

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19339

研究課題名（和文）クロロフィルeの存否の謎を解く

研究課題名（英文）Studies to settle the mystery whether chlorophyll e exists in nature

研究代表者

宮下 英明（Miyashita, Hideaki）

京都大学・人間・環境学研究科・教授

研究者番号：50323746

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、クロロフィル（Chl）eの存否の謎を解くことを目的にした。Chl e について、(1)色素抽出過程において生成した副産物である可能性、(2)黄緑藻自体ではなく、黄緑藻に付着していた他の藻類が生産していた可能性、(3)特定の光条件によって誘導される誘導色素の可能性の3つの仮説の検証を試みた。その結果、特定の光条件によって誘導される色素である可能性は小さいことが明らかになった。しかし、黄緑藻に付着していた他の藻類に由来する色素である可能性については否定することができなかった。その一方で、クロロフィラーゼ活性の評価によって、色素抽出過程において生成した副産物である可能性が大きくなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究期間中にChl eの再発見には至らなかったため、当初期待していたようなインパクトはない。一方で、光質に対する順化によって黄緑藻類の個々の色素の相対的含量や細胞形態・生活環が変化することが明らかになったこと、さらに、微細藻類におけるクロロフィラーゼ活性の有無及びその強弱が、藻類の系統とは関係なく株依存的であり、また、藻類の生育段階や光照射の有無等によって変化しなかったことなど、藻類学の発展に貢献できる新たな知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to solve the mystery of the existence of chlorophyll (Chl) e. We attempted to test three hypotheses: (1) Chl e may be a by-product during the pigment extraction; (2) Chl e may have been produced not by the xanthophycean algae themselves but by other algae attached to them; and (3) Chl e may be an induced pigment under certain light conditions. As a result, it became smaller the possibility that Chl e is induced by the acclimation to light quality. However, we could not rule out the possibility that Chl e was originated from other algae attached on the xanthophycean algae. On the other hand, the studies on chlorophyllase activity of microalgae has increased the possibility that Chl e is a by-product generated during the pigment extraction.

研究分野：藻類学、光合成学

キーワード：クロロフィルe 黄緑藻類 クロロフィラーゼ

1. 研究開始当初の背景

「クロロフィル e は実在するか？」は、三四半世紀以上にわたり解決されていない藻類学分野における課題である。クロロフィル(以降 Chl と略記)は、光合成反応において重要な役割を果たしている色素であり、藻類の光合成機構の多様性や進化を考える上で鍵となる色素である。Chl e は、1943 年に天然から採取された不等毛藻類黄緑藻 *Tribonema bombycinum* から、また 1948 年に同じく天然から採取された黄緑藻 *Vaucheria hamata* から僅かに検出され、カラムクロマトグラフィーにおける挙動が Chl c の挙動に良く似ているものの、メタノール中での吸収極大が 415 nm および 654 nm と Chl c のそれらとは大きく異なる色素である (Strain 1951, 1958)。Chl e に関する情報は総説や講演集に記載されているのみであり原著論文が存在しない。このため、Chl e に関する情報は前述のものが全てである。その後に出る報告が無いことから、藻類学専門書においてもその取扱が統一されておらず「黄緑藻類の一部に Chl e が含まれている」と記載されている専門書がある一方で、Chl e について触れられていない専門書も多い。近年の藻類学専門書には、藻類にみられる Chl として、Chl a, divinyl-Chl a, Chl b, divinyl-Chl b, Chl c, Chl d, Chl f が記載されているだけで、現状 Chl e の理解について触れられていない。このため、初学者には「Chl e はないの？」という疑問が常に生じている。

研究代表者は Chl e が、ある特定の条件下で検出できる色素であると信じている。なぜなら、現状の Chl e の理解が、研究代表者が Chl d を主要な Chl とするシアノバクテリアを発見する以前の Chl d の理解と良く似た状況にあるからである。Chl d は 1943 年に、Chl e と同様に Strain 博士らによって、紅藻類から僅かに検出される色素として報告された。しかしながら、研究代表者が再発見する 1990 年代初めまで、色素抽出過程において生成したアーティファクトであり天然には存在しない、あるいは存在したとしてもその光吸収特性や微量であることなどから酸素発生型光合成には寄与しないという理解が主流であった。それは、必ずしも紅藻類から常に検出されるわけではないこと、Chl a の酸化生成物のなかに Chl d が含まれることが報告されていたからである。研究代表者は、Chl d を主要色素として利用し遠赤色光を用いて酸素発生型光合成をおこなうことのできるシアノバクテリア *Acaryochloris marina* を発見した (Miyashita et al. 1996)。*A. marina* の発見によって、それまでの Chl d の理解はすべて覆された。この研究を通して、Strain 博士らの研究グループが、緻密に分析・観察していることを実感しており、ある特定の条件下で必ず Chl e が検出できると考えている。

Chl d や Chl f の研究の経験から、Chl e の実体について幾つかの可能性が考えられた。例えば Chl d は、発見当初、大型紅藻が生産する微量の色素として報告された。しかし、実際は紅藻に付着するシアノバクテリアの生産物であった (Murakami et al. 2004)。また、近年発見された Chl f は、遠赤色下で培養されたシアノバクテリア細胞にのみ検出される誘導 Chl であった (Miyashita et al., 2014)。これらのことから、Chl e が色素抽出過程で生成したアーティファクトである可能性に加え、黄緑藻類自体ではなく付着藻類が生産している色素である可能性、Chl e が光質の変化によって誘導される色素である可能性などが考えられた。これらを検証することは、Chl e の実体解明に繋がる新たなアプローチである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Chl e の存否の謎を解くことである。Strain 博士らによって Chl e が検出された理由として a) 色素抽出過程において生成した副産物(アーティファクト)である可能性

に加え, b) 黄緑藻自体ではなく, 黄緑藻に付着していた他の藻類が生産していた可能性, c) 特定の光条件によって誘導される色素の可能性が考えられた。そこで 1) 天然の黄緑藻類を収集し, 付着藻類を観察のうえ色素組成分析を行って Chl *e* の有無を明らかにすること, 2) 黄緑藻類を白色光, 青色光, 緑色光, 赤色光など, 様々な光質条件下で培養し, 色素組成分析によって Chl *e* らしき色素が誘導されるかどうか精査すること, 3) クロロフィルの分解に関わる酵素としてクロロフィラーゼ (Chlase) に着目し, その活性を調べること等によって Chl *e* の存否に関する新たな知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

実験に用いた藻類株

Vaucheria sp. は, 京都大学吉田南キャンパス内の人工池から採取した。黄緑藻 *Botrydium granulatum* NIES-622, *Mischococcus* sp. NIES-1963, *Ophiocytium parvulum* NIES-1385, *Vaucheria frigida* NIES-2614 は, 国立環境研究所系統保存施設から購入した。その他の微細藻類については, 当研究室で琵琶湖から分離し保存している株, (株) SeedBank から供与いただいた株を用いた。藻類を生育させる培地には, 緑藻及び真正眼点藻, アオサ藻, トレボウクシア藻, 車軸藻については AF6 培地, 珪藻については CSi 培地, シアノバクテリアについては CT 培地を用いた。培養は, 20℃, 白色光 30-50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ にて静置培養を行い, 色素分析には植え継ぎ後 2~3 週間の細胞を用いた。光質の異なる培養には, 光源として白色, 青色, 緑色, 赤色の LED 光源を用いた。

色素組成の分析

藻類の色素は, 回収した藻類細胞ペレットにメタノールを加えて抽出した。メタノール添加後によく懸濁したのち, 素早く遠心分離し, その上清を素早く HPLC システムにインジェクトして分析した。HPLC 分析は, Zapata et al. (2000) の方法に従った。分析には LC-10A シリーズ (SHIMADZU Co., Kyoto, Japan) を用いた。分光蛍光検出器には RF-10AxL, フォトダイオードアレイ紫外可視検出器には SPD-M10Avp を用いた。蛍光については励起波長 440 nm, 検出波長 650 nm, 紫外可視吸収については 350~750 nm の範囲を測定した。色素の同定は, 保持時間と吸収スペクトルを *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*, (Eds.) Roy, S., Llewellyn, C., Egeland, E., & Johnsen, G.. (2011). (Cambridge University Press) のデータと比較して行った。

クロロフィラーゼ活性の測定

色素抽出は, 遠心分離によって回収した藻類ペレットにアセトンを加えて行った。抽出時に, ジルコニアビーズを加え, ボルテックスミキサーにかけて細胞を破碎した。抽出方法には, Barrett and Jeffrey (1971) の方法に基づき, Chlase 活性条件及び Chlase 不活性条件の 2 通りの方法を用いた。Chlase 活性条件は, Chlase 活性を高く保ちながら測定する方法であり, まず, 藻類ペレットに 50%アセトンを加え, 15 min, 室温, 暗所でインキュベートしたのち, 最終濃度が 90%となるように 100%アセトンを加えて, Chlase の酵素活性をストップさせた。さらにジルコニアビーズを加え, ボルテックスにて細胞を破碎し, 1 min 超音波洗浄機 (Branson Ultrasonics Co., Connecticut, USA) にて超音波処理したのち, 4℃ で遠心分離して上清を回収した。残った沈殿に再度 90%アセトンを加え, ボルテックスで細胞破碎し, 1 min 超音波処理した後, 4℃ で遠心分離して上清を回収した。これらの操作を色素が抽出できなくなるまで 3, 4

回繰り返した。回収した上清を混合したのち 4 で遠心分離を行い、上清を回収し HPLC にて分析した。Chlase 不活性条件は、Chlase 活性を抑制しながら抽出する方法で、ペレットにしたサンプル 100%アセトンを追加し、ジルコニアビーズを加え、ボルテックスにて細胞を破碎した。さらに、1 min 超音波処理を行い、4 で遠心分離し、上清を回収した。残った沈殿に再度 100%アセトンを追加し、遠心分離のち上清を回収した。これらの操作を色素が抽出できなくなるまで 3, 4 回繰り返した。回収した上澄みを混合後、再度 4 で遠心分離を行い、上清を回収して HPLC 分析した。

HPLC 分析によって検出された Chl *a* 量と Chlide *a* 量の合計量に対する Chlide *a* 量を個々の藻類株の「Chlase 活性」とし、検出波長 440 nm で得られたクロマトグラムから同定された Chl *a* と Chlide *a* のエリア面積から以下の式で算出した。

$$\text{Chlase 活性 (\%)} = \text{Chlide } a \text{ ピーク面積} / (\text{Chl } a \text{ ピーク面積} + \text{Chlide } a \text{ ピーク面積}) \times 100$$

4. 研究成果

学内の人口池から採取した *Vaucheria* sp. の顕微鏡観察結果と色素組成分析結果

4 月期の *Vaucheria* sp. には多量の藻類が付着していた。主な付着藻類は珪藻 *Gomphonema* spp. であった。また、水温が上昇する 5 月期には珪藻類に加え糸状緑藻 *Stigeochlonium* sp. も付着していた。6 月中旬には水温の上昇に伴い *Vaucheria* sp. が殆ど観察せず、翌年 3 月に再出現した。3 月の時期の *Vaucheria* sp. には付着藻類が比較的少なかった。天然のサンプルについて色素組成分析したところ、*Vaucheria* sp. には含まれない付着藻類に由来すると考えられる Chl *b* やフコキサンチン、微量の Chl *c* 様の色素が幾つか検出され、付着藻類の色素が分析結果に影響していた。付着藻類の少なかった 3 月の *Vaucheria* sp. においても同様であった。しかし、報告されているような吸収ピークをもち、かつ、Chl *c* と似た挙動をもつ色素は検出されなかった。

黄緑藻の色素組成に与える光質の影響

国立環境研究所より入手した 3 株の黄緑藻、*Ophiocytium parvulum*、*Botrydium granulosum*、*Mischococcus* sp.、*Vaucheria frigida* および学内の人口池から採取した *Vaucheria* sp. を、白色、青色、緑色、赤色の各 LED 光源下で培養し、HPLC 分析によって色素組成に与える光質の影響を調べた。その結果いずれの藻類株においても、青色光、緑色光下で培養した細胞では、Chl/カロテノイド比が、白色光、赤色光下で培養した細胞に比べて低下した。また、白色培養では蓄積されない色素が、青色光や緑色光で蓄積されるものもあった。同時に、光質を変えた培養では、細胞形態の変化、生活環の変化がみられた株があった。しかし、いずれの光質においても Chl *e* のみならず、Chl 化合物と考えられる色素が誘導・蓄積される現象は見い出せなかった。

藻類のクロロフィラーゼ活性

Chlase 活性に着目して、黄緑藻を含む様々な淡水藻類においてその活性を調べた。琵琶湖から単離された微細藻類 23 株の色素分析を行い、HPLC 分析によって得られたクロマトグラムの面積比から Chlase 活性を算出した。その結果、0%~95%の活性が検出された。緑藻ヨコワミドロ目 *Pediastrum duplex*、*Desmodesmus armatus*、車軸藻綱チリモ目 *Cosmoecium constrictum*、珪藻綱 *Aulacoseira granulata*、*Fragilaria crotonensis* の 6 株において 50%以上の高い Chlase 活性が検出された。一方、これらと系統的に近い種であっても活性がほとんど検出されないものもあり、活性の有無及び強弱は、藻類の系統とは関係なく株依存的であった。また、活性の有無や強弱は、藻類の生育段階や光照射の有無等によって変化しなかった。

考察

天然から採取した *Vaucheria* sp. の顕微鏡観察から、*Vaucheria* sp. に珪藻類や糸状緑藻類などが付着し、色素組成分析結果に影響を与えることがわかった。このことから、1940年代に報告された Chl *e* が *Tribonema bombycinum* や *Vaucheria hamata* 自体ではなく、それらに付着していた藻類に由来する可能性は否定できなかった。しかし、今回の実験でも、Chl *e* 様の色素は検出されず、単に付着藻類に由来する色素である可能性を支持するデータを得ることもできなかった。

黄緑藻の色素組成に与える光質の影響を調べたところ、光質に対する順化によって個々の色素の含量の相対的増減は見られたものの、Chl *e* をはじめ、Chl と考えられる色素の誘導・蓄積は見られなかった。これらの結果は、Chl *e* が光質の変化によって誘導される色素である可能性が小さいことを示している。

黄緑藻を含む様々な淡水藻類において Chlase 活性を調べた。Chlase 活性に着目したのは、Chl *e* が Chl *c* の近傍に溶出される色素であると報告されていることから Chl *a* や *b* などに比べ疎水性が低く、フィトール が切断されている分子であると考えたためである。Chl *e* が色素抽出過程において Chl *a* から作られるとすれば、Chlase が働くと考えたからである。その結果、今回実験に用いた黄緑藻類の Chlase 活性は小さいものの、藻類株依存的に高い活性をもつ藻類も存在した。色素抽出時に、Chlase 活性の高い藻類が黄緑藻に共存した場合、Chl *e* に類似した化合物が生成しうる可能性が明らかになった。

本研究では、*Vaucheria* sp. の他にも黄緑藻 *Tribonema* sp. をはじめとする多様な黄緑藻を天然から収集し、それらの色素組成分析によってクロロフィル *e* の検出を試みる計画していたが、残念ながら実施期間中にコロナウイルス感染拡大防止対応にともなう行動の制限が行われていたことにより充分に実施することができなかった。

本研究では、3つの仮説を基に Chl *e* の存否の謎を解くことを目的にした。その結果、光質の変化によって誘導される色素である可能性は小さいことが明らかになった。しかし、色素抽出時に黄緑藻に付着していた他の藻類に由来する色素である可能性については否定することができなかった。その一方で、Chlase 活性の評価によって、色素抽出過程において生成した副産物である可能性がこれまでに比べ大きくなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神尾郁・根来健・河村綾子・石井健一郎・宮下 英明
2. 発表標題 琵琶湖から単離された多様な微細藻類のクロロフィ ラーゼ活性
3. 学会等名 日本藻類学会第 45 回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------