伝子の解析や構造解析が終わっている。そこで、我々はルシフェラーゼに変異を導入して、基質である酸素に対する親和性を様々に変えた変異ルシフェラーゼを得ることを計画したが、この試みは悉く失敗した。

そこで、次に我々が着目したのは、大腸菌などの細菌が持っている天然の酸素センサータンパク質 DosP (Direct oxygen sensor protein) である。DosP は血液中で酸素を輸送するタンパク質であるヘモグロビンと同様にヘムを結合したタンパク質であり、酸素分子を結合・解離する性質を持っている。そこで、この DosP のヘム結合ドメインである DosH 部分を切り出し、適当な蛍光タンパク質と結合させて融合タンパク質を作成することにした。DosH はヘムを持っているので、酸素を結合するとヘモグロビンと同様に吸収スペクトルが変化する<sup>18)</sup>。この吸収帯が変化する領域で応答する蛍光タンパク質をパートナーとすれば、DosH の吸収変化の度合いに応じて、蛍光を変化させるセンサーが作れるのではないかと考えた。

この時、DosH の吸収変化と蛍光タンパク質の蛍光を共役させるためには、両者の色素団を適当な配置に固定する必要がある。このために二種類のタンパク質を接続するリンカー部分の構造が極めて重要であるが、我々は、ここに逆平行のコイルドコイル構造をもつリンカーを導入することで両タンパク質を安定な位置に立体配置する融合タンパク質を作成することに成功した。DosH の酸素親和性が極めて高いため、溶液内の nM レベルの酸素の有無を検出できることから好気条件と嫌気条件を見分けることのできるセンサーという意味で、このセンサータンパク質を

ANA , ANaerobic/Aerobic sensing fluorescence protein と命名した。このセンサータンパク質は、分光特性が類似している二種類の分子間で起こる干渉を利用して蛍光タンパク質の発する蛍光を消光するという現象を利用している点で、従来の FRET 型センサーとは異なる作動原理で機能していると言える<sup>19)</sup>。

このセンサーでは、DosH 部分に酸素が結合すると蛍光の消光が弱まる、つまり蛍光強度が増加し、この変化は酸素濃度依存的である。我々がまだ克服できていない点は、DosH の酸素親和性が高すぎることで、今のところ絶対嫌気か否かを調べる程度のシグナルしか得ることはできない。しかし、ANA を含む溶液中で、シアノバクテリアに光を照射すると、シアノバクテリアが発生する微量の酸素を経時的に測定することができた。まだ ANA を光合成細胞内での測定系に使用するためには、DosH ドメインを細胞内で機能させるためにヘムを合成させる必要があるなど、検討すべき課題は多い (図 1)。

光合成生物では、*Anabaena* sp. PCC7120 のように窒素固定を行う糸状性シアノバクテリアが、窒素固定機能を持つヘテロシストという特殊な細胞を形成する。このヘテロシスト細胞内は酸素に弱いニトロゲナーゼを保護するために極めて嫌氣的に保たれていると言われている。また、ヒトの細胞ではガン化に伴って低酸素状態になることや、バクテリアが細胞内を低酸素状態にすることで酸素に弱いタンパク質を保護しているなどの報告もある。また、微量な活性酸素種が細胞内ではシグナル分子として重要な働きを持っていることも、近年明らかにされている。このように生体内の微量酸素に関する情報は、今後ますます重要性を増すと考えられ、本研究で示した ANA センサーのような生体内で発現可能な酸素センサーは、今後重要な研究手段になるものと期待している。

#### 4. Trx モニタータンパク質 CROST の開発

Trx は、ジチオール-ジスルフィド交換反応により、生体内の還元力を標的となるタンパク質などに伝達し、受け手となる様々な生体分子を調節す

る非常に重要なタンパク質であり、動植物、細菌などほとんど全ての生物が持っている。植物の光合成の場である葉緑体では、Trx は光合成の電子伝達系から還元力を受け取り、葉緑体内の様々な酵素分子に還元力を伝達し多くの場合これらの活性を調節しているため、光合成反応の調節を行う重要なタンパク質として知られている。

光合成では、水の分解によって得られる還元力を NADPH に伝達する光合成電子伝達系がチラコイド膜で働き、光エネルギーを化学エネルギーに変換する光エネルギー変換過程を担っている。一方、stroma では二酸化炭素を有機物に変換する代謝過程 (Calvin-Benson 回路) が働いている。この二つの過程が協調的に機能するためには、特に代謝過程に関わる酵素群の活性が、光合成電子伝達と協調している必要がある。

そこで、両者の共役において最も重要な役割を果たしているタンパク質が、光合成電子伝達系で生じる還元力の一部を酵素分子に受け渡し、酵素分子が持っているジスルフィド結合を還元して活性調節を行う Trx である。したがって、光合成生物では、Trx の酸化還元状態がその機能制御を理解するうえで欠かせない重要な情報といえる。これまで、Trx の酸化還元状態を調べる方法としては、第 1 節でも述べたようにチオール基を化学修飾して電気泳動的に定量する方法が一般的であり、リアルタイムに Trx の酸化還元状態を評価する方法がなかった。

我々は、まず葉緑体が複数持っている Trx アイソフォームのうち、Calvin-Benson 回路の酵素群の活性調節に重要と言われている *f* 型 Trx (*f* はこの Trx が標的とする酵素であることが最初にわかった FBPase に由来する、以降、Trx-*f* と記述する) の酸化還元状態をモニターするタンパク質を作ることとした。葉緑体には、Trx-*f* によって二つある分子内ジスルフィド結合が還元されることで大きく構造変化する CP12 というタンパク質がある<sup>20)</sup>。CP12 は還元状態では伸びた構造を取っているが、酸化条件下では分子内に二組のジスルフィド結合を形成し、その構造変化によって葉緑体酵素である GAPDH 二分子と PRK 二分子を結合して超分子複合体を形成することが知ら

れている。そこで、Trx-*f* による CP12 の還元とこれによる構造変化を反映して蛍光が変化するタンパク質を分子設計することにした。CP12 はシアノバクテリアにも存在することが知られている。しかし、シアノバクテリアは進化的に真核生物由来の Trx-*f* を持っていないため、シアノバクテリアの CP12 は Trx-*f* に対する特異性が弱いと予想される。そこで、シアノバクテリア由来の CP12 をコントロールとして用いることにした。

そして、CP12 のジスルフィド結合を形成する一対の Cys を含む部分配列をリンカーとして用い、二つの蛍光タンパク質を接続することにした。CP12 の約半分の長さの部分配列の両端に、長波長側の蛍光を発する YFP と短波長側の蛍光を発する CFP をそれぞれ結合した。この融合分子では、CP12 断片の酸化還元状態が変化すると、その構造変化によって YFP と CFP の間の距離が変化し、これを蛍光のエネルギー共鳴移動効率の変化として検出することができる。CP12 断片の酸化還元は、Trx の酸化還元状態の変化によって迅速に行われるので、このタンパク質の蛍光の変化は、すなわち Trx-*f* の酸化還元状態の変化と捉えることができる (図 1)。このようにして作成した Trx 酸化還元状態センサータンパク質を、CROST, Change in RedQx State of Thioredoxin と命名した<sup>21)</sup>。葉緑体由来の CP12 断片を利用して作成した CROST は、Trx-*f* の酸化還元状態に特異的にかつ極めて速やかに応答したが、シアノバクテリア由来の CROST は Trx-*f* にも Trx-*m* にも一定程度応答することが分かった。

そこで、この CROST 分子をシロイヌナズナの葉緑体内で発現し、CROST 分子に由来する蛍光の変化を用いて明暗の光条件変化による葉緑体内の酸化還元状態の変化を調べたところ、明所では照射時間に応じて還元レベルが上昇し、暗所では次第に酸化されていくことが分かった。このように経時的な酸化還元応答を追跡するツールができたことで、様々な光条件変化や環境条件変化によって、植物細胞、あるいは、葉緑体内の酸化還元状態がどのように変化するのかを明らかにできるものと期待している。

## 5. ESIPT 型センサータンパク質 FROG/B の開発

第3節で触れたように、生体内の酸化還元状態と活性酸素種は密接に関係している。動物細胞内でも、酸素が電子を受け取る（還元される）と反応性の極めて高い一重項酸素が生成し、これはその後、SOD（スーパーオキシドジスムターゼ）によって過酸化水素に変換される。過酸化水素も反応性の高い ROS なので、ペルオキシダーゼやペルオキシレドキシニンによって無毒化される経路が存在する（抗酸化ストレス系とよぶ）。

本稿では、ここまで光合成の電子伝達系の働きによって誘導される葉緑体内の酸化還元状態の変化に注目してこれまで作成したセンサータンパク質を紹介してきたが、上記の通り、生体内の酸化還元状態としては ROS の存在は極めて重要であるし、実際、ROS がタンパク質や脂質を酸化することによって機能障害を引き起こすことも知られている。抗がん剤の中には、ROS を積極的に生成させることによって、がん細胞自身を殺すというものもある。従って、ROS を測定できるセンサータンパク質は極めて重要と考えられ、Tisen らによって最初に作成された roGFP もペルオキシダーゼとの融合タンパク質を作成することで、ROS のセンサーとして機能できることがすでに報告されている。

しかし、roGFP は酸化状態と還元状態で励起スペクトルが変化することを利用して、蛍光強度の比を取って測定を行うために、2つの励起波長で測定を行う必要があり、通常の装置ではリアルタイムの測定が難しい。また、FRET 型のセンサータンパク質のように 2種類の蛍光タンパク質をリンカーペプチドでつないだ場合には、それぞれの蛍光タンパク質の安定性の違いや成熟速度のコントロールが難しいなど、それぞれに欠点があった。

ESIPT 型の蛍光センサータンパク質では、タンパク質の構造変化が発色団を出発点とする励起状態の分子内プロトン移動 ESIPT (Excited state intramolecular proton transfer) 過程に注目し、何らかのシグナルによって誘導されるセンサータンパク質の構造変化が ESIPT 過程に影響するようにアミノ酸変異を導入したものである。これまで

に、pH センサーである deGFP<sup>22)</sup>やカルシウムセンサーの GEM-GECO<sup>23)</sup>等が作られている。今回、我々は、環境の酸化還元状態の変化によって、GFP 分子表面のシステインペア (Oba-Q や Re-Q でもほぼ同様の位置に導入している) の酸化還元状態が変化して微妙な構造変化を誘導し、これが ESIPT 過程に影響することで発光スペクトルが変化する蛍光タンパク質を作成した。作成に成功したタンパク質では、タンパク質の分子表面にある 2つのシステインが還元状態にあるときには青色の蛍光、酸化ストレスが生じると緑色の蛍光が生じる。単一の励起光でこのような変化を見ることができるので、このセンサータンパク質はこれまで作られたいずれのセンサータンパク質よりも簡便かつ定量的に細胞内の状態変化を調べることができると言える。そこで、この蛍光タンパク質センサーを FROG/B、(Fluorescent protein with RedOx-dependent change in Green/Blue)」と命名した。ちょうど、環境の変化によって体色を変えることのできるアオガエルといったイメージである<sup>24)</sup>。

この FROG/B を、がん細胞のモデル細胞である HeLa 細胞に発現させて、細胞外から過酸化水素、あるいは、抗がん剤 Kp372-1 を加えてみた。Kp372-1 は、細胞内に ROS を発生させることでがん細胞を殺すというものである。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、細胞の蛍光スペクトルの変化を経時的に測定してみると、確かに過酸化水素や Kp372-1 の投与によって細胞内が酸化(細胞内の蛍光スペクトルが緑色帯に変化)することが観察された。細胞内で生じた ROS は、細胞内のレドックス緩衝剤であるグルタチオンの酸化を介してセンサータンパク質の酸化を引き起こしていると考えられる。そこで、FROG/B にグルタレドキシニンを適当なリンカーペプチドを用いてつないでみた。すると、FROG/B 単独に比べて、薬剤投与によって生じる酸化シグナルの応答性が格段に向上した。

次に、FROG/B を糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. 7120 の細胞内に発現させてみた。このシアノバクテリアは、窒素飢餓条件に置くと数珠状に連なった栄養細胞の中に 10~20 個に 1 個

の割合でヘテロシスト（異形細胞）と呼ばれる特殊な細胞が形成される。このヘテロシスト内部では、窒素固定反応を触媒するニトロゲナーゼが、大気中の窒素を直接アンモニアに変換する窒素同化反応を行っているが、ニトロゲナーゼの反応中心は酸素に極めて弱いため、ヘテロシストの細胞内は酸素濃度の低い嫌氣的な状態に保たれているという。そこで、栄養細胞とヘテロシスト、それぞれに FROG/B を発現させ、シアノバクテリアを明暗条件に遷移させたときにどのように蛍光シグナルが変化するかを調べてみた。その結果、暗所から明所に移動した場合には、栄養細胞内部の還元がヘテロシストに比べて早く進むこと、明所から暗所に移動した場合には、ヘテロシスト内部の方がより早く酸化されることなどがわかった。

このように、このセンサーは、従来型のセンサータンパク質に比較して細胞内の酸化還元状態の変化を格段に簡単、かつ経時的に調べることができるツールということができる。例えば、このセンサーをがん細胞に発現しておけば、ROS 発生型の抗がん剤のスクリーニングなどが極めて簡単にできるようになるものと思う。また、光合成生物の研究においても、環境の変化が代謝系酵素の活性制御に及ぼす影響の解析などを容易に行うことができるものと期待している。

## 6. おわりに

本稿で紹介したように、我々はこれまで主に蛍光タンパク質を改変することで、光合成に伴う細胞内の状態変化を可視化することを目指して、各種のセンサータンパク質を開発してきた。しかし、蛍光タンパク質を用いた観察では、必然的にセンサータンパク質を励起するための励起光の照射が必要となる。光合成システムの機能に由来する細胞内の状態変化を観察する場合には、このセンサータンパク質の励起に必要な光が光合成システムに影響することを極力抑えるために励起光強度をぎりぎりまで絞る必要があるなど、技術的な制約も多い。近年、新たなセンサータンパク質として、化学発光タンパク質ルシフェラーゼを蛍光タンパク質と適当なリンカー配列でつなぎ、ル

シフェラーゼの励起エネルギーの共鳴移動によって蛍光タンパク質を励起するという技術が開発されている。このような技術を我々が開発したセンサータンパク質と組み合わせれば、励起光の照射なしに細胞内の状態変化を観察できるようになる。これが実現すれば、我々が当初目指した光合成生物の細胞内や葉緑体内で起こる状態変化を経時的に観察することが可能になるものと期待している。

## 余談

現在は、新しい機能を持った天然のタンパク質を発見して自らネーミングを考えて論文投稿しても、まず認められることはない。既存のタンパク質との関係を明確にした名前が好まれるようである。しかし、人工タンパク質はこの限りではないので、論文著者が好きな名前をつけることができる。我々が名付けた Oba-Q, Re-Q, ANA, CROST はいずれも日本人にしか理解してもらえない名前かもしれないが、それぞれ背景には思い入れがあって、著者達は結構気に入っている。そして、今回、酸化還元センサーとしては決定版ともいえる FROG/B を発表することができた。この最新のセンサータンパク質は、使い勝手がよく国際的に通用する名前を付けることができたので、関連分野の研究者にも広く活用してもらえらるものと期待している。

## 謝辞

本稿で紹介したセンサータンパク質の開発にあたり、大阪大学産業科学研究所の永井健治教授、東京工業大学生命理工学院の原怜助教、東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所の若林憲一准教授には、技術的な重要なサポートを受けたことに対して厚く御礼申し上げます。また、Re-Q の結晶構造解析に尽力していただいた大阪大学蛋白質研究所の栗栖源治教授、田中秀明准教授、ならびに、本稿で紹介した各センサータンパク質の論文の共著者の皆様に厚く御礼申し上げます。

Received Jun 17, 2020; Accepted Jun 29, 2020; Published Aug 30, 2020.

## 参考文献

本解説で取り上げた開発に関する文献を太字で示した。

- Buchanan, B.B., and Balmer, Y. (2005) Redox regulation: a broadening horizon. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 187–220.
- Motohashi, K., Kondoh, A., Stumpp, M.T., and Hisabori, T. (2001) Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11224–11229.
- Arabidopsis* Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796–815.
- Lindahl, M., and Florencio, F.J. (2003) Thioredoxin-linked processes in cyanobacteria are as numerous as in chloroplasts, but targets are different. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 16107–16112.
- Yamazaki, D., Motohashi, K., Kasama, T., Hara, Y., and Hisabori, T. (2004) Target proteins of the cytosolic thioredoxins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45, 18–27.
- Balmer, Y., Vensel, W.H., Tanaka, C.K., Hurkman, W.J., Gelhaye, E., Rouhier, N., Jacquot, J.P., Manieri, W., Schurmann, P., Droux, M., and Buchanan, B.B. (2004) Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2642–2647.
- Kumar, J.K., Tabor, S., and Richardson, C.C. (2004) Proteomic analysis of thioredoxin-targeted proteins in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3759–3764.
- Balmer, Y., Vensel, W.H., Hurkman, W.J., and Buchanan, B.B. (2006) Thioredoxin target proteins in chloroplast thylakoid membranes. *Antioxid. Redox Signal* 8, 1829–1834.
- Montrichard, F., Alkhalfioui, F., Yano, H., Vensel, W.H., Hurkman, W.J., and Buchanan, B.B. (2009) Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *J. Proteomics* 72, 452–474.
- Kobayashi, T., Kishigami, S., Sone, M., Inokuchi, H., Mogi, T., and Ito, K. (1997) Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA-DsbB disulfide bond formation system in aerobically growing *Escherichia coli* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11857–11862.
- Hara, S., Nojima, T., Seio, K., Yoshida, M., and Hisabori, T. (2013) DNA-maleimide: an improved maleimide compound for electrophoresis-based titration of reactive thiols in a specific protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3077–3081.
- Hara, S., Tatenaka, Y., Ohuchi, Y., and Hisabori, T. (2015) Direct determination of the redox status of cysteine residues in proteins *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456, 339–343.
- Dooley, C.T., Dore, T.M., Hanson, G.T., Jackson, W.C., Remington, S.J., and Tsien, R.Y. (2004) Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J. Biol. Chem.* 279, 22284–22293.
- Karasawa, S., Araki, T., Nagai, T., Mizuno, H., and Miyawaki, A. (2004) Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. *Biochem. J.* 381, 307–312.
- Tomosugi, W., Matsuda, T., Tani, T., Nemoto, T., Kotera, I., Saito, K., Horikawa, K., and Nagai, T. (2009) An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. *Nature methods* 6, 351–353.
- Sugiura, K., Nagai, T., Nakano, M., Ichinose, H., Nakabayashi, T., Ohta, N., and Hisabori, T. (2015) Redox sensor proteins for highly sensitive direct imaging of intracellular redox state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 457, 242–248.**
- Sugiura, K., Tanaka, H., Kurisu, G., Wakabayashi, K., and Hisabori, T. (2019) Multicolor redox sensor proteins can visualize redox changes in various compartments of the living cell. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 1098–1107.**
- Delgado-Nixon, V.M., Gonzalez, G., and Gilles-Gonzalez, M.A. (2000) Dos, a heme-binding PAS protein from *Escherichia coli*, is a direct oxygen sensor. *Biochemistry* 39, 2685–2691.
- Nomata, J., and Hisabori, T. (2018) Development of heme protein based oxygen sensing indicators. *Sci. Rep.* 8, 11849.**
- Wedel, N., Soll, J., and Paap, B.K. (1997) CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10479–10484.
- Sugiura, K., Yokochi, Y., Fu, N., Fukaya, Y., Yoshida, K., Mihara, S., and Hisabori, T. (2019) The thioredoxin (Trx) redox state sensor protein can visualize Trx activities in the light/dark**

- response in chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 294, 12091–12098.**
22. Hanson, G.T., McAnaney, T.B., Park, E.S., Rendell, M.E., Yarbrough, D.K., Chu, S., Xi, L., Boxer, S.G., Montrose, M.H., and Remington, S.J. (2002) Green fluorescent protein variants as ratiometric dual emission pH sensors. I. Structural characterization and preliminary application. *Biochemistry* 41, 15477–15488.
23. Zhao, Y., Araki, S., Wu, J., Teramoto, T., Chang, Y. F., Nakano, M., Abdelfattah, A.S., Fujiwara, M., Ishihara, T., Nagai, T., and Campbell, R.E. (2011) An expanded palette of genetically encoded Ca<sup>2+</sup>(+) indicators. *Science* 333, 1888–1891.
24. **Sugiura, K., Mihara, S., Fu, N., and Hisabori, T. (2020) Real-time monitoring of the in vivo redox state transition using the ratiometric redox state sensor protein FROG/B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 16019–16026**

## Development of the tools to visualize the intracellular conditions in photosynthetic organisms

Toru Hisabori<sup>1</sup>, Jiro Nomata<sup>1</sup>, and Kazunori Sugiura<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology

<sup>2</sup>The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University

## 解説

シアノバクテリオクロムの進化的系譜から着想を得た多彩な光変換分子の合理的設計<sup>†</sup>

静岡大学 理学部生物科学科  
伏見 圭司、成川 礼\*

近年、光受容体の光化学的特性を利用して、光照射によって生体分子の動態を検出する「蛍光プローブ」やその活性を制御する「光スイッチ」の開発が進められている。今日まで、国内・国外の研究グループによって、様々なシアノバクテリアのゲノム情報から光受容体・シアノバクテリオクロムが探索され、幅広い波長領域で光を感知する光変換分子が発見されてきた。著者らは、長波長型光変換分子や短波長型光変換分子を解析し、応用研究に向けた分子基盤を構築してきた。将来、この基盤を拡張することができれば、目的や需要に合わせたテーラーメイド型の蛍光プローブや光スイッチを創出することも可能になるかもしれない。

## 1. はじめに

光は、光質（波長）、光量（強度）、照射場所、照射時間という4つのパラメーターを厳密に制御することが可能なツールであり、様々な分析技術に利用されている。近年、光受容体の光化学的特性を利用して、光照射によって生体分子の動態を検出する「蛍光プローブ」やその活性を制御する「光スイッチ」の開発が進められている。

光受容体は、光質や光量を感じ取る色素タンパク質であり、特定の光を吸収することで、生命現象の引き金となる分子機構を制御する機能をもつ。近年、科学技術の発展に伴い、様々な生物のゲノム情報が公開されている中、光受容体の遺伝子は、光合成生物から非光合成生物にまで広く存在していることが知られている。古くにはフィトクロムが発見され<sup>1,2)</sup>、今日に至るまで、その分子構造や色調節機構が解析されている<sup>3-14)</sup>。最近では、そのホモログであるシアノバクテリオクロムが発見され<sup>2,15)</sup>、現時点では、シアノバクテリアだけにしかその存在が確認されていない。光を感知するための構成単位として、フィトクロムは

PAS ( Per/Arnt/Sim ) 、 GAF ( cGMP-phosphodiesterase/adenylate cyclase/FhlA ) 、 PHY ( phytochrome-specific ) の3つのドメインを必要とするが、シアノバクテリオクロムは GAF ドメインのみで十分である (図1A)。これらの分子は、共通して、GAF ドメインの色素結合ポケットにビリン色素 (開環テトラピロール構造を基本骨格とする化合物) を取り込むことで、その共役系の長さに反映した波長の光を吸収することができる (図1B)。ビリン色素は、光の吸収によって Z/E 異性化反応が誘起され (図1C)、それに伴って、タンパク質全体の分子構造が可逆的に変化する。この反応は「光変換」と呼ばれ、基底状態 dark state / 励起状態 photoproduct state の2つの光感知型が観察される。光変換の概要については、著者らが過去に執筆した和文総説<sup>16)</sup> や英文総説<sup>17)</sup> を参考にされたい。

今日まで、国内・国外の研究グループによって、様々なシアノバクテリアのゲノム情報からシアノバクテリオクロムが探索され、幅広い波長領域で光を感知する光変換分子 (シアノバクテリオク

<sup>†</sup> 解説特集「光合成生物に関連する分子の開発」

\*連絡先 E-mail: narikawa.rei@shizuoka.ac.jp

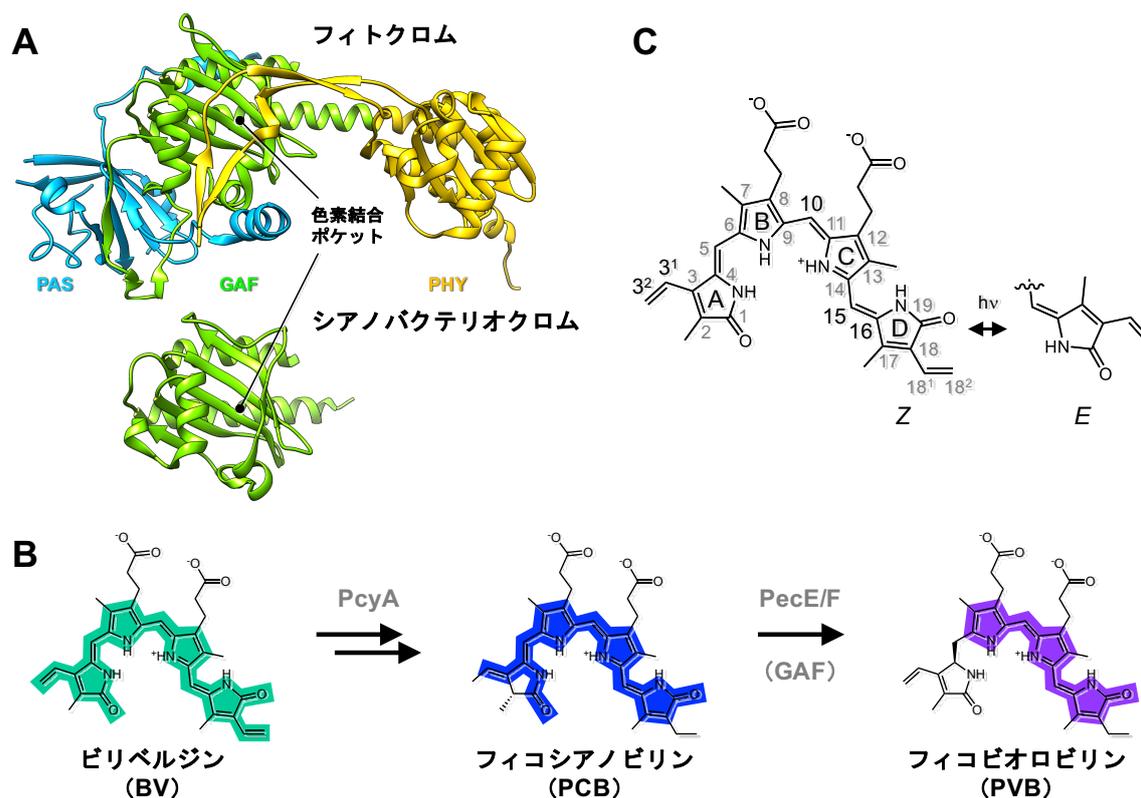


図1. ビリン色素結合型光受容体の構造

(A) フィトクロムやシアノバクテリオクロムの光感知に必要な領域。(B) ビリン色素の構造と生合成経路。様々な生き物がもつヘムを前駆体にしてビリベルジン (BV) が合成される。シアノバクテリアは、還元酵素によって BV をフィコシアノビリリン (PCB) に変換する。一部のシアノバクテリオクロムは、色素結合ポケットに取り込んだ PCB をフィコビオロビリリン (PVB) に変換する機能をもつ。(C) フィトクロムやシアノバクテリオクロムに結合するビリリン色素の Z/E 異性化反応。特定の波長の光を吸収することで C15-C16 位の幾何異性が生じ、光変換を誘起する。フィトクロムやシアノバクテリオクロムで保存されている重要な Cys 残基は、ビリリン色素の C3<sup>1</sup> 位または C3<sup>2</sup> 位に対して不可逆的な共有結合を形成する。また、一部のシアノバクテリオクロムで保存されているもう 1 つの重要な Cys 残基は、光変換に伴って、ビリリン色素の C10 位に対して可逆的な共有結合を形成する。

ロムの GAF ドメイン) が発見されている<sup>15,18-46</sup>。これらのアミノ酸配列と光変換の特徴を比較することで、いくつかの系統に分類することができる(図2A)。中でも、赤色光 / 緑色光感知型と青色光 / 緑色光感知型の光変換分子については、NMR 分光法や X 線結晶構造解析法など様々な分析法による解析が進められている。その結果、基底状態と励起状態の両方での構造が決定され、分子構造と色調節機構の詳細が解明されている(図2B、C)<sup>47-51</sup>。

著者らは、シアノバクテリオクロムに焦点を当て、これまでに蓄積されてきた知見を基にして、多彩な光変換分子を発見ないし改変してきた<sup>22-</sup>

<sup>27,34,36,52,53</sup>)。さらに、これらの分子構造や色調節機構を解明することで、蛍光プローブおよび光スイッチを設計するための分子基盤を構築してきた。本稿では、著者らが研究してきた、長波長型光変換分子を基盤にした「哺乳類内在性色素を結合する近赤外光感知型分子」<sup>25</sup>) と短波長型光変換分子を基盤にした「多段階的変異導入法で創出した8種類の可視光感知型分子」<sup>26</sup>) について解説するとともに(図3A-J)、それぞれの応用例について紹介する。

## 2. ユニークなシアノバクテリア・*Acaryochloris marina* がもつ長波長型光変換分子

著者らは、ユニークなシアノバクテリア・*Acaryochloris marina* に着目し、ゲノム情報からシアノバクテリオクロムを探索してきた。一般的なシアノバクテリア (*Synechocystis* sp. PCC 6803、*Anabaena* sp. PCC 7120 等) は光合成反応中心色素としてクロロフィル *a* を利用するが、*A. marina* はそれよりも長波長の光を吸収するクロロフィル *d* を利用することが知られている<sup>54,55)</sup>。加えて、著者らの研究グループでは、ビリン色素合成系について、一般的なシアノバクテリアはビリベルジン (BV) からフィコシアノビルン (PCB) を合成する還元酵素 (PcyA) を1つしかもたないのに対し、*A. marina* は反応速度が異なる還元酵

素を2つもっていることを発見しており、これらを使い分けることで、長波長の光感知に適した生存戦略を獲得している可能性を提示している<sup>56)</sup>。つまり、*A. marina* がもつシアノバクテリオクロム、延いては、光変換分子は長波長の光を感知できるのではないかと考えた。この仮説の下、*A. marina* に由来し、赤色光 / 緑色光感知型に分類される光変換分子・AM1\_1557g2、AM1\_C0023g2 の解析を行った<sup>22,36)</sup>。赤色光 / 緑色光感知型の光変換分子は、PCB を結合することで、赤色光と緑色光で光変換を示すことが知られており、これまでの常識では、その前駆体である BV は結合しないとされていた (図3A、K)。

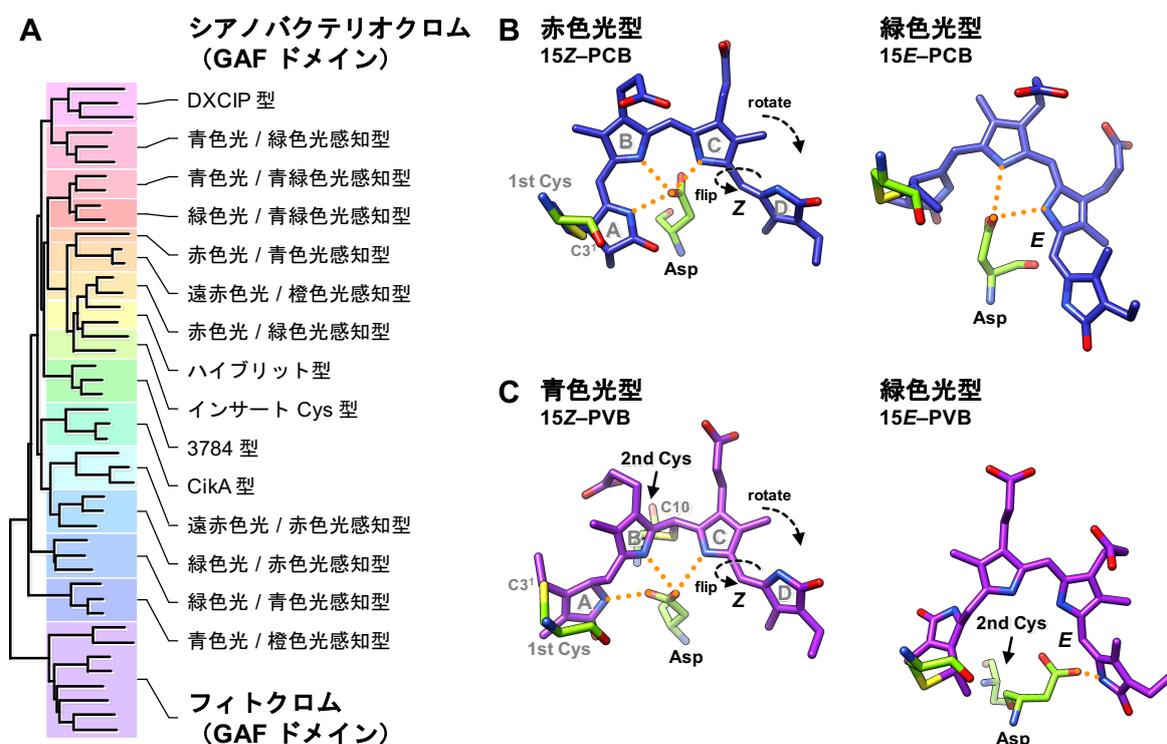


図2. 光変換分子の多様性と分子機構

(A) 光変換分子 (シアノバクテリオクロムの GAF ドメイン) の分子系統樹。アミノ酸配列と光変換の特徴によって各系統に分類される。外群として、フィトクロムの GAF ドメインを比較している。(B、C) 典型的な長波長型光変換分子および短波長型光変換分子の分子機構。(B) 長波長型は PCB を結合することで、赤色光 / 緑色光感知型の光変換を示す。基底状態では 15Z-PCB、励起状態では 15E-PCB が結合する (図には NpR6012g4 の赤色光吸収型 (PDB ID : 6BHN)、緑色光吸収型 (PDB ID : 6BHO) の構造をそれぞれ示す)。

(C) 短波長型は PVB を結合することで、青色光 / 緑色光感知型の光変換を示す。基底状態では 15Z-PVB、励起状態では 15E-PVB が結合する (図には TePixJg の青色光吸収型 (PDB ID : 4GLQ)、緑色光吸収型 (PDB ID : 3VV4) の構造をそれぞれ示す)。長波長型、短波長型ともに、光変換に伴って、ビリン色素の D 環部分の反転 (flip) と構造全体の回転 (rotate) が起こる (flip and rotate と呼ばれる)。ビリン色素の構造に合わせて、保存された Asp 残基の側鎖のカルボニル基が水素結合を形成し、構造を安定化している。



く、哺乳類の細胞または組織に豊富に存在するヘムやメラニンに吸収されにくい。つまり、BV を結合する光変換分子は、哺乳類個体レベルでの光スイッチの適用において、非常に有効な分子基盤となる。ここで著者らは、「なぜ、一般的なシアノバクテリアに由来する光変換分子は BV を結合することができず、*A. marina* に由来する光変換分子は BV を結合することができるのか？」という基礎的な疑問に至るとともに、これを解決することが蛍光プローブや光スイッチの開発の重要な情報基盤になると考え、この分子機構の解明に着手した。

結晶構造が明らかにされている *A. 7120* 由来の PCB を結合する長波長型光変換分子・AnPixJg2<sup>49)</sup> を土台にして、まず、BV に対する親和性を確認した。その結果、BV を結合し、遠赤色光と橙色光で光変換を示すものの、BV の結合効率やタンパク質の発現効率が非常に低いことから、BV に対する親和性は低いと考えられた (図 4 A、B)。そこで、この構造情報を基に、BV を殆ど結合しない光変換分子と BV を顕著に結合する光変換分子のアミノ酸配列を比較し、特異的なアミノ酸残基の抽出を試みた。変異導入法による検証を繰り返し行った結果、最終的に、4 つ

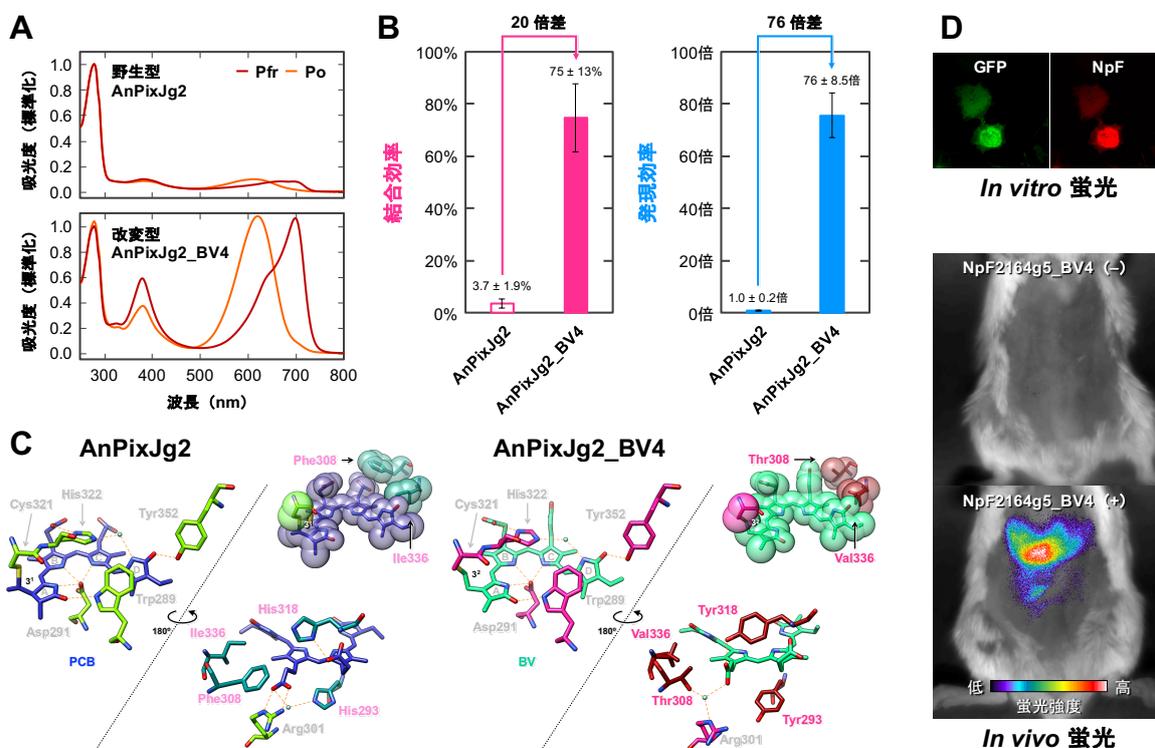


図4. 哺乳類内在性色素を結合する長波長型光変換分子の分子機構と応用利用

(A) BV を殆ど結合しない野生型の AnPixJg2 (上) と BV を顕著に結合する改変型の AnPixJg2\_BV4 (下) の吸収スペクトルの比較。(B) AnPixJg2 と AnPixJg2\_BV4 の色素結合効率 (左) と発現効率 (右) の比較。色素結合効率は、タンパク質と色素のモル比から算出した値 (平均値 ± 標準偏差) を示している。t 検定の結果、野生型と改変型の差は統計学的に有意であることが示された (n = 5、P < 0.01)。発現効率は、タンパク質を発現させた大腸菌の菌体量と精製画分のクロマトグラムの面積値の比から算出した値 (平均値 ± 標準偏差、比較のために野生型の値で標準化) を示している。t 検定の結果、野生型と改変型の差は統計学的に有意であることが示された (n = 4、P < 0.01)。(C) PCB 結合型 AnPixJg2 (PDB\_ID: 3W2Z) と BV 結合型 AnPixJg2\_BV4 (PDB\_ID: 5ZOH) の結晶構造の比較。色素の結合に重要なアミノ酸残基 (灰色で表記)、変異導入前 (薄いピンク色で表記) および変異導入後 (濃いピンク色で表記) のアミノ酸残基をそれぞれ示した。(D) BV を結合する改変型の NpF2164g5\_BV4 の近赤外光の蛍光観察。哺乳類の細胞 (上段) およびマウスの個体 (下段) から検出した NpF2164g5\_BV4 の近赤外光を示した。Fushimi et al., *PNAS*, (2019) より引用<sup>25)</sup>。

のアミノ酸残基が BV の結合に重要であることを特定した (図 3 L)。野生型の AnPixJg2 に対して、これらの箇所に変異導入 (His<sub>293</sub>Tyr、Phe<sub>308</sub>Thr、His<sub>318</sub>Tyr、Ile<sub>336</sub>Val) を施した改変型の AnPixJg2\_BV4 は BV を高効率に結合し、遠赤色光と橙色光で光変換を示すことを確認した (図 4 A)。統計学的にも、AnPixJg2\_BV4 は BV の結合効率およびタンパク質の発現効率が AnPixJg2 よりも有意に高いことが示された (図 4 B)。

続いて、「なぜ、たった4つのアミノ酸残基を置換するだけで、BV に対する親和性が向上するのか？」という新たな疑問に至る。その分子機構を解明するために、BV を結合した AnPixJg2\_BV4 の結晶を作製し、X 線結晶構造解析によって分子構造を決定した (図 4 C)。PCB を結合する AnPixJg2 の分子構造と BV を結合する AnPixJg2\_BV4 を比較した結果、光変換分子の色素結合ポケット内部に保存される重要な Cys 残基 (1st Cys または canonical Cys) とビリネ色素が結合する位置が異なっており、PCB を取り込んだ場合は C3<sup>1</sup> 位に、BV を取り込んだ場合は C3<sup>2</sup> 位に対して共有結合を形成していた。それに伴って、色素の空間的な位置がずれていた。興味深いことに、PCB と比べて BV は色素結合ポケットの奥側にずれているのにも関わらず、色素の結合に重要なアミノ酸残基 (図 4 C の灰色の文字で表示) の配座は非常に似ていた。野生型の4つのアミノ酸残基 (図 4 C の薄いピンク色の文字で表示) に対して、改変型のもの (図 4 C の濃いピンク色の文字で表示) は、色素の近くの Arg 残基と協働的に作用し、空間的な位置のずれによって生じた立体障害を回避するとともに、新たな水素結合ネットワークを形成することで BV を安定的に結合させていた。特に、野生型の Phe<sub>308</sub> と Ile<sub>336</sub> は、その高さが立体障害となって BV の結合効率を大きく低下させている、逆に言えば、改変型の Thr<sub>308</sub> と Val<sub>336</sub> は、その高さを抑えることで BV の結合効率を大きく向上させていた (詳細については、元の論文を参考にされたい)<sup>25</sup>。また、注意深く観察すると、その巧妙な相互作用によって、PCB および BV の C 環上のプロピオン酸の配向を調整し、それ

ぞれのビリネ色素を巧妙に取り込んでいることが分かった。

このような構造情報から、4 アミノ酸の置換が BV 結合能に広く寄与すると期待し、BV を結合しない他のホモログ分子にも変異導入を施したところ、いくつかの分子に対しては BV の結合能力が付加された。Nostoc punctiforme PCC 73102 に由来する NpF2164g5 は、PCB を結合することで、光変換を示さない代わりに赤色光の蛍光を示すが<sup>40</sup>、改変した NpF2164g5\_BV4 は、BV を結合することで、同様の性質を保ったまま近赤外光の蛍光を示した。この特性に着目し、哺乳類の培養細胞およびマウス個体の肝臓で発現させたところ、*in vitro* および *in vivo* のどちらの実験系においても、生きた状態の細胞や組織から近赤外光の蛍光を観測することに成功した (図 4 D)。この分子の蛍光量子収率は約 4% であり、残念ながら、既存の近赤外光の蛍光分子と比べてその値は同程度か低く<sup>57-59</sup>、現段階での実用性はさほど高くないが、この分子にさらなる変異導入を施すことで、より明るい蛍光分子に改変できるのではないかと期待している。

#### 4. ユニークなシアノバクテリア・Acaryochloris marina がもつ短波長型光変換分子

前項では、幅広い波長領域で光感知を示す光変換分子の中で、PCB または BV を取り込むことで、赤色光 / 緑色光感知型または遠赤色光 / 橙色光感知型の光変換を示すものについて述べた (図 2 A)。また、これらの分子の色素結合ポケットの内部には 1st Cys が保存されており、それぞれのビリネ色素を取り込むために重要であることについても述べた (図 2 B)。

光変換分子には、この 1st Cys とは別に、もう一つの重要な Cys 残基 (2nd Cys) が保存されているサブファミリーが広く存在する (図 2 C)<sup>15,21,27,31,41,42,46</sup>。この 2nd Cys には、主に2つの機能が備わっている。1つは、色素結合ポケットに取り込んだ PCB をフィコピオロビリネ (PVB) に変換する反応を補助する機能である (異性化反応) (図 1 B)。PVB は PCB と比べて共役系が短いため (図 1 B)、PVB を結合する光変換分子

は、PCB を結合する光変換分子よりも短波長の光を吸収する。もう1つは、光変換に伴って、ビリネ色素の C10 位に対して可逆的な共有結合を形成する機能である(脱着反応) (図2C)。この反応によって、結合するビリネ色素の共役系が大幅に短くなるため、2nd Cys を結合した基底状態では、解離した励起状態よりも極度に短波長の光を吸収する。典型的な光変換分子は、これら

の機能を合わせもち、PVB を結合することで、青色光と緑色光で光変換を示すことが知られている(図3K、図5A-i) <sup>15,31,47,49,60</sup>。一方、非典型的な光変換分子として、どちらかの機能が欠如したものが知られている <sup>27,41,42,46</sup>。異性化反応を示さないものは、励起状態で黄色～橙色の光を吸収し(図5A-ii)、脱着反応を示さないものは、基底状態で黄緑色～黄色の光を吸収する(図5A-

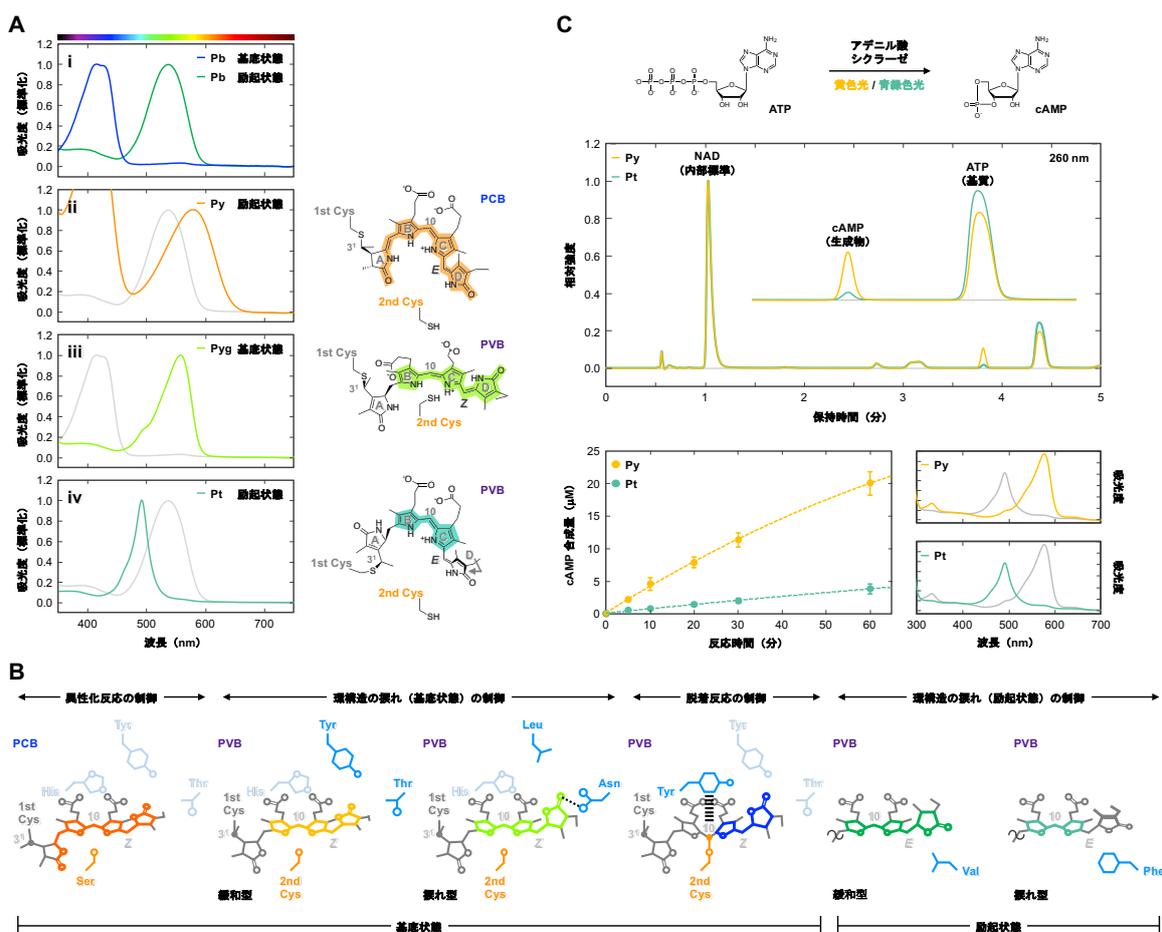


図5. 多彩な光変換を示す短波長型光変換分子の創出と応用利用

(A) 典型的な光変換分子と非典型的な光変換分子の吸収スペクトルの比較。(i) 典型的な光変換分子 (基底状態で青色光、励起状態で緑色光を吸収)。(ii) PCB の異性化反応を示さない光変換分子 (励起状態で黄色光～橙色光を吸収)。(iii) 2nd Cys の脱着反応を示さない光変換分子 (基底状態で黄緑色光～黄色光を吸収)。(iv) D 環の振れを示す光変換分子 (trapped-twist と呼ばれる。励起状態で青緑色光を吸収)。非典型的な光変換分子の各状態におけるビリネ色素の立体構造と共役系を示した。(B) 光変換分子の色調節機構のモデル図。AM1\_1499g1 の解析を基に、異性化反応の制御、脱着反応の制御、基底状態および励起状態における環構造の振れの制御に関わるアミノ酸残基をそれぞれ示した。(C) 黄色光 / 青緑色光感知型光変換分子を用いた光依存性アデニル酸シクラーゼの活性測定。創出したキメラタンパク質と基質のアデノシン三リン酸 (ATP) を混合し、黄色光照射下 (青緑色光感知型) または青緑色光照射下 (黄色光感知型) で酵素反応を行った。反応後のサンプルから高速液体クロマトグラフィーによって生成物の環状アデノシン一リン酸 (cAMP) を検出 (上) し、反応時間ごとの合成量 (下) を比較した。cAMP は、内部標準のニコチンアミド (NAD) を利用して定量した。Fushimi et al., *PNAS*, (2020) より引用<sup>26</sup>。

iii)。また、2nd Cys の2つの機能とは別に、ピリン色素の B-C 環平面に対して D 環部分を高度に振ることで共役系の拡張範囲を制限し、吸収波長領域を短波長にシフトさせるものも知られている(環構造の振れ)(図5 A-iv)<sup>21,27,41,42,46,61,62</sup>。環構造が振れたものは、励起状態で青緑色の光を吸収する(図5 A-iv)。

著者らは、*A. marina* に保存されている 2nd Cys をもつ光変換分子の機能を網羅的に解析し、典型的な青色光 / 緑色光感知型の光変換分子から非典型的な青色光 / 橙色光感知型、黄緑色光 / 青緑色光感知型、青色光 / 青緑色光感知型の光変換分子まで、様々な種類のを同定してきた<sup>27</sup>。これらを解析する過程で、2nd Cys をもつサブファミリーに属するにも関わらず、その証とも言うべき 2nd Cys をもたない光変換分子・AM1\_1499g1 を発見した(図3 L)。著者らは、早速、解析を進め、AM1\_1499g1 は、PCB を結合することで、橙色光と緑色光で光変換を示すことを明らかにした(図3 C)。この光変換分子について考察すると、2nd Cys の代わりに Ser をもつことから、「異性化反応」、「脱着反応」が起きていないと考えられる(図5 B)。また、励起状態が青緑色光感知型となる光変換分子と近縁であることから、この分子は励起状態において「環構造の振れ」が生じていると考えられる。これまでに報告されていなかった、新たな分光特性をもつ光変換分子を発見することができたといえる。

## 5. 多段階的変異導入法で創出した8種類の可視光感知型分子の色調節機構と応用利用

AM1\_1499g1 を含めた近縁の光変換分子は、「異性化反応」、「脱着反応」、「環構造の振れ」という3つの色調節機構の組み合わせによって多様化している。著者らは、この光変換分子の色調節機構を改変し、様々な光変換分子を創出することができれば、多彩な可視光領域で観察・制御可能な蛍光プローブや光スイッチの分子基盤になると考え、この光変換分子の変異導入に着手した。まず、2nd Cys の代わりに Ser をもつ野生型の AM1\_1499g1 に対して、Cys を復帰(Ser<sub>118</sub>Cys)させた改変型の光変換分子1は、PVB を結合す

ることで、黄色光と青緑色光で光変換を示した(図3 D)。野生型と比べて、“基底状態と励起状態の両方でブルーシフト(吸収極大の短波長側への偏移)が起きているが、極度な偏移は起きていない”、“青緑色の光を吸収する”ことから、「異性化反応」のみが付加され、「環構造の振れ」は維持されていると考えられる。

ところで、光変換分子1は、基底状態で黄色の光を吸収するが、これと同様の色調節機構をもつ天然の光変換分子は、黄緑色の光を吸収する<sup>27,41,46</sup>。色調に執拗なまでに拘る著者らには、この僅かな差(波長にして約 20 nm)が大きく映り、その差を生み出す分子機構に興味に向かう。そこで、結晶構造が明らかにされている *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 由来の PVB を結合する短波長型光変換分子・TePixJg<sup>47,49</sup> の構造情報を基に、各光変換分子のアミノ酸配列を比較し、特異的なアミノ酸残基の抽出を試みた。その結果、AM1\_1499g1 において特異的に Tyr、Thr となっている箇所が、他の光変換分子では Leu、Asn として保存されていることを見いだした(図3 L)。この Tyr/Leu 部位および Thr/Asn 部位を変異導入(Tyr<sub>151</sub>Leu、Thr<sub>159</sub>Asn)した改変型の光変換分子2は、PVB を結合することで、黄緑色光と青緑色光で光変換を示すことを確認した(図3 E)。つまり、元分子に対して、基底状態のみが短波長側に偏移している。光変換分子とピリン色素の構造から、Tyr / Leu 部位および Thr / Asn 部位は、色素の D 環部分の振れを調整し、Leu と Asn 残基の存在によって共役系の拡張範囲が制限されていることが示唆される(図5 B)。前項で述べた“振れ”は、励起状態における色調節機構であるのに対して、著者らが示した“振れ”は、基底状態における色調節機構であると言える。

続いて、2nd Cys の脱着反応が起きるものと起きないものには、どのような違いがあるのかを明らかにするために、同様の方法で、特異的なアミノ酸残基の抽出を試みた。その結果、2nd Cys の脱着反応を示す青色光 / 青緑色光感知型の光変換分子において特異的に Tyr となっている箇所、他の光変換分子では His として保存されて

いることを見いだした(図3L)。この His/Tyr 部位を変異導入(His<sub>147</sub>Tyr)した改変型の光変換分子3は、PVBを結合することで、青色光と青緑色光で光変換を示すことを確認した(図3F)。光変換分子とビリン色素の構造から、His/Tyr 部位は、2nd Cys と共に色素の C10 位を挟むように配置されており、Tyr の嵩高さによって色素が 2nd Cys の方向に押し込まれることで、共有結合の形成が起こりやすくなっていると考えられる(図5B)。

さて、ここまで4種類の光変換分子を得ることに成功したが、これらは、どれも励起状態において「環構造の振れ」が生じていると考えられる。この振れは、D 環付近の高度に保存された Phe によって制御されていると報告されている(図3L)<sup>61,62</sup>。そこで、この先行研究に従い、さらなる改変を試みた。野生型の光変換分子の Phe 部位を変異導入(Phe<sub>97</sub>Val)した改変型の光変換分子4は、PCBを結合することで、橙色光と黄色光で光変換を示し(図3G)、改変型の光変換分子1・2・3にその変異導入を施した光変換分子5・6・7は、PVBを結合することで、黄色光と緑色光、黄緑色光と緑色光、青色光と緑色光でそれぞれ光変換を示すことを確認した(図3H-J)。それぞれの元分子と比べて、“励起状態のみでレッドシフト(吸収極大の長波長側への偏移)が起きている”ことから、「環構造の振れ」が緩和されていると考えられる(図5B)。以上をまとめると、多段階的変異導入によって、3つの色調節機構を巧みに組み合わせ、1つの天然分子から8種類の光変換分子を得ることに成功した(図3C-J)。

最後に応用面に焦点を当て、これらの光変換分子が、光スイッチの分子基盤となり得るのかを検証するために、以前、著者らが開発した光依存性アデニル酸シクラーゼを基盤にしたキメラタンパク質の作製を試みた<sup>24</sup>。これまでに様々な光スイッチが開発されてきた中で<sup>63-72</sup>、未開拓の黄色光と青緑色光の波長領域に着目し、黄色光 / 青緑色光感知型の光依存性アデニル酸シクラーゼを創出した。黄色光および青緑色光を照射しながらその活性を測定したところ、黄色光照射下(青

緑色光感知型)に比べて、青緑色光照射下(黄色光感知型)の方が約5倍高い活性を示した(図5C)。今回、著者らが検証した制御系は、ほんの一例に過ぎないが、今後、様々な光変換分子と活性分子を組み合わせることで、多彩な光スイッチを構築し、多波長光による制御系を創出することが可能になるかもしれない。

## 6. おわりに

著者らは、長波長型光変換分子と短波長型光変換分子をそれぞれ基盤にし、構造情報と配列情報から合理的に変異導入を施すことで、光変換分子-ビリン色素間の親和性や色調節機構を改変することに成功した。これら二つの改変は波長領域という点で相補的であり、幅広い波長領域の光で観察・制御可能な蛍光プローブや光スイッチを創出するための大きなブレイクスルーになると期待している。

本稿で書き綴るのは過分になるため、要点のみに留めるが、著者らは、長波長型光変換分子の中で、*A. marina* に由来し、短波長型光変換分子に保存されているものとは別の 2nd Cys をもつ光変換分子・AM1\_1186g2 を発見しており、PCB を結合することで、赤色光と青色光で光変換を示すことを明らかにしている<sup>34</sup>。この光変換分子に“BV4”変異を導入しても、BV 結合能を付与させることはできなかったが、別の戦略から変異導入を施すことで、BV の結合能を大幅に向上させることにも成功している<sup>53</sup>。また、短波長型光変換分子の中で、*Cyanotheca* sp. ATCC 51142 に由来し、色素を安定的に取り込むために必須の 1st Cys をもたず、2nd Cys のみをもつ cce\_4193g1 を発見しており、結合している色素種は不明であるが、黄緑色光の強度を感知することを明らかにしている<sup>23</sup>。この光変換分子は新規性が高いため、これまでの構造情報から、「1st Cys に代わって 2nd Cys が“どのような色素”を“どのように結合”しているか」を予測するのは極めて難しい。現在、この詳細な分子構造を明らかにするために、この光変換分子の結晶を作製し、精力的に解析を進めている。

これまでに様々なシアノバクテリオクロムから多彩な光変換分子の分光特性が明らかにされてきたが、構築されてきた情報と常識に捕らわれない発想を駆使することで、未だに発掘されていない新規の光変換分子を発見できるのではないかと期待している。さらに、その色調節機構を明らかにし、基盤を拡張することができれば、研究者の目的や需要に合わせたテーラーメイド型の蛍光プローブや光スイッチを創出することも可能になるかもしれない。

## 謝辞

本研究は、JST・CREST (JPMJCR1653)、科研費若手 A (26702036) の支援のもとに行われた。また、本稿で紹介したシアノバクテリオクロム関連論文の共著者の皆様に厚く御礼申し上げます。

Received Aug 1, 2020; Accepted Aug 8, 2020; Published Aug 31, 2020.

## 参考文献

本解説で取り上げた設計に関する文献を太字で示した。

1. Butler, W.L., Norris, K.H., Siegelman, H.W., and Hendricks, S.B. (1959) Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 45, 1703–1708.
2. Rockwell, N.C., and Lagarias, J.C. (2010) A brief history of phytochromes. *ChemPhysChem* 11, 1172–1180.
3. Anders, K., Daminelli-Widany, G., Mroginski, M.A., von Stetten, D., and Essen, L.-O. (2013) Structure of the cyanobacterial phytochrome 2 photosensor implies a tryptophan switch for phytochrome signaling. *J. Biol. Chem.* 288, 35714–35725.
4. Bellini, D., and Papiz, M.Z. (2012) Structure of a bacteriophytochrome and light-stimulated protomer swapping with a gene repressor. *Structure* 20, 1436–1446.
5. Bhoo, S.H., Davis, S.J., Walker, J., Karniol, B., and Vierstra, R.D. (2001) Bacteriophytochromes are

- photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature* 414, 776–779.
6. Burgie, E.S., Bussell, A.N., Walker, J.M., Dubiel, K., and Vierstra, R.D. (2014) Crystal structure of the photosensing module from a red/far-red light-absorbing plant phytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 10179–10184.
7. Eichenberg, K., Bäurle, I., Paulo, N., Sharrock, R.A., Rüdiger, W., and Schäfer, E. (2000) Arabidopsis phytochromes C and E have different spectral characteristics from those of phytochromes A and B. *FEBS Lett.* 470, 107–112.
8. Essen, L.-O., Mailliet, J., and Hughes, J. (2008) The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14709–14714.
9. Park, C.-M., Shim, J.-Y., Yang, S.-S., Kang, J.-G., Kim, J.-I., Luka, Z., and Song, P.-S. (2000) Chromophore–apoprotein interactions in *Synechocystis* sp. PCC6803 Phytochrome Cph1. *Biochemistry* 39, 6349–6356.
10. Rockwell, N.C., Duanmu, D., Martin, S.S., Bachy, C., Price, D.C., Bhattacharya, D., Worden, A.Z., and Lagarias, J.C. (2014) Eukaryotic algal phytochromes span the visible spectrum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 3871–3876.
11. Takala, H., Björling, A., Berntsson, O., Lehtivuori, H., Niebling, S., Hoernke, M., Kosheleva, I., Henning, R., Menzel, A., Ihalainen, J.A., and Westenhoff, S. (2014) Signal amplification and transduction in phytochrome photosensors. *Nature* 509, 245–248.
12. Tasler, R., Moises, T., and Frankenberg-Dinkel, N. (2005) Biochemical and spectroscopic characterization of the bacterial phytochrome of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS J.* 272, 1927–1936.
13. Yang, X., Kuk, J., and Moffat, K. (2008) Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophytochrome: photoconversion and signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14715–14720.
14. Yang, X., Kuk, J., and Moffat, K. (2009) Conformational differences between the Pfr and Pr states in *Pseudomonas aeruginosa*

- bacteriophytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15639–15644.
15. Yoshihara, S., Katayama, M., Geng, X., and Ikeuchi, M. (2004) Cyanobacterial phytochrome-like PixJ1 holoprotein shows novel reversible photoconversion between blue- and green-absorbing forms. *Plant Cell Physiol.* 45, 1729–1737.
  16. 成川礼 and 伏見圭司 (2018) 光合成生物における開環テトラピロール結合型光受容体. *生物物理* 58, 303–307.
  17. Fushimi, K., and Narikawa, R. (2019) Cyanobacteriochromes: photoreceptors covering the entire UV-to-visible spectrum. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 57, 39–46.
  18. Bussell, A.N., and Kehoe, D.M. (2013) Control of a four-color sensing photoreceptor by a two-color sensing photoreceptor reveals complex light regulation in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 12834–12839.
  19. Chen, Y., Zhang, J., Luo, J., Tu, J.-M., Zeng, X.-L., Xie, J., Zhou, M., Zhao, J.-Q., Scheer, H., and Zhao, K.-H. (2012) Photophysical diversity of two novel cyanobacteriochromes with phycocyanobilin chromophores: photochemistry and dark reversion kinetics. *FEBS J.* 279, 40–54.
  20. Cho, S.M., Jeoung, S.C., Song, J.-Y., Song, J.-J., and Park, Y.-I. (2017) Hydrophobic residues near the bilin chromophore-binding pocket modulate spectral tuning of insert-Cys subfamily cyanobacteriochromes. *Sci. Rep.* 7, 40576.
  21. Enomoto, G., Hirose, Y., Narikawa, R., and Ikeuchi, M. (2012) Thiol-based photocycle of the blue and teal light-sensing cyanobacteriochrome Tlr1999. *Biochemistry* 51, 3050–3058.
  22. Fushimi, K., Nakajima, T., Aono, Y., Yamamoto, T., Ni-Ni-Win, Ikeuchi, M., Sato, M., and Narikawa, R. (2016) Photoconversion and fluorescence properties of a red/green-type cyanobacteriochrome AM1\_C0023g2 that binds not only phycocyanobilin but also biliverdin. *Front. Microbiol.* 7, 588.
  23. Fushimi, K., Rockwell, N.C., Enomoto, G., Ni-Ni-Win, Martin, S.S., Gan, F., Bryant, D.A., Ikeuchi, M., Lagarias, J.C., and Narikawa, R. (2016) Cyanobacteriochrome photoreceptors lacking the canonical Cys residue. *Biochemistry* 55, 6981–6995.
  24. Fushimi, K., Enomoto, G., Ikeuchi, M., and Narikawa, R. (2017) Distinctive properties of dark reversion kinetics between two red/green-type cyanobacteriochromes and their application in the photoregulation of cAMP synthesis. *Photochem. Photobiol.* 93, 681–691.
  25. **Fushimi, K., Miyazaki, T., Kuwasaki, Y., Nakajima, T., Yamamoto, T., Suzuki, K., Ueda, Y., Miyake, K., Takeda, Y., Choi, J.-H., Kawagishi, H., Park, E. Y., Ikeuchi, M., Sato, M., and Narikawa, R. (2019) Rational conversion of chromophore selectivity of cyanobacteriochromes to accept mammalian intrinsic biliverdin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 8301–8309.**
  26. **Fushimi, K., Hasegawa, M., Ito, T., Rockwell, N.C., Enomoto, G., Ni-Ni-Win., Lagarias, J.C., Ikeuchi, M., and Narikawa, R. (2020) Evolution-inspired design of multicolored photoswitches from a single cyanobacteriochrome scaffold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 15573–15580.**
  27. Hasegawa, M., Fushimi, K., Miyake, K., Nakajima, T., Oikawa, Y., Enomoto, G., Sato, M., Ikeuchi, M., and Narikawa, R. (2018) Molecular characterization of DXCF cyanobacteriochromes from the cyanobacterium *Acaryochloris marina* identifies a blue-light power sensor. *J. Biol. Chem.* 293, 1713–1727.
  28. Hirose, Y., Shimada, T., Narikawa, R., Katayama, M., and Ikeuchi, M. (2008) Cyanobacteriochrome CcaS is the green light receptor that induces the expression of phycobilisome linker protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9528–9533.
  29. Hirose, Y., Narikawa, R., Katayama, M., and Ikeuchi, M. (2010) Cyanobacteriochrome CcaS regulates phycoerythrin accumulation in *Nostoc punctiforme*, a group II chromatic adapter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 8854–8859.
  30. Hirose, Y., Rockwell, N.C., Nishiyama, K., Narikawa, R., Ukaji, Y., Inomata, K., Lagarias, J.C., and Ikeuchi,

- M. (2013) Green/red cyanobacteriochromes regulate complementary chromatic acclimation via a protochromic photocycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 4974–4979.
31. Ishizuka, T., Shimada, T., Okajima, K., Yoshihara, S., Ochiai, Y., Katayama, M., and Ikeuchi, M. (2006) Characterization of cyanobacteriochrome TePixJ from a thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* strain BP-1. *Plant Cell Physiol.* 47, 1251–1261.
  32. Ma, Q., Hua, H.-H., Chen, Y., Liu, B.-B., Krämer, A. L., Scheer, H., Zhao, K.-H., and Zhou, M. (2012) A rising tide of blue-absorbing biliprotein photoreceptors: Characterization of seven such bilin-binding GAF domains in *Nostoc* sp. PCC 7120. *FEBS J.* 279, 4095–4108.
  33. Narikawa, R., Fukushima, Y., Ishizuka, T., Itoh, S., and Ikeuchi, M. (2008) A novel photoactive GAF domain of cyanobacteriochrome AnPixJ that shows reversible green/red photoconversion. *J. Mol. Biol.* 380, 844–855.
  34. Narikawa, R., Enomoto, G., Ni-Ni-Win, Fushimi, K., and Ikeuchi, M. (2014) A new type of dual-Cys cyanobacteriochrome GAF domain found in cyanobacterium *Acaryochloris marina*, which has an unusual red/blue reversible photoconversion cycle. *Biochemistry* 53, 5051–5059.
  35. Narikawa, R., Fushimi, K., Ni-Ni-Win, and Ikeuchi, M. (2015) Red-shifted red/green-type cyanobacteriochrome AM1\_1870g3 from the chlorophyll *d*-bearing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 461, 390–395.
  36. Narikawa, R., Nakajima, T., Aono, Y., Fushimi, K., Enomoto, G., Ni-Ni-Win, Itoh, S., Sato, M., and Ikeuchi, M. (2015) A biliverdin-binding cyanobacteriochrome from the chlorophyll *d*-bearing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *Sci. Rep.* 5, 7950.
  37. Narikawa, R., Kohchi, T., and Ikeuchi, M. (2008) Characterization of the photoactive GAF domain of the CikA homolog (SyCikA, Slr1969) of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1253–1259.
  38. Rockwell, N.C., Njuguna, S.L., Roberts, L., Castillo, E., Parson, V.L., Dwojak, S., Lagarias, J.C., and Spiller, S.C. (2008) A second conserved GAF domain cysteine is required for the blue/green photoreversibility of cyanobacteriochrome Tlr0924 from *Thermosynechococcus elongatus*. *Biochemistry* 47, 7304–7316.
  39. Rockwell, N.C., Martin, S.S., Feoktistova, K., and Lagarias, J.C. (2011) Diverse two-cysteine photocycles in phytochromes and cyanobacteriochromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 11854–11859.
  40. Rockwell, N.C., Martin, S.S., and Lagarias, J.C. (2012) Red/green cyanobacteriochromes: sensors of color and power. *Biochemistry* 51, 9667–9677.
  41. Rockwell, N.C., Martin, S.S., Gulevich, A.G., and Lagarias, J.C. (2012) Phycoviolobin formation and spectral tuning in the DXCF cyanobacteriochrome subfamily. *Biochemistry* 51, 1449–1463.
  42. Rockwell, N.C., Martin, S.S., and Lagarias, J.C. (2015) Identification of DXCF cyanobacteriochrome lineages with predictable photocycles. *Photochem. Photobiol. Sci.* 14, 929–941.
  43. Rockwell, N.C., Martin, S.S., Gan, F., Bryant, D.A., and Lagarias, J.C. (2015) NpR3784 is the prototype for a distinctive group of red/green cyanobacteriochromes using alternative Phe residues for photoproduct tuning. *Photochem. Photobiol. Sci.* 14, 258–269.
  44. Rockwell, N.C., Martin, S.S., and Lagarias, J.C. (2016) Identification of cyanobacteriochromes detecting far-red Light. *Biochemistry* 55, 3907–3919.
  45. Rockwell, N.C., Martin, S.S., and Lagarias, J.C. (2017) There and back again: Loss and reacquisition of two-Cys photocycles in cyanobacteriochromes. *Photochem. Photobiol.* 93, 741–754.
  46. Wiltbank, L.B., and Kehoe, D.M. (2016) Two cyanobacterial photoreceptors regulate photosynthetic light harvesting by sensing teal, green, yellow, and red light. *MBio* 7, e02130–15.

47. Burgie, E.S., Walker, J.M., Phillips, G.N., Jr, and Vierstra, R.D. (2013) A photo-labile thioether linkage to phycoviolobin provides the foundation for the blue/green photocycles in DXCF-cyanobacteriochromes. *Structure* 21, 88–97.
48. Cornilescu, C.C., Cornilescu, G., Burgie, E.S., Markley, J.L., Ulijasz, A.T., and Vierstra, R.D. (2014) Dynamic structural changes underpin photoconversion of a blue/green cyanobacteriochrome between its dark and photoactivated states. *J. Biol. Chem.* 289, 3055–3065.
49. Narikawa, R., Ishizuka, T., Muraki, N., Shiba, T., Kurisu, G., and Ikeuchi, M. (2013) Structures of cyanobacteriochromes from phototaxis regulators AnPixJ and TePixJ reveal general and specific photoconversion mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 918–923.
50. Lim, S., Yu, Q., Gottlieb, S. M., Chang, C.-W., Rockwell, N.C., Martin, S.S., Madsen, D., Lagarias, J.C., Larsen, D.S., and Ames, J.B. (2018) Correlating structural and photochemical heterogeneity in cyanobacteriochrome NpR6012g4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 4387–4392.
51. Xu, X., Port, A., Wiebeler, C., Zhao, K.-H., Schapiro, I., and Gärtner, W. (2020) Structural elements regulating the photochromicity in a cyanobacteriochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 2432–2440.
52. Fushimi, K., Ikeuchi, M., and Narikawa, R. (2017) The expanded red/green cyanobacteriochrome lineage: An evolutionary hot spot. *Photochem. Photobiol.* 93, 903–906.
53. Kuwasaki, Y., Miyake, K., Fushimi, K., Takeda, Y., Ueda, Y., Nakajima, T., Ikeuchi, M., Sato, M., and Narikawa, R. (2019) Protein engineering of dual-Cys cyanobacteriochrome AM1\_1186g2 for biliverdin incorporation and far-red/blue reversible photoconversion. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2935.
54. Hu, Q., Miyashita, H., Iwasaki, I., Kurano, N., Miyachi, S., Iwaki, M., and Itoh, S. (1998) A photosystem I reaction center driven by chlorophyll *d* in oxygenic photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13319–13323.
55. 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.
56. Miyake, K., Fushimi, K., Kashimoto, T., Maeda, K., Ni-Ni-Win, Kimura, H., Sugishima, M., Ikeuchi, M., and Narikawa, R. (2020) Functional diversification of two bilin reductases for light perception and harvesting in unique cyanobacterium *Acaryochloris marina* MBIC 11017. *FEBS J.*
57. Rodriguez, E.A., Tran, G.N., Gross, L.A., Crisp, J.L., Shu, X., Lin, J.Y., and Tsien, R.Y. (2016) A far-red fluorescent protein evolved from a cyanobacterial phycobiliprotein. *Nat. Methods* 13, 763–769.
58. Shcherbakova, D.M., and Verkhusha, V.V. (2013) Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging. *Nat. Methods* 10, 751–754.
59. Shcherbakova, D.M., Baloban, M., Emelyanov, A.V., Brenowitz, M., Guo, P., and Verkhusha, V.V. (2016) Bright monomeric near-infrared fluorescent proteins as tags and biosensors for multiscale imaging. *Nat. Commun.* 7, 12405.
60. Ishizuka, T., Narikawa, R., Kohchi, T., Katayama, M., and Ikeuchi, M. (2007) Cyanobacteriochrome TePixJ of *Thermosynechococcus elongatus* harbors phycoviolobin as a chromophore. *Plant Cell Physiol.* 48, 1385–1390.
61. Rockwell, N.C., Martin, S.S., and Lagarias, J.C. (2012) Mechanistic insight into the photosensory versatility of DXCF cyanobacteriochromes. *Biochemistry* 51, 3576–3585.
62. Rockwell, N.C., Martin, S.S., Gulevich, A.G., and Lagarias, J.C. (2014) Conserved phenylalanine residues are required for blue-shifting of cyanobacteriochrome photoproducts. *Biochemistry* 53, 3118–3130.
63. Chatelle, C., Ochoa-Fernandez, R., Engesser, R., Schneider, N., Beyer, H.M., Jones, A.R., Timmer, J.,

- Zurbriggen, M.D., and Weber, W. (2018) A green-light-responsive system for the control of transgene expression in mammalian and plant cells. *ACS Synth. Biol.* 7, 1349–1358.
64. Kainrath, S., Stadler, M., Reichhart, E., Distel, M., and Janovjak, H. (2017) Green-light-induced inactivation of receptor signaling using cobalamin-binding domains. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 4608–4611.
65. Kawano, F., Suzuki, H., Furuya, A., and Sato, M. (2015) Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins. *Nat. Commun.* 6, 6256.
66. Kennedy, M.J., Hughes, R.M., Peteya, L.A., Schwartz, J.W., Ehlers, M.D., and Tucker, C.L. (2010) Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nat. Methods* 7, 973–975.
67. Levskaya, A., Weiner, O.D., Lim, W.A., and Voigt, C.A. (2009) Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature* 461, 997–1001.
68. Reichhart, E., Ingles-Prieto, A., Tichy, A.-M., McKenzie, C., and Janovjak, H. (2016) A phytochrome sensory domain permits receptor activation by red light. *Angew. Chem. Int. Ed.* 55, 6339–6342.
69. Senoo, S., Tandar, S. T., Kitamura, S., Toya, Y., and Shimizu, H. (2019) Light-inducible flux control of triosephosphate isomerase on glycolysis in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 116, 3292–3300.
70. Shimizu-Sato, S., Huq, E., Tepperman, J.M., and Quail, P.H. (2002) A light-switchable gene promoter system. *Nat. Biotechnol.* 20, 1041–1044.
71. Tabor, J.J., Levskaya, A., and Voigt, C.A. (2011) Multichromatic control of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 405, 315–324.
72. Yazawa, M., Sadaghiani, A.M., Hsueh, B., and Dolmetsch, R.E. (2009) Induction of protein-protein interactions in live cells using light. *Nat. Biotechnol.* 27, 941–945.

## Rational design of multiple photoconvertible molecules inspired by evolutionary lineage of cyanobacteriochromes

Keiji Fushimi, Rei Narikawa

Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Shizuoka University

## 解説

非天然カロテノイド生合成経路の進化分子工学<sup>†</sup>

千葉大学 大学院工学研究科

梅野 太輔\*

光合成におけるカロテノイドの重要性はよく認識されている<sup>1,2)</sup>。生物界には 1000 を超えるカロテノイドが知られるが（高市による解説（本誌 77 号）<sup>3)</sup>に詳しい）、光合成に関わる機能を担っているものは、そのうちごく一握りである。しかし光合成細菌の各種カロテノイド変異体の研究によって、光アンテナ複合体は柔軟に異種のカロテノイドを受け入れ、その光合成マシナリーのデバイス特性を変化させることがわかってきた。もし自然界のカロテノイド色素よりも優れた「超天然」カロテノイドを部材として供給できれば、生物の光合成機能を最小限の工程で飛躍させることが可能かもしれない。本稿では、著者らが行ってきた「非天然骨格カロテノイド」の生合成工学の試みを紹介する。有機合成法に比べると、生合成ルートは未成熟かつ不自由なものであったが、その状況は次第に改善されつつある。進化分子工学を繰り返すことによって、自然界には見られない様々な分子骨格をもつカロテノイド色素の生合成ルートが次々に開通しつつある。これらの経路は、生きた細胞の中で、光合成マシナリーに直接非天然カロテノイドをフィードできるため、光合成マシナリーの物性解析のための、そして光電デバイス性能の積極的なチューニングのための有効なツールになるものと期待される。

## 1. 光合成におけるカロテノイド

太陽光エネルギーを無駄なく吸収するためには、カロテノイドなどの光合成色素が必要である<sup>4)</sup>。クロロフィルには 500 nm 付近（青緑色）に吸収がない。カロテノイド色素は、この吸収波長帯の光エネルギーを吸収してクロロフィルに伝達する補助集光機能のほか、光障害に対する保護機能を担う<sup>5)</sup>。いずれにせよ、光合成におけるカロテノイドの役割は大である。

カロテノイドは、共役した複数の二重結合が分子骨格沿いに並ぶ、アスペクト比と疎水性の高い有機化合物群である（図 1）。これらは、光の吸収効率が高い反面、励起寿命が極めて短い。この短い励起状態のあいだに光エネルギーを光合成中心に伝えることができなければ、カロテノイドの吸収した光エネルギーは熱に変換されてしまう。つまり、光合成マシナリーには、カロテノイ

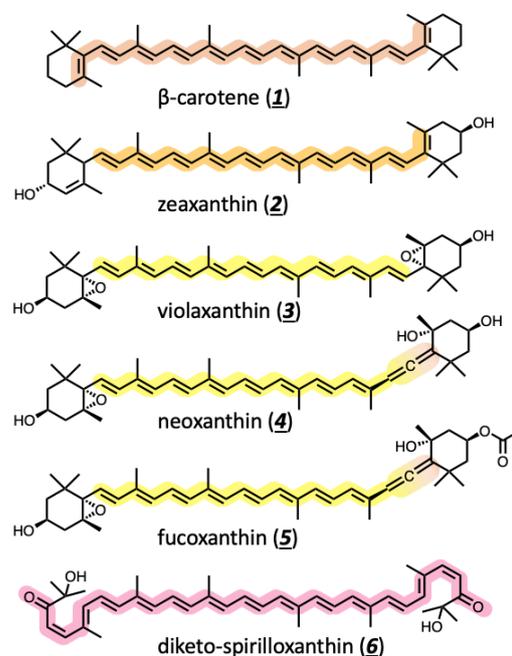


図1. 光合成にかかわるカロテノイドたち

<sup>†</sup> 解説特集「光合成生物に関連する分子の開発」

\*連絡先 E-mail: daisuke.umeno@gmail.com

ドの吸収した光を素早く中心部に伝達するための仕組みが備わっていないと想像される。

そのためであろうか、カロテノイドデータベース<sup>6)</sup>にエントリーされる1,195種(2020年6月1日現在)ものカロテノイドのうち、光合成に関わっているものは非常に少ない。酸素発生型光合成生物の光反応中心やコアアンテナ系に組み込まれている色素は、ほぼβ-カロテン(1)一つに限られている。周辺部のアンテナ複合体には、ルテイン(2)、ビオラキサンチン(3)、ネオキササンチン(4)、フコキササンチン(5)など、ある程度多様な色素が結合できるようである。

多くの光合成生物において、カロテノイド生合成は必須であるが、少なくとも2種類の紅色光合成細菌(*Rhodobacter sphaeroides* や *Rhodospirillum rubrum*) においては、カロテノイド欠損変異体が知られている。これらカロテノイド変異株は、強光ストレスに対する感受性が極端に高まるものの、弱光の下では光合成的に成長できる。遺伝子操作などによってこれらのカロテノイド生合成経路を変更すると、光アンテナは、野生型のものとは異なるカロテノイド色素でも、それらを構成因子として組み上がる柔軟性があるという<sup>7,8)</sup>。今までに様々なカロテノイド生合成改変株が作出されてきたが、生合成されたカロテノイドはどれも、光アンテナ系に組み込まれ、バクテリオクロフィル(BChl)へのエネルギー伝達も観察された<sup>9,10)</sup>。最近、*R. sphaeroides*のカロテノイド生合成経路を改変した株がシリーズで作出され、それぞれの株が形成する光捕集複合体(LH2)の物性が比較調査された<sup>11)</sup>。共役二重結合の数が増えるにつれ、カロテノイドの励起エネルギーは下がってゆく。これを反映して、カロテノイドからのエネルギー移動効率は直線的に低下してゆき、共役二重結合の数が13を超えたところで、エネルギー移動は観察されなくなった。これは、カロテノイドの励起状態のエネルギーが、BChlの一重項励起状態を下回ったからである。共役二重結合の数が15のカロテノイド(ジケトスピロキササンチン(6))は、BChl一重項のクエンチャーとしての機能のみを示した。

これら一連の研究が示すのは、

- (1) 生合成経路さえ用意すれば、光合成マシナリーの中に新規なカロテノイドを滑り込ませることができる
- (2) 新規カロテノイドを抱き込むことで、光合成マシナリーの物性が大きく変わる、そして特に重要なのは、
- (3) この方法で再構成される光合成マシナリーのデバイス物性は、ほぼ一義的にカロテノイド色素側の光化学物性のみによって決まる、

ということであろう。カロテノイドの物性や機能と分子構造の関係については多くの研究があり、我々は、もとめる物性を実現しそうなカロテノイド構造を、まずまずの予測性をもって描くことができる。これまでに、自然界のカロテノイドのラインナップの物性範囲を逸脱した様々な非天然カロテノイドがデザインされ、有機合成されてきた<sup>12-15)</sup>。もし、これら「超天然」カロテノイドを生合成することができるようになれば、生きた細胞の中で、光合成マシナリーに直接組み込むことができるはずである。

## 2. 天然カロテノイドの生合成経路

光合成生物に限らず、カロテノイドは様々な生物に見られるが<sup>6)</sup>、種によらず、カロテノイドの生合成経路は共通している<sup>16,17)</sup>。

カロテノイド色素は、イソプレノイド(テルペノイド)のサブファミリーである。炭素数5のイソペンテニルピロリン酸(IPP)ユニットが4つ縮合して作られるゲラニルゲラニルピロリン酸(C<sub>20</sub>PP)を建材とし、その最初のステップは、C<sub>20</sub>PPの2分子縮合によるフィトエン(7)というC<sub>40</sub>骨格の直鎖状炭化水素の合成である(図2)。このフィトエンは、不飽和化酵素(デサチュラーゼ)によって段階的に不飽和化される。この際、長い共役二重結合が形成されるので、色素としての基本的特徴は、この段階で与えられる。これらの直鎖カロテノイドは、末端の環化や酸化、エステル化、部分切除など、数々の修飾反応によって、

何百種類もの様々なカロテノイドに変換される (図2)。

自然界には多様なカロテノイドが見つまっているが、その分子多様性のほとんどは、リコペンやβ-カロテンなど、少数のカロテノイドの部分修飾によって生み出されている。この「末広がり」な経路のありようを、Armstrongらは、「Inverted Tree」と表現した<sup>18)</sup>。たしかに、共通する上流ステップ (骨格形成および不飽和化) を幹、多様な修飾ステップを枝葉とすれば、カロテノイド経路は、広葉樹を逆にしたような構成である。幹の

部分、骨格合成から不飽和化までは、種を超えてほぼ共通している。

### 3. 誰がために、新種カロテノイド?

カロテノイド経路を見て感じるのは、どうしてカロテノイドには、これほどたくさんの種類があるのか、という疑問である。認定されているカロテノイドの機能は、光捕集、光障害からの保護、抗酸化、色素としての機能、くらいのものである。それなのに、なぜ 1,000 超ものカロテノイドを、自然界は発明し、保持し続けているのか。はたして、次々に見つかる「新種」「珍種」カロテノイ

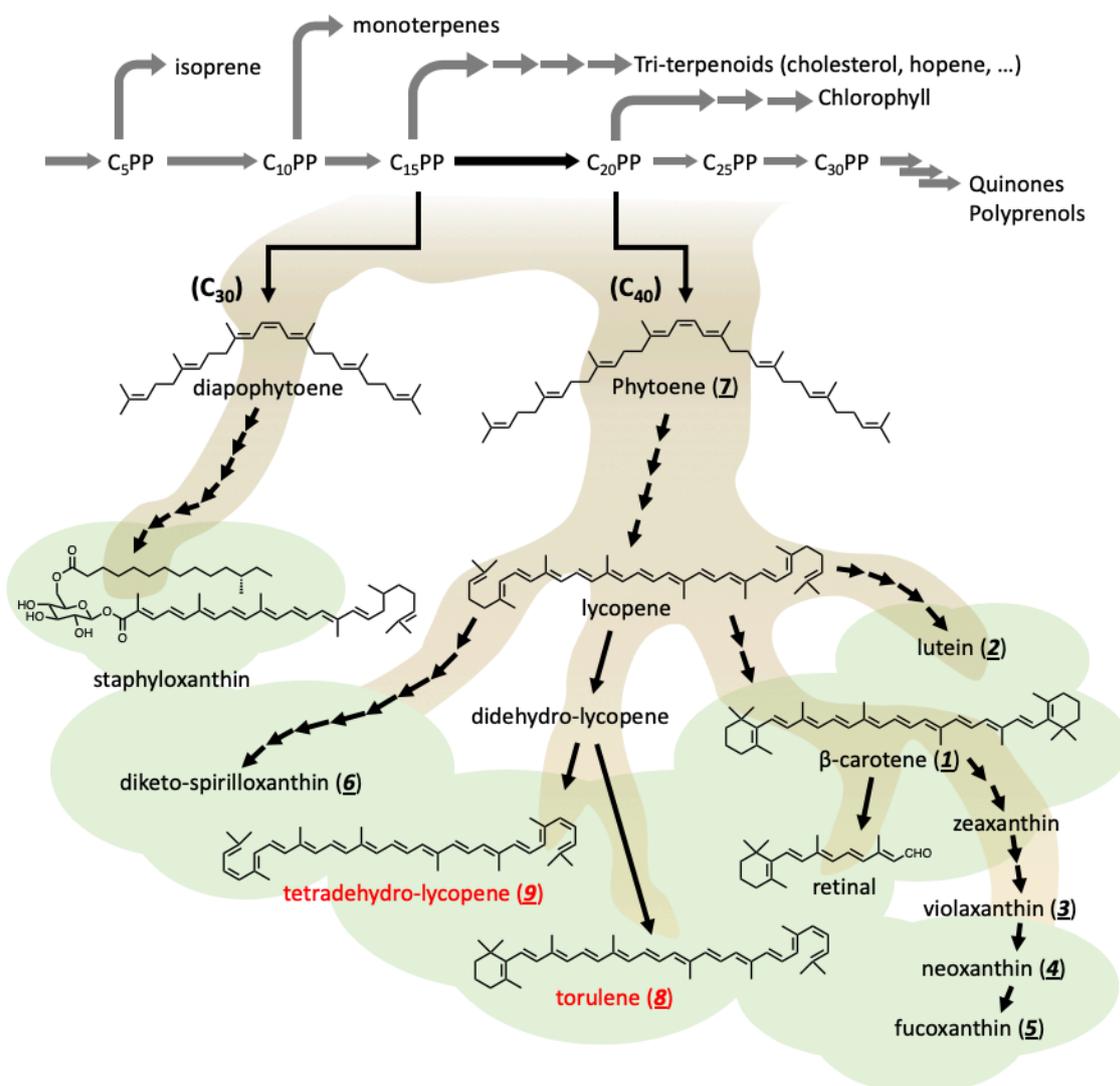


図2. 自然界のカロテノイド生合成経路

ドひとつひとつに、明快な存在理由（それだけが持つ特殊な生理活性）は、あるのだろうか？

この素朴すぎる疑問は、二次代謝物経路（天然物経路）の専門家の間でも長らく議論されてきたようである。Jones と Firm の Screening 仮説<sup>19)</sup>によれば、植物や微生物も、自己の生存を有利にする新しい生理活性をもとめ、製薬会社よろしく、自前の「化合物スクリーニング」を続けているという。気の利いた生理活性をひとつ見出すためには、無数の化合物をシステムチックに試作する必要がある。この理論によれば、天然物経路には、少ない手数（進化的操作）によって新しい代謝物を生み出す何らかの仕組みがある。そして自然界にみられる多くの天然物は、より良い生理活性を求めて作り散らかされたスクリーニング中間体（有象無象）でしかなく、ひとつひとつの天然物に特段の価値はない。もし、同じことがカロテノイド経路にも言えるならば、新しい構造をしたカロテノイドを見つけたとしても、それは「未来の高性能カロテノイド」をもとめて試作された「失敗作」「妥協作」の一つにすぎないかもしれない。2000年に我々は、「実験室進化によって生み出された、初めての非天然カロテノイド生合成経路」と銘打った論文を発表したが<sup>20)</sup>、上の視点に立てば、ここで創った化合物 (**8,9**) は、「またひとつ増えた出来損ないの」カロテノイドでしか無かつたろう。異種カロテノイド酵素の組み合わせ<sup>21)</sup>、あるいは一つのカロテノイド酵素の進化工学<sup>22)</sup>で造る以上、その新規カロテノイドに期待できる新規性・進歩性は Marginal なものであるに違いない。自然界は何度もそれを発見したが、都度、それを採用しなかったのである。

#### 4. 「C<sub>40</sub> 骨格じゃなきゃだめですか？」

次々に見付き記述が増えてゆく新しい「枝葉」を目の当たりにすると、カロテノイド経路が、相当なエフォートをもって、分子多様性を生み出し続けているように思えてくる。なかには、炭素骨格の一部を経路の後段において切除してサイズダウンしたり（アポカロテノイド<sup>23,24)</sup>、色素化（不飽和化）後のカロテノイドに C<sub>5</sub> ユニットの

付加して C<sub>45</sub>~C<sub>50</sub> カロテノイド骨格を創る例もある<sup>25,26)</sup>。

このような非 C<sub>40</sub> カロテノイドには、オーソドックスなカロテノイドとは異なる物性が宿ることが知られている。もともと、カロテノイドの両端に親水基を付加すると、細胞膜の中で膜平面に対して垂直配向し、細胞膜をリベットのように力学的に補強すると言われていた<sup>27)</sup>。しかし細胞膜の膜厚<sup>28)</sup>と比較すると、C<sub>40</sub> 骨格のカロテノイドの両端についた親水基が細胞膜両面から顔を出すにはわずかに尺が足りないことがわかる（図 3A）。C<sub>5</sub> ユニット分の伸長によって初めて、余裕をもってしっかり貫通したかたちで、細胞膜の「リベット補強」は可能となるのではないか。実際、高度好塩菌 *Haloarcula japonica* は、リコペンへの C<sub>5</sub> 付加酵素をノックダウンすることによって、その浸透圧変化への耐性を著しく失うという<sup>25)</sup>。つまりこれは、「C<sub>40</sub> 骨格じゃあ、だめです」な例と言えるかもしれない。

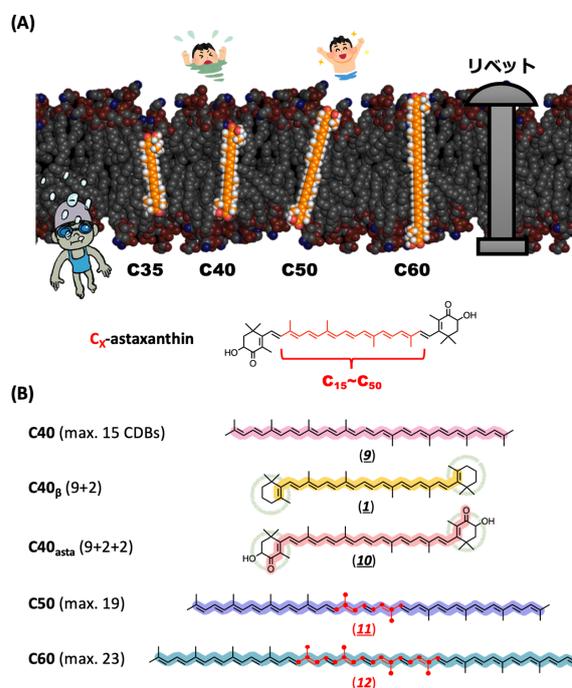


図3. 課題は尺にこそ

### 5. 目標と生合成ルートの設定

ならばいっそのこと、C<sub>50</sub>骨格を生合成の幹とする生合成の樹をつくっても良いのではないか。天然カロテノイドの生合成はC<sub>20</sub>PPを原料としてつくるフィトエン(C<sub>40</sub>骨格由来)と決まっているが、微生物の中には、乳酸菌やブドウ球菌など、

C<sub>15</sub>PPの二分子縮合によってつくられたC<sub>30</sub>骨格型のフィトエン(ジアポフィトエン)を不飽和化して小ぶりのカロテノイド色素を合成するものがしばしば見つかる(図2)。C<sub>40</sub>-Treeに比べれば少ないが、すでに30を超えるC<sub>30</sub>カロテノイドが自然界に認められている。C<sub>15</sub>PPを建材とす

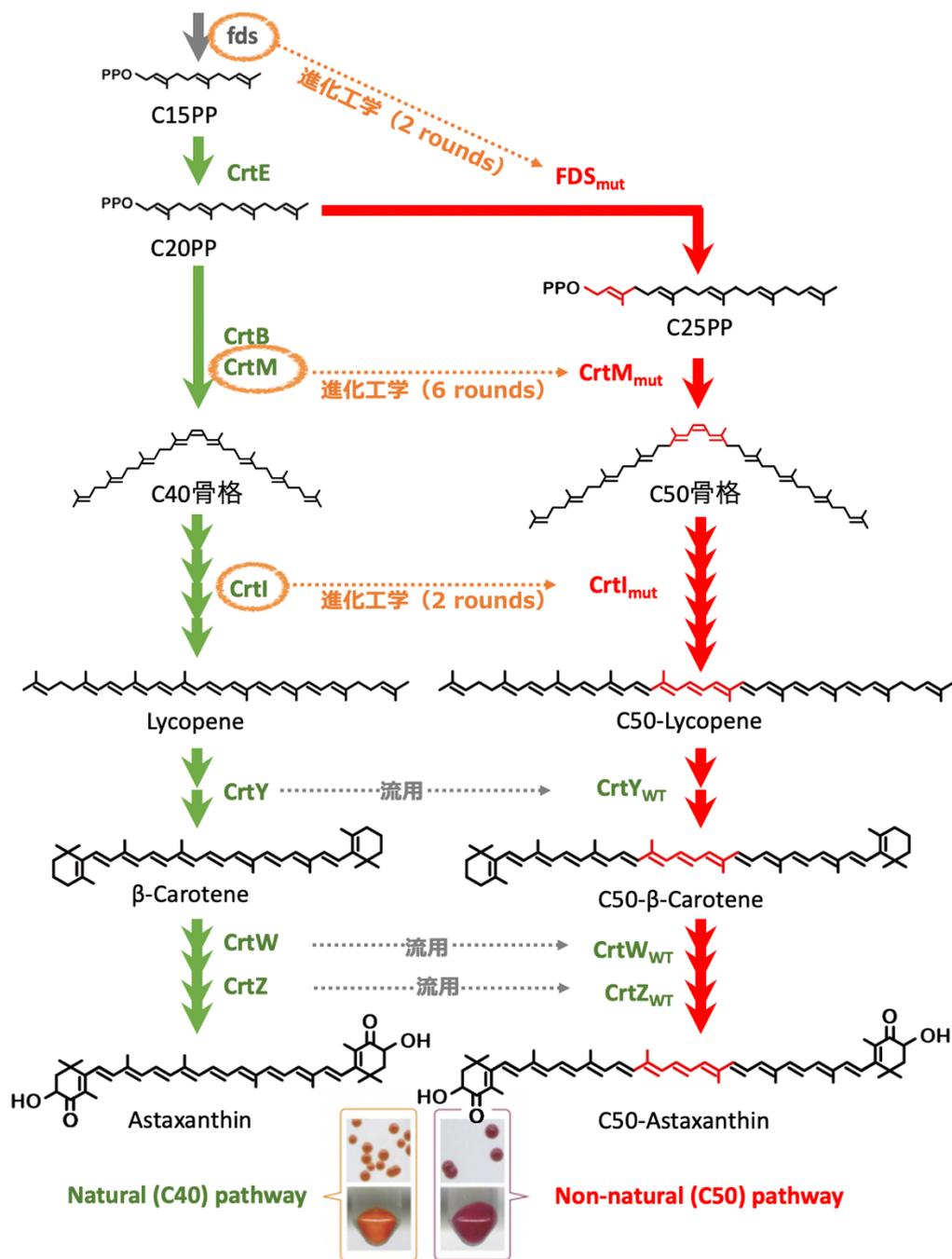


図4. C<sub>50</sub>-カロテノイド経路の構築：C<sub>40</sub>経路の「リデザイン」

る C<sub>30</sub>骨格カロテノイド経路が自然界にあるならば、C<sub>25</sub>PP や C<sub>30</sub>PP を建材とする C<sub>50</sub>-Tree や C<sub>60</sub>-Tree を作り出すことは、生化学的には可能なはずである。

また、カロテノイドの色素としての性質を決めるのは、骨格沿いに並ぶ共役二重結合の数（ポリエンのサイズ）であった。共役二重結合の数が多いほど、吸収波長は長くなる。C<sub>40</sub>カロテノイド骨格には最大 15 個の二重結合を並べることができる（図 3B (9)）。自然界のカロテノイドは、その不飽和化度を 7~15 の間で変化させ、レモン色~深赤色までの様々な色を C<sub>40</sub>骨格の上に実現している。

共役二重結合の数は、カロテノイドの抗酸化性能においても、大きな決定因子である<sup>29)</sup>。しかし、直鎖状のカロテノイドは不安定であるため、自然界の多くのカロテノイドは、β-カロテン (1) のように、末端が環化された構造を有している（図 3B）。環構造の作り込みは、耐光性と酸化剤耐性を確保する上で、譲れない構造要素である。一方で、この末端環化は、共役系を曲げてポリエンの吸収波長を短波長シフトさせてしまう<sup>30)</sup>。β環の 4 位を keto 化して共役型を許されるギリギリまで拡張したのがアスタキサンチン (10) である<sup>30)</sup>（図 3B）。抗酸化剤としての高い性能とタフさを両立させた、恐らくは C<sub>40</sub>カロテノイドに実現しうる最良の構造とって良いのではないか。

これらをふまえて我々が計画したのは、C<sub>50</sub>骨格のカロテノイド生合成経路である（図 4）。もし、C<sub>50</sub> (11) や C<sub>60</sub> (12) 骨格を直接生合成できるならば、それぞれの骨格の上に、最大 19 および 23 の二重結合を並べることができる。このサイズならば、末端に環構造を配置しても、十分なサイズの共役二重結合数がかせげる。これら新しい生合成の樹を繁茂させることによって、黄~赤に限定されていたカロテノイドの色域を、紫や青まで拡張できるかもしれない。これらのいくつかは、すでに有機合成され、天然カロテノイドを明確に凌駕する抗酸化機能を持つことがわかっている<sup>29)</sup>。

そこで、自然界の Blockbuster ともいえるエリートカロテノイド、アスタキサンチンの C<sub>50</sub>タイプの生合成を目指すことにした（図 4）。この生合成のルート設定はごく単純なものである：(i) 基質（C<sub>25</sub>PP）合成、(ii) C<sub>50</sub>骨格合成、(iii) 6-step 不飽和化、(iv) 環化、(v) 3-ヒドロキシル化、(vi) ケト化、の 6 酵素による合計 14 ステップの経路で C<sub>50</sub>-アスタキサンチンである。そのすべてが新規活性であるが、一つ一つの酵素ステップは、自然界に存在する C<sub>40</sub>アスタキサンチン経路とは、サイズ選択性だけが異なる。「ミラー経路」と言って良いだろう。自然界のアスタキサンチン生合成遺伝子のサイズ特異性を改変することによって、ひとつひとつ入手できるはずである。

## 6. カロテノイド生合成酵素の進化分子工学

大腸菌や酵母も、イソプレノイドの主幹経路は有するので、C<sub>15</sub>PP の合成までは宿主細胞に任せてかまわない。この C<sub>15</sub>PP にあと 2 つのイソプレノ（C<sub>5</sub>）ユニットを付加すれば、C<sub>25</sub>PP 合成は叶う。しかし、案外これが手に入らない。我々は、超好熱菌から発見された C<sub>25</sub>PP 合成酵素<sup>31)</sup>の大腸菌発現を試みたが、その細胞活性は低く、代謝経路の構成要素として使うには不適と判断した。そこで、中度好熱菌の C<sub>15</sub>PP 合成酵素（FDS）のサイズ変異体（FDS<sub>Y81A</sub>）<sup>32)</sup>を大腸菌に発現させたところ、若干量の C<sub>25</sub>PP 蓄積が見られた。この C<sub>25</sub>PP 建材の供給量を更にアップするために、FDS<sub>Y81A</sub> の更なる改良のための進化工学を行った（図 5）。まず FDS<sub>Y81A</sub> を鋳型とした変異誘導 PCR 法を行い、一つあたり平均 2~3 のランダムな塩基置換を導入した。

こうして得られる「FDS ライブラリ」の中には、親より高い C<sub>25</sub>PP 合成活性をもつ変異体があるかもしれない。ただし、C<sub>25</sub>PP 合成活性を直接ハイスループットに検出するのは困難であるので、C<sub>20</sub>PP の消費活性を指標にして、その活性を間接的にスクリーニングした。C<sub>25</sub>PP の生合成は C<sub>20</sub>PP への C<sub>5</sub>ユニットの追加によって実現する。この活性を優位に向上させた FDS 変異体は、共存するリコペン合成経路から、共通の建材である C<sub>20</sub>PP を奪うため、リコペンに由来するコロニー

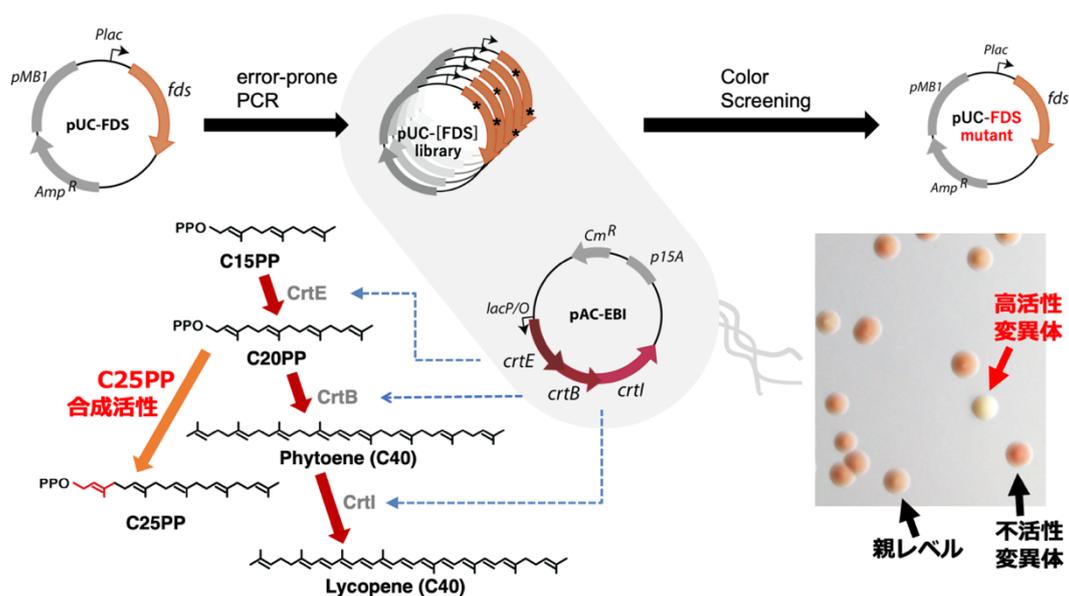


図5. C<sub>20</sub>PP → C<sub>25</sub>PP活性の進化工学

の色が消滅するはずだ。つまり、周囲よりもより色の薄いコロニーを「つつく」ことによって、C<sub>25</sub>PP 合成活性の向上した FDS 変異体が得られるわけである。実際に、数千のコロニーの中から、複数の変異体が得られた。この第二世代の FDS 変異体を発現すると、大腸菌内の細胞内に蓄積するプレニル 2 リン酸の殆どは C<sub>25</sub>PP となった<sup>33)</sup>。なお、ここで作られた「原料消費スクリーニング」は、生産物の種類にかかわらず、カロテノイドと原料をシェアする様々なテルペン・イソプレノイド酵素の活性改良に利用できる<sup>34,35)</sup>。実際に様々なテルペン環化酵素の活性改良に本系は使われている<sup>36,37)</sup>。

もう一つの重要な課題は、2 分子の C<sub>25</sub>PP を縮合して C<sub>50</sub> カロテノイド骨格をつくるステップを造ることである。我々は、ブドウ球菌に由来する C<sub>30</sub> 骨格合成酵素 CrtM のサイズ選択性の進化工学<sup>38-41)</sup>に取り組んだ。

読者の中には、「C<sub>50</sub> 骨格をつくるのに、どうして C<sub>40</sub> 骨格酵素ではなく、C<sub>30</sub> 骨格合成酵素を出発点に選んだのか？」と思われる方がいらっしゃるかもしれない。これには技術的な理由がある。我々は、どうしても、C<sub>50</sub> 骨格の合成活性を直接スクリーニングする方法を思いつかなかっ

たのである。自然界には C<sub>30</sub> カロテノイド経路と C<sub>40</sub> カロテノイド経路が存在し、いずれも専門のデサチュラーゼを持っている。つまり、この2つの骨格形成は、コロニー色で可視化できる。「より大きなカロテノイドを受け入れさせるためのヒント」を得るために、あえて C<sub>30</sub> カロテノイド酵素を出発点とし、それに C<sub>40</sub> カロテノイド骨格合成能を付与するアミノ酸変異を特定しようとしたのである。都合 6 ラウンドの進化工学によって、CrtM の構造を壊さずサイズ特異性をシフトさせる部位をなんとか 3 つ見出すことができた。これらを組み合わせることで、C<sub>25</sub>PP を効率的に二分子縮合し、C<sub>50</sub> 骨格を与える CrtM 変異体が得られた。

カロテノイドに色素としての性質を与えるのは、骨格に共役二重結合を導入するデサチュラーゼが必要である。天然の不飽和化酵素を上記の C<sub>50</sub> カロテノイド経路に追加発現させたが、不飽和化産物はほとんどみられなかった<sup>42)</sup>。今もなお我々は、C<sub>50</sub> カロテノイドを色素化できる酵素を様々な種から探索しているが、未だにひとつも見つかっていない。しかたないので、CrtI の C<sub>50</sub> カロテノイド経路における進化工学を行った。そのやり方は単純である：CrtI のランダム変異ライブ

ラリを C<sub>50</sub>骨格の合成経路を導入した大腸菌に導入し、いろづく細胞を探すのである。様々な苦勞（後述）の末、C<sub>50</sub>骨格を高い効率できっちり 6 ステップ不飽和化する変異体をひとつだけ得た。こうして、C<sub>50</sub>-リコペンの生合成経路までが開通した。

この先 C<sub>50</sub>-アスタキサンチン生合成までは、あと 3 酵素・6 ステップである。しかしご安心いただきたい。この先は、進化学は不要である。自然界から借用したアスタキサンチン合成酵素 CrtY、CrtZ、CrtW を無改造で追加共発現させるだけで、C<sub>50</sub>-アスタキサンチンの合成は可能であった<sup>33)</sup>。結局、図 4 に示した 16 ステップからなるルートは、たった 3 つの酵素の進化学であっさり揃ったことになる。スクリーニング仮説を唱えた Jones/Firn 博士は、天然物生合成経路の高い進化能を保証するために、二次代謝酵素の特異性は許される限り低いはずだと予言した<sup>19)</sup>。少なくともカロテノイド生合成酵素については、この予言は当たっている。カロテノイド経路の下流に位置する (Inverted Tree の枝をなす) 酵素群は、カロテノイド基質の局所構造だけを認識する性質をもつため、認識すべき局所部位さえ存在すれば、どんな新しいカロテノイドも基質として作用する<sup>16)</sup>。

また、酵素が元来持つ「進化能」(=アミノ酸置換によって新たな機能を獲得する傾向)の高さも、指摘しなければならない。そもそも、新しい酵素活性を創出する、とはどういうことであろうか。化学触媒に対する酵素の際立った特徴のひとつは、その反応特異性の高さにある。そして酵素を構成する多くのアミノ酸残基は、細胞内に浮遊する基質と似て異なる擬基質に作用「しない」ために費やされている。酵素が変異によって新しい人工基質を受け入れた瞬間というのは、酵素の美点である「じゃない分子」を排除するメカニズムの部分破壊の瞬間と言って良い。本セクションで筆者が「できた！」とよろこんで見せた新規酵素活性とは、進化時間の中で酵素が獲得してきた特異性を一部取り崩させて得た「退化」「半落ち」の所産というべきである。酵素を、化学触媒に一步近づけたわけである。

我々は、上で作出したカロテノイド酵素変異体をさらに進化させ、新反応「だけ」しかできない酵素変異体の取得に挑戦しているが、それが新規活性の取得ほど簡単ではないことを、身を持って学んでいるところである。おそらくこの事情は、自然界の生合成進化でも同じに違いない。新規経路の発見は、一夜で起きる突然の出来事である。酵素進化の大多数のエフォートは、新機能の発見ではなく、新たに生まれた生合成経路に十分な特異性と効率を与えるためにこそ、費やされているのだろう。このことを考えると、遺伝子やアミノ酸配列のみによる酵素機能の推定には、その精度において限界があるように思えてくる。

## 7. カロテノイド経路の特異性進化

上例のように、今日発表される「新規酵素活性」のほとんどは、もとの酵素の特異性を低下させて無理やりこじ開けたものである。人工生合成経路の実装において、これは頭の痛い問題である。すなわち、生合成デザインにおける作文自由度が高まるにつれ、そしてデザインした経路が多段階になるにつれ、このような方法でつくった酵素変異体は、生合成パーツとして使いづらい。我々はこのプロジェクトにおいて、ただ酵素活性を集めるだけでは、どうにもならないことを、身を持って体験することとなった。

我々は、作ったすべての生合成酵素を共発現したが、大腸菌には痕跡量の C<sub>50</sub>-β-カロテンさえも蓄積しなかった (図 6A)。特異性の低い 6 種類の酵素 (および酵素変異体) の共発現は、無数の副活性の組み合わせによるウェブ状の経路を形成し、与えた前駆体がこのウェブ状経路に吸い込まれ、目的の C<sub>50</sub>-カロテノイドまで届かないのである。本経路の場合、6 つの酵素の理論上 900 超の化合物を与え得る<sup>33)</sup>。自然界に知られる全カロテノイド数に匹敵する Nodes を持つネットワークの中のただ 1 点に代謝フラックスをフォーカスできて初めて、C<sub>50</sub>-アスタキサンチンの選択的な生合成ができるわけである。

当初我々は、C<sub>50</sub>骨格だけをつくる CrtM 変異体の開発に取り組んだ。さらに 5 世代の変異/淘汰サイクルを繰り返して、CrtM のもつ C<sub>30</sub> 合成能

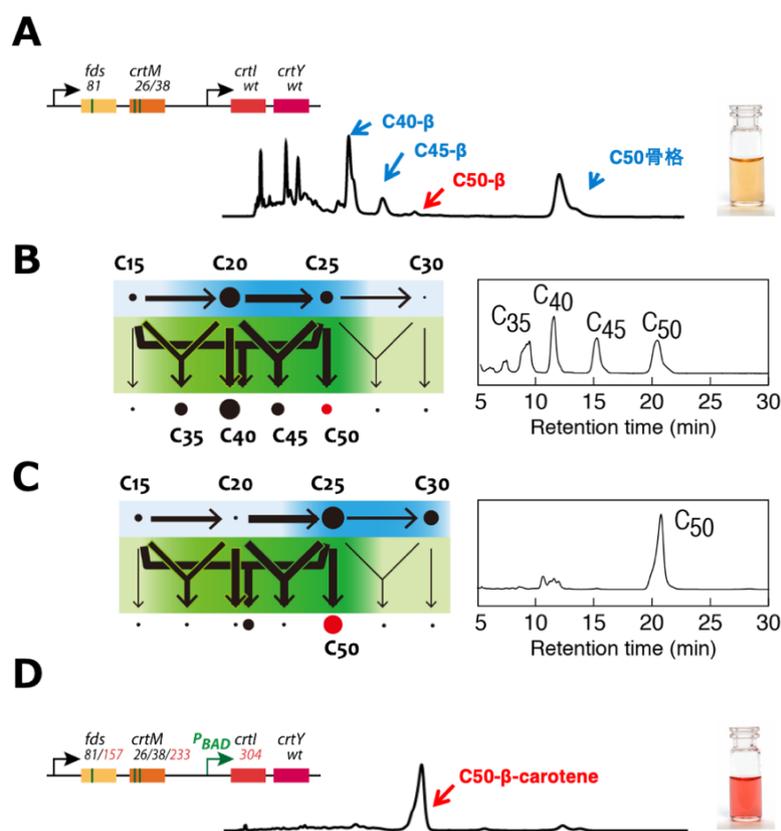


図6. Metabolic Band Pass効果で

をほぼ消し去ることができた。しかし C<sub>40</sub> 機能を消そうとすると、こんどは新たな副産物、C<sub>55</sub>、C<sub>60</sub> カロテノイドの合成能が高くなってしまふのである<sup>43)</sup>。我々は、CrtM のサイズ選択性を「シフト」させることはできても、狭めることは今日に至っても成功していない。建材供給酵素 (FDS 変異体) についても事情は同じであった。

この特異性改良の難しさは、生合成リデザイン上の大きな課題のひとつである。多世代にわたって進化分子工学サイクルをうまくまわせば、親が持っていたオリジナルな機能を消し去ることは可能である<sup>44,45)</sup>。しかし、これらの例においてさえ、ある一つの機能に特化した、副反応の全くない酵素をつくり出したわけではない。我々は「それしか触媒しない」真に選択的な酵素の開発法を知らないし、そもそも、厳密に一つの化学反応のみを触媒できる酵素が存在し得るかどうか、明らかではないのである。

そこで我々は、それぞれの生合成パーツに特異性を求めることを諦め、FDS と CrtM のサイズ変異体の掛け合わせによって、「チームで特異性を出す」ことにした。具体的には、FDS と CrtM について、基質選択性に関与する 3 つのアミノ酸変異を選び、これらとの組み合わせ  $2^3=8$  種の変異体を、それぞれに対して用意した。8 種の FDS 変異体と 8 種の CrtM 変異体を総当たりに共発現させ ( $8 \times 8 = 64$  通り)、細胞に蓄積するカロテノイドのサイズ分布を調べた。多くの組み合わせでは、複数のカロテノイド骨格の混合物が得られたが、組み合わせによっては、C<sub>50</sub> カロテノイドをほぼ単一の産物として与えるものもあった。

最初我々は、最も C<sub>25</sub>PP 供給力の高い FDS 変異体と最も C<sub>50</sub> 合成活性が高い変異体を掛け合わせていた (図 6B)。しかしこの場合、それぞれの副活性によって、C<sub>35</sub>、C<sub>40</sub>、非対称 C<sub>40</sub>、C<sub>45</sub> などの様々な骨格ができてしまう。この状態で下流酵素を追加発現すると、ウェブ状経路が生じて

しまうのだ (図 6A)。対して、C<sub>50</sub> 特異的な酵素ペアでは、互いの不完全性を、互いに補完しあうようである。たとえば図 6C のペアの場合、FDS 変異体が C<sub>25</sub>PP に加えて不要な C<sub>30</sub>PP も作ってしまうのであるが、下流の CrtM 変異体が C<sub>30</sub>PP を受け入れないため、C<sub>55</sub> や C<sub>60</sub> 経路は所持しない。いわば CrtM 変異体は Low-pass フィルタの様な役割を果たすわけである。対して CrtM 変異体は C<sub>25</sub>PP 以外にも、C<sub>15</sub>PP や C<sub>20</sub>PP にも作用してしまう。しかし協働する FDS 変異体が副反応の原料 (C<sub>15</sub>PP や C<sub>20</sub>PP) を渡さないため (High-pass)、細胞内で起こるのは C<sub>50</sub> 骨格形成のみになるのである (図 6D)。結局、それぞれが特異性において完璧ではない酵素も、上・下流のペアリングがよければ、2 者がつくる「生合成モジュール」として、極めて高い特異性を発揮できるわけである。

上のような「お手軽進化」による生合成経路の特異化は、自然界の生合成経路も、少なくともその進化の初期において、多用されたのではなからうか。一見特異的に見える天然のカロテノイド合成経路も、それをなす個々の酵素を取り出して調べると、さほど特異的ではないことが多い<sup>16)</sup>。チームワークによって確度の高い仕事ができるのなら、わざわざ個々の部品に膨大な建設コストをかけて特異性を創り込むこともない。個々の酵素の多機能性 (= 優柔不断) を温存したまま経路を特異化できるのなら、新しい化合物を発掘するという、代謝経路のもう一つの役割を果たすうえでは、むしろ有利な戦略といえる。

## 8. 「逆樹 (inverted tree)」を繁茂させる：多様性の進化

ひとたび特異的な主幹経路ができれば、その枝葉の拡張、多様化は簡単である。上述の CrtI 変異体、CrtY、CrtZ、CrtW) を追加発現しても、もはやウェブ状経路は現れなかった。我々は、追加発現する修飾遺伝子を変化させるだけで、C<sub>50</sub>-βカロテン (図 7)、C<sub>50</sub>-ゼアキサンチン、C<sub>50</sub>-カンタキサンチン、C<sub>50</sub>-アスタキサンチンなどの生合成が、高い選択性と効率をもって実現できた。

二次代謝経路には、基質の部分を認識し、それさえ満たせば何にでも作用できるフレキシブル

な酵素が数多く見いだされる。我々は上の C<sub>50</sub>-リコペン経路を起点とした酵素のコンビナトリアル生合成によって、イプシロン環を持つ C<sub>50</sub>-カロテノイド<sup>46)</sup>、糖化型 C<sub>50</sub>-カロテノイドや 2-OH 型の C<sub>50</sub>-βカロテノイド類<sup>47)</sup>、C<sub>5</sub>-付加した C<sub>60</sub>(50+5+5)骨格カロテノイド<sup>48)</sup>など、様々な C<sub>50</sub>カロテノイドがほぼ想定通りに作れることを確認している。

自然界は、フィトエン (C<sub>40</sub>) というただ一つの分子を出発点として、1,000 を超えるカロテノイドを生合成する (図 2)。すでに知られる何百ものカロテノイド修飾酵素を組織的に試せば、C<sub>50</sub>生合成の Inverted Tree は、さらに数百種類の新規カロテノイドを擁する大きなものに成長するはずである。

## 9. おわりに～ Chemo-mimetic Biology ?

以上、C<sub>50</sub> 骨格カロテノイド経路を開通させるための工程を、細々と説明させていただいた。このプロジェクトは、計画 (図 4) そのものは単純なものであった。しかしその実現の道程には、当初想像していなかった技術課題がいくつも現れ我々を苛んだ。さながらトンネル掘削現場のように、それら一つ一つに対処するうちに、(1) 人工オペロンと宿主の代謝ネットワークを仲良くさせる方法<sup>49)</sup>、(2) 新規経路の中間体が思わぬ細胞毒性を持つ場合の対処法、などを学んだ。なかでも本稿で述べた、(3) 自然界にない酵素活性をどう迅速に揃えるか、(4) 特異性の不足した生合成パーツ (酵素) で特異性の高い経路をどう作るか、という 2 課題は、長いステップの生合成建設を目指すときに初めて、解決を強いられるものであり、我々はこの過程を大いに楽しんだ。上で提案した「代謝バンドパス」技術 (図 6) によって、C<sub>35</sub>-、C<sub>40</sub>-、C<sub>60</sub>-カロテノイドの選択的な生合成も実現している。さらに我々は、様々な非天然サイズをもつ「非 C<sub>30</sub>」トリテルペン経路の選択的な生合成経路にも成功しているが、ここでも「代謝バンドパス」技術は不可欠であった。途中でフォーカシングしなければ、生合成経路はすぐに無数の副反応の組み合わせによるウェブ状の経路を形成

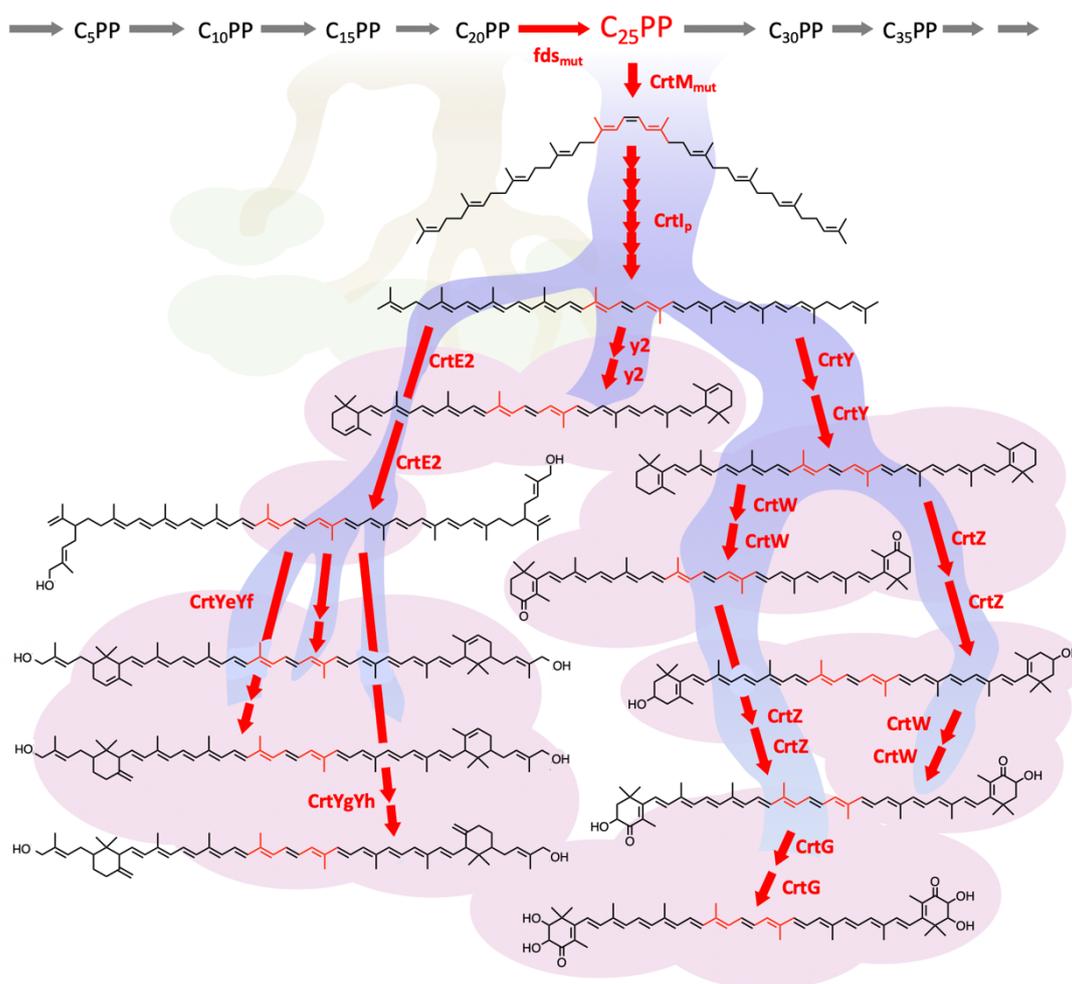


図7. C<sub>50</sub>骨格カロテノイドの生合成Tree

する。経路の特異化は、経路が届き得る生合成ステップ数を確保するためにも、極めて重要であるというのが、この数年で一番重要な学びであった。

図 8 に示すのは、2020 年 6 月現在に我々が生合成できるようになっている非天然カロテノイド骨格の生合成経路である。いまのところ、>C<sub>60</sub>骨格を持つカロテノイドを不飽和化する酵素が見つかっておらず、Inverted Tree の確立には至っていない。しかしそれよりも小さな骨格サイズを持つ経路は、すべて色素化できる。これらひとつひとつが、C<sub>50</sub> 経路 (図 7) のように、遺伝子の mix & match によって分子多様性を獲得できる幹になるのであれば、自然界にない何千もの新規カロテノイドが作れると期待される。カロテノイドの機能・性能は、共役二重結合の数や分子構造に立脚するものであり、骨格サイズの拡張はそのま

ま、カロテノイドが帯び得る光物性・物理物性の拡張を意味する。最近の研究によれば、光合成マシナリーが non-native なカロテノイドをしばしば受け入れ、そのデバイス特性を変化させる。我々は、すでに 50 近い新種カロテノイドの生合成を実現しているが、これらのつくるカロテノイドの中には、光合成マシナリーに受け入れられるものもあるのではないかと。あるいは、少々無理強い (Engineering) すれば、非天然骨格をもつ「超天然」カロテノイドを光学素子とする光合成研究ができるのではないかと。

我々は、これまでに 50 近い新骨格カロテノイドの生合成に成功しているが、今日現在、これらはどれひとつとして、カロテノイドデータベースには載っていない。おそらく、自然界から直接見つからないからだと思われるが、我々は、この

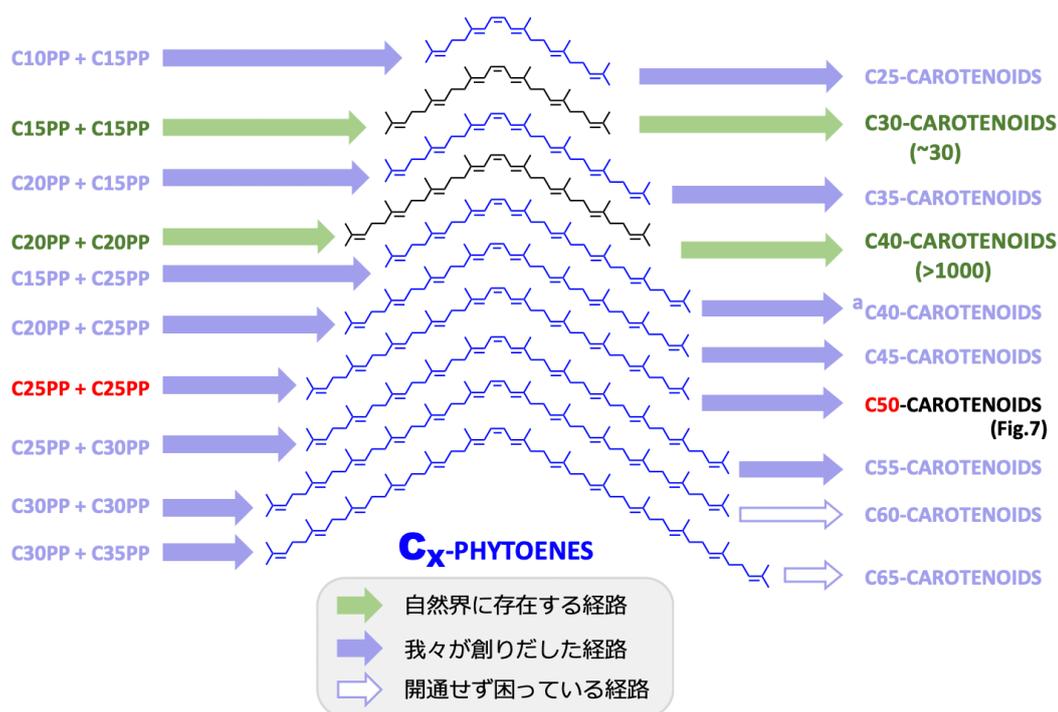


図8. 増えつつあるカロテノイド生成の幹

忝意性を少々残念に思っている。そもそも、我々だって自然の一部であり、ダーウィン進化の所産である。たしかに浅知恵を使いはしたが、我々という生物の営みの中で作り出したカロテノイド色素なのであるから、差別されることなく、天然カロテノイドのラインナップに数えるのが妥当ではないだろうか。

最後に、生合成デザイン学の価値について一言申し述べる。生合成工学（生物生産）は、その建設コストにおいても運転コストにおいても、有機合成や石化プロセスに勝てないことがしばしばである。しかし我々は、それに引け目を感じる必要は全くないと考える。生合成の真の価値は、選択性が高いからでも、常温・常圧で進むからでも、カーボンネガティブなプロセスだから、でもない。過不足なく DNA 文字列に Encode されたケミカルプロセスであるところにこそ、その真の価値がある<sup>50)</sup>。たとえ我々が作る分子が、天然らしからぬ「不」自然な分子だったとしても、その生合成が成功した瞬間から、そのケミストリーは生物相全体に共有される普遍的価値となる（つまり、

DNA にコードできるものは、すべて天然物である）。DNA に encode さえたケミストリー（生合成）は、研究者どうしに止まらず、地球生物全体が共有し、連携して改良できるオープンソース性が保証されている。ヴェーラー合成から 190 年、有機合成化学は、反応や官能基の種類においては、自然界のラインナップを凌駕するに至っている。合成生物学（Synthetic Biology）の使命の一つは、人間様だけが考え得た「不」自然な知恵の一つ一つを、DNA 文字列に書き起こしてゆくこと、であろう。我々がせっせと非天然骨格カロテノイドの生合成経路を作るのは、この営みによって、自然界から学んでばかりだった人類が、ささやかな知恵（分子技術）の返礼をする無二の機会と考えるからである。そして非天然骨格カロテノイドの生合成を目指すのは、もうひとつの「不」自然、物理化学という学問が、我々がつくるカロテノイド（の一部）は、自然界のカロテノイドよりも物性や機能において優れていると明示しているからである。我々はその生合成を実現し DNA 文字起こし、自然界への技術移転を完遂した。無学な

自然界が自力でこの分子を受け取れぬというならば、少々手助けを与えて（進化工学をして）、光合成装置の中にねじ込んでやる必要があるかもしれない。

Received Aug 16, 2020; Accepted Aug 19, 2020; Published Aug 31, 2020.

## 参考文献

本解説で取り上げた開発に関する文献を太字で示した。

- 高橋拓子 and 西山佳孝 (2018) 光合成におけるカロテノイドの機能. *植物科学最前線* 1-13.
- 藤井律子 and 橋本秀樹 (2009) 光合成系におけるカロテノイドの機能と生理活性 in *カロテノイドの科学と最新応用技術* (宮下和夫 Ed.) pp 49-62, シーエムシー出版, 東京, 日本.
- 高市真一 (2010) 光合成生物におけるカロテノイド合成系の進化. *光合成研究* 26, 216-221.
- 高市真一, 三室守 and 富田純史 (2006) カロテノイドーその多様性と生理活性. (裳華房).
- Green, B.R. and Parson, W.W. (2003) *Light-harvesting antennas in photosynthesis. (Advances in photosynthesis and respiration (13))* Springer, Berlin, Germany.
- Carotenoids Database. Available at: <http://carotenoiddb.jp/index.html>.
- Hunter, C.N., Hundle, B.S., Hearst, J.E., Lang, H.P., Gardiner, S., Takaichi, S. and Cogdell, R.J. (1994) Introduction of new carotenoids into the bacterial photosynthetic apparatus by combining the carotenoid biosynthetic pathways of *Erwinia herbicola* and *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 176, 3692-3697.
- Garcia-Asua, G., Cogdell, R.J. and Hunter, C.N. (2002) Functional assembly of the foreign carotenoid lycopene into the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*, achieved by replacement of the native 3-step phytoene desaturase with its 4-step counterpart from *Erwinia herbicola*. *Mol. Microbiol.* 44, 233-244.
- Katabami, A. Li, L., Iwasaki, M., Furubayashi, M., Saito, K. and Umemo, D. (2015) Production of squalene by squalene synthases and their truncated mutants in *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* 119, 165-171.
- Chi, S.C. Mothersole, D.J., Dilbeck, P., Niedzwiedzki, D.M., Zhang, H., Qian, P., Vasilev, C., Grayson, K.J., Jackson, P.J., Martin, E.C., Li, Y., Holten, D. and Hunter, N.C. (2015) Assembly of functional photosystem complexes in *Rhodobacter sphaeroides* incorporating carotenoids from the spirilloxanthin pathway. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1847, 189-201.
- Dilbeck, P.L. Tang, Q., Mothersole, D.J., Martin, E.C., Hunter, N.C., Bocian, D.F., Holten, D. and Niedzwiedzki, D.M. (2016) Quenching capabilities of long-chain carotenoids in light-harvesting-2 complexes from *Rhodobacter sphaeroides* with an engineered carotenoid synthesis pathway. *J. Phys. Chem. B* 120, 5429-5443.
- 山野由美子, 都出千里 and 和田昭盛 (2009) カロテノイドの有機合成 in *カロテノイドの科学と最新応用技術* (宮下和夫 Ed.) 38-48, シーエムシー出版, 東京, 日本.
- Marder, S.R. Torruellas, W.E., Blanchard-Desce, M., Ricci, V., Stegeman, G.I., Gilmour, S., Bredas, J.L., Li, L., Bublitz, G.U. and Boxer, S.G. (1997) Large molecular third-order optical nonlinearities in polarized carotenoids. *Science* 276, 1233-1236.
- Hermann, J.P. and Ducuing, J. (1974) Third-order polarizabilities of long-chain molecules. *J. Appl. Phys.* 45, 5100-5102.
- Lazrak, T., Milon, A., Wolff, G., Albrecht, A.M., Miehe, M., Ourisson, G. and Nakatani, Y. (1987) Comparison of the effects of inserted C<sub>40</sub>- and C<sub>50</sub>-terminally dihydroxylated carotenoids on the mechanical properties of various phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 903, 132-141.
- Umemo, D., Tobias, A.V. and Arnold, F.H. (2005) Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 51-78.

17. 梅野太輔, 古林真衣子 and 三沢典彦. (2009) カロテノイドの生合成. in *カロテノイドの科学と最新応用技術* (宮下和夫 Ed.) 27–37, シーエムシー出版, 東京, 日本.
18. Armstrong, G.A. and Hearst, J.E. (1996) Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* 10, 228–237.
19. Firm, R.D. and Jones, C.G. (2000) The evolution of secondary metabolism - A unifying model. *Mol. Microbiol.* 37, 989–994.
20. Schmidt-Dannert, C., Umeno, D. and Arnold, F.H. (2000) Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. *Nat. Biotechnol.* 18, 750–753.
21. Sandmann, G. (2002) Combinatorial biosynthesis of carotenoids in a heterologous host: A powerful approach for the biosynthesis of novel structures. *ChemBioChem* 3, 629–635.
22. Lee, P.C., Momen, A.Z.R., Mijts, B.N. and Schmidt-Dannert, C. (2003) Biosynthesis of structurally novel carotenoids in *Escherichia coli*. *Chem. Biol.* 10, 453–462.
23. Jia, K.P., Baz, L. and Al-Babili, S. (2018) From carotenoids to strigolactones. *J. Exp. Bot.* 69, 2189–2204.
24. Bouvier, F., Dogbo, O. and Camara, B. (2003) Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science.* 300, 2089–2091.
25. Yang, Y., Yatsunami, R., Ando, A., Miyoko, N., Fukui, T., Takaichi, S. and Nakamura, S. (2015) Complete biosynthetic pathway of the C<sub>50</sub> carotenoid bacterioruberin from lycopene in the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *J. Bacteriol.* 197, 1614–1623.
26. Tao, L., Yao, H. and Cheng, Q. (2007) Genes from a *Dietzia* sp. for synthesis of C<sub>40</sub> and C<sub>50</sub> β-cyclic carotenoids. *Gene* 386, 90–97.
27. Ourisson, G. and Nakatani, Y. (1994) The terpenoid theory of the origin of cellular life: the evolution of terpenoids to cholesterol. *Chem. Biol.* 1, 11–23.
28. Khakbaz, P. and Klauda, J.B. (2015) Probing the importance of lipid diversity in cell membranes via molecular simulation. *Chem. Phys. Lipids* 192, 12–22.
29. Edge, R., McGarvey, D.J. and Truscott, T.G. (1997) The carotenoids as anti-oxidants - A review. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 41, 189–200.
30. Martin, H.D. Ruck, C., Schmidt, M., Sell, S., Beutner, S., Mayer, B. and Walsh, R. (1999) Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions. *Pure Appl. Chem.* 71, 2253–2262.
31. Tachibana, A. Yano, Y., Otani, S., Nomura, N., Sako, Y. and Taniguchi, M. (2000) Novel prenyltransferase gene encoding farnesylgeranyl diphosphate synthase from a hyperthermophilic archaeon, *Aeropyrum pernix*. Molecular evolution with alteration in product specificity. *Eur. J. Biochem.* 267, 321–328.
32. Ohnuma, S.I., Hirooka, K., Tsuruoka, N., Yano, M., Ohto, C., Nakane, H. and Nishino, T. (1998) A pathway where polyprenyl diphosphate elongates in prenyltransferase: Insight into a common mechanism of chain length determination of prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* 271, 18831–18837.
33. Furubayashi, M., Ikezumi, M., Takaichi, S., Maoka, T., Hemmi, H., Ogawa, T., Saito, K., Tobias, A.V. and Umeno, D. (2015) A highly selective biosynthetic pathway to non-natural C<sub>50</sub> carotenoids assembled from moderately selective enzymes. *Nat. Commun.* 6, 7534.
34. Furubayashi, M., Ikezumi, M., Kajiwara, J., Iwasaki, M., Fujii, A., Li, L., Saito, K. and Umeno, D. (2014) A high-throughput colorimetric screening assay for terpene synthase activity based on substrate consumption. *PLoS One* 9, e93317.
35. 田代美希 and 梅野太輔 (2016) テルペノイド合成酵素の機能進化デザイン. *化学と生物* 54, 562–567.
36. Tashiro, M., Fujii, A., Kawai-Noma, S., Saito, K. and Umeno, D. (2017) Directed evolution and expression tuning of geraniol synthase for efficient geraniol production in *Escherichia coli*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 63, 287–295
37. Tashiro, M., Kiyota, H., Kawai-Noma, S., Saito, K., Ikeuchi, M., Iijima, Y. and Umeno, D. (2016) Bacterial production of pinene by a laboratory-

- evolved pinene-synthase. *ACS Synth. Biol.* **5**, 1011–1020
38. Umeno, D. and Arnold, F.H. (2003) A C<sub>35</sub> carotenoid biosynthetic pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3573–3579.
39. Umeno, D., Tobias, A.V. and Arnold, F.H. (2002) Evolution of the C<sub>30</sub> carotenoid synthase CrtM for function in a C<sub>40</sub> pathway. *J. Bacteriol.* **184**, 6690–6699.
40. Umeno, D. (2003) Method to protect a targeted amino acid residue during random mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* **31**, e91.
41. Furubayashi, M., Saito, K. and Umeno, D. (2014) Evolutionary analysis of the functional plasticity of *Staphylococcus aureus* C<sub>30</sub> carotenoid synthase. *J. Biosci. Bioeng.* **117**, 431–436.
42. Tobias, A.V. and Arnold, F.H. (2006) Biosynthesis of novel carotenoid families based on unnatural carbon backbones: A model for diversification of natural product pathways. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1761**, 235–246.
43. Li, L., Furubayashi, M., Hosoi, T., Seki, T., Otani, Y., Kawai-Noma, S., Saito, K. and Umeno, D. (2019) Construction of a nonnatural C<sub>60</sub> carotenoid biosynthetic pathway. *ACS Synth. Biol.* **8**, 511–520.
44. Fasan, R., Meharena, Y.T., Snow, C.D., Poulos, T.L. and Arnold, F.H. (2008) Evolutionary history of a specialized P450 propane monooxygenase. *J. Mol. Biol.* **383**, 1069–1080.
45. 徳力伸彦 (2010) タンパク質進化のダイナミクス. *蛋白質核酸酵素* **55**, 18–25.
46. Otani, Y., Maoka, T., Kawai-Noma, S., Saito, K. and Umeno, D. (2019) Construction of a pathway to C<sub>50</sub>-ε-carotene. *PLoS One* **14**, 1–13.
47. Li, L., Furubayashi, M., Otani, Y., Maoka, T., Misawa, N., Kawai-Noma, S., Saito, K. and Umeno, D. (2019) Nonnatural biosynthetic pathway for 2-hydroxylated xanthophylls with C<sub>50</sub>-carotenoid backbone. *J. Biosci. Bioeng.* **128**, 438–444.
48. Li, L., Furubayashi, M., Wang, S., Maoka, T., Kawai-Noma, S., Saito, K. and Umeno, D. (2019) Genetically engineered biosynthetic pathways for nonnatural C<sub>60</sub> carotenoids using C<sub>5</sub>-elongases and C<sub>50</sub>-cyclases in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* **9**, 1–8.
49. 大谷悠介, 関貴洋 and 梅野太輔 (2019) 二次代謝経路の一次代謝化技術. *ファルマシア* **55**, 658–661.
50. 梅野太輔 (2018) 実験室内[定向進化]による酵素の改良・創出技術. *化学* **73**, 44–48.

## Molecular breeding of pathways to "super" natural carotenoids

Daisuke Umeno

Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Chiba University

## 表紙の紹介

## 東北大学大学院農学研究科附属川渡フィールドセンターの「遺伝子組換え植物隔離ほ場」

東北大学大学院農学研究科  
牧野 周、石山 敬貴

東北大学附属フィールド教育研究センターの隔離ほ場は、日本学術振興会の最初の大型研究プロジェクト「未来開拓学術研究推進事業」の支援を受け、1997年に造成されたものである。「未来開拓学術研究推進事業」は1995年に制定された科学技術基本法(本年、科学技術イノベーション基本法に改正)の施行に伴い、日本学術振興会が国債による出資金事業として初めて取り組んだ研究プロジェクトであった。この隔離ほ場では、NADH-GOGAT アンチセンスイネやムギネ酸を放出する鉄欠乏耐性イネの遺伝子組換え作物の評価試験などが取り組まれた実績もあったが、近年では日本の厳しい栽培規制もあり、使用実績に乏しい。現在の開放系での遺伝子組換え植物栽培の法的措置は、2004年に施行された「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(通称「カルタヘナ法」)に順じ、文部科学省と環境省から第1種使用規程(国が定める生物多様性評価試験を行い、遺伝子組換え生物の環境中への拡散を完全には防止しない使用規程)の承認を得る手順となっている。

しかしながら、自治体によってはその法律やそれに準ずる国の指針を超えるさらに厳しい規制が課せられるところもある。宮城県では、毎年作付け前の一般市民への公開説明会の実施、年間4回の立ち入り調査、年度末の有識者評価委員による公開審査が義務付けられ、栽培植物の開花期に風速が $3\text{ m s}^{-1}$ を超える場合は、付近500mの範囲までの花粉飛散調査が求められる。それらにかかる労力と時間的な消費はきわめて大きい。また、有識者評価委員の多くは、カルタヘナ法や国の第一種使用規程の内容を知らないメンバーで構成されており、既に対応済みの事項が再度要求されるなど、対応に苦慮することが多い。

私たちは、光合成の炭酸固定酵素 Rubisco を約30%増強したイネ(Rubisco 増強イネ)を作出し、この制約のある中で4年間におよぶ収量評価試験を行なった。繰り返しの試験を通して、Rubisco 増強イネの収量は、窒素施肥が $10\text{ kgN}/10\text{ a}$ 以上の施肥区で、親品種「能登ひかり」に比較して20-30%増収となることが実証された(Yoon *et al. Nat. Food*, 1: 134-139, 2020)。詳細な研究成果は本誌次号(第30巻12月号)で解説したい。

世界的にフィールド研究が重要視される昨今、遺伝子組換え植物の開放系栽培試験は、食糧増産を追求する学術的な基礎研究としても必須なプロセスである。ほ場試験を行う上での安全の担保、および地域住民への安心の提供は、研究者の当然の責務であるが、自治体の遺伝子組換え植物の栽培を監査する規制が、国が定める法や指針を超えて過度に厳しくなれば、世界水準から致命的な研究の遅れを伴うばかりか、社会実装への展開にも大きな障害となる。国や政府レベルによる自治体への統一的な開放系組換え植物栽培指針または規制への指導を求めたい。

## 特別企画：若手研究者の海外留学レポート！

## 第10回「Krieger-Liszky 研究室@CEA-Saclay (フランス)」

大阪大学 太陽エネルギー化学研究センター

嶋川 銀河

私は、神戸大学で学位を取得した後 2018 年 5 月～2020 年 3 月までの約 2 年間にわたってフランス CEA-Saclay 研究所における Anja Krieger-Liszky 先生のラボで日本学術振興会の海外特別研究員 (海外学振) として研究を行った。CEA-Saclay は、パリ郊外の Gif-sur-Yvette というコミューンに位置しており長い光合成研究の歴史をもつ研究所である。後述するが受入研究者の Anja はオープンな人柄でなおかつ学術的な興味の幅が広い。2 年間という短い期間ではあったが、我ながら密度の高い時間を過ごせたのではないかと思う。パリには留学生が溢れており、私と似たような境遇でパリに来ている日本人研究者も多かった。一口に海外留学と言っても、研究分野や、とりわけ受入研究室の環境によってその実態は様々であろう。そのため私の留学経験も、あくまで数ある事例の一つとして頭に入れてもらえれば幸いである。実際に留学を経験した私の立場としては、是非とも学生や若手研究者の方々には一度海外へ出てみてほしい。本稿ではそのような願いを込めて「しんどかった、徒労に終わった」ことよりも「楽しかった、実を結んだ」話に焦点をあてたい。どうかその点を考慮した上で一読いただければ幸いである。

## 1. フランスへ行くまでの話

留学を決意したキッカケを挙げるならば、博士課程 2 年生の冬に Flavodiiron タンパク質 (FLV) の生化学を目的としてロンドン大学 (イギリス) の Guy Hanke 先生のラボへ 1 カ月ほど出張させてもらった事であろう。もともとお世辞にも英語ができるとは言い難い私は、海外への研究留学に対して大きな壁を感じていたが、ロンドンでの短期滞在を経て私が抱いた感情は「なんや、英語ができなくても研究できるやん！」というものだった。神戸でもロンドンでも実験に使用する機械やプロトコルは大して変わらず、また似たような分野の研究者であれば「ラボの常識」なるものも凡そ共通の認識をもっているため、英語でのコミュニケーションは (もちろん重要ではあるが) 不可欠ではなかった。このロンドン出張で留学への不安が払拭された私は、帰国後すぐに海外学振への申請を考え始めたように思う。

学位を取りたての海外留学で大きく分野を変える胆力のなかった私は「光合成電子伝達」や「活性酸素」というキーワードを元に受入先を探していた。Anja とは 2016 年の国際光合成サテライト会議 (オランダ) で既に面識があったが、受入れを打診する決定打となったのは 2017 年の日本植物生理学会 (鹿児島) で当時スーパーバイザーであった三宅親弘先生が国際シンポジウムを企画し、Anja を演者として招待したことであろう。Anja と三宅先生はそれぞれドイツのヴェルツブルクでの研究経験があり、何かと共通した話題が多い。また同じくシンポジウムをオーガナイズしていた伊福健太郎先生は Anja と付き合いが長く非常に親しかったため、そのお助けもあって海外学振の受入れを相談するのは難しくなかった。とは言え、受入先の打診をした段階では Anja のことを深く知っていたわけではなく、私の印象は「PSII や活性酸素、Plastidial terminal oxidase (PTOX) のスペシャリスト」で「とても明るい女性の研究者」という程度であった。

海外学振に採用内定をもらってからは、本格的に先方と打ち合わせることになる。諸々の事務手続きやビザ申請は、正直めんどろではあるが、こればかりは各々でうまくやるしかない。私の場合は、フランス留学に不可欠である Convention d'accueil の取得が大変であった。

## 2. フランスでの研究の話

私が働いていた CEA-Saclay 研究所は、長い光合成研究 (特に明反応について) の歴史をもっており、中でも電子スピン共鳴 (EPR, ESR) や分光測定などに強いと思う。かつては Bill Rutherford 先生や Giles Johnson 先生も働いており、今は光合成基礎研究から離れているが Klaus Brettel 先生や Winfried Leibl 先生も同じ建物で研究を行っていた。PSII の専門家である Alain Boussac 先生が同じ部屋で実験しており、また同じ研究グループには Anja の他に Director として PSI およびその周辺の電子伝達を知り尽く

した Pierre Sétif 先生とシアノバクテリア Orange carotenoid protein (OCP) の大家である Diana Kirilovsky 先生が働いていた (図 1)。大学ではなく研究所であるため、先生方は教育指導などに時間を取られている様子はなく、気ままに実験し、その都度でできたデータを材料に議論を交わす。どの先生もディスカッションが大好きで、なおかつレベルが非常に高い。そして皆が常に新しい話題を求めている。これほどディスカッション重視な研究スタイルは私にとってなかなか新鮮で、今考えても不思議な話だが、ただコーヒーを飲みながら話しているだけで貴重な勉強になっていたように思う。残念な事に、上に挙げた先生方の多くはリタイアが近づいており、それに伴って私のいた研究グループも近々引っ越し、再編成の予定である。新型コロナの事も踏まえると、最後の世代として CEA-Saclay のあの環境で働けたことが本当に幸運だったと思う。

Anja のラボでは、光合成電子伝達や活性酸素に係わる幅広い研究テーマに取り組んだ。中でも一番力を注いだのは当初の研究計画に則した「葉の老化」の研究であり、オオムギ第一葉の電子伝達活性や活性酸素生成を老化の初期過程で評価していた。葉の老化と言えばクロロフィル量の低下が分かりやすい指標であるが、実はクロロフィル量が低下する前から光合成活性の減衰が起こっており、さらにそのもっと前の段階において PSI のエレクトロンドナーであるプラストシアニンの量が低下する。このプラストシアニン量の低下は新型 PAM (Klas-NIR) で簡便に測定が可能であり (図 2)、その Methodology に焦点をあてて先ずは一報論文を仕上げる事ができた (Shimakawa et al. 2020 *Photosynthesis Research* 144, 63-72)。この論文を執筆した際には原稿の構成や英文など珍しく褒めてもらい「あなたの仕事でしょ」と言われ Corresponding author をいただいた時は非常に嬉しかった。また論文執筆までこぎつけたのは Pierre の貢献が非常に大きく、彼のデータがなければ Methodology に焦点をあてた構成にはできなかった。フランスでは PAM よりも JTS (Joliot-type spectrometer) を使用する光合成研究者が多い印象だが、Pierre は非常にレベルの高い PAM ユーザーで彼以上に PAM を analytical に使う人は世界中を見ても他にいないように思う。Klas-NIR については神戸の三宅先生のラボでも触っており、私の知識もそれなりにあったおかげで、WALZ から Christof Klughammer 先生が出張に来た際には、ディスカッションも大いに盛り上がった。話が少し逸れたが、オオムギの老化研究についてはその後異なる 2 品種を屋内外で育て、それぞれ光合成電子伝達や活性酸素生成の老化初期過程における変化 (および品種間差) が屋内外の環境でどのように異なるかを調べた。これは Anja が以前に当該 2 品種のオオムギで異なる活性酸素生成特性を見出していたこと (Krieger-Liszkay et al. 2015 *Planta* 241, 1497-1508) に端を発しており、私たちが葉の老化に関する総説 (Krieger-Liszkay et al. 2019 *Physiologia Plantarum* 166, 148-164) を執筆する中で「植物の栽培条件が異なる事によって老化葉の光合成、活性酸素生成の挙動が全く違う」ことに着目したためである。研究テーマについては、その他にも CEA-Saclay ならではの EPR 測定を駆使して PSI 光傷害の分子メカニズムに踏み込んだり、PTOX の欠損株や過剰発現株を解析したり、また (Anja の要望で) 神戸の頃から行っていた FLV の生化学研究を続けたりと、良くも悪くも手当たり次第に様々なテーマに取り組んできたが、私の力不足もあってこ



図 1. 同じ研究グループのメンバー

れらはまだ公表にこぎつけていないため、本稿では詳細を控える。様々な研究テーマに取り組みしたのはひとえに Anja の学術的興味の幅の広さであり、これが私の研究スタイルとも合っていたと思う。

研究テーマのみならず、人間関係においても Anja は幅広くオープンな人柄であったため、研究室にはゲストが来ることも多かった。共同研究を行うこともしばしばあり、中でもインスブルック大学(オーストリア)の Thomas Roach 先生や IBPC (フランス)の Benjamin Bailleul 先生との実験は楽しかった。また南仏の CEA-Cadarache 研究所では Gilles Peltier 先生と、友人の Adrien Burlacot に招待されてセミナーを行うこともできた。当時は現東京薬科大学の溝上祐介先生がこちらの研究所で働いており、その紹介で Bernard Genty 先生 (ΦII の実用性を確立された方)とお話できた時には興奮したものである。フランスあるいはヨーロッパ内での学会で何度か発表できる機会もあり、これら一連の経験を通して、同年代の知り合いもたくさんできた。前回までの記事で多くの方が指摘している通り「海外における人的ネットワークの構築」は、今の日本において海外留学の担う最も大きな意義の一つだと思う。2年間は決して長いとは言えないが、今回得ることができた貴重な人脈はこの先も大切にしたい。

### 3. フランスでの生活の話

カジュアルな話題になるが、少しだけパリでの生活についても触れておく。まずパリほど留学生に優しい街はそうそうないと思う。パリには外国人が本当に多く、街中を出歩いても自分が「よそ者」であることをほとんど感じない。博士学生やポスドクの日本人も多く、また私は運よくパリ国際大学都市に部屋を見つけることができたため、パリ日本人若手物理学者の会(生物の方もいた)などへも参加して日本人の方とも積極的に交流を行っていた。せっきくの海外研究滞在なので「日本語を話せる環境に身をおかない」という考えも大事だと思う。しかしながら私の場合は、パリで働く異分野の方から研究の話も聞けるのも楽しかったし、何よりも生活面(特に留学初期)において日本人が周りになると心強かった。言語について、もちろんフランス語ができた方が生活は遥かに楽だが、簡単な言葉が分かれば生活に困ることはない。私もフランス語教室には通っていたが、実際に職場で使用する機会がほとんどなかったため、今でも必要最低限のフランス語が喋れる程度である。フランスは食も文化も芸術も豊かで、パリ市内だけでも回りきれないほどに名所が多く、またパリを離れば魅力的な地方都市が無数にある。せっきくの貴重な海外長期滞在なので、休日にはその国の文化や歴史にも触れると良いだろう。休日に家で仕事をしてばかりいると、週明け職場でのコミュニケーションに困ることになる。

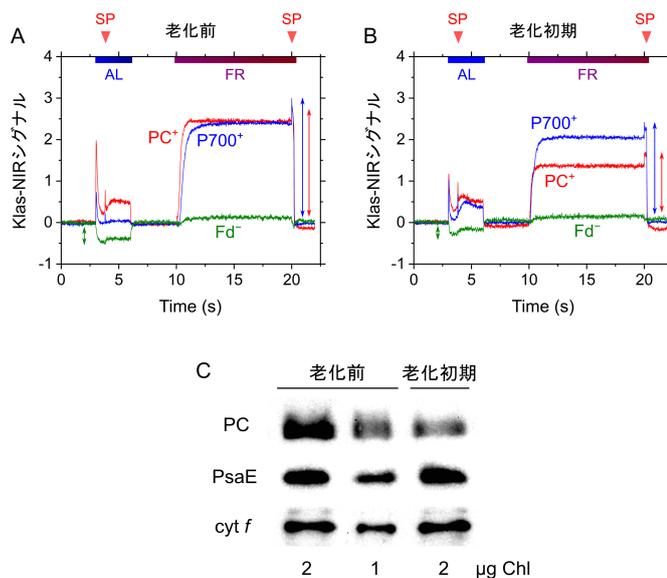


図2. Klas-NIRによるPSI反応中心クロロフィル(P700)、プラストシアニン(PC)、フェレドキシン(Fd)酸化還元同時解析(A, B)およびウエスタンブロットによるプラストシアニン減少の確認(C)。遠赤色光(FR)と飽和パルス光(SP)によりP700とPCを完全に酸化、励起光(AL)とSPによりFdを完全に還元することで、両矢印で示した各コンポーネントの量(ここでは相対値)を見積もることができる。ウエスタンブロットはオオムギ葉の抽出液で行い、PCの他にPsaE(PSIサブユニット)とシトクロムf(cyt f)を検出した。図はShimakawa et al. (2020) *Photosynthesis Research* 144, 63-72より改訂。

#### 4. 日本に戻ってきた話

今回私は日本学術振興会の特別研究員 PD に無事採用されて大阪大学の中西周次先生の研究室で働く事になった。ポスドクで海外留学を考えた際に最も大きい不安は「どうやって日本に戻る？」という問題だと思う。こればかりは正直私も不安であったが、面白いことに現在の受入研究者である中西先生と知り合ったキッカケは Anja の紹介であるため、私の場合は海外留学が結果的に日本での次の仕事と結びついたと言える。ヨーロッパで新型コロナの感染爆発が 3 月半ば頃から始まったのはとても残念であった。研究室のメンバーと企画した「お別れ会」がちょうどパリの全レストラン閉鎖の前々日になった事など不幸中の幸いもあったが、新型コロナの影響で帰国を少し早めた事で片づけられなかった議論や実験もあり、何よりも現時点においてフランス含めたヨーロッパへの出張が難しくなってしまった事態は本当に深刻である。そんな中でも、帰国後に CEA-Saclay の研究セミナーに Zoom で参加させてもらうなど、Anja には感謝の思いでいっぱいである。

#### 5. おわりに

冒頭でも述べた通り、本稿では比較的「海外留学をして良かった」と思えるポジティブな話を選んで綴った。実際はもちろん苦勞もしたし、国外ゆえの大変な事も多かったが「国内でポスドクをしていれば楽チンだった」という話でもないと思う。博士を取った後の初めてのポスドクなんてきつとどこに行っても苦勞はするだろう。

いろいろ書いたものの結局ほとんどが単なる私の思い出話になってしまったため、最後に僭越ながら留学を考えている方へのアドバイスをしたいと思う。第一に、自身の専門性を大切に、アピールすることである。ポスドクとして海外へ留学する場合「あなたはどんな仕事をしてきたの？」と必ず聞かれる。これから博士課程を目指す方、まもなく博士課程を終える方、どんなラボでも尖った武器を身につけることになると思う。それは長かった学生時代に指導教員や出身研究室から得た貴重な宝だと思うので大切にしてほしい。私の場合は、PAM を用いた測定とデータの解釈、様々な生物種での変異体作製能力、そして FLV の事などであった。論文になっていけばきっと海外の研究者の目にも入っている。実績に裏打ちされた専門性は留学初期の頃からしっかり評価してもらえていたように思う。もう一つ私から言えるアドバイスは、コミュニケーションにおける根気を強く持つことである。異なる言語、文化圏で生きてきた人たちとのコミュニケーションでは必ず齟齬が生まれるが、この「食い違い」を解消するために膨大なエネルギーを費やす事も珍しくない。そんな中でも途中で諦めず、根気よく先生や同僚とコミュニケーションを取って「ちゃんと理解し合う」ことが研究留学において最も重要な事だと思う。新型コロナの問題がいつまで続くか分からず先行きの見えない世の中だが、海外での研究滞在に少しでも興味のある方は、是非とも留学のチャンスを掴み取ってほしい。最後に、執筆の機会を与えて下さった若手の会会長の清水隆之先生、そして本会編集長の成川礼先生に、この場を借りて深くお礼申し上げる。

## 集会案内

### 光合成学会若手の会オンラインセミナー開催のお知らせ

若手の会では、10月9日（金）にZoomによるオンラインセミナーを開催することにいたしました。コロナの影響で、発表・交流の機会が減ってしまったため、今回のセミナーでは、学生をはじめとした若手研究者の発表を募集することにいたしました。本企画が、学生らの良い発表の機会になれば幸甚です。また、恒例の先輩研究者の話聞く企画では、基生研の高橋俊一さんにご講演いただきます。皆さんの積極的なご参加をお待ちしております。

詳細は、新しくなった若手の会ホームページ

(<https://sites.google.com/site/photosynwakate/home?authuser=0>) をご覧ください。

#### 仮プログラム

13:00-13:05 挨拶

清水隆之（東京大学・総合文化研究科）

13:05-13:35 発表 1

13:35-14:05 発表 2

14:05-14:20 休憩

14:20-14:50 発表 3

14:50-15:20 発表 4

15:20-15:35 休憩

15:35-16:40 若手の会特別企画 先輩研究者に聞いてみよう

高橋俊一（基礎生物学研究所）

「TBD」

16:40-17:00 休憩

17:00-18:00 全員の自己紹介



## 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ッカイ）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](mailto: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。



## 日本光合成学会会則

### 第1条 名称

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

### 第2条 目的

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

### 第3条 事業

本会は前条の目的を達成するために、シンポジウム開催などの事業を行う。

### 第4条 会員

#### 1. 定義

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

#### 2. 権利

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

#### 3. 会費

会員および賛助会員は本会の定めた年会費を納めなければならない。

### 第5条 組織および運営

#### 1. 役員

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

#### 2. 幹事

幹事数名をおく。幹事任期は4年とする。幹事の再任は妨げない。

#### 3. 常任幹事会

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

#### 4. 幹事会

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

#### 5. 事務局

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

#### 6. 役員および幹事の選出

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

### 第6条 総会

1. 総会は会長が招集し、出席会員をもって構成する。議長は出席会員から選出される。

2. 幹事会は総会において次の事項を報告する。

1) 前回の総会以後に幹事会で議決した事項

2) 前年度の事業経過

3) 当年度および来年度の事業計画

3. 幹事会は総会において次の事項を報告あるいは提案し、承認を受ける。

- 1) 会計に係わる事項
- 2) 会則の変更
- 3) その他の重要事項

#### 第7条 会計

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

#### 付則

第1 年会費は個人会員1,500円、賛助会員一口50,000円とする。

第2 本会則は、平成14年6月1日から施行する。

第3 本会則施行後第一期の会長、事務局長、常任幹事にはそれぞれ、第5条に定める規定にかかわらず、平成14年5月31日現在の会長、事務局担当幹事、幹事が再任する。本会則施行後第一期の役員および幹事の任期は、平成14年12月31日までとする。

第4 本会則の改正を平成21年6月1日から施行する。

### 日本光合成学会の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。

## 「光合成研究」 投稿規定

### 総則

1. 「光合成研究」(本報)は光合成に関連する諸分野における記事を掲載する。
2. 1年に3回(4月、8月、12月号)冊子体として発行し、電子版を光合成学会のホームページ上に公開する。
3. 原稿が E-mail において受付処理をされた日を以て受付日とし、編集委員が掲載可と判断した日を採択日とする。ただし原稿が本規定に合わない場合受け付けないことがある。
4. 編集委員は、原稿の審査に際し、原則的に適切な査読者を選んで査読を依頼し、掲載の可否を判断する。
5. 掲載論文の著作権(冊子体および電子版)は日本光合成学会に属する。
6. 図やそこで使われる写真が過去論文として発表したものもしくは発表されたものであった場合は、それらの著作権問題を著者ら自身でクリアする必要がある。
7. 投稿に当たっては、全ての著者が投稿に同意し、かつ原稿の内容について責任を持たなければならない。また、全ての著者は代表著者が全著者を代表して原稿の掲載に関する事項を執り行うことに同意するものとする。

### 一般的事項

- (1) Microsoft Word ファイルを基本とする。字数制限は設けないが、「解説」は A4 サイズ 6~8 ページ、「トピックス」、「研究紹介」は 4 ページ程度を目安にする。1 ページ当りの文字数は、図表を含めて 1800 字程度。日本語は MS 明朝、英数字は Times New Roman とする。
- (2) 本文の最初に、日本語および英語での論文題名、著者所属機関名、氏名を記載する。
- (3) 句読点は「、」「。」「。」に統一する。
- (4) 300 字程度の日本語要旨を作成すること。
- (5) 参考文献、表、図のキャプションは、本文の後ろにつける。

- (6) 本文中に図の大体の位置を指示する。(図を貼り付けてもよい。)

### 参考文献

- (1) 参考文献は、本文中の該当箇所に、右上付きで、1)、1,2)、1-3) のように示す。
- (2) 参考文献の表記は下記のとおりとする。  
雑誌例
  1. Berthold, D.A., Babcock, G.T. and Yocum, C.F. (1981) A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. EPR and electron-transport properties. *FEBS Lett.* 134, 231-234.
  2. Nanba, O. and Satoh, K. (1987) Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome *b*-559. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 109-112.

### 書籍例

3. Diner, B.A. and Babcock, G.T. (1996) Structure, dynamics, and energy conversion efficiency in photosystem II, in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Ort, D.R. and Yocum, C.F., Eds.) pp 213-247, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.

### 図/写真

- (1) 図、写真はグレースケールでも良い場合には、グレースケールで作成する。カラーの図や写真を希望する場合には、カラーの図や写真を送付すること。図や写真の枚数によっては、編集委員会との相談により、PDF 版ではカラーになるが、冊子体ではグレーになる場合がある。
- (2) jpg あるいは tiff 形式等で本文とは別ファイルとして送付すること。解像度は 300 dpi 程度とする。

日本光合成学会「光合成研究」編集委員会  
2017年12月23日改訂

## 幹事会名簿

秋本 誠志	神戸大学大学院理学研究科	田中 歩	北海道大学低温科学研究所
栗井 光一郎	静岡大学大学院理学領域	田中 寛	東京工業大学化学生命科学研究科
池内 昌彦	東京大学大学院総合文化研究科	田中 亮一	北海道大学低温科学研究所
石北 央	東京大学大学院工学研究科	民秋 均	立命館大学総合理工学院
泉井 桂	近畿大学生物理工学部生物工学科	田茂井 政宏	近畿大学農学部生物機能科学科
伊藤 繁	名古屋大学	都筑 幹夫	東京薬科大学生命科学部
井上 和仁	神奈川大学理学部	出羽 毅久	名古屋工業大学大学院工学研究科
伊福 健太郎	京都大学大学院生命科学研究所	寺島 一郎	東京大学大学院理学系研究科
得平 茂樹	東京都立大学院理工学研究科	梶 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
太田 啓之	東京工業大学生命理工学院	永島 賢治	神奈川大学
大友 征宇	茨城大学理学部	成川 礼	静岡大学大学院理学領域
大政 謙次	東京大学大学院農学生命科学研究科	南後 守	大阪市立大学大学院理学研究科
小川 健一	岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所	西田 生郎	埼玉大学大学院理工学研究科
小俣 達男	名古屋大学大学院生命農学研究科	西山 佳孝	埼玉大学大学院理工学研究科
垣谷 俊昭	名古屋大学	野口 航	東京薬科大学生命科学部
菓子野 康浩	兵庫県立大学理工学部	野口 巧	名古屋大学理学研究科
柏山 祐一郎	福井工業大学環境情報学部	長谷 俊治	大阪大学蛋白質研究所
金井 龍二	埼玉大学	林 秀則	愛媛大学プロテオサイエンスセンター
神谷 信夫	大阪市立大学複合先端研究機構	原 登志彦	北海道大学低温科学研究所
熊崎 茂一	京都大学大学院理学研究科	彦坂 幸毅	東北大学大学院生命科学研究所
栗栖 源嗣	大阪大学蛋白質研究所	久堀 徹	東京工業大学研究院化学生命科学研究科
小池 裕幸	中央大学理工学部	日原 由香子	埼玉大学大学院理工学研究科
小林 正美	筑波大学大学院数理物質科学研究科	福澤 秀哉	京都大学大学院生命科学研究所
坂本 亘	岡山大学資源生物科学研究所	藤田 祐一	名古屋大学大学院生命農学研究科
佐賀 佳央	近畿大学理工学理学部	古本 強	龍谷大学農学部
櫻井 英博	早稲田大学	牧野 周	東北大学大学院農学研究科
佐藤 公行	岡山大学	増田 真二	東京工業大学
佐藤 直樹	東京大学大学院総合文化研究科	増田 建	バイオ研究基盤支援総合センター
鹿内 利治	京都大学大学院理学研究科	松浦 克美	東京大学大学院総合文化研究科
篠崎 一雄	理化学研究所植物科学研究センター	松田 祐介	東京都立大学都市教養学部
嶋田 敬三	東京都立大学	真野 純一	関西学院大学理工学部
沈 建仁	岡山大学異分野基礎科学研究所	皆川 純	山口大学農学部
杉浦 昌弘	名古屋大学	宮尾 光恵	基礎生物学研究所
杉浦 美羽	愛媛大学プロテオサイエンスセンター	宮下 英明	東北大学大学院農学研究科
杉田 護	名古屋大学遺伝子実験施設	宗景 (中島) ゆり	京都大学大学院地球環境学堂
杉山 達夫	名古屋大学	村田 紀夫	関西学院大学理工学部
鈴木 祥弘	神奈川大学理学部	本橋 健	基礎生物学研究所
園池 公毅	早稲田大学教育学部	本橋 令子	京都産業大学総合生命科学部
高市 真一	東京農業大学生命科学部	矢守 航	静岡大学大学院理学領域
高橋 裕一郎	岡山大学異分野基礎科学研究所	和田 元	東京大学大学院農学生命科学研究科
高林 厚史	北海道大学低温科学研究所		東京大学大学院総合文化研究科

## 編集後記

収束しないコロナ禍と 40°C を超える地域も出る猛暑に苦しめられる夏を迎えています。皆様におかれましても、どうか体調にご留意いただければと思います。今回のウイルス禍の影響を受け、第 11 回日本光合成学会年会は残念ながら中止となりましたが、オンラインミニシンポジウム「諸刃の剣: 光合成との付き合い方」が 9/18 (金) 開催されます。詳細は本号 72 ページの案内をご覧ください。このような状況を吹き飛ばす熱いシンポジウムとなるよう、皆様のご参加をお待ちしております。

さて、今号は、前号の表紙を飾った得津さんのトピックス記事と、私と編集委員の高林さんが企画した解説特集「光合成生物に関連する分子の開発」の三記事が掲載されています。記事数は少ないものの、力作揃いの素晴らしい号に仕上がったと思います。個人的には、梅野さんの開発戦略とその研究から浮き彫りにされる生命システムの巧みに魅了されました。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、ぜひ私までご連絡ください。

また、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。表紙に適した写真もよろしくお願ひします。

私の編集委員長としての仕事もあと一号を残すのみとなりました。私と同様に、読者の方々を魅了できる誌面作りに、あと残り僅かとなりましたが尽力したい所存です。

編集長・成川 礼 (静岡大学)

## 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、編集長の成川 (narikawa.rei@shizuoka.ac.jp) までご連絡ください。

「光合成研究」編集委員会

編集長 成川 礼 (静岡大学)  
編集委員 高林 厚史 (北海道大学)  
編集委員 宗景 ゆり (関西学院大学)  
編集委員 矢守 航 (東京大学)

---

日本光合成学会 2020年度役員

会長 鹿内 利治 (京都大学)  
事務局長 園池 公毅 (早稲田大学)

常任幹事 久堀 徹 (東京工業大学) 次期会長  
常任幹事 古本 強 (龍谷大学) 年会 2017年  
常任幹事 石北 央 (東京大学)  
常任幹事 伊福 健太郎 (京都大学) 前編集長  
常任幹事 牧野 周 (東北大学) 年会 2018年  
常任幹事 宮尾 光恵 (東北大学) 年会 2018年  
常任幹事 本橋 健 (京都産業大学) 年会 2019年  
常任幹事 菓子野 康浩 (兵庫県立大学)  
常任幹事 熊崎 茂一 (京都大学) 光生物学協会  
常任幹事 成川 礼 (静岡大学) 編集長、年会 2020年  
常任幹事 矢守 航 (東京大学) ホームページ  
常任幹事 藤田 祐一 (名古屋大学)  
常任幹事 沈 建仁 (岡山大学)

会計監査 高橋 裕一郎 (岡山大学)

---

光合成研究 第30巻 第2号 (通巻86号) 2020年8月31日発行

日本光合成学会

〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町  
京都大学 理学研究科 鹿内利治 研究室内

TEL : 075-753-4247

FAX : 075-753-4257

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 (ゼロイチキュウと入力)、当座、0730290

名前 : ニホンコウゴウセイガッカイ

---