

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870003

研究課題名（和文）バイオインフォマティクスの手法を用いたクロロフィル代謝経路の確立

研究課題名（英文）Challenging for finding unknown chlorophyll metabolism enzymes.

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

公開マイクロアレイデータを用いた共発現解析と系統プロファイル解析を組み合わせた解析により、7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase の候補遺伝子を選抜し、その後の変異株解析により有力な候補を得た。また、BN-PAGE を用いてクロロフィル代謝系の酵素群がタンパク質複合体を形成しているかどうかを網羅的に解析し、新たな知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

We have selected the candidates of the 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase based on the bioinformatic method using the co-expression analysis and phylogenetic profiling, and we found the major candidate. In addition, we have comprehensively detected the protein complexes which contain the known enzymes regarding chlorophyll metabolism by BN-PAGE.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,030,000	609,000	2,639,000

研究分野：光合成

科研費の分科・細目：植物分子生物学・生理学（5703）

キーワード：クロロフィル代謝、バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

高等植物は太陽光エネルギーを「光合成」で化学エネルギーに変換することで、栄養成長や生殖成長を行っている。そのため、植物個体全体での光合成活性を高く保つことは重要である。その一方、葉には寿命があり、光合成活性は徐々に低下していく。そこで植物は古い葉を分解し、養分を新しい葉に転流することで、個体全体での光合成能力を高く維持している。

その際に重要な役割を担うのが、クロロフィル代謝系である。高等植物では光エネルギー

を集めて、光合成を行うためにクロロフィル a とクロロフィル b の 2 種類を用いている。

具体的な使い分けとしては、光化学系の反応中心ではクロロフィル a のみが用いられるが、周辺集光アンテナではクロロフィル a とクロロフィル b が用いられる。光化学系反応中心は光合成生物で広く高度に保存されているが、周辺集光装置については多様性が見られる。それに伴い、クロロフィル a は光合成生物で保存されているが、クロロフィル b を持つのは緑藻と陸上植物だけである。

その量比の調節は合成系と分解系のバラ

ンスにより厳密に行われている。その比率が大きく異なった変異株は光酸化ストレスに弱いなどの表現型を示す。しかし、その代謝経路は未だ確定されておらず、その制御機構には未知な点が多く残されている。

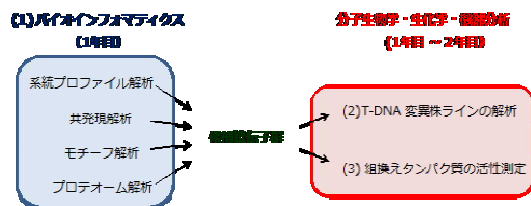
2. 研究の目的

本研究では、バイオインフォマティクスの手法、すなわち、1)ゲノム情報を用いた系統プロファイル解析と2) 公開マイクロアレイの発現情報を用いた共発現解析、を組み合わせ、未同定の酵素を決定し、クロロフィル代謝経路の確定を目指した。

同時に、別のアプローチとして、クロロフィル代謝関連タンパク質がタンパク質複合体を形成するかどうかを網羅的に調べることで、既知の関連タンパク質群と相互作用する未同定の酵素の決定を目指した。

クロロフィル分解の初発段階の2つのステップを司る酵素、すなわち、1) クロロフィルbをaに転換する反応の2段階目の反応を司る7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase、および、2) クロロフィルa からMgを引き抜く反応を司るMg-dechelataaseの同定が本研究の目標である。

3. 研究の方法



まず、バイオインフォマティクスの手法を用いた解析、すなわち共発現解析と系統プロファイル解析を組み合わせた解析により、7-hydroxymethyl chlorophyll a reductaseの候補の探索を行った。具体的には、1) クロロフィル分解経路の既知の遺伝子群と発現プロファイルが類似するシロイヌナズナ遺伝子群のうちを選抜し、2) さらにその遺伝子群の中で、クロロフィルbを持つ光合成生物のゲノムにホモログ遺伝子が存在し、クロロフィルbを持たない光合成生物のゲノムにホモログ遺伝子が存在しないような遺伝子群を選抜した。

次に、変異株の種子を取り寄せ、ホモライン（ノックアウトライン）の確立を進めた。それらの植物体については、PAMクロロフィル蛍光解析を用いた光合成パラメーターの測定と共に、クロロフィル色素分析を行うことで、7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase活性が欠損しているかどうかを判断することにした。

また、Mg-dechelataaseの同定は上記のアプローチでは困難であると判断し、既知のクロロフィル代謝関連酵素と相互作用するタンパク質の網羅的な選抜を並行して行った。具体的には、BN-PAGEとLC-MS/MS解析を組み合わせた新しい手法の開発を試みた。

4. 研究成果

(1) バイオインフォマティクスの手法を用いた7-hydroxymethyl chlorophyll a reductaseの探索

ATTED-II (<http://atted.jp/>) データベースを用いて、シロイヌナズナのクロロフィルb還元酵素である、NOL 遺伝子、もしくはNYC1 遺伝子に対して、順位相関 (MR) が 200 以内の遺伝子群をリストアップした。

次に、それら遺伝子がコードするタンパク質アミノ酸配列をクエリーとして、BlastP プログラムを用いて、それら遺伝子のホモログが 緑藻 (C. reinhardtii, M. pusilla, O. lucimarinus, O. tauri)、珪藻 (T. pseudonana, P. tricornutum)、紅藻 (C. merolae)、陸上植物 (O. sativa, P. patens) にどこまで保存されているかを調べた。もしも、遺伝子がクロロフィルb→クロロフィルaの転換に関わっていれば、緑藻と高等植物では高い相同性を持つホモログが存在し、珪藻や紅藻では存在しないはずである。

その結果、17遺伝子を7-hydroxymethyl chlorophyll a reductaseの候補として見出した。それら遺伝子群の大多数は葉緑体局在の機能未知遺伝子であり、アミノ酸配列情報からは Rieseke 鉄硫黄ドメインや Flavin ドメイン、TPR ドメイン等を有していることが明らかとなった。これらの機能ドメインが7-hydroxymethyl chlorophyll a reductaseの活性に関与する可能性は十分にあるため、有望であると考えた。さらに、1つはその機能破壊が7-hydroxymethyl chlorophyll a の蓄積を生じさせることが既に当研究室で明らかになっていた遺伝子であった。ただし、この遺伝子の機能は不明であり、7-hydroxymethyl chlorophyll a reductaseそのものであるのか、何らかの形でその酵素反応に間接的に関わっているのかはこれまで明らかでなかった。

(2) 変異株の PAM クロロフィル蛍光解析とクロロフィル色素分析

選抜した 17 遺伝子のうち、14 遺伝子 (At1g07040, At1g32160, At1g50450, At1g54570, At1g55480, At1g73980, At1g77090, At2g24820, At2g27680, At3g03890, At3g17250, At4g25650, At4g31530, At5g06130, At5g20300, At5g

27560) について T-DNA 挿入変異株を取り寄せ、その表現型を調べた。

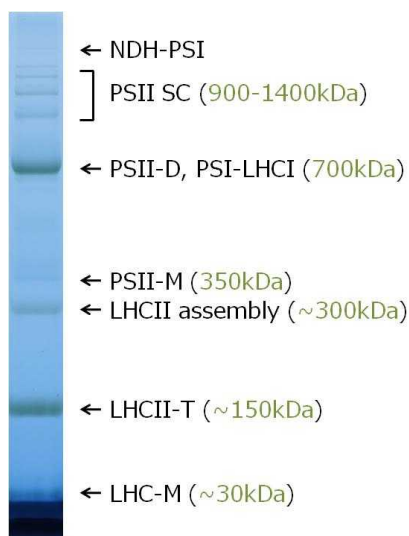
PAM クロロフィル蛍光解析を行った結果、当研究室での選抜で既に単離されていた 7-hydroxymethyl chlorophyll *a* を蓄積する遺伝子変異株は、通常条件では Fo, Fv/Fm とともに野生型とほとんど変わらないものの、暗処理後には、Fo が上昇し、Fv/Fm が低下する、いわゆる high Fo 型の表現型を示した、さらに、その個体は暗処理後にクロロフィル分解が遅延する、“stay-green”表現型を示した。これら表現型は 7-hydroxymethyl chlorophyll *a* を蓄積する既知の遺伝子変異株である *hmc1* 変異株 (Nagane et al., 2010, *Planta*) でも見られた。

一方、新たに取り寄せた T-DNA 挿入変異株については、PAM クロロフィル蛍光解析で野生型と差がある植物体は見いだせなかった。その傾向は植物個体を暗処理しても変わらなかった。さらに、暗処理後に色素分析を行ったが、やはり違いは見いだせなかった。

クロロフィル *b* 還元酵素との遺伝子発現プロファイルの類似と、クロロフィル *b* を利用する生物種でのみホモログが保存されていること、またその表現型から、現時点では、当研究室で選抜していた 7-hydroxymethyl chlorophyll *a* を蓄積するシロイヌナズナ変異株の原因遺伝子が 7-hydroxymethyl chlorophyll *a* reductase の可能性が高いと考えている。

(3) BN-PAGE と LC-MS/MS を用いた既知のクロロフィル代謝関連酵素と相互作用するタンパク質群の網羅的な検出

BN-PAGE と LC-MS/MS 解析を組み合わせた新しい手法を開発することで、既知のクロロフィル代謝関連酵素と相互作用するタンパク質の網羅的な選抜を行った。



具体的な実験手法としては、まず、シロイヌナズナの葉から無傷葉緑体を単離し、ショ糖密度勾配遠心法によって高純度のチラコイド膜を調整した。

次に、界面活性剤である Dodecyl Maltoside を用いてチラコイド膜タンパク質を可溶化し、BN-PAGE で分離した (図)。

その後、LC-MS/MS 解析により、チラコイド膜に含まれるタンパク質複合体を (CBB 染色や銀染色で検出できない量のタンパク質も含めて) 網羅的に検出した。

その結果、LHC-like タンパク質の 1 つである Li13 タンパク質と geranylgeranyl reductase が相互作用している事を見出した。この結果は、ウエスタン解析においても確認できた (業績 1)。

さらに、PAO (pheophorbide *a* oxygenase)、PPOX (protoporphyrinogen oxidase)、POR (NADPH-protochlorophyllide oxidoreductases)、RCCR (red chlorophyll catabolite reductase) がタンパク質複合体を形成していることも見出した。

ただし、これらの酵素が homomeric な複合体を形成しているのか、もしくは heteromeric な複合体を形成しているのかについては、今後のさらなる実験系の改善が必要である。

Mg-dechelataase は PPH (pheophytinase) と相互作用している可能性があるが、本研究では検出できなかった。今後は検出感度を上げる、または老化処理を行うなどして、PPH が検出できるように検出系を工夫していきたいと考えている。

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 4 件)

1. Ryoichi Tanaka, Maxi Rothbart, Seiko Oka, Atsushi Takabayashi, Kaori Takahashi, Masaru Shibata, Fumiyoshi Myouga, Reiko Motohashi, Kazuo Shinozaki, Bernhard Grimm, Ayumi Tanaka. LIL3, a light-harvesting-like protein, plays an essential role in chlorophyll and tocopherol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 107, pp16721-16725, 2010. (査読有り)

2. 高林厚史 “ゲノム世代のタンパク質複合体解析” 光合成研究, 20, pp60-64, 2010 (査読有り)

3. Shinya Yabuta, Kentaro Ifuku, Atsushi Takabayashi, Seiko Ishihara, Kunio Ido,

Noriko Ishikawa, Tsuyoshi Endo, Fumihiko Sato. Three PsbQ-like proteins are required for the function of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*, 51, pp866-876, 2010

(査読有り)

4. Risa Mutoh, Hiroyuki Mino, Reiko Murakami, Tatsuya Uzumaki, **Atsushi Takabayashi**, Kentaro Ishii, Masahiro Ishiura. Direct interaction between KaiA and KaiB revealed by a site-directed spin labeling electron spin resonance analysis. *Genes to Cells.*, 15, pp269-280, 2010 (査読有り)

[学会発表] (計2件)

5. **Atsushi Takabayashi**, The application of BN-PAGE for comprehensive detection of the protein complexes in the chloroplast. 日本植物生理学会、2011年3月20日、東北大学(仙台市)

6. **高林厚史**、クロロフィル *b* 蓄積変異株におけるチラコイド膜タンパク質の網羅的解析、日本植物生理学会、2010年3月20日、熊本大学(熊本市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし