

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570036

研究課題名 (和文) 地球の大酸化イベント酸素危機が導く光合成生物の適応進化

研究課題名 (英文) Evolution of photosynthetic organisms in the Great Oxidation Event

研究代表者

藤田 祐一 (FUJITA YUICHI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：80222264

研究成果の概要：ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 のテトラピロール生合成系のうち4つの酵素系において、環境の酸素レベルに応じて機能分化している複数の系が機能していることを明らかにした。また、その複数の酵素系の成り立ちは、1) 構造の異なる酵素系 (アナログス酵素) が利用される場合、2) 構造が類似した酵素系 (アイソザイム) が利用される場合、という2つに分類できることが判った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：光合成、クロロフィル、ラン藻、アナログス酵素、アイソザイム、進化、大酸化イベント、金属酵素

1. 研究開始当初の背景

(1) 地球の酸素環境の成立と“酸素危機”

ヒトをはじめ酸素呼吸を行う現在の生物は、酸素が21%含まれる現在の地球の大気環境に依存しているが、生命は、酸素がほとんど存在しない嫌氣的環境で誕生した。現在の酸素環境は、27億年前ラン藻の祖先が酸素を発生する光合成を創出し、地球の多様な環境で大繁殖した結果もたらされた。一方、酸素は、

多くの金属酵素の金属中心を破壊したり、反応性の高い活性酸素種に変換されたりするなど、細胞に重篤な作用をもたらす。このため、嫌気環境下で進化してきた生命にとって酸素環境は、生存に関わる重大な選択圧となった。特に約22億年前には酸素レベルが急上昇する大酸化イベント (Great Oxidation Event) が引き起こされ、当時の生命は“酸素危機”に陥った。とりわけ酸素発生を開始した祖先

ラン藻は、自身の生み出す酸素によって“酸素危機”に最初に直面し、解決した生物である。したがって、酸素環境に対し光合成生物がどのように適応してきたのかを明らかにすることは、生命の進化のみならず、地球史を解説する上でもきわめて重要な研究課題である。

(2) クロロフィル生合成系の酸素感受性酵素

クロロフィル生合成系の最終段階で作用する暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素 (Dark-operative protochlorophyllide oxidoreductase; DPOR) は、プロトクロロフィリドをクロロフィル a の直接の前駆体であるクロロフィリド a に変換する光合成に必須の酵素である。DPOR は、窒素固定酵素ニトロゲナーゼと共通の起源をもち、光合成の創出の基盤となったと推察される。ところが、その活性中心が、酸素によってすみやかに破壊される Fe-S クラスタであるため、“酸素危機”において不活性化ターゲットとなったと考えられる。現在の酸素発生型光合成生物は、同じ反応を触媒する酵素として、異なる進化的起源をもつ、光依存型プロトクロロフィリド還元酵素 (Light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase; LPOR) を併存する。この酵素は、酸素耐性であることから、この酵素の創出は、“酸素危機”に応じた DPOR の機能を代替相補するための適応進化の一局面と解釈できる。これにより、申請者は、“酸素危機”は、クロロフィル生合成系のみならず、嫌気環境で成立していた代謝系に大幅な改変をもたらした可能性が高いという着想を得た。

2. 研究の目的

本研究では、“酸素危機”に最初に直面し、解決した生物と考えられるラン藻をもちいて、そのテトラピロール生合成系という一つの

代謝系において、“酸素危機”によってどのような適応進化が生じてきたのかを、ゲノム情報、マイクロアレイ、遺伝子破壊株の単離と形質解析を通して明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ゲノム情報をもっとも整備されているラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 をもちいて、そのテトラピロール生合成系において、複数の酵素が関与すると推定される以下の4つの反応を推定した；1) プロトクロロフィリド還元、2) Mg-プロトポルフィリンIXモノメチルエステル環状化、3) コプロポルフィリノーゲン酸化、4) ヘム酸化開裂。これらの反応に関与すると推定される遺伝子の欠損株を単離した。得られた欠損株が、好气的条件と嫌气的条件における生育と各々の生育におけるテトラピロール生合成中間体の蓄積について検討した。また、コプロポルフィリノーゲン酸化酵素については、各々の遺伝子を大腸菌において発現させて、その酵素活性を測定し、酸素レベルの違いによる機能分化を裏付けている生化学的性質を確認した。

4. 研究成果

(1) プロトクロロフィリド還元酵素

プロトクロロフィリド還元酵素は、別のラン藻 *Leptolyngbya boryana* (*Plectonema boryanum*) や緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* で示されているように、光非依存型(暗所作動型)酵素 DPOR と光依存型 LPOR が存在すると推定される。DPOR のサブユニットの一つである ChIL をコードする遺伝子 *chlL* (*slr0749*) と、LPOR をコードする遺伝子 *por* (*slr0506*) を各々カナマイシン耐性遺伝子とスペクチノマイシン耐性遺伝子によって破壊した変異株(各々 $\Delta chlL$ 、 Δpor) を単離し

た。好気条件では Δpor の生育がきわめて不良で、そのクロロフィル含量は野生株の35%まで低下していたが、嫌気条件では Δpor は目立った生育不良は示さなかった。このことは Δpor が酸素感受性株であることを示している。一方、弱光条件では、嫌気好気条件ともに両破壊株は野生株と同等の生育であった。プロトクロロフィリドの蓄積について検討したところ、 Δpor では生育不良を起こしていた好気条件のみならず、嫌気条件においてもプロトクロロフィリドの蓄積が確認された。これはLPORが好気条件のみならず嫌気条件においても重要な役割を果たしていることを示唆している。一方、弱光条件 ($1 \mu\text{mol}_{\text{photon}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) においては、 $\Delta chlL$ は有意な生育不良を起こし、著しいプロトクロロフィリドの蓄積が見られた。これらの結果から、プロトクロロフィリド還元系において、一定の光強度以上においては嫌気・好気両条件でLPORが主要な役割を果たしているが、弱光及び暗所においてはDPORが重要な寄与を果たしていることが示唆された。

(2) Mg-プロトポルフィリンIXモノメチルエステル環状化酵素

E環（イソサイクリック環）は、多様なクロロフィルに共通した構造的な特徴であり、異なる構造的に類縁性のない2つの酵素系；酸素依存型酵素（AcsF）と酸素非依存型酵素（BchE）、が各々酸素分子と水分子に由来する酸素をC-13¹位のオキソ基として取り込むと推察されている。多様な酸素レベルの環境で繁殖するラン藻においていずれの酵素系が機能しているのかについては不明であった。*Synechocystis* sp. PCC 6803のゲノムには、*acsF*と類似した2つの遺伝子（*sll1214*と*sll1874*）と*bchE*と類似した3つの遺伝子（*slr0905*,

sll1242, *slr0309*）が存在する。これらの遺伝子の一つが欠損した5つの変異株を単離した。*sll1214*欠損株は、好气的条件では、生育することができず、595 nmに蛍光極大を示す色素を蓄積していた。HPLCと質量分析の結果、この色素は3,8-ジビニルMg-プロトポルフィリンIXモノメチルエステル（DV-MPE）と同定された。嫌気条件（微好気条件）では、この変異株の生育が回復した。また、*sll1874*欠損株は、微好気条件に限ってDV-MPEの蓄積が認められた。一方、3つの*bchE*様遺伝子破壊株では、調べたいずれの条件においてもDV-MPEの蓄積は認められなかった。また、RT-PCRによって、*sll1214*は構成的に発現しており、*sll1874*のmRNAは好気条件より微好気条件がより多く検出された。この発現パターンは、各々の欠損株の生育と色素蓄積の動態とよく符合している。これらの結果から、好气的環境ではSll1214（ChlA_I）が唯一のMPE環状化酵素であり、微好气的環境においては低酸素条件に応答して誘導されるSll1874（ChlA_{II}）が主要なMPE環状化酵素として機能していることが示唆された。

(3) コプロポルフィリノーゲンIII酸化酵素

コプロポルフィリノーゲンIII酸化酵素（CPO）は、ヘムやクロロフィルに共通の生合成系においてコプロポルフィリノーゲンIIIを酸化的脱炭酸によってプロトポルフィリノーゲンIXに変換する酵素である。この反応にはO₂を電子受容体とするHemFとRadical SAMファミリーに属するHemNという構造的に全く異なる2種類の酵素が存在する。*Synechocystis* sp. PCC 6803のゲノムには既知の*hemF*と高い類似性を示す*sll1185*、既知の*hemN*と類似性を示す*sll1876*と*sll1917*が存在する。これらの遺伝子の一つが欠損した3つの変異株を単離し、その形質を検討した。

$\Delta sll1185$ 変異株は、好気条件では生育できず、コプロポルフィリンIIIの蓄積を示す特徴的な蛍光スペクトルを示した。一方、 $\Delta sll1876$ 変異株は、微好気条件において有意な生育不良が認められた。この条件においては、5-アミノレブリン酸添加によってコプロポルフィリンの蓄積が認められた。 $\Delta sll1917$ 変異株は、検討した条件ではいずれも野生株と変わりなく生育した。次に、各タンパク質を*E. coli*で発現させて酵素活性を検討することにより各遺伝子産物の機能同定を行った。*Sll1185*は好気条件でCPO活性を示したことから、*Sll1185*がO₂依存型CPO ; HemFであることが確認された。一方、*Sll1876*及び*Sll1917*の吸収スペクトルは共に[4Fe-4S]クラスターを有する特徴を示したが、*Sll1876*のみがNADHに依存したCPO活性を示した。この結果は*Sll1876*がRadical SAM型CPO; HemNであることを示している。欠損株の形質を考え合わせると、*Synechocystis* sp. PCC 6803では、*Sll1185*と*Sll1876*は、各々好気条件及び微好気条件において主要なCPOとして機能していることが示唆された。

(4) ヘムオキシゲナーゼ

ヘムオキシゲナーゼ (HO) は、フィコビルリン生合成系において、ヘムのテトラピロール環をO₂によって酸化的に開裂し、ビリルジンIX α に変換する酵素である。*Synechocystis* sp. PCC 6803には、*hol* (*sll1184*)と*ho2* (*sll1875*)の2つのHOをコードする遺伝子が存在し、これらはアミノ酸配列において51%の同一性を示す。これらHO1とHO2は、いずれもHO活性を示すことが確認されているが、ラン藻細胞での機能分化については明らかされていない。そこで、これら2つの遺伝子*hol*と*ho2*のラン藻細胞での機能分について検討するために、各遺伝子の欠損株の単離

を試みた。*ho2*については通常的好気条件で、野生株コピーを含まない完全な欠損株を得ることができたが、*hol*は嫌気(微好気)条件で選択することにより初めて完全な欠損株の単離が可能であった。*hol*欠損株は、好気条件では著しい生育不良が認められ、嫌気条件においても、野生株に比べ生育が有意に遅い形質を示した。一方、*ho2*欠損株は、好気・嫌気条件ともに、野生株と同様に生育した。これらの形質から、好気条件では、HO1が単独でヘム開裂を行っており、生育に必須の役割を担っており、一方、嫌気条件では低酸素環境で誘導されるHO2が補助的な役割を担っていることが示唆される。

これらの結果を総合すると、ラン藻のテトラピロール生合成系において多様な酸素レベルに応答して2つの異なる戦略を進化させてきたと推察される。1つは、構造的に異なる酵素系(アナログ酵素)を使い分ける戦略(プロトクロロフィリド還元酵素、コプロポルフィリノーゲンIII酸化酵素)であり、もう一つは、構造的に類似する酵素系(アイソザイム)を使い分ける戦略(Mg-プロトポルフィリンIXモノメチルエステル環状化酵素、ヘムオキシゲナーゼ)である。このような適応戦略は、テトラピロール生合成系に限らず、多くの代謝系においても存在することが推察される。本研究成果は、その全貌の解明への重要な一歩となるものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

1. Masuda, S., Ikeda, R., Masuda, T., Hashimoto, H., Tsuchiya, T., Kojima, H., Nomata, J., Fujita, Y., Mimuro, M., Ohta, H. and Takamiya, K. (2009) Prolamellar bodies formed by cyanobacterial protochlorophyllide

- oxidoreductase in *Arabidopsis*. *Plant J.* in press (査読有り)
2. Masuda, T. and Fujita, Y. (2008) Regulation and evolution of chlorophyll metabolism. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 1131-1149. (査読有り)
 3. Yamamoto, H., Nomata, J. and Fujita, Y. (2008) Functional expression of nitrogenase-like protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus* in *Escherichia coli*. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 1238-1242. (査読有り)
 4. Nomata, J., Ogawa, T., Kitashima, M., Inoue, K. and Fujita, Y. (2008) NB-protein (BchN-BchB) of dark-operative protochlorophyllide reductase is the catalytic component containing oxygen-tolerant Fe-S clusters. *FEBS Lett.* **582**: 1346-1350. (査読有り)
 5. Minamizaki, K., Mizoguchi, T., Goto, T., Tamiaki, H. and Fujita, Y. (2008) Identification of two homologous genes, *chlA_I* and *chlA_{II}*, that are differentially involved in isocyclic ring formation of chlorophyll a in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **283**: 2684-2692. (査読有り)

[学会発表] (計 20 件)

1. 野亦次郎・張本純平・村木則文・溝口正・民秋均・栗栖源嗣・藤田祐一「ニトロゲナーゼ類似型プロトクロロフィリド還元酵素の触媒コンポーネント NB-蛋白質の立体構造に基づく立体特異的な D 環二重結合還元機構」第 50 回日本植物生理学会年会 (名古屋)、2009 年 3 月 23 日
2. 山本治樹・久留宮祥平・大橋理恵・藤田祐一「ラン藻 *Leptolyngbya boryana* におけるプロトクロロフィリド還元酵素の酸素感受性」第 50 回日本植物生理学会年会 (名古屋)、2009 年 3 月 23 日
3. 後藤武知・藤田祐一「ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 のヘム・クロロフィル生合成系における 2 つのコプロポルフィリノーゲン III オキシダーゼ」第 50 回日本植物生理学会年会 (名古屋)、2009 年 3 月 23 日
4. 青木里奈・後藤武知・南崎啓・藤田祐一「ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 における 2 つのヘムオキシゲナーゼアイソフォームの機能分化」第 50 回日本植物生理学会年会 (名古屋)、2009 年 3 月 21-22 日
5. 川尻安志・南崎啓・藤田祐一「ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 におけるクロロフィルの E 環生成に関わる 2 つのアイソフォーム ChlA_I と ChlA_{II} の互換性」第 50 回日本植物生理学会年会 (名古屋)、2009 年 3 月 21-22 日
6. 小島寛子・大城香・藤田祐一「ラン藻 *Leptolyngbya boryana* における光依存型プロトクロロフィリド還元酵素の大量発現」第 50 回日本植物生理学会年会 (名古屋)、2009 年 3 月 21-22 日
7. Fujita, Y. Structural aspects of dark-operative protochlorophyllide reductase. International Symposium on Chemistry of Reductases II, January 15-16, 2009, Nagoya, Japan (Invited Speaker)
8. 藤田祐一「クロロフィル生合成系の酸素環境に対する適応進化」日本植物学会第 72 回大会シンポジウム「テトラピロール代謝調節、進化と多機能性」(高知大学) 2008 年 9 月 25 日
9. Fujita, Y. Nitrogenase homologues in chlorophyll biosynthesis. Gordon Research Conference on Iron-Sulfur Enzymes, June 7-13, 2008, Colby Sawyer College, New London, NH, USA (Invited Speaker)
10. 野亦次郎・江端梢・村木則文・志波智生・栗栖源嗣・藤田祐一「光非依存型(暗所作動型)プロトクロロフィリド還元酵素の解析」第 8 回光合成研究会公開シンポジウム「光合成を支える多様な分子システム」(名古屋大学)。2008 年 5 月 30-31 日
11. 山本治樹・久留宮祥平・大橋理恵・藤田祐一「ラン藻 *Leptolyngbya boryana* における暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素の生化学的解析」第 8 回光合成研究会公開シンポジウム「光合成を支える多様な分子システム」(名古屋大学)。2008 年 5 月 30-31 日
12. 村木則文・野亦次郎・志波智生・藤田祐一・栗栖源嗣「光非依存型(暗所作動型)プロトクロロフィリド還元酵素の X 線構造解析」第 49 回日本植物生理学会(札幌)、2008 年 3 月 22 日
13. 野亦次郎・江端梢・村木則文・栗栖源嗣・藤田祐一「ニトロゲナーゼ類似型プロトクロロフィリド還元酵素の触媒コンポーネント NB-蛋白質の金属中心の解析」第 49 回日本植物生理学会(札幌)、2008 年 3 月 22 日
14. 山本治樹・久留宮祥平・大橋理恵・藤田祐一「ラン藻 *Leptolyngbya boryana* (*Plectonema boryanum*) のプロトクロロフィリド還元酵素の触媒コンポーネント NB-蛋白質 (ChlN-ChlB) の生化学的解析」第 49 回日本植物生理学会(札幌)、2008 年 3 月 22 日
15. 後藤武知・南崎啓・藤田祐一「ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 のヘム・クロロフィリド生合成系における 2 つのコプロポルフィリノーゲン III オキシダー

ぜ」第 49 回日本植物生理学会(札幌)、2008 年 3 月 22 日

16. Fujita, Y. Characterization of nitrogenase-like enzymes in chlorophyll and bacteriochlorophyll biosynthesis pathways. International Symposium on Chemistry of Reductases, March 11-12, 2008, Nagoya, Japan (Invited Speaker)
17. Fujita, Y. Final two stages of chlorophyllide *a* formation in chlorophyll biosynthesis: E-ring formation and D-ring reduction. 7th International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors in Photosynthetic Organisms, December 9-14, 2007, Kyoto, Japan (Invited Speaker)
18. 藤田祐一「ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 におけるクロロフィルの E 環生成反応」かずさ DNA 研究会ラン藻の分子生物学 2007 (かずさ DNA 研)、2007 年 12 月 4 日
19. 南崎啓・後藤武知・藤田祐一「ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 のクロロフィルの E 環は 2 つの酸素依存型酵素によって生成される」光合成研究会シンポジウム (岡山大学)、2007 年 5 月 25・26 日
20. 野亦次郎・溝口正・民秋均・藤田祐一「クロロフィル生合成系におけるニトロゲナーゼ類似酵素の阻害剤」第 71 回日本生化学会中部例会 (名古屋大学)、2007 年 5 月 31 日

[図書] (計 4 件)

1. 藤田祐一、野亦次郎 (2009) 光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* における大量発現と形質転換「光合成研究法」低温科学 67 巻、pp. 648-652、北海道大学低温科学研究所
2. 藤田祐一、野亦次郎 (2009) 嫌気条件下でのタンパク質精製「光合成研究法」低温科学 67 巻、pp. 423-427、北海道大学低温科学研究所
3. Minamizaki, K., Goto, T. and Fujita, Y. (2008) Chlorophyll *a* biosynthesis under anaerobic environments in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. In *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis*, Edited by Allen, J.F., Gantt, E., Golbeck, J.H., Osmond, B., Springer, pp. 1081-1084.
4. Nomata, J., Kitashima, M., Ogawa, T., Inoue, K and Fujita Y. (2008) Biochemical analysis of two catalytic components of nitrogenase-like enzymes protochlorophyllide reductase and chlorophyllide *a* reductase from *Rhodobacter capsulatus*. In *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International*

Congress on Photosynthesis, Edited by Allen, J. F., Gantt, E., Golbeck, J. H., Osmond, B., Springer, pp. 1107-1110

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 祐一 (FUJITA YUICHI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号 : 80222264