

 MLF Experimental Report	提出日(Date of Report)
課題番号(Project No.) 2020PX3017 実験課題名(Title of experiment) 水素原子レベルで明らかにする酸化還元に関わる酵素の反応機構 実験責任者名(Name of principal investigator) 海野 昌喜 所属(Affiliation) 茨城大学	装置責任者(Name of responsible person) 日下勝弘 装置名(Name of Instrument : BL No.) iBIX, BL03 実施日(Date of Experiment) 2021/3/20~2021/3/29

実験目的、試料、実験方法、利用の結果得られた主なデータ、考察、及び結論を記述して下さい。

実験結果などの内容をわかりやすくするため、適宜図表添付して下さい。

Please report experimental aim, samples, experimental method, results, discussion and conclusions. Please add figures and tables for better explanation.

1. 実験目的(Objectives of experiment)
<p>光合成生物において光をエネルギー源として利用する際に用いられるピリン色素の一つに、フィコシアノピリン(PCB)がある。PCBは、フェレドキシン依存性ピリン還元酵素の一つ PcyA によってビリベルジン(BV)から生合成される。PcyA の D105N 変異体は、BV に電子を供与することはできるが、H⁺を供与することができず、フィコシアノピリンが生合成されない。我々のグループでは野生型(WT)PcyA-BV 複合体の中性子結晶構造解析によって、Asp105 が中性と脱プロトン化(Asp105⁻)した2つのコンホメーションを持ち、それに対応して BV も中性状態とプロトン化している BVH⁺が混在していることを示した。興味深いことに WT の場合、吸収スペクトルの可視光領域に2つのピークを持つが、D105N には長波長側(730 nm 付近)のピークが見られない。これが BV のプロトン化状態と関連するという報告があり、それを可視化することにより、PcyA の Asp105 の役割を解明する。</p>
2. 試料及び実験方法
Sample(s), chemical compositions and experimental procedure
2.1 試料 (sample(s))
シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 由来 PcyA
2.2 実験方法(Experimental procedure)
<p>大腸菌による大量発現、硫酸分画とそれに続くカラムクロマトグラフィー(疎水性クロマトグラフィー→透析→陰イオン交換クロマトグラフィー→ゲルろ過クロマトグラフィー)で高純度に精製した。得られた試料は 150 mg/mL 程度まで濃縮した。4°Cの条件下、基質である BV の滴定により複合体を形成させた。20°Cで結晶化を行い、重水素置換した後、中性子回折実験に供した。</p>

3. 実験結果及び考察（実験がうまくいかなかった場合、その理由を記述してください。）

Experimental results and discussion. If you failed to conduct experiment as planned, please describe reasons.

中性子回折実験に供することができる大型結晶が数個得られた。重水素置換を十分に行い、iBIX においての 9 日間の実験により、2.1 Å 分解能の中性子回折データを得た。 R_{merge} は 23.9%, $I/\sigma(I)$ は 9.2, Completeness は 99.1%, Redundancy は 6.9 であった。PF AR のビームライン NW12A において同結晶から、X 線回折データを得た。1.3 Å 分解能の X 線回折データとのジョイントリファインメントにより、現在中性子構造解析・精密化が進行中である。

初期的な解析結果では、BV の 4 つのピロール環のうち、3 つがプロトン化されており、1 つはプロトン化されていない。つまり BV は中性の状態であることが示唆される。この状態は、同様に不活性型である別の変異体 I86D (Ile86 をアスパラギン酸に変異した変異体) の中性子構造解析から示唆される結果と大きく異なり、また、WT とも異なっている。今後計算科学的解析を進めていくが、吸収スペクトルから予想された結果と一致した。

Asn105 (Asp105 をアスパラギンに変異した残基) のコンホメーションは一義的に決まっており、ダブルコンホメーションはとっていない。N と O の区別も出来て、水素結合状態も水素原子レベルで明確化できた。BV と Asn105 のコンホメーションについては、WT とは大きくことになっており、プロトン輸送能がなくなっているものと考えられる。それに伴い、BV の遠位側にある最近隣水分子のコンホメーションもはっきり分かった。

第一プロトンドナーと考えられている Glu76 のコンホメーションが WT のそれと異なることは X 線構造解析からわかっていたが、その Glu76 がプロトン化されており中性状態になっていた。プロトン化したカルボキシ基が近くに存在する Asn62 と水素結合を形成し、BV が離れた方向に向かされているということがこの中性子結晶構造解析で初めて明らかになった。

さらに、WT や I86D 変異体において His88 と His74 の近傍にあった H_3O^+ のように解釈できる中性子散乱長密度は、今回の解析では明らかに H_2O と解釈したほうが合理的であった。しかし、PcyA の WT の構造では、計算科学で His88 がプロトン化されていると再安定であるとされていたが、今回の結果では D105N 変異体では、His74 がプロトン化していると解釈できた。この中性子散乱長密度から、WT や I86D よりも水素結合の束縛がきつく、水が固定され、プロトンが動きにくくなっていると考えられる。

今後精密化を終了したのち、計算科学によって吸収スペクトルと水素原子レベルの構造との相関を明らかにしていきたいと考えている。

4. 結論(Conclusions)

- PcyA D105N 変異体の中性子結晶構造解析に 2.1 Å 分解能で成功した。
- 水素原子を可視化し、基質である BV のプロトン化状態を明らかにした。BV の 4 つのピロール環のうち 3 つがプロトン化し、1 つは水素原子が見られなかった。つまり BV は中性の状態にあることが分かった。これは、PcyA の WT や I86D とは異なる結果であった。
- 第一プロトンドナーと考えられている Glu76 はプロトン化されているが、BV とは離れた方向を向き、Asn62 と水素結合を形成していた。
- His88 と His74 には H_2O が存在し、His74 と水素結合していた。WT とは明らかに違う状態であった。