

藻類学最前線



rbcL 遺伝子に働く自然選択とルビスコの適応進化

加藤 将

藻類を含め、植物の系統分類研究者にとって“*rbcL* 遺伝子”は最も馴染みの深い DNA 領域の一つだろう。*rbcL* 遺伝子は、植物の光合成反応の最初のステップである炭酸固定反応を触媒する“リブロース 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (ルビスコ)”の大サブユニットをコードする遺伝子であり、ルビスコの触媒部位はこの大サブユニットに存在する (Spreitzer & Salvucci 2002, Andersson & Backlund 2008)。ルビスコは、光合成系において CO₂ の固定を支配する最も重要な酵素であるにも関わらず、機能効率が非常に悪いことでよく知られている。したがって、その機能向上を促すような分子進化は植物の適応度を直接変化させると考えられ、ルビスコをコードする *rbcL* 遺伝子は、“正の自然選択”の対象となったはずである。

最近になり、この *rbcL* 遺伝子における正の自然選択の例が分子進化的な解析によって続々と検出されており、ルビスコの適応進化が示されている。本稿では、陸上植物で広範囲に発見された *rbcL* 遺伝子の自然選択、そして次に藻類に焦点を当てた研究例、最後に筆者が研究している車軸藻目藻類の 1 種であるシャジクモ *Chara braunii* での研究を紹介させていただきたい。

陸上植物で続々と示される *rbcL* 遺伝子の自然選択とルビスコの進化

rbcL 遺伝子における正の自然選択は、Kapralov & Filatov (2006) によって最初に示された。Kapralov & Filatov (2006) は、光合成を支配している葉緑体ゲノムに働いた自然選択を検証するため、ハワイ諸島で適応放散し様々な光環境に進出している属である *Schiedea* (ナデシコ科) に着目し、葉緑体ゲノムコードである *matK*, *psbA*, *rbcL* の 3 遺伝子について、コドン置換モデルを用いた正の自然選択の検定を行った。この検定は、配列間における非同義置換率 (dN) と同義置換率 (dS) を比較することによって適応進化を検出する方法である (Yang 2006)。ここで少し原理を説明する。分子進化の中立説 (Kimura 1968, 1983) によれば、有害な突然変異はただちに負の自然選択として集団から取り除かれるため観測はほぼ不可能であるが、適応度に影響を及ぼさない中立的な置換は一定の速度で固定される。一方で有利な変異は中立的なものに比べて圧倒的に少ないが、速く固定される。したがって遺伝子に観測される置換は、非同義置換に比べて同義置換が多数を占めることとなる。同じ遺伝子内という物理的に近い領域内で突然変異率に有意な違いがあるとは考えにくいため、同義置換の進化速度をその遺伝子の中立的な進化

速度の上限とみなし、これより進化速度が低ければ ($dN/dS < 1$) 負の自然選択が働いていると考えられる。逆に進化速度が高ければ ($dN/dS > 1$) 適応的な進化、つまり正の自然選択が働いていると考えられる。これらをコドン置換モデルとして、“中立進化モデル (帰無仮説)”ならびに“正の自然選択が存在するモデル (対立仮説)”の尤度を計算し、尤度比検定により正の自然選択を検出する (Yang *et al.* 2005)。ちなみに、計算は PAML のパッケージ (最新版は ver. 4, Yang 2007) で行える。この検定を行った結果、対象にした 3 つの遺伝子の中で *rbcL* のみにおいて正の自然選択が検出されたのである。さらに、正の自然選択を受けている *rbcL* のアミノ酸サイトをベイズ法によって推定した (事後確率 0.99 以上で $dN/dS > 1$ であるサイト, Yang *et al.* 2000)。その結果、選択を受けているサイトは、上記 3 つの遺伝子で構築した系統樹上の古い分岐 (内部的分岐) で固定されたものであることが確認され、自然選択が働いたと考えられる置換は末端よりも内部に見られるという過去の報告を支持した (Ruiz-Pesini *et al.* 2004)。また、選択されているアミノ酸サイトはルビスコアクチベースタンパクと相互作用する部位であり、自然選択とルビスコの機能の間の相関が示された。

翌年、植物全体の *rbcL* 遺伝子を網羅的に解析した論文が同じ著者により発表された。Kapralov & Filatov (2007) では、78 目 279 科 1747 属より収集した 3228 の *rbcL* の配列を用いて、上記同様な検定を 151 の主要な系統に分割して行った。その結果 112 の系統で正の自然選択が検出され、*rbcL* の自然選択は植物において普遍的に存在していることが示された。また、ベイズ法で推定された選択サイトは、特定のサイトにほぼ集中しており、ほとんどがサブユニット間のインタラクションに関与する重要な部位であることが明らかになった。さらにこの研究では *rbcL* 遺伝子を使った系統解析へ影響についても解析している。選択下にあるコドンを除去して行った系統解析と除去せずに行った解析を比較したところ、選択下にあるコドンを除去した場合、全体の 29% の枝でブートストラップ値が 5% 以上増加したという (ある 2 つの系統では 55% も増加)。これらの系統では、正の自然選択がホモブラスシー (塩基またはアミノ酸の収斂) を招いている可能性が示された。分類群間の分子系統解析は、用いるマーカーの変異が中立であることが前提であるが、*rbcL* には自然選択が存在していることを考慮に入れることで、より枝の支持がより強く得られることが示唆された。

上記 2 つの論文を皮切りに、現在 (2013 年) まで様々な系統に焦点をあてた解析が行われている。例えば、C4 経路

(CO₂濃縮機構)を獲得した系統であるC4植物と、機構を持たないC3植物に焦点を当て同様な解析を行ったChristin *et al.* (2008)では、C4植物の系統に特異的な*rbcL*への正の自然選択が検出され、またC4系統において選択されたアミノ酸は組み合わせが類似していることを明らかにした。C4植物の葉緑体内のCO₂は高濃度に保たれるため(von Caemmerer & Furbank 2003)、ルビスコが受ける選択圧が切り替わったことが示されたのである。また、Iida *et al.* (2009)では、水草の進化において働いた光合成への選択圧を解析している。水草には環境に応じて可塑的に沈水葉・浮葉・陸生葉を形成する“異型葉形成種”が多く見られる。したがって外環境が劇的に変化するため、光合成能力に選択圧が働いたことが予想された。異型葉形成の適応進化の代表例とされるヒルムシロ属に焦点を当てて解析した結果、異型葉形成種の系統のみで*rbcL*の正の自然選択が検出され、環境の変化への対応が光合成能力へのより強い選択圧となっていることが示された。上記2つの例の“C4植物”および“異型葉形成系統”は、いずれも多系統的に出現しているものであり(Sage 2004, Lindqvist *et al.* 2006)、同様な環境がルビスコの性質を取収進化させていることを示している。

藻類に見られるルビスコの進化と大気CO₂濃度の変化

藻類に関しては、陸上植物(コケ、シダ、種子植物)に比べて上記のような研究例は未だ少ないが、今回はYoung *et al.* (2012)が行った解析を紹介したい。

大気中のCO₂濃度は、酸素発生型の光合成能力を持つ生命が出現して以来、約24億年の歴史を経て減少してきた。ルビスコは、CO₂を固定する(カルボキシラーゼ活性)本来の役割がある一方で、O₂分子ともまた結合して(オキシゲナーゼ活性)光呼吸を行うという欠点を持つが、これら2つの活性は競合する関係にある。ルビスコの機能的効率は、それぞれの基質(CO₂とO₂)との親和性と触媒回転速度と、そして細胞内のCO₂/O₂濃度に依存する。かつての、O₂濃度が低くCO₂濃度が高かった時代の地球であれば、オキシゲナーゼ活性は欠点として顕在化しなかったと考えられるが、次第に酸素分圧が上昇し、光合成の律速要因となった。したがって、ルビスコは低CO₂濃度環境へと適応してきたと考えられているが(Badger & Andrews 1987, Badger *et al.* 1998, Tortell 2000)、その適応進化のタイミングと大気環境の変化との関連についての知見はほとんどなかった。

Young *et al.* (2012)はこの問題を明らかにすることを目

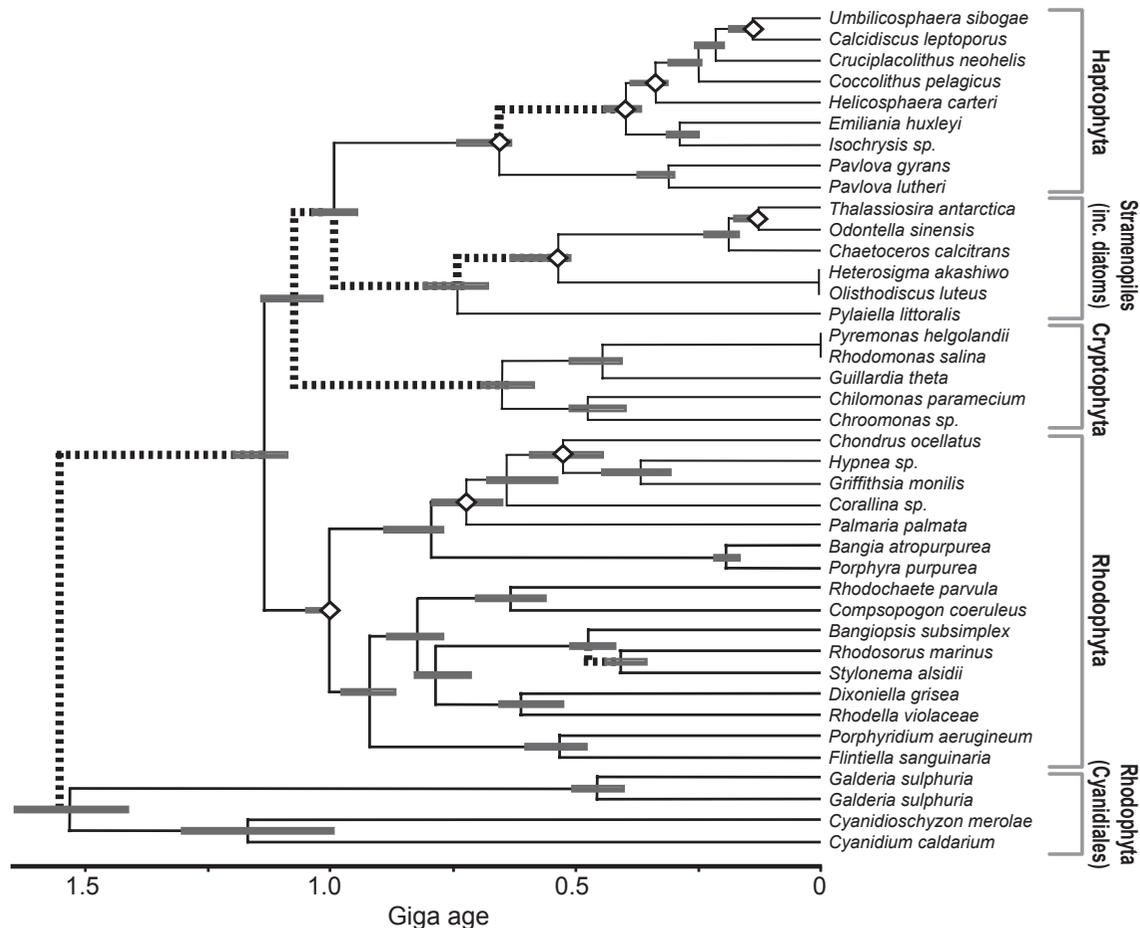


図1. 色素体遺伝子(16S rRNA, *psaA*, *psbA*, *rbcL*, *tufA*)を用いて解析された藻類の分岐年代と、*rbcL* 遺伝子の正の自然選択の系統的位相(破線で示した枝上)。樹上に示した菱形、および灰色のバーは、それぞれ化石記録に基づいて導入した分岐年代の制約と、推定された分岐年代の95%信頼区間をそれぞれ示す。Young *et al.* (2012) より改変。より詳細な解析結果(ハプト藻と珪藻)は、原著のサプリメントファイルを参照されたい。

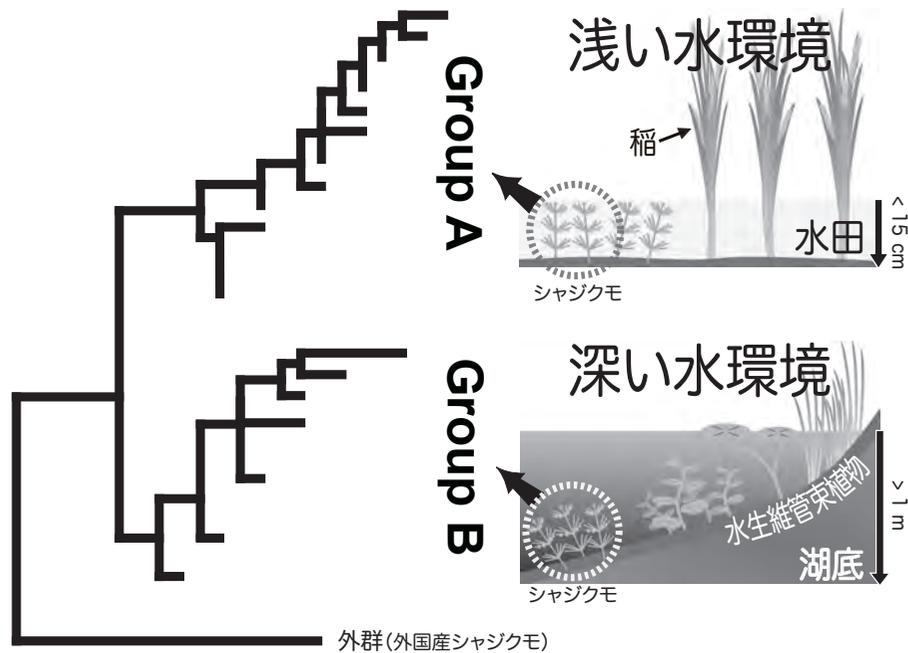


図2. 日本産シャジクモの種内に見られる2大系統と生態的2型。系統樹は葉緑体DNA (*rbcL* 遺伝子と *atpB-rbcL* 遺伝子間領域の合計約3.6 kbp) を用いて構築されたもの。Kato *et al.* (2008, 2011) に基づいて作図。

的に、一次共生起源である紅藻類（紅藻植物門）と、その後の二次共生起源のストラメノパイル、ハプト藻、クリプト藻の種を主な対象として研究を実施した。これらのグループの *rbcL* 遺伝子（紅藻類37属49配列、ハプト藻綱21属32配列、褐藻綱29属45配列、ラフィド藻綱2属2配列、黄金色藻綱およびシヌラ藻綱5属24配列、珪藻綱23属45配列、クリプト藻綱8属28配列）について、コドン置換モデルの尤度比検定による正の自然選択の検出を行い、化石記録に基づいて補正した分子分岐年代推定と、過去の地球における大気環境の変遷を比較した結果、以下のようなことがわかった。

rbcL 遺伝子の正の自然選択は、基本的に紅藻類・珪藻・ハプト藻・クリプト藻といった大きなグループ（高次分類群）の基部付近で検出された（図1）。これは様々な系統で普遍的に自然選択が検出された陸上植物での例（前節で紹介）とは異なる結果であった。コケ・シダ・種子植物が生育する陸上環境においては、様々な環境要因（乾燥、高温など）がルビスコへの選択圧となるが、藻類の高次分類群の分岐といったレベルの長期的な歴史における海洋環境では、大気中の CO_2 濃度の減少に伴う水中の CO_2 の減少が根本的な選択圧だったと考えられる。また、ルビスコの触媒効率は細胞内 CO_2 濃度に大きく左右されるため、多くの藻類は細胞内の CO_2 を高濃度に保つメカニズム、“ CO_2 濃縮機構（Carbon-Concentrating Mechanism, CCM）” を獲得した（Badger & Andrews 1987）。CCMによって細胞内の CO_2 濃度が高く保たれればルビスコの CO_2 への親和性を高める選択圧が弱まるため、機能的にトレードオフの関係にある CO_2 の触媒

回転速度を高める進化が促進されると考えられる（Tcherkez *et al.* 2006）。そこで、解析に含めた分類群についてこれまでに報告されているルビスコの酵素活性データ（e.g. Badger *et al.* 1998, Webster 2009）をまとめて照らし合わせてみると、ハプト藻と珪藻のルビスコは紅藻類に比べて CO_2 への親和性は低いものとなっていた。したがって、ハプト藻や珪藻における *rbcL* 遺伝子の自然選択とルビスコの進化は、海洋中の CO_2 濃度の減少と両グループにおける CCM の獲得と関連していることが示された。他にも、多くの種が CCM を持つと考えられている紅藻類でも、シアニディウム綱とそれ以外の系統を隔てる分岐で自然選択が検出された。さらに、分子分岐年代推定と大気環境の変遷を比較した結果、ハプト藻と珪藻のそれぞれにおいて自然選択が働いた時期（それぞれ 3.75～2.85 億年前、1～0.3 億年前）は、大気中の CO_2 濃度が比較的急に減少したとされる時期と関連することが明らかになった。

これらのことより、それぞれの藻類の系統は、大気環境の変化に対応して異なるルビスコの機能を獲得し、適応放散に成功したことが示されたのである。Young *et al.* (2012) は今後の展望として、それぞれ系統において獲得した生理的機能（それぞれの系統における CCM の機能など）とルビスコの機能進化との関連をより詳しく明らかにすることを挙げている。ただ、この研究は、非常に大きい時間的スケールに焦点を当てており、また扱った分類群は藻類のなかでも一部だった。淡水藻や気生藻などの、海洋とは異なる環境に生育する分類群においては、系統特異的な自然選択以外にも、環

境特異的なルビスコの自然選択と機能的進化が明らかになるかもしれない。

シャジクモの生態的集団分化において見られた *rbcL* の自然選択

ここでは、筆者の研究する淡水性大型藻類 シャジクモ *Chara braunii* の種内で見いだされた *rbcL* 遺伝子の自然選択について紹介したい。シャジクモは、水田や湿原といった水深数センチの浅い所に出現する一方で、湖やため池の底といった水深数メートルの深い水環境にも生育する種である。この水深の異なる2つの環境は、光合成に関する環境条件（光強度や、温度と CO₂ 濃度の日周的な安定性）が明らかに異なり、したがってシャジクモは種内に“生態的2型”を示すと言える。Kato *et al.* (2008) はこの生態的2型に着目し、日本全国から収集した88のサンプルを用いて葉緑体 DNA (*rbcL* 遺伝子および *atpB-rbcL* 遺伝子間領域、合計約3kb) による種内の系統解析を行った。その結果、2つの単系統群 (Group A と B) が示され、それらは生態的2型を完全に反映するものであることが明らかになった (図2)。

シャジクモは他の近縁種とは形態的に明確に区別でき、また、日本産集団においては種内に生態的分化が存在し、外国産の同種を加えたシャジクモ属の系統解析において単系統を示す。したがって、生態的分化の進化研究を行う格好の材料になると考え、Kato *et al.* (2011) では、核ゲノムコードの DNA 領域（それぞれ両端 UTR を含む *hsp90* と *EF1-alpha* 遺伝子領域、合計約6.5 kb) を加えて、系統解析と進化の中立性検定 (Tajima' s *D* 検定, Tajima 1989), そしてコドン置換モデルを用いてコード領域における正の自然選択の検定を行った。

生態的2型間を分集団としたときの遺伝的分化の度合い (F_{st} 値, Wright 1951) は、系統樹でも見られたとおり葉緑体 DNA 領域で最も大きいものであり、核 DNA においても分化は見られた。しかし、生態的2型を反映する2大系統は核 DNA では確認されなかった。このことから、両水環境間における核 DNA の遺伝子流動の存在が示唆される一方で、葉緑体 DNA の流動については環境の差異によって妨げられているものと考えられた。次に、解析に用いた各 DNA 領域の進化的背景を調査するため、Tajima' s *D* を用いた中立性検定を行った。ここで、Tajima' s *D* とは、配列中の多型サイトの割合 (θ) と塩基多様度 (π) の差に基づいて推定される統計量であり、自然選択の有無の検定にしばしば用いられる。理想集団において突然変異に自然選択がはたらいていない場合 (中立な場合), π と θ の期待値は等しいため *D* の値は0になると期待されるが、中立から逸脱して進化している場合、0から有意に異なる *D* の値となる。この中立性検定の結果、葉緑体 DNA 領域 (*rbcL* 遺伝子および *atpB-rbcL* 遺伝子間領域) のみで有意に正の *D* が得られ、中立進化からの逸脱が示された。しかしながら、葉緑体 DNA 領域で浅所産と深所産 (Group A と B) を別々に検定したところ、有

意な逸脱は検出されなかった。この結果は、葉緑体 DNA の2型は環境の違いに起因する多様な選択によって維持されていることを示唆するものだった。ただし、シャジクモ属の葉緑体 DNA 上の遺伝子は連鎖して母性遺伝すると同時にミトコンドリア DNA も同様な遺伝様式であること考慮すると (Sun *et al.* 1988), 中立性検定の結果からは生態的分化に影響を与えた自然選択は少なくとも1個はオルガネラゲノム上に存在する遺伝子に働いたものだろうと考えられた。

そして、コドン置換モデルを用いた尤度比検定の結果、シャジクモの *rbcL* 遺伝子における正の自然選択が検出された。一方で核コード遺伝子 (アミノ酸置換が見られた *hsp90* 遺伝子) からは検出されなかった。ちなみにここでは、より正確かつ保守的な解析を行うため、断片的だった *rbcL* の完全長 (1428 bp) を全サンプルについて決定したデータセットを用いている。ルビスコをコードする *rbcL* 遺伝子で正の自然選択が検出されたことは、生態的2型間における環境の差を考慮すると、尤もらしい結果であると思われる。生態的2型と *rbcL* 遺伝子の多型は一致しており、281番目のアミノ酸サイトにおいて浅所産 (Group A) のものはセリン残基を持つが、深所産 (Group B) はアラニン残基を持つ。興味深いことに、このアミノ酸置換は C4 植物の系統で正の自然選択が働いていると示されたサイトの位置と置換の両方に一致する (Christin *et al.* 2008, Kapralov *et al.* 2012)。C3 植物の281番目のアミノ酸はほぼアラニン残基であり、C4 植物では多くの系統でセリン残基に置き換わっていることから、細胞内 CO₂ 濃度の変化とルビスコの機能進化との重要な関連が示唆される。しかし、この置換はアミノ酸の極性を変化させるが (Nelson & Cox 2005), ルビスコの性質をどのように変化させるかは明らかになっていない。今後、遺伝学的研究や生理学的研究によって性質の変化が解明されること期待したい。

ここまでの解析はすべて天然環境より得られたサンプルによるものだったが、筆者は湖沼の底土に含まれる埋土接合子 (卵胞子) より発芽させたシャジクモも解析している。その結果、株を得ることができた3つの湖沼すべてから、Group A と B の葉緑体 DNA ハプロタイプの両方が確認された。湖沼から得られた天然サンプルはすべて Group B のハプロタイプだったのにも関わらず、である。このことから、異なる水環境間でも卵胞子の移入は存在することが示唆された。また、異なる環境タイプの葉緑体 DNA を持つ卵胞子の発芽の抑制、または発芽後の成長が抑制されている可能性が予想された。この結果については、より多くのサンプルに基づいた解析と発芽実験を行って確認してゆきたい。

この研究は、植物の生態的集団分化におけるオルガネラ遺伝子の自然選択を示したはじめての報告となった。そして、その遺伝子の候補の一つが *rbcL* 遺伝子である可能性を示した。筆者は、シャジクモの生態的2型を用いた生態的集団分化の研究を発展させるため、より多くの領域の DNA データに基づいて自然選択が働いた遺伝子 (適応遺伝子) を探索すると

ともに、ルビスコの酵素活性測定や光合成特性差異を特定する生理学的実験解析，そして形質転換も視野に入れた遺伝学的実験を行っていきたくと考えている。その過程で，生態的2型における *rbcL* 遺伝子の自然選択，そしてルビスコの機能進化に関するさらなる知見が得られることが期待される。

引用文献

- Andersson, I. & Backlund, A. 2008. Structure and function of RubisCo. *Plant Physiol. Biochem.* 46: 275-291.
- Badger, M. R. & Andrews, T. J. 1987. Co-evolution of RubisCo and CO₂ Concentrating mechanisms. In: J. Biggins (ed.) *Progress in photosynthesis research*, vol. III, pp. 601-609. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers.
- Badger, M. R., Andrews, T. J., Whitney, S. M., Ludwig, M., Yellowlees, D. C., Leggat, W. & Price, G. D. 1998. The diversity and Coevolution of RubisCo, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based CO₂ -Concentrating mechanisms in algae. *Can. J. Bot.* 76: 1052-1071.
- Christin, P., Salamin, N., Muasya, A. M., Roalson, E. H., Russier, F. & Besnard, G. 2008. Evolutionary switch and genetic Convergence on *rbcL* following the evolution of C4 photosynthesis. *Mol. Biol. Evol.* 25: 2361-2368.
- Iida, S., Miyagi, A., Aoki, S., Ito, M., Kadono, Y. & Kosuge, K. 2009. Molecular adaptation of *rbcL* in the heterophyllous aquatic plant *Potamogeton*. *PLoS One* 4: e4633.
- Kapralov, M. V. & Filatov, D. A. 2006. Molecular adaptation during adaptive radiation in the Hawaiian endemic genus *Schiedea*. *PLoS One* 1: e8.
- Kapralov, M. V. & Filatov, D. A. 2007. Widespread positive selection in the photosynthetic RubisCo enzyme. *BMC Evol. Biol.* 7: 73.
- Kapralov, M. V., Smith, J. A. C. & Filatov, D. A. 2012. RubisCo Evolution in C4 Eudicots: An Analysis of Amaranthaceae *Sensu Lato*. *PLoS ONE* 7: e52974.
- Kato, S., Misawa, K., Takahashi, F., Sakayama, H., Sano, S., Kosuge, K., Kasai, F., Watanabe, M. M., Tanaka, J. & Nozaki, H. 2011. Aquatic plant speciation affected by diversifying selection of organelle DNA regions. *J. Phycol.* 47: 999-1008.
- Kato, S., Sakayama, H., Sano, S., Kasai, F., Watanabe, M. M., Tanaka, J. & Nozaki, H. 2008. Morphological variation and intraspecific phylogeny of the ubiquitous species *Chara braunii* (Charales, Charophyceae) in Japan. *Phycologia* 47: 191-202.
- Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217: 624-626.
- Kimura, M. 1983. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lindqvist, C., Laet, J. D., Haynes, R. R., Aagesen, L., Keener, B. R. & Albert, V. A. 2006. Molecular phylogenetics of an aquatic plant lineage, Potamogetonaceae. *Cladistics* 22: 568-588.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. WH Freeman and Company, New York.
- Ruiz-Pesini, E., Mishmar, D., Brandon, M., Procaccio, V. & Wallace, D. C. 2004. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* 303: 223-226.
- Sage, R. F. 2004. The evolution of C4 photosynthesis. *New Phytol.* 161: 341-370.
- Spreitzer, R. J. & Salvucci, M. E. 2002. RUBISCO: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 449-475.
- Sun, G. H., Uyeda, T. Q. P. & Kuroiwa, T. 1988. Destruction of organelle nuclei during spermatogenesis in *Chara corallina* examined by staining with DAPI and anti-DNA antibody. *Protoplasma* 144: 185-188.
- Tajima, F. 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123: 597-601.
- Tcherkez, G. G. B., Farquhar, G. D. & Andrews, T. J. 2006. Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose bisphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 7246-7251.
- Tortell, P. D. 2000. Evolutionary and ecological perspectives on carbon acquisition in phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 45: 744-750.
- von Caemmerer, S. & Furbank, R. T. 2003. The C4 pathway: an efficient CO₂ pump. *Photosynth. Res.* 77: 191-207.
- Webster, R. J. 2009. The effects of light and CO₂ on photosynthesis in *Emiliana huxleyi*. PhD thesis, University of Essex, UK.
- Wright, S. 1951. Genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* 15: 323-354.
- Yang, Z. 2006. *Computational Molecular Evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Yang, Z. 2007. PAML4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1586-1591.
- Yang, Z., Nielsen, R., Goldman, N. & Pedersen, A. M. 2000. Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics* 155: 431-449.
- Yang, Z., Wong, W. S. & Nielsen, R. 2005. Bayes empirical Bayes inference of amino acid sites under positive selection. *Mol. Biol. Evol.* 22: 1107-1118.
- Young, J. N., Rickaby, R. E. M., Kapralov, M. V. & Filatov, D. A. 2012. Adaptive signals in algal RubisCo reveal a history of ancient atmospheric carbon dioxide. *Phil. Trans. R. Soc. B* 367: 483-492.