

植生分布で偏りが見られるルビスコ内アミノ酸置換の同定[§]

¹メンフィス大学 生物科学科

²東京工業大学 バイオ研究基盤支援総合センター

³東京工業大学 地球生命研究所

中里 拓也¹ 小笠原 智也² 増田 真二^{2,3,*}

ルビスコは、光合成の暗反応において、二酸化炭素を固定するきわめて重要な酵素である。私たちは、地理情報システム (GIS) と GenBank に登録されている数千種の植物種のデータを組み合わせ、植生分布とルビスコ内のアミノ酸置換の相関を解析した。その結果、高度・緯度・気温・降水量の違いによって変異が偏るアミノ酸置換を複数同定した。これは、ルビスコの収斂進化を具体的に示した最初の例であると共に、光合成効率を高めた植物の開発に利用できる。

1. はじめに

ルビスコ (リブローズ1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ) は、光合成のカルビン - ベンソン回路において二酸化炭素 (CO₂) 固定反応の中核となる重要な酵素である。そのため、ルビスコの反応速度が光合成そのものの効率に大きく影響を及ぼす。その反応速度は、環境、特に温度やCO₂濃度に影響されやすく^{1,2)}、生息環境の異なる種の間で反応速度に大きな幅があることが確認されている³⁾。ルビスコ大サブユニット (RbcL) のアミノ酸配列は、系統学上の種分類に頻繁に利用され、一般的にその進化はほぼ中立であると仮定されている。しかし、多数の被子植物のアミノ酸配列を比較した近年の研究により、ルビスコ分子の進化は自然選択に大きく影響を受けることが確認された⁴⁾。これらのことから、ルビスコのアミノ酸の分布と、それによって形成される分子構造は、自然選択によって進化し、種の生息環境への適応に関与している可能性が高いと考えられる。

私達は、ルビスコ分子構造の進化が、アミノ酸レベルで、生息環境への適応にどのような影響を与えているのかに注目した。具体的には、多数の被子植物種の生息環境と、ルビスコ大サブユニットのアミノ酸分布の関連を調べることによって、環境適応に関わるアミノ酸の特定を試みた。更に、環境適応に関わると考え

られるアミノ酸置換が、どのように酵素の働きに影響しているのかを生理的、三次元構造的な視点から調査した。

2. 生息環境の適応に関与するアミノ酸置換の同定

仮に、あるアミノ酸配列位置において、低温環境に生息する種と高温環境に生息する種が、異なる性質のアミノ酸を持つ傾向があるとすれば、そのアミノ酸置換が自然選択によって環境温度の適応に関わっている可能性が高い。ただし、系統樹上で近接する種は、同じ形質を共有する傾向があるので、環境適応ではなく、歴史的な理由のみによりアミノ酸分布と生息環境に関連が生まれる可能性もある。そうした種間の系統的依存性を取り除くためにPhylogenetic Independent Contrast (PIC)⁵⁾などの方法を介して、アミノ酸分布と生息環境の関連を分析する必要がある。私達は3078科に属する6446種の被子植物において、アミノ酸分布と生息環境の関連を調べた。まず、それぞれの種の生息環境に関係する4つの変数 (緯度、標高、年間平均気温、年間平均降雨量) を、種の確認されている生息地点の地理座標を基に、Geographic Information System (GIS) のデータを使って特定した。次に、それぞれの種のルビスコ大サブユニットのアミノ酸配列から、それぞれのアミノ酸の極性を特定した。そして、それぞ

[§] 第4回日本光合成学会シンポジウム ポスター発表賞受賞論文

* 連絡先 E-mail: shmasuda@bio.titech.ac.jp

れのアミノ酸の配列位置における生息環境とアミノ酸の極性の関連を、PICを使って調べた(図1)。その結果、8つのアミノ酸の配列位置で、1つ以上の環境変数との有意な (family-wise $p < 0.05$) 関連が確認された。特にアミノ酸配列位置aa97とaa328で関連が特に強く(図1)、これらのアミノ酸位置における置換が、何らかの形で種の生息環境への適応に関与していると思われる。環境変数は、お互いに関連しあっているため、要因となる環境要素は特定できない。しかしながら、この二つのアミノ酸配列位置において年間平均気温と特に関連が強いため、温度が環境適応の主要素である可能性が高い。一方で、これはあくまで被子植物全般を見るとこうした傾向があるということで、例外は多数あるということを書いておきたい。

aa97とaa328におけるアミノ酸分布を詳しくみると、aa328では非極性のアラニンが64%、極性のセリンが35%の種を占めていた。この位置は、4つすべての環境変数と有意に関連していて、アラニンをもつ種がセリンを持つ種に比べて、標高が低く高温の環境に生息する傾向にある。一方aa97は、緯度と年間平

均気温と有意に関連しているが、aa328に比べると関連は全般的に弱い(図1)。この位置では、極性のチロシンが66%で、非極性のフェニルアラニンが34%の種を占めており、チロシンを持つ種がフェニルアラニンを持つ種に比べて低緯度で高温の環境に生息する傾向にある。これら二つの配列位置において、極性と生息環境の関係が逆であることから、極性の変化がもたらす環境適応への影響がこれらの位置で異なると考えられる。この2つのアミノ酸は、KapralovとFilatov(2007)の研究結果でも、自然選択に大きく影響されていることが示されている⁴⁾。ただしこの研究では、他のアミノ酸配列位置(例えばaa142やaa470など)も多様性が高く、自然選択に大きく影響されていると示されたが、我々の解析では有意な関連は見られなかった。従って、これら多様性の高いアミノ酸配列位置は、今回調査した以外の環境要素に適応して置換している可能性が考えられる。

3. ルビスコ分子におけるaa97とaa328の分布

aa97とaa328がルビスコ分子の三次元構造のどこに

位置しているかを分析することによって、それらのアミノ酸の機能について考察することができる。aa97とaa328および、基質となるリブローズ1,5-ビスリン酸が結合する活性部位の物理的位置関係を見てみると、aa328は活性部位近傍に位置しているのに対し、aa97は離れた場所に位置していることが分かる(図2)。また、これらのアミノ酸配列位置における溶媒への接触度を示す solvent-accessible surface area (SASA)は、aa97で0.027Å²、aa328で0.001Å²と比較的小さいことから、これらのアミノ酸がルビスコ分子の内側に位置し、周辺の溶媒との接触が少ないことがわかる。これらのことから、aa328はアミノ酸置換によって基質との親和力を変え環境適応を誘導している可能性が高い。一方、aa97は、その基質結合部位との遠さ

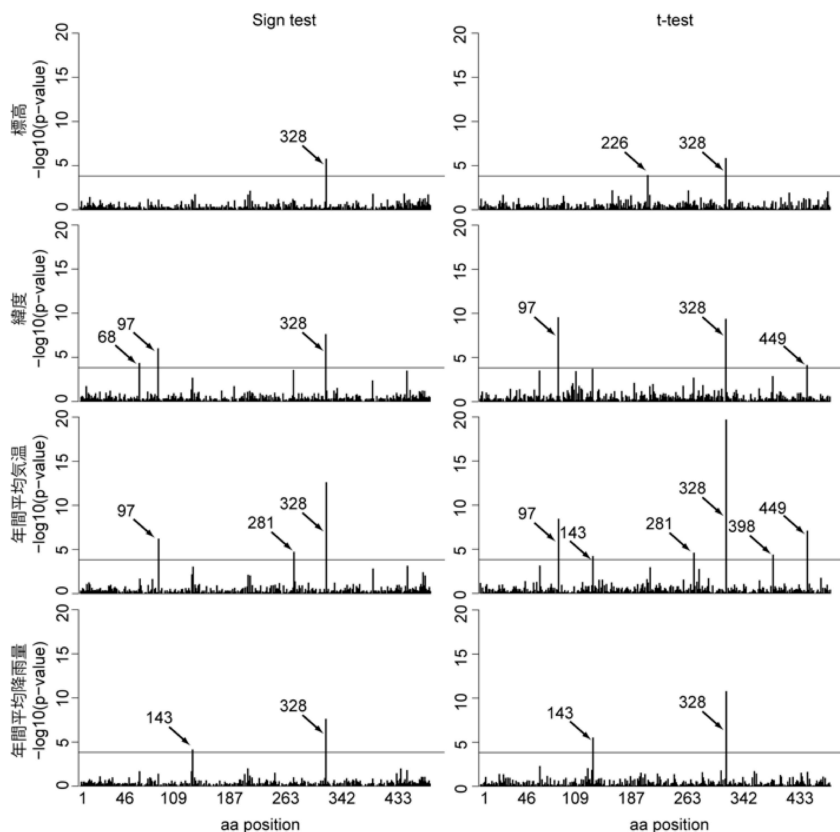


図1 ルビスコ大サブユニットのアミノ酸配列位置の極性と4つの環境変数の関連 PICを使ってsign test とt-testを基に関連の有意値 (logに変換) を特定。灰色の横線は family-wise $p = 0.05$ を示す。

から、直接基質親和性に影響を及ぼしているとは考え難い。他の要因、例えば異なる温度下における分子の構造的安定性を、アミノ酸置換によって環境適応を促している可能性などが考えられる。

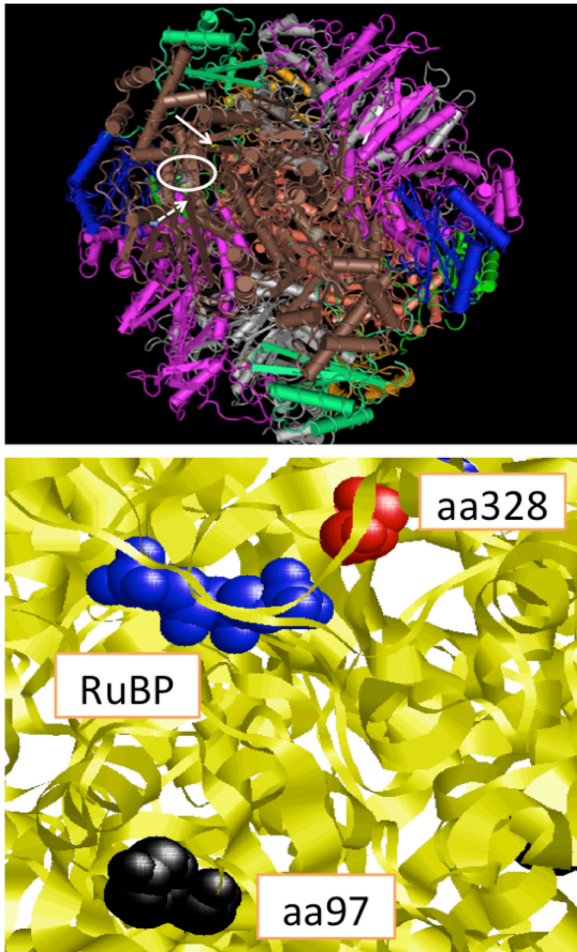


図2 ルビスコの複合体 (L₈S₈) の三次元構造
 (上) aa97とaa328の位置をそれぞれ実線および破線矢印で、リブローズ1,5-ビスリン酸結合部位を丸で示す。
 (下) リブローズ1,5-ビスリン酸結合部位の拡大図。PDB ID: 4HHHを基に作成。

4. aa97とaa328におけるアミノ酸置換の酵素反応に対する影響

今回の解析で同定されたaa97とaa328に位置するアミノ酸置換が、ルビスコの酵素反応にどのような影響を与えるのかを生化学的に調べた。他の変異箇所の影響をさけるために、シアノバクテリアのルビスコに対し、部位特異的な変異導入を行い、それら変異型ルビスコの酵素活性を、野生型のそれと比較することにした。

RbcLのアミノ酸配列のアライメントから、植物のaa97およびaa328に対応するアミノ酸は、シアノバクテリアにおいてはaa92およびaa323であり、*Synecho-*

cystis sp. PCC6803の野生型RbcLでは、それぞれがチロシン、セリンとなっている。*Synechocystis*のゲノム上には、ルビスコ大サブユニットRbcL、ルビスコ特異的シャペロンタンパク質RbcX、ルビスコ小サブユニットRbcSをコードする遺伝子がオペロンを構成している。RbcXは活性型ルビスコ (L₈S₈のヘテロ16量体) の正しい会合状態の形成に必要な因子であることがわかっている^{6,7)}。このオペロンを直接大腸菌発現プラスミドにクローニングし、*rbcL/X/S*の共発現系を構築した。この共発現プラスミドに対し、Y92F (aa92のチロシンをフェニルアラニンに変えた) およびS323A (aa323のセリンをアラニンに変えた) 変異を個別に導入し、空ベクターを含めて計4つのプラスミドをそれぞれ大腸菌に導入した。

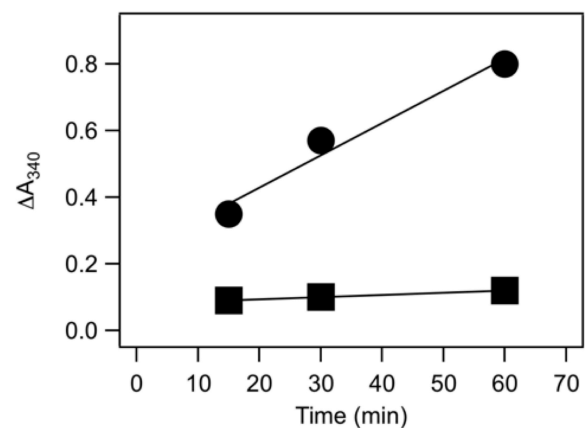


図3 大腸菌内で発現させたルビスコのカルボキシラーゼ活性空ベクター保持大腸菌 (■) もしくは、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803の*rbcL/X/S*遺伝子をベクター上で発現させた大腸菌 (●) 粗抽出液を用いたカルボキシラーゼ活性測定結果。測定は、反応液中のNADHの酸化 (ΔA₃₄₀) をモニターすることでカルボキシラーゼ活性を測定するRackerの方法¹⁰⁾により行った。

RbcL/X/Sの発現を誘導した大腸菌の粗抽出液は、ルビスコ特異的なカルボキシラーゼ活性を示した (図3)。この活性を指標に、CO₂への親和性 (K_m) を調べたところ、WT, Y92F, S323AのK_m値はそれぞれ、191 ± 17, 126 ± 14, 206 ± 10 μM (±SE) となった (図4)。WTの値は、過去に報告された結果 (~200 μM) と一致する^{8,9)}。Y92Fのみ若干CO₂への親和性が上がったが、全体として大きな変化はなかった。最大反応速度を見ると、S323AがWTに比べ3倍ほど高い。しかし、これは大腸菌内での発現量の違いに起因する可能性もあり、アミノ酸置換の影響かどうかは現時点では判断できていない。

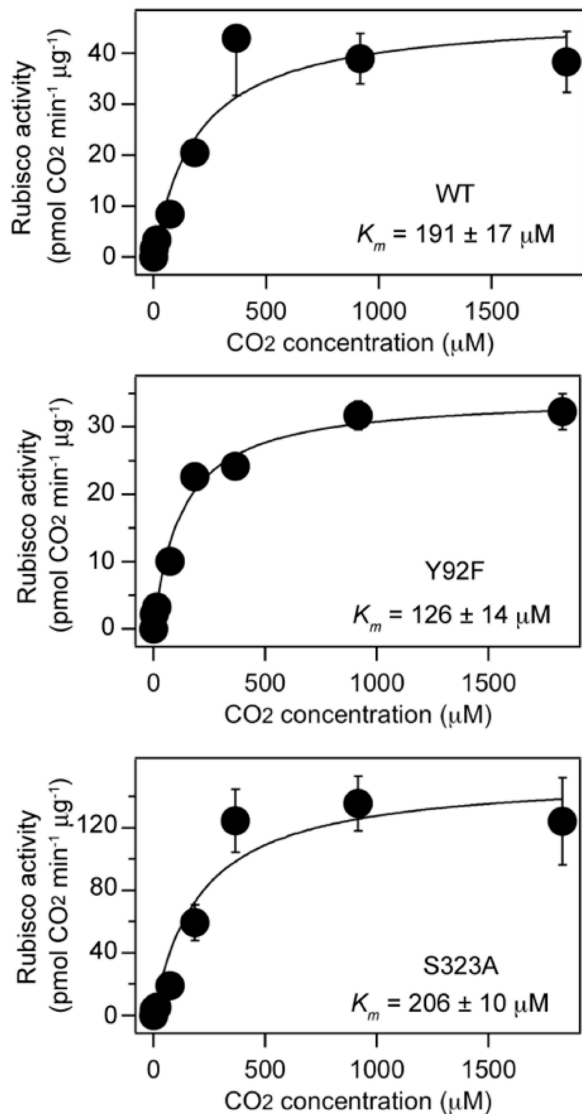


図4 大腸菌内で発現させたルビスコのCO₂濃度依存性

図3と同様にルビスコを発現させた大腸菌粗抽出液のカルボキシラーゼ活性を、異なったCO₂濃度下で測定した。上からWT, Y92F, S323A変異ルビスコ発現株の測定結果を示す。反応は窒素置換条件、且つ異なるNaHCO₃濃度下で行い、HCO₃⁻とCO₂間のpK_aを6.15として⁸⁾、個々の反応液中のCO₂濃度を算出した。K_m値(±SE)は、3回の実験値をミカエリスメンテン式にフィッティングさせることで算出した。

5. おわりに

今回、ゲノム情報とGISデータを組み合わせ、高度・緯度・気温・降水量の違いによって偏りが見られるルビスコ大サブユニット内のアミノ酸置換を同定した。シアノバクテリアのルビスコの生化学的解析により、これらアミノ酸残基の違いは、CO₂への親和性に大きな影響を与えないことがわかった。しかし、高等植物型ルビスコのCO₂に対する基質親和性は、シアノバクテリアのそれに比して一桁以上高いことが知られており、

シアノバクテリア型ルビスコの生化学的性質がそのまま高等植物型ルビスコに当てはまらない可能性もある。ルビスコアクチベース等、高等植物特異的なルビスコ制御因子との相互作用が、これらアミノ酸置換により影響を受けている可能性を踏まえ、高等植物型ルビスコの生化学的/遺伝学的解析が今後期待される。

分析機器の進歩とデータベースの整備に伴い、GenBankとGISには日々膨大な量のデータが蓄積されている。今後、如何にこれらのデータを生物学的研究に利用するかが重要となる。本研究はその指針を与えるものと考えられる。

謝辞

ルビスコの活性測定法に関しまして貴重なアドバイスをいただいた奈良先端科学技術大学院大学の横田明穂教授、蘆田弘樹助教に感謝いたします。

Received October 30, 2013, Accepted November 12, 2013,
Published December 31, 2013

参考文献

1. Steven, J., Crafts-Brandner, S. and Michael E.S. (2000) Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13430-13435.
2. Galmés, J., Flexas, J., Keys, A.J., Cifre, J., Mitchell, R.A.C., Madgwick, P.J., Haslam, R.P., Medrano, H. and Parry, M.A.J. (2005) Rubisco specificity factor tends to be larger in plant species from drier habitats and in species with persistent leaves. *Plant Cell Environ.* 28, 571-579.
3. Jordan, D.B. and Ogren, W.L. (1981) Species variation in the specificity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. *Nature* 291, 513-515.
4. Kapralov, M.V. and Filatov, D.A. (2007) Widespread positive selection in the photosynthetic Rubisco enzyme. *BMC Evol. Biol.* 7, 73.
5. Felsenstein, J. (1985) Phylogenies and the comparative method. *Am. Nat.* 125, 1-15.
6. Onizuka, T., Endo, S., Akiyama, H., Kanai, S., Hirano, M., Yokota, A., Tanaka, S. and Miyasaka, H. (2004) The *rbcX* gene product promotes the production and assembly of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase of *Synechococcus* sp. PCC7002 in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* 45, 1390-1395.
7. Saschenbrecker, A., Bracher, A., Rao, K. V., Rao, B.V., Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M. (2007) Structure and function of RbcX, an assembly chaperone for hexadecameric Rubisco. *Cell* 129, 1189-1200.
8. Marcus, Y. and Gurevitz, M. (2000) Activation of

- cyanobacterial RuBP-carboxylase/oxygenase is facilitated by inorganic phosphate via two independent mechanisms. *Eur. J. Biochem.* 267, 5995-6003.
9. Marcus, Y., Altman-Gueta, H., Wolff, Y. and Gurevitz, M. (2011) Rubisco mutagenesis provides new insight into limitations on photosynthesis and growth in *Synechocystis* PCC6803. *J. Exp. Bot.* 62, 4173-4182.
10. Racker, E. (1962) Ribulose diphosphate carboxylase from spinach leaves. *Methods Enzymol.* 5, 266-270.

Determination of RubisCO amino acid residues that are associated with species' habitat environments

Takuya Nakazato¹, Tomoya Ogasawara², Shinji Masuda^{2,*}

¹University of Memphis, ²Tokyo Institute of Technology