

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22281

研究課題名(和文) 光合成CO<sub>2</sub>固定代謝の進化的分子基盤の解析研究課題名(英文) Analysis of the molecular evolution of photosynthetic CO<sub>2</sub>-fixing pathway

研究代表者

蘆田 弘樹 (Ashida, Hiroki)

神戸大学・人間発達環境学研究科・准教授

研究者番号：50362851

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)：光合成カルビンサイクルはリブロースビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(RuBisCO)をCO<sub>2</sub>固定酵素として利用する、植物、藻類、シアノバクテリア、光合成細菌などの光合成生物利用している主要なCO<sub>2</sub>固定経路である。光合成生物において広くカルビンサイクルが利用されているが、その進化的基盤は明らかにされていない。そこで、本研究では、光合成カルビンサイクルの進化的原型代謝で機能するメタン生成アーキアRuBisCOの酵素特性を解析した。その結果、メタン生成アーキアのRuBisCOは、CO<sub>2</sub>固定速度、CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>反応比特性係数が光合成RuBisCOと比較して非常に低いことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光合成は、エネルギー生産を行う、地球上の生物にとって必須の生物機能である。しかしながら、生物進化の過程で、光合成がどのように確立されてきたのか未だ解明されておらず、光合成研究者、進化学研究者の興味を大いに惹いてきた。本研究において、光合成炭素代謝の進化的原型と考えられているメタン生成アーキアの経路でCO<sub>2</sub>固定反応を行うリブロースビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼの酵素特性を明らかにした。この研究成果は、光合成の進化や獲得を考える上で、重要な情報を提供する。

研究成果の概要(英文)：The Calvin cycle is a primary metabolic pathway for CO<sub>2</sub>-fixing in plants, algae, and cyanobacteria. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) is the CO<sub>2</sub>-fixing enzyme in the Calvin cycle. Methanogenic archaea are not photosynthetic organisms but possess a unique CO<sub>2</sub>-fixing cycle which is composed of partial steps including RuBisCO catalyzing step from the Calvin cycle and Ribulose monophosphate pathway. Therefore, the methanogenic archaeal CO<sub>2</sub>-fixing pathway is thought to be a primitive metabolism of the photosynthetic Calvin cycle. In order to study molecular evolution of the Calvin cycle, we analyzed enzymatic properties of RuBisCO in this CO<sub>2</sub>-fixing pathway. Methanogenic archaeal RuBisCO shows very low maximum reaction rate for the carboxylase reaction and CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> relative specificity factor, as compared with photosynthetic RubisCOs.

研究分野：光合成炭素代謝

キーワード：光合成 CO<sub>2</sub>固定 ルビスコ アーキア

## 1. 研究開始当初の背景

光合成カルビンサイクルはリブローズビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(ルビスコ)をCO<sub>2</sub>固定酵素として利用する、植物、藻類、シアノバクテリア、光合成細菌などの光合成生物利用している主要なCO<sub>2</sub>固定経路である。光合成生物において広くカルビンサイクルが利用されているが、その進化的基盤は明らかにされていない。このような背景のもと、「どのようにカルビンサイクルが進化的に確立されたのか?」「なぜ光合成でカルビンサイクルが選択されたのか?」「カルビンサイクルの進化的原型はどのような代謝経路であったのか?」という疑問が光合成研究者、進化学研究者の興味を大いに惹いてきた。これまでの研究から、進化的に光合成生物よりも前に出現したと考えられている光合成を行わないアーキアにカルビンサイクルの進化的原型とも言えるルビスコを利用した新規CO<sub>2</sub>固定経路を発見してきた。この経路では、光合成カルビンサイクルの一部がアーキアやバクテリア特有のヘキサロース6リン酸にホルムアルデヒドを固定し、リブローズ-5-リン酸を合成するリブローズモノリン酸経路に置換されており、その他のステップはカルビンサイクルと全く同じであったことから、還元的ヘキサロースリン酸経路と名付けた。このような背景から、カルビンサイクルの進化を解析する上で還元的ヘキサロースリン酸経路が研究のための好材料と考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、原始カルビンサイクルと考えられる還元的ヘキサロースリン酸経路で機能する酵素の特性を解析し、光合成カルビンサイクルの酵素のもと比較することで、その進化を酵素学的に明らかにすることを目的とした。特に、光合成カルビンサイクル誕生前のCO<sub>2</sub>固定酵素ルビスコがどのような形態であったか酵素特性を解析した。これらの研究から、酵素分子進化側からの光合成カルビンサイクルが確立された過程を明らかにする。生命の起源に近いと考えられているアーキアが利用する原始カルビンサイクルと光合成カルビンサイクルの進化的関係性を解析することで、光合成カルビンサイクルが確立された分子基盤の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

光合成を行わない原始カルビンサイクルである還元的ヘキサロースリン酸経路を有する生物としてメタン生成アーキアである *Methanoseta concilii* を用いた。*M. concilii* の原始カルビンサイクルの機能解析を行うため、この代謝回路で中心的働きをするCO<sub>2</sub>固定反応を触媒するRuBisCOの酵素学的特性を解析した。*M. concilii* RuBisCOの酵素特性を解析するために、コールドショック発現誘導 pColdI にヒスチジンタグを融合した *M. concilii* RuBisCO 遺伝子を導入したプラスミドを構築し、大腸菌リコンビナントタンパク質発現系の構築を行った。*M. concilii* RuBisCO の発現誘導を行った大腸菌から融合タグを利用したアフィニティータグ精製を行い、ヒスチジンタグ切断・除去し、解析に用いた。

一般的にRuBisCOが触媒能を発揮するためには、触媒残基201番のリジン残基が基質とは異なるCO<sub>2</sub>によってカルバミル化される活性化が必要であるため、この活性化を光合成RuBisCOと比較した。*M. concilii* RuBisCOをCO<sub>2</sub>存在下で活性化処理を行い、各活性化処理時間における活性を測定し、活性化率を測定した。

RuBisCOのCO<sub>2</sub>固定反応であるカルボキシラーゼ反応は、3-ホスホグリセリン酸キナーゼとグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼを用い、NADH還元反応とカップリングさせることで、分光光度計を用いてNADHの吸光度の時間変化測定により行った。この反応速度測定の基質リブローズ-1,5-ビスリン酸濃度およびCO<sub>2</sub>濃度を変化させることで、両基質に対するkm値と最大反応速度を解析した。

RuBisCOのCO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>反応比特異性係数を解析した。CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>反応比特異性係数は、CO<sub>2</sub>とO<sub>2</sub>が同濃度溶解している反応系において、RuBisCOがカルボキシラーゼ反応とオキシゲナーゼ反応の触媒

速度比を示し、この酵素の機能評価のための主要なパラメータである。 $\text{CO}_2/\text{O}_2$  反応比特異性係数は、既存濃度の  $\text{CO}_2$ 、 $\text{O}_2$  濃度下で RuBisCO を反応させ、カルボキシラーゼ反応生成物とオキシゲナーゼ反応生成物を HPLC により定量することにより、それらの生成比から解析した。RuBisCO の多量体構造を解析するために、Native-PAGE およびゲルろ過クロマトグラフィーによる構造解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) *M. concilii* RuBisCO の大腸菌発現

*M. concilii* RuBisCO は、大腸菌においてメインバンドとして高発現させることに成功し、精製によって SDS-PAGE レベルで共雑タンパク質が混在しない状態に精製することができた。

##### (2) *M. concilii* RuBisCO の活性化

*M. concilii* RuBisCO の活性化の必要性および活性化の時間変化を解析した結果、光合成 RuBisCO と同じように  $\text{CO}_2$  による活性化が触媒能に必要であることが明らかになった。また、その活性化には最大を示すまでに 180 分を要し、光合成 RuBisCO では 20 分で十分なことから、この酵素は活性化に長時間を必要とすることが明らかになった。

##### (3) *M. concilii* RuBisCO の酵素特性解析

精製酵素を用いて、RuBisCO カルボキシラーゼ反応のリブローズビスリン酸に対する  $k_m$  値を測定した。その結果、 $k_m$  値は  $180 \mu\text{M}$  で、植物 RuBisCO の 120 倍、シアノバクテリア RuBisCO の 9.5 倍、光合成細菌 RuBisCO の 3 倍と高く、リブローズ-1,5-ビスリン酸に対する親和性がこれまでに報告されている RuBisCO と比較して非常に低いことが明らかになった。また、RuBisCO カルボキシラーゼ反応の  $\text{CO}_2$  に対する  $k_m$  値、最大反応速度を解析した結果、それぞれ  $24.7 \mu\text{M}$ 、 $28 \text{ nmol/min/mg protein}$  であった。 $\text{CO}_2$  に対する  $k_m$  値は、光合成細菌やシアノバクテリアのものよりも低く、真核光合成生物のものよりも高く、*M. concilii* RuBisCO の  $\text{CO}_2$  親和性は、原核光合成生物と真核光合成生物の中間的な性質を有していることが分かった。一方、カルボキシラーゼ最大反応速度は、他の光合成生物 RuBisCO と比較して、非常に低いことが分かった。

$\text{CO}_2/\text{O}_2$  反応比特異性係数を、カルボキシラーゼ反応生成物である 3-ホスホグリセリン酸とオキシゲナーゼ反応生成物の 2-ホスホグリコール酸の生成比から解析した。その結果、*M. concilii* RuBisCO は、0.48 の  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  反応比特異性係数を示した。これは、これまでに報告されているどの RuBisCO よりも低い  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  反応比特異性係数を示し、 $\text{O}_2$  反応性の高い光合成細菌 RuBisCO の 1/24、シアノバクテリア RuBisCO の 1/80、植物 RuBisCO の 1/160 であった。これらの結果から、メタン生成アーキアの RuBisCO は、 $\text{O}_2$  との反応性がこれまでに解析された光合成 RuBisCO と比較して著しく高いことが明らかになった。この低い  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  反応比特異性係数を考えれば、大気条件においては生体内において RuBisCO が  $\text{CO}_2$  固定をほとんど行えないことになるが、*M. concilii* は絶対嫌気性のメタン生成菌であることから、生育環境においては RuBisCO のオキシゲナーゼ反応がほとんど起こることがなく、この酵素が  $\text{CO}_2$  固定に寄与できると予想される。この結果と光合成生物進化に伴って RuBisCO の  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  反応比特異性係数が増加してきたことを合わせて考えると、この RuBisCO が機能する代謝回路が光合成カルビン回路の進化的原型であることを示唆している。

##### (4) *M. concilii* RuBisCO の多量体構造

Native-PAGE およびゲルろ過クロマトグラフィーによる多量体構造を解析した結果、この RuBisCO はホモ 10 量体構造であることが示唆された。この多量体構造は、植物、藻類、シアノバクテリアのものラージサブユニット 8 個、スモールサブユニット 8 個の 16 量体構造、光合成細菌のラージサブユニットダイマー構造とは異なり、他アーキア RuBisCO と同じ構造であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ashida Hiroki, Mizohata Eiichi, Yokota Akiho	4. 巻 47
2. 論文標題 Learning RuBisCO's birth and subsequent environmental adaptation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical Society Transactions	6. 最初と最後の頁 179 ~ 185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 蘆田弘樹
2. 発表標題 CO2固定酵素RuBisCOの環境応答
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会 シンポジウム 新・代謝制御ストラテジー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 蘆田弘樹
2. 発表標題 RuBisCO研究とその応用
3. 学会等名 東京都立大学 生命科学教室セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------