HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	クロロフィル-Mg脱離酵素SGRの酵素活性の進化と触媒機構［全文の要約］
Author(s)	小畑, 大地
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 担当：理学部図書室 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第14395号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/82026
Type	doctoral thesis
File Information	Daichi_Obata_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）氏　名　小畑大地

学 位 論 文 題 名

クロロフィル―Mg 脱離酵素 SGR の酵素活性の進化と触媒機構

生物多様性は代謝系の多様性に支えられている。そして、代謝系を構成する主な要素の１つが酵素である。代謝系の多様性は、酵素が特定の基質に対して決まった触媒活性を示すという特徴により成り立っている。しかしながら、酵素と基質の関係は鍵と鍵穴の関係という訳ではなく、本来の基質以外の分子に対して（時に全く異なる触媒反応で）働くことがある。酵素が本来の活性とは別に持つ副反応的な活性を promiscuous な活性という。酵素が持つ promiscuous な活性は酵素の進化の原動力であり、結果的に代謝系の進化および生物の進化をもたらす。

先行研究では、promiscuous な活性は低いものと考えられており、それに基づいた仮説が提唱されていた。すなわち、低い promiscuous な活性が選択圧により上昇し、遺伝子重複あるいは水平移動により獲得された酵素の活性が専門化して新しい酵素になるという仮説である。この仮説では、酵素の進化が低い promiscuous な活性の選択圧による上昇から始まるということを特徴としている。しかし正にこれが問題であり、このような低い活性に選択圧は働くのかという点が問題であった。これに対して、私はクロロフィル分解酵素の研究を通して上記の仮説とは異なり、高い promiscuous な活性を持つ酵素を発見した。ここから私は promiscuous な活性を原動力とする酵素進化（代謝系進化）に関して新しい仮説を提唱した。

緑色植物のクロロフィル分解酵素である SGR はクロロフィル *a* から Mg を脱離することで、分解する酵素である。しかし、SGR はクロロフィルを持つ光合成生物全てに存在している訳ではなく、葉緑体の由来となったシアノバクテリアには存在せず、その起源が不明であった。起源を探るために SGR のアミノ酸配列を用いて、BLAST 検索を行ったところ、クロロフィルを持たず、光合成も行わないバクテリアとアーキアで類似のタンパク質が見つかった。緑色植物 SGR とバクテリア/アーキアの類似タンパク質のアミノ酸配列を用いて系統解析を行ったところ、バクテリア/アーキアのクレードから緑色植物の系統が分岐しているという結果が得られた。このことから、緑色植物の SGR はシアノバクテリアから獲得したのではなく、バクテリア/アーキアの類似タンパク質（以下 SGR ホモログと呼称）を水平移動によって獲得したことが示唆された。さらに、系統解析に用いた SGR ホモログについて活性測定を行ったところ、緑色植物の SGR を超えるクロロフィル―Mg 脱離活性が得られた。また、基質特異性に関して調べたところ、SGR ホモログは SGR が基質とできないようなクロロフィル誘導体も基質にできるということが明らかとなった。バクテリア/アーキアの SGR ホモログが示した Mg 脱離活性は本来の活性ではなく、promiscuous な活性であると考えられる。なぜならば、これらの生物はクロロフィルを持たないからである。

よって、緑色植物のクロロフィル分解系の進化は次のようなシナリオであると考えられる。①バクテリア/アーキアの SGR ホモログに高い promiscuous な活性としての Mg 脱離活性が偶然存在し、②これを水平移動経由で緑色植物の祖先が獲得、③緑色植物の進化の過程で活性の調節と基質特異性の変化を経てクロロフィル―Mg 脱離酵素 SGR となった。

クロロフィルは植物の光合成において、光エネルギーの獲得に必要不可欠な色素分子である。一方で、不要なクロロフィルが蓄積すると活性酸素が発生する危険もある。そのため、クロロフィル分解は光防御という点で重要な代謝系である。我々の研究室は、STAY-GREEN（SGR）というタンパク質がクロロフィル *a* から Mg を脱離する酵素であり、分解系の最初の反応を触媒することを発見した。金属―有機分子間の配位結合を切断する酵素はこれまで報告されて

いないため、SGR の機能の決定は新規な触媒反応を持つ酵素の発見となった。しかし、SGR は未知のタンパク質構造を持ち、ホモロジーモデリングなどによる構造予測ができない。そのため、Mg 脱離機構は不明である。そこで、本研究では、SGR のアミノ酸置換体を作成し、触媒機構の解明を行った。

SGR のアミノ酸置換体は Mg 脱離活性が低下することが予想されたため、アミノ酸置換に使用する SGR の活性は高いものほど望ましい。これまでの通常の発現系では、大腸菌で十分な活性を持つ SGR が得られなかった。そこで、親水性の FATT タグを用いて発現系を改良したところ、大腸菌のタンパク質発現系で活性の高い SGR が得られた。中でもシロイヌナズナの SGRL（AtSGRL）で最も強い活性が得られたので、アミノ酸置換にはこれを使用した。

SGR の Mg 脱離反応は構造未知のタンパク質ドメインが担っており、触媒を予測できるような類似の反応も存在しない。そこで、Mg 脱離反応はフェロケラテースの触媒する鉄原子挿入反応の逆反応であると仮定した。この反応では、酸性アミノ酸残基とヒスチジン残基が触媒を担うことが報告されている。また、クロロフィルの Mg は酸性条件下で脱離し、光化学系では酸性アミノ酸残基あるいはヒスチジン残基がクロロフィルの Mg と配位していることが知られている。以上の情報から、SGR の酸性アミノ酸残基がクロロフィル *a* の Mg-N 間に H^+を供与し、酸性アミノ酸残基あるいはヒスチジン残基が Mg と配位して引き抜くという仮説を立てた。緑色植物の SGR・SGRL のアミノ酸配列のアライメントからも保存性の高い酸性アミノ酸とヒスチジンが複数見つかった。さらに、興味深いことに、クロロフィルを持たないバクテリアでも SGR ホモログが見つかった。もし SGR ホモログから Mg 脱離活性が検出されるならば、触媒に関わるアミノ酸を更に絞り込めると考えた。そこで、6 つのバクテリア SGR ホモログの人工遺伝子を作成し、大腸菌でタンパク質を合成して活性を測定した。活性の有無から Mg 脱離を触媒するアミノ酸を絞り込めた。以上より、AtSGRL において H105、D107、D132、D133、D186 が触媒に必要であることが明らかになった。

以上の実験により、5 つのアミノ酸が触媒に関わると推測されたため、AtSGRL のアミノ酸置換を行った。酸性アミノ酸は H^+供与体として機能していると考えられたので、別の酸性アミノ酸もしくは、H^+供与ができない中性アミノ酸へ置換を行った。ヒスチジンは金属との相互作用に関わっていると考えられたため、金属と相互作用をしないアラニン、金属と相互作用できるアスパラギン・チロシン、金属との相互作用が報告されているシステインへと置換した。活性測定を行ったところ、H105、D107、D186 のアミノ酸置換体はいずれも活性が得られなくなったため、触媒に関与していると考えられた。D132 は中性アミノ酸への置換で活性を失い、別の酸性アミノ酸であるグルタミン酸への置換では活性が維持された。そのため、これも触媒に関与していると考えられた。しかし、D133 は中性アミノ酸に置換しても活性が維持されたため、触媒には関与していないと考えられた。

従って、AtSGRL の Mg 脱離反応には、以下のような触媒機構が存在すると示唆された。

① D107、D132、D186 がクロロフィル *a* の N に H^+を供与し、Mg-N 間の結合を切断する。

② H105 が不安定化した Mg と配位してテトラピロール環から脱離させる。

他の SGR でも相同な酸性アミノ酸とヒスチジンが触媒に関わっていると考えられる。

本研究によりクロロフィル―Mg 脱離酵素 SGR の酵素活性の進化と触媒機構について新しい概念を提案することができた。