

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370020

研究課題名(和文)プロトクロロフィリド還元酵素とニトロゲナーゼ：安定な多重結合還元の共通反応基盤

研究課題名(英文)Dark-operative protochlorophyllide reductase and nitrogenase: common mechanism for reduction of stable multiple-bonds

研究代表者

藤田 祐一 (Fujita, Yuichi)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：80222264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：暗所作動型プロトクロロフィリド(Pchl_{ide})還元酵素(DPOR)は、Pchl_{ide}のC17=C18二重結合を還元しクロロフィルaの直接の前駆体クロロフィリドを生成する。本反応機構を明らかにするため、プロトン移動を遮断することで反応中間体をトラップし、吸収スペクトルと電子スピン共鳴によって検出することを試みた。その結果、DPORは、電子移動によるPchl_{ide}アニオンラジカルの形成と第2の電子移動によるPchl_{ide}ラジカルの解消によって進行することが判った。DPORはニトロゲナーゼと共通の構造をもちながらニトロゲナーゼとは異なりラジカル形成反応を介して反応を進行させていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：In final stages of biosynthesis of Chlorophylls (Chls), dark-operative protochlorophyllide (Pchl_{ide}) oxidoreductase (DPOR), a nitrogenase-like enzyme, reduces the C17=C18 double bond of Pchl_{ide} to form chlorophyllide, the direct precursor of Chl a. Crystallographic structure of DPOR suggested that the spatial arrangement of the proton donors determines the stereospecificity of the Pchl_{ide} reduction. In this study, reaction intermediates were trapped by blocking the proton transfer and they were detected by absorption and electron spin resonance spectroscopies. We proposed that the DPOR reaction consists of 1) generation of a Pchl_{ide} anion radical by a single electron transfer reaction from a [4Fe-4S]-cluster to Pchl_{ide}, 2) a second Pchl_{ide} neutral radical is formed by a single proton transfer, 3) a second electron transfer eliminates the Pchl_{ide} radical, and 4) a second proton transfer completes the reaction. DPOR is a unique radical enzyme with a structure common to nitrogenase.

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・生理学

キーワード：ラジカル酵素 鉄硫黄クラスター クロロフィル生合成

1. 研究開始当初の背景

クロロフィル (Chl) は、光合成に必須のテトラピロール性色素である。地球上のほとんどの生物が Chl によって吸収される太陽に依存しているという生物学的な重要性に比して、その生合成の反応機構については不明なことが多く残されている。Chl a 生合成系の最終段階で作用するプロトクロロフィリド (Pchlide) 還元酵素は、Pchlide の C17=C18 位の二重結合を還元することでクロロフィリドに変換する。クロロフィリドの吸収スペクトルは Chl a と一致しているため、この反応は、光合成を駆動するための Chl a の光学特性を作り出す最終段階を構成している。Pchlide 還元酵素には、進化的起源を異にする 2 つの酵素が存在する。1 つは、光を反応の触媒作用に必須とする光依存型 Pchlide 還元酵素 (LPOR) であり、被子植物の緑化の光依存性を決定づける酵素である。もう一つは、光に依存することなく反応を進行させることができる暗所作動型 Pchlide 還元酵素 (DPOR) である。DPOR は、光合成細菌から裸子植物に至るまで広く分布し、これらの光合成生物の暗所で (光非依存的) 緑化を決定づけている (図 1)。

私たちは、光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* の DPOR について生化学的解析を進め、その触媒コンポーネント NB-タンパク質の基質結合型と非結合型の結晶構造を決定した。その結果、DPOR はニトロゲナーゼと極めて高い構造的類似性を有すること、全体構造のみならず金属クラスターや基質の立体配置がほぼ一致していること、Pchlide 還元反応の立体特異性がプロトン供与体となる残基の立体配置によって決定されていることを明らかにした。

光合成細菌の酸素非発生型光合成を支えるバクテリオクロロフィル a の生合成系は、クロロフィリドから分岐し、C7=C8 二重結合が還元されバクテリオクロリン環が形成され C3 位の側鎖の修飾を経て完成する。この C7=C8 二重結合の還元を触媒する酵素クロロフィリド還元酵素 (COR) もまた DPOR と同様にニトロゲナーゼと類似した酵素である。したがって、バクテリオクロロフィル a の生合成系の後期過程では DPOR と COR という 2 つのニトロゲナーゼ類似酵素の連続作用によって色素の骨格構造が形成される。しかし、COR の結晶構造を含め、DPOR と COR の間での相互作用や生成物と基質との効率的な移動についての生化学的知見はまったく得られていなかった。

2. 研究の目的

Pchlide の C17=C18 二重結合を立体特異的に還元する Pchlide 還元 (プロトンの *trans* 付加反応) は、Chl a 生合成系の最終段階の反応である (図 1)。酸素発生型光合成生物に普遍的に分布し、被子植物では唯一の Pchlide 還元酵素である LPOR は、単一ポリ

ペプチドから構成され、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。光によって反応が駆動するという特異な性質から、LPOR は、酵素反応の超高速時間スケールの初期反応のモデル酵素とし解析が行われてきた。また、SDR ファミリー酵素との共通属性と部位特異的の変異酵素の解析から、基質である Pchlide 分子が光励起されることにより NADPH のニコチンアミド環からのヒドリド転移と保存されたチロシン残基からのプロトン移動が誘起されて Pchlide 還元が完結すると推察されている。これら詳細な研究の一方、LPOR の立体構造は未だ明らかにされていない。

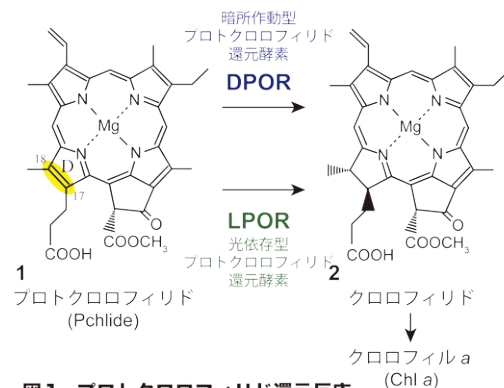


図1 プロトクロロフィリド還元反応
プロトクロロフィリド (Pchlide) (1) の D 環 (C17=C18 二重結合) が還元されて生じるクロロフィリド (2) が Chl a の直接の前駆体となる。

DPOR は、光合成細菌、シアノバクテリア、コケ、シダ、裸子植物に至るまで広く分布し、これらの光合成生物の光非依存的な緑化を支えている。DPOR は、L、N、B (光合成細菌では各々 BchL、BchN、BchB、シアノバクテリアや真核光合成生物では ChlL、ChlN、ChlB と呼ぶ) という 3 つのサブユニットから構成されており、L が二量体を形成して還元コンポーネント L-タンパク質として電子供与体として機能し、N と B はヘテロ 4 量体を形成し触媒コンポーネント NB-タンパク質を構成する (図 2)。基質 Pchlide を結合した NB-タンパク質の結晶構造から、C17 位と C18 位へのプロトンの *trans* 付加反応の分子基盤が明らかとなった (図 3A)。すなわち、C17 位へのプロトン供与は BchB サブユニットのアスパラギン酸 Asp274 のカルボキシル基から、C18 位へのプロトン供与は基質 Pchlide 自身のもつ C17-プロピオン酸のカルボキシル基から行われるため、これらの供与体の空間配置がプロトン付加の特異性を決定づけていると推察された。しかし、この反応は 2 つのプロトンのみならず 2 つの電子移動も伴う。このため、これらプロトン移動と電子移動がどのように協調的に進行するのかという動的な側面からの反応機構についてはまったく不明である。また、この電子移動に直接関わる [4Fe-4S] 型鉄硫黄クラスター (NB-クラスター) は 1 電子伝達体であることから、DPOR による Pchlide 還元の途上で

Pchlide ラジカルが生じることが推定されるが、これまでにこれを実証する実験的根拠は得られていない。そこで、本研究では、プロトン供与過程を変異酵素と基質アナログを用いて遮断することにより、反応中間体をトラップし、これらを吸収スペクトルと電子スピン共鳴法 (EPR) によって検出し、DPOR の反応機構を明らかにし、構造的に類似したニトロゲナーゼとの反応機構の相違を考察することを目的とする。

さらに、バクテリオクロロフィル生合成系における第 2 のニトロゲナーゼ類似酵素 COR について生化学的解析を進め、ニトロゲナーゼ類似酵素の理解を深める。

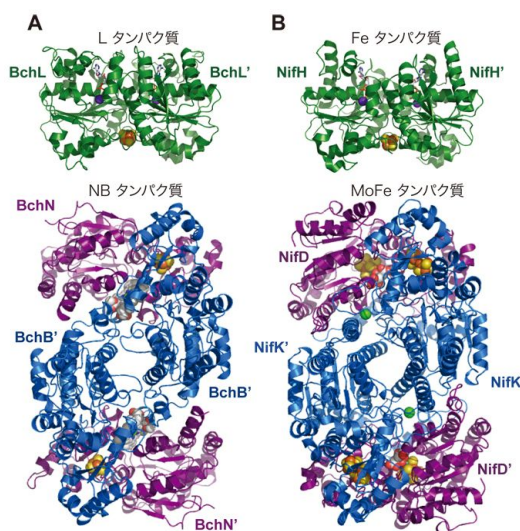


図2 DPORとニトロゲナーゼの結晶構造

DPOR (A) とニトロゲナーゼ (B) の結晶構造の比較。両酵素はともに還元コンポーネント (各々 L-タンパク質と Fe タンパク質) と触媒コンポーネント (各々 NB-タンパク質と MoFe タンパク質) から構成され、還元コンポーネントから ATP 加水分解に共役して供給される電子を使って、触媒コンポーネントにおいて基質の還元反応が進行する。

3. 研究の方法

DPOR および COR はニトロゲナーゼと同様に酸素に触れると急速に失活するため、すべての操作は嫌気チャンパーやスクリーキャップ付きのキュベットなどを活用し嫌気的条件下で行った。*R. capsulatus* の DPOR の各コンポーネント (L-タンパク質・野生型 NB-タンパク質と D274A 変異 NB-タンパク質) は、*E. coli* で大量発現させ N 末端に付加した Strep-tag を利用しアフィニティ樹脂により精製した。DPOR の反応をモニターするために、嫌気チャンパー内で反応の混合液をバイアルに準備し、セプタムを介してシリンジで ATP 溶液を添加することで反応を開始させた。反応は 5 で行い一定時間ごとに吸収スペクトルを記録した。また、同時に EPR スペクトル測定を行った。得られた吸収スペクトル変化は、グローバルフィッティングによって 4 つの素過程成分の時間変化として評価した。

COR の 2 つのコンポーネント (X タンパ

ク質と YZ タンパク質) もまた *E. coli* の大量発現系で発現させ、Strep-tag を利用して精製した。反応の進行は、経時的に色素をアセトンで抽出し、その吸収スペクトルを記録するとともに一部 HPLC により分析を行った。

4. 研究成果

(1) DPOR の反応機構解析

Pchlide の C17 位へのプロトン供与を遮断するために BchB-Asp274 を Ala に改変した D274A 変異 NB-タンパク質を用い (図 3 C, D)、C18 位へのプロトン供与遮断のために Pchlide の C17-プロピオン酸残基の代わりに C17-アクリル酸をもつクロロフィル *c* (Chl *c*) を用いた (図 3 B, D)。これらの組合せによって、一方のプロトン供与もしくは両方を遮断した反応を行った (図 3 B, C, D)。

野生型 NB-タンパク質と本来の基質 Pchlide を用いると、反応を 5 で行っても速やかにクロロフィルドへの反応が進行し、中間体と思われるスペクトルは得られず、また EPR でも有意なシグナルは検出されなかった。そこで、図 3 で示す 3 つの組合せで反応を行った。ここではその典型的な例として D274A と Pchlide の組合せ (図 3 C) の結果を示す (図 4)。この反応では、C17 位へのプロトン供与が遮断された状況でも、反応を開始後、Pchlide に由来する吸収の大幅な減少が観測された。また、反応の後半には長波長領域に新たな吸収が生じてきた。同時に行った EPR 測定では、*g* 値 2.004 を示す幅の広い特徴をもったシグナルが検出された (図

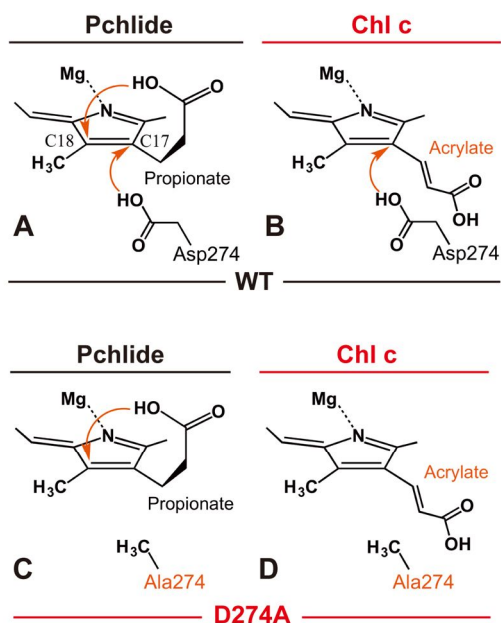


図3 D274A 変異型 NB-タンパク質と基質アナログ Chl c の組合せ

野生型酵素と本来の基質の組合せ (A) では、プロトンが Asp274 とプロピオン酸から供給されて反応が完結する。基質アナログ Chl *c* をもちいると C18 へのプロトン移動が遮断され (B)、D274A で Pchlide を基質とすると C17 位へのプロトン移動が遮断される (C)。これら両方を用いると 2 つのプロトン移動は完全に遮断される (D)。

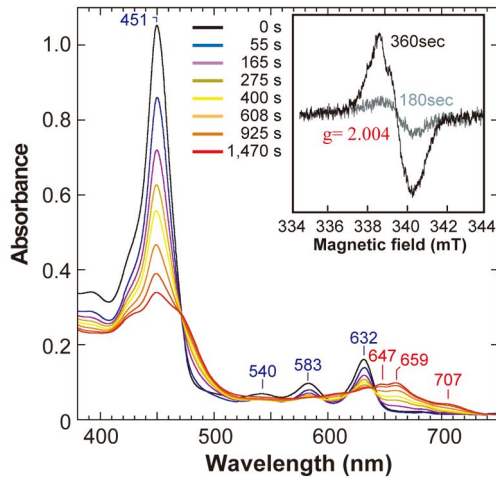


図4 D274A 変異型 NB-タンパク質と Pchlide の反応

Pchlide に由来する大きな吸収が反応開始後大きく減色し、長波長領域に新たな吸収ピークが現れた。EPR で g 値 2.004 のシグナルが検出された。この結果は、Pchlide ラジカルが生じていることを示唆している。

4 挿図)。吸収スペクトルの減少と EPR シグナルの出現は、Pchlide ラジカルの生成を強く示唆している。グローバルフィッティングによってこの吸収スペクトル変化を 4 つのスペクトル成分に分解しスペクトル変化を再構成することができた。

また、研究の過程で、ニコチンアミド (NA) が L-タンパク質から NB-タンパク質への電子移動を阻害することを見出し、DPOR の新しい反応阻害剤として活用することにした。D274A と Pchlide の反応でラジカルが形成している状態で NA を添加し、その後のスペクトル変化と EPR シグナルを観測することで、図 4 での EPR シグナルには NA に感受性のシグナルと非感受性のシグナルが含まれていることが判った。これらの結果を総合し、図 5 に示すような反応スキームを提唱するに至った。まず、NB-クラスターから 1 電子が Pchlide へ移動することで Pchlide アニオンラジカル (中間体 1) が生じる (還元によるラジカル形成)。次にプロピオン酸からプロトンが移動し Pchlide ニュートラルラジカル (中間体 2) となる。NB-クラスターからの第 2 の電子移動によりラジカルが消去され (中間体 3、還元によるラジカル消去)。最後に BchB-Asp274 からプロトンが移動し反応が完結しクロロフィリドが生成する。

これらの結果から、DPOR が基質ラジカルを形成する酵素であることが明らかとなった。ラジカル酵素として、これまでにリボヌクレオチド還元酵素を始めビタミン B₁₂ 依存性酵素やラジカル SAM 酵素が知られているが、これらはすべて補酵素やアミノ酸残基のラジカル (チロシンラジカル、チールラジカル、5'-デオキシアデノシルラジカル) を生成して反応を進行させる。これに対し、DPOR は内部に埋め込まれた鉄硫黄クラスターからの電子移動で基質自体を直接ラジカル化する酵素として非常にユニークな特性を持つことが判った。このような基質ラジカルを

形成する酵素として、*Clostridium difficile* の 2-ヒドロキシイソプロピル CoA デヒドラターゼが知られているが、この酵素は鉄硫黄クラスターから基質への電子の投入 (還元) によって基質ラジカル (ケチルラジカル) を形成して脱水反応を誘起し、その中間体ラジカルから電子を回収すること (酸化) でラジカルを消去して反応を完結させる。一方、DPOR は、還元によって基質ラジカルを形成し、還元によって反応を完結させるという点で非常にユニークである。

DPOR と同じ Pchlide 還元反応を触媒する LPOR は、ヒドリド (H⁻) とプロトン転移によって反応を進めるため、反応機構から見ても DPOR とは根本的に異なる。また、ニトロゲナーゼは、DPOR と構造的に類似しているが、これまでの反応機構解析では、窒素が還元される金属クラスター (FeMo-co) 上で、ヒドリドという形でプロトンと電子が保持され、反応途上でラジカルを生じないと推察されている。このことから、DPOR はニトロゲナーゼと同じ構造基盤を持ちながらラジカル形成反応を触媒するように独自の進化を遂げてきたと推察される。

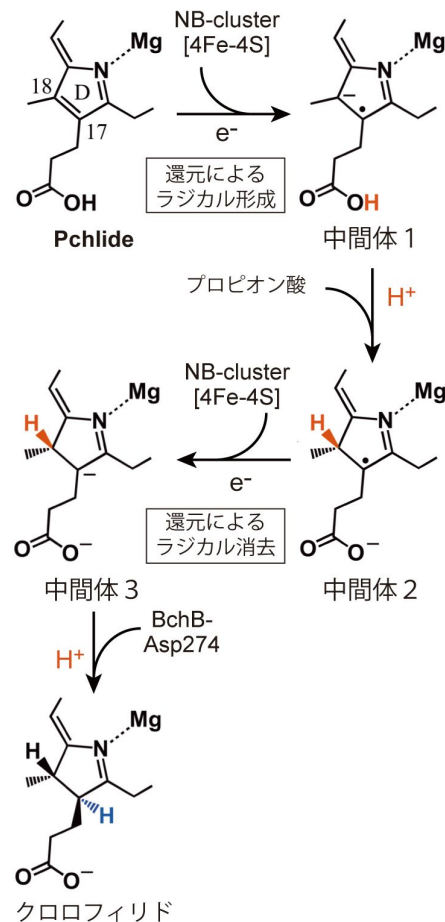


図5 Pchlide 還元反応の中間体

Pchlide は 1 電子還元により Pchlide アニオンラジカル (中間体 1) となりプロトン移動によりニュートラルラジカル (中間体 2) となる。第 2 の電子による還元でラジカルは消去され、Asp274 からのプロトン移動により反応が完結し、クロロフィリドが生成する。

このようなラジカル酵素 DPOR が、光合成細菌のみならずシアノバクテリアや裸子植物まで駆動している。被子植物への進化の過程で DPOR が喪失したのは、このような酵素の性質が一因となっているのかもしれない。

(2) DPOR-COR 連続反応の再構成

R. capsulatus の COR の各コンポーネントを精製し、酵素化学的パラメーター (K_m 値 $5.9 \mu\text{M}$ 、 V_{max} 値 $6.3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) を決定した。さらに、Pchlide を基質として DPOR と COR の精製コンポーネントによって Pchlide がクロロフィリドを經由してバクテリアオクロリン (モノビニルバクテリアオクロロフィリド a) に変換される再構成系を構築した。この再構成系を HPLC によって詳細に検討したところ、*R. capsulatus* の COR は、Tsukatani ら (Tsukatani et al. 2013) によって報告されたように、C8 位のビニル基を還元する活性を併せもつことが確認された。この結果は、ニトロゲナーゼ類似酵素の高い潜在能力を示す結果として評価できる。

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 12 件)

1. Yamamoto, H., Kato, M., Yamanashi, K., Fujita, Y. Reconstitution of a sequential reaction of two nitrogenase-like enzymes in the bacteriochlorophyll biosynthetic pathway of *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 **448**, 2014, 200-205
DOI:10.1016/j.bbrc.2014.404.087
2. Tsujimoto, R., Kamiya, N., Fujita, Y. Transcriptional regulators ChlR and CnfR are essential for diazotrophic growth in nonheterocystous cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 査読有 **111**, 2014, 6762-6767
DOI:10.1073/pnas.1323570111
3. Aoki, R., Hiraide, Y., Yamakawa, H., Fujita, Y. A novel "oxygen-induced" greening process in a cyanobacterial mutant lacking the transcriptional activator ChlR involved in low-oxygen adaptation of tetrapyrrole biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 査読有 **289**, 2014, 1841-1851
DOI:10.1074/jbc.M113.495358
4. Tsukatani, Y., Yamamoto, H., Mizoguchi, T., Fujita, Y., Tamiaki, H. Completion of biosynthetic pathway for bacteriochlorophyll *g* in

Heliobacterium modesticaldum: the C8 ethylidene group formation. *Biochim. Biophys. Acta* 査読有 **1827**, 2013, 1200-1204
DOI:10.1016/j.bbabi.2013.06.007

5. Nomata, J., Kondo, T., Itoh, S., Fujita, Y. Nicotinamide is a specific inhibitor of dark-operative protochlorophyllide oxidoreductase, a nitrogenase-like enzyme, from *Rhodobacter capsulatus*. *FEBS Lett.* 査読有 **587**, 2013, 3142-3147
DOI:10.1016/j.febslet.2013.07.054
 6. Tsukatani, Y., Yamamoto, H., Harada, J., Yoshitomi, T., Nomata, J., Kasahara, M., Mizoguchi, T., Fujita, Y., Tamiaki, H. An unexpectedly branched biosynthetic pathway for bacteriochlorophyll *b* capable of absorbing near-infrared light. *Sci. Rep.* 査読有 **3**, 2013, 1217
DOI:10.1038/srep01217
 7. Aoki, R., Takeda, T., Omata, T., Ihara, K., Fujita, Y. MarR-type transcriptional regulator ChlR activates expression of tetrapyrrole biosynthesis genes in response to low-oxygen conditions in cyanobacteria. *J. Biol. Chem.* 査読有 **235**, 2012, 13500-13507
DOI:10.1074/jbc.M112.346205
- [学会発表] (計 43 件)
1. Fujita, Y., Tsujimoto, R. Two transcriptional regulators, ChlR and PatB, are essential for diazotrophic growth in the non-heterocystous cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. 18th International Congress on Nitrogen Fixation. October 14-18, 2013, Phoenix Seagaia Resort, Miyazaki, Japan (招待講演)
 2. Fujita, Y. Nitrogenase-like enzymes in bacteriochlorophyll biosynthesis. International Mini-Symposium on Biochemistry and Bioinorganic Chemistry of Nitrogenase Active Sites. October 11-12, 2013, Nagoya University, Nagoya, Japan (招待講演)
 3. Fujita, Y., Kato, M., Yamamoto, H. Reconstitution of sequential reaction from protochlorophyllide to 3-vinyl bacteriochlorophyllide *a* by two nitrogenase-like enzymes. International Conference on

Tetrapyrrole Photoreceptors of Photosynthetic Organisms 2013 (ICTPPO2013), September 11-15, 2013, HuaZhong Agricultural University, Wuhan, China (招待講演)

4. 藤田祐一・加藤美奈・山本治樹、ニトロゲナーゼ類似酵素の連続反応によるバクテリオクロリン環形成反応の再構成、第4回日本光合成学会およびシンポジウム、2013年5月31日-6月1日、名古屋大学
5. 塚谷祐介、山本治樹、原田二郎、野亦次郎、溝口正、藤田祐一、民秋均、クロロフィルド *a* 還元酵素によるバクテリオクロロフィル *b* のエチリデン基形成、第54回日本植物生理学会年会、2013年3月21日~23日、岡山大学
6. 藤田祐一、暗所作動型プロトクロロフィルド還元酵素の反応機構解析、第20回光合成の色素系と反応中心に関するセミナー、2012年7月1日、大阪大学、豊中
7. 立松彩、野亦次郎、村木則文、栗栖源嗣、藤田祐一、暗所作動型プロトクロロフィルド還元酵素の BchB サブユニットの C 末端領域の構造と機能、第53回日本植物生理学会年会、2012年3月16日~18日、京都産業大学、京都
8. 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ルド還元酵素の反応機構の解析、第53回日本植物生理学会年会、2012年3月16日~18日、京都産業大学、京都
9. Fujita, Y. Toward understanding of reaction mechanism of dark-operative protochlorophyllide reductase, International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors of Photosynthetic Organisms 2011, July 25, 2011, Berlin, Germany (招待講演)
10. Fujita, Y. Structure-based functional analysis on dark-operative protochlorophyllide reductase, Gordon Research Conference, Photosynthesis, June 14, 2011, Davidson College, MA, USA (招待講演)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称：生物窒素固定制御因子およびその利用
発明者：辻本良真・藤田祐一
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特願 2014-054088
出願年月日：2014年3月17日
国内外の別：国内

名称：シアノバクテリアにおける完全暗所従属栄養能に関連する遺伝子及びその利用
発明者：平出優人・藤田祐一
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特願 2014-046585
出願年月日：2014年3月10日
国内外の別：国内

名称：バクテリオクロロフィル *b* の大量産生菌の作成方法とその産生菌
発明者：塚谷祐介・原田二郎・野亦次郎・藤田祐一・民秋均
権利者：立命館大学・久留米大学
種類：特許
番号：特願 2014-030085
出願年月日：2014年2月19日
国内外の別：国内

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
サイエンスポータル「窒素固定に必須の制御遺伝子を発見」
http://scienceportal.jp/news/newsflash_review/newsflash/2014/04/20140422_01.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
伊藤 繁 (Itoh, Shigeru)
名古屋大学・遺伝子実験施設・名誉教授
研究者番号：40108634

(3)連携研究者
民秋 均 (TAMIAKI, Hitoshi)
立命館大学・薬学部・教授
研究者番号：00192641

栗栖 源嗣 (KURISU, Genji)
大阪大学・たんぱく質研究所・教授
研究者番号：90294131