

2002年度

神奈川大学共同研究奨励助成研究成果報告

研究課題名

光合成とゲノム進化から探る植物の環境適応機構

研究代表者

井上和仁 神奈川大学・理学部・生物科学科・助教授

研究分担者

鈴木季直 神奈川大学・理学部・生物科学科・教授

鈴木祥弘 神奈川大学・理学部・生物科学科・専任講師

大塚一郎 神奈川大学・工学部・一般教育生物・教授

朝倉史明 神奈川大学・工学部・一般教育生物・専任講師

研究支援者

中原昌明 神奈川大学・総合理学研究所・客員研究員

はじめに

地球上の生態系は太陽光をエネルギー源にした植物の光合成による一次生産に支えられている。循環型エネルギー資源の開発・地球環境保全など人類が抱えている課題の解決のために、植物の持つ機能を解析し、それを生物工学的に利用することは緊急の研究課題である。神奈川大学には、植物科学の分野で特色ある研究を展開している教員が、横浜キャンパスの工学部一般教育と湘南ひらつかキャンパスの理学部に所属しており、これまでも、両学部の関係教員は教育研究面で交流を積み重ねてきた。本研究課題は、そうした両学部にまたがって所属している教員のこれまでの教育研究交流とそれぞれの研究成果を基に、植物特有の機能である光合成と植物ゲノムの進化過程を解析し、様々な地球環境に適応して生育している植物の環境適応機構を明らかにすることを目的とした。研究期間は1年であったため、得られた成果には限りがあったが、今後の神奈川大学における光合成機能を利用した研究の展開の可能性を示す事ができた。また、本研究と相前後して、文部科学省の教育研究装置整備費補助により湘南ひらつかキャンパスに植物育成実験棟が建設され、また、同省のハイテク・リサーチ・センター整備事業による分子・生物フォトンクスセンターも竣工することとなった。これらの施設の本格稼動により、本学における生物科学、植物科学研究の一層の発展を目指す上でも、本研究はいわば”呼び水的な”ものになったのではないかと考えている。本研究に多大な御支援をいただいた本学関係者に厚く感謝の意を表したい。

## I. 遺伝子解析による光合成進化

### —光合成遺伝子の系統解析から浮かび上がる黎明期の光合成—

地球上のほとんどの生物は、植物が作る有機物によってその生活を支えられている。太陽エネルギーを基盤にした光合成による食物連鎖は地球誕生後いつ頃から始まり、そして、最初の光合成生物はどのようなものだったのだろうか。これまで、最初の光合成生物についてはいろいろな説が唱えられていた。まず、葉緑体の起源と考えられているラン色細菌（藍藻）が持つクロロフィル *a* が、バクテリオクロロフィル *a* よりも簡単な経路で合成されることから、ラン色細菌が光合成細菌に先んじて登場したという説が 1965 年に S. Granick によって提唱されていた。また、16S リボソーム RNA による分子系統樹では緑色非硫黄細菌が真正細菌のなかでもかなり初期に分岐し、緑色硫黄細菌、ヘリオバクテリア、ラン色細菌、紅色細菌はずっと後になって分岐してくる。一方、熱ショックタンパク質による系統樹では、ヘリオバクテリアが最も初期に登場したということになり、用いる分子指標によってまったく異なる系統関係が示される。

われわれは、光合成の初期進化を考える上で、光合成に欠くことのできない色素であるクロロフィル・バクテリオクロロフィルの合成に関係する酵素を分子指標に用いて系統関係を論ずるのが最も適切と考えた。紅色細菌ではバクテリオクロロフィル *a* の合成過程に関係する数多くの酵素遺伝子が特定されていた。そこで、紅色細菌でこれらの遺伝子を破壊した株に別の光合成原核生物の遺伝子ライブラリーを導入後、バクテリオクロロフィル *a* の合成能が回復した株に含まれるプラスミドを解析し、多数の新規の遺伝子を単離した。この方法は機能的相補とよばれ、一種の遺伝子ライブラリーのスクリーニング法である。また、PCR によって紅色細菌などで明らかになっている遺伝子と相同の遺伝子も得た。このようにして新規に得た遺伝子とデータベース上に登録されている遺伝子を集め、光合成原核生物と葉緑体の系統関係を詳しく調べた。図 1 はクロロフィル・バクテリオクロロフィル合成の途中の段階でプロトクロロフィリドをクロロフィリドに還元する酵素のサブユニット遺伝子 *bchB/chlB* の系

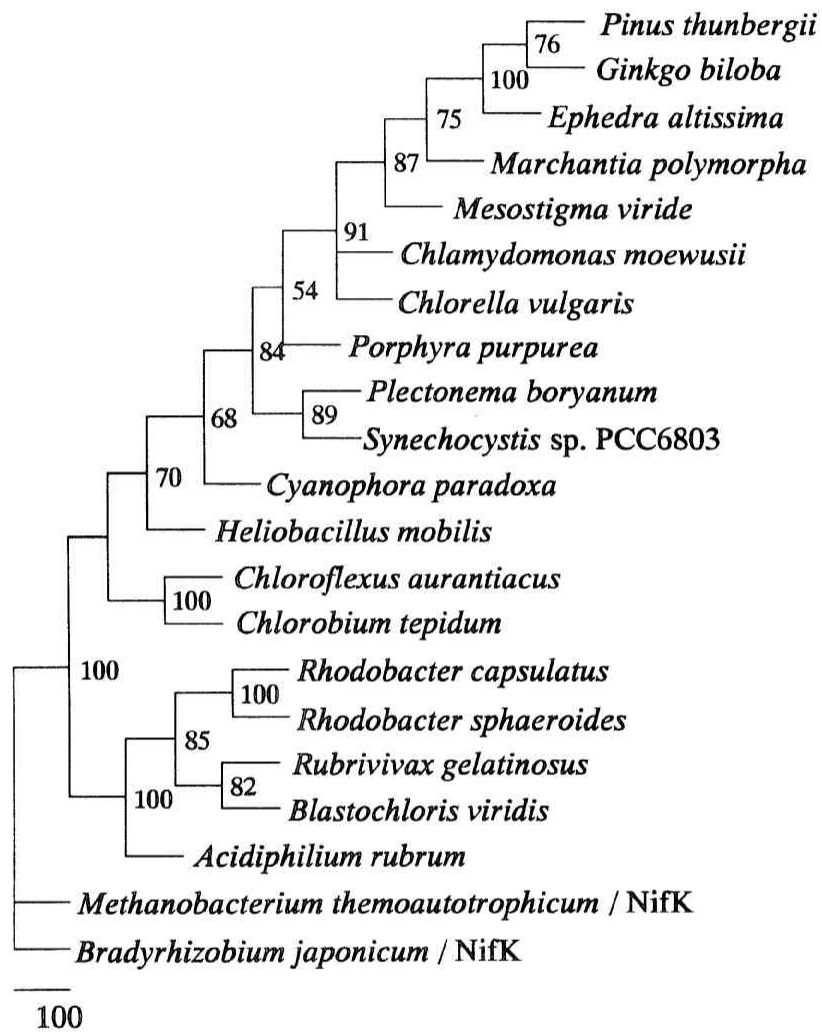


図1 光非依存型プロトクロロフィリド還元酵素のサブユニット **BchB/ChlB** のアミノ酸配列に基づいて最大節約法によって作製した分子系統樹。系統樹上の数値はブートストラップ値を示す。実線の長さは相対的遺伝的距離を示す。

統樹である。この系統樹では、まず、紅色細菌のグループが最も初期に分岐し、次に、緑色非硫黄細菌と緑色硫黄細菌の共通祖先が分岐し、続いて、ヘリオバクテリアとラン色細菌・葉緑体が分岐してくる。これと同様の系統関係は、一部には例外が認められるものの、色素合成に関係する大多数の酵素に見られた。色素合成系から光合成の初期進化を考えると、まず、バクテリオクロロフィル *a* を持つ生物（紅色細菌の祖先）が最初に光合成の能力を獲得し、これにアンテナ色素としてバクテリオクロロフィル *c* が付け加わった生物（緑色非硫黄細菌と緑色硫黄細菌の共通祖先）が登場し、クロロフィル *a* と化学構造の良く似たバクテリオクロロフィル *g* を持つヘリオバクテリア、そして、最終的にクロロフィル *a* を持つラン色細菌が出現したというシナリオが浮かんでくる。

図1の系統樹を作製する上で、アウトグループの遺伝子として窒素固定系のニトロゲナーゼ(*nif*)のサブユニット遺伝子を用いた。クロロフィル *a* やバクテリオクロロフィル *a* の合成系は、中間体であるクロロフィリド *a* の途中までは共通している。クロロフィリド *a* はその前駆体であるプロトクロロフィリド *a* の D 環の C-17 位と C-18 位の間での二重結合が、プロトクロロフィリド還元酵素によって還元されて生じる。プロトクロロフィリド還元酵素には光を必要としないもの(DPOR) と、光を必要とするもの (LPOR) の 2 種類がある。光非依存型の酵素 DPOR は紅色細菌とシアノバクテリアに存在する。一方、光依存型の酵素はシアノバクテリアと葉緑体においてその存在が報告されているが、紅色細菌からは見つかっていない。これまでのところ DPOR はどの光合成生物からも、活性を保持した状態で単離、精製された例は数例しかない。そのため、その機能には不明の点が多いが、本酵素を構成する 3 つのサブユニット BchL、BchN、BchB のアミノ酸配列がニトロゲナーゼの 3 つのサブユニット NifH、NifD、NifK と高い相同性を示すことから、これらの両酵素間に構造と機能上の関連性があるのではないかと指摘がある (図2)。ニトロゲナーゼは  $N_2$  や  $C_2H_2$  を基質として、これらの N 原子間や C 原子間の不飽和結合を還元する。一方、DPOR はプロトクロロフィリドの C-17 位、C-18 位間の不飽和結合を還元するので、酵素作用の面からも類似性が認められる。ニトロゲナーゼでは NifH 自身が二量体を形成し、4Fe-4S 型の鉄硫黄センターを 1 個結合している。*R. capsulatus* の BchL にも鉄硫黄センターを結合しうるシステイン残

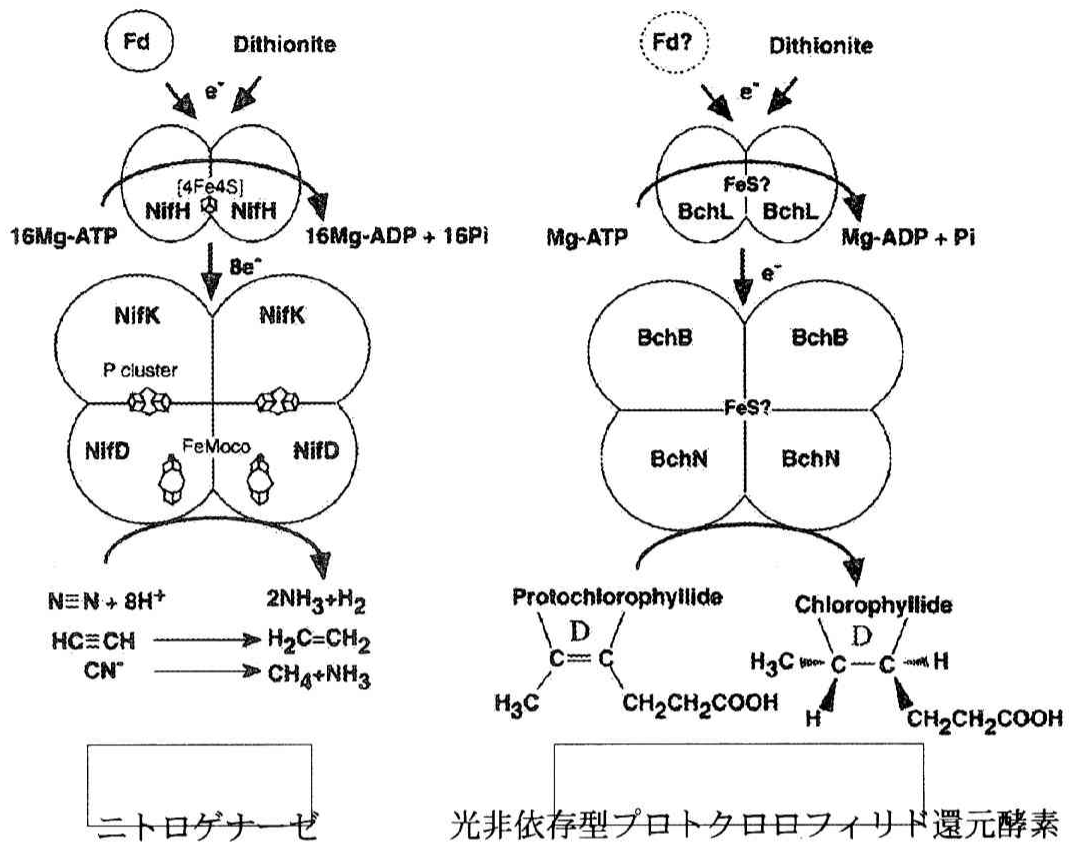


図2 ニトロゲナーゼと光非依存型プロトクロロフィリド還元酵素複合体の構造モデル

基がみられ、本研究で明らかにされた *C. aurantiacus* の *bchL* から予想されるアミノ酸配列にもこれらのシステインが保存されている。またニトロゲナーゼは基質として Mg-ATP を用い、NifH に ATP を結合するアミノ酸の配列モチーフ (GXXXXGKS) が存在する。*R. capsulatus* の BchL、*C. aurantiacus* の BchL にも同様のモチーフが見られる。本研究で *R. capsulatus* の *bchL* を *R. capsulatus* の強力なプロモーターである *puc* プロモーターの下流につなぎ、さらに *bchL* とグルタチオン S-トランスフェラーゼとの融合蛋白質を *R. capsulatus* 内で発現後、精製した BchL 標品の ESR シグナルを測定したところ 4Fe-4S 型の鉄硫黄センター特有のシグナルが検出された。今後、この酵素がどのような補欠分子団を用いているのかその解析が待たれる。酸素発生型光合成を行なうシアノバクテリアや被子植物以外の葉緑体には DPOR と光を必要とする LPOR の両方の酵素系を持つ。被子植物に至っては DPOR を欠き LPOR だけを持っている。酸素発生型光合成生物の進化の過程で LPOR が獲得されると、DPOR は次第に LPOR の補助的な機能しか果たさなくなり、被子植物では DPOR そのものが失われたとも考えられる。

さらに興味深いことに、バクテリオクロロフィル *a* 合成系でクロロフィリド *a* を還元し、バクテリオクロロフィリド *a* を作るクロロフィリド *a* 還元酵素の 3 つのサブユニット BchX、BchY、BchZ は、DPOR の BchB、BchN、BchL とニトロゲナーゼの NifK、NifD、NifH とそれぞれ相同性が高い。以上の事実から次のような仮説が提唱できる。真正細菌が分岐後、ニトロゲナーゼの遺伝子の重複が起こり、重複した一方の遺伝子に変異を受け、基質特異性が変わって DPOR が生じた。この初期の過程で、DPOR の基質特異性は現存の光合成生物が持っている DPOR に比べて低く、プロトクロロフィリドの B 環の C-7、C-8 位の不飽和結合と D 環の C-17、C-18 位不飽和結合を区別できずに還元したので、光合成の成立当初から既にバクテリオクロロフィル *a* が合成されていたという仮説である。現在、ニトロゲナーゼに関しては研究がなり進みその立体構造も明らかになっているが DPOR はようやく部分的な活性を持つ酵素の精製がされた段階である。また、クロロフィリド *a* 還元酵素に関しては、そのサブユニットの遺伝子が特定されただけで、酵素学的な研究はまったく進んでいない。今後、DPOR とクロロフィリド *a* 還元酵素の酵素学的な研究を進

め、ニトロゲナーゼとの比較生化学的な研究により、この仮説が検証されるだろう。

## 文献

Barker, W. C. and Dayhoff, M. O. (1977) Evolution of lipoproteins deduced from protein sequence data. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 57: 309-15.

Burke, D. H. Hearst, J. E. and Sidow, A. (1993a) Early evolution of photosynthesis: clues from nitrogenase and chlorophyll iron proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90: 7134-7138.

Dean, D. R., Bolin, J. T. and Zheng, L. (1993) Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis, *J. Bacteriol.* 175: 6737-6744.

Doolittle, W. F. (1999) Phylogenetic classification and the universal tree, *Science* 284: 2124-2128.

Forreiter, C and Apel, K. (1993) Light-independent and light-dependent protochlorophyllide-reducing activities and two distinct NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase polypeptides in mountain pine (*Pinus mugo*), *Planta* 190: 536-545.

Fujita, Y. and Bauer, C. E. (2000) Reconstitution of light-independent protochlorophyllide reductase from purified bchL and BchN-BchB subunits. *In vitro* confirmation of nitrogenase-like features of a bacteriochlorophyll biosynthesis enzyme, *J. Biol. Chem.* 275: 23583-8.

Fujita, Y. (2001) Chlorophylls, In: *Encyclopedia of Life Sciences*, edited by Keith, R., Macmillan Reference, London:

Granick, S. (1965) Evolution of heme and chlorophyll. in: *Evolving Genes and Proteins*, edited by V. Bryson and H. J. Vogel, Academic Press, New York, pp. 67-88.



Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions, *DNA Res.* 3: 109-136.

Kohchi, T., Shirai, H., Fukuzawa, H., Sano, T., Komano, T., Umesono, K., Inokuchi, H., Ozeki, H. and Ohyama, K. (1988) Structure and organization of *Marchantia polymorpha* chloroplast genome. IV. Inverted repeat and small single copy regions, *J. Mol. Biol.* 203: 353-372.

Ludden, P. W. and Roberts, G. P. (1995) The biochemistry and genetics of nitrogen fixation by photosynthetic bacteria, in: *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, edited by R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. bauer, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 929-947.

Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H. and Ozeki, H. (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA, *Nature* 322: 572-574.

Pace N. R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science.* 276: 734-740.

Reinbothe, S. and Reinbothe, C. (1996) Regulation of chlorophyll biosynthesis in angiosperms, *Plant Physiol.* 111: 1-7.

Sakurai, H., Kusumoto, N. and Inoue, K. (1996) Function of the reaction center of green sulfur bacteria, *Photochem. Photobiol.* 64: 5-13.

Scheer, H. (1991) Structure and occurrence of chlorophylls, in: Chlorophylls, edited by Scheer, H., CRC Press, Florida, pp. 3-30.

Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution, *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.

Woese, C. R., Kandler, O. and Wheelis, M. L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4576-4579.

Xiong, J., Inoue, K. and Bauer, C. E. (1998) Tracking molecular evolution of photosynthesis by characterization of a major photosynthesis gene cluster from *Heliobacillus mobilis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 14851-14856.

Xiong, J., Fischer, W. M., Inoue, K., Nakahara, M. and Bauer, C. E. (2000) Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis, *Science*. 289: 1724-1730.

中原昌明 (2001) 機能的相補によるクロロフィル生合成系遺伝子の同定と単離および分子進化に関する研究。神奈川県立大学大学院理学研究科 博士論文