

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19173

研究課題名(和文) 光合成の喪失と従属栄養の促進：長期継代培養による栄養性の進化

研究課題名(英文) Loss of photosynthesis and stimulation of heterotrophy: trophic evolution through long-term cultivation

研究代表者

藤田 祐一 (Yuichi, Fujita)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：80222264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：酸素発生型光合成生物において光合成能力が喪失する進化の過程を観察するために、暗所でもグルコースをエネルギー源と炭素源として生育する従属栄養生育能力をもつシアノバクテリア *Leptolyngbya boryana* を、長期にわたり完全暗所従属栄養条件で継代培養することで、光合成的生育の能力が著しく低下もしくは失われた暗所適応株を単離した。ゲノム解析の結果、多くの株でセリンホスファターゼ RsbU 遺伝子に多様な変異を有していた。*L. boryana* では、RsbU を含むパートナースイッチングシステムにより光合成栄養条件と従属栄養条件に適した遺伝子発現プロファイルに切り替えていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

被子植物を始め酸素発生型光合成生物において光合成能力を喪失した系統が多数認められる。このような生物が、光合成能力を失い従属栄養的生育のみの生活様式を取るように転換していった進化の過程を観察した事例はない。本研究では、その進化過程を実験室において半年から4年間という時間スケールで観察し、以下のような進化経路を再現した。すなわち、まず、光合成栄養と従属栄養に適した遺伝子発現を調整する遺伝子制御系に変異が生じ、より暗所従属栄養条件への適応を進め、同時に光合成独立栄養能力を大幅に低下させる。その後、光合成能力を失う変異の蓄積を許容する。このような光合成機能喪失の進化を初めて具体的に観察したことは意義深い。

研究成果の概要(英文)：To observe the evolutionary process of loss of photosynthetic capacity in oxygenic photosynthetic organisms, the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*, which has the ability to grow heterotrophically in the dark using glucose as an energy and carbon sources, was cultured under dark heterotrophic conditions for a long time. We isolated many dark-adapted variants with significantly reduced or lost photosynthetic growth ability and significantly stimulated dark heterotrophic growth ability. Genome resequencing analysis revealed that many of the variants had diverse mutations in the *rsbU* gene encoding serine phosphatase. Mutants in which *rsbU* was singly disrupted were isolated to confirm that loss of function of *rsbU* leads the dark-adapted phenotype. These results suggested that in *L. boryana* a partner-switching system involving RsbU regulates the gene expression to be suitable for photosynthetic and heterotrophic conditions.

研究分野：植物生化学

キーワード：光合成 シアノバクテリア 適応進化 光合成独立栄養 従属栄養 パートナースイッチングシステム

1. 研究開始当初の背景

光のエネルギーを利用し、炭素源として二酸化炭素 CO₂ を同化して増殖する光合成独立栄養の能力は、シアノバクテリアや植物のもつ主要な栄養モードである。この能力のおかげで、光合成独立栄養生物は、光と水さえあれば生育でき、地球上の極めて多様な環境で繁殖できることが可能となった。一方、グルコースなどの呼吸基質となる有機物が容易に得られ、その分解によるエネルギーが獲得できる環境(暗所従属栄養条件)においては、光合成独立栄養能は必ずしも必須ではない。実際、光合成を放棄した“非光合成”生物が、植物(寄生性植物、菌従属栄養植物など)、藻類、シアノバクテリア(藍藻)で多数認められており、進化の過程で光合成能の喪失イベントは独立して 100 回以上起こったと推察されている。このことは、光合成という生育様式が、生物自身に有利である一方で逆に一定の制約を生物に与えており、環境が許せばその制約から逃れる方向への進化が高い頻度で生じることを示唆している。これら光合成を放棄した生物は、どのような過程で光合成能を失って従属栄養的生育のみの生活様式を取るよう転換していったのだろうか。栄養性の転換は、生存戦略の根幹に関わる重大な進化であるにもかかわらず、具体的な進化プロセスは不明なままであり、光合成能力を喪失する進化の過程を観察した事例はない。

2. 研究の目的

シアノバクテリアは、植物と同じ光合成を行う原核生物である。植物の光合成機能は、祖先シアノバクテリアが細胞内共生を介して祖先植物細胞に持ち込み現在の真核光合成生物の系統の基礎を築いたと考えられている。これまでに多数のシアノバクテリアのゲノムが解読され、遺伝子操作による遺伝子改変も盛んに行われている。シアノバクテリアには、従属栄養的生育能を有し暗所でも呼吸により生育することができる種も存在し、これらのシアノバクテリアは、光合成という機能に焦点を絞って環境要因による光合成の喪失過程をゲノムへの変異蓄積という観点から評価することができる正に格好の研究材料である。申請者は、従属栄養能を有するシアノバクテリア *Leptolyngbya boryana* のいくつかの株を 15 年以上にわたって暗所従属栄養条件下で継代培養を続けている。これら“長期暗所適応株”は例外なく光合成的生育能を失っており、元株よりも従属栄養的生育速度が促進されている。また、コロニーの色調も変化しており、もはやシアノバクテリアとは言いがたい従属栄養性の別種へと“進化”したように見える。

本研究では、光合成の喪失と従属栄養能の促進という栄養性の転換が、具体的にどのような進化プロセスを経て進行するのかを、長期の継代培養系による適応株の単離とゲノムリシーケンシングにより具体的な変異を見出し、光合成の喪失過程の一般化を試みる。

3. 研究の方法

完全暗所でもグルコースをエネルギー源として生育する能力をもつシアノバクテリア *L. boryana* の野生型及び dg5 株(申請者が単離した暗所適応株で、光合成生育については野生型と変わらない。この形質の原因変異は *cytM* 遺伝子の欠損であることをすでに確認している)から、半年から 4 年間、完全暗所従属栄養条件下で継続的に継代培養することで、光合成的生育の能力が著しく低下もしくは失われた暗所適応株を単離し、ゲノムリシーケンシングによりどのような遺伝子への変異が、光合成能喪失の原因となったのかを検討する。特定の遺伝子に変異が集中していた場合には、その遺伝子に注目してその生理機能について、単独欠損株の単離、形質解析、トランスクリプトーム解析等を行い、その遺伝子の光合成独立栄養と暗所従属栄養における機能に関する考察を深める。

4. 研究成果

L. boryana 野生型及び dg5 株を半年から 3 年間、完全暗所従属栄養条件下で継続的に継代培養し、暗所適応株(dg5)を 4 年間暗所で継続培養した 6 株(v1~v6)と野生型を 7~15 ヶ月暗所で継続培養した 22 株(dg201~dg242; 計 28 株)を単離した(図 1,2)。これらの株の多くは多様な色調の変化を伴っており、特に異常に青い色調の 3 株(dg205, dg217, dg227)ではカロテノイド組成に異常が見られた。また、クロロフィル含量は、全ての適応株で低下しており、最低(OD₇₃₀ 当たり)で元株の約 25%のレベルまで減少していた。生育に

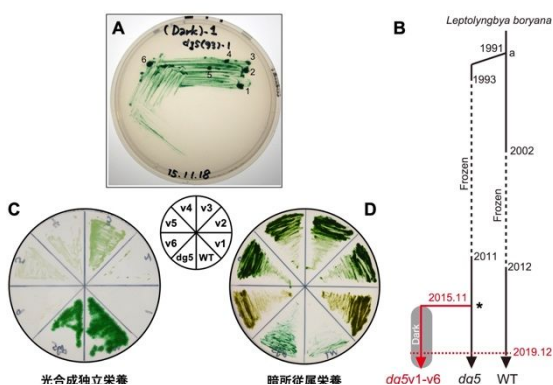


図 1. 暗所従属栄養条件下での継代培養株

A. *L. boryana* dg5 株を暗所にて 9 日間培養後、生育が良好なコロニーを 6 個単離し、その後同条件下で 4 年にわたり継代培養を行った。B. *L. boryana* の継代培養の系譜。* は写真 A 撮影を示す。4 年後に光合成独立栄養条件(C)、暗所従属栄養条件(D)での生育を確認した。

生育に

ついては、ほとんどの株(18株)が光合成独立栄養生育能を失っており、10株については有意な生育低下に留まった。一方、暗所従属栄養条件では、すべての株が元株よりも良好な生育を示した(図1D、図2C, D, F)。

28株についてゲノムリシーケンシングを行いゲノムに蓄積した変異を解析した(図3)。dg5由来の6株についてはdg5のゲノムと比較した結果、合計22個の変異が見つかった(図3A)。また、野生型に由来する22株について野生型ゲノムと比較し合計63ヶ所の変異が見つかった(図3B)。

興味深いことに、カロテノイド蓄積異常を示していた青い色調の3株では、カロテノイド組成から予想された遺伝子(カロテノイド生合成系において蓄積する中間体色素を変換する酵素遺伝子)に変異が生じていた。

全変異のうちdg5を元株とした6株で4個、野生型を元株とした22株では15個の変異(合計19個)が、共通してLBDG_21500(*rsbU*, セリンホスファターゼRsbUをコードする)に蓄積していた。変異の内訳は、内生トランスポゾン挿入が5個、欠失が2個(1197bp欠失, 993bp欠失)、フレームシフト変異が4個(1塩基欠失, 2塩基欠失, 1塩基挿入, 7塩基挿入)、一塩基置換で終止コドンが生じる変異が3個(このうち2個は2株で一致)、アミノ酸置換を起こす一塩基置換が5個であった。このことは、RsbUの機能欠損が、暗所従属栄養生育の促進と光合成生育能の低下をもたらし、そのような変異は、dg5の原因変異である*cytM*欠損という遺伝的背景とは関係なく、暗所従属栄養条件において高い頻度で選抜されることを示唆している。

そこで、*rsbU*機能欠損がこれらの形質の原因遺伝子であることを確認するために、dg5および野生型を背景に*rsbU*の単独欠損株($\Delta rsbU/dg5$; $\Delta rsbU/WT$)を単離した(図4)。その結果、いずれの単独欠損株も光合成独立栄養生育の大幅な低下と暗所従属栄養生育の顕著な促進が認められた。さらに、v1とv4で見られた2つのアミノ酸置換(D407G, G295D)を導入した変異株もまた単独欠損株と同様の形質を示した。これらの*rsbU*単独欠損株の形質は、*rsbU*に生じた変異が22の暗所適応株の形質の主要な原因遺伝子であることを支持している。

RsbUは、原核生物において広く分布する情報伝達系であるパートナースイッチングシステムにおいて、アンチシグマ因子の脱リン酸化を触媒するホスファターゼである。また、ホスファターゼドメインはRsbUタンパク質のC末端側にあたり、プロテインホスファターゼ2C

(PP2C)ファミリーに属するセリンホスファターゼで、 Mn^{2+} もしくは Mg^{2+} を金属触媒として作用すると想定される。

5株の暗所適応株で認められたアミノ酸置換(G289D, G295D, P315L, H358Y, D407G)について、他のシアノバクテリアのRsbUホモログとのアミノ酸配列の比較において5つのアミノ酸はすべてほぼ完全に保存されていた。さらに、すでに立体構造が報告されている結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)のRsbU

の構造に基づいて、*L. boryana*のRsbUの構造予測を行った(図5)。その結果、アミノ酸置換が見られた5残基のうち4残基(Gly289, Gly295, His358, Asp407)がMn/Mg²⁺の近傍に配置

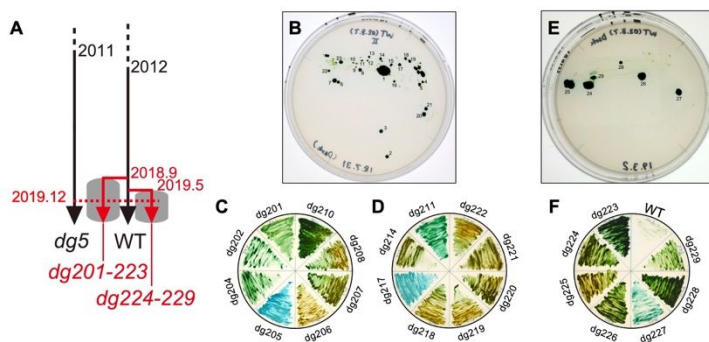


図2. 暗所従属栄養条件での継代培養株

A. *L. boryana* の継代培養の系譜。B, C. *L. boryana* 野生型(WT)を暗所にて約1ヶ月間培養後、生育が良好なコロニーを各16個(B)及び6個(E)単離し、その後同条件で各々15ヶ月、7ヶ月間継代培養を行った。C, D, F. それぞれの適応株を暗所従属栄養条件(C, D, F)での生育を確認した。

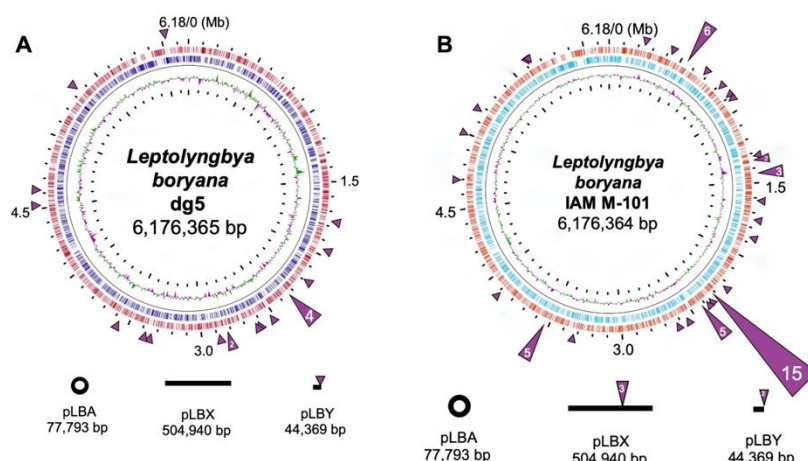


図3. 暗所適応28株のゲノムリシーケンシング

L. boryana dg5 (A) 及び野生型(*L. boryana* IAM M-101)(B)に由来する22個(A)及び63個(B)で見つかった変異箇所をマッピングした。変異位置を三角で示し、2個以上生じた変異に対してその数を記し、その数に比例して三角形を大きく表示した。

されていた。この空間的位置から、これらのアミノ酸置換が RsbU のホスファターゼ活性に重篤な影響を与える可能性が強く示唆された。

L. boryana において RsbU が作動するパートナースイッチングシステムがどのような遺伝子群の発現を制御しているのかを検討するために、明所と暗所で生育した野生型と $\Delta rsbU$ から RNA を調製し、トランスクリプトーム解析 (RNA-seq 解析) を行った。その結果、RsbU は明所では光化学系 II 遺伝子群と光化学系 I 遺伝子群の発現を各々抑制及び活性化していることが示唆された。

以上の実験結果から、*L. boryana* では、RsbU を含むパートナースイッチングシステムをモジュールとする新規な遺伝子発現制御系が作動しており、何らかの環境要因に応じて光合成栄養条件と暗所従属栄養条件に適した遺伝子発現プロファイルに切り替えていることが示唆された。暗所従属栄養条件下での継代培養では、まず *rsbU* の変異が選択されることで、本来抑制されていた従属栄養を支える遺伝子群の発現がアップレギュレーションされて暗所従属栄養生育が促進される。同時に、光合成の光化学反応を最適化する制御が外れることで光合成生育が低下する。さらに同条件で継代培養される過程で光合成生育能を完全に欠失する変異の蓄積が許容される、という進化経路が推定された。

また、この研究と並行して、*L. boryana* の暗所従属栄養における生理学の一環として、*L. boryana* の *chlL* 欠損株の暗所従属栄養生育における光合成色素中間体プロトクロロフィドの蓄積とその動態を解析し、光合成色素中間体が細胞外小胞を介して分泌されることを初めて明らかにした。

	WT	$\Delta rsbU$ /WT	$\Delta rsbU$ /dg5	$\Delta rsbU$ /dg5	<i>rsbU</i> complement	G295D	D407G
光合成独立栄養	●	●	●	●	●	●	●
光混合栄養	●	●	●	●	●	●	●
暗所従属栄養	○	●	●	●	●	●	●

図 4. *rsbU* 単独欠損株及びアミノ酸置換株の生育比較

L. boryana 野生型 (WT) 及び dg5 から *rsbU* 単独欠損株 ($\Delta rsbU$ /WT, $\Delta rsbU$ /dg5) 及びアミノ酸置換体 (G295D, D207G) を単離し、光合成独立栄養条件、光混合栄養条件及び暗所従属栄養条件で生育を比較した。

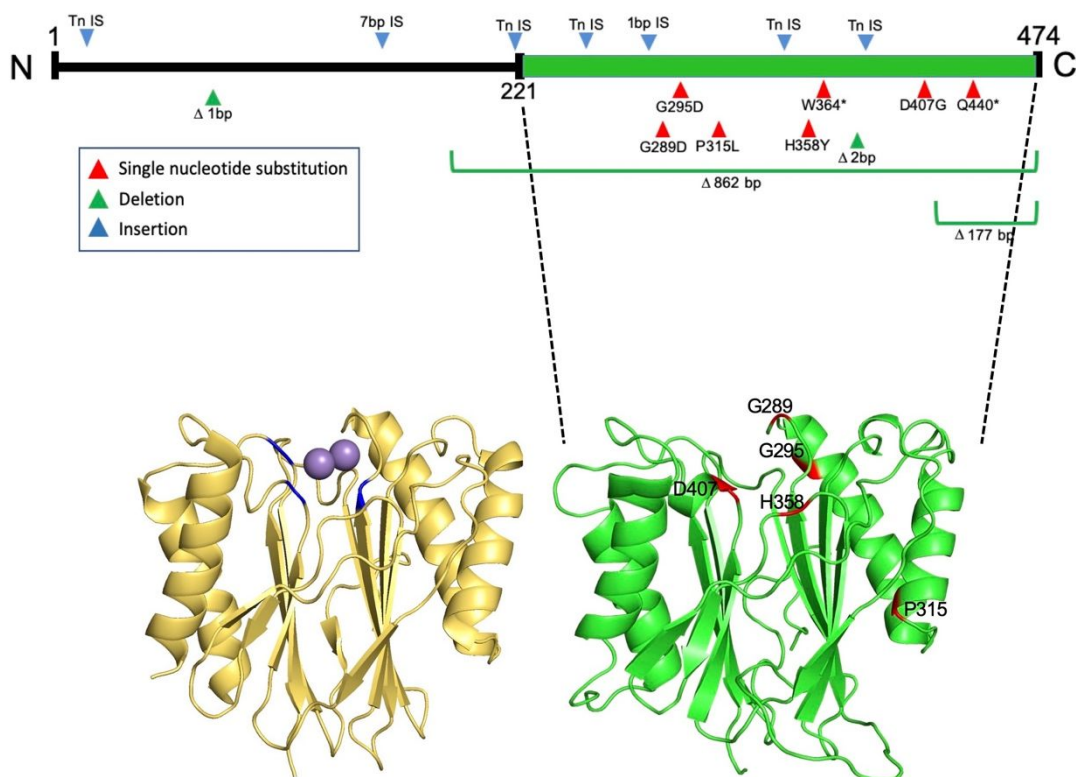


図 5. RsbU のドメイン構成と変異位置及び立体構造予測

L. boryana の RsbU は 474 アミノ酸残基から成り、Glu221 以降の C 末端側がホスファターゼドメイン (緑色) となっている。*rsbU* に生じた 3 種類の変異をマッピングした (赤, アミノ酸置換; 緑, 欠失; 青, 挿入) *Mycobacterium tuberculosis* の RsbU の立体構造 (左下) に基づき *L. boryana* の RsbU のホスファターゼドメインの構造予測を右下に示す。5 つのアミノ酸置換部位を赤で示した。また、*M. tuberculosis* RsbU の該当するアミノ酸残基を青で示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamamoto H, Kojima-Ando, H, Ohki K, Fujita Y	4. 巻 66
2. 論文標題 Formation of prolamellar-body-like ultrastructures in etiolated cyanobacterial cells overexpressing light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in <i>Leptolyngbya boryana</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2323/jgam.2020.01.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Usui K, Yamamoto H, Oi T, Taniguchi M, Mori H, Fujita Y	4. 巻 11
2. 論文標題 Extracellular vesicle-mediated secretion of protochlorophyllide in the cyanobacterium <i>Leptolyngbya boryana</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 910
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants11070910	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 肥田真太郎、山本治樹、上坂一馬、戸松千映、井原邦夫、藤田祐一
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Leptolyngbya boryana</i> における暗所従属栄養生育による光合成生育能の喪失
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 肥田真太郎、山本治樹、上坂一馬、戸松千映、井原邦夫、藤田祐一
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Leptolyngbya boryana</i> における暗所従属栄養環境への適応進化
3. 学会等名 第10回日本光合成学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田祐一、肥田真太郎、戸松千映、上坂一馬、井原邦夫
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Leptolyngbya boryana</i> の暗所継続培養による暗所従属栄養能促進と光合成生育能欠失
3. 学会等名 ラン藻ゲノム交流会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 肥田真太郎、山本治樹、上坂一馬、戸松千映、井原邦夫、藤田祐一
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Leptolyngbya boryana</i> の暗所従属栄養環境への適応に伴う光合成機能の喪失
3. 学会等名 藍藻の分子生物学2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 肥田真太郎、上坂一馬、山本治樹、高市真一、井原邦夫、藤田祐一
2. 発表標題 暗所従属栄養条件に適応したシアノバクテリア派生株のゲノムリシーケンス解析
3. 学会等名 第14回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 肥田真太郎、山本治樹、上坂一馬、井原邦夫、高市真一、藤田祐一
2. 発表標題 暗所従属栄養条件への適応によって光合成生育能を喪失したシアノバクテリア
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田祐一
2. 発表標題 光合成生物が光合成をやめるとき〜シアノバクテリアの暗所継続培養による光合成能喪失
3. 学会等名 立命館大学生命科学部生体ネットワーク研究室セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 臼井健太郎、山本治樹、大井崇生、谷口光隆、森仁志、藤田祐一
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Leptolyngbya boryana</i> の光合成色素生成欠損株における色素排出機構の解析
3. 学会等名 第11回日本光合成学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 肥田真太郎、西尾万梨恵、山本治樹、平出優人、上坂一馬、井原邦夫、藤田祐一
2. 発表標題 シアノバクテリアの暗所継続培養による光合成生育能の低下と喪失
3. 学会等名 第28回光合成セミナー2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西尾万里恵、肥田真太郎、高谷信之、山本治樹、藤田祐一
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Leptolyngbya boryana</i> のrsbU欠損がもたらす暗所従属栄養生育の向上と光合成独立栄養生育の低下
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 臼井健太郎、山本治樹、大井崇生、谷口光隆、森仁志、藤田祐一
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Leptolyngbya boryana</i> におけるクロロフィル合成中間体プロトクロロフィリドの細胞外小胞を介した分泌機構
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>光合成能を失ったシアノバクテリア https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~microbio/research9.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井原 邦夫 (Ihara Kunio) (90223297)	名古屋大学・遺伝子実験施設・准教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------