

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19350082

研究課題名（和文） 有機合成化学を基盤とする光受容色素蛋白質フィトクロムの構造と機能の解明

研究課題名（英文） Studies on the Structure and Function of Phytochromes as Photoreceptive Chromoproteins Based on Synthetic Organic Chemistry

研究代表者

猪股 勝彦 (INOMATA KATSUHIKO)

金沢大学・物質化学系・教授

研究者番号：50110599

研究成果の概要（和文）：植物の光形態形成を制御している光受容色素蛋白質フィトクロムの構造と機能を解明するために、開環状テトラピロール骨格を有するビリン系発色団の一般合成法を開発し、多くの新知見を得た。例えば、CD環部分の立体化学を固定したビリベルジン(BV)型発色団を合成し、生理学的に不活性で赤色光吸収型のフィトクロム(Pr)における発色団15位の立体化学は*Z-anti*であり、生理学的に活性で遠赤色光吸収型のPfrでは*E-anti*であることを世界で初めて直接的に解明した。さらにAB環部分の立体化学も解明するなど、有機合成化学を基盤とするフィトクロム研究が極めて有効で、必須の研究手法であることを示すことができた。

研究成果の概要（英文）：Toward investigation of the structure and function of phytochromes as photoreceptive chromoproteins regulating photomorphogenesis in plants, we have developed an efficient and flexible method for the preparation of chromophores (PΦB, PCB, and BV) of phytochromes, and have found a lot of insights into phytochromes. For example, we could directly reveal the stereochemistry of the chromophore in red light absorbing Pr-form and far-red light absorbing Pfr-form of *Agrobacterium* phytochromes, Agp1 and Agp2, by the assembly experiments of the chemically synthesized locked chromophores with apophytochromes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：有機合成化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：フィトクロム, 光受容色素蛋白質, 発色団, 開環状テトラピロール, 全合成, 構造と機能相関, 光分子スイッチ

1. 研究開始当初の背景

光は植物にとってエネルギー源としてだけでなく、発芽や開花などの時期を決めるための情報源としても重要である。長い進化の

過程で、植物は季節による昼夜の長さの変化（光周性）など、環境の変化に適応するための多様な光受容系を獲得した。これらは人間の「視覚」に相当するとも言えるが、現在、赤色光吸収型のフィトクロムや、青色光吸収

型のクリプトクロム及びフォトトロピンなどが知られている。

植物フィトクロム(Phytochrome)は、分子量約 12 万のアポ蛋白質 1 分子に開環状テトラピロール (ビリン) 発色団のフィトクロモビルン(PΦB) 1 分子が A 環でシステイン(Cys)とチオエーテル結合している。生理学的に不活性で約 660 nm の赤色光吸収型の Pr と生理学的に活性で約 730 nm の遠赤色光吸収型の Pfr との間で可逆的に相互変換し、植物の発生や生長、分化等の様々な巨視的光形態形成過程の制御や遺伝子発現などの微視的過程にいたる制御まで広い調節機能を担っていることが知られている。その後フィトクロムは、植物だけでなく藻類やバクテリア中にも見出され、発色団としてそれぞれフィコシアノビルン(PCB)やビリベルジン(BV)が用いられていることが明らかにされた。

フィトクロムのアポ蛋白質は大腸菌や酵母で大量発現させることが可能であるが、発色団部分については、天然型発色団の PΦB は天然に極微量しか存在せず、不安定で単離・精製も極めて困難であることから、従来、発色団の立体構造と再構成フィトクロムの機能に関する研究は、事実上不可能であった。このような状況下で申請者は長年にわたり、関連発色団の一般合成法の確立を目指して系統的な研究を推進し、この分野で世界をリードする成果を挙げてきた。

そこで本研究では、これらの成果をさらに発展させ、フィトクロム発色団の構造と機能の関係解明を目指し、有機合成化学的手法によって発色団の構成成分である四つのピロール誘導体 (A 環~D 環) のさらに簡便な合成法とそれらのカップリング法、カルボン酸側鎖の温和な条件下での保護及び脱保護法を確立し、植物フィトクロム発色団の PΦB だけでなく、D 環 18 位のビニル基がエチル基に変換されたフィコシアノビルン(PCB)や、バクテリア中に見出されるフィトクロムの発色団であるビリベルジン(BV)及びそれらの誘導体をアポ蛋白質と結合可能な遊離のカルボン酸側鎖を有する化合物群として世界に先駆けて合成することを計画するに至った。

2. 研究の目的

フィトクロムは植物の光形態形成を制御している分子量約 12 万の色素蛋白質で、赤色領域の光を吸収する開環型テトラピロール(ビリン)誘導体を発色団として有し、吸収する光の波長により立体構造が可逆的に変化する光分子スイッチとしての機能を有している。しかし、これらのビリン系発色団の合成は困難であり、その上不安定であるため、

これまで発色団の立体構造と機能の関係は全く不明であった。

そこでまず有機合成化学的手法によって発色団の構成成分である四つのピロール誘導体 (A 環~D 環) の簡便合成法および、それらのカップリング法、さらにカルボン酸側鎖の温和な条件下での保護及び脱保護法を確立し、植物フィトクロム発色団の PΦB だけでなく、D 環 18 位のビニル基がエチル基に変換されたフィコシアノビルン(PCB)や、バクテリア中に見出されたフィトクロムの発色団であるビリベルジン(BV)、及びそれらの誘導体をアポ蛋白質と結合可能な遊離のカルボン酸側鎖を有する化合物群として世界に先駆けて合成することを目指した。

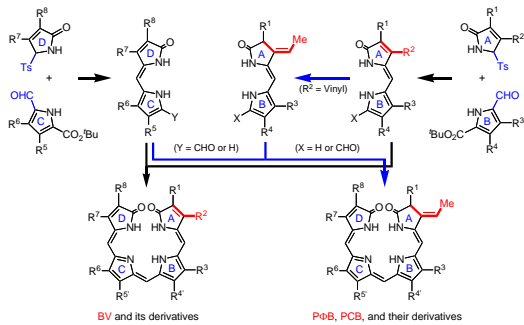
特に最近では、CD 環部位の立体化学を固定した発色団の合成に成功し、Pr 型及び Pfr 型フィトクロム中における発色団の CD 環 15 位の立体化学はそれぞれ、Z-anti, E-antiであることを世界で初めて直接的に解明するなど、フィトクロム研究における有機合成化学的アプローチで先導的な役割を果たしてきた。しかし、AB 環部位の立体化学、光異性化の機構及び、シグナル伝達機構は未だ解明されていないことから、本研究では海外の分子生物学者及び蛋白質の X 線結晶構造解析に関する専門家の協力を得ながら、次に示した具体的課題について、世界を先導する研究成果を目指した。

- (1) 発色団 5 位の立体化学解明を目指した AB 環部位固定型 BV 及び PCB 誘導体の合成
- (2) X 線結晶構造解析を目指した CD 環部位固定型発色団の合成
- (3) AB 環及び CD 環部位の立体化学をともに固定した BV 及び PCB 誘導体の合成と試験管内及び発色団欠損変異株を用いる生体内再構成と表現型(phenotype)の解明
- (4) 光学活性な PCB 誘導体の新規一般合成法の確立
- (5) フィトクロムの簡便精製法の確立を目指したビリン系発色団を用いるアフィニティー・クロマトグラフィーの実現
- (6) ピロール及びジピロール類の新規骨格変換法の開発

3. 研究の方法

我々はすでに、植物の発生や生長、分化などの様々な光形態形成の制御に広く関係して、環境の光情報を植物に伝える重要な役割を担っている光受容色素蛋白質フィトクロムの発色団であるフィトクロモビルン(PΦB)をはじめとするビリン系発色団の柔軟で効率的な合成法を確立している (図 1)。そこ

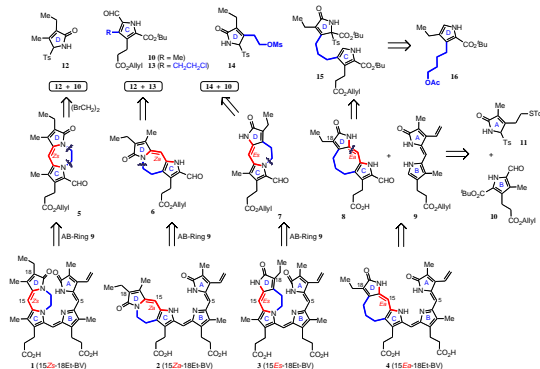
で、有機合成化学の手法を縦横に駆使して、フィトクロムの光合成系遺伝子発現・調節機構の解明を目指し、上記の研究目的の項で示した具体的な課題を次のような方法で達成することを試みた。



(図 1)

(1) 発色団 5 位の立体化学解明を目指した AB 環部位固定型 BV 及び PCB 誘導体の合成

我々はすでに図 2 に従って合成した CD 環部位固定型 BV 誘導体を用い、バクテリオフィトクロム Agp1 及び Agp2 のアポ蛋白質と再構成させて得られる人工フィトクロムの分光学的並びに生物化学的な解析を行い、生理学的に不活性で赤色光吸収型のフィトクロム(Pr)における発色団 15 位の立体化学は Z-anti であり、生理学的に活性で遠赤色光吸収型の Pfr では E-anti であることを世界で初めて直接的に解明した。しかし、AB 環 5 位の立体化学は全く不明であったため、CD 環と同様の有機合成化学的アプローチにより、AB 環部位の立体化学を固定した BV 及び PCB 誘導体を合成し、再構成フィトクロムのスペクトル解析を行った。

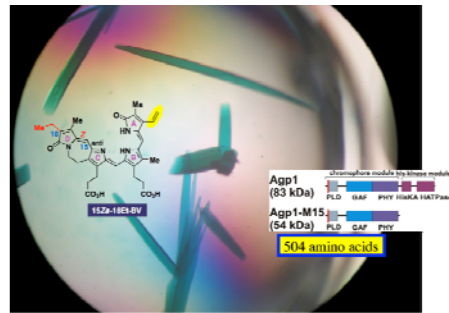


(図 2)

(2) X 線結晶構造解析を目指した CD 環部位固定型発色団の合成

天然型発色団とアポ蛋白質を暗所で再構成すると Pr 型フィトクロムが得られる。一方、天然型フィトクロムの Pfr 型は Pr 型と一部吸収領域が重なるために、常に 10% 程度の Pr 型を含有しており、100% 純粋な Pfr 型フィ

トクロムを得ることは困難である。さらに Pfr 型の単結晶が得られても、操作中に微量の光があたると一部が Pr 型へ光異性化してしまい構造決定は極めて困難となる。しかし、立体固定型発色団は光異性化しないために明所での X 線構造解析が可能になる。そこで、上記の方法により、Pr 型及び Pfr 型に対応した CD 環部位固定型発色団を合成し、再構成フィトクロムの結晶化と構造解析を行った (図 3 参照)。



(図 3)

(3) AB 環及び CD 環部位の立体化学をとともに固定した BV 及び PCB 誘導体の合成と試験管内及び発色団欠損変異株を用いる生体内再構成と表現型(phenotype)の解明

15 位の立体化学を固定した CD 環と 5 位の立体化学を固定した AB 環とをカップリングさせ、AB 環、CD 環部位をとともに固定した BV 及び PCB 発色団を合成して、Pr 型及び Pfr 型フィトクロム中における発色団のスペクトルと比較することにより発色団の立体化学を解明するとともに、発色団欠損変異株を用いる生体内再構成により発色団の構造と各種植物の表現型の関係を解明した。

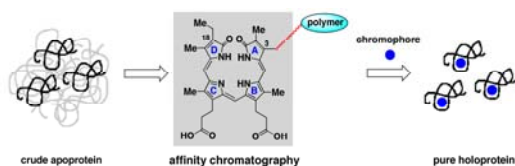
(4) 光学活性な PCB 誘導体の新規一般合成法の確立

植物フィトクロムの発色団である PΦB や PCB はバクテリオフィトクロムの発色団である BV と異なり、2 位に不斉炭素を有する。これまでの予備的な実験によると、この不斉炭素は極めてラセミ化し易いことが観察された。そこで、PCB 誘導体の光学分割法の確立とラセミ化条件を検討した。

(5) フィトクロムの簡便精製法の確立を目指したビリル系発色団を用いるアフィニティー・クロマトグラフィーの実現

植物フィトクロムの X 線結晶構造解析を実現するためには純粋なホロ蛋白質を単離・精製する必要がある。現在、複雑で多段階を要する操作により単離・精製が行われているが、これをより効率的に高純度で単離するために、図 4 に示したようにアポ蛋白質と共有結合できないビリル系発色団を樹脂に固定化した前例のないアフィニティー・クロ

マトグラフィーの実現を試みた。



(図4)

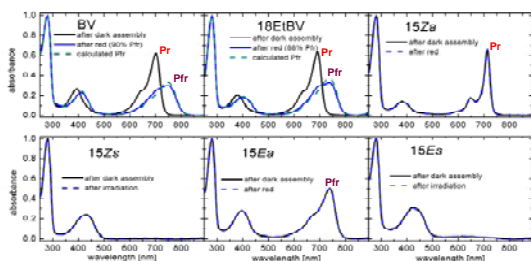
(6) ピロール及びジピロール類の新規骨格変換法の開発

テトラピロールの四つのピロール誘導体 (A環~D環) をそれぞれ修飾する場合、これまでは合成の初期段階から合成し直す必要があった。もし同一のピロールあるいはジピロール類から出発して自由に骨格変換できれば、種々のピリン系色素をより効率良く構築することができる。そこで本研究では、特にピロール及びジピロール類の酸化的修飾法と引き続き置換修飾法を開発し、目的とする立体固定型あるいは置換基修飾型ピリン系色素を柔軟に構築できるより優れた手法を確立した。

4. 研究成果

(1) 発色団 5 位の立体化学解明を目指した AB 環部位固定型 BV 及び PCB 誘導体の合成

我々は植物の光形態形成を制御している光受容色素蛋白質フィトクロムの構造と機能を解明するために、これまで開環状テトラピロール骨格を有するピリン系発色団の一般合成法を開発し、多くの新知見を得た。例えば、CD 環部分の立体化学を固定したピリベルジン (BV) 型発色団を合成し、バクテリオフィトクロム Agp1 及び Agp2 のアポ蛋白質と再構成させて得られる人工フィトクロムの分光学的 (図5) 並びに生物化学的な解析を行い、生理学的に不活性で赤色光吸収型のフィトクロム (Pr) における発色団 15 位の立体化学は *Z-anti* であり、生理学的に活性で遠赤色光吸収型の Pfr では *E-anti* であることを世界で初めて直接的に解明し、世界的に大きな反響を得た。



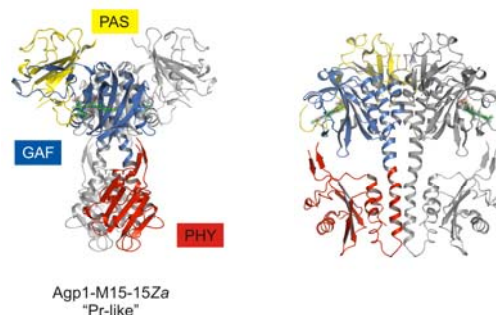
(図5)

さらに今回 AB 環部分の立体化学を固定し

た発色団を合成し、Pfr 型の 5 位の立体配置は *5Z-syn* であることを解明した。

(2) X線結晶構造解析を目指した CD 環部位固定型発色団の合成

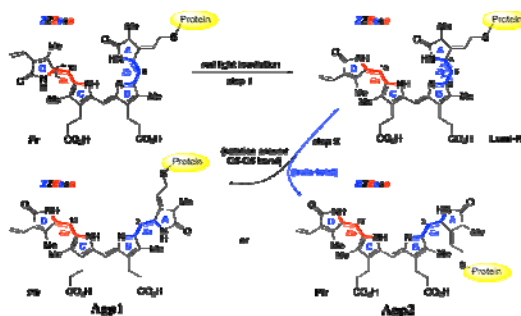
CD 環部位を固定した BV 発色団の合成と Pr 型再構成フィトクロムの単結晶作成に成功し、X線構造解析の結果、図6のような構造を決定することができた。現在、同様な手法により Pfr 型の構造決定を検討中である。



(図6)

(3) AB 環及び CD 環部位の立体化学をともに固定した BV 及び PCB 誘導体の合成と試験管内及び発色団欠損変異株を用いる生体内再構成と表現型(phenotype)の解明

上で Pr 型フィトクロムの立体化学を解明することができたが、Pfr 型については不明であった。そこで AB 環及び CD 環の立体化学を共に固定した発色団を新たに合成し、Pr は *5Z-syn* であり、Pfr 型は Agp1 では *5Z-anti*、Agp2 では *5E-anti* であることを明らかにすることができた (図7)。



(図7)

さらに最近、15Ea-PCB が生体内において活性を示すことを証明するなど、有機合成化学を基盤とするフィトクロム研究が極めて有効で、必須の研究手法であることを示すことができた。

(4) 光学活性な PCB 誘導体の新規一般合成法の確立

PCB 及び 5 位固定型 PCB 誘導体の光学分割に成功した。さらに、これらの光学活性体は温和な塩基性及び酸性条件下で容易にラ

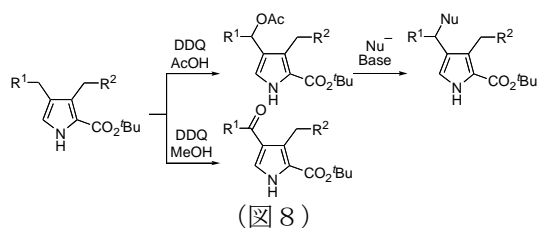
セミ化することを見出した。今後、これらの光学活性発色団とアポフィトクロムとの再構成実験により、光学活性体に関するより詳細な知見が得られるものと期待される。

(5) フィトクロムの簡便精製法の確立を目指したピリン系発色団を用いるアフィニティー・クロマトグラフィーの実現

これまでフィトクロム発色団のA環3位に長鎖アルキル基を導入し、これを介してチオエーテル結合で樹脂に結合させることを検討していたが、カルボン酸側鎖との間の反応性を制御することが困難であった。そこで今回、Click Chemistryの活用を検討したところ、目的実現に向けて有望な結果が得られた。

(6) ピロール及びジピロール類の新規骨格変換法の開発

ピロール及びジピロール類の酸化的修飾法と引き続き置換基修飾法を開発し、目的とする立体固定型あるいは置換基修飾型ピリン系色素を柔軟に構築できるより優れた手法を確立することができた。一例を図8に示す。



今後は、本研究で得られた成果を基盤として、フィトクロムのさらに詳細な構造と機能の解明、光異性化と遺伝子発現にいたるシグナル伝達機構の解明、多様な植物フィトクロムの単離・精製が可能になり、穀物の増産や次世代型光分子スイッチ開発のヒントが得られるものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 31 件)

- ① L.-Y. Chen, R. Iwamoto, Y. Ukaji, K. Inomata, Total Synthesis of Doubly Locked 5Za15Ea-Biliverdin Derivatives; A Convergent Synthesis of the E-anti Dipyrrole Component Locked with a 7-Membered Ring, *Chem. Lett.*, in press, 査読有
- ② T. Ishizuka, A. Kamiya, H. Suzuki, R. Narikawa, T. Noguchi, T. Kohchi, K. Inomata, M. Ikeuchi, The Cyanobacteriochrome, TePixJ, Isomerizes Its Own Chromophore by Converting Phycocyano-

bilin to Phycoviolobin, *Biochemistry*, **50**, 953–961 (2011), 査読有

- ③ R. Sakata, R. Iwamoto, S. Fujinami, Y. Ukaji, K. Inomata, Oxidation of Pyrrole-2-carboxylates with o-Chloranil and Its Synthetic Application, *Heterocycles*, **82**, 1157–1162 (2011), 査読有
- ④ B. Zienicke, L.-Y. Chen, H. Khawn, M. A. S. Hammam, H. Kinoshita, J. Reicher, A. S. Ulrich, K. Inomata, T. Lamparter, Fluorescence of Phytochrome Adducts with Synthetic Locked Chromophores, *J. Biol. Chem.*, **286**, 1103–1113 (2011), 査読有
- ⑤ K. Nishiyama, A. Kamiya, M. S. A. Hammam, H. Kinoshita, S. Fujinami, Y. Ukaji, K. Inomata, Total Syntheses of Sterically Locked Phycocyanobilin Derivatives Bearing a 15Z-anti or a 15E-anti CD-Ring Component, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **83**, 1309–1322 (2010), 査読有
- ⑥ P. Scheerer, N. Michael, J. H. Park, S. Nagano, H.-W. Choe, K. Inomata, B. Borucki, N. Krauß, T. Lamparter, Light Induced Conformational Changes of the Chromophore and the Protein in Phytochromes: Bacterial Phytochromes as Model Systems, *ChemPhysChem*, **11**, 1090–1105 (2010), 査読有
- ⑦ R. Iwamoto, Y. Ukaji, K. Inomata, Regioselective Oxidation of Pyrrole Derivatives with DDQ and Its Synthetic Application, *Chem. Lett.*, **39**, 176–177 (2010), 査読有
- ⑧ Y. Hagiwara, M. Sugishima, H. Khawn, H. Kinoshita, K. Inomata, L. Shang, J. C. Lagarias, Y. Takahashi, K. Fukuyama, Structural Insights into Vinyl Reduction Regiospecificity of Phycocyanobilin: Ferredoxin Oxidoreductase (PcyA), *J. Biol. Chem.*, **284**, 1000–1007 (2010), 査読有
- ⑨ E. M. Franklin, S. Browne, A.-M. Horan, K. Inomata, M. A. S. Hammam, H. Kinoshita, T. Lamparter, G. Golfis, T. J. Mantle, The Use of Synthetic Linear Tetrapyrroles to Probe the Verdin Sites of Human Biliverdin-IX α Reductase and Human Biliverdin-IX β Reductase, *FEBS Journal*, **276**, 4405–4413 (2009), 査読有
- ⑩ L.-Y. Chen, H. Kinoshita, K. Inomata, Synthesis of Doubly Locked 5Zs15Za-Biliverdin Derivatives and Their Unique Spectral Behavior, *Chem. Lett.*, **38**, 602–603 (2009), 査読有
- ⑪ K. Inomata, H. Khawn, L.-Y. Chen, H. Kinoshita, B. Zienicke, I. Molina, T. Lamparter, Assembly of *Agrobacterium* Phytochromes Agp1 and Agp2 with Doubly

- Locked Bilin Chromophores, *Biochemistry*, **48**, 2817–2827 (2009), 査読有
- ⑬ H. Khawn, L.-Y. Chen, H. Kinoshita, K. Inomata, Total Syntheses of Doubly Locked Biliverdin Derivatives toward Elucidation of the Stereochemistry of Phytochrome Chromophore, *Chem. Lett.*, **37**, 198–199 (2008), 査読有
- ⑭ K. Inomata, Studies on the Structure and Function of Phytochromes as Photoreceptors Based on Synthetic Organic Chemistry, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **81**, 25–59 (2008), 査読有
- ⑮ S. Seibeck, B. Borucki, H. Otto, K. Inomata, H. Khawn, H. Kinoshita, N. Michael, T. Lamparter, M. P. Heyn, Locked 5Zs-Biliverdin Blocks the Meta-R_A to Meta-R_C Transition in the Functional Cycle of Bacteriophytochrome Agp1, *FEBS Lett.*, **581**, 5425–5429 (2007), 査読有
- ⑯ 他 17 件
- [学会発表] (計 85 件)
- ① 猪股勝彦, 境界領域を志向した有機合成化学, 有機合成化学協会関西支部・近畿化学協会合成部会主催/有機合成新春講演会, 2011 年 1 月 24 日, 大阪市大阪科学技術センター (大阪府)
- ② K. Inomata, Synthetic Approach to the Structure and Function of Phytochrome Chromophores, 6th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-6), 2010. 7. 8, New Mexico (USA)
- ③ K. Inomata, Studies on the Structure and Function of Phytochromes as Photoreceptors Based on Synthetic Organic Chemistry, 8th International Symposium on Fine Chemistry and Functional Polymers (FCFP-XVIII) & IUPAC 4th International Symposium on Novel Materials and Synthesis (NMS-IV), 2008. 10. 17, Zhenjiang (China)
- ④ K. Inomata, Studies on the Structure and Function of Phytochromes as Photoreceptors Based on Synthetic Organic Chemistry, Ringberg Symposium, Spectroscopy of Sensory Photoreceptors, 2007. 10. 8, Tagungsstätte of the Max-Planck-Gesellschaft “Schloss Ringberg” in Bad Tegernsee (Germany)
- ⑤ K. Inomata, Studies on the Structure and Function of Phytochromes as Photoreceptors Based on Synthetic Organic Chemistry, 2007. 10. 3, Freising Symposium, Light-induced Dynamics of Proteins, Kardinal-Döpfner-Haus, Freising (Germany)
- ⑥ K. Inomata, Studies on the Structure and Function of Phytochromes as Photoreceptors

- Based on Synthetic Organic Chemistry, 2007. 9. 28, The Invited Lecture at Universität Karlsruhe, Botanik 1, Karlsruhe (Germany)
- ⑦ 猪股勝彦, 生命現象解明における有機合成化学的アプローチ—光受容色素蛋白質フィトクロムの構造と機能—, 有機合成化学協会東海支部主催/若手研究者のためのセミナー, 2007 年 7 月 6 日, 信州大学繊維学部 (長野県)
- ⑧ 他 78 件

[図書] (計 1 件)

丸岡啓二, 野崎京子, 石井康敬, 大寺純蔵, 富岡 清 編著, 化学同人, 「使える! 有機合成反応 241 実践ガイド」, 宇梶 裕, 猪股勝彦, 2010 年, 226 頁–227 頁, 288 頁–289 頁, 306 頁–307 頁, 総ページ数 504 頁 [執筆分担]

[その他]

ホームページ等

http://kurt.kanazawa-u.ac.jp/souran_ku/info.php?teacher_id=14

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪股 勝彦 (INOMATA KATSUHIKO)
金沢大学・物質化学系・教授
研究者番号: 50110599