

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：12101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22770096

研究課題名（和文） 中性子結晶構造解析で見るフェレドキシン依存性ビリル還元酵素のプロトン化機構

研究課題名（英文） Elucidation of the protonation mechanisms of ferredoxin-dependent bilin reductase by neutron crystallography

研究代表者 海野 昌喜（UNNO MASAKI）

茨城大学・フロンティア応用原子科学研究センター・准教授

研究者番号：10359549

研究成果の概要（和文）：光合成を行うシアノバクテリアで重要な役割を担う色素フィトクロモビリルを生合成するフェレドキシン依存性ビリル還元酵素の一つ、PcyA の結晶を大型化することに成功し、最高 2.6 Å 分解能の中性子回折像を得た。結晶の大型化はシッティングドロップ蒸気拡散法で、ドロップサイズを大きくする方法を取った。今後、更に大きな結晶が出来れば 2 Å 分解能を超えるような構造解析が可能になり、水素原子位置を同定し、反応機構が明らかになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We succeeded obtaining a big crystal of PcyA, a ferredoxin-dependent bilin reductase, which biosynthesizes an important pigment phytyobilin. The crystal diffracted neutron up to 2.6 Å resolution. If we can obtain bigger crystal than this one, we will be able to structural analysis beyond 2 Å resolution, and determine the position of hydrogen atoms in the structure. The reaction mechanism will be elucidated, soon.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：酵素

1. 研究開始当初の背景

開環テトラピロール骨格（ビリル）を持つ phytyobilin（フィコビリルやフィトクロモビリル）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、フィコシアノビリル（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-phytyocyanobilin (3Z/3E-PCB) を合成する。PcyA 反応の特徴は、BV の 2 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 の反応の機構解明には多くの研究者の興味が注がれており、PcyA の触媒反応において、各反応段階での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、研究協力者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 環ビニル基還元後に構造変化がない限り A 環へのプロトン供給は起こり得ないことが示唆されていた。最近、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 OH- π 水素結合が関与していることが浮かび上がり、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わずかな構造変化が見られた。

申請者は、前任の東北大学多元物質研究所において、BV を生成する酵素ヘムオキシゲナーゼ (HO) の反応中間体や変異体の X 線結晶構造解析を中心的手法とし、酵素反応を解明する研究を行い、世界的に高い評価を受

けた。HO の反応でもプロトンの経路や水素が添加される部位は極めて重要であるが、水素原子を同定するには至らなかったため、水素原子やプロトンを同定することが可能な中性子結晶構造解析法を利用する酵素の構造-機能相関の解明に強く興味を抱いていた。そのような中、2009 年 5 月より、原子力研究機構に隣接する茨城大学フロンティア応用原子科学研究センターに赴任する機会を得て、今まで研究してきた酵素・HO とも関連が深く良質な結晶が再現性良く得られる PcyA の中性子結晶構造解析を行い、複雑で特異な酵素反応を構造からより深く理解しようと考えた。

2. 研究の目的

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るが、X 線解析では水素原子(H)を同定することは困難 (プロトン(H⁺)の同定は不可能) である。そこで、申請者は、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い、世界に先駆けて、水素原子やプロトン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、どのような経路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た。

3. 研究の方法

PcyA の結晶を成長させ、2 mm³ 以上の大きさの結晶を得ることを目指した。結晶化の条件を広い範囲で探索し、PcyA 試料の溶解度曲線を作成し既存の条件を最適化することと結晶化ドロップのスケールアップの組

み合わせで、結晶を大きく成長させた。中性子回折実験においてバックグランドレベルを下げて高分解能の質の良いデータを得るために、得られた結晶の重水素化を行った。重水素化は、ソーキング法で行った。得られた結晶は、重水製リザーバー溶液とともに石英のキャピラリーに封入した。中性子回折実験は当面、原子炉の BIX3, BIX4 ビームポートにおいて行った。

4. 研究成果

我々は、中性子結晶解析を目指した、大型結晶作成に取り組んできた。

X線結晶構造解析で用いられた結晶化条件と類似の条件で、比較的再現性良く、大きな結晶が得られる条件を探索し、その条件でのスケールアップによる結晶の大型化 (1 mm³程度) に成功した。

平成 22 年度は、原子炉 JRR-3 の BIX-3, BIX-4 の二つのビームポートにおいて中性子回折実験を計 3 回行った。中性子回折実験では、蛋白質中の水素原子はバックグランドレベルを上げてしまうので、重水で作成した溶液に結晶を浸漬する“ソーキング”法を行った。重水素化した大型結晶は、乾燥を避けるため、重水で作成したリザーバー溶液と共に石英のキャピラリーの中に封入した。

結果、2.6Å 分解能程度の回折像を得るとどまり、フルデータセット収集には未だ至らなかった。つくばの Photon Factory での実験では、1.2Å 分解能程度の X 線回折強度データ収集に成功した。

しかし、平成 23 年 3 月 11 日の大震災により、研究用原子炉や J-PARC はしばらく稼働できない状況に陥り、平成 23 年度には、中

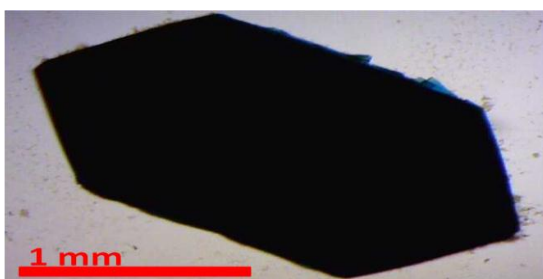


図. 本研究課題で得られた最大の PcyA 結晶

性子回折実験は一度も行うことが出来なかった。

それと並行して、JAXA との共同研究で宇宙実験を試みたり、緩衝液の最適化など結晶化条件の検討、および創晶の新規結晶化キット等を用いた Top-Seeded Solution Growth 法を試みる事が出来た。

現在のところ、最大 2.3 X 1.2 X 0.7 mm³ の大きな結晶を得ることに成功している (図)。

また、質の良い結晶を用いて、放射光を使った X 線結晶構造解析にも着手している。最高分解能 1.1Å の構造を得て、一部の水素原子も同定できた。ただし、活性部位近傍の水素原子は見えていない。

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 4 件)

1. 海野昌喜, 松井敏高, 齋藤正男
金属タンパク質の X 線結晶構造解析: ヘム分解酵素の反応中間体, 日本結晶学会誌 **53**, 213-218 (2011) NAID:10029371570 (査読有)
2. Lai, W., Chen, H., Matsui, T., Omori, K., Unno, M., Ikeda-Saito, M., Shaik, S.
Enzymatic Ring-Opening Mechanism of Verdoheme by the Heme Oxygenase: A Combined X-ray Crystallography and QM/MM Study., *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 12960-12970 (2010), DOI: 10.1021/ja104674q (査読有)
3. Du, Z., Unno, M., Matsui, T., Ikeda-Saito, M., La Mar, G. N.
Solution ¹H NMR characterization of substrate-free *C. diphtheriae* heme oxygenase: Pertinence for determining magnetic axes in paramagnetic substrate complexes., *J. Inorg. Biochem.* **104**, 1063-1070 (2010), DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2010.06.003 (査読有)
4. Matsui, T., Iwasaki, M., Sugiyama, R., Unno, M., Ikeda-Saito, M.
Dioxygen Activation for the Self-Degradation of Heme: Reaction Mechanism and Regulation of Heme Oxygenase, *Inorg. Chem.* **49**, 3602-3609 (2010), DOI: 10.1021/ic901869t (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. 石川久美子, 伊中浩治, 萩原義徳, 和田啓, 黒木良太, 玉田太郎, 福山恵一, 海野昌喜
フェレドキシン依存性ビリル還元酵素 PcyA の大型結晶作製の試みと高分解能結晶構造解析、日本化学会関東支部、茨城地区交流会、東海村、2011 年 11 月 4 日
2. 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ビリル還元酵素 PcyA の結晶成長、日本結晶学会 2010, 創立 60 周年記念大会、大阪、2010 年 12 月 5 日
3. 海野昌喜
中性子結晶解析で見るビリル還元酵素のプロトンを使った反応機構、茨城県中性子利用促進研究会 (生命物質構造研究会) 合同研究会、東京、2010 年 10 月 1 日
4. Toshitaka Matsui, Masaki Unno, Masao Ikeda-Saito
Ring Opening Mechanism of Verdoheme Catalyzed by Heme Oxygenase, 2010 年日本生物物理学会第 48 回年会、仙台、2010 年 9 月 22 日
5. Kumiko Ishikawa, Yoshinori Hagiwara, Kei Wada, Yuji Obara, Ryota Kuroki, Taro Tamada, Keiichi Fukuyama, Masaki Unno
Crystal Growth of PcyA, a Ferredoxin-Dependent Billin Reductase, for Neutron Crystallographic Analysis, 2010 年日本生物物理学会第 48 回年会、仙台、2010 年 9 月 22 日

[その他]

ホームページ等

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・フロンティア応用原子科学研究センター・准教授

研究者番号：10359549

(3) 研究協力者

福山 恵一 (FUKUYAMA KEIICHI)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：80032283