

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究(研究課題提案型)

研究期間：2008～2010

課題番号：20200063

研究課題名(和文)

クロロフィル生合成系酵素を起源とする光依存型ニトロゲナーゼの創出

研究課題名(英文)

Invention of a light-dependent nitrogenase from chlorophyll biosynthesis enzymes

研究代表者：

藤田 祐一 (Yuichi Fujita)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：80222264

研究成果の概要(和文)：クロロフィル生合成系の最終段階を触媒する光依存型プロトクロロフィリド還元酵素(LPOR)は、短鎖脱水素酵素/還元酵素ファミリーに属する。光依存性という特異な性質が進化的にどのように生じてきたのかを明らかにすることは、新たな光依存型酵素を創出する上できわめて重要である。分子系統的に最も早く分岐したと推定される海洋性ラン藻のLPORの活性を確認し、その生化学的性質を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase (LPOR) belongs to a large enzyme family “short-chain dehydrogenase/reductase”. Toward the invention of new light-dependent enzymes it is very important to understand how the light-dependent property of LPOR has been evolved. I have identified a most diverged LPOR in a marine cyanobacterium by biochemical method and determined its enzyme parameters.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2009年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
総計	20,100,000	6,030,000	26,130,000

研究分野：植物生化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学、生物科学・進化生物学

キーワード：光合成、クロロフィル、プロトクロロフィリド、酵素の進化

1. 研究開始当初の背景

進化の過程において新たな酵素の機能は、起源となるタンパク質(酵素)に変異が蓄積し、選抜を受けることによって創出される。多様な酵素の中には、一次構造や立体構造において全く類似性が認められないにもかかわらず同じ反応を触媒する酵素“アナログス酵素”が存在する。このことは、その反応に対する触媒機構には、複数の解が存在し、進化の過程で起源となる酵素が偶発的に選択されてきたことを示唆している。

光合成に必須の色素クロロフィルの生合

成系の最終段階において、プロトクロロフィリド(Pchl_{id})というポルフィリン環化合物がPchl_{id}還元酵素によってその共鳴環構造の一部が還元されクロリン環化合物クロロフィリドaへと変換される(図1)。Pchl_{id}還元酵素には、光依存型と光非依存型というアナログス酵素が存在する。光依存型Pchl_{id}還元酵素(LPOR)は、反応に直接光を要求する非常にユニークな酵素であるが、構造的な理解はほとんど進んでいない。一方、光非依存型(暗所作動型)Pchl_{id}還元酵素(DPOR)は、窒素固定酵素ニトロゲナ

一ゼと構造的な類似性をもつ。ニトロゲナーゼは、分子状窒素 N_2 をアンモニアに変換する反応を触媒する。生物学的にきわめて重要な反応を触媒するにもかかわらず、ニトロゲナーゼは、限られた原核生物にのみしか分布しない。最近申請者らは、DPOR の結晶構造解析からポルフィリン環と N_2 の還元機構の間に共通する構造的な枠組みを見いだした。ポルフィリン環還元反応について2つの酵素が別々に創出されてきたことを考えると、 N_2 の還元反応においても、LPOR を起源酵素にした新たな光依存型ニトロゲナーゼともいべきアナログ酵素の創出が可能かもしれない。

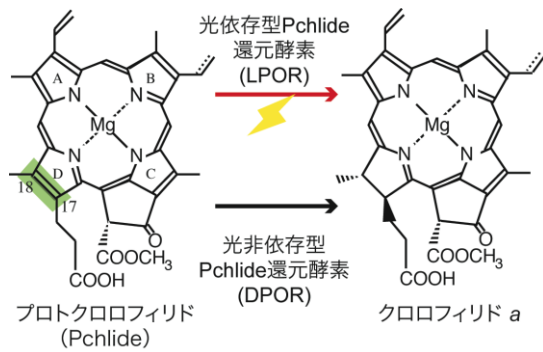


図1. クロロフィル生合成系の最終段階 Pchlide 還元反応。構造的に類縁性のない2つの酵素、光依存型 Pchlide 還元酵素 (LPOR) と暗所作動型 Pchlide 還元酵素 (DPOR) によって、Pchlide の C17=C18 二重結合が還元され、クロロフィル a の直接の前駆体クロロフィリド a が生成する。

2. 研究の目的

本研究では、クロロフィル生合成系において化学的に安定なポルフィリン環を光依存的に還元する酵素 LPOR の進化的起源を明らかにすることを通して、新規な光依存型酵素の創出の可能性を探る。LPOR は、NAD(P)(H)に依存して多様な分子の酸化還元を行う短鎖アルコールデヒドロゲナーゼ (SDR) ファミリーに属する。SDR ファミリーにおいて光依存性という性質を示すのは、LPOR のみである。そこで、SDR ファミリーからどのように LPOR が進化してきたのかを明らかにすることを通して、新規光依存型酵素の創出の可能性を検討する。

海洋性ラン藻 *Synechococcus* sp. CC9311 のゲノムには、3つの LPOR 様遺伝子 (*sync_1162*, *sync_1976*, *sync_2830*) が存在する。これらの配列を含めて LPOR の系統樹を作成すると、Sync_1976 は既知の LPOR、他の2つ Sync_1162 と Sync_2830 はより進化的距離が遠いグループに含まれ、これら2つは LPOR の創出と進化に関わっている可

能性が示唆される (図2)。

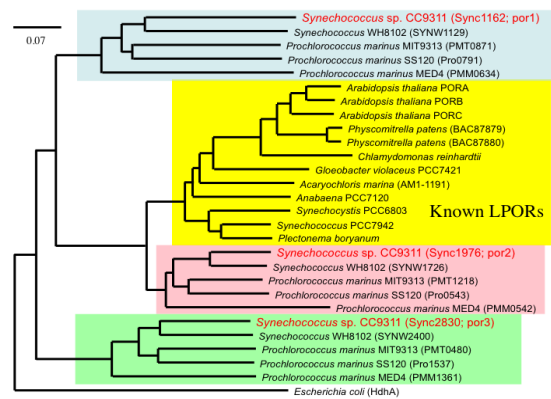


図2. LPORおよびLPOR様タンパク質の分子系統樹。植物、ラン藻のLPORは既知のLPOR (Known LPORs) としてまとまったクレードを形成し、海洋性ラン藻のLPOR 様タンパク質はこれらと離れた3つのグループを形成する。

3. 研究の方法

海洋性ラン藻 *Synechococcus* sp. CC9311 のゲノムを鋳型として、3つの LPOR 様遺伝子 (*sync_1162*, *sync_1976*, *sync_2830*) のコード領域全体を PCR によって増幅し、*E. coli* の大量発現ベクター pASK-IBA5plus に組み込み大量発現プラスミドを構築した。このプラスミドを有する *E. coli* に誘導剤を加えて培養し、可溶性画分を調製した。この可溶性画分を用いて Pchlide 還元活性を測定した。Sync_1976 については、可溶性画分を用いて Pchlide と NADPH に対する K_m 値を算定した。

4. 研究成果

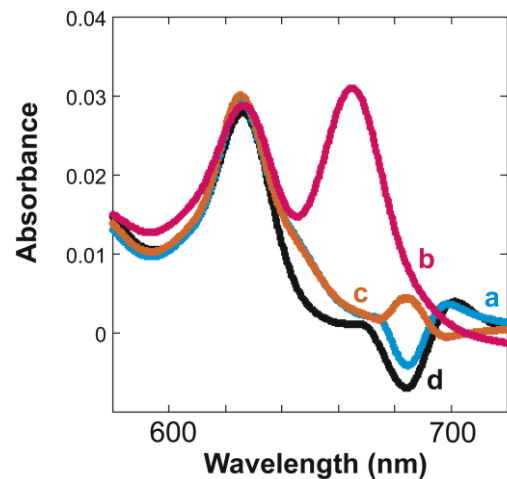


図3. *E. coli* 可用性画分による LPOR 活性。a) *sync_1162*, b) *sync_1976*, c) *sync_2830*, d) *sync_1976* (暗所)。基質濃度 $200 \mu\text{M}$ NADPH、 $2.5 \mu\text{M}$ Pchlide で、光強度 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光を照射し 30°C で 10 分間反応させた。

海洋性ラン藻 *Synechococcus* sp. CC9311

の3つのLPOR様遺伝子を *E. coli* で発現させ、精製タンパク質が光依存型 Pchl_{id}e 還元活性を有するかどうかを検討した。その結果、Strep タグを融合させた Sync_1976のみ明確な Pchl_{id}e 還元活性（光依存的なクロロフィリド *a* 形成）が検出された。他の2つの遺伝子産物では活性を検出することができなかった（図3）。ただし、Sync_1976 以外の2つの遺伝子発現株の可溶性画分では、SDS-PAGE プロファイルにおいて明確なバンドを特定することができなかった。このことから、単に *E. coli* での発現レベルが低すぎたために LPOR 活性を検出できなかったという可能性が残されている。発現レベル改善のため、Strep-tag とは異なるタイプの発現系（GST 融合型、Nus タグ融合型）を検討した。GST 融合タンパク質として、すべてのタンパク質の発現が認められたので、可溶性画分における LPOR 活性を検討したが、他の2つの融合タンパク質のみならず、Sync_1976 融合タンパク質も全く活性を示さなかった。このことは、GST との融合が LPOR としての活性を阻害してしまったと推定され、この系をもちいた活性確認には至らなかった。また、Nus タグ融合タンパク質では、いずれの遺伝子でも発現を確認できなかった。

Strep タグ融合タンパク質として活性の認められた Sync_1976 について、Pchl_{id}e と NADPH に対する Km 値を算定した（表1）。その結果、Sync_1976 の Pchl_{id}e に対する Km 値は、淡水性ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 と同等の値であった。また、NADPH に対する Km についても淡水性ラン藻 *Gloeobacter violaceus* PCC7421 とほぼ同じ値であった。これらの値の比較から、Sync_1976 は、植物よりも淡水性ラン藻の LPOR に近い性質を有していることがわかった。

表1. Sync_1976 の Km 値と他の LPOR との比較

Species	Km value (μM)	
	Pchl _{id} e	NADPH
<i>Synechococcus</i> sp. CC 9311	6.2	22
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	10.83	7.5
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	1.8	0.013
<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	0.50	19.6
<i>Hordeum vulgare</i> (オオムギ)	0.46	35
<i>Avena sativa</i> (エンバク)	0.47	Not determined
<i>Pisum sativum</i> (エンドウ)	0.27	8.7

LPOR の分子系統樹（図2）から、Sync_1976 はこれまででもっとも早く進化

的に分岐した LPOR であり、光依存型という性質が獲得されたのは、海洋性ラン藻が淡水性ラン藻と分岐する以前であることが示唆された。

Synechococcus sp. CC9311 は、カリフォルニア海流の辺縁の水深 95 m から単離された海洋性ラン藻である。この水深では、光強度は非常に低いことから、LPOR が低光強度に適応した特異な性質を示す可能性が想定されたが、調べた限り LPOR としての性質は植物や淡水性ラン藻と変わることはなかった。したがって、この LPOR が機能するのはこのラン藻が比較的海面近くの光強度の高い領域に存在するときであり、水深が深く低光強度においては DPOR を利用して Pchl_{id}e 還元を行っていることが示唆される。本ラン藻のゲノムでは *sync_1976* は、DPOR のサブユニットをコードする3遺伝子 *sync_1973* (*chlN*), *sync_1974* (*chlB*), *sync_1975* (*chlL*) と隣接してコードされており、ターミネータ領域を共有している。このゲノムにおける遺伝子配置は、LPOR と DPOR が協調的に制御されている可能性を示唆している。

活性が得られなかった Sync_1162 と Sync_2830 は、完全には LPOR ではないことが確認できなかったが、もし LPOR ではないと仮定すれば LPOR に分岐する直前の進化的な痕跡かあるいはすでに別の酵素活性をもつように進化してきたのかもしれない。これら2つの LPOR 様遺伝子に変異を導入して LPOR 活性を付与することができれば、光依存型酵素の創出過程を再現することができる可能性がある。

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10件）

1) Takano, Y., Yonezawa, Y., Fujita, Y., Kurisu, G. and Nakamura, H. (2011) Electronic structures of a [4Fe-4S] cluster, [Fe₄S₄ (SCH₃)₃(CH₃COO)], in dark-operative protochlorophyllide reductase (DPOR). *Chem. Phys. Lett.* **503**, 296-300. (査読有り)

2) 藤田祐一、栗栖源嗣 (2011) クロロフィルを緑にする2つの還元酵素: 光依存型酵素と暗所作動型酵素の反応機構と進化的考察 *生物物理* **51**, 66-71 (査読有り)

3) Kondo, T., Nomata, J., Fujita, Y. and Itoh, S. (2011) EPR study of 1Asp-3Cys ligated 4Fe-4S iron-sulfur cluster in NB-protein (BchN-BchB) of a dark-operative protochlorophyllide reductase

complex. *FEBS Lett.*, **585**, 214-218. (査読有り)

4) Reinbothe, C., El Bakkouri, M., Buhr, F., Muraki, N., Nomata, J., Kurusu, G., Fujita, Y. and Reinbothe, S. (2010) Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction. *Trends Plant Sci.* **15**, 614-624. (査読有り)

4) 小俣達男、藤田祐一、前田真一 (2010) 光合成微生物は資源・エネルギー分野で人類に貢献できるか? ~生産性を規定する諸要因の分析~ *光合成研究* **20**, 65-71. (査読有り)

6) Imamura, S., Terashita, M., Ohnuma, M., Maruyama, S., Minoda, A., Weber, A. P. M., Inouye, T., Sekine, Y., Fujita, Y., Omata, T. and Tanaka, K. (2010) Nitrate assimilatory genes and their transcriptional regulation in a unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*: Genetic evidence for nitrite reduction by a sulfite reductase-like enzyme. *Plant Cell Physiol.* **51**, 707-717. (査読有り)

7) Goto, T., Aoki, R., Minamizaki, K. and Fujita, Y. (2010) Functional differentiation of two analogous coproporphyrinogen III oxidases for heme and chlorophyll biosynthesis pathways in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* **51**, 650-663. (査読有り)

8) Muraki, N., Nomata, J., Ebata, K., Mizoguchi, T., Shiba, T., Tamiaki, H., Kurusu, G. and Fujita, Y. (2010) X-ray crystal structure of the light-independent protochlorophyllide reductase. *Nature* **465**, 110-114. (査読有り)

9) Yamamoto, H., Kurumiya S., Ohashi, R. and Fujita, Y. (2009) Oxygen sensitivity of a nitrogenase-like protochlorophyllide reductase from the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Plant Cell Physiol.* **50**, 1663-1673. (査読有り)

10) Masuda, S., Ikeda, R., Masuda, T., Hashimoto, H., Tsuchiya, T., Kojima, H., Nomata, J., Fujita, Y., Mimuro, M., Ohta, H. and Takamiya, K. (2009) Prolamellar bodies formed by cyanobacterial protochlorophyllide oxidoreductase in *Arabidopsis*. *Plant J.* **58**, 952-960. (査読有り)

[学会発表] (計 29 件)

1) 山本治樹・楠見淳子・久留宮祥平・大橋理恵・藤田祐一 「葉緑体にコードされる暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素の RNA editing による活性制御」第 52 回日本植物生理学会年会 (要旨集)、2011 年 3 月 20 日~22 日

2) 野亦次郎・近藤徹・溝口正・民秋均・伊藤繁・藤田祐一 「ニトロゲナーゼ類似型プロトクロロフィリド還元酵素の反応機構の解析」第 52 回日本植物生理学会年会 (要旨集)、2011 年 3 月 20 日~22 日

3) 辻本良真・本松里恵・藤田祐一 「ラン藻を活用した光依存型プロトクロロフィリド還元酵素の機能解析」第 52 回日本植物生理学会年会 (要旨集)、2011 年 3 月 20 日~22 日

4) 青木里奈・井原邦夫・藤田祐一 「ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 のヘムオキシゲナーゼ欠損株の偽復帰変異の解析」第 52 回日本植物生理学会年会 (要旨集)、2011 年 3 月 20 日~22 日

5) 山本治樹・小島寛子・大城香・藤田祐一 「光依存型プロトクロロフィリド還元酵素を大量発現させたラン藻 *Leptolyngbya boryana* における異常な構造体形成」第 52 回日本植物生理学会年会 (要旨集)、2011 年 3 月 20 日~22 日

6) 平出優人・後藤武知・井原邦夫・藤田祐一 「ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 における光依存型プロトクロロフィリド還元酵素欠損株の光感受性形質の相補」第 52 回日本植物生理学会年会 (要旨集)、2011 年 3 月 20 日~22 日

7) 藤田祐一 「プロトクロロフィリド還元酵素を利用した新規ニトロゲナーゼ創出を目指して」“2011 世界化学年”記念 JST さきがけ研究領域合同シンポジウム「人類の危機に挑む研究開発：光と太陽エネルギー」(要旨集) 2011 年 3 月 28 日 (招待講演)

8) 藤田祐一 「暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素：光合成細菌から裸子植物へ」大阪大学蛋白質研究所セミナー：分子科学と生理学が解き明かす植物の光エネルギー変換の新展開、2011 年 3 月 9 日~10 日 (招待講演)

9) Fujita, Y., Muraki, N., Nomata, J. and Kurusu, G. Structure of dark-operative protochlorophyllide reductase: a greening mechanism with an architecture common to nitrogenase. Nagoya University GCOE/Structural Biology Center International Symposium, November 23-24, 2010, Nagoya, Japan (Invited Speaker)

10) Fujita, Y., Muraki, N., Nomata, J. and Kurusu,

G. A common architecture between protochlorophyllide reductase and nitrogenase. 1st Asian Symposium on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, September 20-24, 2010, Miyazaki, Japan (Invited Speaker)

11) Fujita, Y., Muraki, N., Nomata, J. and Kurisu, G. Structure of the light-independent protochlorophyllide reductase reveals architecture common to nitrogenase. 9th European Conference on Nitrogen Fixation, September 6-10, 2010, Geneva, Switzerland (Invited Speaker)

12) 藤田祐一「複数の酵素系を活用した酸素環境に対する適応戦略」ラン藻ゲノム研究交流会（東京）、2010年7月24日（口頭発表）

13) Fujita, Y., Kurisu, G., Muraki, N. and Nomata, J. Structural aspects of dark-operative protochlorophyllide reductase with nitrogenase-like features. 6th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, July 4-9, 2010, Santa Ana Pueblo, NM, USA (Invited Speaker)

14) 山本治樹・久留宮祥平・大橋里恵・藤田祐一「ヒメツリガネゴケ葉緑体 DNA にコードされるニトロゲナーゼ類似酵素のラン藻を用いた機能解析」第 51 回日本植物生理学会年会（熊本）、2010年3月18日～21日（口頭発表）

15) 青木里奈・後藤武知・南崎啓・藤田祐一「ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の 2 つのヘムオキシゲナーゼの機能解析」第 51 回日本植物生理学会年会（熊本）、2010年3月18日～21日（口頭発表）

16) 野亦次郎・張本純平・村木則文・栗栖源嗣・藤田祐一「ニトロゲナーゼ類似型プロトクロロフィリド還元酵素の触媒コンポーネントを構成する BchB 蛋白質の C-末端保存領域の解析」第 51 回日本植物生理学会年会（熊本）、2010年3月18日～21日（口頭発表）

17) 野亦次郎・寺内一姫・藤田祐一「ニトロゲナーゼ類似型プロトクロロフィリド還元酵素の化学量論的解析」第 51 回日本植物生理学会年会（熊本）、2010年3月18日～21日（ポスター発表）

18) 藤田祐一「多様な酸素環境に対するテトラピロール生合成系の適応進化」かざさ DNA 研研究会ラン藻の分子生物学 2009（かざさ DNA 研）、2009年12月4日（口頭発表）

19) 野亦次郎・張本純平・村木則文・溝口正・民秋均・栗栖源嗣・藤田祐一「ニトロゲナーゼ類似型プロトクロロフィリド還元酵素の触媒コンポーネント NB-蛋白質の反応機構の解析」かざさ DNA 研研究会ラン藻の分子生物学 2009（かざさ DNA 研）、2009年12月4日（ポスター発表）

20) 山本治樹・久留宮祥平・大橋里恵・藤田祐一「ラン藻 *Leptolyngbya boryana* を活用した葉緑体のニトロゲナーゼ類似型プロトクロロフィリド還元酵素の機能発現」かざさ DNA 研研究会ラン藻の分子生物学 2009（かざさ DNA 研）、2009年12月4日（ポスター発表）

21) Fujita, Y. Structural basis of nitrogenase-like dark-operative protochlorophyllide reductase catalyzing porphyrin reduction. 16th International Conference on Nitrogen Fixation, June 14-19, 2009, Big Sky, Montana, USA (Invited Speaker)

22) 野亦次郎・張本純平・村木則文・溝口正・民秋均・栗栖源嗣・藤田祐一「ニトロゲナーゼ類似型プロトクロロフィリド還元酵素の触媒コンポーネント NB-蛋白質の立体構造に基づく立体特異的な D 環二重結合還元機構」第 50 回日本植物生理学会年会（名古屋）、2009年3月23日（口頭発表）

23) 山本治樹・久留宮祥平・大橋理恵・藤田祐一「ラン藻 *Leptolyngbya boryana* におけるプロトクロロフィリド還元酵素の酸素感受性」第 50 回日本植物生理学会年会（名古屋）、2009年3月23日（口頭発表）

24) 後藤武知・藤田祐一「ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 のヘム・クロロフィル生合成系における 2 つのコプロポルフィリノーゲン III オキシダーゼ」第 50 回日本植物生理学会年会（名古屋）、2009年3月23日（口頭発表）

25) 青木里奈・後藤武知・南崎啓・藤田祐一「ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 における 2 つのヘムオキシゲナーゼアイソフォームの機能分化」第 50 回日本植物生理学会年会（名古屋）、2009年3月21～22日（ポスター発表）

26) 川尻安志・南崎啓・藤田祐一「ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 におけるクロロフィルの E 環生成に関わる 2 つのアイソフォーム ChlA_I と ChlA_{II} の互換性」第 50 回日本植物生理学会年会（名古屋）、2009年3月21～22日（ポスター発表）

27)小島寛子・大城香・藤田祐一「ラン藻 *Leptolyngbya boryana* における光依存型プロトクロロフィリド還元酵素の大量発現」第50回日本植物生理学会年会(名古屋)、2009年3月21~22日(ポスター発表)

28)藤田祐一「光に依存した新規ニトロゲナーゼ創出の可能性」(財)バイオインダストリー協会“未来へのバイオ技術”勉強会月例会光を利用するものづくりバイオ技術の展望(東京、(財)バイオインダストリー協会2009年3月13日(招待講演))

29)Fujita, Y. Structural aspects of dark-operative protochlorophyllide reductase. International Symposium on Chemistry of Reductases II, January 15-16, 2009, Nagoya, Japan (Invited Speaker)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ：

<http://www.nu-research.com/research/6149.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 祐一 (FUJITA YUICHI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：80222264

(2)研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3)連携研究者

栗栖 源嗣 (KURISU GENJI)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：90294131

大城 香 (OHKI KAORI)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：90101104

寺内 一姫 (TERAUCHI KAZUKI)

立命館大学・生物科学部・准教授

研究者番号：70444370

嶋 盛吾 (SHIMA SEIGO)

マックスプランク研究所・グループリーダー

研究者番号：

野亦 次郎 (NOMATA JIRO)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：40583216