

BL-1A, BL-5A, BL-17A, AR-NE3A, AR-NW12A/2011G519

シアノバクテリア由来フェレドキシン依存性ビリル還元酵素 PcyA の水素原子を同定する試み

Efforts for Visualization of Hydrogen Atoms in Ferredoxin-dependent Bilin Reductase PcyA from Cyanobacteria

海野昌喜^{1,2*}, 石川久美子^{1,2}, 石原真樹子¹, 日下勝弘¹, 和田啓^{3,4}, 杉島正一⁵,
萩原義徳⁶, 玉田太郎⁷, 伊中浩治⁸, 黒木良太⁷, 福山恵一³

¹茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター, 〒319-1106 那珂郡東海村白方 162-1

²茨城大学大学院理工学研究科, 〒310-8512 水戸市文京 2-1-1

³大阪大学理学部, 〒560-0043 豊中市待兼山町 1-1

⁴宮崎大学テニュアトラック推進機構, 〒889-1692 宮崎市清武町木原 5200

⁵久留米大学医学部, 〒830-0011 久留米市旭町 67

⁶久留米工業高等学校専門学校, 〒830-8555 久留米市小森野 1-1-1

⁷ (独) 日本原子力研究開発機構, 〒319-1195 那珂郡東海村白方白根 2-4

⁸丸和栄養食品株式会社, 〒639-1123 大和郡山市筒井町 170-1

Masaki Unno^{1,2*}, Kumiko Ishikawa^{1,2}, Makiko Ishihara¹, Katsuhiko Kusaka¹, Kei Wada^{3,4}, Masakazu Sugishima⁵, Yoshinori Hagiwara⁶, Taro Tamada⁷, Koji Inaka⁸, Ryota Kuroki⁷, and Keiichi Fukuyama³

¹iFRC, Ibaraki University, 162-1 Shirakata, Tokai, Naka 319-1106, Japan

²Graduate School of Science and Engineering of Ibaraki University, 2-1-1 Bunkyo, Mito 310-8512, Japan

³School of Science of Osaka University, 1-1 Machikaneyama, Toyonaka 560-0043, Japan

⁴Organization for Promotion of Tenure Track, University Miyazaki, 5200 Kihara, Kiyotake-cho, Miyazaki 889-1692, Japan

⁵School of Medicine, Kurume University, 67 Asahi-machi, Kurume 830-0011, Japan

⁶Kurume National College of Technology, 1-1-1 Komorino, Kurume 830-8555, Japan

⁷JAEA, 2-4 Shirakata-shirane, Tokai, Naka 319-1195, Japan

⁸Maruwa Foods & Biosciences, inc, 170-1 Tsutsui, Yamatokoriyama, 639-1123, Japan

フェレドキシン依存性ビリル還元酵素は、フェレドキシンから電子を受け取り、ヘムオキシゲナーゼによるヘム分解産物ビリベルジンを還元して、色素を合成する酵素である。このプロジェクトでは、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 由来の PcyA による、フィコシアノビルン生合成反応の機構を「水素原子レベル」で明らかにするために、中性子結晶構造解析を目指している。Photon Factory の利用により、中性子回折実験に供するのに値する、大型且つ良質な結晶を得ることに成功したので報告する。

1 はじめに

開環テトラピロール骨格（ビリル）を持つ phytyobilin（フィコビリルンやフィトクロモビリルン）は、光合成生物において光をエネルギーに変換する光合成色素としてのみならず、様々な生理機能を制御する光受容体色素としても用いられる重要な化合物群である。シアノバクテリアにおける phytyobilin の一つ、フィコシアノビルンは、ヘムオキシゲナーゼによるヘムの開環で生じるビリベルジン IX α (BV) がフェレドキシン (Fd) 依存的に酵素 phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase (PcyA) によって還元され生成する。

PcyA は、BV の D 環ビニル基を 2 電子還元し、中間体 18¹,18²-dihydrobiliverdin (18EtBV) を生成し、次に A 環を 2 電子還元して最終生成物 3Z/3E-phytyocyanobilin (3Z/3E-PCB) を合成する (図 1)。PcyA 反応の特徴は、BV の二箇所に位置選択的 2 電子供与・2 水素添加し、しかもこの二段階反応が一定の順序で起こる点にある。PcyA の反応機構の解明には「立体的な」水素位置を同定することは極めて重要である。

PcyA-BV の X 線結晶構造解析からは、基質 BV の D 環近傍に存在する Glu76 と Asp105 がビニル基のプロトン化に関与すること、また D 環ビニル基還元後の A 環へのプロトン供給は、近傍に現れる水分子

が関与することが示唆されていた。PcyA-18EtBV 複合体の X 線構造情報からも、D 環ビニル基の還元には Glu76 のカルボキシル基とビニル基との（水素結合にしては近すぎる）特異な結合が関与している事が浮かび上がり、D 環還元後に Glu76 が大きく構造変化すると共に、分子表面から A 環に至る水素結合ネットワークに微小な構造変化が見られた。

PcyA の反応機構については、主に生化学・分光学的な手法を用いて研究されてきた。それらの中に、酵素に結合した BV のラクタム (-HN-C=O) 構造がラクチム (-N=C-OH) 構造になっており、それが反応性とも関与するという示唆や、BV が酵素に結合するとピロール環がすぐにプロトン化を受け BVH⁺ になっているという報告もある。特に、PcyA の場合、活性に関連する二つのアミノ酸 Glu76 と Asp105 が二重のコンフォメーションを取っており、X 線解析で水素を見るのは、相当に難しいと考えている。

2 実験

PF では、主に、中性子構造解析・大型結晶生成に適した結晶化条件確定のための予備実験を行った。具体的には、結晶の X 線回折実験を行い、その Wilson Plot を描き、温度因子を見積もっていった。温度因子が小さいほど、良質の結晶だと判断し、その条件で、結晶はより大きく成長すると考えた。

当初は低温（100 K）で回折実験を行っていたが、Wilson Plot が凍結条件など、結晶化条件以外にも左右されてしまうので、常温でも回折実験を行った。

また、それとは別に、宇宙空間での結晶化を試みた。計三回の宇宙実験を行った。

結晶大型化は、1. 蛋白質濃度を上げ、沈殿財濃度をできるだけ下げる。2. シーディング 3. ドロップを大容量にする。4. 緩衝液の種類と pH を検討する、ということを中心に条件を振っていった。

3 結果および考察

今年になり、まず、市販されている BV のロットによる結晶の出やすさの違いを認識した。新しい BV では、pH はやや低いところで良質の結晶が得られることが分かった。

宇宙実験は三回行ったが、残念ながら、そのうち二回は回折実験に供する結晶を得られなかった。また、結晶を得られた一回分のもも、地上実験で得た結晶と同等以上の質の結晶にはなっていなかった。

結晶化には当初、緩衝液としてカコジル酸を用いていたが、それが毒物指定されているため、宇宙実験との絡みもあり、MES に変更した。変更後でも結晶性には問題は生じていない。最終的には、緩衝液として MES を用い pH が 5.9~6.3 の周辺での条件で大型の結晶を得るに至った。

ハンプトンリサーチ社のシッティングドロップ用ブリッジを 24 穴の細胞培養プレートに入れて、結晶化ドロップの総量を 50 μ L とした時に、最大の結晶を得ている。4mM BV 615 μ L + 120mg/ml

(4.2mM) PcyA 550 μ L の混合比で、オーバーナイトで再構成を行った複合体試料（今までに再構成にかけてきた時間より相当長い時間をかけたもの）が、最も良い結晶を生成した。

最大 2 mm³ 程度の結晶を得ており（図 2）、J-PARC（東海村）の回折装置 iBIX で中性子回折強度データを取得することに成功した。

また、中性子回折実験時前に重水素化した、同じ結晶化ドロップにあった小さな結晶で、常温における X 線回折実験を行い、2.0 \AA の回折データを得ている。

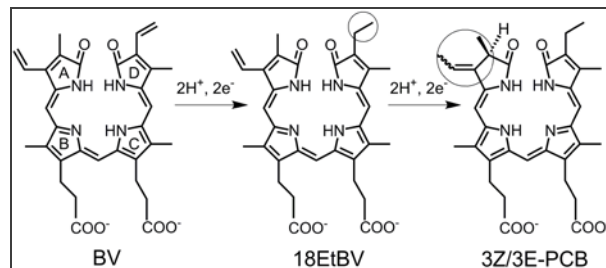


図 1 : PcyA の触媒する反応

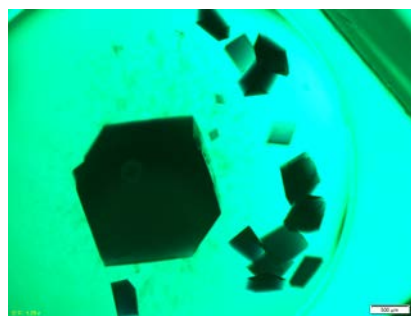


図 2: PcyA-BV の大型結晶（右下バーは 0.5mm）

4 まとめ

PcyA-BV 複合体について、中性子回折実験を行うことに成功した。今後は構造解析を進めていく。また、その次の中間体 18EtBV と PcyA の複合体の中性子構造解析を引き続き目指していく。

謝辞

本研究は、科学研究費補助金、若手研究(B)(22770096)、基盤(C)(24571022)の元、行われている研究である。また JAXA には宇宙実験で大変お世話になったので、この場で感謝いたします。

参考文献

- [1] Y. Hagiwara *et al.*, *PNAS* **103**, 27 (2006).
- [2] M. Unno *et al.*, *Integrating Approach to Photofunctional Hybrid Materials for Energy and the Environment* (Nova Publishers Inc., NY, T. Akitsu ed.) pp. 47-67

* unno19@mx.ibaraki.ac.jp