

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570122

研究課題名(和文)ビリル還元酵素二状態の高分解能中性子構造解析によるビリベルジン水素化反応の解明

研究課題名(英文)High-resolution Neutron Structural Analysis of Two States of a Bilin Reductase PcyA

研究代表者

海野 昌喜(Unno, Masaki)

茨城大学・理工学研究科・教授

研究者番号：10359549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：フィコシアノビルリンを合成する酵素PcyAとその基質BV(ビリベルジン)との複合体の中性子結晶構造解析を行い、水素原子の可視化に成功した。BVの4つのピロール環の窒素原子全ての近傍に重水素が付加した構造が混在していた。また、ラクチム構造は存在しなかった。Asp105は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)が見られ、もう一方には無かった。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。また、His88の近くにヒドロニウムイオン(H3O+)を見出した。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。

研究成果の概要(英文)：PcyA catalyzes two of the steps of two-proton-coupled two-electron reduction of biliverdin (BV), to phycocyanobilin. Revealing the protonation states in the active site of PcyA and the substrate BV is important for understanding this unique reaction mechanism. In the present study, we determined the neutron crystal structure of PcyA in complex with BV. The structure revealed the protonation states of BV and the surrounding residues. We found that two forms of BV, neutral BV and protonated BVH+, were coupled with the two conformation/protonation states of the essential residue Asp105. Further, His88 and His74 near BV were singly protonated and were connected with an intervening hydronium ion. To our knowledge, this is the third example of a hydronium ion in a protein structure. Neutron analysis also revealed how X-ray irradiation of the PcyA-BV crystal altered the structure of the PcyA-BV complex.

研究分野：構造生物化学

キーワード：中性子結晶構造解析 酵素 水素 還元反応 フィコシアノビルリン コンフォメーション

1. 研究開始当初の背景

開環テトラピロール骨格(ピリン)を持つ phytyobilin (フィコピリンやフィトクロモピリン)は、光合成生物において光をエネルギーに変換する光合成色素としてのみならず、様々な生理機能を制御する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。シアノバクテリアにおける phytyobilin の一つ、フィコシアノピリン (phycocyanobilin) 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 (Fd) 依存的に酵素 phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase (PcyA) によって還元され生成する。

PcyA は、BV の D 環ビニル基を 2 電子還元し、中間体 18¹,18²-dihydrobiliverdin (18EtBV) を生成し、次に A 環を 2 電子還元して最終生成物 3Z/3E-phycocyanobilin (3Z/3E-PCB) を合成する。PcyA 反応の特徴は、BV の二箇所に位置選択的 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。また、FDBR は補因子を持たない酵素ファミリーとして注目されており、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 のペアと Glu76 が必須であることが明らかになった。また、連携研究者の福山らにより世界に先駆けて明らかにされた 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。PcyA-18EtBV 複合体の X 線構造情報からも、D 環ビニル基の

還元には Glu76 のカルボキシル基とビニル基との(水素結合にしては近すぎる)特異な結合が関与している事が浮かび上がり、D 環還元後に Glu76 が大きく構造変化すると共に、分子表面から A 環に至る水素結合ネットワークに微小な構造変化が見られた。

PcyA の反応機構については、主に生化学・分光学的な手法を用いて研究されてきた。それらの中に、酵素に結合した BV のラクタム (-HN-C=O) 構造がラクチム (-N=C-OH) 構造になっており、それが反応性とも関与するという示唆や、BV が酵素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・水素化部位は X 線結晶構造解析では明らかにできなかった。

本酵素の触媒機構の理解には、水素原子を含む相互作用と水素移動を捉えることが必須であった。特に、PcyA の場合、活性に関連する二つのアミノ酸 Glu76 と Asp105 が二重のコンフォメーションを取っており、X 線解析で水素を見るのは、相当に難しいと考えていた。

2. 研究の目的

上記のような背景から、PcyA-BV 複合体および PcyA-18EtBV 複合体の中性子結晶構造解析を行うことを本研究課題の柱とし、それに併せて、0.9Å 分解能を超えるような超高分解能 X 線結晶解析を行い、世界に先駆けて、水素原子の確かな構造情報を得ようと考えた。本申請研究では、中性子構造解析による上述の二状態の「水素原子レベル」の構造から、水素原子を介したアミノ酸同士や基質(および反応中間体)と酵素との相互作用様式、あるいは水分子との相互作用を明確にし、どの残基がプロトンのドナーとなりどのような機構でプロトンが供給され供与されるかを理解することを目的としていた。

3. 研究の方法

まず、PcyA-BV の最適結晶化条件を確立した。蛋白質濃度と沈殿剤濃度の条件を振り、

比較的大きな結晶が出る条件を絞った。また、同様に緩衝液の種類と pH も最適化をおこなった。その条件を精密化し、大容量化することにより、中性子回折実験に供するのに適した大型の結晶を得た。

また、高品質の結晶を得るための宇宙実験を試みた。宇宙実験やそのための結晶の高品質化には、研究協力者の伊中浩治博士や JAXA の協力を仰いだ。

中性子回折実験は、日本原子力研究開発機構（原子力機構）の研究用原子炉 JRR-3 に設置された回折計 BIX-3, BIX-4 および大強度陽子加速器施設 J-PARC の iBIX を使用した。原子力機構の玉田太郎博士や茨城大学フロンティア応用原子研究センターの日下勝弘博士らには、中性子回折実験について協力を頂いた。超高分解能 X 線回折実験は、主に SPring-8 と Photon Factory で行った。

4. 研究成果

PcyA-BV) 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 1.95 Å 分解能 (Bragg 回折角での換算) で得た。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。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。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。また、His88 と His74 の間にある密度は水分子ではなく、ヒドロニウムイオンであるという新しい発見があった。

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を考察する。ヒドロニウムイオンは速やかなプロトン供給に使われていると考えられる。

また、J-PARC を用いた新規蛋白質構造の例としては二例目で、しかも 2.0 Å 分解能を超えたのは初めてであることもあり、NHK の水戸放送局のニュースとして取り上げられ、反響を呼んだ。

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 1 件)

Unno, M., Ishikawa-Suto, K., Kusaka, K., Tamada, T., Hagiwara, Y., Sugishima, M., Wada, K., Yamada, T., Tomoyori, K., Hosoya, T., Tanaka, I., Niimura, N., Kuroki, R., Inaka, K., Ishihara, M., Fukuyama, K.

“Insights into the Proton Transfer Mechanism of a Bilin Reductase PcyA Following Neutron Crystallography.”

J. Am. Chem. Soc. (2015), **137**, 5452-5460, [査読有]

[学会発表](計 8 件)

海野昌喜

“中性子結晶構造解析によるフェレドキシン依存性ピリン還元酵素基質複合体の水素化状態可視化”

第 3 回物構研サイエンスフェスタ・第 6 回 MLF シンポジウム (招待講演), 2015 年 3 月 18 日, エポカルつくば (茨城県・

つくば市)

Masaki Unno

“Protonation States of a Bilin Reductase, PcyA Following Neutron Crystallography”

The 2nd Ibaraki University-Kasesart University Symposium (招待講演), 2015年2月17日, 茨城大学(茨城県・水戸市) 海野昌喜, 須藤久美子, 日下勝弘, 玉田太郎, 萩原義徳, 杉島正一, 和田啓, 山田太郎, 石原真樹子, 福山恵一

“中性子結晶構造解析によるフェレドキシン依存性ピリン還元酵素-基質複合体の水素化状態可視化”

平成26年度日本結晶学会年会, 2014年11月3日, 東京大学(東京都・文京区)

海野昌喜

“中性子解析でピリン還元酵素PcyAの特異なプロトン化反応を見る”

平成25年度茨城県ビームライン CROSS トライアルユース成果報告会(招待講演), 2014年10月22日, 化学会館(東京都・千代田区)

海野昌喜

“フェレドキシン依存性ピリン還元酵素PcyAの中性子結晶構造解析”

BioJapan 2014, 2014年10月15日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Masaki Unno, Kumiko Ishikawa-Suto, Katsuhiko Kusaka, Taro Tamada, Yoshinori Hagiwara, Masakazu Sugishima, Kei Wada, Taro Yamada, Makiko Ishihara, Keiichi Fukuyama

“Neutron Structure of Phycocyanobilin: oxidoreductase Complexed with Biliverdin”

International Union of Crystallography, 9th August, 2014, Montreal (Canada)

海野昌喜, 須藤久美子, 日下勝弘, 玉田太郎, 萩原義徳, 杉島正一, 和田啓, 山田太郎, 石原真樹子, 福山恵一

“中性子結晶構造解析で見るフェレドキシン依存性ピリン還元酵素PcyAの水素化状態”

第41回生体分子科学討論会, 2014年6月7日, 九州大学西新プラザ(福岡県・福岡市)

海野昌喜

“フェレドキシン依存性ピリン還元酵素の水素化反応機構を解明するために”

第二回 iBIX 研究会, 2013年9月26日, 茨城量子ビーム研究センター(茨城県・東海村)

〔図書〕(計 1 件)

Integrating Approach to Photofunctional Hybrid Materials for Energy and the Environment, (NOVA Publishers), Ed. Takashiro Akitsu, pp. 47-68, (2013)

Masaki Unno, Masakazu Sugishima, Kei Wada, Keiichi Fukuyama

“Structure-Function Relationships of Ferredoxin-dependent Bilin Reductase”

〔その他〕

ホームページ等

茨城大学大学院理工学研究科・海野昌喜

<http://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/19/0001860/profile.html>

海野昌喜研究室

http://www.fas.ibaraki.ac.jp/?page_id=827

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海野 昌喜 (UNNO Masaki)

茨城大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号: 10359549

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

福山 恵一 (FUKUYAMA Keiichi)

大阪大学・大学院理工学研究科・招へい研究員

研究者番号: 80032283

和田 啓 (WADA Kei)

宮崎大学・テニユアトラック推進機構・テニユアトラック准教授

研究者番号: 80379304

玉田 太郎 (TAMADA Taro)

原子力機構・量子ビーム・グループリーダー

研究者番号: 50391248