

フェレドキシン還元酵素 BphA4 の構造変化における
マルチパスウェイ仮説の検証

Analysis of the multi-pathway hypothesis of the conformational change in BphA4

千田美紀¹, 木村成伸², 千田俊哉^{1,*}¹高エネルギー加速器研究機構, 〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1²茨城大学・工学部, 〒316-8511 茨城県日立市中成沢町 4-12-1Miki Senda¹, Shigenobu Kimura², and Toshiya Senda^{1,*}¹High Energy Accelerator Research Organization, 1-1 Oho, Tsukuba, 305-0801, Japan²VB, Organization for Creation of Collaboration and Innovation, Ibaraki University, 4-12-1

Nakanarusawa, Hitachi, Ibaraki 316-8511, Japan

電子伝達反応に伴う BphA4-BphA3 間の親和性調節は、FAD の変化に伴う BphA4 の全体構造変化により生じるようであることがわかってきた。本課題では、FAD が異なる構造変化をしてもタンパク質の全体構造を同じように変化させ、相互作用分子との親和性調節を維持できる pH 変化に対する BphA4 機能の頑強性を、部分構造の変化 (FAD の構造変化) とタンパク質分子全体構造の変化の両者を解析し明らかにすることを目的として研究を進めている。

1 はじめに

我々は PCB 分解菌の芳香環水酸化ジオキシゲナーゼの電子伝達タンパク系であるフェレドキシン還元酵素(BphA4)とフェレドキシン (BphA3) を対象として研究を続けてきた。その中で電子伝達反応の際に生じる BphA4 と BphA3 との親和性調節は、FAD の酸化還元依存的なイソアロキサジン環のバタフライ型構造変化が BphA4 のドメイン構造の変化を引き起こすことで生じていることを結晶構造に基づき明らかにした[1, 2]。これらの知見は BphA4 の結晶化条件である pH 5.4 で得られたものである。FAD の状態は pH に依存して異なることが報告されており、pH 5.4 では還元型 FAD のイソアロキサジン環は電荷を持たない状態であることが知られている。一方、pH が 6.3 以上になるとイソアロキサジン環のプロトン化状態が変化し負電荷を持つことから、電子伝達の際に生じる構造変化が pH 5.4 の場合と異なる可能性があった。予備実験の結果から、pH が高い場合には FAD の構造変化の様式が異なるにも関わらず BphA4 全体構造の変化は基本的に同じであり、還元型 BphA4 が BphA3 に対する高親和性サイトを形成することが明らかとなっている。これらの結果から、pH に依存して FAD の構造変化様式が変化しても、FAD に端を発する構造変化の伝わり方には幾つかの径路があるために、最終的には同様の構造変化を生じて同じように電子伝達反応が生じるという仮説を持つに至った。pH に依存して酸化還元に伴う FAD の構造変化の様式が pH に依存して異なる理由は、FAD やその周辺残基のプロトン化の有無に起因すると考えられる。しかしながら、これまでに行ってきた 1.6 Å 分解能程度の X 線結晶構造解析では水素を可視化できないことから、FAD および

その周辺残基の詳細な化学的、構造的な変化を追うことができず、我々の仮説を詳細な構造に基づいて実証することができないことが問題となっていた。そこで本課題では結晶の質を大きく改善して 1.0 Å を超えるような超高分解能での X 線結晶構造解析を行い、FAD とその周辺の水素を可視化することで補酵素の構造変化がタンパク質のドメイン構造の変化に与える影響を詳細に明らかにしたいと考えている。

2 実験

BphA4 の結晶化は、我々のグループで確立した既存の方法に基づいて行った。10-20mg/ml に濃縮した BphA4 と結晶化溶液 (1.6-1.9 M ギ酸ナトリウム、0.1 M 酢酸バッファー pH 5.4) を用いてシッティングドロップ蒸気拡散平衡法で 0.5-1.0 mm の大きさの結晶が得られた。

pH を変化させた結晶化条件では結晶を得ることができなかったため、pH 5.4 で得られた結晶を様々な pH (6.0-8.5)の標準母液にソーキングすることで結晶の pH を変化させることを試みた。

3 結果および考察

X 線回折強度データの収集は、PF の構造生物学ビームライン BL-5A, BL-17A を用いて行った。

結晶の取り扱いを工夫することで、クライオプロテクタントとしてグリセロールを用いた既存の条件で凍結した場合であっても 1.4 Å 分解能程度のデータが収集できるようになった。さらにクライオプロテクタントの再検討を行った結果、最大で 1.05 Å 分解能の回折点を生じ、1.15 Å 分解能のデータを収集することができるようになった。

4 まとめ

PF の構造生物学ビームライン BL-5A, BL-17A で BphA4 結晶からの X 線回折強度データ収集を行った。クライオプロテクトの最適化により酸化型 BphA4 結晶から 1.15 Å 分解能のデータを収集することができた。今後は還元型 BphA4 結晶について超高分解能データの収集を行い、FAD とその周辺の水素を可視化することを目指したい。

参考文献

[1] Senda, T. *et al.* (2009) *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 1741.

[2] Senda, M. *et al.* (2007) *J. Mol. Biol.* **373**, 382.

* toshiya.senda@kek.jp