

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370037

研究課題名（和文）フェレドキシン依存性ビリン還元酵素群による多様なビリン色素合成の分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanism of bilin synthesis by ferredoxin-dependent bilin reductases

研究代表者

福山 恵一 (FUKUYAMA KEIICHI)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：80032283

研究成果の概要（和文）：

PcyAの反応機構を明らかにするため、PcyAと反応中間体との複合体結晶の構造を決定した。加えて、化学合成した基質アナログとの複合体(PcyA-BV13)を原子分解能で解析するとともに、基質還元の特異性を変える変異体E76QとBVとの複合体の結晶構造を決定した。これらの結果から、PcyA-BV中にGlu76のカルボキシル基とBVのD環 exo -ビニル基の間にOH... π 結合があり、これが先行的な exo -ビニル基還元の要因であると考えられた。

PcyAのVal225をAspに置換した変異体では、BV複合体の吸収スペクトルが大きく変化した。ここではBVが裏返って結合し、しかもBVの結合によるinduced fitを起こしていなかった。この結果は変異体蛋白質の構造機能解析の解釈に警告を与えた。また、BVをPcyAとは異なる部位を還元するビリベルジン還元酵素を発現・精製・結晶化し、これとSe-Met体結晶の回折実験を行った。

クロロフィル分解系で主要な酵素(RCCR)の結晶構造を決定し、これからRCCRはフェレドキシン依存性ビリン還元酵素ファミリーに属することを示した。さらにRCCRの基質(RCC)結合型の結晶構造、RCCRのPhe218をValに置換した変異体、およびそのRCC結合型の結晶構造をも決定し、これらを総合して、RCCRの活性残基・反応機構を推定した。

研究成果の概要（英文）：

In order to elucidate the molecular mechanism of PcyA, we determined the crystal structures of PcyA in complex with the reaction intermediate ($18^1,18^2$ -dihydrobiliverdin), PcyA in complex with the synthetic analog of substrate (biliverdin XIII α), and PcyA mutant protein of E76Q in complex with BV. These structural studies showed that the carboxyl group of Glu76 in PcyA-BV was in close proximity to the D-ring vinyl group, suggesting the presence of OH... π hydrogen bond here and that this bond is a key for the preceding reduction of the D-ring vinyl group.

When Val225 was replaced by Asp, the absorption spectrum of this mutant protein in complex with BV was very different from that of PcyA-BV. The orientation of BV in V225D-BV was inverted and the induced-fit did not occur upon BV binding. This observation presented a cautionary note about interpreting functional data derived from a mutated protein in the absence of its exact structure. In parallel we expressed, purified and crystallized cyanobacterial biliverdin reductase, an enzyme that reduces at different site of BV from PcyA. We also prepared and crystallized the Se-Met form of biliverdin reductase, and performed preliminary X-ray diffraction analyses for these crystals.

We determined the crystal structure of red chlorophyll catabolite reductase (RCCR), a key enzyme in the chlorophyll breakdown pathway. The structure was essentially the same as PcyA, implicating that RCCR belongs to the ferredoxin-dependent bilin reductase family. We also determined the crystal structures of RCCR and its mutant protein in complex with substrate, proposing the reaction mechanism as well as the active residues of RCCR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

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：ビリル還元酵素、ビリル色素、フェレドキシン、X線結晶解析、クロロフィル

1. 研究開始当初の背景

PcyA はヘムの代謝産物であるビリベルジン IX α (BV) をフェレドキシン依存的に還元し、光合成や光応答に利用されるテトラピロール色素、フィコシアノビルリン、を合成する。PcyA は、BV の D 環 *exo*-ビニル基を還元した後、中間体の A 環 *endo*-ビニル基を還元する。このような部位特異的 2 段階反応を、PcyA がどのように制御しているかは謎であった。一方、クロロフィル分解系の酵素について生化学的・構造生物学的研究はほとんどなされておらず、進化的位置づけや、酵素反応の仕組みはほとんど手つかずの状態であった。

2. 研究の目的

PcyA が基質の還元部位と還元順序を厳密に制御する独自のメカニズムを解明すること。また、PcyA と構造的に関係があると予想されていたクロロフィル分解酵素 (red chlorophyll catabolite reductase) の結晶構造を決定し、反応特異性の構造基盤を明らかにすること。

3. 研究の方法

PcyA および red chlorophyll catabolite reductase に共通して、分子生物学的・生化学的方法を用いて、酵素およびそのミュータントタンパク質を発現・精製した。有機合成を適用して基質や反応中間体を調製した。酵素および基質との複合体の構造決定には X 線結晶解析法を用いた。

4. 研究成果

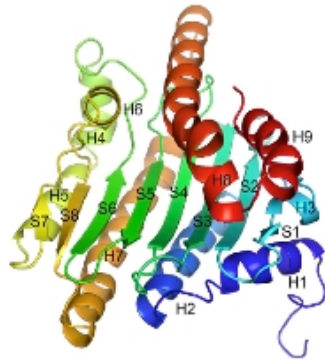
(1) PcyA が基質の還元部位を厳密に認識し、2 段階還元反応の順序を制御するメカニズムを明らかにするため、すでに構造決定していた *Synechocystis* sp. PCC 6803 由来の PcyA と BV との複合体の結晶構造に加え、反応中間体である 18¹,18²-ジヒドロビリベルジン (18EtBV) の BV との複合体の結晶構造を決定

した。さらに、化学合成した基質アナログであるビリベルジン XIII α (BV13)を用いて、PcyA-BV13の構造を原子分解能で解析するとともに、基質還元において重要とされている Glu76 をグルタミンに置換した E76Q の BV 複合体の結晶構造決定と E76Q の酵素学的解析を行った。これらの結果を総合して、PcyA-BV 中で特異的に Glu76 のカルボキシル基と BV の *exo*-ビニル基が近接していることがわかった。これは OH... π 結合と考えられ、PcyA の先行的な D 環 *exo*-ビニル基還元の原因要因であると考えられた。

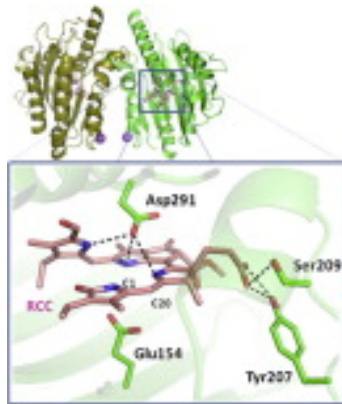
(2) PcyA は BV の方向を厳密に区別して結合する。ところが、BV の認識に強く関与しているとは考えられていなかった Val225 を Asp に置換したところ、この変異体 PcyA-BV の吸収スペクトルに大きな変化が見られた。この変異体 PcyA-BV の結晶構造を決定したところ、BV が裏返って結合し、しかも野生型 PcyA と異なり、BV を結合しても induced fit を起こしていなかった。この結果は、酵素が基質を一見厳密に認識している場合でも、一残基置換により予想を越えた構造変化を引き起こしうることを示し、変異体蛋白質の構造機能解析の解釈には注意を要することを示した。

(3) BV を PcyA とは異なる部位を還元するシアノバクテリア由来の酵素、ビリベルジンレダクターゼ、を発現・精製した。この酵素を結晶化し、予備的に X 線回折実験を行った。また、この Se-Met 体の結晶をも調製し、マイクロビーム放射光を用いて回折実験を行った。

(4) クロロフィル分解系で主要な酵素 red chlorophyll catabolite reductase (RCCR) の結晶構造を MAD 法で決定した。注目すべきことに、RCCR は PcyA と基本的に同じフォールディングをしており、フェレドキシン依存性ビリル還元酵素ファミリーに属することを示した。この酵素の基質結合部位と考えられるポケットの表面は、PcyA と似て正電荷に帯電していた。なお、この酵素は PcyA と異なり、2 量体をとっていた。



(5) RCCR の基質 (RCC) 結合型の結晶構造を決定した。さらに、RCCR の Phe218 を Val に置換した変異体、およびその RCC 結合型の結晶構造をも決定した。これらの構造情報を総合して、RCCR の活性残基を推定すると共に、変異に伴い反応生成物の立体構造が変わる理由を示した。また、RCCR による RCC の還元部位が RCC の中央部にあることを反映して、PcyA とは異なり、RCCR が基質をルーズに結合している必然性に説明を与えた。



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 20 件)

- 1) A. Watanabe, K. Hirata, Y. Hagiwara, Y. Yutani, M. Sugishima, M. Yamamoto, K. Fukuyama, K. Wada, Expression, purification and preliminary X-ray crystallographic analysis of the cyanobacterial biliverdin reductase, *Acta Crystallogr. Sect. F*, **67**, 313-317 (2011), 査読有.
- 2) 和田啓, 福山恵一, 高橋康弘, 鉄硫黄クラスター合成マシーナリーの構造と作動機構, *化学と生物*, **48**, 831-838 (2010), 査読無.
- 3) 高橋康弘, 和田啓, 福山恵一, 超分子マシーナリーが担う鉄硫黄クラスターの合成, *生化学*, **82**, 139-143 (2010), 査読無.
- 4) K. Wada, Y. Hagiwara, Y. Yutani, K. Fukuyama,

One residue substitution in PcyA leads to unexpected changes in tetrapyrrole substrate binding, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **402**, 373-377 (2010), 査読有.

5) M. Sugishima, Y. Okamoto, M. Noguchi, T. Kohchi, H. Tamiaki, K. Fukuyama, Crystal structure of the substrate-bound forms of red chlorophyll catabolite reductase: Implication for site-specific and stereospecific reaction, *J. Mol. Biol.* **402**, 879-891 (2010), 査読有.

6) H. Suzuki, C. Yamada, K. Kijima, S. Ishihara, K. Wada, K. Fukuyama, H. Kumagai, Enhancement of glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase activity, *Biotech. J.* **5**, 829-837 (2010), 査読有.

7) K. Wada, M. Irie, H. Suzuki, K. Fukuyama, Crystal structure of the halotolerant γ -glutamyl-transpeptidase from *Bacillus subtilis* in complex with glutamate reveals its unique architecture of the solvent-exposed catalytic pocket, *FEBS J.* **277**, 1000-1009 (2010), 査読有.

8) Y. Hagiwara, M. Sugishima, H. Kwan, H. Kinoshita, K. Inomata, L. Shang, J. C. Lagarias, Y. Takahashi, K. Fukuyama, Structural insights in vinyl reduction regiospecificity of phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase (PcyA), *J. Biol. Chem.* **285**, 1000-1007 (2010), 査読有.

9) 福山恵一, 不安定なタンパク質をみる, *光合成研究*, **19**, 26-30 (2009), 査読無.

10) N. Ohkama-Ohtsu, K. Fukuyama, D. Oliver, Roles of γ -glutamyltranspeptidase and γ -glutamyl cyclotransferase in glutathione and glutathione-conjugate metabolism in plants, *Adv. Botanical Res.* **52**, 87-113 (2009), 査読有.

11) 鈴木秀之, 和田啓, 福山恵一, γ -グルタミルトランスぺプチダーゼの立体構造に基づいた成熟化と酵素反応機構, *蛋白質核酸酵素*, **54**, 245-251 (2009), 査読無.

12) M. Sugishima, Y. Kitamori, M. Noguchi, T. Kohchi, and K. Fukuyama, Crystal structure of red chlorophyll catabolite reductase: Enlargement of the ferredoxin-dependent bilin reductase family, *J. Mol. Biol.* **389**, 376-387 (2009), 査読有.

13) K. Wada, N. Sumi, R. Nagai, K. Iwasaki, T. Sato, K. Suzuki, Y. Hasegawa, S. Kitaoka, Y. Minami, F. W. Outten, Y. Takahashi, K. Fukuyama, Molecular dynamism of Fe-S cluster biosynthesis implicated by the structure of SufC₂-SufD₂ complex, *J. Mol. Biol.* **387**, 245-258 (2009), 査読有.

14) H. Sato, M. Sugishima, H. Sakamoto, Y. Higashimoto, C. Shimokawa, K. Fukuyama, G. Palmer, M. Noguchi, Crystal structure of rat heme oxygenase-1 in complex with ferrous verdoheme: presence of a hydrogen bond network on the distal side., *Biochem. J.* **419**, 339-345 (2009), 査

読有。

15) T.Osawa, N.Sugiura, H.Shimada, R.Hirooka, T.Tsuji, T.Shirakawa, K.Fukuyama, M.Kimura, and Y.Kakuta, Crystal structure of chondroitin polymerase from *Escherichia coli* K4, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**, 10-14 (2009), 査読有。

16) 和田啓、鈴木秀之、福山恵一、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼはどのように成熟化し、反応を触媒するか？,日本応用酵素協会誌、**43**, 23-31 (2008), 査読無。

17) 鈴木秀之、和田啓、福山恵一、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼのグルタリル-7-アミノセファロスポラン酸アシラーゼへの変換-立体構造に基づく効果的変異導入-,バイオサイエンスとインダストリー、**66**, 660-666 (2008), 査読無。

18) Y.Shimomura, K.Wada, K.Fukuyama, Y.Takahashi, The asymmetric trimeric architecture of [2Fe-2S] IscU: Implications for its scaffolding during iron-sulfur cluster bio- synthesis, *J. Mol. Biol.* **383**, 133-143 (2008), 査読有。

19) K.Wada, J.Hiratake, M.Irie, T.Okada, C.Yamada, H.Kumagai, H.Suzuki, K.Fukuyama, Crystal structure of *Escherichia coli* γ -glutamyl-transpeptidase in complex with azaserine and acivicin: novel mechanistic implication for inhibition by glutamine antagonists, *J. Mol. Biol.* **380**, 361-372 (2008), 査読有。

20) C.Yamada, K.Kijima, S.Ishihara, C.Miwa, K.Wada, K.Fukuyama, H.Kumagai, H.Suzuki, Improvement of glutaryl-7-amino cephalosporanic acid acylase activity of a bacterial γ -glutamyltranspeptidase, *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 3400-3409 (2008), 査読有。

〔学会発表〕(計28件)

1) 平林佳、中嘉孝、高橋康弘、福山恵一、和田啓、鉄硫黄クラスター生合成系における硫黄の供給メカニズム解明に向けた構造生物学的アプローチ、第33回日本分子生物学会 第83回日本生化学会合同大会、神戸ポートアイランド、2010年12月10日。

2) 伊田知代、和田啓、平竹潤、鈴木秀之、福山恵一、グルタチオン代謝の鍵酵素 γ -グルタミルトランスペプチダーゼに対する古典的阻害剤アシピシンの結合様式、第33回日本分子生物学会 第83回日本生化学会合同大会、神戸ポートアイランド、2010年12月7日。

3) 入川鉄平、和田啓、萩原義徳、福山恵一、ピリン還元酵素PcyA 変異体I86D-BV 複合体の高分解能構造解析、日本結晶学会平成22年度年会、大阪大学コンベンションセンター、2010年12月5日。

4) 平林佳、岩永朋子、高橋康弘、福山恵一、和田啓、鉄硫黄クラスターのde novo合成を

担うISCタンパク質群の複合体解析、日本結晶学会平成22年度年会、大阪大学コンベンションセンター、2010年12月5日。

5) 松岡 礼、和田啓、亀田 悠、広瀬 侑、成川 礼、池内 昌彦、福山恵一、シアノバクテリアの補色順化を制御する光受容体タンパク質RcaE のGAF ドメインの結晶化、結晶学会平成22年度年会、大阪大学コンベンションセンター、2010年12月5日。

6) 石川久美子、萩原義徳、和田啓、小原裕二、黒木良太、玉田太郎、福山恵一、海野昌喜、中性子結晶構造解析を目指したフェレドキシン依存性ピリン還元酵素PcyAの結晶成長、日本結晶学会平成22年度年会、大阪大学コンベンションセンター、2010年12月5日。

7) 渡邊彩、平田邦生、萩原義徳、油谷裕子、杉島正一、山本雅貴、福山恵一、和田啓、微細結晶を用いたシアノバクテリア由来ピルジンリダクターゼの結晶学的研究、日本結晶学会平成22年度年会、大阪大学コンベンションセンター、2010年12月5日。

8) 原田英里砂、杉島正一、野口正人、福山恵一、菅瀬謙治、NMRによるヘムオキシゲナーゼのヘム認識機構の解明、第10回日本蛋白質科学会年会、札幌コンベンションセンター、2010年6月18日。

9) 杉島正一、岡本千寛、野口正人、河内孝之、民秋均、福山恵一、基質結合型結晶構造から推定されるred chlorophyll catabolite reductaseの反応機構、第10回日本蛋白質科学会年会、札幌コンベンションセンター、2010年6月18日。

10) 平林佳、中嘉孝、高橋康弘、福山恵一、和田啓、超好熱菌*Aquifex aeolicus*の鉄硫黄クラスター生合成に関わる中核成分、脱硫黄酵素IscSと中間体クラスター形成蛋白質IscUの相互作用、第10回蛋白質科学会年会、札幌コンベンションセンター、2010年6月17日。

11) 萩原義徳、和田啓、福山恵一、ピリン色素合成酵素PcyAは新奇な機構で基質を還元しているのか？ 第10回蛋白質科学会年会、札幌コンベンションセンター、2010年6月17日。

12) 杉島正一、岡本千寛、野口正人、河内孝之、民秋均、福山恵一、シロイヌナズナ由来red chlorophyll catabolite reductaseおよびF218V変異体の基質結合型結晶構造、日本植物生理学会年会、熊本大学、2010年3月18-21日。

13) 福山恵一、フェレドキシン依存性ピリン還元酵素の構造生物学と中性子解析への期待、H21年度生命物質構造解析研究会、三菱総合研究所、東京、2010年1月15日。

14) 杉島正一、北森有加、野口正人、河内孝之、福山恵一、クロロフィル代謝関連酵素

red chlorophyll catabolite reductaseの立体構造, 日本結晶学会平成21年度年会, 関西学院大学上ヶ原キャンパス, 2009年12月5-6日.

15) 和田啓, 入江麻智子, 鈴木秀之, 福山恵二, 枯草菌に由来する耐塩性 γ -グルタミルトランスペプチダーゼの結晶構造, 日本結晶学会平成21年度年会, 関西学院大学上ヶ原キャンパス, 2009年12月5-6日.

16) 萩原義徳, 杉島正一, Htoi Khawn, 木下英樹, 猪股勝彦, Lixia Shang, J.C.Lagarias, 高橋康弘, 福山恵二, フェレドキシン依存性ピリン還元酵素PcyAの部位特異的還元反応を制御する構造要因, 日本結晶学会平成21年度年会, 関西学院大学上ヶ原キャンパス, 2009年12月5日.

17) Y.Hagiwara, M.Sugishima, H.Khawn, H.Kinoshita, K.Inomata, L.Shang, J.C.Lagarias, Y.Takahashi, K.Fukuyama, Molecular mechanism of the two-step reduction catalyzed by PcyA, ICTPPO 2009, USA, July 26-31, 2009.

18) M.Sugishima, Y.Kitamori, M.Noguchi, T.Kohchi, K.Fukuyama, Crystal structure of red chlorophyll catabolite reductase (RCCR) reveals that RCCR and ferredoxin dependent bilin reductase were evolved from the common ancestor, ICTPPO 2009, USA, July 26-31, 2009.

19) 杉島正一, 北森有加, 野口正人, 河内孝之, 福山恵二, クロロフィル代謝関連酵素 Red Chlorophyll Catabolite Reductaseの結晶構造, 第9回日本蛋白質科学会年会, 熊本全日空ホテルニュースカイ, 2009年5月20日.

20) 和田啓, 入江麻智子, 中嶋麻童, 熊谷英彦, 鈴木秀之, 平竹潤, 福山恵二, グルタチオン代謝の鍵酵素 γ -グルタミルトランスペプチダーゼの阻害剤を用いた基質認識機構の解明, 第81回日本生化学会大会, 神戸ポートアイランド, 2008年12月11日.

21) 佐藤 喬之, 和田 啓, 福山 恵二, 高橋 康弘, 鉄硫黄クラスターの生合成に関与する大腸菌SufBの機能解析, 第81回日本生化学会大会, 神戸ポートアイランド, 2008年12月10日.

22) M. Irie, K.Wada, H.Suzuki, C.Yamada, H. Kumagai, J.Hiratake, K.Fukuyama, Crystal structure of *Echerichia coli* γ -glutamyltranspeptidase in complex with glutamine antagonists, IUCr 2008, Osaka, 2008年8月28-29日.

23) Y.Hagiwara, M.Sugishima, H.Khawn, H. Kinoshita, K.Inomata, L.Shang, J.C.Lagarias, Y.Takahashi, K.Fukuyama, Snapshots in the reaction pathway of bilin reductase PcyA, IUCr 2008, Osaka, 2008年8月28-29日.

24) K.Fukuyama, K.Wada, Y.Shimomura, Y. Takahashi, The asymmetric architecture of

2Fe-2S IscU, a scaffold protein for iron-sulfur cluster biosynthesis, IUCr 2008, Osaka, 2008年8月26-27日.

25) K.Wada, T.Sato, N.Sumii, Y.Takahashi, K.Fukuyama, Biosynthesis of Fe-S clusters by SUF system: implications from crystal structure of SufCD complex, IUCr 2008, Osaka, 2008年8月26-27日.

26) 高橋康弘, 和田啓, 下村喜充, 福山恵二, 鉄硫黄クラスターの生合成機構: ISCとSUFタンパク質群の構造と機能, 第8回日本蛋白質科学会年会, タワーホール船堀, 2008年6月12日.

27) 和田 啓, 佐藤喬之, 鷲見法香, 北岡伸太郎, 高橋康弘, 福山恵二, 鉄硫黄クラスターの生合成に関与するSUFマシナリーの構造・機能解析, 第8回日本蛋白質科学会年会, タワーホール船堀, 2008年6月11日.

28) 萩原義徳, 杉島正一, Htoi Khwan, 木下英樹, 猪股勝彦, Lixia Shang, J.C.Lagarias, 高橋康弘, 福山恵二, ピリン還元酵素PcyAの反応経路における段階別スナップショット, 第8回日本蛋白質科学会年会, タワーホール船堀, 2008年6月11日.

[その他]

ホームページ等

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/fukuyama/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福山 恵一 (FUKUYAMA KEIICHI)
大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 80032283

(2) 研究分担者

高橋 康弘 (TAKAHASHI YASUHIRO)
埼玉大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 10154874

和田 啓 (WADA KEI)
大阪大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号: 80379304

(3) 連携研究者

猪股 勝彦 (INOMATA KATSUHIKO)
金沢大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号: 50110599

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