

Title	Structural basis for the regiospecific reaction catalyzed by phycocyanobilin : ferredoxin oxidoreductase (PcyA)
Author(s)	萩原, 義徳
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58011
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

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

＜研究の背景と目的＞

光合成生物は、光応答色素あるいは光合成色素としてビリンをういている。光センサータンパク質であるフィトクロムや、集光性アンテナ複合体であるフィコビリソームが発色団としてビリンを結合している。ビリンとは、ヘムの代謝産物である biliverdin IX α (BV) からフェレドキシン依存性ビリン還元酵素ファミリーによって合成される開環状のテトラピロール色素である。本酵素ファミリーに属する phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase (PcyA) はフェレドキシンから電子を受け取り、BV の異なる 2 箇所を連続的にそれぞれ 2 電子還元して phycocyanobilin を合成する。1 段階目に D 環ビニル基を還元し、2 段階目に反応中間体色素 18¹,18²-dihydrobiliverdin (18EtBV) の A 環を還元する。この部位特異的な 2 段階反応から、PcyA では基質の還元部位を厳密に認識し、D 環ビニル基を先行して還元する独自のメカニズムが存在していると考えられる。しかしながら、本酵素ファミリーにおける構造情報は皆無であり、PcyA の立体構造を始め、その基質結合部位やプロトン供与基も明らかではなかった。

本研究は PcyA における BV 還元の分子機構を明らかにすることを目的とし、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 由来 PcyA の X 線結晶構造解析に取り組んだ。

＜結果と考察＞

まず大腸菌を用いた PcyA の大量発現系を構築し、その精製方法を確立した。PcyA-BV 複合体および PcyA の結晶化に成功し、結晶構造を 1.51 Å、2.5 Å 分解能で決定した。これは本酵素ファミリーにおける初めての結晶構造である。これら結晶構造の比較から、PcyA は基質の結合に伴って誘導適合しており、BV 結合型と非結合型では PcyA 分子表面の電荷分布が顕著に異なっていた。すなわち、BV 非結合型では正電荷が散在していたのに対し、BV 結合型では基質ポケット周辺に正電荷が局在していた。電子供与体であるフェレドキシンが酸性タンパク質であり、その分子表面が主に負電荷を帯びていることを考慮すると、PcyA の基質結合に伴うポケット周辺の正電荷の局在化は、負に帯電したフェレドキシンとの静電的な相互作用を促進すると考えられる。さらに、PcyA の D 環特異的な還元反応の構造基盤に焦点を当て、反応中間体の捕捉に取り組んだ。また、基質アナログ biliverdin XIII α (BV13) との複合体および変異導入 PcyA の構造機能解析も行った。この結果、Glu76 が BV の D 環ビニル基還元必須であることがわかった。さらに PcyA-18EtBV、PcyA-BV13、E76Q-BV 複合体をそれぞれ 1.48 Å、1.04 Å、1.40 Å 分解能で構造決定した。PcyA-BV で D 環ビニル基に近接していた E76 のカルボキシル基は (O-C 間の最短距離：2.51 Å)、反応中間体では D 環ビニル基から離れていた (3.39 Å)。このことは、PcyA-BV 中でのみ E76 のカルボキシル基と D 環ビニル基が親和的に近接していることを示す。これは PcyA が BV と OH- π 結合することを示唆しており、この特異的な酵素内 OH- π 結合が PcyA の先行的な D 環ビニル基還元の構造要因であることを見出した。

論文審査の結果の要旨

生物は光をエネルギー源や環境情報として利用しており、光受容タンパク質がこの機能を担っている。ラン藻などの光合成生物では、フィコビリソームという巨大なタンパク質-色素複合体が光を吸収し、光化学系 II の反応中心にこのエネルギーを効率よく伝達する。この複合体で用いられているのがビリンという色素である。植物中では、この色素はフィトクロムに結合し、これが種子の発芽や花芽形成などの生理反応を制御している。ビリン色素は、ヘムオキシゲナーゼの働きによってヘムが開環

【56】

氏 名	はぎ 秋 原 よし のり 徳
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 5 8 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 22 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	Structural basis for the regiospecific reaction catalyzed by phycocyanobilin : ferredoxin oxidoreductase (PcyA) (フェレドキシン依存性ビリン還元酵素PcyAが触媒する部位特異的反応の 構造基盤)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 福山 恵一 (副査) 教 授 長谷 俊治 教 授 金澤 浩

したビリベルジン IX α (BV) を、フェレドキシン依存性ビリン還元酵素 (FDBR) が還元することによって合成される。FDBR はファミリーを形成し、これを構成する酵素のそれぞれは BV の異なる部位を還元し、この結果様々な吸収波長を持つ色素の合成が可能となり、これによって光合成生物は多様な光環境に適応している。

本研究でとりあげた酵素は FDBR ファミリーの中で最も主要な phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase (PcyA) であり、BV の D 環ビニル基と A 環を部位特異的に、しかも逐次的に還元する特徴を持つ。また、FDBR ファミリーの中で PcyA は D 環ビニル基を還元できる唯一の酵素でもある。まず、PcyA の発現系を構築し、大腸菌で大量に発現できるようにした。PcyA およびその BV 複合体を結晶化し、世界初の X 線結晶解析を行った。この解析結果から、PcyA はユニークな $\alpha/\beta/\alpha$ サンドイッチ構造をとっており、BV の PcyA への結合様式が明確に示された。これらの解析結果は、これまで蓄積された生化学・分光学的性質に構造基盤を与えただけでなく、BV の結合に伴う構造変化およびフェレドキシンとの特異的相互作用を明らかにした。

本研究では PcyA 反応の分子機構解明に迫るため、BV の反応中間体やアナログと PcyA との複合体の構造を決定した。さらに、酵素反応に重要と考えられるアミノ酸残基を改変し、このミュータントタンパク質-BV の構造と性質を明らかにした。これらの知見を総合して、PcyA-BV では Glu76 と D 環ビニル基との間に OH... π 水素結合が存在し、これによって PcyA が BV の D 環ビニル基を優先して還元しているという分子機構を提案した。また、高分解能 X 線解析したことから、PcyA 中では基質 (BV) が通説とは異なる位置にプロトンを結合していることを示し、PcyA の新たな研究展開の芽をつくったといえる。

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。