

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840099

研究課題名(和文) 光合成生物の新たな光ニッチ環境の獲得・進化に必要な最小構成因子の解明

研究課題名(英文) Minimal factors required for the evolution to adapt new light niche for photosynthetic organisms

研究代表者

塚谷 祐介 (Tsukatani, Yusuke)

東京工業大学・地球生命研究所・研究員

研究者番号：10421843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：クロロフィリド還元酵素(以下、COR)はバクテリオクロリンの形成に重要な色素合成酵素であり、光合成細菌の種によってその反応性が異なる点で特徴的である。本研究では、CORを構成するサブユニットのうちBchYとBchZをモデル光合成生物に遺伝子工学的に導入することで、近赤外光吸収型色素を産生するように改変することに成功し、またその結果からCORの反応性はBchY/BchZ依存的事であることを見出した。より詳細な基質特異性解析やその他の生合成酵素活性と併せて続報を準備中である。

研究成果の概要(英文)：Chlorophyllide oxidoreductase (COR) is important for the formation of a bacteriochlorin ring, and is a unique pigment biosynthesis enzyme which shows distinct substrate recognition and hydrogen addition activities, depending on the host strains. We found factors essential for making a model photosynthetic bacterium produce bacteriochlorophyll-b which absorbs near-infrared light. The important factors are the loss of functions of both intrinsic COR and 8-vinyl reductase and the genetic incorporation of the BchYZ catalytic components into the host strain. We are further analyzing substrate recognition of COR in detail and enzymatic activities of other pigment biosynthesis enzymes.

研究分野：光合成科学

キーワード：バクテリオクロロフィル 光合成 色素 近赤外光 光合成の進化

1. 研究開始当初の背景

光合成の初期過程は、太陽光を吸収するアンテナ部と、アンテナから伝達された光エネルギーを化学エネルギーへ変換する反応中心部に分かれる。アンテナ部および反応中心部には、生物種によって様々なクロロフィルあるいはバクテリオクロロフィル(以下 BChl)色素が結合している。色素分子種ごとに特徴的な光吸収帯を持つため、光合成生物はそれぞれの生育環境における効率的な光合成反応に適応している。紅色光合成細菌は、種によって BChl-*a* あるいは BChl-*b* を生産するものがある。BChl-*a* と BChl-*b* の化学構造上の差異は、それぞれ C8 位がエチル基かエチリデン基かという点のみであり、この変化が可視光領域から近赤外光領域への吸収波長帯シフトを生み出す。近年我々の研究グループは、全ての光合成細菌に保存されているクロロフィル還元酵素(以下 COR)という色素生合成酵素が、BChl-*a* 生産性菌由来と BChl-*b* 生産性菌由来では異なる基質特異性と反応性を持ち、それぞれエチル基とエチリデン基の形成に関わることを明らかとしてきた。

2. 研究の目的

本研究課題では、COR の *in vitro* での詳細な反応解析を行うことで、2 タイプの COR の触媒反応特性(つまり反応性変化の原因)を明らかとし、それを基に BChl 色素の生合成経路の全体像を明らかにすることを目的の1つとする。また、BChl-*a* を生産するモデル生物 *Rhodobacter sphaeroides* に、BChl-*b* 生産性菌由来の COR を導入・置換することで、取り扱いや培養が容易なモデル生物を BChl-*b* を生産し得るよう改変して、BChl-*b* の大量生産を実現することも目的とする。

3. 研究の方法

COR 反応特性の違いを生み出すサブユ

ニット構成や基質結合部位周辺のアミノ酸環境を特定して、BChl-*a* 合成型から BChl-*b* 合成型への変化・進化(生成物の吸収帯の長波長化)に必要な因子を解明する。COR の *in vitro* でのアッセイ系は既に確立している。COR は3つのサブユニット BchX/BchY/BchZ で構成される。*R. capsulatus* (BChl-*a* 生産性)由来および *Blastochloris viridis* (BChl-*b* 生産性)由来の BchX/BchY/BchZ を用いて、これらのサブユニットをヘテロに組み合わせた酵素活性アッセイを行い、BChl-*a* と BChl-*b* のどちらが合成されるかを観測して C8 位エチリデン基形成に重要なサブユニット構成をまず同定する。また、研究協力者が COR の結晶構造解析を進めており、COR の構造情報が得られた際には基質結合ポケット周辺のアミノ酸を部位特異的に変異させることで反応性の変化を観測する。

BChl-*a* 生産性のモデル生物へ BChl-*b* 生産菌由来の COR を導入、または一部を改変することで BChl-*b* 生産性へ変化することを確認し、*in vitro* での反応解析結果を *in vivo* でも証明するとともに、BChl-*b* の大量生産系を確立する。

4. 研究成果

COR は BchX/BchY/BchZ の3つのサブユニットで構成されるが、*in vitro* での反応解析の結果から、異種由来のサブユニット間でも複合体を形成すること、及び酵素反応生成物は BchY/BchZ 依存的事であることが明らかとなった。BchY/BchZ は、ヘテロ四量体で触媒コンポーネントを形成すると言われており、これらが同一種由来であれば電子伝達コンポーネント(BchX)は交換可能であることを示す。BchY と BchZ をヘテロにした場合では、反応生成物が見られず、2つのサブユニットのうちどちらが BChl-*a/b* 産生に重要なのかは判別できてお

らず、今後の課題である。サブユニット内の一部のアミノ酸をヘテロ化したものを使用する等、順次明らかにしていくことを計画している。また、様々な色素中間体を準備して COR の基質特異性の詳細解析を継続している。色素生合成ステップにおいて、COR の前後で機能する他の酵素 (BchF や BchC) の反応特性とも併せて続報を準備中である。

COR の反応特性に関する知見を基に、遺伝子工学的な手法により BChl-*a* を生産するモデル生物 *R. sphaeroides* を BChl-*b* 生産性に改変することに成功した。この結果は、国際学術論文への掲載及び国際特許公開として成果発表した。BChl-*b* を生産する変異株は、光捕集系蛋白質の吸収帯が元々の 850 nm から 900 nm まで長波長シフトしていたが、*B. viridis* (元来 BChl-*b* 生産性) などに見られるような 1020 nm の吸収帯は達成しなかった。すなわち *B. viridis* に見られる極端な長波長光吸収は、色素が BChl-*b* に変わったことだけではなく、蛋白質三次元構造やその他のコファクターにも起因することが示唆された。

研究最終年度は、ここまでの COR 研究によって明らかになった BChl 色素生合成経路の分岐および経路全体像について、総説および Book Chapter (計 4 報) の執筆に注力した。

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. Tamiaki, H., Teramura, M., and Tsukatani, Y. (2016) Reduction processes in biosynthesis of chlorophyll molecules: chemical implication of enzymatically regio- and stereoselective hydrogenations in the late stages of their biosynthetic pathway. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 89, 161–173. 査読有

2. 塚谷祐介 (2016) クロロフィル色素類の合成系の進化. **光合成研究** 26, 192–203. 査読有
3. Tsukatani, Y., Harada, J., Nomata, J., Yamamoto, H., Fujita, Y., Mizoguchi, T., and Tamiaki, H. (2015) *Rhodobacter sphaeroides* mutants overexpressing chlorophyllide *a* oxidoreductase of *Blastochloris viridis* elucidate functions of enzymes in late bacteriochlorophyll biosynthetic pathways. *Sci. Rep.* 5, 9741. 査読有
4. Tsukatani, Y., Hirose, Y., Harada, J., Misawa, N., Mori, K., Inoue, K., and Tamiaki, H. (2015) Complete genome sequence of the bacteriochlorophyll *b*-producing photosynthetic bacterium *Blastochloris viridis*. *Genome Announc.* 3, pii: e01006-15. 査読有
5. Mizoguchi, T., Harada, J., Tsukatani, Y., and Tamiaki, H. (2015) The 17-propionate esterifying variants of bacteriochlorophyll-*a* and bacteriopheophytin-*a* in purple photosynthetic bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B* 142, 244–249. 査読有
6. Harada, J., Teramura, M., Mizoguchi, T., Tsukatani, Y., Yamamoto, K., and Tamiaki, H. (2015) Stereochemical conversion of C3-vinyl group to 1-hydroxyethyl group in bacteriochlorophyll *c* by the hydratases BchF and BchV: adaptation of green sulfur bacteria to limited-light environments. *Mol. Microbiol.* 98, 1184–1198. 査読有
7. 塚谷祐介, 民秋均 (2015) 近赤外光を吸収するバクテリオクロロフィル色素の生合成経路解明と応用. **生化学** 87, 234–238. 査読有
8. Harada, J., Mizoguchi, T., Tsukatani, Y., Yokono, M., Tanaka, A., and Tamiaki, H. (2014) Chlorophyllide *a* oxidoreductase works as one of the divinyll reductases

specifically involved in bacteriochlorophyll *a* biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 289, 12716-12726. 査読有

〔学会発表〕(計 37件)

1. **塚谷祐介** 「テトラピロール色素の生合成系の進化」 第18回日本進化学会年会、東京工業大学、2016年8月25-28日 招待講演
2. **塚谷祐介** 「クロロフィルが先か、バクテリオクロロフィルが先か? ~色素合成系の進化~」 第7回日本光合成学会、東京理科大学、2016年5月27-28日 招待講演
3. **塚谷祐介**、原田二郎、山本治樹、野亦次郎、溝口正、藤田祐一、民秋均 「ゲノム比較から紐解くバクテリオクロロフィル生合成系の新機軸」 ゲノム微生物学会、東京工業大学、2016年3月4-5日
4. **Tsukatani, Y.**, Harada, J., Nomata, J., Yamamoto, H., Mizoguchi, T., Fujita, Y., and Tamiaki, H. Functional versatility and application of a nitrogenase-like enzyme, chlorophyllide *a* oxidoreductase, on bacteriochlorophyll biosynthesis. 15th International congress on phototrophic prokaryotes (2015/8/2-6, Tübingen, Germany)
5. Yamamoto, H., Mizoguchi, T., **Tsukatani, Y.**, Tamiaki, T., Kurisu, G., and Fujita, Y. Biochemical analysis of two kinds of catalytic activities of chlorophyllide *a* oxidoreductase from *Rhodobacter capsulatus*. 15th International congress on phototrophic prokaryotes (2015/8/2-6, Tübingen, Germany)
6. 溝口正、伊佐治恵、安居嘉秀、正津大介、軍司昌秀、原田二郎、**塚谷祐介**、民秋均 「超高感度クロロフィル計測システムの開発と緑色光合成細菌の単一細胞測定への応用」 第56回日本植物生理学会、東京農業大学、2015年3月16日~18日
7. **塚谷祐介** 「ニトロゲナーゼ類似酵素による光合成色素合成の多様性と応用」 蛋白

研セミナー「嫌気蛋白質を対象とした構造・機能相関の現状」、大阪大学蛋白質研究所、2015年3月5日 招待講演

8. **Tsukatani, Y.**, Noji, T., Mizoguchi, T., Harada, J., Tamiaki, H., Itoh, S., and Masuda, S. Evolution on photosynthesis toward using different light source. The 2nd CRL International Forum (Tokyo Tech - HHU Düsseldorf Joint Symposium on Photosynthesis as a New Chemical Resource) (2015/3/4-5, Tokyo, Japan)
9. **塚谷祐介**、増田真二 “Artificial creation of oxygenic photosynthesis: Elucidation of genetic backgrounds for chlorophyll *a* biosynthesis” 「細胞を創る」研究会 7.0、東京大学 2014年11月13-14日 招待講演
10. **塚谷祐介**、増田真二 「始原的な光合成から酸素発生型光合成への進化」 バイオコンファレンス 2014、首都大学東京、2014年11月7日 招待講演
11. **Tsukatani, Y.**, Yamamoto, H., Harada, J., Nomata, J., Mizoguchi, T., Fujita, Y., and Tamiaki, H. Chlorophyllide *a* oxidoreductase catalyzes the formation of an ethylidene group of bacteriochlorophyll *b*. 8th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (2014/06/22-28, Istanbul, Turkey) 招待講演

〔図書〕(計 2件)

1. **Tsukatani, Y.**, and Tamiaki, H. (2017) In-vitro and in-vivo synthesis of bacteriochlorophylls absorbing near-infrared light. In: Bioinspired Chemistry (T.S. Balaban ed.), World Scientific Publishing, Singapore, in press.
2. **塚谷祐介**、民秋均 (2016) 光化学系 I. In: 光触媒/光半導体を利用した人工光合成 pp. 22-30. NTS 出版

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：バクテリオクロロフィル*b*の大量産生
方法及び産生菌
発明者：塚谷祐介, 民秋均, 原田二郎, 藤田祐
一, 野亦次郎
権利者：立命館大学, 久留米大学
番号：PCT-JP2015- 54552
出願年月日：2015/02/19
国内外の別：国際

○取得状況（計 1 件）

名称：バクテリオクロロフィル*b*の大量産生
方法及び産生菌
発明者：塚谷祐介, 民秋均, 原田二郎, 藤田祐
一, 野亦次郎
権利者：立命館大学, 久留米大学
番号：WO2015/125849
取得年月日：2015/8/27
国内外の別：国際

6. 研究組織

(1)研究代表者

塚谷 祐介 (Tsukatani, Yusuke)
東京工業大学・地球生命研究所・研究員
研究者番号：10421843

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

原田 二郎 (HARADA, Jiro)
久留米大学・医化学講座・講師
藤田 祐一 (FUJITA, Yuichi)
名古屋大学・生命農学研究科・教授
山本 治樹 (YAMAMOTO, Haruki)
大阪大学・蛋白質研究所・JSPS 研究員