カロテノイド：その多様性と普遍性が切り拓く新展開

篠村知子
帝京大学理工学部バイオサイエンス学科
〒320-8551　栃木県宇都宮市豊郷台 1-1

Tomoko Shinomura

Diverse physiological roles of widespread carotenoids in photosynthetic organisms

Key words: carotenoid, carotene, xanthophyll, photoprotection, antioxidation
Department of Biosciences, School of Science and Engineering, Teikyo University
1-1 Toyosatodai, Utsunomiya, Tochigi, 320-8551, Japan
DOI: 10.24480/bsj-review.9b1.00133

カロテノイドの存在の普遍性

カロテノイドはテトラテルペノイド（C_{40}）の一種であり，その構造からカロテン類とキサントフィル類に大別される。カロテン類は, 炭素の共役２重結合からなる基本骨格（ポリエン鎖）とその両端につくエンドグループが，炭素と水素原子のみで構成される（図 1A)。一方，キサントフィル類に分類されるカロテノイドのエンドグループには，アルコール，ケトン，アルデヒド，カルボン酸，エポキシド，ラクトンなどの酸素原子を含む官能基がある（図 1B）(Niyogi *et al*., 2015; 眞岡, 2009)。カロテノイドの種類は非常に多く，原核生物から動物や高等植物までを含む 683 種類の生物種から約 1100 種類以上の天然カロテノイドが報告されている（Yabuzaki, 2017)。カロテノイドを生合成するのは植物と藻類と，ごく限られた種類のバクテリアと菌類に限られることから，様々な植物種や藻類種の生産するカロテノイド組成やその合成酵素遺伝子を調べることで，進化的な類縁関係や葉緑体の共生による進化の歴史が議論されてきた（三室ら, 2006)。動物は食物連鎖によってカロテノイドを摂取するので，動物種のカロテノイド組成を調べることは生態系の食物連鎖の関係を明らかにすることになる（眞岡, 2009)。

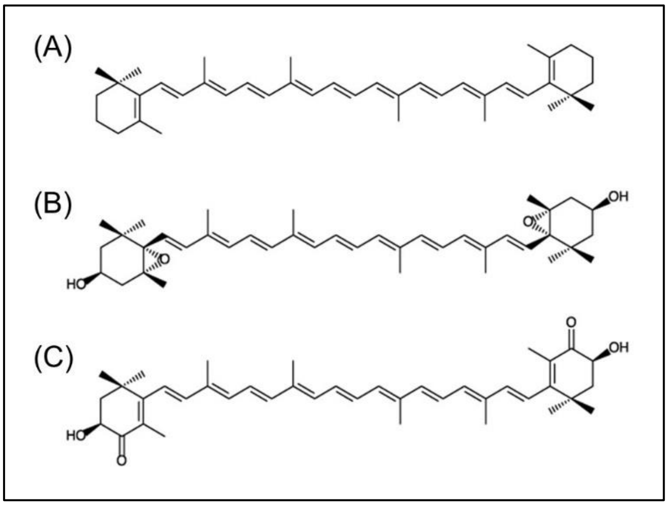

図１　代表的なカロテノイドの構造
(A)　β-カロテン；炭素と水素原子のみで構成されるカロテン類の代表的なカロテノイド
(B)　ビオラキサンチン；分子内に酸素原子を含む官能基をもつキサントフィル類の一種
(C)　アスタキサンチン；強力な抗酸化作用をもち，食品，機能性サプリメント，化粧品，飼料および水産養殖分野で利用されているカロテノイド

カロテノイドの機能の多様性と進化

生物はこのように非常に多種類のカロテノイド分子を，どのような生理機能に利用しているのだろうか。植物や藻類の光合成においては，補助色素としての作用や，キサントフィルサイクルを介する「光防御作用」や「抗酸化作用」などが明らかになりつつある（本総説集の高橋と西山 参照）。すなわち，カロテノイドは，シアノバクテリアや藻類や植物が光合成のための光を絶対的に必要とする反応系において，補助色素としての集光の役割や，光を受け取ることで必然的に生じる過剰エネルギーやラジカルなどのストレス要因を緩和するための機能性分子の役割を果たしてきたと考えられる。さらに，食品栄養科学や医療分野でも，ヒトにおけるカロテノイドの欠乏症が夜盲症などの重篤な疾病を引き起こすこと，β-カロテンなどを「ビタミンAの前駆体」（プロビタミンA）として摂取すると小腸から吸収される際に酸化開裂酵素によりレチナール（ビタミンAの一種）に変換されてそれが視細胞のロドプシンの発色団となること，ヒト網膜の最も光が集まる黄斑にはゼアキサンチンが集中的に蓄積していることが知られている（三室ら, 2006）。これらの研究から，カロテノイドは生物進化の非常に早い段階から，光をエネルギー源として利用する反応系や，光を情報媒体として利用する反応系において，生物が必ず利用してきた化合物分子であるといえるであろう。

一方，ヒトや類人猿には，光とは一見関係がなさそうな脳組織にルテインなどのキサントフィル類が蓄積することが報告されている（Erdman *et al*., 2015）。その他にも，ある種のカロテノイドがビタミンAに変換されるのではない機構（ノンプロビタミンA活性）で抗癌作用や抗動脈硬化作用を示すことが報告されており，その機能は，カロテノイドの「活性酸素の消去作用」，すなわち「抗酸化物質」としての働きによると説明されている（三室ら, 2006; 宮下, 2009）。抗酸化作用のあるカロテノイドとして最も注目を集めているのはアスタキサンチン（図1C）であろう。アスタキサンチンはキサントフィル類の一種で，単細胞性の鞭毛をもつ緑藻の一種である *Haematococcus pluvialis* の休眠胞子に蓄積し，強力な抗酸化活性をもつことがよく知られている（Kobayashi *et al*., 1997）。これらの微細藻類やある種のバクテリアなどが生合成して蓄積したものを，生態系のより上位の消費者のエビやカニやサケなどが摂取して鮮やかな赤色やピンク色の色素物質として蓄積する（矢澤, 2009）。

このように，カロテノイドが非光合成生物を含む生物界全体に広く分布することや，その機能が光受容関連の反応系にとどまらず多様な機能を示すことは，光受容体フィトクロムの進化研究の飛躍的拡大の道筋を連想させる。近年，フィトクロムタンパク質遺伝子に類似したフィトクロム様タンパク質遺伝子が，シアノバクテリアにも（Ikeuchi & Ishizuka, 2008），非光合成バクテリアにも見出され（Davis *et al*., 1999），フィトクロム進化の議論は，一気に陸上植物の範囲を超えて非光合成バクテリアや菌類や後生動物を含むほぼすべての生物群がもつ酸素センサーとしてのヘムタンパク質にまで起源を求めるほどに深化したことは記憶に新しい（Montgomery & Lagarias, 2002）。カロテノイドがさらに興味深いのは，多くの動物はカロテノイドを一部改変するとはいえ基本的には生合成せず，分子そのものを摂取して利用することで進化を遂げてきたのである。こんなユニークな生体分子が他にあるだろうか。カロテノイド分子をめぐる進化は生命進化そのものの本質に迫る新しい知見を示すに違いないと筆者は確信する。

本総説集の構成と今後の展開

本総説集は，日本植物学会第81回大会（2017年9月，東京理科大学 野田キャンパス）で開催さ

れたシンポジウム「カロテノイド：その多様性と普遍性が切り拓く新展開」の内容をもとに，発表者らの協力のもとにまとめたものである。このシンポジウムでは，まずカロテノイドの機能解析の最も進んでいる光合成における機能解析や（本総説集の高橋と西山 参照），合成経路探索の最先端研究が紹介された（本総説集の高市 参照）。続いて進化系統上ユニークな材料であり産業応用も期待されている *Euglena gracilis* のカロテノイド合成系の遺伝子探索や，カロテノイド合成と強光ストレス耐性との関連を議論し（本総説集の加藤と篠村 参照），カロテノイド合成経路探索の一連の研究が広く生物界に分布するシトクロム P450 の機能解析の研究と結びついたことも紹介された（本総説集の玉木と今石 参照）。さらに，鞭毛をもつ微細藻類の眼点の主な組成がカロテノイドであることはよく知られているが，近年，*Chlamydomonas reinhardii* の走光性の研究においてカロテノイド欠損株を用いた興味深い研究から，カロテノイドはレドックス制御を介する走光性の「高精度な光反射板」として機能することが明らかになったことが紹介された（本総説集の若林ら 参照）。本シンポジウム後半には，シアノバクテリアを用いてカロテノイドを高蓄積させるための遺伝子改変の試みや（本総説集の島田ら 参照），合成経路の代謝工学的な改変などの最新のアプローチが紹介された（梅野ら 大会要旨集 p. 105）。カロテノイドの分析技術に関しては，HPLC 解析や LC-MS 解析が飛躍的進歩を遂げたことは言を待たないが，ラマンスペクトル分光法の目ざましい発展により，生きた細胞のカロテノイド分布を無標識でイメージング解析することが可能になりつつあることが紹介された（鈴木ら 大会要旨集 p. 105）。玉木博士，梅野博士および鈴木博士らは他学会からの招待講演者であり，カロテノイド研究の新展開を学会横断的に共有しつつ，進化生物学の考察から将来の医療や化粧品やサプリメントなどの産業応用への新たな進展までをも議論する貴重な機会となった。

今日なお，希少な種類のカロテノイドが，大腸菌等を用いて合成して分析することで新規な種類のカロテノイドとして報告されている（Takemura *et al.*, 2015）。生物はどのようにして，そしてどのような生理機能上の必要があって，かくも多様なカロテノイドを進化させてきたのだろうか。その解明は緒に就いたばかりであり，生物学的興味は尽きない。

謝辞

シンポジウムの企画に際してはオーガナイザーとして池内昌彦博士（東京大学総合文化研究科）に多大な協力を仰いだこと，シンポジウム開催と総説集執筆に際して大会実行委員や編集委員の先生方，および発表者の方々に深謝することをここに記す。

引用文献

Davis, S. J., Vener, A. V., Vierstra, R. D. 1999. Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* 286: 2517–2520.

Erdman, J. W. Jr., Smith, J. W., Kuchan, M. J., Mohn, E. S., Johnson, E. J., Rubakhin, S. S., Wang, L., Sweedler, J.V., Neuringer, M. 2015. Lutein and brain function. *Foods* 4: 547–564. doi: 10.3390/foods4040547

Ikeuchi, M., Ishizuka, T. 2008. Cyanobacteriochromes: a new superfamily of tetrapyrrole-binding photoreceptors in cyanobacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7: 1159–1167.

Kobayashi, M., Kakizono, N., Nishio, N., Nagai, S., Kurimura, Y., Tsuji, Y. 1997. Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haemtococccus pluvialis*. *Appl. Environ. Biotechnol*. 48: 351–356.

眞岡孝至 2009. カロテノイドの構造と生物界における分布. 宮下和夫（編）カロテノイドの科学と最新応用技術. pp. 3-14. シーエムシー出版. 東京

宮下和夫 2009. プロビタミンA活性とノンプロビタミンA活性. 宮下和夫（編）カロテノイドの科学と最新応用技術. pp. 107-115. シーエムシー出版. 東京.

三室守，高市真一，富田純史　2006. 高市真一（編）カロテノイドーその多様性と生理活性ー. 裳華房. 東京.

Montgomery, B. L., Lagarias, J. C. 2002. Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci.*, 7: 357-366.

Niyogi, K. K., Wolosiuk, R. A. & Malkin, R. 2015. Photosynsthesis. In: Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L. (eds.) Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Second edition. pp. 508-566. John Wiley & Sons, Chichester, UK.

Takemura, M., Maoka, T., Misawa, N. 2015. Biosynthetic routes of hydroxylated carotenoids (xanthophylls) in *Marchantia polymorpha*, and production of novel and rare xanthophylls through pathway engineering in *Escherichia coli*. *Planta* 241: 699-710.

Yabuzaki, J. 2017. Carotenoids Database: structures, chemical fingerprints and distribution among organisms. *Database* box004: 1-11, doi:10.1093/database/bax004

矢澤一良（編）　2009. アスタキサンチンの科学. 成山堂書店. 東京.

光合成におけるカロテノイドの機能

高橋拓子，西山佳孝
埼玉大学大学院理工学研究科生命科学部門
〒338-8570 埼玉県さいたま市桜区下大久保 255

Hiroko Takahashi[1], Yoshitaka Nishiyama[1]

Roles of carotenoids in photosynthesis

Keywords: carotenoids, energy quenching, photosystem, photoprotection, repair of PSII
[1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Saitama University
255 Shimo-Okubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570, Japan
DOI: 10.24480/bsj-review.9b2.00134

1. はじめに –光合成とカロテノイド–

光合成細菌から陸上植物に至るまですべての光合成生物はカロテノイドを合成することができ，多様なカロテノイドを有している (三室 et al. 2006)。また，光合成生物ではカロテノイドは主にチラコイド膜に存在する。チラコイド膜には，光化学系複合体など様々なタンパク質複合体が存在しており，光エネルギー変換や電子伝達が起こる。光化学系 II（PSII）で光エネルギーが化学エネルギーに変換されるとき，水分子から電子が引き抜かれ（水分解反応），酸素が発生する。電子はプラストキノンプール，シトクロム b_6/f 複合体を経て光化学系 I（PSI）に伝達される。PSI で光エネルギー変換が起こり，電子が $NADP^+$に伝達され，NADPH が生成する（図 1)。光エネルギーは光合成の駆動に必須であるが，過剰な光エネルギーは活性酸素を誘発し，タンパク質や核酸，生体膜などに酸化傷害を及ぼす。

カロテノイドは，8 個のイソプレノイドが直鎖状に結合した $C_{40}H_{56}$ を基本骨格とする有機化合物であり，炭化水素であるカロテンと，酸素を含む官能基が付いたキサントフィルに大別される。カロテノイドは光エネルギーを吸収するが，クロロフィルのように光化学反応を起こさない。またカロテノイドは，励起エネルギーを熱に変換して過剰エネルギーを散逸したり，ラジカル化合物と電子授受してラジカルを消去したりする。すなわち，光合成ではカロテノイドは集光や光防御，抗酸化といった役割を担っている。本稿では，酸素発生型光合成におけるカロテノイドの様々な役割について述べるとともに，カロテノイドの光防御機能に関して新たな知見を紹介する。

2. 光合成装置に結合するカロテノイド

近年の結晶構造解析技術の進歩によって，光化学系複合体およびシトクロム b_6/f 複合体に結合するカロテノイドの種類や数が明らかになってきた。また，シアノバクテリアではカロテノイドを結合する可溶性タンパク質もある。光合成装置に結合

するカロテノイドの分子数は，クロロフィル分子数の約 20%に相当する。これらのカロテノイドは主に β-カロテンやキサントフィル類であり，反応中心複合体には主に β-カロテンが結合し，集光性複合体には主にキサントフィル類が結合するが，その分子種は生物種によって異なる。この章では，結晶構造解析により明らかになったカロテノイドの分子種と局在性を述べる。

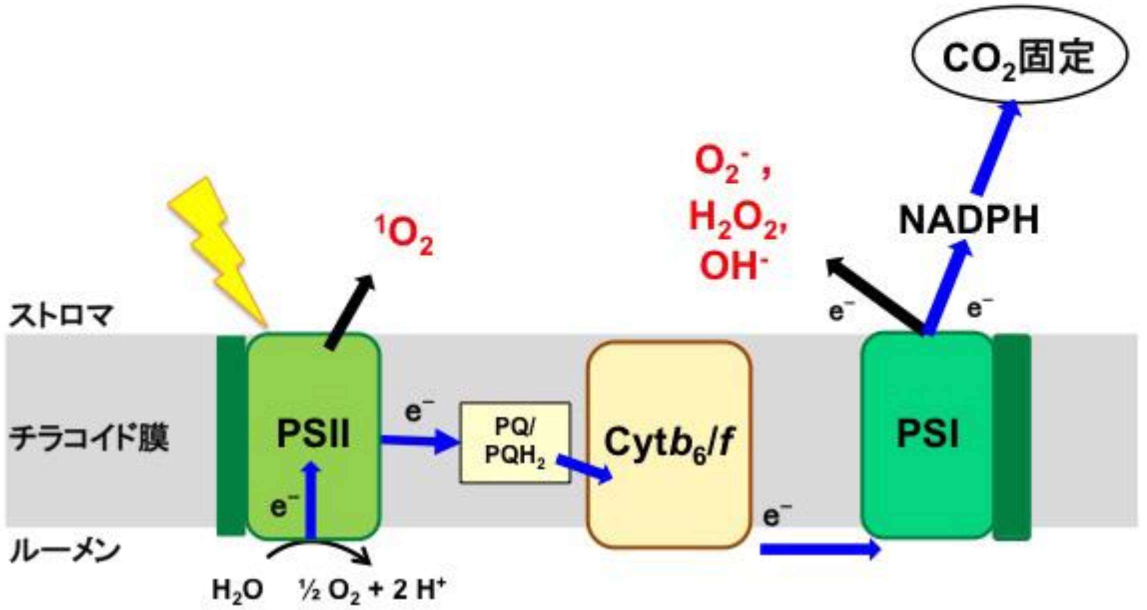

図 1. 光合成電子伝達鎖の模式図
PSII での水分解によって生じた電子が，プラストキノンプール（PQ/PQH_2），シトクロム b_6/f 複合体（$Cytb_6/f$），光化学系 I（PSI）へと伝達され，NADPH を生成する（青矢印）。強光下では，励起エネルギーや電子が過剰に発生し（黒矢印），活性酸素（$^1O_2$, O_2^-, H_2O_2）が生じる。

2-1. 光化学系反応中心複合体に結合するカロテノイド

PSII の構造は，好熱性シアノバクテリアから単離された PSII 複合体の結晶構造解析から明らかになっている (Ferreira et al. 2004, Kamiya and Shen 2003, Loll et al. 2005, Umena et al. 2011)。PSII は 2 量体で存在し，PSII 単量体あたり 16 分子のカロテノイドが結合する。そのうち 11 分子はトランス型 β-カロテンである (Loll et al. 2005) 。反応中心を形成する D1，D2 サブユニットにはそれぞれ 1 分子のカロテノイドが結合している。D2 サブユニットに結合している β-カロテンは，電子供与体としてシトクロム b_{559} を介した電子移動に関与すると考えられている (Kamiya and Shen 2003)。また，反応中心集光性サブユニット CP43 に 3 分子，CP47 に 5 分子のカロテノイドが結合する。その他，周辺サブユニットの近傍にもカロテノイドが結合している。

一方 PSI に関しては，好熱性シアノバクテリアでは 3 量体 PSI，陸上植物では単量体 PSI の結晶構造が明らかになっている (Amunts et al. 2007, Jordan et al. 2001)。好熱性シアノバクテリアでは，PSI 単量体あたり 22 分子のカロテノイドが結合しており，電子密度からその分子種が β-カロテンだと推測されている (Jordan et al.

2001) 。22 分子のうち，10 分子は PSI 反応中心の PsaA/B サブユニットに結合している。残りのカロテノイドは，ルーメン側サブユニット PsaF と PsaJ，および単量体同士の隣接面に位置する PsaI，PsaL，PsaM，PsaK サブユニットに結合している (Jordan et al. 2001)。PSI と PSII の反応中心複合体の構造の類似性が指摘されているが，反応中心クロロフィルに対するカロテノイドの配置も両者の間で類似している (Nelson and Yocum 2006)。

2-2. 集光性複合体に結合するカロテノイド

緑藻類や陸上植物では，膜内在性の light-harvesting complex II (LHCII) が PSII 集光性タンパク質複合体として機能している。LHCII は，3 量体を形成する主要な集光性複合体（陸上植物では Lhcb1-3）と，単量体で存在するマイナーサブユニット（陸上植物では Lhcb4-6）に大別され，それぞれ PSII 反応中心複合体と超分子複合体を形成している (Minagawa and Takahashi 2004, Nield et al. 2000)。LHCII 3 量体の結晶構造は明らかになっており，単量体あたり 3 本の膜貫通部位をもつアポプロテインに，8 分子のクロロフィル *a*，6 分子のクロロフィル *b*，4 分子のカロテノイドが結合する。また，この 4 分子のカロテノイドはキサントフィルであり，その内訳は 1 分子のルテイン，1 分子のネオキサンチン，2 分子のキサントフィルサイクルカロテノイド（後述；ゼアキサンチン，ヴィオラキサンチン，アンテラキサンチンのいずれか）である (Liu et al. 2004) 。

PSI 集光性タンパク質複合体 light-harvesting complex I (LHCI) は，紅藻を含む藻類や陸上植物で PSI 集光装置として機能している。エンドウ（*Pisum sativum*）における PSI -LHCI 結晶構造解析 (Amunts et al. 2007, Ben-Shem et al. 2003, Qin et al. 2015) により，LHCI のサブユニット（Lhca1-4）は，Lhca1 と Lhca4，Lhca2 と Lhca3 の 2 つのヘテロダイマーが並列に PSI 単量体の片側に結合することが示されている。4 つの LHCI サブユニットでは，クロロフィル a（45 分子），クロロフィル b（12 分子），β-カロテン（4 分子），ルテイン（5 分子），ヴィオラキサンチン（4 分子）が同定されている (Qin et al. 2015)。

2-3. シトクロム b_6/f 複合体に結合するカロテノイド

シトクロム b_6/f 複合体は，キノン結合部位 Q_o，Q_i が内向きになるように 2 量体を形成している (Kurisu et al. 2003, Stroebel et al. 2003)。単量体あたり 1 分子の β-カロテンが，シトクロム b_6 サブユニットに結合している (Kurisu et al. 2003)。

2-4. カロテノイドを結合する水溶性タンパク質

上記の複合体はいずれもチラコイド膜タンパク質であるが，カロテノイドを結合する可溶性タンパク質が存在する。その一種にオレンジカロテノイドプロテイン (orange carotenoid protein; OCP) があり，シアノバクテリアに広く保存されている (Holt and Krogmann 1981, Kirilovsky and Kerfeld 2012)。OCP は，7 本の α ヘリック

スからなる N 末端ドメインと, 2 本の α ヘリックスと 7 本の β 鎖からなる β バレルを含む C 末端ドメインからなり，ドメインをまたぐように 1 分子のカロテノイドが結合している (Kerfeld et al. 2003, Leverenz et al. 2015, Wilson et al. 2010)。そのカロテノイドは, 3'-ヒドロキシエキネノンであるが, エキネノン, ゼアキサンチン, カンタキサンチンも結合して役割を補填することが知られている (Leverenz et al. 2015, Punginelli et al. 2009, Wilson et al. 2011)。OCP の相同タンパク質として，ヘリカルカロテノイドプロテイン（helical carotenoid protein; HCP）というファミリーも存在し，OCP の N 末端ドメイン部分のみをもち、そこにカロテノイドが結合するという構造が予測されている (Melnicki et al. 2016)。

3. カロテノイドの集光機能

集光色素として機能するカロテノイドは, クロロフィルとともに集光性タンパク質に結合している。クロロフィルの励起寿命が数ナノ秒であるのに対し，カロテノイドの励起寿命はおよそ 10 ピコ秒と短い (三室 et al. 2006)。そのためカロテノイドは，近くのクロロフィルに励起エネルギーを渡し，クロロフィルの補助色素として機能している。集光性複合体および反応中心複合体に結合するカロテノイドはすべて近傍にクロロフィルが存在しており, 集光補助あるいは過剰エネルギーの散逸（後述）に寄与していると考えられる。

4-1. 光ストレスからの保護 -エネルギーの消去-

カロテノイドの保護機能は, 分子の励起状態を緩和してエネルギーを散逸させる作用と, 化学反応によってフリーラジカルを消去する作用に大別される。ここでは, 過剰エネルギーの散逸メカニズムについて述べる。

基底状態のクロロフィルは一重項であるが，励起すると三重項状態へ遷移する。このとき, スピン交換反応などで励起エネルギーが酸素分子へ移動すると一重項酸素が発生する。三重項励起状態では、カロテノイドのエネルギー準位はクロロフィルのエネルギー準位より低いため, クロロフィルからカロテノイドへのエネルギー移動が起こりクロロフィルの励起状態は緩和される。一方，クロロフィルからエネルギーを受け取ったカロテノイドは励起後に熱を放散して基底状態へと戻る。これにより，クロロフィルから酸素分子へのエネルギー移動が妨げられ，一重項酸素の発生が抑制される。一方, カロテノイドは一重項酸素自体の消去にも寄与している。エネルギー準位の差により一重項酸素からカロテノイドへのエネルギー移動が起こり，励起されたカロテノイドは熱を放散して基底状態へと戻る。カロテノイドのエネルギー準位は，共役二重結合の数に依存している (Hudson et al. 1982)。有機溶媒中では，カロテノイドの共役二重結合数が 9 以上になると，一重項酸素消去速度が増加することが知られている。これは，共役二重結合数が 10 を超えると，一重項酸素の励起状態よりもエネルギー準位が下がるためである (三室 et al. 2006)。

キサントフィルサイクルは，クロロフィルの励起状態の消去に重要な役割を担っ

ている。キサントフィルサイクルは，LHCII に結合するヴィオラキサンチンがアンテラキサンチンを経てゼアキサンチンへと変換される機構で，これに伴いエネルギー準位が下がりクロロフィルから励起エネルギーを受け取る (Demmig-Adams and Adams 1992, Yamamoto 1979, Yamamoto et al. 1962)。そのため，過剰な励起エネルギーが熱として消去される。このキサントフィル変換反応は，ヴィオラキサンチン・デエポキシダーゼにより触媒され，その酵素活性はチラコイド膜ルーメンの酸性化によって活性化する。

シアノバクテリアでは，OCP が過剰な励起エネルギーの散逸を担っている (Kirilovsky and Kerfeld 2012, Wilson et al. 2006)。エネルギー散逸機構は，キサントフィルサイクルと同様に分子の励起状態の解消であるが，クロロフィルではなくシアノバクテリア集光色素であるビリン色素から励起エネルギーを受け取る。OCP は，結合している 3'-ヒドロキシエキネノンにより光を吸収し，460 - 480 nm で吸収極大を示す。この光吸収によって，OCP はエネルギー散逸状態が可能な活性型へと変換される。その分子メカニズムは以下の通りである：(i) 細胞質中に存在する不活性型 OCP が，青色光や白色光の照射により活性化へ変換する (Wilson et al. 2006)。活性型 OCP では，OCP 内のカロテノイドの配位アミノ酸が変化し，それに伴って N 末端ドメインの α ヘリックスに結合していた C 末端ドメインが外れ，分子内に隠れていたカロテノイドが外側に露出するような構造へと変化する (Leverenz et al. 2015)。さらにこの構造変化で，C 末端ドメインから外れた N 末端ドメインが，集光性複合体フィコビリソームのコア部分にあるアロフィコシアニン 3 量体のシリンダー構造に入り込んで結合する (Harris et al. 2016)。このとき，カロテノイドはビリン色素へ接近することで励起状態を解消し，過剰エネルギーが PSII 反応中心へ移動するのを抑制していると考えられる (Leverenz et al. 2015)。このエネルギー消去機構は可逆的であり，細胞内では fluorescence recovery protein によって不活性型へと戻る (Boulay et al. 2010)。

集光性複合体で得た光エネルギー量の指標として，クロロフィル蛍光収率が用いられる。光エネルギーが光化学反応に用いられるとクロロフィル蛍光収率は低下し「消光状態」となる。光化学反応以外の要因でクロロフィル蛍光収率が低下する現象は，非光化学的消光（nonphotochemical quenching, NPQ）と呼ばれる。キサントフィルサイクルや OCP による光エネルギーの消失は，励起エネルギーの熱変換であり，光化学反応による励起エネルギーの消失ではないため NPQ に分類される (Niyogi and Truong 2013)。一般的に，強光条件では NPQ が高くなり，光化学系の保護に重要な役割を担っていることが知られている。

4-2. 光ストレスからの保護 -フリーラジカルの消去-

前章では化学反応を伴わない励起エネルギーの消去について述べたが，ここでは化学反応としてカロテノイドがフリーラジカルを消去するメカニズムについて述べる。

強光下では，光合成電子伝達反応において過剰量の電子が生成され，その一部が酸素を還元することにより活性酸素が生じる。酸素分子が一電子還元されるとスーパーオキサイド（O_2^-），スーパーオキサイドがさらに還元されると過酸化水素（H_2O_2），フェントン反応により過酸化水素が還元されるとヒドロキシルラジカル（OH・）が生成する。カロテノイドは，これらのラジカルと電子の授受を行ってラジカルを消去することができる (El-Agamey et al. 2004)。しかし，ラジカル消去の機構や効率については不明な点が多い。また，カロテノイドはラジカルによる不飽和脂肪酸の過酸化を抑制する (El-Agamey et al. 2004)。

5. カロテノイドによる光化学系の保護

カロテノイドは，強光下で励起クロロフィルや一重項酸素を消光したり，光合成電子伝達反応から生じた活性酸素を消去したりして酸化ストレス傷害を防いでいると考えられる。この機能は，具体的に光合成のどのプロセスで光酸化ストレスからの保護に寄与しているのだろうか。強光下では光合成活性が容易に低下する。この現象は光阻害と呼ばれ，主に光感受性の高い PSII の失活が原因となる。

5-1. PSII の光阻害と活性酸素の関係

PSII の光阻害機構には，いくつか仮説がある。例えば，アクセプターサイド説では，強光下で PSII の反応中心で発生した一重項酸素が，PSII 反応中心の D1 タンパク質を直接損傷し，PSII を失活させると考えられている (Hideg et al. 1994, Keren et al. 1997, Vass et al. 1992)。この場合，一重酸素発生抑制に寄与するカロテノイドは，PSII の損傷緩和に寄与することが考えられる。一方，近年提唱されてきた Two-step 説では，水分解反応を触媒する酸素発生複合体マンガンクラスターが直接光（特に UV や青色光）を吸収して損傷し，それが引き金となって PSII の反応中心が損傷することが考えられている (Murata and Nishiyama 2018, Nishiyama and Murata 2014, Ohnishi et al. 2005)。Two-step 説およびその関連研究から，活性酸素は PSII に直接損傷を及ぼすのではなく，PSII の修復を阻害することが示されている。PSII は，強光下で D1 タンパク質が損傷を受けるが，修復機構によって速やかに修復され活性を維持している。具体的には，損傷を受けた D1 タンパク質の分解，D1 タンパク質の新規合成，D1 タンパク質の PSII 複合体へ挿入とプロセシングを経て PSII が修復される (Jarvi et al. 2015, Murata and Nishiyama 2018, Nishiyama and Murata 2014)。

D1 タンパク質は，チラコイド膜上に結合したリボソームでペプチドが伸長されながら PSII 複合体に挿入される (Tyystjarvi et al. 2001)。シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803（以下 *Synechocystis*）では，強光下での D1 タンパク質の新規合成は，スーパーオキサイドや過酸化水素，一重項酸素によって翻訳伸長反応の過程で阻害されることが示されている (Nishiyama et al. 2004, Nishiyama et al. 2001)。さらに，翻訳伸長反応に関与する翻訳因子 EF-G および EF-Tu が活性酸素によって特定のシステイン残基が酸化され失活する (Kojima et al. 2009, Kojima et al.

2007, Nagano et al. 2012, Yutthanasirikul et al. 2016)。加えて，これらの翻訳因子の酸化標的システイン残基をセリンに置換すると，D1 タンパク質の新規合成が促進し，光阻害が緩和する (Ejima et al. 2012, Jimbo et al. 2018)。また，活性酸素消去系酵素スーパーオキシドジスムターゼおよびカタラーゼを *Synechococcus elongates* PCC 7942 で過剰発現すると，強光下で D1 タンパク質の新規合成が促進し，PSII の光阻害が緩和する (Sae-Tang et al. 2016)。これらの研究から，タンパク質合成を酸化傷害から防御することが，PSII の光防御に重要であると考えられる。

5-2. 光阻害とカロテノイドの関係

前述したように，カロテノイドは光化学系複合体の形成や保護に重要である。β-カロテンを蓄積できない *Synechocystis* は，機能的な PSII 複合体を形成できず，光独立栄養条件では生育できない (Sozer et al. 2010)。*Synechocystis* では，エキネノンとゼアキサンチンは，それぞれ β-カロテンのケト化，β-カロテンへの水酸基の付加により合成される (Takaichi and Mochimaru 2007)。この合成はそれぞれ，β-カロテンケト化酵素（CrtO），β-カロテン水酸化酵素（CrtR）により触媒される。CrtO 欠損株（*crtO*）ではエキネノンが検出限界以下まで減少し，CrtR 欠損株（*crtR*）ではゼアキサンチンが検出限界以下まで減少する (Kusama et al. 2015, Schafer et al. 2005)。強光下で培養すると，*crtO*，*crtR*，*crtOcrtR* 二重欠損株のいずれにおいても光合成活性が低下するが，特に *crtR*，*crtOcrtR* における活性低下は著しい (Schafer et al. 2005).。近年，このようなカロテノイド合成酵素欠損株の光合成活性低下は，PSII の光阻害に起因することが明らかにされている (Kusama et al. 2015)。さらに，PSII の光阻害は，光損傷の促進ではなく修復能力の低下が原因となっていることや，強光下で D1 タンパク質の新規合成が低下することがわかっている。また *crtOcrtR* では，強光下での一重項酸素の発生が著しく増加したことから，カロテノイドは一重項酸素の発生を抑制し，タンパク質合成の酸化傷害を防いで PSII の光阻害を緩和していることが考えられる (Kusama et al. 2015)。

OCP による光エネルギー散逸も，カロテノイドによる光化学系の保護の一例として挙げられる。OCP は結合するカロテノイドを介して，集光性複合体フィコビリソームにおいて過剰エネルギーを散逸する (El Bissati et al. 2000, Wilson et al. 2006)。OCP を欠損した *Synechocystis* 変異株では光エネルギーの散逸活性が減少しており (Wilson et al. 2006)，強光下で誘導される NPQ が低下する (Kusama et al. 2015)。OCP を欠損すると PSII の修復能力が低下し，光阻害が促進する (Kusama et al. 2015)。また OCP 欠損株では，強光下で一重項酸素の発生量が増加し (Kusama et al. 2015, Sedoud et al. 2014)，OCP 過剰発現株では，光エネルギーの散逸活性が大幅に増加することが報告されている (Wilson et al. 2008)。OCP 過剰発現株では NPQ の増加や PSII の光阻害の緩和，D1 タンパク質の新規合成の促進が見られている（投稿準備中）。したがって，OCP による過剰エネルギーの熱放散

および一重項酸素の発生抑制は，タンパク質合成を酸化傷害から保護し，PSII の修復を促進して PSII の光防御に寄与することが考えられる。

6. おわりに

カロテノイドは集光色素として機能しているだけでなく，光合成を行う上で避けることのできない光酸化ストレスの軽減にも役立っている（図 2)。カロテノイドによる三重項クロロフィルや一重項酸素の励起状態の緩和は，光化学系，特に PSII の光防御に寄与することが知られている。これまでカロテノイドが一重項酸素の発生を抑制して PSII の光損傷を防ぐと考えられてきたが，近年，カロテノイドがタンパク質合成を一重項酸素による酸化傷害から保護し，強光下で PSII の修復を促進して光阻害を緩和することが示唆されている。今後，その保護作用の詳細なメカニズム解明が期待される。

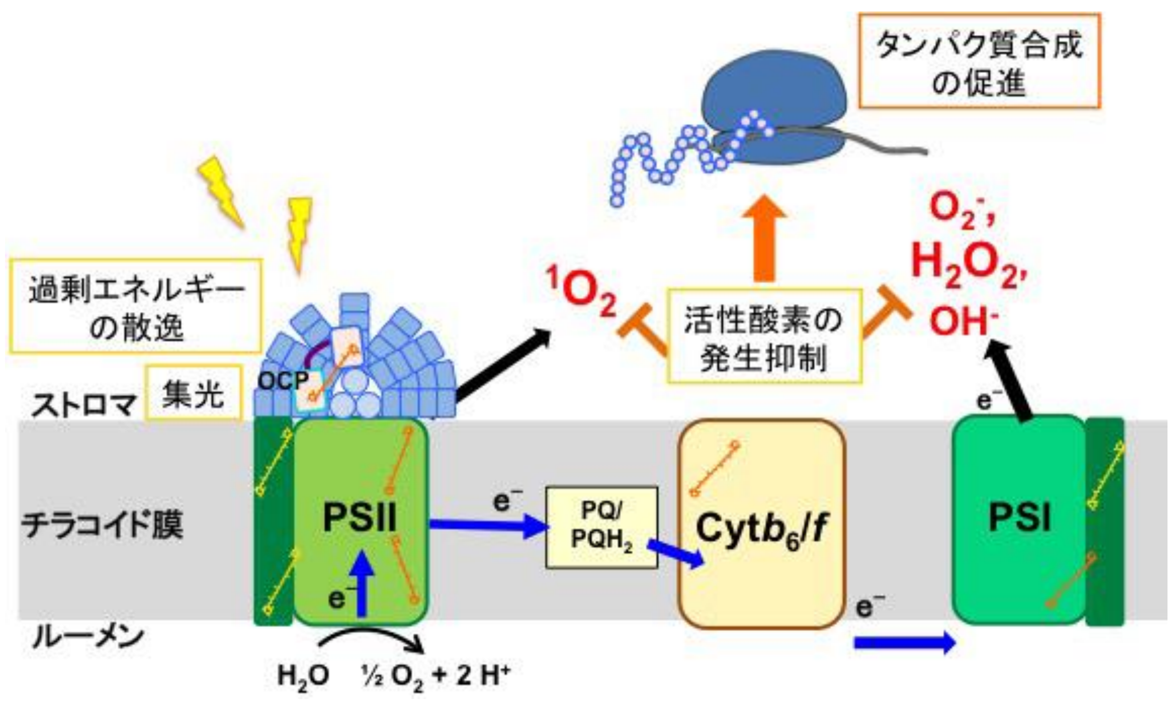

図 2. 光合成におけるカロテノイドの機能
カロテノイドは，クロロフィルの補助色素として集光機能を担う。加えて，三重項クロロフィルや一重項酸素の励起状態の解消によるエネルギー散逸や，過酸化物の発生抑制に寄与する。近年の研究から，カロテノイドによる活性酸素の発生抑制がタンパク質合成の酸化傷害を防御し，PSII の光阻害を緩和する役割を担っていることが示唆されている。

謝辞

本研究は JST 未来社会創造事業「ゲームチェンジングテクノロジーによる低炭素社会の実現：B21 大規模生産に向けて環境にロバストな微細藻類の開発」，および JSPS 科研費 JP18K06276 (Y.N.), JP18K06275 (H.T.)の助成を受けたものです。

引用文献

Amunts A, Drory O, & Nelson N. 2007. The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution. *Nature* 447: 58-63.

Ben-Shem A, Frolow F, & Nelson N. 2003. Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* 426: 630-635.

Boulay C, Wilson A, D'Haene S, & Kirilovsky D. 2010. Identification of a protein required for recovery of full antenna capacity in OCP-related photoprotective mechanism in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 11620-11625.

Demmig-Adams B & Adams WI. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant. Phys.* 43: 599-626.

Ejima K, Kawaharada T, Inoue S, Kojima K, & Nishiyama Y. 2012. A change in the sensitivity of elongation factor G to oxidation protects photosystem II from photoinhibition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS lett.* 586: 778-783.

El Bissati K, Delphin E, Murata N, Etienne A, & Kirilovsky D. 2000. Photosystem II fluorescence quenching in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: involvement of two different mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1457: 229-242.

El-Agamey A, Lowe GM, McGarvey DJ, Mortensen A, Phillip DM, Truscott TG, & Young AJ. 2004. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 430: 37-48.

Ferreira KN, Iverson TM, Maghlaoui K, Barber J, & Iwata S. 2004. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* 303: 1831-1838.

Harris D, Tal O, Jallet D, Wilson A, Kirilovsky D, & Adir N. 2016. Orange carotenoid protein burrows into the phycobilisome to provide photoprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113: E1655-1662.

Hideg E, Spetea C, & Vass I. 1994. Singlet oxygen production in thylakoid membranes during photoinhibition as detected by EPR spectroscopy. *Photosynth Res.* 39: 191-199.

Holt TK & Krogmann DW. 1981. A carotenoid-protein from cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 637: 408–414.

Hudson BS, Kohler BE, & Schulten K. 1982. Linear polyene electronic-structure and potential surfaces. *Excited States* 6: 1–95.

Jarvi S, Suorsa M, & Aro EM. 2015. Photosystem II repair in plant chloroplasts--regulation, assisting proteins and shared components with photosystem II biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1847: 900-909.

Jimbo H, Yutthanasirikul R, Nagano T, Hisabori T, Hihara Y, & Nishiyama Y. 2018. Oxidation of translation factor EF-Tu Inhibits the repair of photosystem II. *Plant Physiol. in press*:

Jordan P, Fromme P, Witt HT, Klukas O, Saenger W, & Krauss N. 2001. Three-dimensional

structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* 411: 909-917.

Kamiya N & Shen JR. 2003. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-A resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 98-103.

Keren N, Berg A, van Kan PJ, Levanon H, & Ohad I. 1997. Mechanism of photosystem II photoinactivation and D1 protein degradation at low light: the role of back electron flow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1579-1584.

Kerfeld CA, Sawaya MR, Brahmandam V, Cascio D, Ho KK, Trevithick-Sutton CC, Krogmann DW, & Yeates TO. 2003. The crystal structure of a cyanobacterial water-soluble carotenoid binding protein. *Structure* 11: 55-65.

Kirilovsky D & Kerfeld CA. 2012. The orange carotenoid protein in photoprotection of photosystem II in cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1817: 158-166.

Kojima K, Motohashi K, Morota T, Oshita M, Hisabori T, Hayashi H, & Nishiyama Y. 2009. Regulation of translation by the redox state of elongation factor G in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 284: 18685-18691.

Kojima K, Oshita M, Nanjo Y, Kasai K, Tozawa Y, Hayashi H, & Nishiyama Y. 2007. Oxidation of elongation factor G inhibits the synthesis of the D1 protein of photosystem II. *Mol. Microbiol.* 65: 936-947.

Kurisu G, Zhang H, Smith JL, & Cramer WA. 2003. Structure of the cytochrome b_6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science* 302: 1009-1014.

Kusama Y, Inoue S, Jimbo H, Takaichi S, Sonoike K, Hihara Y, & Nishiyama Y. 2015. Zeaxanthin and echinenone protect the repair of photosystem II from inhibition by singlet oxygen in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 56: 906-916.

Leverenz RL, Sutter M, Wilson A, Gupta S, Thurotte A, Bourcier de Carbon C, Petzold CJ, Ralston C, Perreau F, Kirilovsky D, & Kerfeld CA. 2015. A 12 Å carotenoid translocation in a photoswitch associated with cyanobacterial photoprotection. *Science* 348: 1463-1466.

Liu Z, Yan H, Wang K, Kuang T, Zhang J, Gui L, An X, & Chang W. 2004. Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 A resolution. *Nature* 428: 287-292.

Loll B, Kern J, Saenger W, Zouni A, & Biesiadka J. 2005. Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* 438: 1040-1044.

Melnicki MR, Leverenz RL, Sutter M, Lopez-Igual R, Wilson A, Pawlowski EG, Perreau F, Kirilovsky D, & Kerfeld CA. 2016. Structure, diversity, and evolution of a new family of soluble carotenoid-binding proteins in Cyanobacteria. *Mol. Plant* 9: 1379-1394.

三室守, 高市真一, & 富田純史 2006. カロテノイドーその多様性と生理活性ー. 裳華房, 東京

Minagawa J & Takahashi Y. 2004. Structure, function and assembly of photosystem II and its light-harvesting proteins. *Photosynth. Res.* 82: 241-263.

Murata N & Nishiyama Y. 2018. ATP is a driving force in the repair of photosystem II

during photoinhibition. *Plant Cell Environ.* 41: 285-299.

Nagano T, Kojima K, Hisabori T, Hayashi H, Morita EH, Kanamori T, Miyagi T, Ueda T, & Nishiyama Y. 2012. Elongation factor G is a critical target during oxidative damage to the translation system of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 287: 28697-28704.

Nelson N & Yocum CF. 2006. Structure and function of photosystem I and II. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 521-565.

Nield J, Kruse O, Ruprecht J, da Fonseca P, Buchel C, & Barber J. 2000. Three-dimensional structure of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechococcus elongatus* photosystem II complexes allows for comparison of their oxygen-evolving complex organization. *J. Biol. Chem.* 275: 27940-27946.

Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Yamamoto H, Hayashi H, & Murata N. 2004. Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 43: 11321-11330.

Nishiyama Y & Murata N. 2014. Revised scheme for the mechanism of photoinhibition and its application to enhance the abiotic stress tolerance of the photosynthetic machinery. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98: 8777-8796.

Nishiyama Y, Yamamoto H, Allakhverdiev SI, Inaba M, Yokota A, & Murata N. 2001. Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *EMBO J.* 20: 5587-5594.

Niyogi KK & Truong TB. 2013. Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16: 307-314.

Ohnishi N, Allakhverdiev SI, Takahashi S, Higashi S, Watanabe M, Nishiyama Y, & Murata N. 2005. Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: Step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. *Biochemistry* 44: 8494-8499.

Punginelli C, Wilson A, Routaboul JM, & Kirilovsky D. 2009. Influence of zeaxanthin and echinenone binding on the activity of the orange carotenoid protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1787: 280-288.

Qin XC, Suga M, Kuang TY, & Shen JR. 2015. Structural basis for energy transfer pathways in the plant PSI-LHCI supercomplex. *Science* 348: 989-995.

Sae-Tang P, Hihara Y, Yumoto I, Orikasa Y, Okuyama H, & Nishiyama Y. 2016. Overexpressed superoxide dismutase and catalase act synergistically to protect the repair of PSII during photoinhibition in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* 57: 1899-1907.

Schafer L, Vioque A, & Sandmann G. 2005. Functional in situ evaluation of photosynthesis-protecting carotenoids in mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 78: 195-201.

Sedoud A, Lopez-Igual R, Ur Rehman A, Wilson A, Perreau F, Boulay C, Vass I, Krieger-Liszkay A, & Kirilovsky D. 2014. The cyanobacterial photoactive orange carotenoid protein Is an excellent singlet oxygen quencher. *Plant Cell* 26: 1781-1791.

Sozer O, Komenda J, Ughy B, Domonkos I, Laczko-Dobos H, Malec P, Gombos Z, & Kis M. 2010. Involvement of carotenoids in the synthesis and assembly of protein subunits of photosynthetic reaction centers of *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 51: 823-835.

Stroebel D, Choquet Y, Popot JL, & Picot D. 2003. An atypical haem in the cytochrome b_6f complex. *Nature* 426: 413-418.

Takaichi S & Mochimaru M. 2007. Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides. *Cell Mol. Life Sci.* 64: 2607-2619.

Tyystjarvi T, Herranen M, & Aro EM. 2001. Regulation of translation elongation in cyanobacteria: membrane targeting of the ribosome nascent-chain complexes controls the synthesis of D1 protein. *Mol. Microbiol.* 40: 476-484.

Umena Y, Kawakami K, Shen JR, & Kamiya N. 2011. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 A. *Nature* 473: 55-60.

Vass I, Styring S, Hundal T, Koivuniemi A, Aro E, & Andersson B. 1992. Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced QA species promote chlorophyll triplet formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1408-1412.

Wilson A, Ajlani G, Verbavatz JM, Vass I, Kerfeld CA, & Kirilovsky D. 2006. A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in cyanobacteria. *Plant Cell* 18: 992-1007.

Wilson A, Kinney JN, Zwart PH, Punginelli C, D'Haene S, Perreau F, Klein MG, Kirilovsky D, & Kerfeld CA. 2010. Structural determinants underlying photoprotection in the photoactive orange carotenoid protein of cyanobacteria. *J. Biol. Chem.* 285: 18364-18375.

Wilson A, Punginelli C, Couturier M, Perreau F, & Kirilovsky D. 2011. Essential role of two tyrosines and two tryptophans on the photoprotection activity of the orange carotenoid protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1807: 293-301.

Wilson A, Punginelli C, Gall A, Bonetti C, Alexandre M, Routaboul JM, Kerfeld CA, van Grondelle R, Robert B, Kennis JT, & Kirilovsky D. 2008. A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 12075-12080.

Yamamoto HY. 1979. Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher-plants. *Pure Appl. Chem.* 51: 639-648.

Yamamoto HY, Nakayama TO, & Chichester CO. 1962. Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. *Arch. Biochem. Biophys.* 97: 168-173.

Yutthanasirikul R, Nagano T, Jimbo H, Hihara Y, Kanamori T, Ueda T, Haruyama T, Konno H, Yoshida K, Hisabori T, & Nishiyama Y. 2016. Oxidation of a cysteine residue in

elongation factor EF-Tu reversibly inhibits translation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 291: 5860-5870.

光合成細菌，シアノバクテリア，藻類，植物における多様なカロテノイド分子種と生合成経路の分布

高市 真一
東京農業大学 生命科学部 分子微生物学科
〒156-8502　世田谷区桜丘

Shinichi Takaichi

Diversities of carotenoid species and carotenogenesis pathways among phototrophs; photosynthetic bacteria, cyanobacteria, alga, and land plants

Keywords: carotenoid, carotenogenesis, diversity phototroph
Department of Molecular Microbiology, Faculty of Life Science, Tokyo University of Agriculture
Sakuragaoka, Setagaya, Tokyo 156-8502, Japan
DOI: 10.24480/bsj-review.9b3.00135

光合成生物は必ず色素として（バクテリオ）クロロフィルとカロテノイドを持っている。（バクテリオ）クロロフィルの構造や合成系，光化学系には類似性が見られる。一方，カロテノイドは分類群ごとに組成や合成経路に大きな差異が見られるので，進化・共生に伴い一部の合成経路を捨てて，一部の合成経路を共生相手とは別の生物から取り込んだと思われる。本総説では，フィトエンからリコペンへの合成経路および酵素，異種のリコペン・シクラーゼの分布，分類群ごとのカロテノイド合成をまとめた。

１．はじめに

光合成生物にとっては（バクテリオ）クロロフィルだけでなくカロテノイドも必須の成分である。カロテノイドは光合成のための光捕集，強光や活性酸素種からクロロフィルや光化学系などの防御・保護，色素タンパク複合体の形成・安定化，などの機能を担っている。光合成生物の分類と存在するカロテノイド分子種の基本型や合成酵素の一部を表 1 にまとめた。光化学系 II 型をもつ光合成細菌と光化学系 I 型をもつ光合成細菌から，酸素発生型のシアノバクテリアができ，そのシアノバクテリアが真核生物に一次共生をして灰色藻類・紅藻類・緑藻類の葉緑体になったと考えられている。その後の二次および三次共生により種々の藻類や陸上植物が出現したと考えられている。さらに光合成の光化学系を構成するペプチド，（バクテリオ）クロロフィルの構造や生合成経路，三次構造には，進化的には一部の成分の置き換えはあるが，類似性と連続性が見られる。一方，カロテノイドは生物分類ごとに一部に共通性は見られるが，共生段階などが変わるごとに組成ばかりでなく，生合成経路や酵素に大きな変化が見られる。従って，進化や共生に伴い一部のカロテノイド合成経路を捨てて，一部の合成経路を共生相手とは別の生物から取り込んだと思われる。カロテノイドは結合タンパクや機能に対して柔軟性が高いためだろう。本総説ではカロテノイド合成系の変化や進化について紹介する。ただし，全体像を見るために，一部の例外的な存在は省略した。

表 1 : 生物の分類とカロテノイド(高市 2006, Takaichi and Mochimaru 2007, Takaichi 2009, Takaichi 2011, Takaichi 2013)

光化学系	光合成生物	カロテノイド型 (基本型)	フィトエンから リコペン	リコペン・ シクラーゼ
II 型	紅色細菌 [1]	C_{40}-鎖状	CrtI	CrtY
	クロロフレクサス	β,γ-カロテン	CrtI[2]	CrtY[2]
I 型	ヘリオバクテリア	C_{30}-鎖状	CrtN (CrtI-type)?	non
	緑色硫黄細菌	β,γ-カロテン	CrtP/Q/H[3]	CruA/P
II+I 型 (酸素発生型)	シアノバクテリア	β,γ-カロテン	CrtP/Q/H + Z-ISO[3]	CruA/P?
	葉緑体	β,α-カロテン	CrtP/Q/H + Z-ISO	CrtL

[1] カロテノイド合成遺伝子はクラスターを形成 [2] Harada et al., unpublished, [3] Sugiyama et al., unpublished

2. フィトエンからリコペンの合成

15-シス-フィトエンから全トランス-リコペンの合成には 4 段階の不飽和化反応が必要である（図 1）。原核生物はフィトエン不飽和化酵素 phytoene desaturase (CrtI) ［注 : 下記のように複数の略語をもつことがある］が担っている。紅色細菌（図 2）とクロロフレクサス(Harada et al., unpublished)ではこの酵素の機能が確認されており，ヘリオバクテリアには *crtI* に相同性がある遺伝子 *crtN* があるがまだ機能が確認されていない (表 1)。紅色細菌の *Rhodobacter* などは CrtI が最後の 4 段階目の不飽和化をできないため，リコペンではなくニューロスポレンが最終産物となりニューロスポレンからスフェロイデンなどを合成する（図 2)。ヘリオバクテリアは鎖状の C_{30}-ジアポニューロスポレンが最終産物である(Takaichi et al. 1997)。シアノバクテリアの中では，例外的に原始的な *Gloeobacter violaceus* のみ CrtI を使うが，他のカロテノイド合成酵素は他のシアノバクテリアと共通性がある(Tsuchiya et al. 2005)。

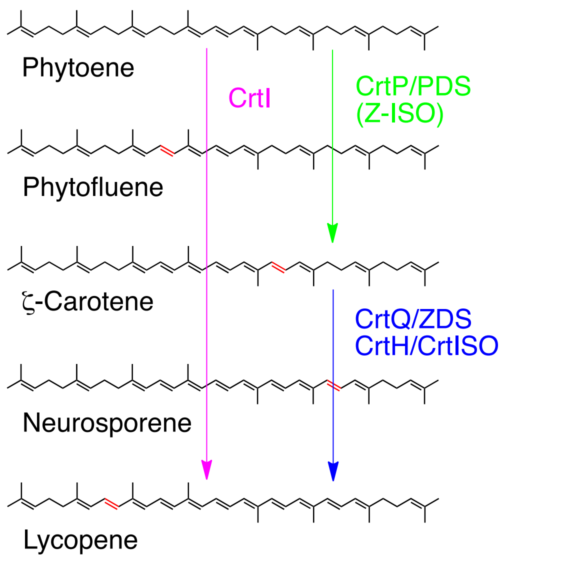

図 1 : フィトエンからリコペンの合成(高市 2006, Takaichi and Mochimaru 2007, Takaichi 2009, Takaichi 2011)

原核生物においては緑色硫黄細菌とシアノバクテリアのみ，葉緑体と同様にフィトエンから ζ-カロテンまでをフィトエン不飽和化酵素 phytoene desaturase (CrtP, Pds) ［注 : CrtI と同じ酵素名であるが機能は異なる］が，ζ-カロテンからリコペンまでを ζ-カロテン不飽和化酵素ζ-carotene desaturase (CrtQ, Zds) が各々2 段階ずつ不飽和化する（図 1)。さらに CrtQ の反応に伴い合成されるポリシス型のニューロスポレンとリコペンを，カロテン異性化酵素 carotene isomerase (CrtH, CrtISO)あるいは光照射によりトラ

ンス型に変換する。植物においてはポリシス-ζ-カロテンをジシス-ζ-カロテンに変換する ζ-カロテン異性化酵素ζ-carotene isomerase (Z-ISO)も必要である(Li et al. 2007)。それに相同性のある遺伝子がシアノバクテリアにも存在し，最近になって機能確認された。また緑色硫黄細菌のゲノムには Z-ISO に対応する遺伝子が見いだされなかった (Sugiyama et al. unpublished)。従って CrtP/Q 型はリコペン合成に合計 3 あるいは 4 種類の酵素を必用とする（表 1、図 1）。

crtP, crtQ, crtH は *crtI* に低い相同性があるので，*crtI* から変化したのであろう。4 種の酵素によるリコペン合成経路は，緑色硫黄細菌からシアノバクテリアに，さらに藻類や陸上植物の葉緑体に引き継がれたと思われる。ただし細菌において 1 酵素(CrtI)が担っていた反応を，CrtP/Q 型では 4 酵素に分割し複雑化したが，そのための原動力やメリットがどこにあったのかは不明である。

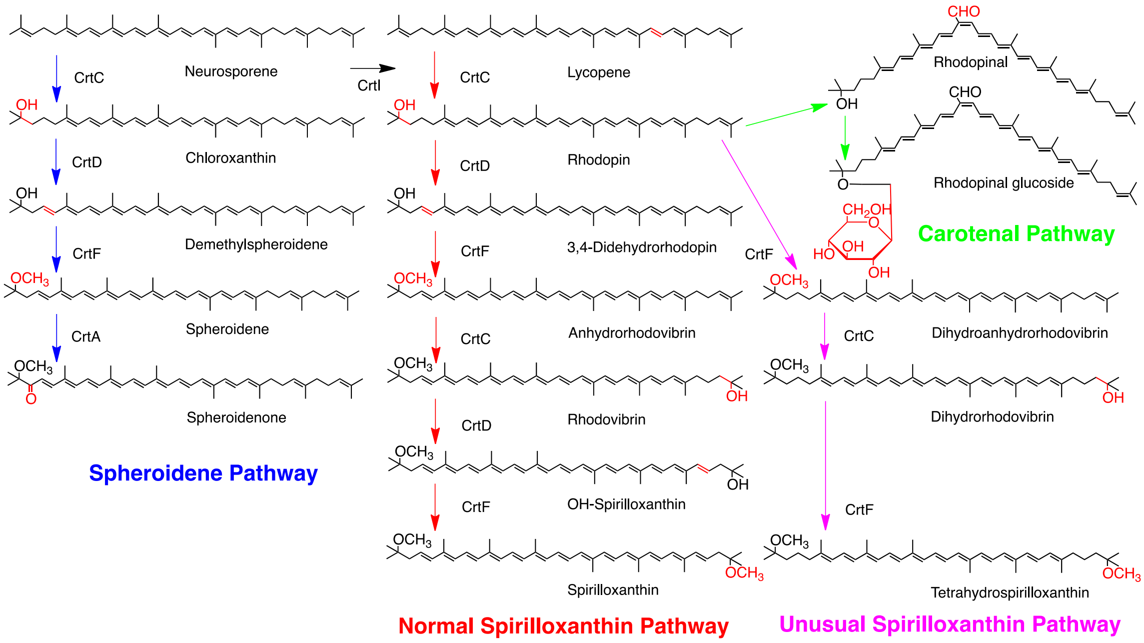

図 2：紅色光合成細菌のカロテノイドと合成経路(高市 2006, Takaichi 2009)
酵素の性質の違いや変化また新たな獲得が合成経路や産物の多様性を生じた。

3．リコペンの環化（β-カロテン，α-カロテン合成）

紅色細菌はリコペンを鎖状のまま修飾してスピリロキサンチンなどを合成する（図 2）。多くのヘリオバクテリアは鎖状カロテンが最終産物である(Takaichi et al. 1997)（表 1）。

リコペン・シクラーゼ lycopene cyclase として相同性のない 3 種類の酵素が知られている。多くの細菌 CrtY と葉緑体 CrtL に見られる型，緑色硫黄細菌と一部のシアノバクテリアに見られる CruA/CruP 型，一部の細菌(CrtYc+CrtYd)とアーキア(CrtYcd)と菌類(CrtYB)には類似した別の型が存在している。CrtY と CrtL にはある程度の相同性が見られるので我々は同一グループと考えているが，Bryant らは 2 つに分けている(Maresca et al. 2007)。リコペンの片方を環化した γ-カロテンしかつくれない CrtYm と CrtLm もあるが，各々CrtY や CrtL と相同性が高い。

紅色細菌の一種である好気性光合成細菌の一部とクロロフレクサスもγ-カロテンと β-カロテンを CrtY により合成する（表 1）(Harada et al. unpublished)。

藻類や陸上植物では，リコペンの両端をリコペン-β-シクラーゼ (CrtL-b, Lcy-b) が β 末端基にして β-カロテンがつくられる。一方，α-カロテンは，基質特異性のために先ずリコペン-ε-シクラーゼ (CrtL-e, Lcy-e) が ε 末端基を合成して，次いで反対側を CrtL-b が β 末端基にして合成される(Cunningham et al. 2001)。2 つの酵素は相同性が高く，CrtL-b から CrtL-e ができたと考えられている。α-カロテンとその誘導体は一部の紅藻類，クリプト藻類，緑藻類，陸上植物に限られていて，光合成細菌と 2 属を除くシアノバクテリア(Takaichi et al. 2012)，褐藻類，ユーグレナには存在しない（図 3)。クリプト藻類 *Guillardia theta* の α -カロテンは CrtL-b, CrtL-e により合成される(Konno et al. unpublished)。

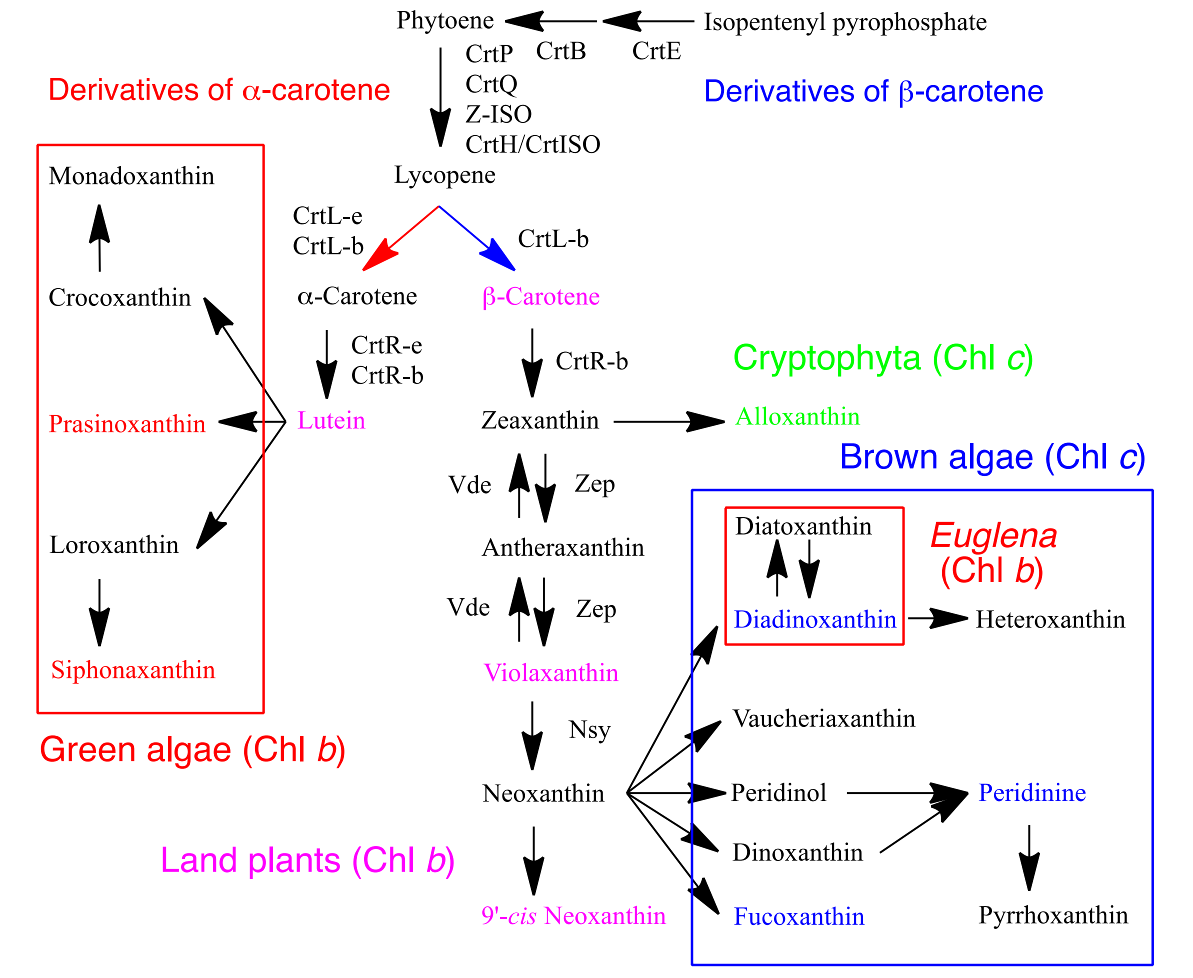

図 3：酸素発生型光合成生物の主要なカロテノイド合成経路と酵素(Takaichi 2011 改変)
分類群の文字色は同色のカロテノイドを主成分とする。

シアノバクテリアのリコペン・シクラーゼは未だに充分な機能解析がされていない。最初に *Synechococcus* sp. PCC 7942 の CrtL (Cunningham et al. 1994)，次いで *Prochlorococcus marinus* の CrtL (Stickforth et al. 2003)の機能が確認された。近年，別型のリコペン・シクラーゼ CruA が緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum tepidum*，CruA と CruP が *Synechococcus* sp. PCC 7002 で機能が確認された(Maresca et al. 2007)。最近，*Arthrospira platensis* においても CruA が機能確認された（Sugiyama et al. 2017)。さらに *Synechocystis* sp. PCC 6803 では CruA の活性発現に結合クロロフィルが必用であると報告された(Xiong et al. 2017)。*crtL* あるいは *cruA/cruP* に相同性のある遺伝子が多くのシアノバクテリアのゲノム上に存

在するが，上記を除いては機能確認できていない。*cruA/cruP* がリコペン・シクラーゼの有力な候補と思われるが，さらなる機能確認が必要である。

４．紅色細菌のカロテノイドと合成経路の多様性

紅色細菌のカロテノイドにも多様性が見られるが，合成酵素の性質の差異により合成経路に多様性が生じたと考えられる（図 2）(高市 2006, Takaichi 2009)。上記のように CrtI の最終産物の違いがスフェロイデン経路とスピリロキサンチン経路を作り出したが，メトキシ基合成は同じヒドロキシニューロスポレン合成酵素 hydroxyneurosporene synthase (CrtC)，メトキシニューロスポレン不飽和化酵素 methoxyneurosporene desaturase (CrtD)，ヒドロキシニューロスポレン-*O*-メチル化酵素 hydroxyneurosporene-*O*-methyl transferase (CrtF)がどちらの経路でも働いている。

５．緑色硫黄細菌とクロロフレクサスのカロテノイドと合成系

緑色硫黄細菌とクロロフレクサスの合成するカロテノイドとその合成経路はまだ充分には解析されていない（図 4）(高市 2006)。緑色硫黄細菌 *Chlorobacula tepidum* は OH-γ-カロテン・グルコシド・エステル，OH-クロロバクテン・グルコシド・エステル，1,2-ジヒドロ-γ-カロテンなどを合成する(Takaichi et al. 1997)。一部の合成酵素・遺伝子のうち CrtC，グルコース添加酵素 glucosyltransferase (CruC)，グルコース脂肪酸添加酵素 glucosyl esterase (CruD)は機能解析された(Frigaard et al. 2004)。また一部の種は β 末端基を芳香環にしたイソレニエラテンをもつ。最近，カロテノイド-1,2-還元酵素 1,2-carotenoid-reductase (CruI)の機能確認がなされた(Canniffe et al. 2018)。

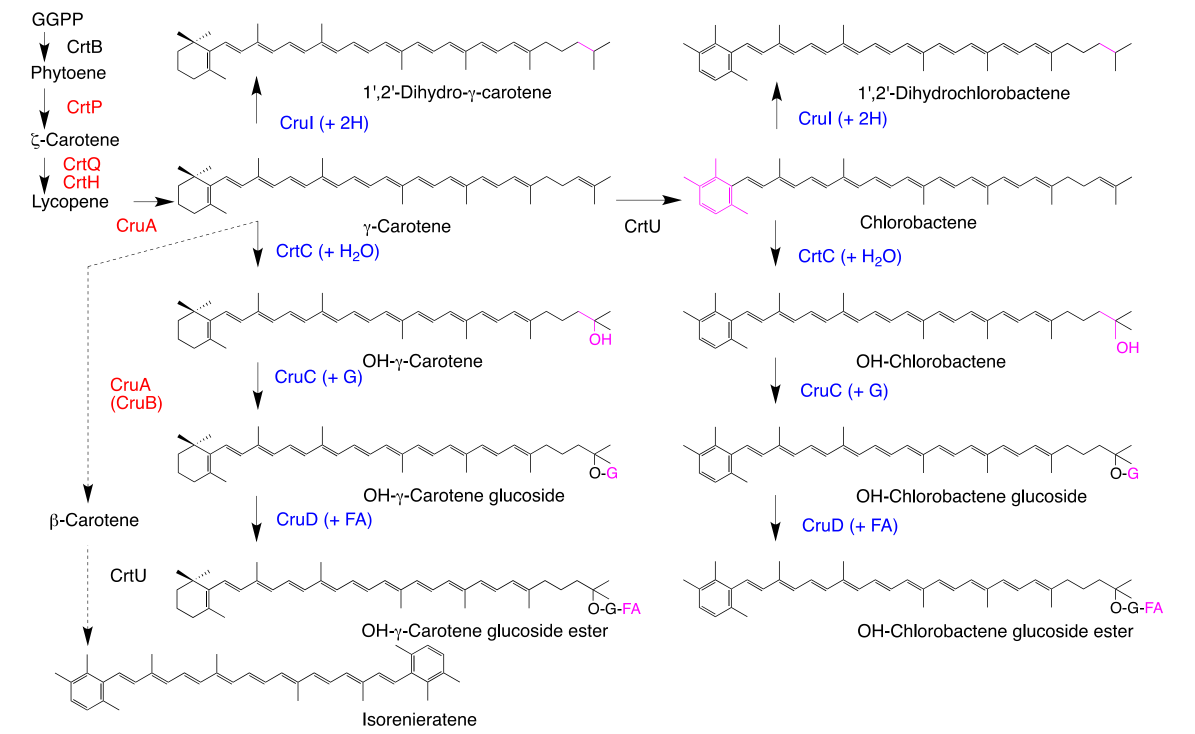

図 4．緑色硫黄細菌 *Chlorobacula tepidum* のカロテノイド合成経路(Takaichi et al. 1997, Maresca et al. 2007，改変) 赤青字は機能確認された酵素である。クロロフレクサスでもほぼ同じ酵素が働いている

S. Takaichi-5

一方，クロロフレクサス *Chloroflexus aurantiacus* はOH-γ-カロテン・グルコシド・エステルなどをもつ(Takaichi et al. 1995)。合成酵素として CrtI, CrtY（表 1）が機能しており，さらに CruC, CruD と CrtC の代わりにカロテノイド-1,2-水添加酵素 carotenoid-1,2-hydratase (CruF)が機能している（図 4）(Harada et al., unpublished)。

６．酸素発生型光合成生物のカロテノイドと合成経路

シアノバクテリア，紅藻類，クリプト藻類，褐藻類，緑藻類，陸上植物など酸素発生型光合成生物の主なカロテノイド合成経路を図 3 にまとめた。リコペンからβ-カロテンとα-カロテンが合成され，中央の経路にはそれらが変化し共通してみられるカロテノイドがあり，さらに左右に枝分かれた誘導体合成経路があり，これらは生物の系統分類に関係している。

シアノバクテリアは β-カロテン誘導体のみをもち，β-カロテン水酸化酵素β-carotene hydroxylase (CrtR, BHY)や下記のケト化によりエキネノンや水酸化によりノストキサンチンを合成し，さらにシアノバクテリアに特有な γ-カロテン誘導体のミクソール配糖体を合成する。いくつかの酵素の機能確認がなされている (図 5)。ただしゼアキサンチンから先のエキネノンやノストキサンチンの合成経路は，葉緑体に引き継がれなかった（図 3)。

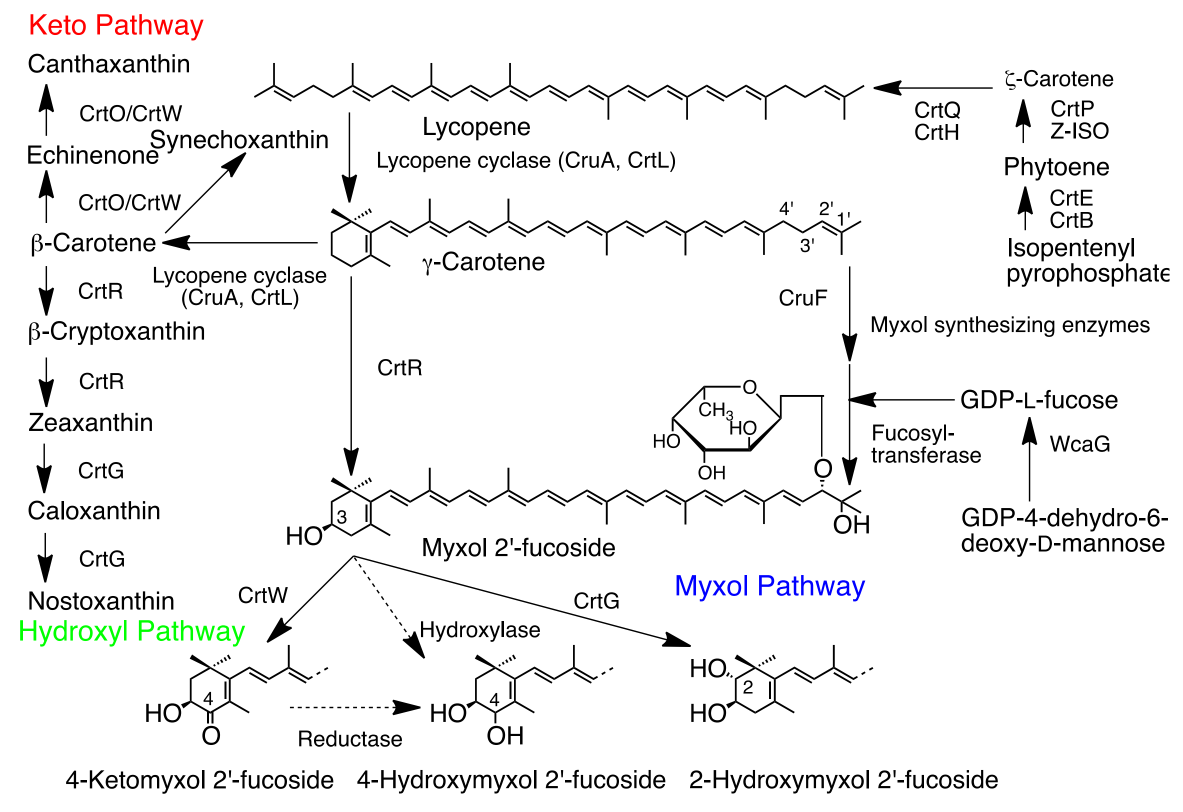

図 5. シアノバクテリアのカロテノイド合成経路(高市 2006, Takaichi and Mochimaru 2007, Takaichi 2011)

シアノバクテリアにはケト化酵素として，互いに相同性のないβ-カロテンケトラーゼβ-carotene ketolase が 2 種類存在する(CrtO, CrtW) （図 5)。*Anabaena* sp. PCC 7120 ではこれらの酵素が働く代謝

経路が異なる(Mochimaru et al. 2005)。CrtO は *Dinococcus* などで，CrtW は *Paracoccus* などで機能確認されており，これらの遺伝子をシアノバクテリアが獲得したと思われる。紅色細菌のスフェロイデン・モノオキシゲナーゼ spheroidene monooxygenase (CrtA) （図 2），褐藻類のフコキサンチンや緑藻類のシフォナキサンチンのケト基合成酵素はまだ見つかっていないがゲノム解析からお互いに相同性がなく，由来が不明である。陸上植物にはケト化カロテノイドがなく，ケト化酵素がない（図 3）。

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

シアノバクテリアが一次共生した紅藻類は，存在するカロテノイドから，ゼアキサンチン-，アンテラキサンチン-，ルテイン-タイプに分けられ，紅藻類の系統分類に対応している(Takaichi et al. 2016)。ただし，シアノバクテリアには見られない ε 末端基（ルテイン）はクリプト藻類にも見られる。またエポキシ基（アンテラキサンチン）は褐藻類だけでなく緑藻類・陸上植物にも見られるが，酵素・遺伝子の由来は不明である（図 3）。

紅藻類が二次共生をした種々の褐藻類のカロテノイドはすべて β-カロテンとその誘導体で，アレン基 (C=C=C) をもつジアジノキサンチン，フコキサンチン，ペリジニンなどがある。アレン基は生体物質としてはカロテノイドに特有な基で，他の生体物質にはほとんど見られない。陸上植物ではビオラキサンチンからネオキサンチンを合成し，アレン基を作るネオキサンチン合成酵素 neoxanthin synthase (NSY) が知られている。褐藻類ではネオキサンチンが検出されないことが多いが，化学構造を比較するとアレン基をもつカロテノイドは，トランス-ネオキサンチンから合成されると思われる（図 3）。ただし系統分類や進化を考えると，どこでこの *Nsy* 遺伝子を獲得し，どのように伝わったかは不明である。

紅藻類が二次共生をしたクリプト藻類には，アセチレン基 (C≡C) をもつアロキサンチンなどがあり，ゼアキサンチンなどの二重結合からアセチレン基ができたと思われる。褐藻類に見られるジアジノキサンチンなどにもアセチレン基はあるが，渦鞭毛藻ではトレーサー実験からネオキサンチンを経由して合成された(Swift et al. 1982) （図 3）。

シアノバクテリアが一次共生した緑藻類は，その後種々の緑藻類に分かれ，シホナキサンチンなど種々のルテイン誘導体がつくられる。緑藻類では β-カロテンの誘導体は限られた種類しか存在しないが，α-カロテン誘導体には多様性が見られる。ただしユーグレナには α-カロテン誘導体が見られない（図 3）。

以上の水生藻類に対して，全ての陸上植物のカロテノイドはほぼ同じで，図 3 の中心部分に位置する β-カロテン，ビオラキサンチン，9’-シス-ネオキサンチン，ルテインを主成分とする。上記のようにゼアキサンチンを合成し，またルテインは α-カロテンから P450 型の α-カロテン水酸化酵素α-carotene hydroxylase が水酸基を合成する。ゼアキサンチンはゼアキサンチン・エポキシダーゼ zeaxanthin epoxydase (ZEP)によりアンテラキサンチンを経てビオラキサンチンに変化する。強光下ではビオラキサンチン・デエポキシダーゼ violaxanthin deepoxydasa (VDE)が活性化されてビオラキサンチンをゼアキサンチンに変化させる。ビオラキサンチンは NSY によりネオキサンチンに変化し，葉緑体には 9’-シス型のネオキサンチンしか存在しないので異性化酵素があるはずだがまだ発見されていない。進化の結果一番単純なカロテノイドだけが残ったのだろうか。陸上植物は形態的には大きな進化をしたが，光合成の機構や色素はほぼ同一で変化が見られない。

7．おわりに

光合成生物（光合成細菌，シアノバクテリア，灰色藻類，紅藻類，褐藻類，緑藻類，陸上植物）のカロテノイド組成，即ちカロテノイド合成経路には多様性が見られる。これは共生や進化段階が変わるごとにカロテノイドの組成や合成経路に大きな変化が起きたためで，その時に一部の合成経路を捨てて，一部の合成経路や遺伝子を共生相手とは別の生物から取り込んだためと思われる。

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

謝辞

数多くの光合成生物のカロテノイドの分析や生合成遺伝子・酵素の解析をできたのは，多くの共同研究者に恵まれたためである。この場を借りて感謝を申し上げます。また，この総説を書く機会を頂きましたシンポジウムのオーガナイザーの帝京大学篠村知子博士と東京大学池内昌彦博士に謝意を表します。

参考文献

Canniffe, D.P., Thweatt, J.L., Chew, A.G.M., Hunter, C.N., Bryant, D.A. 2018. A paralog of a bacteriochlorophyll biosynthesis enzyme catalyzes the formation of 1,2-dihydro-carotenoids in green sulfur bacteria. ISPP 2018, abstract A3.

Cunningham, Jr., F.X., Sun, Z., Chamovitz, D., Hirschberg, J., & Gantt, E. 1994. Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp strain PCC7942. Plant Cell 6: 1107-1121.

Cunningham, Jr., F.X., & Gantt, E. 2001. One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene ε-cyclases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 98: 2905-2910.

Frigaard, N.-U., Maresca, J.A., Yunker, C.E., Jones, A.D., & Bryant, D.A. 2004. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *J. Bacteriol.* 187: 5210-5220.

Li, F., Murillo, C., & Wurtzel, E.T. 2007. Maize *Y9* encodes a product essential for 15-cis-ζ-carotene isomerization. Plant Physiol. 144: 1181-1189.

Maresca, J., Graham, J.E., Wu, M, Eisen, J.A., & Bryant, D.A. 2007. Identification of a fourth family of lycopene cyclases in photosynthetic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 104: 11784-11789.

Mochimaru, M., Masukawa, H., & Takaichi, S. 2005. The cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 has two distinct β-carotene ketolases: CrtO for echinenone and CrtW for ketomyxol synthesis. *FEBS Lett.* 579: 6111-6114.

Stickforth, P., Steiger, S., Hess, W.R. & Sandmann, G. 2003. A novel type of lycopene ε-cyclase in the marine

cyanobacterium Prochlorococcus marinus MED4. Arch. Microbiol. 179: 409-415.

Sugiyama, K., Ebisawa, M., Yamada, M., Nagashima, Y., Suzuki, H., Maoka., T., & Takaichi, S. 2017. Functional lycopene cyclase (CruA) in cyanobacterium, *Arthrospira platensis* NIES-39, and its role in carotenoid synthesis. *Plant Cell Physiol.* 58: 831-838.

Swift, I.E., Milborrow, B.V., & Jeffrey, S.W. 1982. Formation of neoxanthin, diadinoxanthin and peridinin from [^{14}C]zeaxanthin by a cell-free system from *Amphidinium carterae*. *Phytochemistry* 21: 2859-2864.

Takaichi, S., Tsuji, K., Matsuura, K., & Shimada, K. 1995. A monocyclic carotenoid glucoside ester is a major carotenoid in the green filamentous bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Plant Cell Physiol.* 36: 773-778.

Takaichi, S., Inoue, K., Akaike, M., Kobayashi, M., Oh-oka, H., & Madigan, M.T. 1997. The major carotenoid in all known species of heliobacteria is the C_{30} carotenoid 4,4'-diaponeurosporene, not neurosporene. *Arch. Microbiol.* 168: 277-281.

Takaichi, S., Wang, Z.-Y., Umetsu, M., Nozawa, T., Shimada, K., & Mdigan, M.T. 1997. New carotenoids from the thermophilic green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*: 1',2'-dihidro-γ-carotene, 1',2'-dihydrochlorobactene, and OH-chlorobactene glucoside ester, and the carotenoid composition of different strains. *Arch. Microbiol.* 168: 270-276.

高市真一（編）2006．カロテノイド．裳華房．東京

高市真一．2016．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.

Takaichi, S., & Mochimaru, M. 2007. Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides. *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 2607-2619.

Takaichi, S. 2009. Distribution and biosynthesis of Carotenoids. in *The Purple Phototrophic Bacteria* (Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C. and Beatty, J.T., Eds.) pp 97-117, Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Takaichi, S. 2011 Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Mar. Drugs* 9: 1101-1118.

Takaichi, S., Mochimaru, M., Uchida, H., Murakami, A., Hirose, E., Maoka, T., Tsuchiya, T., & Mimuro, M. 2012. Opposite chilarity of α-carotene in unusual cyanobacteria with unique chlorophylls, *Acaryochloris* and *Prochlorococcus*. *Plant Cell Physiol.* 53: 1881-1888.

Takaichi, S., Yokoyama, A., Mochimaru, M., Uchino, H., & Murakami, A. 2016. Carotenogenesis diversification in phylogenetic lineages of Rhodophyta. *J. Phycol.* 52: 329-338.

Tsuchiya, T., Takaichi, S., Misawa, N., Maoka, T., Miyashita, H., & Mimuro, M. 2005. The cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 uses bacterial-type phytoene desaturase in carotenoid biosynthesis. *FEBS Lett.* 579: 2125-2129.

Xiong, W., Shen, G., & Bryant, D.A. 2017. *Synechocystis* sp. PCC 6803 CruA (sll0147) encodes lycopene cyclase and requires bound chlorophyll *a* for activity. *Photosynth. Res.* 131: 267-280.

Euglena gracilis のカロテノイドを介する光応答とその生理生態上の機能

加藤翔太，篠村知子
帝京大学理工学部バイオサイエンス学科
〒320-8551　栃木県宇都宮市豊郷台 1-1

Shota Kato, Tomoko Shinomura

Physiological responses of carotenoid synthesis in *Euglena gracilis* to light conditions

Key words: carotenoid, Excavata, light stress, photoprotection, secondary endosymbiont
Department of Biosciences, School of Science and Engineering, Teikyo University
1-1 Toyosatodai, Utsunomiya, Tochigi, 320-8551, Japan
DOI: 10.24480/bsj-review.9b4.00136

１．はじめに

Euglena gracilis（図 1）は，近年「ユーグレナ」の名で定着しつつあるバイオ燃料や高栄養価食品の原料として注目されている産業上有用な微細藻類の一種である。ユーグレナを産業的に大量培養するためには，太陽光エネルギーを利用した屋外オープンポンドでの培養が不可欠である。しかし，同時に屋外では太陽の直射光のような強すぎる光が光合成の光阻害を引き起こし，しばしば藻体の生産性を低下させる。

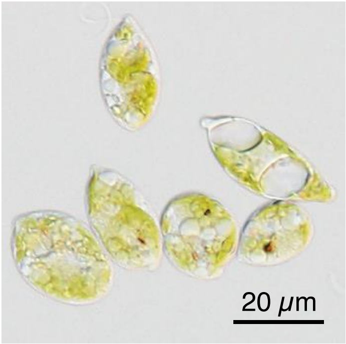

図1. *Euglena gracilis* Klebs細胞の光学顕微鏡写真

光合成生物においてカロテノイドは葉緑体でクロロフィルとともに光エネルギーを吸収し光合成を駆動するための光捕集色素として機能すると同時に，過剰な光エネルギーから葉緑体の光合成システムを保護し活性酸素種を消去する光防護機構としても重要な役割を果たしている。筆者らは *E. gracilis* の光環境応答の基礎生理を明らかにすることを目標に，*E. gracilis* のカロテノイドに着目しその合成の分子機構や光ストレス下におけるカロテノイドの生理機能の解明を目指している。本総説では筆者らが *E. gracilis* から単離同定したカロテノイド合成系遺伝子について概説する。さらに，*E. gracilis* 細胞のカロテノイドの組成と蓄積量に及ぼす光ストレスの影響に関する生理学解析について筆者らのこれまでの知見を紹介する。

２．ユーグレナの生物学的特徴

２−１．ユーグレナの進化と系統分類

*E. gracilis*は「ミドリムシ」とも呼ばれているように，葉緑体で光合成を行いながら鞭毛を用いて水中を活発に遊泳する単細胞真核生物である。*E. gracilis*は緑藻と同様にその葉緑体に光合成色素のクロロフィル*a*と*b*を有するが，緑藻や陸上植物の系統とは全く異なるグループに属する。系統分類において*E. gracilis*はスーパーグループ「エクスカバータ」(Excavata) のユーグレナ目 (Euglenida) に属しており，植物よりもむしろヒトの寄生虫であるトリパノソーマ (Kinetoplastea) と近縁の極めて個性的な藻類である(Adl *et al.*, 2005; Ahmadinejad *et al.*, 2007; Simpson *et al.*, 2004) 。ユーグレナ目には1000を超え

る種のユーグレナ類が存在するが，その多くは従属栄養生物（捕食性や栄養吸収性）である(Zakryś *et al.*, 2017)。*E. gracilis*を含め光独立栄養性のユーグレナ類は元来葉緑体を持っていなかった祖先の原生生物が細胞内に緑藻を取り込み，共生させたことで葉緑体を獲得した（二次共生）と考えられている(Gibbs, 1978; Turmel *et al.*, 2009)。ユーグレナ類の中には葉緑体で光合成を行いながら同時に捕食性も有しているラパザ（*Rapaza viridis*）という混合栄養性のユーグレナも存在する(Yamaguchi *et al.*, 2012)。ラパザは色素体を有するユーグレナ類の基部に位置する系統であり，ユーグレナ類が従属栄養性から混合栄養性を経て光独立栄養性に段階的に栄養様式を転換したことを示している。

ユーグレナ類には形態も栄養様式も異なる多くの種が存在するが，一般に「ユーグレナ」と呼ぶ場合は光独立栄養性のユーグレナ類の中で最も良く研究されている*E. gracilis*のことを指している。

２−２．ユーグレナの細胞構造

ユーグレナ類の細胞は細胞壁を持たず，細胞表層にペリクルと呼ばれる特徴的な線条構造を形成する(Leander *et al.*, 2007)。ユーグレナ類は二次共生によって葉緑体を獲得したため，その葉緑体は3層の包膜に囲まれている(Gibbs, 1978)。このため，核にコードされる葉緑体タンパク質の多くは緑藻や高等植物とは異なる独自の局在化シグナル配列(Bipartite presequence)を有する(Durnford and Gray, 2006)。さらに，緑藻や高等植物が光合成産物を葉緑体内にデンプン(α-1, 4グルカン)として貯蔵するのに対し，ユーグレナ類はパラミロンと呼ばれるβ-1, 3グルカンを細胞質に蓄積することもユーグレナ類の大きな特徴の一つである。

ユーグレナ類の多くは２本の鞭毛を持つ。*E. gracilis*は長さの異なる鞭毛を持ち，１本は細胞前端の陥入部に隠れていて，陥入部から外に長く伸びたもう１本の鞭毛を波打たせて水中を遊泳する。*E. gracilis*の鞭毛基部の細胞質にはユーグレナ（ラテン語で*eu*美しい+*glena*眼）の名称の由来となったオレンジ色の「眼点」（eye spot/ stigma）と呼ばれる構造が存在する。「眼点」と名がついているが，眼点は細胞質に蓄積したカロテノイドを含む脂質顆粒であり，実際の光受容部位は鞭毛基部の副鞭毛体(Paraflagellar body, PFB)と呼ばれる構造である。Iseki *et al*. (2002)は副鞭毛体に局在する光活性化アデニル酸シクラーゼ(Photoactivated adenylyl cyclase, PAC)が*E. gracilis*の光回避反応（ステップアップ驚動反応）における光センサーとして機能することを明らかにしている。眼点と副鞭毛体は近接して存在することから，眼点は光受容部位に当たる光を遮ることで光の方向性の感知に関与していると考えられている。緑藻もカロテノイドを集積した眼点を有するが，緑藻の眼点は光受容体に近接した葉緑体内部のチラコイド膜間に形成される(Kreimer, 2009)。ユーグレナの眼点は緑藻とは異なる部位に形成されること，さらに眼点を形成する脂質顆粒の包膜と葉緑体膜の構造との類似性は認められていないこと(Kivic and Vesk, 1972)から，ユーグレナ類は独自に眼点を発達させたと推察される。

３．ユーグレナのカロテノイド合成遺伝子の単離同定

３−１．*E. gracilis*に含まれる主要なカロテノイド

カロテノイドは８個のイソプレン（C_5）単位から構成される炭素数 40（C_{40}）の基本構造を持つ化合物である。カロテノイドは炭素原子と水素原子のみで構成される「カロテン」と炭素原子と水素原子に加えて酸素原子も含む「キサントフィル」の大きく２つのグループに分類される。緑色植物の葉緑体には主としてβ-カロテンとルテイン，ビオラキサンチン，9′-シス-ネオキサンチンが含まれ，その他

α-カロテンやゼアキサンチンなどの生合成中間体が少量存在する(Takaichi, 2011)。ユーグレナ類ではこれまでにβ-カロテンとゼアキサンチン，9′-シス-ネオキサンチン，ジアトキサンチン，ジアジノキサンチンなどの存在が報告されている(Takaichi, 2011; Aitzetmüller *et al.*, 1968; Bjørnland, 1982; Takaichi and Mimuro, 1998)。一方で，ユーグレナ類はルテインを持たないと考えられている（三室ら，2006）。

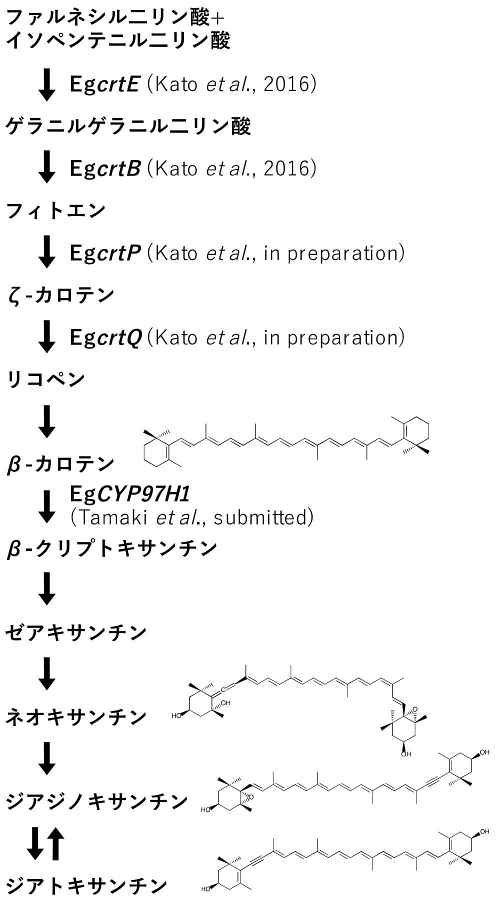

図2. *E. gracilis*のカロテノイド合成経路（推定）と主要なカロテノイドの構造式

図 2 に *E. gracilis* の推定されるカロテノイド合成経路を示した。筆者らは *E. gracilis* に含まれるカロテノイドを高速液体クロマトグラフィーと C-18 カラムを用いて分析し，β-カロテンとネオキサンチン，ジアジノキサンチン，ジアトキサンチンが *E. gracilis* 細胞の主要なカロテノイド分子種（図 2）であることを報告した(Kato *et al.*, 2017)。カロテノイド合成系の中でフィトエンからリコペンの合成に至る初期段階はシアノバクテリアから高等植物まで共通している。これまでに筆者らは *E. gracilis* のカロテン合成系遺伝子を複数単離同定し，既にその一部(Eg*crtE* および Eg*crtB*)を報告した(Kato *et al.*, 2016)。ここではカロテン合成の初期段階に関わる遺伝子についての知見を紹介する。なお，本総説ではカロテノイド合成系の遺伝子名は小文字で始まるイタリック体で表記し，その産物のタンパク質は大文字で始まる立体で表記した（Eg*CYP97H1* を除く）。

3−2．フィトエンの合成

カロテノイドの前駆体はイソプレノイド合成系で合成されるゲラニルゲラニル二リン酸（GGPP; C_{20}）である。GGPP 合成酵素（CrtE または GGPPS, GGPS）によってファルネシル二リン酸（FPP; C_{15}）とイソペンテニル二リン酸(IPP; C_5)が縮重し，GGPP が合成される。その後，フィトエン合成酵素(CrtB または Psy，Pys)によって２分子の GGPP がリン酸基側同士(tail-to-tail)で結合することで最初のカロテン，フィトエン(C_{40})が合成される。GGPP 合成酵素遺伝子とフィトエン合成酵素遺伝子は藻類ではシアノバクテリアの *Thermosynechococcus elongatus* (*crtE*)や *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 (*crtB*)，*Synechococcus elongatus* PCC 7942 (*pys*)や真核藻類の *Pyropia umbilicalis* (*ggps*)，*Chlamydomonas reinhardtii* (*crtB*)，*Haematococcus pluvialis* (*pys*)，*Chlorella zofingiensis* (*psy*)でその単離と機能解析がなされている(Takaichi, 2011; Cordero *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2016)。これまでのところユーグレナの核ゲノム配列は公開されていないが，*E. gracilis* のトランスクリプトームデータ(Yoshida *et al.*, 2016)は報告されている。筆者らは高等植物や他の藻類の既知の GGPP 合成酵素とフィトエン合成酵素のアミノ酸配列を用いて相同性検索を行い，*E. gracilis* の Eg*crtE* と Eg*crtB* の cDNA を単離し，大腸菌タンパク質発現系を用いた相補実験でその機能を明らかにした(Kato *et al.*, 2016)。

EgCrtE のアミノ酸配列には，真正細菌と植物型の GGPP 合成酵素（type II GGPPS）で保存されてい

るアスパラギン酸残基に富む First-aspartate rich motif（FARM: DDXXXD）と Second-aspartate-rich motif（SARM: DDXXD）が存在する。GGPP 合成酵素の分子系統樹において，EgCrtE は比較的シアノバクテリア(Cyanophyta)や紅藻(Rhodophyta)と近縁であり，*T. elongatus* と *P. umbilicalis* の GGPP 合成酵素とそれぞれ 46%と 44%の同一度と 59%と 55%の類似度を示した (Kato *et al.*, 2016)。EgCrtB もシアノバクテリアや緑藻のフィトエン合成酵素と同様にアスパラギン酸に富んだ 2 箇所の DXXXD モチーフを有している。しかしながら，系統樹において EgCrtB はシアノバクテリアや緑藻のフィトエン合成酵素とは異なるクレードに位置し，緑藻の Psy/Pys との同一度と類似度はそれぞれ 38-40%と 52-56%であった (Kato *et al.*, 2016)。ユーグレナ類が合成するジアトキサンチンとジアジノキサンチンは，ユーグレナ類の他にはクロムアルベオラータ(Chromalveolata)に属する一部の藻類(Heterokontophyta，Haptophyta および Dinophyta)でのみ認められる特徴的なキサントフィルである(Takaichi, 2011)。さらに，近年の分子系統解析の結果，ユーグレナ類の共通祖先は緑藻由来の葉緑体を獲得する前に紅藻系二次共生植物(Chromalveolata-like prey alga)を取り込み，遺伝子水平伝播によって紅色系遺伝子を獲得したことが明らかにされている(Maruyama *et al.*, 2011)。これらのことから，ユーグレナのカロテノイド合成系は緑藻ではなく紅藻系二次植物に由来すると推察された。

緑藻や高等植物では CrtE の多くと CrtB が葉緑体に局在するのに対し，EgCrtE と EgCrtB のアミノ酸配列からは *E. gracilis* の典型的な葉緑体局在化シグナル配列は見出されなかった。この結果は，ユーグレナのイソプレノイド合成系が細胞質に存在することと関連があると考えられた。高等植物のイソプレノイド合成系には細胞質のメバロン酸(MVA)経路と葉緑体の非メバロン酸(DOXP/MEP)経路が存在するが，高等植物は非メバロン酸経路で合成されたイソプレノイドを用いてカロテノイドを合成している(Lichtenthaler, 1999; 2007)。進化の過程でメバロン酸経路を失った緑藻も高等植物と同様に非メバロン酸経路由来のイソプレノイドをカロテノイド合成に用いている。一方で，ユーグレナは光合成生物で例外的に非メバロン酸経路を欠き，イソプレノイドを細胞質のメバロン酸経路で合成している(Lichtenthaler, 2007; Disch *et al.*, 1998)。これらのことから，*E. gracilis* は GGPP とフィトエンを細胞質で合成している可能性が考えられた。

３−３．フィトエンからリコペンまで

フィトエンは４段階の不飽和化を経てリコペンに変換される(Takaichi, 2011; Huang *et al.*, 2017)。シアノバクテリアや真核藻類では，フィトエンからリコペンまでの不飽和化に２種類の酵素が関与している。最初の２段階の不飽和化はフィトエン不飽和化酵素（植物型）（CrtP または Pds）によって触媒され，フィトエンからフィトフルエンを経て ζ-カロテンが合成される。その後，ζ-カロテン不飽和化酵素（CrtQ または Zds）によって ζ-カロテンがニューロスポレンを経てリコペンへ変換される。一方で，*Gloeobacter violaceus* PCC 7421 は他のシアノバクテリアと異なり，細菌型のフィトエン不飽和化酵素（CrtI）を持ち，フィトエンからリコペンまでの４段階の不飽和化を一つの酵素で行っている。*E. gracilis* のフィトエン不飽和化酵素は植物型であり，EgCrtP と EgCrtQ の２つの酵素がフィトエンからリコペンへの変換を担っている (Kato *et al.*, in preparation)。

４．ユーグレナのカロテノイド合成・蓄積の光ストレス応答

緑藻の *Dunaliella salina* (Król *et al.*, 1997)や *H. pluvialis* (Steinbrenner and Linden, 2001)，*C. zofingiensis* (Li

et al., 2009)は，強光ストレス下で細胞に高濃度のカロテノイドを蓄積することが知られている。筆者らは *E. gracilis* が合成するカロテノイドの生理生態上の機能を明らかにするため，光ストレス下で培養した *E. gracilis* のカロテノイド合成遺伝子の発現や細胞のカロテノイドの含量と組成を解析した(Kato *et al.*, 2016; 2017)。図 3 に培養時の光強度(27，55，240，460，920 µmol photon m^{-2} s^{-1})が *E. gracilis* の主要なカロテノイドの蓄積量に及ぼす影響を示した。さらに，培養時の光強度の増加に伴う細胞増殖の抑制や光合成色素蓄積量, 細胞の微細構造の変化との関係を図 4 にまとめた。太陽の直射光は 2000 µmol photon m^{-2} s^{-1} に相当する。

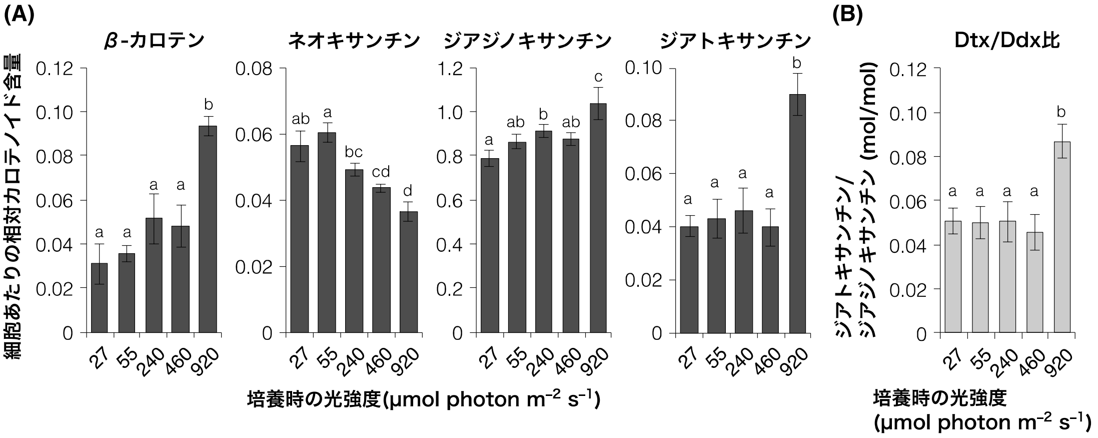

図3. 培養時の光強度が*E. gracilis*の(A)主要なカロテノイドの含量と(B)ジアトキサンチン/ジアジノキサンチン(Dtx/Ddx)比に及ぼす影響(Kato *et al.*, 2017を元に作図)
55 µmol photon m^{-2} s^{-1}照射処理区の細胞あたりの主要なカロテノイドの総量を1とした。

E. gracilis の細胞あたりのクロロフィル含量の減少は 240 µmol photon m^{-2} s^{-1} 以上，細胞増殖の遅延や抑制は 460 µmol photon m^{-2} s^{-1} 以上の連続光照射によって引き起こされた。920 µmol photon m^{-2} s^{-1} 照射下で培養すると *E. gracilis* のカロテノイド合成系は Eg*crtB* の転写レベルで応答し，細胞あたりの主要なカロテノイドの総量も増殖に至適な光強度(55 µmol photon m^{-2} s^{-1})で培養した細胞に比べ 1.3 倍に増加した。一般に葉緑体のカロテノイドの多くはチラコイド膜やチラコイド膜上の反応中心と集光アンテナタンパク質の複合体に存在するが，強光ストレス処理によって *E. gracilis* のカロテノイド含量が増加したのに対し葉緑体チラコイド膜の層の数は著しく減少した(Kato *et al.*, 2017)。一方でチラコイド膜間や細胞質に存在する脂質顆粒の大きさや数が光強度の増加に伴って増加する傾向が認められたことから，これらの脂質顆粒の増加がカロテノイド含量の増加の要因の一つであると考えられた。

緑色植物ではビオラキサンチンとゼアキサンチンの相互変換（ビオラキサンチンサイクル）が光阻害を回避するための非光化学的消光(NPQ)を調節するキサントフィルサイクルとして機能している。一方で，珪藻やハプト藻，渦鞭毛藻はジアジノキサンチンとジアトキサンチンの相互変換反応であるジアジノキサンチンサイクルを NPQ 調節に用いている(Goss and Jakob, 2010)。珪藻の *Phaeodactylum tricornutum* ではジアジノキサンチンの蓄積量が多いほど NPQ 活性が高く，特にジアトキサンチン含量が直接 NPQ 活性と相関することが報告されている(Lavaud *et al.*, 2002; Ruban *et al.*, 2004)。*E. gracilis* の主要なカロテノイドの総量の約 8 割を占めるジアジノキサンチンは，光強度の増加に伴って含量が増加する傾向を示し，その応答はクロロフィル含量の減少や細胞増殖の抑制が生じる光強度よりも弱

い光(55 µmol photon m^{-2} s^{-1})でも引き起こされた。さらに，ジアトキサンチンは主要なカロテノイドの総量に対する割合は低いものの，強光ストレス処理によって対照(55 µmol photon m^{-2} s^{-1} 照射区)の 2 倍以上に増加し，ジアジノキサンチン(Ddx)に対するジアトキサンチン(Dtx)の比(Dtx/Ddx)も約２倍に上昇した。これらのことから *E. gracilis* においてもジアジノキサンチンと特にジアトキサンチンが強光ストレスの回避において重要な役割を果たしているカロテノイドである可能性が示唆された。

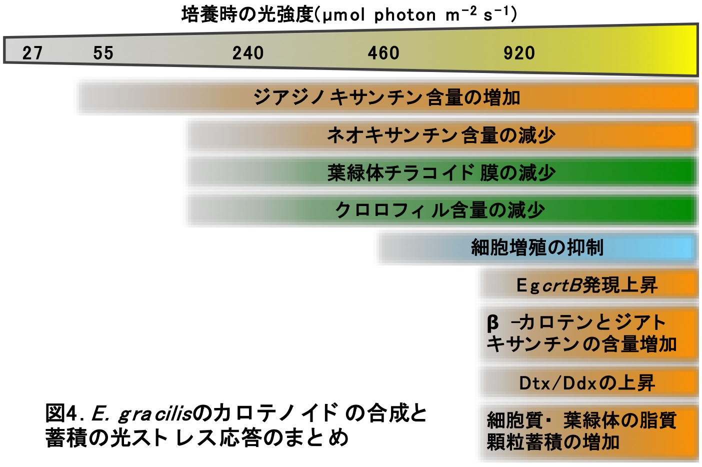

図4. *E. gracilis*のカロテノイドの合成と蓄積の光ストレス応答のまとめ

５．おわりに

藻類が合成するカロテノイドは系統分類によって多岐にわたり，藻類におけるカロテノイド合成遺伝子や調節機構の多くは未解明である。現在，筆者らは *E. gracilis* のカロテノイド合成・蓄積の調節に及ぼす概日リズムや光シグナルの影響を解析し，その光環境応答の分子機構の解明を目指している。

近年，カロテノイドの抗酸化作用やビタミン A 欠乏や加齢黄斑変性，ガン，心疾患の予防効果が注目され，微細藻類ヘマトコッカスが合成蓄積するアスタキサンチンのサプリメントや化粧品等への利用が拡大している。ユーグレナは 9′-シス-ネオキサンチンやアセチレン基を有するジアジノキサンチンなど一部の分類群に特有なカロテノイドを含むことから，ユーグレナのカロテノイド合成系やその調節に関わる分子機構を解明することで強光下でも高効率で増殖する藻類の分子育種のみならず，ユーグレナ特有のカロテノイドを効率的に生産するための応用研究の発展にも貢献できると考えている。

６．謝辞

本総説で紹介した筆者らの研究は，科学研究費補助金(25450308，17K07945)および私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(S1311014)，平成 27 年度帝京大学理工学部教育・研究推進特別補助金の支援を得て遂行した。

引用文献

Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., *et al.* 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52: 399–451.

Ahmadinejad, N., Dagan, T., & Martin W. 2007. Genome history in the symbiotic hybrid *Euglena gracilis*. *Gene* 402: 35–39.

Aitzetmüller, K., Svec, W. A., Katz, J. J., & Strain, H. H. 1968. Structure and chemical identity of diadinoxanthin and the principal xanthophyll of *Euglena*. *Chem. Commun.* 1: 32–33.

Bjørnland, T. 1982. Chlorophylls and carotenoids of the marine alga *Eutreptiella gymnastica*. *Phytochem.* 21: 1715–1719.

Cordero, B. F., Couso, I., León, R., Rodríguez, H., & Vargas, Á. 2011. Enhancement of carotenoids biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* by nuclear transformation using a phytoene synthase gene isolated from *Chlorella zofingiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91: 341–351.

Disch, A., Schwender, J., Müller, C., Lichtenthaler, H. K. & Rohmer, M. 1998. Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. *Biochem. J.*, 333: 381–388.

Durnford, D. G., & Gray, M. W. 2006. Analysis of *Euglena gracilis* plastid-targeted proteins reveals different classes of transit sequences. *Eukaryot. Cell* 5: 2079–2091.

Gibbs, S. P. 1978. The chloroplasts of *Euglena* may have evolved from symbiotic green algae. *Can. J. Bot.* 56: 2883–2889.

Goss, R., & Jakob, T. 2010. Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. *Photosynth. Res.* 106: 103–122.

Huang, J. J., Lin, S., Xu, W., & Cheung P. C. K. 2017. Occurrence and biosynthesis of carotenoids in phytoplankton. *Biotechnol. Adv*. 35: 597–618.

Iseki, M., Matsunaga, S., Murakami, A., *et al*. 2002. A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. *Nature* 415: 1047–1051.

Kato, S., Soshino, M., Takaichi, S., *et al*. 2017. Suppression of the phytoene synthase gene (Eg*crtB*) alters carotenoid content and intracellular structure of *Euglena gracilis*. *BMC Plant Biol.* 17: 1–10.

Kato, S., Takaichi, S., Ishikawa, T., Asahina, M., Takahashi, S. & Shinomura, T. 2016. Identification and functional analysis of the geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene (*crtE*) and phytoene synthase gene (*crtB*) for carotenoid biosynthesis in *Euglena gracilis*. *BMC Plant Biol.* 16: 1–12.

Kivic, P. A., & Vesk, M. 1972. Structure and function in the Euglenoid eyespot apparatus: The fine structure, and response to environmental changes. *Planta* 105: 1–14.

Kreimer, G. 2009. The green algal eyespot apparatus: a primordial visual system and more? *Curr. Genet*. 55: 19–43.

Król, M., Maxwell, D. P., & Huner, N. P. A. 1997. Exposure of *Dunaliella salina* to low temperature mimics the high light-induced accumulation of carotenoids and the carotenoid binding protein (Cbr). *Plant Cell Physiol.* 38: 213–216.

Lavaud, J., Rousseau, B., Gorkom, H. J. van, & Etienne, A.-L. 2002. Influence of the diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant physiol.* 129: 1398–1406.

Leander, B. S., Esson, H. J., & Breglia S. A. 2007. Macroevolution of complex cytoskeletal systems in euglenids. *Bioessays* 29: 987–1000.

Li, Y., Huang, J., Sandmann, G., & Chen, F. 2009. High-light and sodium chloride stress differentially regulate the biosynthesis of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 45: 635–641.

Lichtenthaler, H. K. 1999. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 50: 47–65.

Lichtenthaler, H. K. 2007. Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, α-tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. *Photosynth. Res.* 92: 163–179.

Maruyama, S., Suzaki, T., Weber, A.P. M., Archibald, J. M., & Nozaki, H. 2011. Eukaryote-to-eukaryote gene transfer gives rise to genome mosaicism in euglenids. *BMC Evol. Biol.* 11: 1–11.

三室守，高市真一，富田純史　2006.　カロテノイド-その多様性と生理活性-．裳華房．東京.

Ruban, A. V., Lavaud, J., Rousseau, B., Guglielmi, G., Horton, P., & Etienne, A.-L. 2004. The super-excess energy dissipation in diatom algae: comparative analysis with higher plants. *Photosynth. Res.* 82: 165–175.

Simpson, A. G. B., Gill, E. E., Callahan, H. A., Litaker, R. W., & Roger A. J. 2004. Early evolution within kinetoplastids (Euglenozoa), and the late emergence of trypanosomatids. *Protist* 155: 407–422.

Steinbrenner, J., & Linden, H. 2001. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiol.* 125: 810–817.

Takaichi, S. 2011. Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Mar. Drugs* 9: 1101–1118.

Takaichi, S., & Mimuro, M. 1998. Distribution and geometric isomerism of neoxanthin in oxygenic phototrophs: 9′-*cis*, a sole molecular form. *Plant Cell Physiol.* 39: 968–977.

Turmel, M., Gagnon, M.-C., O'Kelly, C.J., Otis, C., & Lemieux, C. 2009. The chloroplast genomes of the green algae *Pyramimonas*, *Monomastix*, and *Pycnococcus* shed new light on the evolutionary history of prasinophytes and the origin of the secondary chloroplasts of euglenids. *Mol. Biol. Evol.* 26: 631–648.

Yamaguchi, A., Yubuki, N., & Leander, B. S. 2012. Morphostasis in a novel eukaryote illuminates the evolutionary transition from phagotrophy to phototrophy: description of *Rapaza viridis* n. gen. et sp. (Euglenozoa, Euglenida). *BMC Evol. Biol.* 12: 1–16.

Yang, L.-E., Huang, X.-Q., Lu, Q.-Q., Zhu, J.-Y., & Lu, S. 2016. Cloning and characterization of the geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPS) responsible for carotenoid biosynthesis in *Pyropia umbilicalis*. *J. Appl. Phycol.* 28: 671–678.

Yoshida, Y., Tomiyama, T., Maruta, T., Tomita, M., Ishikawa, T., & Arakawa, K. 2016. *De novo* assembly and comparative transcriptome analysis of *Euglena gracilis* in response to anaerobic conditions. *BMC Genom.* 17: 1–10.

Zakryś, B., Milanowski, R., & Karnkowska A. 2017. Evolutionary origin of *Euglena*. In: Schwarzbach, S. D., & Shigeoka, S. (eds.) *Euglena: Biochem. Cell Mol. Biol.* pp. 3–17. Springer, Cham.

真核光合成生物における
シトクロム P450 型カロテン水酸化酵素（CYP97）の機能解析

玉木峻，今石浩正
神戸大学バイオシグナル総合研究センター
〒657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1

Shun Tamaki, Hiromasa Imaishi

Functional analyses of
cytochrome P450-type β-carotene hydroxylases (CYP97s)
in plants and eukaryotic algae

Keywords: β-carotene hydroxylase, CYP97, *Euglena gracilis*
Biosignal Research Center, Kobe University, Rokkodai 1-1, Kobe, 657-8501, Japan
DOI: 10.24480/bsj-review.9b5.00137

１．真核光合成生物における多様なカロテノイドとその合成経路

真核光合成生物に存在するカロテノイド分子種は多種多様である（Takaichi 2011）。多くの真核光合成生物において，β-カロテンは含有量の高い分子種であるが，それ以外のカロテノイド組成は各生物種の進化の過程で多様化した。例えば，陸上植物や緑藻植物門では，ビオラキサンチン，ネオキサンチン，ルテインが主なカロテノイド分子種であるが，紅藻植物門ではゼアキサンチンが，特に大型紅藻ではルテインも豊富に存在する。ユーグレナ藻，渦鞭毛藻ではジアジノキサンチンが，ハプト藻では，ジアジノキサンチンに加えてフコキサンチンも主要なカロテノイド分子種であり，珪藻，褐藻等ではフコキサンチンが主要なカロテノイド分子種である。しかし，これらの真核藻類では，陸上植物や緑藻植物門で主要なカロテノイド分子種であるルテインを持たない。ヘマトコッカス（*Haematococcus pluvialis*）や *Chromochloris zofingiensis* 等の一部の緑藻類は強光等の条件下でアスタキサンチンを蓄積し，赤色化することも知られている。

こうしたカロテノイド分子種の多様性は，カロテノイド合成経路の多様性によって生み出される。図 1 に示すように，真核光合成生物における一般的なカロテノイド合成経路では，イソペンテニル二リン酸を初発物質とし，ゲラニルゲラニル二リン酸，フィトエン，リコペンを経て，α-カロテンまたは β-カロテンが合成される。β-カロテン誘導体の合成経路では，β-カロテンが水酸化されると，β-クリプトキサンチン，ゼアキサンチンを生じる。植物や多くの緑藻類では，ゼアキサンチンとそのエポキシ化体であるアンテラキサンチン，ビオラキサンチンは，強光下での光エネルギーの放出機構であるキサントフィルサイクルに関与する。ビオラキサンチンはネオキサンチンに変換され，さらに，真核藻類の種特異的なジアジノキサンチン，ジアトキサンチン，フコキサンチン等が生成される。上記とは異なる経路として，β-カロテンはケト化されるとエキネノン，

カンタキサンチンを生じ，その水酸化体がアスタキサンチンである。α-カロテン誘導体の合成経路では，α-カロテンが水酸化されるとルテインを生じ，その後，真核藻類の種特異的なシフォナキサンチン等に変換される。

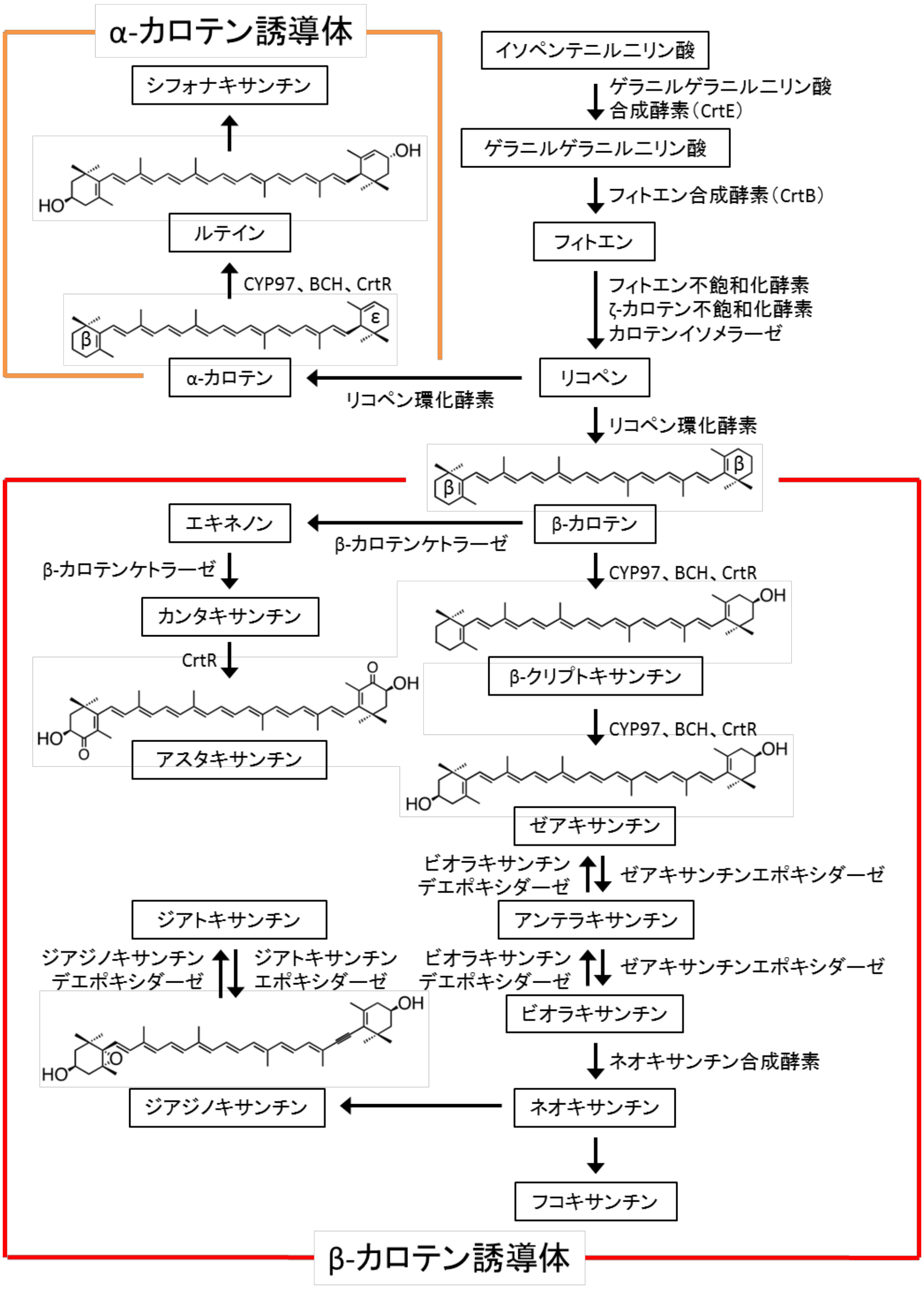

図 1．真核光合成生物における一般的なカロテノイド合成経路

これらカロテノイド合成経路の中でも，リコペン上流までは真核光合成生物においてほぼ共通した経路である。一方，リコペンが環化され，α-カロテンまたはβ-カロテンが合成される段階以降では，各真核光合成生物に特異的な酵素反応によりカロテノイドの多様性が生じる。β-カロテンは両端にβ環を有し，α-カロテンは一方がβ環，他方がε環の構造を持つが，カロテン水酸化酵素（CYP97，BCH）はβ環，ε環を特異的に水酸化することで，ゼアキサンチン，ルテインの生合成に関与している。

CYP97はシトクロムP450酵素ファミリーに属し，ヘムを含有する水酸化酵素である。一方，BCHは非ヘム型二鉄水酸化酵素であり，β環の水酸化にのみ関与する。BCHに相同なβ-カロテン水酸化酵素であるCrtRはシアノバクテリアに存在し（Takaichi and Mochimaru 2007），その相同遺伝子は真核光合成生物では紅藻シゾン（*Cyanidioschyzon merolae*）に存在する（Cunningham et al. 2007）。BCHおよびその相同遺伝子が植物，緑藻類，紅藻シゾンの限られた真核光合成生物にしか見出されないが，CYP97は広範な真核光合成生物に分布しており（Cui et al. 2013），その幅広い保存性は真核光合成生物におけるCYP97の生理的重要性を意味すると考えられる。本稿では，これまでに明らかになった真核光合成生物におけるCYP97の酵素機能および生理機能を概説し，さらに，ユーグレナ藻の一種*Euglena gracilis*（以下，ユーグレナと表記）に見出されたCYP97のユニークな機能についても紹介する。

２．真核光合成生物に存在するCYP97酵素群

シトクロムP450酵素はネルソンらによって体系的な系統分類が行われている（Cytochrome P450 homepage（http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html），Nelson et al. 2008）。CYP97およびその相同遺伝子はクランA，B，C，E，F，G，Hに分類された（表1）。緑藻植物門，陸上植物は共通して，クランA，B，C型CYP97を持つことから，CYP97は緑藻類の進化の過程で発生したと考えられる。紅藻植物門では，海苔の一種である大型紅藻ポルフィラ（*Porphyra umbilicalis*）がクランB型CYP97を持つが（Yang et al. 2014），単細胞紅藻シゾンには*CYP97*相同遺伝子が存在しない（Cui et al. 2013）。不等毛藻類（Heterokontophyta）に属する珪藻類（*Phaeodactylum tricornutum*，*Skeletonema costatum*，*Thalassiosira pseudonana*），褐藻（*Ectocarpus siliculosus*）由来CYP97はクランE，Fに，真正眼点藻（*Nannochloropsis oceanica*）由来CYP97はクランFに分類された。渦鞭毛藻（*Symbiodinium minutum*）由来CYP97はクランGに，ユーグレナ由来CYP97はクランF，Hに分類された。CYP97の系統分類と真核光合成生物のカロテノイド組成には関連があり，クランA，B，C型CYP97を持つ陸上植物，緑藻類，ポルフィラではビオラキサンチン，ネオキサンチン，ルテインが主要なカロテノイド分子種であるが，クランE，F，G，H型CYP97を持つ不等毛藻類，渦鞭毛藻，ユーグレナではジアジノキサンチン，一部ではフコキサンチンが主要なカロテノイド分子種である。したがって，真核光合成生物におけるカロテノイド分子種およびその合成系の多様性を理解する上

で，CYP97 の機能を解析することは重要である。近年，以下に記述する一部の CYP97 の機能が明らかになってきた。

表 1.　CYP97 の系統分類

	クラン						
	A	B	C	E	F	G	H
陸上植物 （例：シロイヌナズナ，イネ，ゼニゴケ）	○	○	○				
緑藻植物門 （例：クラミドモナス，ヘマトコッカス）	○	○	○				
紅藻植物門 (例：*Porphyra umbilicalis*)		○					
珪藻類 (例：*Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*)				○	○		
褐藻 (例：*Ectocarpus siliculosus*)				○	○		
真正眼点藻 (例：*Nannochloropsis oceanica*)					○		
渦鞭毛藻 (例：*Symbiodinium minutum*)						○	
ユーグレナ藻 (例：*Euglena gracilis*)					○		○

２－１．植物 CYP97 の機能解析

シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*），イネ（*Oryza sativa*）由来の CYP97 の機能解析により，CYP97A は α-および β-カロテンの β 環の水酸化を触媒すること，CYP97C が α-カロテンの ε 環の水酸化を触媒することが明らかとなった（Tian et al. 2004，Kim and DellaPenna 2006，Quinlan et al. 2007）。さらに，イネ CYP97A4 および CYP97C2 は直接，タンパク質間相互作用することで，ルテイン合成に関与することが報告された（Quinlan et al. 2012）。一方で，シロイヌナズナの β-カロテン水酸化酵素欠損変異体（*cyp97a3 bch1 bch2*）においてルテインが検出されたことから，シロイヌナズナの CYP97C1 が α-カロテンの β 環水酸化活性を持つ可能性と，シロイヌナズナに未知の α-カロテンの β 環水酸化酵素が存在する可能性が示唆された（Kim et al. 2009）。また，シロイヌナズナを用いた逆遺伝学的解析から，CYP97 は BCH とともに光合成光化学系 II の保護や強光ストレス耐性に対して重要な役割を果たすことが明らかになった（Kim et al. 2009）。ウンシュウミカン（*Citrus unshiu*），ゼニゴケ（*Marchantia polymorpha*）由来 CYP97 の機能解析

からは，CYP97C の α-カロテンの ε 環水酸化活性が明らかとなったが，CYP97A の α-および β-カロテンの β 環水酸化活性は検出されなかった（Takemura et al. 2015，Ma et al. 2016）。これはウンシュウミカン，ゼニゴケ由来 CYP97A が活性を持たないのではなく，大腸菌を用いた CYP97 の機能解析において，機能的なタンパク質の発現に失敗したことが主な原因であると考えられた。

クラン B 型 *CYP97* 遺伝子は陸上植物，緑藻植物門に広く保存されているが，少なくとも，ウンシュウミカン由来 CYP97B において，α-および β-カロテン水酸化活性は確認されなかった（Ma et al. 2016）。 一方で，シロイヌナズナ *CYP97B3* 過剰発現体において，α-カロテン，β-クリプトキサンチンの含量が有意に変化したことから，植物におけるクラン B 型 CYP97 のカロテノイド合成系への関与が示唆されたが（Kim et al. 2010），現時点で，その詳細な機能は不明である。

２－２．真核藻類 CYP97 の機能解析

植物と比較して真核藻類の CYP97 に関する研究報告は多くない。近年では，ポルフィラにおいて，CYP97（PuCHY1）の機能解析が報告された。PuCHY1 は CYP97 ファミリーのクラン B に属し，β-カロテンを水酸化し，ゼアキサンチンを生成する（Yang et al. 2014）。植物および緑藻類由来クラン B 型 CYP97 の機能は不明であるが，PuCHY1 は酵素機能が明らかになった唯一のクラン B 型 CYP97 である。

アスタキサンチン産生藻のヘマトコッカス，オイル産生藻のパラクロレラ（*Parachlorella kessleri*）において，*CYP97* 相同遺伝子の発現解析が行われた。これらの緑藻類では強光照射に応答して，*CYP97* 相同遺伝子の転写レベルが増大し，アスタキサンチンやゼアキサンチン蓄積との相関があることから，*CYP97* 相同遺伝子のアスタキサンチン合成，光合成光化学系 II の保護への関与が示唆される（Cui et al. 2013，Yu et al. 2014）。しかし，現在までこれら緑藻類の *CYP97* 相同遺伝子産物の酵素機能や生理機能は解析されておらず，今後さらなる詳細な機能解析が望まれる。

３．ユーグレナ CYP97 の機能解析

３－１．ユーグレナの特徴

ユーグレナは真核微細藻類の一種であり（図 2），光合成を行う植物的特徴と鞭毛により運動を行う動物的特徴を併せ持つ（北岡　1989，Schwartzbach and Shigeoka 2017）。モデル微細藻類として広く研究されるクラミドモナス（*Chlamydomonas reinhardtii*）や，カロテノイド研究に汎用されるヘマトコッカス，*C. zofingiensis* 等は緑藻植物門に属するのに対し，ユーグレナはユーグレノゾア門に属するため，緑藻でもその

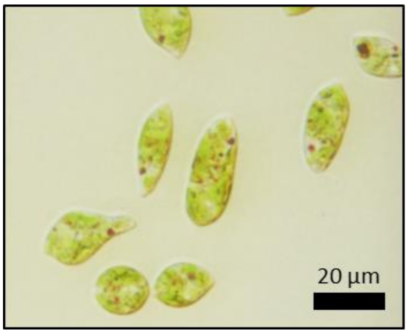

図 2.　ユーグレナ（*Euglena gracilis*）の顕微鏡写真

進化の過程は大きく異なっている。その結果，ユーグレナは特徴的なカロテノイド組成を持ち，それらの合成経路も異なっていると考えられている。特に *E. gracilis* は，生育速度が速いことや，幅広い pH 条件下でも生育すること，また，独立および従属栄養条件のいずれでも生育可能であることなど，他の真核藻類と比較して有利な条件下で培養できることが知られている。こうしたユーグレナの持つ優れた特徴を活用し，ユーグレナ社はユーグレナ屋外大量培養法の開発とその商業生産を成功させた（Suzuki 2017）。このように，現在ユーグレナは基礎研究だけでなく，機能性食品，化成品，バイオ燃料等の応用研究にも盛んに用いられるようになってきた。

３－２．ユーグレナにおけるカロテノイド研究

ユーグレナが産生する幅広い有用物質の中で，カロテノイドも注目を集めている。ユーグレナは主要なカロテノイドとして，β-カロテンやネオキサンチンの他に，植物，緑藻類には検出されないジアジノキサンチン，ジアトキサンチンを産生する（Wright et al. 1991，Küpper et al. 2007，Kato et al. 2017）。現在では，カロテノイド合成経路やその制御機構の理解が，産業実用性の高いユーグレナをカロテノイド生産に利用する上で必要不可欠であると考えられるようになってきた。これまでに，ユーグレナのカロテノイド合成系遺伝子として，生合成経路の上流で機能するゲラニルゲラニル二リン酸合成遺伝子（*crtE*）と，フィトエン合成酵素遺伝子（*crtB*）が同定された（Kato et al. 2016）。さらに，CrtB はユーグレナのカロテノイド合成だけでなく，クロロフィル合成，葉緑体構造のホメオスタシスに重要な役割を果たすことが明らかになった（Kato et al. 2017）。*CYP97* を含むフィトエン下流のカロテノイド合成系遺伝子の詳細な機能は明らかになっていない一方，最近の研究から，ユーグレナの *CYP97* 相同遺伝子（*EgCYP97H1*，*EgCYP97F2*）の酵素機能，生理機能，発現調節に関するユニークな知見が得られたため，以下に紹介する（Tamaki et al. 投稿中）。

３－３．ユーグレナ CYP97 の酵素活性

EgCYP97H1，EgCYP97F2 の酵素活性を評価した。β-カロテン水酸化活性の評価では，β-カロテン蓄積大腸菌に評価対象の *CYP97* 遺伝子を異種発現させ，生じたカロテノイドの HPLC 分析を行う *in vivo* 活性測定法が一般的である（Quinlan et al. 2007，Quinlan et al. 2012，Yang et al. 2014）。本手法によって活性測定を行ったところ，EgCYP97H1 は β-カロテンを水酸化することで β-クリプトキサンチンを生成したことから，EgCYP97H1 は β-カロテンモノ水酸化酵素であることを明らかにした。

３－４．ユーグレナ CYP97 の生理機能

ユーグレナ細胞における EgCYP97H1 および EgCYP97F2 の生理機能を明らかにするために，ユーグレナ CYP97 ノックダウン（KD）細胞を作出した。ユーグレナの形質転

換技術として，標的遺伝子のノックアウト技術は未だ確立されていない。また，過剰発現法の開発は報告されたが（Ogawa et al. 2015），現在のところ汎用性のある技術には至っていない。一方で，標的遺伝子の二本鎖 RNA をエレクトロポレーション法により導入することで，容易に KD 細胞を作出する実験系は既に報告されている（Tamaki et al. 2014，Tamaki et al. 2015）。

EgCYP97H1 および EgCYP97F2 の KD 細胞（KD-*cyp97h1*，KD-*cyp97f2*）では，生育速度およびは細胞当たりのクロロフィル含量は顕著に低下していた。このことから，両 KD 細胞の生育速度の低下は，クロロフィル含量の低下から生じる光合成速度の低下に起因することが示唆された。また，両 KD 細胞中の総カロテノイド含量と，ユーグレナにおいて最も含量の高いジアジノキサンチン量は約 90 %低下したことから，両 EgCYP97 がユーグレナのカロテノイド合成に不可欠な役割を果たすことが明らかになった。また，KD-*cyp97h1* 細胞では，総カロテノイドに占める β-カロテンの割合が増加したことから，EgCYP97H1 が β-カロテン水酸化活性を持つことが *in vivo* の実験系でも明らかとなった。一方，KD-*cyp97f2* 細胞では，野生株で検出されない β-クリプトキサンチンおよびそのエポキシドの蓄積が起こったことから，EgCYP97F2 は β-クリプトキサンチン水酸化酵素である可能性が考えられた。なお，KD-*cyp97f2* 細胞は弱光下で培養を行ったため，蓄積した β-クリプトキサンチンの一部がエポキシ化したと考えられる（Lohr and Wilhelm 2001）。さらに，両 KD 細胞では，微量のエキネノン，カンタキサンチン，アスタキサンチンといったケトカロテノイドの蓄積も確認されたことから，ユーグレナが潜在的にケトカロテノイド合成経路を有することが示唆された。

多くの植物・緑藻類では，β-カロテン水酸化酵素として *CYP97* 遺伝子だけでなく，*BCH* 遺伝子も持っている（Sun et al. 1996，Qui et al. 2013）。しかし，ユーグレナの発現遺伝子データベース（Yoshida et al. 2016）上には *BCH* 相同遺伝子は存在しなかった。したがって，ユーグレナにおける β-カロテンの水酸化には CYP97 のみが関与すると考えられる。この仮定は，両 KD 細胞の生育速度，総カロテノイド，クロロフィル含量における劇的な表現型の変化からも支持された。

３－５．ユーグレナ *CYP97* 発現の転写後調節

上述のように，両 KD 細胞において，総カロテノイド含量が顕著に低下する一方で，シロイヌナズナでは β-カロテン水酸化酵素欠損変異体（*cyp97a3 bch1 bch2*）の総カロテノイド含量はほとんど変化せず，代わりに α-カロテンやルテインの蓄積が起こることが明らかになっている（Kim et al. 2009）。したがって，ユーグレナにおけるカロテノイド合成は植物のそれとは異なるメカニズムで制御されると考えられる。そこで，ユーグレナのカロテノイド合成系遺伝子（*EgCYP97H1*，*EgCYP97F2*，*EgcrtE*，*EgcrtB*）の転写調節について検討した。ユーグレナでは，暗条件から明条件に移行した際に，迅速な葉緑体の発達とカロテノイド蓄積が起こる。また，強光照射下では，β-カロテン，ジアジ

ノキサンチン，ジアトキサンチンが有意に蓄積する（Kato et al. 2017）。しかし，これらカロテノイド蓄積条件下では，*EgCYP97H1*，*EgCYP97F2*，*EgcrtE* および *EgcrtB* 遺伝子の転写レベルはほとんど変化しなかった。そこで，ユーグレナのカロテノイド合成における転写調節ではなく，転写後調節の可能性を検討したところ，ユーグレナにおける暗条件から明条件移行時のカロテノイド合成は転写阻害剤の影響を受けなかったが，翻訳阻害剤処理により強く阻害された。このことから，ユーグレナのカロテノイド合成は転写後調節によって制御されることが示唆された。また，本機構は先に解析された植物，緑藻類由来 *CYP97* 遺伝子の発現制御とは異なっていた。

４．おわりに

CYP97 およびその相同遺伝子は多くの真核光合成生物のゲノム上に存在しており，最初にシロイヌナズナでその酵素機能が明らかになった。その後，イネ，ゼニゴケなどの陸上植物，ポルフィラ，ユーグレナといった真核藻類と研究範囲が広がってきた。また，一つの酵素ファミリーでありながら，7 つものクランに系統分類され，クランごとに機能に違いがあることも分かってきた。その例として，ユーグレナのクラン F および H 型 CYP97 の機能（酵素活性，生理機能，発現制御）は植物のクラン A および C 型 CYP97 のそれらとは異なっていた。このことは，既存の知見を適応するだけでなく，個別の生物種における CYP97 の機能解析の必要性を示している。今後は，酵素機能および生理機能が不明な植物クラン B 型 CYP97 の機能解析や，ユーグレナ以外の有用真核藻類，例えば，生理活性カロテノイドとして知られるフコキサンチンを蓄積する珪藻，褐藻における CYP97 の機能解析が進展することに期待したい。

謝辞

本研究を行うにあたり，帝京大学・篠村知子教授，加藤翔太博士，島根大学・石川孝博教授，生産開発科学研究所・眞岡孝至博士に多大なるご協力を頂きました。心より御礼申し上げます。

引用文献

Cui, H., Yu, X., Wang, Y., Cui, Y., Li, X., & Liu, Z. 2013. Evolutionary origins, molecular cloning and expression of carotenoid hydroxylases in eukaryotic photosynthetic algae. *BMC Genomics* 14: 457.

Cunningham, F.X. Jr., Lee, H., & Gantt, E. 2007. Carotenoid biosynthesis in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Eukaryot Cell.* 6: 533-545.

Kato, S., Takaichi, S., Ishikawa, T., Asahina, M., Takahashi, S., & Shinomura, T. 2016. Identification and functional analysis of the geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene (*crtE*) and phytoene synthase gene (*crtB*) for carotenoid biosynthesis in *Euglena gracilis*. *BMC Plant*

Biol. 16: 4.
Kato, S., Soshino, M., Takaichi, S., Ishikawa, T., Nagata, N., Asahina, M., & Shinomura, T. 2017. Suppression of the phytoene synthase gene (Eg*crtB*) alters carotenoid content and intracellular structure of *Euglena gracilis*. *BMC Plant Biol*. 17: 125.
Kim, J., & DellaPenna, D. 2006. Defining the primary route for lutein synthesis in plants: the role of *Arabidopsis* carotenoid β-ring hydroxylase CYP97A3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 3474-3479.
Kim, J., Smith, J.J., Tian, L., & Dellapenna, D. 2009. The evolution and function of carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 50: 463-479.
Kim, J.E., Cheng, K.M., Craft, N.E., Hamberger, B., & Douglas, C.J. 2010. Over-expression of *Arabidopsis thaliana* carotenoid hydroxylases individually and in combination with a β-carotene ketolase provides insight into *in vivo* functions. *Phytochemistry.* 71: 168-178.
北岡正三郎 1989. ユーグレナ：生理と生化学. 学会出版センター. 東京
Küpper, H., Seibert, S., & Parameswaran, A. 2007. Fast, sensitive, and inexpensive alternative to analytical pigment HPLC: quantification of chlorophylls and carotenoids in crude extracts by fitting with Gauss peak spectra. *Anal. Chem.* 79: 7611-7627.
Lohr, M., & Wilhelm, C. 2001. Xanthophyll synthesis in diatoms: quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model. *Planta* 212: 382-391.
Ma, G., Zhang, L., Yungyuen, W., Tsukamoto, I., Iijima, N., Oikawa, M. Yamawaki, K., Yahata, M., & Kato, M. 2016. Expression and functional analysis of citrus carotene hydroxylases: unravelling the xanthophyll biosynthesis in citrus fruits. *BMC Plant Biol.* 16: 148.
Nelson, D.R., Ming, R., Alam, M., & Schuler, M.A. 2008. Comparison of cytochrome P450 genes from six plant genomes. *Tropical Plant Biol.* 1: 216-235.
Ogawa, T., Tamoi, M., Kimura, A., Mine, A., Sakuyama, H., Yoshida, E., Maruta, T., Suzuki, K., Ishikawa, T., & Shigeoka, S. 2015. Enhancement of photosynthetic capacity in *Euglena gracilis* by expression of cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase leads to increases in biomass and wax ester production. *Biotechnol. Biofuels.* 8: 80.
Quinlan, R.F., Jaradat, T.T., & Wurtzel, E.T. 2007. *Escherichia coli* as a platform for functional expression of plant P450 carotene hydroxylases. *Arch. Biochem. Biophys.* 458: 146-157.
Quinlan, R.F., Shumskaya, M., Bradbury, L.M., Beltrán, J., Ma, C., Kennelly, E.J., & Wurtzel, E.T. 2012. Synergistic interactions between carotene ring hydroxylases drive lutein formation in plant carotenoid biosynthesis. *Plant Physiol.* 160: 204-214.
Schwartzbach, S.D., & Shigeoka, S. 2017. Euglena: biochemistry, cell, and molecular biology. Springer, German.
Sun, Z., Gantt, E., & Cunningham, F.X. Jr. 1996. Cloning and functional analysis of the β-carotene

hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 271: 24349-24352.

Suzuki, K. 2017. Large-scale cultivation of *Euglena*. In: Schwartzbach, S.D., & Shigeoka, S. (eds.) Euglena: biochemistry, cell, and molecular biology. pp. 285-293. Springer, German.

Takaichi, S. 2011. Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Mar. Drugs* 9: 1101-1118.

Takaichi, S., & Mochimaru, M. 2007. Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides. *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 2607-2619.

Takemura, M., Maoka, T., & Misawa, N. 2015. Biosynthetic routes of hydroxylated carotenoids (xanthophylls) in Marchantia polymorpha, and production of novel and rare xanthophylls through pathway engineering in *Escherichia coli*. *Planta* 241: 699-710.

Tamaki, S., Maruta, T., Sawa, Y., Shigeoka, S., & Ishikawa, T. 2014. Identification and functional analysis of peroxiredoxin isoforms in *Euglena gracilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78: 593-601.

Tamaki, S., Maruta, T., Sawa, Y., Shigeoka, S., & Ishikawa, T. 2015. Biochemical and physiological analyses of NADPH-dependent thioredoxin reductase isozymes in *Euglena gracilis*. *Plant Sci.* 236: 29-36.

Tian, L., Musetti, V., Kim, J., Magallanes-Lundback, M., & DellaPenna, D. 2004. The *Arabidopsis LUT1* locus encodes a member of the cytochrome p450 family that is required for carotenoid ε-ring hydroxylation activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 402-407.

Wright, S.W., Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Llewellyn, C.A., Bjørnland, T., Repeta, D., & Welschmeyer, N. (1991) Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 77: 183-196.

Yang, L.E., Huang, X.Q., Hang, Y., Deng, Y.Y., Lu, Q.Q., & Lu, S. 2014. The P450-type carotene hydroxylase PuCHY1 from *Porphyra* suggests the evolution of carotenoid metabolism in red algae. *J. Integr. Plant Biol.* 56: 902-915.

Yoshida, Y., Tomiyama, T., Maruta, T., Tomita, M., Ishikawa, T., & Arakawa, K. 2016. *De novo* assembly and comparative transcriptome analysis of *Euglena gracilis* in response to anaerobic conditions. *BMC Genomics* 17: 182.

Yu, X., Cui, H., Cui, Y., Wang, Y., Li, X., Liu, Z., & Qin, S. 2014. Gene cloning, sequence analysis, and expression profiles of a novel β-ring carotenoid hydroxylase gene from the photoheterotrophic green alga *Chlorella kessleri*. *Mol. Biol. Rep.* 41: 7103-7113.

クラミドモナス走光性における眼点カロテノイドの役割

若林憲一，植木紀子*，井手隆広#
東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所
〒226-8503　横浜市緑区長津田町 4259 番地 R1-7
(*現所属：ニューヨーク市立大学ブルックリン校)
（#現所属：理化学研究所 生命機能科学研究センター 〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 2-2-3）

Ken-ichi Wakabayashi, Noriko Ueki*, Takahiro Ide#

Carotenoids for phototaxis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

Keywords: carotenoids, *Chlamydomonas*, eyespot, flagella, phototaxis

Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, Nagatsuta-cho 4259-R1-7, Midori-ku, Yokohama 226-8503, JAPAN
(*Present address: Brooklyn College, The City University of New York, 2900 Bedford Avenue, Brooklyn, NY 11210, USA)
(#Present address: RIKEN, Center for Biosystems Dynamics Research. 2-2-3 Minatojimaminamimachi, Kobe-shi, Hyogo 650-0047, JAPAN)

DOI: 10.24480/bsj-review.9b6.00138

１．　はじめに

我々の研究グループは，単細胞緑藻クラミドモナスを用いて真核生物鞭毛の運動制御機構の解明に取り組んでいる。カロテノイド研究の特集号には場違いな著者かもしれない。クラミドモナスは，光を受容した後に鞭毛運動様式を変化させ，走光性などの光反応行動を示す。我々は，この光反応行動時の鞭毛運動調節機構を探る目的で，走光性異常の変異株を精力的にスクリーニングしている。その過程で，偶然にもカロテノイド生合成経路の酵素の変異株を単離した。本稿ではその変異株の解析から分かった，クラミドモナスの光受容におけるカロテノイド色素の重要性について解説する。

２．　クラミドモナスの走光性

２−１．　クラミドモナス

クラミドモナス（*Chlamydomonas reinhardtii*　和名コナミドリムシ）は，淡水に棲む

単細胞性の緑藻である（図１）。細胞体は核を避けるような形状のカップ型葉緑体でほぼ満たされており，その赤道面付近には眼点と呼ばれる光受容装置が存在する。そして，２本の鞭毛を人間の平泳ぎのように動かして水中を泳ぐ。

この生物は実験材料としてさまざまな特長を持つ。まず，通常は一倍体で無性的に増殖するため，突然変異株の単離が容易にできる。一方で，２つの接合型を持ち，窒素源飢餓などによって有性生殖を誘導できる。このため，古典遺伝学的な解析（四分子解析）が可能である。さらに，無菌的な培養が容易であり，その培養スケールも数十リットル程度まで増やすことができる。この他，全ゲノムが解読済みであること，遺伝子導入が可能であることなどの多くの利点から，クラミドモナスは鞭毛運動，光合成，光反応行動，有性生殖など，幅広い研究分野でモデル生物と見なされている。

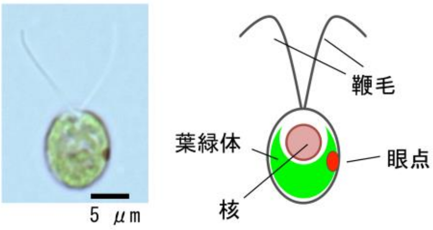

図１　クラミドモナスの明視野顕微鏡像（左）と模式図（右）。

２−２．眼点とカロテノイド色素

クラミドモナスの眼点は高い指向性を持った光受容を行う。その仕組みは眼点の構造を見るとよく分かる（図２）(Boyd et al., 2011; Dieckmann, 2003)。眼点は細胞膜上に存在する光受容タンパク質チャネルロドプシンと，それを裏打ちする色素顆粒層から成る。光学顕微鏡で見ると眼点が赤く見えるのは，この顆粒にカロテノイド（主としてβカロテンとルテイン）が含まれているためである(Eichenberger et al., 1986; Niyogi et al., 1997)。このカロテノイド色素顆粒は空隙を挟んで２〜３層を成している。屈折率の異なる物質から成る積層は，光学の分野で四分の一波長板と呼ばれる光反射板として機能する(Foster and Smyth, 1980; Morel-Laurens and Feinleib, 1983)。そしてその直上の細胞膜にチャネルロドプシンが局在している。

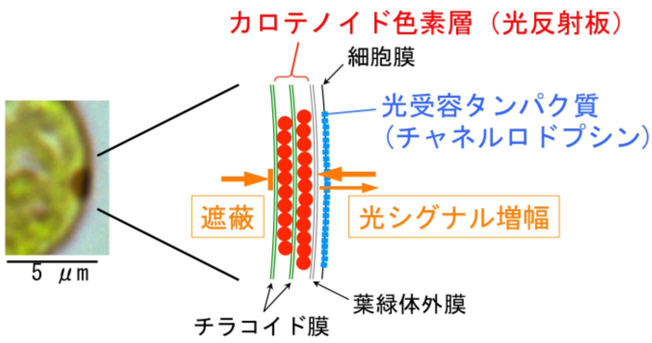

図２　眼点の模式図。カロテノイド色素顆粒が層を成し，光反射板の役割を担う。その直上の細胞膜にチャネルロドプシンが局在する。

K. Wakabayashi *et al.*-2

チャネルロドプシンは光受容に応じて陽イオンを透過する光駆動型陽イオンチャネルである(Nagel et al., 2002; Nagel et al., 2003; Sineshchekov et al., 2002; Suzuki et al., 2003)。眼点には主としてチャネルロドプシン１とチャネルロドプシン２の２種が存在しており，ノックダウン実験の結果から，後述する光反応行動の際には主としてチャネルロドプシン１が機能していると考えられている(Berthold et al., 2008)。（なお近年隆盛を誇る光遺伝学の分野を支えているのはチャネルロドプシン２の改変タンパク質である(Deisseroth et al., 2006; Zhang et al., 2006)。）

このカロテノイド層とチャネルロドプシンの相対的位置から，眼点の高指向性光受容が説明できる。細胞の外から入射した光は，カロテノイド層での反射によりチャネルロドプシンを２度通り，光シグナルが増幅する。一方で，細胞の内側から入射した光はカロテノイド層によって反射されるため，約８分の１程度しかチャネルロドプシンに到達できない (吉村, 2009)。また，チャネルロドプシンの吸収極大波長は約 500 nm 前後の青緑色である(Hegemann and Berthold, 2009)。カロテノイド層の厚さから計算される反射波長域も 340 nm〜560 nm とその範囲をカバーしている(Schaller and Uhl, 1997)（吉村, 2009）。眼点のカロテノイド層とチャネルロドプシンは，クラミドモナスの光受容のために洗練された組み合わせであると言える。

２−３． 光反応行動

眼点における光受容を利用して，クラミドモナスは主として２つの光反応行動を示す（図３）。１つは走光性である。クラミドモナスは通常２本の鞭毛を平泳ぎのようにして動かす。それぞれの鞭毛の打つ面は完全には平面的でなくやや３次元的であり，かつ２つの鞭毛の打つ面も一致しておらず互いに少しずれている。そのため細胞は，遊泳方向後方から見て反時計回りに自転しながら泳ぐ(Isogai et al., 2000)。このことと高指向性光受容の組み合わせによって，一定強度の光環境下にいたとしても，細胞は遊泳時に「明るい〜暗い」という光強度の変動を感じる。このことで，まるでレーダーのように光源方向を正確に察知することができるのである。さらに，光受容後に起

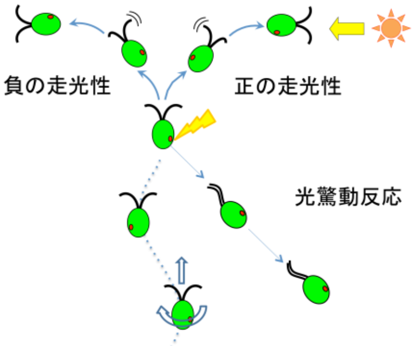

図３　光行動の模式図。連続的な光照射を感じると２本の鞭毛の打つバランスを変えて正または負の走光性を示す。急激な光強度変化を感じると鞭毛の運動波形を変化させて光驚動反応を示す。

こる細胞へのカルシウムイオンの流入をシグナルとして，２本の鞭毛の打つ強さのバランスが少し変化する(Kamiya and Witman, 1984)。２本の鞭毛は眼点に近い側のシス鞭毛と遠い側のトランス鞭毛に区別され，これらの間にはカルシウムイオンの感受性に違いがある。概ね 10^{-7} M を境にして，これより低いとシス鞭毛が，高いとトランス鞭毛がそれぞれ他方よりも強く打つ。これによって細胞は遊泳方向を変化させ，光源方向に向かう正の走光性か，逆に光源から逃げる負の走光性のどちらかを示す。

２つ目は光驚動反応である。これは急激な大きい光強度差を眼点が感じたとき（たとえば日陰から日向に出たとき）に，鞭毛波形を一時的に変えて，後退遊泳するという行動である。これはカルシウムイオン濃度が 10^{-4} M 程度まで上昇すると起きる反応である(Bessen et al., 1980; Hyams and Borisy, 1978)。このようにクラミドモナスは，感受した光に応じて鞭毛運動を巧みに調節することで，光合成に最適な「強すぎず，弱すぎない」光条件下で棲息できる。

２−４．　走光性符号の切り替え調節

クラミドモナスの走光性の正負の符号切り替え研究の歴史は古く，これまでに光強度，概日リズム，外液のイオン強度，cAMP などが符号に影響を与えると示されてきた(Boonyareth et al., 2009; Feinleib and Curry, 1971; Kondo et al., 1991; Morel-Laurens, 1987)。しかし，決定的な因子は見つかっていなかった。興味深いことに，Takahashi と Watanabe は光合成阻害剤処理によって走光性が正に偏ることを明らかにした(Takahashi and Watanabe, 1993)。走光性は光合成のための光条件最適化行動だと考えられていたが，この実験により初めて走光性と光合成という２つの現象がつながった。しかし，光合成によって変化するどのような因子が符号を切り替えているのかは謎のままであった。

我々はこれとは別の方向から走光性符号調節シグナルの解明に至った。鞭毛を動かすモータータンパク質の１つ外腕ダイニンには，酸化還元タンパク質であるチオレドキシン様の軽鎖が存在する(Patel-King et al., 1996)。また，鞭毛プロテオームデータベースによれば，鞭毛内にはリンゴ酸脱水素酵素や細胞質型チオレドキシンなど，複数の酸化還元関連酵素が局在する(Pazour et al., 2005)。さらに，鞭毛の運動様式は細胞内酸化還元状態に応じて変化する(Wakabayashi and King, 2006)。これらのことに着想を得て，我々は走光性の符号を切り替える因子は「細胞内酸化還元状態」であることを見出した(Wakabayashi et al., 2011)。クラミドモナスは，細胞内が酸化的になると正，逆に還元的になると負の走光性を示すのである（図４）。還元力を取り出す反応である光合成は，細胞内の酸化還元状態を大きく変える。つまりクラミドモナスは，細胞内酸

化還元状態を指標にして自らの光合成活性をモニターし，より光を浴びるべきなのか，光を避けるべきなのかを「判断」するという，高度な生存戦略をもっていると考えられる。最近ではこの発見を利用し，光合成効率の高い突然変異株のスクリーニングも行われている(Kim et al., 2016)。

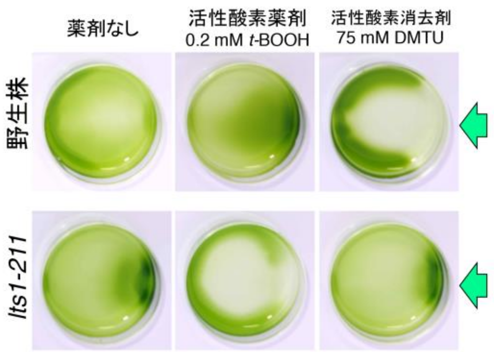

図４　クラミドモナスの走光性の検定。培養液をペトリディッシュに入れ，右側から光を当てた。野生株は活性酸素薬剤処理で正，活性酸素消去剤処理で負の走光性を示す。*lts1-211* 変異株は野生株と逆符号の走光性を示す。 ((Ueki et al., 2016)より引用して改変。)

３．　走光性における眼点カロテノイドの重要性

３−１．　走光性符号逆転変異株 *lts1-211* の単離

クラミドモナスの走光性符号は細胞内酸化還元状態が切り替えていると分かった。しかし，その分子メカニズムは分からない。このような未知の現象を解明するアプローチには順遺伝学がよくフィットする。我々はクラミドモナス野生株にランダムに変異を導入し，得られた変異株ライブラリに対して酸化・還元処理を行い，走光性の符号を確かめた。その結果，野生株と逆方向に泳ぐ変異株 *lts1-211* を単離した(Ueki et al., 2016)。この株は，細胞内が酸化的になると負，還元的になると正というように，野生株と反対符号の走光性を示す。

クラミドモナスを用いる利点の１つは，変異遺伝子の同定に古典遺伝学が適用できることである。*lts1-211* 株と，配列多型を持つクラミドモナス S1D2 株を掛け合わせ，得られた子孫株に対して PCR 多型を用いた AFLP 解析を行った。これにより，変異が 2 番染色体の 131 kbp の範囲に絞られた。しかし，その範囲にはまだ 15 個程度の遺伝子が存在する。

そこで我々はさらに，Illumina HiSeq2000 を用いて *lts1-211* 株とその親株である野生株の全ゲノムシーケンスを行い，比較解析を行った。両者の間には 3,000 以上の SNPs が存在した。しかし，上記の範囲には 1 箇所しか変異が存在しなかった。それがフィトエン合成酵素の活性ドメインの１アミノ酸置換であった。古典遺伝学と次世代型シーケンスはそれぞれ強力ではあるが，それだけではすぐには遺伝子同定に至らない。これらを組み合わせることで，迅速な変異遺伝子同定につながった。

３−２． *lts1-211* 変異株の眼点

フィトエン合成酵素は，カロテノイド生合成経路における重要な酵素であり，これまで複数の機能欠損株が得られている（図５）。それらの株は”white mutants”と呼ばれることからもわかるように色素をほぼ失っており，明条件では培養することができない(McCarthy et al., 2004)。一方で，我々が単離した *lts1-211* は明条件でも培養でき，培養液の見た目ではほとんど野生株と区別がつかない。βカロテンやルテインといったカロテノイド色素の量は激減しているが，光の下での生存には支障がない（図５）。

しかし，顕微鏡で観察すると，*lts1-211* は眼点の色素を失っていることがわかった（図５）。野生株では細胞の赤道面付近に確認できる眼点の赤い点が見られない。*lts1-211* は逆符号ではあるものの走光性を示し，光驚動反応も正常に示すため，チャネルロドプシンには異常がなく，あくまでカロテノイド色素顆粒層から色素だけが抜けていると考えられる。

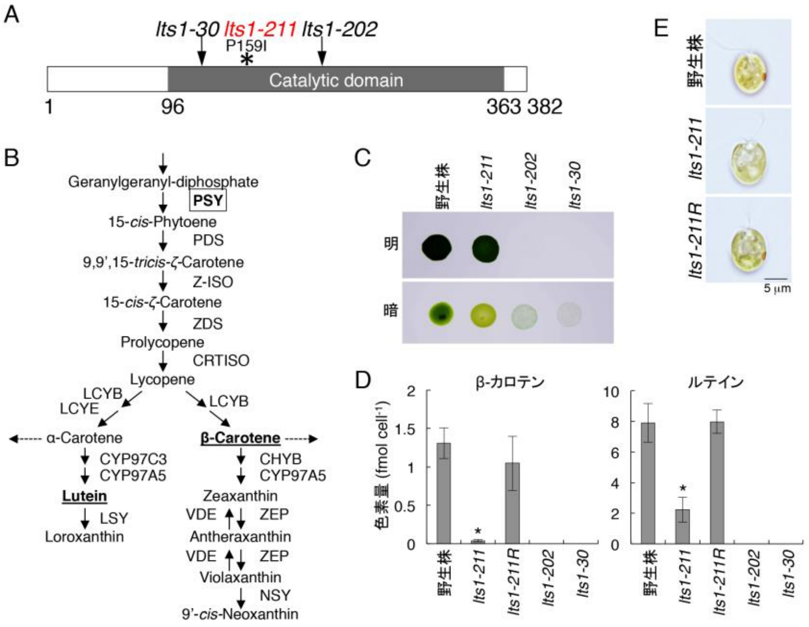

図５ (A)フィトエン合成酵素遺伝子の模式図。*lts1-30* 株と *lts1-202* 株では矢印の位置に終始コドンが，*lts1-211* 株では＊の位置に１アミノ酸置換が生じている。(B)カロテノイド生合成経路の概略。フィトエン合成酵素は PSY と示す。(C)*lts1* 変異株を寒天培地で培養した様子。*lts1-30* 株と *lts1-202* 株は明条件では致死，暗条件で白いコロニーを形成する。(D)細胞あたりのβカロテンとルテインの定量。*lts1-211* 株では減少し、ここに野生型フィトエン合成酵素遺伝子を導入した *lts1-211R* 株では色素量が回復する。(E)*lts1-211* 株は眼点のオレンジ色が見られない。((Ueki et al., 2016)より引用して改変。)

３−３． 細胞レンズ効果

眼点への色素の局在に異常のある変異株はこれまで複数単離されているが，走光性を示さない，あるいは弱い（強い光を照射しないと示さない）と報告されている

(Morel-Laurens and Feinleib, 1983; Roberts et al., 2001)。これは，光反射板であるカロテノイド色素層を失っているために，細胞が光照射方向を認識できないためと説明されている。しかし *lts1-211* は，逆符号ではあるものの，弱い光に対しても走光性は示している。そこで，まず既存の眼点色素欠損変異株 *eye1~eye3* の３株の走光性を酸化還元薬剤を用いて再検討した。その結果，どの株も *lts1-211* と同様に野生株と逆符号の走光性を示した。つまり，*lts1-211* の表現型はフィトエン合成酵素の異常が理由ではなく，その結果として眼点に色素が蓄積しないことが直接の理由であると分かった。

では，なぜ眼点に色素がないと逆符号の走光性になるのか。我々は模索の末，「細胞レンズ効果」に行き着いた（図６）。細胞レンズ効果とは，楕円体状の細胞が凸レンズとして機能し，集光することである。細胞の側方，眼点の反対側から光が入射した場合を考えてみる。カロテノイド色素層があれば，仮に細胞がレンズとして機能したとしても，集まった光はチャネルロドプシンの手前で遮蔽されるため，細胞は「暗い」と感じる。しかし，このとき *lts1-211* のように色素がないと，チャネルロドプシンは直接浴びるよりも強い光を受容することになる（図６）。光受容後の反応経路の下流が野生株と同じであれば，野生株が正の走光性を示す際に色素欠損株は負の走光性を示すだろう。

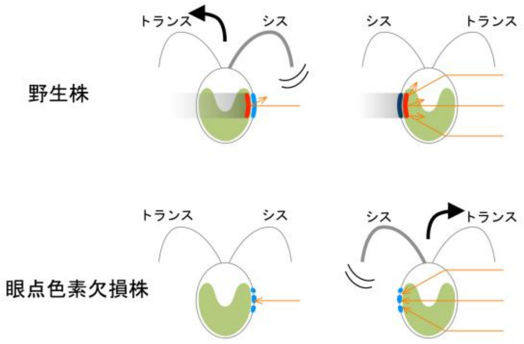

図６　細胞レンズ効果の説明。細胞が凸レンズのように振る舞った場合，眼点色素欠損株はチャネルロドプシン（水色）が光源と反対側を向いているときのほうが光源側を向いているときよりも強い光を感じるため，光源方向を間違って認識する。((Ueki et al., 2016)より引用して改変。)

クラミドモナス細胞が凸レンズとして振る舞うか否かは以前から議論があった。Sineshchekov らは前述の white mutant の細胞が強い光を浴びたとき野生株と逆方向に泳ぐことを見出し，透明な細胞が凸レンズとして振る舞う可能性を指摘している (Sineshchekov et al., 1994)。しかし，野生株の細胞のレンズ効果は，水との屈折率の違いが大きくないこと，葉緑体が存在することなどにより否定的に考えられていた (Foster and Smyth, 1980)。

我々は野生株細胞のレンズ効果の有無を結像実験によって確かめた。細胞が凸レンズなら虫めがねのように結像するはずである。まず正立顕微鏡の視野絞り部分に，OHP シートに印刷した「P」の字を置いた（図７）。P の字は photo の頭文字であると同時に，上下左右に非対称な文字として光学の分野でレンズ効果を確かめるのに使わ

れている(Serra et al., 2015)。結ばれるはずの像が小さくなるのを防ぐために明視野観察用のコンデンサを外し，まずスライドガラスに野生株細胞を貼り付けて観察した。そして焦点面を上方向に動かすと，果たして各細胞の上に P の字が現れた（図７）。つまり，葉緑体をもつ野生株細胞も凸レンズとして機能したことがはっきりと分かった。

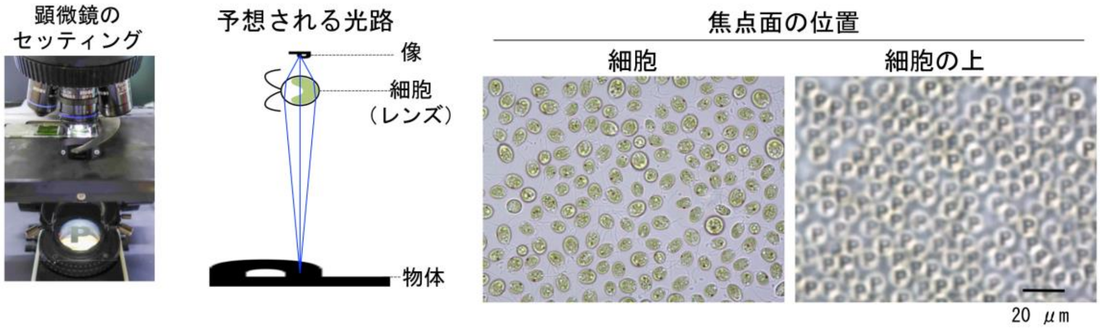

図７　（左）レンズ効果検証のための顕微鏡のセッティングと，予想される光路。（右）焦点面を細胞から上にずらすと，細胞の上に P の字が現れた。((Ueki et al., 2016)より引用して改変。)

冒頭で述べたように，カロテノイド色素層は，眼点が高指向性光受容を実現するための重要な部品であることは以前から分かっていた。しかし，この研究を通じて，それが無くなったときの効果がはっきりと確かめられた。色素層を失ったクラミドモナスは，走光性を示せなくなるどころか，光源方向を逆だと誤認してしまうのである。クラミドモナスの進化の過程で，単純に光受容タンパク質があるだけの光受容装置では細胞レンズ効果により光源方向を誤認してしまうことから，それを裏打ちする色素層が形成されたと考えられる。

ただ，もしそうであれば，色素層を省いて「本当の光源は常に逆方向にある」という認識の仕方で光受容装置を発展させる進化の道筋もあり得たかもしれない。しかし，我々の実験では酸化還元薬剤によって走光性符号を強調する方法を採ったが，薬剤なしの眼点色素欠損細胞は，顕微鏡下で走光性を観察すると正と負を頻繁に入れ替え，どちらに行くか「迷って」いるように見える。色素層ありの状態で自転遊泳を行い，「明るい～暗い」の変動の中で光源を探すのでなく，色素層なしの状態で「明るい～もっと明るい」の変動の中で光源を探すのは非効率的なようである。色素層を備えた光受容装置はやはり正しい光源認識のために不可欠なのだろう。

４．　おわりに

我々は鞭毛制御機構の解明への手段としてクラミドモナス走光性符号異常株の単離

を開始した。しかし，得られた*lts1-211*株の解析は結果的に「細胞レンズ効果による集光をも跳ね返すための光反射板」という眼点カロテノイド色素の意義の再発見を導いた。このような意外な方向への研究の進展は，基礎研究，とりわけ順遺伝学的な研究手法の醍醐味と言えるかもしれない。近年，ゲノム編集による逆遺伝学的手法が生命科学の趨勢を占めているように見える。しかし，今回の発見は，順遺伝学的手法によるフィトエン合成酵素の活性低下株の単離なくして成し得なかった。「細胞運動屋」である我々のこの研究が，カロテノイド研究に少しでも寄与できたとしたら幸いである。

謝辞

本研究は科学研究費補助金 25113507, 25117506, 25291058, 26650093, 16K14752，基礎生物学研究所統合ゲノミクス共同利用研究(14-733)，および住友財団基礎科学研究助成(170862)の援助を受けて行った。また，本研究は廣野雅文教授（法政大学），久堀徹教授，田中寛教授，小林勇気博士（以上東京工業大学），皆川純教授，重信秀治博士，得津隆太郎博士，山口勝司博士（以上基礎生物学研究所），大西紀和博士（岡山大学），持地翔太氏（元東京大学），神谷律教授（東京大学，学習院大学）の協力を得て行った。

引用文献

Berthold, P., Tsunoda, S.P., Ernst, O.P. , Mages, W., Gradmann, D. & Hegemann, P. 2008. Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in chlamydomonas by immediate light-induced depolarization. *Plant Cell*. 20: 1665-1677.

Bessen, M., Fay, R.B., Witman, G.B. 1980. Calcium control of waveform in isolated flagellar axonemes of *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol*. 86: 446-455.

Boonyareth, M., Saranak, J., Pinthong, D., Sanvarinda, Y. & Foster, K.W. 2009. Roles of cyclic AMP in regulation of phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biologia.* 64: 1058-1065.

Boyd, J.S., Mittelmeier, T.M., Lamb, M.R. & C.L. Dieckmann. 2011. Thioredoxin-family protein EYE2 and Ser/Thr kinase EYE3 play interdependent roles in eyespot assembly. *Mol. Biol. Cell*. 22: 1421-1429.

Deisseroth, K., Feng, G., Majewska, A.K., Miesenbock, G., Ting, A. & Schnitzer, M.J. 2006. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J. Neurosci.* 26: 10380-10386.

Dieckmann, C.L. 2003. Eyespot placement and assembly in the green alga Chlamydomonas.

Bioessays. 25:410-416.

Eichenberger, W., Boschetti, A. & Michel, H.P. 1986. Lipid and Pigment Composition of a Chlorophyll Beta-Deficient Mutant of Chlamydomonas-Reinhardii. *Physiol Plantarum*. 66:589-594.

Feinleib, M.E.H. & Curry, G.M. 1971. The relationship between stimulus intensity and oriented phototactic response (topotaxis) in *Chlamydomonas*. *Physiol. Plantarum.* 25: 346-352.

Foster, K.W. & Smyth, R.D. 1980. Light Antennas in phototactic algae. *Microbiol. Rev*. 44: 572-630.

Hegemann, P. & Berthold, P. 2009. Sensory photoreceptors and light control of flagellar activity. *In* The Chlamydomonas Sourcebook Second Edition. Vol. 3. Academic Press. 395-430.

Hyams, J.S. & Borisy, G.G. 1978. Isolated flagellar apparatus of Chlamydomonas: characterization of forward swimming and alteration of waveform and reversal of motion by calcium ions in vitro. *J. Cell Sci*. 33: 235-253.

Isogai, N., Kamiya, R. & Yoshimura, K. 2000. Dominance between the two flagella during phototactic turning in *Chlamydomonas*. *Zool. Sci.* 17: 1261-1266.

Kamiya, R., &Witman, G.B. 1984. Submicromolar levels of calcium control the balance of beating between the two flagella in demembranated models of Chlamydomonas. *J. Cell Biol.* 98: 97-107.

Kim, J.Y.H., Kwak, H.S., Sung, Y.J., Choi, H.I., Hong, M.E., Lim, H.S., Lee, J.-H., Lee, S.Y. & Sim., S.J. 2016. Microfluidic high-throughput selection of microalgal strains with superior photosynthetic productivity using competitive phototaxis. *Sci. Rep*. 6: 21155.

Kondo, T., Johnson, C.H. & Hastings, J.W. 1991. Action spectrum for resetting the circadian phototaxis rhythm in the CW15 strain of Chlamydomonas 1. Cells in darkness. *Plant Physiol.* 95: 197-205.

McCarthy, S.S., Kobayashi, M.C. & Niyogi, K.K. 2004. White mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* are defective in phytoene synthase. *Genetics*. 168: 1249-1257.

Morel-Laurens, N. 1987. Calcium control of phototactic orientation in *Chlamydomonas reinhardtii*: sign and strength of response. *Photochem. Photobiol*. 45: 119-128.

Morel-Laurens, N.M.L. & Feinleib, M.E.H. 1983. Photomovement in an "eyeless" mutant of *Chlamydomonas*. *Photochem. Photobiol*. 37: 189-194.

Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A.M., Bamberg, E. & Hegemann, P. 2002. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science*. 296:2395-2398.

Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P. & Bamberg, E. 2003. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100: 13940-13945.

Niyogi, K.K., Bjorkman, O. & Grossman, A.R. 1997. The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc. Nat.l Acad. Sci. USA*. 94: 14162-14167.

Patel-King, R.S., Benashki, S.E., Harrison, A. & King, S.M. 1996. Two functional thioredoxins containing redox-sensitive vicinal dithiols from the *Chlamydomonas* outer dynein arm. *J. Biol. Chem*. 271: 6283-6291.

Pazour, G., Agrin, N., Leszyk, J. & Witman, G.B. 2005. Proteomic analysis of a eukaryotic flagellum. *J. Cell Biol*. 170: 103-13.

Roberts, D.G., Lamb, M.R. & Dieckmann, C.L. 2001. Characterization of the EYE2 gene required for eyespot assembly in *Chlamydomonas reinhardtii. Genetics*. 158: 1037-1049.

Schaller, K. & Uhl. R. 1997. A microspectrophotometric study of the shielding properties of eyespot and cell body in *Chlamydomonas*. *Biophys. J*. 73: 1573-1578.

Serra, F., Gharbi, M.A., Luo, Y., Liu, I.B., Bade, N.D., Kamien, R.D., Yang, S. & Stebe, K.J. 2015. Curvature ‐ Driven, One ‐ Step Assembly of Reconfigurable Smectic Liquid Crystal “Compound Eye” Lenses. *Adv. Opt. Materials*. 3: 1287-1292.

Sineshchekov, O.A., Govorunova, E.G., Der, A., Keszthelyi, L. & Nultsch, W. 1994. Photoinduced electric currents in carotenoid-deficient *Chlamydomonas* mutants reconstituted with retinal and its analogs. *Biophys. J*. 66: 2073-2084.

Sineshchekov, O.A., Jung, K.-H., & Spudich, J.L. 2002. Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 8689-8694.

Suzuki, T., Yamasaki, K., Fujita, S., Oda, K., Iseki, M., Yoshida, K., Watanabe, M., Daiyasu, H., Toh, H., Asamizu, E., Tabata, S., Miura, K., Fukuzawa, H., Nakamura, S., & Takahashi, T. 2003. Archaeal-type rhodopsins in *Chlamydomonas*: model structure and intracellular localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 301: 711-717.

Takahashi, T. & Watanabe, M. 1993. Photosynthesis modulates the sign of phototaxis of wild-type *Chlamydomonas reinhardtii*. Effects of red background illumination and 3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea. *FEBS Lett*. 336: 516-520.

Ueki, N., Ide, T., Mochiji, S., Kobayashi, Y., Tokutsu, R., Ohnishi, N., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Tanaka, K., Minagawa, J., Hisabori, T., Hirono, M. & Wakabayashi, K. 2016. Eyespot-dependent determination of the phototactic sign in Chlamydomonas reinhardtii. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA. 113: 5299-5304.

吉村建二郎 2009. 細胞行動−感じてたじろぐ単細胞生物. 尾崎浩一, 吉村建二郎（編）. 動物の「動く」の秘密に迫る−運動系の比較生物学. pp. 109-129 共立出版. 東京.

Wakabayashi, K. & King, S.M. 2006. Modulation of Chlamydomonas reinhardtii flagellar motility by redox poise. *J. Cell Biol*. 173: 743-754.

Wakabayashi, K., Misawa, Y., Mochiji, S. & Kamiya, R. 2011. Reduction-oxidation poise regulates the sign of phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108: 11280-11284.

Zhang, F., Wang, L.P., Boyden, E.S. & Deisseroth, K. 2006. Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nature methods*. 3: 785-792.

シアノバクテリアにおけるカロテノイド合成とその改変

島田 尚弥，前田 海成，池内 昌彦
東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻
〒153-8902 東京都目黒区駒場

Naoya Shimada, Kaisei Maeda, Masahiko Ikeuchi

Biosynthesis and engineering of carotenoids in cyanobacteria

Keywords: carotenoids, mutants,
Department of Life Sciences (Biology), Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo
Komaba, Meguro, Tokyo, 153-8902, Japan
DOI: 10.24480/bsj-review.9b7.00139

カロテノイドは炭素５（C5）を単位とするイソプレンの重合体であるイソプレノイドのうちおもに炭素 40（C40）の一群の化合物であり，共役二重結合によって色素などとしてのはたらきをもち，植物やシアノバクテリア，光合成細菌だけでなく，光合成機能をもたない動物，菌類，微生物にも広く分布する。その主な役割は，光合成のアンテナもしくは過剰な光エネルギーのクエンチ，活性酸素種ストレスの防御などが知られている。なかでも，シアノバクテリアは遺伝子改変が容易で，光合成生物のモデルとしてよく利用されている。そのためカロテノイドの機能や合成経路，その調節について解析するのに最適である。本稿では，モデル生物 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の遺伝子を合成経路に示し，その調節や改変について概説する。

１．シアノバクテリアのカロテノイド種

多くのシアノバクテリアにおいて，β-カロテン，ゼアキサンチン，ミクソキサントフィル，エキネノンなどの炭素 40（C40）のカロテノイドが広く分布している。また紅色光合成細菌に特徴的な非環状のカロテノイドはシアノバクテリアにはほとんど含まれない。代わりに，βイオノン環を１つもつミクソールと２つもつβ-カロテンおよびそれらの誘導体が普通である。また，藻類に多いエポキシドをもつものもあまり知られていない。図１に示すように，シアノバクテリアは植物の葉緑体と同じく MEP（メチルエリスリトール-4-リン酸）経路で C5 単位を合成し，これを順次重合して C20 をつくり，さらに C20 同士を重合し C40 のカロテノイド前駆体であるフィトエンをつくる。このようなカロテノイド合成系のほとんどはすでに同定されており，さまざまな改変も試みられている。また，多様なカロテノイドの役割として，デオキシ糖を付加したミクソキサントフィルの存在，シアノバクテリア特有の光合成のクエンチに関わるオレンジカロテノイドタンパク質（OCP），光合成の光化学系 I 反応中心の多様なカロテノイドの結合などもシアノバクテリアの特徴である。

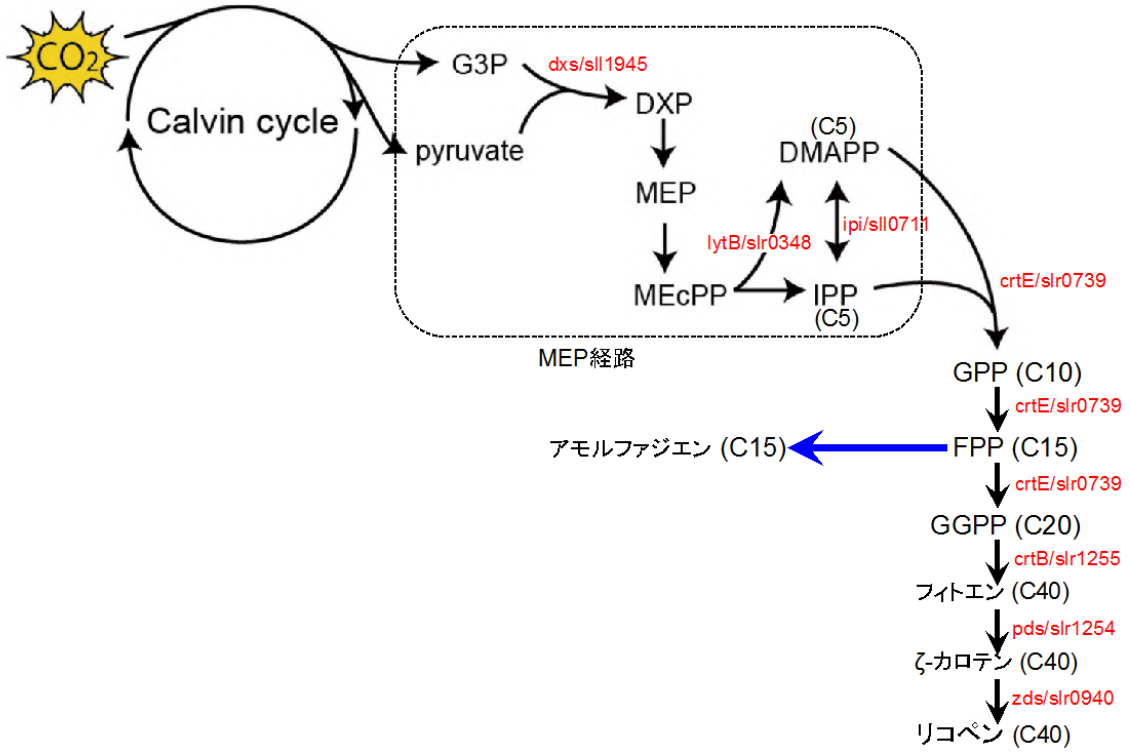

図１．シアノバクテリアのカロテノイド前駆体供給経路の概略

G3P,グリセルアルデヒド-3-リン酸; pyruvate, ピルビン酸; DXP, 1-デオキシキシルロース; MEP, メチルエリスリトール-4-リン酸; MEcPP, メチルエリスリトールサイクロ二リン酸; DMAPP, ジメチルアリル二リン酸; IPP, イソペンテニル二リン酸; GPP, ゲラニル二リン酸; FPP, ファルネシル二リン酸; GGPP, ゲラニルゲラニル二リン酸

２．MEP 経路とリコペン合成

真核生物や古細菌はメバロン酸経路でイソプレノイドの前駆体（C5）を合成するが，葉緑体やシアノバクテリアを含む多くの細菌は MEP 経路で合成する。この MEP 経路ではメバロン酸を中間体として経由しないため，非メバロン酸経路ともいわれる。その概略は図１に示す通りで，グリセルアルデヒド-３-リン酸（G3P）とピルビン酸を前駆体として MEP などを経由する。この経路に関与する酵素とその遺伝子はほぼ同定されているが，その調節系は明らかではない。我々は，*Synechocystis* sp. PCC6803 を用いて，MEP 経路の律速段階を推定した。まず，植物のリモネン（C10）合成酵素を導入した株を作出し，大腸菌で MEP 経路の強化に有効な酵素遺伝子の発現強化によって，リモネン生産の大きな促進を確認した（Kiyota et al. 2014）。しかし，このとき内在のイソプレノイド合成の数%程度のリモネン生産であったため，内在のカロテノイド蓄積にはほとんど影響がなかった。次に，別の植物のアモルファジエン（C15）合成酵素の導入株を作出した。この株ではリモネンの約 30 倍にあたるアモルファジエン生産となり，内在のイソプレノイド合成の炭素フローの 90%を越える値であった。このような高生産株は酵素自身の高発現とともにその基質を供給するファルネシル二リン酸（FPP）合成酵素の発現強化によって実現できた。このとき，内在

のカロテノイド蓄積は大きく減少し，光合成による増殖速度も低下した（清田ら 2016)。これはアモルファジエン合成酵素による FPP を消費が，内在のカロテノイド合成と競合したためと考えられる。なお，リモネンはレモンの香成分，アモルファジエンは抗マラリア薬アルテミシニンの合成前駆体として知られている。このようなカロテノイド生産の抑制の解消を手がかりとして，MEP 経路の強化も試みた。シアノバクテリアでは MEP 経路の酵素として推定されている 7 種の酵素遺伝子の発現強化株を作出したところ，dxs（1-デオキシ-D-キシルロース-5-リン酸シンターゼ）と ipi（イソペンテニル・ジメチルアリルピロリン酸イソメラーゼ）, lytB（4-ヒドロキシ-3-メチル-2-ブテニルピロリン酸レダクターゼ）の発現が蓄積減少を回復させた。以上のことは律速段階の存在を示唆している（池内ら 2016)。これらの結果は大腸菌での報告とも似ており，律速段階が生物間で似ていることを示唆している。なお，C5 単位から C20 の GGPP（ゲラニルゲラニル二リン酸）を合成する GGPP 合成酵素（crtE）は、経路途中の FPP の蓄積にも貢献するようである。

GGPP 以降は，C20 の GGPP を重合して C40 のフィトエンを合成し，これを段階的に脱水素してリコペンまで合成する。これらの反応にかかわるフィトエン合成酵素（crtB）とフィトエン不飽和化酵素（pds)，ζ-カロテン不飽和化酵素（zds）は順次共役二重結合を導入してリコペンとする。これらの酵素を光合成細菌の酵素に置換すると，β-カロテンを合成することができなくなり，光化学系のアセンブリに影響が出る。また，これらを破壊すると，カロテノイド蓄積がなくなり，光合成能も消失する（Bautista et al. 2005)。一方，これらの遺伝子の強制発現株は安定に維持できないので，毒性があるかもしれない。また，強光で crtB や pds が誘導を受けるといわれ，カロテノイド蓄積の引き金になっている可能性が高い（Fernandez-Gonzalez et al. 1998)。一方，crtB, pds だけでなく zds, crtR が誘導されるという報告もある（Schäfer et al. 2006)。このようにシアノバクテリアでは光合成機能が必須であるため、カロテノイド合成のドラスティックな改変はこれまで成功していない。

３．β-カロテンとその関連カロテノイドの合成

シアノバクテリアのβ-カロテンおよびその誘導体であるキサントフィル類は，チラコイド膜の主要なカロテノイドである。β-カロテンは植物でもシアノバクテリアでも光化学系Ｉ，系IIの反応中心に結合し，反応中心のアセンブリや安定化に必要と考えられている。しかし，最近の *Synechocystis* sp. PCC 6803 の光化学系Ｉ三量体の結晶構造では，β-カロテンだけでなく，少量のエキネノン，ゼアキサンチン，カンタキサンチン，ヒドロキシエキネノンが特定の部位に含まれている。これらのβ-カロテン系列のカロテノイド種の役割について，再注目されている（Malavath et al. 2018)。一方，大部分のキサントフィルは脂質とともにチラコイド膜に存在する。一方，植物では，キサントフィルの多くは集光性アンテナ複合体に結合しており，集光性アンテナ複合体が一般的ではないシアノバクテリアとは異なっている。つまり，多くのシアノバクテリアの主要なキサントフィルであるゼアキサンチンやその関連カロテノイドは膜内にあって，光傷害ストレスの回避などの役割を果たしている。多くのシアノバクテリアに存在する OCP は 3’-ヒドロキシエキネノンを結合し，フィコビリソームが吸収した光エネルギーの非光化学消光に重要な役割を果たしている。この OCP に含まれる 3’-ヒドロキシエキネノンは青紫色光を吸収して長波長シフト

した活性型となり，暗所で元の不活性型に戻る。このようなカロテノイド分子の構造変化が非光化学消光の活性を調節している。

β-カロテンは両端がリコペンシクラーゼ（cruA）によって環化されたβイオノン環をもつ（β, β-カロテン）（図２）。一方，植物には cruA とは別のシクラーゼによって，一端がεイオノン環となったα-カロテン（β, ε-カロテン）が合成され，これを経由してルテインがつくられる。また，光合成細菌にはβ-カロテンやその誘導体はなく，光化学系反応中心にも非環状のカロテノイドが結合しており，シクラーゼもない。多くのシアノバクテリアにみられるゼアキサンチンはヒドロキシラーゼ（crtR）によって両端の 3, 3’位が OH 化されたもので，ミクソキサントフィルとともにストレスによって蓄積が亢進することが多く，強光ストレスで crtR の発現が誘導されることによるらしい。しかし，光化学系に必須のβ-カロテンを消費し尽くすことはないので，何らかの調節があるらしい。また，crtR 破壊株では，ゼアキサンチンの消失とともにβ-カロテンが代償的に増加する（Zhu et al. 2010）。一方，ケトラーゼ（crtO）はβ環の 4 位にケト基を導入し，エキネノン，カンタキサンチンを合成する。また，crtR と crtO のはたらきで少量の 3’-ヒドロキシエキネノンを合成し，OCP に取りこまれる。この OCP も光ストレスの軽減に重要な役割をもっている。なお，OCP のバリアントにはカンタキサンチンが結合し，一重項酸素の解消などの光保護の役割をもつものや未知の役割をもつものがあり，それらもシアノバクテリアに広く分布している（Lopez-Igual et al. 2016）。なお，強光ストレスでゼアキサンチン蓄積が亢進しても，β-カロテンが消失することも，後述のアスタキサンチンが合成されることもないのは，光合成に必要な一定量のβ-カロテン蓄積を担保するしくみがあるためと考えられる。

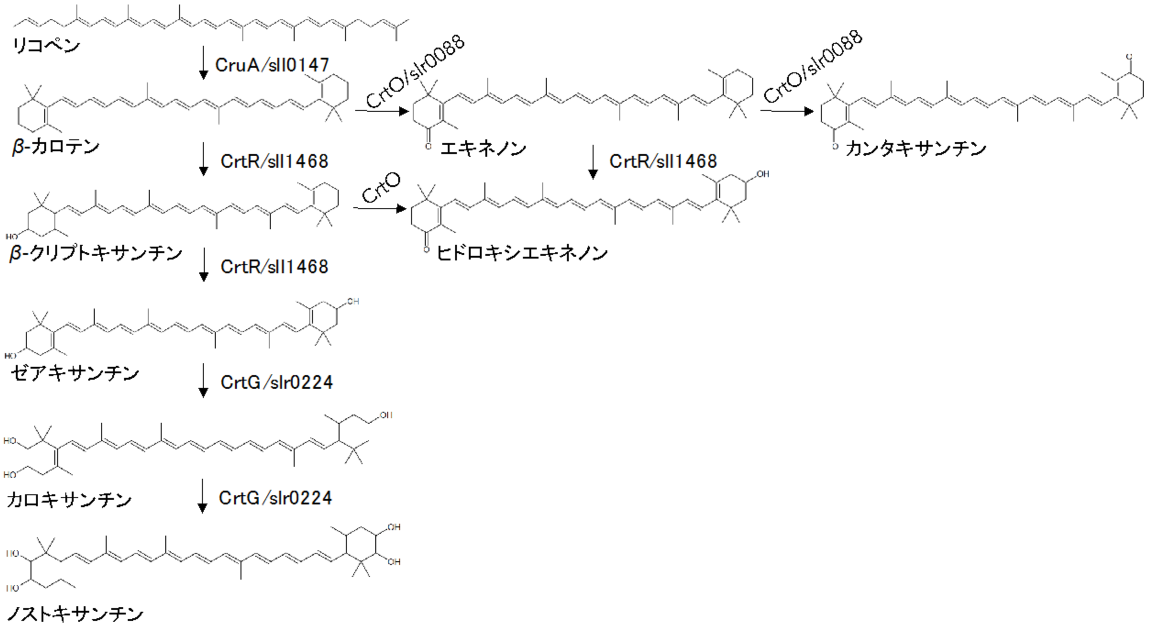

図２．β-カロテンなどの合成経路

４．ミクソキサントフィルの合成（糖付加）

ミクソキサントフィルは一端がβ環となったミクソールの他端にデオキシ糖が付加したもので，シアノバクテリアにおける主要なカロテノイドのひとつであり，ストレスで蓄積が亢進することが多い。

N. Shimada-4

その多くは，フコースやラムノースなどのデオキシ糖が C-2'位の OH に付加されている点で，当初はシアノバクテリア固有とされていた。なお，*Synechocystis* ではジメチルフコースが付加している。これらはシアノバクテリアの細胞外膜にとくに多い。ミクソキサントフィルの合成にかかわるいくつかの酵素遺伝子は同定されている（図３，Graham and Bryant 2009）。その破壊株ではミクソキサントフィルが合成されなくなること，光ストレスへの感受性が増加することが知られている。しかし，ストレスでどのように合成が誘導されるかはわかっていない。また，ミクソールの合成においてβ環の形成と他端の OH 化のどちらが先に進行するかが，β-カロテン系列とミクソキサントフィル系列の蓄積量比に影響を及ぼすはずであるが，わかっていない。また，ミクソキサントフィルへの糖付加は細胞外膜への局在に重要な役割を持つと考えられているが，その機構についてもほとんど知見がない。

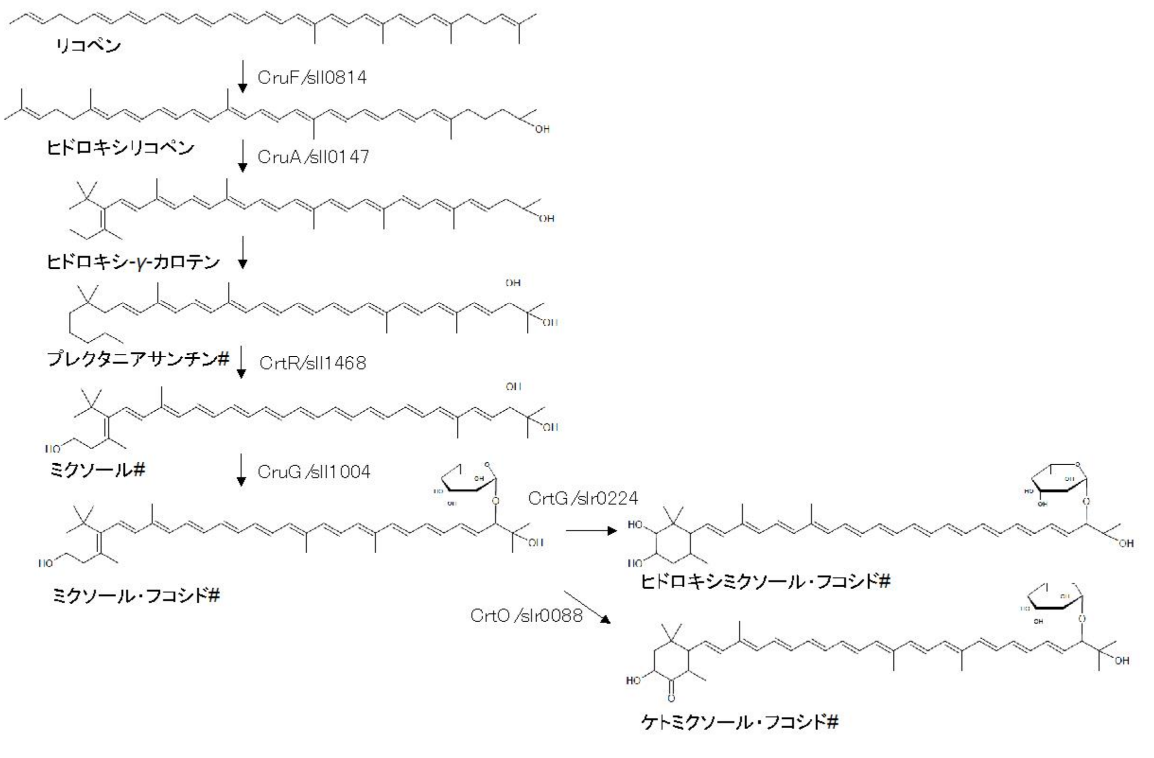

図３．ミクソキサントフィル合成経路

５．シネコキサンチンの合成

シネコキサンチンは最近 Bryant らによって発見された芳香族環にカルボン酸をもつカロテノイドで，水溶性が高く細胞外へ放出される特徴がある。また，通常の増殖期には生産されないが，定常期に高生産され，活性酸素ストレスへの防御の役割をもつので，なんらかの合成の誘導のしくみと細胞外への排出のしくみがあると考えられる（Graham and Bryant 2008）。その合成経路の全貌はまだ不明だが，重要な酵素遺伝子β-カロテンデサチュラーゼ/メチルトランスフェラーゼ（CruE）と C18 ヒドロキシラーゼ（CruH）が同定されている（図４）。カロテノイドの細胞外への排出は，合成調節機構の理解や応用としての大量生産において重要なポイントのひとつであるが，その詳細はわかっていない。

６．アスタキサンチンの合成

アスタキサンチンは両方のβ環の 3 位に OH，4 位にケト基をもつもので，抗酸化活性が高いことともに，いくつかの動物においてディスプレイ，保護色，警告色などのための色素として役割を果たしている。その合成はある種の海洋細菌，藻類や一部の植物に限られ，シアノバクテリアでは知られていない。原理的には上述の crtR による OH 付加と crtO によるケト化の作用で合成されるはずであるが，現実には合成されない。これは，これらの酵素の基質特異性が高いことによるらしい。一方，海洋性細菌から単離された同様の活性をもつ crtZ（ヒドロキシラーゼ）と crtW（ケトラーゼ）をシアノバクテリアで発現すると，大量にアスタキサンチンが合成される。このとき，β-カロテンやゼアキサンチンが消失するので，これらの酵素は光化学系に結合したカロテノイドにも作用するのかもしれない（池内，未発表）。

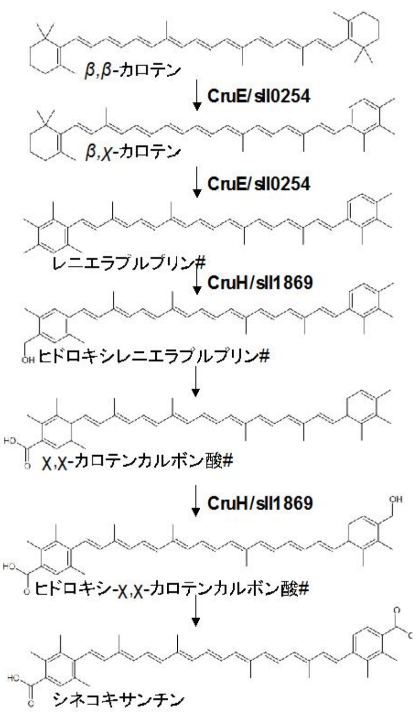

図４．シネコキサンチン合成経路

７．展望

シアノバクテリアは遺伝子改変や導入による代謝経路や光合成活性のエンジニアリングに適した生物であり，これまでにさまざまな物質生産にも応用されている。一方、シアノバクテリアでは光合成による独立栄養が主要な増殖手段であるため，これまでさまざまな制約があった。とくに､カロテノイドは光合成の補助色素として重要であるため,その役割の解析は不十分であった。昨今，多様なゲノム情報の蓄積，遺伝子改変や代謝エンジニアリング，さらにこれに適した株の開発などが急速に進歩している。近い将来，シアノバクテリアを用いてさらなるカロテノイド合成経路の改変によって，多種多様なカロテノイドを生産することが可能になり，各種カロテノイドの役割の解明，生産への応用などに展開していくことが期待される。

謝辞

カロテノイド合成にかかわる複数の酵素遺伝子の提供を梅野太輔先生（千葉大学）から受けました。また，カロテノイド組成の分析は，高市真一先生（東京農業大学）によります。ここに感謝いたします。

引用文献

Bautista JA, Rappaport F, Guergova-Kuras M, Cohen RO, Golbeck JH, Wang JY, Beal D, & Diner BA 2005. Biochemical and biophysical characterization of photosystem I from phytoene desaturase and zeta-carotene desaturase deletion mutants of *Synechocystis* Sp. PCC 6803: evidence for PsaA- and PsaB-side electron transport in cyanobacteria. J. Biol. Chem. 280: 20030-20041.

Fernandez-Gonzalez B, Martinez-Ferez IM, & Vioque A 1998. Characterization of two carotenoid gene promoters in the

cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Biochim. Biophys. Acta 1443: 343-351.

Graham JE & Bryant DA 2008. The Biosynthetic pathway for synechoxanthin, an aromatic carotenoid synthesized by the euryhaline, unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. J. Bacteriol. 190: 7966-7974.

Graham JE & Bryant DA 2009. The biosynthetic pathway for myxol-2' fucoside (myxoxanthophyll) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. J. Bacteriol. 191: 3292-3300.

池内昌彦, 清田浩史, 松村雅子, 奥田裕紀子, 高市真一, 2016.日本植物学会年会

清田浩史，奥田裕紀子，梅野太輔，平井優美，池内昌彦．2016.日本植物生理学会年会

Kiyota H, Okuda Y, Ito M, Hirai MY, & Ikeuchi M 2014. Engineering of cyanobacteria for the photosynthetic production of limonene from CO2. J. Biotechnol. 185: 1-7.

Lopez-Igual R, Wilson A, Leverenz RL, Melnicki MR, Bourcier de Carbon C, Sutter M, Turmo A, Perreau F, Kerfeld CA, & Kirilovsky D 2016. Different functions of the paralogs to the N-terminal domain of the orange carotenoid protein in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. Plant Physiol. 171: 1852-1866.

Malavath T, Caspy I, Netzer-El SY, Klaiman D, & Nelson N 2018. Structure and function of wild-type and subunit-depleted photosystem I in *Synechocystis*. Biochim. Biophys. Acta, 1859: 645-654.

Schäfer L, Sandmann M, Woitsch S, & Sandmann G 2006. Coordinate up-regulation of carotenoid biosynthesis as a response to light stress in *Synechococcus* PCC7942. Plant Cell Environ. 29: 1349-1356.

Zhu Y, Graham JE, Ludwig M, Xiong W, Alvey RM, Shen G, & Bryant DA 2010. Roles of xanthophyll carotenoids in protection against photoinhibition and oxidative stress in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. Arch. Biochem. Biophys. 504: 86-99.