生物物理 **58**（6），303-307（2018）
DOI: 10.2142/biophys.58.303
受理日：2018 年 8 月 22 日

総説

光合成生物における開環テトラピロール結合型光受容体

伏見圭司, 成川　礼　静岡大学理学部生物科学科

Because light is not only energy source but also important signal for photosynthetic organisms, these organisms develop highly organized light acclimation processes. Linear tetrapyrrole-binding photoreceptors play central roles in these processes. They are categorized into phytochrome and cyanobacteriochrome families. Here, we summarize current knowledge on these photoreceptor families especially focusing on color-tuning mechanisms of the cyanobacteriochromes. Because these photoreceptors possess many advantages for optogenetic and bio-imaging applications, we briefly introduce current developmental status of these photoreceptors.

Cyanobacteria / Phytochrome / Cyanobacteriochrome / Optogenetics / Tetrapyrrole / Bilin

1. はじめに

光合成生物は光をエネルギーとしているが故に，光を情報として認識する高度な機構を備えている．さらに光合成装置の特徴に応じて，生物毎に光の色や強さに対して異なった好みを有しているため，各々が持つ光受容体は非常に多様化している．中でも，開環テトラピロールを発色団とする光受容体の多様性に近年，注目が集まっている．本総説では，最初に開環テトラピロール色素そのものについて簡単に概説する．開環テトラピロールを結合する光受容体はフィトクロムと**シアノバクテリオクロム**（CBCR）に大別されるため，それぞれ別項で解説する．特に，我々が精力的に研究を進めている CBCR について，詳細に記載する．また，これらの開環テトラピロール結合型光受容体を基にしたオプトジェネティクスやライブセルイメージングに資する分子の開発が近年，活発に進められているため，その現状についても簡単に解説する．

2. 開環テトラピロール

開環テトラピロールは，読んで字の如く，環が開いた 4 つのピロール環で構成され，ヘムの開裂により生じるビリベルジン（BV）という色素を起点に合成される色素群の総称である．哺乳類の胆汁（バイル）から同定された色素も開環テトラピロールであったことから，ビリンとも呼ばれる．BV を起点として，様々な還元酵素によって多様な色素種が合成される（**図 1**）．BV が天然の開環テトラピロールの中で最も共役系が長く，吸収波長も長波長である．それぞれの色素種は共役系の長さが異なっており，それに伴い吸収波長も多様化している．フィトクロムも CBCR も，結合色素の C 環と D 環の間の二重結合が光受容の初期反応として回転し，光異性化を起こす（**図 1**）．そのため，これまでにフィトクロムや CBCR の結合色素として同定されている BV，フィトクロモビリン（PΦB），フィコシアノビリン（PCB），フィコビオロビリン（PVB）は全てこの二重結合を保持している．

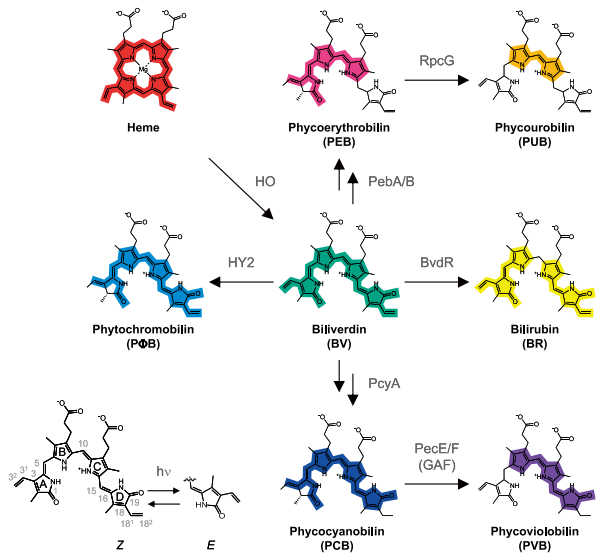

図 1
開環テトラピロールの生合成経路．ヘムの開裂により生じる BV を起点として，様々な還元酵素の働きにより，吸収波長の異なる多様な色素が合成される．PCB から PVB への異性化は，通常，PecE/F という酵素によって触媒されるが，GAF ドメイン自身の異性化活性によっても触媒される．

Linear Tetrapyrrole-binding Photoreceptors
Keiji FUSHIMI and Rei NARIKAWA
Faculty of Science, Shizuoka University

3. フィトクロム

フィトクロムは植物において，発芽，避陰応答，開花など様々な応答を制御する光受容体として同定された[1]．典型的なフィトクロムは開環テトラピロールを結合し，赤色光吸収型（Pr）と遠赤色光吸収型（Pfr）の間の可逆的な光変換を示す．光変換過程でタンパク質の構造変化が起こり，下流にシグナルが伝わることで，様々な応答現象が制御されている．ゲノム解析の進展とともに，陸上植物だけでなくシアノバクテリア，非光合成バクテリア，真菌類からも同定され，多様な生物で光受容体として働いていることが分かっている．これらの生物で見つかっているフィトクロムのドメイン構成は基本的によく似ており，N 末端側に色素結合領域，C 末端側に酵素活性領域が配置されている（**図 2**）．N 末端側に存在する PAS, GAF, PHY ドメインの 3 つのドメインが協調して色素を結合し，GAF ドメインが中心的な役割を果たしている．

生物種毎にフィトクロムに結合する色素が異なっており，陸上植物のフィトクロムは PφB，シアノバクテリアのフィトクロムは PCB を結合する．一方，非光合成バクテリアや真菌類のフィトクロム（バクテリオフィトクロム）は BV を結合する．PφB と PCB はよく似た色素であり，D 環の $C18^1$ と $C18^2$ の間の結合が単結合か二重結合かの違いしかない（**図 1**）．実際に，どちらの生物種由来のフィトクロムも，PφB と PCB の両方を結合し，光変換を示すことが可能である．これらの結合色素の違いは，それぞれの生物種が持つ色素合成酵素の違いに起因する．つまり，陸上植物は PφB を産生する酵素フィトクロモビリン：フェレドキシンオキシドレダクターゼ（HY2）を持ち，シアノバクテリアは PCB を産生する酵素フィコシアノビリン：フェレドキシンオキシドレダクターゼ（PcyA）を持っている．興味深いことに，HY2 を欠失した植物に PcyA を導入することで，フィトクロムが制御する光応答現象が相補される．一方，非光合成バクテリアや真菌類のバクテリオフィトクロムは BV を結合するが，この場合，色素合成系の違いだけではなく，タンパク質側に明確な違いがある．PφB や PCB を結合するフィトクロムは，GAF ドメイン内部に保存された Cys 残基を持ち，その Cys 残基が色素に共有結合しているのに対し，BV を結合するフィトクロムは，PAS ドメインの N 末端側に保存された Cys 残基が，GAF ドメインの色素結合領域にアクセスし，外側から色素に共有結合している（**図 2**）．上述したように，それぞれの結合色素種の共役系の長さに従い，BV > PφB > PCB の順番で長波長から短波長へと推移するものの，

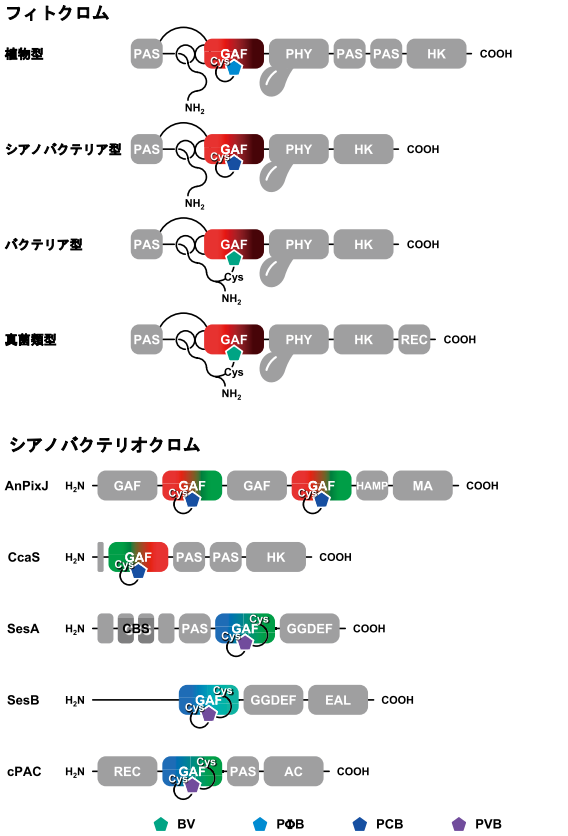

図 2
フィトクロムと CBCR のドメイン構成．フィトクロムの色素結合領域では，GAF ドメインのループ構造が作る八の字の中を N 末端領域が通ることで，N 末端領域を色素近傍に固定している．PHY ドメイン内部のタン構造が色素近傍に配置し，光変換過程で構造変化する．HK: ヒスチジンキナーゼ，REC: レスポンスレギュレーター，HAMP: 二量化等に関わる領域，MA: メチル基受容領域，CBS: 二量化等に関わる領域，GGDEF: c-di-GMP 合成酵素，EAL: c-di-GMP 分解酵素，AC: cAMP 合成酵素．

基本的にどのフィトクロムも Pr 型と Pfr 型の間の可逆的な光変換を示し，その分子機構は共通している．Pr 型と Pfr 型の両方の構造が決定され，光変換の初期反応として，C15=C16 位の *ZIE* 光異性化が起こり，それに伴ってタンパク質の構造変化が起こることが解明されている．特に，C 末端側に存在する PHY ドメインから GAF ドメインにアクセスしているタン（舌）と呼ばれる領域の二次構造（**図 2**）が，光変換に伴い大きく変化することが解明されている．

近年，真核藻類由来のフィトクロムの解析が行われ，典型的な赤／遠赤色光変換型ではなく，遠赤／緑色光，青／遠赤色光，赤／青色光，橙／遠赤色光変換型など多様な光変換が報告された[2]．これらの詳細な解析が進むことで，後述する CBCR の多様な光変換と合わせて，テトラピロール結合型光受容体の色調節機構の普遍性と多様性について理解が進むだろう．

4. シアノバクテリオクロム

CBCRは，シアノバクテリアにおいて走光性や補色順化を制御する推定光受容体として遺伝学的に単離され[1]，2004年に初めて，走光性に関わるCBCRの分光特性が解明された[3]．フィトクロムの赤／遠赤色光吸収型間の変換とは全く異なり，短波長の青色光と緑色光の間で可逆的に光変換することが示された．その後，多様なCBCRが網羅的に解析され，その分光特性の多様性が明らかとなっている．これらのCBCRは，どれもGAFドメインを有しているが，全体のドメイン構成はそれぞれで異なっていることが分かる（**図2**）．フィトクロム同様，N末端側に色素結合領域，C末端側に酵素活性領域が配置されている．CBCRはフィトクロムと異なり，色素結合と光変換にはGAFドメインのみが必要である．植物やシアノバクテリアのフィトクロムと同様に，GAFドメイン内部に保存されたCys残基が，色素に共有結合している．現在では，紫外から遠赤色光までの幅広い領域で，様々な波長を感知する光受容体が同定されている（**図3**）．UV-Vis分光，ラマン分光，NMR，X線結晶構造解析などが網羅的に進められ，それぞれの光受容体の色調節機構の詳細が解明されつつある[4),5)]．これまでの解析から，基本的に全てのCBCRにおいて，フィトクロムと同様，光変換の初期反応としてC15=C16位の*Z/E*異性化が起き，その後，独自の色調節機構が働くことで，それぞれ特有の光変換特性を示す．これまでに，大きく4つの色調節機構が解明されているので，それぞれについて簡単に概説する（**図4**）．

第一に，フィトクロム同様，結合する色素の共役系の長さが異なることで吸収波長の多様化が生じている（**図4a**）．これまでにCBCRの結合色素としてPVB，PCB，BVが知られている[6)-9)]．この順番で吸収波長が短波長から長波長に推移するため，それぞれを結合する典型的なCBCRの2つの吸収型の差スペクトルを比較すると，色素自身の吸収と対応していることがよく分かるだろう（**図S1**）．また，PVBを色素として結合する場合，最初にPCBが結合し，その後，CBCR自身の自己異性化活性によりPVBへと異性化することが知られている[10)]．BVとPCBの構造を比較すると，BVでは$C3^1$と$C3^2$の間に二重結合が存在し，PCBでは$C3$と$C3^1$の間に二重結合が存在している（**図1**）．フィトクロムの場合，N末端側のCys残基がBVの$C3^2$位に共有結合しており，GAFドメイン内部のCys残基（Canonical Cys）がPCBの$C3^1$位に共有結合している．CBCRに関してはGAFドメイン内部のCanonical Cys残基しか保存されておらず，結合色素もPCBとそれから派生するPVBのみが長らく知られていた．しかしながら，我々は近年，長波長の遠赤色光を光合成に用いる特殊なシアノバクテリア*Acaryochloris marina*から，GAFドメイン内部のCanonical Cys残基がBVに結合し，遠赤色光と橙色光の間で光変換するCBCRを発見した（**図3**，**図S1**）[8),9)]．天然のタンパク質で，GAFドメイン内部のCanonical Cys残基を介してBVを結合する分子は，これが初めての報告である．このCBCRにおいて，Canonical Cys残基がBVの$C3^1$と$C3^2$のどちらに共有結合しているかは不明である．現在，それを明らかにするためにX線結晶構造解析を

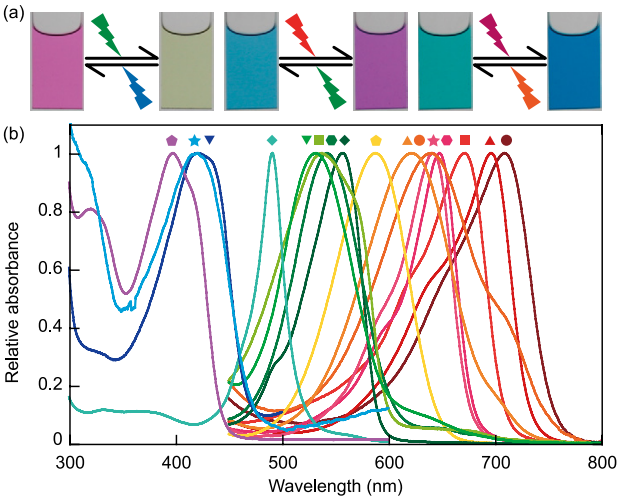

図3
様々なCBCRの光変換．（a）緑／青色光変換，赤／緑色光変換，遠赤／橙色光変換型CBCRの色変化．（b）我々が見出している主なCBCRの2つの光吸収型の吸収スペクトルを，ピークの値で標準化して並べた図．同じタンパク質の2つの吸収型のピークの上に同じ図形が配置されている．

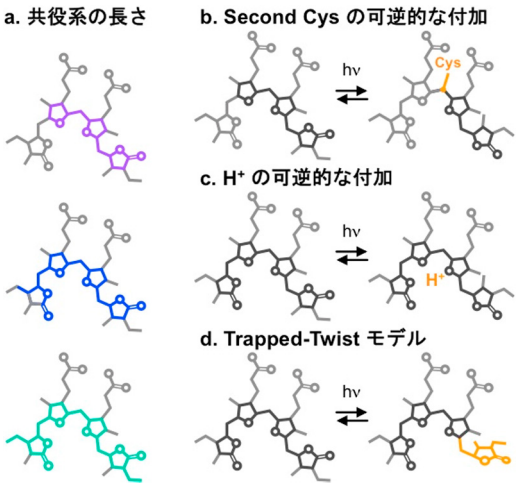

図4
主な色調節機構．（a）共役系の長さが異なる結合色素種．（b）Second Cys残基の可逆的な付加．（c）H^+の可逆的な付加．（d）Trapped-Twistモデル．

進めている．

第二に，光変換過程で第二の Cys 残基（Second Cys）が過渡的に色素と共有結合を形成することで色調節する仕組みが，複数の CBCR サブファミリーにおいて発見されている（**図 4b**）[10),11)]．どの場合でも，光変換過程で B 環と C 環の間の炭素 C10 に Second Cys 残基が脱着する．共役系が中央で切断されてしまうため，大幅に共役系が短くなり，青色光を吸収するようになる．興味深いことに，異なる系統に属する CBCR サブファミリーにおいて，一次配列上で異なる位置に存在する Second Cys 残基が，どれも C10 に脱着することが分かっている．CBCR の分子進化の過程で，複数回，Second Cys 残基を介した色調節機構が新たに生じたことが強く示唆される．

第三に，光変換過程で色素にプロトンが過渡的に脱着することで色調節する仕組みが，特定の CBCR サブファミリーにおいて発見されている（**図 4c**）[12)]．プロトンが C 環に付加することで共役系が安定し長波長シフトすることができ，プロトンが脱離することで共役系が不安定化し短波長を吸収することができる．色素周辺のアミノ酸の変異導入解析により，プロトンの脱着に重要なアミノ酸も同定されている．

第四に，色素の A 環や D 環が BC 環平面に対して高度に捩れることで脱共役し（Trapped-twist モデル），短波長シフトする仕組みも，複数の CBCR サブファミリーにおいて発見されている（**図 4d**）[13)]．

これら 4 つの色調節機構が様々に組み合わさることで，**図 2** に示すような分光特性の多様化が生じている．これらの CBCR に共通する特徴として，① GAF ドメインのみが色素結合と光変換に必要である，② A 環と安定的な共有結合を形成する Canonical Cys 残基を持つ，③光変換過程で *Z*/*E* 異性化を示す，④ 2 つの光吸収型が共に暗状態で安定であり，2 つの光質の量比を感知する，という 4 つの特徴が挙げられていた．しかしながら，ごく最近の研究により，これらの共通の特徴から外れた例外的な分子が，続々と発見されている．まずは，②の例外として，Canonical Cys 残基を持たず，代わりに Second Cys 残基が安定的に色素に結合し光受容体として働く分子が発見されている[14)]．また，③の例外として，*Z*/*E* 異性化を起こさずに光変換を示す分子も同定されている[13)]．この分子の場合，Second Cys 残基が色素に安定的に結合しているが，この Second Cys 残基の近傍アミノ酸に変異を導入することで，*Z*/*E* 異性化を示すようになることも分かっている．最後に，④の例外として，片方の光吸収型が暗状態で安定であり，もう片方の光吸収型から暗状態で速やかに元に戻ってしまう分子が，複数の CBCR サブファミリーから発見されている[13)-15)]．このような光受容体の場合，2 つの光質の量比を感知するのではなく，特定の光質の光量を感知することができる．これまでに，赤・緑・青色光それぞれの光量を感知する光受容体が同定されている．つまり，現状では，① GAF ドメインのみが色素結合と光変換に必要である，という特徴のみが CBCR の光感知に関する共通の特徴といえるだろう．

一方，**図 2** に示すように，C 末端側の酵素活性領域は，それぞれのタンパク質によって異なっている．これまでに，GAF ドメインの光感知により，ヒスチジンキナーゼ，c-di-GMP（cyclic diguanosine monophosphate）合成・分解酵素や，cAMP（cyclic adenosine monophosphate）合成酵素の活性が制御されていることが明らかとなっている．これらの酵素活性が光によって制御されることで，光依存的細胞凝集，補色順化，走光性といった細胞レベルの光応答現象が最終的に発現する．中でも，細胞凝集と補色順化の分子機構が詳細に解明されている．前者においては，青／緑色光感知型 CBCR が，青色光依存的に c-di-GMP を合成し，c-di-GMP がセルロース合成酵素の C 末端領域に結合しセルロース合成を促進することで，細胞が凝集する[16)]．後者においては，緑／赤色光感知型 CBCR が，緑色光依存的に自己リン酸化し，下流の転写因子にリン酸を転移することで，光捕集遺伝子の転写を促進する[17)]．

5. 応用利用

フィトクロムは古典的に知られている光受容体であるため，フィトクロムを土台として，バイオイメージングやオプトジェネティクスに資する分子の開発が進んでいる．中でも，BV は上述したように，天然の開環テトラピロール色素の中で最も長波長の光質を吸収し，BV を結合するバクテリオフィトクロムも遠赤色光領域である 700 nm と 760 nm の間で可逆的な光変換を示す．これらの遠赤色光は，動物組織中に存在するヘムやメラニンによってあまり吸収されない光質であるため，非侵襲的に動物個体の奥深い組織へと照射することが可能である．さらに BV は哺乳類を含んだ様々な生物種において，ヘムの分解産物として存在する内在性色素である．以上より，BV を結合するバクテリオフィトクロムに特に注目が集まり，開発が進められている[18)-20)]．開発対象としては，オプトジェネティクス（光遺伝学）での利用に向けた光スイッチと，ライブセルイメージングでの利用に向けた蛍光プローブが主である．光変換する分子であるため，オプトジェネティクスへの利用としては，下流のシステムへ

どのように繋ぐか，という部分が肝になる．これまでに，特定の酵素活性を制御する酵素ドメインとのキメラタンパク質を作出し，その酵素活性を光で制御するシステムの開発と[18]，光依存的に相互作用する分子に着目し，制御したい分子の分割体を光受容体と相互作用分子のそれぞれに融合することで，その分子の活性を制御するシステムの開発がされている[19]．一方，蛍光プローブの開発としては，ランダム変異によって，光変換を示さず蛍光量子収率の高い分子の取得が行われた[20]．さらに，フィトクロムの場合，色素結合と適切な光変換にはPAS，GAF，PHYドメインが必要でありサイズが大きいため，分子サイズを小さくする開発も進められ，GAFドメインのみでBVを結合し蛍光を発する分子の開発に成功している[20]．CBCRに関しては，PCBを結合した分子を基にした開発がこれまで主に進められてきたが[9), 15)]，我々が近年，BVを結合するCBCRの発見に成功したため[8), 9)]，それに基づいた開発に現在，着手している．特に，光変換が必須である光スイッチの開発においては，フィトクロムと比べて分子サイズという点で大きな強みを有しているため，オプトジェネティクスツールの開発に注力している．

6. おわりに

CBCRの分光特性が最初に報告されてから，15年近くが経過した．当初の発見現場に，著者（成川）が学生時代に居合わせた頃は，全てが手探りであり，結合する色素も光変換機構も不明なことばかりであった．翻って現在では，複数の色素結合領域の構造も解明され，色調節機構の詳細も解明されつつあり，隔世の感を禁じ得ない．その一方で，未だ特異な分光特性を有するCBCRの報告が続々と行われている．これら天然分子と変異導入やキメラタンパク質作出による人工分子を活用した基礎・応用研究がさらに発展するだろう．日本では，CBCRを扱う研究者の数は多くはなく，最初の発見者である池内昌彦教授と，その系譜の研究者がほとんどである．本総説をきっかけに，CBCRの面白さに触れ，新たに研究対象に加える読者が出てくることを期待しつつ，筆を置きたい．

文　献

1） Rockwell, N. C., Lagarias, J. C.（2010）ChemPhysChem **11**, 1172-1180. DOI: 10.1002/cphc.200900894.
2） Rockwell, N. C. *et al.*（2014）Proc. Natl. Acad. Sci. USA **111**, 3871-3876. DOI: 10.1073/pnas.1401871111.
3） Yoshihara, S. *et al.*（2004）Plant Cell Physiol. **45**, 1729-1737. DOI: 10.1093/pcp/pch214.
4） Narikawa, R. *et al.*（2013）Proc. Natl. Acad. Sci. USA **110**, 918-923. DOI: 10.1073/pnas.1212098110.
5） Song, C. *et al.*（2015）J. Phys. Chem. B **119**, 9688-9695. DOI: 10.1021/acs.jpcb.5b04655.
6） Ishizuka, T. *et al.*（2007）Plant Cell Physiol. **48**, 1385-1390. DOI: 10.1093/pcp/pcm106.
7） Narikawa, R. *et al.*（2008）J. Mol. Biol. **380**, 844-855. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.05.035.
8） Narikawa, R. *et al.*（2015）Sci. Rep. **5**, 7950. DOI: 10.1038/srep07950.
9） Fushimi, K. *et al.*（2016）Front. Microbiol. **7**, 588. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00588.
10） Ishizuka, T. *et al.*（2011）Biochemistry **50**, 953-961. DOI: 10.1021/bi101626t.
11） Narikawa, R. *et al.*（2014）Biochemistry **53**, 5051-5059. DOI: 10.1021/bi500376b.
12） Hirose, Y. *et al.*（2013）Proc. Natl. Acad. Sci. USA **110**, 4974-4979. DOI: 10.1073/pnas.1302909110.
13） Hasegawa, M. *et al.*（2018）J. Biol. Chem. **293**, 1713-1727. DOI: 10.1074/jbc.M117.816553.
14） Fushimi, K. *et al.*（2016）Biochemistry **55**, 6981-6995. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00940.
15） Fushimi, K. *et al.*（2017）Photochem. Photobiol. **93**, 681-691. DOI: 10.1111/php.12732.
16） Enomoto, G. *et al.*（2015）Proc. Natl. Acad. Sci. USA **112**, 8082-8087. DOI: 10.1073/pnas.1504228112.
17） Hirose, Y. *et al.*（2008）Proc. Natl. Acad. Sci. USA **105**, 9528-9533. DOI: 10.1073/pnas.0801826105.
18） Gasser, C. *et al.*（2014）Proc. Natl. Acad. Sci. USA **111**, 8803-8808. DOI: 10.1073/pnas.1321600111.
19） Redchuk, T. A. *et al.*（2017）Nat. Chem. Biol. **13**, 633-639. DOI: 10.1038/nchembio.2343.
20） Oliinyk, O. S. *et al.*（2017）Int. J. Mol. Sci. **18**, 1691. DOI: 10.3390/ijms18081691.

伏見圭司

伏見圭司（ふしみ　けいじ）
静岡大学理学部生物科学科特任助教
2012年静岡大学創造科学技術大学院自然科学系教育部バイオサイエンス専攻博士課程修了，同年静岡大学教育学部協力研究員，13年日本分析化学専門学校専任講師，14年静岡大学理学部生物科学科学術研究員，17年より現職．
研究内容：光受容体の機能解明・改変
連絡先：〒422-8529 静岡市駿河区大谷836
E-mail: fushimi.keiji@shizuoka.ac.jp
URL: http://narikawa-lab.wixsite.com/narikawa-laboratory

成川　礼

成川　礼（なりかわ　れい）
静岡大学理学部生物科学科講師（PI）
2006年東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻博士課程修了，同年東京大学大学院総合文化研究科博士研究員，07年東京大学大学院総合文化研究科助教を経て，14年より現職．11-15年科学技術振興機構さきがけ研究者（兼任）
研究内容：光合成生物の光応答
連絡先：同上
E-mail: narikawa.rei@shizuoka.ac.jp
URL: 同上