



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
Author(s)	小畑, 大地
Description	担当：理学部図書室
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14395
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96763
Type	doctoral thesis
File Information	Daichi_Obata.pdf



博士学位論文

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

小畑大地

北海道大学大学院生命科学院

生命科学専攻

令和 3 年 3 月

目次

第1部

要旨.....	3
序論.....	5
結果.....	9
1. 緑色植物 SGR と原核生物 SGR ホモログの分布および系統関係.....	9
1.1. SGR と SGR ホモログの分布.....	9
1.2. SGR と SGR ホモログの系統関係.....	11
2. SGR ホモログの Mg 脱離活性.....	12
2.1. FATT タグによる緑色植物 SGR 発現系の改良.....	13
2.2. バクテリア SGR ホモログの活性測定.....	15
2.3. 酵素反応速度論的解析.....	17
3. SGR ホモログの基質特異性について.....	20
3.1. 遊離のクロロフィル誘導体とヘミンに対する活性.....	21
3.2. クロロフィル-タンパク質複合体への活性.....	22
4. SGR ホモログの primary 活性の検討.....	23
考察.....	25
1. 光合成をしないバクテリアからの SGR ホモログの水平移動.....	25
2. 酵素の活性と基質選択性の変化による植物のクロロフィル分解系の進化.....	27
3. promiscuous な活性には高いものも存在する.....	28
4. バクテリア SGR ホモログの primary な活性は何か？.....	28
5. クロロフィル分解系の多様性.....	29
結語.....	30

第2部

要旨.....	31
序論.....	34
結果.....	37
1. クロロフィル-Mg 脱離反応の活性中心を担うアミノ酸残基の推定.....	37
1.1. SGR が触媒するクロロフィル-Mg 脱離機構の仮説.....	37
1.2. SGR ホモログの活性の有無に基づく候補アミノ酸残基の絞り込み.....	37
2. アミノ酸置換体作成による候補アミノ酸残基の機能解析.....	38
2.1. AtSGRL アミノ酸置換体の作成とタンパク質発現.....	39
2.2. AtSGRL アミノ酸置換体の活性測定.....	40
2.3. AtSGRL アミノ酸置換体の V_{max} の相対値と K_m 値の測定.....	40

考察.....	42
1. 活性中心候補アミノ酸残基の更なる機能解析	42
2. 酸性アミノ酸残基が H ⁺ を供与する条件	44
3. アスパラギン酸残基とグルタミン酸残基	45
実験材料・方法	
1. タンパク質の系統解析と宿主生物の系統解析	46
1.1. SGR と SGR ホモログの系統解析.....	46
1.2. SGR ホモログを持つ生物の系統解析	47
2. AtSGRL とバクテリア SGR ホモログおよび AtHCAR のクローニング	48
2.1. FATT-tag のクローニング	48
2.2. 緑色植物 SGR と SGR ホモログおよび AtHCAR のクローニング	49
3. タンパク質の発現と検出・定量.....	52
3.1. 大腸菌の形質転換と液体培養	52
3.2. 目的タンパク質の合成	52
4. 目的タンパク質の検出.....	53
4.1. SDS-PAGE.....	53
4.2. イムノブロット	54
5. 基質の調製.....	55
5.1. クロロフィル誘導体とヘミンおよびプロトポルフィリン IX の調製	55
5.2. PSI 粒子と LHCII の精製.....	55
6. 酵素反応と HPLC による Mg 脱離活性の検出.....	55
7. Mg 脱離活性の検出	56
8. 基質特異性の決定	57
9. 光化学系タンパク質 (PSI と LHCII) の精製と酵素反応、並びに活性測定	58
10. 酵素反応速度論的解析	58
11. アミノ酸置換体の作成	59
参考文献	61
図表.....	68
謝辞.....	108

第 1 部

要旨

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の特徴としている。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 脱離活性を持つものもあるということが判明した。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。

promiscuous な活性を原動力とする酵素の進化では、従来は低い promiscuous な活性を前提としていた。これに対して、私は promiscuous な活性には高い場合があることを示し、実例によって、高い promiscuous な活性の水平移動による酵素の進化仮説を提唱した。これにより、promiscuous な活性の水平移動が酵素の進化に与えるインパクトは従来考えられてきたよりも広範だったという可能性を示すことができた。

序論

地球上には様々な種類の生物があり、日々新しい種が報告されている。これらの生物中には多様な代謝系が存在し、生命活動を通じて様々な物質が作られている。その中には抗生物質を生産する代謝系を持つものや、人工的に作られた物質を分解できる生物がいたりするため、医学・産業的な応用が期待される。代謝系の中心的な構成要素の 1 つが酵素であり、有用物質などは酵素の持つ活性と関係している。多様な分子の裏には多様な代謝系とそれを支える酵素活性があると言える。酵素の基質特異性と触媒活性が多様な代謝系を支えており、酵素の活性は有用物質と同様に資源ととらえることができる。

そして今では酵素の基質特異性や活性を人為的に操作し、新しい機能を持つ酵素が作られている。2018 年のノーベル化学賞はタンパク質の指向性進化に携わっていたフランシス・アーノルド、ジョージ・スミス、グレゴリー・ウィンターに授与された。タンパク質の指向性進化とは、遺伝子工学的手法によって既存のタンパク質の能力を強化、新しい機能を付与するなど、望ましい機能を持つタンパク質が得る技術である。そして、一連の進化の過程は大腸菌などの生物を用いて行われ、任意の選択圧をかけて目的の機能を増強、新しい機能の獲得を行う。この技術は、酵素に潜む極めて低い活性を人為的な選択圧を通して高めるというコンセプトが背景にある。つまり、酵素が本来の基質以外に示す活性を利用している。

しかしながら、高校の生物の教科書では、酵素と基質の関係はよく鍵と鍵穴の関係と例えられる。これは酵素が特定の基質に対して決まった触媒活性を示す、つまり、高い基質特異性と高い触媒特異性を持つからである。しかし、実際は基質でないものを、場合によっては Enzyme Commission Numbers の異なる触媒活性により代謝することがある (Khersonsky and Tawfik, 2010)。従って、酵素の活性は 2 種類に分類でき、1 つは代謝系に組み込まれており、生理的に重要な意味を持つ primary な活性、もう 1 つは代謝系に組み込まれておらず、生理的に無意味な promiscuous な活性である (Copley, 2003; Kazlauskas,

2005; Khersonsky and Tawfik, 2010; Martínez-Núñez et al., 2017; Peracchi, 2018)。promiscuous な活性はある酵素だけが持つ特殊な活性ではなく、多くの酵素に普遍的に存在する活性である(Pandya et al., 2014; Baier et al., 2016; Copley, 2017)。興味深いのは、promiscuous な活性は宿主細胞内では全く意味のない活性であるにも関わらず、新しい活性を持つ酵素誕生の原動力となっていることである(Rison and Thornton, 2002)。

promiscuous な活性と酵素の進化に関してはたくさんの報告があり、分子メカニズムによって主に Neofunctionalization、Subfunctionalization に分類されている(Glasner et al., 2020)(Fig. 1)。Neofunctionalization は遺伝子重複/水平移動により獲得された遺伝子がアミノ酸残基の置換をきっかけに promiscuous な活性を獲得、最終的に promiscuous な活性を primary な活性へと昇華させて新しい代謝系を獲得するモデルである(遺伝子重複/水平移動が promiscuous な活性の獲得に先行するのが特徴)。Subfunctionalization はアミノ酸残基の変異により promiscuous な活性を獲得し、遺伝子重複/水平移動を経て promiscuous な活性が primary な活性へと変化するモデルである(promiscuous な活性の獲得が遺伝子重複/別の生物への)水平移動に先行するのが特徴である)。クロロフィル代謝系(Fig. 2)を例にとると、クロロフィル *a* 合成系に関わる酵素の 1 つ、フェレドキシン依存型ジビニルクロロフィル還元酵素(F-DVR)は微弱な 7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a*還元活性(HCAR 活性、クロロフィル *b* 分解に必須)を promiscuous な活性として持っている。シアノバクテリアの F-DVR は HCAR 活性の上昇と F-DVR 活性の低下を経て、緑色植物のクロロフィル *b* 分解関連酵素 HCAR へと進化した(Ito and Tanaka, 2014)。

先行研究では、一般的に promiscuous な活性は生理的に無意味な活性であるため、活性を高めるような選択圧に曝されておらず、活性は低いものと考えられてきた(Khersonsky and Tawfik, 2010; Rauwerdink et al., 2016; Noda-Garcia et al., 2018)。そして、低い promiscuous な活性は、環境が変化するなどして生理的に重要な位置を占めるようになってから選択圧で活性が上昇するとされていた(O'Brien and Herschlag, 1999)。しかし、私はク

クロロフィル代謝に関わる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い。

クロロフィルは光エネルギーを吸収するアンテナ色素であるとともに、吸収したエネルギーにより駆動される電子伝達鎖の構成要素でもある。このようにクロロフィルは光合成における、光エネルギーの化学エネルギーへの変換に深く関与している。一方で、クロロフィルが過剰に光を吸収するとエネルギーの処理が間に合わなくなり、酸化ストレスの発生源にもなる。そのため、光エネルギー吸収のためにクロロフィルを合成するとともに、過剰な光エネルギーを吸収しないようにクロロフィルを分解することも不可欠である。そして、クロロフィル分解はクロロフィルを結合している光化学系タンパク質の分解も促進するため、栄養の転流にも寄与する (Hortensteiner and Krautler, 2011)。

クロロフィル分解系に関わる一連の酵素は陸上植物で良く研究されている (Hauenstein et al., 2016; Shimoda et al., 2016)。陸上植物はクロロフィル *a* とクロロフィル *b* を持つが、クロロフィル *b* はクロロフィル *a* に変換され、必ずクロロフィル *a* を介して分解される (Fig. 2B)。クロロフィル分解の最初のステップは、クロロフィル *a* の中心の Mg が脱離してフェオフィチン *a* へと変換されることで始まり、この反応は Mg 脱離酵素 (STAY-GREEN; SGR) によって触媒される (Shimoda et al., 2016)。次に、フェオフィチン *a* はフェオフィチン-フェオフォルビド加水分解酵素 (PPH) によりフェオフォルビド *a* へと変換される (Schelbert et al., 2009)。そして、フェオフォルビド *a* はフェオフォルビド *a* 酸化酵素 (PAO) によってテトラピロール環の酸化開裂が引き起こされ、直鎖状テトラピロール分子の赤色クロロフィル代謝物 (RCC) へと変換される (Pružinská et al., 2003; Tanaka et al., 2003)。得られた直鎖状テトラピロール分子はさらなる修飾を受け、最終的に光毒性のない分子へと変換され、液胞で保存される (Hortensteiner and Krautler, 2011)。以上より、陸上植物における SGR は一連の分解反応を支配するキー酵素である。しかしそれだけではなく、SGR のクロ

クロフィル分解は間接的に他のクロロフィル分解酵素の遺伝子発現も誘導するため、老化においても中心的な役割を持っている (Sato et al., 2018)。実際に、*sgr* 完全欠損株では老化時にクロロフィル分解が妨げられるだけではなく、老化そのものが不完全になってしまう。従って、*SGR* の獲得は陸上植物の進化の過程で老化現象の発達と密接に関わってきたと考えられる。

陸上植物では *SGR* が老化時のクロロフィル分解を担っているが、他の光合成生物はどうであろうか。実は光合成生物全体を見渡すと、*SGR* を持っているのは緑色植物（緑藻と陸上植物）と灰色藻だけであり、シアノバクテリアや紅藻、二次共生藻や三次共生藻には *SGR* は一切見つかっていない (Fig. 3)。一方で、バシラス綱細菌やクロストリジウム綱細菌をはじめとする光合成をしないバクテリアにホモログ遺伝子が広く存在していることが分かった。本研究では、私はバクテリア *SGR* ホモログの中には緑色植物 *SGR* のクロロフィル-Mg 脱離活性をはるかに凌ぐ活性を持つものがあることを発見した。これより、酵素の promiscuous な活性は必ずしも低くなく、高いものも存在することが示された。系統解析では、高い Mg 脱離活性を持つバクテリア *SGR* ホモログが真核光合成生物の祖先に水平移動したことが示唆された。本研究の結果より、私は酵素の promiscuous な活性を原動力とする代謝系進化について新しい仮説を提唱した。すなわち、promiscuous な活性には低いものから高いものまで存在し、高い活性を持つものが水平移動により獲得されることで新しい代謝系が獲得されるという説である。

結果

緑色植物（緑藻および陸上植物）のクロロフィル分解系の最初の反応を担う酵素、クロロフィル-Mg 脱離酵素 SGR のアミノ酸配列を用いて類似する配列の検索を行ったところ、光合成をしない（クロロフィルを持たない）バクテリアとアーキアにも SGR の類似配列が存在することが判明した。データベースより得られた緑色植物 SGR と原核生物の類似タンパク質のアミノ酸配列を用いて系統関係を調べたところ、①SGR ホモログのある系統から SGR が分岐・誕生したことが示唆された。系統関係が得られたことから、以降は緑色植物のクロロフィル-Mg 脱離酵素を SGR、緑色植物以外の生物で発見された類似配列を SGR ホモログと呼称する。系統解析に使用した SGR ホモログの一部について Mg 脱離活性を測定したところ、②SGR の活性を超える非常に高い活性を持つものと活性を全く持たないものが得られた。また、活性を持つ SGR ホモログの基質特異性を調べたところ、③SGR が分解できない基質に対しても活性を持つということが明らかとなった。

続く考察では、①系統解析と、②③酵素学的解析の結果をもとにして、SGR の酵素活性の進化がもたらした緑色植物のクロロフィル分解系の進化について議論をする。

1. 緑色植物 SGR と原核生物 SGR ホモログの分布および系統関係

予備実験の BLAST 検索により、光合成をしない（クロロフィルを持たない）バクテリアとアーキアにも SGR の類似タンパク質が存在することが明らかとなった。そこで、SGR とその類似タンパク質がどのような生物に存在し、それらがどのような系統関係を持つのかを調べた。

1.1. SGR と SGR ホモログの分布

SGR 類似タンパク質の検索は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の SGR1 (アミノ酸配列は Phytozome から取得) を Query 配列として用い、以下 4 つのデータベースにお

いて 2018 年 11 月時点で報告されている類似タンパク質について網羅的に検索した。

- ① Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)
- ② realDB (<http://realdb.algaegenome.org/>)
- ③ NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)
- ④ Alga-PrAS (<http://alga-pras.riken.jp/>)

その結果、真核生物では、アーケプラスチダに属する緑色植物（一部例外あり）と灰色植物でのみ SGR および SGR 類似タンパク質が見つかった（Fig. 3）。アーケプラスチダとは、緑色植物と灰色植物と紅色植物が属する分類群であり、一次共生を経て誕生した真核光合成生物を共通祖先に持つ。

緑色植物では、祖先種に近いとされるクレブソルミディウム藻については例外的に SGR が見つからなかった。同じく祖先種に近いと考えられているメソスティグマ藻はゲノム情報欠損のため、SGR の有無は分からなかった。灰色藻については、報告されている 4 属全てが SGR 類似タンパク質を持つことが分かった。ただし、灰色植物の類似タンパク質がクロロフィル分解酵素として機能しているという報告はない。一方で、紅色植物では SGR を持つものは 1 種も見つからなかった。また、紅色植物の細胞内共生を介して誕生した二次（三次）共生藻にも SGR ホモログは見つからなかった。二次共生藻には、SGR を持つ緑色植物の細胞内共生を介して光合成能を獲得したとされるユーグレナ藻がいるが、これにも SGR は存在しなかった。アーケプラスチダとは独立に一次共生を介して光合成能を獲得したポーリネラにも SGR は存在しなかった。

次に、原核生物における SGR 類似タンパク質の分布であるが、興味深いことに（バクテリア）クロロフィルを持つシアノバクテリアや他の光合成細菌からは類似タンパク質は見つからなかった。逆に、光合成を行わないバクテリアとアーキアで類似タンパク質が見られた（Fig. 3）。バクテリアで最も多くのヒットが得られ、特にフィルミクテス門に属するバシラス綱とクロストリジウム綱細菌に広く見られた。他にも、クロロフレクサス門（アナ

エロリネア綱)、バクテロイデス門 (バクテロイデス綱)、プロテオバクテリア門 (ビブリオ属、アシネトバクター属)、放線細菌門 (マイコバクテリウム属) の細菌にいくつか見られた。クロロフレクサス門は緑色非硫黄光合成細菌を含むが、SGR の類似タンパク質を持つのは光合成をしないグループの細菌である。アーキアでは、クレン古細菌門とトール古細菌門に属すると考えられる種で SGR 類似タンパク質を持つことが分かった。

(2020 年 10 月時点で) 原核生物の SGR 類似タンパク質の報告はさらに増え、バクテリアではクロロフレクサス門などで情報が追加された。アーキアでは、詳細な分類がされていないものがほとんどだが、上門あるいは門のレベルでさらなる追加が見られた。

1.2. SGR と SGR ホモログの系統関係

網羅的に検索された SGR (類似タンパク質) のアミノ酸配列より、系統樹を作成し、互いの系統関係を調べた。本実験では、検索された全ての配列を使用したわけではなく、一部の配列を代表として選択して解析に使用した (Table 1)。アミノ酸配列の選択条件は、①類似性が高いものから低いものまで偏りが無い、かつ、②SGR (類似タンパク質) を持つ宿主の系統に偏りが無いように行った。ただし、①と②に従って選択された中でも *Alicyclobacillus hesperidum* と *Clostridium* sp. Marseille-P2414 の SGR 類似配列は以降の解析では除外した。これらは E-value などのスコアにおいては確かに SGR の配列に類似しているとされたが、アミノ酸配列のアライメントを見ると SGR や他の SGR 類似配列とアミノ酸残基の保存性がかなり異なっていた。該当するタンパク質は、他の SGR 類似タンパク質とは異なる選択圧に曝されており、系統樹の形を乱すと考えられたためである。

①と②の条件に従って選択した SGR (類似タンパク質) のアミノ酸配列を用いて、アライメントを作成し (Fig. 4)、系統解析を行ったところ、Fig. 5 のような系統樹が得られた。遠縁な関係にあるはずの生物間に近縁な関係を持つ遺伝子が見つかったため、水平移動により様々な生物に広がったと推察された。系統樹に使用したバクテリアとアーキアについ

ては、16SrRNA の配列を用いてもう 1 つ系統樹を作成した (Table 2、Fig. 6)。その結果、バチルス綱とクロストリジウム綱がそれぞれグループを形成し、SGR ホモログの系統樹と異なる形状になった。このことから、バチルス綱細菌とクロストリジウム綱細菌の間でも複数回水平移動が行われていることが示唆された。

水平移動には方向があるため、どちらの生物がドナーであるかが問題となる。本研究では、緑色植物 SGR の起源に注目しており、原核生物から緑色植物へと水平移動したのか、それとも逆なのかが重要である (Fig. 7)。系統樹の形状からは、前者の可能性が支持された。これはバチルス/クロストリジウム綱の枝から緑色植物と灰色植物の枝が分岐していたためである。もし、緑色植物からバチルス/クロストリジウム綱へと遺伝子が渡っているならば、緑色植物のある枝からバチルス/クロストリジウム綱の枝が広がるはずである。

緑色植物と灰色植物の枝とバチルス/クロストリジウム綱細菌の枝の分岐はブーツストラップ値が 95%であったことから分岐の信頼性は高く (Fig. 5)、バチルス/クロストリジウム綱から緑色植物と灰色植物へ SGR 類似タンパク質が水平移動したシナリオが一番有力であると考えられる。緑色植物と灰色植物が同じ位置から分岐していたため、両植物が独立に SGR ホモログを獲得したのではなく、両者の共通祖先が獲得した可能性が高い。緑色植物と灰色植物が具体的にどの細菌から SGR の祖先タンパク質を得たのかは不明であるが、はっきりしているのは、SGR がシアノバクテリア由来でないことである。

以上より、バクテリア/アーキアの SGR 類似タンパク質が緑色植物の SGR と系統関係を持つことが系統樹から明らかになったため、これ以降は SGR 類似タンパク質を SGR ホモログと呼称する。

2. SGR ホモログの Mg 脱離活性

SGR (類似タンパク質) の系統解析より、緑色植物 SGR と灰色植物 SGR 類似タンパク質が光合成をしないバクテリア/アーキア由来であり、水平移動により獲得されたことが示

唆された。両者に系統関係があるということが示されたが、SGR の祖先と考えられる SGR ホモログにはクロロフィル-Mg 脱離活性は存在したのだろうか？ つまり、SGR が持つ活性の獲得と進化には以下の 2 通りのシナリオが考えられる。

- ① 真核光合成生物にクロロフィル分解活性のない SGR ホモログが獲得され、宿主の進化の過程で分解活性を獲得した
- ② バクテリア SGR ホモログはクロロフィルの存在しないバクテリア内で既にクロロフィル分解活性を持っており、それが真核光合成生物に獲得された

本章では、まず緑色植物 SGR の大腸菌タンパク質発現方法の確立について論じ、次にバクテリア SGR ホモログの酵素活性測定ならびに比較をし、最後に活性の得られた SGR (ホモログ) に対して酵素反応速度論的解析を行い、酵素学的な特徴の比較について述べる。

2.1. FATT タグによる緑色植物 SGR 発現系の改良

酵素を使用する実験では、多くの酵素が安価・簡便に得られるほど研究がしやすい。先行研究での SGR の合成はコムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質発現系を利用していた。この発現系は高い活性の SGR を合成できたが、高価であるという欠点があった。そのため、大腸菌による安価・簡便なタンパク質発現系が探索されたが、緑藻クラミドモナスの SGR でしか活性が得られず、活性もそこまで高くなかった。この段階でも研究は行えるが、より効率的に実験を行うため、発現系の改良に取り組んだ。具体的には、大腸菌を用いたコストの低い発現系で大量の活性型 SGR の合成を目指した。発現系の改良が成功すれば、酵素学的な実験のデータの質も向上することが期待される。

SGR は可溶性タンパク質であるが、大腸菌内で合成された SGR は封入体に閉じ込められており、これが活性型の SGR が得られない原因であると考えられた。そこで、封入体形成を抑制 (SGR の可溶化を促進) するために、親水性タグの 1 つである FATT タグ(Chen et al., 2017)を融合することで問題解決を図った (Fig. 8)。FATT タグはヒトアミロイド前駆

体タンパク質の超酸性領域をもとに作成されたアフィニティータグである。この超酸性領域は親水性で、負の電荷を帯びており、立体構造を形成しないという 3 つの特徴を持っている。FATT タグの強い親水性は融合タンパク質の可溶化を促進し、負電荷と構造を持たないという特性は封入体形成を抑制する。

まず、FATT タグを人工遺伝子として注文し、プラスミド pET30a にクローニングした。次に、クローニングした FATT タグの下流にシロイヌナズナの SGR (*Arabidopsis thaliana* SGR1: AtSGR1、*Arabidopsis thaliana* SGR-LIKE: AtSGRL) とクラミドモナスの SGR (*Chlamydomonas reinhardtii* SGR: CrSGR)、AtSGR1 と CrSGR の融合タンパク質 (AtSGR1_CrSGR C-term.) をそれぞれクローニングした。融合タンパク質に使用した CrSGR のアミノ酸配列は推定される触媒部位を除いた C 末端領域の配列である。この配列は緑藻 SGR に特徴的な配列であり、従来の発現系で CrSGR のみ活性が得られたのは、この C 末端の配列が関わっていたと考え、この配列を融合タンパク質作成に用いた。以上の 4 種類のコンストラクトを大腸菌でのタンパク質翻訳合成に供試し、N 末端に FATT タグを持つ SGR を得た (以降は「FATT_SGR」と記述する)。

SGR は可溶性タンパク質であるため、可溶性画分にタンパク質が存在する必要がある。FATT_SGR を発現した大腸菌の溶解液と上清を SDS-PAGE に供試し、続くイムノブロットによりそれぞれの画分中の目的タンパク質の検出を行った。イムノブロットの結果、FATT_AtSGR1 (39.4 kDa) と FATT_AtSGRL (39.0 kDa) でタンパク質が可溶性画分で検出された (Fig. 9)。大腸菌溶解液と比較するとタンパク質のシグナルが弱いため、一部のタンパク質しか可溶化していないと考えられる。FATT_AtSGR1 と FATT_AtSGRL に比べ、FATT_CrSGR (76.0 kDa) と FATT_AtSGR1_CrSGR C-term. (70.4 kDa) では可溶性タンパク質の絶対量はさらに少なかった。尚、ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/) が提供するプログラムを用いてタンパク質の分子量を計算したが、検出されたタンパク質のバンドは全体的に高分子側にシフトしていた。

合成した 4 種類の緑色植物 SGR を用いて、クロロフィル *a* に対するクロロフィル—Mg 脱離活性を測定したところ、FATT_AtSGR1 では活性が得られず、FATT_CrSGR、FATT_AtSGR1_CrSGR C-term. は従来の発現系の活性と同程度の強さであった。その中で、FATT_AtSGRL で格段に高い活性が得られた (Fig. 10)。以上より、FATT タグを用いた大腸菌タンパク質発現系の改良により、緑色植物 SGR の 1 つ AtSGRL の可溶化タンパク質の発現と活性の検出に成功した。そのため、以下のバクテリア SGR ホモログを用いた実験では AtSGRL を緑色植物 SGR の代表とし、比較対象として扱う。

2.2. バクテリア SGR ホモログの活性測定

2.2.1. SGR (ホモログ) の発現と定量

SGR の進化シナリオを調べるため、緑色植物 SGR 代表の AtSGRL と系統解析に使用されたバクテリア SGR ホモログ 6 種 (*Anaerolineae* bacterium SM23_63 SGR ホモログ: AbSGR ホモログ、*Clostridium botulinum* sp. A2 117 SGR ホモログ: CbSGR ホモログ、*Bacillus aquimaris* sp. SAMM SGR ホモログ: BaSGR ホモログ、*Bacillus solani* SGR ホモログ: BsSGR ホモログ、*Romboutsia* sp. MT17 SGR ホモログ: RSGR ホモログ、*Peptoniphilus phoceensis* SGR ホモログ: PpSGR ホモログ) を大腸菌で発現し、*in vitro* での活性測定に供試した。SGR ホモログの活性の有無を明らかにし、進化シナリオについて検討する。原核生物 SGR ホモログの代表としたバクテリア 6 種のホモログは、緑色植物 SGR に対するホモロジーの程度と宿主の系統に多様性を持たせるとともに、系統樹上の位置も特定のクレードに偏らないように選択した。

酵素活性測定のため、選択したホモログ 6 種の人工遺伝子を用意し、クローニングを行った。クローニングは N 末端に FATT タグを融合する形で行い、先に作成した AtSGRL と構造を統一した。クローニング後は大腸菌でタンパク質を合成し、タンパク質の定量と酵素活性測定を行った。

本実験における FATT タグには、His タグおよび FLAG タグ配列が含まれているが、精製してもタンパク質量は少なかった。そのため、濃度既知の AtHCAR（同様に N 末端に FATT タグを融合）と同時にイムノブロットを行い、タンパク質バンドの蛍光量とタンパク質量を対応させる検量線とした。作成した検量線を利用して、酵素液（大腸菌溶解液）の可溶性画分に含まれる SGR（ホモログ）の濃度を計算した。可溶性画分に着目するのは SGR が可溶性タンパク質であり、それらが正常なタンパク質の状態であると考えているからである。目的のタンパク質を大腸菌で発現し、可溶性画分の SGR（ホモログ）をイムノブロットで検出したところ、4 種の SGR ホモログ（AbSGR ホモログ、CbSGR ホモログ、BaSGR ホモログ、BsSGR ホモログ）は AtSGRL よりも 2.5 倍ほど多く分画できた。一方で残り 2 種の SGR ホモログ（RSGR ホモログ、PpSGR ホモログ）は AtSGRL よりも少量のタンパク質しか分画できなかった（Fig. 11）。

2.2.2. SGR（ホモログ）の Mg 脱離活性の測定

SGR（ホモログ）を発現した大腸菌の溶解液を酵素液、クロロフィル *a* 溶液を基質溶液として用意し、両者を混合して酵素反応させ、反応後の色素組成を HPLC で解析した。HPLC による分離・検出で、Mg 脱離分子（フェオフィチン *a*）の蛍光シグナルの有無で使った SGR（ホモログ）が Mg 脱離活性を持つのか調べた。本実験の HPLC 解析の条件では、基質であるクロロフィル *a* の保持時間は 4 分で、分解産物のフェオフィチン *a* は 4.6 分の位置にシグナルが現れる。

活性測定の結果、3 種の SGR ホモログ（AbSGR ホモログ、CbSGR ホモログ、BaSGR ホモログ）は活性を持つが、残りの 3 種（BsSGR ホモログ、RSGR ホモログ、PpSGR ホモログ）は分解産物のシグナルが検出されなかったことから、活性がないと考えられた（Fig. 12）。驚いたことに、活性のあったホモログに関しては、AtSGRL よりも格段に高い活性を示した。この AtSGRL はシロイヌナズナが持つ 3 種類の SGR の中で最も活性が高い SGR

である。活性の得られた SGR ホモログは、選抜されたホモログ 6 種のうち緑色植物の SGR に対してホモロジーの高い上位 3 種であった。

本実験の結果は、先に挙げた SGR 進化のシナリオの②をサポートするような結果であった。強力な活性を持つ SGR ホモログが存在することに加え、系統樹中の真核光合成生物の分岐の近くにクロロフィル-Mg 脱離活性のある SGR ホモログがいることも②のシナリオを支持しているように思われる。そして、SGR ホモログを持つバクテリアには（バクテリア）クロロフィルが存在しないため、検出されたクロロフィル-Mg 脱離活性は promiscuous な活性（酵素が本来の機能とは別に持つ、代謝系に組み込まれていない活性）と考えられる。よって、②のシナリオに従うのならば、緑色植物の祖先はバクテリアのタンパク質が持っていた「代謝系に組み込まれていない活性」を利用し、「代謝系を構成する活性」として運用し始めた可能性が示唆される。

2.3. 酵素反応速度論的解析

次に、AtSGRL と活性の得られたバクテリア SGR ホモログ 3 種に関して、 K_m 値と k_{cat} の決定を行い、基質との相互作用の程度や活性強度を詳細に測定し、これらの比較を試みた。

2.3.1. 反応初速度の決定とミカエリスメンテン曲線の作成

実験結果の報告に進む前に酵素の反応速度論的解析について説明を挟む。この解析の目的は、触媒としての酵素のパラメーターを定量し、比較を可能とすることである。最終的に得られるパラメーターは、酵素-基質間の相互作用の程度（ K_m 値 [μM]）と酵素の最大反応速度（ V_{max} [$\mu\text{M}/\text{min}$]）である。ただし、 V_{max} は単位時間あたりに生成物がどれだけ生じるかだけを表す指標であり、使用する酵素量については考慮されていない。使用する酵素量が多くなれば V_{max} は上昇するため、複数の酵素間でパラメーターを比較する際には酵

素量に依存しない形式に変換・統一する必要がある。そのため、 k_{cat} [min^{-1}] というパラメーターを用いる。 k_{cat} は、 V_{max} を使用した酵素濃度で除したもので、酵素 1 分子が単位時間当たり最大で何回触媒反応を行うかを表す。

上記パラメーターの決定に必要な具体的な実験は、一定濃度の酵素に対して様々な濃度の基質を作用させることである。様々な基質濃度条件を用意するのは、酵素の反応速度は基質が酵素の活性中心と出会う確率に依存するから、つまり、基質の濃度に相関するからである。基質濃度が低い条件では、基質濃度に比例して酵素の反応速度は上昇する。一方で、基質濃度が高くなると酵素の活性中心は常に基質に占有されるため、濃度に関係なく一定の速度（≡最大速度）しか得られなくなる。基質濃度による反応「初」速度の関係を表したグラフがミカエリス・メンテン曲線であり、この曲線から V_{max} や K_m 値が算出される。

よって、酵素のパラメーターを求めるにはミカエリス・メンテン曲線を得る必要がある。そしてこの曲線を得るには、先に各基質濃度における反応「初」速度を決定する必要がある。初速度とは、酵素反応開始直後の短時間での反応速度のことであり、すなわち、基質の濃度が変化していないとみなせるような条件での反応速度である。酵素反応の速度は基質の濃度に影響を受けるため、基質の濃度変化がないとみなせる時間内では、生成物量が時間に比例する（両者の関係が一次式で表現でき、グラフの傾きが初速度に相当する）。仮に、長時間の酵素反応を行ったとすると、基質濃度の低下に伴った反応速度の低下も引き起こされる。そのため、反応時間に応じて異なる速度が得られてしまう。反応初期の速度が必要とされるのは、濃度条件が変化しても統一した基準に基づいて比較するためである。

最後に今回の実験の流れをまとめる。まず、ある濃度の SGR（ホモログ）を適当な濃度のクロロフィル *a* と反応させ、反応時間に比例して分解産物（フェオフィチン *a*）量が増加するような条件（酵素濃度、基質濃度範囲、反応時間）を調べる。次に、各基質濃度条件におけるクロロフィル *a* の分解速度（分解産物フェオフィチン *a* の生成速度） [$\mu\text{M}/\text{min}$] を求める（Fig. 13）。求めた初速度は基質濃度と対応させてプロットし、最適なミカエリス

ーメンテン曲線を計算、酵素反応速度論的パラメーターを得る (Fig. 14)。

上述の実験は、本来ならば [酵素濃度] $\ll$ [基質濃度] となるような実験系 (短時間の酵素反応では基質濃度が変化しないとみなせるような系) が望ましいが、基質濃度を高くしすぎるとすると Mg 脱離活性が阻害された。そのため本実験では、阻害が生じない範囲で基質濃度を設定した。基質濃度に対して酵素濃度がやや高めだが、酵素濃度が低すぎると今度は分解産物が検出できなくなるため、活性測定できるぎりぎりの酵素濃度を本実験で使用した。そのため、ミカエリスーメンテン曲線は比較的低濃度の基質濃度領域のデータを用いて得られたということになる。

2.3.2. SGR (ホモログ) の k_{cat} と K_m 値

Table 3 は AtSGRL と活性を示した 3 種のバクテリア SGR ホモログの酵素反応速度論的パラメーターをまとめたものである。 k_{cat} は単位時間当たりの最大代謝回転速度を表し、高いほど活性が高い。一方で K_m 値は酵素と基質の結合のしやすさを表している。低い値ならば、低基質濃度でも (酵素と基質の衝突回数が少なくても) 効率よく活性中心へアクセスでき、酵素反応に利用される。逆に高い値を示すものは基質濃度が高くなければ (酵素と基質の衝突回数が多くなければ) 活性中心へアクセスできず、酵素反応に利用されない。従って、 K_m 値は低いほど酵素反応が起こりやすいことを表しており、 K_m の高さと反応の起こりやすさは反比例の関係にある。つまり、酵素反応の起こりやすさは K_m 値の逆数、 $1/K_m$ に比例すると言える。 k_{cat}/K_m は k_{cat} と K_m 両パラメーターの評価を統合したものである。値が高いほど、つまり、 k_{cat} と $1/K_m$ が高いほど酵素反応がよく起こることを指すため、 k_{cat}/K_m の値が高いほど活性の高い酵素であると言える。

Table 3 の K_m 値を比較すると、AtSGRL、CbSGR ホモログ、BaSGR ホモログ 3 者は互いに近い値を示し、その値は他のクロロフィル代謝酵素の値と類似していた (Shieh et al., 1978)。これに対して AbSGR ホモログはその他の SGR (ホモログ) よりも高い K_m 値が算

出された。 k_{cat}/K_m を比較すると酵素間の値の差は顕著であった。BaSGR ホモログの k_{cat}/K_m は $394 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ で最も高い値を示した。これに次いで、CbSGR ホモログは $84.5 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ 、AbSGR ホモログは $31.4 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ 、AtSGRL は $4.64 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ であり、酵素間に大きなばらつきが見られた。AtSGRL は現在知られている緑色植物 SGR の中で最も高い活性を持つと知られていたが、BaSGR ホモログはその約 85 倍もの活性を持っていた。AbSGR ホモログの k_{cat}/K_m の値が低かったのは分母の K_m 値が高いことが影響している。また、活性のなかった SGR ホモログとそれを持つ宿主を考慮すると、酵素間の分解活性のばらつきはさらに強調されるとともに、酵素の系統が近いからといって似たような k_{cat}/K_m を示すわけではなかった。2 種類のバシラス細菌 SGR ホモログ (BaSGR ホモログと BsSGR ホモログ) を例に挙げると、BaSGR ホモログは高い k_{cat}/K_m を示す一方で BsSGR ホモログは全く活性を示さなかった。

SGR ホモログを持つバクテリアはクロロフィルを持っていない、そのようなバクテリアに強力なクロロフィル—Mg 脱離活性を持つ酵素が存在するのは非常に興味深い。さらに、活性の程度は酵素の系統が近くてもばらばらであることも面白い特徴であると思われる。

3. SGR ホモログの基質特異性について

当研究室では、様々なクロロフィル誘導体を緑色植物 SGR に作用させ、*in vitro* での基質特異性決定を行ってきた。これにより、シロイヌナズナの SGR1、SGR2 およびクラミドモナスの SGR はクロロフィル *a* のみを基質とし、クロロフィル *a* の前駆体のクロロフィリド *a* は基質としないことが調べられていた (Matsuda et al., 2016)。これに対して、AtSGRL は両者を基質にできるということが確かめられた (ただし、AtSGRL のクロロフィリド *a* 分解活性が *in vivo* で機能しているか、機能しているとしてどのような意味があるのかは今のところ明確なデータはない)。そして、上記の SGR は全てクロロフィル *b* からは Mg を脱離できないことも調べられた。この結果は、クロロフィル *b* から Mg を脱離すると安全な分

子まで分解されず、光毒性のある分子が蓄積してしまうという点で筋の通るものであった。

本実験では、活性のあるバクテリア SGR ホモログのクロロフィル誘導体に対する活性を調べ、基質特異性の決定を行った。これにより、SGR の進化の過程で基質特異性はどのように変化してきたかを調べる。基質には、遊離状態のクロロフィル誘導体およびヘミンと光化学系タンパク質を用いた。ヘミン（≡ヘム）はプロトポルフィリン IX の中心に鉄原子を挿入することで合成される分子であり、中心に Mg を挿入することで合成されるクロロフィルと似た構造を持つ (Fig. 2A)。活性のある SGR ホモログが鉄原子脱離も可能なのか（ヘミン（ヘム）分解酵素として機能するか）を検討するために使用した。ヘミンの中心鉄は 3 価であり、中心鉄が 2 価のヘムとは若干異なる。しかし、ヘムは酸化しないように保つのが難しいことと、ヘムとヘミンで鉄原子—テトラピロール環の結合（脱離時に切断される結合）は同一であるため本実験ではヘミンで代用している。クロロフィル—タンパク質複合体を使用するのは、タンパク質中のクロロフィルが基質となるかを確かめるためである。生体内のクロロフィルはタンパク質と結合して存在するため、クロロフィル—Mg 脱離酵素として働くにはこれを基質とする必要がある。

3.1. 遊離のクロロフィル誘導体とヘミンに対する活性

本実験では、遊離状態のクロロフィル誘導体（クロロフィル *a*、クロロフィリド *a*、クロロフィル *b*、プロトクロロフィル *a*、クロロフィル *c₁* および *c₂*、Zn-クロロフィル *a*、バクテリオクロロフィル *a*）とヘミンを用いた。

酵素反応の結果は Fig. 15 と Table 4 の通りで、活性を示したバクテリア SGR ホモログ 3 種はクロロフィル *a* とクロロフィリド *a* から Mg を脱離し、さらにクロロフィル *b*、プロトクロロフィル *a*、クロロフィル *c₁* および *c₂* といった緑色植物 SGR の基質でないクロロフィルに対しても分解活性を示した。しかしながら 3 種全てのホモログは、Zn-クロロフィル *a* とバクテリオクロロフィル *a* に対しては活性を示さなかった。また、ヘミンの中心から鉄原

子を脱離することもなかったため、バクテリア内でヘミン（ヘム）—鉄原子脱離酵素として働いているわけではないようであることが示唆された。

本実験により、バクテリア SGR ホモログは緑色植物 SGR が分解できないクロロフィル誘導体をも基質にできることが判明した (Fig. 16)。このことは、バクテリア SGR ホモログは基質選択が緩く、逆に緑色植物 SGR は高い基質選択性を持っていると解釈できる。つまり、バクテリア SGR ホモログの Mg 脱離活性はバクテリア時代に既に獲得されていたが、基質特異性に関しては緑色植物の進化の過程で変化したと考えられる。

3.2. クロロフィル—タンパク質複合体への活性

クロロフィルは生体内ではクロロフィルタンパク質に取り込まれた複合体の状態で存在・機能している。そのため、SGR がクロロフィル—Mg 分解酵素として機能するには、タンパク質中のクロロフィルこそ基質としなくてはならない。先行研究では SGR の光化学系タンパク質中のクロロフィル *a* に対する活性が確認されている (Shimoda et al., 2016)。ここでは、バクテリア SGR ホモログを使用して同様の実験を行った。SGR ホモログのクロロフィル—Mg 脱離活性が植物体内で生理的機能を獲得し、代謝系の構成要素として取り込まれるためには、複合体中のクロロフィルを分解する必要があるためである。

活性測定に使用する基質は、ショ糖密度勾配遠心法によりハウレンソウから単離した 2 種類のクロロフィル—タンパク質複合体を用いた。1 つは光化学系のコアを形成する光化学系 I 粒子 (PSI 粒子)、もう 1 つは周辺アンテナの Light harvesting complex II (LHCII) である。単離したこれら複合体に対して AtSGRL とバクテリア SGR ホモログを反応させたところ、AtSGRL は PSI 粒子と LHCII に含まれるクロロフィル *a* のみから Mg を脱離し、クロロフィル *b* からは Mg を脱離しないという先行研究と一致する結果が得られた (Fig. 17、Fig. 18)。AbSGR ホモログは遊離クロロフィルを用いた際にはクロロフィル *b* に対しても活性を示したが、複合体を用いた場合は PSI 粒子と LHCII 中のクロロフィル *a* からのみ

Mg を脱離し、クロロフィル *b* からはほとんど Mg を脱離することができなかった。CbSGR ホモログと BaSGR ホモログに関しては、PSI と LHCII 中のクロロフィル *a* とクロロフィル *b* から Mg を脱離した。AbSGR ホモログは先の実験で CbSGR ホモログや BaSGR ホモログよりも K_m 値が高いということが示されていた。この高い K_m 値のため、クロロフィル *b* との結合が上手くいかなかったことが活性を示さなかった原因かもしれない。

本実験からは、基質がクロロフィル-タンパク質複合体であっても、バクテリア SGR ホモログは AtSGRL よりも高い活性を示すことが判明した。そして、タンパク質中のクロロフィルを分解するという重要な特性もバクテリア SGR ホモログの時点で既に備わっていることが分かった。

4. SGR ホモログの primary 活性の検討

バクテリアの SGR ホモログの本来の活性を探るために、活性測定に使用した 6 種のバクテリアについてゲノム構造を調べた。バクテリアでは、同じ代謝系に関わっている酵素をコードする遺伝子が 1 つのオペロンとしてまとまっていることがよくある。そのため、ある遺伝子の機能が不明でもオペロン中の既知遺伝子から機能を推測できると考えた。ただし、今回はオペロンを正確に調べるのではなく、SGR ホモログと同じ転写方向を持つ ORF が 1 つオペロンを構成していると仮定し、これに基づいてホモログの機能推定を行った (Fig. 19)。

まず、高い promiscuous な活性を示したホモログを持っていたバクテリアについて述べる。*Anaerolineae* bacterium SM23_63 は、12 kbp 強の領域において転写の向きが同じオープンリーディングフレーム (ORF) が見つかった。これらの ORF がコードするタンパク質の機能はほとんどが不明であった。*Clostridium botulinum* sp. A2 117 は、SGR ホモログの前後に同じ向きで転写される ORF は見つからなかった。*Bacillus aquimaris* sp. SAMM では、約 13 kbp の領域において転写方向の同じ ORF が 8 個見つかった。この中には alanine:cation

symporter family protein、DNA topoisomerase IV subunit A および B、purine/pyrimidine permease など ORF が見つかった。

次に活性を示さなかったホモログを持っていたバクテリアについて述べる。*Bacillus solani*では、同じ方向に転写される ORF は 2 つだけであった。1 つは機能不明で、もう 1 つは alanine:cation symporter family protein であった。*Bacillus solani*中の SGR ホモログ周辺のゲノム構造は *Bacillus aquimaris* sp. SAMM と似ていた。これは両者の生物としての系統が近いめだと考えられる。*Romboutsia* sp. MT17 ではホモログの前後に同じ向きで転写される ORF は見つからなかった。*Peptoniphilus phoceensis*では、同じ方向に転写される ORF が 10 個見つかり、中には 23SrRNA (guanosine(2251)-2'-O)-methyltransferase RlmB、FAD-dependent thymidylate synthase、ribonuclease III、cysteine-tRNA ligase、catalase などが含まれていた。

以上より、SGR ホモログと転写方向が同じ ORF には、①機能未知のタンパク質が多い、②そもそも転写方向が同じ ORF がない、③転写方向が同じ ORF がコードするタンパク質の機能に共通点が見つからないことから SGR ホモログの機能推定はできなかった。

考察

2016年に我々の研究室は、緑色植物のSGRはクロロフィル分解系の最初の反応を担う酵素であり、クロロフィル *a* からのMg脱離反応を触媒するということを報告した(Shimoda et al., 2016)。光合成生物に特徴的な分子であるクロロフィルを分解するSGRであったが、全ての光合成生物が持っている訳ではなく、特にシアノバクテリアにはSGRが存在しない。このことは緑色植物のSGRが一次共生由来ではないことを示している。

本研究では、光合成をしないバクテリアでSGRのホモログが存在することを発見し、SGRを含めた系統解析により、バクテリアSGRホモログが緑色植物の祖先に水平移動したことでSGRが獲得されたことが示唆された (Fig. 20、21)。バクテリアSGRホモログから緑色植物のSGRへの具体的な進化プロセスを明らかにするため、ここでは両者の酵素学的な特性、特に活性と基質特異性の側面から調べた。これにより、SGRホモログには非常に高い活性を持つものと活性を全く持たないものがあり、活性を持つものに関しては本来のSGRが基質にできないクロロフィル誘導体も基質にすることが分かった。これらのSGRホモログを有する生物はいずれも光合成色素を持たないため、今回検出されたMg脱離活性はpromiscuousな活性であると言える。

1. 光合成をしないバクテリアからのSGRホモログの水平移動

真核光合成生物のほぼ全ての光合成関連遺伝子は一次共生の際にシアノバクテリアから獲得したものである。しかし、SGRやそのホモログはシアノバクテリアからは1つも発見できなかった。従って、真核光合成生物のSGRは細胞内共生の際にシアノバクテリアから獲得したものではないと考えられる。系統解析によって、緑色植物のSGRと灰色植物のホモログを含むグループはバクテリアSGRホモログのクラスターから分岐したことが示された。このことから、真核光合成の祖先はバクテリアのSGRホモログを水平移動により獲得し、緑色植物の進化の過程でSGRとしてクロロフィル代謝系に組み込まれたと考えられる。

具体的にどの生物が遺伝子のドナーとなり、どの生物がレシピエントとなったかは不明であるが、ドナー側に関してはバシラスなどのバクテリアやあるいはアーキアと考えられる。レシピエント側の遺伝子獲得に関しては複数のシナリオが想定される。緑色植物と灰色植物と紅色植物は共通の祖先から進化した、紅色植物だけは SGR を持たない。よって、① 3 つの共通祖先が SGR ホモログを獲得し、進化の過程で紅色植物は失った、あるいは、② 緑色植物の祖先と灰色植物の祖先がそれぞれ独立に SGR ホモログを獲得した可能性がある。③ 緑色植物と灰色植物の共通祖先が獲得したシナリオも考えられるが、現時点では緑色植物と灰色植物と紅色植物の分岐の順番がそもそも不明であるため、紅色植物の祖先が先に分岐し、緑色植物と灰色植物だけの共通祖先が本当に存在したのか確証が得られない。

真核生物で遺伝子の水平移動が起こるためには、遺伝子が生殖細胞に取り込まれる必要がある。緑色植物の進化において単細胞型の真核生物が SGR を獲得したと考えるのがリーズナブルであると思われる。

続いて、酵素の進化のシナリオについて考えた。緑色植物は①既にクロロフィル分解活性のある SGR ホモログを獲得したのであろうか、それとも、②活性のない SGR ホモログを獲得した後に分解活性を備えていったのかであろうか。SGR と 6 種のバクテリア SGR ホモログの酵素活性を測定し、系統樹上の位置と照らし合わせることで、活性の進化のスナップショットを再現した。活性測定の結果、SGR ホモログは、SGR を超える非常に高い活性を持つものと全く活性を持たないものに分かれた。そして、緑色植物と灰色植物が分岐した位置に近いホモログたちに高い活性が見られたことから、既に活性を持った SGR ホモログが水平移動により獲得されたシナリオが支持された。そして両者の活性の比較から、獲得後に活性の低下を引き起こすようなプロセスが起こったのではないかと推測している。このシナリオとは逆に、活性のない酵素を獲得した場合、機能する酵素になるまでのタイムラグが発生し、その間生物が無意味な遺伝子をゲノム上に保持し続けるかという点が問題となる。このシナリオの場合は、SGR ホモログがクロロフィル分解以外の機能で植物に

恩恵がなければならない。既に出来合いの酵素を獲得し、徐々に活性を調整するというシナリオは速やかな進化と環境適応を支える原動力になると考えられる。従って、①のシナリオのような、もともと十分な活性を持つような SGR ホモログが水平移動により獲得されたと考えられる。

2. 酵素の活性と基質選択性の変化による植物のクロロフィル分解系の進化

さらに、活性だけではなく基質特異性についても比較を行い、進化の痕跡を辿った。一般的に酵素は高い基質選択性を持ち、目的外の分子を代謝することを防いでいる。SGR はクロロフィル *a* のみ基質とする（緑色植物の中にはフィトール側鎖のないクロロフィリド *a* も基質とする SGR があり、SGRL と呼ばれている）。これに対して高い活性を示した SGR ホモログの基質特異性を調べるとクロロフィル *a* とクロロフィリド *a* に加えて、クロロフィル *b*、プロトクロロフィル *a*、クロロフィル *c₁* および *c₂* まで分解する幅広い種類の分子を基質にできることが分かった。つまり、SGR は厳格な基質選択を行うように進化したと考えられる。実際、植物体内でクロロフィル *b* を基質とした場合、産物としてできたフェオフィチン *b* はフェオフォルビド *b* まで代謝されるが、それ以降の代謝がされないために細胞内に蓄積して光毒性を示してしまう。このことから、基質の選択の調整は代謝系に取り込まれる過程で必要な変化であったと考えられる。

しかし AbSGR ホモログは興味深いことに、遊離のクロロフィル *b* に対しては活性を示したが、PSI 粒子や LHCII に結合しているクロロフィル *b* に対しては活性を示さなかった。このことは、SGR ホモログの基質選択の厳格化が必要ないことを示しているわけではないと考える。つまり、実際の細胞内では何らかの条件でクロロフィル *b* が遊離する可能性もあり、また、緑色植物の祖先では SGR の祖先型タンパク質が光化学系上のクロロフィル *b* を基質とした可能性もある。このように考えると、基質選択の厳格化は必要だったのではないだろうか。

3. promiscuous な活性には高いものも存在する

一般的に酵素の primary な活性は、自然界で選択圧を受けていると考えられる。一方、promiscuous な活性は選択圧を受けていないはずである。実際に、本研究でも非常に系統的に近縁の SGR ホモログであっても BaSGR ホモログは非常に高い活性を示したが、BsSGR ホモログは一切活性を示さなかった。もし、低い promiscuous な活性を持つ酵素を水平移動により獲得したならば、代謝経路への影響は小さいと思われ、このような活性を保持する選択圧も低いのではないかと予想される。反対に、高い promiscuous な活性を持つ酵素が水平移動した場合は代謝経路への影響も大きく、活性を保持する選択圧が強く働くことになると思われる。先行研究では promiscuous な活性を前提とした進化の仮説が提唱されていた。しかし、その場合は上述のように、代謝経路への影響は小さいという欠点がある。ここで、高い promiscuous な活性（より正確には promiscuous な活性のばらつき）を考慮すると、promiscuous な活性が代謝系の進化に与える影響がより大きなものになると考えられる。

4. バクテリア SGR ホモログの primary な活性は何か？

SGR ホモログはバシラス綱細菌やクロストリジウム綱細菌に特に広く分布しており、さらに放線細菌門（マイコバクテリウム属）やクロロフレクサス門（アナエロリネア綱）などの他の細菌、さらにアーキアにも分布していることが分かった。これらのホモログのアミノ酸配列を比較した結果、ほとんどのホモログは 150 アミノ酸程度の長さで、緑色植物 SGR に対して配列の類似性が高く、さらに SGR とホモログ間で共通に保存されたアミノ酸残基が存在すること明らかになった (Fig. 4)。また、酵素学的な解析によると、SGR ホモログの中にはクロロフィル-Mg 脱離活性を全く示さないものがあつた一方で、極めて高い活性を示すものもあつた。興味深いことに、バクテリア SGR ホモログの活性はシロイヌナズナの SGR の中で最も高い活性を示す AtSGRL よりも高いことがわかった。

私は SGR ホモログを持つバクテリアとアーキアにおいてクロロフィル—Mg 脱離活性は promiscuous な活性であると考えている。なぜなら、SGR ホモログを有する全てのバクテリアとアーキアはクロロフィルを持たないからである。そこで、これらの生物における SGR ホモログの primary な活性をオペロンから推定できるのではないかと考えた。しかし、6つのバクテリアの ORF を調べたが、ホモログを含むオペロンに共通する ORF 見つからなかった。

また、SGR ホモログがヘムの中心に位置する鉄原子を引き抜く、ヘム—鉄脱離活性を持つ可能性について検討したが、SGR ホモログのいずれもヘム（ヘミン）から鉄原子を脱離できなかった。現段階では、SGR ホモログのバクテリアとアーキアにおける primary な活性は不明である。

今回の研究で得られた結果では、promiscuous な活性には高いものから低いものまでばらつきがあり、高い promiscuous な活性は primary な活性（緑色植物 SGR のクロロフィル—Mg 脱離活性）を超えることもあるということを示した。このことは、酵素が一度も出会ったことのない基質に対して高い触媒活性を示すこともあるという報告 (Villiers and Hollfelder, 2009) と一致している。別の研究では、アミノ酸残基の置換は primary な活性に影響を与えずに promiscuous な活性を上昇させることもできると報告されており (Aharoni et al., 2005)、このことは promiscuous な活性は高いこともあるということを支持している。

5. クロロフィル分解系の多様性

緑藻（クラミドモナス）の SGR は陸上植物の SGR と同様に Mg 脱離活性を触媒する。しかし、両者での生理的役割は異なり、陸上植物では老化時のクロロフィル分解に関わる一方で、クラミドモナスの SGR は光化学系 II (PSII) の構築に関与していると考えられる (Chen et al., 2019)。クラミドモナスは窒素飢餓条件で簡単にクロロフィル分解を誘導できるが (Siaut et al., 2011)、*sgr* 欠損株を用いてもクロロフィル分解は野生株と変わらずに誘導

された。それよりも SGR が欠損したことで、PSII 活性とフェオフィチン *a* の量の減少が見られた。この実験からは、クラミドモナス SGR が PSII にフェオフィチン *a* を直接供給しているかは不明である。しかしこのことは、クラミドモナスにおける SGR の本来の機能が老化プロセスとしてのクロロフィルの分解でないことを示唆するとともに、緑藻では陸上植物とは異なる方法でクロロフィルを分解していることを示している。

緑色植物の進化の過程で、SGR ホモログを水平移動により獲得したが、この時に祖先型の SGR の生理的な機能が、PSII の構築に必要なフェオフィチンの供給に必要だったのか、老化のために必要だったのかは不明である。これを明らかにするためには、緑藻と陸上植物の共通祖先における SGR の生理的な機能の解析が必要である。

結語

本研究の最大の成果は promiscuous な活性はどんな場合でも低いわけではなく、非常に高い場合があることを示し、実例によって、高い promiscuous な活性の水平移動による酵素の進化仮説を提唱できたことである。このことは promiscuous な活性の水平移動が酵素の進化に与えるインパクトは従来考えられてきたよりも広範だったという可能性を示唆している。

第2部

要旨

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。これらの情報から、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。実際に、緑色植物 SGR とバクテリア SGR ホモログ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残基が 4 つとヒスチジン残基が 1 つ見つかり、これらが活性中心で触媒を担うアミノ酸残基候補と考えられた。

AtSGRL では H105、D107、D132、D133、D186 が該当する残基であり、これらの置換を行った。酸性アミノ酸残基は H^+ 供与体あるいは金属との配位子として機能していると考えられたので、同じように機能すると考えられる別の酸性アミノ酸残基、もしくは H^+ 供与体にはならないが配位子としては機能する中性アミノ酸残基へ置換を行った。ヒスチジン残基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残基、金属と相互作用できるアスパラギン残基、チロシン残基、システイン残基へと置換した。

まず、イムノブロットにより発現を確認した。SGR は可溶性タンパク質であるため、可溶性画分でタンパク質が検出される必要がある。H105N と D186N は可溶性画分のタンパク質量が低下したが、それ以外のアミノ酸置換体は野生型 AtSGRL と同程度に発現された。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 は中性アミノ酸残基への置換で活性を失い、別の酸性アミノ酸残基であるグルタミン酸残基への置換では活性が維持された。そのため、これは H^+ 供与体として触媒に関与していると考えられた。しかし、D133 は中性アミノ酸残基に置換しても活性が維持されたため、少なくとも H^+ 供与体としては関与していないと考えられた。

以上のアミノ酸置換体の解析から、AtSGRL の Mg 脱離機構は現段階では次のようなモデルが予想された。

- ① D107、D132、D186 のいずれかあるいは複数がクロロフィル *a* の Mg-N 間に H^+ を供与することで配位結合を切断する。

- ② D107、D133、D186、H105 のいずれかあるいは複数が不安定化した Mg と配位してテトラピロール環から脱離させる。

序論

クロロフィルは光合成において集光アンテナとして働く色素であり、原核から真核の光合成生物まで幅広く存在している。生体中では、クロロフィルは遊離状態で存在せず、光化学系タンパク質に補因子として結合している(Markwell et al., 1979)。クロロフィル結合タンパク質は反応中心とアンテナに分けられる。アンテナのクロロフィルは光エネルギーを吸収し、励起エネルギーを反応中心へと伝達する(Nelson and Yocum, 2006)。伝達された励起エネルギーは反応中心の電荷分離に利用される。電荷分離は吸収した光エネルギーを電子の流れに変換する反応であり、化学エネルギーを生産するための最初のステップである(Holzwarth et al., 2006)。光化学系 II の反応中心では、特殊なクロロフィル (P680) とフェオフィチン *a* の間で電荷分離が発生する。フェオフィチン *a* はクロロフィル *a* の分解物でもあり Mg が脱離することで生じる。フェオフィチン *a* は電荷分離後の電子伝達体としても振る舞うため、欠落すると光化学系は正常に機能しなくなる。よって、クロロフィル *a* の分解経路の一部はフェオフィチン *a* を供給するための重要な反応である。

クロロフィル *a* の分解はフェオフィチン *a* の供給だけでなく、強光への応答にも必須である。過剰な量の光をクロロフィルが吸収すると、励起エネルギーの処理が追い付かなくなる。行き場をなくした励起エネルギーは分子状酸素へ渡され、活性酸素を発生させる(Krieger-Liszkay, 2005)。そのため、光の量に応じたアンテナサイズの調整が必要である。アンテナサイズは弱光下で拡大し、強光下では縮小する。光環境に対応するためにも、クロロフィルの分解は必要不可欠な代謝系である(Hortensteiner and Krautler, 2011)。

さらに、クロロフィルの分解は老化の際にも重要になる。クロロフィルはクロロフィル結合タンパク質と強固に結合しており、クロロフィルが分解されないとこのタンパク質も分解されない(Hortensteiner, 2009)。クロロフィル結合タンパク質は葉中のタンパク質の一定量を占めているため、分解すれば植物体のシンク部位へのアミノ酸供給源となる(Li et al., 2017)。

以上の通り、クロロフィル分解は様々な側面において重要なため、分解系の酵素について研究がなされてきた。これまでに、フェオフィチン *a* 以降の分解を担う酵素は全て同定されたが、クロロフィル *a* から Mg を脱離してフェオフィチン *a* を生成する酵素（通称クロロフィル—Mg 脱離酵素）だけは分かっていなかった (Armstead et al., 2006; Hortensteiner and Krautler, 2011)。これまでに有機分子から金属原子を脱離する酵素は知られていなかったため、クロロフィル—Mg 脱離酵素の正体は低分子化合物であるとする説 (Shioi et al., 1996) や Mg 脱離は自発的に起こる現象とする説が唱えられていた。

クロロフィルは緑色の色素であり、吸収した光エネルギーが適切に処理されなければ活性酸素を発生させる。活性酸素による光化学系の損傷や細胞死を防ぐために、不要なクロロフィルは光毒性のない無色な分子まで分解する必要がある (Rodoni et al., 1997; Pružinská et al., 2003; Schelbert et al., 2009)。クロロフィルを分解できない変異体は、老化しても緑葉を保つ STAY-GREEN という表現型を呈する。老化の葉の色に顕著な差が現れるため、メンデルの緑豆を始め、広く研究されていた (Vicentini et al., 1995; Ren et al., 2007; Sato et al., 2007; Barry et al., 2008)。その中で STAY-GREEN (SGR) というタンパク質はクロロフィルが分解されるときに必ず現れるタンパク質として知られていた。SGR が欠損すると STAY-GREEN の表現型を示し、また SGR は光化学系タンパク質とも相互作用していることが示唆されていた (Hortensteiner and Krautler, 2011)。そのため、Mg 脱離酵素の有力な候補として大腸菌タンパク質発現系を用いた活性測定が多くの研究室で行われた。ところが、酵素活性は一切得られず、SGR は光化学系タンパク質を不安定化し、クロロフィル分解酵素群のアクセスを促進する機能があると結論付けられていた (Sakuraba et al., 2012)。

その中、当研究室は無細胞タンパク質発現系を用いることで SGR の Mg 脱離活性測定に成功した (Shimoda et al., 2016)。その結果、世界で初めて有機物から金属原子を脱離する酵素を報告するとともに、クロロフィル分解系の酵素を全て決定することができた (Fig 2B)。

その後の研究で、緑藻クラミドモナスの SGR (CrSGR) の活性を大腸菌発現系で得るこ

とに成功し(Matsuda et al., 2016)、無細胞タンパク質発現系に比べて安価で大量に SGR の酵素活性測定ができるようになった。そのため、CrSGR のアミノ酸置換体を作成することで Mg 脱離機構の解明ができると思われた。

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 (Fig 22)。この反応では、酸性アミノ酸とヒスチジンが触媒を担うことが報告されている(Hansson et al., 2007)。また、クロロフィルの Mg は酸性条件下で脱離し(Saga and Tamiaki, 2012)、光化学系では酸性アミノ酸残基や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(Heimdal et al., 2007)。以上の情報から、Mg 脱離反応でも酸性アミノ酸残基とヒスチジン残基が触媒に関与していると予想した。実際に緑色植物 SGR 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残基 4 つとヒスチジン残基 1 つが見つかった (Fig 4)。これより、SGR の酸性アミノ酸残基がクロロフィル *a* に H^+ を供与し、酸性アミノ酸残基またはヒスチジン残基が Mg と配位して引き抜くという触媒仮説を立てた (Fig 23)。

第 1 部の大腸菌タンパク質発現系の改良により、緑色植物 SGR では AtSGRL で最も高い活性を得られるようになった。そこで、これを用いてアミノ酸置換体の作成を行い、Mg 脱離機構の解明を試みた。

結果

1. クロロフィル-Mg 脱離反応の活性中心を担うアミノ酸残基の推定

1.1. SGR が触媒するクロロフィル-Mg 脱離機構の仮説

本研究では SGR の Mg 脱離反応はフェロケラテースの逆反応であり、触媒機構も似ていると仮説を立てた (Fig 22)。フェロケラテースはクロロフィルと類似の構造を持つ分子であるプロトポルフィリン IX に鉄を挿入する酵素で、活性中心は酸性アミノ酸残基とヒスチジン残基が担っているとされている (Hansson et al., 2007)。この報告では、酸性アミノ酸残基による H^+ の脱離とヒスチジン残基による鉄原子の保持・挿入が行われるモデルを支持している。一方で、クロロフィルの Mg 脱離は酸性条件下で進行するため、酸性アミノ酸残基が H^+ 供与体として機能する可能性が考えられた。また、光化学系タンパク質中では、酸性アミノ酸残基やヒスチジン残基がクロロフィルの Mg に配位していることが知られている (Heimdal et al., 2007)。そのため、SGR においても基質との相互作用にこれら残基が関与していると考えられた。これらの情報から、SGR の触媒機構について次のような仮説を立てた。

- ① 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、配位結合を切断する
- ② 酸性アミノ酸残基もしくはヒスチジン残基が不安定化した Mg と配位結合を形成し、テトラピロール環から引き抜く

1.2. SGR ホモログの活性の有無に基づく候補アミノ酸残基の絞り込み

この仮説に従うと、SGR には保存されている酸性アミノ酸残基とヒスチジン残基が存在すると推察される。第 1 部の実験より、バクテリア SGR ホモログは緑色植物 SGR と類似のアミノ酸配列を持つことが明らかとなり、さらにホモログの中には Mg 脱離活性を持つものがあると判明した。SGR とホモログの Mg 脱離機構は共通していると考えられるため、アミノ酸残基の保存性はホモログにも拡張できるはずである。そのため、緑色植物 SGR と

活性のあるバクテリア SGR ホモログには保存性の高い酸性アミノ酸残基とヒスチジン残基を共有していると考えられた。また、活性の検出できなかった SGR ホモログの配列情報も同様に重要であり、アミノ酸残基の変異に活性消失の原因（触媒に関与している可能性の高い残基）を見出すことができる期待された。

Fig. 4 は緑色植物 SGR、灰色植物 SGR ホモログ、バクテリアとアーキアの SGR ホモログのアミノ酸配列から作成されたアライメントである。これによると、緑色植物 SGR と活性のあるバクテリアホモログに共通して、保存性の高い酸性アミノ酸残基が 4 つ、ヒスチジン残基が 1 つ見つかった（矢印で示している残基）。さらに、これら 5 つのアミノ酸残基は活性が検出できなかったホモログ（BsSGR ホモログ、RSGR ホモログ）で変異が入っていた。PpSGR ホモログに関しては、保存性の高い酸性アミノ酸残基とヒスチジン残基を全て持っていたにも関わらず、活性は検出できなかった。これは最も C 末端側の保存された酸性アミノ酸残基（活性が得られているものではアスパラギン酸残基）がもう 1 つの酸性アミノ酸残基（グルタミン酸残基）になっていたことが原因かと推測される。

以上より、Mg 脱離反応の活性中心を担うと考えられるアミノ酸残基候補が 5 つ得られた。次はこれら候補残基を置換し、置換体の活性測定を行う。これにより、選ばれた 5 つの残基が本当に活性中心として働いているのか、それとも構造の維持など別の役割を持っているのかを検討する。

2. アミノ酸置換体作成による候補アミノ酸残基の機能解析

上記の解析で絞り込んだ 4 つの酸性アミノ酸残基と 1 つのヒスチジン残基について、アミノ酸置換体を作成し、活性の有無と酵素反応速度論的解析から対象残基の役割の決定に挑む。

酸性アミノ酸残基は H^+ 供与もしくは Mg との配位結合の形成に関わっていると考えられるため、 H^+ 供与と Mg との配位結合形成が可能な別の酸性アミノ酸残基へ置換、あるいは、

H⁺供与はできないが Mg との配位結合形成は可能な中性アミノ酸残基への置換を行う。H⁺供与に関わっているならば、別の酸性アミノ酸残基への置換では活性が維持され、中性アミノ酸残基への置換では活性が消失すると予想している。Mg との配位結合形成に関与している場合はどちらに置換しても活性は維持されると推測している。

ヒスチジン残基は Mg との配位結合形成に関わっていると考えられるため、配位結合を形成しないアラニン残基、あるいは、配位結合を形成可能なアスパラギン残基、チロシン残基、システイン残基へと置換する。配位結合形成に関わっているならば、アラニン残基で活性消失し、それ以外の置換体では活性が維持されると考えられる。

アミノ酸置換体作成の鋳型には緑色植物の SGR の中で最も活性の高い AtSGRL (第 1 部でも使用された N 末端に FATT タグを融合したコンストラクト) を使用した。AtSGRL における保存性の高い 4 つの酸性アミノ酸残基は D107、D132、D133、D186 で、ヒスチジン残基は H105 である。SGR と SGR ホモログはアミノ酸配列が類似しており、共通の触媒機構で Mg 脱離を行うと考えられるため、本解析には活性の高い SGR ホモログを利用するのが適している。しかし、本実験は第 1 部よりも先に行った実験であるため、ここでは活性の高いホモログは使用していない。

2.1. AtSGRL アミノ酸置換体の作成とタンパク質発現

Megaprimer 法により指定したアミノ酸置換を導入し、クローニングを行った。作成したアミノ酸置換体を大腸菌で発現し、イムノブロットによりタンパク質を検出した (Fig. 24)。SGR は可溶性タンパク質であるため、活性型の酵素は可溶性画分に存在するはずである。作成したアミノ酸置換体のうち、D186N と H105N は可溶性画分で検出されたタンパク質量が減少していた。

2.2. AtSGRL アミノ酸置換体の活性測定

次に、得られたアミノ酸置換体の活性測定を行った (Fig. 25、Table. 6)。D107、D186、H105 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、具体的な機能は分からないが重要な残基であると考えられる。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。H⁺供与ができるときのみに活性が得られたため、D132 は H⁺供与体として機能している可能性が最も高いと考えられる。一方で、D133 は別の酸性アミノ酸残基や中性アミノ酸に置換してもいずれも活性を維持したため、H⁺供与体ではない別の機能を持っていると考えられる。具体的な機能は分からないが、想定されるのは Mg との配位結合形成か、構造の維持と推測される。

2.3. AtSGRL アミノ酸置換体の $V_{\max}$ の相対値と K_m 値の測定

活性の得られた D132E、D133E、D133N に関しては $V_{\max}$ の相対値と K_m 値の簡易的な測定を行い、残基の機能を再度検討した (Fig. 26、27)。酵素反応速度論的パラメーターを算出するときは、酵素の各基質濃度における反応初速度を算出する必要があるが、今回は時間の都合上行っていない。そのため、酵素反応後得られた分解産物の量を反応時間で割り、仮の反応速度（反応時間の間は一次関数的に分解産物量が増加していると仮定）を用いて $V_{\max}$ と K_m 値を算出している。今回は第 1 部と異なり、 k_{cat} ではなく $V_{\max}$ で酵素の活性を比較している。 k_{cat} を用いないのは、使用した酵素を定量しておらず、具体的な値が計算できないためである。その代わりに、酵素反応に使用した酵素量が全て同じと仮定して、野生型の $V_{\max}$ を基準とした相対的な比較を行った。 $V_{\max}$ の相対的な比較は酵素量が同じならば可能である。

D132E は野生型に比べて K_m 値に大きな変化は見られなかったが、 $V_{\max}$ は相対的に低下していた。そのため、この置換は基質クロロフィル *a* との相互作用の程度に影響は与えず、触媒の活性に影響を及ぼしていると考えられる。このことから、D132 はやはり触媒に関与し

ている残基と推測される。

D133E は D132E と同様に K_m 値は野生型相当の一方で活性は相対的に低下していた。これとは異なり、D133N は、 V_{max} は大きな低下は見られず、その代わり K_m 値の上昇が見られた。つまり、D133N は、基質の結合は起こりにくいが、一度結合すれば触媒反応は野生型に近いレベルで進行することを示している。D133 は別の酸性アミノ酸残基への置換と中性アミノ酸残基への置換の両方で活性を維持していたことから、Mg との配位結合形成か構造維持に関わっていると考えられた。しかし、今回の反応速度論的解析からはこれ以上は機能の絞り込みはできなかった。

考察

FATT タグによるタンパク質発現系の改良と、バクテリア SGR ホモログのアミノ酸配列および活性測定結果より、AtSGRL の H105、D107、D132、D133、D186 が活性中心を担うアミノ酸残基として触媒に関わっていると推測した。続くアミノ酸置換体の活性測定により、H105、D107、D186 の置換体は全て活性が消失したため、触媒に関与しているかは断定できなかったが、重要なアミノ酸残基であると分かった。D132 置換体では、 H^+ 供与ができる D132E では活性が維持され、 H^+ が供与できない D132N では活性が消失した。そのため、D132 は H^+ 供与体として触媒に関与している可能性が最も高いと考えられた。一方で、D133 は酸性アミノ酸置換、中性アミノ酸置換の両方で活性が得られた。中性アミノ酸に置換しても活性が得られるということより、D133 は H^+ 供与に関わっておらず、Mg との配位結合形成か構造の維持に関わっていると判断された。

以上の実験結果によると、現段階で予想される AtSGRL の Mg 脱離機構は次のようなモデルが示唆された (Fig 28)。

- ③ D107、D132、D186 のいずれかあるいは複数がクロロフィル *a* の Mg-N 間に H^+ を供与することで配位結合を切断する。
- ④ D107、D133、D186、H105 のいずれかあるいは複数が不安定化した Mg と配位してテトラピロール環から脱離させる。

しかしながら、今回の実験結果からは、活性部位候補アミノ酸残基の具体的な機能を特定できず、Mg 脱離機構の提案には至らなかった。

1. 活性中心候補アミノ酸残基の更なる機能解析

SGR の酸性アミノ酸残基がクロロフィル *a* に供与する H^+ は水溶液中から得られるはずであるが、どのような経路を経て活性中心の酸性アミノ酸残基に到達するかは不明である。今回挙げた酸性アミノ酸残基 (D107、D132、D186) が H^+ をリレーする形で触媒を再生し

ているのか、または、溶媒から活性中心に直接 H^+ が供給されるのかは現段階では不明である。個々の酸性アミノ酸残基がタンパク質表面あるいは内部にあるかを、酸性アミノ酸残基の化学修飾により判別する手法がある (Hoares and Koshland, 1967; Yamada et al., 1981)。この手法ならば、活性中心を担う酸性アミノ酸残基の標識ができる可能性がある。活性中心に結合する阻害剤を混ぜて修飾すれば、活性中心の酸性アミノ酸残基の修飾が阻害されることで識別ができると考えられる。SGR の活性中心に結合する阻害剤の候補としては、Zn-クロロフィリド *a* が挙げられる。この分子は SGR が基質にできるクロロフィリド *a* とほぼ同じ構造を持つが、分解はできないからである。

しかしながら、アミノ酸残基の修飾実験は目的タンパク質が精製されていることが大前提である。現在の大腸菌タンパク質発現系は、活性測定はできるようにはなったものの精製が上手くいっていない。そのため、触媒機構を詳細に調べるには、まずは SGR の大量発現系と精製方法の確立が必要である。純度の高いタンパク質が大量に扱えるようになれば、より質の高い生化学的実験が可能になるとともに、結晶構造解析にも挑戦できるようになる。

また、ヒスチジン残基 (H105) の機能についてもさらなる検討が必要である。そのため、H105A にイミダゾールを加えたとき活性が回復するかに着目している。アラニン残基とイミダゾールを足し合わせると疑似的にヒスチジン残基のようになる (Uchida et al., 2017)。H105 は基質ポケットに存在すると考えられ、H105A の基質ポケットに位置するアラニンにイミダゾールが位置すれば触媒機能が回復する可能性がある。

そして、今回作成したアミノ酸置換体の中で活性の得られなかったものについては、アミノ酸置換による構造変化の可能性を取り除く必要がある。SGR は二量体を形成することが報告されている (Sakuraba et al., 2014)。アミノ酸置換の二量体形成への影響評価は Blue Native-PAGE (BN-PAGE) (Wittig et al., 2006; Takabayashi et al., 2011) が有効であると考えられる。BN-PAGE とはアクリルアミドゲルを用いた電気泳動の 1 種であり、タンパク質の立体構造を維持したまま泳動が可能である。これにより、アミノ酸置換体が二量体を

形成しているかを確認できる。また、ゲル濾過により単量体と二量体を分離することで、それぞれの状態のタンパク質の活性測定も可能である。

2. 酸性アミノ酸残基が H^+ を供与する条件

酸性アミノ酸残基が H^+ 供与体としてクロロフィルを分解するとき、活性中心の酸性アミノ酸残基には H^+ が結合していなければならない。しかしながら、水溶液中では酸性アミノ酸残基は H^+ を解離しているほうが安定であり、 H^+ が結合した残基の存在確率は極めて低い (Warshel, 1981)。これは酸性アミノ酸残基が酸として、溶媒の H_2O に H^+ を渡してしまうからである。ある物質が酸にどれだけなりやすいかを示す指標として pK_a という値がある。この値が低い方が強い酸であり、強い酸は弱い酸へ H^+ を受け渡すという化学的性質がある。酸性アミノ酸残基の pK_a は、アスパラギン酸が 3.86、グルタミン酸が 4.25 で H_2O がおよそ 15 である。そのために酸性アミノ酸は H_2O に H^+ を渡してしまい、 H^+ 供与体として機能しないという矛盾が生じてしまう。

一方で、疎水性環境中では酸性アミノ酸は H^+ と結合している方が安定である。酸性アミノ酸は残基にカルボニル基を持つため、 H^+ と解離すると負電荷を帯びる。疎水環境中では電荷を持たない方が安定であるため、 H^+ と結合している酸性アミノ酸の存在確率が上昇する (Christian Zscherp, Ramona Schlesinger, Jörg Tittor, Dieter Oesterhelt, 1999; Brik and Wong, 2002)。従って、クロロフィルに H^+ を供与する酸性アミノ酸残基は SGR 内部の疎水性アミノ酸残基に囲まれていると推測される。SGR の基質であるクロロフィル *a* は疎水的な分子であるため、疎水アミノ酸残基は活性中心に H^+ を結合させると同時に、基質であるクロロフィルを結合する結合サイトとして機能していると考えられる。

FATT タグには、超酸性領域と呼ばれるドメインが存在する (Fig 8)。この領域は構成アミノ酸の 50%以上が酸性アミノ酸であり、立体構造を持たない。FATT タグのみを発現させた empty vector では Mg 脱離活性がなかった。これは、超酸性領域の酸性アミノ酸残基

が上述の理由により H^+ と結合しておらず、触媒にはなり得ないことを意味している。

3. アスパラギン酸残基とグルタミン酸残基

同じ酸性アミノ酸残基でも、アスパラギン酸残基は pKa 3.86、グルタミン酸残基は pKa 4.25 であり、アスパラギン酸の方が強い酸である。つまり、アスパラギン酸の方が基質に対する H^+ 供与能力に優れており、活性中心として好ましいと言える。実際、バクテリア SGR ホモログのアミノ酸配列を用いて絞り込んだ活性中心候補の酸性アミノ酸残基は、AtSGRL では全てアスパラギン酸であった (D107、D132、D133、D186) (Fig 4)。ただし、Fig 4 を見ると、AtSGRL の D133 に相同な位置の酸性アミノ酸残基は、グルタミン酸残基のものもある。このことから D133 およびこれと相同な酸性アミノ酸は H^+ 供与体として触媒には関わっていないことを支持すると考えられる。

PpSGR ホモログは Mg 脱離活性が得られなかったが、触媒に必要なだと考えられるヒスチジンと酸性アミノ酸残基を全て持っていた (Table 5)。しかし、AtSGRL の D186 に相当する位置の酸性アミノ酸残基がグルタミン酸残基であった (Fig 4)。PpSGR ホモログは、グルタミン酸の H^+ 供与能力がアスパラギン酸に比べて弱いため、クロロフィルを分解できなかったと考えられる。AtSGRL のアミノ酸置換体においても、D186E では活性が得られなかったことも同様の理由と考えられる (Fig 25)。PpSGR ホモログの AtSGRL D186 に相同なグルタミン酸をアスパラギン酸に置換すれば活性が得られるようになるかもしれない。

実験材料・方法

1. タンパク質の系統解析と宿主生物の系統解析

1.1. SGR と SGR ホモログの系統解析

SGR と SGR ホモログの系統樹は以下の 4 ステップを踏んで作成した。

- ① アミノ酸配列の検索と系統樹に使用する配列の選択
- ② 選択したアミノ酸配列を用いたアライメントの作成
- ③ 系統樹の作成に悪影響を及ぼすアミノ酸残基のトリミング
- ④ 系統樹の描画

SGR と SGR ホモログのアミノ酸配列は以下のデータベースから BLAST 検索により得られた。

- ・ Phytozome (ver.12.1.5) (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)
- ・ realDB (<http://realdb.algaegenome.org/>)
- ・ NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)
- ・ Alga-PrAS (<http://alga-pras.riken.jp/>)

Query 配列にはシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の代表的な SGR である SGR1 (At4G22920.1)を使用した。尚、この SGR1 は Phytozome から得た配列である。検索の結果、Phytozome と NCBI から緑色植物 SGR とバクテリア SGR ホモログ、アーケア SGR ホモログのアミノ酸配列を得た。そして、realDB と Alga-PrAS からは灰色植物 SGR ホモログのアミノ酸配を得た。

作業の効率化および計算の省力化のため、各データベースから検索された SGR (ホモログ) アミノ酸配列は全て使用せず、一部の配列を代表として選択して使用した。配列選択の際には、由来となる宿主生物の系統と配列のホモロジーに偏りがないように留意した。これにより、14 種類の緑色植物 SGR と 4 種類の灰色植物 SGR ホモログ、3 種類のアーケア SGR ホモログ、44 種類のバクテリア SGR ホモログを選択した (Table 1)。

上記の操作で得られたアミノ酸配列は FASTA 形式のファイルにまとめられ、M-Coffee(Moretti et al., 2007)においてアライメントを作成した。M-Coffee とは、ブラウザ上で提供されるサービスで、複数のアルゴリズムを統合して多数決的に最適なアライメントを作成することができる。作成された SGR (ホモログ) の結果を見ると、2 つのバクテリア SGR ホモログ (Table 1 の *Alycyclobacillus hesperidium* と *Clostridium* sp. Marseille-P2414) はある程度のアライメントを有しているが、配列の保存性が他とは明らかに異なっていた。この 2 種には、他の SGR ホモログとは異なる選択圧が働いている可能性があったため、これらは除外して再度アライメントを作成した。

M-Coffee の出力結果には、アミノ酸残基ごとに信頼性 (正しくアライメントされている可能性) が与えられ、「GOOD > AVE > BAD」とスコアが付けられる。このスコア付けは赤～青のカラーチャートと対応しており、本研究では、「GOOD」の範囲は赤色～桃色、「AVE」の範囲は黄色、「BAD」の範囲は緑～青の範囲と定めた。アライメントの信頼性は系統樹の質に強く影響するため、「GOOD」とスコアが付けられた残基のみ残し、それ以外の残基は全てトリミングした。

トリミングされた配列データは IQ-TREE (ver. 1.6.9) に提出され、最尤法により系統樹が作成された (Fig. 5)。IQ-TREE もブラウザ上のサービスであり、各種パラメーターを設定の後、先のトリミングされたデータを提出して系統樹を作成する。パラメーターは、系統解析の反復回数を 1000 回、解析の速度をウルトラファストモードに設定し、残りはデフォルトとした。出力された系統樹には、最適とされるアミノ酸置換モデルが当てはめられる。今回は「LG+I+G4」が最適なモデルと判断された。

1.2. SGR ホモログを持つ生物の系統解析

SGR ホモログの系統関係と宿主生物の系統関係を比較するために、宿主生物の 16SrRNA に基づいた系統樹の作成を行った。系統樹作成の手順は「1.1. SGR と SGR ホモログの系統

解析」に同じである。SGR（ホモログ）の系統解析に使用した宿主生物の 16SrRNA 配列は Integrated Microbial Genomes (<https://img.jgi.doe.gov/>) より入手した (Table 2)。しかし他のデータベースを含めても、16SrRNA の配列が短いものや登録されていないものがあったため、それらについては系統解析からは除外した。収集した配列は M-Coffee でアライメントを作成し、「GOOD」とスコア付けされた残基以外をトリミングの後、IQ-TREE (ver. 1.6.12) で系統樹を作成した。IQ-TREE の設定も SGR（ホモログ）の系統解析と同じである。最適とされるヌクレオチド置換モデルは「GTR+F+I+G4」と判断された。

2. AtSGRL とバクテリア SGR ホモログおよび AtHCAR のクローニング

2.1. FATT-tag のクローニング

FATT タグはアミロイド前駆体タンパク質から作成されたフュージョンタグであり、タンパク質の可溶化を促進する。このタグを用いることで、大腸菌タンパク質発現系での SGR の封入体形成（不溶化）問題の解決を試みる。大腸菌発現系の改良に取り組むのは、費用と労力削減のためである。本研究では、Chen et al., 2017 により作成された FATT タグ配列を参考に、大腸菌でのタンパク発現用に最適化したコドンを持つ人工遺伝子を注文した。

人工合成された FATT タグ DNA 断片とプラスミド pET30a (+) (Merck) のそれぞれに対して *Nde*I と *Nco*I (TAKARA) を加え、37°C で 1 h インキュベートすることで DNA 断片及びプラスミドの切断を行った。操作手順はメーカープロトコルに従った。制限酵素処理産物は 1% アガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics) により目的の DNA 断片を精製した。精製した FATT タグ断片と pET30a 断片を T4 DNA Ligase (PROMEGA) で 16°C、一晩ライゲーション反応させ、FATT タグを pET30a に組み込んだ。

FATT タグを組み込んだ pET30a (以下 FATT_pET30a と表記) を用いて大腸菌 ECOS Competent E.coli DH5 α (ニッポンジーン) の形質転換を行った。形質転換はヒートショ

ック法により行った。形質転換した大腸菌は 50 μ g/ml カナマイシンを含む LB 培地 (Table S1) に塗布し、プレートの蓋を下向きにして 37°C、一晩のインキュベートをした。

カナマイシン耐性のコロニーが得られたら、複数のコロニーを P10 チップで少量取り、それぞれ 10 μ l の H₂O に懸濁した。この大腸菌懸濁液を鋳型として Go-Taq (PROMEGA) を用いた PCR を行った。PCR 条件はメーカープロトコルを参照した。任意のプライマーセットにより、目的の長さの DNA 断片が増幅されたら、鋳型コロニーの液体培養を行った。試験管に 2ml の 50 μ g/ml カナマイシン入りの液体 LB 培地を用意し、ここへ鋳型コロニーを懸濁した。試験管を 37°C のインキュベーターへ移し、ダブルシェーカー (TAITEC) で振とうしながら一晩培養した。

白濁した大腸菌培養液から FastGene Plasmid Mini Kit (NIPPON Genetics) を用いて抽出、精製を行った。抽出された FATT_pET30a は Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行い、反応液は Big Dye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) により精製を行った。シーケンス反応と精製はメーカープロトコルに従った。精製した反応液の上清を 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で解析を行い、目的のコンストラクトであることを確認した。

表S1. LB培地組成

試薬	容量
Bacto tryptone	10 g/L
Bacto yeast extract	5.0 g/L
Agar powder	10 g/L *1
NaCl	10 g/L

*1: 液体LB培地を作成するときは添加しない

2.2. 緑色植物 SGR と SGR ホモログおよび AtHCAR のクローニング

目的のタンパク質の N 末端側に FATT タグを持つようにコンストラクトの作成を行った。

緑色植物 SGR は Shimoda et al., 2016 及び Matsuda et al., 2016 で使用された AtSGR1、

AtSGRL、CrSGR のクローンを鋳型とし、AtHCAR は Meguro et al., 2011 で使用されたクローンを鋳型とした（いずれも葉緑体移行シグナルと推定される領域は取り除かれている）。表 S2 のプライマーと KOD -Multi & Epi- (TOYOBO) を使用して、PCR を行った。PCR の条件はメーカーの提供するプロトコルを参照した。また、AtSGR1 のクローンは Megaprimer 法による融合タンパク質作成にも利用した。表 S3 のプライマーセットを用いて AtSGR1 と CrSGR の C 末端配列（推定触媒部位は含まない）で融合タンパクを作成した。

クローニングする SGR ホモログは、「1.1. SGR と SGR ホモログの系統解析」で使用したものから 6 種類を選択した。ホモログを選択する際には、緑色植物 SGR に対するホモロジーと宿主の系統、ホモログが所属する系統樹上の枝に偏りがないように配慮した。選択したホモログの人工遺伝子は、大腸菌タンパク質発現系に合わせてコドン最適化し、Table S4 のプライマーを用いて PCR (KOD -Multi & Epi-) を行った。

FATT_pET30a を *Nco*I と *Bam*HI (TAKARA) で制限酵素処理し、プラスミドの切断を行った。反応後液を H₂O で 2 倍に希釈し、75°C で 10min 過熱して制限酵素を失活させた。

PCR により増幅した DNA 断片をインサートとして、作成した FATT_pET30a 断片へ In-Fusion HD cloning Kit (TAKARA) による組み込みを行った。In-Fusion 反応はメーカープロトコルに従った。In-Fusion 産物 1μl を用いて上記と同様に大腸菌 (ECOS) の形質転換、コロニー PCR、プラスミド抽出、シーケンス反応を行って目的のコンストラクトを作成した。

Table S2. AtHCARと緑色植物SGRクローニング用プライマー

プライマー名称	塩基配列 (5'→3')
FATT_AtHCAR_Fw	CGGTCAGGGTCCATGGAACCTCTTCTTCTCGCGTT
FATT_AtHCAR_Rv	CGAATTCGGATCCTATTTCTTGGAGAGCATTTTAT
CrSGR_Fw	GGAGATATACATATGGCCTCCAGGCGACAACCTAC
CrSGR_Rv	ATCGTCTTTGTAGTCGGAGGCCGAGGAGCGCGCTA
FATT_AtSGR1_Fw	CGGTCAGGGTCCATGGGCAAGGTTGTTTGGACCGG
FATT_AtSGR1_Rv	GCTCGAATTCGGATCCTAGAGTTTCTCCGGATTTG
FATT_AtSGRL_Fw	CGGTCAGGGTCCATGGAGCTCCGCTATTAGTGACG
FATT_AtSGRL_Rv	GCTCGAATTCGGATCCTACAGAAGAAACGTAAATA
FATT_CrSGR_Fw	CGGTCAGGGTCCATGGGCCTCCAGGCGACAACCTA
FATT_CrSGR_Rv	GCTCGAATTCGGATCCTAGGAGGCCGAGGAGCGCG

Table S3. AtSGR1_CrSGR C-term.融合タンパク質作成用プライマー

A) 融合部位より5'側のDNA断片増幅用プライマーセット

プライマー名称	塩基配列 (5'→3')
FATT_AtSGR1_Fw	CGGTCAGGGTCCATGGGCAAGGTTGTTTGGACCGG
AtSGR1_CrSGR C-term._Rv	CTTCCTGCCGGAGTTTCTCCGGATTTGGAG

B) 融合部位より3'側のDNA断片増幅用プライマーセット

プライマー名称	塩基配列 (5'→3')
AtSGR1_CrSGR C-term._Fw	GGAGAACTCCGGCAGGAAGGACGGCAGGA
FATT_CrSGR_Rv	GCTCGAATTCGGATCCTAGGAGGCCGAGGAGCGCG

Table S4. バクテリアSGRホモログクローニング用プライマー

プライマー名称	塩基配列 (5'→3')
FATT_AbSGR homolog_Fw	CGGTCAGGGTCCATGGGATCATCTGAAACCGGAGA
FATT_AbSGR homolog_Rv	GCTCGAATTCGGATCCTATTTGTAATCGCGCAGAA
FATT_CbSGR homolog_Fw	CGGTCAGGGTCCATGGAGCAAACCTGAACACCGACA
FATT_CbSGR homolog_Rv	GCTCGAATTCGGATCCTAGGTTTTATAATCGCTGA
FATT_BaSGR homolog_Fw	GGCGGTCAGGGTCCATGGAGCGAGTTCAATCCGGA
FATT_BaSGR homolog_Rv	GCTCGAATTCGGATCCTAGGCCGGGTTCAGTTTCA
FATT_BsSGR homolog_Fw	CGGTCAGGGTCCATGGAGCCATTGGGATCCGACCA
FATT_BsSGR homolog_Rv	GCTCGAATTCGGATCCTAGGTGCCAATCAGCTGCA
FATT_RSGR homolog_Fw	CGGTCAGGGTCCATGGATCATCCTGCGCAACCTGA
FATT_RSGR homolog_Rv	GCTCGAATTCGGATCCTATTTTCACTCACATCCA
FATT_PpSGR homolog_Fw	CGGTCAGGGTCCATGGAAAAATCTGAAAGTGATCG
FATT_PpSGR homolog_Rv	GCTCGAATTCGGATCCTAGATATTTTTCAGGCTCT

3. タンパク質の発現と検出・定量

3.1. 大腸菌の形質転換と液体培養

作成された FATT_SGR (ホモログ)_pET30a と FATT_AtHCAR_pET30a は大腸菌 BL21 (Invitrogen) の形質転換に使用した。上記と同様にヒートショック法を用い、50 μ g/ml カナマイシンを含む LB 培地に塗布して 37°Cで一晩静置して培養した。次に、2ml の 50 μ g/ml カナマイシンを含む液体 LB 培地の入った試験管を用意し、ここへ得られたコロニーを懸濁した。試験管を 37°Cのインキュベーターへ移し、シェーカーで振とうしながら一晩培養した。

3.2. 目的タンパク質の合成

200ml 三角フラスコ (IWAKI) に 30ml の 50 μ g/ml カナマイシン含有液体 LB 培地を用意し、ここへ試験管中の大腸菌培養液から 300 μ l (1/100 量) 移し取った。培地の入った三角フラスコを 37°Cで振とうし、前培養とした。可視光度計 Colourwave C07500B Colorimeter (funakoshi) で 590nm における大腸菌の OD を測定し、OD の値が 0.5 から 1.0 に達したところで前培養を終了した。次に、前培養液に終濃度 0.4mM になるように IPTG を添加することで目的タンパク質の合成を誘導し、再び 37°Cで 3h 振とう培養した。

タンパク質の合成が終了したら、大腸菌培養液を 50ml のコニカルチューブへ回収し、13000rpm、1min の遠心をして大腸菌ペレットを得た。ペレットは 20ml の H₂O で再懸濁して LB 培地の塩を取り除いた。再度遠心して塩を抜いた大腸菌ペレットを得た。このペレットに対して培養液の 1/20 量 (今回は 1.5ml) の BugBuster (Merck) を加えることで大腸菌溶解液を作成し、さらに 1 μ l の Benzonase (Merck) を加えてタンパク質を用いる実験に不要な DNA を分解した。この大腸菌溶解液を酵素溶液とした。

4. 目的タンパク質の検出

4.1. SDS-PAGE

タンパク質の電気泳動はアクリルアミド 12%の分離ゲルと 3%の濃縮ゲル (Table S5) を用いて行った。各ゲルの組成は下表の組成の通りで、ガラス板 (ATTO) を用いて作成した。泳動するサンプルは、SGR を発現させた大腸菌の溶解液もしくはその上清に等量のサンプルバッファー (Table S6) を加え、1/10 量の 2-メルカプトエタノールの添加後 90°C、1min 加熱してタンパク質を変性させたものを使用した。作成したゲルを AE-6500 ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (ATTO) にセットし、泳動バッファー (Table S7) で満たした。マーカーには Precision Plus Protein Dual Color Standards (BIO RAD) を 1µl 使用し、サンプルを全てロードしたら 200V、60min の定電圧条件で電気泳動した。

Table S5. アクリルアミドゲルの組成

A) 分離ゲル (12%)

試薬	容量
30% Acrylamide stock solution	6.0 ml
3M Tris-HCl (pH 8.8)	1.9 ml
H ₂ O	7.1 ml
TEMED	12 µl
10% APS	125 µl *2

*2: TEMEDと反応してアクリルアミドゲルの重合反応が始まるので最後に添加する

B) 濃縮ゲル (3%)

試薬	容量
30% Acrylamide stock solution	0.75 ml
0.5M Tris-HCl (pH 6.8)	1.88 ml
H ₂ O	4.9 ml
TEMED	6.0 µl
10% APS	62.5 µl *2

Table S6. SDS-PAGEサンプルバッファーの組成

試薬	容量
Sucrose	1.0 g
0.5M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 ml
10% SDS	4.0 ml
Bromophenol blue	a little
H ₂ O	up to 10ml

Table S7. SDS-PAGE泳動バッファーの組成

A) 10×SDS-PAGE泳動バッファー

試薬	容量
Tris	30 g
Glycine	144 g
H ₂ O	up to 1L

B) SDS-PAGE泳動バッファー

試薬	容量
10×SDS-PAGE泳動バッファー	100 ml
H ₂ O	900 ml
SDS	1.0 g

4.2. イムノブロット

SDS-PAGE 終了後、分離ゲルを切り出し、PVDF メンブレン (Perkin-Elmer) へタンパク質を転写した。タンパク質は SDS-PAGE で使用したサンプルバッファー中の SDS により負に帯電しているため、陽極へ引き寄せられる。そのため、陽極側からクロマト濾紙 (ADVANTEC)、PVDF メンブレン、分離ゲル、クロマト濾紙の順で並ぶように 2 連式ミニ転写装置 (日本エイドー) にセットした。このとき、クロマト濾紙には転写バッファーを含ませ、PVDF メンブレンはメタノールに浸した後で転写バッファー (Table S9) を馴染ませた。転写は 40V、2h の定電圧条件で行った。

転写が完了した PVDF メンブレンは PBS-T (Table S10) で溶かした 50 g/L スkimミルク溶液に 1h から一晩浸しながら振とうし、ブロッキングとした。ブロッキングした PVDF メンブレンは PBS-T で振とう 10min の洗浄を 3 回行い、skimミルクを除去した。次に一次抗体反応を振とう、1h 行った。この反応では、Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO) で 3000 倍希釈した monoclonal ANTI-FLAG produced in mouse を使用した (必要に応じて防腐剤として 1/1000 量の 10%NaN₃ を加えた)。一次抗体反応後は不要な抗体を取り除くために、再び PBS-T で振とう 10min の洗浄を 3 回行った。洗浄後、PBS-T で 20000 倍希釈した ANTI-mouse 抗体で二次抗体反応を振とう、1h 行った。二次抗体反応後も同様に PBS-T で振とう 10min の洗浄を 3 回行った。PVDF メンブレンは最終的に WESTERN LIGHTNIG Plus-ECL (Perkin-Elmer) と満遍なく反応させ、蛍光をルミビジョンプロ (アイシン精機) でタンパク質の検出を行った。

Table S8. 転写バッファーの組成

試薬	容量
10×SDS-PAGE泳動バッファー	100 ml
H ₂ O	700 ml
メタノール	200 ml

Table S9. PBS-Tの組成

試薬	容量
NaCl	8.0 g
Na ₂ HPO ₄	1.1 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
10% Tween20	10 ml
H ₂ O	up to 1L

5. 基質の調製

5.1. クロロフィル誘導体とヘミンおよびプロトポルフィリン IX の調製

クロロフィル *a*、クロロフィル *b*、ヘミン及びプロトポルフィリン IX（ヘミンから鉄原子が脱離した分子）は市販の粉末試薬から調製した。

クロロフィリド *a* はクロロフィル *a* をクロロフィラーゼで加水分解し、フィトール基を除去することで得た。プロトクロロフィル *a* はクロロフィル *a* を 0.5 mM 2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノベンゾキノンを含むジエチルエーテル中で酸化処理することで得た。Zn-クロロフィル *a* は、まずクロロフィル *a* を塩酸で処理して Mg を脱離することでフェオフィチン *a* に変換し、次にフェオフィチン *a* をジクロロメタンに溶かし、1/10 量の酢酸亜鉛飽和メタノールと混和することでフェオフィチン *a* に亜鉛を挿入した。バクテリオクロロフィル *a* は紅色細菌 *Rhodobacter sphaeroides* (NBRC) から、クロロフィル *c*₁ と *c*₂ の混合物は珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* (Bigelow) からそれぞれアセトンで抽出した。

合成あるいは抽出したクロロフィルは既知のモル吸光係数と吸光度の測定 (HITACHI) から物質量を計算した。プロトクロロフィル *a* は 30.4 (626 nm、80%アセトン中) (Brouers and Michel-Wolwertz, 1983)、Zn-クロロフィル *a* は 77.3 (659 nm、80%アセトン中) (Jones et al., 1977)、バクテリオクロロフィル *a* は 7.15 (770 nm、アセトン中) (Connolly et al., 1982)、クロロフィル *c*₁ と *c*₂ はそれぞれ 348 (446.1 nm、1%ピリミジン含有アセトン中) と 321 (444.6 nm、1%ピリミジン含有アセトン中) である (Jeffrey, 1972)。

5.2. PSI 粒子と LHCII の精製

PSI 粒子と LHCII は市販のハウレンソウからショ糖密度勾配遠心法で分離・精製した。

6. 酵素反応と HPLC による Mg 脱離活性の検出

酵素反応には、AtSGRL あるいはバクテリア SGR ホモログを発現した大腸菌の溶解液を

酵素液として使用する。今回は酵素の精製していないため、酵素液には目的の酵素と大腸菌のタンパク質などが含まれている。酵素反応の際には反応条件を統一するため、反応液中の目的の酵素の濃度と大腸菌のタンパク質の濃度を統一した。そのため、目的酵素を含む大腸菌溶解液は empty vector を導入した大腸菌の溶解液で希釈し、酵素液中の大腸菌タンパク質の濃度は変えず、酵素濃度のみを希釈・統一した。

色素溶液の調製は、乾燥クロロフィル誘導体（物質既知）にジメチルスルホキシド（DMSO）を加え、任意の濃度にした後に BugBuster に添加して色素溶液とした（色素溶液内の DMSO 濃度は 1.2% [v/v] である）。ヘミンとプロトポルフィリン IX は BugBuster（1.2% [v/v] の DMSO を含む）で直接希釈して色素溶液とした。

酵素反応には酵素溶液と色素溶液それぞれ 10 μ l を混和し、25°C、30 分、暗黒下で反応させた。全てのクロロフィル誘導体に対して、Mg 脱離物であるフェオフィチンは 10 μ l の 1M HCl との反応で取得し、ポジティブコントロールとした。ただし、ヘミンは 1M HCl に対して安定であるため、ヘミンの鉄脱離物であるプロトポルフィリン IX は購入した標品から調製してある。

酵素反応は、20 μ l の酵素反応液に 80 μ l のアセトンを追加することで、SGR（ホモログ）を失活させることで反応を止めた。20000 $\times$ g、4°C、10 分の遠心により色素の解けた上清を回収し、HPLC による色素分析に用いた。酵素反応により Mg 脱離物、鉄脱離物が生じるかで活性を評価する。

7. Mg 脱離活性の検出

はじめに SGR（ホモログ）の活性の有無を決定するために、SGR（ホモログ）を発現した大腸菌の溶解液を希釈せずにクロロフィル *a* と反応させた。大腸菌溶解液とクロロフィル *a* の終濃度はそれぞれ 50% [v/v]、18 μ M とした。反応前と反応後の色素組成は HPLC 解析に使用した。この解析には、カラムは C8 カラム（Waters Symmetry C8、Waters）、溶媒は

B 液（メタノール：アセトニトリル：アセトン=1：3：1 [v:v:v]）を用い、溶媒の流速は 1ml/分、カラムの温度は 40℃で行った。溶出した色素プロファイルは蛍光強度（励起光波長/蛍光検出波長=410/680nm）と吸光度でモニターし、フェオフィチン *a* の検出を行い（RF-20A、島津製作所）、その有無で活性の有無を決定した。

8. 基質特異性の決定

SGR（ホモログ）を発現した大腸菌溶解液をクロロフィル誘導体もしくはヘミンを溶解した色素溶液と混和して酵素反応させた。AtSGRL とクロロフィル *a* に対して活性が確認されたバクテリア SGR ホモログは同じ濃度（終濃度 50% [v/v] 大腸菌溶解液、1.5μM 可溶性酵素）に調製した。一方で活性のないバクテリア SGR ホモログに関しては、希釈は行わなかった。基質として用いた色素の終濃度は、クロロフィル *a*、クロロフィリド *a*、クロロフィル *b*、プロトクロロフィル *a*、Zn-クロロフィル *a* がそれぞれ 18μM、クロロフィル *c₁* と *c₂* の混合物は 1.2mM、バクテリオクロロフィル *a* は 60μM、ヘミンとプロトポルフィリン IX は 100μM である。酵素反応の前と後に色素組成の HPLC 解析を行い、それぞれの基質に対して酵素反応による分解が生じているかを評価する。この解析では、カラムは上記と同様の C8 カラム、溶媒は A 液（メタノール：アセトニトリル：ピリジン水溶液（0.25M ピリジン）=2：1：1 [v:v:v]）から B 液へのグラジエントを使用し、流速は 1ml/分、カラム温度は 40℃とした(Shimoda et al., 2012)。溶出した色素のプロファイルは分解物（フェオフィチン誘導体もしくはプロトポルフィリン IX）の検出に最適化された蛍光光度計と吸光度計により調べた。ヘミンとバクテリオクロロフィル *a* の分解産物の検出は吸光度計を用いており、それぞれ 401nm、388nm で吸光度を測定した。それ以外の分解産物に対しては蛍光検出器を用いた。クロロフィル *a*、クロロフィリド *a*、Zn-クロロフィル *a* は励起波長/検出蛍光波長=410/680nm による検出を、クロロフィル *b* は 434/660nm で、プロトクロロフィル *a* およびクロロフィル *c₁* と *c₂* に関しては 415/640nm で検出した。

9. 光化学系タンパク質 (PSI と LHCII) の精製と酵素反応、並びに活性測定

酵素活性のために、酵素溶液は「基質特異性の決定」で述べられた方法と同様の手順で調製された。基質となる PSI 粒子と LHCII は 0.05% Triton X-100 で可溶化し、終濃度は含有クロロフィルが 18 μ M に相当する量になるよう調製された。色素組成は HPLC で解析されたが、本解析ではカラムは C18 カラム (Shim-Pack CLC-ODS、島津製作所) を用いた。C18 カラムを使用することで、フェオフィチン *b* とクロロフィル *a* の溶出時間をずらすことができる。溶媒はメタノールを使用し、流速は 2ml/分、カラム温度は 40°C で行った。溶出した色素プロファイルは蛍光検出器 (励起光波長/蛍光検出波長 = 406/680nm (フェオフィチン *a*)、430/650nm (フェオフィチン *b*)) でモニターし、タンパク質中のクロロフィルに対しての分解活性を評価した。

10. 酵素反応速度論的解析

酵素反応速度論的パラメーターである k_{cat} と K_m の決定を、クロロフィル *a* を基質として用いて行った。酵素反応は 25°C、暗黒下で行った。基質となるクロロフィル *a* の終濃度は 6、10、15、18、21、24 μ M とし、それぞれに対して AtSGRL とバクテリア SGR ホモログを反応させた (反応系中の大腸菌溶解液は 12.5% [v/v] で統一されている)。AtSGRL とバクテリア SGR ホモログの可溶性画分中の酵素濃度はそれぞれ 0.236 μ M、0.118 μ M に調製された。反応によって生じるフェオフィチン *a* を経時的に測定し、酵素反応の初速を求めた。AtSGRL は 10 分毎に酵素反応液を採取、AbSGR ホモログと CbSGR ホモログは 5 分毎に、BaSGR ホモログは 1 分毎に行った。酵素反応液の採取の際には、20 μ l の酵素液が回収され、液体窒素中で保存された。HPLC 解析の前に 80 μ l のアセトンが添加され、20000 $\times$ g、4°C、10 分の遠心により色素の解けた上清を回収し、HPLC による色素分析に用いた。HPLC 解析の手法は「Mg 脱離活性の検出」で述べた通りである。全ての SGR (ホモログ) の各基質終濃度における反応初速度の決定後、求めた速度をもとにミカエリスメンテン曲線を

描画した。曲線はエクセルのソルバーを用いて、最小二乗法により作成し、ベストフィットするものを取得、ここからそれぞれの k_{cat} と K_m を算出した。

11. アミノ酸置換体の作成

Megaprimer 法を使用して AtSGRL へ任意の塩基置換を導入し、翻訳合成されるアミノ酸の置換を行った。FATT_AtSGRL_pET30a を鋳型として、Table S10 のプライマーセットを用いて PCR (KOD -Multi & Epi-) を行った。増幅された DNA 断片は、*NcoI* と *BamHI* で切断した FATT_pET30a へ In-Fusion 反応により導入した。上記と同様に、In-Fusion 産物 1 μ l を用いて上記の通り大腸菌 (ECOS) の形質転換、コロニーPCR、プラスミド抽出、シーケンス反応を行って目的のコンストラクトを作成した。

Table S10. AtSGRLの塩基置換導入用プライマーと組み合わせ

A) 変異導入部位より5'側のDNA断片増幅用のプライマーセット

プライマー名称	塩基配列 (5'→3')
FATT_AtSGRL_Fw	CGGTCAGGGTCCATGGAGCTCCGCTATTAGTGACG
AtSGRL D107E_Rv	AGTTAGCAGTGAATTCACAATGCGAAAGAA
AtSGRL D107N_Rv	AGTTAGCAGTGAAGTTACAATGCGAAAGAA
AtSGRL D132E_Rv	ACCACATCTTCTTTCTTGTACCAGCCTTCT
AtSGRL D132N_Rv	ACCACATCGTTTTTCTTGTACCAGCCTTCT
AtSGRL D133E_Rv	ACCACTTCATCTTTCTTGTACCAGCCTTCT
AtSGRL D133N_Rv	ACCACGTTATCTTTCTTGTACCAGCCTTCT
AtSGRL D186E_Rv	ACATAACTGATTCTCCATGCACCACAGCTT
AtSGRL D186N_Rv	ACATAACTGAGTTTCCATGCACCACAGCTT
AtSGRL H105A_Rv	AAGTCACACGCCGAAAGAATATAAGTCCGC
AtSGRL H105N_Rv	AAGTCACAGTTCGAAAGAATATAAGTCCGC
AtSGRL H105Y_Rv	AAGTCACAATACGAAAGAATATAAGTCCGC
AtSGRL H105C_Rv	AAGTCACAGCACGAAAGAATATAAGTCCGC

B) 変異導入部位より3'側のDNA断片増幅用のプライマーセット

プライマー名称	塩基配列 (5'→3')
FATT_AtSGRL_Rv	GCTCGAATTCGGATCCTACAGAAGAAACGTAAATA
AtSGRL D107E_Fw	TTGTGAATTCAGTCTAACTTAACGTTAAC
AtSGRL D107N_Fw	TTGTAACTTCAGTCTAACTTAACGTTAAC
AtSGRL D132E_Fw	TACAAGAAAGAAGATGTGGTTGCTGAGTGG
AtSGRL D132N_Fw	TACAAGAAAAACGATGTGGTTGCTGAGTGG
AtSGRL D133E_Fw	TACAAGAAAGATGAAGTGGTTGCTGAGTGG
AtSGRL D133N_Fw	TACAAGAAAGATAACGTGGTTGCTGAGTGG
AtSGRL D186E_Fw	GCATGGAGAATCAGTTATGTTTAGAGAGAA
AtSGRL D186N_Fw	GCATGGAAACTCAGTTATGTTTAGAGAGAA
AtSGRL H105A_Fw	ATTCTTTTCGGCGTGACTTCACTGCTAAC
AtSGRL H105N_Fw	ATTCTTTTCGAAGTGACTTCACTGCTAAC
AtSGRL H105Y_Fw	ATTCTTTTCGTATTGTGACTTCACTGCTAAC
AtSGRL H105C_Fw	ATTCTTTTCGTGCTGTGACTTCACTGCTAAC

参考文献

- Aharoni A, Gaidukov L, Khersonsky O, Mc QGS, Roodveldt C, Tawfik DS, Gould SMQ, Roodveldt C, Tawfik DS (2005) The “evolvability” of promiscuous protein functions. *Nat Genet* 37: 73–76
- Armstead I, Donnison I, Aubry S, Harper J, Hörtensteiner S, James C, Mani J, Moffet M, Ougham H, Roberts L, et al (2006) From crop to model to crop: identifying the genetic basis of the staygreen mutation in the *Lolium/Festuca* forage and amenity grasses. *New Phytol* 172: 592–597
- Baier F, Copp JN, Tokuriki N (2016) Evolution of Enzyme Superfamilies: Comprehensive Exploration of Sequence-Function Relationships. *Biochemistry* 55: 6375–6388
- Barry CS, Mcquinn RP, Chung M-YY, Besuden A, Giovannoni JJ (2008) Amino acid substitutions in homologs of the STAY-GREEN protein are responsible for the green-flesh and chlorophyll retainer mutations of tomato and pepper. *Plant Physiol* 147: 179–187
- Brik A, Wong C-H (2002) HIV-1 protease: mechanism and drug discovery.
- Brouers M, Michel-Wolwertz MR (1983) Estimation of protochlorophyll(ide) contents in plant extracts; re-evaluation of the molar absorption coefficient of protochlorophyll(ide). *Photosynth Res* 4: 265–270
- Chen Y, Porter K, Osawa M, Augustus AM, Milam SL, Joshi C, Osteryoung KW, Erickson HP (2017) The Chloroplast Tubulin Homologs FtsZA and FtsZB from the Red Alga *Galdieria sulphuraria* Co-assemble into Dynamic Filaments. *J Biol Chem* 292: 5207–5215
- Chen Y, Shimoda Y, Yokono M, Ito H, Tanaka A (2019) Mg-dechelataase is involved in the formation of photosystem II but not in chlorophyll degradation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 97: 1022–1031
- Christian Zscherp, Ramona Schlesinger, Jörg Tittor, Dieter Oesterhelt and JH (1999) In situ

- determination of transient pKa changes of internal amino acids of bacteriorhodopsin by using time-resolved attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5498–5503
- Connolly JS, Samuel EB, Janzen AF (1982) EFFECTS OF SOLVENT ON THE FLUORESCENCE PROPERTIES OF BACTERIOCHLOROPHYLL a. *Photochem Photobiol* 36: 565–574
- Copley SD (2003) Enzymes with extra talents: Moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Curr Opin Chem Biol* 7: 265–272
- Copley SD (2017) Shining a light on enzyme promiscuity. *Curr Opin Struct Biol* 47: 167–175
- Glasner ME, Truong DP, Morse BC (2020) How enzyme promiscuity and horizontal gene transfer contribute to metabolic innovation. *FEBS J* 287: 1323–1342
- Hansson MD, Karlberg T, Rahardja MA, Al-Karadaghi S, Hansson M (2007) Amino Acid Residues His183 and Glu264 in *Bacillus subtilis* Ferrochelatase Direct and Facilitate the Insertion of Metal Ion into Protoporphyrin IX. *Biochemistry* 46: 87–94
- Hauenstein M, Christ B, Das A, Aubry S, Hörtensteiner S (2016) A Role for TIC55 as a Hydroxylase of Phyllobilins, the Products of Chlorophyll Breakdown during Plant Senescence. *Plant Cell* 28: 2510–2527
- Heimdal J, Jensen KP, Devarajan A, Ryde U (2007) The role of axial ligands for the structure and function of chlorophylls. *J Biol Inorg Chem* 12: 49–61
- Hoares DG, Koshland DE (1967) A Method for the Quantitative Modification and Estimation of Carboxylic Acid Groups in Proteins. *J Biol Chem* 242: 2447–2453
- Holzwarth AR, Müller MG, Reus M, Nowaczyk M, Sander J, Rögner M (2006) Kinetics and mechanism of electron transfer in intact photosystem II and in the isolated reaction center: Pheophytin is the primary electron acceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6895–6900

- Hortensteiner S (2009) Stay-green regulates chlorophyll and chlorophyll-binding protein degradation during senescence. *Trends Plant Sci* 14: 155–162
- Hortensteiner S, Krautler B (2011) Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochim Biophys Acta* 1807: 977–988
- Ito H, Tanaka A (2014) Evolution of a New Chlorophyll Metabolic Pathway Driven by the Dynamic Changes in Enzyme Promiscuous Activity. *Plant Cell Physiol* 55: 593–603
- Jeffrey SW (1972) Preparation and some properties of crystalline chlorophyll c1 and c2 from marine algae. *Biochim Biophys Acta* 279: 15–33
- Jones ID, White RC, Gibbs E, Butler LS (1977) Estimation of Zinc Pheophytins, Chlorophylls, and Pheophytins in Mixtures in Diethyl Ether or 80% Acetone by Spectrophotometry and Fluorometry Chart I.
- Kazlauskas RJ (2005) Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol* 9: 195–201
- Khersonsky O, Tawfik DS (2010) Enzyme promiscuity: A mechanistic and evolutionary perspective. *Annu Rev Biochem* 79: 471–505
- Krieger-Liszkay A (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *J Exp Bot* 56: 337–346
- Li Z, Wu S, Chen J, Wang X, Gao J, Ren G, Kuai B (2017) NYEs/SGRs-mediated chlorophyll degradation is critical for detoxification during seed maturation in Arabidopsis. *Plant J* 92: 650–661
- Markwell JP, Thornber JP, Boggs RT (1979) Higher plant chloroplasts: Evidence that all the chlorophyll exists as chlorophyll—protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 1233–1235
- Martínez-Núñez M, Rodríguez-Escamilla Z, Rodríguez-Vázquez K, Pérez-Rueda E (2017) Tracing the Repertoire of Promiscuous Enzymes along the Metabolic Pathways in Archaeal

Organisms. *Life* 7: 30

- Matsuda K, Shimoda Y, Tanaka A, Ito H (2016) Chlorophyll a is a favorable substrate for *Chlamydomonas* Mg-dechelatase encoded by STAY-GREEN. *Plant Physiol Biochem* 109: 365–373
- Moretti S, Armougom F, Wallace IM, Higgins DG, Jongeneel C V., Notredame C (2007) The M-Coffee web server: A meta-method for computing multiple sequence alignments by combining alternative alignment methods. *Nucleic Acids Res* 35: 205–217
- Nelson N, Yocum CF (2006) Structure and function of photosystems I and II. *Annu Rev Plant Biol* 57: 521–565
- Noda-Garcia L, Liebermeister W, Tawfik DS (2018) Metabolite–Enzyme Coevolution: From Single Enzymes to Metabolic Pathways and Networks. *Annu Rev Biochem* 87: 187–216
- O’Brien PJ, Herschlag D (1999) Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chem Biol* 6: R91–R105
- Pandya C, Farelli JD, Dunaway-Mariano D, Allen KN (2014) Enzyme promiscuity: Engine of evolutionary innovation. *J Biol Chem* 289: 30229–30236
- Peracchi A (2018) The Limits of Enzyme Specificity and the Evolution of Metabolism. *Trends Biochem Sci* 43: 984–996
- Pruž Inská A, Tanner G, Anders I, Roca M, Hö S, Lagarias JC (2003) Chlorophyll breakdown: Pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron–sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15259–64
- Rauwerdink A, Lunzer M, Devamani T, Jones B, Mooney J, Zhang Z-J, Xu J-H, Kazlauskas RJ, Dean AM (2016) Evolution of a Catalytic Mechanism. *Mol Biol Evol* 33: 971–979
- Ren G, An K, Liao Y, Zhou X, Cao Y, Zhao H, Ge X, Kuai B (2007) Identification of a Novel Chloroplast Protein AtNYE1 Regulating Chlorophyll Degradation during Leaf Senescence

- in Arabidopsis. *Plant Physiol* 144: 1429–1441
- Rison SCG, Thornton JM (2002) Pathway evolution, structurally speaking. *Curr Opin Struct Biol* 12: 374–382
- Rodoni S, Muhlecker W, Anderl M, Krautler B, Moser D, Thomas H, Matile P, Hortensteiner S (1997) Chlorophyll Breakdown in Senescent Chloroplasts (Cleavage of Pheophorbide a in Two Enzymic Steps). *Plant Physiol* 115: 669–676
- Saga Y, Tamiaki H (2012) Demetalation of Chlorophyll Pigments. *Chem Biodivers* 9: 1659–1683
- Sakuraba Y, Kim D, Kim Y-S, Hörtensteiner S, Paek N-C (2014) Arabidopsis STAYGREEN-LIKE (SGRL) promotes abiotic stress-induced leaf yellowing during vegetative growth. *FEBS Lett* 588: 3830–3837
- Sakuraba Y, Schelbert S, Park S-Y, Han S-H, Lee B-D, Line C, André B, Kessler F, Hö S, Paek N-C, et al (2012) Stay-green and chlorophyll catabolic enzymes interact at light-harvesting complex II for chlorophyll detoxification during leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Cell* 24: 507–518
- Sato T, Shimoda Y, Matsuda K, Tanaka A, Ito H (2018) Mg-dechelation of chlorophyll a by Stay-Green activates chlorophyll b degradation through expressing Non-Yellow Coloring 1 in Arabidopsis thaliana. *J Plant Physiol* 222: 94–102
- Sato Y, Morita R, Nishimura M, Yamaguchi H, Kusaba M (2007) Mendel's green cotyledon gene encodes a positive regulator of the chlorophyll-degrading pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 14169–14174
- Schelbert S, Aubry S, Burla B, Agne B, Kessler F, Krupinska K, Hörtensteiner S (2009) Pheophytin pheophorbide hydrolase (pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during Leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Cell* 21: 767–785
- Shieh J, Miller GW, Psenak M (1978) Properties of

- s-adenosyl-L-methionine-magnesium-protoporphyrin IX methyltransferase from barley. *Plant Cell Physiol* 19: 1051–1059
- Shimoda Y, Ito H, Tanaka A (2016) Arabidopsis *STAY-GREEN*, Mendel's Green Cotyledon Gene, Encodes Magnesium-Dechelataase. *Plant Cell* 28: 2147–2160
- Shimoda Y, Ito H, Tanaka A (2012) Conversion of chlorophyll b to chlorophyll a precedes magnesium dechelation for protection against necrosis in Arabidopsis. *Plant J* 72: 501–511
- Shioi Y, Watanabe K, Takamiya K -i. (1996) Enzymatic Conversion of Pheophorbide a to the Precursor of Pyropheophorbide a in Leaves of *Chenopodium album*. *Plant Cell Physiol* 37: 1143–1149
- Siaut M, Cuiné S, Cagnon C, Fessler B, Nguyen M, Carrier P, Beyly A, Beisson F, Triantaphyllides C, Li-Beisson Y, et al (2011) Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnol* 11: 1–15
- Takabayashi A, Kurihara K, Kuwano M, Kasahara Y, Tanaka R, Tanaka A (2011) The oligomeric states of the photosystems and the light-harvesting complexes in the Chl b-less mutant. *Plant Cell Physiol* 52: 2103–2114
- Tanaka R, Hirashima M, Satoh S, Tanaka A (2003) The Arabidopsis-accelerated cell death gene ACD1 is involved in oxygenation of pheophorbide a: inhibition of the pheophorbide a oxygenase activity does not lead to the “stay-green” phenotype in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 44: 1266–1274
- Uchida T, Dojun N, Sekine Y, Ishimori K (2017) Heme Proximal Hydrogen Bonding between His170 and Asp132 Plays an Essential Role in the Heme Degradation Reaction of HutZ from *Vibrio cholerae*. *Biochemistry* 56: 2723–2734
- Vicentini F, Hortensteiner S, Schellenberg M, Thomas H, Matile P (1995) Chlorophyll

- breakdown in senescent leaves identification of the biochemical lesion in a stay-green genotype of *Festuca pratensis* Huds. *New Phytol* 129: 247–252
- Villiers BRMM, Hollfelder F (2009) Mapping the limits of substrate specificity of the adenylation domain of TycA. *ChemBioChem* 10: 671–682
- Warshel A (1981) Calculations of Enzymatic Reactions: Calculations of pKa, Proton Transfer Reactions, and General Acid Catalysis Reactions in Enzymes. *Biochemistry* 20: 3167–3177
- Wittig I, Braun HP, Schagger H (2006) Blue native PAGE. *Nat Protoc* 1: 418–428
- Yamada H, Imoto T, Fujita K, Okazaki K, Motomura M (1981) Selective Modification of Aspartic Acid-101 in Lysozyme by Carbodiimide Reaction*. *Biochemistry* 20: 4836–4842

Table 1. 系統解析に使用したSGRとその類似タンパク質

Taxon	Host organism	Database	Accession No.
Green plant	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phytozome	At4G22920.1
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phytozome	At4G11910.1
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phytozome	At1G44000.1
	<i>Oryza sativa</i>	Phytozome	LOC_Os09g36200.1
	<i>Oryza sativa</i>	Phytozome	LOC_Os04g59610.2
	<i>Physcomitrella patens</i>	Phytozome	Pp3c17_23030V3.1
	<i>Physcomitrella patens</i>	Phytozome	Pp3c3_28140V3.1
	<i>Physcomitrella patens</i>	Phytozome	Pp3c20_6290V3.1
	<i>Physcomitrella patens</i>	Phytozome	Pp3c8_17510V3.1
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Phytozome	Cre12.g487500
	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i> C-169	NCBI	XP_005650112.1
	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545	NCBI	XP_003060977.1
	<i>Ostreococcus tauri</i>	NCBI	XP_022840207.1
	<i>Chlorella variabilis</i>	NCBI	XP_005850408.1
Glaucophyta	<i>Cyanophora paradoxa</i>	realDB	Cyanophora_paradoxa-WLZP-2005695
	<i>Gloeochaete wittrockiana</i>	realDB	Gloeochaete_wittrockiana-PQED-2051318
	<i>Glaucocystis</i> cf. <i>nostochinearum</i>	realDB	Glaucocystis_cf._nostochinearum-POOW-2011694
	<i>Cyanoptycha gloeocystis</i>	realDB	Cyanoptycha_gloeocystis-JKHA-2001686
Archaea	miscellaneous Crenarchaeota group-1 archaeon SG8-32-1	NCBI	KON32503.1
	<i>Candidatus Thorarchaeota</i> archaeon SMTZ-45	NCBI	KXH70069.1
	miscellaneous Crenarchaeota group-6 archaeon AD8-1	NCBI	KON32872.1
Bacteria	<i>Anaerolineae</i> bacterium SM23_63	NCBI	KPK94580.1
	<i>Anaerolineales</i> bacterium	NCBI	WP_116781458.1
	<i>Alicyclobacillus ferrooxydans</i>	NCBI	KPV40529.1
	<i>Clostridium novyi</i>	NCBI	WP_039245490.1
	<i>Bacillus aquimaris</i> sp. SAMM	NCBI	WP_071617569.1
	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	NCBI	WP_019379967.1
	<i>Sporosarcina globispora</i>	NCBI	WP_053435952.1
	<i>Bacillus selenatarsenatis</i>	NCBI	WP_041965262.1
	<i>Mycobacteroides abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	NCBI	SHT39353.1
	<i>Clostridium botulinum</i> sp. CDC54075	NCBI	WP_024931542.1
	<i>Bacillus wudalianchiensis</i>	NCBI	WP_065409936.1
	<i>Bacillus aquimaris</i> sp. JM7	NCBI	WP_044336981.1
	<i>Gottschalkia acidurici</i>	NCBI	WP_041701757.1
	<i>Bacillus megaterium</i>	NCBI	WP_013082933.1
	<i>Bacillus timonensis</i>	NCBI	WP_010677389.1
	<i>Clostridium</i> sp. HMP27	NCBI	KGK89931.1
	<i>Clostridium sporogenes</i>	NCBI	WP_058008982.1
	<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	NCBI	WP_083341124.1
	<i>Clostridium</i> sp. DMHC 10	NCBI	WP_084757076.1
	<i>Bacillus massiliogorillae</i>	NCBI	WP_042348482.1
	<i>Clostridium botulinum</i> sp. A2 117	NCBI	WP_061317852.1
	<i>Anoxybacillus tepidamans</i>	NCBI	WP_027408343.1
	<i>Thalassobacillus cyri</i>	NCBI	WP_093042251.1
	<i>Clostridium botulinum</i> sp. BKT015925	NCBI	WP_013726199.1
	<i>Anoxybacillus</i> sp. UARK-01	NCBI	WP_080861000.1
	<i>Anaerotignum neopropionicum</i>	NCBI	WP_066089690.1
	<i>Bacillus solani</i>	NCBI	WP_056684568.1
	<i>Intestinibacter bartlettii</i>	NCBI	WP_082421703.1
	<i>Clostridium botulinum</i> sp. CDC41370	NCBI	WP_045890658.1
	<i>Clostridium baratii</i>	NCBI	WP_039311721.1
	<i>Bacillus campisalis</i>	NCBI	WP_046522531.1
	<i>Bacillus flexus</i>	NCBI	WP_025749656.1
	<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>	NCBI	WP_040373082.1
	<i>Anaeromicrobium sediminis</i>	NCBI	WP_095131604.1
	<i>Clostridium</i> sp. Marseille-P2414	NCBI	WP_084766812.1
	<i>Paenibacillus sordellii</i>	NCBI	WP_055333840.1
	<i>Romboutsia</i> sp. MT17	NCBI	WP_092926206.1
	<i>Peptoniphilus</i> sp. HMSC075B08	NCBI	WP_070700731.1
	uncultured <i>Clostridium</i> sp.	NCBI	SCJ05302.1
	<i>Peptoniphilus phoceensis</i>	NCBI	WP_062552496.1
	<i>Vibrio harveyi</i>	NCBI	WP_050912742.1
	<i>Bacteroides xylanolyticus</i>	NCBI	WP_104438939.1
	<i>Acinetobacter</i> sp. RIT592	NCBI	RDC50442.1
	<i>Clostridium bifermentans</i>	NCBI	WP_021432481.1

番号が付けられたSGR類似タンパク質を代表とし、以降の生化学実験に使用した。

番号が若いほど、シロイヌナズナのSGR1 (At4G22920.1) に対して高いホモロジーを持つことを表している。

灰色で塗りつぶされたものはアミノ酸配列のアライメントから、アミノ酸残基の保存性が異なっていたため、以降の解析からは除外した。

Table 2. SGR類似タンパク質を持つバクテリアとアーキアの宿主間の系統解析に使用した16SrRNA配列

Taxon	Host organism	Database	Accession No.	Discription	
Archaea	miscellaneous Crenarchaeota group-1 archaeon SG8-32-1			16srRNAの報告なし	
	<i>Candidatus Thorarchaeota</i> archaeon SMTZ-45			16srRNAの報告なし	
	miscellaneous Crenarchaeota group-6 archaeon AD8-1			16srRNAの配列が短いため除外	
Bacteria	<i>Anaerolineae</i> bacterium SM23_63			16srRNAの配列が短いため除外	*1
	<i>Anaerolineales</i> bacterium			16srRNAの報告なし	
	<i>Alicyclobacillus ferrooxydans</i>	Integrated Microbial Genomes	2714431926		
	<i>Clostridium novyi</i>	Integrated Microbial Genomes	2823501834		
	<i>Bacillus aquimaris</i> sp. SAMM	Integrated Microbial Genomes	2813992354		*2
	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	Integrated Microbial Genomes	2814727561		
	<i>Sporosarcina globispora</i>	Integrated Microbial Genomes	2648000896		
	<i>Bacillus selenatarsenatis</i>	Integrated Microbial Genomes	2646448541		
	<i>Mycobacteroides abscessus</i> subsp. <i>Abscessus</i>	Integrated Microbial Genomes	2801926781		
	<i>Clostridium botulinum</i> sp. CDC54075	Integrated Microbial Genomes	2683194727		
	<i>Bacillus wudalianchiensis</i>			16srRNAの報告なし	
	<i>Bacillus aquimaris</i> sp. JM7			16srRNAの配列が短いため除外	
	<i>Gottschalkia acidurici</i>	Integrated Microbial Genomes	2517499933		
	<i>Bacillus megaterium</i>	Integrated Microbial Genomes	646756272		
	<i>Bacillus timonensis</i>	Integrated Microbial Genomes	2547532779		
	<i>Clostridium</i> sp. HMP27	Integrated Microbial Genomes	2632614743		
	<i>Clostridium sporogenes</i>	Integrated Microbial Genomes	2662277092		
	<i>Clostridium</i> sp. DMHC 10			16srRNAの報告なし	
	<i>Bacillus massiliogorillae</i>	Integrated Microbial Genomes	2600929525		
	<i>Clostridium botulinum</i> sp. A2 117	Integrated Microbial Genomes	2695789357		*3
	<i>Anoxybacillus tepidamans</i>			16srRNAの配列が短いため除外	
	<i>Thalassobacillus cyri</i>	Integrated Microbial Genomes	2676280493		
	<i>Clostridium botulinum</i> sp. BKT015925	Integrated Microbial Genomes	650808756		
	<i>Anoxybacillus</i> sp. UARK-01	Integrated Microbial Genomes	2852099799		
	<i>Anaerotignum neopropionicum</i>	Integrated Microbial Genomes	2729514297		
	<i>Bacillus solani</i>	Integrated Microbial Genomes	2648622037		*4
	<i>Intestinibacter bartlettii</i>	Integrated Microbial Genomes	2813256678		
	<i>Clostridium botulinum</i> sp. CDC41370			16srRNAの報告なし	
	<i>Clostridium baratii</i>	Integrated Microbial Genomes	2646836096		
	<i>Bacillus campisalis</i>			16srRNAの配列が短いため除外	
	<i>Bacillus flexus</i>	Integrated Microbial Genomes	2732613272		
	<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>			16srRNAの配列が短いため除外	
	<i>Anaeromicrobium sediminis</i>			16srRNAの報告なし	
	<i>Paeniclostridium sordellii</i>	Integrated Microbial Genomes	2693740364		
	<i>Romboutsia</i> sp. MT17	Integrated Microbial Genomes	2752974952		*5
	<i>Peptoniphilus</i> sp. HMSC075B08			16srRNAの報告なし	
	uncultured <i>Clostridium</i> sp.			16srRNAの報告なし	
	<i>Peptoniphilus phoceensis</i>	Integrated Microbial Genomes	2776379436		*6
	<i>Vibrio harveyi</i>	Integrated Microbial Genomes	2652727948		
	<i>Bacteroides xylanolyticus</i>	Integrated Microbial Genomes	2739450966		
	<i>Acinetobacter</i> sp. RIT592			16srRNAの報告なし	
	<i>Clostridium bifermentans</i>	Integrated Microbial Genomes	2543314837		

Table 3. 緑色植物SGRとバクテリアSGRホモログの酵素反応速度論的パラメーター

Enzyme	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Protein expression	Reference
<i>Chlamydomonas</i> SGR		8.44		<i>E. coli</i>	Matsuda et al., 2016
AtSGRL	0.156 ± 0.0674	33.6 ± 13.4	4.64×10^{-3}	<i>E. coli</i>	This study
AbSGR homolog	2.87 ± 0.734	91.3 ± 35.6	31.4×10^{-3}	<i>E. coli</i>	This study
CbSGR homolog	1.74 ± 0.212	20.6 ± 6.75	84.5×10^{-3}	<i>E. coli</i>	This study
BaSGR homolog	11.4 ± 2.97	28.9 ± 13.7	394×10^{-3}	<i>E. coli</i>	This study

Table 4. 緑色植物SGRとバクテリアSGRホモログの基質特異性

Reagents or Enzymes	Pigments and final concentrations								Reference
	Chlorophyll <i>a</i>	Chlorophyllide <i>a</i>	Chlorophyll <i>b</i>	Proto- chlorophyll <i>a</i>	Chlorophyll <i>C</i> ₁ + <i>C</i> ₂	Zn-chlorophyll <i>a</i>	Bacterio- chlorophyll <i>a</i>	Hemin	
	18 μ M	18 μ M	18 μ M	18 μ M	1.2 mM	18 μ M	60 μ M	100 μ M	
Buffer	-	-	-	-	-	-	-	-	This study
1 M HCl	+	+	+	+	+	+	+	-	This study
Empty vector	-	-	-	-	-	-	-	-	This study
<i>Chlamydomonas</i> SGR	+	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	Matsuda et al., 2016
AtSGR1	+	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Shimoda et al., 2016
AtSGR2	+	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Shimoda et al., 2016
AtSGRL	+	+	-	-	-	-	-	-	This study
AbSGR homolog	+	+	+	+	+	-	-	-	This study
CbSGR homolog	+	+	+	+	+	-	-	-	This study
BaSGR homolog	+	+	+	+	+	-	-	-	This study

+ : Active - : Not active n.d. : Not determined

Table 5. 緑色植物SGRとバクテリアSGRホモログの酸性アミノ酸残基とヒスチジン残基の保存性

		保存されている残基のAtSGRLにおけるアミノ酸番号				
		H105	D107	D132	D133	D186
AbSGR homolog		+	+	+	+	+
CbSGR homolog	活性あり	+	+	+	+	+
BaSGR homolog		+	+	+	+	+
BsSGR homolog		-	-	+	+	+
RSGR homolog	活性なし	+	+	-	-	+
PpSGR homolog		+	+	+	+	+

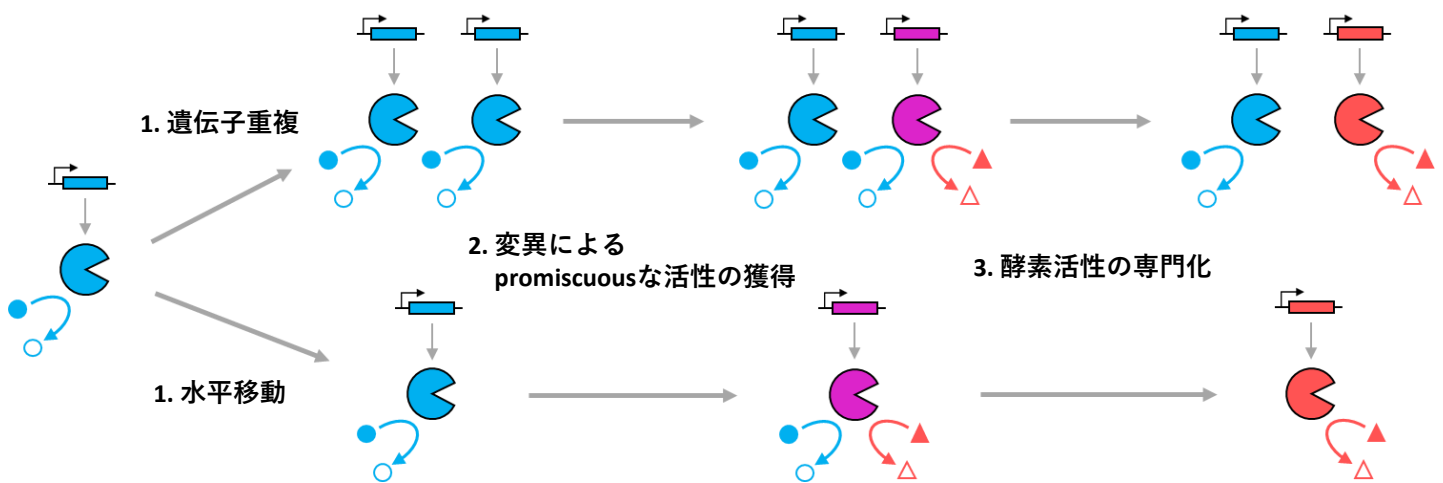
+: Conserved -: Substituted

Table 6. AtSGRL アミノ酸置換体の活性測定結果まとめ

Empty vector	AtSGRL (WT)	D107		D132		D133		D186		H105			
		D107E	D107N	D132E	D132N	D133E	D133N	D186E	D186N	H105A	H105N	H105Y	H105C
-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-

+: Active -: Not active

A. ネオファンクショナリゼーション



B. サブファンクショナリゼーション

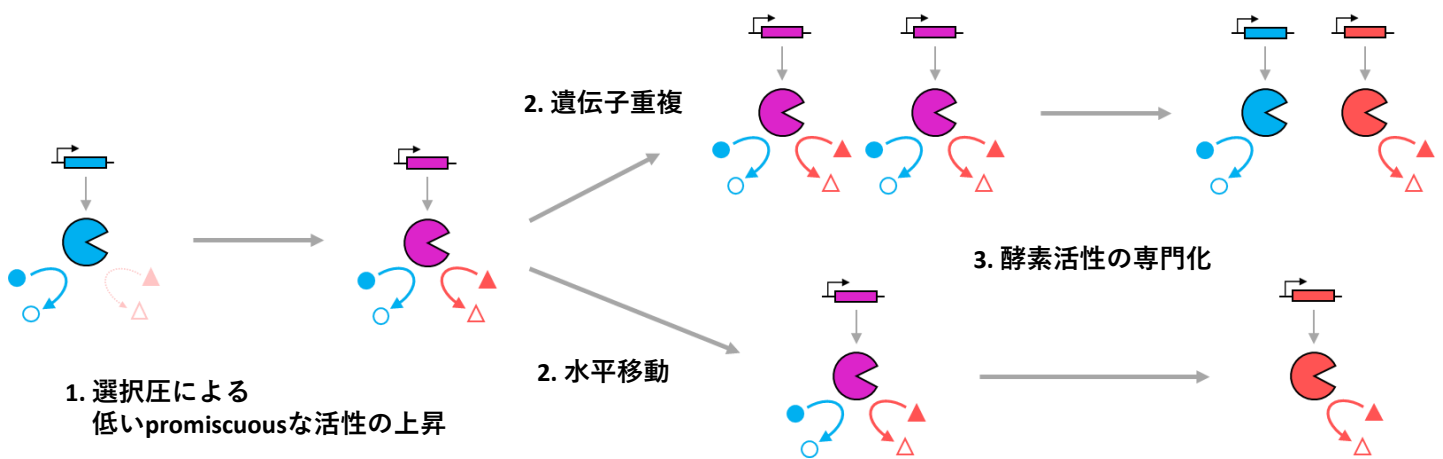
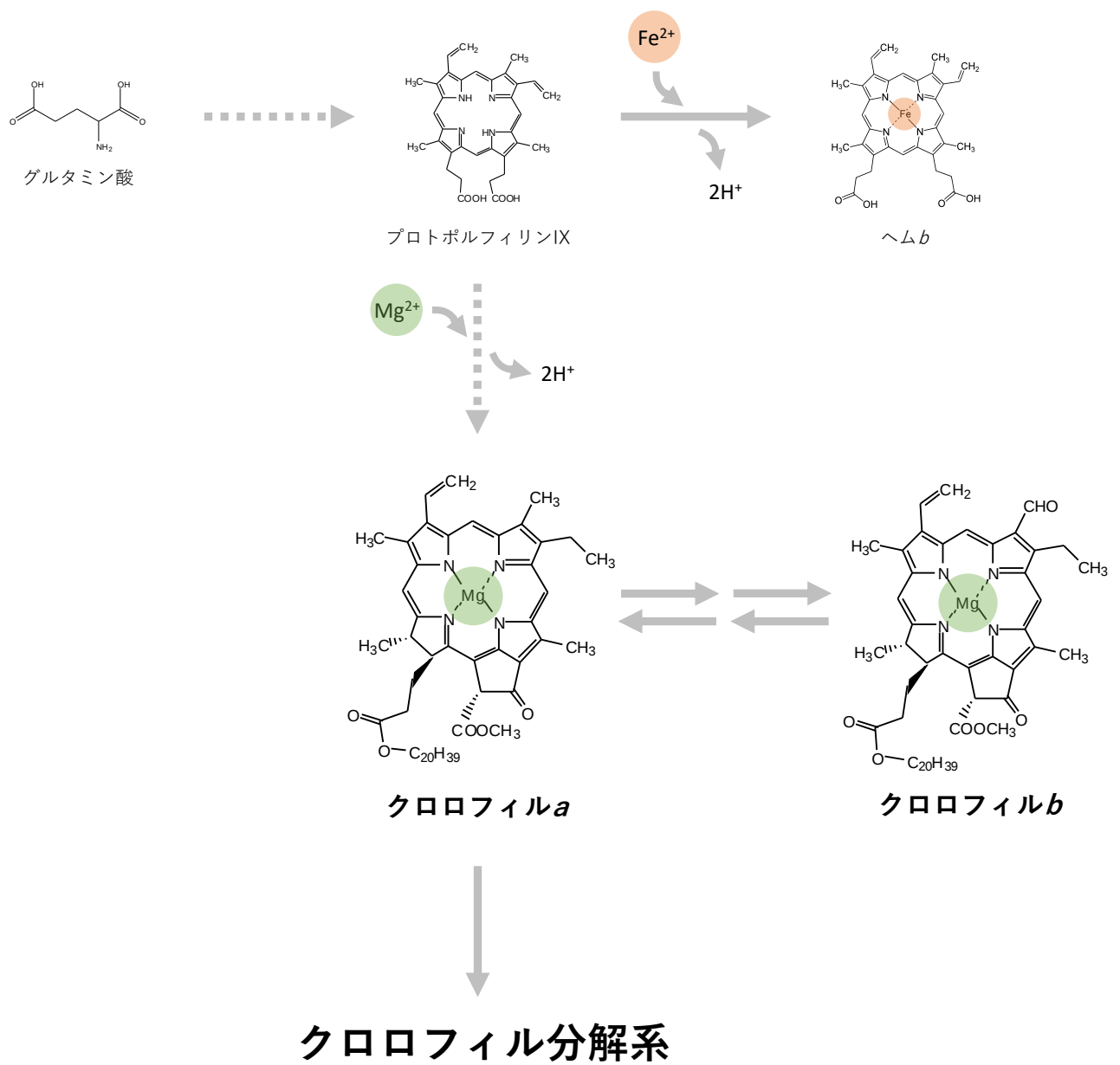


Fig. 1. 先行研究におけるpromiscuousな活性を原動力とする酵素の進化

青色で示された酵素は青色の基質に対する活性をprimaryな活性とし、赤色の基質に対する活性をpromiscuousな活性としている。紫色で示された酵素は、両方の基質に対する活性をprimaryな活性とするbi-functionalな酵素で、赤色で示された酵素は赤色の基質に対する活性をprimaryな活性としている。

先行研究では主に2つのシナリオが提唱されており、ネオファンクショナリゼーション (A) とサブファンクショナリゼーション (B) がある。これらはpromiscuousな活性の獲得のタイミングで区別されており、前者は遺伝子重複あるいは水平移動の後、後者は前である。

A. クロロフィル/ヘム合成系



B. クロロフィル分解系

クロロフィル合成系

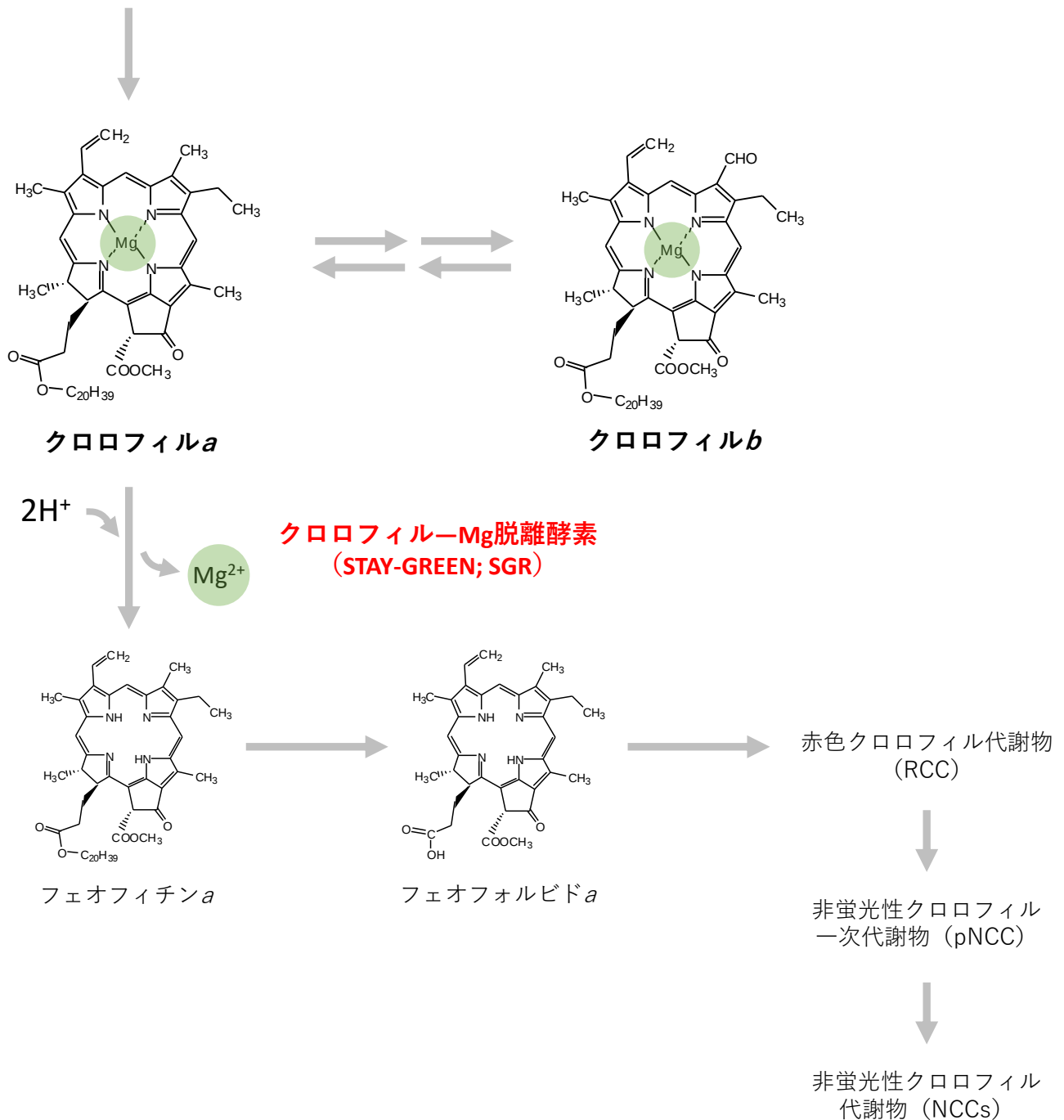


Fig. 2. 緑色植物におけるクロロフィル合成系と分解系

- A) クロロフィル合成系はグルタミン酸から始まり、9つの酵素反応を経てプロトポルフィリンIXが合成される。プロトポルフィリンIXは環状構造を持つ分子で、この中心にMg²⁺が挿入されればクロロフィルプランチへ、Fe²⁺が挿入されればヘムプランチへ進む。緑色植物ではクロロフィルaとクロロフィルbを集光アンテナ色素として利用している。
- B) 緑色植物のクロロフィル分解系は必ずクロロフィルaを経由して行われ、中心のMgが脱離することで分解系へと入る。この反応はSTAY-GREEN (SGR) という酵素により触媒される。SGRによるMg脱離後は複数の酵素反応を経て、最終的に光毒性のない分子へと変換される。

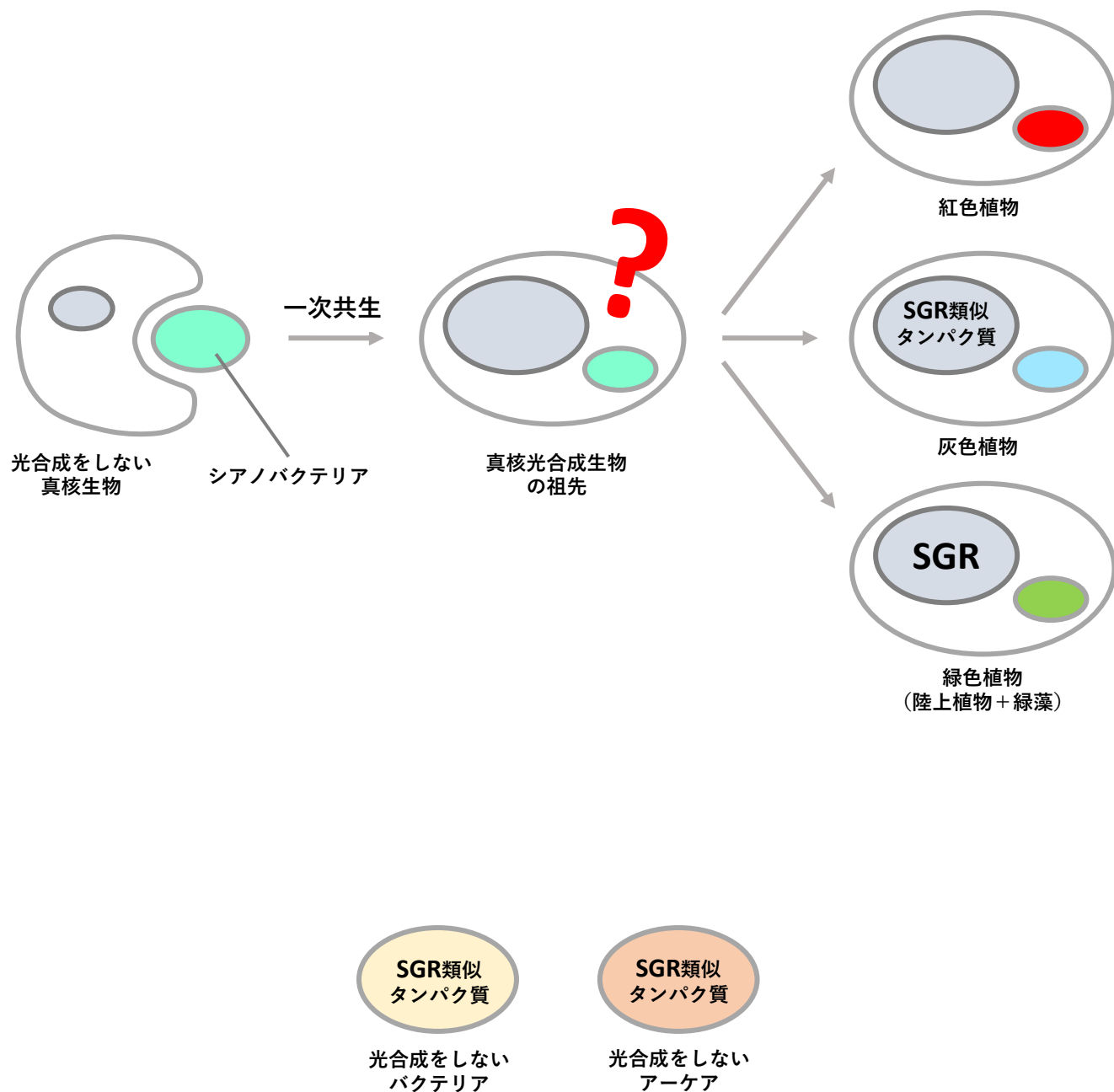


Fig. 3. SGRとSGR類似タンパク質の分布

クロロフィル-Mg脱離酵素SGRと類似するタンパク質はシアノバクテリア、シアノバクテリアを除く光合成細菌、紅藻、二次共生藻、三次共生藻およびポーリネラでは見つかっていない。一方で、光合成をせず、クロロフィル持たないバクテリアとアーキアで類似のタンパク質が発見されている。光合成生物では灰色植物でのみ類似タンパク質が存在するが、クロロフィル分解に関与しているかは現段階では不明である。

			10	20	30	40	50	60	
緑色植物SGR	AtSGRL	1	MACYIVPYH-H	PVLSHNRE	IFSHRHHHRR	CNNLLNRRIS	VPRSSAIS	D	51
	OsSGRL	1	MPIEAVAVAS-L	PMASRSAL	CFSSAAAARS	RSRSRHG	RMA	VSC	44
	AtSGR1	1	MCSLSAIMLL-P	TKLKPAYSD	KRNSSSSSSL	FFN-N			35
	OsSGR	1	MAAATSTMSL-L	PPITQQQRW	HAADSLVVL	ASRCH	N		35
	CrSGR	1	MTALASCHTC	STTPTRRGL	CGRPSTLE	SAAASRCATHYS	ASTSEC	VAKS	48
灰色植物SGR類似タンパク質	Cyanophora protein (a)	1	MYLRTPTAGDDEHTARAPP	SLITFAEDVGGTES	LDESS	AETRLCDC	T		48
アーキアSGR類似タンパク質	Cyanophora protein (b)	1							1
バクテリアSGR 類似タンパク質	Archaea protein	1							1
	Anaerolineae protein	1							1
	Clostridium protein	1							1
	Bacillus protein (a)	1							1
	Bacillus protein (b)	1							1
	Romboutsia protein	1							1
	Peptoniphilus protein	1							1
			70	80	90	100	110	120	
緑色植物SGR	AtSGRL	52	GGV-S		YNTLVSEAVRLL	VQANFDS	SKLVFELGELLE		88
	OsSGRL	45	AGA-S		DLLYSSLAAKLL	GPPTSFD	AKLIVEFAHSHGN		81
	AtSGR1	36	RRS-K		KKNQSVFVARLF	GPAIFESS	KLVLFLGVDEK		72
	OsSGR	36	SRR-R		RRCRYVVPARLF	GPAIFESS	KLVLFLGVDEK		72
	CrSGR	49	TAAARRRQPT		WTPRRGVATKAL	DPPEFK	PEKLAIVLLAAGTSS		90
灰色植物SGR類似タンパク質	Cyanophora protein (a)	49	EAGVLLAPRPVAEFVPGDAVSPMGLQNGGLTRVRALREDEPKYIHLQPSKLVFLSGIQR						108
アーキアSGR類似タンパク質	Cyanophora protein (b)	1							14
バクテリアSGR 類似タンパク質	Archaea protein	1							19
	Anaerolineae protein	1							19
	Clostridium protein	1							19
	Bacillus protein (a)	1							19
	Bacillus protein (b)	1							19
	Romboutsia protein	1							22
	Peptoniphilus protein	1							14
			130	140	150	160	170	180	
緑色植物SGR	AtSGRL	89	NKSNGGI--	ITPRRYLTHSDITANL	LTISNVINLDQLE	GGW--	YKDDVVAEW		138
	OsSGRL	82	S-SSG--	FPRAYLTHSDITANL	LAIVSDTIAADRR		LRADDVFAEW		124
	AtSGR1	73	K--HPS--	TLPRRYLTHSDITAKL	LAISQSINNSQL	GGWANRLYRDE	VVAEW		122
	OsSGR	73	K-HQHPG--	KLPRRYLTHSDITARL	LAIVSHITINRAQL	GGWYNKLRDE	VVAEW		124
	CrSGR	91	LE--	PAPPRSRKYLTHTDITEN	RLTISADYNQOOIS	SGEYTRLLE	DEVIAEW		141
灰色植物SGR類似タンパク質	Cyanophora protein (a)	109	RGRIGTTE--	MPARRYLTHSDITADLE	LSISGVAYNRAQL	RDFGTQLMRDE	LAEWCELEDP		166
アーキアSGR類似タンパク質	Cyanophora protein (b)	15	RGRIGTTD--	MPARRYLTHSDITADLE	LSISGVAYNRAQL	RDLTQLMRDE	LAEWCELEDP		73
バクテリアSGR 類似タンパク質	Archaea protein	20	EV--	P--	IHERRYLTHSDIT	GDLELITSPDYDRKOIR	GWYTRLMRDE	VVAEW	68
	Anaerolineae protein	20	DG--	P--	RYPRCYLTHSDIT	GELELITSPSYDYEQT	SGWYTRFRMRDE	VVAEW	68
	Clostridium protein	20	TE--	P--	ILGRRYLTHSDITAE	LELITSSAYAYDKINA		TRDEVLGWIGKQ	67
	Bacillus protein (a)	20	FH--	P--	IDNRRYLTHSDITGN	LSISGCHYDSPKINT		QMRDEVLAEW	64
	Bacillus protein (b)	20	FR--	P--	VDRRYLTHSDITG	ESCLISYHYDFNVIQV		EYRDEVLAEW	64
	Romboutsia protein	23	TS--	P--	IRRRRYLTHSDITN	PREVLISIPYFYNDL	LYTTS	TNLIYSQW	67
	Peptoniphilus protein	15	LE--		LKKRYLTHSDIT	GELELITVDNLD	DTMSE	EKDEVFGYWE	58
			190	200	210	220	230	240	
緑色植物SGR	AtSGRL	138	--KKVN--	DE-LRLHIHCCVSGMSLLQD	--VAAELRYHISKE	ITPLVLKAVVHGDSVMFR			191
	OsSGRL	124	--KQQQQEG--	MALHVHCFVSGANLLHG	--LAAGFRYYVSK	EDPLVLKAVVHGDAALLFA			179
	AtSGR1	122	--KKVK--	GK-MSLVHCHISGGHFLLD	--LFAKFRYFIC	KEDPLVLKAFVHGDNLLN			175
	OsSGR	124	--KKVQ--	GH-MSLVHCHISGGHVLDD	--LIAGLRYIIRK	EDPLVLKAFVHGDNLLFS			177
	CrSGR	141	--VAVGA-SG-	YALHVYCHVSGEERWL	--APLLRNYIERRM	ELVDITVYADROLLO			194
灰色植物SGR類似タンパク質	Cyanophora protein (a)	167	DGRAA--	GE-ASLRVHVQVVGGLPCLVPGTLPL	--LRYTIKREIPQVFEAIRQGD	TAFLD			222
アーキアSGR類似タンパク質	Cyanophora protein (b)	74	DGRAA--	GG-VSLRVHVQVVGGLPCLVPGTLPL	--LRXTIKREIPQVFEAIRQGD	DAFLD			130
バクテリアSGR 類似タンパク質	Archaea protein	68	--KNDT--	EG-PTLHVYCEVVRG	--L--	GSSSEFESVRRER	GLVLETRFRGDRKLFE		117
	Anaerolineae protein	68	--EMDE--	ED-MALHVHVHVGGLLIL	--GSAKWRDKIERQ	EMPLVLEAFRYGDRLEVK			119
	Clostridium protein	67	--	KN-YLFHVYLHIDGNN	--P--	IVTGVRNHIERLE	PLAKAIRYVDRKEFS		113
	Bacillus protein (a)	64	--RREQ--	GQ-YTLCGMVYVSGGEFDE	--KLSQVRFMIEKKE	LPALTAIVNGDGFFFT			116
	Bacillus protein (b)	64	--IPQM--	GQ-YVLSGKIFISDESFEDE	--KYAQIRFLIQRE	ARQALAGMIYGDRTFFT			116
	Romboutsia protein	67	--YFIY--	GDRYQITFAVFVGD	--YPY--	DVAKYRYEKELE	TPMSISAVANGDKSLE		118
	Peptoniphilus protein	58	--D--		KYFVFQCFELDNENSKF	--STKARFIIIEKE	ELQNSLLAIVQAEKRLNF		104

		250	260	270	280	290	300
緑色植物SGR	AtSGRL	192	ENPEIMDAYVVFVFSST	-PKYNRIECWGLKDAAGKQQGNHGG	235		
	OsSGRL	180	EQPEILEAKVVFVFSSSNAKYNRIECWGLREAAANAETTHKRHA	224			
	AtSGR1	176	NYPEIQEALVVFVFSNV	-NEFNKVECGPLWEAVSPDGHKTETLPEA	222		
	OsSGR	178	RHPETEEATVVFVFSNL	-PRFNKVECGPLRDAGAPPEEDDAVAAAA	224		
	CrSGR	195	ROPEIARACVVFVFSQSSV	-RELDIVVWGLLGERSTWPKGPTSILLRTIYATIGWPPYLE	253		
灰色植物SGR類似タンパク質	Cyanophora protein (a)	223	DSPLIRDAFIVVFVFSST	-DEFDRVRYVGLTDDYALS	258		
アーキアSGR類似タンパク質	Cyanophora protein (b)	131	DSPLIRDAFIVVFVFSQD	-EEFDRIRYVGLT	160		
バクテリアSGR 類似タンパク質	Archaea protein	118	KKSKLQCARIVVFETARK	-FEESKVEVWGLMKDYT	151		
	Anaerolineae protein	120	KYPEMOCAPFIVVFETAPN	-PKFDLVEVWGLLRDYK	153		
	Clostridium protein	114	AHSKIDNSFIVVFVFSY	-PSFNRTKRGTFSDYK	147		
	Bacillus protein (a)	117	YYPWILDAPFIVVFVFSV	-EQFNQVLYEGTFRQYLL	155		
	Bacillus protein (b)	117	NYPWILDSPFIVVFVFSNY	-KEYNKIIVYETFRQYLL	158		
	Romboutsia protein	119	ANPSLYEAPFIVVFVFSY	-QFNKIVPKFKIDYIDDKVDVSV	160		
	Peptoniphilus protein	105	SDTDIVYKEI	-YKSKD-EKFNIRLVKTLRDYVYKDDRSYV	143		
		310	320	330	340	350	360
緑色植物SGR	AtSGRL	235					235
	OsSGRL	224					224
	AtSGR1	222					222
	OsSGR	224		-AE-	-EA-		228
	CrSGR	254	ALPADLSIDLPEVDRDLEEA	VRWQQOQROG	PROEGLROEGROEAROEGROEGROEAROE	313	
灰色植物SGR類似タンパク質	Cyanophora protein (a)	258					258
アーキアSGR類似タンパク質	Cyanophora protein (b)	160					160
	Archaea protein	151					151
バクテリアSGR 類似タンパク質	Anaerolineae protein	153					153
	Clostridium protein	147					147
	Bacillus protein (a)	155					155
	Bacillus protein (b)	158					158
	Romboutsia protein	160					160
	Peptoniphilus protein	143					143
		370	380	390	400	410	420
緑色植物SGR	AtSGRL	235				FLSSTTSR	243
	OsSGRL	224				LEQLHNATKGTTRRR	240
	AtSGR1	222					222
	OsSGR	228			-AAEQMPAA-	-GEWPR-	241
	CrSGR	314	GRQEGROEAWQEGWQDQWQEGROEVEQLLRQERRKAERG	REARERDREAEERAREPSAA	373		
灰色植物SGR類似タンパク質	Cyanophora protein (a)	258					258
アーキアSGR類似タンパク質	Cyanophora protein (b)	160					160
	Archaea protein	151					151
バクテリアSGR 類似タンパク質	Anaerolineae protein	153					153
	Clostridium protein	147					147
	Bacillus protein (a)	155					155
	Bacillus protein (b)	158					158
	Romboutsia protein	160					160
	Peptoniphilus protein	143				-EYRRG-	148
		430	440	450	460	470	480
緑色植物SGR	AtSGRL	243					243
	OsSGRL	240					240
	AtSGR1	222					222
	OsSGR	241					241
	CrSGR	374	VAGTQALARAFAAVPVVFEEDQQQPQGGVPGAAPDARQEW	ORQAASHGAAEFVQAAAPAP	433		
灰色植物SGR類似タンパク質	Cyanophora protein (a)	258					258
アーキアSGR類似タンパク質	Cyanophora protein (b)	160					160
	Archaea protein	151					151
バクテリアSGR 類似タンパク質	Anaerolineae protein	153					153
	Clostridium protein	147					147
	Bacillus protein (a)	155					155
	Bacillus protein (b)	158					158
	Romboutsia protein	160					160
	Peptoniphilus protein	148					148

			490	500	510	520	530	540	
緑色植物SGR	AtSGRL	243	-----	-----	-----	-----	KLIRH	SI	-----FHTLFT
	OsSGRL	240	-----	-----	-----R-----	-----	KWSSP	DAI	-----FSALLA
	AtSGRL	222	-----	-----	-----R-----	-----	CADEC	SCCFPTV	SSIPWS
	OsSGR	241	-----	-----	-----R-----	-----	CPGQ	CDCCFFPY	SLIPWP
	CrSGR	434	PTGSYP	HNGAPASE	STPCSAGT	SAGEEAGRWPC	RSSTNGAGVLR	SGTSSSSSS	SGNGLL
	Cyanophora protein (a)	258	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
灰色植物SGR類似タンパク質	Cyanophora protein (b)	160	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
アーキアSGR類似タンパク質	Archaea protein	151	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
バクテリアSGR 類似タンパク質	Anaerolineae protein	153	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Clostridium protein	147	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Bacillus protein (a)	155	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Bacillus protein (b)	158	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Romboutsia protein	160	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Peptoniphilus protein	148	-----	-----	-----F-----	-----	DYKSLK	-----	N-----
			550	560	570	580	590	600	
緑色植物SGR	AtSGRL	258	F	---	L	-----	-----	-----	-----
	OsSGRL	256	L	---	L	-----	-----	-----	-----
	AtSGRL	242	HSLS	NEG	V	-----	-----	-----	NGY
	OsSGR	261	H	---	QHD	V	-----	-----	AAA
	CrSGR	494	FAASQ	APVNGY	SLNGSA	AGRSSLEAGGL	NGVAPGAGAE	ARAYERRA	APT
	Cyanophora protein (a)	258	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
灰色植物SGR類似タンパク質	Cyanophora protein (b)	160	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
アーキアSGR類似タンパク質	Archaea protein	151	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
バクテリアSGR 類似タンパク質	Anaerolineae protein	153	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Clostridium protein	147	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Bacillus protein (a)	155	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Bacillus protein (b)	158	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Romboutsia protein	160	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Peptoniphilus protein	156	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
			610	620	630	640	650	660	
緑色植物SGR	AtSGRL	259	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	OsSGRL	257	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	AtSGRL	253	SGT	-----	Q	-----	TEGI	ATP	-----
	OsSGR	269	DGQ	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	CrSGR	554	DGQPC	SGGPGC	SCDAAD	QAPEV	PGRAT	PAVAS	AGSFVGL
	Cyanophora protein (a)	258	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
灰色植物SGR類似タンパク質	Cyanophora protein (b)	160	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
アーキアSGR類似タンパク質	Archaea protein	151	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
バクテリアSGR 類似タンパク質	Anaerolineae protein	153	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Clostridium protein	147	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Bacillus protein (a)	155	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Bacillus protein (b)	158	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Romboutsia protein	160	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Peptoniphilus protein	156	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
			259	-----	L	260			
緑色植物SGR	AtSGRL	259	-----	-----	L	260			
	OsSGRL	257	-----	-----	L	258			
	AtSGRL	263	---	NPE	KL	268			
	OsSGR	271	---	PQ	Q	274			
	CrSGR	614	RAVAR	SSAS	622				
	Cyanophora protein (a)	258	-----	-----	A	259			
灰色植物SGR類似タンパク質	Cyanophora protein (b)	160	-----	-----	160				
アーキアSGR類似タンパク質	Archaea protein	151	-----	-----	151				
バクテリアSGR 類似タンパク質	Anaerolineae protein	153	-----	-----	153				
	Clostridium protein	147	-----	-----	T	148			
	Bacillus protein (a)	155	-----	-----	A	156			
	Bacillus protein (b)	158	-----	-----	T	159			
	Romboutsia protein	160	-----	-----	K	161			
	Peptoniphilus protein	156	-----	-----	I	157			

Fig. 4. SGRとSGR類似タンパク質のアミノ酸配列のアライメント

アライメントはTable 1中のSGRとその類似のタンパク質のアミノ酸配列を用いて作成している (AtSGRL: AT1G44000.1、OsSGRL: LOC_Os04g59610.2、AtSGRL1: AT4G22920、OsSGR: LOC_Os09g36200.1、CrSGR: Cre12.g487500、Cyanophora protein (a): Cyanophora_paradoxa-WLZP-2005695、Archaea protein: KXH70069.1、Anaerolineae protein: KPK94580.1、Clostridium protein: WP_061317852.1、Bacillus protein (a): WP_071617569.1、Bacillus protein (b): WP_056684568.1、Romboutsia protein: WP_092926206.1、Peptoniphilus protein: WP_062552496.1)。ただし、Cyanophora protein (a)のN末端配列が欠けていたため、それを補うためにTable 1に含まれていない別のデータベース (Alga-PrAS) から同種の類似タンパク質 (Cyanophora protein (b): Cyanophora_30639)を追加した。アライメントはM-Coffeeにより作成され、アミノ酸残基の保存性が90%以上の部分は塗りつぶしされている。

ピンクと赤色の矢印で示された残基はそれぞれ触媒に関与すると推測されたヒスチジン残基と酸性アミノ酸残基を表している。第2部ではこれらのアミノ酸置換を行い、触媒に関与するかを調べている。

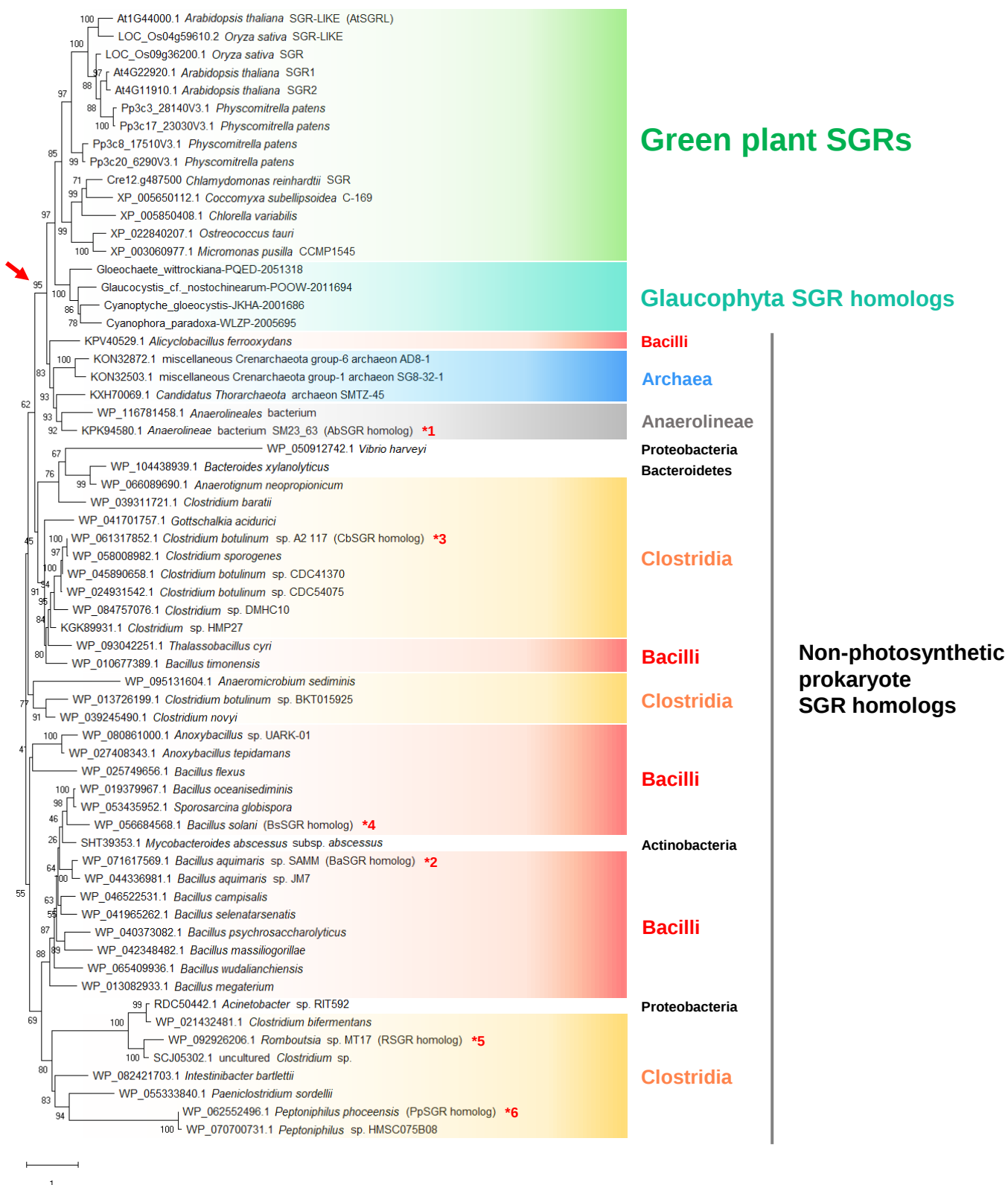


Fig. 5. SGRとSGR類似タンパク質の最尤法系統樹

分岐点における数値は1000回反復により得られたブートストラップ値である。赤矢印で示した位置が真核光合成生物と光合成をしないバクテリアとアーキアの分岐点である。番号が付けられたSGR類似タンパク質を代表とし、以降の生化学実験に使用した。番号が若いほど、シロイヌナズナのSGR1 (At4G22920.1) に対して高いホモロジーを持つことを表している。

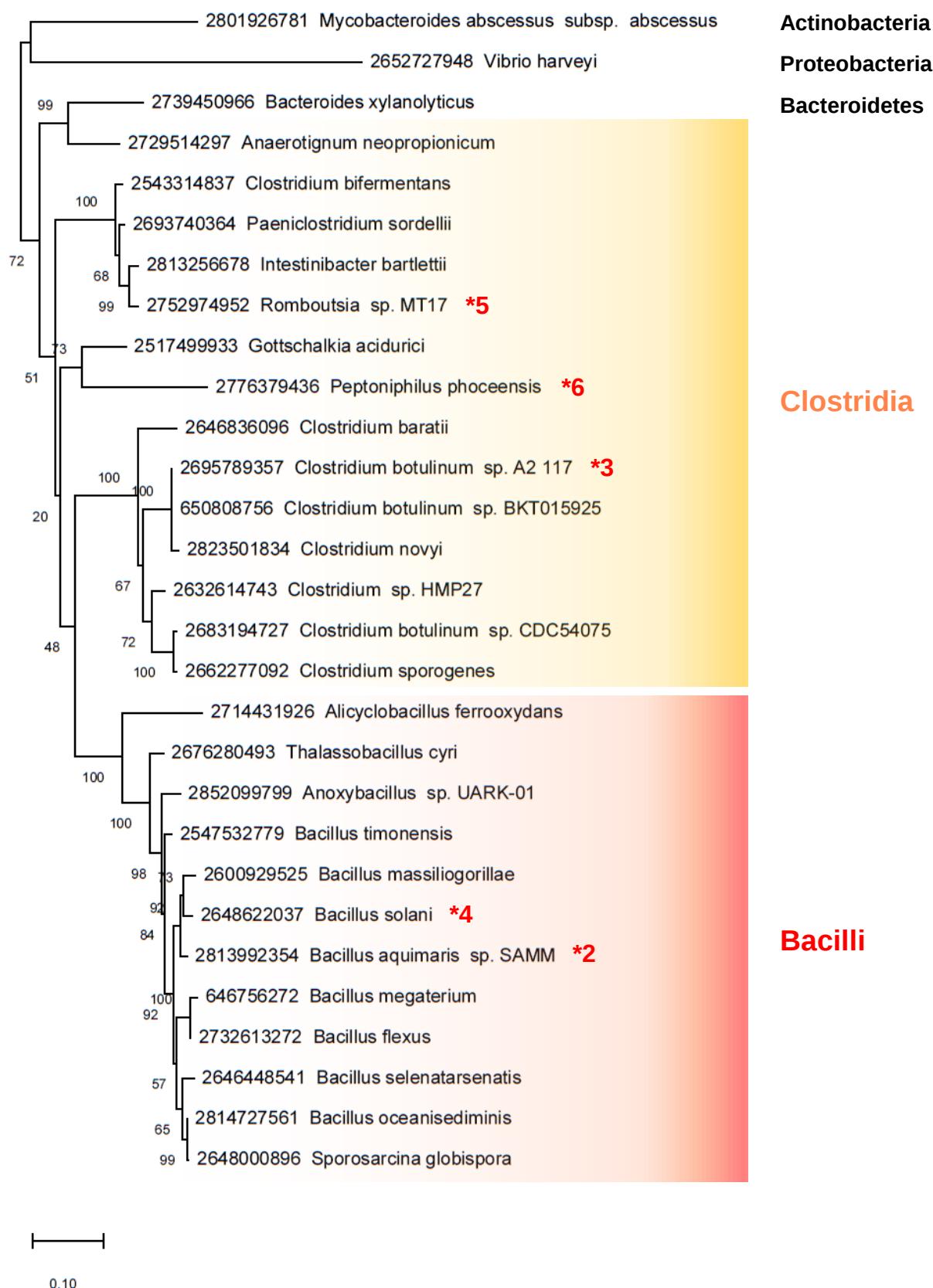
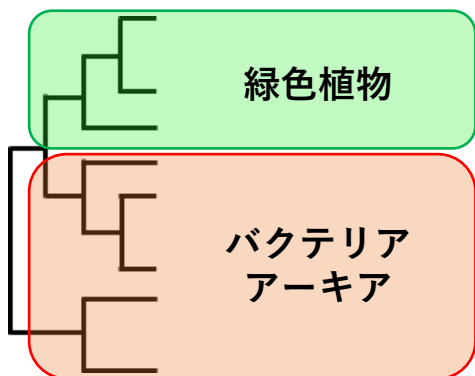


Fig. 6. 16SrRNA配列に基づくSGRホモログを持つ宿主生物の最尤法系統樹

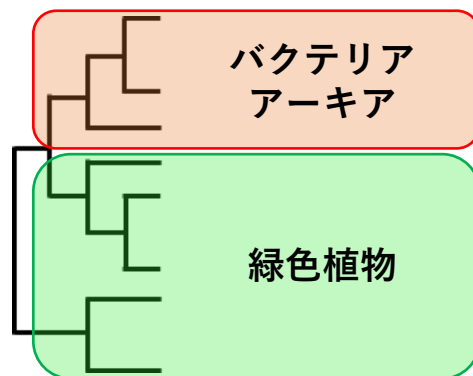
分岐点における数値は1000回反復により得られたブートストラップ値である。番号が付けられた宿主生物が持つSGRホモログを以降の生化学実験に使用した。若い番号が付けられた宿主生物ほど、シロイヌナズナのSGR1 (At4G22920.1) に対して高いホモロジーを持つSGRホモログを有する。

A



バクテリア
アーキア $\xrightarrow{\text{水平移動}}$ 緑色植物

B

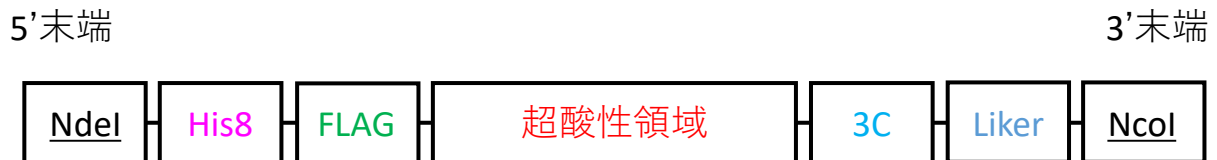


緑色植物 $\xrightarrow{\text{水平移動}}$ バクテリア
アーキア

Fig. 7. 想定される系統樹の形と示唆される水平移動の方向

- A) バクテリアとアーキアのクレードから緑色植物のクレードが分岐するパターン
 B) 緑色植物のクレードからバクテリアとアーキアのクレードが分岐するパターン

A. 人工合成したFATTタグの構成



B. 翻訳合成されるFATTタグのアミノ酸配列

N末端

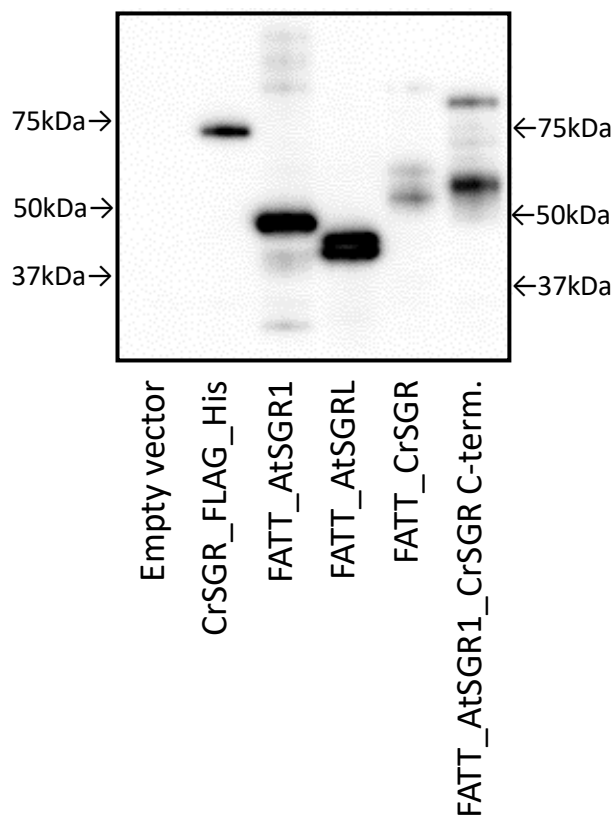
MGHHHHHHHHDYKDDDDVEAEESDNVDSADA
 EEDDSDVWWGGADTDYADGSEDKVVEVAEEEE
 EVAEVEEEEEADDDDEDDGDEVEEEAEPPYE
 EATERTTSIATTTTTTTESVEEVLDVLFQGP
 HSGGQGPW

C末端

Fig. 8. FATTタグの構造と配列

- A) 人工合成したFATTタグDNA断片の構成を示している。ライゲーション反応によるクローニングのため、DNA断片の5'末端にはNdeI、3'末端にはNcoIの制限酵素認識サイトが用意されている。コドンは大腸菌での発現用に最適化されている。
- B) 大腸菌の発現系で合成されるFATTタグのアミノ酸配列を示している。HisタグとFLAGタグによる精製が可能であり、目的タンパク質からのタグの除去には3Cプロテアーゼを使用できるようにデザインされている。

A. 大腸菌溶解液



B. 可溶性画分

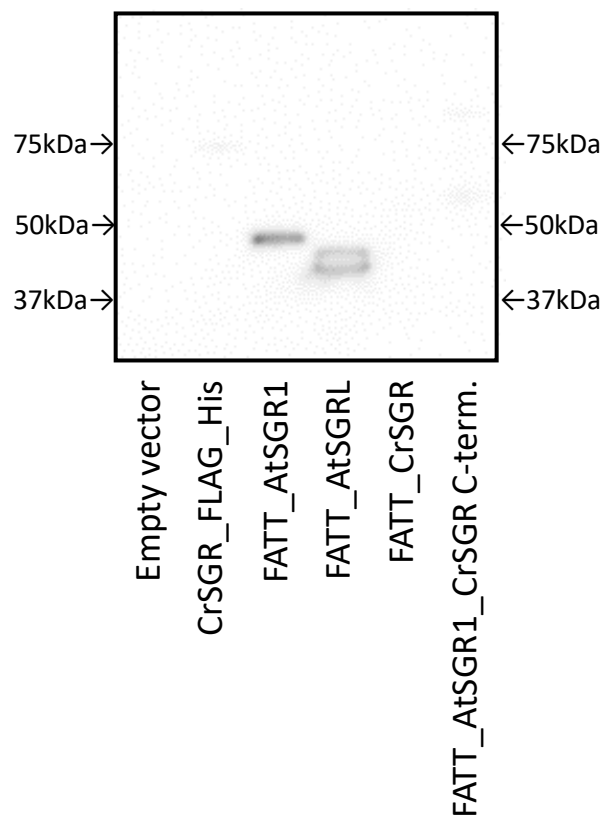


Fig. 9. 大腸菌タンパク質発現系でのFATT_SGRの発現

FATT_SGRを大腸菌で発現し、SDS-PAGEにより分離し、FLAGタグに対する抗体を用いて検出した。予想される分子量は、CrSGR_FLAG_His: 63.4kDa、FATT_AtSGR1: 39.4kDa、FATT_AtSGRL: 39.0kDa、FATT_CrSGR: 76.0kDa、FATT_AtSGR1_CrSGR C-term.: 70.4kDaである。Empty vectorはpET30aを指す。

- A) 大腸菌溶解液全体
- B) 可溶性画分

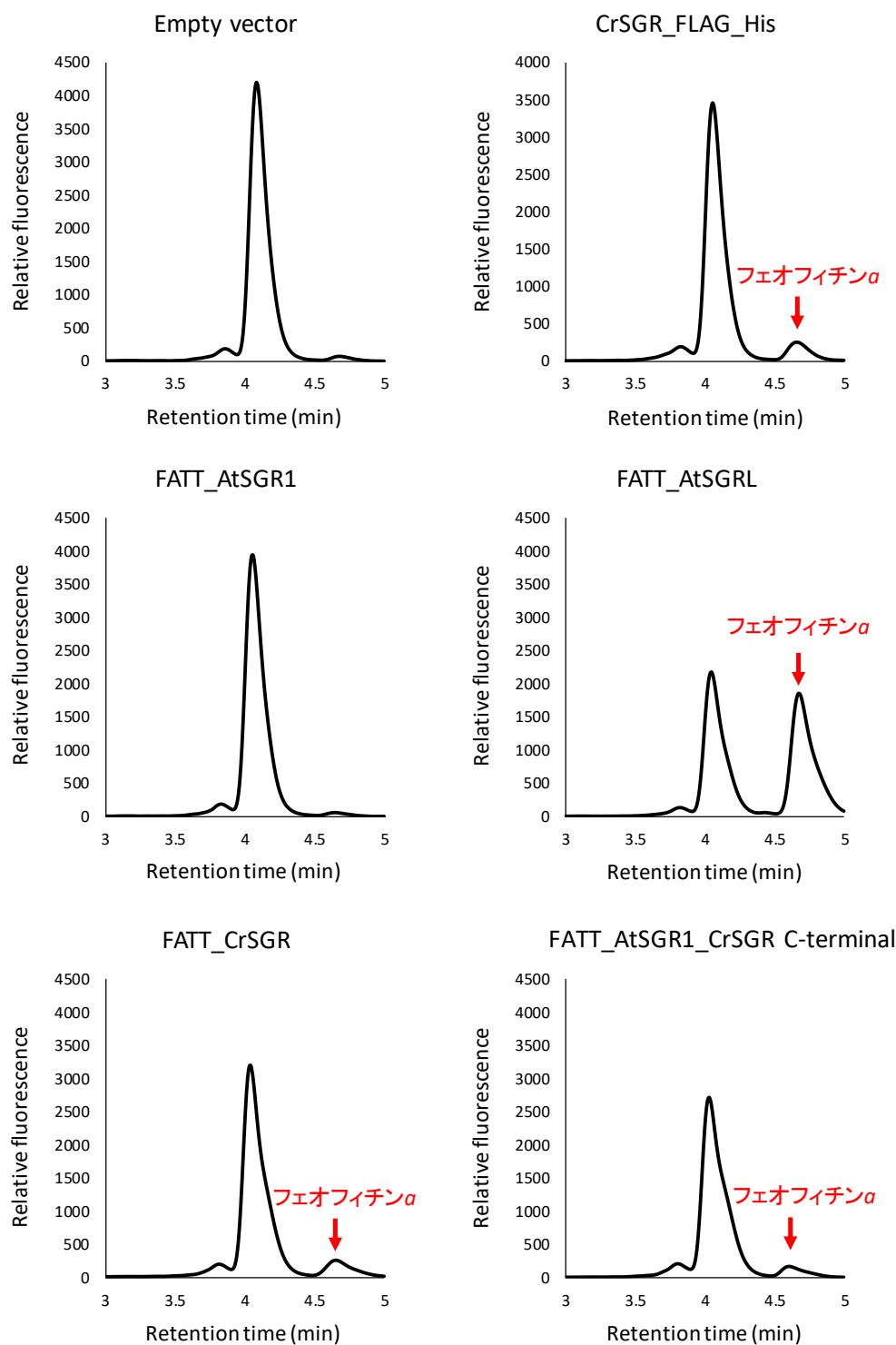


Fig. 10. FATT_SGRの活性測定

FATT_SGRを発現した大腸菌の溶解液を酵素液として、クロロフィル a （終濃度:6 μ M）と反応させた。反応前後の色素組成をHPLCにより解析し、酵素反応によりフェオフィチン a （Mg脱離分子）が生じるかでMg脱離活性を評価する。縦軸は蛍光シグナル量を表し、横軸は保持時間を表す。基質のクロロフィル a は4.1分の位置に、分解産物のフェオフィチン a は4.6分の位置に蛍光シグナルが得られる。蛍光検出器はフェオフィチン a の検出に最適化している（励起光波長/検出蛍光波長: 410/480nm）。

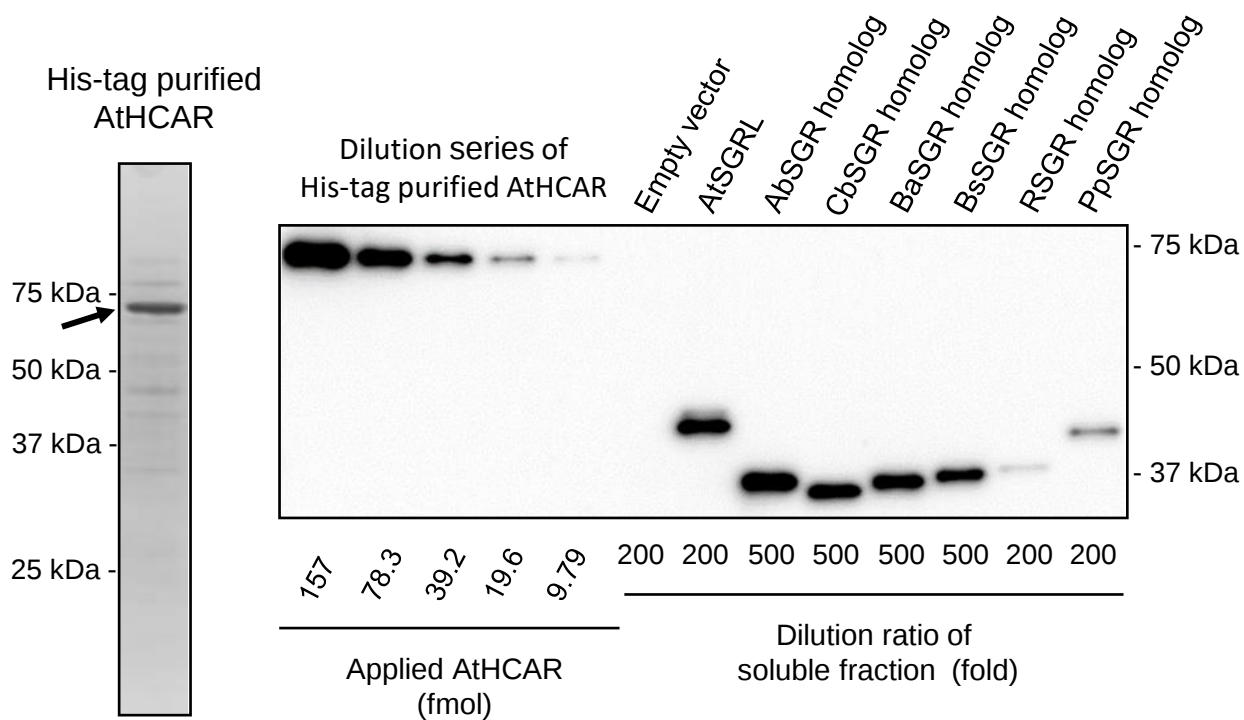


Fig. 11. バクテリアSGRホモログの発現

FATTタグをN末端に融合しているSGRホモログおよびAtHCRを大腸菌で発現した。可溶性画分に含まれるSGRホモログ量を調べるため、タンパク質量既知のAtHCRと同時にイムノブロットを行った。AtHCRをタンパク質量—蛍光シグナル量の検量線とし、SGRホモログの蛍光シグナル量からタンパク質量を計算した。検量線として使うAtHCRはFATTタグ中のHisタグを用いて精製し、SDS-PAGEの後にCoomassie Brilliant Blueで染色し、純度とタンパク質量を調べた（左パネル）。矢印で示されたタンパク質バンドがFATTタグを融合したAtHCRである（純度は60%以上）。イムノブロットでは、各レーンにサンプルを5 μ lロードし、anti-FLAG抗体によりタンパク質の検出を行った（右パネル）。

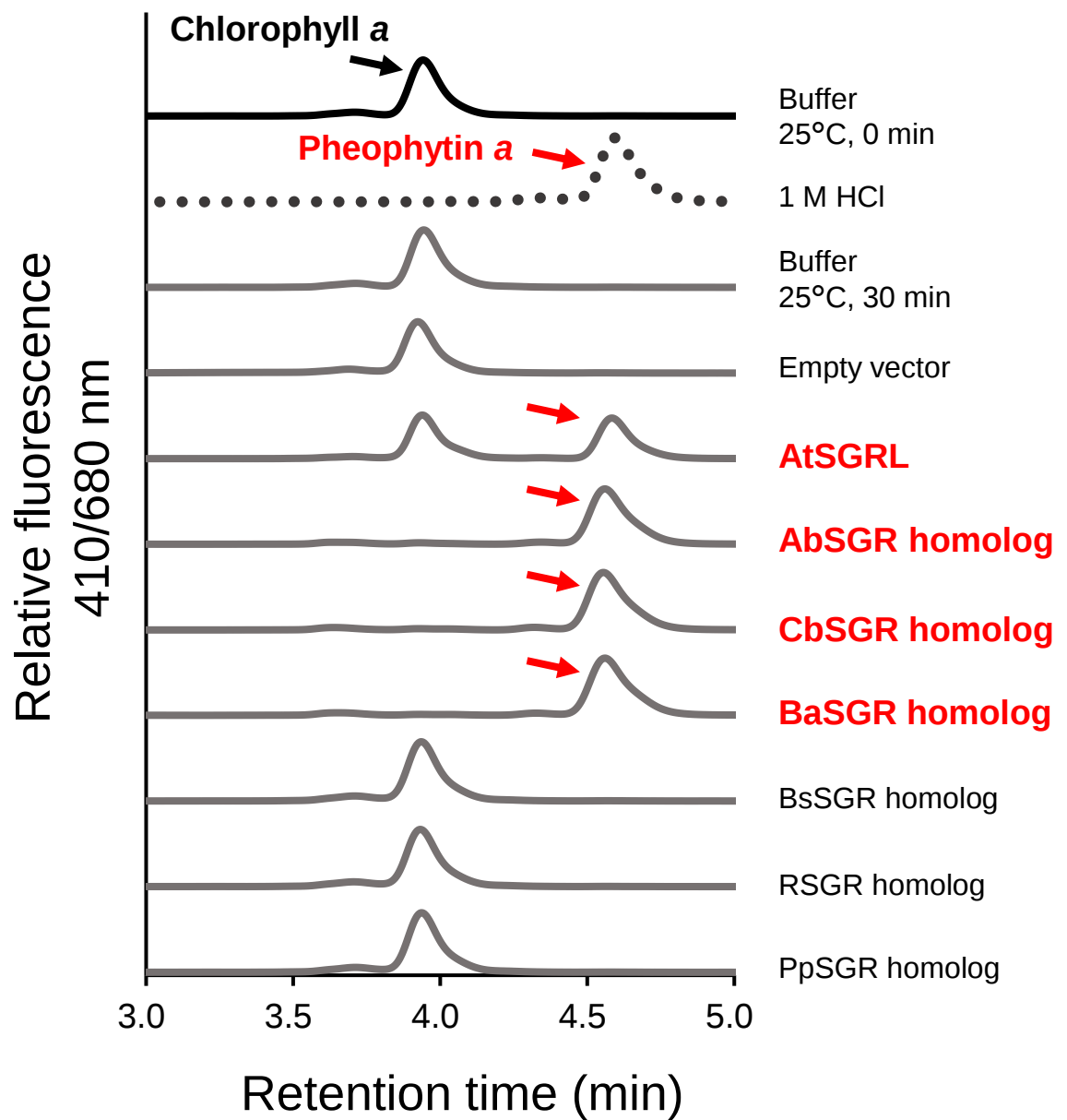


Fig. 12. バクテリアSGRホモログの活性測定

SGRホモログを発現した大腸菌の溶解液を酵素液として、クロロフィル a （終濃度:18 μ M）と反応させた。反応前後の色素組成をHPLCにより解析し、酵素反応によりフェオフィチン a （Mg脱離分子）が生じるかでMg脱離活性を評価する。縦軸は蛍光シグナル量を表し、横軸は保持時間を表す。基質のクロロフィル a は3.9分の位置に、分解産物のフェオフィチン a は4.6分の位置に蛍光シグナルが得られる。蛍光検出器はフェオフィチン a の検出に最適化している（励起光波長/検出蛍光波長:410/480nm）。

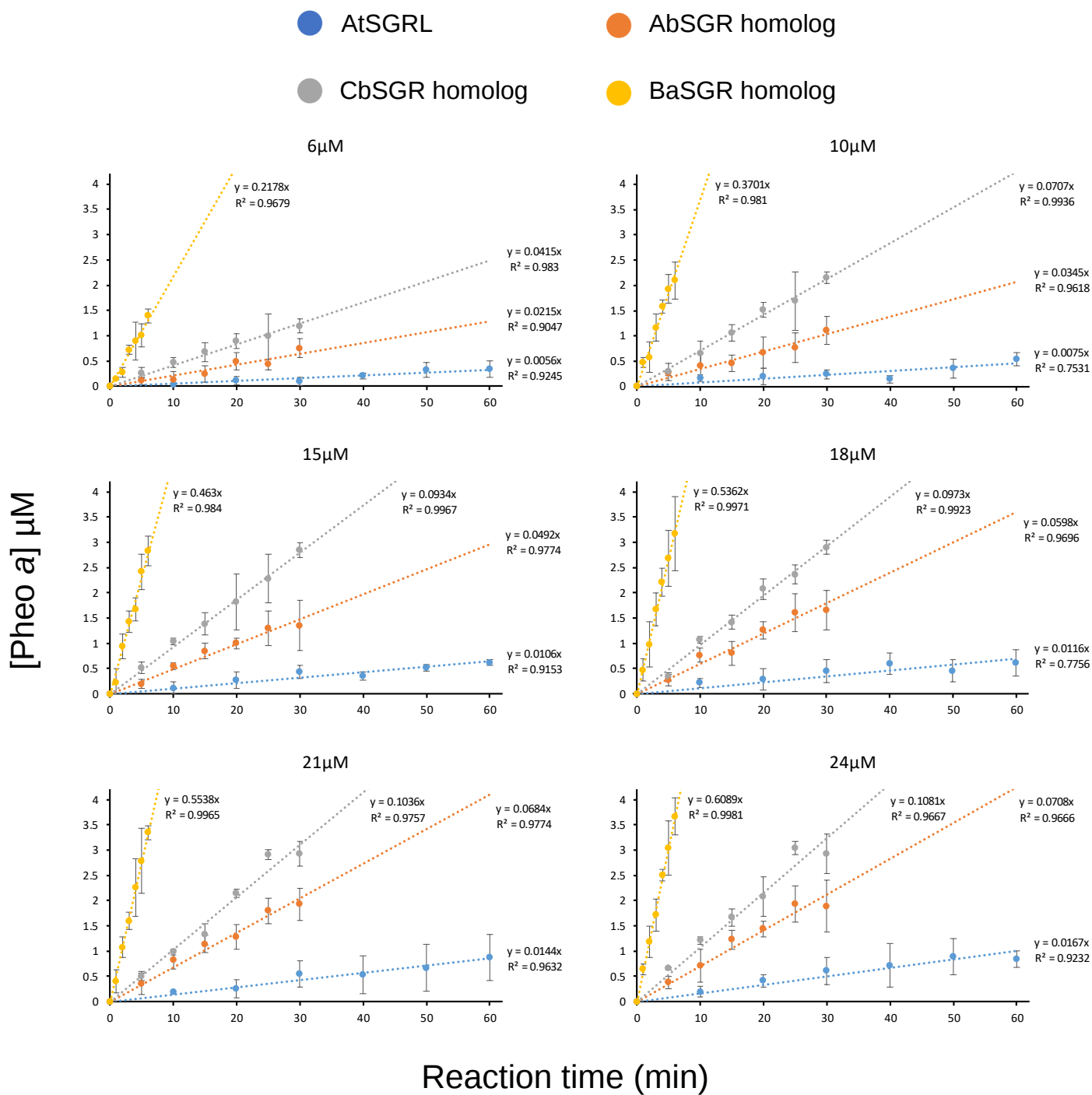


Fig. 13. AtSGRLとバクテリアSGRホモログの酵素反応初速度

様々なクロロフィル*a*濃度（終濃度: 6、10、15、18、21、24μM）における酵素反応の初速度（単位時間当たりのフェオフィチン*a*生成量）を計算した（ $n = 3 \pm \text{SD}$ ）。酵素終濃度はAtSGRLは0.236μM、バクテリアSGRホモログは0.118μMとした。縦軸が反応系中のフェオフィチン*a*濃度で、横軸が酵素反応時間であるので、一次関数の傾きが初速度になる。Fig. 14のミカエリスメンテン曲線とTable 3の酵素反応速度論的パラメーターはここで得られた初速度をもとにして計算されている。

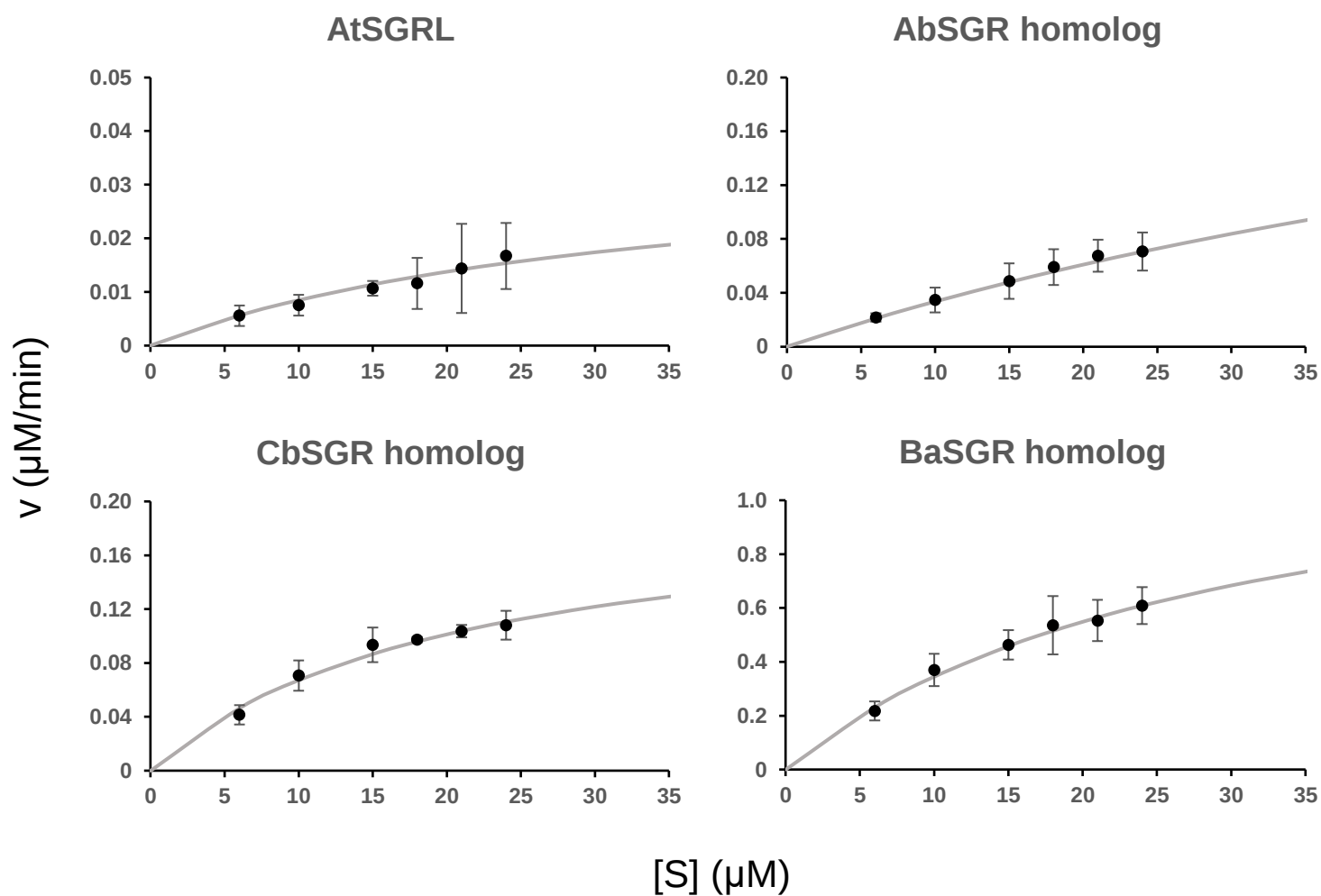
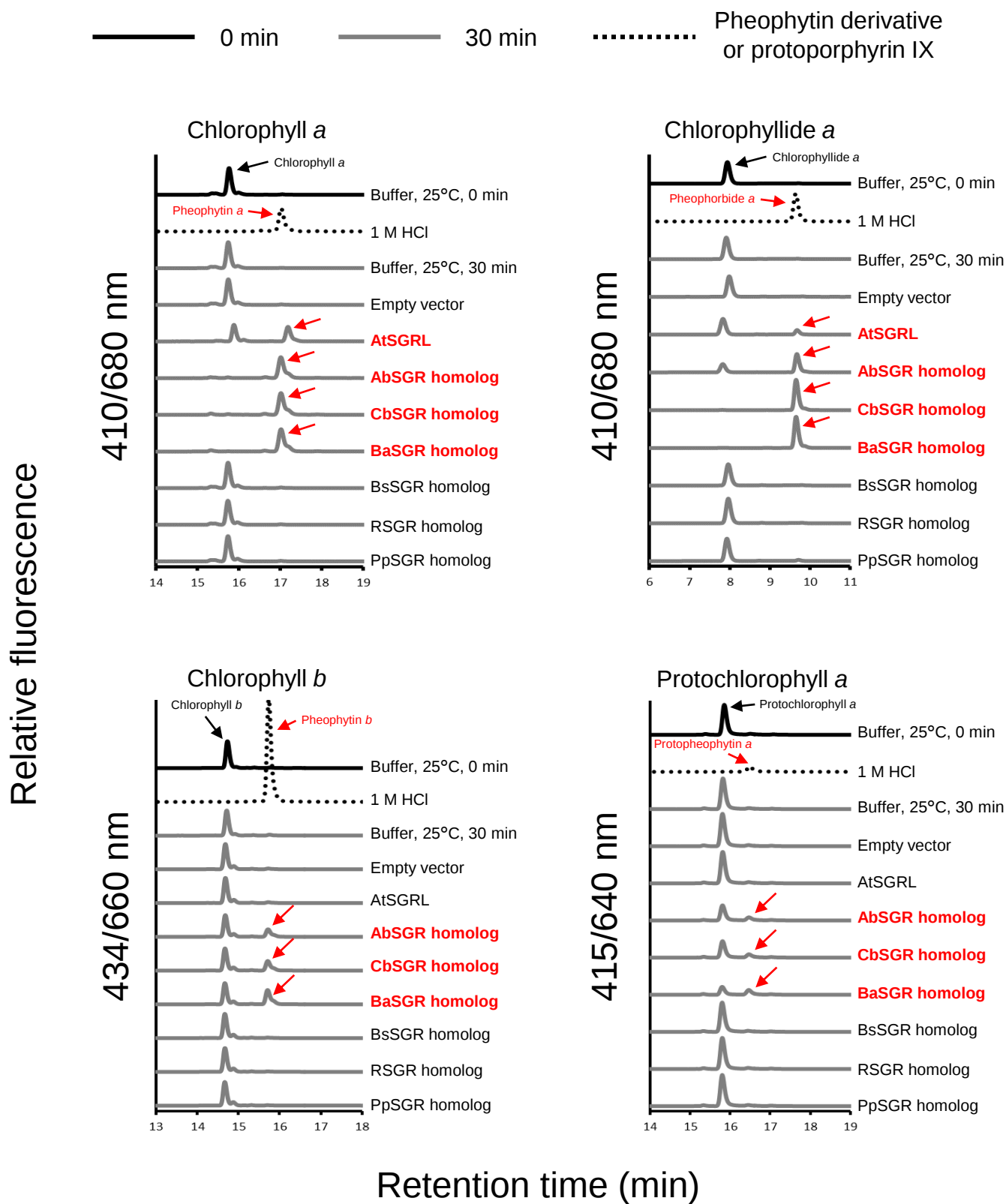


Fig. 14. AtSGRLとバクテリアSGRホモログのミカエリスメンテン曲線

縦軸に初速度、横軸に基質濃度を設け、Fig. 13で得られた各クロロフィル濃度における初速度をプロットした ($n=3 \pm \text{SD}$)。これを基に最適なミカエリスメンテン曲線を計算し、そのとき与えられる酵素反応速度論的パラメーター (k_{cat} と K_{m} 値)をそれぞれの酵素の値とした。



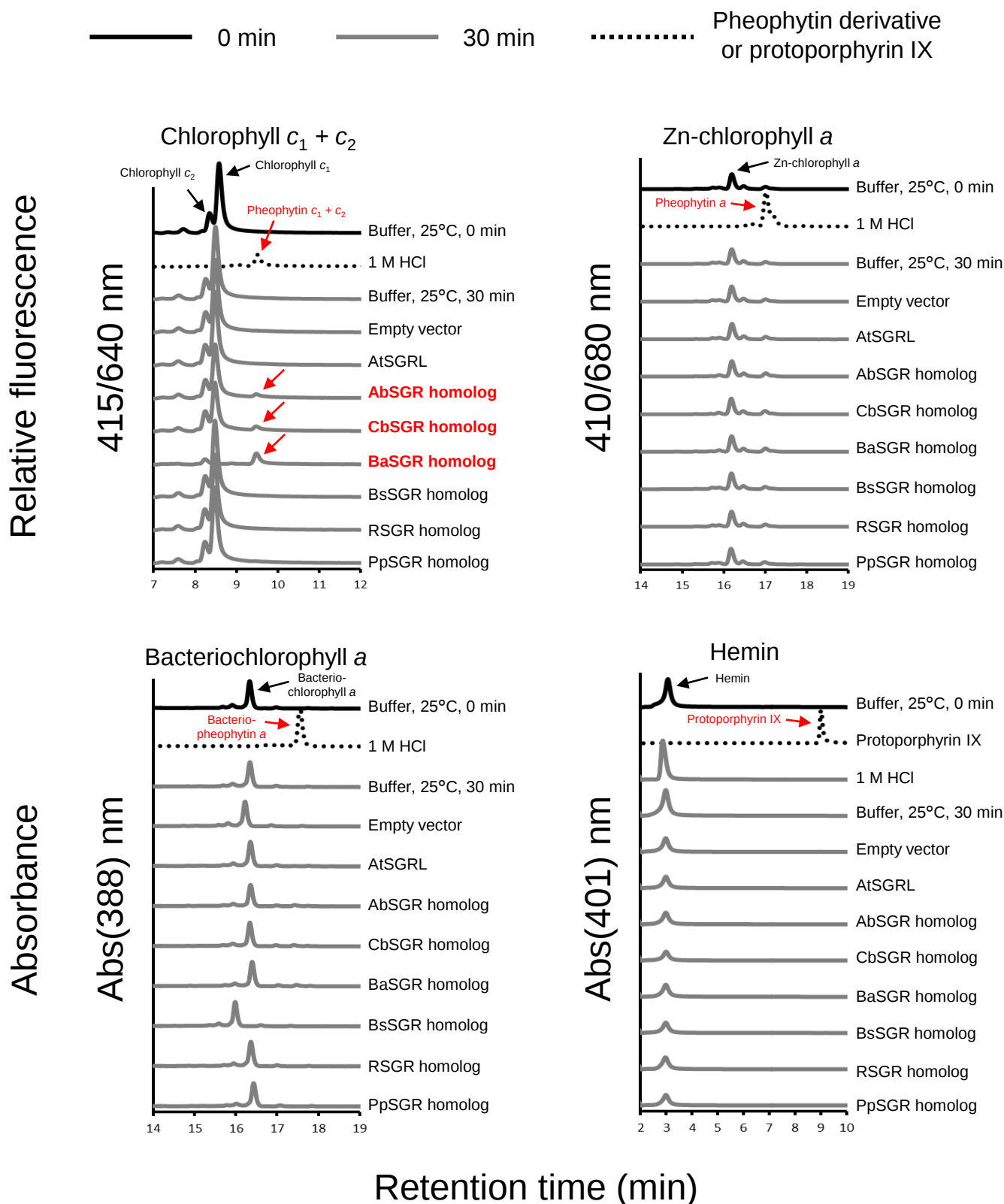


Fig. 15. バクテリアSGRホモログの遊離クロロフィル誘導体およびヘミンに対する活性

バクテリアSGRホモログの基質特異性を決定するため、様々なクロロフィル誘導体とヘミンを基質として酵素反応を行った。クロロフィル誘導体以外にヘミンを基質に用いたのは、ヘミンの中心金属である鉄の脱離を行うか調べるためである。AtSGRLおよびMg脱離活性を持つバクテリアSGRホモログは終濃度1.5μMになるよう調製し、活性の得られなかったホモログは希釈せずに使用した。反応前後の色素組成をHPLCにより解析し、酵素反応により金属脱離物が生じるかで活性を評価する。分解産物の検出は、バクテリオクロロフィルaとヘミンでは吸光度計を、それ以外は蛍光光度計を使用し、いずれも分解産物の検出に最適化した波長を用いた。横軸は保持時間で、縦軸は蛍光シグナル量あるいは吸光度を表す。クロロフィル誘導体の金属脱離物は1MのHClと反応させることで取得し、ポジティブコントロールとした。ヘミンは同様の処理では中心鉄を脱離できなかったため、鉄脱離物であるプロトポルフィリンIXの標品を用いた。

グルタミン酸 → 5-アミノレブリン酸 (ALA)

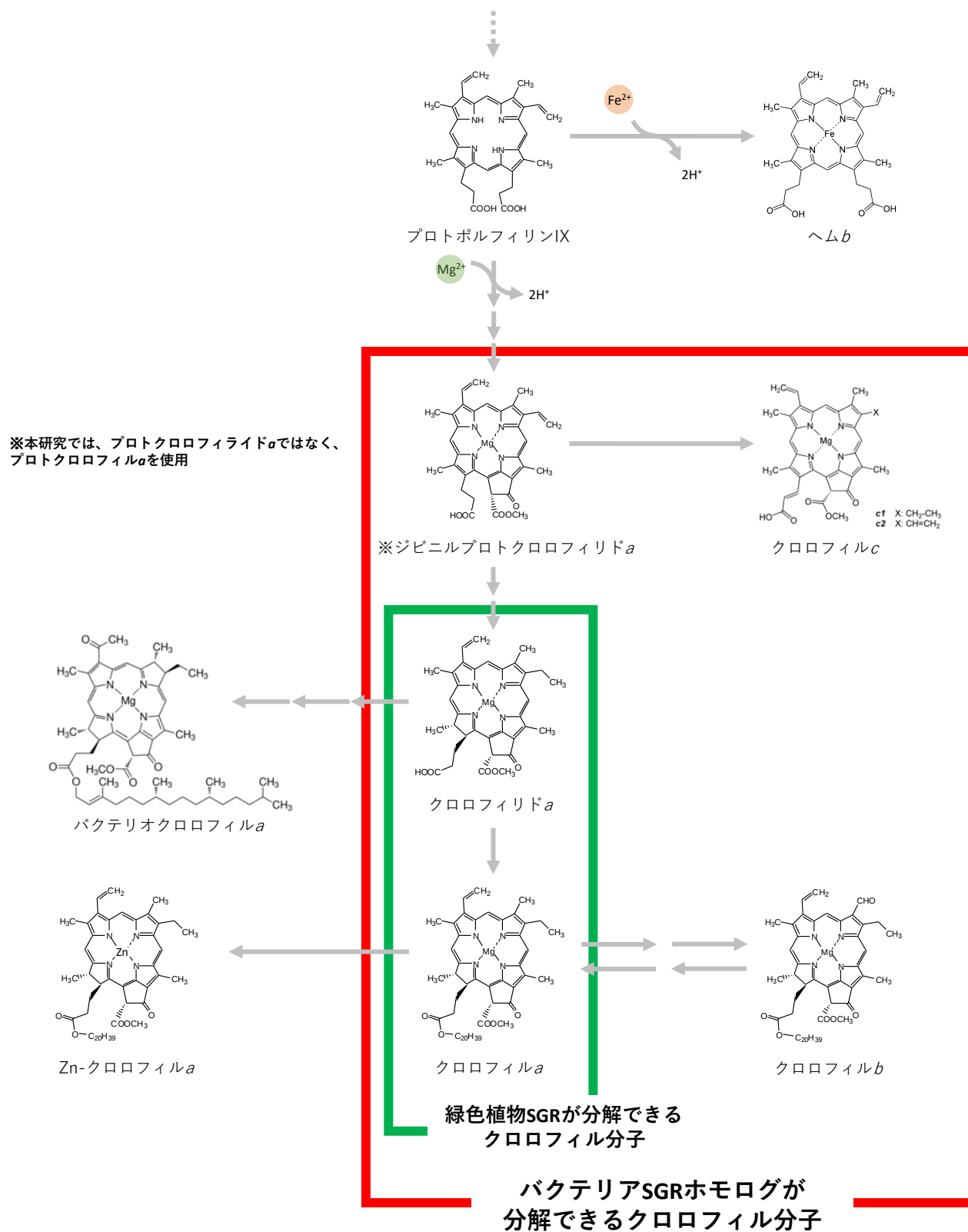


Fig. 16. 緑色植物SGRとバクテリアSGRホモログの基質特異性まとめ

Table 4の結果をクロロフィル代謝系に投影した。四角で囲んだ分子がそれぞれの酵素が基質にできる分子を表す。

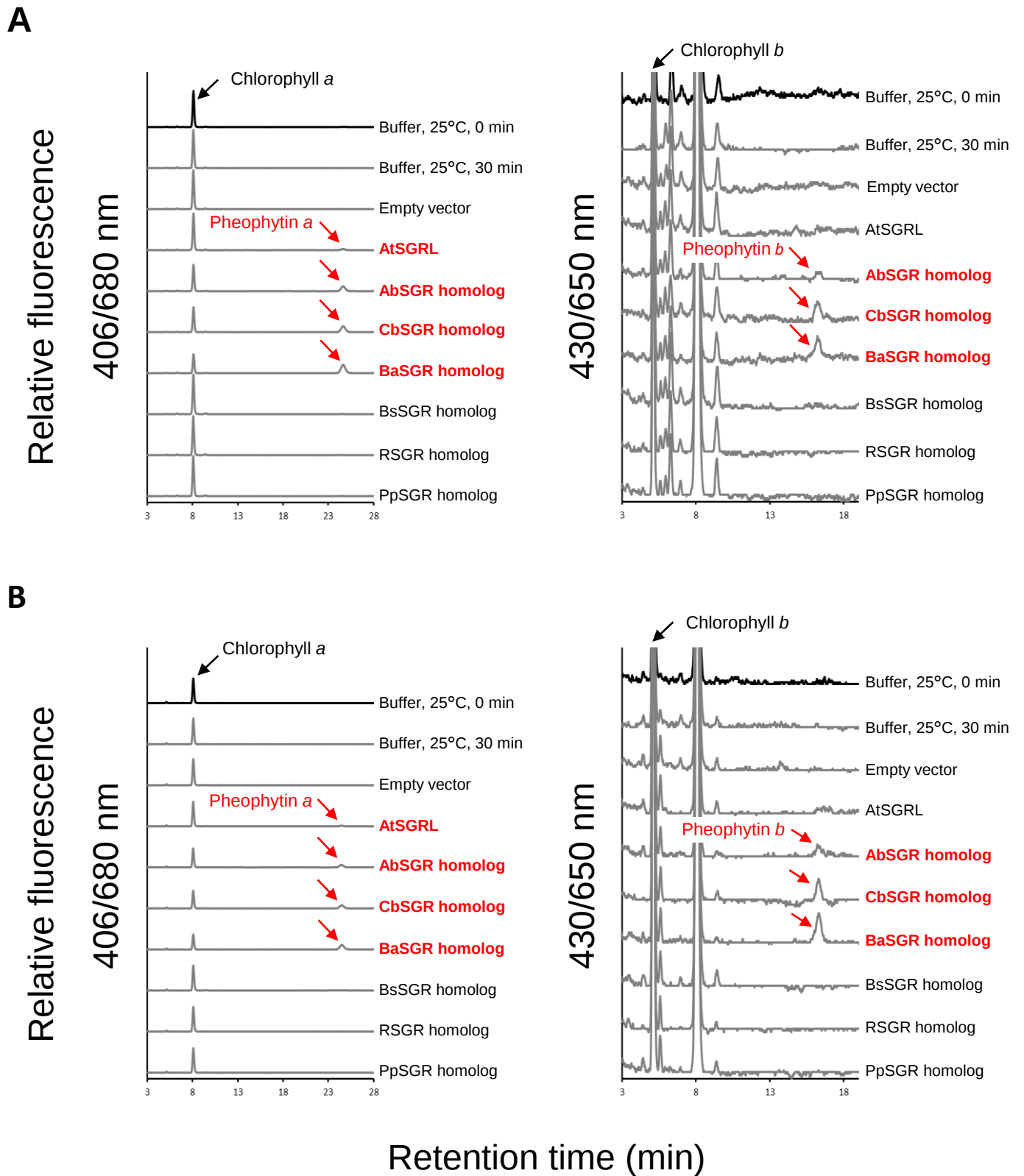


Fig. 17. バクテリアSGRホモログのクロロフィル-タンパク質複合体に対する活性

AtSGRLとバクテリアSGRホモログはPSI粒子 (A) またはLHCII (B) と酵素反応を行い、タンパク質複合体内のクロロフィルに対してMg脱離活性を示すか確かめた。反応系中の酵素は終濃度1.5 μ M、PSI粒子とLHCIIはクロロフィル量が終濃度18 μ Mとなるよう調製した。反応前後の色素組成をHPLCで分析し、フェオフィチンa (左パネル) とフェオフィチンb (右パネル) を検出することで活性を判断する。フェオフィチンaの検出には励起光/検出蛍光: 406/680nm、フェオフィチンbの検出には励起光/検出蛍光: 430/650nmを用いた。

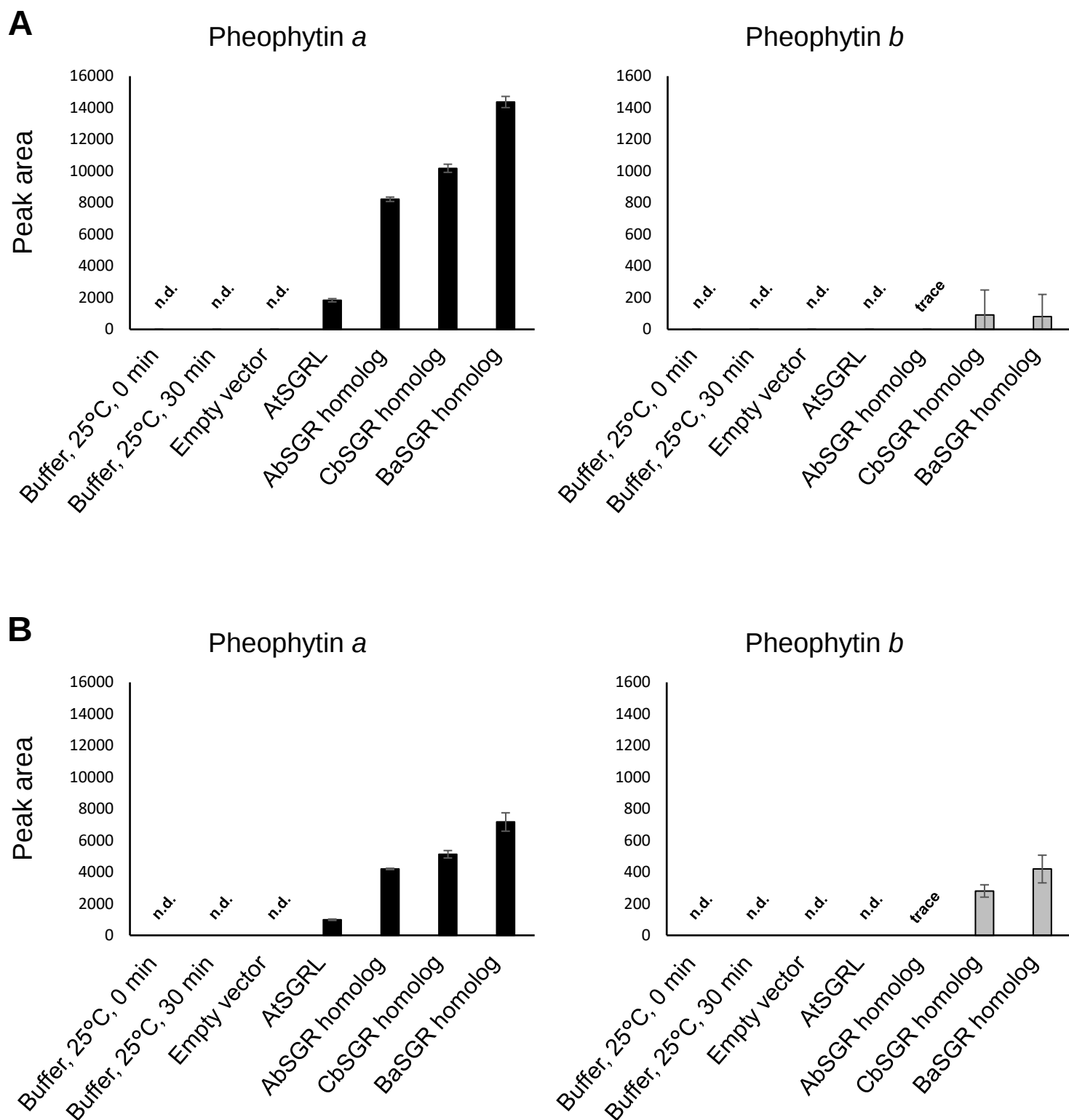
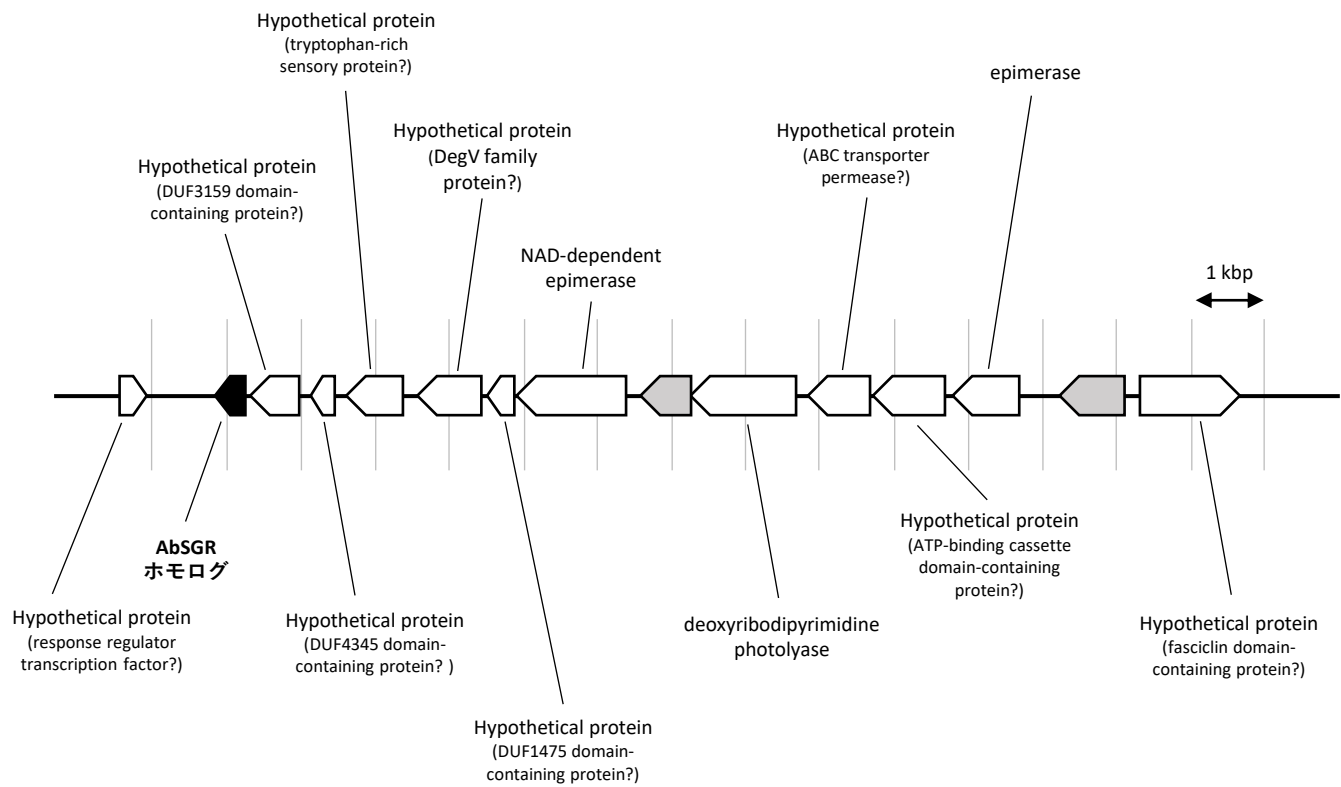


Fig. 18. バクテリアSGRホモログにより分解されたクロロフィル-タンパク質複合体中のクロロフィル量

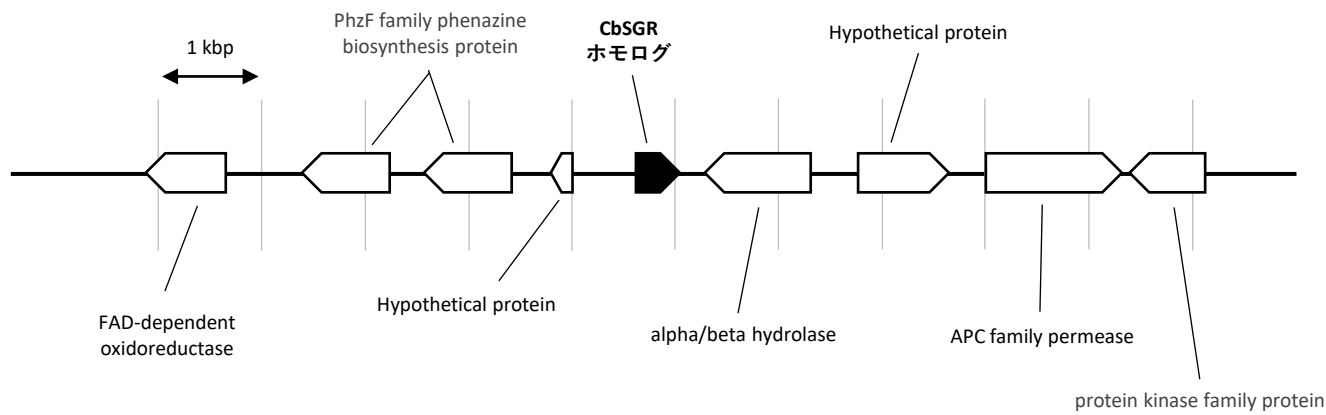
Fig. 17で検出されたフェオフィチンをピーク面積で定量した ($n=3 \pm \text{SD}$)。

- A) PSI粒子
B) LHCII

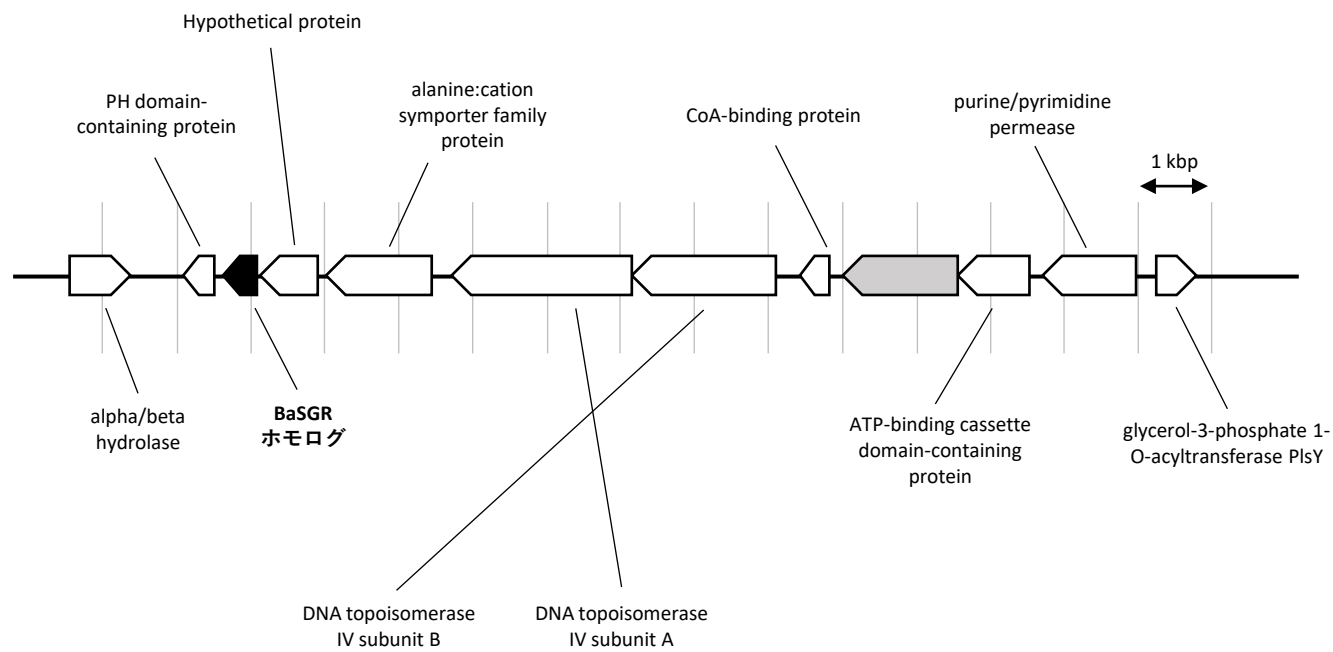
A. *Anaerolineae* bacterium SM23_63



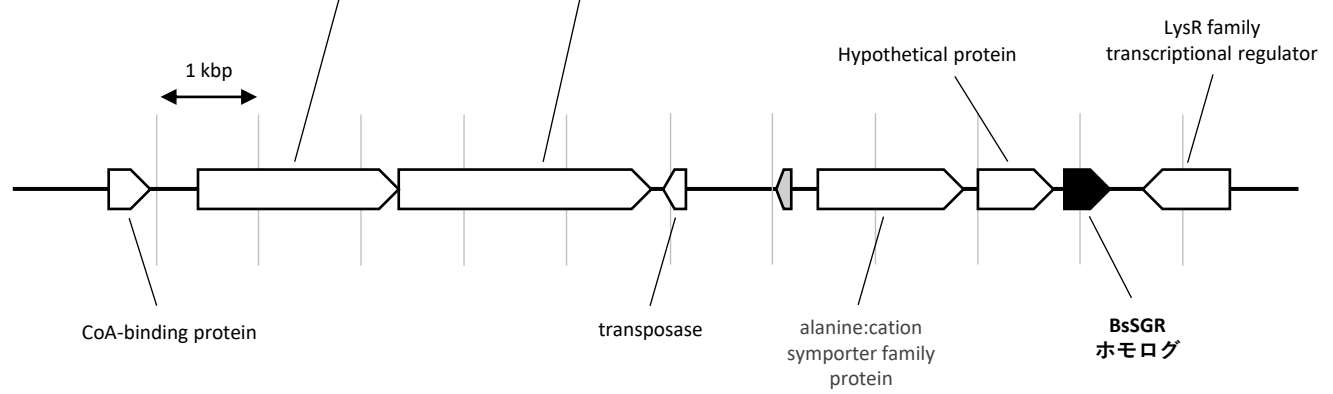
B. *Clostridium botulinum* sp. A2 117



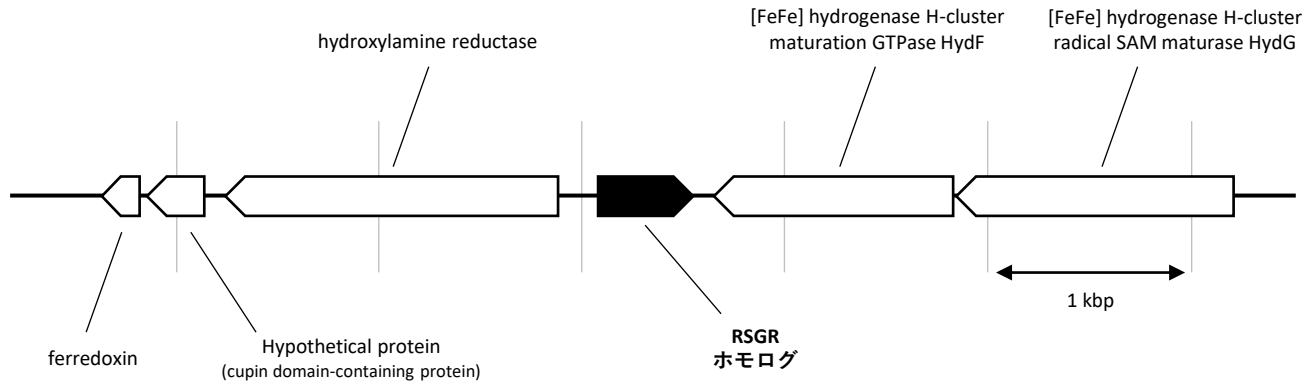
C. *Bacillus aquimaris* sp. SAMM



D. *Bacillus solani*



E. *Romboutsia* sp. MT17



F. *Peptoniphilus phoceensis*

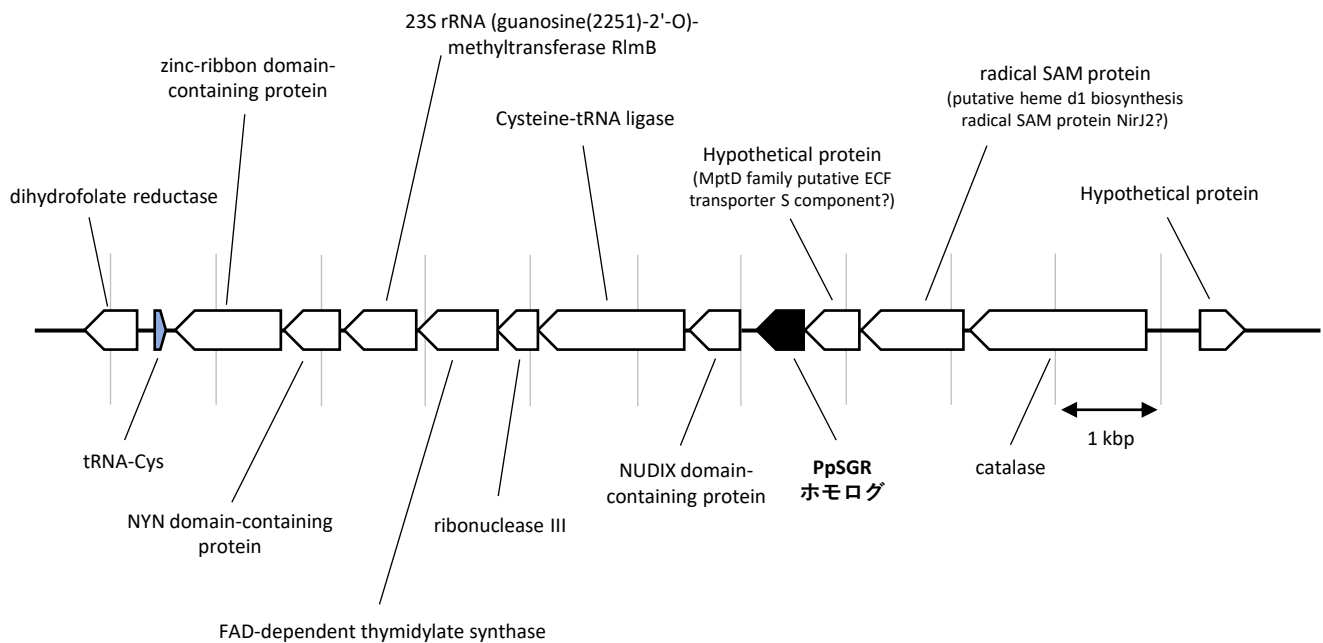


Fig. 19. SGRホモログを持つバクテリアのゲノム構造

酵素活性測定に使用したSGRホモログを持つバクテリアを対象としている。黒色で示された遺伝子はSGRホモログをコードし、青色で示された遺伝子はtRNAをコードしている。それ以外の遺伝子は白色で示している。

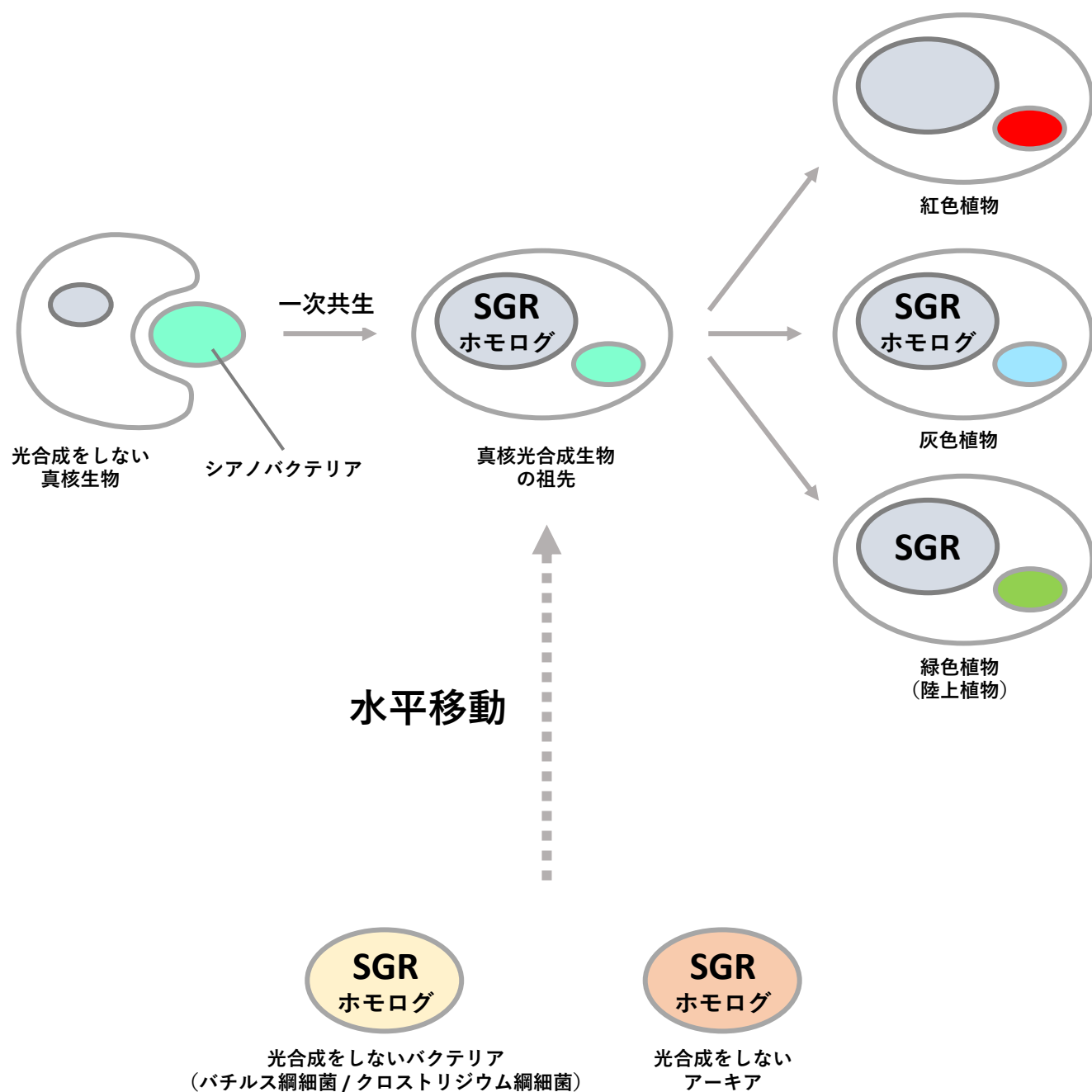


Fig. 20. 本研究から提唱されるSGRの進化プロセス

緑色植物のクロロフィル-Mg脱離酵素SGRの進化は次のようであると考えられる。①光合成をせず、クロロフィルも持たないバクテリアとアーキアに偶然Mg脱離活性を持つ未知のタンパク質が存在した。このMg脱離活性はpromiscuousな活性で、様々な強度のものが存在した。②その中で高いMg脱離活性を持つものが緑色植物の祖先へと水平移動し、③緑色植物の進化過程で活性の調節と基質特異性の調整を経て、SGRが誕生した。

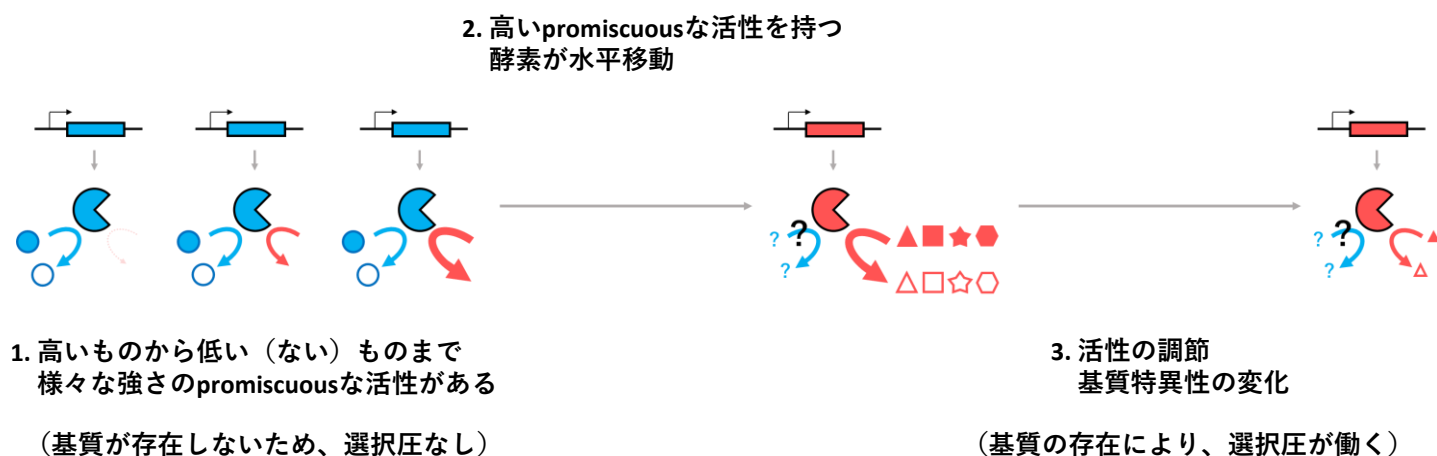
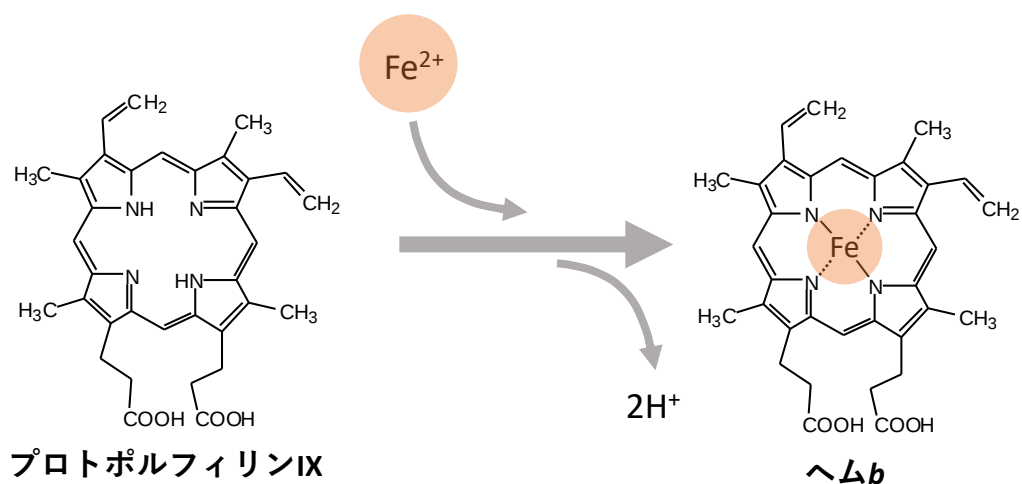


Fig. 21. 高いpromiscuousな活性と水平移動による酵素の進化モデル

青色で示された酵素は青色の基質に対する活性をprimaryな活性とし、赤色の基質に対する活性をpromiscuousな活性としている。赤色で示された酵素は赤色の基質に対する活性をprimaryな活性としている。

本モデルでは水平移動が関与するため、ドナー側生物とレシピエント側生物という2つの異なる基質環境が存在する。水平移動前のドナー側生物内で、ある酵素のpromiscuousな活性に対応する基質が存在しなければ、promiscuousな活性には選択圧が働かない。選択圧が働かなければ様々な強さのpromiscuousな活性が生じうる。水平移動後のレシピエント側生物内でpromiscuousな活性に対応する基質と出会えば、基質の存在により選択圧が働き、活性の調節と基質特異性の変化が起こる。

A. フェロケラテースによる鉄挿入反応



B. SGRによるMg脱離反応

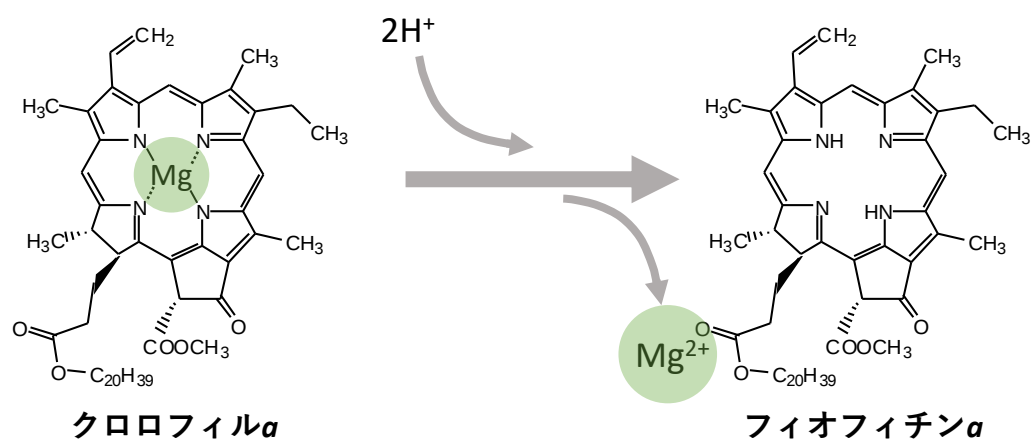


Fig. 22. 逆反応の関係にあるフェロケラテースの鉄挿入反応とSGRのMg脱離反応

- A) フェロケラテースはクロロフィルに類似した構造を持つ分子（プロトポルフィリンIX）に鉄原子挿入を触媒する酵素である。この反応には金属の挿入と H^+ の脱離が必要であり、酸性アミノ酸とヒスチジンが関わっていると報告されている。
- B) Mg脱離反応は基質と生成物の比較から、 H^+ の供与と金属の脱離が必要であり、フェロケラテースの鉄挿入反応と真逆の反応である。

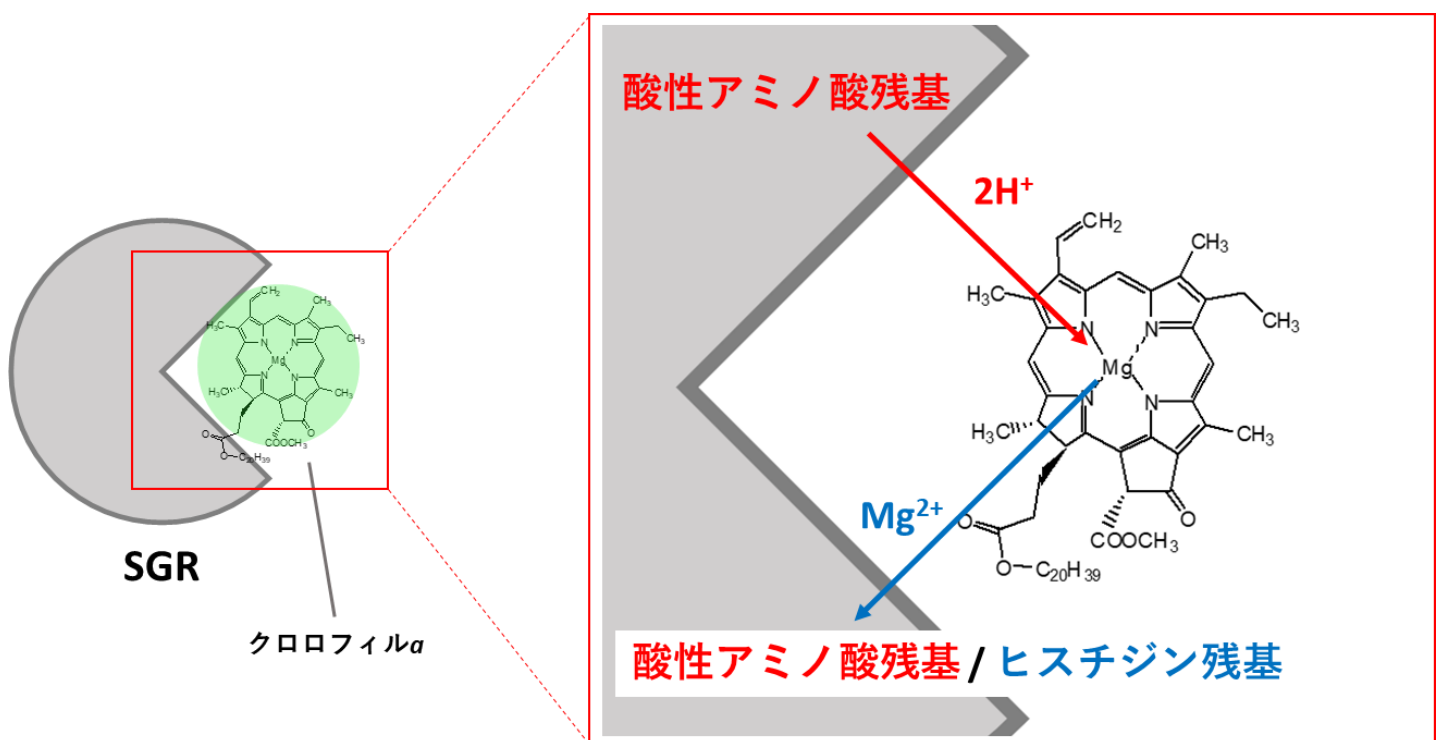
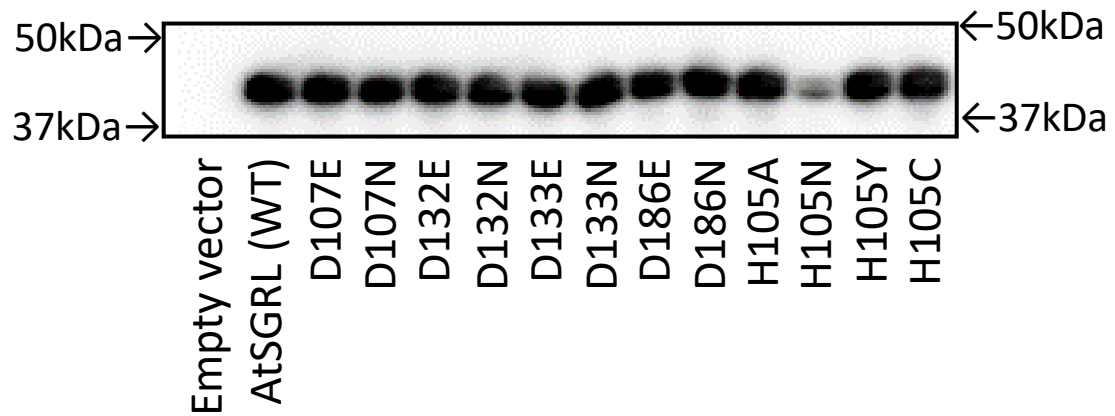


Fig. 23. SGRのMg脱離反応の仮説

SGRのMg脱離反応は2段階の反応で構成されているとモデルを立てた。①SGRの酸性アミノ酸残基がクロロフィル a に H^+ を供与し、Mg-N間の結合を切断する。②不安定化したMgは酸性アミノ酸残基あるいはヒスチジン残基と配位結合を形成し、Mgを引き抜く。

A. 大腸菌溶解液



B. 可溶性画分

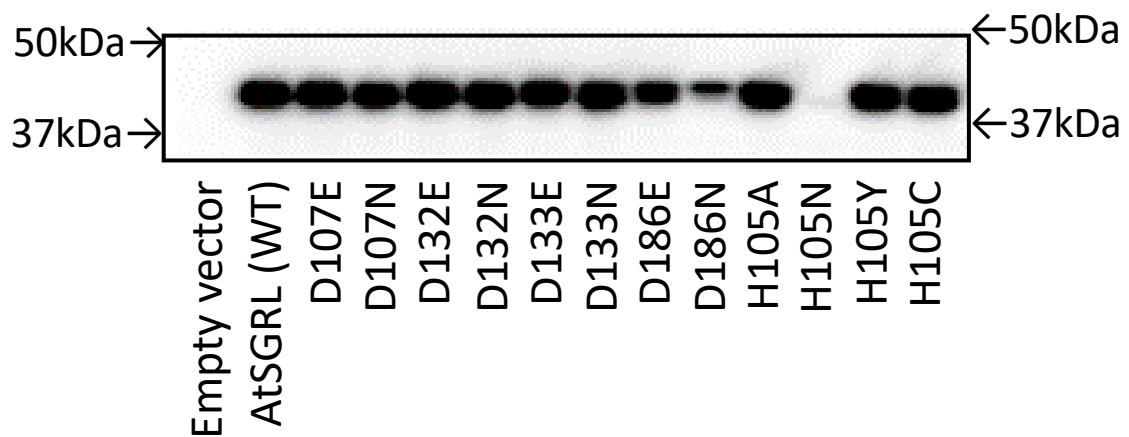


Fig. 24. AtSGRL アミノ酸置換体の発現

FATT_AtSGRLとそのアミノ酸置換体を大腸菌で発現し、SDS-PAGEにより分離し、anti-FLAG抗体を用いて検出した。予想される分子量は39.0kDaである。Empty vectorはpET30aを指す。

- A) 大腸菌溶解液全体
- B) 可溶性画分

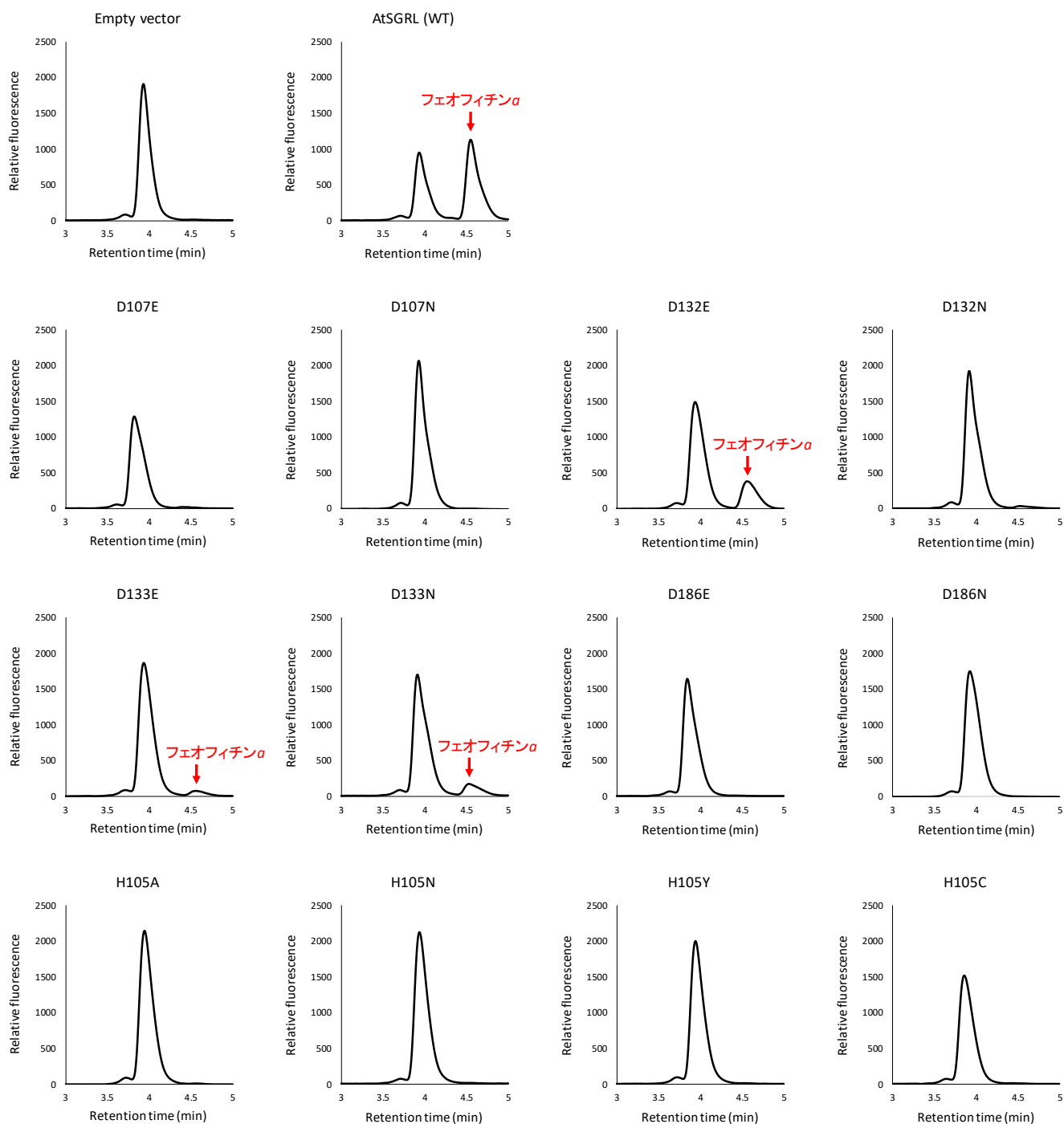


Fig. 25. AtSGRL アミノ酸置換体の活性測定

AtSGRL アミノ酸置換体を発現した大腸菌の溶解液を酵素液として、クロロフィル a （終濃度: $6\mu\text{M}$ ）と反応させた。反応前後の色素組成をHPLCにより解析し、酵素反応によりフェオフィチン a （Mg脱離分子）が生じるかでMg脱離活性を評価する。縦軸は蛍光シグナル量を表し、横軸は保持時間を表す。基質のクロロフィル a は3.9分の位置に、分解産物のフェオフィチン a は4.6分の位置に蛍光シグナルが得られる。蛍光検出器はフェオフィチン a の検出に最適化している（励起光波長/検出蛍光波長: 410/480nm）。

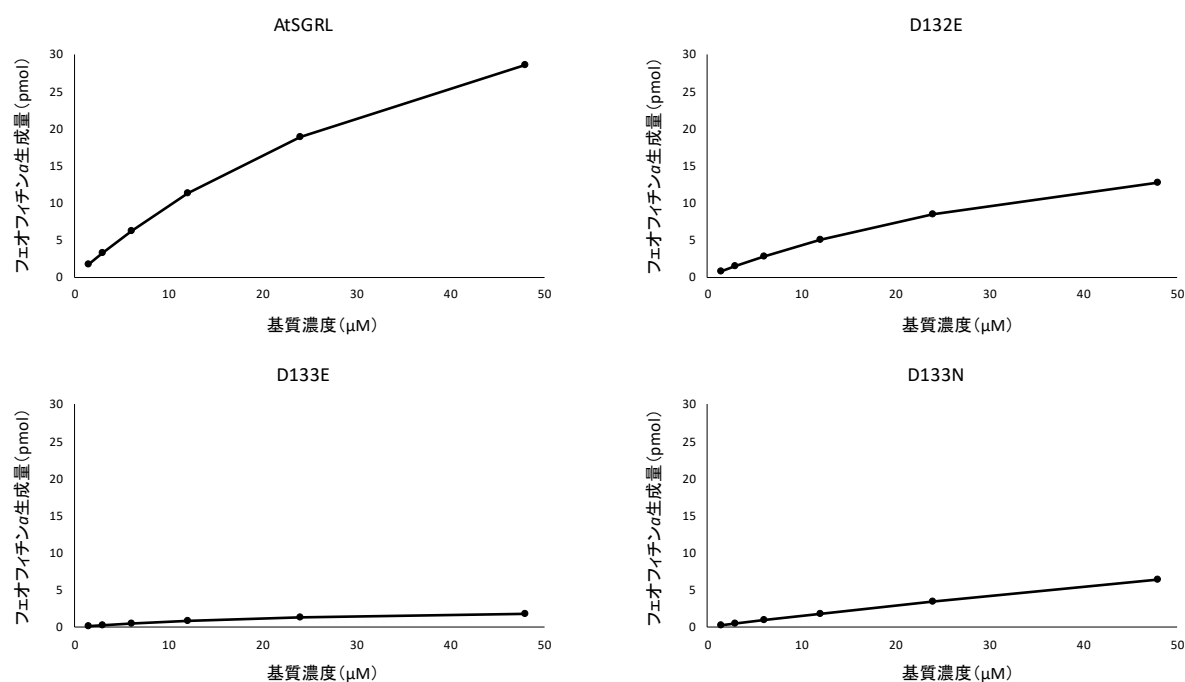


Fig. 26. AtSGRL アミノ酸置換体のミカエリスーメンテン曲線

AtSGRL アミノ酸置換体を発現した大腸菌溶解液を希釈せず酵素液として、様々な濃度のクロロフィル *a*（終濃度: 1.5、3、6、12、24、48 μM）と反応させた。本来は生成物量が反応時間によって一次関数的に上昇するような酵素量や反応時間を設定し、単位時間当たりの生成物量から酵素の反応初速度を調べる。ここでは反応時間30分間は条件に当てはまると仮定して簡易的な実験を行っている。縦軸には30分の反応で生じたフェオフィチン *a* の生成量、横軸は基質濃度を設け、散布図を作成した ($n=1$)。これを基に最適なミカエリスーメンテン曲線を計算し、そのとき与えられる酵素反応速度論的パラメーター ($V_{\max}$ と K_m 値) をそれぞれの酵素の値とした。

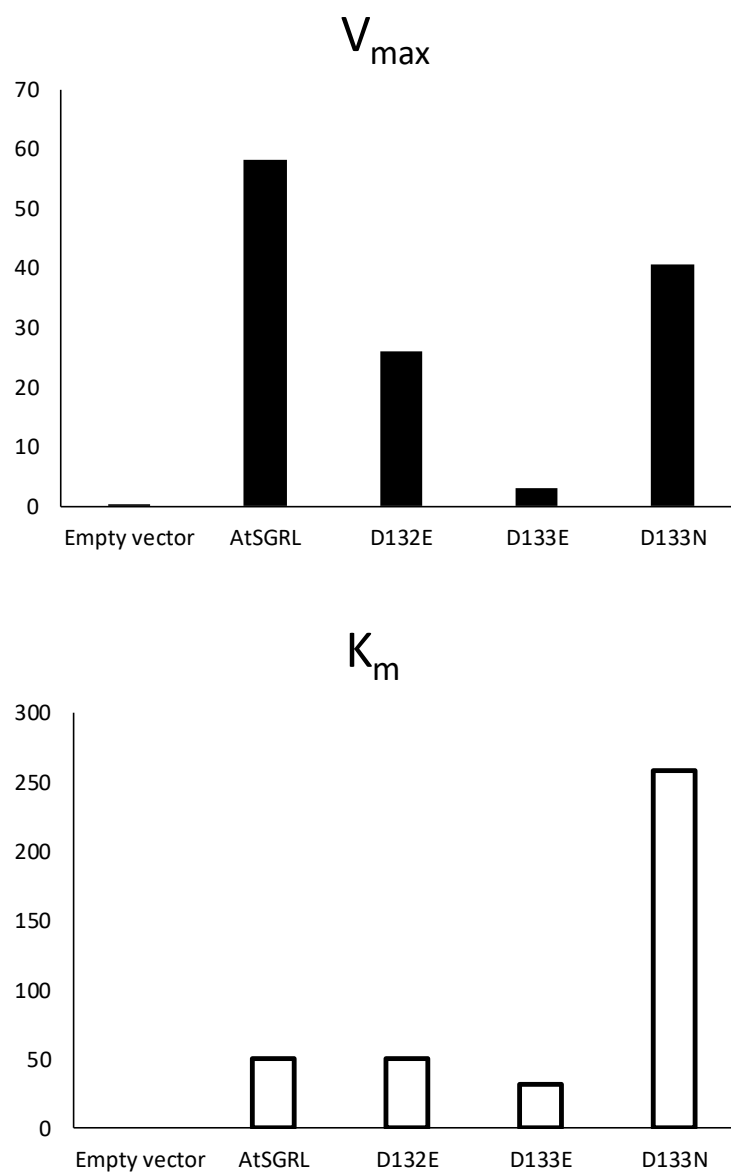


Fig. 27. AtSGRLアミノ酸置換体のV_{max}とK_m値

Fig. 26のミカエリスメンテン曲線からV_{max}とK_m値を算出した (n=1)。V_{max}は酵素量により増減するため、ここでは全てのアミノ酸置換体の酵素量が等しいと仮定し、簡略化している。

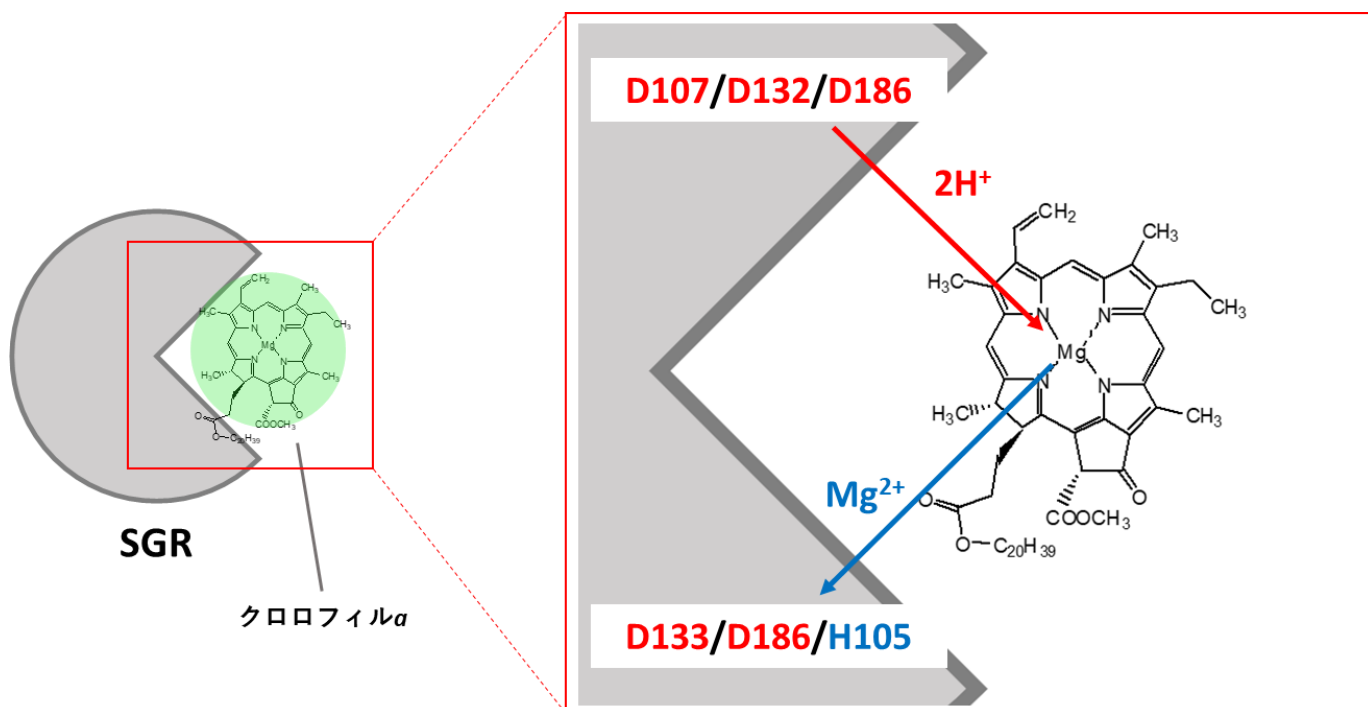


Fig. 28. 現段階で予想されるSGRの触媒反応機構

アミノ酸置換より、現段階のMg脱離機構は次のようであると考えられる。①D107、D132、D186のいずれかあるいは複数がクロロフィルaのMg-N間に H^+ を供与することで配位結合を切断する。②D107、D133、D186、H105のいずれかあるいは複数が不安定化したMgと配位して引き抜く。

謝辞

指導教官の田中亮一准教授には、博士課程の間一貫して丁寧な指導・助言をしていただきましたことに深く感謝いたします。力をこめて指導頂いたプレゼンテーション技術は一生分の宝になりました。

長らく研究に携わり、研究の意義や実験における知識をご鞭撻いただきました伊藤寿助教、実験結果を活発にディスカッションしていただきました高林厚史助教に厚くお礼を申し上げます。

退官された田中歩特任教授には、本研究「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」という 2 つのテーマを与えていただきました。このような大きなテーマに携わらせていただけたことに心より感謝申し上げます。

本研究の副査を担当された加藤敦之教授と藤田知道教授にはお忙しいにも関わらず、懇切丁寧にご指導いただきました。この場を借りてお礼申し上げます。

技術補助員の岸本純子さん、先端技術支援室の加藤由佳子さんには実験だけでなく研究生活の面で手厚いサポートをしていただきました。

また、生物適応研究室の皆様には普段の生活でお世話になり、充実した 5 年間を送ることができました。

最後に、ともに勉学に励み、心の支えになってくれた友人たち、経済的・精神的に支えてくれた家族に心の底から感謝申し上げます。