

# 研究報告書

研究課題名：「光に依存した新規窒素固定酵素の創成」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：藤田 祐一

## 1. 研究のねらい

クロロフィル生合成系の最終段階を担う酵素プロトクロロフィリド(Pchlide)還元は、光に依存して反応を触媒する光依存型 Pchlide 還元酵素(LPOR)と光に依存しない暗所作動型 Pchlide 還元酵素(DPOR)の2つの酵素が存在する。LPOR が、短鎖脱水素酵素／還元酵素 (SDR)と呼ばれる大きな酵素ファミリーに属するのに対し、DPOR は窒素固定酵素ニトロゲナーゼと構造的な類似性を示す。ニトロゲナーゼは空気中の窒素分子をアンモニアに変換する農業的に大変重要な酵素である。これらの酵素の関係から、LPOR と構造的に類似した光に依存する新規ニトロゲナーゼが創成可能ではないかという着想を得た(図1)。この着想の実現のためには、これら既存の酵素 DPOR、LPOR とニトロゲナーゼの詳細な分子機構の解析が必要である。また、新たな酵素創成のための技術基盤の確立が必要である。

本さきがけでは、DPOR の構造と機能解析、LPOR の機能解析および新たな機能を持つ酵素創成に向けた技術基盤の確立を目指した。

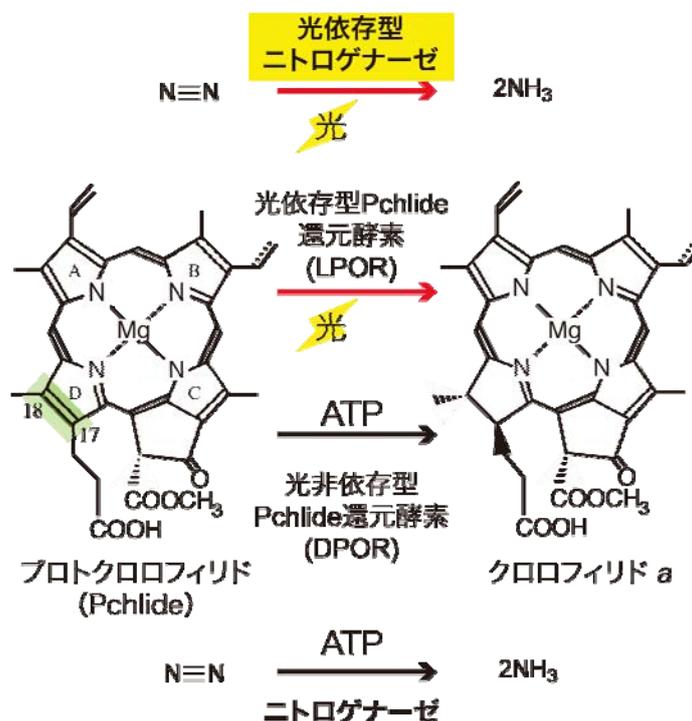


図1、プロトクロロフィリド(Pchlide)還元酵素は、化学的に安定なポルフィリン環の共鳴構造の一部C17=C18二重結合を還元する。Pchlide還元酵素には、ニトロゲナーゼと類似した光非依存型酵素(DPOR)と反応に光を要求する光依存型酵素(LPOR)という2つのアナログ酵素が存在する。これらの酵素の構造と機能に関する詳細な解析に基づいて、「光依存型ニトロゲナーゼ」の創出を目指した。

## 2. 研究成果

### 1) 暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素(DPOR)の構造機能解析

#### (a) NB-タンパク質の構造解析

DPOR は、ATP の加水分解に共役して電子を供給する還元コンポーネント L-タンパク質と Pchlide の還元反応を行う触媒コンポーネントNB-タンパク質から構成されている。本研究では、Pchlide 還元反応機構を明らかにすることを目指し NB-タンパク質に研究の焦点を当てるこ

とにした。X線構造解析により基質結合型のNB-タンパク質の立体構造(2.3 Å分解能)を得た。全体の構造は、生化学的解析によって予測されたように BchN と BchB のヘテロ 4 量体 ((BchN-BchB)<sub>2</sub>) であった(図2A)。また、金属分析で予測されていたように [4Fe-4S]型鉄硫黄クラスターが最小機能単位 BchN-BchB の界面に存在していた。この鉄硫黄クラスターは、3つのシステインと1つのアスパラギン酸によって保持されるユニークなものであったためNB-クラスターと名付けた。また、NB-クラスターから 10 Å の位置に Pchlide 分子が存在していた。構造から機能的に重要と推察されるアミノ酸残基について部位特異的変異導入により変異タンパク質を単離し、活性を評価し、反応機構を以下のように推定した。電子は、NB-クラスターを経由して Pchlide に移され、C17=C18 二重結合還元に供される。この還元に必要な2つのプロトンのうち一つは C17 炭素から下方 4.9 Å の位置の BchB-Asp274 から、もう一つは C18 炭

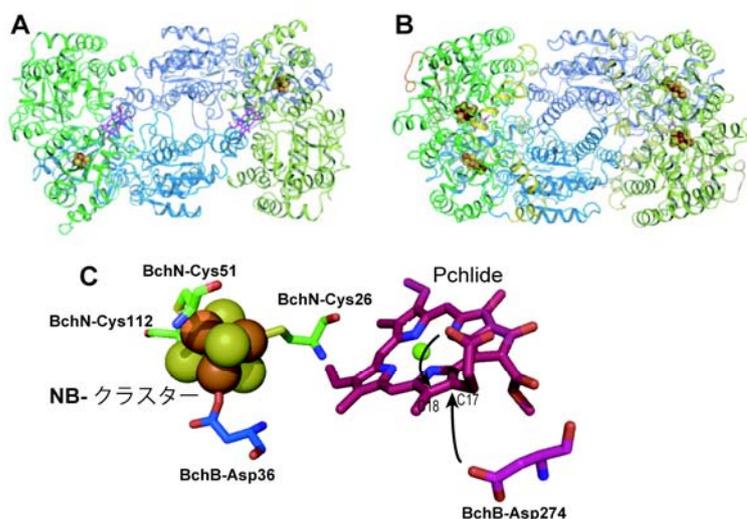


図2、DPORのNB-タンパク質 (A) とニトロゲナーゼMoFe タンパク質 (B) の立体構造比較。全体構造が非常によく保存されている。(C) 構造から予想されるPchlide還元反応の模式図。アスパラギン酸によって保持される鉄硫黄クラスターをもつ酵素は、NB-タンパク質が鉄硫黄酵素として初めての例である。プロトンの供与体は、C17に対してBchB-Asp274、C18に対して基質Pchlideのプロピオン酸と推定され、これらの立体配置が反応の立体特異性を決定づけていると推定される。

素には 4.8 Å 上方に位置する基質自身のプロピオン酸から供給されることで反応の立体特異性が決定していることが推察された(図2C)。この仮説は、BchB-D274A が活性を失うこと、C13 位のプロピオン酸がアクリル酸に置換された Pchlide アナログであるクロロフィル *c* が競合阻害を引き起こすことにより実験的に支持された。

(b)NB-タンパク質の部位特異的変異による機能解析

NB-タンパク質の構造に基づくPchlide 還元の分子機構解明を目指し、部位特異的変異酵素を用いた解析を進めた。NB-クラスターの特徴であるアスパラギン酸配位の意義を検討するため、BchB-Asp36 をシステインに置換した BchB-D36C 変異型 NB-タンパク質のNB-クラスターを電子常磁性共鳴(EPR)により解析した。野生型 NB-タンパク質が L-タンパク質と競合阻害剤クロロフィル *c* の共存下で異常に広い S=3/2 の EPR シグナルを示したのに対し、BchB-D36C 変異型 NB-タンパク質では通常の4つのシステイン残基によって保持される [4Fe-4S]クラスターが示す S=1/2 の EPR シグナルが観測された。また、この変異型 NB-タンパク質は Pchlide 還元活性を失っていた。この結果は、[4Fe-4S]クラスターの配位子の一つをシステインからアスパラギン酸にすることで酸化還元電位が低下し、[4Fe-4S]クラスターが Pchlide 還元への電子供与体として機能することが可能となったことを示唆している。

## 2)ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いた新規酵素選抜系の開発

LPOR は、SDR ファミリーに属する酵素であるが、結晶構造はいまだ明らかにされていない。

構造が解かれた SDR ファミリー酵素から推定された LPOR の構造によると、LPOR ポリペプチドの中央付近に構造が予測できない LPOR 特有のループ構造が存在する。この LPOR 特異的ループが LPOR の光依存的性質の構造基盤を成していると推察される。そこで、LPOR 特異的ループをコードする DNA 領域を新たな DNA 断片に置き換えることで、LPOR を構造鋳型とした新規な光依存的酵素が創出できるのではないかと考えた。このループ配列が LPOR の活性に必須であることを、実際にこのループを削除した短縮型 LPOR を野生型 LPOR と置き換えた変異ラン藻が、LPOR 欠損株  $\Delta por$  と同じように光感受性を示すことで確認した。

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 のゲノム DNA を 200–500 bp に断片化し、エラープローン PCR(epPCR)によって変異をランダムに導入したライブラリーを調製し、このライブラリーで *Synechocystis* sp. PCC 6803 を形質転換し、適切な条件で選抜することで新規酵素をもつ形質転換体を得るという戦略を策定した。そのモデル実験として、実際にライブラリーを調製し、このうち 11 クローンの塩基配列を決定した。平均鎖長は 213 bp であり、エラー導入率は 1 kb 当たり 5 塩基であった。興味深いことに、1 つのクローン(215 bp の挿入)はある遺伝子の相補鎖が翻訳されるようにベクターに連結され、そのアミノ酸配列は *Campyrobacter jejuni* のアスパラギン酸 tRNA シンターゼと 27% 相同性を示した。この結果は、この方法による新たな酵素創出の可能性を示唆するものである。一方、この方法による新規酵素創出に向けての問題点として次の 2 点が明らかになってきた。1 点目は、epPCR による変異率がそれほど高くなく、もともとゲノム断片に存在する終止コドンに加え、変異導入によって新たに生じる終止コドンを排除することが困難である点である。これらを考慮した上で大腸菌ライブラリーのサイズをできる限り大きくする必要がある。もう一点は、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の形質転換効率が大腸菌に比べると非常に低いため、いかに大きな大腸菌ライブラリーを調製したとしても、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の形質転換の段階でスクリーニングできるクローン数が限定されてしまうことである。

これらの問題点を克服するために新たな戦略を立案した。すでに存在する終止コドンと変異導入によって生じる終止コドンを排除するために、終止コドンを最初から排除したランダムコドンをもつ合成 DNA でライブラリーを調製することを考えた。遺伝暗号表から終止コドンを排除できる 3 種類のランダムコドン NNY、NBB、VNN を考案し、これが連続するようなランダム合成 DNA を利用することにした。これにより終止コドンの完全排除が可能となる。ヌクレオチド合成の技術的問題で、合成可能な一本鎖 DNA は最長 120 mer 程度である。より長いアミノ酸配列をコードできる DNA 断片を得るために、2 本の合成 DNA を、確定配列を介したオーバーラップ PCR によって連結し、213 bp のランダム二本鎖 DNA (両端に 21 bp と中央部に 27 bp の確定配列をもち、前半 72 bp と後半 69 bp のランダムコドン領域をもつ)を得た。実際にこの合成ランダム配列によって得られたクローンの 1 つは、ヒトの骨形成タンパク質-3b の一部と有意な類似性を示した。このことは、終止コドンを排除したランダムコドンをもつ完全合成 DNA が酵素の進化の母集団になりうることを示唆している。

次に、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の形質転換効率向上を試みた。エクソヌクレアーゼをコードする *recJ* 遺伝子を欠損した *Synechocystis* sp. PCC 6803 の形質転換効率が非常に高いことが報告されている (Kufryk et al. (2002) *FEMS Microbiol. Lett.* **206**, 215–219)。そこで、実際に *recJ* 変異株を単離し、形質転換効率について野生株と比較した。その結果、*flv3* 遺伝子破壊によりジェンタマイシン耐性を付与する形質転換においては、*recJ* 欠損株は野生株よりも約

1300 倍の形質転換効率が得られた。さらに、*slr2031* 遺伝子の欠損を加えた二重変異株  $\Delta recJ-\Delta slr2031$  では約 1600 倍の効率向上が認められた。この飛躍的に高い形質転換効率は、大腸菌の形質転換効率に匹敵しており、もはや大腸菌でのライブラリー調整を経由することなく、DNA ライブラリーを直接 *Synechocystis* sp. PCC 6803 で選抜することが可能であることを示している。

### 3. 今後の展開

DPOR の構造と機能解析によって、DPOR は基質を含めた酵素の構造に基づき反応機構を議論できる、クロロフィル生合成系酵素として初めての酵素となった。また、構造は未解明ながら詳細な分光学的解析から反応機構が解析されている LPOR と比較が可能となったことは学術的意義が非常に大きい。また、ニトロゲナーゼでは 8 電子還元が複雑な金属クラスターを経由して進行する非常に複雑な反応であるため、反応機構解析が困難を極めている。これに対し、DPOR では 2 電子還元であり、ニトロゲナーゼ MoFe タンパク質と構造的に酷似していることから、ニトロゲナーゼ反応機構のモデル酵素となることが期待される。また、DPOR のような酸素感受性の高いニトロゲナーゼ類似酵素が葉緑体の中で機能していることを考えると、作物として重要な植物への窒素固定能の付与が原理的に十分可能であることを示唆する研究結果である。

一方で、LPOR 特異的ループを置換することで、SDR ファミリーとしての構造を保持しながら、LPOR 特有の光依存的性質をもつ新たな酵素を創出するというための技術基盤の開発に取り組んだ。ランダムコドンをもつ合成 DNA をもちいたライブラリー調整と *recJ* 欠損株を活用することで、新たな酵素創出に向けて有力な方法を提案することができた。また、*Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いた選抜系は、これまで大腸菌などの従属栄養生物に限られていた酵素選抜系に光合成生物の系が加わることとなり、新規な光依存型酵素の創出に向け可能性を大きく広げることとなる。

### 4. 自己評価

DPOR の構造機能解析は、NB-タンパク質の X 線立体構造をもとに部位特異的変異導入や金属中心の解析により、反応機構について具体的な提案を示すことができた。この一連の解析により、光合成を支えるクロロフィルがどのように生合成されているのか、その最終段階の反応に対して初めて構造に基づく反応機構を提案することができた。また、ニトロゲナーゼとの類似性から DPOR がニトロゲナーゼの反応機構解析のモデルになる可能性が新たに拓かれ、これまで国内ではほとんど皆無であったニトロゲナーゼの生化学に対して新たな切り口での取り組みを可能とした。また、作物への窒素固定能移入の可能性に実現性を示す結果であるとして、DPOR の構造解析の論文が引用されたことから周辺分野にも高いインパクトを与えたとと思われる(Beatty and Good, 2011, *Science* **333**, 416-417)。

光に依存した新規ニトロゲナーゼ創成は、容易に可能なことではないが、この大きな目標に対して具体的な方法論の確立を目指してさまざまな試みを行った。その結果、終止コドンを含まないランダムコドンからなる合成 DNA の利用と *Synechocystis* sp. PCC 6803 の高効率形質転換系を確立することができた。特に、高効率形質転換系を利用することで従来のような大腸菌のライブラリー調整を経由することなく、リガーゼで連結した DNA 試料で *Synechocystis* sp. PCC 6803 を直接形質転換するという独自の系を提案することができた。この方法は、光合成

に関連したさまざまなタンパク質や酵素に応用可能であると期待できる。

## 5. 研究総括の見解

藤田研究者は、光依存型プロトクロロフィリド還元酵素 (DPOR) と窒素を還元してアンモニアにする酵素 (ニトロゲナーゼ) との間に構造的な類似性を発見した。本研究では、この光依存型酵素 (LPOR) をモデルとして、光依存的にアンモニアを合成する新規の酵素の創出を目指した。その研究過程で、DPOR の立体構造を X 線解析法により世界で初めて決定し、ニトロゲナーゼとの構造的な類似・相違を解析し、目的の酵素を創出するストラテジーを提案した。そして、LPOR をテンプレートにして網羅的変異導入の手法により、目的の酵素の創出を試みている。研究期間内に目的酵素の創出までには至っていないが、立体構造を基礎として両還元酵素の作用機作についての新知見を発見した。藤田研究者のこの努力が、農学関連研究者に光技術のインパクトを理解してもらいきっかけを作り、さらに新しい研究アプローチとして定着していくことを祈っている。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文 (原著論文) 発表

1. Yamamoto, H., Kurumiya, S., Ohashi, R. and Fujita, Y. Functional evaluation of a nitrogenase-like protochlorophyllide reductase encoded by the chloroplast DNA of *Physcomitrella patens* in the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Plant and Cell Physiology* **52**, 1983–1993, 2011
2. Aoki, R., Goto, T. and Fujita, Y. A heme oxygenase isoform is essential for aerobic growth in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Modes of differential operation of two isoforms/enzymes to adapt low oxygen environments in cyanobacteria. *Plant and Cell Physiology* **52**, 1744–1756, 2011
3. Kondo, T., Nomata, J., Fujita, Y. and Itoh, S. EPR study of 1Asp–3Cys ligated 4Fe–4S iron–sulfur cluster in NB–protein (BchN–BchB) of a dark–operative protochlorophyllide reductase complex. *FEBS Letters*, **585**, 214–218, 2011
4. Muraki, N., Nomata, J., Ebata, K., Mizoguchi, T., Shiba, T., Tamiaki, H., Kurisu, G. and Fujita, Y. X–ray crystal structure of the light–independent protochlorophyllide reductase. *Nature* **465**, 110–114, 2010
5. Yamamoto, H., Kurumiya S., Ohashi, R. and Fujita, Y. Oxygen sensitivity of a nitrogenase–like protochlorophyllide reductase from the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Plant and Cell Physiology* **50**, 1663–1673, 2009

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

### (3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物等)

<国際学会招待講演> [下記の他、国際学会 11 件、国内学会 46 件]

- 1 Yuichi Fujita, Toward understanding of reaction mechanism of dark–operative protochlorophyllide reductase. International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors of Photosynthetic organisms, July 24–28, 2011, Berlin, Germany

- 2 Yuichi Fujita, Structure-based functional analysis on dark-operative protochlorophyllide reductase. Gordon Research Conference, Photosynthesis, June 12-17, 2011, Davidson College, Davidson, NC, USA
- 3 Yuichi Fujita, Creation of a new light-dependent nitrogenase. AS-JST Joint Workshop on Innovative Use of Light and Nano/Bio Materials, May 26-27, 2011, Taipei, Taiwan
- 4 Yuichi Fujita, Norifumi Muraki, Jiro Nomata and Genji Kurisu, Structure of dark-operative protochlorophyllide reductase: a greening mechanism with an architecture common to nitrogenase. Nagoya University GCOE/Structural Biology Center International Symposium, November 23-24, 2010, Nagoya, Japan
- 5 Yuichi Fujita, Norifumi Muraki, Jiro Nomata and Genji Kurisu, A common architecture between protochlorophyllide reductase and nitrogenase. 1st Asian Symposium on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, September 20-24, 2010, Miyazaki, Japan
- 6 Yuichi Fujita, Norifumi Muraki, Jiro Nomata and Genji Kurisu, Structure of the light-independent protochlorophyllide reductase reveals architecture common to nitrogenase. 9th European Conference on Nitrogen Fixation, September 6-10, 2010, Geneva, Switzerland
- 7 Yuichi Fujita, Genji Kurisu, Norifumi Muraki and Jiro Nomata, Structural aspects of dark-operative protochlorophyllide reductase with nitrogenase-like features. 6th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, July 4-9, 2010, Santa Ana Pueblo, NM, USA
- 8 Yuichi Fujita, Structural basis of nitrogenase-like dark-operative protochlorophyllide reductase catalyzing porphyrin reduction. 16th International Conference on Nitrogen Fixation, June 14-19, 2009, Big Sky, Montana, USA
- 9 Yuichi Fujita, Structural aspects of dark-operative protochlorophyllide reductase. International Symposium on Chemistry of Reductases II, January 15-16, 2009, Nagoya, Japan

<総説>

- 1 藤田祐一暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素～ニトロゲナーゼとの構造的類似性から見る酵素の多様性と進化～ *生化学* **83**, 642-647, 2011
- 2 村木則文、栗栖源嗣、野亦次郎、藤田祐一 クロロフィル生合成系酵素と窒素固定酵素の共通構造基盤 *日本結晶学会誌* **53**, 113-118, 2011
- 3 藤田祐一、栗栖源嗣 クロロフィルを緑にする2つの還元酵素：光依存型酵素と暗所作動型酵素の反応機構と進化的考察 *生物物理* **51**, 66-71, 2011
- 4 Reinbothe, C., El Bakkouri, M., Buhr, F., Muraki, N., Nomata, J., Kurisu, G., Fujita,

Y. and Reinbothe, S. Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction. *Trends in Plant Sciences* **15**, 614-624, 2010 (表紙を飾りました)

- 5 小俣達男、藤田祐一、前田真一 光合成微生物は資源・エネルギー分野で人類に貢献できるか？～生産性を規定する諸要因の分析～ *光合成研究* **20**, 65-71, 2010

<著書>

1. 藤田祐一、野亦次郎 (2009) 光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* における大量発現と形質転換「光合成研究法」低温科学 67 巻、pp. 648-652、北海道大学低温科学研究所
2. 藤田祐一、野亦次郎 (2009) 嫌気条件下でのタンパク質精製「光合成研究法」低温科学 67 巻、pp. 423-427、北海道大学低温科学研究所