

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370052

研究課題名(和文) ビリン色素を合成する酵素および利用して光適応を制御する蛋白質の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms of bilin synthesizing enzyme and photo-adaptation regulating protein

研究代表者

福山 恵一 (Fukuyama, Keiichi)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80032283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円、(間接経費) 4,590,000円

研究成果の概要(和文)： ビリン色素を合成する酵素PcyAの結晶構造解析を通して、PcyAの分子機構の解明に挑んだ。これにはPcyAのミュータントの解析や、X線結晶解析だけでなく中性子結晶解析も含まれる。PcyAはビリベルジンの2カ所を、しかも順序よく還元する特徴を持つ。PcyAは1段階目の反応が終わると、2段階目の反応の反応が進むように切り替わる。これにはAsp105などの残基が関与していることを突き止めた。また中性子解析によりビリベルジンやAsp105のプロトン化状態を決定し、還元反応の分子機構をより深く理解した。
シアノバクテリオクロムに関しては、全長の蛋白質の結晶化に成功した。

研究成果の概要(英文)： We tried to elucidate the molecular mechanism of PcyA, an enzyme that synthesizes bilin pigment, through crystal structures. These studies include analysis of PcyA mutants and neutron crystallography as well as X-ray crystallography. PcyA is characteristic in that it reduces two sites of biliverdin sequentially. When the first step is completed, PcyA switches to the second step. We defined Asp105 and other residues are involved in this reaction. We also determined the protonation state of Asp105 and biliverdin, and clarified the molecular mechanisms of the reduction.
We succeeded in crystallization of the full-length cyanobacteriochrome.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶解析 中性子結晶解析 ビリン還元酵素 シアノバクテリオクロム シトクロムp450還元酵素
ヘムオキシゲナーゼ 反応機構 立体構造

1. 研究開始当初の背景

PcyA はヘムの位が開裂したピリベルジン IX (BV) を 2 段階で還元する酵素で、フェレドキシン依存性ピリン還元酵素ファミリーで最もメジャーな酵素である。この酵素が BV の D 環と A 環を特異的に、しかも順序よく還元し、フィコシアノピリンへと導く。この反応の仕組みは当初謎であった。

シアノバクテリオクロム全長の結晶構造は例がなく、ドメイン間の配置や情報伝達の仕組みも手つかずの状態であった。

2. 研究の目的

還元反応の分子機構を PcyA の立体構造をもとに明らかにすることが目的であった。まず PcyA・BV 複合体の結晶構造を決定し、反応に関与しているアミノ酸残基が浮かび上がった。これらの残基に変異をいれたミュータントの構造や反応の特性を調べることとした。また、BV や周辺のアミノ酸残基のプロトン化状態を明らかにすることで、分子機構を明らかにしようとした。

シアノバクテリオクロムについては、全長の結晶構造を決定することを目指した。

3. 研究の方法

PcyA の各種ミュータントの結晶構造を、X 線解析により原子分解能で決定することとした。さらに、精度を上げるため、複数のデータを積み、それぞれから得られた立体構造を比較検討することとした。X 線結晶解析に加え、PcyA・BV の中性子結晶解析をも進めた。中性子結晶解析では、X 線解析ではとらえられない水素原子の位置を求めることが期待でき、結果 PcyA・BV のプロトン化状態が実験的に求められる。

全長のシアノバクテリオクロムについて、よりよい発現を試みた。得られた結晶の回折強度データを収集し、構造解析を試みた。

4. 研究成果

(1) PcyA・BV 結晶について、約 1.1 Å 分解能で複数回結晶解析をし、これらを比較検討した。その結果、BV 中では 2 つともラクタム環をしており、ラクチム環ではないことが示唆された。また、BV の周辺にあるアミノ酸残基 (Glu76 と Asp105) は 2 つのコンフォメーションをとっており、いずれもプロトン化状態を決めるには至らなかった。

(2) PcyA・BV の巨大結晶を作成し、中性子解析を 1.95 Å 分解能で行った。X 線解析と中性子解析の結果を比べてみて明らかになったことは、X 線解析で見ていた構造は、X 線照射によりアーティファクトになっていたことである。とりわけ活性中心付近にあるアミノ酸残基でこのようなことが起こっていた。また、活性部位近くにある (X 線解析ではとらえ難かった) 水分子を同定することができた。

中性子解析により、PcyA・BV の水素原子位

置が決まった。BV や活性部位付近のアミノ酸残基のプロトン化状態を決定できたことにより、PcyA から BV へプロトンを渡すスキームが得られた。また X 線解析で示唆されていた BV の 2 つのラクタム環が確定すると同時に、グルタミンおよびアスパラギン側鎖の配向が数多く修正できた。これらにより、各種アミノ酸残基の役割が中性子解析により具体的になった。

(3) シアノバクテリオクロム全長の結晶から、低分解能の回折データが得られた。しかし残念ながら、構造解析には至らなかった。その原因は分解能が低かったことや、新規のドメインが多く含まれていたことなどがあげられる。

(4) ヘム分解酵素ヘムオキシゲナーゼ (HO) と HO に電子を渡す酵素 NADPH-シトクロム P450 還元酵素 (CPR) の複合体結晶を調製した。CPR は open 型と close 型をとるが、open 型の CPR と HO の複合体の結晶化に成功し、この立体構造を X 線結晶解析により 4.3 Å 分解能で明らかにした。これにより、各酵素に含まれる補酵素の位置関係が明らかになり、電子伝達経路などメカニズムを明らかにすることができた。

(5) γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) と阻害剤の結晶構造を決定した。この阻害剤は基質であるグルタチオンのアナログで、分解を受けない特徴を持っている。この複合体構造では、阻害剤の全原子が電子密度に現れており、予期に反して阻害剤は折れ曲がったコンフォメーションをとっていた。この構造情報などから、GGT がいかにグルタチオンに働きかけているか、新規なモデルを提案することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

T. Inoue, K. Takao, T. Yoshida, K. Wada, T. Daifuku, Y. Yoneda, K. Fukuyama, and Y. Sako, Cysteine 295 indirectly affects Ni coordination of carbon monoxide dehydrogenase-II C-cluster. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441, 13-17 (2013).

福山恵一、和田啓、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼの立体構造と特異的反応. *日本結晶学会誌* 55 巻、340-344 (2013).

T. Ida, H. Suzuki, K. Fukuyama, J. Hiratake, and K. Wada, Crystal Structure of *Bacillus subtilis* γ -glutamyltranspeptidase in complex with acivicin: diversity of the binding mode of a classical and electrophilic active-site directed glutamate analogue. *Acta Crystallogr. Section D* 70, 607-614 (2014).

M. Nakajima, B. Watanabe, L. Han, B. Shimizu, K. Wada, K. Fukuyama, H. Suzuki, and J. Hiratake, Glutathion-analogous peptidyl phosphorus esters as mechanism-based inhibitors of -glutamyl transpeptidase for probing cysteinyl-glycin binding site. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 1176-1194 (2013).

M. Sugishima, H. Sato, Y. Higashimoto, J. Harada, K. Wada, K. Fukuyama, and M. Noguchi, Structural basis for the electron transfer from an open form of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase to heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 2524-2529 (2014).

〔学会発表〕(計7件)

N. Tanaka, T. Masako, K. Wada, K. Fukuyama, and Y. Takahashi, Mutational analysis of IsnU revealed novel functional residues. International Conference on Iron-Cluster Biogenesis and Regulation 2013, 2013年5月20日～2013年5月23日, Univ. of South Carolina, Columbia, USA.

K. Hirabayashi, H. Kameda, Y. Takahashi, K. Fukuyama, and K. Wada, Structural basis of protein interaction manners in the plant-type [2Fe-2S] ferredoxin. International Conference on Iron-Sulfur Cluster Biogenesis and Regulation 2013, 2013年5月20日～2013年5月23日, Univ. of South Carolina, Columbia, USA.

K. Hirabayashi, T. Iwanaga, M. Yamakawa, N. Tanaka, K. Fukuyama, Y. Takahashi, and K. Wada, X-ray crystallographic analysis of a non-canonical cysteine desulfurase from the hyperthermophile, *Aquifex aeolicus*. International Conference on Iron-Cluster Biogenesis and Regulation 2013, 2013年5月20日～2013年5月23日, Univ. of South Carolina, Columbia, USA.

田中尚志、和田啓、福山恵一、高橋康弘、鉄硫黄クラスター生合成系の中心成分 IscU への変異導入と in vivo 機能解析, 第86回日本生化学会, 2013年9月11日～2013年9月13日, パシフィコ横浜, 神奈川.

平林佳、長坂雄太、佐藤喬之、片山寿美枝、岩崎憲治、福山恵一、高橋康弘、和田啓、鉄硫黄クラスター合成装置のダイナミックな構造変化. 第86回日本生化学会, 2013年9月11日～2013年9月13日, パシフィコ横浜, 神奈川.

平林佳、田中尚志、福山恵一、高橋康弘、和

田啓、新たな ABC 蛋白質ファミリーに属する鉄硫黄クラスター生合成装置の構造・機能解析, 第37回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2013年9月26日～2013年9月28日, ゆやど雲仙新湯, 長崎.

平林佳、長坂雄太、佐藤喬之、片山寿美枝、岩崎憲治、福山恵一、高橋康弘、和田啓、鉄硫黄クラスター合成に伴う SufBCD 複合体の会合状態変換. 平成25年度日本結晶学会, 2013年10月12日～2013年10月13日, 熊本大学, 熊本.

〔図書〕(計2件)

J. Hiratake, H. Suzuki, K. Fukuyama, K. Wada, and H. Kumagai, -Glutamyltranspeptidase and Its Precursor. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3rd Ed, Chapter 820, 3712-3719 (2013).

M. Unno, M. Sugishima, K. Wada, and K. Fukuyama, Structure function relationships of ferredoxin-dependent bilin reductases. *Nova Science Publishers*, pp. 21, (2013).

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福山恵一 (FUKUYAMA KEIICHI)
大阪大学・工学研究科・特任教授
研究者番号：80032283

(2) 研究分担者

海野昌喜 (UNNO MASAKI)
茨城大学・理工学研究科・教授
研究者番号：10359549

和田啓 (WADA KEI)
宮崎大学・テニユアトラック推進機構・助
教
研究者番号：80379304

(3)連携研究者

池内昌彦 (IKEUCHI MASAHIKO)
東京大学・総合文化研究科・教授
研究者番号：20159601

杉島正一 (SUGISHIMA MASAKAZU)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号：30379292