

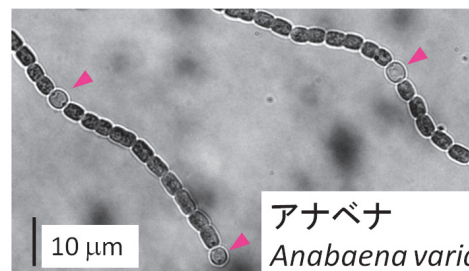


光合成と窒素固定の両立形式の多様性を見る細胞個別の分光學

京都大学理学研究科
化学専攻 熊崎茂一

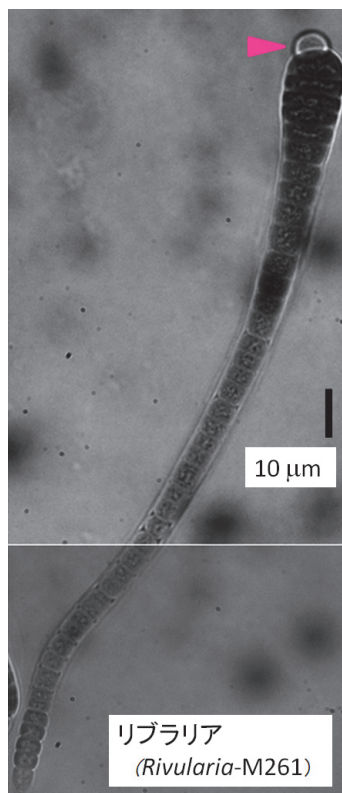
「なぜ多くの動物は体内で光合成をしないのか」と、ある学生から質問されたことがあります。人間を含む多くの動物は他の生物が作った栄養を奪うことに磨きをかけてきました。人間には奪うだけではなく、持続可能なエネルギーを作り出す能力があります。しかし、エネルギー消費の増大には歯止めがかからず、消費に見合う持続可能なエネルギーを作り出すことは非常に困難な課題です。持続可能な社会では、人間が自らの行動を律する必要があるのでしょうか。エネルギー的独立性の高い生物の生き様を分子や生態のレベルで理解することは、人工光合成を含む科学技術や環境保全はいうに及ばず、社会問題解決にも良い影響があると信じて、最近の拙著 [1] の一部を紹介させていただきます。

水を電子源として利用する酸素発生型光合成を地上で最初に始めたのがシアノバクテリアと考えられています。バクテリアというと単細胞生物を想像する人が多いかもしれませんが、複数の細胞が繋がって生育している種は決して少数派ではありません。シアノバクテリアにも細胞が何十と連なっている糸状性と呼ばれる形態を示すものが多く存在します。さらに、糸状性シアノバクテリアの中は、窒素固定能力を有する特殊な細胞（異型細胞、ヘテロシスト）を生じるものがあります。図1は比較的研究がよく進んでいる種（アナベナ）ですが、ヘテロシストは細胞連結体の端にできたり、細胞連結体の中間にできたりします。図2はこれまで比較的研究が行われていない種（リブラリア）で、少なくとも見かけ上、ヘテロシストは細胞連結体の片方の端（細



アナベナ
Anabaena variabilis

図1：糸状シアノバクテリアの一例
矢印（マゼンタ）はヘテロシスト



リブラリア
(*Rivularia-M261*)

図2：糸状シアノバクテリアの一例
矢印（マゼンタ）はヘテロシスト

胞が太い側）にだけ生じます。ヘテロシストにはニトロゲナーゼという窒素 (N_2) を還元できる酵素がありますが、この酵素が酸素によって失活するため、酸素発生型光合成と窒素固定を両立させる特別な仕組みが必要です。図1と図2の種では酸素発生型光合成と窒素固定を空間的に分離しています。図の顕微鏡画像で、ヘテロシストは比較的透明に見えるのに対し、それ以外の細胞（栄養細胞と呼びます）は比較的暗く見

えます。暗く見えるのは光合成色素が比較的多いためです。色素分子の多寡を定量するには細胞個々の吸収スペクトルが有効です。図3と図4にアナベナとリブラリアの場合の栄養細胞とヘテロシストの吸収スペクトルを示しています。どちらの種でも、栄養細胞の吸収スペクトルがヘテロシストの吸収スペクトルを上回っています。この差が、光化学系 II の有無に対応します。ただし、光化学系 II の多寡が吸収スペクトルに与える直接的影響は 680nm 近辺が主で、光化学系 II に電子励起エネルギーを供給するフィコビリン色素タンパク質 (APC, PC, PE, PEC、各図下段参照、主に 500 - 650 nm で吸収) の細胞内濃度の違いが大きく影響しています。また、どちらの種でもヘテロシストの吸収スペクトルにはクロフィルの吸収スペクトル (Chl と各図下段に表記、およそ 680nm に吸収極大を示す) が大きく残ります。これは、ヘテロシスト中に光化学系 I が残って機能していることを示します。光化学系 I だけでは、水から電子を取り出して正味の還元力を生成して二酸化炭素を還元することはできません。しかし、光化学系 I は光エネルギーを利用して、循環型電子伝達を行い、チラコイド膜 (光合成膜) 内外でプロトン濃度勾配を生成できます。このプロトン濃度勾配は ATP 合成に利用されます。安定な三重結合を切断する窒素固定反応は多くの ATP を消費する反応ですから、ヘテロシストが単独でも ATP を生成できることは生存に有利に働くでしょう。

さらに、図3と図4の上段同士でヘテロシストの吸収スペクトルを比較すると、顕著な違いがあります。アナベナのヘテロシストの吸収スペクトルはほとんどクロフィルの吸収スペクトル (Chl, 下段) だけで説明できます。ところが、リブラリアではクロロフィルに加えてフィコシアニン (PC、下段、600-630nm 辺りで強く吸収) というフィコビリン色素タンパク質複合体が多く含まれます。このフィコシアニンは光化学系 I に電子励起エネルギーを渡す光捕集系として働いていると考えられます (図5)。細胞毎の蛍光スペクトルの計測も行っており、電子励起されたフィコシアニンが他の分子複合体に励起エネルギーを渡している割合について見積もりました [1]。その結果、リブラリアのヘテロシスト中のフィコシアニンは、リブラリアの栄養細胞中のフィコシアニンと同じ程度に電子励起エネルギーを何者かに渡していることが判明しました (図5参照)。フィコシアニンから移動す

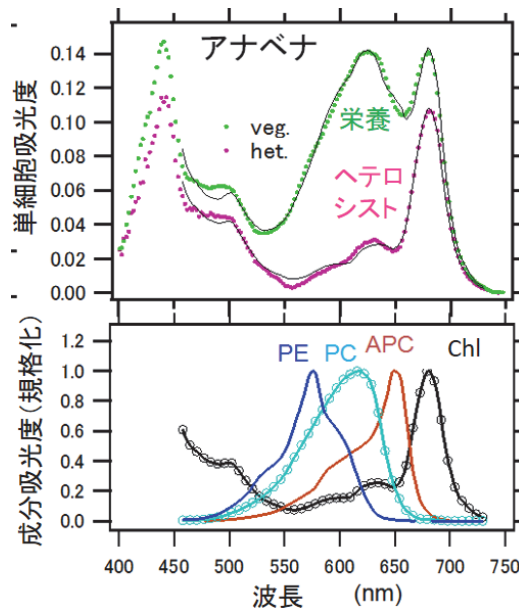


図3 アナベナの細胞種別顕微吸収スペクトル (上段)。下段は吸収スペクトルを構成する色素タンパク質成分。

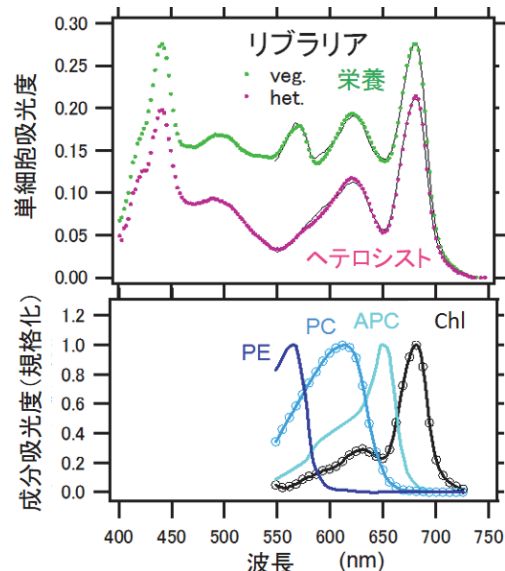


図4 リブラリアの細胞種別顕微吸収スペクトル (上段)。下段は吸収スペクトルを構成する色素タンパク質成分。

る電子励起エネルギーは、栄養細胞では APC を経由して光化学系 II に伝わり、ヘテロシストでは光化学系 I に直接伝えられると考えられます (図5)。図1のアナベナの近縁種から単離精製された光化学系 I とフィコシアニンの複合体が単一粒子毎に電子顕微鏡で構造解析されています [2]。その結果では光化学系 I の四量体に、二つのフィコシアニン六量体が結合しているモデルが一つの典型構造として示されました。我々のリブラリアの顕微吸収スペクトルから導いた光化学系 I : フィコシアニンの化学量論比では、光化学系 I の四量体当たり、四つのフィコシアニン六量体が結合し

ているモデルになります。ただし、文献[2]ではヘテロシストだけから光化学系 I を取り出しているわけではないので、単純な比較はできません。

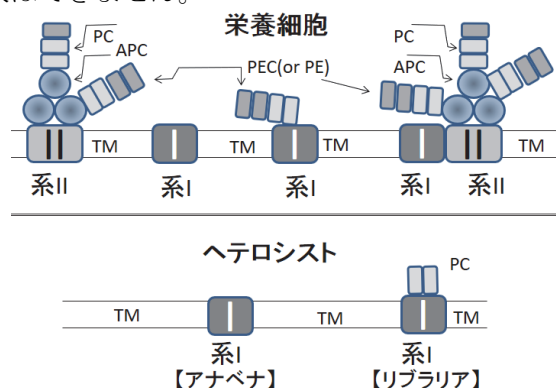


図5 光合成膜(TM)上の色素タンパク質複合体の集合状態モデル。文献[1]の研究のみでは栄養細胞中における色素タンパク質複合体の集合状態に関しては特定のモデルに絞り込むことができないため、複数の可能性を描画している。

細胞を扱っている以上、多くの分子種の混合状態を見ている可能性もあり、正確に分子レベルの描像を確定できないこともあります。しかし、色素タンパク質複合体は細胞や葉緑体中の光合成膜で他の色素タンパク質と相互作用しながら最適に機能するように進化してきたはずですから、情報豊富な顕微分光イメージングによって、生きた細胞中の光合成膜上で機能する状態を捉えることは重要な知見を提供できるはずだと考えています。複数種類の細胞が混在する状況では、本来の機能を保ったヘテロシストだけを単離して生化学的な分析が可能とは限りません。特に、連結した多数の細胞から一部の細胞だけが機能分化する過渡的状態の観察には、顕微鏡による観察が必須です [3]。一方、生活史や環境によってどれ程特性が変わっていくか、という複雑な要素が細胞の研究には付きまといまます。太陽光の強度、スペクトル、温度、無機栄養状態、生育履歴、他の生物との共生状態（例えば、窒素固定できない生物との共生）等、光合成活動に影響を与え得る多くの要素があります。ただし、今回紹介した測定例のように、二種の生物を比較して計測することにより、生物種間の特性の違いを明確にすることは各生物種の光合成膜の特性評価に非常に有効であると考えられます。例えば、図2のリブラリアで太い端の異型細胞だけで窒素固定を行っているかどうかについてはさらに厳格な検証が必要です。しかし、リブラリアの一端のヘテロシストには、フィコシアニンを伴う光化学系 I が存在していることは ATP 生産能力を助

けますから、比較的大きな細胞集合体全体に固定窒素を供給する上で有利に働くことでしょう。他方、図1のアナベナでは細胞集合体に複数のヘテロシストが十数個間隔で発現しますから、ヘテロシスト一個あたりに求められる窒素固定能力は比較的低いのかも知れません。

文献[1]で用いた測定装置は、同一の細胞連結体について、顕微吸収スペクトルと顕微蛍光スペクトルの両方を測定できましたので、細胞毎に濃度と蛍光量子収率の両方を分離する解析を行うことができました。さらに、顕微蛍光スペクトルの測定には3種類の励起方式を採用し、同一細胞連結体について、3種の異なる励起エネルギー初期分配（光励起直後の電子励起状態の存在確率分布）が生成できました。それは、フィコシアニンからのエネルギー移動の描像や色素タンパク質複合体の細胞内濃度を確定する上で非常に重要な根拠となりました。785nm 連続発振レーザーが光化学系 I の比重が大きくなアンチストークス蛍光画像をもたらすということは過去に報告してきましたし [3]、この研究でも光化学系 I の細胞内濃度を見積もるために用いました。フィコシアニン(PC)とそれよりも短波長側に吸収極大を持つアンテナ（フィコエリスリンまたはフィコエリスロシアニン(PE or PEC)の励起比率が 488nm-1 光子励起と 808nm-2 光子励起で大きく違うことが励起エネルギーの流れを推定する上で役に立ちました。2光子励起は奥深い試料のイメージングへの活用で特に効用が強調されています。今回の研究対象は微細な細胞連結体であり、2光子励起を用いる効用が無いと思いきや、意外にも、2光子励起の効用がありました。フィコシアニンを1光子励起で選択励起するとフィコシアニンの蛍光波長領域が励起波長に近過ぎて蛍光スペクトル取得が困難になりがちです。2光子励起でフィコシアニンの励起選択性が高ければ、励起波長から遠い波長領域にあるフィコシアニンの蛍光スペクトルの全体像を観測し易いのです。

最後に、窒素固定能力と酸素発生型光合成能力を兼ね備えた一部のシアノバクテリアは光合成生物の中でも最も栄養的独立性が高いということを念押しして筆をおきたいと思います。

[1] S. Nozue et al., *Biochimica et Biophysica Acta, Bioenergetics*, 1858 (2017) 742 - 749 .
 [2] M. Watanabe et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111 (2014) 2512-2517.
 [3] S. Kumazaki et al., *Plant Physiology*, 161, (2013)1321 - 1333.