

研究紹介

バクテリオクロロフィル生合成系のニトロゲナーゼ類似酵素の生化学的解析

名古屋大学 大学院生命農学研究科

野亦次郎

はじめに

クロロフィル、バクテリオクロロフィルは光合成に必須の色素であり、光化学系や光捕集系を形成し、光の吸収や電子の移動を引き起こすなど、光エネルギーを化学エネルギーに変換する上で重要な役割を担う。これまでに、クロロフィル、バクテリオクロロフィルは合わせて 100 種類以上が知られている¹⁾。クロロフィルおよびバクテリオクロロフィルの光吸収特性は、閉環状テトラピロールからなる主要環構造により大きく影響される(図1)。これまでに発見されたクロロフィルとバクテリオクロロフィルの環構造は、ポルフィリン環、クロリン環、バクテリオクロリン環のいずれかに分類される。ポルフィリン環と比較すると、クロリン環は D 環の炭素間二重結合が還元されており、バクテリオクロリン環は D 環と B 環の両方が還元されている。各環構造を持った代表的な光合成色素として、プロトクロロフィリド (Pchl_{id})、クロロフィル a (Chl a)、バクテリオクロロフィル a (Bchl a) が、それぞれ挙げられる。アセトン中での Q_y ピークの位置を比較すると、Pchl_{id} は 627nm、Chl a は 665nm、Bchl a

は 779nm に各々吸収極大を示し、環構造の還元が進むにつれて、より長波長の光を吸収することがわかる。これら光合成色素の光吸収特性は、光合成生物が生育できる光環境や、酸素発生型/非発生型という光合成のタイプを決定づけている。したがって、ポルフィリン環からのクロリン環、バクテリオクロリン環への変換は、生物学的にも生化学的にも非常に重要な反応である。

2つのニトロゲナーゼ類似酵素

これまでの紅色非硫黄細菌 *Rhodobacter capsulatus* を用いた研究から、Bchl a の生合成経路において2つのニトロゲナーゼ類似酵素がこれらの環構造の変換を触媒することが明らかとなった。1つは光非依存型プロトクロロフィリド還元酵素(DPOR; Dark-operative Pchl_{id}e oxidoreductase)であり、Pchl_{id} の D 環の炭素間二重結合を立体特異的に還元し、クロリン環化合物であるクロロフィリド a (Chl_{id} a) を生成する²⁾。Chl_{id} a は引き続き、もう1つのニトロゲナーゼ類似酵素、クロロフィリド a 還元酵素 (COR; Chl_{id} a

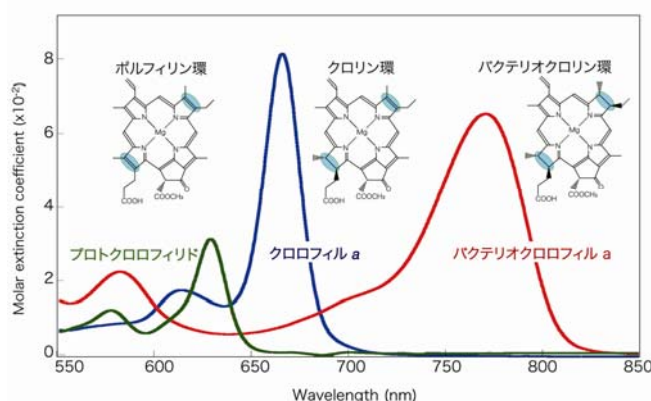


図1 クロロフィルおよびバクテリオクロロフィルの環構造は、ポルフィリン環、クロリン環、バクテリオクロリン環の3種類に分類される。各環構造を持つ代表的な光合成色素、プロトクロロフィリド (Pchl_{id})、クロロフィル a (Chl a)、バクテリオクロロフィル a (Bchl a)、Q_y ピーク周辺の吸収スペクトルを示す。環構造の還元が進むにつれ、より長波長の光を吸収するようになることがわかる。

oxidoreductase) によって B 環が還元され、バクテリオクロリン環 (3-ビニルバクテリオクロロフィリド *a*) に変換される³⁾。DPOR の3つのサブユニット BchL、BchN および BchB と、COR の3つのサブユニット BchX、BchY および BchZ は、ニトロゲナーゼの NifH、NifD および NifK と各々、有意な相同性を示すことから^{2,4)}、ポルフィリン環の D 環とクロリン環の B 環はニトロゲナーゼと共通した反応機構で還元されることが示唆されていた。

ニトロゲナーゼは、分子状窒素(N₂)をアンモニアに還元する反応を触媒する複雑な金属酵素であり、Fe-蛋白質と MoFe-蛋白質と呼ばれる容易に分離可能な2つのコンポーネントにより構成される。Fe-蛋白質は NifH 蛋白質の二量体からなり、各々の NifH 蛋白質から2つずつ提供されるシステイン残基によって [4Fe-4S]型の鉄硫黄クラスターを保持している。窒素は MoFe-蛋白質上でアンモニアへと還元されるが、Fe-蛋白質はこの還元反応に必要な電子を、ATP 依存的に MoFe-蛋白質へ供給する。電子を MoFe-蛋白質に渡して酸化された Fe-蛋白質は、フェレドキシンやフラボドキシニンによって再び還元される⁵⁾。BchL および BchX 蛋白質は NifH 蛋白質とおおよそ30%の同一性を示し、ATP 結合モチーフや、[4Fe-4S]型の鉄硫黄クラス

ターの保持に関わる2つのシステイン残基を保存している。それゆえ、BchL は、Pchlide 還元反応を行う BchN-BchB へと電子を渡す、また同様に BchX も Chlide *a* 還元反応を行なう BchY-BchZ へ電子を供給する、各々特異的な ATP 依存型還元酵素として機能する、という仮説が立てられていた^{2,6,7)}。

DPOR および COR を構成するもう2つのサブユニット蛋白質、BchN と BchB および BchY と BchZ はニトロゲナーゼの NifD、NifK 蛋白質のどちらとも20~25%の相同性を示す。BchL や BchX と NifH との間での類似性と比べると低い値ではあるが、金属中心の保持に関わる NifD の3個のシステインと NifK の1個のシステインが保存されている^{2,6)}。NifD、NifK 蛋白質からなるヘテロ四量体は、対をなした2種類の(合計4個)複雑な金属中心を持った、ニトロゲナーゼの触媒コンポーネント、MoFe-蛋白質を形成する。金属中心の1つは、[8Fe-7S]から構成される“P-cluster”であり、もう1つは[1Mo-7Fe-9S-X-ホモクエン酸]から構成される(X=未同定の元素,7)“FeMo-cofactor”である⁸⁾。P-cluster は、Fe-蛋白質から窒素の還元が行われる FeMo-cofactor へと電子を仲介する役割を担うと考えられている(図2)。

以前の研究では、*R. capsulatus* からの DPOR の構成

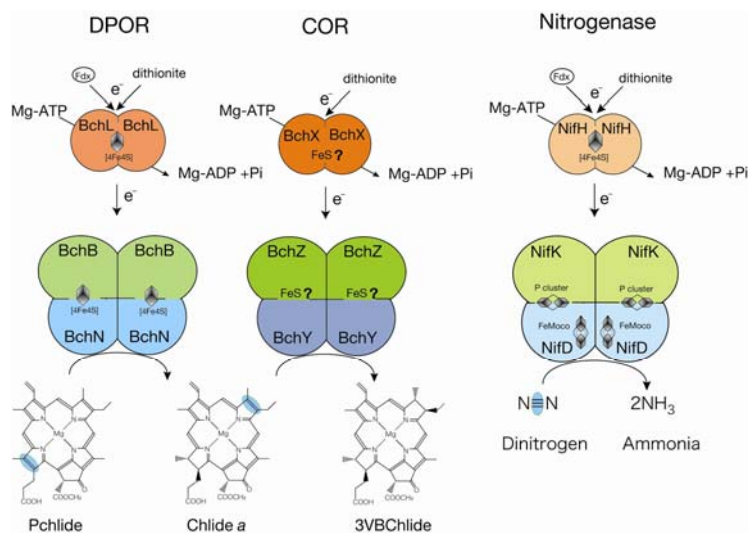


図2 ニトロゲナーゼ、DPOR、COR の構造モデル。ニトロゲナーゼの還元コンポーネントである Fe-蛋白質 ((NifH)₂ ホモ二量体)は[4Fe-4S]型の鉄硫黄クラスターを保持し、触媒コンポーネントである MoFe-蛋白質 ((NifD)₂(NifK)₂ ヘテロ四量体)は P-cluster([8Fe-7S])および FeMo-cofactor (FeMoco; [Mo-7Fe-9S-X-homocitrate]) と呼ばれるユニークな金属中心を持つ。ニトロゲナーゼは分子状窒素(N₂)の三重結合を還元し、アンモニアを生成する反応を触媒する。DPOR は Pchlide の D 環の炭素間二重結合を還元し、Chlide を生成する。COR は Chlide の B 環の炭素間二重結合を還元し、3VBChlide を生成する。本研究では DPOR の還元コンポーネントである L-蛋白質((BchL)₂ ホモ二量体)と触媒コンポーネントである NB-蛋白質((BchN)₂(BchB)₂ ヘテロ四量体)がいずれも[4Fe-4S]型の鉄硫黄クラスターを保持することを明らかにした。

コンポーネントの精製とそれらによる DPOR 活性の再構成系について報告がなされていた⁹⁾。それによると、DPOR は 2 つのコンポーネント、L-蛋白質(BchL)と NB-蛋白質(BchN-BchB 複合体)から構成され、DPOR 活性は両コンポーネントに加え ATP と還元剤(ジチオナイト)に依存することが示されていた。ニトロゲナーゼとのアミノ酸配列の相同性および機能モチーフの保存に基づいて、L-蛋白質は ATP に依存した還元コンポーネントとして機能し、Pchlide 還元触媒部位を提供する触媒コンポーネント NB-蛋白質へと電子を供給することが示唆されていた。しかし、更なる生化学的解析に十分な量を精製することは困難であり、新たな大量発現系と迅速な蛋白質の精製が求められた。そこで私は、*R. capsulatus* において、解析に必要な充分量の精製蛋白質を簡便かつ効率よく得るために、新たなアフィニータグ(6xHN タグ、または Strep タグ)を付加した L-蛋白質および NB-蛋白質の大量発現系を構築した^{10,11)}。また、ニトロゲナーゼは著しく酸素感受性であることから、DPOR も酸素によって容易に不活化されることが推測された。そこで、各蛋白質を嫌気状態に保つため、嫌気チャンパー(図 3)を用いることで、さらなる DPOR コンポーネントの生化学的解析を行なった。

L-蛋白質の生化学的解析

嫌気条件下、ジチオナイト存在下で精製した L-蛋白質の吸収スペクトルを測定したところ、390 nm から 650 nm にかけてなだらかなピークを示し、際立ったピークは見られなかった(図 4 A trace a)。しかし短時間



図 3 嫌気チャンパー。この中は窒素、水素(1%)、二酸化炭素(5%)で充填されており、O₂ レベルが 1ppm 以下という嫌気状態が保たれている。DPOR、COR はニトロゲナーゼ同様、酸素感受性の酵素であるため、粗抽出液の調製、蛋白質の精製、活性測定など全ての操作をこの中で行なう。

空気に曝すと、およそ 410 nm を頂点とする吸収スペクトルの盛り上がりが見られた。(図 4 A trace b)。これらのスペクトルの特徴と変化は、様々な生物のニトロゲナーゼの Fe-蛋白質と酷似しており、L-蛋白質が Fe-蛋白質と同様の金属中心を持つことが示唆される^{12,13)}。さらに、この金属中心の性質を調べるため、還元型の L-蛋白質の EPR 測定を行った(図 4 B)。L-蛋白質は、[4Fe-4S]型の鉄硫黄クラスターに特有のシグナル $g=2.03, 1.94, 1.92$ を示した。これらの g 値は、様々なニトロゲナーゼの Fe-蛋白質とよく一致した。さらに、L-蛋白質の金属および硫黄定量を行った(表 1)ところ、Fe のみが有意な量検出された。L-蛋白質の酸素感受性を調べたところ、半減期約 20 秒で失活することがわかった(図 4 C)。ゲルろ過の挙動から BchL が二量体であることが確認されている¹⁰⁾ので、以上の

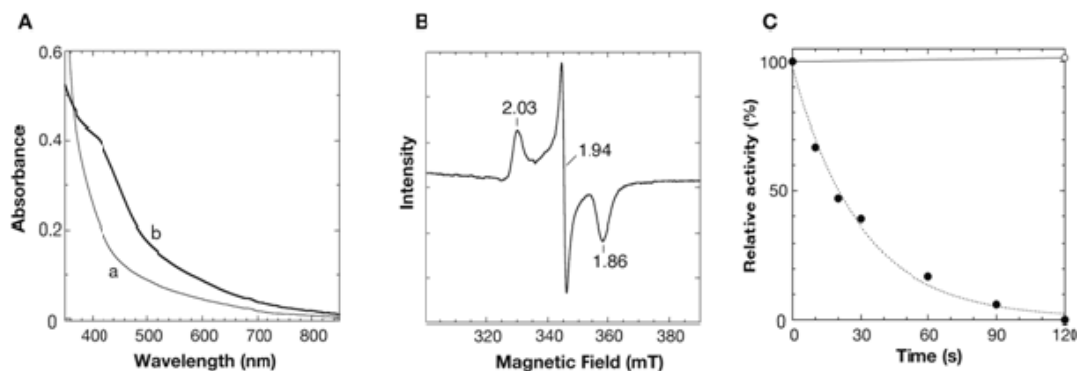


図 4 (A) 還元型 (trace a) および酸化型 (trace b) の L-蛋白質の吸収スペクトル。(B) 還元型 L-蛋白質の EPR スペクトル。グラフ中の数値は g 値を表す。(C) L-蛋白質の酸素感受性の検討(黒丸)。白い丸は対照実験として空気に曝していない L-蛋白質の活性を測定した。

結果から、L-蛋白質はニトロゲナーゼの Fe-蛋白質と同様に、酸素感受性の[4Fe-4S]型の鉄硫黄クラスターを一つ持つと結論した¹¹⁾。

NB-蛋白質の生化学的解析

R. capsulatus の大量発現株から精製した NB-蛋白質は明るい緑色を呈しており、その特徴的な吸収スペクトルから Pchl_{id}e を結合していると考えられる。遊離の Pchl_{id}e と吸収スペクトルを比較すると、NB-蛋白質と結合した Pchl_{id}e では、Soret、Q_x、Q_y ピークの吸収極大がいずれも長波長側へとシフトしていた。とくに Soret 吸収極大が 10 nm と大きく長波長にシフトしていた。これは、別の Pchl_{id}e 結合蛋白質である光依存型 Pchl_{id}e 還元酵素に結合した Pchl_{id}e では顕著な長波長シフトが Q_y ピークに認められることと、対照的である。NB-蛋白質の Pchl_{id}e 結合容量を調べたところ、NB-蛋白質 1 分子あたり 1 分子の Pchl_{id}e を結合していることが明らかとなった。NB-蛋白質に結合している

Pchl_{id}e は L-蛋白質と Mg²⁺、ATP、還元力の供給で速やかに (3 秒以内) Chl_{id}e a へと変換された。これらの性質は、NB-蛋白質が DPOR の触媒コンポーネントであるという考えと矛盾しない。次に、NB-蛋白質の持つ金属中心の種類を調べるため EPR スペクトルの測定を行なった。ジチオナイトによる還元条件下で、EPR シグナルは検出されなかった (図 5 B 青)。そこで、ジチオナイト存在下で、微量の L-蛋白質と Mg-ATP を添加しターンオーバー条件におくことにより、g=1.94 と 1.92 の弱いシグナルを観測することができた (図 5 B 赤)。この EPR スペクトルは、2 つの [4Fe-4S] 型の鉄硫黄クラスターを持つ典型的なフェレドキシン (例えば *R. capsulatus* の Fdx I)^{14,15)} の EPR スペクトルと類似している。NB-蛋白質に含まれる金属の定量を行ったところ、Fe のみが有意な量検出された (表 1)。また、酸遊離性の硫黄含量は Fe とほぼ同じレベルであった。別にゲルろ過での挙動から NB-蛋白質が (BchN)₂(BchB)₂-ヘテロ四量体から成ることが確認され

表 1 L-蛋白質、NB-蛋白質の金属および硫黄の定量。数値は各蛋白質 (L-蛋白質は(BchL)₂-二量体、NB-蛋白質は(BchN)₂(BchB)₂-ヘテロ四量体) 1 mol あたりに含まれる個数(mol)を表す。
 ND: not detected.
 *酸遊離性硫黄の定量は Timcenko らの方法に従って行なった¹⁷⁾。

	Co	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	V	Zn	S*
L-protein	ND	0.244	2.53	0.131	ND	0.067	0.209	0.031	3.1
NB-protein	ND	ND	7.23	0.116	ND	0.235	ND	0.023	7.2

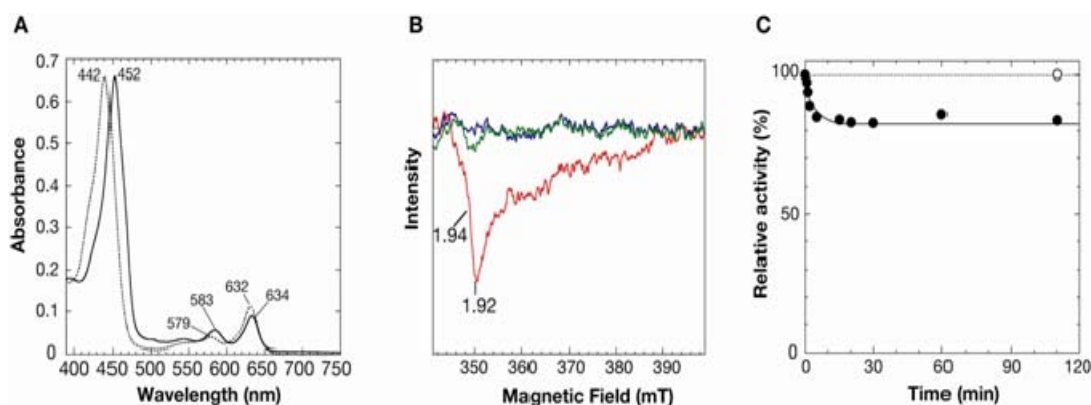


図 5 (A) NB-蛋白質(実線)と遊離の Pchl_{id}e(点線)の吸収スペクトル。(B) NB-蛋白質の EPR スペクトル。グラフ中の数値は g 値を表す。ジチオナイト存在下(青)と L-蛋白質、Mg、ATP 添加後(赤)および L-蛋白質のみ(緑)のスペクトル。(C) NB-蛋白質の酸素感受性の検討 (黒丸)。白い丸は対照実験として空気に曝していない NB-蛋白質の活性を測定した。

ている¹⁰⁾。従ってこれらの結果は、NB-蛋白質当たり2つの[4Fe-4S]型鉄硫黄クラスターが存在することを示唆している。NB-蛋白質の酸素感受性を調べたところ、空気に曝したNB-蛋白質はわずかに活性が低下したものの、2時間経っても80%の活性を維持しており、NB-蛋白質は酸素に対し安定であることが明らかとなった(図5C)。以上から、DPORのNB-蛋白質はニトロゲナーゼのMoFe-蛋白質と同様に基質の還元を行なう触媒コンポーネントと言う点で共通しているが、P-clusterやFeMo-co factorといった複雑な金属中心ではなく酸素に耐性のある[4Fe-4S]型の鉄硫黄クラスターを保持しており、ニトロゲナーゼのMoFe-蛋白質とは異なる性質を持つことが明らかになった¹⁶⁾。

以上のように、DPORはニトロゲナーゼと、ある部分では共通した複合体構造と反応機構をもつが、特に触媒コンポーネントには独自の構造と金属中心をもつことが明らかとなった。還元コンポーネントであるL-蛋白質は、金属中心、酸素感受性など、多くの点でFe-蛋白質とよく似ていた。一方、NB-蛋白質は金属中心、酸素感受性においてMoFe-蛋白質とは異なる性質を示した。一次構造の類似性から、DPOR、COR、ニトロゲナーゼは進化的起源を同じくしており、共通の祖先酵素から分岐したと考えられている²⁾。NB-蛋白質がMoFe-蛋白質に比ベシンプルな金属中心を持つことから、DPORは共通祖先酵素の性質を直接引き継いでいるのかもしれない。MoFe-蛋白質はその進化の過程でN₂還元を行なうためにP-clusterとFeMo-co factorという独自の金属中心を持つように独自の進化を遂げてきたと考えられる。NB-蛋白質の系統ではポルフィリンD環とクロリンB環を区別するような基質特異性を獲得し、各々NB-蛋白質とYZ-蛋白質となり、現在のBChl *a*の生合成系の最終段階を担うようになったと考えられる。今後はDPOR、COR、ニトロゲナーゼの比較生化学を行ない、MoFe-蛋白質との共通点、相違点の構造的基盤に迫りたい。

謝辞

本研究は名古屋大学生命農学研究科の藤田祐一准教授のもとで行なわれました。EPRスペクトルの測定は神奈川大学理学部の井上和仁教授、北島正治さん、小川拓郎さんとの共同研究により行なわれました。COR

の反応生成物3-ビニルバクテリオクロロフィリド *a*の同定は立命館大学の民秋均教授、溝口正講師との共同研究により行なわれました。また、金属定量は名古屋大学大学院生命農学研究科の渡辺彰准教授と宮本悦子さんの御協力を頂きました。本研究は、日本学術振興会のサポートを得て行なわれたものです。皆様に、深く感謝を致します。

参考文献

1. Scheer, H. (2006) An overview of chlorophylls and Bacteriochlorophylls: biochemistry, biophysics, functions and applications, in *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications* (Grimm, B., Porra, R. J., Rüdiger, W., and Scheer, H., Eds.) pp 1–26, Springer, Dordrecht.
2. Fujita, Y., and Bauer, C. E. (2003) The light-independent protochlorophyllide reductase: a nitrogenase-like enzyme catalyzing a key reaction for greening in the dark, in *Chlorophylls and Bilins: Biosynthesis, Synthesis, and Degradation* (Kadish, K. M., Smith, K. M., and Guilard, R., Eds.), Porphyrin Handbook, vol. 13, pp 109–156, Academic Press, San Diego.
3. Nomata, J., Mizoguchi, T., Tamiaki, H., and Fujita, Y. (2006) A second nitrogenase-like enzyme for bacteriochlorophyll biosynthesis: Reconstitution of chlorophyllide *a* reductase with purified X-protein (BchX) and YZ-protein (BchY-BchZ) from *Rhodobacter capsulatus*, *J. Biol. Chem.* 281, 15021–15028.
4. Burke, D. H., Alberti, M., and Hearst, J. E. (1993) The *Rhodobacter capsulatus* chlorin reductase-encoding locus, *bchA*, consists of three genes, *bchX*, *bchY*, and *bchZ*, *J. Bacteriol.* 175, 2407–2413.
5. Thorneley, R. N. F., and Lowe, D. J. (1985) Kinetics and mechanism of the nitrogenase enzyme system, in *Molybdenum Enzymes* (Spiro, T. G. Ed.) pp 221–284, Wiley-Intersciences, New York.
6. Fujita, Y. (1996) Protochlorophyllide reduction: a key step in the greening of plants, *Plant Cell Physiol.* 37, 411–421.
7. Armstrong, G. A. (1998) Greening in the dark: light-independent chlorophyll biosynthesis from

- anoxygenic photosynthetic bacteria to gymnosperms, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 43, 87–100.
8. Igarashi, R. Y., and Seefeldt, L. C. (2003) Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38, 351–384.
 9. Fujita, Y., and Bauer, C. E. (2000) Reconstitution of light-independent protochlorophyllide reductase from purified BchL and BchN-BchB subunits. In vitro confirmation of nitrogenase-like features of a bacteriochlorophyll biosynthetic enzyme, *J. Biol. Chem.* 275, 23583–23588.
 10. Nomata, J., Swem, L. R., Bauer, C. E., and Fujita, Y. (2005) Overexpression and characterization of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus*, *Biochim. Biophys. Acta* 1708, 229–237.
 11. Nomata, J., Kitashima, M., Inoue, K., and Fujita, Y. (2006) Nitrogenase Fe protein-like Fe-S cluster is conserved in L-protein (BchL) of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus*, *FEBS Lett.* 580, 6151–6154.
 12. Eady, R. R., Smith, B. E., Cook, K. A., and Postgate, J. R. (1972) Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*: Purification and properties of the component proteins, *Biochem. J.* 128, 655–675.
 13. Shah, V. K., and Brill, W. J. (1973) Nitrogenase IV. Simple method of purification to homogeneity of nitrogenase components from *Azotobacter vinelandii*, *Biochim. Biophys. Acta* 305, 445–454.
 14. Saeki, K., Suetsugu, Y., Tokuda, K., Miyatake, Y., Young, D. A., Marrs, B. L., and Matsubara, H. (1991) Genetic analysis of functional differences among distinct ferredoxins in *Rhodobacter capsulatus*, *J. Biol. Chem.* 266, 12889–12895.
 15. Naud, I., Meyer, C., David, L., Breton, J., Gaillard, J., and Jouanneau, Y. (1996) Identification of residues of *Rhodobacter capsulatus* ferredoxin I important for its interaction with nitrogenase, *Eur. J. Biochem.* 237, 399–405.
 16. Nomata, J., Ogawa, T., Kitashima, M., Inoue, K., and Fujita, Y. (2008) NB-protein (BchN-BchB) of dark-operative protochlorophyllide reductase is the catalytic component containing oxygen-tolerant Fe-S clusters, *FEBS Lett.* 582, 1346–1350.
 17. Timcenko, L., and Kimura, T. (1979) Liberation of labile sulfur from ferredoxins by alkaline zinc reagent: an appraisal of the methylene blue method, *Anal. Biochem.* 95, 452–457.