

光合成 CO₂ 固定酵素 RuBisCO の機能進化研究

神戸大学大学院人間発達環境学研究科 准教授 蘆田 弘樹

はじめに

カルビンサイクルは、光合成細菌、シアノバクテリア、藻類、植物などが利用する主要な CO₂ 固定経路である。カルビンサイクルの初発において、リブローズビスリン酸に CO₂ を固定し、3-ホスホグリセリン酸を生成するカルボキシラーゼ反応を触媒する酵素が、リブローズビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) である。RuBisCO は光合成鍵酵素であるが、O₂ を CO₂ と誤認識し、同一触媒部位において、リブローズビスリン酸に対して、O₂ を結合するオキシゲナーゼ反応も触媒する。オキシゲナーゼ反応はカルボキシラーゼ反応を拮抗的に阻害するため、高濃度 O₂ を含む現気下では、RuBisCO の CO₂ 固定能を大きく抑制している。このような RuBisCO の非効率な CO₂ 固定酵素としての非効率な特性が、様々な局面において光合成生物の CO₂ 固定速度を律速する大きな原因となっている。このような背景から、RuBisCO は光合成機能改良の研究ターゲットとして、これまで注目されてきた。RuBisCO がなぜ CO₂ 固定酵素として非効率な性質を示すのか、その理由が分子進化過程に隠されていると考え、この酵素の機能進化に関する研究を行ってきた。以下に研究成果の概要を紹介する。

1. RuBisCO-like protein を用いた RuBisCO の機能進化研究

RuBisCO 機能進化を考える上で興味深い研究対象として、枯草菌やアーキアなどの多くの非光合成原核生物に RuBisCO とアミノ酸配列相同性を示す RuBisCO-like protein (RLP) を発見した。RLP は RuBisCO のカルボキシラーゼ及びオキシゲナーゼ両反応触媒能を全く示さず、非光合成原核生物における RLP の生体内機能が何であるか、なぜこれらの生物が RLP を有するのか、光合成・酵化学分野において大いに注目されていた。当時全ゲノム解読が終了していた枯草菌において、RLP 遺伝子とその下流遺伝子から形成されるオペロンがメチオニン欠乏により発現誘導され、さらに、RLP 遺伝子破壊株がメチオニン再生経路中間代謝産物を単一硫黄源に生育できないことから、RLP がこの経路で機能すると予想した。メチオニン再生経路は、s-アデノシルメチオニンからのポリアミン合成副産物であるメチルチオリボスの還元硫黄をメチオニンに再生する経路で、*Klebsiella* で予想されていたものの、明らかでなかった。RLP オペロンとその周辺の機能未知遺伝子の大腸菌組換えタンパク質を用い、順次、反応生成物の ¹H-NMR と UV スペクトル解析を行い、メチオニン再生経路の代謝産物と酵素を同定するとともに、RLP がこの経路酵素の 2,3-ジケト-5-メチルチオペンチル-1-リン酸エノラーゼであることを明らかにした。

RLP が、RuBisCO の機能する炭素代謝とは全くことなる含硫アミノ酸代謝で機能していたことは、非常に驚きであった。しかしながら興味深いことに、RLP の基質は RuBisCO の基質

リブローズビスリン酸と構造が類似しており、RLP エノラーゼ反応は RuBisCO 触媒反応の初発ステップであるリブローズビスリン酸のエノール化と酷似していた (図1)。大阪大学大学院工学研究科の松村浩由博士グループとの共同研究による RLP の X線結晶解析の結果、RLP の全体的な構造は RuBisCO と類似し、ホモダイマー境界に触媒中心を形成していた。構造解析に加え、アミノ酸置換変異酵素の解析から、RLP と RuBisCO は構造的に保存された活性中心で共通残基を用いてそれぞれの反応を触媒していることを明らかにした (図2)。また、RuBisCO の特徴として、エノール化の脱プロトンに触媒リジン残基の ε-アミノ基のカルバミル化が必須であるが、この反応様式が RLP でも保存されていた。これらの結果から、RLP と光合成 RuBisCO の進化的・機能的関連性が強く示された。RLP を有するアーキアやバクテリアが、光合成生物以前に出現していた進化仮説から、光合成 CO₂ 固定酵素 RuBisCO の生きた化石酵素の発見として、TV や新聞などで大々的に報道された。現在では、RuBisCO 進化研究から発展させ、光合成カルビンサイクルの進化的な原型回路がアーキアに存在することを発見し、光合成の生物進化の過程でどのように確立されたのかを解明しようとしている。

RLP の機能同定の過程でメチオニン再生経路を明らかにしたが、その中でも新規酵素であったイソメラーゼ、デヒドラターゼの酵素特性・構造を明らかにした。これら RLP 研究から派生した研究は、メチオニン再生経路がヒトを含めた様々な生物に広く分布することを明らかにしたとともに、特にヒトにおいては、この経路がアポトーシスに関わる発見にも繋がった。

2. 機能進化に着目した RuBisCO 反応機構の解明

RLP の研究成果は、RuBisCO の分子・機能進化を探るだけ

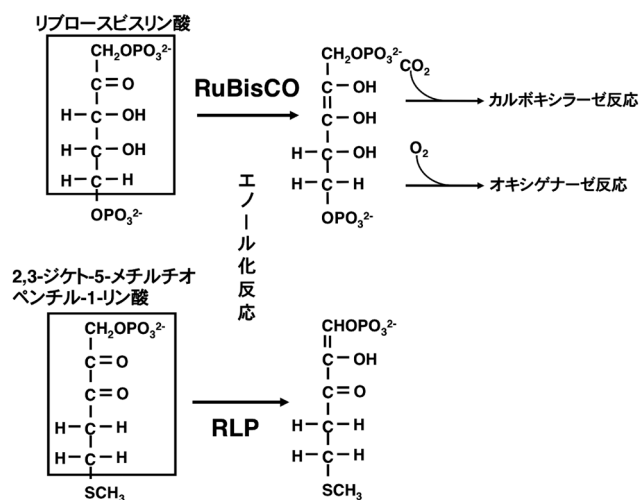


図1 RLP と光合成 RuBisCO の触媒反応の比較

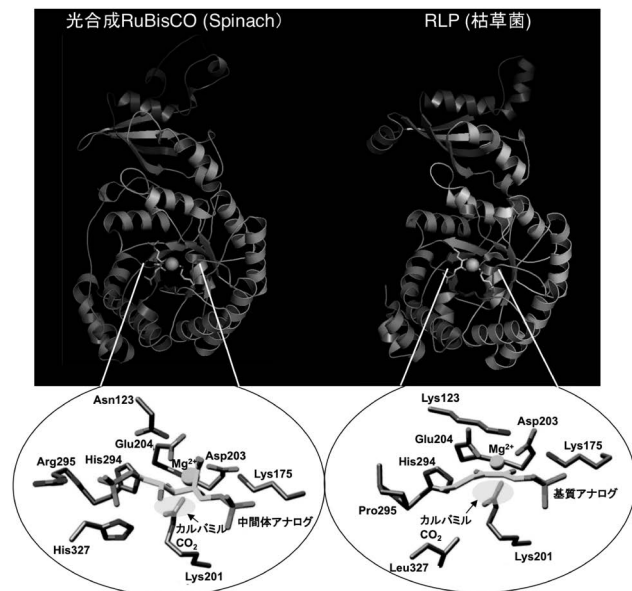


図2 RLPと光合成RuBisCOの構造類似性

RLPと光合成RuBisCOは全体構造が良く似ており、活性中心における触媒残基の立体配置も酷似している。

でなく、これまで光合成生物内でしか進めることができなかったRuBisCO触媒機構の解明研究を新たな方向へ導くことを可能とした。実際、RLPとRuBisCOで保存される機能未知アミノ酸残基に着目し、これら残基に関する構造活性相関比較研究から、光合成RuBisCOのみを用いた研究からは同定できなかったRuBisCOカルボキシラーゼ反応に関与するアミノ酸残基や構造を明らかにした。

RLPを用いたRuBisCOの反応機構解析研究と並行して、光合成生物種の違いによりRuBisCOのCO₂識別能が大きく異なることに注目し、CO₂識別能に関与するアミノ酸残基や構造の同定を進めてきた。地球上で最も高い植物RuBisCOの3倍ものCO₂識別能を示す好熱性原始紅藻*Galdieria* RuBisCOと他のRuBisCOの配列・構造比較により、*Galdieria* RuBisCOが高CO₂識別能を示すための触媒ループ安定化残基を見出した。この残基は、紅藻型RuBisCOでは完全に保存されていたが、植物型RuBisCOでは異なるアミノ酸に置換されていた。実際、RuBisCO研究モデルであるシアノバクテリアRuBisCOに紅藻型残基を導入することでCO₂識別能が17%増加することを明らかにした。*Galdieria*が好熱性であることから、高温適応している光合成生物のRuBisCOが高いCO₂識別能を有している可能性が考えられた。そこで、光合成生物の中でも最も高温適応を果たしている好熱性シアノバクテリアに注目し、このRuBisCOが常温性シアノバクテリアのものより5~6倍のCO₂

親和性を示すことを発見した。現在、好熱性シアノバクテリアRuBisCOのCO₂識別能関与残基の同定を進めている。

おわりに

これまで述べてきた、機能進化に着目したRuBisCOの研究成果は、光合成能強化を介した植物生産性向上やバイオ燃料高生産に応用しようとしている。原始紅藻RuBisCOの高CO₂識別残基は、研究室で確立した植物葉緑体形質転換法を用い、葉緑体ゲノムにコードされるRuBisCOへ導入した形質転換タコを作製し、植物光合成機能改良へ応用展開している。また、アルコール発酵菌のエタノール合成系を導入し、光合成直接的にエタノール生産を可能としたシアノバクテリアに、RuBisCO機能改良を組み合わせ、バイオエタノール高生産シアノバクテリアを確立し、現在も生産性改良研究を進めている。

謝辞 本研究は、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科分化・形態形成学研究室と神戸大学大学院人間発達環境学研究科光合成機能研究室で行われたものです。本研究の機会を与えていただくとともに、本研究だけでなく、公私にわたり学生時代から今日まで多大なご指導ご鞭撻を賜りました奈良先端科学技術大学院大学名誉教授 横田明穂先生（現先端科学技術研究推進センター特任教授）に心から感謝申し上げます。分化・形態形成学研究室において、多大なご指導を頂きました京都大学大学院生命科学研究科教授 河内孝之先生、石川県立大学生物資源工学研究所准教授 竹村美保先生、神戸大学農学部准教授 三宅親弘先生、鳥取大学農学部准教授 明石欣也先生、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科助教 宗景ゆり先生に厚く御礼申し上げます。常日頃から激励と暖かいご助言をいただきました、近畿大学農学部教授 重岡成先生、近畿大学農学部准教授 田茂井政宏先生に感謝致します。また、共同研究者として多大なご協力をいただきました、奈良先端科学技術大学院大学学長 小笠原直毅先生、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科助教 小林和夫先生、大阪大学大学院工学研究科准教授 松村浩由先生、大阪大学大学院工学研究科助教 溝端栄一先生、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科助教 齋藤洋太郎先生に感謝致します。さらに、本研究に参加し支えてくれた奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科分化・形態形成学研究室の院修了生、院生、研究補助員諸氏に感謝致します。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関西支部長・内海龍太郎先生（近畿大学農学部教授）ならびにご支援を賜りました農芸化学会関西支部の諸先生方に厚く御礼申し上げます。