

論文の内容の要旨

暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素の構造研究

Structure of Dark-operative Protochlorophyllide Oxidoreductase : a Greening Mechanism in the Dark

村木 則文

序論

光合成反応において光エネルギーを化学エネルギーに直接変換している分子がクロロフィルであることは一般に広く知られている。しかし、その生合成過程の構造生物学的な詳細は、最近になるまで全く知られていなかった。本研究で注目したのは、複数のステップにより構成されるクロロフィル生合成反応のなかでも特にプロトクロロフィリド (Pchl_{id}e) 還元反応である。Pchl_{id}e 還元反応は、テトラピロール環をクロリン環に変換し、クロロフィルの直接前駆体であるクロロフィリドを生成する反応で、緑色を発色するという観点からも非常に重要な反応である。この反応には、光に依存する経路と光に依存しない経路が存在し、それぞれ光依存型プロトクロロフィリド還元酵素 (LPOR) と光非依存型 (暗所作動型) プロトクロロフィリド還元酵素 (DPOR) という全く異なる酵素が反応を担っていると報告されている。

この 2 種類の Pchl_{id}e 還元酵素のうち、DPOR は被子植物を除く光合成生物に広く保存されており、アミノ酸配列から分子状窒素をアンモニアに還元するニトロゲナーゼと一定の相同性をもつことが指摘されていた。DPOR のサブユニット構成もニトロゲナーゼと類似しており、電子伝達コンポーネント (BchL) と触媒コンポーネント (BchNB) から構成されていることが解っていた。しかし、DPOR にはニトロゲ

ナーゼに特有の金属クラスターは保存されておらず、金属定量から[4Fe-4S]型 FeS クラスターを有することが予想されていたが、対応する EPR シグナルを示さなかったため、クラスター構造は同定されていなかった。また、ニトロゲナーゼは分子状窒素を基質とするのに対し、DPOR は Pchlide という非常に大きい環状分子を基質とする。そのため、ニトロゲナーゼの立体構造だけでは、DPOR が基質をどのように認識し立体特異的還元反応を触媒するのかを予想することは出来ない。前述の通りクロロフィル生合成を担う酵素群の構造解析例は乏しく、環状テトラピロール骨格の変換反応について構造生物学的にわかっていることは少ない状況であった。

そこで、私は以下の 3 つの点に注目した。まず、1) BchNB が有する FeS クラスターの構造を明らかにする。次に、2) DPOR が対称性の高い基質をどのように認識し立体特異的に還元するのかを明らかにしたい。最後に、3) 分子サイズの異なる基質を認識するニトロゲナーゼと DPOR の構造を比較することにより、ニトロゲナーゼ様の酵素が共通の構造基盤の有するかどうかを考察する。以上を本研究の目的として、DPOR の触媒コンポーネントである BchNB の X 線結晶構造解析を行った。さらに、得られた知見を元に変異酵素の構造解析を行った。変異酵素の解析結果から立てた仮説を検証したいと考え、電子伝達コンポーネントである BchL と BchNB の複合体の構造解析も試みた。

第 1 章 触媒コンポーネント BchNB の野生型酵素の構造解析

光合成細菌 *R. capsulatus* と大腸菌に BchNB を発現させ、Pchlide 結合状態と Pchlide が結合しない基質フリー状態の 2 状態の酵素を調製し、双方を結晶化・構造解析した。

1. 全体構造

2.3Å 分解能で解析した BchNB は、BchN と BchB からなるヘテロ四量体構造をしており、BchN と BchB の擬似二回回転軸上に FeS クラスターが結合していた。Pchlide 結合型 BchNB の結晶構造では、同じ擬似 2 回回転軸上に Pchlide も結合していた。

2. FeS クラスター

ニトロゲナーゼとの配列比較から、当初 4 つの Cys が配位子を提供する [4Fe-4S] 型の FeS クラスターを有すると予想されていた。しかし構造解析の結果、BchN の 3 つの Cys に加えて、BchB の Asp36 が FeS クラスターに配位子を提供していることが判明した (図 1)。Asp を配位子とする FeS クラスターが酸化還元酵素に発見された例はなく本研究が初めての報告であった。

3. Pchlide結合領域

Pchlide は疎水性アミノ酸からなる基質結合ポケットに結合していた (図 2)。Pchlide 結合構造と基質フリー構造とを比較したところ、Pchlide 結合に伴って BchB の C 末側ヘリックスが大きく構造変化していることがわかった。この動きの中で、ヘリックス上の Met408 が Pchlide のプロピオン酸基を一方向に押し上げるように移動しており、基質のトランス特異的な還元をもたらす反応メカニズムを提唱した。

4. ニトロゲナーゼとの類似性

ニトロゲナーゼの触媒コンポーネントと BchNB の立体構造を比較したところ、ニトロゲナーゼが持つ FeMo-cofactor と Pchlide の結合部位がほぼ重なることが判明した。分子状窒素が結合する FeMo-cofactor は再構成可能な補欠分子なので、これを基質の一種と考えると、ニトロゲナーゼ様酵素がもつ構造上の特徴は、分子サイズの大きい基質上にある安定な多重結合を還元する共通の構造基盤であると考えられる。

第 2 章 配位子変異型酵素の構造解析による FeS クラスターの構造研究

新規の FeS クラスターにおける BchB-Asp36 の必要性を確かめるため、BchB-D36C と D36A 変異体を作製し、生化学的な解析とともに X 線構造解析を行った。D36C 変異体は 4 つの Cys が配位した典型的な FeS クラスターを形成していたにもかかわらず、酵素活性は失われていた。一方の D36A 変異体では、水分子が配位子となる変則的な構造をしていたにもかかわらず、約 13%の活性が残っていた。これらの実験結果から、BchNB の FeS クラスターが機能するには、Asp がもつ酸素原子からの配位が必須であろうと考えられた。

第 3 章 基質相互作用領域変異型酵素の構造解析による BchB の C 末端領域の構造決定

C 末側ヘリックスによって基質生成物の立体特異性がもたらされるという作業仮説を確かめるため、BchB-M408L および M408A 変異体を作製し、解析を行った。M408L 変異体は高活性で結晶構造上にも大きな差は見られなかったが、M408A 変異体では、Pchlide が結合しているにも関わらず C 末側ヘリックスが基質フリー型と同様に伸びた構造のままであった。このことから、Met408 は、動的な構造変化を伴う反応メカニズムに重要であることが示唆された。

C 末側ヘリックスより下流の約 100 残基は、電子密度が不明瞭なため野生型の結

晶構造では確認することができなかった。しかし、大変興味深いことに M408A 変異体の結晶構造において、C 末端に約 50 残基分の球状ドメインの構造が、二つある BchB サブユニットの一方にのみ確認された (図 3)。球状ドメインの分子表面に塩基性アミノ酸が集まった領域があることから、基質のプロピオン酸基と相互作用して基質を活性中心にリクルートしてくる役割を持つのではないかと考えている。

第 4 章 DPOR のすべてのコンポーネントを含んだ、BchLNB 三者複合体の構造研究に向けた試み

電子伝達コンポーネント BchL は非常に酸素感受性が高く、光合成細菌に発現させ、嫌気チャンバー内で精製することによって、安定なサンプルを得た。BchL 単体で結晶化することは確認できたが、BchL と BchNB の複合体結晶は得られていない。

総論

BchNB とその変異体の構造解析により、新規 FeS クラスタや活性発現に関わる構造変化が明らかになった。構造研究が豊富なニトロゲナーゼでは、電子伝達コンポーネントとの複合体解析により、レドックス状態に依存したダイナミックな構造変化が報告されている。DPOR においても、複合体形成やレドックス状態に依存して FeS クラスタや C 末端構造に変化が生じると推定しており、今後の BchL : BchNB 複合体の結晶化・構造解析が待たれる。

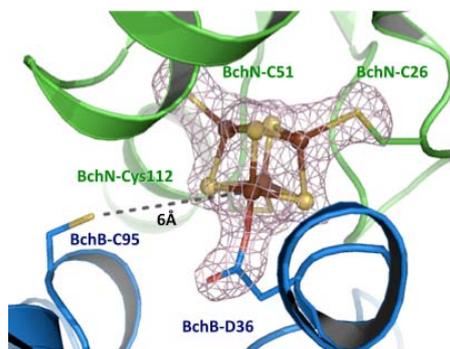


図 1

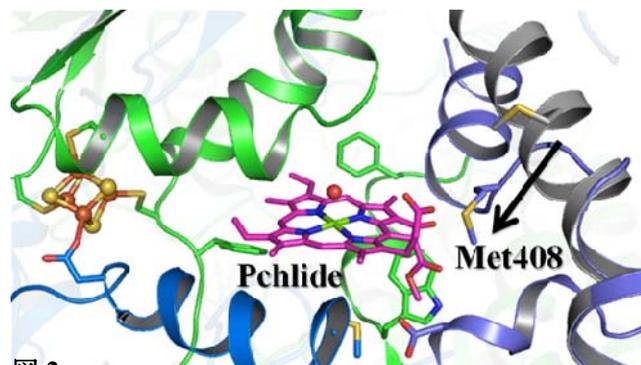


図 2

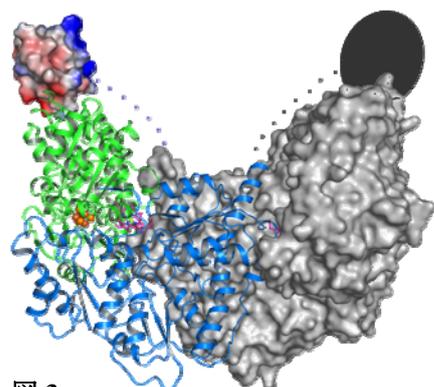


図 3