

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04381

研究課題名(和文)全酵素同定に基づくクロロフィル代謝の多面的・総合的研究

研究課題名(英文)Comprehensive study of chlorophyll metabolism based on enzyme identification

研究代表者

田中 歩 (TANAKA, Ayumi)

北海道大学・低温科学研究所・特任教授

研究者番号：10197402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：クロロフィル分解の最初の反応を触媒するMg脱離酵素は、その重要さにもかかわらず、これまで同定されていなかった。本研究では、Mg脱離酵素(SGR)を同定し、その活性の測定に成功した。また、SGR1とSGRLで基質特異性が異なることを見出した。これらの研究によってクロロフィル代謝経路の主要な酵素は全て同定された。さらに、SGRは遊離のクロロフィルだけでなく、タンパク質に結合したクロロフィルも基質にすることができ、その結果、色素タンパク質や光化学系の分解において中心的な役割を担っていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Despite its importance, Mg-dechelataase that catalyzes the first step of chlorophyll degradation pathway was not identified. In this study, we found that Mg-dechelataase is encoded by SGR gene and the dechelating activity was successfully measured with the recombinant protein expressed in *E. coli*. We also found that substrate specificity differs between SGR1 and SGRL. By these studies, all major enzymes of the chlorophyll metabolic pathway were finally identified. Furthermore, it was revealed that SGR can catalyze not only free chlorophyll but also chlorophyll bound to protein, thus playing a central role in the degradation of chlorophyll-binding proteins and photosystems.

研究分野：植物生理学

キーワード：色素体機能 光合成

1. 研究開始当初の背景

クロフィル代謝は長年の研究によって大きく発展してきた。緑色植物のクロフィル a 合成経路は、我々が残された最後の酵素を同定することで最終的に確定した (図1)。しかしながら、クロフィル分解の最初で、かつその制御過程を担う Mg 脱離酵素 (クロフィルの中心金属の Mg を引き抜く酵素) や二次共生生物 (褐藻や珪藻、渦鞭毛藻など) を特徴づけるクロフィル c の合成酵素は、その重要性にもかかわらず、同定に成功していなかった。

代謝調節に関しては、申請者は分解シグナル (デグロン) (Plant Cell 2005、JBC 2010) や Lil3 (PNAS 2010) による酵素の安定化を介したクロフィル合成調節を明らかにし、他のグループも Flu 因子による ALA 合成調節など幾つかの機構を提案してきた。しかし、どのようにしてクロフィルの全体量を調節しているのかなど、本質的な機構の理解には至っていない。

一方、クロフィル代謝経路の確定や酵素の同定と前後して、クロフィル代謝の新たな研究が始まった。その一つは、クロフィル代謝が様々な生理的な役割を担っていることである (図1)。申請者も、クロフィル分解中間体であるフェオフォルビド a の細胞死誘導 (PCP 2009)、種子形成におけるクロフィル分解の役割と調節機構 (2012) を明らかにした。

また、クロフィル代謝の進化も多くの研究者の興味を引いてきた。我々もクロフィル代謝と光合成の進化の新しいシナリオを提案し (2011)、代謝経路の進化のシナリオを提唱した (2014)。さらに、代謝を改変することで、Stay green 植物の作製に成功し (2012)、応用研究へと展開し始めた。このように、近年の特徴として、クロフィル代謝研究が多くの生理現象や生物学の基本的な課題と関連して発展してきたことが挙げられる。

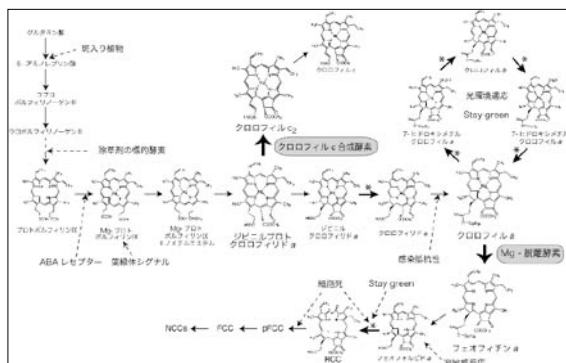


図1 クロフィル代謝経路と多機能性

2. 研究の目的

以上の背景の下、以下のように目的を設定した。①クロフィル代謝に関わる全遺伝子の同定、②代謝酵素の生化学的・酵素学的解析、③代謝調節機構の解明の研究を推進し、クロフィル代謝研究の基盤を整備すると

同時に、それをもとに④クロフィル代謝の多機能性の解明、⑤クロフィル代謝経路の誕生と進化の解明、⑥応用研究への展開に取り組む。

以上の研究を通じてこの分野の研究を全面的に展開し、代謝研究の課題を明らかにし、代謝研究の新しい方向を提案する。特に、緑色植物でクロフィル分解の中心的な役割を担っている Mg 脱離酵素については、その同定が強く求められていた。本プロジェクトが始まる直前に、極めて有望な候補遺伝子が得られたので、最終的に確認することが本プロジェクトの一つの目的であった。

3. 研究の方法

本研究では生理学や生化学、分光学、分子生物学、分子遺伝学、バイオインフォマティクスなど、必要とされる全ての技術を採用する。その他に関しては、通常の技術を利用するが、酵素活性の測定は、工夫が必要と考えている。生物材料としては、シロイヌナズナとクラミドモナスを中心に行い、課題によってはシアノバクテリアと珪藻を用いる。

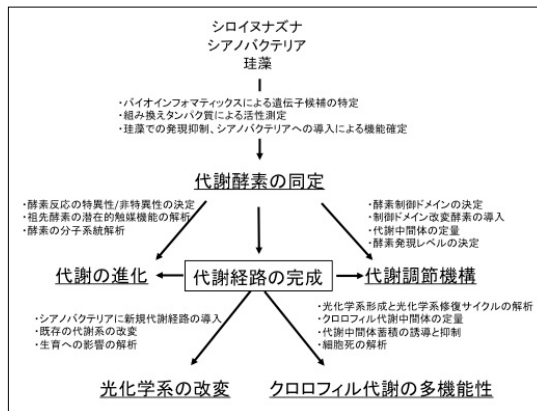


図2 研究課題の関連性と解析方法

4. 研究成果

(1) クロフィル c 合成酵素の同定

我々は、全ゲノムと生物の形質を比較することで、特定の形質に関わる遺伝子を推定するツール CCCT を開発し、多くの酵素遺伝子を同定した (JBC 2008、Plant Cell 2011、PLoS ONE 2013)。このツールを用いたところ、有望な候補遺伝子が得られた。この遺伝子は、ある種のヒドロゲナーゼと相動性があり、クロフィル c 合成の触媒機構と同じであった。しかし、この遺伝子の組み換えタンパク質では、この活性を検出することはできなかった。また、珪藻でこの遺伝子発現を抑制しても、クロフィル c 合成低下は確認できなかった。しかし、この遺伝子の可能性は大きいと考えているので、今後何らかの手法でクロフィル c 合成活性を検出したいと考えている。

(2) Mg 脱離酵素の同定

我々は最終的に Mg 脱離酵素の同定に成功した。この酵素は、SGR と呼ばれていたタン

パク質であった。SGR はメンデルが遺伝学に利用した緑豆の原因遺伝子であり、多くの植物において、その欠損株はステイグリーンの形質を示している。Mg 脱離酵素はクロロフィル分解の最初の反応を担うので、このステップが進行しなければクロロフィルは分解されず、老化のステージでも緑を保持していると考えられる。

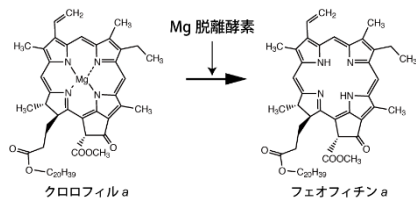


図3 Mg 脱離酵素

これまでに有機物から金属を引き抜く反応を触媒する酵素は報告されていない。そのため、触媒機構は全く不明である。酸性条件下で Mg が離脱すること、逆反応と考えられる Fe-chelatase (Fe をテトラピロール環に挿入する反応を触媒する) は脱プロトンと Fe の挿入が同時に行われていることから、酸性アミノ酸がクロロフィルの N にプロトンを付加することで Mg を離脱すると予想している。詳しい反応機構に関しては現在解析中である。

### (3) Mg 脱離酵素の生理的役割

SGR (Mg 脱離酵素) は遊離のクロロフィルから Mg を引き抜くだけでなく、タンパク質と複合体を形成しているクロロフィルからも Mg を引き抜くことができた。そこで、SGR を一過的に発現させると、ほぼ全てのクロロフィルが分解された。面白いことに、クロロフィルを結合しているタンパク質も分解し、光化学系も全て分解された。現在、光化学系 (クロロフィルタンパク質複合体) の分解は、プロテアーゼが制御していると考えられている。しかし、我々の研究によって、光化学系の分解はクロロフィル分解酵素によって制御されていることが明らかになった。

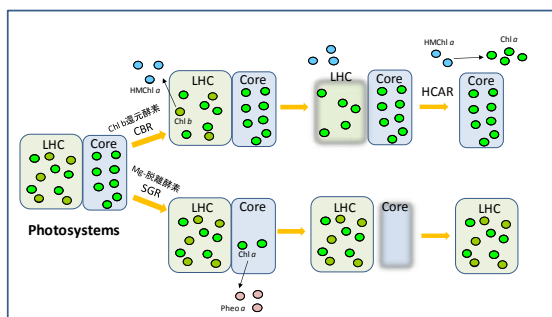


図4 クロロフィル分解酵素による光化学系の分解

### (4) その他の進展

本プロジェクトでいくつかの興味深い進展が見られた。陸上植物では、SGR は老化時のクロロフィル分解に関与するが、クラミドモナスでは SGR 欠損株でもクロロフィル分解は正常に進行し SGR はクロロフィル分解に

関わっていないようである。一方、SGR 欠損株では光化学系 II の形成が抑制された。おそらく、クラミドモナスでは SGR は光化学系 II に必須なフェオフィチン a を供給しているのであろう。

一方、SGR の進化に関しても興味深いことが分かってきた。系統的な解析から、緑色植物の共通祖先が SGR をバクテリアからの水平移動によって獲得したことが示唆された。

### まとめ

本研究により、クロロフィル分解系の遺伝子が全て同定された。その結果、これまでの科学研究費により、クロロフィル代謝経路の確定と酵素の同定が大きく進展した。謝意を表したい。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計16件)

全て査読あり

1. Sato T, Shimoda Y, Matsuda K, Tanaka A and Ito H (2018) Mg-dechelation of chlorophyll a by Stay-Green activates chlorophyll b degradation through expressing Non-Yellow Coloring 1 in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* 222:94-102, <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.01.010>
2. Yamatani H, Kohzuma K, Nakano M, Takami T, Kato Y, Hayashi Y, Monden Y, Okumoto Y, Abe T, Kumamaru T, Tanaka A, Sakamoto W, and Kusaba M (2018) Impairment of Lhca4, a subunit of LHCI, causes high accumulation of chlorophyll and the stay-green phenotype in rice. *J Exp Bot.* 69(5): 1027-1035, <https://doi.org/10.1093/jxb/erx468>
3. Kato Y, Yokono M, Akimoto S, Takabayashi A, Tanaka A and Tanaka R (2017) Deficiency of the Stroma-Lamellar Protein LIL8/PSB33 Affects Energy Transfer Around PSI in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 58(11): 2026-2039, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx124>
4. Kohzuma K, Sato Y, Ito H, Okuzaki A, Watanabe M, Kobayashi H, Nakano M, Yamatani H, Masuda Y, Nagashima Y, Fukuoka H, Yamada T, Kanazawa A, Kitamura K, Tabei Y, Ikeuchi M, Sakamoto W, Tanaka A and Kusaba M (2017) The non-Mendelian green cotyledon gene in soybean encodes a small subunit of photosystem II. *Plant Physiol.* 174(3): 2138-2147, doi: 10.1104/pp.16.01589
5. Hu X, Kato Y, Sumida A, Tanaka A and Tanaka R (2017) The SUFBC2D Complex is Required for the Biogenesis of All Major Classes of Plastid Fe-S Proteins. *Plant J.* 90(2): 235-248 <https://doi.org/10.1111/tpj.13483>

6. 横野牧生、高林厚史、秋本誠志、田中歩 (2017) 光化学系 I -光化学系 II 超複合体の発見と機能、*化学と生物* 55(2):78-80
  7. Hu X, Page MT, Sumida A, Tanaka A, Terry MJ and Tanaka R (2017) The iron-sulfur cluster biosynthesis protein SUFB is required for chlorophyll synthesis, but not phytochrome signaling. *Plant J.* 89(6):1184-1194, doi: 10.1111/tpj.13455.
  8. Furukawa R, Kunugi M, Ihara K, Takabayashi A and Tanaka A (2017) Complete Chloroplast Genome Sequence of the Early-Divergent Green Alga *Palmophyllum crassum*. *Genome Announcement* 5(10): e01745-16, doi: 10.1128/genomeA.01745-16
  9. Takabayashi A, Takabayashi S, Takahashi K, Watanabe M, Uchida H, Murakami A, Fujita T, Ikeuchi M, Tanaka A (2016) PCoM-DB Update: a Protein Co-Migration Database for photosynthetic organisms. *Plant Cell Physiol.*, doi: 10.1093/pcp/pcw219
  10. Matsuda K, Shimoda Y, Tanaka A and Ito H (2016) Chlorophyll a is a favorable substrate for Chlamydomonas Mg-dechelatase encoded by STAY-GREEN. *Plant Physiol Biochem* 109: 365-373, <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.10.020>
  11. Shimoda Y, Ito H and Tanaka A (2016) Arabidopsis STAY-GREEN, Mendel's Green Cotyledon Gene, Encodes Magnesium-Dechelatase. *Plant Cell* 28:2147-2160, doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.16.00428>
  12. Takabayashi A, Niwata A and Tanaka A (2016) Direct interaction with ACR11 is necessary for post-transcriptional control of GLU1-encoded ferredoxin-dependent glutamate synthase in leaves. *Scientific Reports* 2016; 6: 29668. doi:10.1038/srep29668
  13. Jia T, Ito H and Tanaka A (2016) Simultaneous regulation of antenna size and photosystem I/II stoichiometry in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 244(5): 1041-1053 doi: 10.1007/s00425-016-2568-5
  14. Kunugi M, Satoh S, Ihara K, Shibata K, Yamagishi Y, Kogame K, Obokata J, Takabayashi A and Tanaka A (2016) Evolution of Green Plants Accompanied Changes in Light-Harvesting Systems. *Plant Cell Physiol.* 57(6):1231-1243 doi: 10.1093/pcp/pcw071
  15. Sato R, Ito H and Tanaka A (2015) Chlorophyll b degradation by chlorophyll b reductase under high-light conditions. *Photosynth. Res.* 126, 249-259 doi:10.1007/s11120-015-0145-6
  16. Inagaki N, Kinoshita K, Kagawa T, Tanaka A, Ueno O, Shimada H and Takano M (2015) Phytochrome B Mediates the Regulation of Chlorophyll Biosynthesis through Transcriptional Regulation of ChlH and GUN4 in Rice Seedlings. *PLoS One* 2015 Aug 13;10(8):e0135408. doi: 10.1371/journal.pone.0135408.
- [学会発表] (計 4 2 件)
1. Helena Sapeta, Makio Yokono, Atsushi Takabayashi, Yoshifumi Ueno, Seiji Akimoto, Junko Kishimoto, Ayumi Tanaka, M. Margarida Oliveira, Ryouichi Tanaka : Photoprotection mechanisms of the drought-tolerant *Jatropha curcas* plant、第 59 回日本植物生理学会年会、2018
  2. 木村円香、松浦英幸、田中歩、伊藤寿 : SGR によるクロロフィル分解が引き起こすジャスモン酸とエチレンの増加、第 59 回日本植物生理学会年会、2018
  3. 山谷浩史、上妻馨梨、中野道治、高見常明、加藤裕介、林依子、門田有希、奥本裕、阿部知子、熊丸敏博、田中歩、坂本亘、草場信 : イネ stay-green 突然変異体 dye1 の分子遺伝学的解析、第 59 回日本植物生理学会年会、2018
  4. Hyunseok Lim, Samuel Koh, Hisashi Ito, Szilvia Nagy, Taichi Takasuka, Ayumi Tanaka, Yoshiki Nishimura, Ryouichi Tanaka : Intracellular location of  $\beta$ -carotene ketolase in *Haematococcus pluvialis*、第 59 回日本植物生理学会年会、2018
  5. 高橋小春、明賀史純、小澤真一郎、篠崎一雄、高橋裕一郎、田中歩、高林厚史、田中亮一 : クロロフィル合成酵素と光化学系 II アセンブリ複合体は相互作用をしているのか?、第 59 回日本植物生理学会年会、2018
  6. 古川亮、横野牧生、秋本誠志、藤田知道、高林厚史、田中歩 : ヒメツリガネゴケの PSI-PSII 超複合体の解析、第 59 回日本植物生理学会年会、2018
  7. 小畑大地、田中歩、伊藤寿 : クロロフィル a の Mg を脱離する酵素 SGR の触媒機構解析、第 59 回日本植物生理学会年会、2018
  8. Ying Chen, Yousuke Shimoda, Ayumi Tanaka, Hisashi Ito : The effect of chlorophyll degradation by SGR on senescence、第 59 回日本植物生理学会年会、2018
  9. Makio Yokono, Atsushi Takabayashi, Junko Kishimoto, Tomomichi Fujita, Masakazu Iwai, Akio Murakami, Seiji Akimoto, Ayumi Tanaka : PSI-NPQ in higher plants、第 59 回日本植物生理学会年会、2018
  10. Ayumi Tanaka : The role of chlorophyll

- metabolism in the formation and degradation of photosystems., 8th Asia and Oceania Conference on Photobiology, 2017
11. Yukako Kato, Makio Yokono, Seiji Akimoto, Atsushi Takabayashi, Ayumi Tanaka, Ryouichi Tanaka : Deficiency of the Stroma-lamellar Protein LIL8/PSB33 Affects the Dynamics of Light-harvesting Complexes and Energy Transfer around Photosystem I in *Arabidopsis*., Taiwan-Japan Plant Biology 2017, 2017
  12. Helena Sapeta, Makio Yokono, Atsushi Takabayashi, Seiji Akimoto, Junko Kishimoto, Ayumi Tanaka, M. Margarida Oliveira, Ryouichi Tanaka : Photoprotection mechanisms of the drought-tolerant *Jatropha curcas* plant., Taiwan-Japan Plant Biology 2017, 2017
  13. Samuel Wee Han Koh, Hisashi Ito, Ayumi Tanaka, Yoshiki Nishimura, Ryouichi Tanaka : Intracellular localization of  $\beta$ -carotene ketolase in *Haematococcus pluvialis*., 日本植物学会第 81 回大会、2017
  14. Yukako Kato, Makio Yokono, Seiji Akimoto, Atsushi Takabayashi, Ayumi Tanaka, Ryouichi Tanaka : ストロマラメラに局在する Light-harvesting-like タンパク質 LIL8 の機能解析。光合成に関する植物 (シロイヌナズナ) の変異体を生化学的、分光学的に解析、日本植物学会第 81 回大会、2017
  15. 田中 歩 : クロロフィル代謝の機能と進化、第 25 回「光合成セミナー2017: 反応中心と色素系の多様性」、2017
  16. Hisashi Ito: Chlorophyll c1 synthesis from chlorophyll c2., The 73rd Fujihara Seminar, The 4th International Conference "Molecular Life of Diatoms", 2017
  17. Ayumi Tanaka: Mg-dechelataase contributes to the formation and the degradation of photosystems., Chloroplast Metabolism and Photosynthesis Meeting, 2017
  18. 横野牧生、高林厚史、岸本純子、藤田知道、岩井優和、村上明男、秋本誠志、田中 歩 : 緑色植物の PSI-PSII 超複合体、第 8 回日本光合成学会年会およびシンポジウム、2017
  19. 秋山雄希、横野牧生、秋本誠志、田中 歩、田中亮一 : シロイヌナズナにおける ELIP の機能解析、第 58 回日本植物生理学会年会、2017
  20. 小畑大地、下田洋輔、田中 歩、伊藤 寿 : SGRL は光阻害を抑制することで黄化芽生えの緑化に寄与する、第 58 回日本植物生理学会年会、2017
  21. 坂田啓、秋山雄希、高林厚史、明賀史純、篠崎一雄、田中 歩、田中亮一 : 光化学系 II アセンブリー因子 HCF173 および LIL6 は光化学系 II の修復に参与するか?、第 58 回日本植物生理学会年会、2017
  22. 高林厚史、庭田章弘、永森彩奈、田中 歩 : 窒素代謝制御因子 ACR11 の生理的機能の解析、第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年
  23. 古川 亮、高林厚史、田中 歩 : クロロフィル *b* 過剰蓄積植物株における細胞死の解析、第 58 回日本植物生理学会年会、2017
  24. Ying Chen, Yousuke Shimoda, Hisashi Ito, Ayumi Tanaka: The function of SGR in the formation and degradation of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*., 第 58 回日本植物生理学会年会、2017
  25. 佐藤智亮、高林厚史、田中 歩 : シロイヌナズナにおける高バイオマス変異体の解析、第 34 回日本植物細胞分子生物学会(上田) 大会、2016
  26. Ayumi Tanaka: Acclimation of the photosynthetic apparatus., 17th International Congress on Photosynthesis Research, 2016
  27. Hisashi Ito: Chlorophyll degradation by Mg-dechelataase., Photosynthesis Research for Sustainability-2016, 2016
  28. Ayumi Tanaka: Mg-dechelataase initiates chlorophyll degradation and controls the gene expression of chlorophyll metabolism., International Symposium on Plant Signaling and Behavior 2016, 2016
  29. 伊藤 寿 : クロロフィル代謝による光化学系の集光アンテナの制御、第 7 回日本光合成学会年会およびシンポジウム「光合成色素代謝と光化学系構築のダイナミックな関係」、2016
  30. Xueyun Hu, Mike T. Page, Ayumi Tanaka, Matthew J. Terry and Ryouichi Tanaka : Is the iron-sulfur cluster biosynthesis protein SufB involved in chlorophyll synthesis and phytochrome signaling?、第 57 回日本植物生理学会年会、2016
  31. 大野滉平、下田洋輔、伊藤 寿、田中 歩 : シロイヌナズナの SGR によるクロロフィル分解制御、第 57 回日本植物生理学会年会、2016
  32. 古川 亮、功刀 基、井原邦夫、高林厚史、田中 歩 : 緑色植物における光捕集系の進化、第 57 回日本植物生理学会年会、2016
  33. 庭田章弘、高林厚史、田中 歩 : グルタミン酸合成を制御するタンパク質複合体の解析、第 57 回日本植物生理学会年会、2016

34. 松田香織、下田洋輔、伊藤 寿、田中 歩：クラミドモナスのクロロフィル分解酵素 SGR の機能解析、第 57 回日本植物生理学会年会、2016
35. 上妻馨梨、伊藤 寿、渡辺麻衣、永峰茉奈、田中啓介、亀山昭彦、池内昌彦、坂本亘、田中 歩、矢追克郎、海田るみ、太治輝明、草場 信：葉老化時における LHCII 分解への光化学系 II 小サブユニットの関与、第 57 回日本植物生理学会年会、2016
36. 田中 歩：マグネシウム脱離酵素による植物の発育と遺伝子発現制御、第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015
37. Atsushi Takabayashi : Evolution of photosystems in green algae through ice ages., ILTS International Symposium on Low Temperature Science, 2015
38. 伊藤 寿：クロロフィル合成系の酵素と基質の多様性、藍藻の分子生物学 2015、2015
39. Ayumi Tanaka : Identification of Mg-dechelate essential for the degradation of photosystems., Yamada Conference International Symposium on Dynamics and Regulation of Photosynthesis, 2015
40. 藤田拓矢、鈴木雄大、高林厚史、坂田洋一、田中 歩、藤田知道：ヒメツリガネゴケにおけるアブシジン酸による熱放散の制御、日本植物学会第 79 回大会、2015
41. 田中 歩：葉緑体機能改変によるステイグリーン植物の創出、2015 年度生物工学会北日本支部仙台シンポジウム「北日本から世界に発信する環境保全のためのバイオテクノロジー」、2015
42. 伊藤 寿、下田洋輔、松田香織、田中 歩：酵素によるクロロフィルからの Mg の脱離について、第 23 回光合成セミナー、2015

〔図書〕(計 2 件)

1. 田中 歩：朝倉書店、光と生命の事典、2016、436
2. 田中 歩、田中亮一、高林厚史、伊藤 寿、横野牧生：丸善出版、低温科学便覧、2015、383 (第16章 低温下の光合成 337-366)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/plantadapt/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 歩 (TANAKA AYUMI)

北海道大学・低温科学研究所・特任教授

研究者番号：10197402

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

高林 厚史 (TAKABAYASHI ATSUSHI)

北海道大学・低温科学研究所・助教

研究者番号：90546417

伊藤 寿 (ITO HISASHI)

北海道大学・低温科学研究所・助教

研究者番号：50596608