

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月16日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370014

研究課題名（和文） クロロフィル代謝研究の基盤整備と新展開に向けた総合的研究

研究課題名（英文）

Study of chlorophyll biosynthesis

研究代表者

田中 歩（TANAKA AYUMI）

北海道大学・低温科学研究所・教授

研究者番号：10197402

研究成果の概要（和文）：クロロフィルサイクルの未同定な酵素7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* 還元酵素（HCAR）の同定に成功した。この酵素の組み換えタンパク質は、2Fe-2S と FAD を持ち、フェレドキシンを必要とし、これはジビニル還元酵素から進化したと考えられる。HCAR の基質特異性から、クロロフィル *b* 分解経路を調べたところ、クロロフィル *b* → 7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* → クロロフィル *a* の経路で転換することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We identified 7-hydroxymethyl chlorophyll *a* reductase (HCAR). Recombinant HCAR converted 7-hydroxymethyl chlorophyll *a* to chlorophyll *a* by using ferredoxin and contains FAD and an iron-sulfur center. A phylogenetic analysis elucidated the evolution of 7-hydroxymethyl chlorophyll *a* reductase from divinyl chlorophyllide vinyl reductase. We examined the substrate specificity of HCAR and determined the chlorophyll *b* degradation pathway in which chlorophyll *b* is converted to chlorophyll *a* via 7-hydroxymethyl chlorophyll *a*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物学・生理学

キーワード：クロロフィル、代謝、酵素、常緑、細胞死

1. 研究開始当初の背景

クロロフィルは光エネルギーを捕捉し、光合成において中心的な役割を担っている。従来、クロロフィル代謝の役割は、必要な時に合成し、不要になったら分解するだけと考えられてきた。しかし、近年、クロロフィル代謝は様々な生理的な役割を担っていることが知られてきた。クロロフィル代謝中間体は葉緑体シグナル分子として働き、核遺伝子の

発現を制御し、様々な現象を制御している。また、ACD1 (Accelerated cell death 1) ACD2は細胞死に関わる遺伝子として同定されたが、本来の機能は、クロロフィル代謝遺伝子であった。また、クロロフィル分解産物は過敏反応 (Hypersensitive reaction; HR) に関わっており、クロロフィル代謝酵素は、植物ホルモン ABA のレセプターであることも知られてきた。このように、植物の

様々な現象を、クロロフィル代謝の視点から見直す必要が出てきた。一方、クロロフィル代謝を制御すると、老化しても緑を保つ Stay green を引き起こすことができ、またクロロフィル代謝を制御する薬剤は、植物成長調節剤となるなど、農学的な応用も開かれてきた。

2. 研究の目的

本研究では、新しいクロロフィル代謝研究を切り開くことを目的としている。そのため、クロロフィル代謝に関わる全般的な課題に取り組む。具体的には、①クロロフィル代謝に関わる全遺伝子の同定、②代謝経路の確定、③調節機構の解明、④クロロフィル代謝の多機能の解明、⑤応用研究への展開を目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、クロロフィル代謝系酵素の同定や農学的応用、進化など課題を幅広く取り扱うので、シロイヌナズナだけでなく、シアノバクテリアやその他の藻類を研究材料に利用した。

一方、分子遺伝学以外に、バイオインフォマティクス、生化学、分光光学等の技術・方法を用いた。

4. 研究成果

(1) HCAR の単離同定

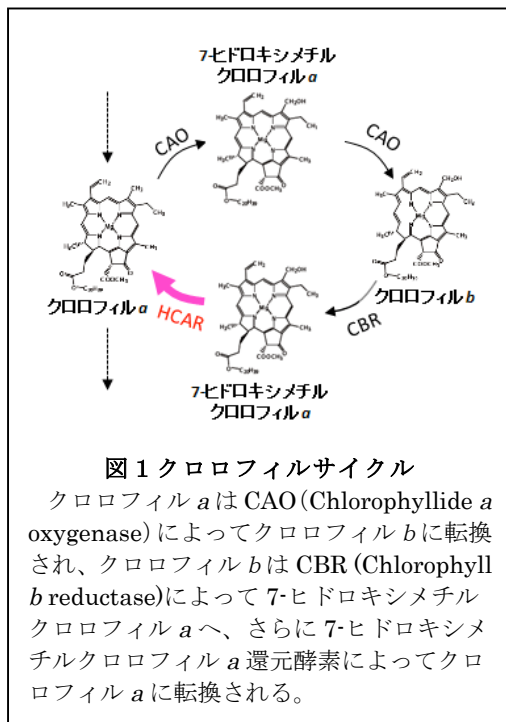


図1 クロロフィルサイクル

クロロフィル a は CAO (Chlorophyllide a oxygenase) によってクロロフィル b に転換され、クロロフィル b は CBR (Chlorophyll b reductase) によって 7-ヒドロキシメチルクロロフィル a へ、さらに 7-ヒドロキシメチルクロロフィル a 還元酵素によってクロロフィル a に転換される。

クロロフィル代謝酵素の中で、クロロフィルサイクル(図1)の HCAR とクロロフィル分解系の Mg-デケラターゼが同定されていなかった。本基盤研究では、両方の単離を試みたところ、HCAR の単離に成功した。

クロロフィル代謝合成経路の中で、ビニル

基を還元するビニルレダクターゼ (DVR) は、シロイヌナズナとシアノバクテリアの *Synechocystis pcc6803* では異なった酵素を用いている。興味深いことに、シロイヌナズナのゲノムには、シアノバクテリア DVR に高い相同性を持つ遺伝子が存在した。

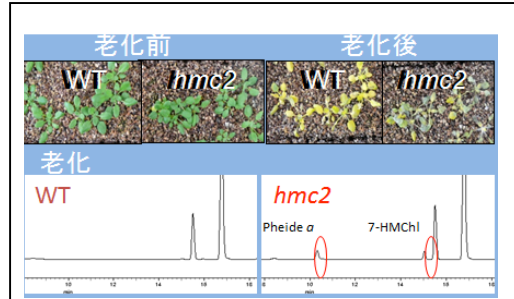


図2 7-HMChl の蓄積

シアノバクテリア DVR のホモログを破壊したシロイヌナズナ変異株 (*hmc2*) の形質。暗所での強制老化時に Stay green の形質を示すと同時に、7-ヒドロキシメチルクロロフィル a (7-HMChl) の蓄積がみられた。このことからこの遺伝子は HCAR であることを示唆している。

この遺伝子の破壊株を解析したところ、クロロフィル分解時に 7-ヒドロキシメチルクロロフィル a を蓄積することが解った(図2)。

そこでこの遺伝子の組み換えタンパク質を作成し、活性を調べた(図3)。

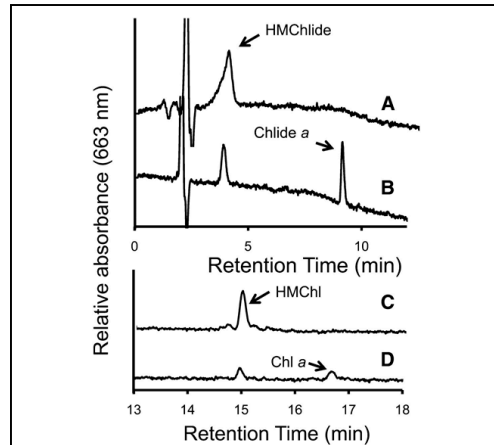


図3 HCAR 活性の測定

組み換えタンパク質を大腸菌で発現させ、還元型フェレドキシンの存在下で、7-ヒドロキシメチルクロロフィライド a (HMChlide) (A,B) もしくは 7-ヒドロキシメチルクロロフィル a (HMChl) とインキュベートし (C,D)、HPLC で色素を分析した。その結果、それぞれクロロフィライド a (Chlide a) とクロロフィル a (Chl a) が検出された。

その結果、この遺伝子産物は、7-ヒドロキシメチルクロロフィル a をクロロフィル a

に転換する酵素、HCAR であることがわかった。この研究により、クロロフィルサイクルの未同定酵素 HCAR を同定することに成功した。

この酵素は進化的に興味深い。系統樹を作成したところ、この酵素はシアノバクテリアタイプの DVR から進化したことが解った (図 4)。このことは、代謝系の獲得・進化に面白い考え方を提供する。

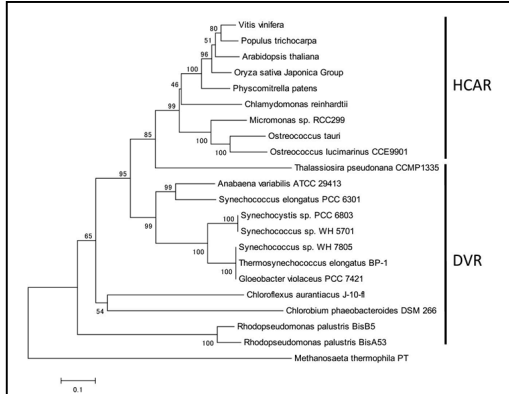


図 4 HCAR の系統樹

HCAR とその相動性のある遺伝子で系統樹を作成した。HCAR はシアノバクテリア型 DVR から進化したことを示している。

(2) シアノバクテリア型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (Protox) の同定

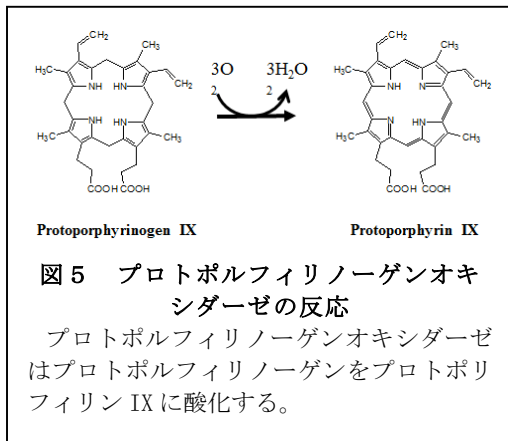


図 5 プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの反応

プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼはプロトポルフィリノーゲンをプロトポルフィリン IX に酸化する。

Protox はいくつかの生物種で同定されているが、シアノバクテリアではいまだ同定されていない。シアノバクテリアの Protox をコードする遺伝子を見つけるために、遺伝学的な手法を用いた。単純に Protox を欠損する変異株を得るという手法は難しいために、一度ラン藻の野生株に植物 (*Arabidopsis thaliana*) の HemY 遺伝子を導入した上で変異株の作出をおこなうという工夫を取り入れた。さらに、HemY 遺伝子の存在下で Protox 変異株を識別するために、HemY タンパク質の阻害剤 acifluorfen を培地に加えてスクリー

ニングを行った。これらの戦略は他の酵素の遺伝子の同定にも利用可能な新しい手法である。この手法によって、筆者はラン藻の Protox の変異株を得ることに成功した。さらに、この原因遺伝子である slr1790 遺伝子の光合成細菌のホモログからタンパク質を合成し、このタンパク質が Protox 活性を有することを証明した。バクテリアにおける新規ヘム合成遺伝子の発見はおよそ 15 年ぶりであり、この遺伝子を hemJ と名付けた。この研究により、従来不明であった酵素を明らかにすることができた。

(3) その他の成果

詳細は省くが、基盤研究によって以下の成果もあげることができた。

新しいクロロフィル代謝経路の獲得と光合成の進化について研究を行った。その中で、ジビニルクロロフィルの獲得に伴って、光化学系の D1 タンパク質のアミノ酸変異が起こり、色素変化に伴う光障害を回避していることが解った。

また、クロロフィル代謝系を改変すると、Stay green の形質がみられることを示した。興味深いことに、老化関連の転写因子の発現抑制がみられた。おそらく、クロロフィル代謝の改変に伴い、転写のリプログラミングが起こったと思われる。

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 16 件、全て査読あり)

1. Tomo, T., Kusakabe, H., Nagao, R., Ito, H., Tanaka, A., Akimoto, S., Mimuro, M. and Okazaki, S. (2012) Luminescence of singlet oxygen in photosystem II complexes isolated from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 containing monovinyl or divinyl chlorophyll *a*. *Biochim Biophys Acta*. in press. DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.02.018
2. Sakuraba Y, Balazadeh S, Tanaka R, Mueller-Roeber B and Tanaka A. (2012) Overproduction of chlorophyll b retards senescence through transcriptional re-programming in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, DOI: 10.1093/pcp/pcs006
3. Yokono, M., Tomo, T., Nagao, R., Ito, H., Tanaka, A. and Akimoto, S. (2012) Alterations in photosynthetic pigments and amino acid composition of D1 protein change energy distribution in photosystem II. *Biochim Biophys Acta*. DOI:

- 10.1016/j.bbabi.2012.02.009
4. Ito, H. and Tanaka, A. (2011) Evolution of a divinyl chlorophyll-based photosystem in Prochlorococcus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(44): 18014-18019, DOI: 10.1073/pnas.1107590108
 5. Takabayashi, A., Kurihara, K., Kuwano, M., Kasahara, Y., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2011) The Oligomeric States of Photosystems and Light-harvesting Complexes in the Chlorophyll b-less Mutant. *Plant Cell Physiol.* 52(12): 2103-2114, DOI: 10.1093/pcp/pcr138
 6. Masuda, S., Harada, J., Yokono, M., Yuzawa, Y., Shimojima, M., Murofushi, K., Tanaka, H., Masuda, H., Murakawa, M., Haraguchi, T., Kondo, M., Nishimura, M., Yuasa, H., Noguchi, M., Oh-oka, H., Tanaka, A., Tamiaki, H. and Ohta, H. (2011) A Monogalactosyldiacylglycerol Synthase Found in the Green Sulfur Bacterium Chlorobaculum tepidum Reveals Important Roles for Galactolipids in Photosynthesis. *Plant Cell* 23(7): 2644-2658, DOI: 10.1105/tpc.111.085357
 7. Meguro, M., Ito, H., Takabayashi, A., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2011) Identification of the 7-Hydroxymethyl Chlorophyll a Reductase of the Chlorophyll Cycle in Arabidopsis. *Plant Cell* 23(9): 3442-3453, DOI: 10.1105/tpc.111.089714
 8. Tanaka, R. and Tanaka, A. (2011) Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biophys Biochim Acta* 1807: 968-976, DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.01.002
 9. Tanaka, R., Rothbart, M., Oka, S., Takabayashi, A., Takahashi, K., Shibata, M., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K., Grimm, B. and Tanaka, A. (2010) LIL3, a light-harvesting-like protein, plays an essential role in chlorophyll and tocopherol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(38): 16721-16725, DOI: 10.1073/pnas.1004699107
 10. Kato, K., Tanaka, R., Sano, S., Tanaka, A. and Hosaka, H. (2010) Identification of a gene essential for protoporphyrinogen IX oxidase activity in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6803. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(38): 16649-16654, DOI: 10.1073/pnas.1000771107
 11. Mochizuki, M., Tanaka, R., Grimm, B., Masuda, T., Moulin, M., Smith, AG., Tanaka, A. and Terry, MJ. (2010) The cell biology of tetrapyrroles: a life and death struggle. *Trends Plant Sci* 15(9): 488-498, DOI: 10.1016/j.tplants.2010.05.012
 12. Tanaka, R., Ito, H. and Tanaka, A. (2010) Regulation and Functions of the Chlorophyll Cycle in The Chloroplast: Basics and Applications, ed by Rebeiz C. A., Benning, C., Bohnert, H. J., Daniell, J. K., Hooper, J. K., Lichtenthaler, H. K., Portis, A. R., Tripathy, B. C. Springer pp55-77, DOI: 10.1007/978-90-481-8531-3_4
 13. Sakuraba, Y., Yokono, M. Akimoto, S., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2010) Deregulated chlorophyll b synthesis reduces the energy transfer rate between photosynthetic pigments and induces photodamage in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 51(6): 1055-1065, DOI: 10.1093/pcp/pcq050
 14. Nagane, T., Tanaka, A. and Tanaka, R. (2010) Involvement of AtNAP1 in the regulation of chlorophyll degradation in Arabidopsis thaliana. *Planta.* 231(4): 939-949, DOI: 10.1007/s00425-010-1099-8
 15. Sakuraba, Y., Tanaka, R., Yamasato, A. and Tanaka, A. (2009) Determination of a chloroplast degron in the regulatory domain of chlorophyllide a oxygenase. *J Biol Chem.* 2009 Oct 20, 284(52): 3 6689-6699, DOI: 10.1074/jbc.M109.008144
 16. Horie, Y., Ito, H., Kusaba, M., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2009) Participation of chlorophyll b reductase in the initial step of the degradation of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes in Arabidopsis. *J Biol Chem.* 284(26): 17449-17456, DOI: 10.1074/jbc.M109.008912
- [学会発表] (計 28 件)
1. Xueyun Hu, Tohru Tsuchiya, Stefan Hoertensteiner, Ayumi Tanaka, Ryouichi Tanaka ; Chlorophyllase1 is

- not involved in chlorophyll breakdown during methyl-jasmonate-induced senescence in *Arabidopsis thaliana*、第 52 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 18 日、京都産業大学（京都市）
2. 横野牧生, 高林厚史, 栗原克宜, 田中 歩, 秋本誠志; BN-PAGE により精製された光合成反応中心の時間分解蛍光スペクトルの測定、第 52 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 18 日、京都産業大学（京都市）
 3. 伊藤 寿、田中 歩; Divinyl Chlorophyllide Reductase の性質、第 52 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 18 日、京都産業大学（京都市）
 4. 高林厚史, 栗原克宜, 田中亮一, 田中 歩; 新規手法による葉緑体タンパク質複合体の網羅的検出、第 52 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 18 日、京都産業大学（京都市）
 5. 加藤由佳子、高林厚史、田中 歩、田中亮一; シロイヌナズナにおける新規 Light-harvesting-likeタンパク質の機能解析、第52回日本植物生理学会年会、2012年3月16日、京都産業大学（京都市）
 6. 高橋香織、高林厚史、田中 歩、田中亮一; Light-harvesting chlorophyll-binding proteinと共通するモチーフを持つタンパク質、LIL3の機能解析、第52回日本植物生理学会年会、2012年3月16日、京都産業大学（京都市）
 7. 下田洋輔、伊藤寿、田中 歩; シロイヌナズナのクロロフィルb分解における複数経路の検証、第52回日本植物生理学会年会、2012年3月16日、京都産業大学（京都市）
 8. 田中 歩; 生体金属イオン：生命と分子をつなぐメッセンジャー、第 8 4 回日本生化学会大会シンポジウム、2011年9月21日、国立京都国際会館（京都府）
 9. Ayumi Tanaka; Evolution of chlorophyll metabolism. “The Evolution of Photosynthesis and Oxygenation of the Earth.” 2011. 6.June 28-29, 2011, The University of New South Wales, Sydney (Australia)
 10. 中島沙織, 伊藤寿, 高林厚史, 田中亮一, 田中 歩; 強光適応時のシロイヌナズナにおけるクロロフィルb還元酵素の機能解析 第 5 2 回 日本植物生理学会 2011 年3月20日～3月22日、東北大学 (仙台市)
 11. 目黒美生, 伊藤寿, 高林厚史, 田中亮一, 田中 歩; シロイヌナズナにおける7-ヒドロキシメチルクロロフィルa還元酵素の同定、第 5 2 回 日本植物生理学会 2011年3月20日～3月22日、東北大学 (仙台市)
 12. Ayumi Tanaka; Enzymes and functions of the chlorophyll cycle. JAPANESE-FINNISH Seminar 2011”Future prospects of photosynthetic organisms: from genomes to environment”, 2011.3.1-5, 岡山大学 (岡山市)
 13. Ayumi Tanaka; Enzymes and functions of the chlorophyll cycle. Swiss-Japan International science seminar: Adaptation of the plastids to various environmental conditions: Evolution, acclimation and regulation, 2011.1.10～14, Villars-sur-Ollon (Switzerland)
 14. Ayumi Tanaka; Roles of chlorophyll metabolism in the formation and degradation of light-harvesting complexes. 15th International Congress of Photosynthesis, 2010.8.22～27, Beijing (China)
 15. 前田真一, 村上明男, 伊藤寿, 田中 歩, 小俣達男; 海洋性ラン藻の亜硝酸イオン輸送体の解析、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月21日、熊本大学黒髪キャンパス (熊本市)
 16. 高橋和馬, 浅田裕, 山本宏子, 高林厚史, 田中亮一, 田中 歩, 山口淳二; 恒常的免疫応答変異体 ns12 の老化過程に関わる機能解析、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月21日、熊本大学黒髪キャンパス (熊本市)
 17. 増田真二, 原田二郎, 横野牧生, 下嶋美恵1, 室伏和博, 湯澤優一, 村川雅人, 近藤真紀, 西村幹夫, 大岡宏造, 田中 歩, 民秋均, 太田啓之; 緑色硫黄光合成細菌から新規に単離した MGDG 合成酵素はシロイヌナズナ MGDG 合成酵素の変異を部分的に相補する第51回日本植物生理学会年会、2010年3月20日、熊本大学黒髪キャンパス (熊本市)
 18. 高林厚史, 栗原克宜, 櫻庭康仁, 桑野晶喜, 笠原康裕, 田中亮一, 田中 歩; 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、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月20日、熊本大学黒髪キャンパス（熊本市）
19. 田中亮一, Maxi Rothbart, 岡征子, 柴田勝, 明賀丈史, 本橋令子, 篠崎一雄, Bernhard Grimm, 田中歩; クロロフィル合成およびトコフェロール合成に関与する, LHCモチーフを持つタンパク質の同定、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月18日、熊本大学黒髪キャンパス（熊本市）
 20. 浅田裕, 高橋和馬, 田中莉夏子, 勝又邦明, 山本宏子, 上中弘典, 長根智洋, 田中亮一, 田中歩, 山口淳二; 植物免疫抑制因子NSL2の相互作用タンパク質の探索と解析、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月18日、熊本大学黒髪キャンパス（熊本市）
 21. 中島沙織, 伊藤寿, 田中亮一, 田中歩; シロイヌナズナの種子形成におけるクロロフィルb還元酵素の機能解析、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月18日、熊本大学黒髪キャンパス（熊本市）
 22. 目黒美生, 伊藤寿, 高林厚史, 田中亮一, 田中歩; クロロフィル分解に関与するフラビントタンパク質、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月18日、熊本大学黒髪キャンパス（熊本市）
 23. 伊藤寿, 田中亮一, 田中歩; D1タンパク質の改変によるジビニルクロロフィルへの適合性の獲得、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月18日、熊本大学黒髪キャンパス（熊本市）
 24. 日下部勇人, 岡崎茂俊, 長尾遼, 伊藤寿, 田中歩, 三室守, 鞆達也; ジビニルクロロフィルに置換した Synechocystis sp. PCC 6803 光化学系 II の解析、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月18日、熊本大学黒髪キャンパス（熊本市）
 25. Yasuhito Sakuraba, Ryouichi Tanaka, and Ayumi Tanaka; Delayed leaf senescence by enhanced chlorophyll b biosynthesis. ILTS International Symposium "Frontier of Low Temperature Science" 2009.9.9, Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University (Sapporo)
 26. Hisashi Ito and Ayumi Tanaka; Photosystem development of marine cyanobacterium Prochlorococcus. ILTS International Symposium "Frontier of Low Temperature Science" 2009.9.9, Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University (Sapporo)
 27. Ayumi Tanaka; Tetrapyrrole metabolism of photosynthetic organisms: Degradative pathways & their regulation. International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors in Photosynthetic Organisms (ICTPPO 2009), July 26-31, Asilomar Conference Center, Pacific Grove, CA (USA)
 28. 田中歩; 地球環境と光合成の進化、北海道大学低温科学研究所研究集会「大気圏と生物圏の相互作用：大気化学を中心として」、2009年7月9日、北海道大学低温科学研究所（札幌市）
- 〔その他〕
ホームページ等
<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/lantadapt/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
田中 歩 (TANAKA AYUMI)
北海道大学・低温科学研究所・教授
研究者番号：10197402
 - (2) 研究分担者
田中 亮一 (TANAKA RYOUICHI)
北海道大学・低温科学研究所・准教授
研究者番号：20311516
 - (3) 連携研究者
なし