

1. Introduction

光合成の電子伝達系では、光化学系Iから電子を受け取ったフェレドキシン (Fd) が、ストローマ側に存在する様々な Fd 依存性酵素に電子を分配する。しかし、Fd 依存性酵素は特定の Fd 認識配列を持っておらず、多様な各酵素をどのようにして認識しているのかは不明なままである。フェレドキシン NADP⁺還元酵素 (FNR) は Fd 依存性酵素の一つであり、活性中心にフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を持つフラビン酵素で、植物プラスチド中で Fd と NADP⁺の酸化還元反応を触媒する。FAD は、酸化型、1 電子還元型のセミキノン型、2 電子還元型のヒドロキノン型の 3 つの立体構造をとることが知られている。Fd は 1 電子キャリアーであるため、FAD は Fd から 1 電子ずつ 2 回の電子移動を経てヒドロキノン型になる。また、Fd から FNR への電子移動が完了すると、Fd と FNR の親和性は 1/20 に低下することが知られているが、これは酸化還元状態によって FAD のコンフォメーションが変化し、周囲の水素結合ネットワークが再編成され、タンパク質のコンフォメーション変化が誘発されるためと考えられる。この高度に制御された電子伝達機構を解明するためには、水酸基を含むすべての原子の座標を決定する必要があり、そのための手法としては中性子結晶構造解析が最も有効な手段である。

2. Experiment

中性子蛋白質結晶構造解析では、中性子ビームの散乱力が X 線に比べて非常に弱いため、体積が 1mm³ 以上の大きな結晶が必要です。我々は、マイクロシーディングとバッチ結晶化を組み合わせた条件で、中性子回折実験用の大きな結晶を再現性よく得ることに成功した。そして、2022 年 3 月に JPARC MLF の BL03 において、1.8Å 分解能で中性子回折強度データを得る事に成功した (Fig. 1)。得られたデータはプログラム STARGazer でデータ処理を行った。また、同じ結晶を用いて、SPring-8 の BL44XU で極低温条件下で X 線回折強度データを収集した。構造精密化は、プログラム PHENIX の phenix refine を用い、中性子と X 線の両方のデータを用いた joint refinement によって行った。最終的に、FNRoxi の中性子構造を 1.8Å 分解能で決定した (R=0.2232, Rfree = 0.2485)。

3. Results

構造解析の結果、FAD 周辺の水素原子や重水素原子からの原子散乱長密度 (SLD) の観測に成功しました (Fig. 2)。得られた中性子構造から、水分子の水素原子の向きを決定し、X 線構造では明らかにできなかった FAD と近接した水分子との正しい水素結合を決定することができました (Fig. 3)。また、FAD は多くの水分子に取り囲まれており、タンパク質主鎖やアミノ酸側鎖と水素結合ネットワークを形成している。FNR が還元されると、これらの水素結合ネットワークが再編成され、それが FNR の構造変化を引き起こすと考えられる。この構造変化が Fd との相互作用界面に伝播し、Fd に対する親和性が変化すると考えられる。

4. Conclusion

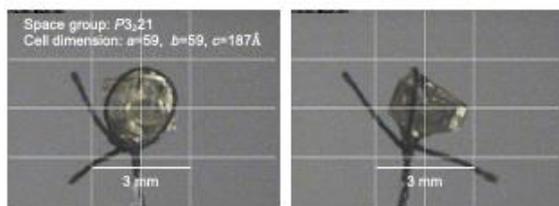
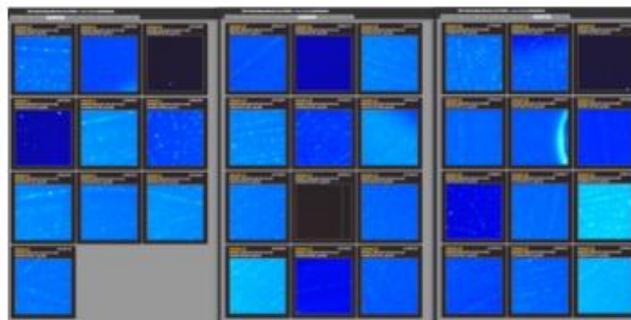
我々はすでに FNRred の大型結晶の作製に成功し、その中性子回折データを収集している。FNRred の中性子構造を決定した後、FNRoxi の中性子構造と比較し、水素結合の再配列など電子移動における重要な構造変化を明らかにする予定です。FNR の正確な原子座標が決定されれば、効率的な電子伝達機構や電子の逆流防止機構など、光合成の電子伝達機構に関する新たな知見が得られると期待される。

2021PX2002

中性子結晶構造解析による光合成電子伝達メカニズムの解明

● 酸化型FNR データ収集 (2022年3月)

Method	TOF-Laue
Measurement temperature (K)	100
Crystal size (mm ³)	5.76
Accelerator power (kW)	731
Wavelength range (Å)	2.05-5.38
Expose time (h)	7
Total No. of frames	24
Total measurement time (days)	10



NX-ジョイントリファインメントで構造精密化を行い、1.8 Åで構造決定できた

Fig 1. 中性子回折実験結果

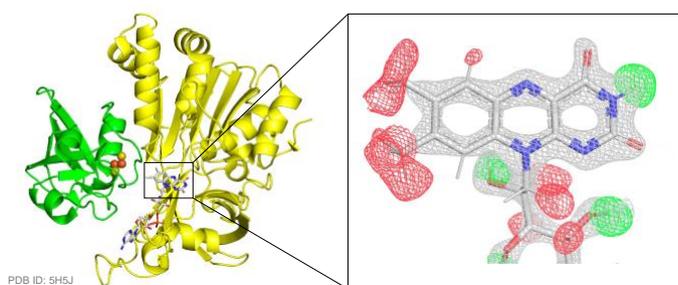


Fig 2. Maps around FAD. Neutron $2Fo-Fc$ SLD map of 2.5σ (grey) and Neutron $Fo-Fc$ omit SLD map are contoured with positive (green) and negative (red) contours of 3.5 and -2.5σ .

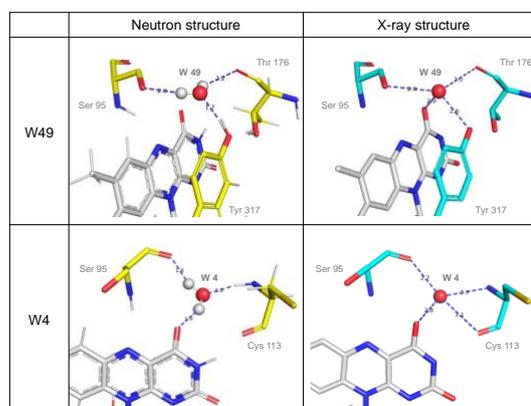


Fig 3. Comparison of neutron and x-ray structures for hydrogen bond between FAD and water molecule.