



## 藻類食プロティストが関与するクロロフィルの「解毒」代謝

横山亜紀子<sup>1</sup>・柏山祐一郎<sup>2,3</sup>

クロロフィルは、藻類が太陽の光エネルギーを捉え、かつ、それを電気化学的なポテンシャルに転換する、光合成の初期過程に不可欠な有機分子である。地球の生態系のほとんど全ての構成要素は、究極的にこの光合成によって有機物の化学ポテンシャルの形で蓄えられたエネルギーを利用しているため、クロロフィルは地球生命圏を支える重要な分子だといえる。しかし、クロロフィルには、生物にとっては猛毒(!)の、「一重項酸素」と呼ばれる活性酸素を生み出す「光毒性」と呼ばれる重大な負の側面がある。私たち大型の多細胞生物は、普段の生活でこのクロロフィルの光毒性が問題となることはないが、海洋や湖沼で微細な藻類を食べて生きる微生物たちにとっては重大な問題である。光が透過する体を持つ微生物の場合、餌として取り込んだ藻類を消化する過程で、遊離したクロロフィルやその誘導体が活性酸素を発生させてしまうと、細胞を破壊される危険があるためだ。これを回避するには、クロロフィルを素早く分解して活性酸素の発生を抑ええるか、活性酸素を除去する機構が必要である。昨年我々の研究グループでは、藻類を捕食するプロティストが、光毒性を回避するための、クロロフィル代謝による光毒性回避機構の一端を解明した論文を発表した (Kashiyama, Yokoyama *et al.* 2012)。本稿ではこの論文に至るまでの数奇で紆余曲折な裏話をたどりながら、クロロフィル代謝機構の主人公とそれを取り巻く状況について解説する。

### 環境に見いだされる謎の色素たち

話は柏山の古い研究に遡る。古生物学が出自である柏山は、過去の光合成生物の痕跡から太古の環境や生命進化を研究するべく、藻類が生産するクロロフィル (図 1 a) を起源とする分子化石の研究に携わってきた。地層中から見つかる「化石ポルフィリン」と呼ばれる赤い色素がクロロフィルを起源としていること、そうした分子化石に到る中間的なクロロフィルの分解産物が現在の水圏環境の底泥などから見つかることなどは、以前の藻類学最前線の稿で紹介した (柏山 2010)。しかし、環境中から見いだされるクロロフィルの誘導体には、光合成器官で機能することが報告されたことのない、奇妙な構造を持つ分子種が知られてきた。例えば、クロロフィル類の多くでは、それらの光化学的な機能を担うテトラピロール構造 (クロリン環) に、エステル結合により脂溶性の炭化水素鎖である「フィトール」と呼ばれるアルコールが架橋しているが (図 1 a)、堆積物などを抽出して分析すると、このフィトールの代わりにコレステロールなどの各種ス

テロール類やキサントフィル色素類と結合した摩訶不思議な分子が見いだされる。しかしこれらは通常は主要な成分では無いためか、その起源や生物学的・生化学的な意義を解明する研究ほとんどなかった。

これら奇妙な色素群の中でも、特に異様な構造を持つ化合物が、本稿の主役に抜擢されるに到った「シクロエノール」と呼ばれる化合物群である (図 1 b)。正しくは「<sup>13</sup>C,<sup>17</sup>O-Cyclopheophorbide *a* enol (ジユウサンニ ジュウナナサン シクロフェオフォルバイド エー エノール)」などという長ったらしい名前であるが、如何せん面倒である。この略称には、CPP, CPP516 とか CYCLO などが使われていたが、Kashiyama, Yokoyama *et al.* (2012) では cPPB-*a*E と略した。ここで斜体で「*a*」とあるのは、クロロフィル *a* の誘導体であることを意味し、実は cPPB-*b*E (クロロフィル *b* の誘導体) などの相同体も存在する。しかし何れにせよ、日本語の口述には馴染まない。そこで、言語の意味的な厳密さを多少犠牲にしても、我々は一連の相同体の総称として「シクロエノール」という用語を用いる。何しろシクロエノールは、生物界に普遍的に見いだされ、底泥まで含めた水圏環境全体ではクロロフィル類に匹敵するかそれ以上の量が存在し、かつ、微生物生態学的に重要な化合物である、というのが我々の主張であり、使い勝手の良い名前が必要だと考えたからである。

### シクロエノールを巡る研究史

研究の現場には時として不思議な展開が待ち受けているものである。「シクロエノール」は、実は 40 年近く前に、ドイツの有機合成化学のラボにおいて、純粋な化学的興味 (クロリン環の化学的研究) のもとに初めて「誕生」した (Falk *et al.* 1975)。分子酸素を遮断したフラスコの中で、有機溶媒に溶かされたクロロフィルの人為的な誘導体である pyropheophorbide methyl ester にある特殊な強塩基、それに続いてリン酸バッファーを作用させることで、分子内での縮環反応によりクロリン環にエノール基を持たせた化合物が作り出された。結果としてそれらの化合物は、クロロフィル類に特徴的な *exo*- 五員環に隣接した *exo*- 七員環を有する…まあ、このあたりはテキトウに読み飛ばしていただいても構わないのだが、とにかく図 1 b に示すような色素が人工的に作られた。この物質は、有機溶媒中では不安定な化合物であり実験系での取り扱いが難しく、合成の反応機構の詳細も分からず、彼らのやり方以外の有機合成はうまくいかないのである。

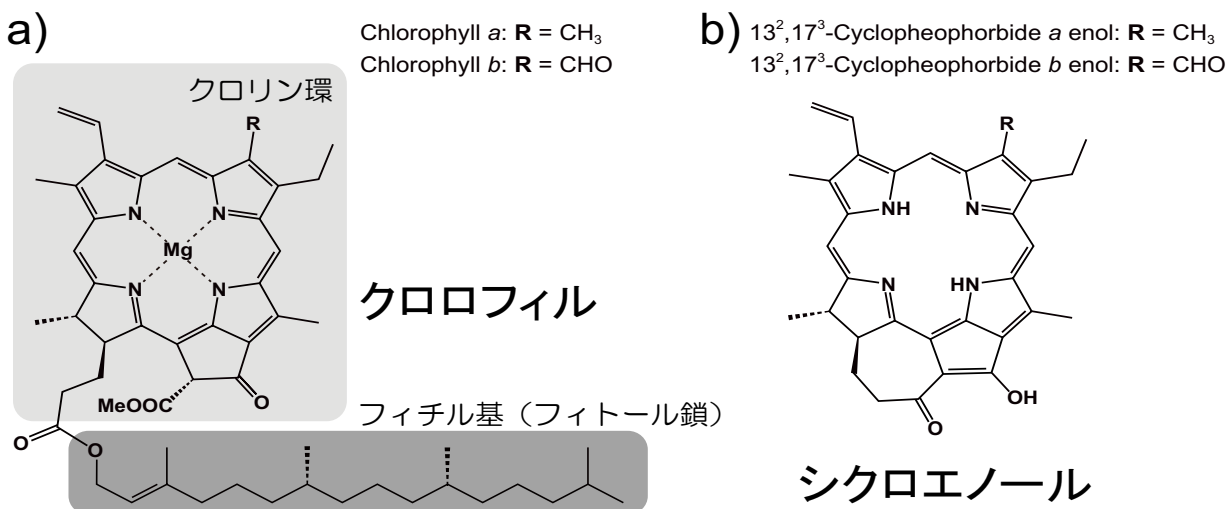


図1. クロロフィルとシクロエノールの化学構造式。

そんなこともあってか、これ以降この化合物の化学的な研究は途絶える。しかし、その十一年後、今度は天然物としてシクロエノールが報告された。海綿（樹状角質海綿目の *Darwinella oxeata*）の組織から抽出されたものだが、この研究はあくまで化合物の化学的な研究に留まっている (Karuso *et al.* 1986)。さらに十年以上が経ち、二十世紀も暮れが差し迫った頃、ちらほらと環境試料（海洋の表層堆積物や海水中の懸濁粒子）から抽出されたという報告が相次いだ (Ocampo *et al.* 1999, Goericke *et al.* 2000, Louda *et al.* 2000, Ostrovsky & Yacobi 2001)。さらに、Goericke *et al.* (2000) では、化合物の同定が不完全ながらも、シクロエノールを濃集あるいは生産する生物として、オキアミや貝形虫などの多細胞動物プランクトン、繊毛虫 (*Strombidinopsis acuminatum*) や従属栄養性の渦鞭毛藻 (*Amphidinium* sp. および *Noctiluca scintillans*) が示唆された（「糞粒」の抽出分析）。しかし、この化合物の不安定性による分析の再現性の低さなど多くの問題が残し、結局その後環境試料中からの報告は途絶えた。それ以降は、2008 年には二枚貝（イガイ科の *Perna perna*）の消化管にシクロエノールが濃集することが報告されたのみであった (Louda *et al.* 2008)。

#### 流浪する研究：裏話あれこれ・・・

ここからは、結構個人的な話にはなるが、今回の研究を理解しやすいと考え、研究背景を時系列にそって解説しよう。柏山が初めてシクロエノールの重要性に接したのは、2008 年、海洋研究開発機構において、黒海などの高度に有機物に富む嫌氣的な堆積物からシクロエノールを検出 (Kusch *et al.* 2010) してからである。当時の分析技術では、海底が淀んで無酸素になるような堆積物のみで検出されることから、「シクロエノールは嫌氣的水塊の環境指標ではないか」と、

漠然とした疑いを抱いていた。その一方で、シクロエノールの不安定性に起因する“分析の再現性の低さ” (Louda *et al.* 2000) を強く認識させられていた。よって、シクロエノールの信頼性の高い分析には、標準試料を入手することが重要であると考えた。こうして彼は、2010 年 4 月、地球科学の世界を離れて、筑波大学化学の有機合成ラボである野本信也研究室の門を叩くこととなった。

このころ柏山は、シクロエノールは堆積物中ではなく、水塊中で生成し、それが海底に降り積もっているのではないかと疑い始めていた。これを証明するためには、色素濃度が低い水試料から抽出を行ない、極微量の成分としてシクロエノールを高速液体クロマトグラフィーで検出する必要があった。このため、純度の高いシクロエノールの標品を合成し、できればクロロフィル誘導体の特徴的な自家蛍光を利用して HPLC- 蛍光検出計を用いた分析が望ましいと考えた。しかし、文献による合成レシピ (Falk *et al.* 1975, Ma & Dolphin 1999) を読む限りはかなり簡単にみえるが、シクロエノール合成は難渋を極めた。結局、野本教授の援助を得て少量のシクロエノール合成標品を手に入れた。クロロフィルの研究をされている、同じく筑波大学の小林正美准教授のラボで、その合成標品の光化学的物性を調べたところ、なんとこのシクロエノールの標品がほとんど全く自家蛍光を発せず、蛍光検出は無理であることが判明した。さらに、酸素存在下では、濃度が低いシクロエノール溶液はたちまち分解されて無色になってしまうことも分かった。これでは酸素存在下での定量的な分析は容易ではない。泣きっ面に蜂である。

#### 「Detoxification catabolism of chlorophyll」仮説

しかし研究というのは不思議なもので、この望まない発見が結局道を開くこととなる。2011 年 4 月、立命館大学の有

機生物化学研究室に移籍した柏山は、「天然環境中から、どうやら生物が関与して作られるらしい奇妙なクロロフィル誘導体が見つかる」という話を民秋均教授に振ったとき、意外な言葉を耳にした。クロロフィルの光毒性。有機化学出身でも生物物理出身でもない柏山には想像もしなかった話である。民秋教授が言うには、クロロフィルは光により活性酸素を発生させる能力を持ち、微生物にとって危険な化合物であるはずだというのだ。その光毒性を回避するための工夫の結果、それら奇妙なクロロフィル誘導体で作られているのではないかと。柏山はとっさに「蛍光を出さないクロロフィル誘導体」であるシクロエノールの話を持ち出した。なぜなら、蛍光を出さないことは、光毒性がないことを強く示唆するからだ。この時初めて、シクロエノール = detoxification catabolite of chlorophyll という仮説が産まれた。この証明には、再現性があり定量的な分析法を確立することが必要である。ところがいくら分析を繰り返しても、シクロエノールがHPLC分析の過程で分解してしまい、濃度が低いと全く検出できない。ただし、逆に言えば、濃度が高ければ場合によっては検出される。実際、横山とともに印旛沼で採取した堆積物からシクロエノールは検出できた（未公表）。

### シクロエノールは水圏環境に遍在する！

時間は1年遡って、柏山が筑波大学に移ってきたときの話になる。2010年4月柏山は、以前から面識のあった筑波大学の稲垣祐司准教授に、つくば藻類・プロティストフォーラムで化石ポルフィリンの話をしてほしいと誘われた。折しも、同大学の井上勲教授の著書「藻類30億年の自然史」を感動と共に読了したばかりであり、柏山はこの話を喜んで受けた。これを機に、柏山は筑波大学の藻類・プロティスト研究者たちと面識を得たが、とりわけ横山との再会は、その後のシクロエノール研究に重大な転機をもたらした。その後、日本地球惑星科学連合の学際セッションのコンペーナとしての誘いを横山が受けたのを機に研究の方向性が徐々に生物側へと近づいて行く。横山は当時、共同研究者の理研・守屋繁春博士とともに継続的に印旛沼で定期サンプリングを行っていたが、2011年3月11日の午前中のサンプリングに柏山も同行する。大学に戻ってサンプル処理を始めた途端、それまで経験した事のない揺れに襲われた。立命館大学への赴任が決まっていた柏山は震災の余韻から逃げるように予定よりも早くつくばを去った。

その2011年の晩春には、その印旛沼の底泥試料から、続いて水試料を濾過したガラスファイバーフィルターからシクロエノールが検出された。さらに、横山と守屋博士が継続的観測を行っていた東京湾沿岸の底泥試料と水フィルター試料が届き、泥・水どちらからもシクロエノールが検出された。夏までには、柏山はついに微量のシクロエノールを定量分析するHPLCメソッドに到達していた。このかなり異様なメソッドに関しては、話が脇にそれるので本稿では措く。とも

かく、ひとたび分析が可能になってみると、この化合物はあらゆる水圏環境から検出された。まず堆積物に関していえば、印旛沼、東京湾に始まり、琵琶湖、伊勢湾そして立命館キャンパス内のため池の泥に到るまで遍在し、しかも驚くべきことに、検出される全クロロフィル誘導体に関してシクロエノールが軒並み50%を超えるのである。つまりこれまで報告されていなかったのは、単にシクロエノール分析手法に問題があっただけなのである。

さらに重要なことは、シクロエノールが表層水から検出されたことである。しかも分析した全ての試料からだ。印旛沼に始まり、東京湾、琵琶湖、立命館キャンパス内の池の水、後日になるが、伊勢湾、熊野灘沖太平洋、三方五湖（水月湖と三方湖）、余呉湖、さらには柏山の実家の庭の手水鉢の中の水にいたるまで、シクロエノールは様々な水圏生態系から発見された。もちろんそれらの水には藻類が生息しているため、検出される主な色素はクロロフィルaなどの光合成色素であるが、分解物中の単一化合物としてはシクロエノールが必ずと言っていいほど最も量が多かった。

### 犯人は藻類食プロティスト！

そうすると、勢い、「誰がシクロエノールを作っているのだ」という話になるのは道理である。もちろん柏山も、立命館大学に移った早い段階から模索を始めており、最初はミジンコにクロレラを食べさせる実験などに取り組んだ。過去の研究に節足動物の糞粒からシクロエノール様化合物が検出されたという報告があったからである（Goericke *et al.* 2000）。しかしどうしてもミジンコはシクロエノールを作ってくれなかった。その「糞粒」に含まれていたというシクロエノールは、そもそも彼らの餌生物・物質に含まれていたのではないか。そうすると犯人はほかの微生物か。バクテリアだろうか。そもそも多様な微生物の中から犯人を特定することがそんなに容易だとは思えなかった。柏山は、犯人探しに関しては長期戦を覚悟しかけていたが、ここでも横山の入れ知恵で突破口が開かれる。答えはあっさり見つかった。

横山は当時、東京湾沿岸から、奇妙な珪藻食いのプロティストを単離し、珪藻 *Skeletonema* と共に二員培養することに成功していた。遺伝子解析からケルコゾアに属することが分かったこの鞭毛虫は、餌の珪藻に近づくと、まるで触覚の先で餌をさぐるアリのように、鞭毛を珪藻に接触させながら、しばらくの間、珪藻をつつき回す。すると突然、細胞の一部にくぼみのようなものが見え始め、珪藻を縁どるようにアメーバ状に変形し、ついには自分の細胞長よりもずっと大きな珪藻を丸呑みする。しばらくすると珪藻を食胞に抱えたまま2本の鞭毛を使って泳ぎ回る。最後はあたかも靴下を脱ぎ去る様に珪藻から体を離し、またもとの球状の鞭毛虫に戻るのである（図2）。捨てられた珪藻の細胞内部には、縮んだ色素体が赤褐色に変色していた。横山は、この培養試料を柏山に送って色素分析を依頼した。

それは本当に目を疑うデータであった。ケルコゾアと珪藻の二員培養系で、餌の珪藻が本来持っていたクロロフィルはわずかしこ検出されず、代わりに検出された全クロロフィル誘導体の実に 80% 強がシクロエノールだったのである。横山は筑波大学の石田健一郎教授と中山剛講師の研究室の学生たち（特に白鳥峻志氏）の協力を得ながら、プロティストの二員培養株を、次々と柏山に送りつけた。ケルコゾアに続いて、色素を持たない藻類食のストラメノパイル生物、セントロヘリドに属する太陽虫などから次々とシクロエノールが検出された。一方で、藻類を食べてもシクロエノールはおろか、クロロフィルの本質的な代謝分解は行なっていない生物も、オピストコンタに近縁なプロティストで見つかった。過去の文献も含めて考察し (Goericke *et al.* 2000), シクロエノールは「ストラメノパイル-アルベオラータ-リザリア群 (SAR 群) とクリプト藻-有中心粒類-テロネマ類-ハプト藻群 (CCTH 群)」に属する藻類食のプロティストが、クロロフィルの代謝産物として作り出している」という結論に到って、いよいよ論文投稿という話になった。

### 色素体のクロロフィル自家蛍光が消える！

原稿は残念ながら S 誌や N 誌などの派手なジャーナルには丁重に断られてしまったが、賭に出た PNAS (アメリカ科学アカデミー紀要) への Feature Article としての投稿で、幸いにも色よい返事がエディターから返ってきた。しかし、「プロティストが藻類の摂食に際してシクロエノールを作っているというより直接的な証拠を示せ」という、やっかいな注文も付けられていた。そこで我々は、プロティストの食作用に際して、餌の色素体内部のクロロフィルの自家蛍光が消えるはず (シクロエノールは無蛍光性であるため) という仮説を、蛍光顕微鏡観察で証明することにした。代表選手には再び例のケルコゾアが選ばれた。食事をしながら動き回るケルコゾアを追った連続写真 (微分干渉像と蛍光像の両方) を撮る。しかも光源の強光によりクロロフィルのブリーチングが起こらない様に一瞬の照射で蛍光像を得る…。この作業はなかなか手強いものであった。ようやく蛍光撮影に成功すると、餌の色素体が放つ赤い自家蛍光は、ケルコゾアに飲み込まれると数分の内にパタパタパタッ、と消えていく。傾向としてはケルコゾアの細胞中央部付近から順に、クロロフィル自家蛍光の消失が起こるようである。しかし、これを微分干渉像とセットで示す事は難渋を極めた。結局、論文の本編の図 (Kashiyama, Yokoyama *et al.* 2012; Fig. 3) には、異なる消化段階にある 3 つのケルコゾア細胞が映った像と、Supporting Information の中に、1 個体を連続で追いかけた図 (Kashiyama, Yokoyama *et al.* 2012; Fig. S2) を掲載した。

### 後日譚：深化するシクロエノール研究

Kashiyama, Yokoyama *et al.* (2012) で示したように、シクロエノールを代謝するか否かは、どうやら分類群によって全く異なっている。しかし、まだ調査した分類群は生物界の

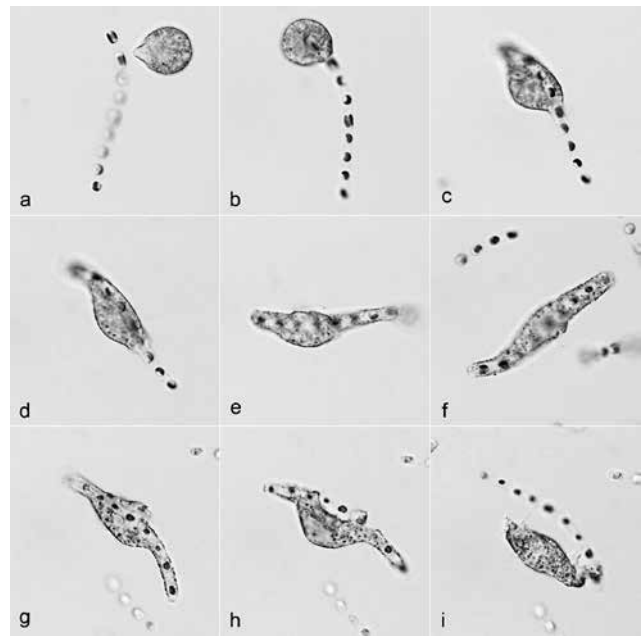


図2. 二員培養系でのケルコゾア生物の珪藻捕食シーンの連続観察像。

- a. ケルコゾアが鞭毛で珪藻 (*Skeletonema*) に接触。
- b-e. アメーバ状になり、細胞内へ珪藻を取り込む。
- f. 珪藻を取り込んだまま、鞭毛で遊泳するケルコゾア生物。
- g-i. 珪藻の遺骸を細胞外へ出し、もとの球状遊泳細胞へと戻りつつあるケルコゾア生物。

多様性全体を網羅しているとはいえない。そこで、我々の研究グループでは、様々な研究者に協力をおおぎながら、徐々に調査分類群の幅を広げている。まずは先行論文で一度も調査されていないスーパーグループのエクスカバータ生物をターゲットとした。この生物群には細菌捕食性、真核捕食性、吸収栄養性、独立栄養性、そして、近年記載された *Rapaza viridis* (Yamaguchi *et al.* 2012) のような混合栄養性のものまで多種多様な栄養様式のもの存在し、この中で、シクロエノールの有無を調べる事は重要であると考えた。先に述べた通り、藻類捕食生物であっても、シクロエノールを必ず生成するわけではない。しかし、この系統内にシクロエノール合成能が備わっているのであれば、たとえ独自色素体を保有していても、緑藻植物の *Tetraselmis* を捕食する *Rapaza* あたりまではシクロエノールを生成するのではないかと。そして独立栄養性生物で段階的にシクロエノールを作らなくなるとしたら・・・そんなことを思いついた横山はまた次々に柏山にサンプルを送りつけた。この顛末については、まだ全てを語る事は出来ないが、実は日本藻類学会第 37 回大会の要旨に記載されているので、軽く触れておこう。光合成生物であってもユーグレノイドはシクロエノール合成能があるらしい・・・と。これまでの分析では、光合成生物である珪藻類 3 種や真眼点藻類 1 種、あるいはプラシノ藻類 1 種 (未発表データを含む) からは、全くシクロエノールが検出されてい

ない。ところが、光合成ユーグレナ類は、祖先生物で獲得されたシクロエノール代謝能を保持し続けていて、自らの色素体で合成され利用されているクロロフィルを分解してシクロエノールを作っている。このことは、光合成ユーグレナ類自身の色素体を自ら処分していることを示唆する。実はこの理由について、“あたり”はついているのだが、この先は次の論文を待つてほしい。

さて、しかしそうすると、二次植物だけでなく、本当に一次植物にはシクロエノール代謝能はないのだろうか？また、いつの時代からシクロエノールは作られ、それを化石や堆積物からうまく検出する事はできるのか？さらにシクロエノール合成にかかわる遺伝子は？という疑問が出てくる。まだまだ、多くの謎に満ちたシクロエノールを今後も深く追求していきたい。

## 引用文献

- Falk, H., Hoornaert, G., Isenring, H. P. & Eschenmoser, A. 1975. Enol derivatives in the chlorophyll series. Preparation of 132,173-cyclopheophorbide enols. *Helv. Chim. Acta* 58: 2347-2367.
- Goericke, R., Strom, S. L. & Bell, M. A. 2000. Distribution and sources of cyclic pheophorbides in the marine environment. *Limnol. Oceanogr.* 45: 200-211.
- Karuso, P., Bergquist, P. R., Buckleton, J. S., Cambie, R. C., Clark, G. R. & Rickard, C. E. F. 1986. 132,173-Cyclopheophorbide enol, the first porphyrin isolated from a sponge. *Tetrahedron Lett.* 27: 2177-2178.
- Kashiyama, Y., Yokoyama, A., Kinoshita, Y., Shoji, S., Miyashita, H., Shiratori, T., Suga, H., Ishikawa, K., Ishikawa, A., Inouye, I., Ishida, K., Fujinuma, D., Aoki, K., Kobayashi, M., Nomoto, S., Mizoguchi, T. & Tamiaki, H. 2012. Ubiquity and quantitative significance of detoxification catabolism of chlorophyll associated with protistan herbivory. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 109: 17328-17335.
- 柏山祐一郎 2010. 地層に眠るクロロフィルの分子「化石」. *藻類* 58: 9-12.
- Kusch, S., Kashiyama, Y., Ogawa, N. O., Altabet, M., Butzin, M., Friedrich, J., Ohkouchi, N. & Mollenhauer, G. 2010. Implications for chloro- and pheopigment synthesis and preservation from combined compound-specific  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ , and  $\Delta^{14}\text{C}$  analysis. *Biogeosciences* 7: 4105-4118.
- Louda, J. W., Loitz, J. W., Rudnick, D. T. & Baker, E. W. 2000. Early diagenetic alteration of chlorophyll-a and bacteriochlorophyll-a in a contemporaneous marl ecosystem; Florida Bay. *Org. Geochem.* 31: 1561-1580.
- Louda, J. W., Neto, R. R., Magalhaes, A. R. M. & Schneider, V. F. 2008. Pigment alterations in the brown mussel *Perna perna*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 150: 385-394.
- Ma, L. & Dolphin, D. 1999. The metabolites of dietary chlorophylls. *Phytochemistry* 50: 195-202.
- Ocampo, R., Sachs, J. P. & Repeta, D. J. 1999. Isolation and structure determination of the unstable 132, 173-Cyclopheophorbide a enol from recent sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63: 3743-3749.
- Ostrovsky, I. & Yacobi, Y. Z. 2001. Cyclopheophorbide a in suspended particles in the meta- and hypolimnion during oxygen depletion in a subtropical lake. *J. Phycol.* 37 suppl. 39.
- 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: 29.

(<sup>1</sup> 筑波大学, <sup>2</sup> 独立行政法人日本科学技術振興機構さきがけ, <sup>3</sup> 立命館大学)