

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02018

研究課題名(和文) 長波長吸収型光合成への進化再現によるレッドエッジ変化の実験的検証

研究課題名(英文) Reproduction of the evolutionary process of photosynthesis utilizing near infrared light toward astrobiology

研究代表者

塚谷 祐介 (Tsukatani, Yusuke)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭研究プログラム)・副主任研究員

研究者番号：10421843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：可視光利用型光合成から近赤外光利用型光合成への進化は、クロロフィリド酸化還元酵素(COR)という色素生成酵素内の進化でモデル化する。本研究では、この進化を駆動させるアミノ酸領域を同定するために、まずCORの立体構造を予測して、基質となる色素中間体の結合部位周辺のアミノ酸残基を選定し、COR構成遺伝子の複合変異ライブラリを作製した。変異DNAライブラリを形質転換した大腸菌株をマイクロドロップレット中に封入することでCORの発現と活性測定を行う。そのため、ドロップレット内におけるCOR活性試験の条件検討を進めた。またCORの前後で働くと考えられる色素色素生成酵素についてもその機能解析を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立した、または今後確立する実験系を複合することで試験管内進化した近赤外光型CORを抽出して、その進化発生の元となるアミノ酸変化を同定することが今後の課題である。これによって長波長吸収型光合成への進化を実験的に証明することができ、地球と同様の光質環境変化が見込まれる系外惑星においても同様の進化が起きることを示唆する。生命居住惑星の探索におけるバイオシグニチャー選定の際に重要な知見を提供することが期待される。

研究成果の概要(英文)：To understand the evolutionary process of photosynthesis utilizing near infrared light, we choose chlorophyllide oxidoreductase, COR, as a model system. In this study, we constructed combinatorial mutation libraries of the genes encoding COR subunits. The designed mutations included amino acid substitutions close to the predicted substrate binding site. We attempted to pack a mutated gene or a E. coli cell possessing a mutated gene into a micro-droplet by the microfluidics technique. We also tested the enzymatic assay conditions for COR in the micro droplet.

研究分野：光合成微生物学、分子生物学、生化学

キーワード：色素生成 光合成 バクテリオクロロフィル バイオシグニチャー クロロフィリド酸化還元酵素 レッドエッジ

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ハビタブル惑星の探査対象として近年相次いで発見されている赤色矮星が注目されており、その周辺惑星におけるバイオシグニチャーの観測が期待されている。バイオシグニチャーの1つとして、光合成生物が光波長を吸収することによって起こるレッドエッジと呼ばれる反射スペクトルが挙げられる。赤色矮星は太陽質量の半分以下の低温度星であり、その周辺惑星の地表面では可視光よりも近赤外光が優占するため、レッドエッジも長波長側の近赤外線に移動すると考えられてきた。しかしながら、最近の研究により、近赤外線は水で吸収されるため水中で発生・進化して最初に上陸する光合成生物は地球と同じように光合成に可視光を利用すること、その結果従来の予想とは異なり、赤色矮星周辺であっても地球の植生と同じ位置にレッドエッジが現れる可能性が高いことが提唱された。

この仮説をさらに発展させるなら、水中深くで可視光を利用していた初期の光合成生物は、その後、浅水域や陸上に進出する際に、地表ではなお優占している近赤外光を利用した光合成へ適応する可能性も高い。光合成の光波長利用の進化は、旧来考えられていた近赤外光→可視光ではなく、可視光→近赤外光であると言える。これは我々の近年の研究結果とも一致する。我々はこれまでに、クロロフィリド酸化還元酵素(Chlorophyllide-*a* oxidoreductase: COR)が、種によって異なる反応性を示すためにそれぞれの種内で可視光吸収型あるいは近赤外光吸収型の色素をもたらすことを示した。つまり、可視光利用から近赤外光利用への進化は、COR という1つのタンパク質の進化でモデル化することが可能である。赤色矮星周辺惑星では水域のレッドエッジ観測は水の反射によって難しいため、観測達成には地表面での光利用に関する情報が必須である。しかし現状では光合成生物による光波長利用の変遷に関する情報がないことが問題であり、近赤外光吸収型への進化がわずかな変異によって速やかにもたらされるかどうかは鍵となる。

2. 研究の目的

本研究は、可視光吸収型光合成から近赤外光吸収型光合成への進化を再現するために、クロロフィリド酸化還元酵素(COR)のタンパク質進化過程を明らかにすることを目的とする。水中で可視光を利用していた初期の光合成生物が、陸上進出時にどれだけ速やかに近赤外光利用型へと進化することが可能であったのかを検証する。

3. 研究の方法

クロロフィリド酸化還元酵素(COR)をコードする遺伝子のコンビナトリアルな変異ライブラリを作製し、CORの酵素進化を試験管内で実験的に再現して、その反応性が変化する過程を明らかにする。変異ライブラリの組み合わせは、次世代シーケンサーを用いて目的の組み合わせのものが作製されたかを確認する。作製できた変異ライブラリを用いて、*in vitro*の無細胞反応系内で変異型COR発現と活性測定を行い、合成される色素が長波長側の吸収を示すように変化した系を選抜する。選抜したライブラリの配列決定を行い、光吸収帯の変化を示した遺伝子ライブラリの配列決定を行う。得られた結果を元に、長波長型への進化に必要なアミノ酸置換を特定し、それをもとにモデル光合成細菌のCORに部位特異的変異を導入した場合に変化する酵素機能を解析する。

4. 研究成果

CORの立体構造は不明であるため、同一タンパク質ファミリー内の類似タンパク質である暗所作動型プロトクロロフィリド酸化還元酵素(DPOR)の立体構造情報を利用して、COR触媒サブユニットの立体構造予測を行った。

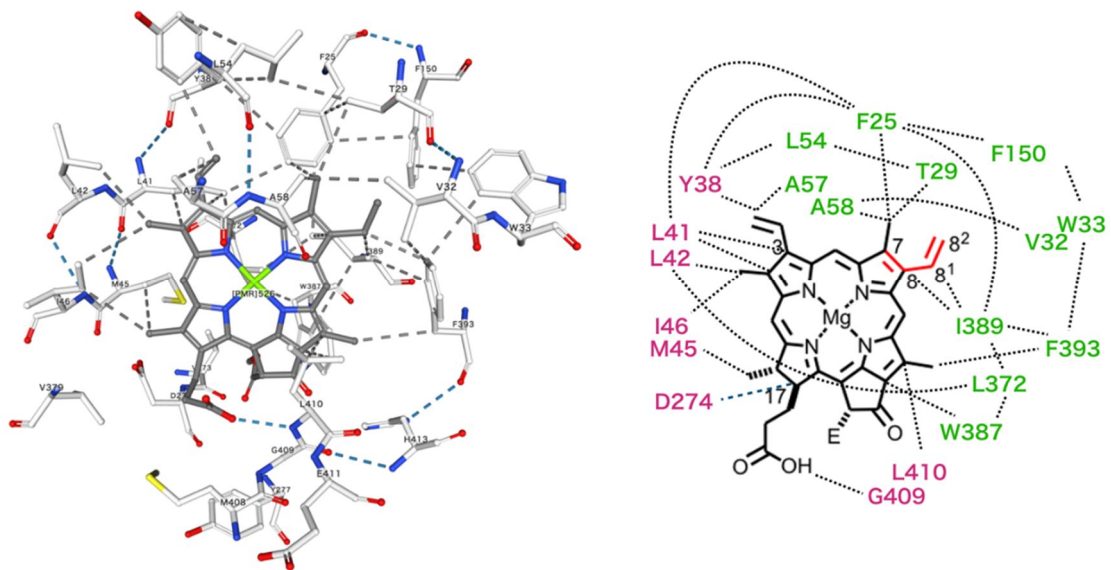


図1 . DPOR の立体構造をもとに予測した COR 構造における基質結合部位周辺のアミノ酸 .

予測した立体構造にもとづき、基質であるクロロフィリドの結合部位周辺のアミノ酸を選定した。結果として、COR の一次配列上の異なる 2 領域にランダム変異導入領域を設定した。かつ、各領域において、アミノ酸が任意の別のアミノ酸構造に変化するように、コンビナトリアル DNA ライブラリを設計した（1 アミノ酸につき概ね 4~9 種類のアミノ酸へランダム変異するように設計）。COR 遺伝子の全長ライブラリを作製するために、まず 2 箇所の変異導入箇所だけの短い DNA ライブラリ断片を作製した（図 2）。それら以外の遺伝子領域は通常の PCR 法により遺伝子断片を作製した。合計 5 つの遺伝子断片を In-Fusion 法により連結し（図 3）コンビナトリアル DNA ライブラリを作製した。

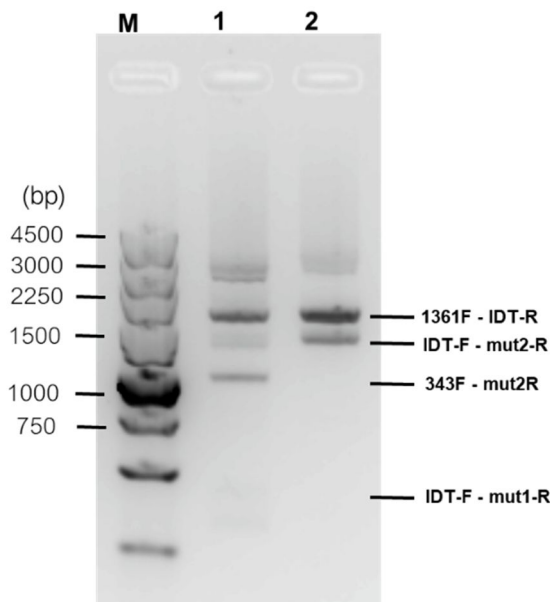


図 2 . 各遺伝子断片の電気泳動図.

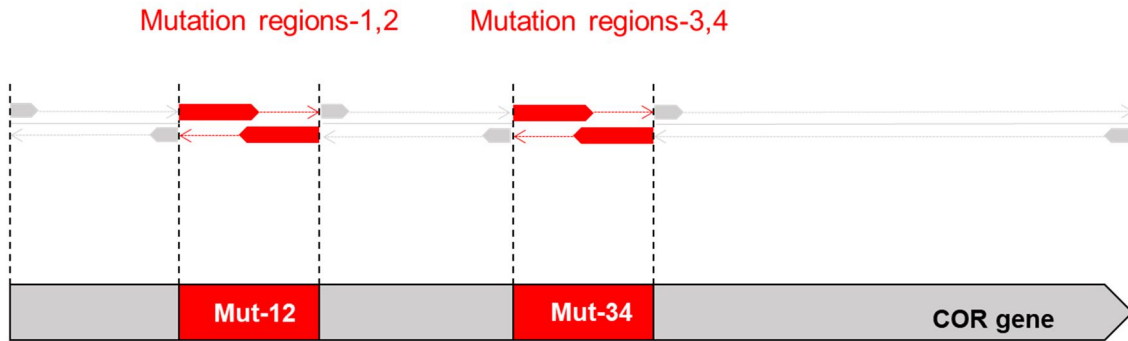


図 3 . 変異導入 DNA ライブラリ作製の概要.

作製した DNA ライブラリを次世代シーケンサーを用いて配列解読したところ、当初デザインした配列領域において変異が想定のリandomネスで入っていることを確認できた (図 4) .

Mutation regions #1 and #2

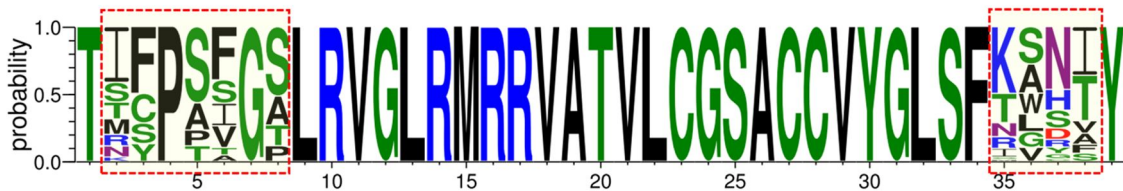


図 4 . 次世代シーケンサーにより配列確認したアミノ酸変異導入のリandomネスを表す.

作製したライブラリを用いた変異タンパク質の発現は、マイクロ流体技術により作成するドロップレット内で行う。ランダムな変異を施された COR タンパク質をコードする DNA を形質転換した大腸菌が、各マイクロドロップレットにおおよそ1~数分子程度封入されるようにする。マイクロドロップレット内で活性試験を行うためにネイティブ COR を形質転換した大腸菌を用いて活性測定の条件検討を進めている。基質としては、原型と変異後の COR のどちらとも反応可能な 8-ピニルクロロフィドを用いる。

長波長化を示したエマルジョンから、元となった遺伝子ライブラリを取り出し、配列決定を行うことで変異箇所を同定する。複数箇所に変異が入る場合もあるため、吸収帯の長波長化の度合いと照らし合わせて、色素合成触媒反応に重要なアミノ酸残基を絞り込む。

また、可視光利用型から長波長光利用型への進化過程のスクリーニングだけでなく、長波長型から可視光型への逆進化を促す変異箇所のスクリーニング系の構築にも着手した。この系では逆進化が起きて可視光を吸収できるようになった株のみを取得するように設計することで、スクリーニングの時間を大幅に短縮できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsukatani, Y., Harada, J., Kurosawa, K., Tanaka, K., and Tamiaki, H.	4. 巻 204
2. 論文標題 Incomplete hydrogenation by geranylgeranyl reductase from a proteobacterial phototroph <i>Halorhodospira halochloris</i> , resulting in the production of bacteriochlorophyll with a tetrahydrogeranylgeranyl tail.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jb.00605-21	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 Yuki Tsuzuki, Yusuke Tsukatani, Hisanori Yamakawa, Shigeru Itoh, Yuichi Fujita, and Haruki Yamamoto	4. 巻 11
2. 論文標題 Effects of light and oxygen on chlorophyll d biosynthesis in a marine cyanobacterium <i>Acaryochloris marina</i> .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 915
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants11070915	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 Yamamoto, H., Mizoguchi, T., Tsukatani, Y., Tamiaki, H., Kurisu, G., and Fujita, Y.	4. 巻 21
2. 論文標題 Chlorophyllide a oxidoreductase preferentially catalyzes 8-vinyl reduction over B-ring reduction of 8-vinyl chlorophyllide a in late steps of bacteriochlorophyll biosynthesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1760 - 1766
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.201900785	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 -
1. 著者名 Tsukatani, Y., Hirose, Y., Harada, J., Yonekawa, C., and Tamiaki, H.	4. 巻 140
2. 論文標題 Unusual features in the photosynthetic machinery of <i>Halorhodospira halochloris</i> DSM 1059 revealed by complete genome sequencing.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photosynthesis Research	6. 最初と最後の頁 311 - 319
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11120-019-00613-0	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 -

1. 著者名 Teramura, M., Tsukatani, Y., Harada, J., Hirose, M., and Tamiaki, M.	4. 巻 593
2. 論文標題 Stereoselective C3-substituent modification and substrate channeling by oxidoreductase BchC in bacteriochlorophyll a biosynthesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 799 - 809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13372	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 -

1. 著者名 Madigan, M.T., Resnick, S.M., Kempfer, M.L., Dolnalkova, A.C., Takaichi, S., Wang-Otomo, Z., Toyoda, A., Kurokawa, K., Mori, H., and Tsukatani, Y.	4. 巻 201
2. 論文標題 Blastochloris tepida, sp. nov., a thermophilic species of the bacteriochlorophyll b-containing genus Blastochloris.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Microbiology	6. 最初と最後の頁 1351 - 1359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00203-019-01701-4	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 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 塚谷祐介
2. 発表標題 光合成生物の近赤外光利用型への進化再現
3. 学会等名 第9回宇宙における生命ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚谷祐介
2. 発表標題 クロロフィル色素の生合成酵素の多様性と進化
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚谷祐介
2. 発表標題 クロロフィル色素の生合成系の進化
3. 学会等名 日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚谷祐介、原田二郎、田中圭子、民秋均
2. 発表標題 好塩性光合成細菌Halorhodospira halochlorisのグラニルグラニル還元酵素
3. 学会等名 日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塚谷祐介
2. 発表標題 光合成生物による利用波長変遷の進化再現実験
3. 学会等名 第8回宇宙における生命ワークショップ
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 編集：嶋田敬三、高市真一（執筆：浅井智広、井上和仁、大友征宇、嶋田敬三、高市真一、塚谷祐介、永島賢治、原田二郎、平石明）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 裳華房	5. 総ページ数 320
3. 書名 光合成細菌 酸素を出さない光合成	

〔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
研究分担者	藤島 皓介 (Fujishima Kosuke) (00776411)	東京工業大学・地球生命研究所・准教授 (12608)	
研究分担者	松村 茂祥 (Matsumura Shigeyoshi) (40619855)	富山大学・学術研究部理学系・講師 (13201)	

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