

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：74417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05050

研究課題名(和文)超高速レーザー分光によるフェレドキシン:NADP還元酵素の構造予測と反応解析

研究課題名(英文)Structural prediction and reaction analysis of ferredoxin: NADP reductase by ultrafast laser spectroscopy

研究代表者

谷口 誠治 (Seiji, Taniguchi)

公益財団法人レーザー技術総合研究所・レーザーバイオ化学研究チーム・副主任研究員

研究者番号：00342725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：光合成反応は環境要因によって電子伝達過程を変化させるが、その最終段階に関わるフェレドキシン:NADP+還元酵素(FNR)の役割の変化については明確ではない。本研究では、溶液中においてFNRの蛋白構造が複数存在し、それぞれの役割が異なるという可能性を検証するため、フェムト秒レーザー計測法によるFNRの超高速光誘起電子移動反応の観測および、分子動力学計算、電子軌道計算を取り入れた電子移動速度解析により、溶液中でのFNRの構造予測を行った。その結果、FNRの光励起により約200fsの超高速光誘起電子移動反応が起こるが、溶液中構造は単一であり複数構造を持つ可能性は低いことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、自然界において最も重要な化学反応のひとつである光合成反応の環境による変化の要因を、光合成に関わる酵素の溶液中での立体構造変化を予測するという新しい手法により解き明かそうとしたものであり、学術的に高い意義を持つ。またこれらの要因の解明は、悪環境でも育成する穀物といった品種改良への応用など、社会的意義は非常に高いと言える。

研究成果の概要(英文)：The photosynthetic reaction changes the electron transfer process due to environmental factors, but the change in the role of ferredoxin: NADP + reductase (FNR) involved in the final stage is not clear. In this study, in order to verify the possibility that multiple FNR protein structures exist in the solution and their roles are different, the structure of FNR in the solution was predicted by observation of the ultrafast photoinduced electron transfer reaction of FNR by femtosecond laser measurement, and the analysis of the electron transfer rate incorporating the MD and MO calculation. As a result, it was clarified that the photoexcitation of FNR causes an ultrafast photoinduced electron transfer reaction of about 200 fs, but the structure in solution is single and unlikely to have multiple structures.

研究分野：光化学

キーワード：フェムト秒時間分解蛍光計測 フェレドキシン:NADP+還元酵素 サイクリック電子電子伝達反応

### 1. 研究開始当初の背景

光合成反応における電子伝達過程では、光合成系 II (PSII) からシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体を介して光合成系 I (PSI) へと電子が伝達されるリニア電子伝達 (図 1 上) と、シトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体および PSI のみが関与するサイクリック電子伝達 (図 1 下) が存在し、植物は環境変化 (主に照射光強度の変化) によりその形態を変化させる (ステート遷移) ことが知られていたが、近年、これまで不明であったサイクリック電子伝達が起こるメカニズムが明らかにされ、注目を集めた。サイクリック電子伝達では、シトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体 (*b<sub>6</sub>f*) と光合成系 I が超複合体 (CEF 超複合体) を形成し (A. K. Hochmal, G. Kurusu et al, *Nature Commun.*, 7, 11847 (2016))、光合成系 I で生成した電子が *b<sub>6</sub>f* (*b<sub>6</sub>f* 中のプラストキノン) に伝達されることで ATP 合成のみが起こる (図 1 下)。

一方で、いまだに明確でないと考えられるのが、サイクリック電子伝達時のフェレドキシン:NADP<sup>+</sup>還元酵素 (FNR) の役割である。FNR は光合成初期過程の最終段階における酸化還元反応を制御する酵素である (図 2)。リニア電子伝達では光合成系 I からフェレドキシンへと伝達された 2 電子を受け取り、NADP<sup>+</sup>の NADPH への還元を触媒することで知られるが、サイクリック電子伝達における FNR の役割は明確ではない。これまでの研究では、リニア電子伝達時には FNR は PSI 上に局在し、サイクリック電子伝達時には *b<sub>6</sub>f* (または CEF 超複合体) 上に局在しているとの報告 (川島ら、北大低温研、来栖ら、阪大蛋白研) があるため、FNR がフェレドキシンと *b<sub>6</sub>f* 間の電子伝達過程に深く関与しているものと考えられる。しかしながら、リニア電子伝達は 2 電子、サイクリック電子伝達は 1 電子伝達過程であるため、FNR の役割は両過程で異なる可能性は高い。申請者はその要因として、それぞれの電子伝達反応において有利な構造を持つ数種の FNR が存在するか、*b<sub>6</sub>f* や PCI と同様に環境の変化により反応に有利となるよう FNR 自体の蛋白構造が変化するのではないかと考えた。実際に、FNR にはアミノ酸配列が異なる 3 種の分子種 (アイソザイム) が存在し、*b<sub>6</sub>f* (または *b<sub>6</sub>f* 上のフェレドキシン) と結合するものと、ストローマ内の可溶性領域に単独で浮遊するものがある、との報告 (来栖ら、阪大蛋白研) もある。

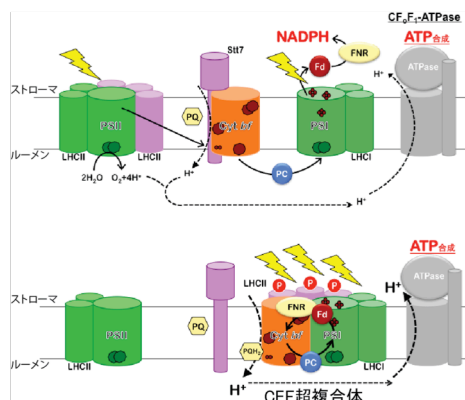


図 1. 光合成 (チラコイド膜) における電子伝達反応の模式図 (上) リニア電子伝達、(下)サイクリック電子伝達

### 2. 研究の目的

本研究では、分子動力学法を用いた FNR の蛋白構造の予測、およびフェムト秒領域の超高速時間分解蛍光計測法を用いた FNR の光誘起電子移動過程の観測を行い、液相中における蛋白構造、および構造異性体の有無などについて理論的、実験的に検証することにより、(サイクリック) 電子伝達反応に対する FNR の蛋白構造因子の関与について新たな知見を得ることを目的とする。酵素が示す特異的な機能性には、アミノ酸により構成される蛋白構造が深く関与しているため、その反応メカニズムを明らかにするにはこれらの立体構造を明確にすることが必要である。このことから近年、X 線結晶構造解析法による蛋白質結晶構造の観測が数多く行われてきたが、実際に蛋白質が機能するのは液相 (生体膜) 中であるため、液相中における蛋白質構造の (正確な) 予測が重要となる。蛋白構造の予測によく用いられるのが分子動力学 (MD) 法であるが、得られた計算値は何らかの実験的な検証を行う必要があると考えられる。これに対して我々は、フェムト秒レーザーを用いた超高速時間蛍光計測法による実験的な検証を行う。FNR は捕因子に FAD (図 2) を持つフラビン蛋白質の一種で、FAD が青色光を吸収し、周囲に存在する電子供与性のアミノ酸 (チロシン(Tyr)、トリプトファン(Trp))との間で光誘起電子移動反応を引き起こすことが予想される。FAD の電子移動速度は FAD と Tyr または Trp 間の距離や配向に依存して大きく変化するため、計測データは FNR の構造を反映したものとなる。このことから、MD 法から得ら

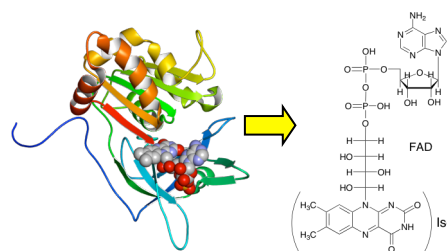


図 2. FNR (トウモロコシ葉由来、PDB: 1GAW) の (左) 立体構造、(右) 捕因子 FAD の分子図

れる蛋白質構造を用いて電子移動速度を理論的に算出し、実験値と比較することで、溶液中での (FAD 周囲の) 蛋白質構造予測を実験的に検証することができる。また本研究は、未だに不明点が多い光合成反応の解明へのアプローチ法の一つであり、得られた成果は光合成過程のより深い理解に有益な知見を与えることができると考えられる。

### 3. 研究の方法

フェムト秒時間分解蛍光計測には、我々が自作した蛍光和周波 (up-conversion) 発生法を用いた。図 3 に装置図を示す。光源にはチタン-サファイアレーザーを用い、第二高調波 (~400 nm) を励起光に用いた。計測システムの時間分解能は約 120 fs である。蛋白質構造の計算には AMBER を用いた。X 線結晶構造解析結果を用いて TIP3P 水分子を取り入れた共役勾配法により構造を最適化し、計算の初期構造として使用した。補因子内の電荷は MO 法 (Hartree-Fock 法) により計算する。MD 計算は 100 K から 298 K まで数 10 ps 秒間加熱し、周期境界条件下で更に平衡化させる。計算結果は構造が平衡状態に達する計算開始後 2 ns~10 ns 経過後から 0.1 ps 間隔で取り入れ、安定構造を決定した。蛋白質構造計算で得られた時間に依存する補因子の原子座標と、実験で観測した蛍光減衰データを予測される光電子移動理論式 (1) を用いて解析した。また、半経験 MO 法を用いて補因子の励起状態エネルギーや双極子モーメント、エネルギー状態等の計算を行う。それらのデータを用いて補因子や錯体の光励起状態の濃度減衰関数を計算し、実測の蛍光減衰データと比較した。

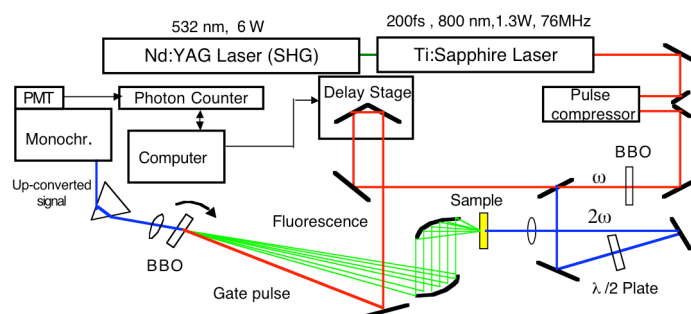


図 3. 蛍光 up-conversion 計測システム配置図

$$k_{KM} = \frac{v_0}{1 + \exp\{\beta(R_c - R_0)\}} \sqrt{\frac{k_B T}{4\pi\lambda}} \exp\left[-\frac{\{\Delta G^0 - e^2 / \epsilon_0^{DA} R_c + \lambda + E_{Net}\}^2}{4\lambda k_B T}\right] \quad (1)$$

$v_0$ : 断熱振動数,  $\beta$ : ET 過程係数,  $R_0$ : 断熱-非断熱の ET 境界距離,  $\Delta G^0$ : 反応生成物と反応物の自由エネルギー差,  $-e^2 / \epsilon_0^{DA} R_c$ : イオン対間の静電エネルギー,  $\lambda$ : 溶媒和エネルギー,  $E_{Net}$ : 反応生成物-タンパク質内イオンとの静電エネルギー

### 4. 研究成果

結晶状態での立体構造が明らかとなっているトウモロコシ葉由来 FNR、ホウレン草由来 FNR の 2 種についてフェムト秒領域でのフェムト秒時間分解蛍光計測を行った。図 4 にホウレン草由来 FNR の FAD (Iso) 近傍の結晶構造を示す。FAD のごく近傍に還元力を持つ Tyr および Trp が配置されており、FAD の光励起により数 100fs の超高速電子移動が起こるものと予測される。図 5 に、ホウレン草由来 FNR 水溶液の吸収および蛍光スペクトルを示す。緩衝液には 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 8.0) を用いた。380、460 nm 付近に FAD (Iso) の吸収帯に起因する吸収ピークが観測されている。図 5 に励起波長 390 nm での蛍光スペクトルを併せて示す。525 nm にピークを持つ蛍光帯がわずかに観測され、これは FAD の励起状態からの蛍光と考えられる。図 6 に、ホウレン草由来およびトウモロコシ由来 FNR のフェムト秒時間分解蛍光減衰を示す。観測波長は蛍光帯のピーク波長 (525 nm) である。寿命約 170 fs の急速な減衰が観測された。この減衰は FAD (Iso) の励起状態から起こる Iso と周囲のアミノ酸残基 (Tyr314、Tyr95、Trp58) 間の光誘起電子移動反応に起因するものと考えられる。ホウレン草由来の FNR では、寿命 170 fs 減衰の他に寿命約 10 ps の遅い減衰が観測された (図 6 中 (●)) が、これに関しては光励起の影響でアミノ酸構造が解け FAD が水溶液中に露出した状態が一部生成することに起因する可能性があり、この要因については明確ではない。次にそれぞれの FNR の結晶構造を元に分子動力学計算による溶液中構造の予測を行ったが、溶液中において FAD 周囲の構造は結晶構造と大きな変化はなく、また熱的に安定な複数の構造も得られなかった。このため、結晶構造から FAD (Iso) と周囲の Trp および Tyr の配置を決定し、式(1)により FAD (Iso) の励起

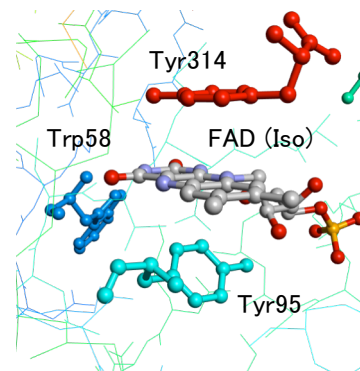


図 4. ホウレン草由来 FNR の FAD 近傍の構造 (PDB:1GAQ)

状態からの電子移動速度を算出した。その結果光誘起電子移動速度は 179 fs と算出され、実測値と一致することがわかった。これらの結果から、それぞれの FNR の立体構造は、少なくとも FAD 周囲においては結晶構造と類似しており、FNR が水溶液中において役割が異なる複数の構造を持つ可能性は小さいと考えられる。

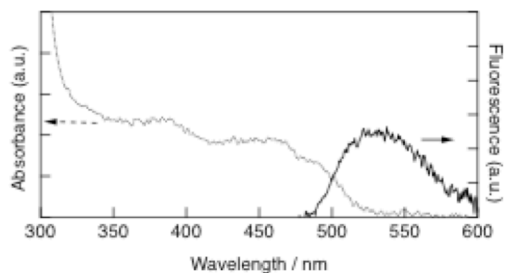


図 5. ホウレンソウ由来 FNR の吸収、蛍光スペクトル

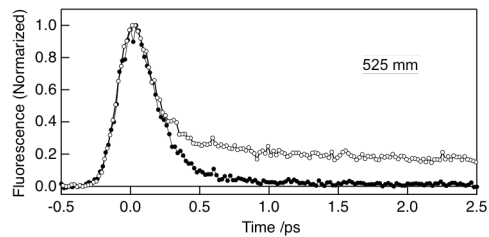


図 6. (○) ホウレンソウ由来、(●)トウモロコシ葉由来の fs 蛍光減衰 (励起波長 400 nm、観測波長 525 nm)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Seiji Taniguchi, Haik Chosrowjan, Syoji Ito, Hiroshi Miyasaka Masumi Katane, Hiroshi Homma, Fumio Tanaka, Arthit Nueangaudom, Kiattisak Lugsanangarm, Sirirat Kokpol	4. 巻 198
2. 論文標題 comparative studies on picosecond-resolved fluorescence of D-amino acid oxidases from human with one from porcine kidney. Photoinduced electron transfer from aromatic amino acids to the excited flavin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology	6. 最初と最後の頁 111546-111558
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphotobiol.2019.111546	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Arthit Nueangaudom, Kiattisak Lugsanangarm, Somsak Pianwanit, Sirirat Kokpol, Nadtanet Nunthaboot, Fumio Tanaka, Seiji Taniguchi, Haik Chosrowjan	4. 巻 4
2. 論文標題 Comparative Study on the Mechanism of Photoinduced Electron Transfer from Tryptophan 168 to Excited Flavin in T169S and Wild-type Pyranose 2 Oxidase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS OMEGA	6. 最初と最後の頁 593 - 605
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.8b02158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kiattisak Lugsanangarm, Fumio Tanaka, Sirirat Kokpol, Nadtanet Nunthaboot, Seiji Taniguchi, Haik Chosrowjan	4. 巻 407
2. 論文標題 Effects of protein association on the rates of photoinduced electron transfer from tryptophan residues to excited flavin in medium-chain acyl-Co A dehydrogenase. Molecular dynamics simulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry	6. 最初と最後の頁 113039-113049
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphotochem.2020.113039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Arthit Nueangaudom, Somsak Pianwanit, Haruhiko Tamaoki, Yasuzo Nishina, Fumio Tanaka, Seiji Taniguchi, Haik Chosrowjan	4. 巻 408
2. 論文標題 Interactions between isoalloxazine and o-aminobenzoate in o-aminobenzoate- D-amino acid oxidase complex. Molecular dynamics and molecular orbital studies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry	6. 最初と最後の頁 113090-113100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphotochem.2020.113090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nadtanet Nunthaboot, Seiji Taniguchi, Haik Chosrowjan, Fumio Tanaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Equivalence between inverted regions of the energy gap law and inverted regions of donor-acceptor distances in photoinduced electron transfer processes in flavoproteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 8821-8832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0ra09716k	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kiattisak Lugsanangarm, Haruhiko Tamaoki, Yasuzo Nishina, Masaya Kitamura, Nadtanet Nunthaboot, Fumio Tanaka, Seiji Taniguchi, Haik Chosrowjan	4. 巻 10
2. 論文標題 Simultaneous analyses of the rates of photoinduced charge separation and recombination between the excited flavin and tryptophans in some flavoproteins: Molecular dynamics simulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AIP Advances	6. 最初と最後の頁 1052241-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0014718	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 文夫  (Fumio Tanaka)  (20022907)	公益財団法人レーザー技術総合研究所・研究部・特別研究員1   (74417)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

#### 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------