

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 村上 則文

本論文は、暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素 (DPOR) の構造研究に関する論文である。X線構造解析により決定された DPOR の触媒コンポーネント BchNB 複合体の構造と、その構造から示唆された、基質プロトクロロフィリド (Pchl<sub>id</sub>) の認識機構およびトランス特異的な還元反応機構についての報告である。論文全体は、序、4つの章、および総論から構成されている。序では、本論文の研究の背景と目的が述べられている。第1章では、野生型 DPOR 酵素の BchNB 複合体の X線構造解析による構造研究、第2章では、変異型 BchNB 複合体の X線構造解析による FeS クラスターの構造研究、第3章では、変異型 BchNB 複合体の X線構造解析による BchB の C末端領域の構造研究、第4章では、DPOR のすべてのコンポーネントを含む BchLNB 三者複合体の構造研究に向けた試みについて述べられている。最後の総論では、第1章から第4章までで報告された研究の総括的な結論と今後の展望が述べられている。

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する分子がクロロフィルである。本論文で X線構造解析が行われた DPOR は、クロロフィルの生合成経路の中で、プロトクロロフィリド (Pchl<sub>id</sub>) のテトラピロール環をクロリン環に変換してクロロフィルの前駆体であるクロロフィリドを生成する Pchl<sub>id</sub> 還元反応を光非依存的に触媒する酵素である。Pchl<sub>id</sub> 還元反応は、緑色を呈する前駆体を生成する、クロロフィルの生合成経路において重要な反応である。

DPOR は被子植物を除く光合成生物で広く保存されている。そのアミノ酸配列は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有する。サブユニット構成もニトロゲナーゼと類似し、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。ニトロゲナーゼについては構造生物学的な研究が進んでいるが、DPOR についてはこれからであり、構造と機能との関係についての知見がほとんどないのが現状である。

論文提出者は、このような背景を踏まえ、DPOR の構造生物学的な研究を実施し、世界ではじめて、DPOR の触媒コンポーネントである BchNB およびその変異体の構造を決定した。そして、対称性の高い基質を認識して立体特異的に Pchl<sub>id</sub> を還元する機構、Asp を配位子にもつ新規な FeS クラスターの存在、ニトロゲナーゼ様酵素と共通する構造基盤の存在などを明らかにした。また、DPOR のすべてのコンポーネントを含む BchLNB 三者複合体の構造研究に向けてその結晶化を試み、BchL 複合体の結晶化に成功した。

論文提出者は、2.3Å 分解能で決定された BchNB の構造から、BchNB は BchN と BchB からなるヘテロ四量体で、BchN と BchB の擬似二回回転軸上に FeS クラスターと疎水基に富んだ Pchl<sub>ide</sub> 結合部位が存在することを明らかにした。Pchl<sub>ide</sub> が結合すると、BchB の C 末側ヘリックスが Pchl<sub>ide</sub> に蓋をするような形で大きく構造変化し、ヘリックス上の Met408 が Pchl<sub>ide</sub> のプロピオン酸基を一方向に押し上げるように移動することを見つけ、この構造変化が基質のトランス特異的な還元をもたらすという反応機構を提唱した。BchB-M408L と M408A 変異体の生化学的解析および X 線構造解析により、Met408 がプロピオン酸基の跳ね上げに必須であることの証明を試みたが確定的な結論は得られなかった。しかし、C 末側ヘリックスの移動および C 末端にある表面が塩基性アミノ酸に富んだ小さな球状ドメインが活性に重要な役割を担っていること強く示唆する知見を示した。

また、論文提出者は、BchNB の FeS クラスターが BchN の 3 つの Cys と BchB の Asp36 を配位子にもつクラスター構造であることを明らかにした。これは、ニトロゲナーゼとの配列比較からは予想されていた、4 つの Cys が配位子を提供する [4Fe-4S] 型の FeS クラスターとは異なる構造であった。BchB-D36C と D36A 変異体について生化学的解析と X 線構造解析を行い、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ることを示した。Asp を配位子とする FeS クラスターの発見は、酸化還元酵素では本論文の報告がはじめてである。

さらに、論文提出者は、BchNB とニトロゲナーゼの触媒コンポーネントの立体構造を比較することにより、Pchl<sub>ide</sub> 結合部位の構造とニトロゲナーゼで分子状窒素が結合する FeMo-cofactor の構造がほぼ同じであることを見いだした。脱着可能な補欠分子である FeMo-cofactor も一種の基質と見なすと、DPOR とニトロゲナーゼ様酵素は、大きい基質上にある安定な多重結合を還元するための共通の構造基盤を有していることを明らかにした。

以上のように、論文提出者は暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素の触媒コンポーネントである BchNB 複合体の構造を世界ではじめて決定し、その構造生物学に大きな進展をもたらす研究成果をあげた。なお、本論文は野亦次郎、江端梢、溝口正、志波智生、民秋均、栗栖源嗣、藤田祐一との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験・解析および考察を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。したがって、構造生物学の分野において博士（学術）の学位を授与できると認める。