

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06716

研究課題名(和文) 光合成色素合成酵素の立体構造からニトロゲナーゼ類似酵素の進化を紐解く

研究課題名(英文) Structural and functional analysis of Chlorophyllide a oxidoreductase

研究代表者

澄田 智美 (Sumida, Tomomi)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋機能利用部門(生命理工学センター)・副主任研究員

研究者番号：00746331

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)：クロロフィリド還元酵素(COR)はバクテリオクロロフィル形成の最終段階反応の一つを触媒する酵素だが、CORの反応メカニズムの詳細な解明は進んでいない。そこで本研究では酵素の立体構造解析を手法としてCORの反応機構の解明に取り組んだ。CORのリコンビナント酵素を精製し、X線結晶構造解析とクライオ電顕による解析を行ったが、データ処理の結果、構造解析に十分な高分解能のデータを得ることができなかった。そこでAlphaFold2を用いた構造予測を行ない、予測構造と基質のDocking modelを作製しCORの触媒残基の推測を行なった。今後CORの基質認識及び触媒メカニズムの解明を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CORの反応メカニズムの解明は、これまでの研究において酵素学的なアプローチからも触媒残基の同定には至っていない。CORの立体構造解析から、CORによる色素生成メカニズムの直接的な知見を得ることができれば、触媒残基や認識サイトの改変も可能となり、異なる吸収波長を持つ任意のバクテリオクロロフィル形成酵素の作製や、ニトロゲナーゼ類似酵素ファミリーに属する酵素間の比較から、多重結合を還元する共通の反応メカニズムを解明出来るだけでなく、共通祖先からの進化の過程を議論することが可能となるため学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Chlorophyllide a oxidoreductase (COR) is a divinyl reductase that play a role in the late step of bacteriochlorophyll biosynthesis. In this study, we purified the recombinant COR enzyme and analyzed it with X-ray crystallography and cryo-EM. However the high resolution images were not obtained, we used AlphaFold2 to predict the structure. We constructed the docking model for COR with substrate. Based on this information, we try to elucidate the substrate recognition and catalytic mechanisms of COR.

研究分野：分子生物学

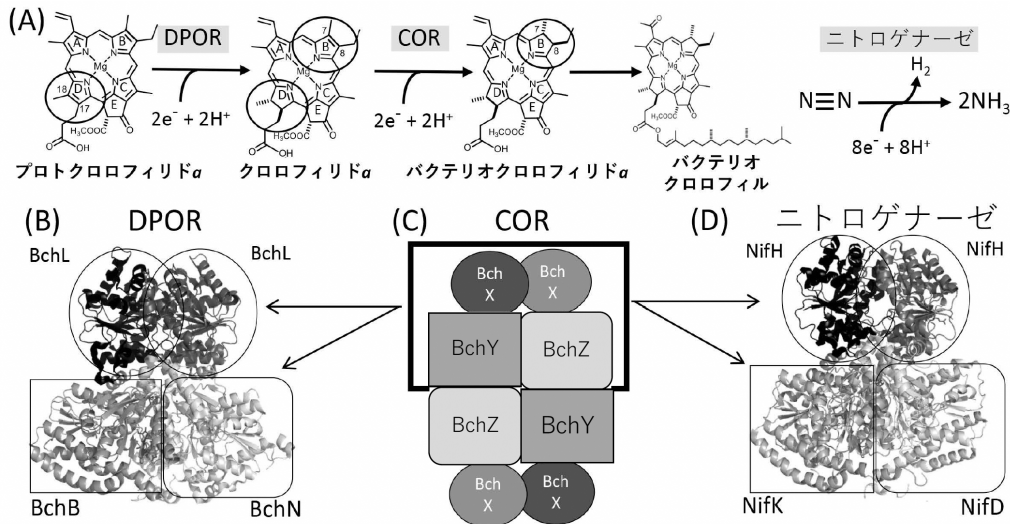
キーワード：光合成 色素合成酵素 バクテリオクロロフィル

1. 研究開始当初の背景

バクテリオクロロフィルは光合成細菌の持つ光合成色素で、タンパク質と複合体を形成し、光合成反応において電子伝達やエネルギーの吸収の中心的役割を担っている。クロロフィリド還元酵素(COR)はバクテリオクロロフィリド(Bchl_a)形成の最終段階の反応を行う嫌気性ヘテロ八量体の色素合成酵素であるが、CORの詳細な反応メカニズムの解明は未だ進んでいない。CORによる還元反応メカニズムを明らかにするために、本研究ではX線結晶構造解析を手法としてCORの立体構造を解析し、Bchl_aの生合成機構の解明を行う。得られた構造情報をもとに、改変酵素を遺伝子工学的に作製し、異なる吸収波長を持つ任意のBchl_a形成酵素の作製や、ニトロゲナーゼ様酵素ファミリーに属するCORが祖先酵素からどのように進化してきたのか、酵素進化に関して考察していく。

2. 研究の目的

CORは、CORの基質となるクロロフィリド a を形成する光非依存性プロトクロロフィリド還元酵素(DPOR)と高い配列類似性と反応類似性を示す酵素で、COR, DPOR は共に一次配列の類似性からニトロゲナーゼ様酵素ファミリーに属する(図 1(A))。本研究では、CORの結晶構造解析を手法として、CORによるBchl_a形成に関わる反応メカニズムの解析を目的として研究を行う。マルチサブユニット構造をとるCORの電子伝達ユニットと触媒ユニットの相互作用や電子伝達経路、クロロフィリドの認識機構、反応メカニズムをCORの立体構造解析から解明する。また、CORには、8-ビニルクロロフィリドをクロロフィリド a を経てBchl_aへと変換する二つのステップを一つの酵素で触媒するa-CORと、8-ビニルクロロフィリドのC7=C8-C=Cの共益二重結合を一段階で1,4還元し、Bchl_bを形成する反応を触媒するb-CORが存在するが、a-CORとb-CORは非常に相同性が高く(65-80%)、実際にどのアミノ酸がそれぞれの反応に直接関与しているのか、一次配列の比較や酵素アッセイだけでは解決する事が出来なかったため、CORの立体構造解析からa-CORとb-CORの生合成メカニズムの違いを視覚的に解析することも目的とする。CORの構造解析に成功するとDPOR、ニトロゲナーゼの立体構造との比較が可能となり、多重結合を還元する共通の祖先から、各々の酵素が各々の基質に特化する形でのように進化したのかを推測する手がかりが得ることができる(図 1(B-D))。よって、CORの立体構造を解析することでこれらの色素生合成メカニズムを視覚的に解明し、得られた構造情報から改変酵素の作製や、ニトロゲナーゼ様酵素ファミリーのファミリー間酵素の構造比較を行い、共通の祖先からの進化の過程を一次構造だけでなく、立体構造や触媒メカニズムから考察する事を目的とする。



(図1) ニトロゲナーゼ類似酵素ファミリーの触媒反応 (A)と立体構造 (B-D)

3. 研究の方法

CORは酸素感受性があるため、酵素の精製、結晶化スクリーニング及び結晶凍結は嫌気チャンパー内で行った。マルチサブユニット構造をとるa-CORにおいて、BchX/BchY/BchZの複合体でのリコンビナントの酵素を安定に効率良く作製するために、HisTagをBchYのみに付けBchX/BchY/BchZを全て同じ大腸菌で発現させる系を作製し、複合体を形成したタンパク質のみを精製するための系を構築した。大腸菌で発現させたタンパク質は、嫌気チャンパー内で、アフィニティー・イオン交換・ゲル濾過などの各種クロマトグラフィーを実施し、高品質・高純度

での精製条件を確定した。これを BchX/BchY/BchZ の apo 酵素とし、この三者複合体に基質を結合させ再精製したものを基質との複合体とし、結晶化を行った。また、並行してクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析も試みた。クライオ電顕測定用のグリッド作製は嫌気チャンバー内ではできなかったため、酸素存在下で行った。この事がその後の結果にも影響している可能性は否定できない。

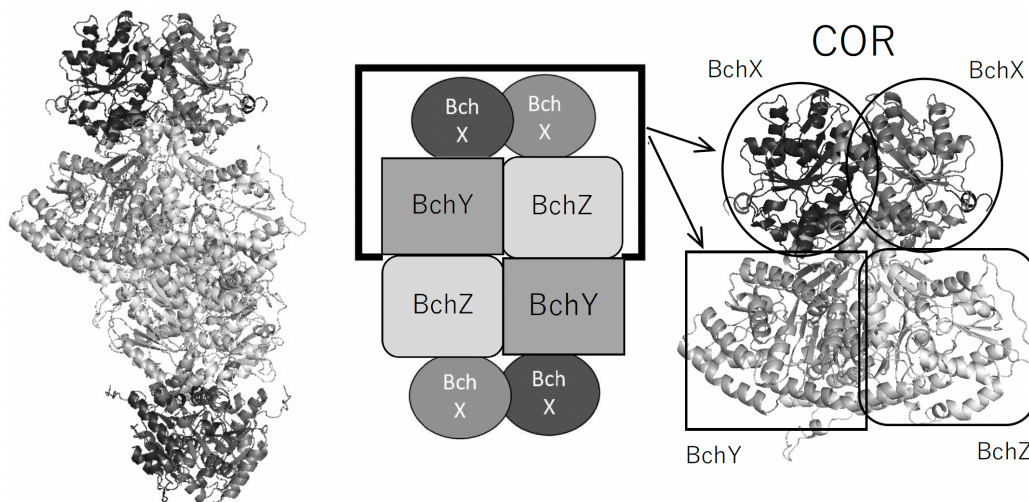
4. 研究成果

a-COR の BchX/BchY/BchZ 複合体形成効率の良い発現ベクターの構築、嫌気チャンバー内での精製条件の確定、apo 体及び基質との複合体での結晶化スクリーニングを行い、微結晶を確認したため、大型放射光施設での X 線回折測定を実施した。しかし、構造解析可能な回折データを得る事ができなかった。そこで、COR は分子量約 350 kDa のヘテロ八量体のため、X 線結晶構造解析と並行してクライオ電子顕微鏡での構造解析に着手した。ネガティブ染色法による観察でサンプルが複合体を形成していることを確認し、クライオ電子顕微鏡観察によるデータ取得及び構造解析を行った。その結果、2D Classification では図のような像が確認できた(図 2)。しかし、複合体の一部脱離が見られ、分解能も低かったため構造決定には至らなかった。そこで、BchY/BchZ で酵素を精製し、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析を試みたが、構造解析には至らなかった。



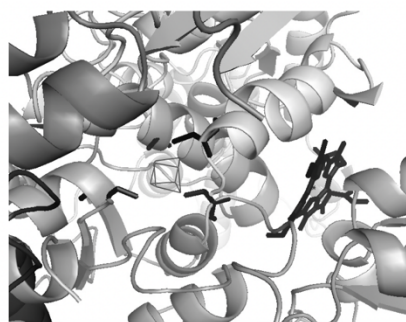
(図2) 2D classificationの結果

令和 3 年 7 月にタンパク質の立体構造を高精度に予測できる AlphaFold2 (AF2) が公開されたため、AF2 での予測構造を作製して検討を行った。COR のヘテロ八量体の予測構造は、DPOR の結晶構造を参考に再構築した(図 3)。



(図3) AF2構造から構築したCORの(X₂)₂(YZ)₂予測構造

DPOR の基質との複合体の構造を参考に、COR の AF2 の予測構造に FeS クラスターと基質を配置した docking model を作成し、周辺アミノ酸を確認した(図 4)。FeS クラスターは、BchY の 3 つの Cys と BchZ の 1 つの Cys が関わっていることが確認できた(図 4)。基質の認識に関しては、基質がどの向きで入っているか確定できないため、DPOR の X 線結晶構造での位置を参考に、様々な向きで入る事を想定し、周辺アミノ酸を確認した。その結果、基質の疎水性部分の認識に関わると考えられる疎水性アミノ酸残基や、プロトン供給源となり得る極性アミノ酸残基候補をいくつか選定した。今後、これらのアミノ酸の点変異体を作製し、COR の反応機構を解明していく予定である。



(図4) CORの(X₂)₂(YZ)₂予測構造での FeSクラスターと基質の結合部位

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	塚谷 祐介 (Tsukatani Yusuke) (10421843)	国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭研究プログラム)・副主任研究員 (82706)	

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