

フェレドキシン依存性ビリル還元酵素 PcyA の中性子構造解析 Neutron Structural Analysis of the Ferredoxin-dependent Bilin Reductase PcyA

○ 海野昌喜^{1,2*}, 須藤久美子^{1,2}, 日下勝弘², 玉田太郎³, 萩原義徳⁴, 杉島正一⁵, 和田啓⁶,
山田太郎², 石原真樹子², 福山恵一^{7,8}

¹茨大・院理工, 〒316-8511 茨城県日立市中成沢町 4-12-1

²茨大・フロンティア, 〒319-1106 茨城県那珂郡東海村白方 162-1

³原子力機構・量子ビーム, 〒319-1195 茨城県那珂郡東海村白方白根 2-4

⁴久留米高専・生物応用化学, 〒830-8555 福岡県久留米市小森野 1-1-1

⁵久留米大・医, 〒830-0011 福岡県久留米市旭町 67

⁶宮崎大・TT 推進機構, 〒889-2192 宮崎市学園木花台西 1-1

⁷阪大・院理, 〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1

⁸阪大・院工, 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

Masaki Unno^{1,2*}, Kumiko Ishikawa-Suto^{1,2*}, Katsuhiko Kusaka², Taro Tamada³, Yoshinori Hagiwara⁴, Masakazu Sugishima⁵, Kei Wada⁶, Taro Yamada², Makiko Ishihara², and Keiichi Fukuyama^{7,8}

¹Graduate School of Science and Engineering, Ibaraki University, 4-12-1 Nakanarusawa, Hitachi, Ibaraki 316-8511, Japan

²Frontier Research Center for Applied Atomic Sciences, Ibaraki University, 162-1 Shirakata, Tokai, Naka, Ibaraki 319-1106, Japan

³Quantum Beam Science Center, Japan Atomic Energy Agency, 2-4 Shirakata-Shirane, Tokai, Naka, Ibaraki 319-1195, Japan

⁴Department of Biochemistry and Applied Chemistry, Kurume National College of Technology, 1-1-1 Komorino, Kurume, Fukuoka 830-8555, Japan

⁵Department of Medical Biochemistry, Kurume University School of Medicine, 67 Asahi-machi, Kurume, Fukuoka 830-0011, Japan

⁶Organization for Promotion of Tenure Track, University of Miyazaki, 5200 Kihara, Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan

⁷Graduate School of Science, Osaka University, 1-1 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan,

⁸Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

1 はじめに

開環テトラピロール骨格を持つ *phytyobilin* は、光合成生物において光合成色素としてのみならず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。シアノバクテリアの *phytyobilin* の一つ、フィコシアノビルン (PCB) 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) がフェレドキシン依存的な酵素 *phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase* (PcyA) によって還元され生成する [1]。

PcyA 反応の特徴は、BV の 2 箇所位置選択的 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 (図 1)。また、補因子を持たず、反応の過程で比較的安定なラジカル中間体が生成することも知られている。このような特

徴を有する PcyA の反応機構の解明には多くの研究者の興味注が注がれており、PcyA の触媒反応において、各反応段階での「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 の部位特異的変異体の反応解析の結果、この反応には His88/Asp105 のペアが必須であることが明らかになった。また、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。さらに、分光学的な解析結果から PcyA に結合した BV は A 環および D 環のラクタム (-HN-C=O) 構造がラクチム (-N=C-OH) 構造であり、

それが反応性とも関与するという示唆や、BV が PcyA 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。しかし、それらの水素化状態は X 線結晶構造解析では明らかにできなかった。本研究では、PcyA-BV 複合体の中性子結晶構造解析により水素化状態を明らかにすることを旨とした。

2 実験

培養・精製は、既報の方法[2]とほぼ同様に行った。中性子結晶解析に必要な巨大結晶を得るために精製した試料を 120mg/mL と高濃度に濃縮後、BV と 1:1 で混合し、氷上でオーバーナイト静置した。得られた試料を、硫酸アンモニウムを沈殿剤とした条件で、シッティングドロップ蒸気拡散法により、20℃で結晶化した。得られた結晶を重水素化試薬で作成した重水素化結晶化溶液にソーキングし、キャピラリーに封入後、J-PARC の茨城県生命物質構造解析装置 (iBIX) において中性子回折強度測定を行った。また、同結晶を短いキャピラリーに詰め直し、Photon Factory の BL5A で X 線回折強度測定を行った。中性子・X 線回折実験は常温で行った。結晶化以降の操作は全て、暗所で行い、最低限の照明には BV に影響を及ぼさない緑色光を用いた。X 線回折強度と中性子回折強度の両方を使って構造精密化を行ったが、若干の構造の違いが見つかった。そのような箇所は、中性子散乱長密度の方に構造を合わせ、最終精密化構造を中性子構造とした。

3 結果および考察

我々は、PcyA-BV (基質、図 1 左) 複合体の中性子結晶構造解析を行い、世界に先駆けて、水素原子を含む確かな構造情報を 1.95Å 分解能 (Bragg 回折角での換算) で得た (図 2)。BV の 4 つのピロール環の窒素原子全ての近傍に残余の中性子散乱長密度が見られ、これも重水素であると判断した。そのうち二つのピロール環 (B 環と C 環) に結合した重水素の中性子散乱長密度はやや低く、それぞれの正味の占有率が 0.83 と 0.65 であった (他の二つの占有率は両方とも 1)。一方、ラクタム酸素の周辺には残余中性子散乱長密度は見られなかった。この結果は BV がラクチム構造ではなく、ラクタム構造であることを示す。Asp105 は X 線低温構造と同様に二重配座をとっていたが、一方のコンフォメーションには水素 (重水素) に相当する中性子散乱長密度が見られ、もう一方には無かった (図 2)。His88 は水素化しており、その水素が A 環のラクタム酸素と水素結合を形成していた。

さらに、同定できていなかった BV 近傍の水分子 (H-O-H) の存在と配向が確認できた。その水分子

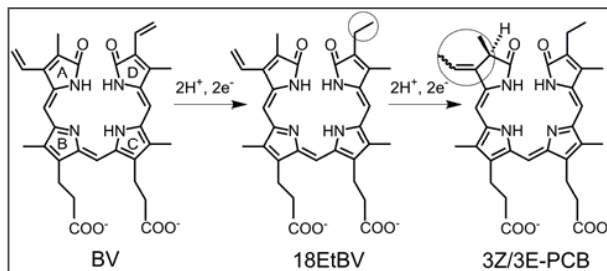


図 1. PcyA が触媒する反応

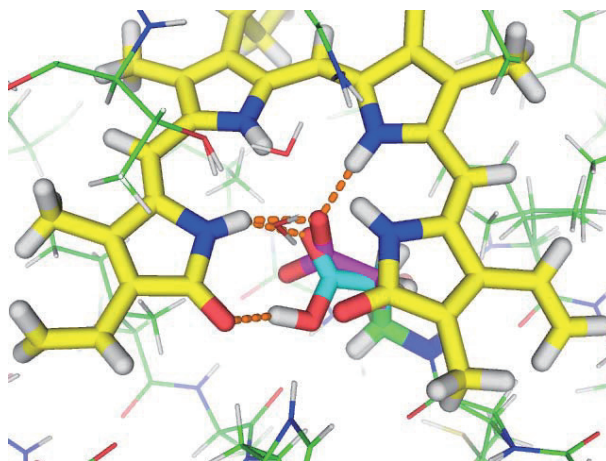


図 2. PcyA-BV 複合体活性部位近傍の構造

の O が BV の A 環ピロールの水素と水素結合距離にあった。

本研究では、BV と周辺のアミノ酸残基の水素化状態とその占有率から、BVH⁺/Asp105 の組み合わせと中性の BV/Asp105 の組み合わせがほぼ半々の割合で存在していることが示された。また、BV/Asp105 の状態の時、近傍の水分子が BV の A 環ピロールの水素原子と水素結合を形成していることが示唆された。これらの構造情報から、PcyA の BV 還元的第一段階の機構が推定された。

4 まとめ

X 線と中性子では構造が若干異なることが示唆された。酸化還元酵素の構造解析の場合、水素原子を見るという目的以外にも中性子の利用は有効である可能性がある。

参考文献

- [1] Unno, M., et al., *Integrating Photofunction Hybrid Material for Energy and the Environment* (Ed. Akitsu, T.), pp. 47-67
- [2] Hagiwara, Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 27-32, (2006)

* unno19@mx.ibaraki.ac.jp