

## 光合成生理・微細形態・分子進化の接点 “ピレノイド”

## --- 緑藻クロロモナス系統群を用いた進化生物学的研究

森田詠子<sup>1</sup>, 野崎久義<sup>2</sup>

はじめに

光合成のカルビン・ベンソン回路のCO<sub>2</sub>固定酵素である ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) は、通常の陸上植物では葉緑体ストロマ中に分散しているが、ツノゴケの一部と多くの真核藻類では葉緑体内でRubiscoタンパク質同士が集合して基質となり、スターチに囲まれピレノイドと呼ばれる構造をとっている。ピレノイドの形態や数は分類群により異なり、形態学的、分類学的に詳細に検討され、分類の指標ともされてきたが、その形成(生成)機構や進化生物学的意義は明らかになっていない。ピレノイド構造の生理的役割は少しずつ明らかにされてきており、光合成に強く関与していること、さらにCO<sub>2</sub>濃縮機構(本稿ではCO<sub>2</sub>濃縮機構を藻類の細胞外の無機炭素を効率よく細胞内に取り込み効率良く光合成に用いるシステムの総称とする。狭義には藻類の無機炭素能動輸送体、濃縮ポンプを示すこともある。)にも関与していることが示唆されてきている。藻類は高等植物に比べ、基質CO<sub>2</sub>に対する親和性の低いRubiscoを持ち、大気中に比べCO<sub>2</sub>分子の拡散速度の遅い水中に生活する。しかしながらその悪条件にもかかわらず、

藻類細胞はCO<sub>2</sub>に対し高い親和性を持ち、高い光合成活性を示すことが知られている。このような藻類のCO<sub>2</sub>に対する高い親和性は、概ねCO<sub>2</sub>濃縮機構の働きで説明されている。ピレノイドがCO<sub>2</sub>濃縮機構に関与し、ピレノイドがCO<sub>2</sub>を効率よく固定する場であるという考えが支持されつつあるが、我々が研究を開始する以前は具体的にピレノイドがどのようにCO<sub>2</sub>濃縮機構に寄与しているのかは明らかにされていなかった。

本稿では、ピレノイドの形態的、生理的性質を明らかにするために、緑藻 *Chloromonas* 等を用いて我々が行ってきたピレノイドに関する研究について概説する。

## 1. クロロモナス系統群のピレノイド構造の多様性

我々はピレノイドの形成の機構、生理的性質を明らかにする手段として、緑藻類の中のピレノイドを持たないクロロモナス(*Chloromonas*)に着目した研究を実施している。*Chloromonas* 属及び *Chlamydomonas* 属は共に緑藻綱ボルボックス目の単細胞藻類である。*Chloromonas* 属はピレノイドを持たないことからピレノイドを持つ *Chlamydomonas* 属と区別されてきた(図1, 2)。我々は、

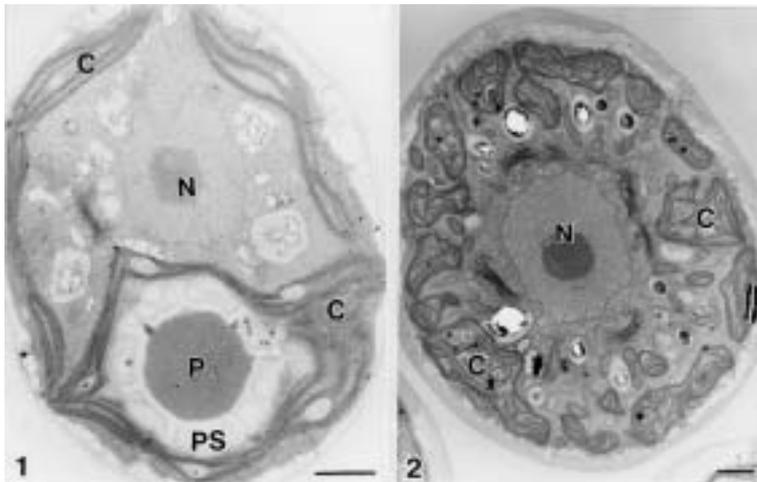


図1-2. *Chlamydomonas reinhardtii* (図1), *Chloromonas serbinowii* UTEX 492 (図2)の透過型電子顕微鏡像。C, 葉緑体; N, 核; P, ピレノイド; PS, ピレノイドスターチ。Bar = 1  $\mu$ m。

表 1. <クロロモナス> 系統群及び *Chlamydomonas reinhardtii* の CO<sub>2</sub> 濃縮機構とピレノイドの有無及び細胞内無機炭素濃度 (Morita et. al. 1998, 1999 に基づく)

株	細胞内無機炭素 <sup>a</sup> (mM)	CO <sub>2</sub> 濃縮機構 <sup>b</sup>	ピレノイド <sup>c</sup>
<i>Cr. clathrata</i> UTEX 1970	0	-	-
<i>Cr. rosae</i> SAG 26.90	0	-	-
<i>Cr. palmelloides</i> SAG 32.86	0	-	-
<i>Cr. serbinowii</i> UTEX 492	13	+	-
<i>Cr. rosae</i> UTEX 1337	27	+	-
<i>Cd. bipapillata</i> SAG 11-47	24	+	±
<i>Cr. insignis</i> NIES-447	31	+	±
<i>Cd. mutabilis</i> UTEX 578	252	+	+
<i>Cd. radiata</i> UTEX 966	231	+	+
<i>Cd. augustae</i> UTEX 1969	-	+	+
<i>Cd. macrostellata</i> SAG 72.81	-	+	+
<i>Cd. reinhardtii</i>	151	+	+

<sup>a</sup>10 mM の無機炭素を与え光照射を行い 10、20、40 秒後の細胞内無機炭素濃度の最大値。

<sup>b</sup>- , CO<sub>2</sub> 濃縮機構無し; + , CO<sub>2</sub> 濃縮機構有り。

<sup>c</sup>- , ピレノイド無し; ± , 典型的でないピレノイド有り; + , 典型的なピレノイド有り。

*Chloromonas* 属としてカルチャー・コレクションに保存された *Chloromonas* 5 株について光学顕微鏡法、透過型電子顕微鏡法、及び免疫電子顕微鏡法でピレノイド構造のないこと、葉緑体内に Rubisco の集中した部位がないことを確認した。また、これらの 5 株の *Chloromonas* と、ピレノイドを持つことが確認された *Chloromonas* 1 株と *Chlamydomonas* の 5 株がボルボックス目の中で単系統群 "クロロモナス系統群" を形成することが分子系統学的研究で明らかとなった (図 3)。クロロモナス系統群にはピレノイドを持たないもの 5 株に加えて、ピレノイドスターチに囲まれた Rubisco の集中度の高い典型的なピレノイドを持つもの 4 株、ピレノイドスターチを欠き Rubisco の集中度の低い典型的でないピレノイドを持つもの 2 株が認められ、我々はこれらの株を用いた研究を進めた。

## 2. クロロモナス系統群の CO<sub>2</sub> 濃縮機構

クロロモナス系統群はピレノイド形態が多様な群であるが、ピレノイドとの関連が示唆される CO<sub>2</sub> 濃縮機構にも多様性が認められた。以下、我々がクロロモナス系統群の CO<sub>2</sub> 濃縮機構を調査した結果を示す。CO<sub>2</sub> 濃縮機構は次の 3 項目にわたり検討した: a) 光合成における、細胞の CO<sub>2</sub> に対する親和性 [ 光合成酸素最大発生量の 1/2 を与える CO<sub>2</sub> 濃度, K<sub>0.5</sub>(CO<sub>2</sub>) で示す ], b) 細胞内に蓄積された無機炭素の濃度, c) CO<sub>2</sub> 濃縮機構への寄与が認められている酵素 carbonic

anhydrase 活性。調査の結果、ピレノイドを持たない 5 株は 2 つのタイプに分かれた (表 1)。*Chloromonas* (*Cr.*) *clathrata* UTEX 1970, *Cr. rosae* SAG 26.90, *Cr. palmelloides* SAG 32.86 は CO<sub>2</sub> 濃縮機構を持たないことが判明した。一方 *Cr. serbinowii* UTEX 492 と *Cr. rosae* UTEX 1337 はピレノイドがないにもかかわらず CO<sub>2</sub> 濃縮機構を保持していることが明らかになった。ただしこれら 2 株では対照として調査した *Chlamydomonas* (*Cd.*) *reinhardtii* に比べると無機炭素の蓄積は 1/10 程度であった。*Cr. insignis* NIES-447 及び *Cd. bipapillata* SAG 11-47 は、ともに典型的でないピレノイドを持つ株で、前者は葉緑体包膜の内側に、スターチを欠くピレノイド基質様の構造を持ち、後者は葉緑体の中央に大きな基質構造を持つ。これら 2 株でも CO<sub>2</sub> 濃縮機構があることが示唆されたが、細胞内無機炭素の蓄積は *Cr. serbinowii* UTEX 492 と *Cr. rosae* UTEX 1337 と同様、*Cd. reinhardtii* などの約 1/10 であった。典型的なピレノイドを持つ 4 株はいずれも CO<sub>2</sub> 濃縮機構を持っており、うち *Cd. mutabilis* UTEX 578 と *Cd. radiata* UTEX 966 では、*Cd. reinhardtii* と同程度の大きな細胞内無機炭素の蓄積が認められた。残り 2 株では細胞内無機炭素が測定できなかった。これらの結果から、クロロモナス系統群の中には、ピレノイドがなくても CO<sub>2</sub> 濃縮機構が機能している株があることが明らかになった。またピレノイド形態と CO<sub>2</sub> 濃縮機構の特徴を照らし合わせると、典型的なピレノイドの存在が、CO<sub>2</sub> 濃縮

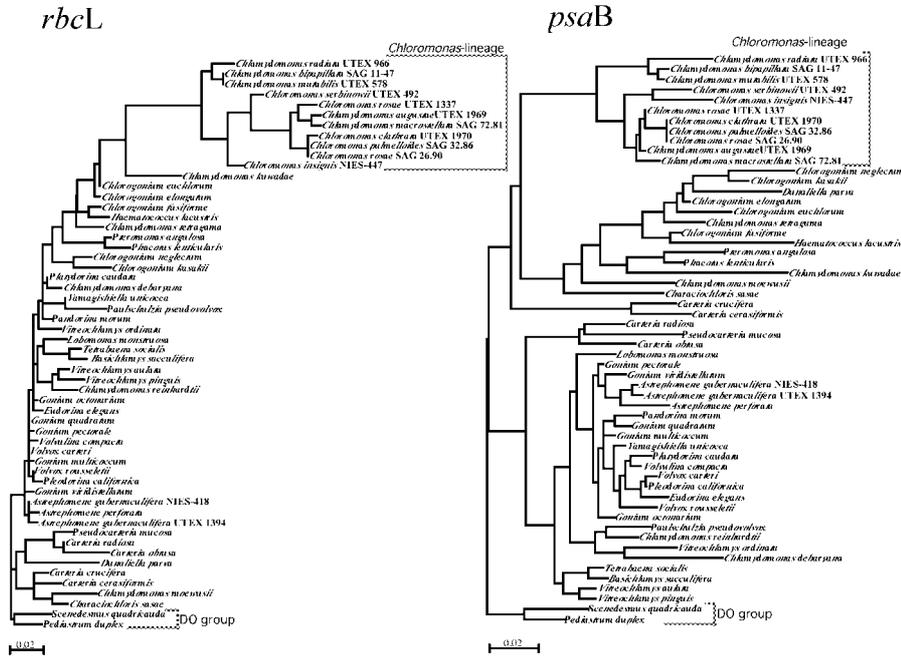


図 3. *rbcL* 遺伝子及び *psaB* 遺伝子から推定されるアミノ酸配列 (376 アミノ酸残基, 464 アミノ酸残基) を基に最尤法で作成した系統樹 [Nozaki et al. (2002) に基づく]。枝長はアミノ酸置換数に比例させている。

機構における無機炭素の蓄積の大きさに関係していることが推定された。これは今まで議論されたことのない具体的なピレノイドに関する機能推定である。

3. クロロモナス系統群の進化

クロロモナス系統群はピレノイドとCO<sub>2</sub>濃縮機構という Rubisco に関連した形態と生理学的特性が非常に多様化した生物群であり、本生物群の Rubisco タンパクの分子レベルでの進化は形態と分子の進化の接点を探索する上で非常に興味深いと思われた。そこで我々は *rbcL* 塩基配列を予想されるアミノ酸配列に置き換え、同じ葉緑体コードタンパク遺伝子である *atpB*, *psaB* 遺伝子との比較をクロロモナス系統群 11 株を含む合計 54 株のボルボックス目を主な構成員とする CW (時計回り交叉型鞭毛根) group で行った (図 3)。その結果、*rbcL* のアミノ酸の系統樹ではクロロモナス系統群の枝長が他の群に比べて長くなっており、*psaB* と *atpB* ではクロロモナス系統群の枝長は他の群とあまり変わらない

ことが明らかになった。アミノ酸置換数を比較したところ、外群とした *Scenedesumus quadricauda* 及び *Pediastrum duplex* とクロロモナス系統群の *rbcL* のアミノ酸の置換数は  $33.2 \pm 5.3$  であったのに対し、クロロモナス系統群を除くボルボックス目では  $16.8 \pm 4.3$  となっており (表 2)、クロロモナス系統群でボルボックス目のそれ以外の株に比べ 2 倍近くのアミノ酸置換が起こったことが推定された。一方、*atpB* と *psaB* のアミノ酸では外群からの置換数が、クロロモナス系統群とそれ以外の株で大きな差は認められなかった。これらの結果から、ボルボックス目の中でク

表 2. クロロモナス系統群 (11 株) とその他の CW group (43 株) の *rbcL*, *atpB*, *psaB* アミノ酸配列における外群 (*Scenedesumus quadricauda*, *Pediastrum duplex*) からのアミノ酸置換数 (Nozaki et al. 2002 に基づき算出)

遺伝子	アミノ酸置換数	
	クロロモナス系統群	その他
<i>rbcL</i>	33.2±5.3	16.8±4.3
<i>atpB</i>	29.4±7.2	25.1±4.9
<i>psaB</i>	38.1±2.6	37.8±5.7

クロロモナス系統群の *rbcL* のアミノ酸の置換率が特異的に高いこと、即ち *rbcL* のアミノ酸レベルでの特異的進化が本系統群で起っていることが推定され、本系統群内のピレノイドの多様性がこのような *rbcL* のアミノ酸の特異的進化と関連している可能性があると考えられた。さらに、クロロモナス系統群の *rbcL* のアミノ酸のうち、Rubisco大サブユニット同士の会合に関与しているアミノ酸だけを比較すると、クロロモナス系統群のピレノイドが完全に消失した系統で進化速度が著しく増大することが明らかとなった。このことはRubisco大サブユニット同士の会合に関与しているアミノ酸の変異が本系統群内のピレノイドの消失と直接的に関連している可能性を示唆する。また、*rbcL* 遺伝子系統樹と *atpB-psaB* 遺伝子系統樹は基本的に一致しない点があった。ピレノイドを持つ *Cd. augustae* UTEX 1969 と *Cd. macrostellata* SAG 72.81 は、*rbcL* 遺伝子系統樹ではピレノイドを欠く *Chloromonas* 株の系統群の末端で単系統群を形成したが、*atpB-psaB* 遺伝子系統樹ではピレノイドを欠く *Chloromonas* 株の系統群の基部に位置した。一方、典型的でないピレノイドを持つ *Cr. insignis* NIES-447 とピレノイドを持たない *Cr. serbinowii* UTEX 492 は、*atpB-psaB* 遺伝子系統樹では単系統群を形成していたが、*rbcL* 遺伝子系統樹では系統的に離れて位置した。また、これらのピレノイドの有無に相関した *rbcL* 遺伝子系統樹だけが支持する不自然な系統関係は *rbcL* の特異なアミノ酸置換が関連していた。即ち、*rbcL* 遺伝子系統樹では *atpB-psaB* 遺伝子系統樹と異なり、ピレノイドを持たないものが *rbcL* のアミノ酸の平行進化が原因でまとまる傾向を見せており、このこともクロロモナス系統群のピレノイドの有無に関連した *rbcL* の特異的進化を示唆するものである。

#### 4. 今後の課題

現在我々は、クロロモナス系統群のピレノイド形態、さらには CO<sub>2</sub> 濃縮機構が Rubisco タンパクのアミノ酸配列に依存しているか否か明らかにするために、ピレノイドを持つ株の *rbcL* 遺伝子

を、ピレノイドを持たない株に形質転換し、その変化を調査する研究を実施している。

#### 文献

- Buchheim MA, Buchheim JA, Chapman RL. 1987. Phylogeny of *Chloromonas* (Chlorophyceae): a study of 18S ribosomal RNA gene sequences. *J. Phycol.* 33:286-293.
- Kaplan A and Reinhold L. 1999. CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 539-570.
- Morita E, Kuroiwa H, Kuroiwa T, and Nozaki H. 1997. High localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in the pyrenoids of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta), as revealed by cryofixation and immunogold electron microscopy. *J. Phycol.* 33: 68-72.
- Morita E, Abe T, Tsuzuki M, Fujiwara S, Sato N, Hirata A, Sonoike K, and Nozaki H. 1998. Presence of the CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism in some species of the pyrenoid-less free-living algal genus *Chloromonas* (Volvocales, Chlorophyta). *Planta* 204: 269-276.
- Morita E, Abe T, Tsuzuki M, Fujiwara S, Sato N, Hirata A, Sonoike K, and Nozaki H. 1999. Role of pyrenoids in the CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism: comparative morphology, physiology and molecular phylogenetic analysis of closely related strains of *Chlamydomonas* and *Chloromonas* (Volvocales). *Planta* 208: 365-372.
- Nozaki H, Onishi K, and Morita E. 2002. Differences in pyrenoid morphology are correlated with differences in the *rbcL* genes of members of the chloromonas lineage (Volvocales, Chlorophyceae). *J. Mol. Evol.* in press.
- Thoms S, Pahlow M, and Wolf-Gladrow DA. 2001. Model of the carbon concentrating mechanism in chloroplasts of eukaryotic algae. *J. Theor. Biol.* 208: 295-313.
- (<sup>1</sup> 国立保健医療科学院, <sup>2</sup> 東京大学大学院理学系研究科)