



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on relationship between evolution of photosystems and evolution of chlorophyllide a oxygenase in green plants
Author(s)	功刀, 基
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11839号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11839
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60975
Type	doctoral thesis
File Information	Motoshi_Kunugi.pdf



博士論文

Study on relationship between evolution of photosystems and
evolution of chlorophyllide *a* oxygenase in green plants

(緑色植物における光化学系の進化とクロロフィル *b* 合成酵素の進化の関
係に関する研究)

北海道大学 生命科学院

生命システム科学専攻 生命システム科学コース

生物適応機構講座

功刀 基

2015 年 3 月

目次

1	要旨	1
2	諸言	
2.1	はじめに	4
2.2	クロロフィル b 合成酵素 (CAO)	6
2.3	クロロフィル b を持つ光合成成生物の進化	11
2.4	本研究の目的	13
3	材料と方法	
3.1	緑藻と培養条件	17
3.2	陸上植物と生育条件	20
3.3	リコンビナントAtCAO の作成と精製	23
3.4	チラコイド膜の単離	23
3.5	Native green gel	24
3.6	1次元SDS-PAGE	25
3.7	2次元SDS/SDS-PAGE	26
3.8	2次元BN/SDS-PAGE	27
3.9	2次元CN/SDS-PAGE	28
3.10	銀染色	29
3.11	免疫沈降解析	29
3.12	ウェスタンブローディング解析	29
3.13	色素分析	30
3.14	分光光度測定	31
3.15	ゲノムPCR	31
3.16	緑藻類からのfull length cds CAOのクローニング	31
3.17	アミノ酸配列比較と系統樹解析	32
3.18	遺伝子番号	32
4	結果と考察	
4.1	<i>Chlorophyllide a oxygenase</i> (CAO)の構造の進化的変化による、 <i>Micromonas</i> の新たな集光装置の獲得	34
4.1.1	結果	
4.1.1.1	クロロフィル b を持つ光合成生物のCAOの構造と <i>Micromonas</i> CAO (<i>Mp</i> CAO) の特徴	34
4.1.1.2	CAOの構造	39
4.1.1.3	<i>Micromonas</i> と <i>Mp</i> CAO1+ <i>Mp</i> CAO2 変異株の色素組成	43
4.1.2	考察	
4.1.2.1	CAOの構造の多量体構造について	47
4.1.2.2	<i>Micromonas</i> CAO の構造について	47
4.1.2.3	<i>Micromonas</i> CAO の2量体構造について	48
4.1.2.4	CAOと集光装置の進化について	49

4.2	緑色植物の進化がもたらす集光装置の変化	52
4.2.1	結果	
4.2.1.1	本研究で使用した緑色植物の系統関係	52
4.2.1.2	色素組成と細胞の吸収スペクトル	53
4.2.1.3	色素タンパク質複合体の解析	56
4.2.1.4	複合体中のクロロフィル a からクロロフィル b へのエネルギー伝達	59
4.2.1.5	CAOの進化と配列比較	63
4.2.2	考察	
4.2.2.1	光化学系内の集光インナーアンテナにおけるクロロフィル b の影響	68
4.2.2.2	緑色植物の祖先がクロロフィル b を用いていた可能性について	68
4.2.2.3	クロロフィル b の量と局在が光環境適応に与える影響	70
4.2.2.4	地球の歴史と緑色植物の進化	73
5	全体考察(CAOの制御について)	75
6	参考文献	77
7	謝辞	91

要旨

光合成生物は光エネルギーを集めて光合成を行うために、光化学系においてクロロフィル・カロテノイド・フィコビルンといった光合成色素を用いて、光を集めるためのアンテナを構築しており、生育環境に応じてそれら光合成色素の量や分子種を調節することで、環境に適合した光化学系を構成していると考えられている。その中でもクロロフィルは、地球上で最も多い分子と考えられており、現在までに9種類のクロロフィル（クロロフィル *a*, *b*, *c1*, *c2*, *c3*, *d*, *f*, divinyl-chlorophyll *a*, *b*）が確認されている。緑色植物は、クロロフィル *a* とクロロフィル *b* を用いて光化学系を構築し、集光を行っている。光化学系において、クロロフィル *a* は光合成生物が共通して持っているが、クロロフィル *b* は一部のシアノバクテリアと緑藻類・陸上植物が属する緑色植物が持っている。先行研究より、クロロフィル *a* は、光化学系の反応中心複合体の内側のインナーアンテナ複合体、および、外側の周辺アンテナ複合体の両方に組み込まれていることが明らかになっている。一方、クロロフィル *b* はインナーアンテナ複合体には用いられず、周辺アンテナ複合体のみに組み込まれていると考えられてきた。

このクロロフィル *b* は、クロロフィル *a* からクロロフィル *a* 酸化酵素（**CAO**）によって合成される。そのため、クロロフィル *b* を持つ光合成生物は、CAO の活性を調節することでクロロフィル *b* の合成量を制御して、集光アンテナの大きさの調節を行っている。配列の保存性から、CAO は、クロロフィル *b* の合成を実際に行っている触媒ドメインと CAO タンパク質の安定性の制御に関与し、クロロフィル *b* の量の調節を行う制御ドメインから成り立っていると考えられている。またアミノ酸配列の比較から考えると、制御ドメインは陸上植物でのみ保存されていることから、制御ドメインは緑藻類から陸上植物への進化の過程で獲得した配列であると考えられる。一方、触媒ドメインは、高等植物間だけでなく緑藻類やシアノバクテリアといったクロロフィル *b* を持つすべての生物間で高く保存されていることから、高等植物や緑藻類の祖先にあたる生物も触媒ドメインのみの CAO を保持していた可能性が考えられる。しかし、CAO の分子進化が光化学系の進化にどのような影響してきたのかは不明であった。

近年、Mamiellales に属する、海産性緑藻類の *Micromonas* と *Ostreococcus* の全ゲノム解読が行われた結果、この両者が非常に特徴的な CAO を有していることがわかった。これらの緑藻の CAO は、制御ドメインを有していないだけでなく、触媒ドメインを分割して二つの遺伝子にコードしていることがわかった。これらの緑藻の CAO の特徴は

陸上植物やモデル緑藻の *Chlamydomonas* と大きく異なっている。そこで、本研究では、CAO の構造が光化学系に与える影響を調べるため、初めに *Micromonas* の CAO (MpCAO) を用いた逆遺伝学的手法と *Micromonas* の光化学系の生化学的な解析を詳細に行った。その結果、*Micromonas* の光化学系は周辺アンテナ複合体だけでなく、インナーアンテナ複合体にもクロロフィル *b* を組み込んでいることがわかった。また MpCAO を、クロロフィル *b* を持たないシロイヌナズナ (*ch1-1*) に導入すると、シロイヌナズナ中で *Micromonas* と同様の光化学系を構築することがわかり、シロイヌナズナにおいて *Micromonas* の光化学系が再現した。これらの結果から、CAO の構造は光化学系の構造に影響を与える可能性が示唆された。

本研究では *Micromonas* が、インナーアンテナ複合体にもクロロフィル *b* を持っていることを明らかにした。当研究室での先行研究より、インナーアンテナ複合体にクロロフィル *b* を多く組み込むと、海中の光環境では有利である一方、淡水域や陸上などの強光環境では不利である可能性が考えられている。陸上植物が属する Streptophyta は淡水域や陸上に生息する一方、緑藻類が属する Chlorophyta では、海産性の緑藻が多く存在する。進化的には、クロロフィル *b* は細胞内共生（一次共生）後に、緑色植物が獲得したクロロフィル色素であると考えられ、その後緑色植物は、Streptophyta と Chlorophyta に分かれ、現在の高等植物や緑藻類（微細藻、大型藻含む）へと進化を遂げた。Streptophyta は、淡水性緑藻から蘚苔類を介して高等植物へと進化を遂げ、Chlorophyta は、海産性微細藻類、淡水性微細藻類、そして海藻類へと進化を遂げた。Streptophyta と Chlorophyta は、クロロフィル *b* 以外にも多くの共通した光合成色素を保持しており、色素系の類似性は高い。一部、綱特有の光合成色素の保持も見受けられるが、Streptophyta か Chlorophyta のどちらか一方だけが特異的に持っている光合成色素は存在していない。そのため、共通祖先種の緑色植物から Streptophyta と Chlorophyta への進化の際に、新たな光合成色素の獲得が重要であったとは考えにくく、何が光化学系の進化に影響を与えたのかは明らかになっていなかった。そこで私は、先の実験結果から淡水性の Streptophyta と海産性の Chlorophyta の光化学系では、インナーアンテナ複合体におけるクロロフィル *b* の利用様式が異なるのではないかと。さらにその利用様式の異なりに CAO の構造が関係しているのではないかとという仮説を立てた。

その仮説の妥当性を明らかにするため、Streptophyta に属する 2 種の緑藻とモデル高

等植物のシロイヌナズナ, および Chlorophyta に属する 9 種の緑藻を用いて, 各々の光化学系の解析を行った. その結果, Streptophyta は 3 種全てでクロロフィル *b* を周辺アンテナ複合体のみに組み込んでいた. また, Chlorophyta に属する淡水性の 2 種も同様に, クロロフィル *b* を周辺アンテナ複合体のみに組み込んでいた. 一方, 海産性の Chlorophyta は, 7 種全てで, クロロフィル *b* を周辺アンテナ複合体とインナーアンテナ複合体の両方に組み込んでいた. CAO の構造に関しては, Streptophyta の CAO の構造は用いた 3 種で共通していたが, Chlorophyta の CAO は制御ドメインの構造が様々であり, 共通性は確認できなかった. これらの結果から緑色植物は, 海中における光環境に適応するためにクロロフィル *b* を周辺アンテナ複合体とインナーアンテナ複合体の両方に組み込んでいる一方, 淡水や陸上における光環境に適応するためにクロロフィル *b* を周辺アンテナ複合体のみに組み込んでいるという相関関係を明らかにした. しかし, このクロロフィル *b* の利用様式に CAO の構造が密接に関係しているかどうかを, 明らかにするには至らなかった. *Micromonas* を用いた研究結果も併せて考えると, 本研究の結果は, 緑色植物の Streptophyta と Chlorophyta への進化の分岐において, クロロフィル *b* の利用様式の違いが大きく寄与した可能性を示唆している.

2. 諸言

2.1 はじめに

地球上の生物は、光合成生物が行う光合成から非常に大きな恩恵を受け生育している。光合成生物が行う光合成は、二つのプロセスから成り立っている。一つは光エネルギーを集めて、化学エネルギーである ATP と NADPH を作り出すことであり、もう一つは、作り出した ATP と NADPH を用いて、二酸化炭素の固定と糖を作り出すことである。この光合成を行う光合成生物は、約 32 億年前に地球上に誕生したと考えられており (Blankenship, 2010)、この光合成生物が誕生した結果、地球上の環境は大きく変動し、その影響から多種多様な生物が地球上に誕生したと考えられている。

光合成生物は、光合成を行う為の光エネルギーを集めるために、クロロフィル、カロテノイド、フィコビリןといった光合成色素を用いていることが知られている (Neilson *et al.*, 2010; Green *et al.*, 1996)。特にその光合成色素の中でもクロロフィルは、地球上で最も多い分子と言われており、現在までに 9 種類 (*a*, *b*, *c1*, *c2*, *c3*, *d*, *f*, divinyl-chlorophyll *a*, *b*) の存在が確認されている。この 9 種類の中で光合成生物によって最も利用されているのがクロロフィル *a* であり、光化学系内にある光エネルギーを集めるための周辺アンテナ複合体と、電子伝達等を行っている反応中心の両方に存在していることが知られている (現在知られている例外としては、divinyl-chlorophyll を持っている *Prochlorococcus* と、反応中心にクロロフィル *d* を持つ *Acaryochloris* の 2 例のみ)。つまりクロロフィル *a* は、光合成においてとても重要な光合成色素であるといえる。光合成生物は周辺アンテナ複合体にクロロフィル *a* の他にも光合成色素を持ち、幅広く光エネルギーを集め、光合成をより効率的に行なっていると考えられている (Chen *et al.*, 2010)。例えばシアノバクテリアや紅藻類は、フィコビリソームと呼ばれる周辺アンテナ複合体にフィコビリןを持ち (Adir *et al.*, 2005)、褐藻類や珪藻類は周辺アンテナ複合体である Fucoxanthin-chlorophyll-protein (FCP) に Fucoxanthin というカロテノイドを持っている (Lepetit *et al.*, 2007)。これらの光合成色素は、クロロフィル *a* が集めることのできない範囲の光エネルギーを集めることに使用していると考えられている。

一方、クロロフィル *a* 以外に、クロロフィル *a* のように光合成生物が共通して持っているクロロフィルはない。クロロフィル *b* は主に陸上植物や緑藻類が、クロロフィル *c1-3* は主に褐藻類や珪藻類、渦鞭毛藻等が、クロロフィル *d*, *f* はシアノバクテリア

のみが保持しているように (Miyashita *et al.*, 1996; Miyashita *et al.*, 2011), 光合成生物内の多様な系統に沿ってそれぞれのクロロフィルが保持されている。これらのクロロフィルは、主に周辺アンテナ複合体に存在し、光エネルギーの収集に寄与している。この多様なクロロフィルの中でも主に陸上植物や緑藻類(一部のシアノバクテリアや2次共生藻も持っている)が持つクロロフィル *b* については、これまでに多くの研究が行われ、様々なことが明らかにされてきた。例えば、クロロフィル *b* はクロロフィル *a* とは異なる光の波長を吸収しており、幅広い光エネルギーの吸収に関与している (クロロフィル *b* は 470 nm と 650 nm に、クロロフィル *a* は 430 nm と 660 nm に (Fig. 1))。またクロロフィル *b* は、クロロフィル *b* が存在している周辺アンテナ複合体の大きさをコントロールしていることも知られている (Polle, *et al.*, 2000)。つまりクロロフィル *b* の合成量が、陸上植物や緑藻類、一部のシアノバクテリアや一部の2次共生藻の光エネルギーの受け取り量の調節を担っていると考えられている (Polle *et al.*, 2000)。

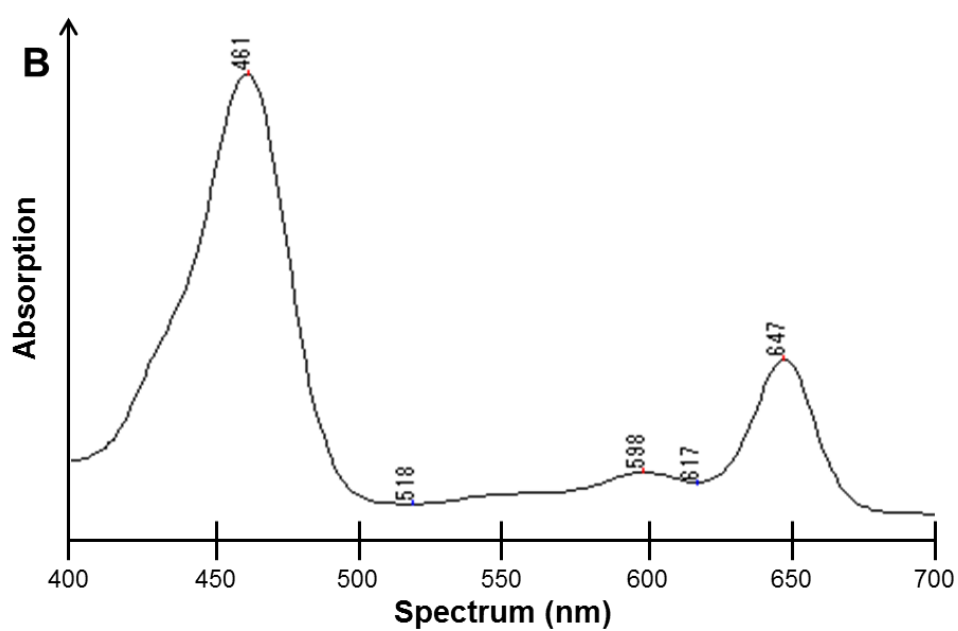
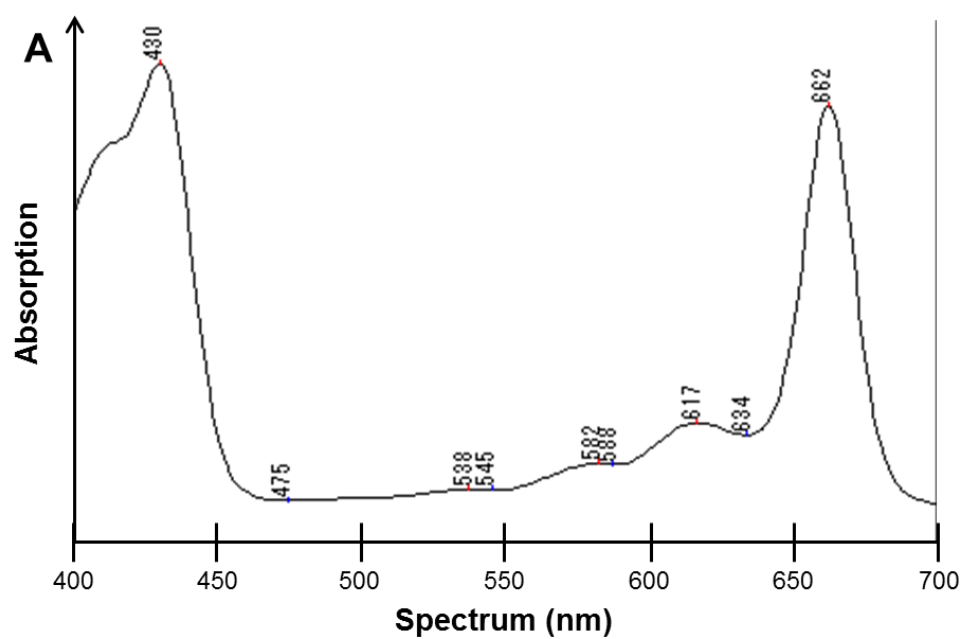


Fig. 1. Spectrum of chlorophyll *a* and chlorophyll *b*.

A, spectrum of chlorophyll *a* in 100% acetone; B, spectrum of chlorophyll *b* in 100% acetone.

2.2 クロロフィル *b* 合成酵素 (CAO)

これまでに紹介してきたクロロフィル *b* は、グルタミン酸から始まり多くの中間体を経てクロロフィル *a* から合成される。クロロフィルの合成経路 (Fig. 2) に関しては長年研究が行われてきており、これまでにシロイヌナズナにおいては、グルタミン酸からクロロフィル *b* までの全てのクロロフィル合成色素、酵素の単離・同定がなされている (Nagata *et al.*, 2005)。

クロロフィル *b* はクロロフィル *a* 酸化酵素 (CAO) によって、クロロフィル *a* (7 位: メチル基) から、7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* を経てクロロフィル *b* (7 位: ホルミル基) へ転換されることで合成される (Tanaka *et al.*, 1998; Tomitani *et al.*, 1999)。また、クロロフィル *b* はクロロフィル還元酵素 (NYC1/NOL) (Kusaba *et al.*, 2007; Horie *et al.*, 2009) および、7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* 還元酵素 (HCAR) (Meguro *et al.*, 2011) の働きによって、クロロフィル *a* に再転換される (Ito *et al.*, 1993)。このクロロフィル *a* とクロロフィル *b* の相互転換は、クロロフィルサイクル (Fig. 3) と呼ばれている (Ohtsuka *et al.*, 1997)。クロロフィル *a* からクロロフィル *b* を合成する酵素 CAO は、Rieske 型のモノオキシゲナーゼである。上記したようにクロロフィル *b* は、光化学系の周辺アンテナ複合体の大きさを制御し、植物の成長に大きな影響を与えていることから、クロロフィル *b* の合成を掌っている CAO のタンパク質量が、光化学系の周辺アンテナ複合体の大きさを制御している。つまり CAO は、クロロフィル *b* を持つ光合成生物の生育にとって非常に重要な酵素であると考えられる。

CAOのアミノ酸配列は、陸上植物以外にも緑藻類やシアノバクテリアで明らかになっており、それらのCAOのアミノ酸配列を比較 (Fig. 4) してみると、配列の保存性から三つのドメインに分けることができる (Nagata *et al.*, 2004)。その三つのドメインを当研究室では、A, B, Cドメインと名付けている (Nagata *et al.*, 2004)。当研究室のこれまでの研究から、これら三つのドメインには各々機能があることがわかっている。Aドメインは、CAOタンパク質の安定性の制御に関与し、クロロフィル*b*の量を調節する制御ドメインであると考えられ (Yamasato *et al.*, 2005)、Bドメインは、AドメインとCドメインを繋ぐリンカーとしてのみ働いていると考えられている。最後にCドメインは、[2Fe-2S] RieskeモチーフとFe結合モチーフの二つのモチーフを持っていることがわかっており、クロロフィル*b*の合成を実際に行っている触媒ドメインであると考えられている (Nagata *et al.*, 2004)。またアミノ酸配列の比較から、Aドメインは陸上植物で

のみ保存されていることから，緑藻類から陸上植物への進化の過程で獲得した配列であると考えられる．しかしCドメインは，陸上植物間だけでなく緑藻類やシアノバクテリアといったすべての生物間で高く保存されていることから，陸上植物や緑藻類の祖先にあたる生物もCドメインのみのCAOを保持していたと考えられる．

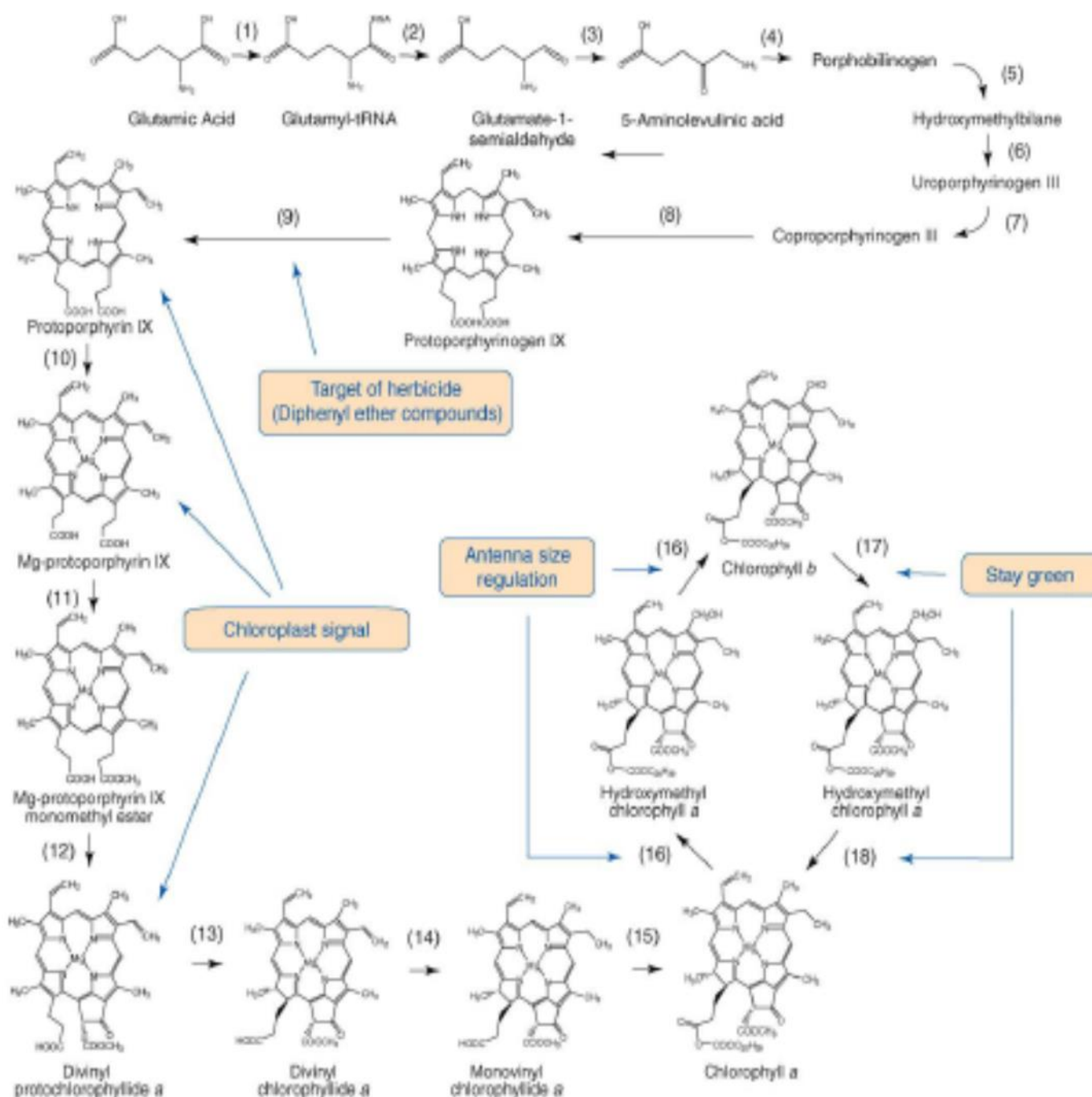


Fig. 2. Chlorophyll metabolic pathway and its relevance to various physiological phenomena.

The chlorophyll metabolic pathway is classified into three phases: chlorophyll *a* synthesis from glutamate, interconversion of chlorophyll *a* and chlorophyll *b*, and the chlorophyll degradation pathway. (1) Glutamyl-tRNA synthetase, (2) Glutamyl-tRNA reductase, (3) Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, (4) Porphobilinogen synthase, (5) Hydroxymethyl-bilane synthase (porphobilinogen deaminase), (6) Uroporphyrinogen III synthase, (7) Uroporphyrinogen III decarboxylase, (8) Coproporphyrinogen III oxidase, (9) Protoporphyrinogen IX oxidase, (10) Protoporphyrin IX Mg-chelatase, (11) S-adenosyl-Lmethionine:Mgprotoporphyrin IX methyltransferase, (12) Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester oxidative cyclase, (13) NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase, (14) Divinyl chlorophyllide *a* 8-vinyl reductase, (15) Chlorophyll synthase, (16) Chlorophyllide *a* oxygenase, (17) Chlorophyll *b* reductase, (18) Hydroxymethyl chlorophyll *a* reductase. (Tanaka *et al.*, 2006)

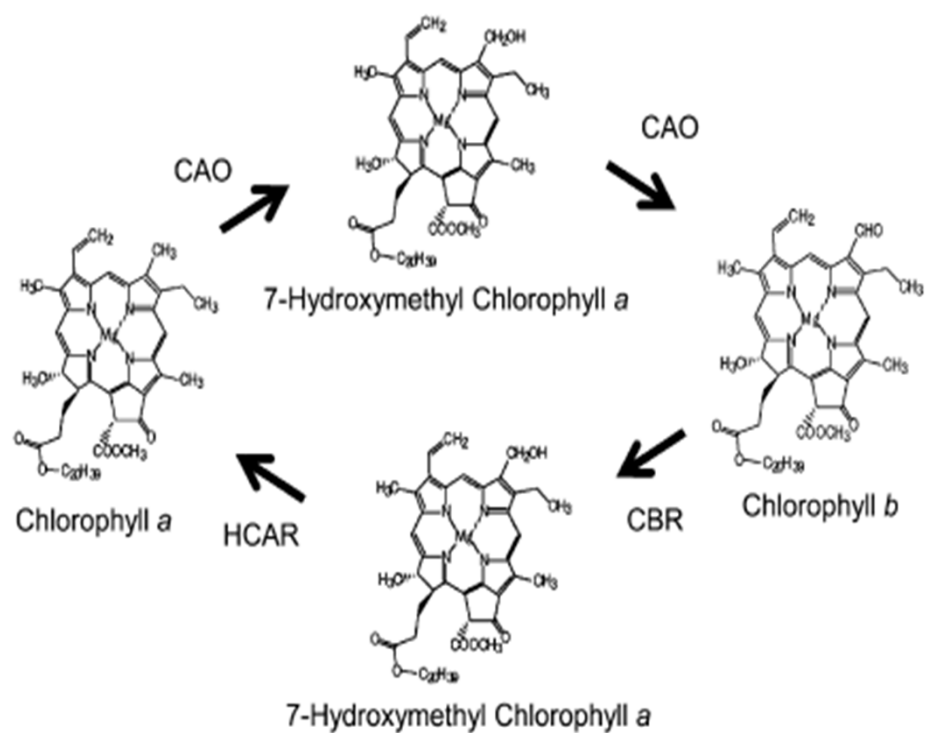


Fig. 3. Chlorophyll cycle.

CAO, chlorophyllide *a* oxygenase; CBR, chlorophyll *b* reductase;

HCAR, 7-hydroxymethyl chlorophyll *a* reductase. (Meguro *et al.*, 2011)

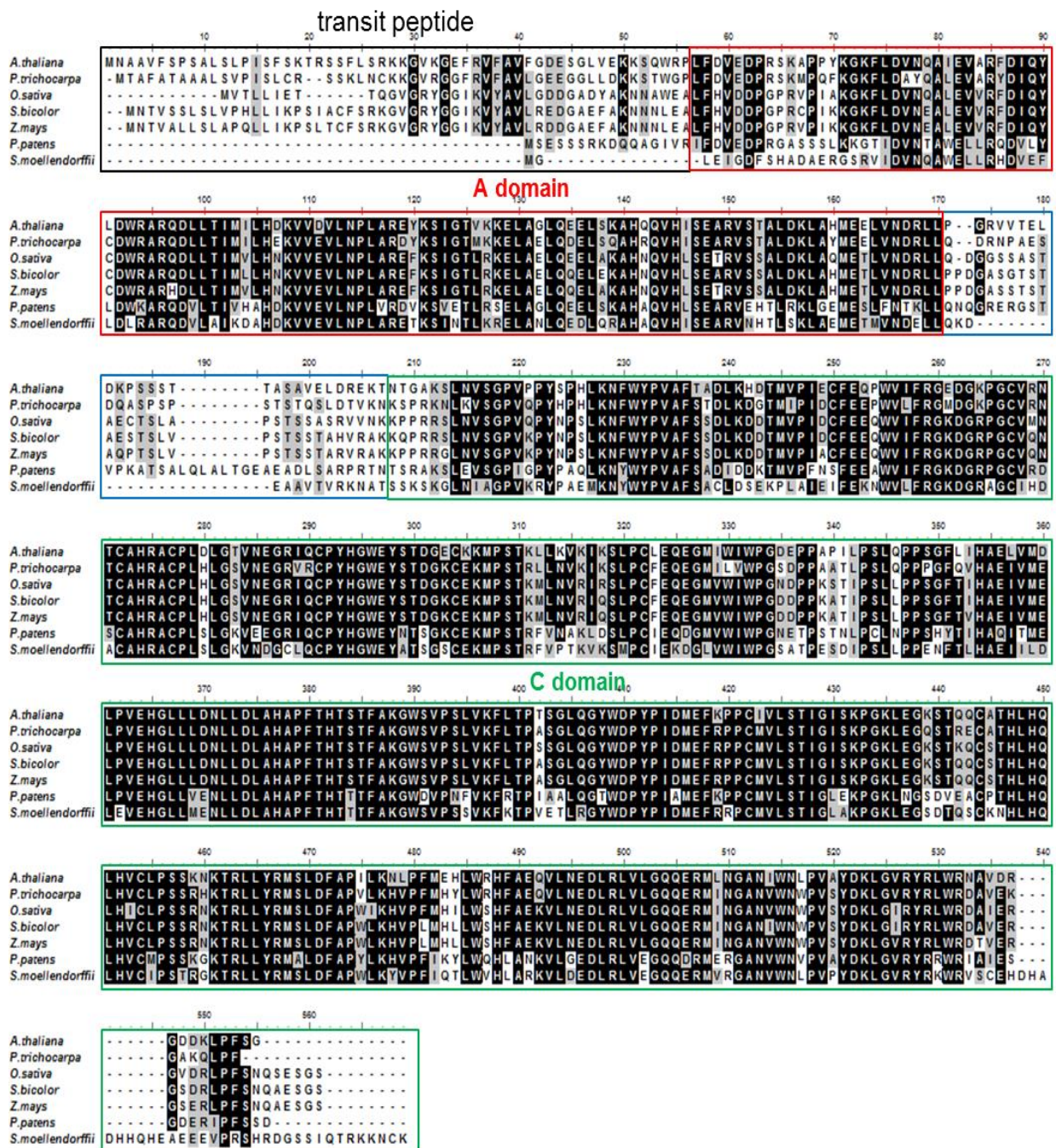


Fig. 4. Alignment of CAO in higher plants.

A. thaliana: Arabidopsis thaliana, *P. trichocarpa*: Populus trichocarpa, *O. sativa*: Oryza sativa, *S. bicolor*: Sorghum bicolor, *Z. mays*: Zea mays, *P. patens*: Physcomitrella patens, *S. moellendorffii*: Selaginella moellendorffii

2.3 クロロフィル**b**を持つ光合成生物の進化

これまでに、現在クロロフィル *b* を持つ光合成生物やクロロフィル *b* を合成する酵素について紹介してきたが、ここからはクロロフィル *b* を持つ光合成生物の歴史について紹介する。

クロロフィル *b* は、約 12 億年前にシアノバクテリアを細胞内共生（一次共生）として取り込んだことで誕生した Viridiplantae（緑色植物）が持ち始めたクロロフィル色素であると考えられている（Tomitani *et al.*, 1999）（現時点では、クロロフィル *b* を持つシアノバクテリアは葉緑体の祖先とは考えられていない（Urbach *et al.*, 1992））。緑色植物は、約 10 億年前に Streptophyta と Chlorophyta に分かれ、その後、現在の高等植物や緑藻類（微細藻、大型藻含む）へと進化を遂げてきた（Fig. 5）と考えられている（Leliaert *et al.*, 2011）。Streptophyta は、一次共生後、淡水性微細藻類から蘚苔類などを介して高等植物へと進化を遂げ、Chlorophyta は、海産性微細藻類、淡水性微細藻類、そして海産性大型藻類へと進化を遂げてきた。Streptophyta と Chlorophyta は、クロロフィル *b* 以外にも多くの共通した光合成色素を保持しているが、一部では網特有の光合成色素も保持している。例えば、クロロフィル *c*-like と呼ばれ、クロロフィル色素合成の中間体にあたる divinyl protochlorophyllide *a* (DVP) は、Chlorophyta に属する海産性である prasinophytes（Fig. 5）は持っているが、淡水性藻類や高等植物は持っていない（Garczarek *et al.*, 2000）。また prasinophytes は、prasinoxanthin という prasinophytes 特有のカロテノイドを持っているなどといったことが知られている。しかし、Streptophyta, Chlorophyta のどちらか一方だけが特異的に持っている光合成色素は存在していない。そのため、緑色植物から Streptophyta と Chlorophyta への進化の際に、新たな光合成色素の獲得が重要であったとは考えにくく、何が進化に影響を与えたのかはいまだ明らかになっていない。

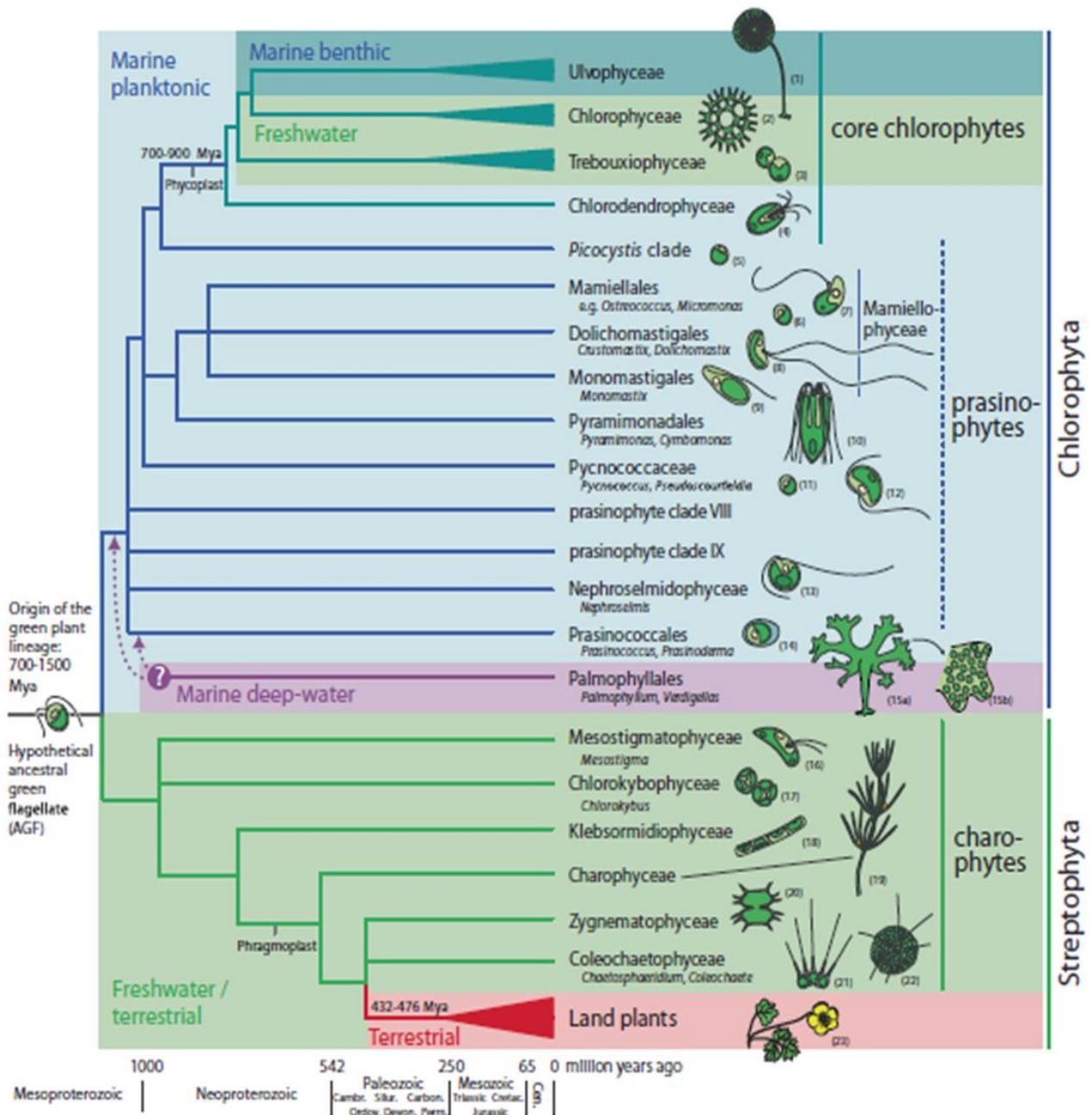


Fig. 5. Phylogenetic relationships among the main lineages of green plants.
 The tree topology is a composite of accepted relationships based on molecular phylogenetic evidence.
 (Leliaert *et al.*, 2011)

2.4 本研究の目的

これまでに Chlorophyta は海水中、特に深い海（50 m 前後）で主に進化し、その後、淡水域へと進化を遂げてきた。一方 Streptophyta は、淡水域から陸上へと進化を遂げてきた (Leliaert *et al.*, 2012)。そのため Chlorophyta は、光強度が非常に弱く、かつ、光合成に利用できる光の領域も限られた条件（ほとんどが青色光）で (Fig. 6)、できるだけ効率よく光合成を行う光化学系が必要であったと考えられる。それに対して Streptophyta は、強光条件への適応や、強光から身を守るための仕組みを発達させた光化学系が必要であったと考えられる。そのため Streptophyta と Chlorophyta は、各々の生育する光環境に適応した光化学系、特に光を集めるためのアンテナ部分を各々に進化させ構築してきたと考えられ、アンテナの形成に密接に関わるクロロフィル *b* の利用様式が両者間で異なっているのではないかと考えられる。しかし、緑藻の光化学系の詳細な研究は、これまでに一部のモデル光合成生物に限られており、先行研究からはそのような比較は難しい。

そこで本研究では、Streptophyta と Chlorophyta の光化学系の特徴と両者の差異を、クロロフィル *b* の利用様式や CAO の構造との関係性を含めて解析することを目的とした。

近年 Chlorophyta の prasinophyceae に属する Mamiellales の *Micromonas* と *Ostreococcus* (Fig.5) の全ゲノム解読が行われた結果、この両者が非常に特徴的な CAO を有していることがわかった。これらの緑藻の CAO は、A, B ドメインを有していないだけでなく、C ドメインを分割し二つのモチーフをそれぞれ別の遺伝子にコードしていた。そのためこれらの海産性緑藻は、高等植物や淡水性緑藻の *Chlamydomonas* とは異なった構造の CAO を有していることから、新規な光化学系を構築していると考え、初めに *Micromonas* の CAO (MpCAO) と *Micromonas* の光化学系の生化学的構造解析を行った。その結果、*Micromonas* は周辺アンテナ複合体だけでなく、反応中心の周りにあるインナーアンテナ複合体 (Fig. 7) にもクロロフィル *b* を持っていることがわかった。また MpCAO を、クロロフィル *b* を持たないシロイヌナズナ (*ch1-1*) に導入すると、シロイヌナズナ中で *Micromonas* と同様の光化学系を再現することができた。

次に先の結果から、Chlorophyta に属する緑藻の 1 種が Streptophyta に属する高等植物とは異なる光化学系を構築していたことがわかり、Streptophyta と Chlorophyta の光化学系の異なり的一端を垣間見ることができた。さらにその光化学系の違いに CAO が

関連していることも分かった．しかし本研究の目的である Streptophyta と Chlorophyta の光化学系の特徴と両者の差異を明らかにするためには，これらの結果をより一般的にする必要がある．そこで，Streptophyta に属する 3 種の高等植物や緑藻と Chlorophyta に属する 9 種の緑藻を用いて，各々の光化学系と CAO の構造に対する系統的解析を行った．その結果，Streptophyta は生育環境に関わらず，クロロフィル *b* を周辺アンテナ複合体のみに組み込んでいた．一方 Chlorophyta では，海水中に生育する藻類はクロロフィル *b* を周辺アンテナ複合体とインナーアンテナ複合体の両方に組み込んでいた．特に進化の初期に誕生し，深い海に生息する緑藻は，多くのクロロフィル *b* をインナーアンテナ複合体に組み込んでいた．しかし，淡水域に生息する Chlorophyta は，Streptophyta と同様に周辺アンテナ複合体のみにクロロフィル *b* を組み込んでいた．また，CAO の構造の解析を行った結果，Streptophyta と Chlorophyta では CAO の一部の構造が異なっていることがわかった．これより，CAO の構造と光化学系の構造には，何らかの相関関係があると考えられるが，両者の明確な関係性を見出すことはできなかった．

以上のことから，Streptophyta と Chlorophyta では，光化学系におけるクロロフィル *b* の量と局在が異なる結果，各々異なった光化学系を構築していることが，本研究で明らかになった．この光化学系の違いは，異なる生育環境への適応のためであると考えられ，このことが緑色植物の進化の重要な原動力であったと考えられる．さらにこの過程において，CAO の分子進化が重要な役割を担っていた可能性があると考えられる．

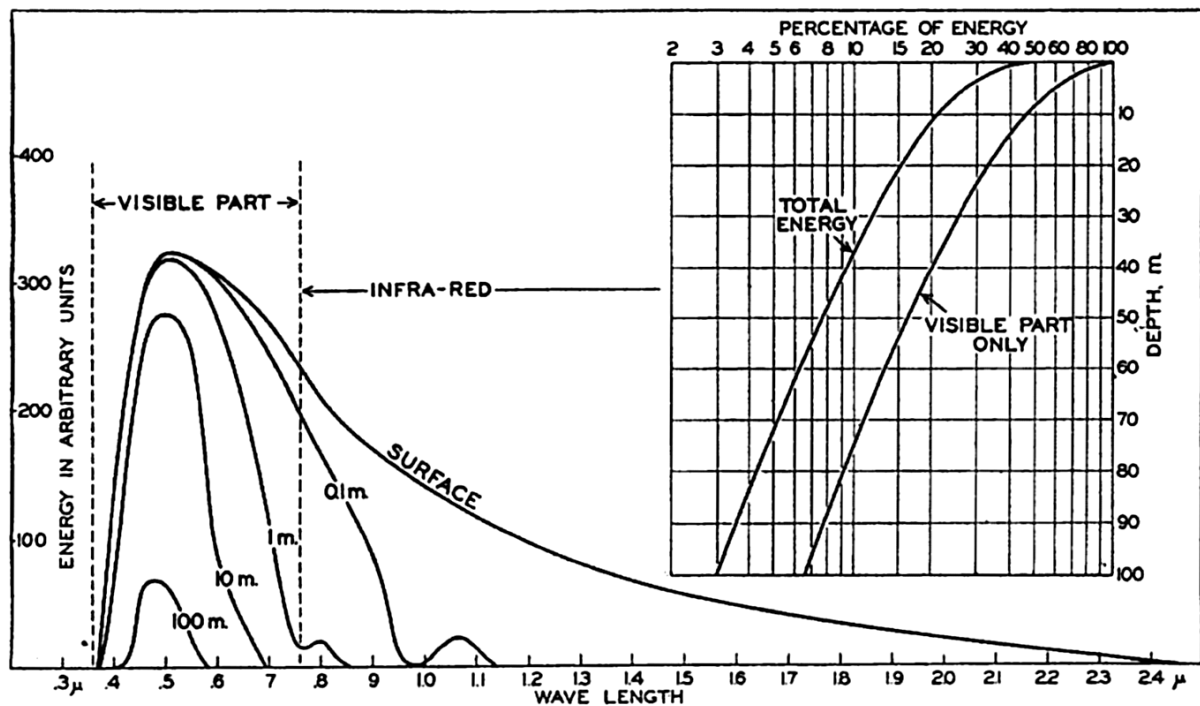


Fig. 6. Light condition in the ocean.

(The Oceans Their Physics, Chemistry, and General Biology Prentice-Hall, Inc. New York 1942)

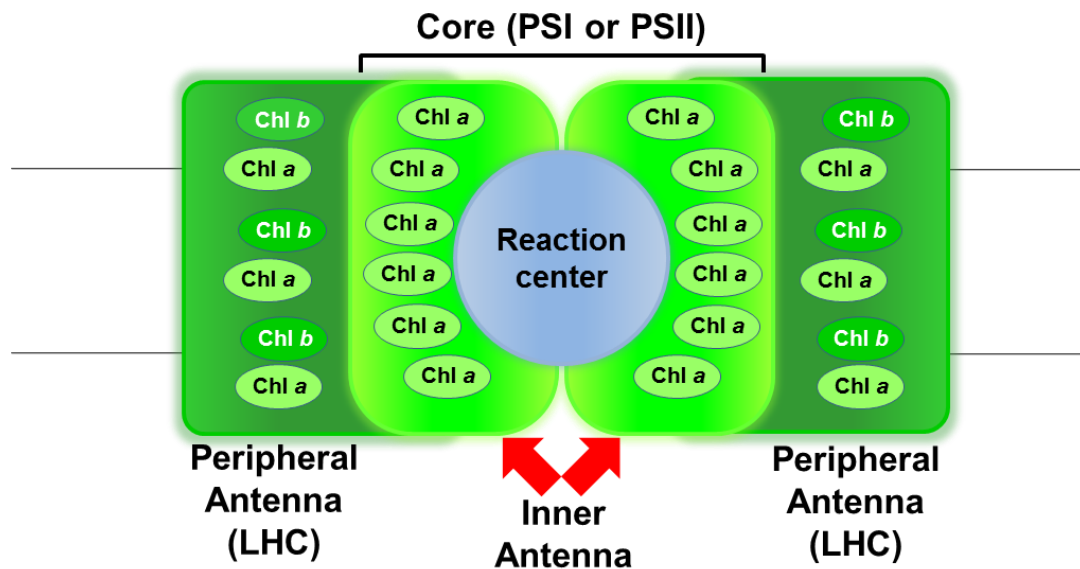


Fig. 7. Schematic drawing of inner/peripheral antenna complexes of *Arabidopsis*.
Chl, Chlorophyll.

3. 材料と方法

3.1 緑藻と培養条件

実験で用いた緑藻の中で, *Bryopsis plumose* (Hudson) C. Agardh は北海道室蘭市(日本)で採取し, *Palmophyllum crassum* は, 高浜漁港(愛媛県松山市, 日本)で採取した. また, *Klebsormidium flaccidum* (NIES-2285), *Mesostigma viride* (NIES-296), *Prasinodrama colonial* (NIES-2582), *Pseudoscurfieldia marina* (NIES-1419), *Pyramimonas parkeae* (NIES-254), *Chlorella variabilis* (NIES-2541) は, 国立環境研究所微生物保存施設(日本)から購入した. また *Nephroselmis pyriformis* (CCMP549) と *Micromonas pusila* (CCMP1545) は, National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA, USA) から購入した. *Chlamydomonas reinhardtii* (cc1931(arg7)) は, Tris-acetate-phosphate (TAP) 培地に 200 mM Arginine を付加した培地で培養した (Tanaka *et al.*, 1998). *C. variabilis* は CCA 培地で (Hoshina *et al.*, 2009), *M. pusila* と *N. pyriformis* は L1 培地で (Kunugi *et al.*, 2013), *P. parkeae*, *P. marina*, *P. colonial* は f/2 培地で, *M. viride*, *K. flaccidum* は C 培地で, *B. plumose* は PES 培地 (Takahiro *et al.*, 2003) でそれぞれ培養を行った. 海産性緑藻は $15 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ で, 淡水性緑藻は $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ の光強度で, 100~300 ml の三角フラスコ, 24.5 °C, 明:暗=14 h:10 h で培養を行った. TAP+200 mM Arginine 培地, CCA 培地, C 培地, L1 培地, f/2 培地, PES 培地の組成を Table 1-13 に示した.

Table 1. TAP medium with 200 mM arginine

Conc.	Name
400 mg	NH ₄ Cl
51 mg	CaCl ₂ · 2H ₂ O
100 mg	MgSO ₄ · 7H ₂ O
119 mg	K ₂ HPO ₄
60.3 mg	KH ₂ PO ₄
1 mL	Hutner's trace elements
1 mL	Acetic acid
2.42 g	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
200 mM	Arginine
998 mL	Distilled water

Table 2. Hunter's trace elements

Conc.	Name
50 g	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O
22 g	ZnSO ₄ · 7H ₂ O
11.4 g	H ₃ BO ₃
5.06 g	MnCl ₂ · 4H ₂ O
4.99 g	FeSO ₄ · 7H ₂ O
1.61 g	CoCl ₂ · 6H ₂ O
1.57 g	CuSO ₄ · 5H ₂ O
1.10 g	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O
1.0 L	Distilled water

Table 3. CCA medium

Conc.	Name
150 mg	Ca (NO ₃) ₂ · 4H ₂ O
100 mg	KNO ₃
50 mg	β-Na ₂ glycerophosphate · 5H ₂ O
40 mg	MgSO ₄ · 7H ₂ O
0.1 µg	Vitamin B ₁₂
0.1 µg	Biotin
10 µg	Thiamine HCl
3 mL	PIV metals
500 mg	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
200 mg	Casamino acid
997 mL	Distilled water

Table 4. C medium

Conc.	Name
150 mg	Ca (NO ₃) ₂ · 4H ₂ O
100 mg	KNO ₃
50 mg	β-Na ₂ glycerophosphate · 5H ₂ O
40 mg	MgSO ₄ · 7H ₂ O
0.1 µg	Vitamin B ₁₂
0.1 µg	Biotin
10 µg	Thiamine HCl
3 mL	PIV metals
500 mg	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
997 mL	Distilled water

Table 5. PIV metals

Conc.	Name
1.0 g	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O
196 mg	FeCl ₃ · 6H ₂ O
36 mg	MnCl ₂ · 4H ₂ O
10.4 mg	ZnCl ₂
4.0 mg	CoCl ₂ · 6H ₂ O
2.5 mg	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O
1.0 L	Distilled water

Table 6. L1 medium

Conc.	Name
1.0 ml	NaNO ₃ (75.0 g/L dH ₂ O)
1.0 ml	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (5.0 g/L dH ₂ O)
1.0 ml	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O (30.0 g/L dH ₂ O)
1.0 ml	L1 Trace Metal Solution
0.5 ml	f/2 Vitamin Solution
1.0 L	Filtered seawater

Table 7. L1 Trace Metal Solution

Conc.	Name
3.15 g	FeCl ₃ ·6H ₂ O
4.36 g	Na ₂ EDTA·2H ₂ O
0.25 ml	CuSO ₄ ·5H ₂ O (9.8 g/L dH ₂ O)
3.0 ml	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O (6.3 g/L dH ₂ O)
1.0 ml	ZnSO ₄ ·7H ₂ O (22.0 g/L dH ₂ O)
1.0 ml	CoCl ₂ ·6H ₂ O (10.0 g/L dH ₂ O)
1.0 ml	MnCl ₂ ·4H ₂ O (180.0 g/L dH ₂ O)
1.0 ml	H ₂ SeO ₃ (1.3 g/L dH ₂ O)
1.0 ml	NiSO ₄ ·6H ₂ O (2.7 g/L dH ₂ O)
1.0 ml	Na ₃ VO ₄ (1.84 g/L dH ₂ O)
1.0 ml	K ₂ CrO ₄ (1.94 g/L dH ₂ O)
1.0 L	Filtered seawater

Table 10. f/2 Vitamin Solution

Conc.	Name
1.0 ml	Vitamin B ₁₂ (1.0 g/L dH ₂ O)
10.0 ml	Biotin (0.1 g/L dH ₂ O)
200 mg	Thiamine HCl
1.0 L	Distilled water

Table 8. f/2 medium

Conc.	Name
1.0 ml	NaNO ₃ (75.0 g/L dH ₂ O)
1.0 ml	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (5.0 g/L dH ₂ O)
1.0 ml	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O (30.0 g/L dH ₂ O)
1.0 ml	f/2 Trace Metal Solution
0.5 ml	f/2 Vitamin Solution
1.0 L	Filtered seawater

Table 9. f/2 Trace Metal Solution

Conc.	Name
3.15 g	FeCl ₃ ·6H ₂ O
4.36 g	Na ₂ EDTA·2H ₂ O
1.0 ml	CuSO ₄ ·5H ₂ O (9.8 g/L dH ₂ O)
1.0 ml	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O (6.3 g/L dH ₂ O)
1.0 ml	ZnSO ₄ ·7H ₂ O (22.0 g/L dH ₂ O)
1.0 ml	CoCl ₂ ·6H ₂ O (10.0 g/L dH ₂ O)
1.0 ml	MnCl ₂ ·4H ₂ O (180.0 g/L dH ₂ O)
1.0 L	Distilled water

Table 12. Fe Stock Solution

Conc.	Name
0.33 g	Na ₂ EDTA·2H ₂ O
0.351 g	(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ ·6H ₂ O
500 ml	Distilled water

Table 11. PES medium

Conc.	Name
0.1 g	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
0.07 g	NaNO ₃
0.01 g	Disodium beta-glycerophosphate
5 ml	Fe Stock Solution
5 ml	P2-metal mix
0.02 ml	VitaminB ₁₂ (0.1 mg/ml)
0.1 ml	Thiamine HCl (1.0 mg/ml)
0.01 ml	Biotin (0.1 mg/ml)
989.87 ml	Distilled water

Table 13. P2-metal mix

Conc.	Name
0.5 g	Na ₂ EDTA·2H ₂ O
0.57 g	H ₃ BO ₃
0.0245 g	FeCl ₃ ·6 H ₂ O
0.073 g	MnCl ₂ ·4 H ₂ O (or MnSO ₄)
0.5 ml	CoSO ₄ ·7 H ₂ O solution (4.8 mg/ml)
0.011 g	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O (or ZnCl ₂)
499.5 ml	Distilled water

3.2 実験に用いた植物とその生育条件

i) *MpCAO* 導入シロイヌナズナの作成 (*MpCAO1*+*MpCAO2-1* 遺伝子導入株, *MpCAO1*+*MpCAO2-2* 遺伝子導入株, *MpCAO1* 遺伝子導入株, *MpCAO2* 遺伝子導入株)

本研究では *MpCAO* (FeS), *MpCAO* (Fe) 遺伝子として, シロイヌナズナ (col-o 系統) の codon usage に最適化された人工遺伝子 *MpCAO1*, *MpCAO2* (Fig. 8) を用いた. *MpCAO1* vector は, *MpCAO1* 遺伝子のコーディング領域の N 末端側にシロイヌナズナの *CAO* (*AtCAO*) の葉緑体移行シグナル (1–168 bp) を, C 末端側に Flag tag (GATTATAAAGATGACGATGATAAG) を融合し, pGreenII MH2 vector (Hygromycin 耐性) に組み込み作成した. *MpCAO2* vector は, *MpCAO2* 遺伝子のコーディング領域の N 末端側に *AtCAO* の葉緑体移行シグナル (1–168 bp) を, C 末端側に HA tag (TACCCATATGATGTTCTGATTACGCA) を融合し, pGreenII MH2 vector (Kanamycin 耐性) (Yamasato *et al.*, 2005) に組み込み作成した. この際, 遺伝子の増幅には KOD-FX Neo (TOYOBO) を, ベクターへの組み込みには In-Fusion HD Cloning Kit (TAKARA) を用いた. その後作成したコンストラクトを, エレクトロポレーション法を用いてアグロバクテリウムへ形質転換した後, Luria-Bertani (LB) 培地 (Table 14) に 0.7% agar, 50 mg/L kanamycin, 50 mg/L rifampicin, 10 mg/L tetracycline を加えたプレートに播いた. その後コロニーを 2 mL の LB 培地に 50 mg/L kanamycin, 50 mg/L rifampicin, 10 mg/L tetracycline を加えた液体培地で 28 °C, 2 日間培養した. 培養したアグロバクテリウムを 8,000×g, 1 min で集菌した. 集菌したアグロバクテリウムを懸濁液 (1/2×MS salt, 5% sucrose, 0.05% SILWET L-77 (パ

イオメディカルサイエンス))で懸濁し、感染液とした。感染液を 1 滴ずつ茎頂へ添加して、アグロバクテリウムを感染させた。このアグロバクテリウム感染は、3 日間隔で 4 回おこなった。感染した植物の種子を採取し、50 mg/L kanamycin 及び 20 mg/L hygromycin を用いてスクリーニングを行い、*MpCAO1*, *MpCAO2* 遺伝子を同時に挿入したシロイヌナズナ (*MpCAO1+MpCAO2-1* 遺伝子導入株)を作成した。また、同時に *MpCAO1* のみを導入したシロイヌナズナ (*MpCAO1* 遺伝子導入株)や *MpCAO2* のみを導入したシロイヌナズナ (*MpCAO2* 遺伝子導入株)を、さらに *MpCAO1* と *MpCAO2* を掛け合わせたシロイヌナズナ (*MpCAO1+MpCAO2-2* 遺伝子導入株)を作成した。ジェノタイピングに用いたプライマー配列は Table 27 に示した。

Table 14. Luria-Bertani medium

Conc.	Name
10 g	NaCl
10 g	Tryptone
5 g	Yeast extract
1 L	Distilled water

ii) *BCFLAG* 挿入シロイヌナズナの作成 (*BCFLAG* 遺伝子導入株)

BCFLAG は、*AtCAO* 遺伝子のコーディング領域中の B ドメインと C ドメイン (Pro¹⁷¹–Gly⁵³⁵) の N 末端側に *AtCAO* の葉緑体移行シグナル (1–168 bp) を、C 末端側に FLAG tag を融合し、pGreenII MH2 vector (kanamycin 耐性) に組み込み作成した。その後、i)と同様の操作を行い、*BCFLAG* 挿入シロイヌナズナ (*BCFLAG* 遺伝子導入株)を作成した。

本研究では、以上の植物の他に、シロイヌナズナ野生株 (コロンビア) とその変異株である *ch1-1* 変異株 (Oster *et al.*, 2000), *PhCAO* 遺伝子導入株 (Hirasima *et al.*, 2006) を用いた。以上の陸上植物は、種子を三共園芸培土 (北海山峡株式会社, 北海道) と太平洋バーミライト (太平洋石炭販売輸送株式会社, 北海道) を混合した土壤に播種した。その後、低温室にて 4 °C で 2 日間低温処理を行った後、白色長日光 (70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$) 照射下、室温 25 °C の条件下で 4 週間、または 6 週間生育した。この際用いたプライマー配列は Table 27 に示した。

ATGAGATGTGACGCTGAAGGATTTCGCTGCTATCGGAAGAAGAGATGCTAGAACACGTACTTCTGCTGCTTCTAGCTCCTCTTCTTCGACA
GTGGCTAAATATATGATTCCAGTTATTCTCTCCGAGTCAGTTGGAAGAGGAATATGTCCTTGGAACTCGAAAGGAGAGAGCTAACTGGTTT
CCTGTTGCGTTTCGCTGACGAGTTGGACGATAAGACTATGATTCTTTTGTATCTTTTCAACGTTTCTTGGGTGGCTTTTCAGGGATCAAGAT
GGAATGGCGGGTTGTATAAAGGATGAATGCGCCCATAGAGCTTGCCCTATATCTTTGGGAAAAGTTGTGGAAGGTAGAGTTCAATGCCCT
TATCATGGGTGGGAATACACGAGTGGTGGAGAATGTAAAAAGATGCCGCTCTATTAATACTGTTGCCAAATGTTTATGTGGATGCAGCC
CCGATCGTAGAAAGAGACGGGCTTTTGTACGTTTGGCTGGAGTTTGGGAACCAGAAAGAGCGGAAGAAATTCTATCTGAACTTCCACCT
TCAGCCGCAACTGCTCCTCTCTGATTTCGACGCTATGGCTGAAGTAACAGTTGATGTTCCATTAGATGCACCAGCTATCCTTTCTCGG
CTCATGGATGTAAAAGGACACGAAGTTGGATTTGATGGCCGTGCACGTCAAGAAAATAAAGTGCCTTTTACCAGAGTTGATACCACTACT
CTCTCAGATGATGTTTTCCCAAGGTTATCGCTAAGGTTCTTAGAGGATTTGGAAAGCCTGCTCCTAAACGTGTTGAATTTACACCCGCA
TGTATACTTGATAGTACTATCGGACTTGACGGTGTAGGAGGACAGGATTGGAATGTTACCAGACCCATGTCGTTTTACCGTCTCGACCA
GGAAAGGCTAGAGTTCTTTACAGGCTTTCTGTTGACTTTGTGCTTGGAGCTGAAATAGCTAGAACAGTAGGAGGACAGGTGTGGCAAAAC
TTAGCTGAAATGATTCTTCAAGAGCAACTTGAAGGTATCAGAGGAGGAAGATTTCAGGATGATTTCGGTTGGAGAGCAAGCTGCTGACGTT
AGCCAGTCTACGATGAATGGATGGAAGAAATTCAGGCTCCAAGA

ATGGCTCCAGAAAGTATCTTCTCTCTCTGCTCTGTTGACGCCCTCAAGAGGTTGGTCTGCTGCAAGGCTGCTCGCAGACTTGGAATGGGAAGA
AGGTTTCGCTGACGAAGTAAGTTTAGACAATCCATCTGATGTTGGAGCTATCCGAAATTATTGGTATCCGATACATTTTATTTCTAAGTTG
AACAAAGGAGATGCTGCAACAAGTTTTGTTCTATTGAGAGAAAGATGGGAATTGGTTGCTGATGATGATGCTGCTGTGCTGCTGCTAAG
ACCGCTGTAGGTGTTTTCGGACCAGAATATGCAGAACTCAGGCTCATCTTGTGGATGGAGCTGCTCAGAGATGGACCTGTAGATCTAGA
GATGATGCTACTAGATTCTACCGATCGGTTTGCAAGATGGACTTGTTATGGTTTGGCCAGGGACGTGTAAGCCAGACGTTGCATTACCA
ACTACATTTACTCCTCCTGCTGGTTATACAACCTCACGCTGAACTTATAATTGAAGACGTACCGGTGGAACACGGACTTCTCATGGAAAAC
CTTTTGGACTTGGCCCATGCACCTTTTACTCATACGGGTACATTGCGTAAAGGTTGGGGAGTTTCTACTTTTGTGCAATTGCTTACAAGT
AAACTGAGAAGAGAAGGTGATGGATGGCAAGATATGGCTAGAGGGTTAACAAGAGAAGGTATTGGACTTGGATCACAGCAAGGTTCTTGG
AATCCTTACCTTATCGATATGAAGTTTGTTACTCCTTGATGTTGATTCTCATATCGGAATGTCTCAAGCAGGTGCTGCTGGAAGGGT
GCACAGTTTGAAGAGGGTGTCCAATGCGCAGAGTGTTCAAACCATCTTCACCACTACATGTCTGTGTTCTTCTGAGCCCGGAAGAACA
CGTCTTCTCTACCGCATGGCTTTGGACTTTGCTGGATGGGCTAAATACGTTTCTGGAATTGAACTTGTGTTGGACTGAAATGGCTAACCAA
GTTTTAGGAGAAGATCTTAGACTCGTTACTGGACAGCAGGATAGAATGAGAAGAGGTGGAAGAGTTTGGGCTCACCCCGTAGCATATGAT
AAACTTGGACTTGTGTTACAGAAGATGGAGAAATTTCTCTGTTGGAGAAGCATGCGATGTTTCTGCAGGAATTGGGGCTGAGGGCGCTGGA
GAAACTGCTCAACGATCGAGA

22

3.3 リコンビナント AtCAO の作成と精製

葉緑体移行ペプチドを取り除いたコーディング領域のAtCAOをKOD-FX NEOを用いて増幅し, pCold ProS2 vector (Takara) のSacI/PstIサイトに導入したvectorを用いて, 実験を行った. なお, AtCAO導入vectorは, N末端側にhexahistidine tag (His tag)を保持している. このvectorをEscherichia coli C41 cells (Avidis SA)に形質転換した. 作成した*E.coli*を, LB培地に50 mg/L ampicillin と 0.1 mM ammonium ferric citrateを加えた液体培地で, 600 nmにおける吸光度が1.5になるまで37 °C, 175 rpmで培養した (Shimoda *et al.*, 2012). その後, 遺伝子発現を誘導するために, 0.3 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranosideを添加し, 18 °C, 18時間, 175 rpmで培養した. 培養後, 遠心分離(2,000 $\times g$, min, 25 °C)で細胞を集め, 集めた細胞をbuffer (20 mM imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.9))に懸濁し, ホモジナイザー (BRANSON)によって氷上で破碎した. 破碎後の細胞を遠心分離 (21,600 $\times g$, 5 min, 4 °C)によって集積し, 上澄みを可溶性フラクションとして以後の実験に用いた. この可溶性フラクションをニッケルカラム (His-Trap HP kit; GE Healthcare)を用いて精製した. 生成方法は付属のマニュアルに従って行った. 生成後の溶出液を回収し, 遠心濾過器 (Amicon Ultra-15 30,000 MWCO; Millipore)を用いて50 μ Lに濃縮し, 2次元BN/SDS-PAGEに用いた.

.

3.4 チラコイド膜の単離

シロイヌナズナのチラコイド膜の単離には, 播種後4週間(野生株, *MpCAO1*+*MpCAO2-1*遺伝子導入株, *BCFLAG*遺伝子導入株, *PhCAO*遺伝子導入株), 播種後6週間 (*chl1-1*変異株)の葉を用いた.

i) Native-green gel用

シロイヌナズナ(野生株, *MpCAO1*+*MpCAO2-1*遺伝子導入株)は採取した葉を, *B. plumose*は切断した細胞を, *P. crussami*は細胞を, 冷やしておいた50 mM Tricine-NaOH (pH 8.0)に浸し, 氷上でガラスホモジナイザー (PYREX)を用いて破碎した. 破碎後, ミラクロス (Calbiochem)を用いて濾過し, 濾過液を21,600 $\times g$, 2 min, 4 °Cで遠心分離した. 遠心後, 上澄み液を取り除き, ペレットを5 mM EDTA-2Na (pH8.0)に再懸濁し, 2回洗浄した. この際の遠心分離も21,600 $\times g$, 2 min, 4 °Cの条件で行った. 洗浄後のペレットをチラコイド膜として使用した.

微細緑藻類は, 対数増殖期の細胞を遠心分離 (2,000 $\times g$, 10 min, 25 °C)し, ペレットにした. その後, *C. variabilis*を除く微細緑藻類は各々の液体培地に再懸濁し, 直径100 μ mのガラスビーズ, 500 mgで, Mini-Bead Beater (Waken B Tech, Japan)を用いて4 °Cで細胞を破碎した. *C. variabilis*は, 遠心後のペレットを液体窒素で凍結後, 直径500 μ mのガラスビーズ, 500 mgで, Mini-Bead Beaterを用いて4 °Cで細胞を破碎した (Honjoh *et al.*, 1995). 破碎後, 遠心分離 (21,600 $\times g$, 2 min, 4 °C)を行い, ビーズと破

砕できなかった細胞を取り除き、ペレットを5 mM EDTA-2Na (pH8.0) に再懸濁し、2回洗浄した。この際の遠心分離も21,600 ×g, 2 min, 4 °Cの条件で行った。洗浄後のペレットをチラコイド膜として使用した。

ii) Blue native-PAGE (BN-PAGE) 用

採取した葉(野生株, *MpCAO1+MpCAO2-1*遺伝子導入株, *BCFLAG*遺伝子導入株, *PhCAO*遺伝子導入株)を冷やしておいた単離buffer(20 mM Tricine-NaOH (pH 8.0), 0.45 M sorbitol, 10 mM EDTA-2Na, 1 mM NaHCO₃, 0.1% (w/v) bovine serum albumin (BSA))に浸し、ミキサー (Tiger) を用いて破碎した。破碎した葉を4層に重ねたミラクロスで濾過し、1,000×g, 5 min, 4 °Cで遠心分離を行った。遠心分離後、上澄みを取り除き、ペレットを冷やしておいた洗浄buffer(20 mM MOPS-NaOH (pH 7.6), 0.33 M sorbitol, 5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA-2Na)に懸濁した。次に洗浄buffer中で40%と80% Percollを用意し、下層に80% Percoll, 上層に40% Percollの2層に分けた溶液を作り、上層に先程懸濁した溶液を乗せた。その溶液を2,500×g, 10 min, 4 °Cで遠心分離を行い、40%と80%の層の間に蓄積したものを回収した。その回収物を5倍量の洗浄bufferに再懸濁し、1,000×g, 5 min, 4 °Cで遠心分離を行った。この操作を2度行った後のペレットをチラコイド膜としてBN-PAGEに用いた (Takabayashi *et al.*, 2011)。

3.5 Native green gel

チラコイド膜(野生株, *MpCAO1+MpCAO2-1*遺伝子導入株, *M. viride*, *K. flaccidum*, *N. pyriformis*, *P. colonial*, *P. parkeae*, *P. marina*, *M. pusilla*, *B. plumose*)を4 °Cで0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) で可溶化した。また*P. crussam*は1.0% SDSで可溶化し、*C. variabilis*と*C. reinhardtii*は0.5% β-dodecyl maltoside (β-DM) で可溶化した。可溶化後、遠心分離(21,600×g, 5分, 4 °C)を行い、上澄み液を0.1% SDSを含む8%アクリルアミドゲル(直径5 mmのガラス棒)にアプライした。電気泳動は、4 °C, 1.5 h, ガラス棒一本当たり0.5 mA, 泳動bufferには0.1% SDSを添加して行った (Anderson *et al.*, 1978)。Native green gel用のゲル組成をTable 15に泳動用のbufferをTable 16に示した。

Table 15. Native-green gel component

Running gel		Stacking gel	
Conc.	Name	Conc.	Name
8.00%	Acrylamide	4.00%	Acrylamide
10.25 mM	Tris-Borate (pH 8.64)	6.75 mM	Tris-H ₂ SO ₄ (pH 6.1)
0.10%	SDS	0.10%	SDS
0.10%	APS	0.10%	APS
0.05%	TEMED	0.05%	TEMED

Table 16. Native-green gel buffer

Upper buffer		Lower buffer	
Conc.	Name	Conc.	Name
12.5 mM	Tris-Borate (pH 9.5)	10.25 mM	Tris-Borate (pH 8.64)
0.1%	SDS	0.1%	SDS

3.6 1次元SDS-PAGE

播種後4週間(野生株, *MpCAO1*+*MpCAO2-1* 遺伝子導入株, *MpCAO1*+*MpCAO2-2* 遺伝子導入株, *MpCAO1* 遺伝子導入株, *MpCAO2* 遺伝子導入株)または6週間(*chl1-1* 変異株)経過後の葉(15 mg fresh weight)を採取後, また緑藻に関しては細胞を集積後, すぐに液体窒素で凍結させた. その後, 植物の葉に関しては15 mg に対し50 μ L の protein extraction buffer (Table 17)を加え, 100 °Cで10 min 加熱し, タンパク質の抽出を行った(Tsugama *et al.*, 2011). 加熱後, 21,600 $\times g$, 5 min, 25 °Cで遠心分離した. 遠心分離後, 上清をサンプルとして用いた. また緑藻類に関しては, protein extraction buffer でタンパク質を抽出後, Bradford法(Total Protein Quantitation Kit, BradfordUltra™, コスモ・バイオ)を用いて濃度を測定し, タンパク質濃度が2 μ g になるようにサンプルを調整した. その後, 各サンプルを14%アクリルアミドゲルで25 mA, 1 h の条件で電気泳動した(Laemmli, *et al.*, 1970). 電気泳動を行った際の buffer は Table 18 に示した. また, PsaA/PsaB (PSI) のイムノブロット解析を行った際には, 14% アクリルアミドゲルに4 M urea を加えた. SDS 用のゲル組成を Table 19 に示した.

Table 17. Protein extraction buffer

Conc.	Name
0.1 M	EDTA-2Na (pH 8.0)
0.12 M	Tris-HCl (pH 6.8)
4.0%	SDS
10% (v/v)	Glycerol
0.005%	bromophenol blue

Table 18. SDS-PAGE running buffer

Conc.	Name
25 mM	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
192 mM	Glycine
0.1%	SDS

Table 19. SDS-PAGE gel component

Running gel		Stacking gel	
Conc.	Name	Conc.	Name
14%	Acrylamide	3.5%	Acrylamide
375 mM	Tris-HCl (pH 8.8)	127 mM	Tris-HCl (pH 6.8)
0.1%	SDS	0.1%	SDS
0.083%	APS	0.083%	APS
0.0083%	TEMED	0.0083%	TEMED

3.7 2次元SDS/SDS-PAGE

播種後4週間経過後の葉(100 mg fresh weight)を採取後, LDS sample buffer (63 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 0.5% LDS) 中でペッスルを用いて, 葉を破碎してタンパク質の抽出を行った. 抽出後, 遠心分離(18,800×g, 5 min, 4 °C)を行い, 上清を14% アクリルアミドゲル, 6 mA, 4 h, 電気泳動を行った. 電気泳動後, 泳動後ゲルから1レーンの流れ方向と平行に切り取り, 切り取ったレーンを1% SDS, 1% 2-mercaptoethanolに37 °C, 1時間, 浸した. その後, 4 M ureaを含んだ14% アクリルアミドゲルの上に乗せ, 1次元SDS-PAGEと同様の系で電気泳動を行った. 電気泳動終了後, ゲルを銀染色した.

3.8 2次元BN/SDS-PAGE

チラコイド膜(野生株, *MpCAO1+MpCAO2-1*遺伝子導入株, *BCFLAG*遺伝子導入株, *PhCAO*遺伝子導入株)と精製したリコンビナントAtCAOタンパク質を, 冷やしておいたsolubilization buffer (50 mM imidazole-HCl (pH 7.0), 20% glycerol, 5 mM 6-aminocaproic acid, 1 mM EDTA-2Na)に懸濁した. その後1% β -DMで, 氷上で5分間可溶化し, 可溶化後の上清を電気泳動した. 泳動は4-15%のグラジエントゲルで40 V, 1 mA, 16時間泳動した(Takabayashi *et al.*, 2011). 2次元目のSDS-PAGEに移る前に, BN-PAGEのゲルを1レーン切り出し, 1.0% SDSと1.0% 2-mercaptoethanolに37 °Cで1時間浸した. その後, 2次元SDS/SDS-PAGEと同様にSDS-PAGEを行った. BN-PAGE用のグラジエントゲル組成をTable 20に泳動bufferをTable 21に示した.

Table 20. BN-PAGE gel component

Running gel				Stacking gel	
4% Acrylamide		15% Acrylamide			
Conc.	Name	Conc.	Name	Conc.	Name
4.0%	Acrylamide	15%	Acrylamide	3.5%	Acrylamide
1×	Gel buffer	1×	Gel buffer	1×	Gel buffer
0.05%	APS	0.167% (w/v)	Glycerol	0.083%	APS
0.01%	TEMED	0.05%	APS	0.0083%	TEMED
		0.01%	TEMED		

Table 21. BN-PAGE buffer

3×Gel buffer		10×Cathode buffer		10×Anode buffer	
Conc.	Name	Conc.	Name	Conc.	Name
75 mM	Imidazole/HCl (pH 7.0)	500 mM	Tricine	250 mM	Imidazole/HCl (pH 7.0)
1.5 M	6-Aminohexanoic Acid	75 mM	Imidazole		
		0.02%	CBB		

3.9 2次元CN/SDS-PAGE

野生株と*N. pyriiformis*のチラコイド膜を冷やしておいたsolubilization buffer (50 mM imidazole-HCl (pH 7.0), 20% glycerol, 5 mM 6-aminocaproic acid, 1 mM EDTA-2Na)に懸濁した。その後4% β -DM (Nagao *et al.*, 2013)と0.1% Triton X-100を用いて氷上で5分間可溶化し、可溶化後の上清を電気泳動した。泳動は4-14%のグラジエントゲルで40 V, 1 mA, 16時間の条件で泳動した (Takabayashi *et al.*, 2011)。2次元目のSDS-PAGEに移る前に、CN-PAGEのゲルを1レーン切り出し、1.0% SDSと1.0% 2-mercaptoethanolに37 °Cで1時間浸した。その後、2次元SDSPAGE/SDS-PAGEと同様にSDS-PAGEを行った。その際、6 M ureaを含んだ14%アクリルアミドゲルを作成した。CN-PAGE用のグラジエントゲル組成をTable 22に泳動bufferをTable 23に示した。

Table 22. CN-PAGE gel component

Running gel				Stacking gel	
4% Acrylamide		14% Acrylamide			
Conc.	Name	Conc.	Name	Conc.	Name
4.0%	Acrylamide	14%	Acrylamide	3.5%	Acrylamide
1×	Gel buffer	1×	Gel buffer	1×	Gel buffer
0.05%	APS	0.167% (w/v)	Glycerol	0.083%	APS
0.01%	TEMED	0.05%	APS	0.0083%	TEMED
		0.01%	TEMED		

Table 23. CN-PAGE buffer

3×Gel buffer		10×Cathode buffer		10×Anode buffer	
Conc.	Name	Conc.	Name	Conc.	Name
1.5 M	6-Aminohexanoic Acid	75 mM	Imidazole	250 mM	Imidazole/HCl (pH 7.0)
		0.05%	Sodium Deoxycholate		
		0.05%	β -DM		

3.10 銀染色

SDS/PAGE, CN/SDS-PAGE後にゲルの銀染色を行った。銀染色は、Pierce Silver Stain kit for mass spectrometry (Thermo Fisher Scientific)を用いて行った。また、実際の手順は付属のマニュアルに従って行った。

3.11 免疫沈降解析

チラコイド膜(野生株, *MpCAO1*+*MpCAO2-1*遺伝子導入株)を冷やしておいたsolubilization bufferに懸濁した後, 1% β -DMで, 氷上で5分間可溶化した。可溶化後, 上清液とanti-DYKDDDDK beads (Wako), またはanti-HA beads (Wako)を4 °Cで8 h, 反応させた。反応後, 使用したbeadsのプロトコルに従って洗浄を行い, 得られた上清をSDS-PAGE (14% アクリルアミドゲル)で分離し, 続けてイムノブロット解析を行った。

3.12 イムノブロット解析

電気泳動後, Hybond-P PVDF Membrane (GE Healthcare)にタンパク質を転写した後, メンブレンをスキムミルク入りブロッキング液 (5% スキムミルク, 1×PBS, 0.05% Tween-20)に浸し, 30 min振とうした。その後, PBS-Tで10 min×3回洗浄した。次に抗体希釈液Can Get Signal solution Immunoreaction Enhancer Solution 1 (TOYOBO)で一次抗体を希釈し, 一次抗体反応を25 °C 1 h行った。その後, PBS-Tで10 min×3回洗浄した後, 抗体希釈液Can Get Signal solution Immunoreaction Enhancer Solution 2 (TOYOBO)で二次抗体を希釈し, 二次抗体反応を25 °C 1 h行った。その後, PBS-Tで10 min×3回洗浄したのち, Western Lighting Plus-ECL (PerkinElmer)のプロトコルに従って検出をおこなった。一次抗体として, anti-AtCAO antibody (Yamasato *et al.*, 2005), anti-PsaA/PsaB (CP1) antibody (Tanaka *et al.*, 1991), anti-CP47 antibody (Agrisera), anti-Lhcb2 antibody (Agrisera), anti-FLAG antibody (Sigma), anti-HA antibody (Funakoshi)を用いた。二次抗体として, anti-rabbit IgG peroxidase antibody (GE Healthcare)とanti-mouse IgG peroxidase antibody (Sigma-Aldrich)を用いた。Penta-His HRP conjugate kit (Qiagen)を抗体として使用した場合は, 付属のマニュアルに従って実験を行った。ブロッキングbufferの組成をTable 24にPBS-Tの組成をTable 25に示した。

Table 24. Blotting buffer

Conc.	Name
25 mM	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
192 mM	Glycine
20%	Methanol

Table 25. PBS and PBS-T buffer

10×PBS		PBS-T	
Conc.	Name	Conc.	Name
1.37 M	NaCl	1×	PBS
26.8 mM	KCl	0.05%	Tween 20
77.5 mM	Na ₂ HPO ₄		
14.7 M	KH ₂ PO ₄		

3.13 色素分析

採取した葉(野生株, *ch1-1*変異株, *MpCAO1*+*MpCAO2-1*遺伝子導入株, *MpCAO1*+*MpCAO2-2*遺伝子導入株, *MpCAO1*遺伝子導入株, *MpCAO2*遺伝子導入株, *BCFLAG*遺伝子導入株, *PhCAO*遺伝子導入株)を液体窒素で凍結させ, -20 °Cで冷やしておいた100% Acetoneとジルコニアビーズ 2.3 mm (バイオメディカルサイエンス)を加え, シェイクマスター ver. 1.2 (バイオメディカルサイエンス)を使用し, 葉を破碎した. 破碎後, 21,600×g, 5 min, 4°Cで遠心し, 上清をサンプルとして用いた. Native green gel とCN-PAGE後のゲルからの色素の抽出は, 氷上, 50 mM Mops-KOH (pH 7.0) 中で, ゲルをペッスルで破碎後, 21,600×g, 5 min, 4°Cで遠心し, 上清を再度同条件で遠心した. その後, 上清に100% Acetoneを加え, 再度遠心した後の上清をサンプルとして用いた. 解析は, サンプルをSymmetry C8 column (4.6×150 mm; Waters)にロードして行った. カロテノイドの解析にはZapataの系 (Zapata *et al.*, 2000)を, クロロフィルの解析にはSolvent B (20% methanol, 60% acetonitrile, 20% acetone)を用いて, 検出時間 6.5 min, 流量1.2 ml/minの系を用いた. 各色素のエリア解析には, diode array detector (SPD-M20A, Shimadzu)を用いて, 450 nm (カロテノイド), 650 nm (クロロフィル)の吸光度を測定した. 色素は, スペクトルと保持時間から同定した. クロロフィル*a*, *b*の濃度は, ピーク面積の値から検量線を用いて算出した. カロテノイドの定量は, 各カロテノイドのピーク面積とクロロフィル*a*のピーク面積の比で算出した.

3.14 分光光度測定

野生株の葉, *B. plumose*のチラコイド膜, その他の緑藻の細胞の吸光度の測定は, オパールグラスを用いて, 分光光度計(UV-2550; Shimadzu)で行った. 野生株の葉, *B. plumose*のチラコイド膜, その他の緑藻の細胞, CN-PAGEのinner antenna (PSII) の77 K蛍光の測定は, 蛍光分光光度計(F-2500; Hitachi)を用いて行った.

3.15 ゲノムPCR

野生株, *ch1-1*変異株, *MpCAO1+MpCAO2-1*遺伝子導入株, *MpCAO1+MpCAO2-2*遺伝子導入株, *MpCAO1*遺伝子導入株, *MpCAO2*遺伝子導入株からのゲノム抽出は, Edwards *et al.*,の方法に従って行った(Edwards *et al.*, 1991). その後, *MpCAO1*, *MpCAO2*増幅用のprimer (Table 27)を用いて, PCRを行った. PCR産物は2.0% agarose gelを用いて分離し, エチジウムブロマイド染色によって確認した. ゲノム抽出bufferの組成をTable 26に示した.

Table 26. DNA extraction buffer

Conc.	
250 mM	NaCl
200 mM	Tris-HCl (pH 7.5)
0.50%	SDS

3.16 緑藻からのfull length cds CAOのクローニング

対数増殖期の*K. flaccidum*, *M. viride*, *N. pyriformis*, *P. colonial*, *P. marina*, *P. parkeae*, *B. plumose*の細胞からRNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany)を用いてtotal RNAの抽出を行った.

i) Degerate PCR

*B. plumose*のCAOをクローニングするために, Degerate PCR用のprimer (Table 27)をシロイヌナズナやその他の植物, 緑藻類のCAOのcds配列を参考にして作成した.

ii) 5' race, 3' race PCR

K. flaccidum, *M. viride*, *P. crassum*, *N. pyriformis*, *P. colonial*, *P. marina*, *P. parkeae*, *B. plumose*の5', 3' raceは, total RNAをGeneRacer Kit (Invitrogen) を用いて, 付属のマニュアルに従って行った. この際に用いたprimer (Table 27)は, Degerate PCR の結果とGenBankTM(www.ncbi.nlm.nih.gov) にある各々の緑藻のCAOの部分配列のデータを基にして作成した.

3.17 アミノ酸配列比較と系統樹解析

3.16で得られたCAOのアミノ酸配列とデータベースから得たCAOのアミノ酸配列を用いて、本研究で扱った緑色植物のCAOの系統樹を作成した。系統樹では、本研究で用いた緑色生物の他にクロロフィルbを持つシアノバクテリアである、*Prochlorothrix hollandica*と*Prochloron didemni*のCAOも用いた。またシアノバクテリアが持つCAOの祖先配列と考えられている遺伝子を系統樹のアウトグループとして用いた。系統樹を作成するにあたっては、MEGA6 (Tamura, *et al.*, 2013) 内でMUSCLE algorithmを用いて配列比較を行った。その後、作成した配列比較を基にして系統樹を作成した。作成方法としてMaximum Likelihoodを、モデルとしてLG+Gを用いた。Bootstrapは1000で行い、Partial deletionは80%で行った。系統樹解析で用いた遺伝子の遺伝子番号は3.18にまとめて記載する。

Fig.10におけるCAOのアミノ酸配列比較解析では、BioEdit (Hall, T. A., 1999) 内でClustalW program (Thompson, *et al.*, 1994) を用いて行った。各々のアミノ酸配列は、GenBank™ (www.ncbi.nlm.nih.gov) から取得した。

3.18 遺伝子番号

CAO配列の比較解析や系統樹の作成、また各々のprimerの作成に使用した遺伝子の番号をTable 28に示した。また、本研究で初めて解読した数種の緑藻のCAOの全長の配列は、Fig.25に示した。

Table 27. Primer sequence			
gene	Primer name	Sequence	Use
MpCAO1	tpAtCAO-MpCAO1-HA-PGII-Hyg Fw	ATGGAGACCT GT CGAC ATGGCTCCAGAAATCTTCC 下線: <i>Sal</i> I、下線部の左の配列はtransit peptide (AtCAO)、右の配列はMpCAO1	MpCAO1 cloning in PGII
MpCAO1	tpAtCAO-MpCAO1-HA-PGII-Hyg Rv	GCAGCCGG GCGGCCG CTATGCGTAATCAGGAACATC 下線: <i>Not</i> I、下線部の左の配列はPGII、右の配列はHA tag	MpCAO1 cloning in PGII
MpCAO2	tpAtCAO-MpCAO2-FLAG-PGII-Kan Fw	ATGGAGACCT GT CGAC ATGAGATGTGACGCTGAAGGA 下線: <i>Sal</i> I、下線部の左の配列はtransit peptide (AtCAO)、右の配列はMpCAO2	MpCAO2 cloning in PGII
MpCAO2	tpAtCAO-MpCAO2-FLAG-PGII-Kan Rv	GCAGCCGG GCGGCCG CTACTTATCATCGTCATCTTT 下線: <i>Not</i> I、下線部の左の配列はPGII、右の配列はFLAG tag	MpCAO2 cloning in PGII
AtCAO(BC)	tpAtCAO-AtCAO(BC)-FLAG-PGII-Kan Fw	ATGGAGACCT GT CGAC CCTGGCAGAGTTGTAAACGGA 下線: <i>Sal</i> I、下線部の左の配列はtransit peptide (AtCAO)、右の配列はAtCAO (B domain)	AtCAO (BC domain) in PGII
AtCAO(BC)	tpAtCAO-AtCAO(BC)-FLAG-PGII-Kan Rv	TGCAGCCGG GCGGCCG CTTTACTTATCATCGTCATCTTTAATCGCCGGAGAAAG GTAGTTTAT 下線: <i>Not</i> I、下線部の左の配列はPGII、右の配列はFLAG tag+AtCAO (C domain)	AtCAO (BC domain) in PGII
MpCAO1	MpCAO1 Fw	ATGAGATGTGACGCTGAAGGA	Genome PCR
	MpCAO1 Rv	TTACTTATCATCGTCATCTTT	Genome PCR
MpCAO2	MpCAO2 Fw	ATGGCTCCAGAAATCTTCC	Genome PCR
	MpCAO2 Rv	TTATGCGTAATCAGGAACATC	Genome PCR
KfCAO	5' race outer primer	GCGCCAGGTCCAGCAGGTTCTCCAC	5' race PCR
	5' race inner primer	GAGGGTGGCTCCGGCACTTTGTCC	5' race PCR
MvCAO	5' race outer primer	AGGTGCTGCTTGCACTCGCCACTGA	5' race PCR
	5' race inner primer	ATCGTCATGCACGGGCAGTCAAAC	5' race PCR
	3' race outer primer	CCTTCCTCCGCCACTGCGGTAC	3' race PCR
	3' race inner primer	TGAAGGACAAGCCCAACCCGATGGA	3' race PCR
NpCAO	5' race outer primer	CGTGCGCCAGGTCCAGGAGGTTCT	5' race PCR
	5' race inner primer	GCTCCACGGGCACGTCCAGCACTAT	5' race PCR
	3' race outer primer	GGGAGGGGGGGTGGCTGCGTCTA	3' race PCR
	3' race inner primer	CGGCAACGTGCAGTGGCGTACCACG	3' race PCR
PcCAO	5' race outer primer	GCTGAAAGGTCATGTGATGGGTAGGG	5' race PCR
	5' race inner primer	GCGACGGCGTTCTTACCGTCTTG	5' race PCR
PmCAO	5' race outer primer	CGATGCCCATGCCGAGTCGAGGTGGAAC	5' race PCR
	5' race inner primer	CAGCAGGCCGTGCTCGACGGAAACGTC	5' race PCR
	3' race outer primer	GAGCGGGAACCGAAACGCTCTG	3' race PCR
	3' race inner primer	CTGGCGCAACAAACGAAGGCGAGGTA	3' race PCR
PpCAO	5' race outer primer	GGGTCCCAGTTTCCAACCAAGCGCCGTTCA	5' race PCR
	5' race inner primer	GAGTGAATGGAGCATGCGCCAAGTCCAGCA	5' race PCR
	3' race outer primer	GCAGGACGGGTTGATCTGGGTGGG	3' race PCR
	3' race inner primer	GGACGTGCCTGTGGAGCACGCTCTT	3' race PCR
BpCAO	CAO Degenerate Fw	GCA Y GGCCTGCT S AT K GAGAA	Degenerate PCR
	CAO Degenerate Rv	CA W GCACAC R T G SAGCTGGTG	Degenerate PCR
	5' race primer	AGACATGTGATGGGATAGG	5' race PCR
	3' race primer	GAGAGAGAAGGATCCAAGAGC	3' race PCR

* Italic boldface letters represent the degenerate nucleotides.

Table 28. Gene IDs		
Plants	Name	ID(GenBank)
<i>A.thaliana</i> (At)	AtCAO	841029
<i>P.trichocarpa</i> (Pt)	PtCAO	7460954
<i>O.sativa</i> (Os)	OsCAO	78709028
<i>S.bicolor</i> (Sb)	SbCAO	8077402
<i>Z.mays</i> (Zm)	ZmCAO	100284976
<i>P.patens</i> (Pp)	PpCAO	5944131
<i>S.moellendorffii</i> (Sm)	SmCAO	9662436
<i>K. flaccidum</i> (Kf)	KfCAO	AB453278.1
<i>M. viride</i> (Mv)	MvCAO	AB453277.1
<i>N. pyriformis</i> (Np)	NpCAP	AB453267.1
<i>P. colonial</i> (Pc)	PcCAO	AB453271.1
<i>P. marina</i> (Pm)	PmCAO	AB453273.1
<i>P. parkeae</i> (Pp)	PpCAO	AB453269.1
<i>M. pusilla</i> (Mp)	MpCAO(FeS)	9683265
	MpCAO(Fe)	:9686569
<i>C. variabilis</i> (Cv)	CvCAO	17351319
<i>C. reinhardtii</i> (Cr)	CrCAO	5715613
<i>P. hollandica</i> (Ph)	PhCAO	AB126597.1
<i>Synechocystis</i> PCC6803		499174829
<i>Cyanobacteria</i> sp. PCC7424		506434500

4. 結果と考察

4.1 *Chlorophyllide a oxygenase* (CAO) の構造の進化的変化による *Micromonas* の新たな集光装置の獲得

近年, Chlorophyta の Mamiellales に属する海産性緑藻 *Micromonas* (Fig.5) の全ゲノム解読が行われた結果, *Micromonas* は陸上植物やモデル緑藻の *Chlamydomonas* とは大きく異なった CAO を有していることがわかった. *Micromonas* の CAO の特徴は, A ドメインを有していないだけでなく, C ドメインを二つの遺伝子にコードしていたことであった. そこで本章では, CAO の構造が光化学系に与える影響を調べるために, *Micromonas* を用いて *Micromonas* の CAO (MpCAO) と *Micromonas* が持つ光化学系の詳細な解析を行った.

4.1.1 結果

4.1.1.1 クロロフィル *b* を持つ光合成生物の CAO の構造と *Micromonas* CAO の特徴

高等植物や多くの緑藻類の CAO は, クロロフィル *b* の量を調節する制御ドメイン (A ドメイン), クロロフィル *b* の合成を行う触媒ドメイン (C ドメイン), その二つのリンカーである B ドメインから構築されている (Fig. 9). CAO を持つ光合成生物のアミノ酸配列の比較 (Fig. 10) を見てみると, B ドメインには全く相同性がない. このことから, B ドメインにはリンカー以外の機能はないと考えられる. また, 高等植物においてクロロフィル *b* の量の調節を行っていると考えられている A ドメイン (Yamasato *et al*, 2005) 領域を, 緑藻の *Chlamydomonas* も有しているが, 配列が全く異なっていることから, 緑藻類は高等植物とは異なったメカニズムで, クロロフィル *b* の量を調節していると考えられる. さらに, Mamiellales の CAO と *Prochlorophyte* の CAO は, A ドメインと B ドメインを持っていないことがわかる (Fig. 10). C ドメインは, Mamiellales の CAO (Fig. 10) とジビニルクロロフィルを持つ *Prochlorococcus* の CAO (Satoh *et al*, 2006) 以外では非常に高い相同性を示している. さらに *Micromonas* においては, CAO は二つに分割され, 一方は Rieske center モチーフ (MpCAO1) を, もう一方は mononuclear iron モチーフ (MpCAO2) を持っている (Fig. 11).

これまでに知られている CAO の中で, MpCAO のように二つに分かれている CAO は, *Micromonas* と同様に Mamiellales に属する緑藻の *Ostreococcus* が持つ CAO だけである. これらの CAO は, 他の緑色植物の CAO と配列が似ていることから, CAO の構造は異なっているがクロロフィル *b* 合成能を有していると考えられる. そこで MpCAO にクロロフィル *b* 合成能があ

ることを実証するために、クロロフィル *b* を持たないシロイヌナズナに *MpCAO* を導入した (Hirashima *et al*, 2006; Satoh *et al*, 2001). しかし, *Micromonas* の遺伝子は GC 含量が非常に高いため (Worden *et al*, 2009), シロイヌナズナには適さないと考え, シロイヌナズナのコードンに最適化された *MpCAO1* と *MpCAO2* を人工的に作成し (Fig. 8), それぞれの C 末端側に FLAG tag と HA tag を付けた.

これらの人工合成 *MpCAO* 遺伝子を, カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモータの制御化でクロロフィル *b* を持たないシロイヌナズナ (*chl1-1* 変異株) に導入した. まず PCR によって *MpCAO1* と *MpCAO2* が *chl1-1* 変異株に導入されていることを確認した (Fig. 12B). 次に, 播種後 25 日目にそれぞれの植物を撮影した (Fig. 12A). Fig. 12A より, *chl1-1* 変異株は野生株 (WT) よりも小さく, またクロロフィル *b* を持たないことから, 黄緑色をしていることがわかる. 同様に *chl1-1* 変異株に *MpCAO1* と *MpCAO2* をそれぞれ別々に導入した遺伝子導入株 (*MpCAO1*, *MpCAO2*) も *chl1-1* 変異株と同様の表現型を示したことがわかる. しかし, *MpCAO1* と *MpCAO2* の両方を同時に *chl1-1* 変異株に導入した遺伝子導入株 (*MpCAO1+MpCAO2*) では, 野生株と同様の大きさと色合いを示した. またこの時の *MpCAO* タンパク質の蓄積を, イムノブロット解析を用いて確認した (Fig. 12C). その結果, 野生株と *chl1-1* 変異株では, *MpCAO* タンパク質の蓄積は確認できなかったが, *MpCAO1* 遺伝子導入株, *MpCAO2* 遺伝子導入株では, それぞれの *MpCAO* タンパク質の蓄積が確認できた. しかし, *MpCAO1* 遺伝子導入株, *MpCAO2* 遺伝子導入株では, 片方ずつの *MpCAO* タンパク質の蓄積しか確認できなかった. 最後に *MpCAO1+MpCAO2* 遺伝子導入株では, 両方の *MpCAO* タンパク質の蓄積が確認できた. また, *MpCAO2* タンパク質のイムノブロット解析においては, バンドが 2 本得られたが, この明確な原因は分かっておらず, *MpCAO2* タンパク質の一部が何らかの修飾を受けていると考えられる.

次に作成した遺伝子導入株のクロロフィル含有量を, HPLC を用いて測定した (Table 29). 一般的に野生株の chl *a/b* 比は 3.0 前後と考えられており (Sakuraba *et al.*, 2012; Meguro *et al.*, 2011), 本研究においても野生株の chl *a/b* 比は 3.03 であった. また, *chl1-1* 変異株ではクロロフィル *b* は検出できなかった. さらに *chl1-1* 変異株は周辺アンテナ複合体の一つである LHCII を失っているため, 全クロロフィル量も野生株より少なかった (Takabayashi *et al.*, 2011). また Fig. 12A で, *chl1-1* 変異株と同様の表現型を示した *MpCAO1* 遺伝子導入株と *MpCAO2* 遺伝子導入株も, クロロフィル *b* を持っておらず, 全クロロフィル量が野生株より少なかった. 一方, *MpCAO1+MpCAO2* 遺伝子導入株は, 野生型よりも多くのクロロフィル *b* を持っていたが, 全クロロフィル量は野生型よりも少し減少した. このことから *MpCAO* は, *MpCAO1* と *MpCAO2* が存

在することによってクロロフィル *b* を合成し、どちらか一方だけではクロロフィル *b* を合成できないことがわかった。また, *MpCAO1*+*MpCAO2* 遺伝子導入株は, chl *a/b* 比が 1.6 前後と野生株に比べて非常に低くなっていることも分かった。このような現象は, 全長の CAO を持ったシロイヌナズナではこれまでに報告されていないことから, ネガティブフィードバックによって, A ドメインがクロロフィル *b* の量の制御を厳密に行っていることがわかる (Sakuraba, *et al.*, 2009)。一方, A ドメインを持たない *MpCAO* はシロイヌナズナにおいて, クロロフィル *b* の量の制御を行っていないこともわかった。

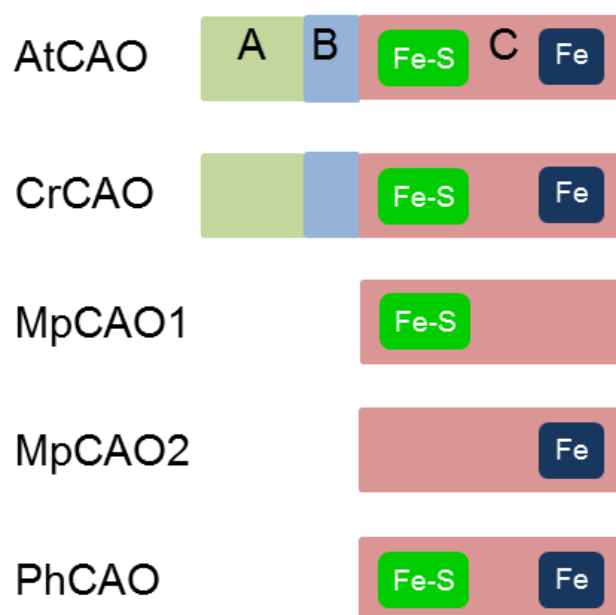


Fig. 9. Comparison of the domain structure of the CAO protein among photosynthetic organisms.

Domain structure of CAO proteins. Rieske center (*Fe-S*) and mononuclear iron (*Fe*)-binding motif are in the C domain. AtCAO, *A. thaliana* CAO; CrCAO, *C. reinhardtii* CAO; MpCAO1, *M. pusilla* CAO (*Fe-S*); MpCAO2, *M. pusilla* CAO (*Fe*); PhCAO, *P. hollandica* CAO.

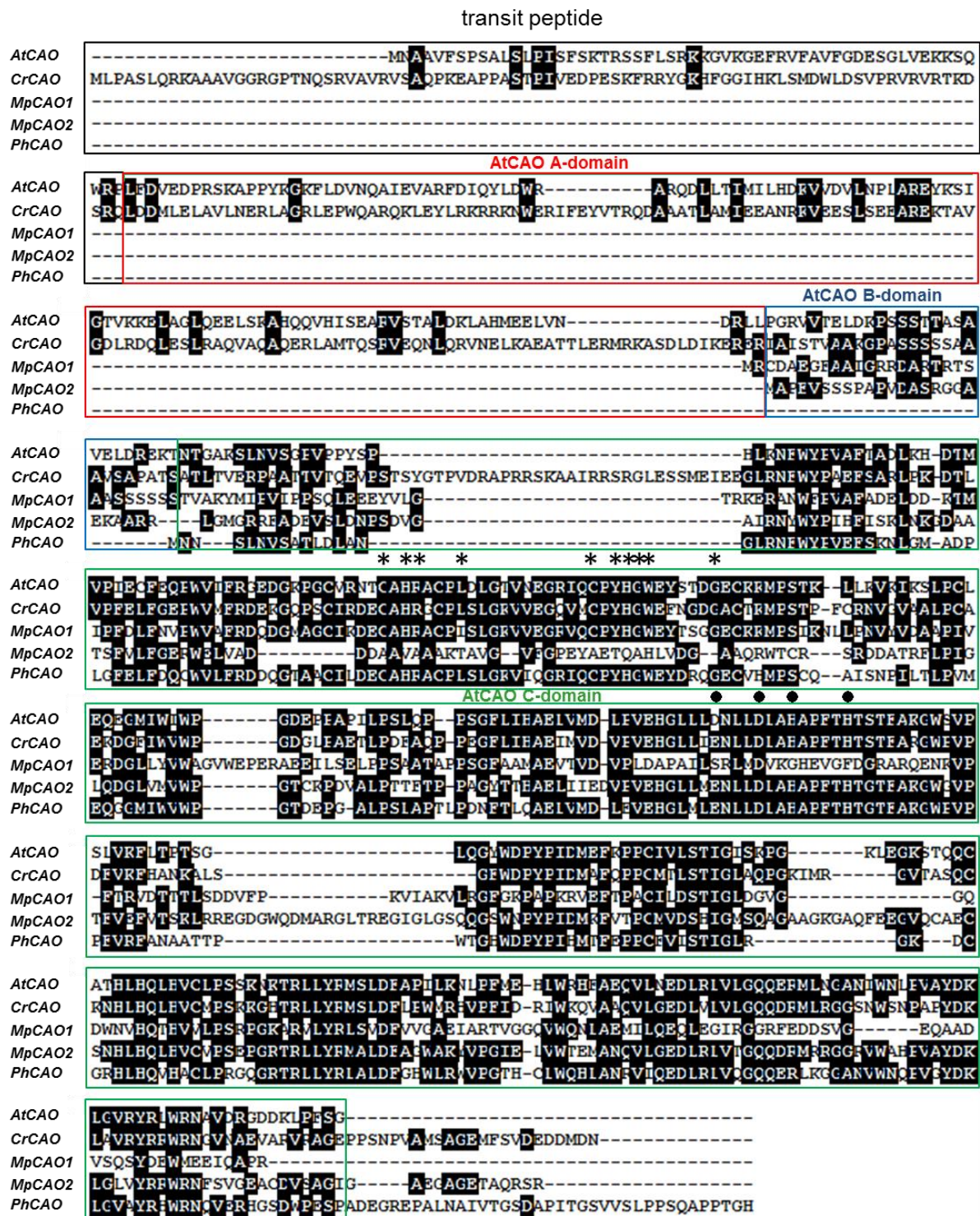


Fig. 10. Multiple amino acid sequence alignment of CAO proteins.

Identical residues are shown in white type on a black background. The AtCAO sequences corresponding to the A domain, B domain, and C domain are shown. Asterisks and closed circles show binding sites of Rieske center and mononuclear iron-binding motif, respectively.

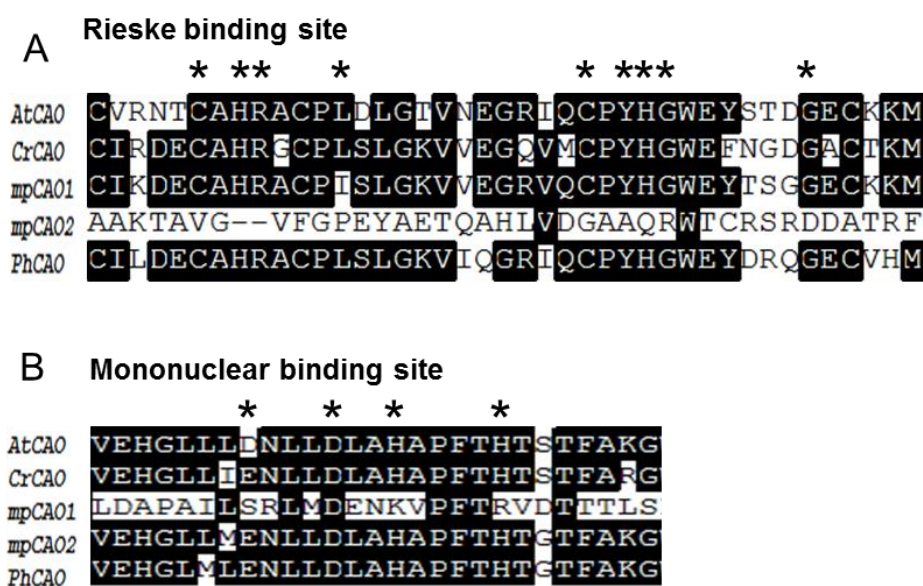


Fig. 11. Comparison of the domain structure of the CAO protein among photosynthetic organisms.
A, comparison of amino acid sequences of the Rieske center in CAO proteins. B, comparison of amino acid sequences of the mononuclear iron-binding motif in CAO proteins. In both panels, identical residues are shown in white type on a black background.

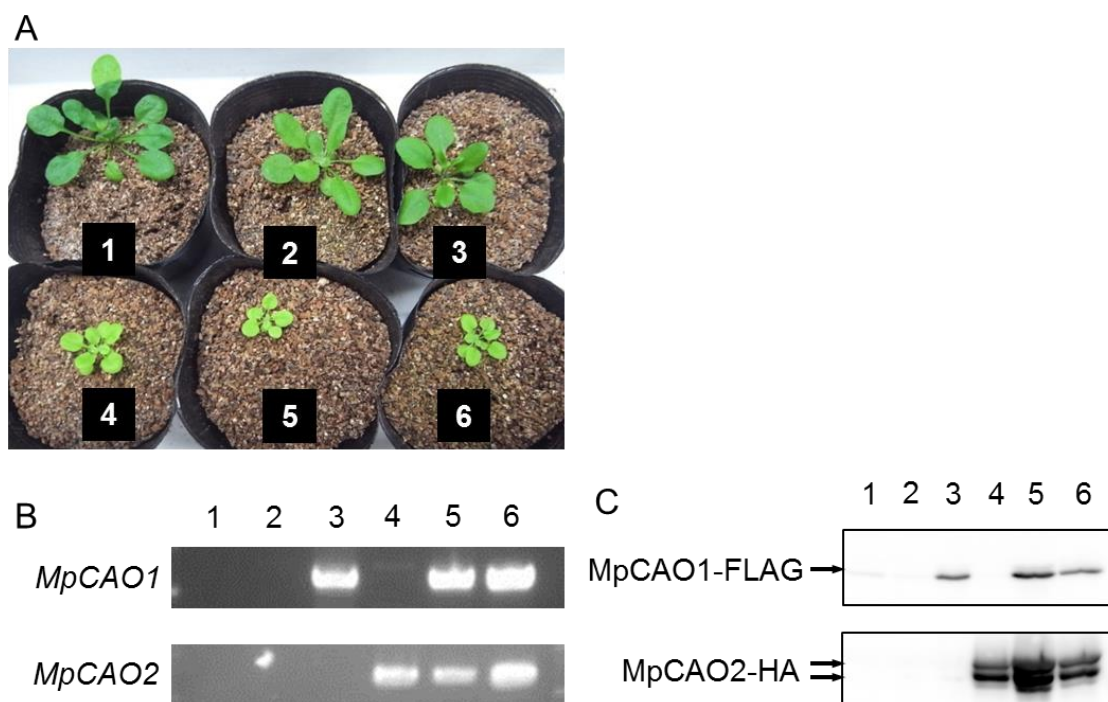


Fig. 12. Generation of *MpCAO* overexpression of *Arabidopsis* lines.

A, phenotypes of wild-type and transgenic lines. 1, wild type; 2, *MpCAO1*+*MpCAO2*-1; 3, *MpCAO1*+*MpCAO2*-2; 4, *ch1-1*; 5, *MpCAO1*; and 6, *MpCAO2*. B, confirmation of transgenic lines by PCR. C, confirmation of transgenic lines by immunoblot analysis. The *MpCAO1*-FLAG and *MpCAO2*-HA proteins were detected using anti-FLAG or anti-HA antibodies, respectively. Lane 1, wild type; lane 2, *ch1-1*; lane 3, *MpCAO1*; lane 4, *MpCAO2*; lane 5, *MpCAO1*+*MpCAO2*-1; lane 6, *MpCAO1*+*MpCAO2*-2.

Table 29. Chlorophyll content of wild-type and transgenic Arabidopsis plants.

Sample	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Total Chl	Chl <i>a/b</i>
	(μg/gFW)			
WT	1053.1±47.8	347.8±14.9	1400.9±62.1	3.03±0.04
<i>chl1-1</i>	760.6±67.6	ND	760.6±67.6	ND
<i>MpCAO1</i>	671.4±16.4	ND	671.4±16.4	ND
<i>MpCAO2</i>	650.1±37.8	ND	650.1±37.8	ND
<i>MpCAO1+MpCAO2-1</i>	737.9±68.9	445.5±30.5	1182.5±68.9	1.65±0.03
<i>MpCAO1+MpCAO2-2</i>	747.6±69.9	490.0±31.0	1237.6±69.9	1.53±0.09

The value given is the mean S.D. of three experiments. ND stands for not detected; FW is flesh weight.

4.1.1.2 CAO の構造

CAO はクロロフィル *b* 合成を行うために, Cドメイン内の Rieske センターから mononuclear iron へと電子伝達を行っていることが知られている. そのため *MpCAO* はこの電子伝達を効率的に行うために, *MpCAO1* と *MpCAO2* とで複合体を形成していると考えられる. そこで, *MpCAO1* と *MpCAO2* が複合体を形成していることを証明するために, *MpCAO1+MpCAO2* 遺伝子導入株からチラコイド膜を単離し, 単離したチラコイド膜を用いて, 抗 FLAG 抗体と抗 HA 抗体で共免疫沈降法を行った. その結果を Fig. 13 に示した. 結果より, *MpCAO*-HA タンパク質は抗 FLAG 抗体で共沈降することがわかった. また Fig. 13 より, *MpCAO*-FLAG タンパク質が抗 HA 抗体で共沈降していることもわかった. これらの結果より, *MpCAO1* と *MpCAO2* が複合体を形成していることがわかった.

次に, 1 次元目で BN-PAGE, 2 次元目で SDS-PAGE を行った後, イムノブロット解析を用いて *MpCAO1* と *MpCAO2* がヘテロ 2 量体を形成しているのかどうかの解析を行った. 先程と同様に *MpCAO1+MpCAO2* 遺伝子導入株から単離したチラコイド膜を用いて, BN-PAGE に続いて SDS-PAGE を行い, その後, 抗 FLAG 抗体と抗 HA 抗体を用いたイムノブロット解析を行った. その結果を Fig. 14A に示した. Fig. 14A より, ~40 kDa 付近に *MpCAO1* タンパク質と *MpCAO2* タンパク質の単量体と推定されるバンドが検出された. またそのバンドに加えて, 抗 FLAG 抗体と抗 HA 抗体の両方で 80 kDa 付近にバンドが検出され, このバンドが *MpCAO1* と *MpCAO2* のヘテロ 2 量体に相当するバンドであると考えられる. さらに, 80 kDa 以上 (ヘテロ 2

量体以上)の大きさのバンドも両方の抗体から検出された。

続いてシロイヌナズナ CAO (*AtCAO*) の構造についても調べた。しかし、これまでの当研究室の研究から、イムノブロット解析では全長 *AtCAO* のタンパク質は検出されていないため (Yamasato *et al.*, 2005), *AtCAO* の BC ドメインに FLAG tag を融合させた CAO を *ch1-1* 変異株内で高発現させた遺伝子導入株 (*BCFLAG*) を作成し、解析に用いた。 *MpCAO1+MpCAO2* 遺伝子導入株の時と同様に、 *BCFLAG* 遺伝子導入株からチラコイド膜を単離し、BN/SDS-PAGE 後にイムノブロット解析を行い、結果を Fig. 14B に示した。 Fig. 14B より、抗 CAO 抗体、抗 FLAG 抗体、どちらの抗体でイムノブロット解析を行った場合も、同様のバンドパターンが得られた。最も小さいバンドは 50 kDa 付近であり、これは *BCFLAG* タンパク質の単量体だと考えられる (42 kDa)。それに加えて、160, 240-300, 500, 750 kDa 付近からもバンドが検出された。 CAO は Rieske-mononuclear iron oxygenase モチーフを持っている dicamba monooxygenase と 2-oxoquinoline 8-monooxygenase (Fig. 15) と高い相同性を示すことが分かっており、これらの二つの酵素はこれまでの結晶構造解析から、3 量体構造をしていることが分かっている (Martins *et al.*, 2005)。そのため、Fig. 14B の 160 kDa 付近のバンドは *AtCAO* (*BCFLAG*) の 3 量体構造を示していると考えられる。さらに、 *AtCAO* (*BCFLAG*) が 3 量体構造であるとすれば、240-300, 500, 750 kDa 付近のバンドはそれぞれ、3 量体構造が 2 個、3 個、5 個繋がった構造を反映していると考えられる。

さらに *AtCAO* (*BCFLAG*) の結果を全長 *AtCAO* の構造へと飛躍させるために、 *E.coli* 内で全長 *AtCAO* に His tag を融合させたタンパク質を発現させ、発現させたタンパク質を用いて BN/SDS-PAGE を行った後にイムノブロット解析を行った。その結果、変異株と同様に超複合体と 3 量体のバンドが得られた (Fig. 14C)。これより、全長 *AtCAO* は基本的にはホモ 3 量体であるが、そのホモ 3 量体を基本とした超複合体も形成できると考えられる。

最後にクロロフィル *b* を持つシアノバクテリア、 *Prochlorothrix* の CAO (*PhCAO*) の構造についても調べた。なお *PhCAO* は A ドメイン、B ドメインを持っておらず、C ドメインのみを有している CAO であることから、 *AtCAO* と同様の構造をしていることが考えられる。解析には、 *ch1-1* 変異株に *PhCAO* 遺伝子を導入したシロイヌナズナの遺伝子導入株 (*PhCAO*) を用いた。その結果を Fig. 14D に示した。 Fig. 14D より、 *PhCAO* タンパク質は単量体と 3 量体の位置に加えて、170 ~ 1200 kDa 間にも見られ、この間に多くのタンパク質が存在しているように考えられる。

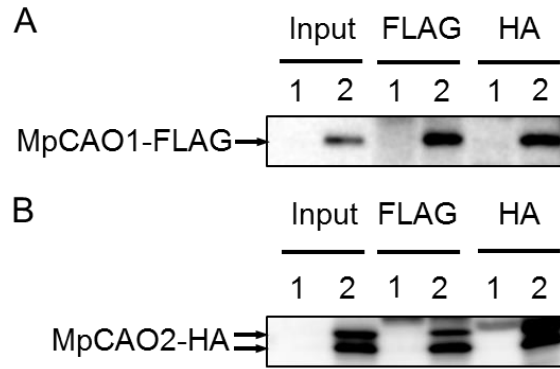


Fig. 13. Co-immunoprecipitation of MpCAO1-FLAG and MpCAO2-HA proteins.

The solubilized thylakoid membrane proteins from wild type or *MpCAO1+MpCAO2* plants were co-immunoprecipitated with the anti-FLAG antibody (FLAG) or anti-HA antibody (HA) and subjected to SDS-PAGE. Detection of MpCAO1-FLAG and MpCAO2-HA proteins was performed by immunoblot analysis with anti-FLAG antibody (A) or anti-HA antibody (B), respectively. Lane 1, wild type; lane 2, *MpCAO1+MpCAO2*.

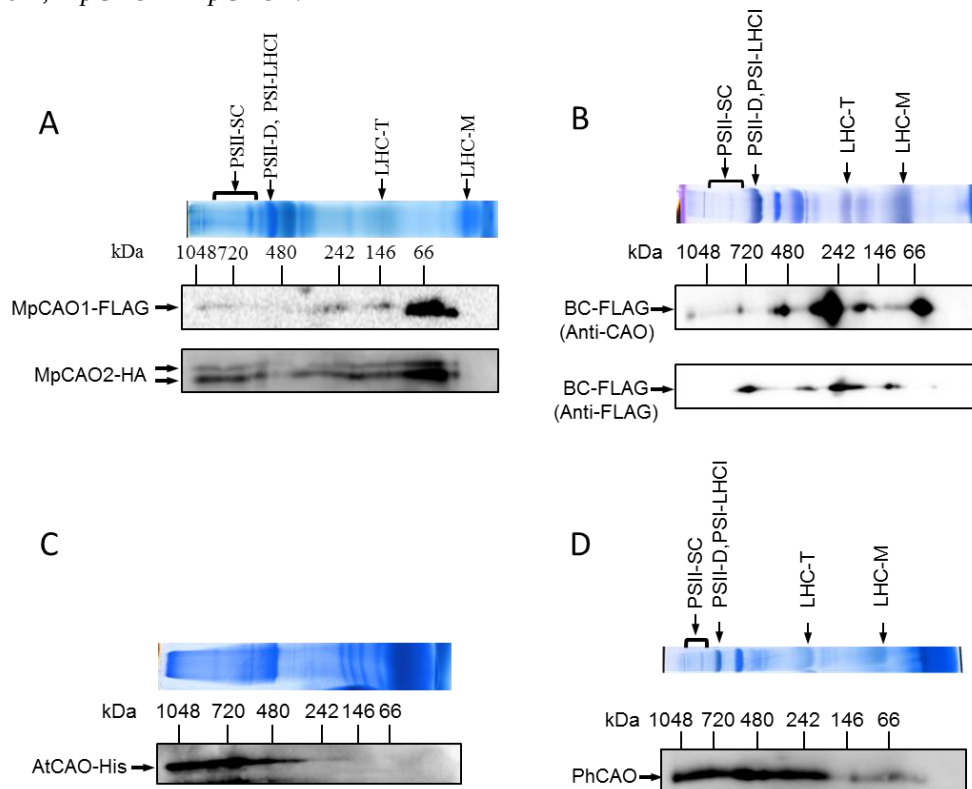


Fig. 14. Analysis of the oligomeric states of the CAO proteins.

A, two dimensional BN/SDS-PAGE followed by immunoblotting indicated that MpCAO1 and MpCAO2 proteins accumulated in monomeric, heterodimeric (86 kDa), and higher molecular weight forms in *MpCAO1+MpCAO2* plant. B, two-dimensional BN/SDS-PAGE followed by immunoblotting indicated that BCFLAG proteins accumulated in monomeric (43 kDa), trimeric (126 kDa), and higher molecular weight forms in the BCFLAG overexpression plants. The BCFLAG proteins were detected using an anti-FLAG antibody or anti-CAO antibody. C, two-dimensional BN/SDS-PAGE followed by immunoblotting indicated that recombinant AtCAO protein formed higher molecular weight protein complexes in *E. coli*. The AtCAO proteins were detected using an anti- His antibody. D, two-dimensional BN/SDS-PAGE followed by immunoblotting indicated that PhCAO formed monomeric (41 kDa), trimeric (123 kDa), and higher molecular weight complexes. The PhCAO proteins were detected using an anti-CAO antibody.

```

AtCAO  MNAAVFSPSALSLSLPIFSKTRSSFLSRKKGVKGEFRVFAVFGDESGLVEKKSQWRPLFDVEDPRSKAPPY
ddmC   -----
oxoO   -----

AtCAO  KGKFLDVNQAEIVARFDIQYLDWRARQDLLTIMILHDKVVDVLNPLAREYKSIGTVKKELAGLQEELSKA
ddmC   -----
oxoO   -----

AtCAO  HQQVHISEARVSTALDKLAHMEELVNDRLLPGRVVTEIDKPSSTTASAVELDREKINTGAKSLNVSGPV
ddmC   -----
oxoO   -----MSDQPIIRRRQVKTGISDARANN-AKTQSQYQBY

AtCAO  PPYSPHLKNEWYPVAFTALLKHDIMVHIECFEQPMVIFRGEDGKPGCVRNTCAHRACPLDIG--TVNEGR
ddmC   ---MTFVRNAPWYVAALPEELSEKPLG-RTILDTPALALYRQPDGVVPAALIDICEHRFAPLSEG--ILVNGH
oxoO   KDAAWGFINHWYPALFTELEEDQVQGIQICGVPIVLR--VNGKVFALKDQCLHRGVRLSEKPTCFTKST
      * * * * *
AtCAO  IQCPYHGMEYSTD-GECKKMPS---TKLLKVK-IKSLPCLEQEGMIWIWPGDE-EPAPIIP-----
ddmC   LQCPYHGLEFDGG-GQCVHNPHGNGARPASLN-VRSEFPVVERDALIWIWPGD---PALADP-----
oxoO   ISCWYHGFTFDLETGKIVTIVANPEDKLIGTTGVTTYPVHEVNGMIFVVRREDDEPDDEDVPLAHDLPFR
      * * * * *
AtCAO  -----SLQPSGFLIHAEIVMD-----LPVEHGLLLDNLIDLAHAPFTHTS-----
ddmC   -----GAIPDEGCRVDPAYRTVGGYGHVDCNYKLLVDNLMDLGHAQYVHRANAQTDADFRLEREV
oxoO   FPERSEQFPHELPSSPSVLDNNAVHGMHRTGFGNWRACENGFDNAHILVHKDNTIVHAMDWVLPGL

AtCAO  -----TFAGWSVPSLVKFLTPTSGLQGYWDPYPIDMEFKPPCIVLSTIGISKPGKLEGK-STQ
ddmC   IVGDGEICALMKIPGTPSVLMAKFLRGANTPVDAWN---DIRWNKVSAMLNFIAPVAPBG-----TPK
oxoO   LPTSDDCIAVVEDDDEGPKGMMQWLETDKWAPVLENQE---LGLKVEGLKGRHYRTSVVLPGLMVENWPE

AtCAO  QCATHLHQLHVCIPSSKNKTRILMRMSLLFAPILKNLPFMEHLWRHFAEQVLNEDLRIVLGQGER---ML
ddmC   EQSIHSRGTHIILTPETEASCHYFFGSSRNFG---IDDPMDGVLRSWQAQALVKEDKVYVEATERRRAYV
oxoO   EHVVQYEWYVPITDDTHEYWEILVRVCPTDEDKRFQYRYDHMYKPLCLHGFNDSLYAREAMQN--FYV

AtCAO  NGANIWN-----IPVAYDKLVRYRLWRNAVDRGDDKLPFSG-----
ddmC   EANGIRP-----AMLSDEAVRVRSREIEKLEQLAA-----
oxoO   DGTGWDDEQLVATDISPITWRKLASRWNRCSIAKPGRGVAGAVKDTSLIFKQTADGKRPGYKVEQIKEDH

```

Fig. 15. Multiple sequence alignment of AtCAO, dicamba monooxygenases (*ddmC*), and 2-oxoquinoline 8- monooxygenase (*oxoO*) proteins.

Identical residues are shown in white type on a black background. Red asterisks and red circles show binding sites of Rieske center and mononuclear iron-binding motif, respectively.

4.1.1.3 *Micromonas* と *MpCAO1+MpCAO2* 遺伝子導入株のクロロフィルタンパク質複合体の色素組成

緑色植物では、クロロフィル *b* は周辺アンテナである LHCII と LHCI のみに局在していると考えられている。しかし、シロイヌナズナに A ドメインを欠損させて CAO を導入したシロイヌナズナでは、クロロフィル *b* が周辺アンテナ複合体だけでなく、PSI, PSII 内にあるインナーアンテナ複合体にも局在していることがわかっている (Sakuraba *et al.*, 2010)。これより、CAO の構造と光化学系におけるクロロフィル *b* の局在には相関関係があると考えられる。そのため、特徴的な構造の CAO を持つ *Micromonas* の光化学系も、これまでに知られている光化学系とは異なっていると考えられる。そこで Native-green gel を用いて、光化学系の解析を行った。その結果を Fig. 16A に示した。Fig. 16A より、6 個の緑色のバンドが得られた。1 と 4 のバンドは、光化学系内の PSI と PSII のインナーアンテナ複合体のバンドであり、3 と 5 は周辺アンテナである LHCII の 3 量体と単量体のバンドである。単量体の量が非常に少ないのは、3 量体がより安定的な構造であるためだと考えられる。*Micromonas* の Native green gel の結果は、PSI のインナーアンテナ複合体と LHCII の 3 量体の間にある LHCII のバンドを除いては、シロイヌナズナや他の緑色植物と非常に似ていた。またバンド 6 は、各クロロフィル複合体から外れた光合成色素が集積したものであると考えられる。次に、このバンドを切り出して色素を抽出し、HPLC によって解析を行った。その結果を Table 30 に示した。まず、LHCII の 3 量体と、単量体のクロロフィル *a/b* 比は、それぞれ 0.98 と 1.38 であり、この結果は高等植物の結果と一致した。さらに LHCII からは、*Micromonas* に特徴的な色素である, Divinyl-proto-chlorophyllide *a* (DVP) や prasinoxanthin も確認できた。しかし PSI や PSII のインナーアンテナ複合体からは、これらの色素は確認できなかった。それに対して、 β -carotene は PSI と PSII のインナーアンテナ複合体のみから確認できた。PSI のインナーアンテナ複合体と PSII のインナーアンテナ複合体のクロロフィル *a/b* 比は、それぞれ 3.22 と 5.73 であり、これらのクロロフィル *a/b* 比は高等植物と比べると、非常に低い値であった。このことから *Micromonas* は、インナーアンテナ複合体にも多くのクロロフィル *b* を組み込んでいることがわかった。これは、CAO の構造が高等植物とは異なっていることが原因であると考えられる。そこで *Micromonas* のインナーアンテナ複合体にクロロフィル *b* が局在していることが、*MpCAO* によって起こっていることを確かめるために、*MpCAO* を導入したシロイヌナズナ (*MpCAO1+MpCAO2* 遺伝子導入株) でも同様の解析を行った。その結果を Fig. 16B と Table 31 に示した。Table 31 よりシロイヌナズナ野生株の PSI と PSII のインナーアンテナ複合体のクロロフィル *a/b* 比は、それぞれ 21.35 と 13.09 であった。この結果より野生株のインナーアン

テナ複合体内の 95%以上はクロロフィル *a* であり、クロロフィル *b* はわずかであった。それに対して *MpCAO1+MpCAO2* 遺伝子導入株の PSI と PSII のインナーアンテナ複合体のクロロフィル *a/b* 比は、それぞれ 3.43 と 3.50 であった。この結果は、*AtCAO* を *MpCAO* に置き換えることによって、PSI と PSII のインナーアンテナ複合体にも多くのクロロフィル *b* が組み込まれるようになったことを示しており、ひいては光化学系の構造と CAO の構造に相関関係があることを示唆している。

Fig. 16A, B の PSI (heterodimer PsaA/PsaB) には、PSI のインナーアンテナ複合体のみが含まれているといわれているが (Anderson *et al*, 1980), PSI バンドの近くには PSI -LHCI のバンドがあり、PSI バンドに LHC が混ざっている可能性がある。そこで、LHC を含まない PSI を精製するために、チラコイド膜を 0.5% LDS で可溶化し、4 °C で 4 時間かけて SDS-PAGE を行った。その結果を Fig. 16C, D に示した。Fig. 16C, D より、LHC と PSI を完全に分離することができ、さらに、PSI -LHCI のバンドを消失させることができた。また、2 次元電気泳動を行った後に銀染色を行ったことで、PSI バンドが LHC を含んでいないことも確認できた。その結果、野生株の PSI バンドのクロロフィル *a/b* 比は 19.30 であり、以前に述べられた結果と一致した (Satoh *et al*, 2001)。一方 *MpCAO1+MpCAO2* 遺伝子導入株の PSI バンドは 4.46 であり、PSI インナーアンテナ複合体に多くのクロロフィル *b* が組み込まれていることがわかった。このことは、A ドメインを欠損させた *AtCAO* を持つシロイヌナズナでも起こっており (Sakuraba *et al*, 2010)、A ドメインの有無がインナーアンテナ複合体へのクロロフィル *b* の組み込みを制御しているものと考えられる。最後に、野生株と *MpCAO1+MpCAO2* 遺伝子導入株における LHCII と PSI (PsaA/B) と PSII (CP47) のタンパク質量の比較を、イムノブロット解析を用いて行った。その結果を Fig. 16E に示した。Fig. 16E より、*MpCAO1+MpCAO2* 遺伝子導入株では野生株と比較して、LHCII の量が多少増加し、PSI の量が僅かに減少していた。この結果は、クロロフィル *b* が LHCII の量を制御しているという考え方と一致しているといえる。

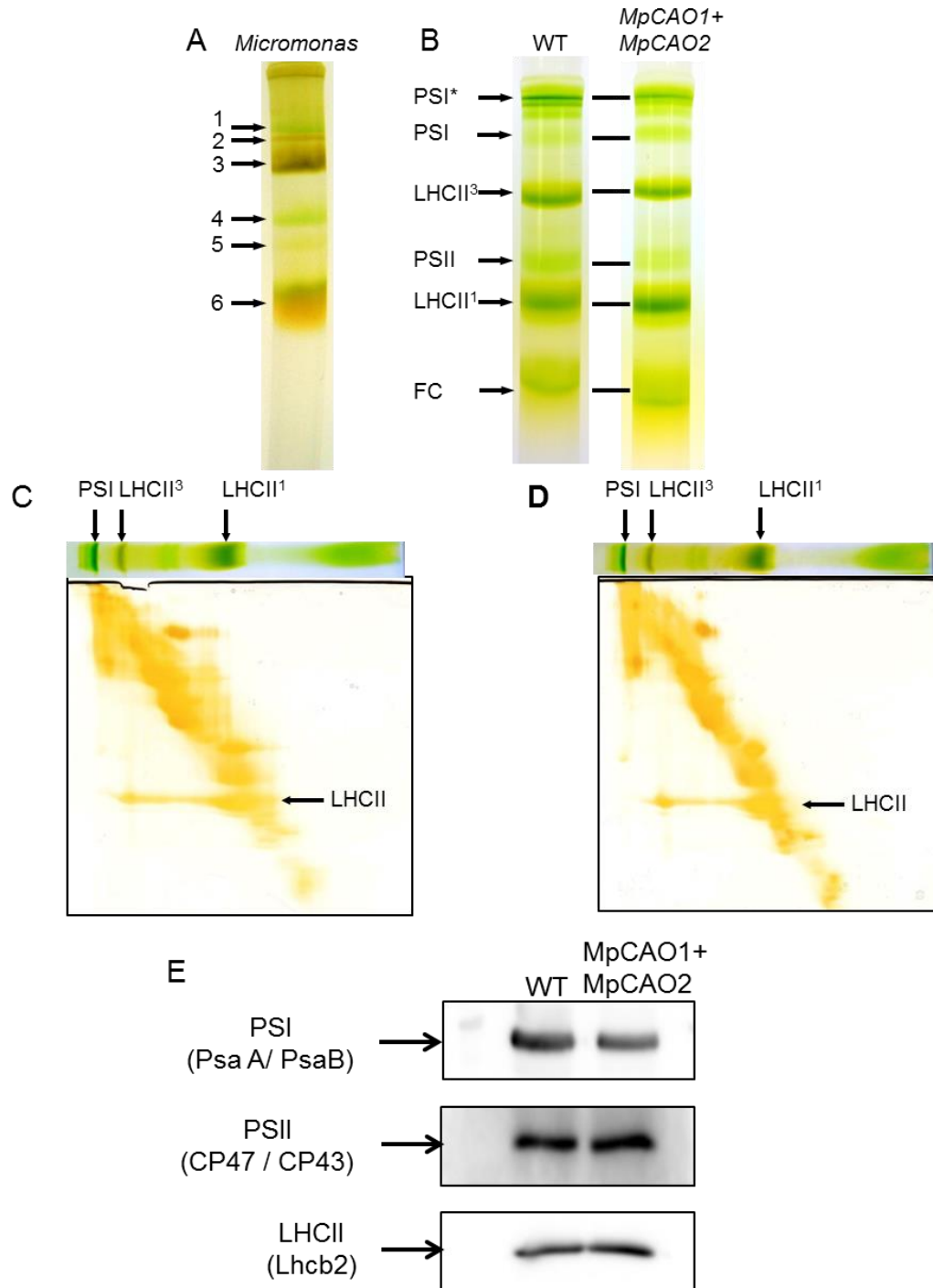


Fig. 16. Separation of chlorophyll-protein complexes.

Thylakoid membranes of *M. pusilla* (A), *A. thaliana* (WT) (B, C, and E), and *MpCAO1+MpCAO2* plants (B, D, and E) were prepared. Chlorophyll-protein complexes of those plants were separated by native green gel electrophoresis (A and B). The identity of the chlorophyll-protein complexes corresponding to the bands are presented on the *left side* of the gel. *PSI**, *PSI* (PsaA/B)-LHCI complexes; *PSII*, core complexes of *PSII* (CP43/CP47); *LHCII*¹ and *LHCII*³, monomeric and trimeric *LHCII*, respectively; *FC*, free Chl. In addition, chlorophyll-protein complexes of WT and *MpCAO1+MpCAO2* plants were also analyzed by two-dimensional SDS/PAGE, followed by silver staining (C and D). The amounts of PsaA/B, CP47, and Lhcb2 proteins were estimated by SDS-PAGE, followed by immunoblot analysis with their specific antibodies (E).

Table 30. Chlorophyll *a/b* ratios and other pigments of chlorophyll-protein complexes in *Micromonas*.

Band Number	Chl <i>a/b</i>	β -car [*] /Chl <i>a</i>	DVP [*] /Chl <i>a</i>	Pra [*] /Chl <i>a</i>
1	3.22	0.26	ND	ND
2	1.03	0.03	0.61	0.91
3	0.98	0.01	0.69	0.77
4	5.73	0.48	ND	ND
5	1.38	0.22	ND	2.17
6	1.66	0.48	ND	4.73

Chlorophyll-protein complexes were separated by native green gel electrophoresis and were extracted from the gel. Their chlorophyll *a/b* ratios and other pigments were determined by HPLC analysis. The band numbers correspond to Fig. 16. Chl, Chlorophyll; β -car, β -carotene; DVP^{*}, 8-vinyl-protochlorophyllide; Pra^{*}, Prasinoxanthin; ND, not detected.

Table 31. Chlorophyll *a/b* ratios of chlorophyll-protein complexes in WT and MpCAO1+MpCAO2 plants.

Chl-protein complexes	Wild type	<i>MpCAO1</i> + <i>MpCAO2</i>
PSI-LHCI complexes (PSI [*])	8.75	3.25
PSI	21.35	3.43
Trimeric LHCII (LHCII ³)	1.49	0.90
Core complexes of PSII (PSII)	13.09	3.50
Monomeric LHCII (LHCII ¹)	1.57	0.86
Free Chls (FC)	1.82	0.79

Chlorophyll-protein complexes were separated by native green gel electrophoresis and were extracted from the gel. PSI is a heterodimer of PsaA/PsaB. Their chlorophyll *a/b* ratios were determined by HPLC analysis. Chl, chlorophyll.

4.1.2 考察

4.1.2.1 CAO の多量体構造について

Dicamba monooxygenase と 2-oxoquinoline 8-monooxygenase は, Rieske-mononuclear iron oxygenase であり (Martins *et al.*, 2005), これらの酵素の結晶構造は, 環状型の対称性のある 3 量体構造である. これらの酵素はその 3 量体構造において, 隣り合っている Rieske center と mononuclear iron のサブユニット間で電子伝達を行い, そこで触媒反応を行っていると考えられる. CAO も Rieske-mononuclear iron oxygenase であり, アミノ酸配列もこれらの酵素と似ていることから, CAO も同様の多量体構造をしており, さらに同様の電子伝達鎖を持っていると考えられる. これは AtCAO と PhCAO の BN-PAGE の結果からも示唆されており, AtCAO タンパク質, PhCAO タンパク質共に 3 量体構造を形成していた (Fig. 14). さらに興味深いことにシロイヌナズナ内の CAO は, 3 量体以上の多量体構造も形成をしていた (Fig. 14). *E.coli* 内でリコンビナント AtCAO タンパク質を生成させ, BN-PAGE を行った場合も, AtCAO, PhCAO タンパク質と同様の結果となった. しかし AtCAO タンパク質も PhCAO タンパク質も, BN-PAGE の結果より PSII や LHCII とは結合していなかった. このことから AtCAO タンパク質も PhCAO タンパク質も, CAO タンパク質自身で 3 量体構造を形成しており, さらにこの 3 量体を基本構造として, 多量体構造を形成していることがわかった. CAO はクロロフィル合成の最後を触媒する酵素であることが分かっているため, CAO は LHC の形成に関与していると考えられる. しかし, クロロフィル *b* 生合成の最後の段階であるフィチル化やホルミル化がどこで行われているのかはいまだ明らかになっていない (Tanaka *et al.*, 2011). また LHC は, 形成時に多くのクロロフィル *b* を必要とするため, 多くのクロロフィル *b* を効果的に LHC に供給するには, 一度に多くのクロロフィル *b* を合成することが必要であり, そのために CAO はより大きな複合体を形成していると考えられる. 若しくは, CAO の触媒機能を有しているのは 3 量体構造の CAO のみであり, 多量体構造は機能していない可能性もある. しかし, 生化学において大きな複合体の機能は明らかになっていないことが多く, 多量体構造についても今後研究を進めていく必要があると考えられる.

4.1.2.2 *Micromonas* CAO の構造について

Micromonas の CAO は二つのタンパク質からできており, 片方は Rieske binding モチーフを (MpCAO1), もう片方は mononuclear iron binding モチーフを持っている (MpCAO2). これらのタンパク質は, 片方だけではクロロフィル *b* を合成することはできないが, 両方の CAO が同時に存在することで, クロロフィル *b* 合成を行うことができる. また, 共免疫沈降や BN-PAGE 後に

イムノブロット解析を行ったことから, MpCAO1 と MpCAO2 同士がヘテロ 2 量体を形成していることが分かった. これまでの研究より, Rieske-mononuclear iron oxygenase は, ホモ 3 量体を形成していることは知られていたが (D'Ordine *et al.*, 2009; Jakoncic *et al.*, 2007; Ferraro *et al.*, 2005), *Micromonas* CAO のように Rieske-mononuclear iron oxygenase でヘテロ 2 量体を形成していたのは初めての報告であった. またこれまでの研究から, Rieske-mononuclear iron oxygenase (Fig. 15) は隣り合うサブユニット間で電子伝達を行っていることも知られている (Martins *et al.*, 2005). そのため 3 量体構造の CAO においては, Rieske がフェレドキシンによって還元され, 隣り合うサブユニットである mononuclear iron に電子を伝達する. この時に CAO は, クロロフィル *a* をクロロフィル *b* に変換していると考えられる. これと同様に *Micromonas* CAO も, MpCAO1 の Rieske がフェレドキシンによって還元され, MpCAO2 の mononuclear iron に電子を伝達した際に, クロロフィル *b* の合成を行っていると考えられる.

4.1.2.3 *Micromonas* CAO の 2 量体構造について

本研究より *Arabidopsis* の CAO は, A ドメインを持たない AtCAO やリコンビナント AtCAO タンパク質の 2 次元 BN/SDSPAGE による構造解析の結果から, 基本構造としてホモ 3 量体構造を形成していることが考えられる. それに対して MpCAO タンパク質は, 同様の実験からヘテロ 2 量体を形成していることが分かった. しかし本研究では, *Micromonas* の CAO が進化の過程で分割された原因を明らかにするには至らなかった. 古生代の頃, 多くの緑藻類は海水中に生息していたと考えられているが, 中生代の頃になると海水中の主な生息者は緑藻類から珪藻類や紅藻類に代わり, 緑藻類は海水中から沿岸域や淡水域, 陸上へと生息域を代えていったと考えられている. この現象の主な原因としては, 海水中の金属栄養素の組成が挙げられている. 古生代の頃の地球は低酸素状態であり, 海水中は鉄や亜鉛, 銅などの金属栄養素類を多く含んでいた. しかし中生代の頃になると, 地球環境の変化に伴い海水中はマンガンやコバルト, カドミウム類を多く含むようになり, 鉄イオン等の濃度は減少していった (Falkowski *et al.*, 2004; Quigg *et al.*, 2003). この海水中の金属栄養素類の組成変化, 特に鉄イオン濃度の減少が緑藻類の海水中での衰退の原因でないかと考えられている. つまり緑藻類は, 成長に際して珪藻類や紅藻類よりも多くの鉄イオンを必要とすると考えられる (Quigg *et al.*, 2003). このことは, 例えば緑藻類と珪藻類の PSI と PSII の量比からも示唆できる. 一般的に, PSI は多くの鉄イオンを含んでいることが知られている. そのため, PSII に比べて PSI を多く持つことによって, 成長時により多くの鉄イオンが必要となる (Cardol *et al.*, 2008). 実際, 淡水域に生息する緑藻

類や陸上植物のシロイヌナズナの PSI/PSII 比は約 2.0 であるが (Ballottari *et al.*, 2007; Bonente *et al.*, 2012), 海水中に生息する珪藻類では 0.5 以下となることが知られている (Strzepek *et al.*, 2003). また海産性緑藻である Mamiellales の *Ostreococcus* は, 鉄イオン濃度が比較的高い沿岸域に生息する種では PSI/PSII 比 1.4 程度であるが, 鉄イオン濃度の低い沖合に生息する種では 0.5 程度となことも知られている (Cardol *et al.*, 2008). そのため沖合に生息する緑藻である *Micromonas* も, 鉄イオンをできるだけ消費しない CAO を作りだしたのではないかと考えられる。

次に MpCAO の活性についても考えてみる. MpCAO タンパク質の活性の強さは, 本研究では明らかにできていない. しかし, MpCAO を AtCAO 内で高発現させた際に (MpCAO1+MpCAO2 遺伝子導入), 全クロロフィル量が野生型よりも少し減少していたことから, MpCAO タンパク質のクロロフィル *b* 合成能が, AtCAO タンパク質のクロロフィル *b* 合成能よりも劣っていることが考えられる. 陸上植物は種子の段階では, ほとんどクロロフィルを含んでおらず (Nakajima, *et al.*, 2012), その後の成長過程でクロロフィル合成を行う. 特に緑化時には, 非常に多くのクロロフィルを合成すると考えられている (Gassman, *et al.*, 1967). そのため, 陸上植物の CAO も非常に強いクロロフィル *b* 合成能を保持していることが考えられる. しかし藻類は, 成長過程において細胞分裂を繰り返して増殖するため (Goodenough, *et al.*, 1992), 常に一定量のクロロフィルを保持した状態で成長していることが考えられる. そのため, 陸上植物と比べて合成すべきクロロフィルの量も少ないことが考えられ, 緑藻の CAO は陸上植物の CAO ほどのクロロフィル *b* 合成能が必要ないと考えられる. そのため, CAO の活性部位を減少させることが可能であったと考えられる.

以上のことより, *Micromonas* は鉄イオンをできるだけ消費せず, かつ, 必要以上のクロロフィル *b* 合成能を有しない CAO を形成するために, CAO の構造をホモ 3 量体からヘテロ 2 量体に変化させたと考えられる.

4.1.2.4 CAO と集光装置の進化について

クロロフィル代謝は, クロロフィル結合タンパク質の合成や分解に密接に関与している. LHC とクロロフィル代謝酵素間の直接的な相互作用は, クロロフィルサイクル内でクロロフィル *b* を 7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* に変換するクロロフィル *b* 還元酵素で報告されている (Kusaba *et al.*, 2007). このクロロフィル *b* 還元酵素は, LHCII 分解の 1 段階目である LHC 内のクロロフィル *b* の還元を直接的に触媒していると考えられている (Shimoda *et al.*, 2012). その理由とし

ては、クロロフィル *b* 還元酵素を持たないシロイヌナズナでは、LHC が分解されないことが報告されているからである (Horie *et al.*, 2009). 興味深いことに、*chl1-1* 変異株に A ドメインを持たない CAO を導入すると、LHC と PSI, PSII のインナーアンテナ複合体の両方にクロロフィル *b* を組み込み、自然界では見られないような集光装置を構築することが分かっている (Hirashima *et al.*, 2006; Sakuraba *et al.*, 2010). これらのことより、CAO の進化と集光装置の進化には密接な関係があることが示唆される. CAO の進化と集光装置の進化の関係をまとめた図を Fig. 17 に示した. Prochlorophyta の CAO は、A, B ドメインにあたる配列を持たず、触媒ドメイン (C ドメイン) のみを持っている. これらの生物は、クロロフィル *b* を LHC ではなく、Pcb に持っており (van der Staay *et al.*, 1998), Pcb は LHC よりも PSII のインナーアンテナ複合体 (CP47/CP43) に配列が似ていることが分かっている. また、*Prochlorothrix* の CAO は、高等植物の CAO と非常に相同性の高い C ドメインを有しているが、*Prochlorococcus* の CAO は似ていないことも分かっている (Satoh *et al.*, 2006). さらに *Prochlorococcus* は、他の酸素発生型光合成生物と異なっており、唯一ジビニルクロロフィルを用いていることから、CAO の配列は用いているクロロフィルによって異なっているとも考えられる. 真核生物になると、光合成生物は 3 つの膜ヘリックスを持つ LHC を獲得し、LHC 内に多くのクロロフィル *b* を組み込んだ. この時 CAO は、クロロフィル *b* の量の制御とクロロフィル *b* を LHC に優先的に組み込むために重要な制御ドメイン (A ドメイン) を獲得したと考えられる. このことは、全長の CAO (A,B,C ドメイン) の代わりに、A ドメインを欠損させた CAO を導入した際に、クロロフィル *b* が過剰に蓄積し、かつ、LHC だけでなく PSI, PSII のインナーアンテナ複合体にもクロロフィル *b* を組み込んだことから示唆できる (Hirashima *et al.*, 2006; Sakuraba *et al.*, 2010). CAO の A ドメインは、LHCII を主な集光装置として利用し、かつ、PSI, PSII のインナーアンテナ複合体にクロロフィル *b* を組み込んでいない高等植物や緑藻類では保存されている. しかし、Mamiellales においては、進化の過程で A ドメインを失い、かつ、CAO を二つに分割していた. このような CAO の分割は、3 量体構造の CAO において、隣り合う CAO の Reiske と mononuclear iron 間で電子伝達を行っていることから、進化の過程において可能であったと考えられる.

さらに興味深いことに、*Micromonas* は高等植物や緑藻類と同様にクロロフィル *b* を主な集光色素として用いているにも関わらず、集光装置も大きく変化させていた. *Micromonas* のクロロフィル *a/b* 比は非常に低く、また LHC だけでなく PSI, PSII のインナーアンテナ複合体にもクロロフィル *b* を組み込んでいた. *Micromonas* が持つこのような特徴的な集光装置には、CAO の構造の変化が少なからず関わっていると考えられる. この仮説は、*Micromonas* CAO を

Arabidopsis CAO の代わりにシロイヌナズナに導入した際にその植物のクロロフィル *a/b* 比が低くなり, さらに LHC だけでなく PSI, PSII のインナーアンテナ複合体にもクロロフィル *b* を組み込み, *Micromonas* と同様の集光装置を構築したことから言える.

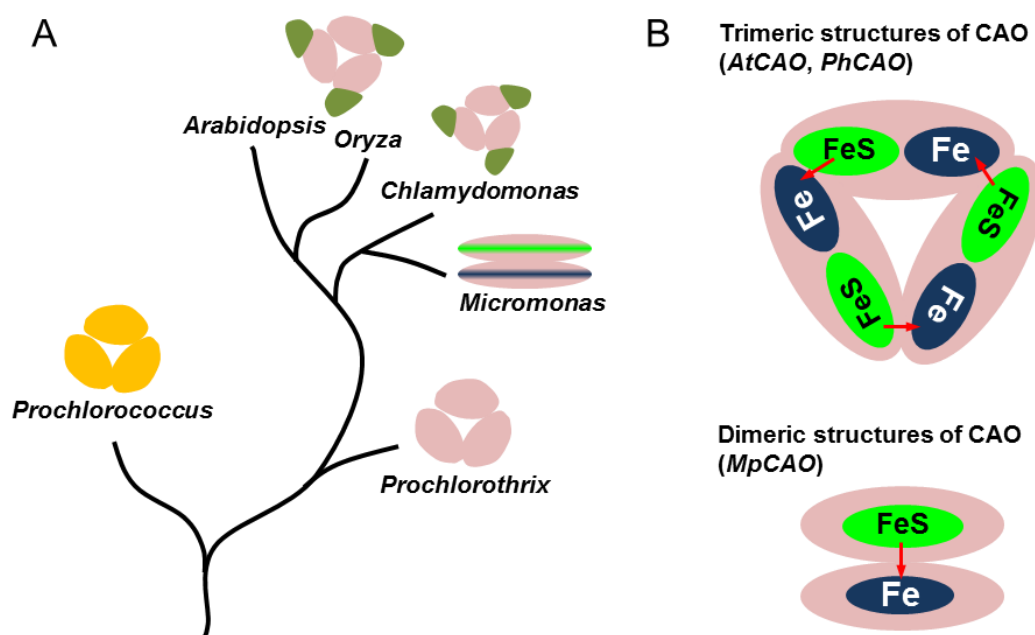


Fig. 17. Evolution of CAO structure.

A, prochlorophyte CAOs have only the C domain (catalytic domain) and form a trimer. CAOs in green algae and land plants have A, B, and C domains and form a trimer. Mamiellales *Micromonas* CAOs are composed of two proteins with either a Rieske (Fe-S)- or mononuclear iron (Fe)-binding motifs. Neither protein has an A or B domain. They interact with each other to form a dimer. B, in each case, electrons must be transferred to a mononuclear iron (Fe) from a Rieske center (Fe-S) across the protein-protein interface.

4.2 緑色植物の進化がもたらす集光装置の変化

4.1 章の結果から, Chlorophyta に属する海産性緑藻の *Micromonas* が Streptophyta に属する高等植物とは異なる光化学系を構築していたことがわかり, Streptophyta と Chlorophyta の光化学系の異なりの一端を垣間見ることができた. また, 光化学系の構造には, CAO の構造が関係していることが示唆された. このことから, 淡水性の Streptophyta と海産性の Chlorophyta の光化学系では, インナーアンテナにおけるクロロフィル *b* の利用様式が異なり, それには CAO の構造が関係しているのではないかという仮説を立てた. そのため本章では, この仮説を実証するために Streptophyta に属する 2 種の緑藻とモデル高等植物のシロイヌナズナ, および Chlorophyta に属する 9 種の緑藻を用いて, 各々の光化学系と CAO の構造の系統解析を行った.

4.2.1 結果

4.2.1.1 本研究で使用した緑色植物の系統関係

近年の研究により, 緑色植物は進化の初期に, Chlorophyta と Streptophyta の二つの系統に分かれたと考えられている. Streptophyta は charophytes と陸上植物から構成され, Chlorophyta は prasinophytes と core chlorophytes から構成されている (Leliaert *et al.*, 2012). 本研究においては, Streptophyta として陸上植物の *Arabidopsis*, charophytes の *Klebsormidium*, *Mesostigma* を用いた (Fig. 18). また Chlorophyta として, prasinophytes の *Nephroselmis*, *Prasinoderma*, *Pseudoscurfieldia*, *Pyramimonas*, *Micromonas*, core chlorophyta の *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Bryopsis* を用いた. さらに Chlorophyta の最も根元, 若しくは, Streptophyta と Chlorophyta の共通祖先と考えられている海産性緑藻の *Palmophyllum* を用いた (Zechman, *et al.*, 2010).

Arabidopsis は高等植物のモデル植物であり, *Klebsormidium* と *Mesostigma* は淡水性緑藻である. *Mesostigma* は緑色植物の進化の初期に分岐したと考えられている. *Klebsormidium* は Streptophyta に属する藻類で初めて全ゲノム解読が行われた緑藻である (Hori, *et al.*, 2014). *Nephroselmis*, *Prasinoderma*, *Pseudoscurfieldia*, *Pyramimonas*, *Micromonas* は, 海産性緑藻である. *Chlamydomonas* と *Chlorella* は海産性と淡水性の両方が存在するが, 本研究では淡水性モデル緑藻の *Chlamydomonas reinhardtii* と *Chlorella variabilis* を用いた. 一方, *Bryopsis* は海産性緑藻である. また *Palmophyllum* のみ, 培養方法が確立されていないため, 自然から採取した細胞を用いた.

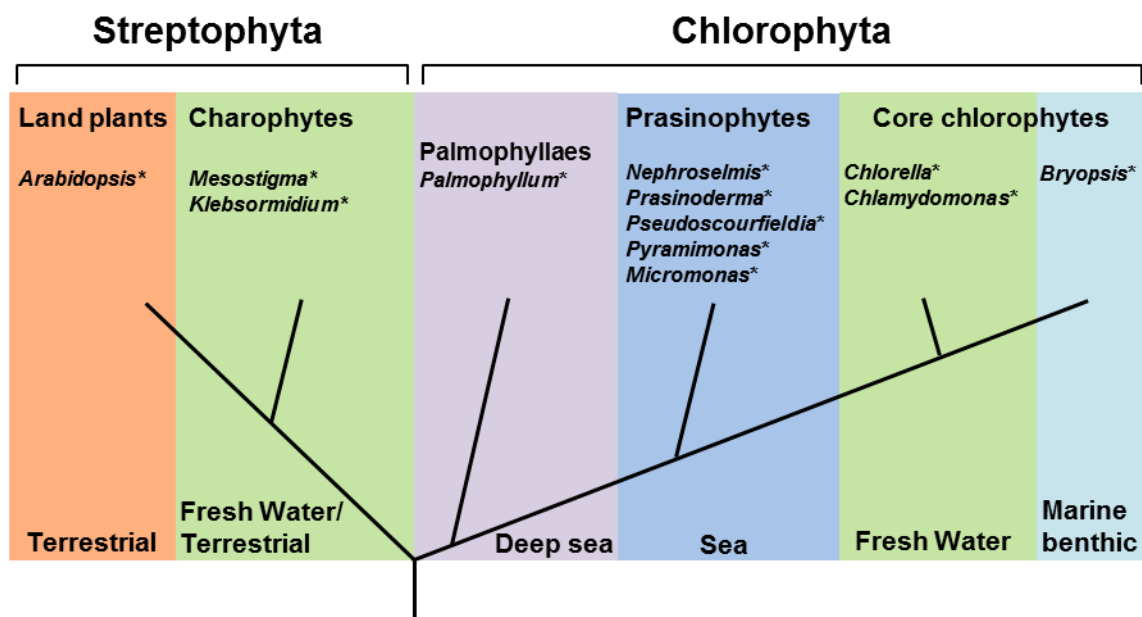


Fig. 18. Overview phylogeny of the green lineage.

This figure was drawn in reference to Leliaert *et al.* 2011. *, used species in this article.

4.2.1.2 色素組成と細胞の吸収スペクトル

本研究で用いた緑色植物の色素組成を調べるために、培養した細胞やフィールドで採取した細胞からアセトンを用いて色素抽出を行った。アセトンで抽出した色素は、HPLC を用いてフォトダイオードアレイによって検出した。クロロフィル *a*、クロロフィル *b*、 α -carotene もしくは β -carotene, violaxanthin は、用いたすべての緑色植物が色素として保持していた (Table 32)。また、lutein もしくは dihydrolutein に関しては、*Bryopsis* を除くすべての緑色植物が色素として用いていた。キサントフィルサイクルによって、violaxanthin から合成される zeaxanthin は、prasinophytes のみが蓄積していた。これは、本研究で培養に用いた光条件では、深い海に生息する prasinophytes の細胞内で Δ pH によってキサントフィルサイクルが駆動してしまったためであると考えられる。さらにこれらの色素に加えて、緑藻独自に分布している prasinoxanthin と siphonaxanthin も蓄積していた。prasinoxanthin は、*Prasinoderma*, *Pseudoscourfieldia*, *Micromonas* の主な色素であったが、残りの prasinophytes の *Nephroselmis* と *Pyramimonas* では蓄積が確認できなかった。また、siphonaxanthin は *Mesostigma*, *Nephroselmis*, *Bryopsis* で主に用いられていたことから、siphonaxanthin は光環境や系統に関わりなく、用いられていることがわかった (Table 32; Latasa, *et al.*, 2004)。

クロロフィル *b* は、本研究で用いたすべての緑色植物がクロロフィル色素として用いていたが、

細胞のクロロフィル *a/b* 比は生物種間で大きく異なった。淡水適応した *Chlamydomonas* と *Chlorella* を除いた Chlorophyta のクロロフィル *a/b* 比は非常に低く、0.6-1.3 の間であった。これは光を効率よく集めるために、非常に多くの量のクロロフィル *b* を用いていると考えられる。特に、Chlorophyta で最も初期に分岐したと考えられている *Palmophyllum* のクロロフィル *a/b* 比は 0.64 を示した。これは Streptophyta ではこれまでに報告されていない程の極端に低い値であった。また、Streptophyta と淡水適応した Chlorophyta のクロロフィル *a/b* 比は、2.1-3.4 であった。これらのことから、淡水域に生息する緑藻のクロロフィル *a/b* 比は高く、海水域に生息する緑藻のクロロフィル *a/b* 比は低くなる傾向があることがわかった。

クロロフィル *a* とクロロフィル *b* に加えて、数種の緑藻は DVPchl *a*（クロロフィル *c*-like）とクロロフィル *c3* like（Chl *c* cs170）を用いていた（Latasa, *et al.*, 2004）。DVPchl *a* はクロロフィルの前駆体にあたるため、すべての光合成生物は、DVPchl *a* を合成することができる（Tanaka *et al.*, 2006）。しかし、DVPchl *a* を光合成色素として用いていたのは、prasinophytes のみであった。DVPchl *a* の吸収スペクトルは、クロロフィル *c* と似ているため、海水域の光条件に非常に適している（Larkum, *et al.*, 1994）。また、*Nephroselmis* のみから検出されたクロロフィル *c3* like（Chl *c* cs170）も深い海の光条件に非常に適している。興味深いことに、最も深い海に生息しており、かつ、本研究で用いた緑色植物で最も低いクロロフィル *a/b* 比を示した *Palmophyllum* は、DVPchl *a* もクロロフィル *c3* like（Chl *c* cs170）も光合成色素として用いていなかった。これは *Palmophyllum* が Chlorophyta の最も根元、若しくは、Streptophyta と Chlorophyta の共通祖先だと考えられていることと一致している。

光合成生物は、生き延びるために生育環境に適した光合成を行っていると考えられ（Chen *et al.*, 2005; Kunugi *et al.*, 2013）、そのような光合成を行うために集光装置を進化させて（Büchel *et al.*, 2015）環境適応してきたと考えられる。そこで、本研究で用いた緑色植物が率的に利用している光の波長を調べるために、細胞の吸収スペクトルを測定した。*Bryopsis* は糸状体であるため、細胞の吸収スペクトルの測定が難しいことから、*Bryopsis* のみチラコイド膜の吸収スペクトルを用いた。すべての Streptophyta と淡水適応した Chlorophyta では、クロロフィル *b* のピークに相当する 650 nm において肩のようなピークが得られたが、Chlorophyta では 650 nm においてはっきりとしたピークが得られた（Fig. 19）。また海産性の Chlorophyta が、470 nm 付近の青色光を効率よく吸収していることから、海産性の Chlorophyta は、海水中の光環境に適応して生息していることがわかる。

Table 32. Chlorophyll *a/b* ratios and other pigments profile of *A. thaliana* leaves and greenalgae total cells

Name	Chl <i>a/b</i> ratio	DVP	Chl <i>c</i> cs170	α -car	β -car	Vio	Neo	Zea	Lut	Dihy	Sip	Pra	Sip B1	Sip B2
<i>A.thaliana</i>	2.92	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>K. flaccidum</i>	2.10	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>M. viride</i>	3.40	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>P. crussam</i>	0.64	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>N. pyriformis</i>	1.02	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>P. colonial</i>	1.13	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>P. marina</i>	1.14	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>P. parkeae</i>	1.29	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>M. pusilla</i>	1.10	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>C. variabilis</i>	3.25	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. reinhardtii</i>	2.58	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>B. plumose</i>	1.06	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-

Chl, Chlorophyll; DVP, 8-vinyl-protochlorophyllide; Chl *c* cs170, Chlorophyll *c* CS170; α -car, α -carotene; β -car, β -carotene; Vio, Violaxanthin; Neo, Neoxanthin; Zea, Zeaxanthin; Lut, Lutein; Dihy, Dihydrolutein; Lor, Loroxanthin; Sip, Siphonaxanthin; Pra, Prasinoxanthin; Sip B1, Siphonaxanthin-derivative B1; Sip B2, Siphonaxanthin-derivative B2; +, detected the peak area; -, not detected.

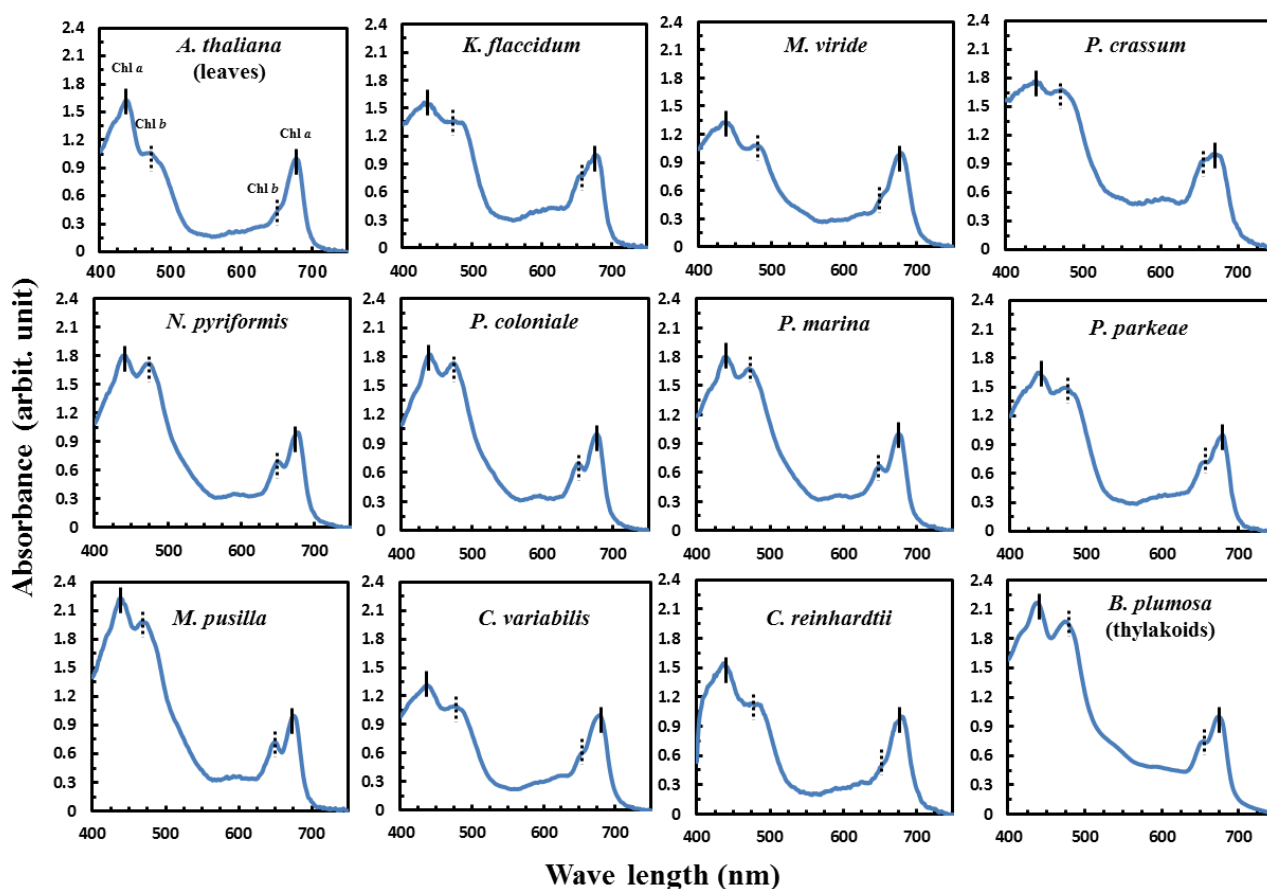


Fig. 19. Room temperature absorption spectra of *A. thaliana* leaves, isolated thylakoid membrane from *B. plumosa* and other green algae cells.
Solid vertical line is peak of chl *a* and dashed line is peak of chl *b*.

4.2.1.3 色素タンパク質複合体の解析

これまで緑色植物において、クロロフィル *b* は周辺アンテナである LHC のみが用いており、LHC の大きさの制御に寄与していると考えられてきた (Polle *et al.*, 2000). そのため、クロロフィル *b* を非常に多く持っている prasinophytes や *Palmophyllum* では以下の二つの可能性が考えられる. 一つは、LHC が非常に多く蓄積されているということが考えられ、もう一つは、LHC のクロロフィル *a/b* 比が淡水性緑藻の core chlorophyta よりも非常に低いことが考えられる. そこでこれらの可能性を確かめるために、native green gel を用いて色素タンパク質複合体を分離し、それぞれの複合体の色素組成を調べた. ただし、PSII のインナーアンテナ複合体のバンドの近傍には、LHC の単量体のバンドがあるために、PSII のインナーアンテナ複合体のバンドに LHC が含まれている可能性が高いと考え、PSII のインナーアンテナ複合体の色素組成の測定は行わなかった. そのため本研究では、インナーアンテナ複合体として PSI のインナーアンテナ複合体を、周辺アンテナ複合体として LHC の 3 量体の解析を行った.

結果より、本研究で用いたすべての緑色植物で同様の色素タンパク質複合体の分離パターンが得られ、それぞれ PSI-LHCI, PSI, LHCII の 3 量体、LHCII の単量体のバンドが得られた (Fig. 20) (Hirashima *et al.*, 2006). 分離様式は一樣であったが、複合体ごとの色素組成は大きく異なっていた. 初めに LHCII の色素組成について調べた. Fig. 20 を見ると、生物種によって LHCII の色が異なっていることがわかり、これより生物種によって LHCII の色素組成が異なっていることが予想される. LHCII の色素組成の結果を Table 33 に示した. Table 33 より海産性の Chlorophyta においては、LHCII のクロロフィル *a/b* 比が特に低かった. しかし、Streptophyta と淡水適応した Chlorophyta の LHCII のクロロフィル *a/b* 比は、同様の値であった. このことから、prasinophytes や *Palmophyllum* の LHCII の低いクロロフィル *a/b* 比は、細胞のクロロフィル *a/b* 比に部分的に影響していることが分かった. また、siphonaxanthin と prasinoxanthin を含むすべての xanthophyll は LHCII に含まれており、*Nephroselmis* の Chlorophyll *c* cs170 も LHCII に存在していた. 次に、PSI インナーアンテナ複合体のクロロフィル *a/b* 比についても解析を行った. その結果を Table 34 に示した. Table 34 より、Streptophyta と淡水適応した Chlorophyta の PSI のインナーアンテナ複合体は、多くのクロロフィル *a* と極少量のクロロフィル *b* を含んでおり、Streptophyta と淡水適応した Chlorophyta の PSI のインナーアンテナ複合体のクロロフィル *a/b* 比は約 15.0 以上であった (Table 33). 一方、prasinophytes と *Bryopsis* の PSI のインナーアンテナ複合体のクロロフィル *a/b* 比は 2.0-6.7 であり、これらの Chlorophyta で

は、クロロフィル *b* がインナーアンテナ複合体において重要な光合成色素として働いていることがわかった. 特に Chlorophyta で最も初期に分岐したと考えられている *Palmophyllum* では、PSI のインナーアンテナ複合体のクロロフィル *a/b* 比は他の生物と比べて非常に低く、PSI のインナーアンテナ複合体におけるクロロフィル *b* の量は全体のクロロフィル量の 30%以上であった. これより緑色植物の光化学系のインナーアンテナ複合体は、主にクロロフィル *a* を含んでいるが、海産性の Chlorophyta の PSI インナーアンテナ複合体は、クロロフィル *a* だけでなくクロロフィル *b* も多く含んでいることがわかった. 以上のことから、海産性の緑藻の細胞のクロロフィル *a/b* 比が低いのは、LHC のクロロフィル *a/b* 比と、PSI インナーアンテナ複合体のクロロフィル *a/b* 比の両方が低いことが要因であると考えられる.

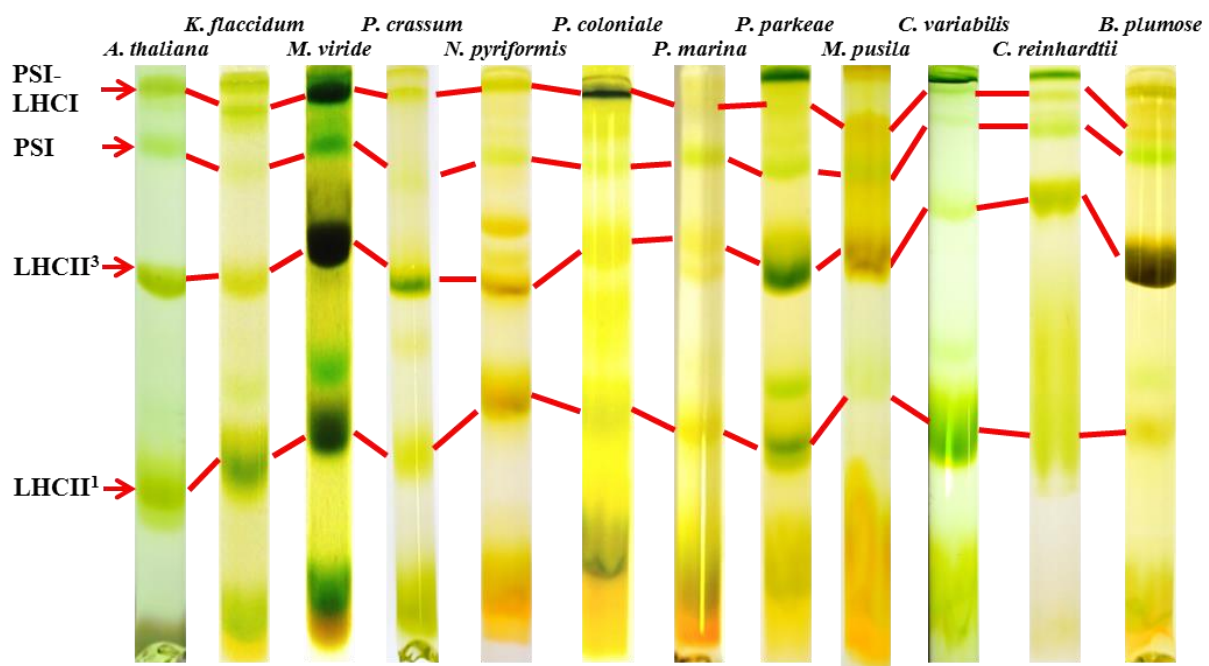


Fig. 20. Chl-protein complexes separated by native green gel electrophoresis.

Thylakoid membranes of *A.thaliana* and all green algae were prepared. Chlorophyll-protein complexes of those plants were separated by native green gel electrophoresis as described under “Experimental Procedures.” PSI, PsaA/B; LHCII₃, trimeric LHCII; LHCII₁, monomeric LHCII.

Table 33. Chlorophyll *a/b* ratios and other pigments profile of peripheral antenna (LHCII) in *A. thaliana* and green algae

Name	Chl <i>a/b</i> ratio	DVP	Chl <i>c</i> cs170	α -car	β -car	Vio	Neo	Zea	Lut	Dihi	Lor	Sip	Pra	Sip B1	Sip B2
<i>A.thaliana</i>	1.15	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>K. flaccidum</i>	1.51	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>M. viride</i>	1.38	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>P. crussam</i>	0.36	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>N. pyriformis</i>	0.67	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>P. colonial</i>	0.86	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
<i>P. marina</i>	0.71	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
<i>P. parkeae</i>	0.61	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>M. pusilla</i>	0.80	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-
<i>C. variabilis</i>	1.12	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. reinhardtii</i>	1.24	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>B. plumose</i>	0.73	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-

Peripheral antenna was separated by native green gel electrophoresis and was extracted from the gel. Peripheral antenna is trimeric LHCII. Chl, Chlorophyll; DVP, 8-vinyl-protochlorophyllide; Chl *c* cs170, Chlorophyll *c* CS170; α -car, α -carotene; β -car, β -carotene; Vio, Violaxanthin; Neo, Neoxanthin; Zea, Zeaxanthin; Lut, Lutein; Dihi, Dihydrolutein; Lor, Loroxanthin; Sip, Siphonaxanthin; Pra, Prasinoxanthin; Sip B1, Siphonaxanthin-derivative B1; Sip B2, Siphonaxanthin-derivative B2. +, detected the peak area; -, not detected.

Table 34. Chlorophyll *a/b* ratios and other pigments profile of inner antenna (PSI) in *A. thaliana* and green algae

Name	Chl <i>a/b</i> ratio	DVP	Chl <i>c</i> cs170	α -car	β -car	Vio	Neo	Zea	Lut	Dihi	Lor	Sip	Pra	Sip B1	Sip B2
<i>A.thaliana</i>	22.50	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>K. flaccidum</i>	14.80	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. viride</i>	18.35	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>P. crussam</i>	2.04	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. pyriformis</i>	3.08	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>P. colonial</i>	5.05	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>P. marina</i>	6.26	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>P. parkeae</i>	5.61	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>M. pusilla</i>	4.72	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>C. variabilis</i>	19.13	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. reinhardtii</i>	20.16	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. plumose</i>	6.68	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-

Inner antenna was separated by native green gel electrophoresis and was extracted from the gel. Inner antenna is a PSI which is heterodimer of PsuA/PsaB. Chl, Chlorophyll; DVP, 8-vinyl-protochlorophyllide; Chl *c* cs170, Chlorophyll *c* CS170; α -car, α -carotene; β -car, β -carotene; Vio, Violaxanthin; Neo, Neoxanthin; Zea, Zeaxanthin; Lut, Lutein; Dihi, Dihydrolutein; Lor, Loroxanthin; Sip, Siphonaxanthin; Pra, Prasinoxanthin; Sip B1, Siphonaxanthin-derivative B1; Sip B2, Siphonaxanthin-derivative B2. +, detected the peak area; -, not detected.

4.2.1.4 複合体中のクロロフィル *a* からクロロフィル *b* へのエネルギー伝達及び集光

LHCII と PSI の色素分析によって、海産性緑藻は LHC に加えて、PSI のインナーアンテナ複合体にも多くのクロロフィル *b* を組み込んでいることが分かった。そこで、クロロフィル *b* によって集められた光エネルギーが、光合成に効果的に用いられているかどうか(特に PSI のインナーアンテナ複合体において)を確かめるために、細胞の低温蛍光放射スペクトルを測定した。その結果を Fig.21,22 に示した。Fig.21,22 より、クロロフィル *a* (Fig.21), クロロフィル *b* (Fig.22) のどちらを優先的に励起させた場合でも、海産性緑藻を含むすべての緑色植物において、フリーのクロロフィル *b* からのピークは検出されず、全てのクロロフィル *b* が光化学系に含まれていることがわかった。

次に、光化学系のインナーアンテナ複合体において、クロロフィル *b* からクロロフィル *a* へのエネルギー伝達を確かめるために、clear-native(CN)-PAGE を用いて、*Arabidopsis* と *Nephroselmis* の LHC を含まない光化学系の精製を行った。native green gel の PSI バンドは、PSI のインナーアンテナ複合体のみが含まれていると報告されているが (Anderson *et al.*, 1980), PSI バンドの近傍には PSI-LHCI のバンドも存在していることから、PSI バンドから LHC を完全には排除しきれないと考えられる。さらに native green gel では、PSII のインナーアンテナ複合体への LHC のコンタミも防ぎきれない。そこで LHC を含まないインナーアンテナ複合体を精製するために、チラコイドメンブレンを 4.0% β -DM と 0.1% Triton X-100 で可溶化し、CN-PAGE によって分離した (Nagao *et al.*, 2013)。その結果、CN-PAGE によって LHC から PSII を分離することができた。さらに 2 次元電気泳動を行った後に銀染色を行った結果、*Arabidopsis* と *Nephroselmis* のどちらの PSII のバンドも LHC を含んでいないことが確認できた。これより、この方法を用いることで LHC から PSII のインナーアンテナ複合体を精製することができるとわかった (Fig. 23)。またこの時の *Arabidopsis* の PSII のクロロフィル *a/b* 比は 19.54 であり、この結果は、4.1.1.3 章の精製した PSI と同程度のクロロフィル *a/b* 比であった。また、*Nephroselmis* の PSII のクロロフィル *a/b* 比は 7.74 であったことから、*Nephroselmis* の PSII のインナーアンテナ複合体はクロロフィル *b* を多く含んでいることがわかった。次に *Arabidopsis* と *Nephroselmis* の精製された PSII のインナーアンテナ複合体の低温蛍光放射、励起スペクトルを測定した。その結果を Fig. 24 に示した。Fig. 24D より *Nephroselmis* では、688 nm における低温蛍光励起スペクトルが 461 nm でピークを示していることがわかる。これは PSII のインナーアンテナ複合体に存在するクロロフィル *b* とカロテノイドの両方が、集光色素として機能していることを示している。一方、*Arabidopsis* においても 688 nm における低温蛍光励起スペクトルが 468 nm でピークを示し

ていることがわかる。しかし、このピークは *Nephroselmis* とは異なり、カロテノイドだけが集光色素として機能していることを示している (Fig. 24C)。また *Arabidopsis* において、470 nm で PSII のインナーアンテナ複合体内のクロロフィル *b* を励起させると、684 nm に LHC からのピークが得られた (Fig. 24A) (McCourt, *et al.*, 1985)。これは、電気泳動中に色素タンパク質複合体が変性したことによって起こったことであると考えられる。これらのことより *Nephroselmis* において、PSII のインナーアンテナ複合体内のクロロフィル *b* は PSII のインナーアンテナ複合体の集光に寄与し、エネルギー伝達を行っていることがわかった。以上の結果より、海産性緑藻が持つ非常に多くのクロロフィル *b* は、アンテナと反応中心の両方のクロロフィル *a* に、光エネルギーの伝達をしていることがわかった。

さらに細胞の蛍光放射スペクトルの結果より、*Arabidopsis* と数種の緑藻は、光化学系 I の低ポテンシャルクロロフィル (レッドクロロフィル) による長波長側の蛍光 (Buschmann *et al.*, 2005) を放射していることが見受けられたが、他の緑藻は放射していなかった。レッドクロロフィルの蛍光は、すべての Streptophyta と淡水適応した Chlorophyta では検出できたが、海産性緑藻からは検出できなかった。このように緑色植物間でレッドクロロフィルの用い方が異なるということは、これまでに報告されていない。Streptophyta と淡水適応した Chlorophyta はレッドクロロフィルを持っていたが、海産性の緑藻はレッドクロロフィルを持っていなかったことから、レッドクロロフィルの存在は、生育環境に依存していることがわかる。先行研究より、レッドクロロフィルは強光条件への適応に重要な役割を担っていることが分かっており (Ballottari, *et al.*, 2014)、本研究のデータと一致していることがわかる。系統樹から考えると、Streptophyta と淡水適応した Chlorophyta は、淡水環境に適応するために PSI のレッドクロロフィルを独自に獲得したか、海産性の緑藻が海水環境に適応するためにレッドクロロフィルを失ったかのどちらかであると考えられる。以上の結果より、PSI のレッドクロロフィルは、強光下での光酸化ダメージを回避するために保持されていると考えられる。

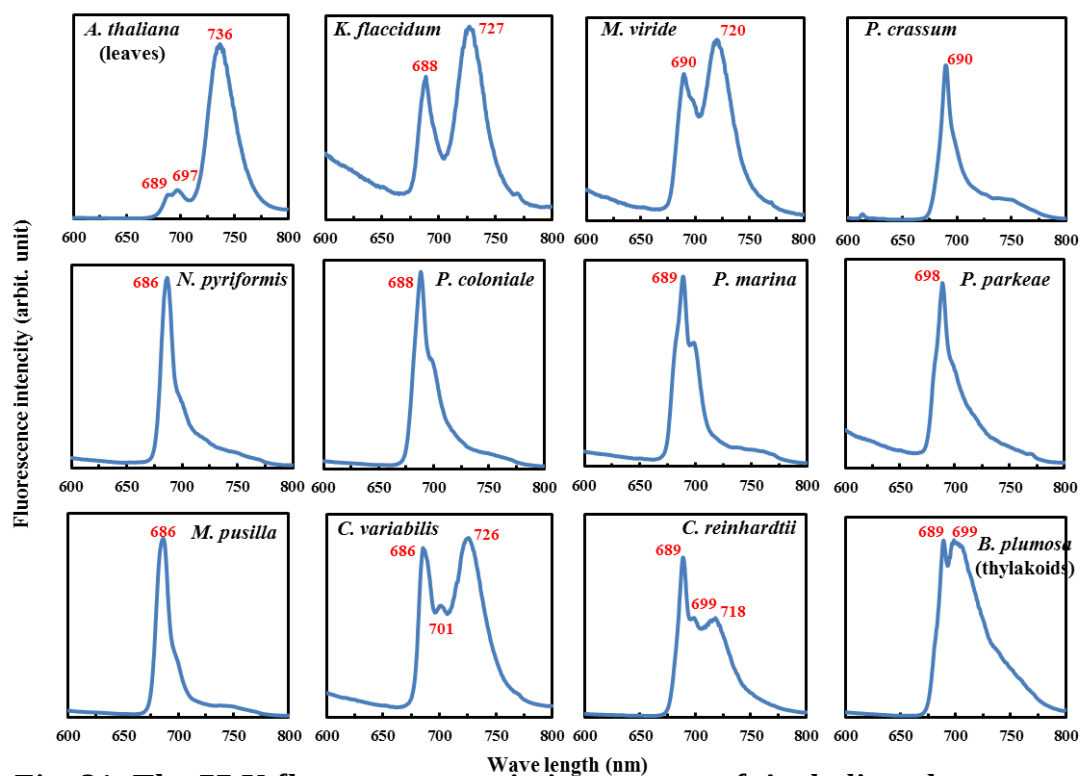
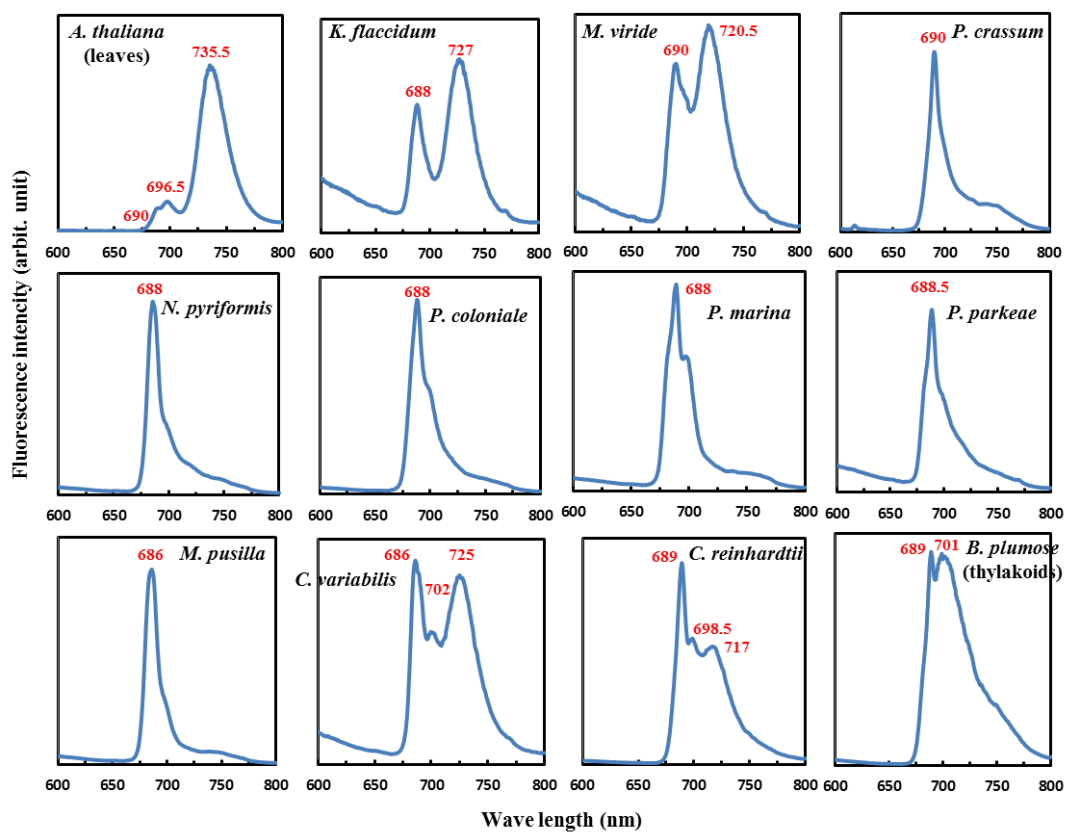


Fig. 21. The 77 K fluorescence emission spectra of *A. thaliana* leaves, isolated thylakoid membrane from *B. plumosa* and other green algae cells. Excitation wavelength was set at 440 nm.



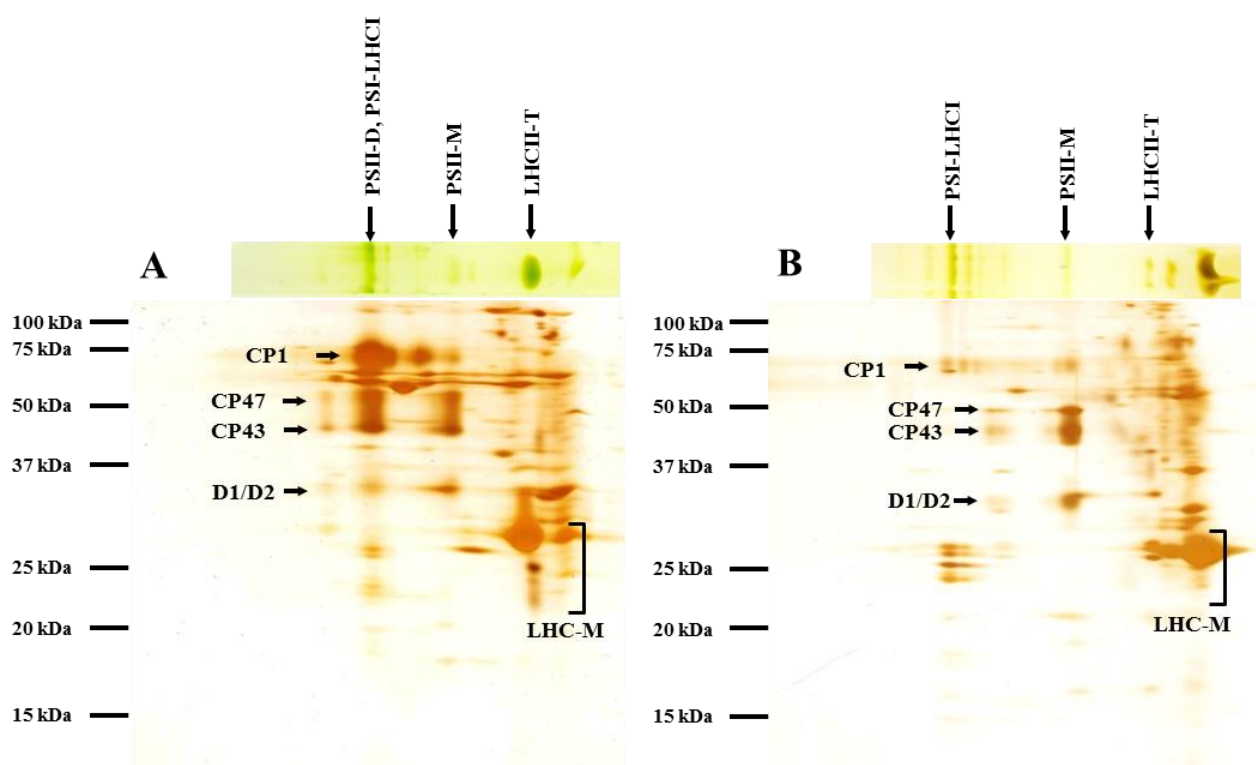


Fig. 23. Separation of chlorophyll-protein complexes.

Thylakoid membranes of *A. thaliana* (A), *N. pyriformis* (B) were prepared. Chlorophyll-protein complexes of *A. thaliana* and *N. pyriformis* were analyzed by two-dimensional CN/SDS-PAGE, followed by silver staining.

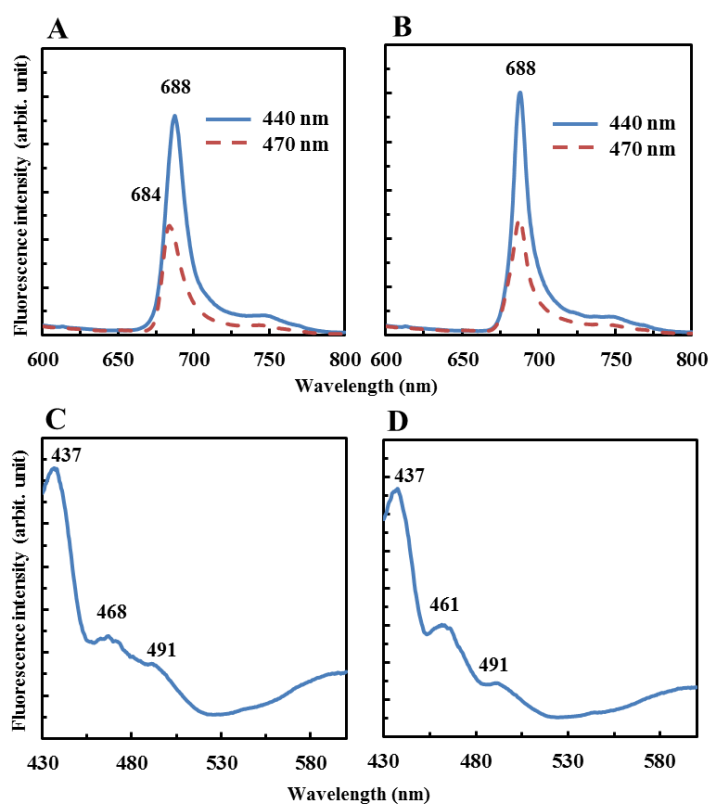


Fig. 24. The 77 K fluorescence (A, B) emission and (C, D) excitation spectra of inner antenna of PSII resolved from (A, C) *A. thaliana* and (B, D) *N. pyriformis* thylakoids membrane.

Excitation wavelength was set at 440 nm (solid line) and 470 nm (dashed line). *A. thaliana*, and *N. pyriformis* emission peak at 688 nm.

4.2.1.5. CAO の進化と配列比較

クロロフィル *b* は chlorophyllide *a* oxygenase (CAO) によってクロロフィル *a* から合成される。陸上植物の CAO は、3 つのドメイン（触媒ドメイン、制御ドメイン、リンカードメイン）から成り立っていることが知られている (Yamasato *et al.*, 2005)。触媒ドメインは、クロロフィル *a* をクロロフィル *b* に変換する反応を担っており、制御ドメインは、CAO タンパク質の量的制御と合成されたクロロフィル *b* の LHC への選択的な分配を担っていると考えられている (Sakuraba *et al.*, 2009, 2012)。このことから CAO の進化は、細胞内のクロロフィル *b* の量と色素タンパク質複合体へのクロロフィル *b* の分配に関係があると予想される。そこで、*Klebsormidium* (Hori, *et al.*, 2014), *Mesostigma*, *Prasinoderma*, *Nephroselmis*, *Pyramimonas*, *Pseudoscurfieldia*, *Bryopsis* の CAO の全長のアミノ酸配列を決定した。またその他の生物の CAO のアミノ酸配列はデータベースから取得し、*Palmophyllum* を除く本研究に用いたすべての緑色植物の CAO のアミノ酸配列比較を行った。その結果を Fig. 25 に示した。Fig. 25 より、触媒ドメインはマイクロモナスを除いた緑色植物において、非常に高い相同性を示した。次に、緑色植物の CAO の触媒ドメインのアミノ酸配列比較を用いて、系統樹を作成した (Fig.27)。また、この系統樹の作成の際に用いたアミノ酸配列比較を Fig.26 に示した。Fig.27 より、CAO の触媒ドメインの系統樹は、本研究で用いた緑色植物の系統関係とよく似ていたことから、緑色植物において CAO は、垂直的に遺伝されてきたと考えられる。

推測されている葉緑体移行シグナル配列を除くと、制御ドメインは陸上植物間では高く保存されていることが知られているが、緑藻についてはこれまでに報告されていない。そこで、AtCAO の N 末端側と緑藻の CAO の N 末端側のアミノ酸の配列比較を行い、その結果を Fig.28 に示した。Fig.28 より、触媒ドメインと比較して制御ドメインは、緑藻間で大きく変動していた。まず、*Micromonas*, *Pseudoscurfieldia*, *Prasinoderma* の CAO の N 末端配列は、他の緑藻の CAO の N 末端配列と配列の保存性が全くなかったため、Fig.28 には載せていない。一方、他の緑藻の CAO の N 末端配列からは、有意な配列の相同性が得られた。*Streptophyta* と *Chlorophyta* の両方で共有されている N 末端配列は、触媒ドメインだけでなく、緑藻の共通祖先から発生した制御ドメインも共有されていた (Fig.28 の赤枠内)。次に、CAO の蓄積の転写後制御に不可欠である AtCAO の 97-106 アミノ酸 (Q⁹⁷DLLTIMILH¹⁰⁶) (Sakuraba *et al.*, 2009) を比較してみる。この配列は先行研究から陸上植物間では非常によく保存されていることがわ

かっているが、本研究から Chlorophyta に属する緑藻の CAO はこの配列に相当する配列を全く有していないことがわかった。一方 Streptophyta に属する緑藻の CAO は、相同性は低いがこの配列に相当するものを有していた。しかしその代わりとして、core chlorophyta の CAO は、制御ドメインにおいて、共有配列から N 末端側の上流へと伸びている付加配列を有していた。そしてこの付加配列は、core chlorophyta 間では非常に高い相同性を示していた。

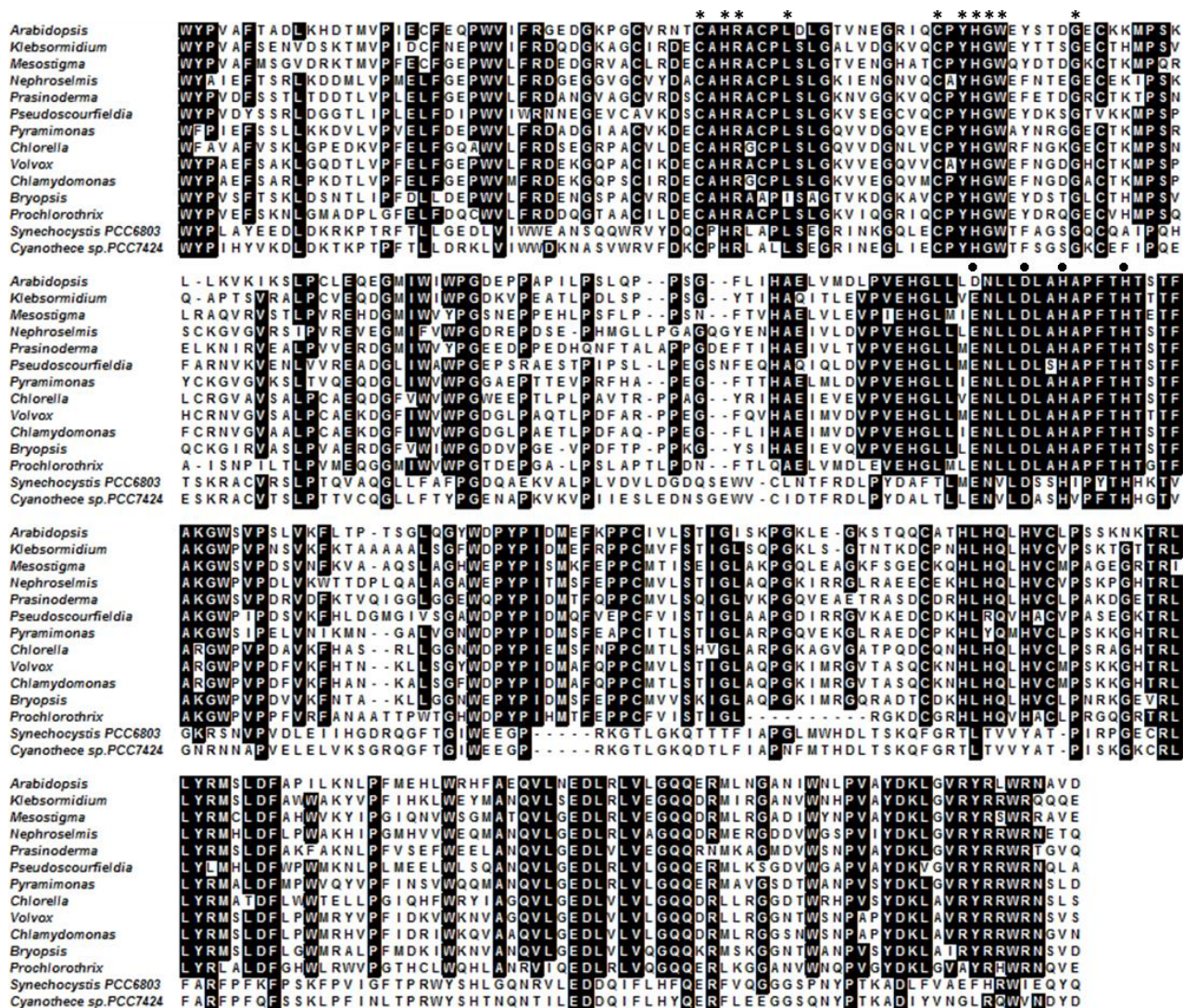


Fig. 26. Multiple amino acid sequence alignment of CAO catalytic domain proteins. Identical residues are shown in white type on a black background. The AtCAO sequences corresponding to the catalytic domain are shown. Asterisks and closed circles show binding sites of Rieske center and mononuclear iron-binding motif, respectively.

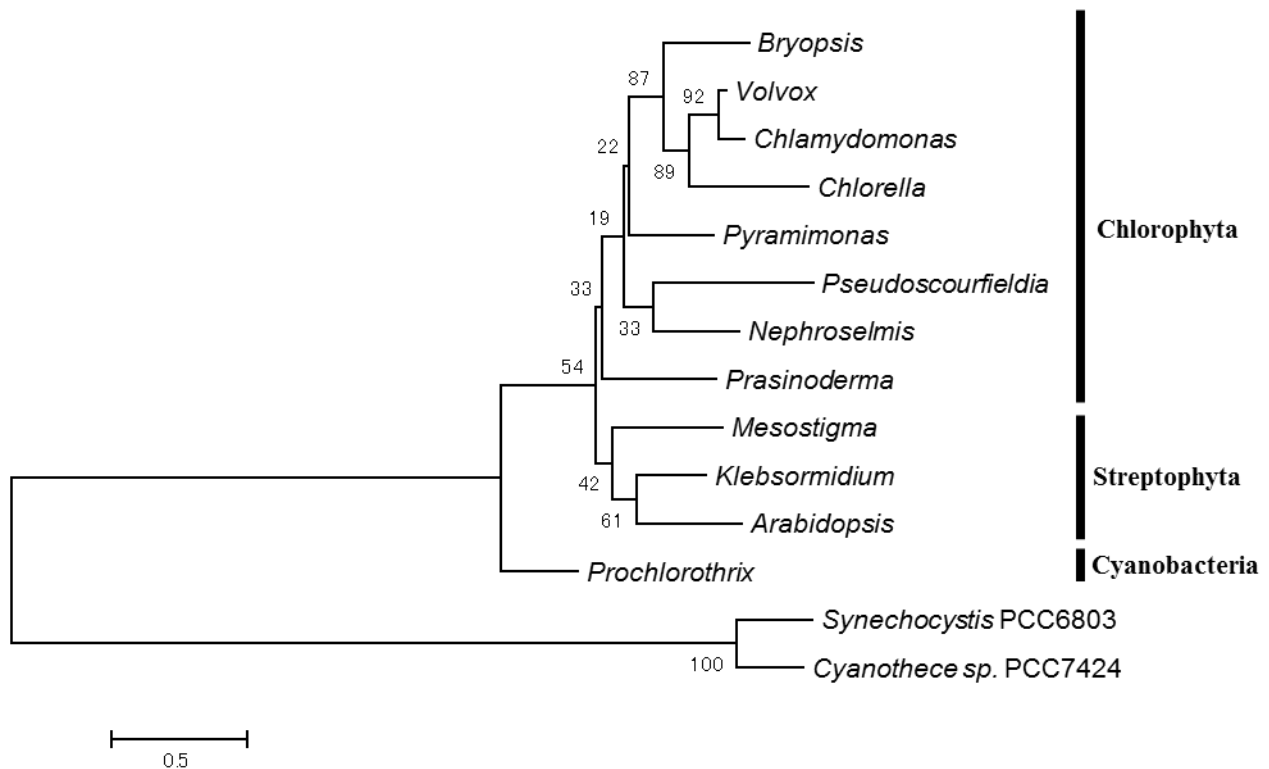


Fig. 27. Phylogenetic tree of CAO.

The bootstrap values for each clade are indicated on each node, and the scale bar indicates the number of amino acid substitutions per site. *Synechocystis sp. PCC6803* and *Cyanothece sp. PCC7424* were used as an outgroup.

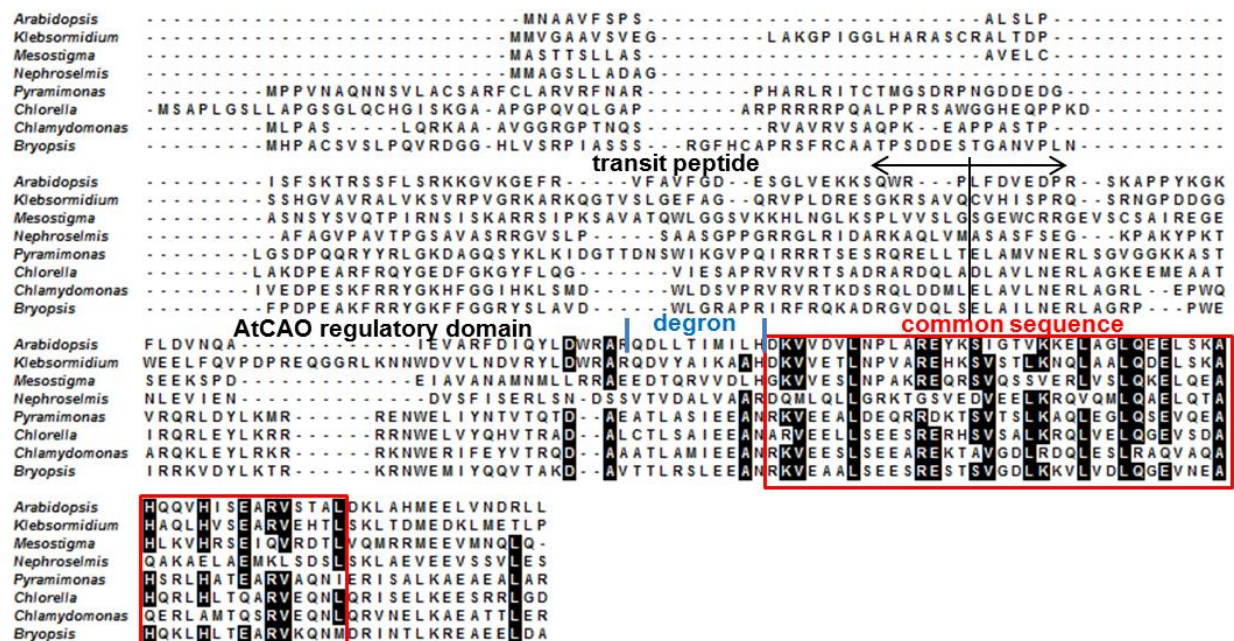


Fig. 28. Multiple amino acid sequence alignment of CAO transit peptide and regulatory domain proteins.

Identical residues are shown in white type on a black background. The AtCAO sequences corresponding to the transit peptide and regulatory domain are shown. Red box show common sequence.

4.2.2 考察

4.2.2.1 光化学系内の集光インナーアンテナにおけるクロロフィル *b* の影響

緑色植物の集光装置は二つのグループに分かれており、一つは LHC と呼ばれる周辺アンテナ複合体であり (Horton *et al.*, 1996), もう一つは CP43/47 と呼ばれる PSII のインナーアンテナ複合体と PsaA/B (P700 クロロフィル *a* タンパク質複合体) と呼ばれる PSI のインナーアンテナ複合体である (Nickelsen *et al.*, 2013; Chitnis *et al.*, 2001). これまでクロロフィル *b* は、周辺アンテナ複合体のみに組み込まれており、インナーアンテナ複合体はクロロフィル *a* のみを含んでいると考えられてきた (Anderson *et al.*, 1980). このことは、これまでの *Arabidopsis* と *Chlamydomonas* の光化学系に関する研究結果からも証明されている (Chitnis *et al.*, 2001). このクロロフィルの分子種による局在の違いについての一つの仮説として、インナーアンテナ複合体にはクロロフィル *b* が結合できないのではないかとということが考えられる. しかしこの仮説は、CAO の制御ドメインを欠損させた *AtCAO* を通常の *AtCAO* の代わりにシロイヌナズナに導入したところ、インナーアンテナ複合体が多くのクロロフィル *b* を結合した (Sakuraba *et al.*, 2010) ことから、この仮説は否定された. さらに、シロイヌナズナにシアノバクテリアの CAO (制御ドメイン領域を持たない) を導入した際にもインナーアンテナ複合体にクロロフィル *b* が組み込まれ、このクロロフィル *b* が集光色素として機能していた (Hirashima *et al.*, 2006). またシアノバクテリアの *Acaryochloris* は、インナーアンテナ複合体に主なクロロフィルとして、クロロフィル *a* だけでなくクロロフィル *d* も組み込んでいることが知られている (Chen *et al.*, 2005). これらのことから、インナーアンテナ複合体はクロロフィル *a* だけでなく、様々なクロロフィルを組み込むことができることが分かった. 本研究では、12 種の緑色植物から分離したクロロフィルタンパク質複合体の色素組成を調べ、その結果、多くの Chlorophyta はインナーアンテナ複合体にクロロフィル *b* を組み込んでおり、その量は全体のクロロフィル量の 15-30% 近くであった. このことから、緑色植物においてクロロフィル *b* は周辺アンテナ複合体だけでなく、インナーアンテナ複合体の主な色素でもあると考えられる.

4.2.2.2 緑色植物の祖先がクロロフィル *b* を用いていた可能性について

Chlorophyta の中で最も初期に分岐したと考えられている *Palmophyllum* は (Zechman, *et al.*, 2010), インナーアンテナ複合体に非常に多くの量のクロロフィル *b* を組み込んでいた (クロロフ

イル *a/b* 比=2.0). また *Nephroselmis* も初期に分岐した *Chlorophyta* であり, インナーアンテナ複合体に多くのクロロフィル *b* を含んでいた (クロロフィル *a/b* 比=3.1). 他の *prasinophytes* もインナーアンテナ複合体に全体のクロロフィルの 14-17%のクロロフィル *b* を含んでいた. 4.1 章で切断した CAO を導入した *Arabidopsis* の遺伝子導入株を用いた実験から, クロロフィル *b* の局在や量と CAO の構造には相関関係があることが見出されたが, 様々な緑色植物の CAO の配列比較からは, クロロフィル *b* の量や局在と CAO の制御ドメインの構造の明確な相関関係を見出すことはできず, 両者には何らかの相関関係がある可能性があることが明らかになった. インナーアンテナ複合体に多くのクロロフィル *b* を保持している *Prasinoderma* の CAO は, 制御ドメインを持っていなかった. 興味深いことに, この表現型は完全長 CAO の代わりに制御ドメインを持たない CAO を導入した *Arabidopsis* の遺伝子導入株の表現型と非常に良く似ていた. この *Arabidopsis* の遺伝子導入株もインナーアンテナ複合体に多くのクロロフィル *b* を組み込んでおり, 全体のクロロフィル *a/b* 比も非常に低かった (Hirashima, *et al.*, 2006; Sakuraba, *et al.*, 2012). また *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Bryopsis* は, CAO の N 末端側が長くなっており, それと一致してこれらの光合成生物のインナーアンテナ複体内のクロロフィル *b* 量は, 非常に少なかった. クロロフィル *b* の局在は, *Streptophyta* においては例外なしに LHC のみであり, 本研究で扱ったすべての *Streptophyta* の CAO は, 制御ドメインの長さが同程度であり, 配列も良く保存されていた. これは *Streptophyta* の祖先がすでに, 完全な制御ドメインを持っており, クロロフィル *b* を優先的に周辺アンテナ複合体に組み込んでいたことを示唆している. これらの結果より, クロロフィル *b* の量と局在は, 進化の過程で CAO の制御ドメインを変化させることによってコントロールされてきた可能性があることがわかった.

では, *Streptophyta* と *Chlorophyta* の共通祖先はインナーアンテナ複合体にクロロフィル *b* を組み込んでいたのかという疑問が生じてくる. この疑問の答えに関するキーポイントの一つとして, CAO の配列比較より, シアノバクテリアの CAO が制御ドメインを持っていないことが挙げられ (Tomitani, *et al.*, 1999), このことから緑色植物の CAO は, 進化の初期段階では触媒ドメインのみを持っていたと考えられる. また, CAO のアミノ酸配列比較を注意深く見てみると, Fig.28 の赤色で示した範囲は低くではあるが相同性を示していることがわかる. しかし制御ドメインの他の部分は全く似ていないことも同時にわかる. これらの結果より, 緑色植物が *Streptophyta* と *Chlorophyta*

に分かれた際に、赤枠の小さい領域が制御ドメインに対応しており、制御ドメインのその他の部分は、二つのグループに分かれたのちに個々に獲得した領域であると考えられる。さらに全長の AtCAO の代わりに、この赤枠の部分のみの制御ドメインを持った AtCAO を導入した *Arabidopsis* の遺伝子導入株のクロロフィル *a/b* 比は、2.0 であった (Sakuraba, *et al.*, 2009)。この遺伝子導入株は、緑色植物の祖先の光化学系を部分的に模していると考えられる。以上のことから、緑色植物の共通祖先はクロロフィル *a/b* 比が低く、低い光照度に適応していたと考えられる。

4.2.2.3 クロロフィル *b* の量と局在が光環境適応に与える影響

Streptophyta は淡水域や陸上で進化してきたと考えられている。淡水域や陸上において植物は強光に曝されることが多々あると考えられ (Sakuraba *et al.*, 2010)、強光は淡水域や陸上で生育することにおける深刻な環境ストレスの一つである。もし淡水性緑藻や陸上植物がインナーアンテナ複合体にクロロフィル *b* を組み込んでいれば、強光下においてこれらの光合成生物は、すぐに細胞死を引き起こしてしまうことが予想される。植物は強光下において、クロロフィル *b* を持つ周辺アンテナ複合体の大きさを調節して光の吸収量を制御していると考えられている (Polle, *et al.*, 2000)。この周辺アンテナ複合体の大きさの調節の際には、クロロフィル *b* 分解酵素がクロロフィル *b* を積極的に分解していると考えられる。しかし、クロロフィル *b* を組み込んだインナーアンテナ複合体は、周辺アンテナ複合体に比べて、クロロフィル *b* 分解酵素が働きにくいことが分かっている (Shimoda *et al.*, 2012)。そのため、インナーアンテナ複合体にクロロフィル *b* を組み込んだ植物は、強光下において過剰な光エネルギーを吸収してしまうことで、細胞死が誘発されることが考えられる。また、周辺アンテナ複合体が持つ過剰エネルギーを消失させるクエンチング能が、インナーアンテナ複合体からは見つかっていないことも要因の一つであると考えている (Goss, *et al.*, 2015)。実際、先行研究において、制御ドメインを持たない AtCAO を導入した *Arabidopsis* の遺伝子導入株を強光下にさらした際に、遺伝子導入株が枯死してしまった (Sakuraba *et al.*, 2010) ことから、インナーアンテナ複合体にクロロフィル *b* が組み込まれていれば、強光下においてすぐに細胞死が起こってしまうことが考えられる。従って、植物は強光条件に適応するために、インナーアンテナ複合体からクロロフィル *b* を除去したと考えられる。ここで、本研究から得られた緑色植物の光化学系の進化と CAO の構造の進化の

関係をまとめた図を Fig.29 に示した。Streptophyta の祖先は、完全長制御ドメインの獲得によって、クロロフィル *b* の分配を達成した。これに対して Chlorophyta は、深い海で進化してきたために、進化の初期段階で深い海の光条件に適応したと考えられる。深い海では青緑色光が多く (Qin *et al.*, 2014), 深い海の光合成生物は生きるためにこの青緑色光を吸収する必要があったため、他の色素よりも青緑色光を集めることに優位な光合成色素であるクロロフィル *b* を主に用いたと考えられる。これは、最も初期に分岐し深い海に生息している *Palmophyllum* (Sartoni *et al.*, 1993) が、非常に多くの量のクロロフィル *b* を利用していることから考えられる。このクロロフィル *b* の量を増加させるために Chlorophyta は、周辺アンテナ複合体と同様にインナーアンテナ複合体にもクロロフィル *b* を組み込んだと考えられ、このような光化学系を構築するために、CAO の制御ドメインを改変したと考えられる。以上の結果より、強光条件と深い海に適応することが、緑色植物の共通祖先から Streptophyta と Chlorophyta の二つに分かれたことの進化の原動力になったと考えられ、このことは光呼吸経路が Streptophyta と Chlorophyta で異なっている報告と一致している (Stabenau *et al.*, 2005)。その後 Chlorophyta 系統に属する一部の緑藻である *Chlamydomonas* や *Chlorella* は、再び淡水と強光環境に適応したと考えられる。これらの緑藻の CAO は、長い制御ドメイン領域を有し、クロロフィル *b* をインナーアンテナ複合体には組み込まずに、LHC のみに組み込んでいた。この収斂進化は、集光装置におけるクロロフィル *b* の局在の重要性を強く示唆している。また、緑色植物の進化に伴う光環境適応の重要性は、蛍光スペクトルの結果によって強く支持されている。強光条件下において P700 がカチオン (P700⁺) になると、励起エネルギーは励起エネルギーを消失させるためのレッドクロロフィルに伝達される (Mullet *et al.*, 1980)。このことは、強光条件下で生育する光合成生物にとって、レッドクロロフィルが重要であることを示している (Ballottari, *et al.*, 2014)。さらに Streptophyta と淡水適応した Chlorophyta では、明確なレッドクロロフィルが検出できたが、低照度に適応した prasinophytes や *Palmophyllum* からはレッドクロロフィルが検出できなかったことから示唆できる。

以上より、様々な光環境への適応は、緑色植物の進化の重要な原動力であったと考えられる。さらにこの進化の過程において、CAO の分子進化が重要な役割を担っていた可能性があると考えられる。

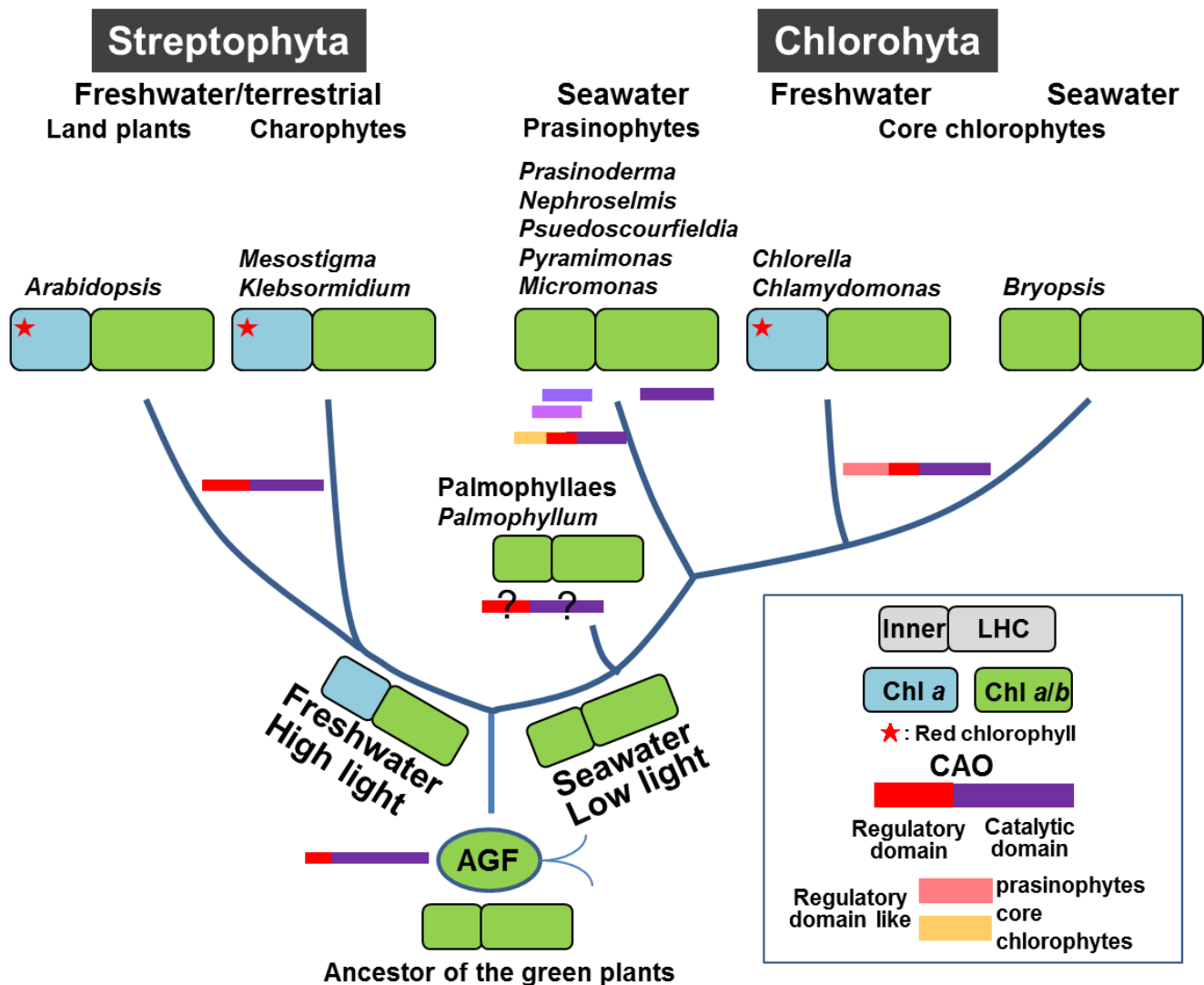


Fig. 29. Evolution of CAO and light-harvesting systems in green plants.

Ancestor of the green plants has chlorophyll *b* in inner antenna and common regulatory domain in CAO. Green plants in Streptophyta don't have chlorophyll *b* in inner antenna, regulatory domain in CAO and red chlorophylls. *Palmophyllum* has chlorophyll *b* in inner antenna, but CAO sequence of *Palmophyllum* is not clear. Green algae in prasinophytes have chlorophyll *b* in inner antenna and have various types of CAO. Fresh water green algae in core chlorophytes don't have chlorophyll *b* in inner antenna, regulatory domain like in CAO and red chlorophylls. Sea water green algae in core chlorophytes have chlorophyll *b* in inner antenna and regulatory domain like in CAO.

4.2.2.4 地球の歴史と緑色植物の進化

これまでに、緑色植物は進化の過程において、生育環境の違いから異なる光環境に適応するために、光化学系を Streptophyta と Chlorophyta で別々の様式で進化をさせてきたことがわかった。では、どうして緑色植物がそれぞれの異なった環境に適応する必要があったのだろうか。何が原因で、緑色植物の生育環境に変化が訪れたのかを考えてみる。そこでまずは光合成生物や緑藻類の進化について考えてみる。

地球における生命の誕生は 38 億年前に海で起こったと考えられ (Buick 2008)、光合成生物としては 32 億年前に初めて、シアノバクテリアが同じく海で誕生したと考えられている (Blankenship 2010)。シアノバクテリアが海に広がり始め、酸素が少しずつ大気中に放出されるようになり、オゾン層が形成され始め紫外線が地表に届きにくくなると、海水中以外でも生物が生息できるようになった。この頃になると 1 次共生が起こり、真核生物が誕生したのではないかと考えられている。実際、真核生物の化石として 21 億年前のグリバニアと呼ばれる生物のものや (Han *et al.*, 1992)、16.7 億年前の紅藻のもの (Bengtson *et al.*, 2009)、さらには 12 億年前のプラシノ藻のもの (Tappan *et al.*, 1980) などが見つかっている。しかし、これらの年代同定が信憑性のあるものであるかどうかは定かではなく (Cavalier 2006)、真核生物の確かな証拠は 10 億年前までのものしかないとも考えられている (Berney *et al.*, 2006)。つまり現時点では、真核生物はこの後に大きく広まったと考えられている。また緑色植物の出現年代について考えると、上記したプラシノ藻を除くと緑藻類の最古の化石は 7.5 億年前であり (Butterfield *et al.*, 1994)、その後 2.5-5.4 億年前頃になると微細藻の緑藻類の化石 (Parke *et al.*, 1978; Colbath 1983) だけでなく、海藻類の化石や (Hall *et al.*, 2007; Verbruggen *et al.*, 2009)、陸上植物の化石も見つかっている (Kenrick *et al.*, 1997; Steemans *et al.*, 2009)。また分子時計の観点から考えると緑色植物は 7-15 億年前に出現したと考えられている (Douzery *et al.*, 2004; Berney *et al.*, 2006; Roger *et al.*, 2006; Herron *et al.*, 2009)。つまり二つの観点を合わせて考えると真核生物である緑色植物は、10-15 億年前には出現し、その後 Streptophyta と Chlorophyta に別れ、それぞれの進化を遂げ地球上に広く存在していったと考えられる。では、この 7-9 億年前頃に地球上で何が起こったのか、緑色植物が二つに分かれた原動力は何であったのかを考えてみる。

1998 年のホフマンらの報告によると、6-8 億年前の地球は全球凍結 (Snowball earth) 状態であったのではないかと考えられている (Salyards *et al.*, 1992; Hoffman *et al.*, 1998)。

この現象から光合成生物の淡水化を考えると、地球全体が凍結することによって海水が凍って淡水（純水）になり、その後の環境変化（火山活動_{など}）の影響で氷が解けることで、淡水とともに凍っていた光合成生物が淡水域で生育するようになったのではないかと考えられる。またもしくは、氷上で生き延びた藻類が川などの誕生によって、生息域を拡大していったのではないかと考えられる。また全球凍結という非常に過酷な環境に生物が曝されたことで、真核生物の広がりや多細胞生物の誕生なども起こったと考えられる。実際この頃、地球上では生物の多細胞化が起こったのではないかと考えられている（Shen *et al.*, 2008）。さらに、全球凍結直後に大気中の酸素濃度が急激に上昇したことで、二酸化炭素濃度が非常に低くなったとも言われており（Pierrehumbert *et al.*, 2011）、このことが、光呼吸経路が Streptophyta と Chlorophyta で異なった原因に繋がったのではないかという仮説も立てられている（Becker *et al.*, 2013）。またもしも真核生物の誕生が 21 億年前に起こっていたのであれば、24.5 億年前から 22 億年前に起こったと考えられている全球凍結と時期が重なるため（Kopp *et al.*, 2005）、全球凍結と生物の進化には非常に密接な関係があると考えられる。

以上のことより、6 億~8 億年前に地球が全球凍結に陥ったことで、緑色植物の共通祖先が海水中だけでなく、淡水域にも生息するようになったため、それぞれの緑色植物の共通祖先が各々の生育環境に適応した進化を遂げ、本研究で紹介したような光化学系の違いを生み出したのではないかと考えられる。

5. 全体考察(CAO の調節機構について)

本研究では、12種の緑色植物を用いて光化学系の進化とCAOの進化の相関関係に関する研究を行ってきた。その結果、光化学系の進化は、緑色植物の進化の原動力の要因の一つになった可能性が示唆され、さらにこの光化学系の進化には CAO の分子進化が重要な役割を担っていた可能性があると考えられる。しかし本研究では、CAO によるクロロフィル *b* の量の調節機構までを明らかにするには至らなかった。そこで、CAO が持つと考えられている機能である、クロロフィル *b* の量の調節機構を CAO の進化と絡めて考えてみる。

当研究室の先行研究から、陸上植物の CAO, 特に *Arabidopsis* の CAO のクロロフィル *b* 調節機構に関しては、以下の仮説が立てられている。AtCAO は、CAO の制御ドメインに分解促進シグナルである *degron* を持っており、*degron* はクロロフィル *b* 非存在下では制御ドメインによって覆われているため、葉緑体 ClpC1 プロテアーゼに認識されない。しかし、CAO によってクロロフィル *b* の合成・蓄積が起こることで、制御ドメインが直接的または間接的にクロロフィル *b* を認識し、制御ドメインの立体構造変化が起こり、*degron* が露出する。そして、露出した *degron* が葉緑体 ClpC1 プロテアーゼによって認識されることで、CAO の分解が誘導される。このようなクロロフィル *b* による CAO のネガティブフィードバック制御によって、クロロフィル *b* の量は制御されていると考えられている(Nakagawara, *et al.*, 2007; Sakuraba *et al.*, 2009)。この仮説から考えると周辺アンテナ複合体へのクロロフィル *b* の優先的な分配に、CAO が関与しているかどうかは定かではない。そのため、現時点ではインナーアンテナ複合体へのクロロフィル *b* の組み込みは、あくまでのクロロフィル *b* の量に応じて行われていると考えている。では、陸上植物以外の緑色植物の CAO は、どのようにクロロフィル *b* の量を調整しているのだろうか。Fig.28 の結果から Streptophyta, Chlorophyta に関わらず緑色植物の多くが制御ドメイン領域を持っていることが明らかになった。この制御ドメイン領域の配列に関しては、Streptophyta に属する緑色植物間ではある程度の相同性が見られたが、Streptophyta と Chlorophyta では制御ドメイン領域の前半部分が全く異なっていた。このことは、インナーアンテナ複合体にクロロフィル *b* を組み込んでいない Chlorophyta の緑藻でも同様であった。このことから、Streptophyta と Chlorophyta では制御ドメインの機能が異なっていると考えられる。これは、インナーアンテナ複合体にクロロフィル *b* を組み込んでいる緑色植物でも、制御ドメイン領域を有していたことから言える。

次に、各々の緑色植物の CAO タンパク質の蓄積に関して調べた。AtCAO は、制御ドメインを有していると、*Arabidopsis* 内で高発現させても CAO タンパク質は蓄積しないが、制御ドメインを有していない AtCAO を *Arabidopsis* 内で高発現させると、AtCAO タンパク質が蓄積し、かつ、

クロロフィル *a/b* 比が低下することが知られている (Sakuraba, *et al.*, 2012). そこで, クロロフィル *a/b* 比が低く, かつ, 制御ドメイン領域を有していない CAO を持つ緑藻において, CAO タンパク質の蓄積を確認するために, イムノブロット解析を行った. その結果を Fig.30 に示した. Fig.30 より, *Arabidopsis* 内で制御ドメインを持たない AtCAO を高発現させた株 (BCG 株) 以外の全ての緑色植物で, CAO タンパク質が蓄積していないことがわかった. 特に, クロロフィル *a/b* 比が非常に低く, かつ, 制御ドメイン領域を持たない緑色植物でも CAO タンパク質は蓄積していなかった. このことから, Chlorophyta におけるクロロフィル *b* の量の調節は, 触媒ドメイン領域が行っている, もしくは明らかになっていない他の遺伝子が行っていると考えられる.

以上のことからいずれの場合においても, Streptophyta と Chlorophyta では, クロロフィル *b* の量の制御システムが異なっていることが考えられる. しかし, Streptophyta と Chlorophyta のどちらにしてもクロロフィル *b* の量の詳細な制御システムは定かではないため, 今後も研究を進めて行く必要があると考えている.

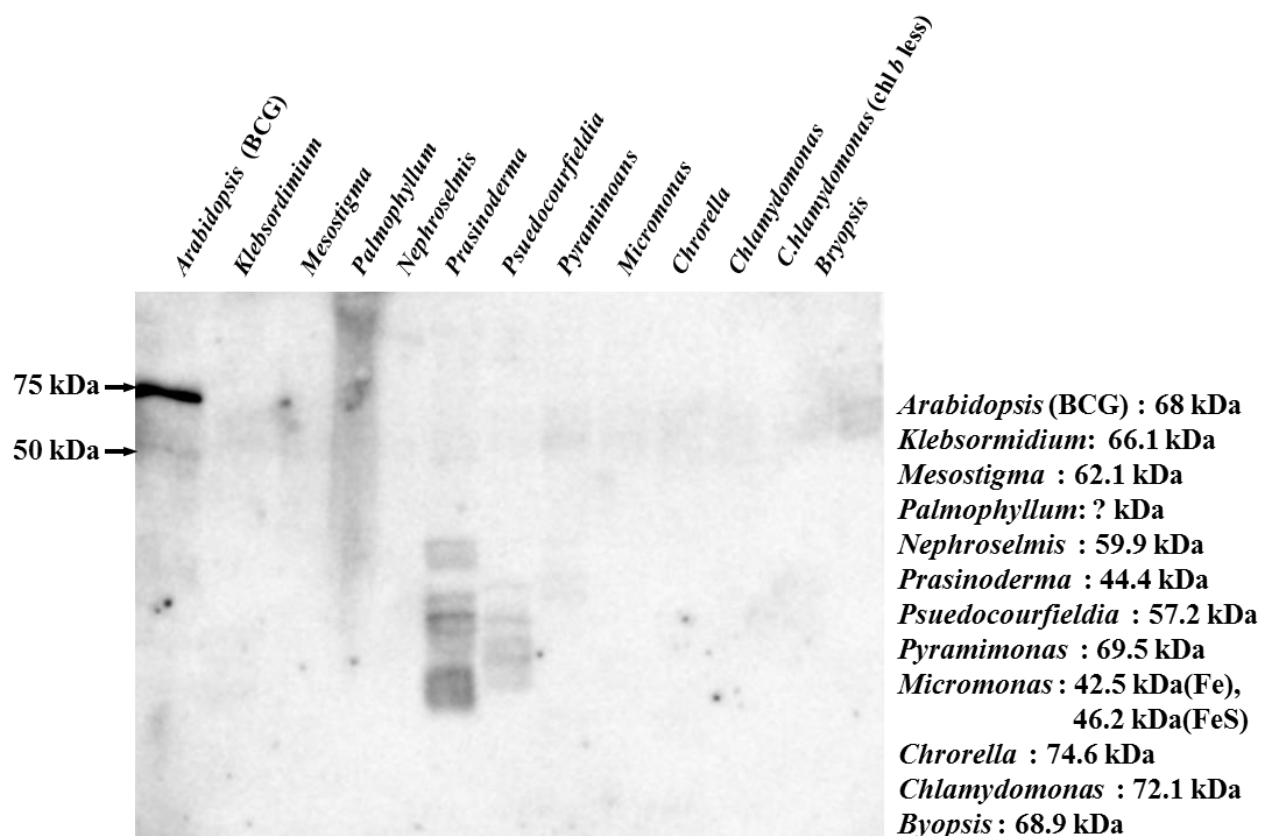


Fig. 30. Immunoblot analysis of the CAO protein in Green algae.
 Total protein was subjected to SDS-PAGE. The CAO proteins were detected using an anti-AtCAO antibody (1/3000) .

6. 参考文献

A

Adir, N. (2005). Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: reconstructing a giant. *Photosynth. Res.* 85, 15–32

Akutsu, S., Fujinuma, D., Furukawa, H., Watanabe, T., Ohnishi-Kameyama, M., Ono, H., Ohkubo, S., Miyashita, H., Kobayashi, M. (2011) Pigment analysis of a chlorophyll *f*-containing cyanobacterium strain KC1 isolated from Lake Biwa. *Photomedicine and Photobiology* 33, 35–40

Anderson, J. M. (1980). P-700 content and polypeptide profile of chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoids. *Biochim. Biophys. Acta* 591, 113–126

Anderson, J.M., Waldron, J.C., Thorne, S.W. (1978). Chlorophyll–protein complexes of spinach and barley thylakoids: Spectral characterization of six complexes resolved by an improved electrophoretic procedure. *FEBS Lett.* 92, 227–233

B

Ballottari, M., Dall’Osto, L., Morosinotto, T., Bassi, R. (2007). Contrasting behavior of higher plant photosystem I and II antenna systems during acclimation. *J. Biol. Chem.* 282, 8747–958

Ballottari M., Alcocer M. J., D’Andrea C., Viola D., Ahn T. K., Petrozza A., Polli D., Fleming G. R., Cerullo G., Bassi R. (2014) Regulation of photosystem I light harvesting by zeaxanthin. *Proc Natl Acad Sci. USA* 111, 23, 2431–2438

Becker, B. (2013) Snow ball earth and the split of Streptophyta and Chlorophyta. *Trends Plant Sci.* 18, 180–183

Bengtson, S., Belivanova, V., Rasmussen, B., Whitehouse, M. (2009). The controversial “Cambrian” fossils of the Vindhyan are real but more than a billion years older. *Proc Natl Acad Sci. USA* 106, 7729–7734

Berney, C., Pawlowski, J. (2006). A molecular time-scale for eukaryote evolution recalibrated with the continuous microfossil record. *Proc. R. Soc. B* 273, 1867-1872

Blankenship, R.E. (2010). Early evolution of photosynthesis. *Plant Physiol.* 154, 434–438

Buick, R. (2008). When did oxygenic photosynthesis evolve? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363, 2731–2743

Buschmann, C. (2007). Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. *Photosynthesis Res.*, 92, 261–271

Butterfield, N.J., Knoll, A.H., Swett, K. (1994). Paleobiology of the Neoproterozoic Svanbergfjellet Formation, Spitsbergen. *Fossils and Strata* 34, 1–84

Büchel, C. (2015) Evolution and Function of light harvesting proteins. *J Plant Physiol* 2015, 172

C

Cardol, P., Bailleul, B., Rappaport, F., Derelle, E., Be´al, D., Breyton, C., Bailey, S., Wollman, F.A., Grossman, A., Moreau, H., Finazzi, G. (2008). An original adaptation of photosynthesis in the marine green alga *Ostreococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 7881–7886

Cavalier-Smith, T. (2006). Cell evolution and earth history: stasis and revolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361, 969–1006

Chen, M., Telfer, A., Lin, S., Pascal, A., Larkum, A.W.D., Barber, J., Blankenship, R.E. (2005). The nature of the photosystem II reaction centre in the chlorophyll *d* containing prokaryote, *Acaryochloris marina*. *Photochem Photobiol. Sci.* 4(12), 1060–1064

Chen, M., Schliep, M., Willows, R.D., Cai, Z.L., Neilan, B.A., Scheer, H. (2010). A red-shifted chlorophyll. *Science* 329, 1318–1319

Chitnis, P.R. (2001). Photosystem I: Function and physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 52, 593–626

Colbath, G.K. (1983). Fossil prasinophycean phycmata (Chlorophyta) from the Silurian Bainbridge formation, Missouri. *Phycologia* 22, 249–265

D

Evelyne, D., Conchita F., Stephane R., Pierre R., Alexandra Z. W., Steven R., Frédéric P., Sven D., Sophie E., Richard C., Yvan S., Jan W., Kamel J., Chris B., Olivier P., Benoît P., Steven G. B., Jean-Philippe R., François-Yves B., Gwenaël P., Bernard D. B., André P., Michel D., Jacques D., Yves V. de P., Hervé M. (2006). Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 11647–11652.

D’Ordine, R.L., Rydel, T.J., Storek, M.J., Sturman, E.J., Moshiri, F., Bartlett, R.K., Brown, G.R., Eilers, R.J., Dart, C., Qi, Y., Flasiniski, S., Franklin, S.J. (2009). Dicamba monooxygenase: structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *J. Mol. Biol.* 392, 481–497

Douzery, E.J., Snell, E.A., Baptiste, E., Delsuc, F., Philippe, H. (2004). The timing of eukaryotic evolution: Does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 15386–91

E

Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19, 1349

F

Falkowski, P.G., Katz, M.E., Knoll, A.H., Quigg, A., Raven, J.A., Schofield, O., Taylor, F.J.R. (2004). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science*. 305, 354–360

Ferraro, D.J., Gakhar, L., Ramaswamy, S. (2005). Rieske business: structure-function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 175–190

G

Garczarek, L., Hess, W. R., Holtzendorff, J., van der Staay, G. W., Partensky, F. (2000). Multiplication of antenna genes as a major adaptation to low light in a marine prokaryote. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4098–4101

Gassman, M., L. Bogorad. (1967). Control of chlorophyll production in rapidly greening bean leaves. *Plant Physiol.* 42, 774-780

Goodenough, U.W. (1992) Green yeast. *Cell* 70, 533–538

Goss R, Lepetit B. (2015) Biodiversity of NPQ. *J Plant Physiolol.* 172, 13–32

Green, B.R., Durnford, D.G. (1996). The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 685–714

H

Hall, J.D. Delwiche, C.F. (2007). In the shadow of giants: systematics of the charophyte green algae. In: *Unravelling the Algae: The Past, Present, and Future of Algal Systematics*, 155–169. Brodie, J. and Lewis, J., Eds., CRC Press, Boca Raton, FL.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98

Hedges, S.B., Blair, J.E., Venturi, M.L., Shoe, J.L. (2004). A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evol. Biol.* 4, art no. 2.

Herron, M.D., Hackett, J.D., Aylward, F.O., Michod, R.E. (2009). Triassic origin and early radiation of multicellular volvocine algae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 3254–3258

Hirashima, M., Satoh, S., Tanaka, R., Tanaka, A. (2006). Pigment shuffling in antenna systems achieved by expressing prokaryotic chlorophyllide *a* oxygenase in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 281, 15385–15393

Honjoh, K., Yoshimoto, M., Joh, T., Kajiwar, T., Miyamoto, T., Hatano, S. (1995). Isolation and characterization of hardening-induced proteins in *Chlorella vulgaris* C-27: identification of late embryogenesis abundant proteins. *Plant Cell physiol.* 36 (8), 1421-1430

Hori, K., Maruyama, F., Fujisawa, T., Togashi, T., Yamamoto, N., Seo, M., Sato, S., Yamada, T., Mori, H., Tajima, N., Moriyama, T., Ikeuchi, M., Watanabe, M., Wada, H., Kobayashi, K., Saito, M., Masuda, T., Sasaki-Sekimoto, Y., Mashiguchi, K., Awai, K., Shimojima, M., Masuda, S., Iwai, M., Nobusawa, T., Narise, T., Kondo, A., Saito, H., Sato, R., Murakawa, M., Ihara, Y., Oshima-Yamada, Y., Ohtaka, K., Satoh, M., Sonobe, K., Ishii, M., Ohtani, R., Kanamori-Sato, M., Honoki, R., Miyazaki, D., Mochizuki, H., Umetsu, J., Higashi, K., Shibata, D., Kamiya, Y., Sato, N., Nakamura, Y., Tabata, S., Ida, S., Kurokawa, Ken., Ohtani, H. (2014). *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nature communications* 5.

Horie, Y., Ito, H., Kusaba, M., Tanaka, R., Tanaka, A. (2009). Participation of chlorophyll *b* reductase in the initial step of the degradation of light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complexes in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 284, 17449–17456

Horton, P., Ruban, A.V., Walters, R.G. (1996). Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 655–84

Hoshina, R., Imamura, N. (2009). Phylogenetically close group I introns with different positions among *Paramecium bursaria* photobionts imply a primitive stage of intron diversification. *Mol. Biol. Evol.*, 26, 1309-1319.

I

Ito, H., Tanaka, Y., Tsuji, H., Tanaka, A. (1993). Conversion of chlorophyll *b* to chlorophyll *a* by isolated cucumber etioplasts. *Arch Biochem Biophys.* 306(1), 148-151

J

Jakoncic, J., Jouanneau, Y., Meyer, C., Stojanoff, V. (2007). The crystal structure of the ring-hydroxylating dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1. *FEBS J.* 274, 2470–2481

K

Kenrick, P., Crane, P. R. (1997). The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389, 33–39

Kopp, R. E., Kirschvink, J. L., Hilburn, I. A., Nash, C. Z. (2005) The Paleoproterozoic snowball Earth: a climate disaster triggered by the evolution of oxygenic photosynthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 11131–11136

Kunugi, M., Takabayashi, A., and Tanaka, A. (2013). Evolutionary changes in chlorophyllide *a* oxygenase (CAO) structure contribute to the acquisition of a new light-harvesting complex in *Micromonas*. *J. Biol. Chem.* 288, 19330–19341

Kusaba, M., Ito, H., Morita, R., Iida, S., Sato, Y., Fujimoto, M., Kawasaki, S., Tanaka, R., Hirochika, H., Nishimura, M., and Tanaka, A. (2007). Rice NON-YELLOW COLORING1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence. *Plant Cell* 19, 1362–1375

L

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685

Larkum, A.W.D., Scaramuzzi, C., Cox, G.C., Hiller, R.G., Turner, A.G. (1994). Light harvesting chlorophyll *c*-like pigment in *Prochloron*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 679–83

Latasa, M., Scharek, R., Le Gall, F. Guillou, L. (2004). Pigment suites and taxonomic groups in Prasinophyceae. *J Phycol* 40, 1149–1155

Leliaert, F., Verbruggen, H., Zechman, F. W. (2011). Into the deep: new discoveries at the base of the green plant phylogeny. *BioEssays* 33, 683–692

Leliaert, F., Smith, D.R., Moreau, H., Herron, M., Verbruggen, H., Del-wiche, C.F., DeClerck, O. (2012). Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Crit. Rev.PlantSci.* 31, 1–46

Lepetit, B., Volke, D., Szabo, M., Hoffmann, R., Garab, G., Wilhelm, C., Goss, R. (2007). Spectroscopic and molecular characterization of the oligomeric antenna of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochemistry* 46, 9813–9822

M

Martins, B. M., Svetlitchnaia, T., Dobbek, H. (2005). 2-Oxoquinoline 8-monooxygenase oxygenase component: active site modulation by Rieske-[2Fe-2S] center oxidation/reduction. *Structure* 13, 817–824

McCourt, P., Browse, J., Watson, J., Arntzen, C.J., Somerville, C.R. (1985). Analysis of photosynthetic antenna function in a mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) lacking trans-hexadecenoic acid. *Plant Physiol.* 78, 853–858

Meguro, M., Ito, H., Takabayashi, A., Tanaka, R., Tanaka, A. (2011). Identification of the 7-hydroxymethyl chlorophyll *a* reductase of the chlorophyll cycle in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23, 3442–3453.

Miyashita, H., Ikemoto, H., Kurano, N., Adachi, K., Chihara, M., Miyachi, S. (1996). Chlorophyll *d* as a major pigment. *Nature*, 383, 402

Mullet, J.E., Burke, J.J., Arntzen, C.J. (1980). Chlorophyll proteins of photosystem I. *Plant Physiol.* 65, 814–822

N

Nagata, N., Satoh, S., Tanaka, R., Tanaka, A. (2004). Domain structures of chlorophyllide *a* oxygenase of green plants and *Prochlorothrix hollandica* in relation to catalytic functions. *Planta* 218, 1019–1025

Nagata, N., Tanaka, R., Satoh, S., 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

Nagao, R., Takahashi, S., Suzuki, T., Dohmae, N., Nakazato, K., Tomo, T. (2013). Comparison of oligomeric states and polypeptide compositions of fucoxanthin chlorophyll *a/c*-binding protein complexes among various diatom species. *Photosynth Res* 117, 281–288

Nakagawara, E., Sakuraba, Y., Yamasato, A., Tanaka, R., Tanaka, A. (2007) Clp Protease Controls Chlorophyll *b* Synthesis by Regulating the Level of Chlorophyllide *a* Oxygenase. *Plant J.* 49, 800-809

Nakajima, S., Ito, H., Tanaka, R., Tanaka, A. (2012) Chlorophyll *b* reductase plays an essential role in maturation and storability of Arabidopsis seeds. *Plant Physiol.* 160, 261–273

Neilson, J. A., Durnford, D. G. (2010). Structural and functional diversification of the light-harvesting complexes in photosynthetic eukaryotes. *Photosynth. Res.* 106, 57–71

Nickelsen, J., Rengstl, B. (2013). Photosystem II assembly: from cyanobacteria to plants. *Annu Rev Plant Biol.* 64, 609–635

O

Ohtsuka, T., Ito, H., Tanaka, A. (1997). Conversion of Chlorophyll *b* to Chlorophyll *a* and the Assembly of Chlorophyll with Apoproteins by Isolated Chloroplasts. *Plant Physiol.* 113(1), 137-147

Oster, U., Tanaka, R., Tanaka, A., Rudiger, W. (2000). Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll *b* biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 21, 305–310

P

Parke, M., Boalch, G. T., Jowett, R., Harbour, D. S. (1978). The genus *Pterosperma* (Prasinophyceae): species with a single equatorial ala. *J. Mar. Biol. Assoc.* 58, 239–276

Paul F. H., Alan J. K., Galen P. H., Daniel P. S. A. (1998). Neoproterozoic Snowball Earth, *Science* 281, 5381, 1342 - 1346

Polle, J.E., Benemann, J.R., Tanaka, A., Melis, A. (2000). Photosynthetic apparatus organization and function in the wild type and a chlorophyll *b*-less mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. Dependence on carbon source. *Planta* 211: 335–344

Q

Qin, X., Wang, W., Chang, L., Chen, J., Wang, P., Zhang, J., He, Y., Kuang, T., Shen, J. R. (2014). Isolation and characterization of a PSI–LHCI super-complex and its sub-complexes from a siphonaceous marine green alga, *Bryopsis Corticulans*. *Photosynthesis research*, 1-16

Quigg, A., Z. V. Finkel, A. J. Irwin, Y. Rosenthal, T.-Y. Ho, J. R. Reinfelder, O. Scholfield, F. M. M. Morel, P. G. Falkowski. (2003). The evolutionary inheritance of elemental stoichiometry in marine phytoplankton. *Nature* 425, 291–294

R

Roger, A. J., Hug, L. A. (2006). The origin and diversification of eukaryotes: problems with molecular phylogenetics and molecular clock estimation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361, 1039–1054

R.T. Pierrehumbert, D.S. Abbot, A. Voigt., D. Koll. (2011). Climate of the Neoproterozoic. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 39, 417–460

S

Sakuraba, Y., Tanaka, R., Yamasato, A., Tanaka, A. (2009). Determination of a chloroplast degen in the regulatory domain of chlorophyllide *a* oxygenase. *J. Biol. Chem.* 284, 36689 – 36699

Sakuraba, Y., Yokono, M., Akimoto, S., Tanaka, R., and Tanaka, A. (2010). Deregulated chlorophyll *b* synthesis reduces the energy transfer rate between photosynthetic pigments and induces photodamage in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 51, 1055–1065

Sakuraba, Y., Balazadeh, S., Tanaka, R., Mueller-Roeber, B., Tanaka, A. (2012). Overproduction of chl *b* retards senescence through transcriptional reprogramming in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 53, 505–517

Sakuraba, Y., Schelbert, S., Park, S-Y., Han, S-H., Lee, B-D., Andres, CB., Kessler, F., Hortensteiner, S., Paek, N-C. (2012). Stay-green and chlorophyll catabolic enzymes interact at light-harvesting complex II for chlorophyll detoxification during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 507–518

Sartoni, G., Cinelli, F., Hirata, T., Katayama, N., Yokohama, Y. (1993). On the lack of green light-harvesting pigments and the extremely high chlorophyll *b/a* ratio in the deep-water green alga, *Palmophyllum crissum* (Chlorosphaerales). *Japanese Journal of Phycology* 41, 327–331

Satoh, S., Tanaka, A. (2006). Identification of chlorophyllide *a* oxygenase in the *Prochlorococcus* genome by a comparative genomic approach. *Plant Cell Physiol.* 47, 1622–1629

Salyards, S. L., K. E. Sieh, and J. L. Kirschvink (1992). Paleomagnetic Measurement of Nonbrittle Coseismic Deformation Across the San Andreas Fault at Pallett Creek, *J. Geophys. Res.*, 97 (B9), 12457–12470

Shen, B., Dong, L., Xiao, S., Kowalewski, M. (2008). The Avalon explosion: Evolution of Ediacara morphospace. *Science*. 31981–31984

Shimoda, Y., Ito, H., Tanaka, A. (2012). Conversion of chlorophyll *b* to chlorophyll *a* precedes magnesium dechelation for protection against necrosis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 72, 501–511

Stabenau, H., Winkler, U. (2005). Glycolate metabolism in green algae. *Physiol. Plant.* 123235–123245

Steemans, P., Le Herisse, A., Melvin, J., Miller, M. A., Paris, F., Verniers, J., Wellman, C. H. (2009). Origin and radiation of the earliest vascular land plants. *Science* 324, 353.

Strzepek, R.F., Harrison P.J. (2004). Photosynthetic architecture differs in coastal and oceanic diatoms. *Nature* 431, 689–92

T

Takabayashi, A., Kurihara, K., Kuwano, M., Kasahara, Y., Tanaka, R., Tanaka, A. (2011). The oligomeric states of the photosystems and the light-harvesting complexes in the Chl *b*-less mutant. *Plant Cell Physiol.* 52, 2103–2114

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729

Tanaka, A., Ito, H., Tanaka, R., Tanaka, K.N., Yoshida, K. and Okada K. (1998). Chlorophyll *a* oxygenase is involved in chlorophyll *a* formation from chlorophyll *a*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 95, 12719-12723

Tanaka, A., Tanaka, R. (2006). Chlorophyll metabolism. *Curr Opin Plant Biol.* 9(3), 248-255.

Tanaka, R., Tanaka, A. (2011). Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 968–976

Tappan, H. (1980). Palaeobiology of Plant Protists. *Freeman, San Francisco, CA*

Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties, and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680

T. M. Han, B. Runnegar (1992). Megascopic eukaryotic algae from the 2.1-billion-year-old negaunee iron-formation, Michigan. *Science* 257, 232–235.

Tomitani, A., Okada, K., Miyashita, H., Matthijs, H. C., Ohno, T., Tanaka, A. (1999). Chlorophyll *b* and phycobilins in the common ancestor of cyanobacteria and chloroplasts. *Nature* 400, 159–162

Tsugama, D., Liu, S. K., Takano, T. (2011). A rapid chemical method for lysing *Arabidopsis* cells for protein analysis. *Plant Methods* 7, 22, 1–7

U

Urbach, E., D. L. Robertson, S. W. Chisholm. (1992). Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation. *Nature* 355, 267–269

V

Van der Staay, G. W., Yurkova, N., Green, B. R. (1998). The 38-kDa chlorophyll *a/b* protein of the prokaryote *Prochlorothrix hollandica* is encoded by a divergent *pcb* gene. *Plant Mol. Biol.* 36, 709–716

Verbruggen, H., Ashworth, M., LoDuca, S. T., Vlaeminck, C., Cocquyt, E., Sauvage, T., Zechman, F.W., Littler, D. S., Littler, M. M., Leliaert, F., De Clerck, O. (2009). A multi-locus time-calibrated phylogeny of the siphonous green algae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 50, 642–653

W

Worden, A. Z., Lee, J. H., Mock, T., Rouze, P., Simmons, M. P., Aerts, A. L., Allen, A. E., Cuvelier, M. L., Derelle, E., Everett, M. V., Foulon, E., Grimwood, J., Gundlach, H., Henrissat, B., Napoli, C., McDonald, S. M., Parker, M. S., Rombauts, S., Salamov, A., Von Dassow, P., Badger, J. H., Coutinho, P. M., Demir, E., Dubchak, I., Gentemann, C., Eikrem, W., Gready, J. E., John, U., Lanier, W., Lindquist, E. A., Lucas, S., Mayer, K. F., Moreau, H., Not, F., Otilar, R., Panaud, O., Pangilinan, J., Paulsen, I., Piegu, B., Poliakov, A., Robbens, S., Schmutz, J., Toulza, E., Wyss, T., Zelensky, A., Zhou, K., Armbrust, E. V., Bhattacharya, D., Goodenough, U. W., Van de Peer, Y., and Grigoriev, I. V. (2009). Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeukaryotes *Micromonas*. *Science* 324, 268–272

Y

Yamagishi, T., Hishinuma, T., Kataoka, H. (2003). Bicarbonate enhances synchronous division of the giant nuclei of sporophytes in *Bryopsis plumosa*. *J Plant Res* 116, 295–300

Yamasato, A., Nagata, N., Tanaka, R., Tanaka, A. (2005). The N-terminal domain of chlorophyllide *a* oxygenase confers protein instability in response to chlorophyll *b* accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 1585–1597

Z

Zapata, M., Rodriguez, F., Garrido, J. L. (2000). Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 195, 29–45

Zechman, F. W., Verbruggen, H., Leliaert, F., Ashworth, M., Buchheim, M. A., Fawley, M. W., Spalding, H., Pueschel, C. M., Buchheim, J. A., Verghese, B., Hanisak, M. D. (2010). An unrecognized ancient lineage of green plants persists in deep marine waters. *J. Phycol.* 46, 1288–1295

BOOKS

藻類 30 億年の自然史－藻類から見る生物進化・地球・環境－第 2 版 井上 勲 著 (2007)

The Oceans Their Physics, Chemistry, and General Biology H. U. Sverdrup, Martin W. Johnson, Richard H. Fleming. (1942)

7. 謝辞

本研究を行うにあたって、日ごろから懇切なるご指導を頂いた、北海道大学低温科学研究所 田中 歩教授に厚く感謝申し上げます。同じく、ご指導頂いた同研究所 田中 亮一准教授、高林 厚史助教授、伊藤 寿助教授に厚く感謝申し上げます。緑藻 *Palmophyllum crassum* の採取にご協力いただきました、北海道大学理学部生物科学科 小亀 一弘准教授、福山大学生命工学部海洋生物学科 山岸 幸正講師、愛麺株式会社 柴田 健介さん、*Bryopsis plumose* (Hudson) C. Agardh を頂いた京都府立大学生命環境科学研究科 佐藤 壮一郎特任助教授に厚く感謝申し上げます。末筆とはなりましたが、日ごろからお世話頂いた同研究室の学生、スタッフの方々に厚く御礼申し上げます。