

平成30年6月5日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21122

研究課題名(和文) 光合成反応中心の進化を構造から探る

研究課題名(英文) Evolution of the photosynthetic reaction center

研究代表者

武藤 梨沙 (Mutoh, Risa)

福岡大学・理学部・助教

研究者番号：10622417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：光合成反応中心タンパク質(RC)は太陽光エネルギーを化学エネルギーへ高効率で変換する。このRCは末端電子受容体の違いによりType1、Type2に分けられる。非酸素発生型Type1 RCは唯一構造決定がされていないRCである。本研究では、Type1型RCの構造を3.2 Å分解能で決定した。構造解析の結果、機能未知のペプチドを発見し、アミノ酸シーケンスによってその配列を決定した。また、電子伝達に関わっているとされるキノンの有無が長年議論になっていたが、キノンの解析の結果結晶中に0.8分子のキノンが結合していることが明らかになり、結晶構造中にもキノンの電子密度が観察された。

研究成果の概要(英文)：Type 1 Reaction Center (RC) is the simplest structures among 4 kinds of RCs. Phototrophs are classified into two groups, oxygenic phototrophs and anaerobic phototrophs, and they have each RC. The structural and functional relationships in type 1 RCs remain poorly understood because of the difficulty with sample preparations due to their highly fragile properties against oxygenic air. I resolved the crystal structure of Type 1 RC at 3.2 Å resolution and found one new peptide which function is unknown. The existence of quinone molecules in Type 1 RC was unknown for long time. I identified RC contains 0.8 molecule quinones and found the electron density of quinones in the crystal structure.

研究分野：生物物理

キーワード：光合成 反応中心 X線結晶構造解析 電子スピン共鳴法

1. 研究開始当初の背景

太陽光の光エネルギーを電気化学エネルギーへ変換する光合成反応中心 (RC) タンパク質の反応効率は極めて高く、ほぼ 100%に達する。このような高効率な系の反応機構を原子レベルで解明することは、光合成電子伝達系の理解だけでなく、近年盛んに研究されている人工光合成系構築のための構造基盤に関して有益な情報を与える。光合成を行う生物は、光合成反応による酸素発生の有無に

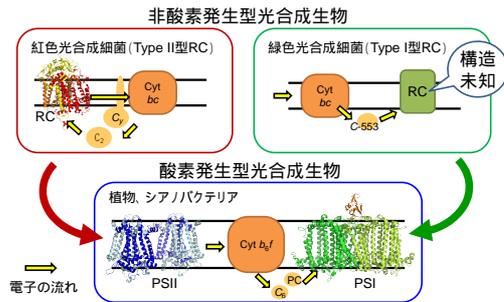


Fig. 1 酸素発成型光合成生物と非酸素発成型光合成生物の進化と電子伝達の流れ

よって大きく2つに分けることができる。「酸素発成型光合成」を行う植物やシアノバクテリアは2種類のRC(光化学系II(PSII: Type II型RC)と光化学系I(PSI: Type I型RC))が連結することにより共同で機能している(Fig. 1)。「非酸素発成型光合成」を行う紅色光合成細菌と緑色光合成細菌は、それぞれType II型RCとType I型RCを単独で持つ(Fig. 1)。「非酸素発成型」RCはPSII、PSIの祖先型であり、分子進化の過程で2種類のRCが共存し「酸素発成型」光合成生物が誕生した(Fig. 1)。これまでに解明されたRCはいずれもヘテロダイマー型のRCである。紅色光合成細菌RCとPSIIはコアタンパク質の一次構造は10-20%の相同性であるにもかかわらず、それらの立体構造・機能上の類似性は極めて高い。このことは、Type II型RCは進化的に連続していることを意味する。唯一構造決定に至っていない緑色光合成細菌のType I型RCは、コアタンパク質をコードする遺伝子が1つ(*pshA*)しか存在しないホモダイマー型RCである。PSIは相同性の高いコアタンパク質PsaA/PsaBを持つヘテロダイマー型RCである。緑色光合成細菌ヘリオバクテリアRC(hRC)はホモダイマーを形成するPshAからPshBへ電子が2方向に等価に流れると考えられているのに対し、PSIは優先的に片方(PsaAまたはPsaB)を電子移動に使用し、PsaCへ電子が流れる。hRCとPSIの一次構造上の相同性は15-20%程度であるが、hRCとPSIは、ともに11本膜貫通ヘリックスをもち、補欠分子(クロロフィル(Chl)、キノン)や鉄硫黄クラスターの並びは分光学的測定により共通であることがわかっている。一方、hRCとPSIではアンテナChlの種類が異なる点や、hRCのPshA-PshBは低塩濃度で容易に解離するが、PSIのPsaA/PsaB-PsaCは強く結合しているというサブユニット間相互作用の違い

がある。

2. 研究の目的

緑色光合成細菌ヘリオバクテリアRC(hRC)はPSIの祖先型で、光合成の分子進化を知る上でも長年に渡りその構造情報が待ち望まれているが、嫌気性条件下での精製や結晶化が難しく構造決定には至っていない。本研究では、X線結晶構造解析によりhRCの立体構造を高分解能で決定する。また、電子スピン共鳴(ESR)法を用いてPSIとhRCの電子伝達経路の違いを解明する。

3. 研究の方法

(1) X線結晶構造解析: 嫌気条件下でhRCの精製、結晶化を行う。結晶化の方法はハンギングドロップ蒸気拡散法とバッチ法を用いた。高分解能を目指すために、結晶化の際に用いる界面活性剤の種類の検討を行った。初期位相はPSIのモデルを用いて分子置換法で決定した。

(2) ESR法: 還元剤存在下で暗中のhRCにレーザー閃光照射を行った。また、W-band ESRを用いて、キャピラリーに封入したhRCの結晶にレーザー閃光照射を行いESRスペクトルの測定を行った。

(3) 生化学的解析

低分子SDS-PAGEによるペプチドの検出: 結晶構造解析を行っていた際、PSIにはない未知のヘリックスの電子密度を確認した。このペプチドのアミノ酸残基を特定するために、アミノ酸シーケンスを行った。

過渡吸収測定におけるhRCの活性測定: 結晶化に用いるhRCおよび結晶が活性を保持しているか否かを明らかにするために過渡吸収測定を行った。

4. 研究成果

(1) X線結晶構造解析: hRCの高分解能での結晶構造解析を目指し、精製法の改良および界面活性剤の検討を行った。精製法を改良した結果、純度の高いhRCを得ることができ、収量は当初の約3倍に増加した。結晶化の際に用いる界面活性剤は、これまでの結晶構造解析の実績を元に7種類検討を行った。まず、精製標品hRCを7種類の界面活性剤にそれぞれ交換し活性が保持されているか否かを確認した。その結果、界面活性剤による差はあるものの7種類すべてにおいて活性を保持していた。各界面活性剤に交換したhRC精製標品を4で1週間静置した後、クロロフィルの吸収スペクトルおよび電気泳動でhRCの状態を観察した。7種類のうち1種類の界面活性剤は、4で1週間静置すると白色沈殿が生じていた。よってこの界面活性剤は結晶化には不向きであると判断し、残り6種類の界面活性剤を用いて結晶化スクリーニングを

行った。その結果、界面活性剤 -UDM と -DDM を用いた結晶は比較的サイズも大きく分解能が高かったため、この2種類に絞ってさらに二次スクリーニングを行った。-UDM を用いた hRC 結晶 (-UDM 結晶) は空間群 $C2$ 、分解能は 4.05 Å であり、-DDM を用いた hRC 結晶 (-DDM 結晶) は空間群 $R32$ 、分解能 3.2 Å であった。-UDM 結晶は完全対称のホモ型 hRC であったのに対し、-DDM 結晶はヘテロ型 hRC であった。2つのヘリックスモデルの重ね合わせを Fig. 2 に示す。

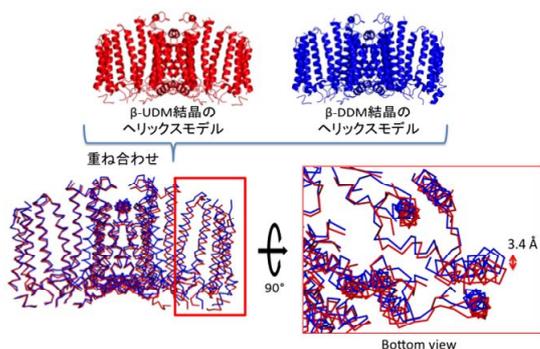


Fig. 2 -UDMと -DDMを用いて結晶化したhRCのヘリックスモデルの比較

本研究課題の途中で、hRC の結晶構造が 2.2 Å で発表された (Gisriel *et al.*, 2017)。彼らの構造は -UDM 結晶と同じ空間群 $C2$ であり完全ホモ型であったがキノンは確認されなかった。キノンは不安定であり容易に hRC から遊離すると考えられる。彼らが高分解能で構造を決定できたのはキノン分子が外れて安定化したためであると考えられる。本研究で解析中の -DDM 結晶の電子密度には明らかにキノンの電子密度が観察された。キノン分析の結果、1hRC に対して 0.8 分子のキノンが結合していると見積もられた。hRC の分子によってキノンの個数が異なるため、分解能が向上しなかったと考えられる。高分解能を得るためには、キノンが均一に入った hRC の精製法を検討する必要がある。

(2) ラジカル対の検出：

hRC は閃光照射によるスペシャルペアクロロフィル P800 と鉄硫黄センター-Fx との間でラジカル対 P800⁺Fx がスピン分極する。また、射条件を調整することでキノン分子 (A_1) の還元を行い、ESR の測定が可能になる。光ファイバーでパルスレーザー照射を行うことにより、W-band ESR を用いて高感度で P800⁺ A_1 スピン分極を得るための足掛かりとした。

溶液状態の hRC で検出されたラジカル対の ESR スペクトルをシミュレーション解析した結果、 $J_e=+13$ mT、 $D_e=-2$ mT と決定した。得られた交換相互作用 J 値は他の RC におけるラジカル対と比較すると非常に大きい値であった。また、-DDM 結晶を用いて W-band ESR 測定を行った。その結果、溶液状態と同じく P800 の信号を得た (Fig. 3)。結晶を 15 度ず

つ回転させ、測定を行いスペクトルに変化があるか否かを検証した。しかし、低温での測定のため装置の温度が安定せず、角度による優位な差があるとは言えない結果であった。大きな結晶を用いることで測定時間を短くすることで、温度のずれも少なくなると考えられるが、結晶が大きくなるほどキャピラリーへの結晶封入が難しくなる。今後は、キャピラリー内で結晶化させるなどの工夫が必要である。

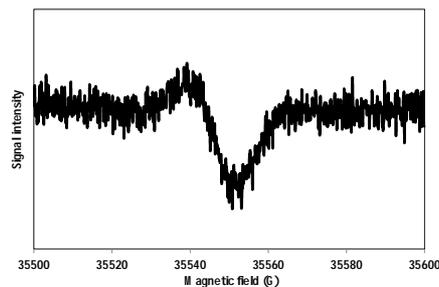


Fig. 3 W-band ESRで測定したhRC結晶 (-DDM)のP800の信号

(3) 新規ペプチドの決定と活性測定：

-UDM 結晶 および -DDM 結晶を溶かした溶液を用いて Tricine SDS-PAGE を行った (Fig. 4)。PVDF 膜転写を行い、5 kDa 近傍のバンドを切り出し、エドマン分解法による N 末端アミノ酸配列のシーケンスを行った結果、双方から以下のような 17 残基が決定された。

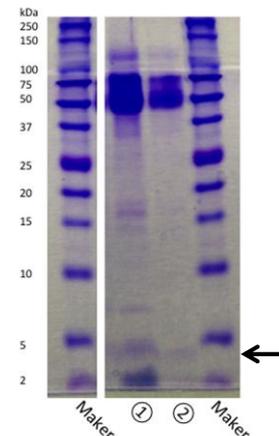


Fig. 4 hRC結晶 (-DDM) のTricine SDS-PAGE 矢印の5 kDa近傍のバンドが目的のペプチド。

MEMYSPTFNVAHILAFF

-UDM 結晶と -DDM 結晶が活性を保持しているか否かを確認するために過渡吸収測定を行った。試料に閃光が照射されると、P800 は速やかに P800⁺に酸化され、急激な吸収減少が観測される。その後 P800⁺は放出された電子と電荷再結合を行うことにより P800 に再還元される減衰過程が示されている。RC コアタンパク質が光反応活性を失っていると閃光照射後このような吸収変化は観測されなくなる。

また、生じた減衰過程は $\tau = 20^{-22}$ msec の時定数を持つ単一成分で説明できるものだった。hRC コアタンパク質標品中では P800 から放出された電子は常温では F_x まで移動し、(Kleinherenbrink *et al.*, 1994)、行き場

のなくなった電子は F_x から P800 に戻ってくる。この過程は約 19 msec の時定数で行われると報告されており (Miyamoto *et al.*, 2006)。今回の測定結果とほぼ一致した。この結果は RC コアタンパク質標品が P800 から F_x までの電子移動反応に必要なすべての成分を保持していることを示している。Fig. 19 の閃光誘起差スペクトルからは 780 nm で正の吸収変化の最大ピークが、800 nm で負の吸収変化のピークがあることがわかる。この結果もこれまでの報告と一致するものであった。

これら結果を踏まえ、hRC コアタンパク質は界面活性剤を -UDM および -DDM に交換しても活性が損なわれることはなく、また、その結晶も活性を保持していることがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

1. Charoenwattanasatien R., Tanaka H., Zinzius K., Hochmal A. K., Mutoh R., Yamamoto D., Hippler M., Kurisu G., X-ray crystallographic and high-speed AFM studies of peroxiredoxin 1 from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 74 (Pt2):86-91,doi:10.1107/S2053230X17018507.
2. Mosebach L., Heilmann C., Mutoh R., Gäbelein P., Steinbeck J., Happe T., Ikegami T., Hanke G., Kurisu G., Hippler M., Association of Ferredoxin:NADP⁺-oxidoreductase with the photosynthetic apparatus modulates electron transfer in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthetic Research*, doi: 10.1007/s11120-017-0408-5.
3. Sétif P., Mutoh R., Kurisu G., Dynamics and energetics of cyanobacterial photosystem I: ferredoxin complexes in different redox states. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics*, 1858 (7): 483-496, doi: 10.1016/j.bbabi.2017.04.001.
4. Nagashima H., Kishimoto H., Mutoh R., Terashima N., Oh-Oka H., Kurisu G., Mino H., Hyperfine Sublevel Correlation Spectroscopy Studies of Iron-Sulfur Cluster in Rieske Protein from Green Sulfur Bacterium *Chlorobaculum tepidum*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 121 (12): 2543-2553,doi:10.1021/acs.jpcc.6b12968.
5. Migné C., Mutoh R., Krieger-Liszkay A., Kurisu G., Sétif P., Gallium

ferredoxin as a tool to study the effects of ferredoxin binding to photosystem I without ferredoxin reduction. *Photosynth Research*. doi: 10.1007/s11120-016-0332-0.

6. Murakami R., Mutoh R., Ishii K., Ishiura M., Circadian oscillations of KaiA-KaiC and KaiB-KaiC complex formations in an in vitro reconstituted KaiABC clock oscillator. *Genes to Cells*, 21 (8): 890-900, doi: 10.1111/gtc.12392.
7. Hochmal A. K., Zinzius K., Charoenwattanasatien R., Gäbelein P., Mutoh R., Tanaka H., Schulze S., Liu G., Scholz M., Nordhues A., Offenborn J. N., Petroustos D., Finazzi G., Fufezan C., Huang K., Kurisu G., Hippler M., Calredoxin represents a novel type of calcium-dependent sensor-responder connected to redox regulation in the chloroplast. *Nature Communications*, 7: 11847, doi: 10.1038/ncomms11847.
8. Charoenwattanasatien R., Pengthaisong S., Breen I., Mutoh R., Sansenya S., Hua Y., Tankrathok A., Wu L., Songsiriritthigul C., Tanaka H., Williams S. J., Davies G. J., Kurisu G., Cairns J. R., Bacterial α -Glucosidase Reveals the Structural and Functional Basis of Genetic Defects in Human Glucocerebrosidase 2 (GBA2). *ACS Chemical Biology*, 11 (7): 1891-1900,doi:10.1021/acscchembio.6b00192.
9. Mutoh R., Muraki N., Shinmura K., Kubota-Kawai H., Lee Y. H., Nowaczyk M. M., Rögner M., Hase T., Ikegami T., Kurisu G., X-ray Structure and Nuclear Magnetic Resonance Analysis of the Interaction Sites of the Ga-substituted Cyanobacterial Ferredoxin. *Biochemistry*, 54 (39): 6052-6061,doi: 10.1021/acs.biochem.5b00601.

[学会発表](計 12 件)

1. Kishimoto H., Mutoh R., Tanaka H., Kurisu G., Oh-oka H., Studies on structure-function relationships among the Rieske protein and Cytochromes in Green sulfur bacteria, 第 59 回日本植物生理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 2018 年 3 月 28 日-30 日
2. 佃野弘幸、武藤梨沙、栗栖源嗣、大岡宏造、三野広幸、ヘリオバクテリア反応中心の初期電荷分離スピン相関解析ラジカル対の捕捉, 第 56 回電子スピンサイ

- エンス学会年会 (SEST2017), 東京工業大学大岡山キャンパス, 2017年11月2-4日
3. Mutoh, R., Iida, T., Yamamoto, D., The dynamics of photosystem 2 and light-harvesting complex 2 in spinach grana membrane revealed by high-speed AFM, 第55回生物物理学会年会, 熊本大学, 2017年9月19日-21日
 4. Tanaka, H., Kubota-Kawai, H., Mutoh, R., Pierre, S., Nowaczyk, M., Rogner, M., Ikegami, T., Kurisu, G., X-ray structure and NMR analysis of the electron transfer complex between Photosystem I and Ferredoxin, 第55回生物物理学会年会, 熊本大学, 2017年9月19日-21日
 5. Mino, H., Tsukuno, H., Mutoh, R., Nagashima, H., Kobori, Y., Kurisu, G., Oh-oka, H., 時間分解 EPR でとらえる光合成反応中心初期電荷分離の制御機構, 第55回生物物理学会年会, 熊本大学, 2017年9月19日-21日
 6. 池田祐輔, 武藤梨沙, 波佐間雄世, 大岡宏造, 栗栖源嗣, 寺内一姫, 浅井智広, 第58回日本植物生理学会年会, 鹿児島大学郡元キャンパス, 2017年3月16日-18日
 7. 大岡宏造, 小島理沙, 浅井智広, 武藤梨沙, 栗栖源嗣, 伊藤繁, Analyses of transient absorption changes and low-temperature fluorescence in the photosynthetic reaction center of heliobacteria., 第54回生物物理学会年会, つくば国際会議場, 2016年11月25日-27日
 8. 佃野弘幸, 武藤梨沙, 栗栖源嗣, 大岡宏造, 三野広幸, 時間分解 EPR によるヘリオバクテリア反応中心での初期ラジカル対生成, 第55回電子スピンサイエンス学会年会 (SEST2016), 大阪市立大学杉本キャンパス, 2016年11月10日-12日
 9. 寺島尚貴, 長嶋宏樹, 岸本拓, 武藤梨沙, 大岡宏造, 栗栖源嗣, 三野広幸, Chlorobaculum tepidum 還元型 [2Fe2S]Rieske cluster の磁気構造解析, 第55回電子スピンサイエンス学会年会 (SEST2016), 大阪市立大学杉本キャンパス, 2016年11月10日-12日
 10. Mutoh, R., Mino, H., Ishiura, M., Conformational changes of cyanobacterial circadian clock proteins, The 4th Awaji International Workshop on Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science, 淡路夢舞台, 2016年6月19日-22日 (招待講演)
 11. Kishimoto, H., Mutoh, R., Tanaka, H., Kurisu, G., Oh-oka, H., 緑色硫黄細菌の

- Rieske タンパク質可溶性ドメインの構造と相互作用解析, 第8回光合成学会年会, 龍谷大学瀬田キャンパス, 2016年5月27日-28日
12. 安田垂矢, 武藤梨沙, 大岡宏造, 浅井智広, 栗栖源嗣, ヘリオバクテリア由来の1型光合成反応中心の活性測定, 第57回日本植物生理学会年会, 2016年3月18日-20日
- 〔図書〕(計 0件)
なし
- 〔産業財産権〕
なし
- 〔その他〕
なし
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
武藤 梨沙 (Mutoh, Risa)
福岡大学・理学部・助教
研究者番号: 10622417
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
なし
 - (4) 研究協力者
なし