

フェレドキシン還元酵素 BphA4 の反応サイクルの解析

千田美紀¹、西澤明人²、木村成伸²、石田哲夫³、福田雅夫⁴、千田俊哉⁵
(¹JBIC, ²茨大・工, ³滋賀医大, ⁴長岡技大, ⁵産総研・BIRC)

BphA4(フェレドキシン還元酵素)は補酵素として FAD を含むフラビン蛋白質であり、NADHから電子を受け取り、BphA3(フェレドキシン)へ電子を伝達する。伝達された電子は芳香環水酸化ジオキシゲナーゼ BphA1A2 の反応に使われる。我々のグループでは、BphA4 から BphA3 への電子伝達反応で生じる酸化還元状態依存的な構造変化と親和性調節機構の関連を解析してきた。その結果、BphA4 の酸化還元状態の変化に伴い FAD がバタフライ型の構造変化を生じ、この FAD の構造変化とリンクして BphA4 の全体構造が変化することで BphA3 との親和性が調節されていることが明らかになった。しかし、これまでに構造解析を行った BphA4 の結晶化条件の pH は 5.4 であり、還元型の時に FAD のイソアロキサジン環は電荷を持っていない。そのため、電子伝達の際に生じる構造変化が、FAD が電荷を持つ pH が 6.3 以上の場合と異なる可能性があった。そこで我々は、ソーキング法により pH を 5.4-8.5 の範囲で変化させた酸化型、還元型の BphA4 結晶を用意し X 線結晶構造解析を行うことで、pH と構造との関連性を調べることにした。

X 線回折強度データの収集は KEK フォトンファクトリーのビームライン BL-5A、BL-6A を利用して行い、1.3-1.9 Å 分解能で構造を決定した。BphA4 の酸化還元に伴って生じる FAD の構造変化に注目すると、pH に依存して構造変化の様子が大きく異なっており、pH が高い時には pH5.4 で見られたようなバタフライ型の構造変化は生じなかった。しかし、BphA4 の全体構造に注目すると、どの pH でも還元に伴って BphA3 に対する高親和性サイトを形成するような類似した構造変化を生じていた。これらの結果から、BphA4 の還元によって生じる FAD の構造変化は pH に依存して異なるが、全体構造の変化は基本的に同じであることが明らかになった。pH に依存して FAD のプロトン化の状態や構造が変化するにも関わらず、いつでも電子伝達反応が生じる(BphA4 の場合は、pH6.0-8.5 の範囲で活性が 2 倍も変化しない)のは、FAD に端を発した構造変化の伝わり方にはある程度のバイパスがあり、どのような経路をたどっても最終的には 1 つの決まった構造に落ち着くことが原因ではないかと考えられる。

Reference

- Senda, T., Senda, M., Kimura, S. & Ishida, T. (2009) *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 1741-1766.
- Senda, M., Kishigami, S., Kimura, S., Fukuda, M., Ishida, T. & Senda, T. (2007) *J. Mol. Biol.* **373**, 382-400.