

2021 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

研究成果報告書

(1) 事業名 (下記より該当事業名を選択し、ほかは削除して下さい。)

共同研究員

(2) 研究代表者

氏名：伊藤 寿

所属機関名・部局名・職名：北海道大学・低温科学研究所・助教

(3) 研究課題名 (申請時に記載したものと同一課題名を記入して下さい。)

クロロフィルのマグネシウム脱離酵素の構造解析

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：田中秀明 (研究室名：蛋白質結晶学研究室)

(5) 研究成果の概要 (公開)

クロロフィルは閉環テトラピロール構造よりなり、中心にマグネシウムを持つ。クロロフィルの分解はマグネシウム脱離酵素によってこのマグネシウムが外され、プロトンと置換することにより始まる。このマグネシウム脱離酵素はクロロフィル分解の律速段階を触媒する酵素であり、クロロフィル分解を理解するうえで最も重要な酵素である。この酵素の候補遺伝子は、クロロフィル分解が抑制され、老化時にも緑色を維持する変異体の原因遺伝子として 2007 年に韓国のグループによって報告された。しかし、無細胞タンパク質翻訳系を利用して、植物の遺伝子の組み換えタンパク質の酵素活性が検出され、マグネシウム脱離酵素が最終的に決定されたのは 2016 年であった。植物の遺伝子の組み換えタンパク質が大腸菌で調製できなかつたことが時間のかかった原因である。

植物のマグネシウム脱離酵素と相同な遺伝子がバクテリアにも存在していた。そこでこの遺伝子を大腸菌で発現させたところ、活性のある組換えタンパク質が大量に発現した。バクテリアの遺伝子であったため大腸菌で発現できたと思われる。そのような中でも特に *Anaerolineae bacterium* 由来の遺伝子の組み換えタンパク質が安定であり、研究材料として優れていた。これにより、マグネシウム脱離酵素の構造解析を現実的な課題とすることができるようになった。マグネシウム脱離酵素は新規なタンパク質であり、その構造は不明である。そのため、ホモロジーモデリングから構造を予測することができず、結晶化と構造の決定が、この酵素の機能を理解するためには必要である。

バクテリアである *Anaerolineae bacterium* のマグネシウムと相同な遺伝子を発現ベクターにクローニングし、大腸菌で発現した。その後ニッケルカラムにより精製し、さらにゲル濾過により精製した。このタンパク質の結晶が得られたので、X 線回折像をもとにした分子置換による構造解析を進めている。

Anaerolineae bacterium の遺伝子の組み換えタンパク質を利用して、生化学的な分析も進めている。植物を含めた、マグネシウム脱離酵素と相同性のあるタンパク質のアミノ酸配列を比較し、保存されているアミノ酸の置換体を作製した。その結果、アミノ酸置換により組み換えタンパク質が不溶化してしまうものと、不溶化はしないが活性が失われるものが得られた。これらの結果を通して構造の維持に必要なアミノ酸と触媒反応に必要なアミノ酸が明らかになった。これまでに分析の進んでいる結晶構造とアミノ酸置換体の性質、および酵素と基質のドッキングシミュレーションを総合したところ、タンパク質の酸性アミノ酸の側鎖が基質のクロロフィルに結合してマグネシウムを外していることが予想された。