

結晶構造から示唆される *Chlorobaculum tepidum* 由来 FNR の Fd 依存性構造基盤

村木則文^{1,2}, 瀬尾悌介³, 志波智生¹, 桜井武³, 栗栖源嗣²
¹東大院総文, ²阪大蛋白研, ³金沢大院

フェレドキシン-NADP⁺還元酵素 (FNR) は, 光合成電子伝達の最終段階で NADP⁺を NADPH に還元する酵素であり, 反応を進行させるために Fd から電子を受け取る代表的な Fd 依存性酵素である。高等植物やラン藻に存在する葉緑体型 FNR は, Fd との電子伝達複合体の結晶構造も報告されており, 非常に多くの構造生物学的知見が報告されている。Fd を光還元する反応中心は, 葉緑体と光合成細菌 *Chlorobaculum tepidum* とでアミノ酸配列に相同性が見られる。そのため, 光合成細菌 *C. tepidum* にも葉緑体型 FNR が存在すると推測されてきたが, ゲノム解析の結果, *C. tepidum* には葉緑体型 FNR のホモログが存在せず, チオレドキシン還元酵素 (TR) によく似た新規 FNR が光合成電子伝達の最終酵素として働いていることが報告されている。この新規 TR 型 FNR は, 葉緑体型 FNR とアミノ酸配列上の相同性を持たないため, Fd と NADP⁺間の酸化還元反応を全く異なった構造基盤に基づいて触媒すると推測された。我々は, この新規 FNR と TR との構造比較を行うことにより, Fd 依存性の構造基盤を解明しようと *C. tepidum* FNR の結晶構造解析に着手し, 昨年度までに, AR-NW12A の放射光を利用し 2.4Å 分解能で結晶構造解析に成功している。

C. tepidum FNR の結晶構造は, 2 分子からなるホモダイマーを形成しており, 各分子は FAD 結合ドメインと NADP 結合ドメインとがヒンジ領域で繋がった構造をしていた。二量体を形成する 2 分子間で, NADP ドメインの FAD ドメインに対する相対配置が 39.8° 異なっており, NADP ドメインがヒンジ領域を中心に大きく移動する可能性が示唆された。この角度は, TR に見られるドメイン間の動きとは, その方向と距離とが大きく異なっていた。また, *C. tepidum* FNR には TR に保存されていない C 末端サブドメインが存在し, このサブドメイン上にある Phe227 が FAD のイソアロキサジン環とスタッキングしていた。

これらの TR 型 FNR に特徴的で TR には存在しない構造上の特徴は, Fd 依存性と相関が高いと考えられる。そこで, ドメインを繋ぐヒンジ領域に Pro 残基を導入した 2 種類の変異体, FAD とスタックしている Phe 残基を Ser, His, Tyr に置換した 3 種類の変異体の計 5 種類の変異体酵素を作成し, 酵素活性と NADP⁺結合時のスペクトル変化を測定した。その結果, 結晶構造から示唆される通り TR 型 FNR に特徴的な構造特性は FNR 酵素活性に必須であり, 基質である NADP⁺との結合にも重要であることが判明した。