

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19420

研究課題名(和文)代謝経路の誕生と進化

研究課題名(英文)Evolution of metabolic pathway

研究代表者

田中 歩(TANAKA, Ayumi)

北海道大学・低温科学研究所・特任教授

研究者番号：10197402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：Mg-脱離酵素の系統解析および酵素学的解析から、酵素の進化に関する以下のシナリオを提案した。Promiscuousな活性には揺らぎがあり、本来の活性より高いものも存在する。高いPromiscuousな活性を持った遺伝子が新しい生物に水平移動する。新しい生物ではPromiscuousな活性が生理的役割を担うことができる。その後基質特異性や様々な調節機構を獲得し酵素として確立する。一方、同じ酵素でも生物によって異なる機能を持つように進化することも示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新しい代謝経路の誕生は生物に新しい機能を付加し、生物の多様性と進化において中心的な役割を担ってきた。そのため、代謝経路を担う酵素が如何に誕生し進化してきたかは生物を理解する上で極めて重要な点である。一方、酵素は生物のみならず産業的にも大きな役割と可能性を秘めており、試験管内で酵素を進化させ、新しい有用な酵素を作出することが試みられている。本研究は酵素の多様な機能の源泉となっているPromiscuousな活性に揺らぎがあることを示した。これは酵素の進化や作出に関する新しい考え方を示したものであり、上記の研究に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：From phylogenetic and enzymological analysis of Mg-dechelating enzyme (SGR), the following scenarios for the evolution of the enzyme were proposed.

1. Promiscuous activity is fluctuating, and some activities are higher than the primary activity of the experts.
2. Genes with high promiscuous activity is horizontally transferred to a new organism.
3. Promiscuous activity can play a physiological role in the new organism.
4. Then the enzyme acquire substrate specificity and various regulatory mechanisms and the promiscuous activity becomes to be a primary activity and the new enzyme appears.

On the other hand, I also showed that the same enzyme evolved to have different functions depending on the organism.

研究分野：植物生理学

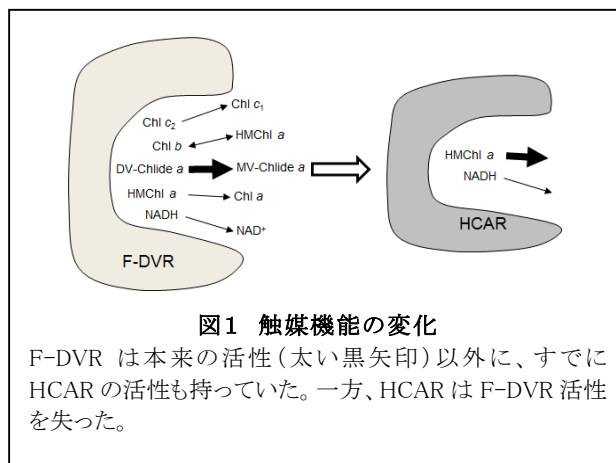
キーワード：進化 酵素 植物

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命活動とは、エネルギー代謝や物質代謝など多くの代謝のネットワークとも捉えることができる。新しい代謝経路の誕生は生物に新しい機能を付加し、生物の多様性と進化において中心的な役割を担ってきた。しかし、新しい代謝経路の誕生には、精巧に作られた複数の酵素の出現が必要なため、大変難しい過程だと考えられている。特に植物は、生体防御や環境適応に重要な役割を担っている数十万種の2次代謝物を作り出すことが知られている。しかしながら、「比較的短期間」でこのような多くの代謝経路を作り出すのは、特異的な酵素の出現という従来の考え方では説明できない。複雑で多様な代謝経路を実現するには、代謝経路の誕生進化は「極めて容易なプロセス」でなくてはならない。

従来、酵素は基質特異性と反応特異性が極めて高いと考えられてきた。私は、葉緑体の起源であるシアノバクテリア(ラン藻)のクロロフィル代謝酵素の一つである Divinyl reductase (F-DVR) の生化学的研究から、酵素が高い特異性を持つとの考えに疑問をもった(図1)。F-DVR は多様な基質を触媒し、しかも3つの異なった反応を触媒するが、シアノバクテリアの細胞では、その中の一つだけが生理的役割を担っている。これらの結果は、“酵素は基質特異性が高くなると反応速度が低下するため、酵素は細胞にとって邪魔にならない限り、反応特異性と基質特異性をできる限り広く保つような方向に進化している”との考えを支持している。いわゆる Promiscuous な活性が酵素の進化の原動力になっているとの考えである。この考えは、基質特異性と反応特異性が極めて高くなるように進化したという従来の酵素の考え方とは全く逆であるが、新しい酵素進化のモデルとして注目されている。



私は、酵素の広い特異性は、進化において新しい可能性を引き出すと考えた。シアノバクテリアが細胞内共生することで、緑色植物や紅藻、褐藻など新しいグループが誕生した。これらのグループはクロロフィル a-クロロフィル b 相互転換系や、クロロフィル c 合成系などの代謝経路を獲得し、新しいクロロフィルを合成するようになった。しかし、シアノバクテリアの F-DVR の潜在的な酵素活性を詳細に調べることによって、これらクロロフィル a-クロロフィル b 相互転換経路やクロロフィル c 合成経路の多くの部分が、すでにシアノバクテリアに存在していることがわかった。このことから、私は代謝経路の多くの部分が祖先の生物で潜在的に存在し、このことが多くの機能的な代謝経路の誕生を可能にした仕組みであると考えた。この考えをまとめると以下の通りである。

私は、酵素の広い特異性は、進化において新しい可能性を引き出すと考えた。シアノバクテリアが細胞内共生することで、緑色植物や紅藻、褐藻など新しいグループが誕生した。これらのグループはクロロフィル a-クロロフィル b 相互転換系や、クロロフィル c 合成系などの代謝経路を獲得し、新しいクロロフィルを合成するようになった。しかし、シアノバクテリアの F-DVR の潜在的な酵素活性を詳細に調べることによって、これらクロロフィル a-クロロフィル b 相互転換経路やクロロフィル c 合成経路の多くの部分が、すでにシアノバクテリアに存在していることがわかった。このことから、私は代謝経路の多くの部分が祖先の生物で潜在的に存在し、このことが多くの機能的な代謝経路の誕生を可能にした仕組みであると考えた。この考えをまとめると以下の通りである。

- (1) 酵素は本来、基質特異性と反応特異性が広いものである
- (2) この広い特異性のため、新しく獲得された代謝経路の一部はすでに祖先生物に存在していた
- (3) この潜在的代謝経路が新しい機能的な代謝経路の誕生の原動力となった

2. 研究の目的

この Promiscuous な活性を通じた酵素の進化は多くの論文で議論されているが、これらの研究は酵素の Promiscuous な活性に関する構造的・生化学的研究や試験管内での酵素進化の研究に基づいたものが多い。実際の進化を例にした研究は極めて限られており、概念が先行した仮説と考えている。そのため、この分野を発展させるには実例を示すことが極めて重要である。本研究の目的は、実際の酵素の進化を調べることで、生命活動の中心を担う代謝経路がどのように誕生・進化したのか、その仕組みを解明することにある。

具体的な研究対象はクロロフィル代謝である。植物は進化の過程で様々なクロロフィルを獲得し、大きな分類群が形成された。例えば、およそ 10 億年前にクロロフィル *b* を利用する緑色植物が誕生し、4 億年前にクロロフィル *c* を利用する褐藻が出現した(図2)。このように新しいクロロフィルの獲得は、生物の多様化に重要な役割を担っている。一方、緑色植物は、その陸上化に伴ってクロロフィル分解経路を完成させた。このクロロフィル分解経路は、陸上植物が新しい環境へ適応し、生活環を進行するために必須である。しかしこの分解経路がどのようにして獲得されたか不明である。

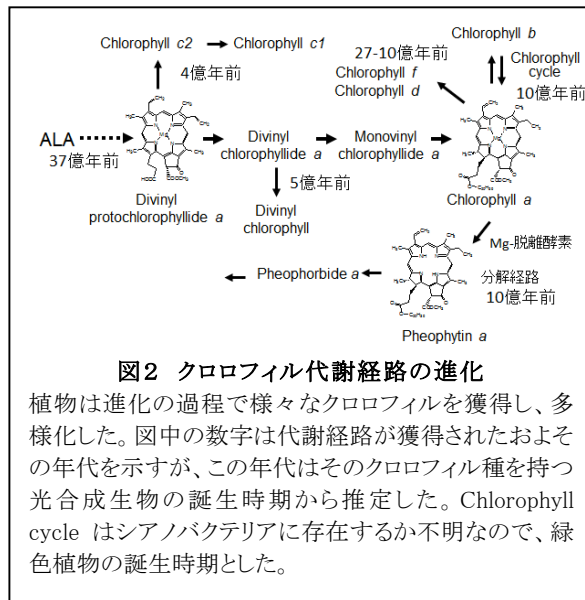


図2 クロロフィル代謝経路の進化

植物は進化の過程で様々なクロロフィルを獲得し、多様化した。図中の数字は代謝経路が獲得されたおよその年代を示すが、この年代はそのクロロフィル種を持つ光合成生物の誕生時期から推定した。Chlorophyll cycle はシアノバクテリアに存在するか不明なので、緑色植物の誕生時期とした。

本研究は上で述べた視点から、緑色植物におけるクロロフィル合成経路と分解経路の誕生・進化の、特に陸上植物におけるクロロフィル分解酵素(Mg-脱離酵素)について解析した。

3. 研究の方法

本研究は、酵素の分子系統学的解析と組み換えタンパク質の酵素活性測定を主な方法としている。紙面の関係で具体的な手法は省くが、系統学的解析は MEG による最尤法を採用し、組み換えタンパク質の調整と活性測定の詳細は引用文献①、②に記載している。

4. 研究成果

(1)クロロフィル分解酵素の誕生

我々のグループは、長年不明であったクロロフィル分解の最初のステップを触媒する酵素の同定に成功した。この酵素は Mg-脱離酵素と呼ばれ、クロロフィル *a* から中心金属の Mg を引き抜きフェオフィチン *a* に転換する。Mg-脱離酵素は植物の老化にとって中心的な役割を果たしているため、この酵素の獲得は植物にとって極めて重要な出来事であった。まずその起源を調べるため、この酵素の相同遺伝子を BLAST で検索すると、緑色植物と Chloroflexi や Firmicutes に属するバクテリアに存在することがわかった(図3)。これらのタンパク質のアラインメントを作成したところ、バクテリアの相同

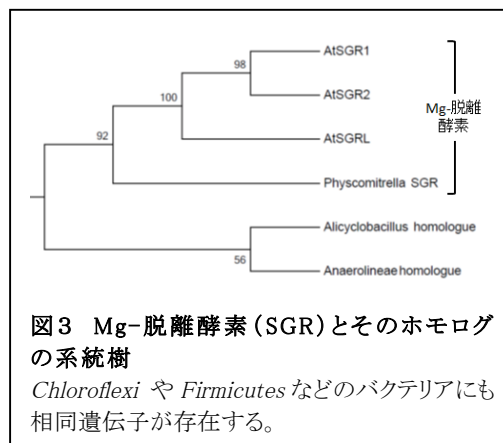


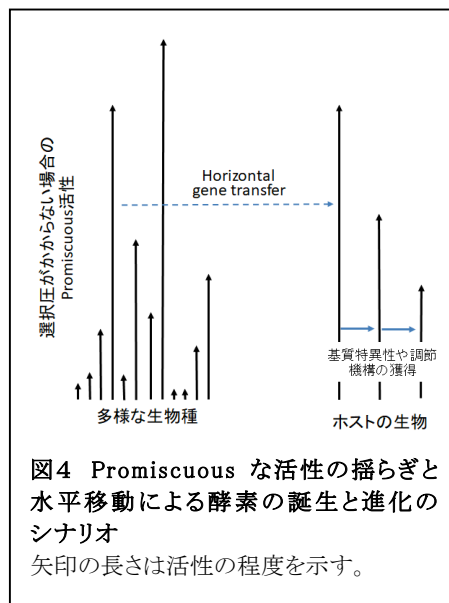
図3 Mg-脱離酵素 (SGR) とそのホモログの系統樹

Chloroflexi や Firmicutes などのバクテリアにも相同遺伝子が存在する。

遺伝子は Mg-脱離酵素と極めて高い相同性を持っており、しかも触媒反応にかかわると予想されるアミノ酸の多くが保存されていることがわかった。これらのバクテリアにはクロロフィルは存在しないので、細胞内では異なった役割を果たしていると予想されるが、その高い相同性から Mg-脱離酵素活性を既に持っていると考えられる。そこで、バクテリアの相同遺伝子の組み換えタンパク質を作製し、Mg-脱離酵素活性を調べたところ、驚くことにホモログの中に植物の Mg-脱離酵素よりも極めて高い活性を持っていたものがあつた。またそのホモログの基質特異性も広く様々なクロロフィル類から Mg を引き抜くことができた。系統樹から考えると、緑色植物はバクテリアから相同遺伝子を水平移動によって獲得したのであろう。これらの結果から酵素の進化に関していくつかの知見が得られた。

従来は、Promiscuous な活性は淘汰圧を受けないため、低いままであると考えられてきたが、本研究によって Promiscuous な活性には揺らぎがあり、場合によっては本来の活性(Primary activity)よりも格段に高い活性をもたらすことがあることがわかった。従来、Promiscuous な活性が環境の変化などによって生理的な役割を持つようになって、その活性が低い場合には選択圧がかからず、活性を高められないと考えられてきた。この点が Promiscuous な活性に基づく酵素進化のシナリオの一つの問題点であった。しかし、我々は淘汰圧がなくとも Promiscuous な活性が高くなることを示すことができた。この発見は酵素進化を論じるにあたって重要な点であろう。

もう一つは Promiscuous な活性の水平移動による酵素の獲得である。従来の多くのシナリオは Promiscuous な活性を持った酵素遺伝子の重複を考えている。しかし、特にバクテリアにおいては新しい遺伝子の獲得は、水平移動によるものが圧倒的に多いと考えられている。本研究は Promiscuous な活性の水平移動による新しい酵素の誕生を示したものである。これらの研究をまとめると、酵素の誕生に関して次のようなシナリオが考えられる(図4)。① Promiscuous な活性には揺らぎがあり、Primary activity より高いものも存在する。②高い Promiscuous な活性を持った遺伝子が新しい生物に水平移動する。③新しい生物では Promiscuous な活性が生理的役割を担うことができる。④その後基質特異性や様々な調節機構を獲得し酵素として確立する。このシナリオは新しい酵素の獲得が比較的たやすく(確率が高く)行われることに特徴がある。多くの遺伝子がこのシナリオに基づいて誕生進化することが予想される。



(2)Mg-脱離酵素の緑色植物における進化

Mg-脱離酵素は緑色植物において興味深い進化を示した。Mg-脱離酵素はクロロフィル a をフェオフィチン a に転換する反応である。この反応はクロロフィル分解の最初の反応である一方、フェオフィチンは光化学系 II の重要な分子であり、初期電荷分離を担っている。シロイヌナズナの Mg-脱離酵素欠損株では、野生型と同じように生育するが、老化時にクロロフィルを分解できず、Stay green の形質を示した。我々は、緑藻クラミドモナスの Mg-脱離酵素欠損株を作成し解析したところ、この変異株では光化学系 II の形成が阻害されていた。おそらくフェオフィチンの供給が少なかったため光化学系 II が形成されなかったのだろう。ところが、クラミドモナスの Mg-脱離酵素欠損株では、野生型と同じようにクロロフィルが分解された。

このように Mg-脱離酵素は同じ触媒機能を持っているのにも関わらず、シロイヌナズナでは老化時のクロロフィル分解、クラミドモナスでは光化学系 II の形成に関わっていることが示された。なぜこのように機能分化したかは不明であるが、興味深い現象である。

本研究によって酵素の獲得と代謝系の確立に関する新しいシナリオを提案することができた。この分野の発展には実際の酵素の進化のプロセスを調べるのが極めて重要である。クロロフィル代謝はこれらの研究にとって解析しやすい対象であり、今後の研究が期待される。

<引用文献>

- ① Matsuda K, Shimoda Y, Tanaka A and Ito H (2016) Chlorophyll a is a favorable substrate for Chlamydomonas Mg-dechelataase encoded by STAY-GREEN. *Plant Physiol. Biochem.* 109:

365-373.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.10.020>

- ② Shimoda Y, Ito H and Tanaka A (2016) Arabidopsis STAY-GREEN, Mendel's Green Cotyledon Gene, Encodes Magnesium-Dechelate. *Plant Cell* 28:2147-2160.
doi: 10.1105/tpc.16.00428

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件、全て査読あり)

- ① Chen Y, Shimoda Y, Yokono M, Ito H and Tanaka A (2018) Mg-dechelate is involved in the formation of photosystem II but not in chlorophyll degradation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*. Published online,
DOI: <https://doi.org/10.1111/tpj.14174>
- ② Yokono M, Satoh S and Tanaka A (2018) Comparative analyses of whole-genome protein sequences from multiple organisms. *Sci Rep*. 8(1): 6800.
doi: 10.1038/s41598-018-25090-8.
- ③ Yokono M, Umetani I, Takabayashi A, Akimoto S and Tanaka A (2018) Regulation of excitation energy in Nannochloropsis photosystem II. *Photosyn. Res.* 139(1-3) 155-161.
<https://doi.org/10.1007/s11120-018-0510-3>
- ④ Tominaga J, Nakahara Y, Horikawa D, Tanaka A, Kondo M, Kamei Y, Takami T, Sakamoto W, Unno K, Sakamoto A and Shimada H (2018) Overexpression of the protein disulfide isomerase AtCYO1 in chloroplasts slows dark-induced senescence in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 18:80.
<https://doi.org/10.1186/s12870-018-1294-5>
- ⑤ Sato T, Shimoda Y, Matsuda K, Tanaka A and Ito H (2018) Mg-dechelation of chlorophyll *a* by Stay-Green activates chlorophyll *b* degradation through expressing Non-Yellow Coloring 1 in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* 222: 94-102.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.01.010>
- ⑥ Yamatani H, Kohzuma K, Nakano M, Takami T, Kato Y, Hayashi Y, Monden Y, Okumoto Y, Abe T, Kumamaru T, Tanaka A, Sakamoto W and Kusaba M (2018) Impairment of Lhca4, a subunit of LHCI, causes high accumulation of chlorophyll and the stay-green phenotype in rice. *J Exp Bot.* 69(5): 1027-1035.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erx468>
- ⑦ Umetani I, Kunugi M, Yokono M, Takabayashi A and Tanaka A (2018) Evidence of the supercomplex organization of photosystem II and light-harvesting complexes in *Nannochloropsis granulata*. *Photosyn. Res.* 136(1): 49-61.
doi: 10.1007/s11120-017-0438-z.
- ⑧ Kato Y, Yokono M, Akimoto S, Takabayashi A, Tanaka A and Tanaka R (2017) Deficiency of the Stroma-Lamellar Protein LIL8/PSB33 Affects Energy Transfer Around PSI in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 58(11): 2026-2039.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcx124>

[学会発表] (計 20 件)

- ① 伊藤寿、荒川圭太、田中歩、ポプラにおけるクロロフィル分解を介したエチレンの発生と落葉、第 60 回日本植物生理学会年会、2019
- ② Ying Chen, Ayumi Tanaka, Hisashi Ito, Effects of chlorophyll degradation by Stay-Green on senescence in *Arabidopsis*, 第 60 回日本植物生理学会年会、2019
- ③ 田中歩、Tree of life の構築と植物の進化、2018 年度北海道植物学会大会および総会、2018
- ④ Ayumi Tanaka, Regulation of the stability of light-harvesting complexes by chlorophyll degradation enzymes, 1st Asia-Oceania International Congress on Photosynthesis, 2018
- ⑤ Ayumi Tanaka, Regulation of Chlorophyll Metabolism by Mg-Dechelate, Gordon Research Conference-Chemistry and Biology of Tetrapyrroles, 2018
- ⑥ 小畑大地、田中歩、伊藤寿、クロロフィル *a* の Mg を脱離する酵素 STAY-GREEN(SGR)、第 9 回日本光合成学会年会、2018
- ⑦ 高林厚史、古川亮、田中亮一、田中歩、藤田知道、秋本誠志、横野牧生、ヒメツリガネゴケの光化学系 I-II 超複合体の解析、第 9 回日本光合成学会年会、2018
- ⑧ 伊藤寿、田中歩、クロロフィルの分解とジャスモン酸の関係、第 9 回日本光合成学会年会、2018
- ⑨ Helena Sapeta, Makio Yokono, Atsushi Takabayashi, Yoshifumi Ueno, Seiji Akimoto, Junko Kishimoto, Ayumi Tanaka, M. Margarida Oliveira, Ryouichi Tanaka, Photoprotection mechanisms of the drought-tolerant *Jatropha curcas* plant, 第 59 回日本植物生理学会年会、2018
- ⑩ 木村円香、松浦英幸、田中歩、伊藤寿、SGR によるクロロフィル分解が引き起こすジャスモン酸とエチレンの増加、第 59 回日本植物生理学会年会、2018
- ⑪ 山谷浩史、上妻馨梨、中野道治、高見常明、加藤裕介、林依子、門田有希、奥本裕、阿部知子、熊丸敏博、田中歩、坂本亘、草場信、イネ stay-green 突然変異体 *dye1* の分子遺伝学的解析、第 59 回日本植物生理学会年会、2018

- ⑫ 高橋小春、明賀史純、小澤真一郎、篠崎一雄、高橋裕一郎、田中歩、高林厚史、田中亮一、クロロフィル合成酵素と光化学系 II アセンブリ複合体は相互作用をしているのか?、第 59 回日本植物生理学会年会、2018
- ⑬ 古川亮、横野牧生、秋本誠志、藤田知道、高林厚史、田中歩、ヒメツリガネゴケの PSI-PSII 超複合体の解析、第 59 回日本植物生理学会年会、2018
- ⑭ 小畑大地、田中歩、伊藤寿、クロロフィル a の Mg を脱離する酵素 SGR の触媒機構解析、第 59 回日本植物生理学会年会、2018
- ⑮ Ying Chen, Yousuke Shimoda, Ayumi Tanaka, Hisashi Ito, The effect of chlorophyll degradation by SGR on senescence、第 59 回日本植物生理学会年会、2018
- ⑯ Makio Yokono, Atsushi Takabayashi, Junko Kishimoto, Tomomichi Fujita, Masakazu Iwai, Akio Murakami, Seiji Akimoto, Ayumi Tanaka, PSI-NPQ in higher plants、第 59 回日本植物生理学会年会、2018
- ⑰ Ayumi Tanaka, The role of chlorophyll metabolism in the formation and degradation of photosystems, 8th Asia and Oceania Conference on Photobiology, 2017
- ⑱ 田中歩、クロロフィル代謝の機能と進化、第 25 回 光合成セミナー2017:反応中心と色素系の多様性、2017
- ⑲ Ayumi Tanaka, Mg-dechelataase contributes to the formation and the degradation of photosystems, Chloroplast Metabolism and Photosynthesis Meeting, 2017
- ⑳ 横野牧生、高林厚史、岸本純子、藤田知道、岩井優和、村上明男、秋本誠志、田中歩、緑色植物の PSI-PSII 超複合体、第 8 回日本光合成学会年会およびシンポジウム、2017

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

該当なし

○取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/plantadapt/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。