



Title	Redox-dependent conformational change of the [2Fe-2S] ferredoxin revealed by ultra-high resolution X-ray crystallography
Author(s)	大西, 裕介
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76400
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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">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

氏 名 (大 西 裕 介)	
論文題名	Redox-dependent conformational change of the [2Fe-2S] ferredoxin revealed by ultra-high resolution X-ray crystallography (超高分解能X線結晶解析による[2Fe-2S]型フェレドキシンの酸化還元反応に関する構造基盤の解明)
論文内容の要旨	
植物型フェレドキシン (Fd) は、[2Fe-2S] 錯体を持つ水溶性の電子伝達蛋白質である。葉に存在する Fd は、光化学系Iから電子を受け取った後、Fd-NADP⁺-レダクターゼ (FNR) などの Fd 依存酵素と特異的に複合体を形成し、電子を受け渡す。ここで、Fd と FNR 間の解離定数は、電子伝達の前後で20倍程度変化することが知られており、Fd の酸化還元に伴う構造変化が Fd と Fd 依存酵素の間の解離・会合を制御しているものと考えられているが、そのメカニズムはよく分かっていなかった。酸化型 [2Fe-2S] については、現在までに複数種の構造が高分解能で解析されている。しかしながら、高輝度X線の照射により金属タンパク質が還元される例が報告されるにつれ、現在解析されている酸化型 Fd の構造についても酸化型と還元型の混合状態である可能性が疑われた。還元型 [2Fe-2S] Fd については、シアノバクテリア <i>Anabaena</i> PCC7119 由来の Fd 結晶を還元剤にソークすることで、唯一1.17 Å 分解能で構造が決定されているが、この結果では還元により [2Fe-2S] 錯体近くのペプチド結合がフリップすることが示されただけであった。しかし還元型 Fd の構造についても、このペプチド結合のフリップ前後の構造に由来する電子密度が両方観測されたことから、この構造も酸化型と還元型の混合状態であると考えられる。 本研究では、厳密に酸化型及び還元型の[2Fe-2S] Fd の構造を決定し、精密な構造比較を行うことで、Fd の酸化還元に伴う構造変化をより正確に明らかにし、これを元にFd が FNR との親和性を制御するメカニズムを解明することを目的とした。初めに、X線の照射が結晶中の Fd の酸化状態にどれほど影響を与えるかを調べるため、緑藻由来 Fd の結晶にX線を照射し、その吸収スペクトルの変化を顕微分光法でモニターした。その結果、酸化型 Fd に特有の吸収ピークがX線の照射に伴い徐々に減衰する様子が観測された。この結果から、結晶の還元率とX線ドーズとの関係を見積もった。これを元に、結晶のX線による還元率を10%未満に抑えつつ、複数の Fd 結晶から回折データを収集し統合することで、低損傷の酸化型 Fd の構造を0.78 Å 分解能で決定した。また、X線自由電子レーザーを用いて全く損傷の無い酸化型 Fd の構造を1.41 Å 分解能で構造決定することにも成功し、無損傷の構造が低損傷の構造とほとんど差がないことを確認した。還元型 Fd については、還元剤ソーキングの時間を先行研究の6倍に伸ばすことで、完全還元型 Fd の構造を0.77 Å 分解能で決定することに成功した。両構造をさふりエマップと分子モデルの双方で比較することにより、以前報告されていたペプチド結合のフリップが初めて明瞭に観測された他、[2Fe-2S] 錯体のジオメトリや、Fd の酸化還元電位の保持に重要であることが知られる46番目のセリン (S46)、64番目のフェニルアラニン (F64) 及び93番目のグルタミン酸 (E93) のアミノ酸側鎖の位置が酸化還元に伴って、わずかに変化することを新たに明らかにした。F64の変位は FNR との相互作用面に存在する66番目及び68番目のアスパラギン酸の位置取りに影響すると考えられ、Fd の酸化還元に伴う FNR との親和性の変化を説明する作用モデルを構築することができた。また、今回発見された一連の構造変化の機序を検証するため、S46をアラニンに置換した変異体、F64をアラニンに置換した変異体を作製し、それぞれの酸化型及び還元型の結晶構造を0.95~1.1 Å 分解能で決定した。この結果から、[2Fe-2S] 錯体の酸化還元に伴うペプチド結合のフリップが S46, F64 及び E93 の変位に先立って起こることが分かった。以上の一連の実験により、[2Fe-2S] Fd の錯体に生じる1電子の電荷の変化が周辺残基の連続的な変位により FNR との相互作用面にまで伝わり、FNR との解離定数に大きく影響を及ぼす仕組みを構造化学的に説明することができた。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (大 西 裕 介)			
論文審査担当者	(職)		氏 名
	主 査	教 授	栗 栖 源 嗣
	副 査	教 授	後 藤 祐 児
	副 査	教 授	中 川 敦 史
論文審査の結果の要旨			
学位申請者は、光合成電子伝達系ではたらく電子伝達蛋白質フェレドキシンに着目し「Redox-dependent conformational change of the [2Fe-2S] ferredoxin revealed by ultra-high-resolution X-ray crystallography (超高分解能 X 線結晶解析による[2Fe-2S]型フェレドキシンの酸化還元反応に関する構造基盤の解明)」と題する研究を行った。 植物型フェレドキシン (Fd) は、[2Fe-2S]錯体をもつ水溶性の電子伝達蛋白質であり、葉緑体中でチラコイド膜から電子を受け取って Fd-NADP⁺-レダクターゼ (FNR) などの Fd 依存性代謝酵素へと電子を受け渡す役割を担っている。Fd と FNR 間の解離定数は、電子伝達前後で約 20 倍変化することが知られているが、その分子メカニズムはよく分かっていなかった。Fd の高分解能 X 線構造から酸化還元に伴う構造変化を議論しようと、数多くの X 線結晶構造が報告されてきたが、どれも放射線損傷や不十分な還元剤ソーキングにより酸化型と還元型の混合状態であると結論づけられる。申請者は、厳密に酸化型、還元型の各状態で Fd の構造を決定し、精密な構造比較を行うことで酸化還元に伴う親和性制御のメカニズム解明を目指した。本論文で申請者は、まず極めて薄い板状の Fd 結晶を作成し顕微分光装置をもちいて、X 線照射量と結晶中の Fd の酸化状態との相関を調べた。次に、X 線照射量を厳密にコントロールし複数の結晶から回折データを収集・統合することで、低損傷の酸化型 Fd の構造を 0.78 Å 分解能で決定することに成功している。また、X 線自由電子レーザーを用いて全く損傷の無い酸化型 Fd の構造も 1.41 Å 分解能で決定し、無損傷の構造が低損傷の構造とほとんど差がないことを確認した。還元型 Fd については、還元剤ソーキングの時間を先行研究の 6 倍に伸ばす工夫を施し、完全還元型 Fd の構造も 0.77 Å 分解能で決定することに成功している。酸化型、還元型の両構造を差フリーエ法と分子モデルの双方で比較することにより、[2Fe-2S]錯体のジオメトリー変化や、ペプチド主鎖やアミノ酸側鎖の複数の構造変化を新たに解明した。最後に、酸化還元に伴う一連の構造変化の機序を検証するため、複数の変異体を作成し酸化型、還元型の結晶構造をそれぞれ 0.95~1.1 Å 分解能で決定して、[2Fe-2S] 錯体の酸化還元に伴うペプチド結合の変化が、Ser46, Phe64 及び Glu93 の構造変位に先立って起こることを確認している。 申請者は、一連の超高分解能 X 線結晶解析により [2Fe-2S] 型 Fd に生じる 1 電子の電荷変化が、周辺残基の連続的な変位を誘起し、FNR との相互作用面にまで伝わって解離定数に大きく影響を及ぼす分子メカニズムを構造化学的に明らかにし、解離会合を伴う蛋白質複合体形成の精緻な仕組みについて新たなモデルを提唱するに至っている。本論文の研究内容は、弱い相互作用で形成される蛋白質複合体形成の制御機構を理解する上で、大変意義のある成果である。 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。			