

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26660084

研究課題名(和文) 高い形質転換効率をもつシアノバクテリアによる新規光依存型酵素の創成

研究課題名(英文) Creation of new light-dependent enzymes using cyanobacteria with high transformation efficiency

研究代表者

藤田 祐一 (FUJITA, Yuichi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：80222264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：酸素発生型光合成生物のクロロフィル生合成系では、光によって触媒作用を駆動する酵素光依存性プロトクロロフィリド還元酵素(LPOR)が作動している。LPORは、短鎖デヒドロゲナーゼファミリーに属する酵素であり、本ファミリーの共通構造に加えて光で作動する機能の基盤となる固有のループ構造を有する。本研究では、このループ構造を除去した変異LPORから、合成セミランダムDNAから新たなLPORの再創出を試みたが、現時点で新たなLPORを得るところには至っていない。合成セミランダムDNAに2塩基程度の誤差があること、親株に強光耐性を有する細胞集団が含まれていることが、主な技術的ハードルとなることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Light-dependent protochlorophyllide reductase (LPOR), which requires light for catalysis, operates in chlorophyll biosynthesis. LPOR belongs to the short chain dehydrogenase (SDR) family and has an intrinsic loop structure that provides the structural basis for the light-driven catalytic function in addition to the common structure of the SDR family. In this study, we tried to re-create a new LPOR from a library constructed using synthetic semi-random DNA in the cyanobacterial mutant, in which shows a lethal phenotype under high light conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803. However, at the moment, a mutant carrying such a new LPOR has not yet isolated. We consider two main technical hurdles that should be solved in future; 1) semi-random DNA fragments have length variation (± 2 bases) in current synthetic technology. 2) the parental strain contains a cell population bearing high-light tolerant revertants, which may be generated by high mutation rate in the *recJ* mutant.

研究分野：植物生化学

キーワード：光依存型プロトクロロフィリド還元酵素 シアノバクテリア クロロフィル生合成 酵素 進化

1. 研究開始当初の背景

生命が長い進化の中で創出してきた多様な酵素には、ほぼ同じ立体構造をとりながら、触媒する反応が大きく異なる酵素群が存在する。このことは、酵素が長年にわたる遺伝子変異による多様な構造変化を受け入れ新たな触媒作用を獲得するという“可塑的な”性質を示している。この魅力的な性質は、生物が長期的な環境変化に応じて代謝を多様化させていく原動力となっており、新たな酵素創出の可能性を示すものでもある。

多様な酵素の中には光によって触媒作用を駆動させる酵素が存在する。このような光依存型酵素は極めて希有であり、これまでに DNA の光修復を行う DNA フォトリアーゼとクロロフィル生合成系の光依存型プロトクロロフィリド還元酵素 (LPOR) の 2 例のみが知られている。光による酵素作用の駆動は、それらを選抜した要因と進化プロセスという点で非常に興味深いだけでなく、その解明は新たな光駆動性酵素を創出する可能性を拓く。LPOR は、植物のクロロフィル生合成の最終段階で作用する酵素で、光により NADPH のヒドリド転移反応とチロシン残基からのプロトン移動を駆動し、プロトクロロフィリド (Pchl_{id}) のポルフィリン環共鳴構造の一部 C17=C18 二重結合を還元する (図 1)。

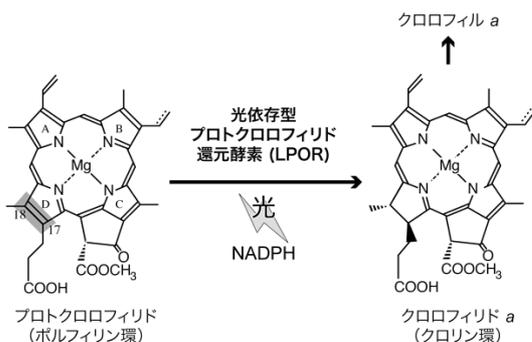


図 1. 光依存型プロトクロロフィリド還元酵素 (LPOR) は、ポルフィリン環の共鳴構造の一部 C17=C18 二重結合を、光依存的に還元する。光は、Pchl_{id} を励起し、それにより NADPH からヒドリド転移とチロシン残基からのプロトン転移が誘起され、反応が完結する。クロロフィリド a はクロロフィル a の直接の前駆体となる。

LPOR は、多様な反応を触媒する酵素を含む短鎖デヒドロゲナーゼ/レダクターゼ (SDR) ファミリーに属し、植物の緑化の光依存性を規定するキー酵素である。被子植物芽生えが暗所で黄化するの、LPOR の反応が暗所では作動できないためである。これまでに LPOR についての研究は、黄化した植物

などを用いた生理学的側面と酵素化学的な側面から、分光分析を中心として活発に行われてきた [1]。しかし、このような興味深い光依存型酵素がどのように進化してきたのかについては、申請者による環境の酸素レベルの関与以外に具体的な議論はほとんどなされていない [2,3]。

参考文献

1. Sytina OA, Heyes DJ, Hunter CN, Alexander MT, *et al.* (2008) *Nature* **456**, 1001-1004.
2. Yamazaki S, Nomata J, Fujita Y (2006) *Plant Physiol.* **142**, 911-922.
3. Kavanagh KL, Jörnvall H, Persson B, Oppermann U (2008) *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3895-3906.

2. 研究の目的

本研究では、最近申請者が確立した高い形質転換効率をもつシアノバクテリアと、終止コドンを含まない合成ランダム DNA 断片を活用して、LPOR が創出された進化の過程を再現する。さらに、LPOR の構造基盤を利用した新たな光依存型酵素の創出を試みる。

3. 研究の方法

光依存型プロトクロロフィリド還元酵素 (LPOR) は、短鎖デヒドロゲナーゼ/レダクターゼ (SDR) ファミリーに属する。LPOR の N 末端と C 末端ドメインは SDR の共通構造基盤をなし、光依存性反応は中央の約 90 残基のドメイン (Light ドメイン) の作用によるものと推察される。そこで、Light ドメインを欠いた短鎖型 LPOR 遺伝子に、終止コドンを含まないように設計した合成ランダム配列を挿入したライブラリーを構築する。このライブラリーを、高い形質転換効率のシアノバクテリアの LPOR 欠損株に形質転換することで選抜を行う。LPOR 欠損株は、LPOR 欠損のため一定の光強度以上の光条件では生育することができないので、強光耐性と薬剤耐性によって選抜を行う。さらに、別の酵素を対象に同じ方法で光依存型酵素の創出を試みる。

4. 研究成果

終止コドンを含まないような合成ランダ

ム DNA 配列は、以下の 3 つのコドンから構成される：

NNY (Y は T または C)

NBB (B は A 以外)

VNN (V は T 以外)

これらのコドン を 連結した配列 NNYNBBVNN (9 塩基) の 3 回繰り返し配列に、5' 末端に NNY を付加した 75 塩基のセミランダムな DNA 断片を合成した。

一方、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の LPOR 欠損株は強光・好気条件下で致死となるが、強光・嫌気条件では生育できる。*recJ* 欠損株は、その形質転換効率が野生型に比べて大幅に上昇する [1]。そこで、これらの二重欠損株 $\Delta por \Delta recJ$ を単離し、この変異株について、形質転換の効率と選抜条件の検討を加えた。ここでは、 Δpor の遺伝子座が、別のシアノバクテリアの LPOR (*Leptolyngbya boryana* 由来) の置換される組換えにより強光耐性およびカナマイシン耐性が付与される形質転換と、LPOR の内部ループを除去した *L. boryana* の LPOR ($\Delta loop$) をもつプラスミドとの置換でカナマイシン耐性のみが付与される形質転換との比較をおこなった。その結果、 $\Delta por \Delta recJ$ を強光・嫌気で前培養し、OD₇₃₀ が 1.0 の細胞懸濁液でプラスミドと混合し、非選択培地に播種し弱光・嫌気条件で 1 日インキュベーションし、その後カナマイシンを含む寒天培地に移し、弱光・好気条件で 3 日さらに強光・好気条件で選抜を行うという選抜条件が最適であることがわかった。

この条件で、上記のセミランダム DNA 配列により作製したプラスミドライブラリーにより $\Delta por \Delta recJ$ の形質転換を行った。その結果、12 個の強光耐性を示すコロニーを得た。しかし、これらの形質転換体では Δpor の遺伝子座位に変化が見られなかった。このため、これらの形質転換体が示した強光耐性は、別のゲノムの変異によって付与されたものであると推察された。

この結果は、 $\Delta por \Delta recJ$ を親株として形質転換を行う上で避けることがむずかしい“背景”変異が高い頻度で生じることを示している。

作製したセミランダム合成配列を用いたライブラリー作成において想定したような

アミノ酸配列をもつプラスミドを生じるかどうかについても確認を行った。その結果、合成セミランダム配列がプラスミドに連結される効率は 87.5% であり、このうち想定されるような終止コドンを含まない一連のアミノ酸配列をもつ効率は 57% であった。具体的には、合成したセミランダム DNA には誤差 ± 2 塩基程度の塩基長のばらつきがあり、このためフレームシフトによって終止コドンが生じる可能性が残されていることがわかった。実際のライブラリーでは想定通りの配列を含む確率は約 50% と評価された。

実際のスクリーニングにおいて生じた強光耐性を示す疑似復帰変異株 5 株についてゲノムをリシーケンスし、生じた変異を特定した。その結果、5 つの座位において共通の変異が見つかり、1~3 つの固有の変異を伴っていることが分かった。共通変異のうち *rsbU* (セリンホスファターゼをコードすると推定) については、*Synechocystis* sp. PCC 6803 でこの変異を有する変異株は、熱耐性を向上させる報告がある [2]。そこで、今回のスクリーニングの親株として用いた $\Delta por \Delta recJ$ 株の熱耐性を野生型と比較したところ、*rsbU* 変異を持った細胞集団が一定数含まれていることが示唆された。この事実は、*recJ* 欠損により変異率が上昇しそのような細胞集団が含まれるようになったと解釈される。

これらの結果をまとめると、今後新たな LPOR 創出実験を行う上で、考慮すべき問題点が洗い出された。

1) 一定の長さ以上の一本鎖セミランダム配列の合成においては現在の技術レベルでは誤差 ± 2 塩基程度の誤差をもった集団として供される。

2) $\Delta recJ$ により形質転換効率は上昇する一方、ゲノムの変異率が上昇し一定の変異をもつ細胞を含むような細胞集団が形成されている。このため、スクリーニングの条件によっては、一定の細胞集団を選抜することになる場合がある。特に、強光耐性付与については、*rsbU* の変異が大きく寄与している可能性が高い。

参考文献

1. Kufryk GI, Sachet M, Schmetterer G, Vermaas WFJ (2002) *FEMS Microbiol.*

Lett. **206**, 215-219.

2. Tuominen I, Pollari M, Tyystjärvi E, Tyystjärvi
(2006) *FEBS Lett.* **580**, 319-323.

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8件)

1. Tomatsu, C., Uesaka, K., Yamakawa, H., Tsuchiya, T., Ihara, K., and Fujita, Y. (2018) *In-vivo* transposon tagging in the nonheterocystous nitrogen-fixing cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *FEBS Lett.*, **592**, 1634-1642, <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13079> (査読有り)
2. Tsujimoto, R., Kotani, H., Yokomizo, K., Yamakawa, H., Nonaka, A. and Fujita, Y. (2018) Functional expression of an oxygen labile nitrogenase in an oxygenic photosynthetic organism. *Sci. Rep.* **8**, 7380, DOI:10.1038/s41598-018-25396-7 (査読有り)
3. Terauchi, K., Sobue, R., Furutani, Y., Aoki, R., and Fujita, Y. (2017) Isolation of cyanobacterial mutants exhibiting growth defects under microoxic conditions by transposon mutagenesis of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **63**, 131-138, DOI: 10.2323/jgam.2016.08.004. (査読有り)
4. Nomata, J., Terauchi, K. and Fujita, Y. (2016) Stoichiometry of ATP hydrolysis and chlorophyllide formation of dark-operative protochlorophyllide oxidoreductase from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **470**, 704-709, DOI:10.1016/j.bbrc.2016.01.070. (査読有り)
5. Tsujimoto, R., Kotani, H., Nonaka, A., Miyahara, Y., Hiraide, Y. and Fujita, Y. (2015) Transformation of the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana* by electroporation. *Bio-protocol*, **5**, 24, e1690. (査読有り)
6. Yamanashi, K., Minamizaki, K. and Fujita, Y. (2015) Identification of the *chlE* gene encoding oxygen-independent Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase in cyanobacteria. *Biochem. Biophys.*

Res. Commun. **463**, 1328-1333; DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.124 (査読有り)

7. Fujita, Y., Tsujimoto, R. and Aoki, R. (2015) Evolutionary aspects and regulation of tetrapyrrole biosynthesis in cyanobacteria under aerobic and anaerobic environments. *Life*, **5**, 1172-1203; DOI:10.3390/life5021172 (査読有り)
8. Hiraide, Y., Oshima, K., Fujisawa, T., Uesaka, K., Hirose, Y., Tsujimoto, R., Yamamoto, H., Okamoto, S., Nakamura, Y., Terauchi, K., Omata, T., Ihara, K., Hattori, M. and Fujita, Y. (2015) Loss of cytochrome *c_M* stimulates cyanobacterial heterotrophic growth in the dark. *Plant Cell Physiol.*, **56**, 334-345, DOI:10.1093/pcp/pcu165. (査読有り)

[学会発表](計3件)

1. Hiraide, Y., Uesaka, K., Ihara, K. and Fujita, Y., Loss of the *cytM* encoding cytochrome *c_M* stimulates dark heterotrophic growth of cyanobacteria. International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes 2015, August 2-6, 2015, Tübingen, Germany (Selected as an oral presentation from posters)
2. 平出優人・上坂一馬・井原邦夫・藤田祐一
「シトクロム *c_M* の欠損はシアノバクテリアの従属栄養生育を促進する」第56回日本植物生理学会年会(東京農大)2015年3月16日~18日(ポスター発表)
3. 平出優人・上坂一馬・井原邦夫・藤田祐一
「ゲノムリシーケンスによるシアノバクテリアの暗所従属栄養生育を促進する変異の同定」日本ゲノム微生物学会年会(神戸大学)2015年3月6日(一般口頭発表)

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・教授
研究者番号: 80222264

(2)研究分担者

藤田 祐一 (FUJITA, Yuichi)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 80222264

(4)研究協力者

辻本良真 (TSUJIMOTO, Ryoma)
山川壽伯 (YAMAKAWA, Hisanori)

平出優人 (HIRAIDE, Yuto)
橋本薫槻 (HASHIMOTO, Kazuki)