

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：34315

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23870028

研究課題名（和文） 海洋・湖沼環境におけるクロロフィル色素の代謝プロセスの解明

研究課題名（英文） Elucidation of catabolic processes of chlorophylls in marine and lacustrine environments

研究代表者

柏山 祐一郎 (KASHIYAMA YUICHIRO)

立命館大学・立命館グローバル・イノベーション研究機構・ポストドクトラルフェロー

研究者番号：00611782

研究成果の概要（和文）：

光合成に不可欠なクロロフィルには、猛毒の一重項酸素（活性酸素）を生じる「光毒性」がある。本研究では、藻類を食べる原生生物がクロロフィルを解毒して光毒性のないシクロエノールに変える、自然界で普遍的な仕組みを世界で初めて解明した。また、この代謝物をあらゆる天然の水環境に見出し、原生生物の水圏の物質循環における寄与の重大性も示した。一方、シクロエノール代謝が藻類の共生進化に重要であった可能性も示した。

研究成果の概要（英文）：

Chlorophylls are essential biomolecules for photosynthesis yet also phototoxic to generate singlet oxygen, a highly toxic reactive oxygen for organisms. The present research elucidated that aquatic protists feeding on microalgae degrade chlorophylls into detoxified catabolites “cyclo-enols”. This cyclo-enol catabolism is common among diverse groups of protists and also ubiquitously generated in any aquatic environments, suggesting significant contributions of such protists in aquatic material and energy flows. The catabolism has also been critical for the endosymbiotic evolutionary processes of algae.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：環境生命化学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生態・環境

キーワード：クロロフィル，水圏環境，プロティスト，微細藻類，光毒性，シクロエノール

1. 研究開始当初の背景

クロロフィル色素は、地球生命圏の主要な基礎生産者である光合成生物に由来し、単純な代謝・リサイクルが困難かつ化学活性の高い物質である。クロロフィルの分解過程に関しては長く全く不明であったが、ごく近年になり、陸上植物では高度に制御された代謝系により、無色の無毒化合物に代謝されていることが解明された。しかし、水圏環境の生物によるクロロフィルの代謝分解に関してはほとんど知見がなかった。一方、地球化学分野では、堆積物や太古に形成された堆積岩から、クロロフィルを起源とすると考えられる有機分子が確認されることは古くから知られていた。中でも、本研究で集中的に取り組んだシクロフェオフォルバイドエノール類（シクロエノール）をはじめとする幾つかのクロロフィル誘導体の化学構造は、生物による代謝・改変を明示しており、地層中から見出されるこれら化合物の生物・環境指標としての意義を理解するためにも、その形成プロセスの解明が必要であった。

2. 研究の目的

従来の研究で環境試料中から報告されてきた主要なクロロフィル誘導体のうち、量的に重要かつ明らかな生物学的関与が想定される4つの化合物群（シクロエノール、イソクロロポリフィリン、クロリンカロテノイルエステル、クロリンステリルエステル）の生成プロセスと、それらの生物学的な存在意義の解明を当初の目的とした。すなわち、生成プロセスの解明に関しては、これら化合物の生成（基質であるクロロフィルの変成、あるいは代謝）に関与する生物を特定し、それら生物の生息・活動環境、あるいは生成反応の環境条件等の検証を目指した。また、これらクロロフィル誘導体の生化学的な意義を理解するために、有機合成によりクロロフィルから各化合物を誘導し、化学反応性、物性（会合・凝集体の形成など）、光化学特性（特に光毒性一活性な一重項酸素発生に関する機能）などを実験的に検証し、これら化合物の天然環境中（生物中・細胞内を含む）における状態を種々の顕微分析的な手法により特定することを計画した。

3. 研究の方法

研究の開始段階において、上述のクロロフィル誘導体のうちシクロエノールの分析手法を確立したことで、この化合物が極めて普遍的で重要な化合物であることが強く示唆されたため、研究対象をシクロエノールだけに集中した。従って、以下にはシクロエノールに関する研究方法について述べる。

(1) シクロエノールの有機合成：シアノバクテリアから抽出したクロロフィルを基に、先行研究を参照してシクロエノールの有機合成をおこない標準試料を作成し、化学構造の決定と純度の検証をおこなった。

(2) シクロエノールの安定的分析法の確立：シクロエノールは酸素雰囲気下で極めて不安定な化合物であり、また、シリカゲルなど有機物の分画に一般的に用いられる素材も分解を促進することがわかった。そこで、色素の抽出やHPLC分析、光学測定などの前処理を全てアルゴン雰囲気下でおこなうプロトコルを確立した。また、上述の合成標品を用いて、シクロエノールが安定化する有機溶媒、試薬の検討をおこなった。

(3) 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によるシクロエノール分析法の開発：シクロエノールは通常の順相及び逆相HPLCメソッドでは分析過程で分解が起こり定量的な分析が困難であったため、まず上述の標準試料を用いて、比較的安定に分析が可能な条件（移動相溶媒の組成やカラムの選択）を模索した。次に、濃度をあらかじめ決めた標準試料を用いることで、検量線を用いて定量的にシクロエノールを検出する手法を考案した。

(4) シクロエノールの蛍光特性及び光増感作用の計測：上述の標準試料を用いて、アルゴン雰囲気下でシクロエノールの各種光学特性を測定した。光増感作用に関しては、一重項酸素の蛍光検出試薬を用いて、*in vitro*における活性を他のクロロフィル誘導体と比較した。

(5) 水圏従属栄養微生物によるクロロフィル代謝の検証：多細胞動物プランクトン（ミジンコ）、微細生類食のプロティスト、及びバクテリアに関して、微細藻類を各培地に餌として与え一定期間培養後、培地の濾過残渣を有機溶媒で抽出して上述のHPLC分析法により分析した。また、コントロール実験として、餌として与えた藻類の単藻培養培地も同様に分析した。

(6) 水圏光栄養微生物によるクロロフィル代謝の検証：シアノバクテリアと各種微細藻類（一次植物及び二次植物）に関して、単藻培養をおこない、有機溶媒で抽出して同様に色素分析をおこなった。

(7) 微細生類食のプロティストによる摂食過程におけるクロロフィル代謝分解の「観察」：微分干渉/蛍光顕微鏡およびデジタル

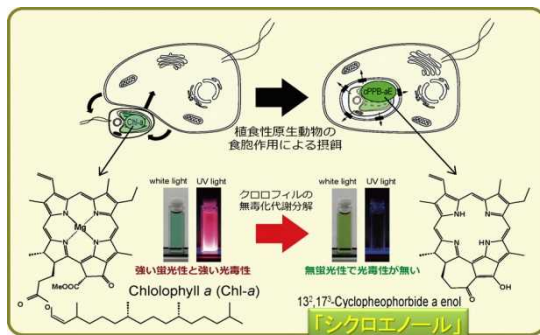
CCDカメラを用いて、プロティストが食胞作用によって餌である微細藻類を貪食し消化/排泄する一連の過程を観察し、かつその過程における餌生物の色素体のクロロフィル自家蛍光の変化を観察した。

(8) 環境試料のサンプリング：滋賀県琵琶湖環境科学センターの調査船はっけん号による月例調査に同船し、琵琶湖の鉛直各10mごとの湖水試料を毎月採取し、また底泥試料も採取した。同様な定期的調査は研究協力者によって東京湾沿岸でもおこなわれた。また、三重大学の練習船勢水丸の太平洋調査航海に乗船し、伊勢湾内と熊野灘沖の海水試料(鉛直方向に複数層)と底泥試料を採取した。採取した水試料は直ちにグラスファイバーフィルターで濾過し、濾紙を凍結保管した。濾紙はアルゴン雰囲気下でアセトン抽出し、エタノールとの共沸により真空乾固後、アニソールに再溶解してHPLC分析をおこなった。

4. 研究成果

(1) 本研究ではまず、クロロフィル誘導体「シクロエノール」はプロティストによるクロロフィルの「解毒」代謝物であることを解明した。まず、微細藻類を捕食する多くのプロティストが、食作用とよばれる消化・分解の仕組みの過程で、クロロフィルaをシクロフェオフォルバイドaエノール(以下では「シクロエノール」と略する)という化合物に変化させることを発見し、これがプロティストによるクロロフィルの解毒代謝産物であると結論づけた。すなわち、シクロエノールの合成標準試料の研究から、この化合物は可視光を吸収する緑色のクロリン色素であるにもかかわらず、無蛍光性で光毒性を有しない(一重項酸素を発生させない)、微生物にとって安全な色素であることが示された。

図1:プロティストの微細藻類捕食に伴う色素代謝



(2) 次に「シクロエノール代謝機構」をもつプロティストの多様性の解明に取り組み、遺伝的に異なる様々なプロティストの間で

共有されていることを示した。すなわち、SAR群とCCTH群、およびエクスカバータ群に属するプロティストが、この代謝をおこなうことが分かった。これらのグループだ

従属栄養「シクロエノール代謝」の広がり

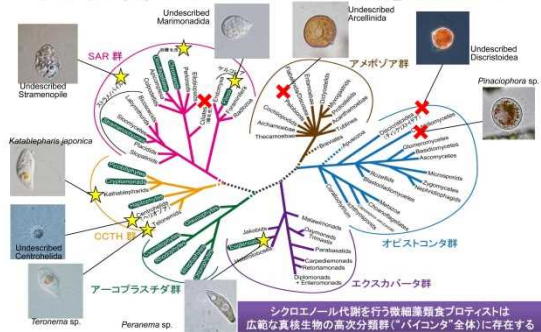


図2:シクロエノール代謝をおこなうプロティスト

けで海洋中のプロティストのうちの約70%を占めるとされており、今回の結果は、シクロエノールが海洋や湖沼の様々な試料中に多量に検出される事実とよく合致する。すなわち、プロティストたちにとって、光毒性のクロロフィルを大量に含有している植物プランクトンを捕食するという生き方を進化させ、水圏環境で成功を収めるには、クロロフィルの解毒戦略という生理学的な適応戦略を進化させる必然性があったことを示唆する。

(3) シクロエノールは環境中から普遍的に検出され、シクロエノール代謝を備えたプロティストによる植物食が、海洋や湖沼の食物網において重大な寄与を持つことが示された。すなわち、シクロエノールは琵琶湖、伊勢湾、東京湾、太平洋熊野灘沖、および大学キャンパス内の溜池や庭の石鉢中の水など、あらゆる表層水から相当量検出されることがわかった。また、琵琶湖や伊勢湾、太平洋ではシクロエノールの相対濃度が鉛直方向に深度が増すにつれ増加し、堆積物中にはクロロフィル誘導体の主要成分として見出されることが示された。このことは、シクロエノール代謝をおこなうプロティストが水圏表層における主要な微細藻類の一次捕食者であること、また、シクロエノールが選択的に沈降/堆積していくことを示唆する。なお、これらの成果は、本研究における分析法の改良によって、シクロエノールが微量でも定量的に検出されることが可能になった成果に負うものである。特に、熊野灘沖のデータは、東海行の主要な基礎生産者であるピコ藻類が食物網に組み込まれる過程として、このプロティストによる捕食活動が非常に重要な役割を果たしている可能性を指摘したものであった。

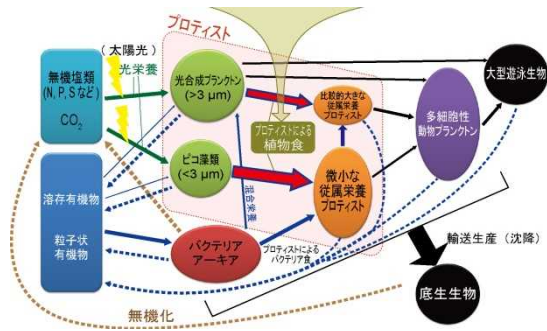


図3: 微細藻類食プロティストの水圏環境中の役割

以上の研究成果 (1) ~ (3) の成果は、米
国科学アカデミー紀要に Feature Article (長
文の特別論文) として公表された。

(4) これまでシクロエノール類はクロロフ
イル *a* の誘導体のみが報告されていたが、本
研究ではクロロフィル *b*, *d*, 及びバクテリ
オクロロフィル *a* においても相同なシクロエ
ノールが環境中及びプロティストの培地中
に見出されることを示した。これは、陸上植
物においてはクロロフィルの代謝分解系が
クロロフィル *a* のみを基質としてとること
と対照的に、プロティストのシクロエノール
代謝においては、様々な種類のクロロフィル
類を直接の基質として分解が進行すること
を示唆したものである。この成果の一部につ
いて、*FEBS Letters* 誌に投稿した。

(5) 藻類の単藻培養培地を網羅的に分析し
た結果、ユーグレノイドに属する二次植物だ
けが、単藻培養条件でもシクロエノールを生
産することを発見した。従属栄養培地で
Euglena gracilis を培養した場合、対数増殖
期には全く検出されず、死滅期に入ると検出
量が増加する (この場合、顕微鏡観察により
細胞内の色素体の自食作用が確認される)。
天然から分離された他の光栄養ユーグレ
ノイド類は、独立栄養培地で単藻培養した
結果、全ての株からシクロエノールが検出さ
れた。これら光栄養性ユーグレノイドの外群
にあたる、色素体を持たない微細藻類食ユ
グレノイドがシクロエノールを生産すること
と併せて、二次植物の進化におけるシクロ
エノールの重要性という視点で研究をまと
め、論文投稿の準備を進めている。

5. 主な発表論文等
(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kashiyama Y., Yokoyama A., Shiratori T.,
Inouye I., Mizoguchi T., Tamiaki H.
13², 17³-Cyclophosphoribide *b* enol as a

catabolite of chlorophyll *b* in
phycophagy by protists. *FEBS Letters* (査
読あり) 審査中。

- ② Kashiyama Y.*, Yokoyama A. *, Kinoshita
Y., Shoji S., Miyashita H., Shiratori T.,
Suga H., Ishikawa K., Ishikawa A.,
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. *Proceedings of
National Academy of Sciences of the
United States of America* (査読あり)
Vol. 109, 17328-17335.

*筆頭共著者

[学会発表] (計 10 件)

- ① 発表者名: 柏山祐一郎, 発表標題: 色素体
獲得を可能にしたユーグレノイドによる
クロロフィルの解毒代謝分解, 学会等名:
日本藻類学会第 37 回大会, 発表年月日:
2013 年 03 月 28 日, 発表場所: 山梨大学
(山梨県)
- ② 発表者名: Y. Kashiyama, 発表標題:
Chlorophyll catabolism in aquatic
ecosystems: Physiology, ecology, and
evolution, 学会等名: CER International
workshop on Biogeochemical cycling and
Microbial Ecology for Young Scientists,
発表年月日: 2013 年 03 月 19 日, 発表場
所: 京都大学生態研究センター (滋賀県)
- ③ 発表者名: Y. Kashiyama, 発表標題:
Detoxification catabolism of
chlorophyll associated with protistan
herbivory in aquatic ecosystems, 学会
等名: 2nd International Symposium on
Biosynthesis of Tetrapyrroles, 発表年
月日: 2012 年 12 月 01 日, 発表場所: 立
命館大学 (滋賀県)
- ④ 発表者名: Y. Kashiyama, 発表標題:
Ecological significance of chlorophyll
metabolism of herbivorous protists in
aquatic ecosystems, 学会等名:
Protist2012, 発表年月日: 2012 年 08 月
01 日, 発表場所: Oslo (Norway)
- ⑤ 発表者名: Y. Kashiyama, 発表標題:
Evolutionary significance of
chlorophyll metabolisms of herbivorous
protists in aquatic ecosystems, 学会等

名: Protist2012, 発表年月日: 2012年07月30日, 発表場所: Oslo (Norway)

- ⑥ 発表者名: 柏山祐一郎, 発表タイトル: 微細藻類捕食プロテオストによるクロロフィルの解毒代謝, 学会等名: 日本藻類学会第36回大会, 発表年月日: 2012年07月13日, 発表場所: 北海道大学 (北海道)
- ⑦ 発表者名: Y. Kashiya, 発表タイトル: Occurrence and distribution of chlorophyll catabolites in aquatic environments, 学会等名: 2012 ASLO Aquatic Sciences Meeting, 発表年月日: 2012年07月11日, 発表場所: びわ湖ホール (滋賀県)
- ⑧ 発表者名: Y. Kashiya, 発表タイトル: A non-fluorescent/non-photosensitizing chlorophyll metabolites of herbivorous protists in aquatic ecosystems, 学会等名: 8th International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments, 発表年月日: 2012年06月23日, 発表場所: 立命館大学 (滋賀県)
- ⑨ 発表者名: 柏山祐一郎, 発表タイトル: 光毒性クロロフィルを摂取するための生化学的進化戦略, 学会等名: 日本地球惑星科学連合2012年大会, 発表年月日: 2012年05月20日, 発表場所: 幕張メッセ (千葉県)
- ⑩ 発表者名: 柏山祐一郎, 発表タイトル: 水圏生態系におけるクロロフィルの代謝, 学会等名: 日本微生物生態学会第27回大会, 発表年月日: 2011年10月, 発表場所: 京都大学 (京都府)

[その他]

ホームページ等

- ① 世界で初めて水中の微生物がクロロフィル (葉緑素) の光毒性を無くす仕組みを発見
http://www.ritsumei.jp/topics_pdf/adm_in_31e79bc7e550c8e584b58c2efad01665_1346757212_.pdf
- ② 立命館グローバル・イノベーション研究機構 水中の微生物がクロロフィルの光毒性を無くす仕組みを発見
http://www.ritsumei.jp/news/detail_j/topics/11008/year/2012/publish/1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柏山 祐一郎 (KASHIYAMA YUICHIRO)
立命館大学・立命館グローバル・イノベーション研究機構・ポストドクトラルフェロー
研究者番号: 00611782

(2) 研究協力者

横山 亜紀子 (YOKOYAMA AKIKO)
筑波大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号: 30466601

井上 勲 (INOUE ISAO)
筑波大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号: 80001973

民秋 均 (TAMIaki HITOSHI)
立命館大学・薬学部・教授
研究者番号: 00192641

中澤 昌美 (NAKAZAWA MASAMI)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号: 90343417