

解説

クロロフィル合成系の多様性はいかにして生まれたか？[‡]北海道大学 低温科学研究所¹, CREST/JST²伊藤寿^{1,2}, 田中歩^{1,2}, 田中亮一^{1,2*}

1. はじめに

光合成生物はchlorophyll (Chl) *a*, *b*, *c*, *d*, *f* や bacteriochlorophyll *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *g* といった多様なクロロフィルやバクテリオクロロフィルを合成する。これらのクロロフィル類は、それぞれ異なった吸収波長を持ち、光合成生物が多様な光環境に適応する原動力となっている。これらのクロロフィル類のうち、Chl *a* は、すべての酸素発生型の光合成を行う生物にとって必須の光合成色素である。酸素発生型の光合成がラン藻から真核型光合成生物のプラスチドへと受け継がれたのと同様に、クロロフィル生合成を担う酵素群もラン藻から真核型光合成生物へと受け継がれた。しかし、意外なことにクロロフィル合成経路の一部の反応は、ラン藻と真核型光合成生物において、全く違う酵素が担っていることが明らかになってきた。「なぜ」違う酵素が存在するのか、という問に対しては現状では明快な答えはない。しかし、クロロフィル合成系の「酵素の」多様性は、クロロフィルの多様性が「いかに」生まれたのか、という問に対しては、ヒントを与えるかもしれない。本稿では、protoporphyrinogen IX oxidase (PPOX) と divinyl chlorophyllide reductase (DVR) の2つの酵素の多様性を通じて、クロロフィルの多様性が「いかに」生まれたのか、という点について考察を試みる。

2. 高等植物のクロロフィル合成

Chl *a* は、高等植物においては、glutamyl-tRNAを出発物質として、15段階の酵素反応によって合成される(図1にその前半の反応経路の概略が、図2に後半の反応経路が記載されている)。これらの酵素は2005年までにすべて同定された¹⁾。(高等植物が持つ、もう一つのクロロフィル、Chl *b* の代謝経路は、後述するように、ようやく2012年に同定された。)さまざま

な光合成生物のゲノム情報を調べてみると、高等植物のChl *a* 合成経路の酵素は、その大半がラン藻由来であることが明らかとなった²⁾。しかし、予想に反して、大部分のラン藻のゲノムには、植物のPPOXとDVRの2つの酵素はコードされていないことが明らかになった^{1,2)}。当時、ゲノム情報の公開されていた約30種類のラン藻のゲノムのうち、植物型のPPOX遺伝子のホモログを有するラン藻は、*Trichodesmium erythraeum*と*Thermosynechococcus elongatus*のみであり³⁾、植物型のDVRを有するラン藻は5種類の*Synechococcus*のみであった⁴⁾。これらの結果は、大部

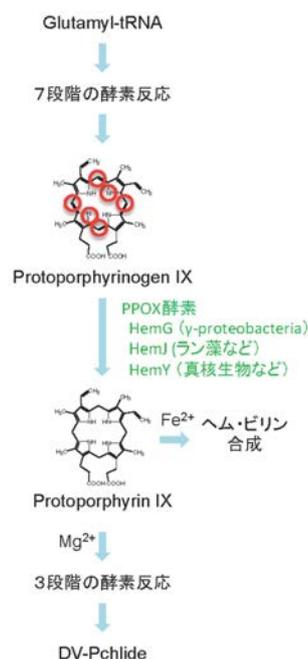


図1 クロロフィル代謝経路 (前半部分)

Protoporphyrinogen IXの酸化は、ヘム合成経路とクロロフィル合成経路に共通な反応である。HemY, HemG, HemJという3つのタイプのPPOXが同定された。Protoporphyrin IXにFe²⁺がキレートするとヘムが合成され、Mg²⁺がキレートされるとクロロフィル合成経路へと反応が進む。Protoporphyrinogen IXの酸化される部位を赤で示した。

[‡] 解説特集「光合成を支えるテトラピロール代謝の多様性」

* 連絡先 E-mail: rtanaka@lowtem.hokudai.ac.jp

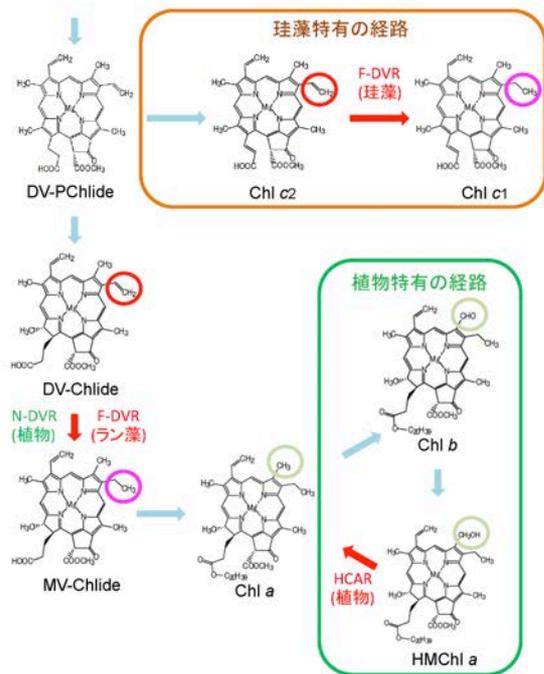


図2 Chl aの代謝経路（後半）およびChl b、Chl cの代謝経路

Mg-Protoporphyrin IX monomethylester以降、Chl a、Chl bおよびChl cの代謝経路の概略図を示した。Chl aおよびChl bの相互転換の経路（緑色の枠内）は、緑色植物に存在すると考えられる。Chl cの代謝経路は珪藻や褐藻などに存在するが、図に茶色の枠で示した、F-DVRによって触媒される経路は、珪藻のみに存在すると考えられる（本文参照）。

分のラン藻が植物型とは異なるPPOXやDVRを有することを示唆している。もし、この仮説が正しければ、大部分のラン藻はどのようなPPOXやDVRを有しているのだろうか？これらの酵素は、なぜ植物に受け継がれなかったのだろうか？これらの疑問に答えるとともに、ラン藻のテトラピロール代謝への理解を深めるために、われわれは、ラン藻のPPOXとDVRの酵素の同定を目指した。

3. 新しいスクリーニングのストラテジーで、ラン藻 PPOX 酵素を同定する

我々がラン藻のPPOX酵素の同定を目指して研究を始める前に、2種類のPPOX酵素が別の生物で同定されていた。1つは*hemY*遺伝子にコードされる55 kD前後のフラビン結合タンパク質で⁵⁾、phytoene desaturase などと同じFADを結合するタンパク質のsuperfamilyに属する^{1,6)}。植物、緑藻、枯草菌などがこのタイプのPPOXを持つことが知られていた。この酵素は、特に農業としてよく使われているacifluorfenなどの標的化

合物であることで有名である。もう一つは、*hemG*遺伝子にコードされる20 kD程度のタンパク質で、やはりフラビン結合タンパク質であり、Flavodoxinと構造上の類似性が見られる^{1,2,7)}。このタイプのPPOX酵素は、主に大腸菌などγ-proteobacteriaに見られる。

我々は当初、大腸菌*hemG*欠損株の機能的相補による、ラン藻PPOX遺伝子のスクリーニングを行ったが、一年近い試行錯誤にも関わらず、大腸菌*hemG*欠損株を相補するラン藻ゲノムDNAクローンは得られなかった。そこで、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 (*Synechocystis*)を用いた遺伝学的手法によってラン藻 P P O X 遺伝子を同定しようと方針を変更した。

*Synechocystis*は複数コピーのゲノムを持っているが、トランスポゾンを用いて導入したゲノム断片を用いて、組換えを起こさせることによって、ランダムに遺伝子を破壊することができる。しかし、単純にPPOX遺伝子を破壊してしまうとその株はヘムやクロフィルを合成できずに死滅してしまうと予想された。そこで、我々はランダムな遺伝子破壊に先立って、シロイヌナズナの*hemY*遺伝子を*Synechocystis*のゲノムに導入し、PPOX遺伝子の破壊にも耐えられる（と予想された）株を作成した。その上で、シロイヌナズナのPPOX酵素の阻害剤であるacifluorfenを培地に混ぜ、ランダムな遺伝子破壊を行った*Synechocystis*の変異体プールをスクリーニングした。PPOX遺伝子以外の必須遺伝子が破壊された株は、acifluorfenの有無に関わらず死滅し、必須でない遺伝子が破壊された株は、acifluorfenの有無に関わらず生育すると予想された。そして、ラン藻本来のPPOX遺伝子が破壊された株は、acifluorfenの存在下では死滅し、acifluorfenがなければ、(シロイヌナズナの*hemY*遺伝子のおかげで) 無事に生育できると予想された。果たして、6,686株の変異株をスクリーニングしたところ、acifluorfenに感受性を示す7株を単離することができた。これらの株はすべて *slr1790* 遺伝子の21 bp 上流にトランスポゾンタグが挿入されていた。*slr1790* 遺伝子は機能未知の24 kDの5回膜貫通タンパク質をコードしていた¹⁻³⁾。

我々は*slr1790*遺伝子がPPOXをコードしていると考え、野生型の*Synechocystis*でカナマイシン耐性遺伝子カセットにより、*slr1790*遺伝子の破壊を試みた。しかし、この遺伝子はラン藻にとって必須であるようで、完全に*slr1790*遺伝子が破壊された株を分離することはできなかった。複数コピーのゲノムのうち、一

部のコピーで *slr1790* 遺伝子が破壊された株は、protoporphyrin IX の異常な蓄積が観察された（細胞中では protoporphyrinogen IX が蓄積していたが、色素の抽出時に空気中の酸素で酸化され、protoporphyrin IX として検出されたと考えられる。）この結果は、*slr1790* 遺伝子が PPOX の反応に関わっていることを示す。そこで、我々は、*slr1790* 遺伝子を *hemJ* 遺伝子と命名した¹⁻³。しかし、*hemJ* 遺伝子がコードするタンパク質が単独で PPOX として機能しうなのか、それとも、PPOX に必須なコンポーネントの一部であるのかはこの時点では明らかではなかった。

そこで、我々は、*in vitro* での *hemJ* 遺伝子産物の PPOX 活性を調べようと試みた。しかし、いくつかの発現系を用いた試みはタンパク質発現がうまくいかなかったり、あるいは、活性を検出できなかったり、すべて失敗に終わったため、我々は、次に紅色硫黄細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の *hemJ* 遺伝子ホモログの組換えタンパク質を大腸菌で発現しようと試みた。*hemJ* 遺伝子ホモログの発現は成功し、我々は精製した *R. sphaeroides* の HemJ タンパク質が PPOX 活性を持つことを示すことができた。HemJ タンパク質はアッセイ系に電子受容体を加えなくても、活性を示したことから、我々は、HemJ タンパク質が酸素を電子受容体とするのではないかと考えているが、この点に関しては、今後のさらなる研究が必要である。

4. *hemJ* 遺伝子の分布

hemJ 遺伝子ホモログのラン藻のゲノムにおける分布を調べてみたところ、興味深い事実が明らかとなった^{3,5}。現在、Microbial Genome Database に登録されている 40 種類のラン藻ゲノムのうち、*Gloeobacter violaceus* PCC 7421 のみ *hemJ* と *hemY* の 2 種類のホモログを持つが、他の 39 種類は、*hemJ*, *hemY*, *hemG* のうち、いずれか一つのみを持つことがわかった。*hemJ* ホモログを持つものが、34 種類、*hemY* ホモログを持つものが 5 種類、*hemG* ホモログを持つものが 2 種類存在する。*hemJ*, *hemY*, *hemG* のいずれも持たないラン藻は存在しなかった。この結果は、HemJ, HemY, HemG が同じ酵素活性を有し、これらのうち一つが存在すれば、テトラピロール合成には十分である、ということを示唆しているように思われる。また、ラン藻のゲノム上で、*hemY* ホモログ、*hemG* ホモログと排他的に分布している遺伝子は、*hemJ* のみであった。この

結果もやはり、HemJ が HemY, HemG と重複する機能を有することを示唆している。

さらに、バクテリアゲノムにおける *hemJ* 遺伝子の分布を調べてみると、 α -proteobacteria, ϵ -proteobacteria, bacteroidetes などの門においても、*hemJ* ホモログが見つかった^{3,4}。特に、bacteroidetes においては、ラン藻と同様に *hemJ*, *hemY*, *hemG* ホモログとの排他的な分布が見られた^{3,4}。しかしながら、bacteroidetes では、さらに *hemJ*, *hemY*, *hemG* のいずれのホモログ遺伝子も持たない生物種が見つかった^{3,4}。Bacteroidetes では、未同定の第 4 のタイプの PPOX が存在すると考えられる。

5. なぜ 3 種類以上の異なるタイプの PPOX が存在するのか

HemJ, HemY, HemG という異なるタイプの PPOX が存在する理由は明らかではない。一つの仮説は、最も古いタイプの PPOX は嫌気的な酵素であり、好気的な環境には適していなかったが、ラン藻の出現によって地球上の酸素濃度が上昇することによって、新しいタイプの PPOX、すなわち、HemJ, HemY, HemG が同時発生的に出現した、とする考えである。(HemJ, HemY, HemG は好気的な環境でも、微好気環境でも機能すると考えられる^{3,7,8})。HemJ, HemY は酸素を電子受容体とすると考えられるので、絶対的嫌気環境では機能できないと予想される^{3,5}。) この仮説によれば、遺伝子の水平移動によって *hemJ*, *hemY*, *hemG* はその後バクテリア界に広まった、と考えられる。この仮説の問題点は、ラン藻の大半は、*hemJ* 遺伝子 (ホモログ) を有する、ということである。この事実は、ラン藻が多様化する以前に *hemJ* 遺伝子が出現したことを示唆しており、地球上の酸素濃度が上昇した結果、新しいタイプの PPOX が出現したとする仮説と矛盾するように見える。しかしながら、現存するラン藻が地球上の酸素濃度上昇のあとで多様化した種である可能性も考えられるので、上記の仮説は十分に検討に値すると思われる。この仮説を検討するためには、想定されている古いタイプの PPOX を同定し、このタイプの PPOX が生物界にどのように分布しているのか、を調べる必要がある。なお、上記の 40 種類のシアノバクテリアのうちで、最も古いと考えられている *G. violaceus* が *hemJ*, *hemY* ホモログを持つことか

ら、ラン藻にはもともと2種類のPPOX遺伝子が存在したと考えることもできるが、そう考えると、なぜ、*G. violaceus* 以外のラン藻には2種類のPPOX遺伝子が受け継がれなかったのか、疑問が残る。筆者らは、今のところ、*G. violaceus* が遺伝子の水平移動によって、比較的新しい時代に*hemY*ホモログを獲得したのではないかと考えている。

6. ラン藻の3,8-divinyl chlorophyllide a 8-vinyl reductase (DVR) の同定

クロロフィルの合成過程において、3位と8位のビニル基を持つ中間体 (3,8-divinyl chlorophyllide) の8位のビニル基がエチル基に還元される (3-vinyl 8-ethyl chlorophyllide、図2)。前者がビニル基を2つ持ち、後者がビニル基を1つ持つことから、前者がdivinyl (DV)-chlorophyllide、後者がmonovinyl (MV)-chlorophyllideと呼ばれている。3,8-divinyl chlorophyllide a 8-vinyl reductase (DVR) がDV-chlorophyllideをMV-chlorophyllideに還元する。冒頭にあげたすべてのクロロフィルにおいて、8位は必ずエチル基なので、クロロフィルを合成する生物はすべてDVR活性を持つと考えられる。しかしその遺伝子は高等植物のクロロフィル合成系の遺伝子の中では同定されたのが最も遅く、2005年にシロイヌナズナの変異体を利用して報告された¹⁾。ところがシロイヌナズナのDVRと相同な遺伝子が多くのラン藻には存在しなかった。ラン藻もChl aを持つため、当然DVRを持つはずである。このことからラン藻にはシロイヌナズナのDVRとは相同性のない新規なDVRが存在すると予想された。

そこで、ゲノム情報を利用することによりラン藻特有のDVRの探索を行った。ラン藻はゲノムサイズが小さく、全ゲノム配列の読まれている種が多い。クロロフィルを光合成色素として利用するほとんどすべての光合成生物はモノビニル型のクロロフィルを利用して、ラン藻の中には例外的にジビニル型のクロロフィルを持つ*Prochlorococcus*と呼ばれるラン藻が存在する。*Prochlorococcus*は貧栄養な外洋では主要な光合成生物であり、地球上での二酸化炭素の固定への寄与も大きいことから、そのゲノムが精力的に調べられている。*Prochlorococcus*はDV-ChlをMV-Chlに還元できないため、そのゲノム上にはDVRが存在しないはずである。全ゲノム配列が読まれている通常のラン藻

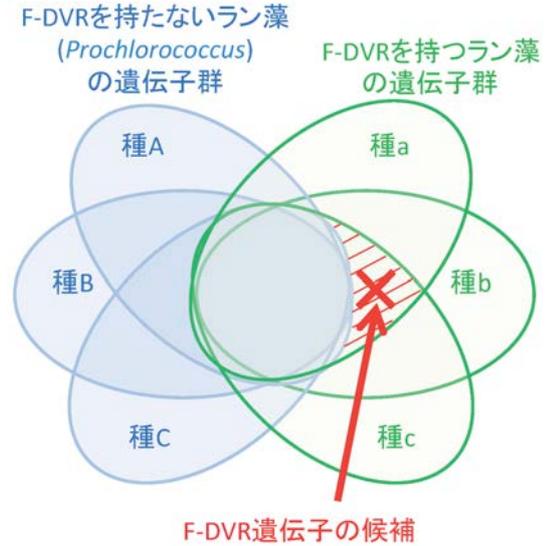


図3 ゲノムの比較による遺伝子の選抜

ラン藻のゲノム比較によるF-DVR遺伝子の選抜のストラテジーの概念をベン図で表した。ラン藻DVRを同定するために、ゲノム配列が解読されている20種類のラン藻の遺伝子(群)について、遺伝子の配列同士の総当たりのBLAST検索を行い、ホモログの有無によって、一つずつの遺伝子を分類した。F-DVRを持たないと予想されるラン藻*Prochlorococcus* (種A, B, Cと表記)のゲノムに存在せず、かつ、F-DVRを持つと予想されるラン藻 (種a, b, cと表記)のゲノムに存在する遺伝子群は図のXの集合で表記される。実際の選抜の際には、この図のように単に遺伝子群を分類するだけでなく、BLAST検索の際の期待値 (E-value)をもとに、予想される分布パターンにどれだけ近いかを(実際のパターンと予想されるパターンの)相関係数によって、比較した⁴⁾。

20種類と、全ゲノム配列が読まれている11種類の*Prochlorococcus*の遺伝子を比較し、通常のラン藻、つまりジビニル型のクロロフィルをモノビニル型のクロロフィルに還元できるラン藻にだけ共通して含まれる遺伝子の集合の中にラン藻特有のDVRが存在すると予測した (図3)。その結果、その遺伝子の集合に存在する遺伝子として、モデル型のラン藻である*Synechocystis*において*slr1923*と呼ばれる遺伝子が候補として挙げられた。*slr1923*はF-420 reducing hydrogenaseと相同な遺伝子として登録されていた。そこでこの遺伝子の破壊株を作製したところ、DV-Chlが蓄積したことから*Slr1923*がラン藻特有のDVRであると推測され⁴⁾、組換えタンパク質がDV-ChlをMV-Chlに還元できたことから (未発表)、この遺伝子がラン藻特有のDVRであることが示された。

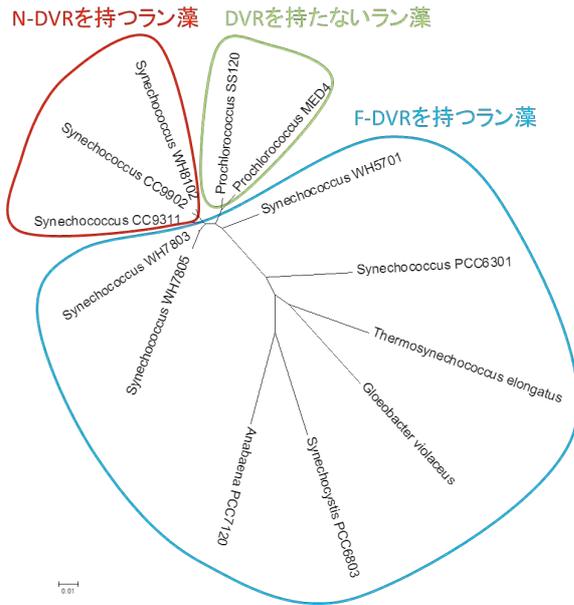


図4 ラン藻における二種類のDVRの分布
16S rRNAによりラン藻の系統樹を作製した。Gloeobacterが最も古いラン藻であると考えられている。ラン藻はDVRにより、F-DVRを持つもの、N-DVRを持つもの、DVRを持たないものの三つに分類できる。N-DVRを持つものは系統的には遅く出現したものであることがわかる。またProchlorococcusはN-DVRではなくF-DVRを失って出現したと考えられる。

7. DVRの多様性

シロイヌナズナのDVRがNADPHを還元剤として利用していたのに対し¹⁾、SynechocystisのDVRはフェレドキシンを還元剤として利用することが示された(未発表)。そこで、シロイヌナズナのDVRを還元剤のNADPHに基づいてN-DVR、SynechocystisのDVRをフェレドキシンに基づいてF-DVRと呼ぶこととする。F-DVRはN-DVRとは全くアミノ酸配列の相同性がなく、F-DVRはフラビンのFADが結合し、鉄硫黄センターを持つと予測される点もN-DVRと異なる。

多くのラン藻はF-DVRを持つが、一部の海洋性ラン藻SynechococcusはN-DVRを持つ。それらの中の一つSynechococcus WH8102のN-DVRの組換えタンパク質を調べたところ、確かにDVR活性が検出された(未発表)。よって、ラン藻の中には二種類のDVRが存在することになる。なお、これまで全ゲノムが解読されたラン藻の中にはF-DVRとN-DVRの両方を持つものではなく、逆にProchlorococcus以外は必ずどちらか一方を持つ。ラン藻の系統樹の上では、N-DVRを持つラン藻は最近進化してきたと考えられる⁸⁾(図4)。これらのラン藻が出現したときには、海洋中に

はN-DVRを持つ緑藻類が存在していたと考えられることから、それらのN-DVRを取り込んだものと予測される。F-DVRに対してN-DVRの方が構造が単純であり、還元剤として安定なNADPHを使うという点だけから判断すると、N-DVRの方が酵素として優れていると考えられる。

8. 7-hydroxymethyl chlorophyll a 還元酵素(HCAR)の同定

ラン藻のF-DVRが同定されたときに、シロイヌナズナのゲノム上に相同な遺伝子(AT1G04620)が存在することがわかった。シロイヌナズナN-DVR破壊株はMV-Chlを合成できないことから、N-DVRがシロイヌナズナのDVR反応を担っていると考えられており、シロイヌナズナのF-DVRホモログの機能は不明であった。そこでF-DVRホモログの破壊株のクロロフィルを調べたところ、7-hydroxymethyl Chl a (HM-Chl a)が蓄積していた。HM-Chl aとはChl bがChl aに変換されるときの中間体であり、Chl bの7位のフォルミル基がヒドロキシメチル基に還元されることによって合成される。Chl bは分解されるときにChl aに変換される必要がある、また光環境適応においてはChl bがChl aに変換されて光化学系の集光装置の大きさを調節していると考えられている。このようにChl bからChl aへの変換系は植物の生存に重要な役割を果たしていると考えられている。Chl bはChl b還元酵素によりHM-Chl aに還元され、さらにHM-Chl a還元酵素(HCAR)によりChl aに還元される。HCARは単離プラスチドを用いた生化学的な実験からその存在が知られていたが⁹⁾、その遺伝子は同定されていなかった。F-DVRホモログの破壊株がHM-Chl aを蓄積したことから、F-DVRホモログがHCARの遺伝子であると予測しその組換えタンパク質を作製し酵素活性を測定した。その結果HM-Chl aがChl aに還元され、AT1G04620がHCARであることが示された¹⁰⁾。HCARもラン藻のF-DVRと同じくフラビンを持ち、フェレドキシンを還元剤として使用する。

DVRはビニル基をエチル基に還元し、HCARはヒドロキシメチル基をメチル基に還元する。F-DVRとHCARはアミノ酸配列の相同性が高いにもかかわらず、なぜ、この2つの酵素の行う反応は異なるのだろうか。F-DVRとHCARの詳細な反応機構が明らかになると新規な知見が得られると期待される。なお、

*Synechocystis*のF-DVRの組換えタンパク質はDVR活性だけでなくHCAR活性も持つが、シロイヌナズナのHCARの組換えタンパク質にはDVR活性は検出されていない(未発表)。

9. DVRからHCARへの進化

大部分のラン藻はクロロフィルとしては Chl *a* しか持たないため、Chl *b*の分解物であるHM-Chl *a*をChl *a*に還元する反応は必要ない。進化の過程で、一部のラン藻がChl *b*を利用するようになり、Chl *b*を分解しなければならなくなった時、F-DVRをHCARとして使いまわし、DVRとしては新たにN-DVRを獲得したのではないだろうか。(このように2種類のDVRを持つラン藻はあくまで遷移的に出現し、現存しないのではないかと考えている。) Chl *b*を持つ真核型の緑藻はすべてHCARとN-DVRを持っている。Chl *b*の分解の最初の反応はChl *b*のフォルミル基をヒドロキシメチル基に還元することである。この反応を行うChl *b*還元酵素はshort-chain dehydrogenase/reductaseドメインを持つ酵素である¹¹⁾。このドメインを持つ酵素は多数存在するため、Chl *b*還元酵素を作り出すことは必ずしも困難ではなかったと考えられる。Chl *b*還元酵素ができれば、次のヒドロキシメチル基からメチル基への還元はもともと持っていたF-DVRが行うことができた。このことから、Chl *b*の分解経路を獲得することは比較的容易であったと考えられる。Chl *b*を光合成色素として使い始めたとき、光環境の変化に対応してChl *b*を分解しなければならなかったと考えられるが、Chl *b*の分解経路の獲得が比較的容易であったことはChl *b*を光合成色素として使う点においても有利であったと考えられる。また、現在Chl *b*の分解経路を持たない緑藻が見つかっていない理由も、Chl *b*の分解経路の獲得が容易であり、Chl *b*合成能の獲得後速やかにその分解能も獲得したためであると推測できる。

10. 珪藻のF-DVRと相同な遺伝子

珪藻は、紅藻が真核生物に共生して誕生したと考えられている¹²⁾(図5)。Chl *b*は持たないが、Chl *a*とともに補助色素としてChl *c*を持つ。Chl *c*は17-18位が還元されずに二重結合のままであること、および17位にフィチル基がついていないことが特徴である。Chl *c*にはいくつかの種類があり、全ゲノム配列の報告され

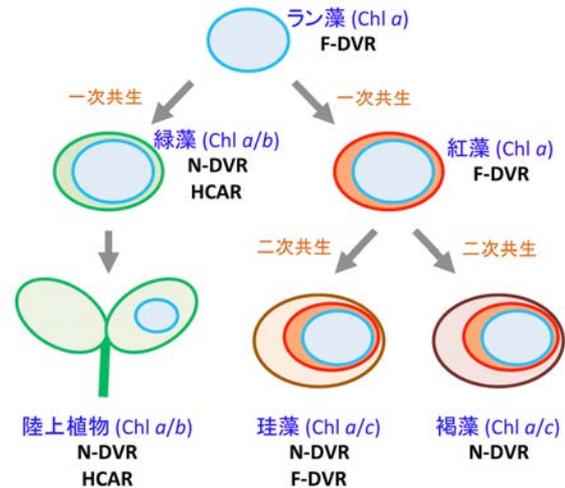


図5 ラン藻および真核光合成生物におけるDVRの分布
生物のあとのカッコ内に、その生物がもつ代表的なクロロフィルを示した。

ている*Thalassiosira pseudonana*はChl *c*₁とChl *c*₂を持つ。Chl *c*₁はChl *c*₂の8位のビニル基がエチル基に還元されることにより合成される。この部分は通常のDVRによる反応と同じである。この珪藻のゲノム上にN-DVRとともにF-DVRと相同な遺伝子が見いだされる。珪藻のF-DVRはアミノ酸配列の系統樹を描くとラン藻のF-DVRと植物等のHCARの間にある¹⁰⁾。珪藻はChl *b*を持たないためヒドロキシメチル基をメチル基に還元する必要がなく、珪藻の持つF-DVRがHCARであるとは考えられない。珪藻のN-DVRがDV-Chlは還元できるがChl *c*₂は還元できないこと、およびラン藻のF-DVRはChl *c*₂の還元もできることが、それぞれの組換えタンパク質によって確認されている(未発表)。よって、珪藻においてはN-DVRがChl *a*の合成、F-DVRがChl *c*₁の合成に利用されていると推測される。ただし、褐藻の*Ectocarpus siliculosus*など、全ゲノムが読まれているChl *c*₁を持つ藻類の中にはF-DVRと相同な遺伝子が存在しないものもある。これまでのところChl *c*の合成にかかわる遺伝子については何も報告がなく、多様性に富む可能性もある。

11. 残された課題

ラン藻が真核生物に共生して葉緑体となり、Chl *b*を獲得したときにそれまでChl *a*の合成のために使っていたF-DVRをChl *b*の分解のために使いまわしたことが明らかとなった。また、Chl *c*を獲得したときは、その合成に使われるようになったことが推測さ

れた。どちらの場合も、もともとF-DVRが行っていた反応は新たに獲得したN-DVRが代用するようになったと考えられる。これらの結果より、クロロフィル代謝系の進化の一部が明らかになったと考えられる。

しかし、これらの結果において、以下のような課題が残されている。

(1) なぜ2種類のDVRが存在するのか

DVRにN-DVRとF-DVRが存在することが明らかとなったが、このような多様性のある理由が不明である。現時点ではDVRの行う反応が、クロロフィル合成の律速段階であったり、調節を受けているという報告はない。ラン藻においては、系統樹からはもともとはF-DVRを持っていたものが、後発的にN-DVRを獲得したと推測されるが、N-DVRを持つラン藻に特徴的な点は見られない。なお、F-DVRの欠損した*Synechocystis*にシロイヌナズナのN-DVRを導入したところ、F-DVRの欠損を相補した。通常の培養条件下ではN-DVR導入株は成長速度などに野生株との差異は見られていない(未発表)。

(2) なぜ光合成細菌のDVRは光合成関連遺伝子のクラスターに入っていないのか

光合成細菌のDVRにおいても特徴的な点が見られる。クロロフィル合成系の遺伝子の同定は、光合成細菌の研究が中心となって進められた。光合成細菌においてはクロロフィル合成系の遺伝子がクラスターを作っていることがあるため、クラスター内の遺伝子の破壊株を作製することにより合成系の遺伝子が同定できるためである¹³⁾。光合成細菌はクロロフィルではなくバクテリオクロロフィルを持つが、Chl *a*までの合成系はほとんど共通している。そのため、光合成細菌の遺伝子の情報を利用して高等植物のクロロフィル合成系の遺伝子が同定されていった。しかし光合成細菌において、DVRはバクテリオクロロフィル合成系の遺伝子のクラスターの中に存在しなかった。DVRに関しては植物が先行し、その後光合成細菌のDVRが同定された理由の一つはこの点にある^{14,15)}。なぜDVRが他の光合成関連の遺伝子と挙動が異なるのか不明である。また、光合成細菌においてもN-DVRを持つものとF-DVRを持つものが存在する。嫌気性、好気性のような酵素の特性としての相違は見出されていない

い。このように現時点では特徴がないと考えられるDVRになぜこのような多様性があるのか謎である。

(3) なぜラン藻は自分の持っていない色素を代謝できるのか

ラン藻はChl *b*を持たないにもかかわらず、Chl *b*関連色素であるHM-Chl *a*を代謝できることが明らかとなった。なぜラン藻にこのような能力があるのか謎である。ラン藻のF-DVRがHCAR活性を有していたことは単なる偶然かもしれないが、緑藻や高等植物が補助色素としてChl *b*を選択する過程にF-DVRが間接的にかかわっていた可能性も考えられる。

(4) なぜ褐藻はF-DVRを使わないのか

珪藻のChl *c*の合成にはF-DVRと相同性のある遺伝子がかかわっていると推測される。珪藻は、紅藻が二次共生して誕生したと考えられている。紅藻はクロロフィルとしてはChl *a*しか持たない。全ゲノム配列の報告されている原始紅藻*Cyanidioschyzon*のゲノム上にはF-DVRと相同な遺伝子が存在し、N-DVRと相同な遺伝子はない。このことより、ラン藻が一時共生により紅藻になった時、F-DVRをそのまま使い続けたと考えられる。しかし、紅藻が共生して誕生したと考えられる、Chl *c*を持つ褐藻はN-DVRのみを持つ。珪藻や褐藻のN-DVRの組換えタンパク質からはChl *c*₂を還元してChl *c*₁を合成する活性は検出されていない。褐藻がなぜChl *c*を代謝できるF-DVRを失いN-DVRを獲得したのか不明である。

5. おわりに

ラン藻のPPOXとDVRの同定をきっかけとして、多様なタイプのPPOXとDVRが存在することが明らかになった。F-DVRは広い基質特異性を有し、このことが、植物のChl *b*代謝、珪藻のChl *c*合成を可能にしたと考えられる。PPOXやDVRについては、現在は、一つの生物は一つのタイプのみを持っているケースが多い。しかし、遺伝子の水平移動が非常に頻繁に起こっていることを考えると、遺伝子を交換できる生物間において、複数のタイプの酵素の存在は、一種の「酵素のレポジトリ」と言えるのではないだろうか？そして、その酵素が水平移動を通じて他の生物に移動しうることが、代謝経路の選択肢を広げ、代謝の多様化につながったのではないかと。PPOXやDVRの研究は、

クロフィル代謝についての知見を提供するのみでなく、代謝経路の進化について新しい知見を与えてくれるのではないだろうか？

謝辞

本稿で紹介したラン藻の protoporphyrinogen IX oxidaseの研究は、日本曹達株式会社の保坂秀夫博士、加登一成博士との共同研究である。また、6節で解説したラン藻ゲノムの比較アルゴリズムは横野牧生博士（現神戸大学）によって開発された。

Received July 3, 2012, Accepted July 27, 2012, Published August 31, 2012

参考文献

1. Nagata, N., Tanaka, R., Satoh, S. and Tanaka, A. (2005) Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana* and implications for the evolution of *Prochlorococcus* species, *Plant Cell* 17, 233–240.
2. Oborník, M. and Green, B. (2005) Mosaic origin of the heme biosynthesis pathway in photosynthetic eukaryotes, *Mol. Biol. Evol.* 22, 2343–2353.
3. Kato, K., Tanaka, R., Sano, S., Tanaka, A. and Hosaka, H. (2010) Identification of a gene essential for protoporphyrinogen IX oxidase activity in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16649–16654.
4. Ito, H., Yokono, M., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2008) Identification of a novel vinyl reductase gene essential for the biosynthesis of monovinyl chlorophyll in *Synechocystis* sp. PCC6803, *J. Biol. Chem.* 283, 9002–9011.
5. Koch, M. *et al.* (2004) Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: a key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis, *EMBO J.* 23, 1720–1728.
6. Dailey, T.A. and Dailey, H.A. (1998) Identification of an FAD superfamily containing protoporphyrinogen oxidases, monoamine oxidases, and phytoene desaturase, *J. Biol. Chem.* 273, 13658–13662.
7. Boynton, T.O., Daugherty, L.E., Dailey, T.A. and Dailey, H.A. (2009) Identification of *Escherichia coli* HemG as a novel, menadione-dependent flavodoxin with protoporphyrinogen oxidase activity, *Biochemistry* 48, 6705–6711.
8. Swingley, W.D., Blankenship, R.E. and Raymond, J. (2008) Integrating markov clustering and molecular phylogenetics to reconstruct the cyanobacterial species tree from conserved protein families, *Mol. Biol. Evol.* 25, 643–654.
9. Ito, H., Ohtsuka, T. and Tanaka, A. (1996) Conversion of chlorophyll b to chlorophyll a via 7-hydroxymethyl chlorophyll, *J. Biol. Chem.* 271, 1475–1479.
10. Meguro, M., Ito, H., Takabayashi, A., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2011) Identification of the 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase of the chlorophyll cycle in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 23, 3442–3453.
11. Kusaba, M. *et al.* (2007) Rice NON-YELLOW COLORING1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence, *Plant Cell* 19, 1362–1375.
12. Falkowski, P.G. *et al.* (2004) The evolution of modern eukaryotic phytoplankton, *Science* 305, 354–360.
13. Bollivar, D., Suzuki, J., Beatty, J., Dobrowolski, J. and Bauer, C. (1994) Directed mutational analysis of bacteriochlorophyll a biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus*, *J. Mol. Biol.* 237, 622–640.
14. Chew, A. and Bryant, D. (2007) Characterization of a plant-like protochlorophyllide a divinyl reductase in green sulfur bacteria, *J. Biol. Chem.* 282, 2967–2975.
15. Liu, Z. and Bryant, D.A. (2011) Multiple types of 8-vinyl reductases for (bacterio)chlorophyll biosynthesis occur in many green sulfur bacteria, *J. Bacteriol.* 193, 4996–4998.

How Did the Chlorophyll Biosynthetic Pathways Get Diversified?

Hisashi Ito^{1,2}, Ayumi Tanaka^{1,2} and Ryouichi Tanaka^{1,2*}

¹Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University

²Core Research for Evolutionary Science and Technology, Japan Science and Technology Agency