

「クロロフィル合成から見た光合成生物の環境適応と多様化に関する研究」

生態環境科学専攻 生物適応機構学講座
博士課程2年 永田 望
指導教官 田中 歩

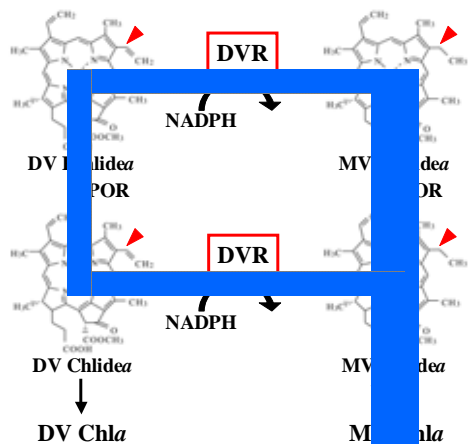
背景

海洋に生育している光合成生物は光合成細菌、ラン藻、緑藻、紅藻など多岐にわたり、その生育領域も光環境によって多様化している。

ラン藻 *Prochlorococcus* は温暖な外洋域に多く生育し、CO₂ 固定を担う重要な基礎生産者である。また、*Prochlorococcus* は海表面から水深約 150~200m までの多様な光環境に適応している。*Prochlorococcus* が他の海洋に生育する光合成生物よりも幅広い領域に生育できる理由は、*Prochlorococcus* 特有の光合成色素であるジビニルクロロフィル *b* にあると考えられる。*Prochlorococcus* が主に生育している水深 70m 付近の光環境は非常に苛酷で、短波長側の青色の光しか到達しない。しかし、クロロフィルの中でもジビニルクロロフィル *b* はこの光を効率よく利用できる。このため *Prochlorococcus* は海洋で最も多い光合成生物となったと考えられる。現在、全海洋中での *Prochlorococcus* の基礎生産はおよそ 8% にもなり、海洋での一次生産者として重要な役割を担っている。このようなことから *Prochlorococcus* の進化を明らかにすることは、初期の地球環境を作り上げてきた光合成生物全体を理解する上で大変重要であると考えられる。

Prochlorococcus 以外の生物はモノビニルクロロフィルを利用していることから、*Prochlorococcus* は 3'-8-ジビニルプロトクロロフィリド *a* 8-ビニルレダクターゼ (DVR) を光環境への適応と進化の過程で失ったと考えられる。しかし本遺伝子は単離されていないため、その進化の過程も明らかにされていない。

本研究ではシロイヌナズナの DVR 遺伝子を単離し、分子系統学解析を行うことによって *Prochlorococcus* がこの遺伝子を失ったことを明らかにする。さらに、光合成生物が光環境への適応と多様な進化の過程を明らかにすることを目的としている。



WT *dvr*

ジビニルクロロフィル合成経路

DVPchlidea は DVR によって MVChl へと合成される (青矢印)。
Prochlorococcus は DVR 遺伝子を失ったために光合成色素として DVChl を利用するようになったと考えられる。

左：シロイヌナズナ野生株
右：ジビニルクロロフィルを蓄積するシロイヌナズナ変異株

結果

<ジビニルクロロフィルを蓄積するシロイヌナズナ変異株 (*dvr*) の原因遺伝子の同定>

昨年度に単離した、EMS 処理による突然変異株、ジビニルクロロフィルを蓄積するシロイヌナズナ変異株 (*dvr*) の、原因遺伝子の同定を行った。*dvr* のポジショナルクローニングには、960 個体を用いた。その結果、原因遺伝子は、シロイヌナズナ 5 番染色体の AT5G18660 で、葉緑体移行シグナルは TargetP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)による解析で 49 アミノ酸であると予想された (図 1-A)。

AT5G18660 は 417 アミノ酸からなり、EMS 処理による一塩基置換によって、333 番目のアミノ酸を

プロリンからロイシンへ変換していた。また、膜貫通予測プログラムの SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html>) を用いた解析で、C 末端側に 1 回膜貫通ドメインを持つと予想された (図 1-B)。

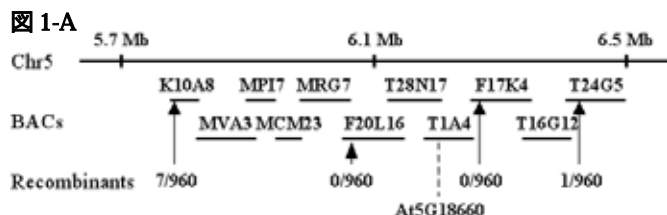
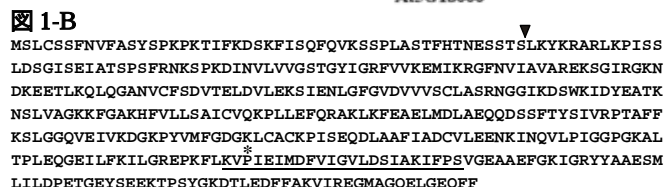


図 1-A *dvr* 変異株のポジショナルクローニングの結果。原因遺伝子は T1A4 BAC クローン上の AT5G18660 であった。

図 1-B AT5G18660 のアミノ酸配列。矢印は葉緑体移行シグナルの切断部位を示している。河川部分は予想された膜貫通ドメインを示している。* は EMS 処理によって変異が生じたアミノ酸を示している。



また、*dvr* 変異体に野生型の AT5G18660 を導入すると、形質転換体の表現型は相補され、野生型を示した (図 2-A)。クロロフィルの構成もジビニル型からモノビニル型へと変わった (図 2-B)。以上のことから、*dvr* 変異株の原因遺伝子は AT5G18660 であることが決定した。

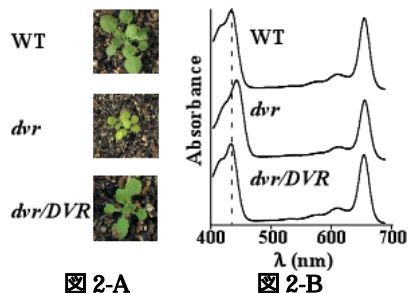


図 2-A *dvr* 変異株に AT5G18660 遺伝子を導入した植物体の写真。図 2-B *dvr* 変異株に AT5G18660 遺伝子を導入した植物体のクロロフィル a の吸収スペクトル。上から、シロイヌナズナの野生株。ジビニルクロロフィルを蓄積する *dvr* 変異株。 *dvr* 変異株に AT5G18660 遺伝子を導入した株。ジビニルクロロフィルを蓄積する *dvr* 変異株。 *dvr* 変異株に AT5G18660 遺伝子を導入した株。

< DVR 活性測定 >

変異株がジビニルクロロフィルを蓄積することから、AT5G18660 はクロロフィル合成酵素の 3'-8-ジビニルプロトクロロフィリド α 8-ビニルレダクターゼ (DVR) をコードしていると考えられた。そこで、AT5G18660 の翻訳産物が DVR 活性を持つかを、AT5G18660 を大腸菌発現用ベクターの pET30 に導入し、大腸菌 BL21 で発現させた菌破砕液を用いて測定した。DVR 活性の測定方法は Kolossov と Rebeiz (2001) の論文を引用し、基質としてジビニルクロロフィリドを用いて行った。反応後、それぞれの色素を回収し、HPLC によって色素の同定をした。その結果、ジビニルクロロフィリドはモノビニルクロロフィリドへと還元された。以上のことから、AT5G18660 は DVR 遺伝子であることがわかった。

参考文献 : Kolossov, V.L. and Rebeiz, C.A. (2001). Chloroplast biogenesis 84: solubilization and partial purification of membrane-bound [4-vinyl] chlorophyllide a reductase from etiolated barley leaves. *Anal Biochem.* 295, 214-219

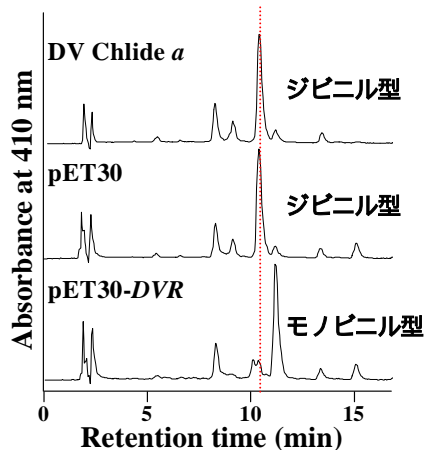


図 3 AT5G18660 発現タンパク質の DVR 活性を測定した結果。上から、基質に使用したジビニルクロロフィリド。ジビニルクロロフィリドと、ベクターの pET30 を大腸菌で発現させた菌破砕液とを反応させたコントロール。ジビニルクロロフィリドと、AT5G18660 遺伝子を導入した pET30 を大腸菌で発現させた菌破砕液とを反応させた色素。

<DVR 遺伝子の進化系統樹>

DVR 遺伝子がどのような生物に存在しているかを調べるため、DVR 遺伝子のアミノ酸配列と紅色細菌、緑色硫黄細菌、ラン藻、紅色植物、緑色植物のアミノ酸配列との BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) による同源性検索を行い、系統樹を作成した。また、The National Center for Biotechnology Information (NCBI), Cyanobase, DOE Joint Genome Institute BLAST WWW servers and a server of the *Rhodobacter sphaeroides* genome project on the web site of The University of Texas – Houston Health Science Center の BLAST も利用した。系統樹の作成には CLUSTALX を用いた。その結果、数種のモノビニルクロロフィルを光合成色素として利用する生物の中に、DVR 遺伝子のホモログを持たないものが存在した(図 4-A)。さらに、DVR 遺伝子を持たない *Prochlorococcus* と、*Prochlorococcus* と最も近縁種の海洋性 *Synechococcus* WH8102 のゲノム上での DVR 遺伝子周辺の遺伝子の並び方を比較した。その結果、周囲の遺伝子は保存されているのに対し、DVR 遺伝子は *Synechococcus* WH8102 から *Prochlorococcus* への進化の過程で失われたことがわかった(図 4-B)。

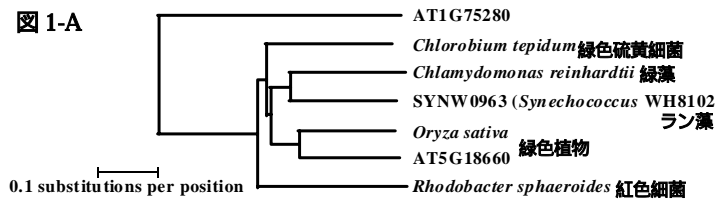
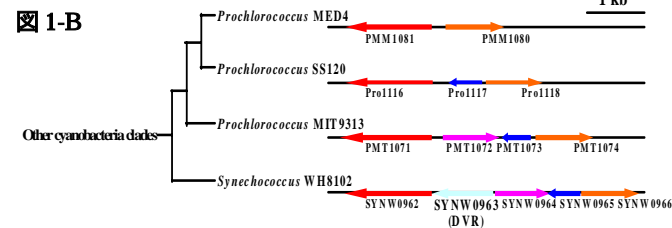
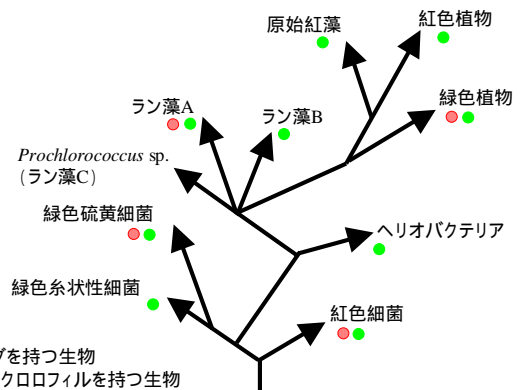


図 1-A DVR 遺伝子の進化系統樹。
 図 1-B *Synechococcus* WH8102 と 3 種の *Prochlorococcus* の 16S rRNA を用いた進化系統樹とゲノムの比較。
Synechococcus WH8102 と *Prochlorococcus* のゲノム上で、同じ色の矢印は *Synechococcus* WH8102 のホモログを示している。



今後の課題と展望

本年度の研究で、クロロフィル a 合成経路の最後の酵素である 3'-ジビニルプロトクロロフィリド a 8-ビニルレダクターゼ (DVR) を決定することができた。しかし、光合成色素としてモノビニルクロロフィルを利用する光合成生物の中に、DVR 遺伝子のホモログが存在しないものがあつた。例を挙げると、全ゲノム配列が決定されている、ラン藻 *Synechocystis* PCC6803 はモノビニルクロロフィルを利用する生物であるが、DVR 遺伝子のホモログは存在しなかつた。この結果から



DVR と同じ活性をもつ酵素が、少なくとも 2 種存在していると考えられる。今後の研究では、本研究で決定した DVR 遺伝子とは異なる配列の酵素を持つと予想される *Synechocystis* PCC6803 から、DVR と同様の活性を示す酵素遺伝子を単離することを予定している。そして、本酵素の研究によって、光合成生物が多様化した過程を明らかにしたいと考えている。さらに、プロクロロコッカス属が DVR 遺伝子をなくしたことによって得た、新しい色素への適応過程を実験的に再現することによって、光合成生物の光環境への適応と進化について考察できると考えている。

また、植物内でクロロフィル中間体は様々なシグナル伝達物質として働くという報告がある。そのため、DVR がクロロフィル合成で考えられる、どの中間体(プロトポルフィリン IX、Mg-プロトポルフィリン、Mg-プロトポルフィリンモノエチルエステル、ジビニルプロトクロロフィリド、ジビニルクロロフィリド、ジビニルクロロフィル)を基質としているかを明らかにする。

本酵素の今後の研究は、本研究分野の進展に重要であると考えている。

本年度の研究業績

論文

1. 著者: N.Nagata, R. Tanaka, S. Satoh, A. Tanaka

題名: Identification of a Vinyl Reductase Gene for Chlorophyll Synthesis in *Arabidopsis thaliana* and Implications for the Evolution of *Prochlorococcus* Species

掲載紙名: *The Plant Cell*.

年月: (2005) 17:233-40

発表

1. 発表者: 永田望、田中亮一、佐藤壮一郎、田中歩

題名: クロロフィル合成酵素 8-ビニルレダクターゼ遺伝子の同定と機能解析

学会名: 2004 年度大阪大学蛋白質研究所セミナー 葉緑体: 構築と分解のダイナミクス

場所: 大阪大学 蛋白質研究所

年月: 2004 年 11 月 11 日 ~ 12 日

発表形式: ポスター発表

2. 発表者: 永田望、田中亮一、佐藤壮一郎、田中歩

題名: クロロフィル合成酵素 8-ビニルレダクターゼ遺伝子の同定と機能解析

学会名: 2005 年度 植物生理学会

場所: 新潟コンベンションセンター

年月: 2005 年 3 月 26 日

発表形式: 口頭発表(予定)