

葉 緑 体 の 起 源 の 解 明

姫路工業大学理学部助手

菓子野 康浩

葉緑体の起源の解明

1 研究の背景と目的

光合成生物は、補助色素としてフィコビリリンを持つラン色細菌から補助色素としてクロロフィル b を持つ高等植物葉緑体へと進化していったと考えられている。このような葉緑体の進化を考えるために、各種光合成生物の光合成関連そして葉緑体の遺伝子が解析されてきている。現在までのところ、高等植物の葉緑体については、名古屋大学の杉浦先生がタバコ（双子葉）葉緑体をはじめイネ（単子葉）、クロマツ（裸子植物）の葉緑体について、また京都大学の大山先生がゼニゴケについて全DNA配列を決定された。そのほかにもいろいろな種で光化学系に關与するタンパク質の遺伝子の配列が三々五々、分析されてきている。緑藻ではユーグレナで葉緑体の全DNA配列が解析されている。また、紅藻の葉緑体DNAの配列もすべて決定された。

原核生物であるラン色細菌は実験系としても非常に有用なためいくつもの種で光化学系の各種タンパク質の遺伝子について解析がなされてきている。ところが、酸素発生型原核緑藻（*Prochlorophyte*）については光化学系II複合体の20近くにもなるタンパク質の中でわずかに4つの遺伝子が報告されているにすぎず、光化学系Iに至ってはまだ報告は見られない。この原核緑藻はラン色細菌と同じく原核生物ではあるが、補助色素として高等植物と同じクロロフィル b を持っており、光合成生物の進化を考える上で“生きた化石”とも言える非常に興味深い生き物である。

そこで、本研究ではこの原核緑藻プロクロロンの光化学系および光捕集系にとくに注目して、そのアミノ酸配列そして遺伝子のDNA配列を明らかにして、原核緑藻の進化上の位置づけを明らかにすることを目的として研究を行った。また、ラン色細菌が原核動物と細胞内共生しているとみられ、葉緑体の進化の過程を物語る*Cyanophora*についても分析した。

2 研究方法・研究内容

チラコイド膜の調製 パラオ近海のホヤに共生しているプロクロロンを単離し、小俣ら（1985）の方法を改変した非連続蔗糖密度勾配浮上遠心により調製した。

電気泳動とアミノ酸配列分析 チラコイド膜のタンパク質を5% LDS、40mM DTT および熱処理により変性させ、6M尿素を含む18%～24%アクリルアミドゲルの電気泳動により分離した。これを、PVDF膜（ProBlott）に電気泳動的に転写し、アミドブラックで染色した。目的のタンパク質のバンドを切り出し、ABI社製タンパク質シーケンサ473Aにてアミノ酸配列を決定した。アミノ酸配列の相同性検索はGCG遺伝子解析ソフトウェアパッケージにより行った。

非変性電気泳動 非変性電気泳動は、AllenとStaehelin（1991）の方法を改良して行った。オクチルグルコシド、ドデシルマルトシド、LDSの3種類の界面活性剤をクロロフィルに対して20:20:2の重量比で0.5mg chl/mlのチラコイド膜懸濁液に添加し、30分間、暗中、氷上で処理した。可溶化されなかったものを遠心により除き、6%アクリルアミドのゲルを使い、2mA、4°C、暗中で3時間電気泳動した。

Allen, K. D. and Staehelin L. A. (1991) Resolution of 16 to 20 chlorophyll-protein complexes using a low ionic strength native green gel system. *Anal. Biochem.* 194: 214-222.

Omata, T., Okada, M. and Murata, N. (1985) Separation and partial characterization of membranes from *Prochloron* sp. *Plant Cell Physiol.* 26: 579-584.

3 研究結果

プロクロロンから調製したチラコイド膜を電気泳動したところ、10数種のポリペプチドが分離された(図1)。ホウレンソウ (*Spinach*) のチラコイド膜やラン色細菌 *Synechococcus vulcanus* の光化学系II標品と比べるとそのバンドの数は極端に少ないことがわかる。各ポリペプチドのバンドもやや広がりが見られる。海産藻類のチラコイド膜などでよく見られる現象である。電気泳動用の試料の調製でLDSを入れた際に、タンパク質の変性ととともに凝集してしまった可能性も考えられる。事実、プロクロロンのチラコイド膜だけは濃縮ゲルのところもCBBで染色され、タンパク質が残っていることがわかる。このようにして分離されたタンパク質をプロットし、それら18本のN-末端アミノ酸配列を分析した(図中A~R)。光化学系I、光化学系IIともに10数種類のサブユニットタンパク質から構成されているが、図1で分離されたタンパク質から、光化学系Iの5種(PsaB, PsaD, PsaL, PsaF, PsaK)、光化学系IIの8種(PsbB, PsbE, PsbH, PsbL, PsbI, PsbT, PsbM, PsbK)、その他のクロロフィルタンパク質1種(IsiA)、計14種の光化学系のタンパク質を同定できた。これらのアミノ酸配列を他の光合成生物の対応するタンパク質のアミノ酸配列と比較してみると高い相同性を示し、とくにラン色細菌のものとは80%近い相同性を示すものもあった。プロクロロンを始め原核緑藻の光化学系Iの構成タンパク質の一次構造についてはこれまで報告がなく、これが初めての知見である。光化学系IIについては4種のタンパク質の遺伝子配列が報告されているだけであったが、ここで同定されたタンパク質はそれらのこれまでに報告されているものとは別のサブユニットタンパク質である。図1の結果から、プロクロロンも他の酸素発生型光合成生物とほぼ同じ光化学系の仕組みを持っていることが分かった。

図2にそれらタンパク質のひとつ、光化学系IIの構成成分であるチトクロームb559のLサブユニット(PsbE)の系統樹を示した。双子葉植物(図中、spinach、pea)、針葉樹(blackpine)、こけ(liverwort)、緑藻(chlamydomonas)、紅藻(cyanophora)、ラン色細菌(*Synechocystis_6803*, *S_vulcanus*)という、系統分類的な距離をよく反映していることが分かる。プロクロロンは、このような分類郡の中でラン色細菌にもっとも近く、進化的に両者が非常に近いということがわかる。そして、プロクロロンはクロロフィルbを持っているものの、ラン藻と同じフィコビリンを補助色素として持っている紅藻の方が高等植物と相同性が高いという非常に興味深いことも明らかになった。

また、図には示さなかったが、光化学系Iのサブユニットタンパク質であるPsaDについて、新たに同定した*Cyanophora paradoxa* (cyanelleと呼ばれるラン色細菌様のものが原生動物中に取り込まれている)のアミノ酸配列も含めて系統樹を作成したところ、原核生物であるラン色細菌と葉緑体を持つ生物の二つのグループに分けられた。プロクロロンはラン色細菌のグループに入り、PsbEの場合の結果と一致した。両者が非常に近縁であることを物語っている。*Cyanophora*は葉緑体を持つ生物群の中に入った。*Cyanophora*もラン色細菌と同様のフィコビリンを補助色素として持っているが、クロロフィルbを持っているプロクロロンよりも高等植物葉緑体と相同性が高いということが言える。これも、PsbEの場合の結果と一致した。他の光化学系のタンパク質からも、概ね同様の結果がえられた。

これらの結果から、プロクロロンは補助色素として高等植物と同じクロロフィルbを持っているが、ラン色細菌と非常に近縁であり、むしろフィコビリンを持っている紅藻の方が高等植物とは近縁であるということがわかった。これは、補助色素としてクロロフィルbを獲得した原核光合成生物が細胞内共生によって葉緑体へと進化したというより、フィコビリンを補助色素として持っているラン色細菌が細胞内共

生によって葉緑体になり、その後クロロフィル b を獲得していったということを示唆している。

図1では、光化学系のサブユニットタンパク質の他にもうひとつIsiAが同定された。IsiAタンパク質は、これまでのところラン色細菌でしか発見されていなかった。ラン色細菌ではこのタンパク質は一種のストレスタンパク質として発現してくる。これは鉄欠乏培地で培養したときに顕著に現れるが、ラン色細菌がこの状態におかれるとこのIsiAタンパク質とともにフェレドキシンの代わりにフラボドキシンを合成してくる。このIsiAはクロロフィル結合タンパク質ということが知られている。このタンパク質は非常に蛍光性が高く、吸収ピークを670-672nmに持つ。したがって、鉄欠乏培地でラン色細菌を培養すると、通常680nmにある吸収ピークが670nmぐらいにshiftしてしまう。さらに非常に興味深いことにこれは光化学系IIのコアを構成する集光性クロロフィルタンパク質であるCP43（クロロフィルとしては a のみを結合している）と相同性を持っている。このタンパク質がラン色細菌のCP43とどのような関係を持ち、このように進化してきたのかはわからないが、現在のラン色細菌ではIsiAタンパク質は細胞が正常でない状態におかれたときに発現してくるようになってしまっている。しかし、プロクロロンでは電気泳動像からもわかるようになんかなり大量に発現している。ただこれが”共生”というストレスにおかれたために大量に発現しているという可能性も否定はできない（アリマキの細胞内に共生する細菌は共生することでストレスタンパク質を合成することが知られており、このプロクロロンはホヤに共生しているため）。しかし、積極的な意味を見出すこともできる。プロクロロンはクロロフィル b を持っている。ところが、現在までに高等植物でクロロフィル b を結合している集光性色素タンパク質（LHC）と相同性を示すタンパク質は発見されていない。IsiAはクロロフィルを結合することができ、またプロクロロンでは大量に発現しているので、LHCの代わりにIsiAがクロロフィル b を結合して集光性クロロフィルタンパク質となっている可能性が考えられる。

そこで、プロクロロンのチラコイド膜を非変性条件下で電気泳動して、クロロフィルを結合したままのタンパク質を分離した。この非変性ゲル電気泳動により、10本以上のバンドが分離された。これを8つの画分（a~h）に分けた。aからdまでの画分ではほとんど蛍光が見られず、光化学系のタンパク質複合体が含まれていることを示唆している。fおよび、遊離クロロフィルやカロチノイドが多く見られるhの画分で強い蛍光が見られる。ここでは吸収された光エネルギーが利用されることなく蛍光として放出される割合が高いことを示している。fの画分は遊離クロロフィルは含まれていないので、光化学系と分離したためにエネルギーを転移できなくなった光捕集系のクロロフィルタンパク質複合体があると考えられる。各画分のクロロフィル a/b 比を求めると、画分a、b、e、fでの値が小さく、クロロフィル b が多く含まれていることが分かる。吸収スペクトルもこれを反映したものとなっていた。したがって、クロロフィル a/b 結合タンパク質は、これらの画分に多く含まれていると考えられる。

非変性ゲル電気泳動後、そのゲルを2次元電気泳動により各画分のタンパク質複合体のサブユニット組成を分析した。その結果、クロロフィル b が多く含まれていた上述の画分a、b、e、fのいずれの画分でも確認されるタンパク質が2種類（38および30 kDa程度）見つかった。とくに、画分fはそのふたつのタンパク質のみであった。したがって、クロロフィル b を結合するタンパク質はこれらのうちのいずれか、または両方、ということが言える。そこで、これらのタンパク質のアミノ酸配列を分析したところ、38 kDaの方はIsiA、30 kDaの方は未知のタンパク質であった。こ

これらの結果から、原核緑藻プロクロロンの光捕集クロロフィル *a/b* タンパク質は IsiA あるいは 30 kDa の未知のタンパク質であるといえる。ラン色細菌では IsiA がクロロフィル *a* のみを結合しているの、プロクロロンでも IsiA がクロロフィル *a* を結合し、未知の 30 kDa タンパク質がクロロフィル *b* のみを結合している可能性も考えられる。タンパク質量としては IsiA の方がかなり多いので、これがクロロフィル *a/b* をともに結合している可能性が高い。いずれにしても、原核緑藻プロクロロンは高等植物と同じくクロロフィル *b* を持っているが、そのクロロフィル *b* を結合して光捕集機能を果たしているタンパク質は、他の光合成生物とはまったく異なるものであることが分かった。

プロクロロンの進化上の位置づけをさらに明確にするために、この研究で得られたタンパク質のシーケンズデータを基に、プロクロロンの光化学系の遺伝子をクローニングすることを試みた。そのために、まずプロクロロンから DNA を単離・精製した。これは、植物の葉緑体での単離法を援用した。このようにして調製してきた試料は非常に多くの核酸を含んでいた。ところが、これを電気泳動したところ長い DNA は非常に少ないことがわかった。これは、いったん冷凍したものを解凍したため壊れていた細胞があり、リゾチーム処理などの最中にヌクレアーゼが働いてしまったのか、あるいはホヤなど海産動物はヌクレアーゼやプロテアーゼ活性が非常に高いので、残っていたホヤのヌクレアーゼによって分解されてしまったものではないかと考えられる。現在、DNA の抽出法を改善したうえで、ライブラリーを作成することを検討中である。

4 研究がもたらす効果および波及効果

”原核光合成生物が真核非光合成生物に共生して葉緑体に進化した”という共生説が広く支持されている。その葉緑体の祖先となった原核生物の生き残りが現在のラン色細菌あるいは原核緑藻であると考えられている。プロクロロンはラン色細菌とは異なり、補助色素としてクロロフィル *b* を持っており、この点ではより高等植物葉緑体に近い。しかし、補助色素としてフィコビルリンを持っているラン色細菌の方がより近いという意見もある。このような意見の相違は、原核緑藻の光化学系の構成タンパク質、遺伝子についての情報が極端に少ないことが主たる要因である。

本研究では、原核緑藻プロクロロンを実験材料としてその光化学系の構成タンパク質のアミノ酸配列の一部を明らかにした。光合成生物の光捕集系はフィコビルリン系からクロロフィル *b* 系へと進化してきているので、クロロフィル *b* 系の方が進化上は有利であったと考えられる。しかし、この研究により、高等植物葉緑体は原核緑藻を経由して進化してきたのではなく、ラン色細菌から進化してきた可能性が高いということが分かった。原核緑藻は、ラン色細菌から進化していったクロロフィル *b* を獲得したにも関わらず、植物界での優占種とはならなかったのである。このことは、クロロフィル *b* 獲得が葉緑体への進化にはつながらなかったこと、葉緑体のクロロフィル *b* の獲得は、細胞内共生のあとに起こった可能性が高いことを示している。また、高等植物の LHC と相同なクロロフィルタンパク質がプロクロロンでは見つからなかったことから、この LHC を持ったまだ見つかっていない、あるいはすでに絶滅してしまった別の原核緑藻が葉緑体へと進化していった可能性も考えられる。

この原核緑藻の光化学系の構成タンパク質、遺伝子についての解析を今後もさらに進めていくことで現世の真核植物門の進化の過程について新しい、そしてより詳しい知見が得られることがおいに期待される。

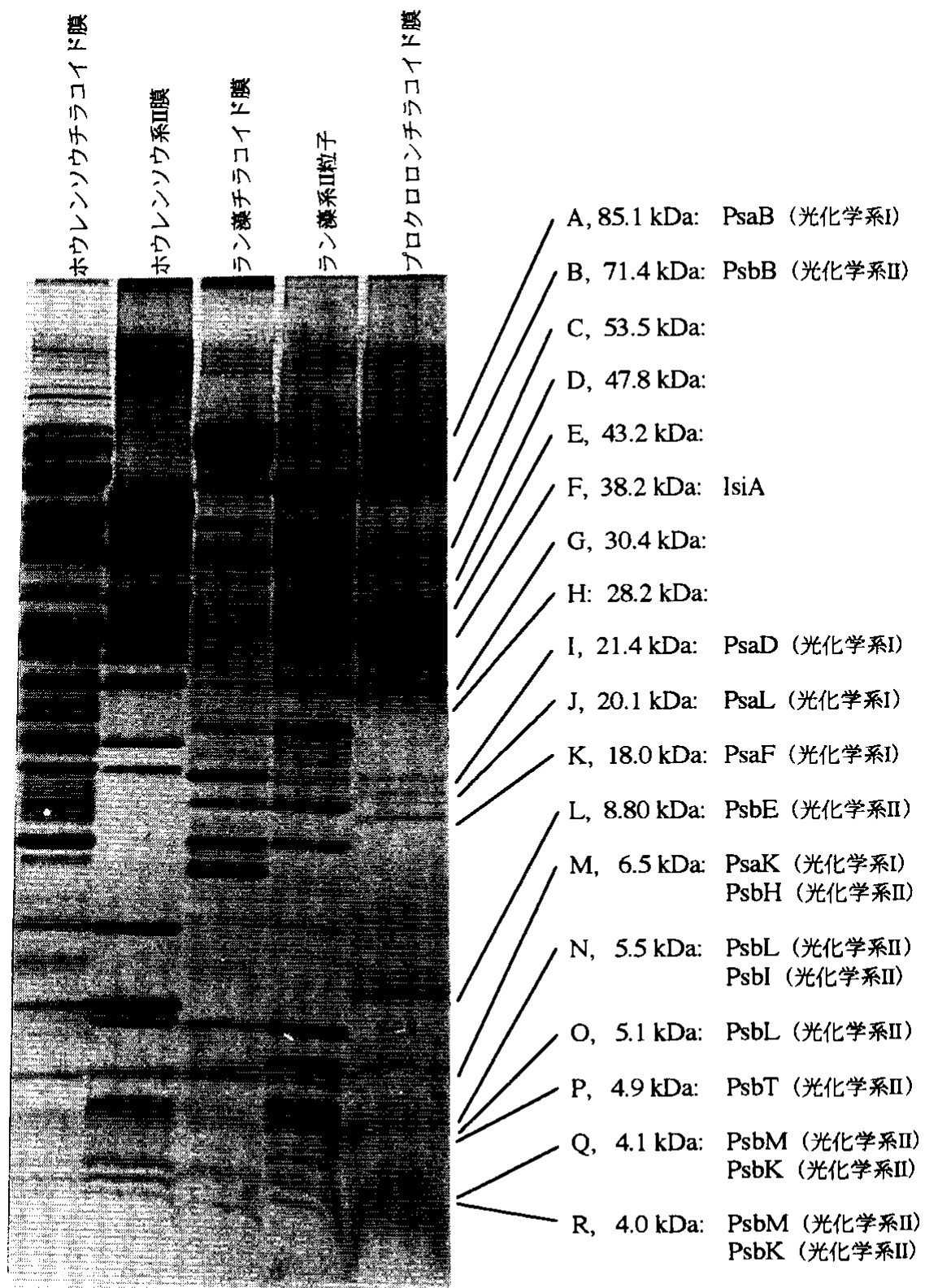


図1 原核緑藻プロクロロンのチラコイド膜の電気泳動像

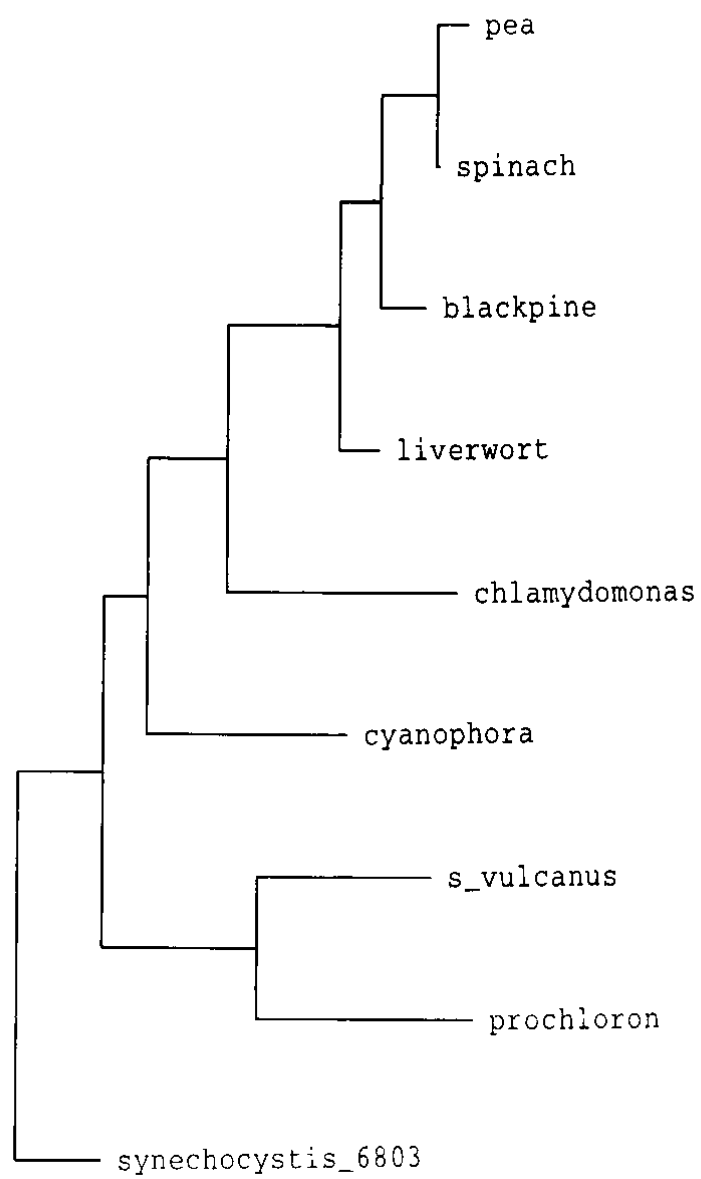


図2 PsbEのアミノ酸配列を元にした系統樹

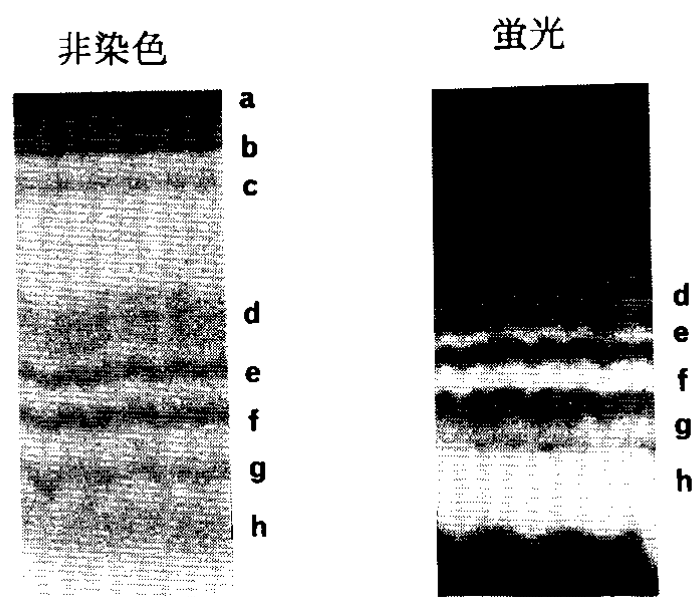


図3 プロクロンチラコイド膜の非変性ゲル電気泳動