

令和元年6月13日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07261

研究課題名(和文) 中性子構造解析を中心とした多角的な手法によるビリン還元酵素の反応機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of Reaction Mechanism of Bili Reductase by Multiple Methods Mainly Neutron Structure Analysis

研究代表者

海野 昌喜 (Unno, Masaki)

茨城大学・理工学研究科(工学野)・教授

研究者番号：10359549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：フェレドキシン依存性ビリン還元酵素の一つPcyAは、ヘム分解産物であるビリベルジン(BV)からフィコシアノビルリンを生成する酵素である。この反応は二か所を順を追って二段階で各2電子還元・2プロトン化(計4電子と4つのプロトンを使って還元)する。この特異な反応機構を水素原子レベルで解明するべく、PcyAの反応中間体や変異体の中性子結晶構造解析を目指した。2つの変異体(186D, D105N)について、結晶大型化に成功し、中性子回折実験を行って、それぞれ1.6 Å分解能に相当する中性子回折データを得た。両構造に関して精密化を行っているが、BVのプロトン化状態に違いが見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この酵素により生成される色素は、光合成に使われる色素の一つであり、また、光センサーとしても機能していることが知られている。この色素の合成機構を理解することは、人工的に合成することにも応用可能である。PcyA変異体では、フィコシアノビルリンとは異なる状態で反応が止まり、その中間体は特異な吸収スペクトルを示す。吸収スペクトルが異なるということは、吸収する光の波長(すなわちエネルギー領域)が異なることを意味し、太陽光の効率的な利用に有用である。今回の研究で得られた結果は、近い将来にPcyAの反応機構を明らかにするための実験的なデータとして使われ、類縁構造を持った色素の開発につながる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：PcyA, one of the ferredoxin-dependent bilin reductases, is an enzyme that biosynthesizes phycocyanobilin from the heme degradation product, biliverdin (BV). In this reaction, two-electron reduction and two-protonation (reduction using a total of four electrons and four protons) are catalyzed in two steps. In order to elucidate this unique reaction mechanism at hydrogen atom level, we aimed at neutron crystal structure analysis of reaction intermediates and mutants of PcyA. The crystal growth was successful for two variants (186D, D105N), and neutron diffraction experiments were performed. We succeeded collecting data corresponding to a resolution of 1.6 Å; for the both mutants. Structure refinements were in progress for both structures, and differences in the protonation state of BV were observed.

研究分野：構造生物化学

キーワード：中性子結晶構造解析 ビリン還元酵素 光合成色素 水素原子 プロトン 分光学 反応機構

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物は光をエネルギー源や環境情報として利用している。開環テトラピロール骨格(ピリン)を持つ色素群 phytyobilin 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(PCB)は、ピリベルジン IX α (BV) が、酵素 phytyocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase (PcyA)によって還元され生成する。

フェレドキシン依存性ピリン還元酵素(FDBR)は、フェレドキシンから受け取った電子を使い、ヘム分解産物である BV を還元して phytyobilin を生合成する酵素の総称である。PcyA は FDBR の主要なメンバーで、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 (PCB)を合成する。この PcyA 反応の特徴は、BV の離れた 2 つの部位に選択的にそれぞれ 2 電子と 2 つのプロトン(H⁺)を供給し、しかもこの二段階反応の順序を間違えない点にある。また、PcyA は BV の D 環を還元できる当時唯一の FDBR メンバーであり、その特異な反応機構の解明のためには、触媒反応中の「立体的な」水素位置を同定することが極めて重要である。

PcyA の構造機能相関の研究は FDBR の中でも最も活発であり世界的に競争が激しく、特に、ペンシルバニア大の Bryant、カリフォルニア大の Fisher や Lagarias らはしのぎを削っている競争相手である。PcyA の反応機構については、生化学・分光学的な手法に X 線結晶構造解析を融合して研究されてきた。部位特異的な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、PcyA-BV の X 線結晶構造解析からも、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が示唆された。さらに、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 中間体複合体の X 線構造では、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。しかしながら、酵素の中の水素原子を同定する研究は NMR での変異体の解析(座標までは正確にわからない)があるのみで、プロトン移動を伴う PcyA の反応機構解明には、未だに不明な点が多く残されていた。

我々は、「水素原子レベル」で構造を明らかにするために、過去の科研費研究課題の遂行により、PcyA-BV 複合体の大型結晶育成を行い、中性子結晶構造解析に成功した。これは、FDBR メンバーで世界初の中性子結晶構造である(FDBR の研究分野で中性子結晶構造解析に従事しているのは応募者が世界唯一のようである)。その構造解析では、BV と近傍の Asp105 に二つの水素化状態があることを証明し、世界で初めてその構造の可視化に成功した。また、最も近傍にある水分子の存在も BV の状態に依存することを示した。それ以前に提唱されていた BV のラクチム(-N=C-OH)構造は存在せず、H⁺が付いていないラクタム(-HN-C=O)構造を実証することができた。さらに、BV 近傍の His88 の N δ のプロトン化や、その近くのヒドロニウムイオン(H₃O⁺)を発見し、His88 にプロトンを渡す準備をしている構造になっていることを示した。H₃O⁺をタンパク質構造中に見出したのは世界で 3 例目である。

一方で、最初のプロトンドナーであると提唱されている Glu76 の水素化状態については曖昧さが残った。また、反応前(PcyA-BV 複合体)の構造だけでは、実際に「どこから」「どのアミノ酸が」「どの段階で」「BV のどの部位に」「どのように」プロトンを渡すのかという機構は推測の域を出ない。さらに、反応解析の過程で、BV との複合体の吸収スペクトルが大きく変わる変異体(例えば I86D や D105N)が見出され、BV 近傍の水素結合様式の変化が考えられるが、実際のところは不明であった。

2. 研究の目的

PcyA-BV の中で二状態があった BV と Asp105 は、吸収スペクトルや反応が異なる変異体でも同様に二状態が混在しているのか、また、その構造と吸収スペクトルとの相関はあるのかを解明することは、PcyA の反応機構を解明する上で極めて重要である。そこで、これら残された問題を解決して PcyA の特異な反応機構を「水素原子レベル」の構造から完全に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

目的を達成するために、課題として以下の項目を上げた。

野生型 PcyA-18EtBV 中間体複合体、PcyA-PCB 生成物複合体および Ile86Asp 変異体 PcyA と BV の複合体(I86D-BV)の高分解能中性子結晶構造解析を行うこと。(反応前の野生型構造との違いから水素配置・水素結合の変化がわかるはずである。)そのためにそれらの大型結晶作製方法を確立すること。また、生成物 PCB と PcyA の複合体を安定化する条件を確立すること。

野生型、Asp105Asn(D105N)変異体、Glu76Gln(E76Q)変異体 PcyA それぞれと BV との複合体を用いて、赤外分光により Asp105、Glu76 の水素化状態を解析すること(理研・久保と協力)。

水素原子レベル構造を基にした計算科学による反応機構の補完すること(茨大・森と協力)。

PcyA と各色素の複合体は滴定により再構成を行った。BV、PCB は市販のものがあるが、

18EtBV は市販されておらず、手持ち分がなくなれば、化学合成が必要であった。これは研究協力者として様々な研究者が担当した（後述）。これらの色素は光に不安定なため、低温で暗所に保存し、必要時に溶解して用いた。色素とタンパクは等量で混合し、複合体を氷上で再構成した。複合体の濃度は吸収スペクトルにより見積もったが、等量点は滴定によりさらに正確に決定した。

PcyA-18EtBV および I86D-BV の結晶化条件はすでに報告されており、それらの条件を改良し良質の結晶を得ようと試みた。また、研究開始までに、PcyA-BV 複合体の大型結晶の作製には成功しており、その方法に準じて目的結晶の大型化を試みた。具体的には、タンパク質濃度を上げ、沈殿剤濃度を下げたシッティングドロップ蒸気拡散法を用いて、小ケールで結晶化条件を細かく振って相図を描き、良質で且つ大きな結晶が得られる条件を探し当て、そのスケールを大きくする方法を採用した。これらの実験は全て実験室の蛍光灯を消して行った。I86D 変異体は大腸菌の発現系で、野生型とほぼ同様の方法（細胞破碎後、硫酸分画、疎水クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー）で精製した。

大型結晶ができたため、中性子回折実験でバックグラウンドを抑えるために結晶の重水素置換を試みた。結晶化溶液と同様の組成を重水素試薬と重水で作成し、結晶のソーキングを行った。

中性子回折実験は大強度陽子加速器施設 J-PARC の iBIX とドイツの FRM2, BIODIFF で行った。前者は D105N-BV 複合体の中性子回折実験に、後者は I86D-BV 複合体の中性子回折実験に用いた。

高分解能“常温”X線回折実験は、つくばの Photon Factory で行った。常温実験は PcyA-BV の解析時にすでに経験しており、キャピラリーを短くすることなど、失敗から学んだノウハウがあった。X線の照射損傷をできるだけ抑えるべく、大きな結晶に対しては、1ショットごとにX線照射位置をずらした回折実験が可能であるが、今回は照射量を変化させたデータセットを3種類ずつ収集した。

D105N および Glu76Gln 変異体 (E76Q) のプラスミドは、研究協力者の杉島らが作製したものをを用いた。発現・精製法に関しては、野生型と同様の方法で行った。吸収スペクトルを測定し、濃度を他の変異体と一致させ、速やかに赤外分光の実験に移った。赤外分光の実験は、研究分担者の久保・野村と協力して行った。

4. 研究成果

反応中間体である 18EtBV の化学合成や単離を試みたが、結論から述べるとうまくいっていない。まず、ヘミンの還元を行ったが、還元される部位が選択的にできないため、この方法は断念した。一方で、研究協力者の静岡大学・成川が見つけた、反応中間体を多く蓄積する菌の PcyA から単離する方法を試みた。しかし、PcyA の発現量が少なく、微量のタンパク試料からの出発となり、この方法も一時保留となった。

PcyA (WT)-BV 複合体の BV のプロトン化状態は、B 環ピロール N に付いた水素の occupancy + C 環ピロール N に付いた水素の occupancy が $0.8 + 0.6 = 1.4$ 有意に 1.0 より大きく 2.0 より小さいので、4つのピロール環すべてがプロトン化した BVH^+ だけでなく、プロトン化していない（3つのピロール環のみがプロトン化している）中性の BV も混在していた。本研究で遂行した I86D-BV 複合体の中性子構造解析の結果、B 環ピロール N に付いた水素の occupancy + C 環ピロール N に付いた水素の occupancy は $1.0 + 0.9 = 1.9$ であった。つまり、 BVH^+ と BV が混在していた WT-BV 複合体と違い、I86D-BV 複合体では BVH^+ のみが存在し完全プロトン化していたといえる。一方で、D105N-BV 複合体の中性子回折実験を行うことはできたが、水素原子の見え方が弱かった。この原因はいくつか考えられるが、重水素置換が不十分であった可能性がある。これについては現在考察中であり、構造解析と精密化を繰り返している。近い将来に、もう一度中性子回折実験を行う必要があるかもしれない。両方の回折データは 2.0 \AA で処理された。詳細については、近く論文で発表したい。

その他、先に報告した PcyA-BV 複合体中性子結晶構造解析の結果残った曖昧な点として、Glu76 のプロトン化状態がある。この残基はプロトンドナーとなると考えられたが、中性子結晶構造解析の結果でははっきりとわからなかった。要因としては、光の照射が構造を変化させてしまった可能性や、X線照射によるラジカルや電子の発生が考えられた。そのため、まず、Glu76 のプロトン化状態を溶液の中で確かめるため、赤外分光解析を行った。pH8.0 と 5.9 において PcyA (WT, E76Q, D105N) と BV の複合体を作製し、兵庫県西播磨にある SPring-8 の高空間分解顕微鏡 (BRUKER Hyperion2000) と赤外分光光度計 (BRUKER Vertex70) を用いて測定を行った。それぞれの差スペクトルを計算した結果、Glu76 は 2 つのコンホメーションを持ちどちらもプロトン化していることが分かった。また Asp105 はプロトン化と脱プロトン化の 2 状態が存在し、中性子結晶構造と一致する結果となった。

この結果を受けて、我々は「Glu76 はプロトン化している」と結論付けるに至った。そこで、結晶構造解析でもプロトン化を確認するため、まず、X線の影響を排除するため、X線自由電子レーザー (XFEL) で回折実験を行った。その結果、Glu76 は 2 つのコンホメーションを持つことが明らかになり、かつ、光（生活光）の照射により、Glu76 は BV に接近することが示唆された。今後は、暗所での試料調製を徹底し、低温で中性子回折実験・X線回折実験を行うことを予定している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- [1] Igarashi, K., Hagiwara, Y., Sugishima M., Wada, K., Fukuyama, K., Ikeda, A., Yano, N., Kusaka, K., Ostermann, A., *Unno, M.,
"Crystal Growth of a Bilin Reductase PcyA I86D Mutant-Substrate Complex for Neutron Crystallography", *Cryst. Growth. Des.* (査読有); **18**, 5174-5181, (2018)
DOI: 10.1021/acs.cgd.8b00607
- [2] Iijima, E., *Gleeson, P., Unno, M., *Mori, S.,
"QM/MM Investigation for Protonation States in a Bilin Reductase PcyA-Biliverdin Complex",
ChemPysChem (査読有); **19**, 1809-1813, (2018)
DOI: 10.1002/cphc.201800031

〔学会発表〕(計 18 件)

- [1] 池田篤史、平田邦生、杉島正一、萩原義徳、和田啓、福山恵一、山下恵太郎、吾郷日出夫、海野昌喜
“SACLA を利用した PcyA-BV 複合体の X 線と中性子構造の矛盾点の解決に向けた研究”
2018 年度量子ビームサイエンスフェスタ, 2019 年
- [2] 堀江和輝、五十嵐啓介、杉島正一、萩原義徳、和田啓、福山恵一、矢野直峰、山田太郎、日下勝弘、海野昌喜
“PcyA D105N-BV 中性子結晶構造解析”
2018 年度量子ビームサイエンスフェスタ, 2019 年
- [3] 堀江和輝、五十嵐啓介、杉島正一、萩原義徳、和田啓、福山恵一、矢野直峰、山田太郎、日下勝弘、海野昌喜
“フェレドキシン依存性ビリル還元酵素 PcyA D105N 中性子構造解析”
日本中性子科学会第 18 回年会, 2018 年
- [4] 海野昌喜
“中性子・X 線構造解析で酸化還元酵素の構造を観る。～中性子・X 線の利点と欠点～”
第 31 回生物無機化学夏季セミナー, 2018 年
- [5] 海野昌喜
“光合成色素フィコシアノピリンを生合成する酵素のプロトンの構造情報と化学”
第 18 回日本蛋白質科学会年会, 2018 年
- [6] Masaki Unno
“Protonation State and Reaction Mechanism of a Phycocyanobilin:ferredoxin Oxidoreductase, PcyA”
Asian Workshop of Experiment and Theory in Quantum Beam Molecular Sciences, 2018 年
- [7] 五十嵐啓介、杉島正一、和田啓、萩原義徳、日下勝弘、矢野直峰、福山恵一、Andreas Ostermann, 海野昌喜
“ビリル還元酵素 PcyA 変異体 I86D-BV 複合体の中性子結晶構造解析”
2017 年度量子ビームサイエンスフェスタ, 2018 年
- [8] 堀江和輝、久保稔、野村高志、杉島正一、萩原義徳、和田啓、五十嵐啓介、福山恵一、海野昌喜
“FTIR 法を用いたフェレドキシン依存性ビリル還元酵素 PcyA-BV 複合体 Glu76 の水素化状態の解明”
2017 年度量子ビームサイエンスフェスタ, 2018 年
- [9] 海野昌喜
“中性子構造解析を中心的手法とした光合成色素合成酵素の水素原子レベル反応機構解明”
ConBio2017, 2017
- [10] 五十嵐啓介、松井敏高、日下勝弘、矢野直峰、杉島正一、和田啓、萩原義徳、Andreas Osterman, 福山恵一、海野昌喜
“ビリル還元酵素 PcyA の I86D 変異体の水素原子レベル構造解析”
第 17 回東北大学多元物質科学研究所研究発表会, 2017 年
- [11] 堀江和輝、久保稔、杉島正一、萩原義徳、和田啓、五十嵐啓介、福山恵一、海野昌喜
“フェレドキシン依存性還元酵素 PcyA によるフィコシアノピリン生合成反応機構の解明”
日本化学会関東支部茨城地区交流会, 2017 年
- [12] 五十嵐啓介、杉島正一、和田啓、萩原義徳、日下勝弘、矢野直峰、福山恵一、Andreas Ostermann, 海野昌喜
“ビリル還元酵素 PcyA 変異体 I86D-BV 複合体の中性子結晶構造”
日本結晶学会平成 29 年度年会, 2017 年

- [13] Eri Iijima, M. Paul Gleeson, Masaki Unno, Seiji Mori
“ Structural QM/MM Investigation of Bilin Reductase PcyA-substrate Complex. ”
第 11 回分子科学討論会, 2017 年
- [14] 海野昌喜
“ 中性子構造解析を中心とした手法で解明する光合成色素フィコシアノビリンの合成メカニズム ”
平成 29 年度 iBIX-JAXA 合同タンパク質研究会, 2017 年
- [15] Masaki Unno
“ Neutron Crystallographic Study of a Bilin Reductase, PcyA ”
14th Conference of Asian Crystallographic Association, 2016 年
- [16] Masaki Unno
“ Neutron crystallography elucidated the protonation states of a bilin reductase PcyA in complex with its substrate biliverdin ”
The International Symposium of Quantum Beam Science at Ibaraki University, 2016 年
- [17] 五十嵐啓介, 杉島正一, 和田啓, 萩原義徳, 日下勝弘, 福山恵一, 海野昌喜
“ ビリン還元酵素 PcyA 変異体 I86D-BV 複合体の中性子結晶構造解析に向けて ”
日本結晶学会年会 2016, 2016 年
- [18] 萩原義徳, 和田啓, 入川鉄平, 佐藤秀明, 海野昌喜, 山本健, 福山恵一, ○杉島正一
“ I86D 変異フィコシアノビリリン：フェレドキシン還元酵素 (PcyA) の精密構造解析から見てきた活性部位周辺残基の水素化状態 ”
第 89 回日本生化学会大会, 2016 年

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：森 聖治

ローマ字氏名：Mori Seiji

所属研究機関名：茨城大学

部局名：理工学研究科（理学野）

職名：教授

研究者番号（8桁）：50332549

研究分担者氏名：久保 稔

ローマ字氏名：Kubo Minoru

所属研究機関名：兵庫県立大学

部局名：生命理学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：90392878

(2)研究協力者

研究協力者氏名：五十嵐 啓介

ローマ字氏名：Igarashi Keisuke

研究協力者氏名：堀江 和輝

ローマ字氏名：Horie Kazuki

研究協力者氏名：池田 篤史

ローマ字氏名：Ikeda Atsushi

研究協力者氏名：萩原 義徳

ローマ字氏名：Hagiwara Yoshinori

研究協力者氏名：杉島 正一
ローマ字氏名：Sugishima Masakazu

研究協力者氏名：和田 啓
ローマ字氏名：Wada Kei

研究協力者氏名：日下 勝弘
ローマ字氏名：Kusaka Katsuhiko

研究協力者氏名：矢野 直峰
ローマ字氏名：Yano Naomine

研究協力者氏名：野村 高志
ローマ字氏名：Nomura Takashi

研究協力者氏名：野村 高志
ローマ字氏名：Nomura Takashi

研究協力者氏名：成川 礼
ローマ字氏名：Narikawa Rei

研究協力者氏名：吾郷 友宏
ローマ字氏名：Agou Tomohiro

研究協力者氏名：平田 邦生
ローマ字氏名：Hirata Kunio

研究協力者氏名：吾郷 日出夫
ローマ字氏名：Ago Hideo