

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06542

研究課題名（和文）光依存型酵素をプラットフォームとした新奇光反応への機能変換

研究課題名（英文）Functional conversion to novel photoreactions using light-dependent enzymes as a platform

研究代表者

山本 治樹（YAMAMOTO, Haruki）

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：80615451

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では光合成色素生成に関わる酵素CORについて、光合成細菌の遺伝子欠損株を用いた *in vivo*相補系を確立し、その実験系を用いて光依存型の酵素LPORにランダムな変異を導入した変異ライブラリからCOR活性を保持する変異LPORのスクリーンを実施した。これまで7万種類以上の変異LPORをスクリーンしたが有意なCOR活性を持つ変異LPORは得られなかった。そこでこのCOR活性評価系を利用して、異なる二つの活性を持つCORについて、その活性の違いを決定づけるアミノ酸残基の特定を行った。その結果BchYのP189Sというアミノ酸変異が活性に有意な影響を与えることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では光合成細菌のCOR欠損株を用いた相補系を確立し高感度でCOR活性の検出を可能とした。その相補系を用いて異なる二つの活性を保持するCORについて、その活性の違いを決定づけるアミノ酸残基について網羅的な探索を行った。その結果活性の変化に影響を与えるBchYのP189Sを含む複数のアミノ酸置換を見出した。このように共通の酵素からアミノ酸置換を経て異なる活性を持つ酵素への分岐していくメカニズムに関する知見は酵素進化において非常に重要な根拠を与える。また本研究課題で開発したCOR検出系はCOR活性を持つ可能性がある機能未知の酵素の活性確認に有用なツールとなると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, an *in vivo* complementation system was established for COR, an enzyme involved in photosynthetic pigment, bacteriochlorophyll biosynthesis, using gene-deficient strains of photosynthetic bacteria, and the experimental system was used to screen mutant LPORs that retain COR activity from a mutant library in which random mutations were introduced into the light-dependent enzyme LPOR. So far, more than 70,000 mutant LPORs have been screened, but no mutant LPOR with significant COR activity was obtained. Therefore, this COR activity evaluation system was used to identify the amino acid residues that determine the difference in activity for the two different kind CORs with different activities. We found that the amino acid mutation P189S in BchY had a significant effect on the activity.

研究分野：生化学

キーワード：光合成色素 クロロフィル 酵素

## 1. 研究開始当初の背景

地球上に生育する生態系は太陽光からの光エネルギーにより支えられており、光エネルギーから生物が利用可能なエネルギーへの変換は光合成生物によって行われる。光合成生物は光エネルギーの吸収にクロロフィルをはじめとする色素を結合するタンパク質複合体を利用し、光吸収によって励起した色素のエネルギーを化学エネルギーへ変換する。これらの光合成反応複合体は緻密に整列したアンテナ構造を持ち、アンテナ色素から反応中心の色素へ励起エネルギーが効率的に集約されるメカニズムが存在する。光合成反応複合体やアンテナ複合体以外にも色素結合タンパク質は存在しており、その多くは光環境の感知に携わる光受容体であり、様々な色調の光を吸収する多くの種類の光受容体が報告されている。本研究課題では代謝酵素として働く色素結合タンパク質である、光依存型プロトクロロフィリド還元酵素(LPOR)に着目する。LPORは基質であるプロトクロロフィリドを結合し、基質が吸収する光エネルギーを利用して反応を触媒する酵素という点で他に類を見ない色素タンパク質複合体である。LPORはクロロフィル生合成の後期の律速反応を触媒し、クロロフィルaの分光学的な性質はこの反応によって決定される。LPORは光照射がある時のみクロロフィル合成が進むような制御システムの一環であるとも考えられ、その光依存性は光による活性制御であるとともに、光エネルギーを利用する酵素という二つの側面を与えている。全く同じ反応を触媒する別の酵素、暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素(DPOR)では、反応に必要な還元力以外に4分子のATPを必要とするのに対し、LPORは還元力のみで反応を触媒する。このことからLPORは光エネルギーをATP4分子分の化学エネルギーに変換していると考えられる。LPORは光の照射によって反応を制御することができる希少な例として、古くからナノ秒レベルでの化学反応の素過程が解析されてきた。そして2021年初めてLPOR基質結合複合体の立体構造が報告され、どのように光エネルギーを利用し反応を触媒しているか議論できる基盤が整いつつある。本研究課題ではこのLPORの光エネルギー利用という性質を応用し、光エネルギーを変換し任意の反応を触媒する新規光利用酵素の創出を試みる。

## 2. 研究の目的

本研究課題ではこのLPORの光エネルギー利用という性質を応用し、光エネルギーを変換し任意の反応を触媒する新規光利用酵素の創出を試みる。具体的にはLPORの基質結合部位の周辺をターゲットにしてランダムな変異を導入し異なる反応を光依存的に触媒する新規酵素の創出を試みる。最初の変換反応のターゲットとしてLPORが触媒する反応(Fig. 1

step 1)に続いて進行するクロロフィリド還元反応に焦点を絞る(Fig. 1 step 2)。クロロフィリド還元反応はCORという酵素が触媒する反応で、LPORが触媒する部位の反対側の炭素二重結合を還元する。この反応はLPORにおける基質の配向を変えることによって実現可能な反応であるためLPORからの機能変

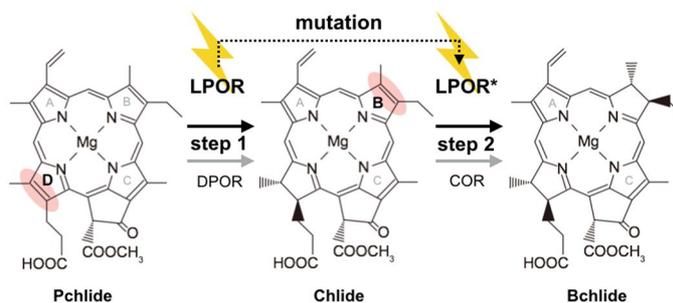


Figure 1 LPORの改変による機能変換スキーム

本来Pchlide還元を行うLPORの活性部位への変異導入により、後  
に続く反応であるChlide還元を光依存的に触媒する新規酵素の創  
出を試みる。

換において最も起こりやすい反応であると考え、最初のターゲットとした。まず、LPORの基質結合に関わるアミノ酸残基周辺を対象としたランダムな変異導入を行い、その変異 LPOR 遺伝子ライブラリから COR 活性を持つ変異 LPOR をスクリーニングする。これまでの研究で LPOR の活性においてプロトン供与に関与するチロシン(Tyr)残基は特定されており、NADPH と Tyr から H<sup>+</sup>が供給されて還元反応が起こると予想されている。この Tyr 残基は保存したまま、基質の結合に関わるアミノ酸残基を変更し LPOR に対する基質の配向を変えることで基質の還元部位を変え COR 反応に変換することを試みる。

### 3. 研究の方法

LPOR における部位特異的なランダムな変異導入は DNA 合成サービスなどを利用し幅広い変異を含蓄するライブラリを作成する。変異の種類は置換変異を基本とし、変異の導入比率をコントロールし対象領域内での変異存在率ごとに幾つかのライブラリ群を作成する。COR 活性を保持する変異 LPOR のスクリーニングでは光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* の COR 欠損株における in vivo の光合成生育能の相補を利用する。*R. capsulatus* の COR 欠損株はバクテリオクロロフィルを生成できないため、光合成条件で生育できない。COR 活性を持つ変異 LPOR が導入されれば、バクテリオクロロフィル生成能が相補され光合成生育が可能となると考えられる。この相補系を使って大規模な変異 LPOR ライブラリから COR 活性を持つものをスクリーニングする。この一次スクリーニングで得られた変異 LPOR について、二次スクリーニングとして精製タンパク質を用いた in vitro での活性測定により COR 活性を評価する。COR 活性を持つ変異 LPOR についてそのアミノ酸置換部位を解析し、その情報を基盤にさらに別の光反応に応用するための LPOR 改変モデルを考察する。

### 4. 研究成果

本研究課題では光依存型 protochlorophyllide 還元酵素(LPOR)に変異を導入し、別の還元反応へ機能変換することを試みた。まず最初の機能返還のターゲットとして、LPORの本来の活性である protochlorophyllide 還元活性の生成物、chlorophyllide に対してさらなる還元反応を行う chlorophyllide 還元酵素(COR)に着目した。大規模なLPOR変異ライブラリを作成し、光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus*のCOR欠損株を利用した in vivo相補系によるスクリーニングを実施した。これまで70,000種類以上の変異LPORをスクリーニングしたが、有意なCOR活性を相補する変異 LPORは得られなかった(Fig. 2)。並行して本研究で確立した in vivoのCORの活性評価系を利用し下記の通り、二つの異なる活性を持つCORの機能変換のメカニズムについて解析を行った。

CORはchlorophyllide(Chlide) aのB環の炭素二重結合を還元しバクテリオクロロフィリド(Bchl) aへ変換する反応を触媒する。しかしBchl bを主要色素として保持する光合成細菌 *Blastochloris viridis* の保有するCORはB環の二重結合の還元ではな



Fig 2 光合成細菌 *R. capsulatus* の光合成スクリーニング。光合成能をもつ変異株はコロニーを形成する

く、8V-Chlide aに対してエチリデン基の生成を行う。このように同じCORでも種によって異なる活性を有することが報告されているが、どのような違いによりこの活性の違いが決定づけられているかは不明である。この活性の違いを決定づけるアミノ酸残基を特定するため、COR欠損株を用いたin vivo活性評価を利用してそのアミノ酸残基の特定を行った。COR欠損株に*B. viridis*のCOR遺伝子**bchY-Z**を導入した株は光合成的には生育しないが、長期の培養により光合成的に生育するリパータントを取得した(Fig. 3)。得られたリパータントにおける**bchY-Z**配列を確認したところ、いくつかのアミノ酸置換を伴う塩基置換が起こっていることがわかった。その中でも最も相補効果が大きいと判断されたBchYのP189S変異に着目して、そのリパータントが持つ色素の解析、COR\_P189Sの活性の変化を解析した。その結果、COR\_P189Sは元来のエチリデン基生成活性を維持しつつ、Bchlide aへの活性を獲得していることを見出した。構造予測から推測される変異箇所から金属中心の構造に変化をもたらしたこのような活性の変化が生じたと考えられる。

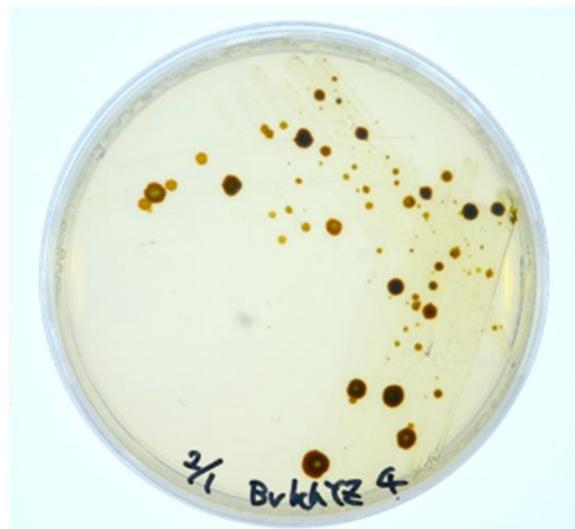


Fig. 3  $\Delta bchYZ/BvYZ$  株を長期培養することで出現した *pseudo revertant*. これら一つ一つが異なるアミノ酸変異を持ち、光合成能の獲得すなわちバクテリオクロロフィルの生合成が相補されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamamoto H, Uesaka K, Tsuzuki Y, Yamakawa H, Itoh S, Fujita Y	4. 巻 Jul 7;10(7)
2. 論文標題 Comparative Genomic Analysis of the Marine Cyanobacterium <i>Acaryochloris marina</i> MBIC10699 Reveals the Impact of Phycobiliprotein Reacquisition and the Diversity of <i>Acaryochloris</i> Plasmids.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms10071374.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsuzuki Y, Tsukatani Y, Yamakawa H, Itoh S, Fujita Y, Yamamoto H	4. 巻 Mar 29;11(7)
2. 論文標題 Effects of Light and Oxygen on Chlorophyll d Biosynthesis in a Marine Cyanobacterium <i>Acaryochloris marina</i> .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 915
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants11070915.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山本治樹
2. 発表標題 海洋性シアノバクテリア <i>Acaryochloris marina</i> MBIC10699のゲノム比較解析から考察する <i>Acaryochloris</i> の多様性の獲得戦略
3. 学会等名 ラン藻ゲノム交流会2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Tsuzuki, Yusuke Tsukatani, Hisanori Yamakawa, Shigeru Itoh, Yuichi Fujita, and Haruki Yamamoto
2. 発表標題 Effects of light and oxygen on chlorophyll d biosynthesis in a marine cyanobacterium <i>Acaryochloris marina</i>
3. 学会等名 17th International symposium on photosynthetic prokaryote（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 都築侑季、塚谷 祐介、山川壽伯、伊藤繁、藤田祐一、山本治樹
2. 発表標題 海洋性シアノバクテリアAcaryochlorisのクロロフィルd合成における光と酸素の影響
3. 学会等名 藍藻の分子生物学2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小幡京香、塚谷祐介、藤田祐一、山本治樹
2. 発表標題 異なる活性を持つ二つのCORにおける活性の違いを決定づけるアミノ酸残基の探究
3. 学会等名 第13回日本光合成学会年会およびシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuki Tsuzuki, Yusuke Tsukatani, Hisanori Yamakawa, Shigeru Itoh, Yuichi Fujita, and Haruki Yamamoto
2. 発表標題 Light and oxygen requirements for chlorophyll d biosynthesis on marine cyanobacterium Acaryochloris marina
3. 学会等名 15th International conference on Tetrapyrrol photoreceptors in photosynthetic organisms (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------