

光捕集アンテナ系クロロゾームを構築するバクテリオクロロフィル類の 生合成段階で働く酵素 BciC の基質特異性とその反応機構の解明

廣瀬 光了*¹, 原田 二郎*², 柏山 祐一郎*³, 民秋 均*⁴

Elucidation of Substrate Specificity and Mechanism for BciC Enzymatic Reactions in the Biosynthetic Pathway of Self-Aggregative Bacteriochlorophylls in Light-Harvesting Antenna Systems

Mitsuaki HIROSE*¹, Jiro HARADA*², Yuichiro KASHIYAMA*³, Hitoshi TAMIAMI*⁴

ABSTRACT : Green photosynthetic bacteria, one of chlorophotosynthetic species, have the largest and most efficient light-harvesting antenna systems (chlorosomes). The core part of chlorosomes comprises special bacteriochlorophyll-*c/d/e* pigments, which self-aggregate to form large oligomers. In the biosynthetic pathway of these pigments, a BciC enzyme catalyzes the removal of C13²-methoxycarbonyl group of chlorophyllide-*a*. The substrate specificities of *in vitro* BciC enzymatic reactions for the central metal and C13²-alkoxycarbonyl group, and the reaction mechanism were elucidated in the molecular level. The BciC would bind to the central metal to form the stereospecific complex. Additionally, the cavity in the active site of the BciC was predicted to be smaller than molecular size of zinc chlorophyll derivative bearing a propyl-esterifying group. Most importantly, the BciC would catalyze two-step reaction via hydrolysis by E85/D180 and decarboxylation by H137.

Keywords : biosynthesis, chlorophyll, chlorosome, enzyme, photosynthesis, self-aggregation

1. 緒言

光合成とは、光励起電子供与によって高エネルギー化合物を合成すると同時に、その反応に使われた電子を様々な電子源から補うエネルギー変換系である^{1,2}。光合成を行う生物の中には、水を電子源とする酸素発生型光合成生物と、硫化水素や水素ガス、さらには有機物を電子源として酸素を発生させない酸素非発生型光合成生物が存在する²。これらの生物が行う光合成初期過程では、太陽光の吸収と励起エネルギーの伝達を行う光捕集アンテナと電荷分離を行う反応中心(RC)に分けられる。この光捕集アンテナ系は、化学量論的にRCと結合するコアアンテナと、その回りに連結したペリフェラルアンテナに

分類される。紅色光合成細菌での対応するアンテナ系 Light-Harvesting (LH) 1 と LH2 は、どちらもリング状のタンパク質集合体を基盤としてバクテリオクロロフィル (BChl) 分子やカロテノイドといった色素分子が規則正しく配列している (図 1A, B)^{3,4,5}。このタンパク質と色素分子の相互作用による配列が、効率的な光捕集系を実現している。一方で、タンパク質による相互作用を基盤としない光捕集アンテナ系も緑色光合成細菌には存在する。それらはクロロゾームと呼ばれ、特殊な BChl 分子である BChl-*c/d/e* のいずれかだけで自己会合体を形成する (図 2)^{6,7}。この自己会合体の形成することが、光捕集の効率が極めて高い理由の 1 である。また、この自己会合体は、生体外で人工的に構築することもできる⁸⁻¹¹。

緑色細菌のクロロゾームで自己会合体形成を行う色素 BChl-*c/d/e* と、酸素発生型光合成生物でエネルギー移動や電荷分離に関わる色素クロロフィル (Chl-*a*) 分子には、化学構造上に大きな違いが 2 つ存在する。1 つ目が 3 位置換基に水酸基を有していることである (図 3)。この水酸基の酸素原子は他の分子の中心金属マグネシウムと配位

*1 : 成蹊大学理工学部理工学科 助教
(mitsuaki-hirose@st.seikei.ac.jp)

*2 : 久留米大学医学部 講師

*3 : 福井工業大学環境学部 教授

*4 : 立命館大学大学院生命科学研究科 教授

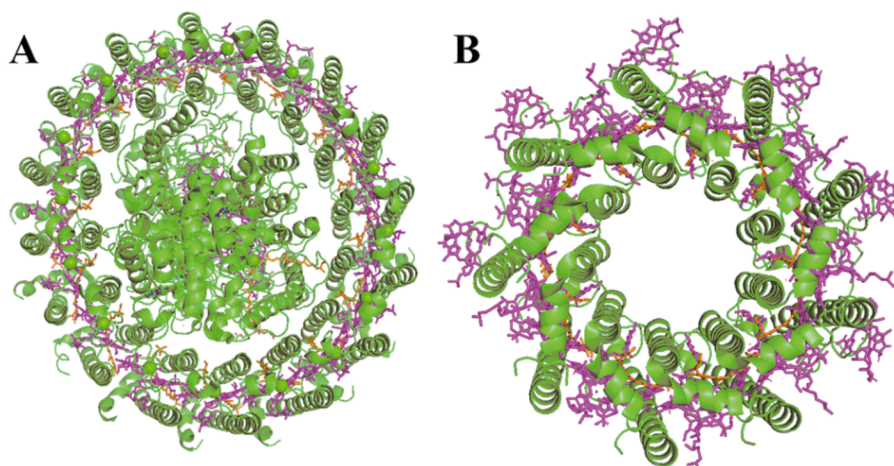


図 1. (A) *Thermochromatium tepidum* 由来の LH1-RC 複合体の結晶構造 (PDB ID : 3WMM) と (B) *Rhodospseudomonas palustris* 由来の PucA-LH2 複合体のクライオ電子顕微鏡構造 (PDB ID : 7ZCU)。基盤となるタンパク質、BChl 類、カロテノイド類はそれぞれ緑、紫、橙で示す。

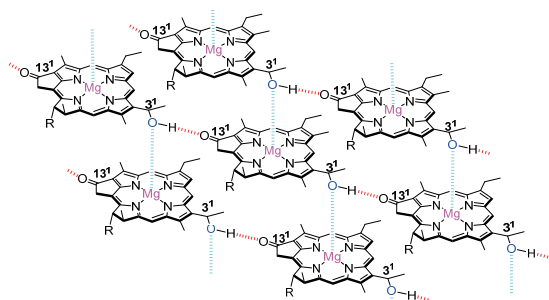


図 2. BChl-*d* 分子 ($R^{17} = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO-farnesyl}$) による自己会合体の模式図。自己会合体は水素結合、配位結合、クロリン環同士の π - π 相互作用を駆動力としている。

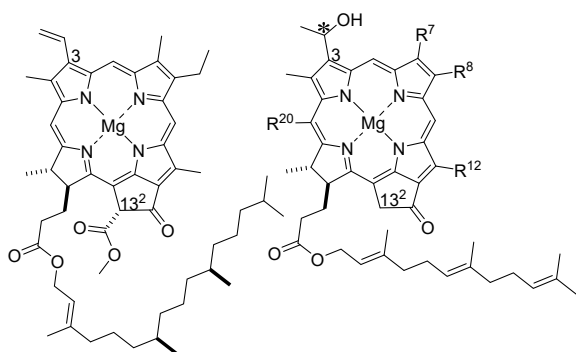


図 3. Chl-*a* (左) と BChl-*c/d/e* 同族体 (右) の化学構造。
 BChl-*c* : $R^7 = R^{20} = \text{CH}_3$; BChl-*d* : $R^7 = \text{CH}_3$, $R^{20} = \text{H}$; BChl-*e* : $R^7 = \text{CHO}$, $R^{20} = \text{CH}_3$; $R^8 = \text{CH}_2\text{CH}_3/\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3/\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2/\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$; $R^{12} = \text{CH}_3/\text{CH}_2\text{CH}_3$ 。アスタリスク (*) は 3' 位の不斉炭素原子を示す。

結合、並びにその水酸基はもう 1 分子の 13 位ケトカルボニル基と水素結合を形成することで、自己会合体の構築に貢献している (図 2)。2 つ目は、13² 位のメトキシカルボニル基が欠如していることである (図 3)。これにより、13 位のケト基周りの立体障害が低減し、上述の水酸基とケト基の水素結合がしやすくなる¹²。このように、周辺置換基が異なる (B)Chl 類が、様々な酵素による位置・立体選択的な反応を介して生合成されることで、光合成機能の発揮に繋がっている¹³。本論文では、光捕集アンテナを構築する BChl-*c/d/e* 分子の生合成経路に関わる酵素 BciC に焦点を当てて、その基質特異性とその反応機構について記述する。

2. BciC 酵素反応と中心金属の効果

BChl-*c/d/e* の生合成過程で働く酵素 BciC は生合成中間体クロロフィリド (Chlide) -*a* の 13² 位のメトキシカルボニル基の脱離を触媒する (図 4, $M = \text{Mg}$, $R = \text{H}$)^{14,15}。この BciC 酵素が働くことで、BChl-*c/d/e* への生合成経路に分岐される。つまり、BciC 酵素は (B)Chl 分子の生合成経路の分岐点で働く重要な酵素である。

本節では、中心金属を変換した Chl-*a* 誘導体 (図 4, $M = \text{Zn/Ni/Cu}$, $R = \text{CH}_3$) を合成し、それらを基質として用いて生体外における BciC 酵素反応を行ったときの基質特異性について言及する。また、このときの BciC 酵素は、大腸菌で大量発現させた後にライセートした溶液を用いた。さらに、天然型の Chl 中間体は、化学的に不安定であり、取り扱いが困難である。そこで 17 位上のプロピオネート残基のカルボキシ基をメチル基へと変換したモデル体を基本骨格とした ($R = \text{H} \rightarrow \text{CH}_3$)。

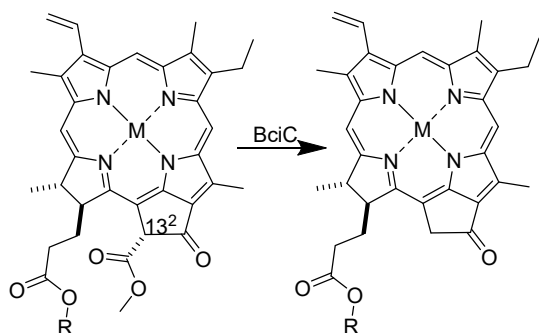


図4. BciC酵素による13²位脱メトキシカルボニル化反応。Chlide-a: M = Mg, R = H; Chlide-a誘導体: M = Zn/Ni/Cu, R = CH₃。

生体外でBciC酵素反応を行った結果、その酵素反応性はZn錯体が最も高く、Ni錯体が中程度で、Cu錯体が最も低かったことが判明した¹⁶。この酵素反応性の差異を説明するため、ベンゼン溶液中におけるピリジン滴下による紫外可視吸収スペクトルの変化を観察した。この時、ピリジンと金属錯体は1:1で5配位の錯体であると仮定し、錯体形成定数を算出した。亜鉛とニッケル錯体は、それぞれ20,000 M⁻¹と5 M⁻¹であると決定された。一方、銅錯体は軸配位能が低く、紫外可視吸収スペクトルの変化は見られなかったため、錯体形成定数を見積もることはできなかった。以上より、金属錯体の軸配位の強さはZn > Ni > Cuという順序であることが判った。さらに、この軸配位能の強さの順序は、BciC酵素反応性の順序と一致していた。このことから、BciC酵素は基質の中心金属の軸配位能を介して認識していると考えた。また、同じBChl-*c/d/e*の生合成経路で働くBchU酵素の結晶構造解析の結果から、ヒスチジンが中心金属に配位していることが判っている¹⁷。この結果と合わせると、BciC酵素の活性中心では、ヒスチジン残基のイミダゾリル基のような金属配位が可能なアミノ酸残基が、酵素活性や基質-酵素複合体の安定化に関与していることが考えられた。

3. 13²位の置換基に対する基質特異性

BciC酵素はChlide-aの13²位のメトキシカルボニル基を脱離する触媒である。そのため、反応点に近いと思われる13²位の周辺の置換基を化学修飾した基質を用いたBciC酵素の基質特異性の解明を目指した。この本節では、天然型のメトキシカルボニル基のメチル基よりも炭素数が伸長されたエトキシカルボニル基(炭素数2)とプロポキシカルボニル基(炭素数3)について言及する(図5, m = 0, n = 1/2/3, R = CH₃)。前節で、中心金属がZn、17位上のプロピオネート残基がメチル基へ変換された基質は、

BciC酵素反応を進行させることが判った。この結果に基づいて、メチルエステルの亜鉛錯体を基質として用いることにした。

13²位に炭素数を1つ伸長したエトキシカルボニル基を用いてBciC酵素反応を行った場合、酵素反応の進行が確認された(図5上段, m = 0, n = 2, R = CH₃)。興味深かったことに、そのBciC酵素反応性はメトキシカルボニル基(炭素数1)の時とほぼ同じであった(m = 0, n = 1, R = CH₃)¹⁸。これは、BciC酵素が反応する13²位上のオキシカルボニル基と中心金属との距離が変化しなかったためであると考えられた。一方で、炭素数を2つ伸長したプロポキシカルボニル基を用いた場合には、酵素反応の進行は確認できなかった。まとめると、この13²位のアルコキシカルボニル基に対する酵素反応性は、CH₃ ≈ CH₂CH₃ >>> (CH₂)₂CH₃の順になった。このことから、BciC酵素の活性中心には、エステル鎖が炭素数3未満のChl-a誘導体までが収容できることが予想された。

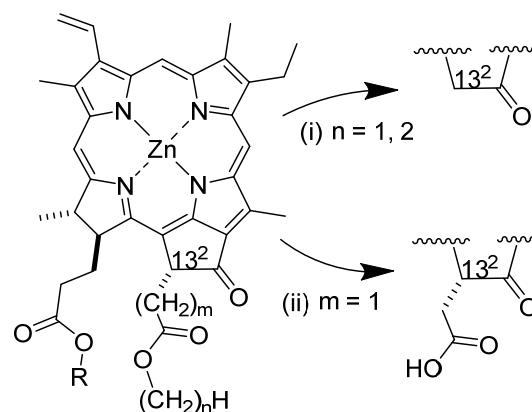


図5. 13²位の官能基を置換したChl-a誘導体のBciC酵素反応。m = 0/1, n = 1/2/3, R = H/CH₃。

4. BciC酵素機能の解明

BciC酵素による反応機構には、2通りの説が存在していた。それは1段階的な脱メトキシカルボニル化が進行するというものと、2段階的な脱メトキシカルボニル化が進行するというものである。その反応機構を調べた研究から、1段階的な反応であると予想されていた¹⁵。本節では、前節で絞りこんでいた13²位におけるBciC酵素反応の基質特異性の範囲内で、BciC酵素の反応機構を解明できる基質を考案した¹⁹。それは、13²位にメチレンが挿入されたChl-a誘導体である(図5, m = 1, n = 1, R = H)。この基質を用いたBciC酵素反応を生体外で行うと、脱メトキシカルボニル化された生成物は検出されず、13²位上にカルボキシ基を有する生成物が検出された(図5下段)。

このことから、BciC酵素反応による脱メトキシカルボニル化は加水分解反応を経由していることが示された。この結果はこれまでの予想と異なり、BciC酵素が2段階的な反応で行われていることを実証した。この時の反応機構は以下のように推定された。まずBciC酵素反応がメトキシカルボニル基を加水分解してカルボン酸を産生させる。その生成された β -ケトカルボン酸は、化学的安定性が低いため熱分解(自発的な脱炭酸反応)を起こす。結果として、脱メトキシカルボニル化生成物が得られる。

5. 活性中心内に存在するアミノ酸残基を含めた反応機構

前節でBciC酵素が加水分解酵素であることが判明した。そこで、この加水分解反応機構を分子レベルで解明すべく、計算科学の分野と組み合わせて、BciC酵素の3次元構造モデルの作製を行った^{20,21}。そこから、基質と予想構造のDocking-Simulationを行い、酵素活性中心にかかわるアミノ酸残基の候補を予想した²²。ここでは8つのアミノ酸残基(Y58, N81, E85, H126, W130, H137, H176, D180)が挙げられた。さらに、それらのアミノ酸残基を、それぞれアラニンに変換した変異型BciC酵素を作製し、生体外で酵素反応を行った²³。すると、8つのうち、7つのアミノ酸残基(N81, E85, H126, W130, H137, H176, D180)では¹³位脱メトキシカルボニル化生成物の検出量が大幅に減少し、検出限界値以下となった。興味深いことに、H137A BciC酵素反応では、¹³位がカルボン酸

となった生成物が検出された(図6)。この結果から、BciC酵素は加水分解だけでなく、脱炭酸反応も触媒する2重機能性を有することが示唆された。ここからは、加水分解と脱炭酸の反応機構について議論する。

まずは加水分解反応機構について議論する。現在、発見されている加水分解酵素は6種類ある。セリン/システイン/トレオニン/アスパラギン酸/グルタミン酸/金属加水分解酵素である²⁴。これら酵素名は、触媒活性を示すときに用いられるアミノ酸残基から命名されている。今回、BciC酵素の活性中心にはセリン/システイン/トレオニン残基は観測されなかった。ゆえに、BciC酵素はアスパラギン酸/グルタミン酸加水分解酵素、もしくは金属加水分解酵素の3つに絞られる。もし、アスパラギン酸/グルタミン酸加水分解酵素であるならば、アラニンへの変異で不活性化したアスパラギン酸残基D180とグルタミン酸残基E85を1つずつ利用したハイブリット型の加水分解酵素であるだろう。もし、金属加水分解酵素であるならば、N81, E85, H176, D180が金属配位に関与しているだろう。まずアスパラギン酸/グルタミン酸加水分解酵素であるかどうかを確かめるため、同様の極性アミノ酸残基に変換したE85DとD180E型BciCを作製し、酵素活性を確認したところ、目的生成物がいくらかは検出された。一方で、金属加水分解酵素であるかどうかを確かめるため、N81, E85, H176, D180のそれぞれをアラニンに変換した変異型BciCを作製し、 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} のいずれかの金属イオンを加えて²⁵、酵素活性が回復するかを調べた。結果として、酵素活性の回

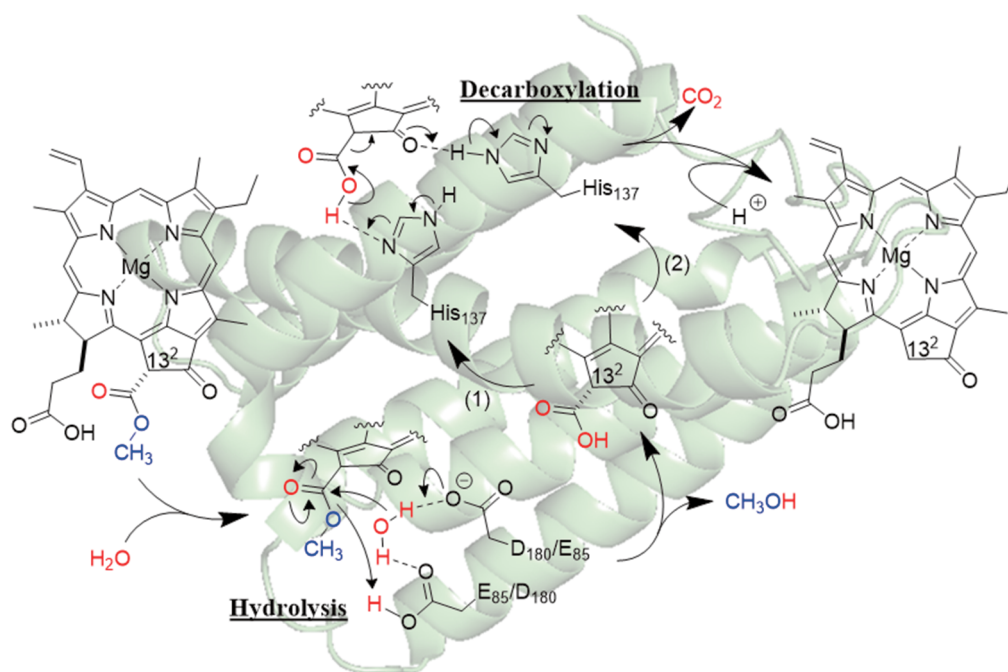


図6. 提唱されたBciC酵素による2重機能性の反応機構。

復は確認できなかった。さらに、金属加水分解酵素によく確認されるHEXXHモチーフもBciC酵素の1次配列には観測されなかった。以上より、BciC酵素はアスパラギン酸/グルタミン酸加水分解酵素のような反応機構であると暫定的に決定した(図6)。

次に脱炭酸反応機構について議論する。 β -ケトカルボン酸は酵素反応条件(pH 7.0)下では、酵素外ではアニオン型(カルボキシレート)であると考えられる²⁶。ゆえに、前述のようにH137A BciCでは自発的な脱炭酸反応が進行せず、中間体が得られたと考えた。そこで、この脱炭酸反応は酵素内で進行したと考えた。H137が脱炭酸に必要なであることが判っていたので、BciC酵素による脱炭酸反応機構として次の2通りを考えた(図6)。(1) H137残基が加水分解後、直ちに 13^2 -COOHからプロトンを受け取ることで、 13^2 位の脱炭酸反応が進行する。(2) H137残基が13位のケト基をプロトン化することで脱炭酸反応を促進させる。しかし、どちらの反応機構で脱炭酸反応が進行するかを決定することはできなかった。

6. 結語

今回は光捕集アンテナ系の1種であるクロロゾームを構築する色素BChl-*c/d/e*の生合成経路で働くBciC酵素に着目した。先行研究の結果とも合わせることで、その基質特異性と反応機構を分子レベルで解明してきた^{16,18,19,23,27-29}。そのBciC酵素は、中心金属を認識するアミノ酸残基を有する可能性がある。また 13^2 位に対する基質特異性の範囲は、炭素数3つのプロポキシカルボニル基を有するChl-*a*誘導体の分子サイズ未満であった。そして、BciC酵素は加水分解と脱炭酸の二重機能性を有しており、それぞれの反応機構にはE85/D180とH137が関与していると思われる。このBciC酵素の反応機構の全貌を解明するためには、基質Chlide-*a*とBciC酵素の複合体を結晶構造解析/クライオ電子顕微鏡解析することが必要となる。

謝辞

本稿で紹介した研究内容は、筆頭著者が学生時代に、共著者の先生方の協力・指導を受けて行った研究である。本研究を進めるにあたり、機器装置の使用、助言や議論などを下さった共著者の先生方、立命館大学 民秋 均教授、久留米大学 原田 二郎 講師、福井工業大学 柏山 祐一郎 教授、並びに立命館大学 前田大光教授、立命館大学総合科学技術研究機構 溝口 正 教授、小笠原 伸 教

授、海洋研究開発機構 塚谷祐介 博士、立命館大学生命科学部 木下雄介 助教(現早稲田大学 助教)、立命館大学 博士研究員 庄司 淳 博士(現奈良女子大学 助教)、立命館大学生命科学研究科 寺村美里 博士、松原翔吾 博士(現名古屋工業大学 助教)、篠崎喜脩 博士、中野健史 博士(現信州大学 助教)、原 伸行 博士に厚く御礼申し上げます。重ねて、立命館大学生物有機化学研究室の卒業生および在学生の皆様へ感謝します。

参考文献

- (1) 嶋山敬三, 高市真一(嶋山敬三, 高市真一 編集), 光合成細菌-酸素を出さない光合成-, 裳華房 (2020).
- (2) 垣谷俊昭, 三室守, 民秋 均(三室守 編集), クロロフィル-構造・反応・機能-, 裳華房 (2011).
- (3) S. Niwa, L.-J. Yu, K. Takeda, Y. Hirano, T. Kawakami, Z.-Y. Wang-Otomo, K. Miki, *Nature* **2014**, *508*, 228–232.
- (4) J. Koepke, X. Hu, C. Muenke, K. Schulten, and H. Michel, *Structure* **1996**, *4*, 581–597.
- (5) P. Qian, C. T. Nguyen-Phan, A. T. Gardiner, T. I. Croll, A. W. Roszak, J. Southall, P. J. Jackson, C. Vasilev, P. Castro-Hartmann, K. Sader, C. N. Hunter, R. J. Cogdell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2022**, *119*, e2210109119.
- (6) H. Tamiaki, Chlorophylls. In *Fundamentals of Porphyrin Chemistry: A 21st Century Approach*; P. J. Brothers, M. O. Senge, Eds.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2022; ch. 17, pp 743–776.
- (7) S. Matsubara, H. Tamiaki, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2020**, *45*, 1000385.
- (8) S. Shoji, T. Ogawa, T. Hashishin, S. Ogasawara, H. Watanabe, H. Usami, H. Tamiaki, *Nano Lett.* **2016**, *16*, 3650–3654.
- (9) S. Matsubata, H. Tamiaki, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 1207–1211.
- (10) T. Miyatake, K. Okada, Y. Yamamoto, R. Hirai, R. Inoue, T. Imai, H. Tamiaki, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2020**, *400*, 112683.
- (11) T. Ishii, S. Matsubara, H. Tamiaki, *Chem. Comm.* **2023**, *59*, 1967–1970.
- (12) H. Tamiaki, *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *148*, 183–197.
- (13) D. A. Bryant, C. N. Hunter, M. J. Warren, *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 6888–6925.
- (14) Z. Liu, and D. A. Bryant, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 22393–22402.

- (15) M. Teramura, J. Harada, T. Mizoguchi, K. Yamamoto, H. Tamiaki, *Plant Cell Physiol.* **2016**, *57*, 1048–1057.
- (16) M. Hirose, M. Teramura, J. Harada, H. Tamiaki, *ChemBioChem* **2020**, *21*, 1473–1480.
- (17) K. Wada, H. Yamaguchi, J. Harada, K. Niimi, S. Osumi, Y. Saga, H. Oh-oka, H. Tamiaki, K. Fukuyama, *J. Mol. Biol.* **2006**, *360*, 839–849.
- (18) M. Hirose, M. Teramura, J. Harada, S. Ogasawara, H. Tamiaki, *Bioorg. Chem.* **2020**, *102*, 104111.
- (19) M. Hirose, J. Harada, H. Tamiaki, *Biochemistry*, **2020**, *59*, 4622–4626.
- (20) J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Židek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A. Kohl, A. J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A. W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, D. Hassabis, *Nature* **2021**, *596*, 583–589.
- (21) M. Mirdita, K. Schütze, Y. Moriwaki, L. Heo, S. Ovchinnikov, M. Steinegger, *Nat. Methods* **2022**, *19*, 679–682.
- (22) O. Trott, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **2009**, *31*, 455–461.
- (23) M. Hirose, J. Harada, Y. Kashiyama, H. Tamiaki, *Biochemistry* **2023**, *62*, 1443–1451.
- (24) M. Nacem, S. Manzoor, M.-U.-H. Abid, M. B. K. Tareen, M. Asad, S. Mushtaq, N. Ehsan, D. Amna, B. Xu, A. Hazafa, *J. Fungi.* **2022**, *8*, 109.
- (25) M. S. Finnin, J. R. Donigian, A. Cohen, V. M. Richon, R. A. Rifkind, P. A. Marks, R. Breslow, N. P. Pavletich, *Nature* **1999**, *401*, 188–193.
- (26) Y. Chiang, A. J. Kresge, V. A. Nikolaev, V. V. Popik, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11183–11190.
- (27) M. Teramura, J. Harada, H. Tamiaki, *Photosynth. Res.* **2019**, *139*, 163–171.
- (28) M. Hirose, J. Harada, H. Tamiaki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, *40*, 127931.
- (29) M. Hirose, J. Harada, H. Maeda, H. Tamiaki, *Tetrahedron* **2021**, *88*, 132151.