



Title	Redox-dependent hydrogen bond network rearrangement of Ferredoxin-NADP+ reductase revealed by high-resolution X-ray and neutron crystallography
Author(s)	上中, みどり
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/101929
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (上中みどり)	
論文題名	Redox-dependent hydrogen bond network rearrangement of Ferredoxin-NADP ⁺ reductase revealed by high-resolution X-ray and neutron crystallography (X線と中性子を用いたフェレドキシン-NADP ⁺ 還元酵素の結晶構造解析により明らかに なった酸化還元依存した水素結合ネットワークの再配置)
論文内容の要旨	
<p>植物細胞では、レドックス代謝反応に必要な還元力は電子伝達タンパク質のフェレドキシン (Fd) が多くのFd依存性酵素に分配している。Fd依存酵素のうち、Fd-NADP⁺還元酵素 (FNR) は FAD を補欠分子族として結合するフラビン酵素で、植物プラスチドにおいてFdと NADP (H) 間の酸化還元反応を触媒する役割を持つ。FADのイソアロキサジン環が酸化還元中心であり、二電子を授受できる。イソアロキサジン環は、酸化型 (FAD) 、一電子還元状態のセミキノノン型 (FADH) 、二電子還元状態のヒドロキノノン型 (FADH₂) の三構造をとる。このようなFADの酸化還元状態の違いによって引き起こされるタンパク質の構造変化が、Fd-FNR間の会合・解離を含めた効率的なタンパク質間電子伝達に寄与すると考えられた。そのため、過渡的かつ特異的な複合体形成について、生化学的および構造生物学的な研究が積み重ねられてきた。酵素学的には酸化型Fdと還元型FNRで活性を測った時と、その逆反応で活性を測った時とで、<i>K_m</i>値に大きな違いが報告されていた。しかし、構造生物学的には実験上の都合から酸化型Fdと酸化型FNRを用いた構造解析の報告しかなく、FADの酸化還元状態の違いに起因したタンパク質の構造変化、およびそれによって引き起こされるであろうFd-FNR間の相互作用の変化について構造生物学的に詳細な検討がなされていなかった。そこで本研究では、良質な結晶が得られるトウモロコシ根由来のFNRを用いて、FNRの酸化還元状態を厳密にコントロールしたX線結晶構造解析を実施し、FADの酸化還元状態の違いによってFNRがどの様に構造変化するのかを実験的に確認した。</p> <p>X線結晶構造解析において高分解能のデータを取得するには、結晶への X 線照射量を増やす必要である。しかし結晶に照射されたX線が水和電子を発生させ、酸化還元中心を還元してしまう現象が以前から報告されていた。酸化還元酵素であるFNRにおいても、酸化型結晶へのX線照射によりFADが一部還元されてしまう可能性が指摘できるが、データベースに登録されているFNRのX線構造でデータ収集の際にX線照射量が考慮されたものはない。そこで真に酸化型の構造を解析するために、X線照射量とFADの還元率との関係性を導き出して、還元率が 1 割未満になる最小限のX線照射量で回折強度データを収集した。その結果、酸化型のX線構造を1.15 Å分解能で決定できた。併せて結晶の還元状態を顕微分光装置により確認した還元型FNRのX線結晶構造も1.10 Å分解能で決定した。二つの構造を比較したところ、主鎖構造に大きな変化はないことが示された。しかし酸化型と還元型の構造因子で計算した$F_o - F_c$差フーリエマップの解析から、側鎖や水分子による構造変化がFAD周辺に集中していることが明らかになった。FADからFADH₂への還元に伴い、イソアロキサジン環周辺にあるArg115およびSer95の側鎖とTyr317のC-末端に構造変化が観察され、周囲の水分子の数や配置にも変化が確認された。しかし、これらの変化がFADからFADH₂への還元とどの様に繋がっているのかは解釈できず、水分子とFADH₂との間の水素結合に影響を与えた結果であろうと推測されるに留まった。</p> <p>そこで、次に水素原子を含む全原子座標の位置を正確に決定するために中性子結晶構造解析を行なった。酸化型および還元型の中性子回折強度データは J-PARC/MLFのBL03 (iBIX) において100K下でTOF-Laue法により収集し、両者とも1.8Å 分解能で構造決定した。X線では難しかった水素原子の位置を含めたFADおよびFADH₂の完全な構造と、クラスター状に存在する周辺の水分子が形成する複雑な水素結合ネットワークを、水素結合のドナーとアクセプターを区別して明らかにすることができた。酸化型・還元型の中性子構造の比較から、FADがFADH₂に還元されることでSer95のO_γ酸素およびHOH78のO酸素と新しく斜めにかかった水素結合が形成され、この水素結合形成をトリガーにTyr317のFADH₂に対する位置取りに影響を及ぼしていることがわかった。また、HOH78はHOH60を介してArg115の側鎖と水素結合しており、HOH60の水素結合がOH•••Oのドナー型からO•••HOのアクセプター型に再配置することでArg115の側鎖との水素結合を切り、Arg115側鎖の運動性をコントロールしていることが判明した。Arg115はFNR分子の表面に位置し、電子伝達複合体の形成に重要であると考えられている静電的な性質に大きな影響を与えている。そのため、酸化還元に伴う水素結合の再配置がFdとFNRの顕著な相互作用の違いを引き出す構造的な要因であると考察した。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (上 中 み ど り)			
論文審査担当者	(職)		氏 名
	主 査	教授	栗栖 源嗣
	副 査	教授	中川 敦史
	副 査	准教授	山下 栄樹
論文審査の結果の要旨			
<p>学位申請者は、植物のレドックス代謝反応ではたらく酵素に着目し「Redox-dependent hydrogen bond network rearrangement of Ferredoxin-NADP+ reductase revealed by high-resolution X-ray and neutron crystallography (X 線と中性子を用いたフェレドキシン-NADP+還元酵素の結晶構造解析により明らかになった酸化還元に依存した水素結合ネットワークの再配置)」と題する研究を行った。</p> <p>植物細胞のレドックス代謝反応では、必要な還元力は電子伝達タンパク質フェレドキシン (Fd) により Fd 依存代謝酵素に分配されている。Fd 依存代謝酵素のうち、Fd-NADP+還元酵素 (FNR) は FAD を補欠分子族としてもつフラビン酵素で、Fd と NADP(H) 間の酸化還元反応を触媒する。FAD のイソアロキサジン環が酸化還元中心となり、酸化型 (FAD)、一電子還元状態のセミキノン型 (FADH\cdot)、二電子還元状態のヒドロキノン型 (FADH$_2$) の三構造をとる。FAD の酸化還元状態の違いによって引き起こされるタンパク質の構造変化が Fd-FNR 間の会合・解離を含めた効率的なタンパク質間電子伝達に寄与すると考えられる。しかし、FAD の酸化還元状態の違いに起因したタンパク質の構造変化、およびそれによって引き起こされるであろう Fd-FNR 間の相互作用の変化について構造生物学的に詳細な検討はなされてこなかった。</p> <p>本論文で申請者は、トウモロコシの根プラスチドにある FNR に着目した。まず、顕微分光装置をもちいて FNR の酸化還元状態を厳密にモニターしながら X 線結晶構造解析を実施し、酸化還元状態の違いによって FNR がどのように構造変化するかを実験的に確認した。その結果、FAD から FADH$_2$ への還元に伴い、イソアロキサジン環周辺にある Arg115 および Ser95 の側鎖と Tyr317 の C-末端に構造変化が観察され、周囲の水分子の数や配置も変化を確認した。しかし、これらの変化が FAD から FADH$_2$ への還元とどのように繋がっているのかは X 線構造からだけでは解釈できず、水分子と FADH$_2$ との間の水素結合に影響を与えた結果であろうと推測されるに留まった。そこで、水素原子を含む全原子座標の位置を正確に決定するために中性子結晶構造解析を行なった。中性子結晶構造解析には重水化した超大型の単結晶を必要とするが、申請者は酸化型および還元型の両者ともに 1.8Å 分解能で中性子構造を構造決定した。FAD 周辺の水素原子に由来する原子散乱長密度の観察に成功して、X 線では難しかった水素原子の位置を含めた FAD および FADH$_2$ の完全な構造と、クラスター状に存在する周辺の水分子が形成する複雑な水素結合ネットワークを全て明らかにした。特に Arg115 の側鎖と水素結合している水分子が、OH\cdotsO のドナー型から O\cdotsH-O のアクセプター型に再配置することで Arg115 の側鎖との水素結合を切り、Arg115 側鎖の運動性をコントロールしていることを明らかにしたことは、非常に学術的価値が高い。酸化還元に伴う水素結合の再配置が Arg115 の側鎖の構造変化を引き起こし、Fd との相互作用の違いを引き出す構造的な要因であると提唱するに至っている。本論文の研究内容は、植物のレドックス代謝を駆動する電子伝達の制御機構を理解する上で、大変意義のある成果である。</p> <p>よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。</p>			