

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：84502

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02914

研究課題名(和文) フィコビリソーム-四量体光化学系I超複合体の構造生物学的研究

研究課題名(英文) Structural biology of phycobilisome-tetrameric photosystem I supercomplex

研究代表者

加藤 公児 (Kato, Koji)

公益財団法人高輝度光科学研究センター・構造生物学推進室・テニユアトラック研究員

研究者番号：30452428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：シアノバクテリア、各種藻類そして植物が行う光合成は、太陽の光エネルギーを化学エネルギーに変換し、同時に酸素分子を発生させる。この光エネルギー変換は、主に光化学系I(PSI)と光化学系II(PSII)という2つの膜タンパク質複合体が担っており、光駆動型の電荷分離と一連の電子伝達反応を行う。

本研究では、PSIとアンテナタンパク質から構成される超複合体の構造と生育環境中の条件に応答したエネルギー変換機構をX線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡単粒子解析、その他の生化学的解析を使い明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

立体構造解析によって生物の多様性を明らかにした本研究の知見は生物が行う光合成のメカニズムの解明、そして効率化へとつながる。このような知見を人工光合成研究に取り入れることで、高効率光エネルギー伝達システムの構築が進展し、持続可能な社会の実現へ近づくことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Oxygenic photosynthesis of cyanobacteria, various algae, and land plants converts light energy from the sun into biologically useful chemical energy concomitant with the evolution of molecular oxygen. The central part of the light-energy conversion is two multi-subunit pigment-protein complexes, photosystem I and photosystem II (PSI and PSII, respectively), which perform light-driven charge separation and a series of electron-transfer reactions. In this study, the structure of the super-complex composed of PSI and antenna protein and the energy conversion mechanism in response to the conditions in the growth environment were investigated using X-ray crystallography, cryo-electron microscopy single-particle analysis, and biochemical analysis.

研究分野：構造生物学

キーワード：生体超分子複合体 光化学系タンパク質 構造生物学 クライオ電子顕微鏡 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

シアノバクテリア、各種藻類そして植物が行う酸素発生型光合成は、太陽光を利用して水を分解し酸素分子を放出するとともに、二酸化炭素から有機物を作り出す反応である。地球上に絶え間なく降り注いでいる太陽の光エネルギーは糖の形として化学エネルギーへ変換され、ほぼすべての生物の生存維持に必要なエネルギー供給源となっている。この光合成の過程は、光を必要とする明反応と、光を必要としない暗反応に分けられ、このうち、明反応は光エネルギーの吸収・伝達、電子伝達、水分解・酸素発生反応などを含み、これらの一連の反応は葉緑体のチラコイド膜上に存在する光化学系 (PSI) と光化学系 (PSII) によって触媒される。また、光を集めるアンテナ装置がこれら 2 種類の光化学系に結合して、吸収した光エネルギーを効率的に 2 つの光化学系に伝える。光合成は外からくる光エネルギーによって駆動されるため、複雑な光合成システムの反応を効率よく進めるには、システムを駆動するエンジンに相当するアンテナ装置や光化学系の設計が重要になる。

これまで、PSI の構造・機能研究はよく行われており、シアノバクテリア由来の三量体 PSI や植物由来の単量体 PSI などいくつかの構造・機能解析がなされてきた。近年、四量体を形成した PSI がアナベナに存在することが電子顕微鏡観察で確認された。さらに、この四量体 PSI は、これまで PSII としか相互作用しないと考えられていたアンテナタンパク質フィコビリソーム (PBS) と超複合体を形成することが確認された。先行研究で我々は四量体 PSI をクライオ電子顕微鏡により 3.3 Å 分解能で決定した。その構造と時間分解蛍光分析の結果から四量体 PSI は強い光エネルギーを効率よく逃がす光防御機構を持つということが明らかになった。これまでの研究を総合して考えると、光の強さに応じて四量体 PSI のリモデリングを行い、その量を調節しているということが明らかになった。光合成生物は進化の過程において、PSI の形と量を変えることによって、その生育する環境に適応してきたということが示唆された。しかしながら生体内で四量体 PSI はアンテナタンパク質と結合した超複合体の状態で存在し、機能していることが確認されており、その超複合体が如何に効率的な集光や光エネルギー移動の機構を維持しているのか、また、我々が明らかにした四量体 PSI のリモデリングにアンテナタンパク質はどのような機構で関わってくるのか、それらの詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、光合成によって二酸化炭素だけではなく、空気中の窒素を窒素化合物に変換 (窒素固定) できるシアノバクテリアの一種アナベナから、明反応において光エネルギーを集めるアンテナタンパク質と集めた光エネルギーを化学エネルギーに変える PSI が相まって形成する超複合体を単離し、その構造と機能を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) フィコシアニンの X 線結晶構造解析

高分解能の解析が困難であることが予想されるアンテナタンパク質 PBS のサブコンプレックスであるフィコシアニンを、個別に陰イオン交換カラムを用いて精製を行った。その精製標品と市販の結晶化スクリーニングキットを用いて約 500 条件で結晶化し、いくつかの条件で結晶が得られた。それらの結晶を用いて、SPRING-8 のビームライン BL41XU 及び、BL44XU にて、X 線回折実験を行い、1.5-2.0 Å 分解能の回折強度データを収集した。また位相は天然のタンパク質が

持つ硫黄などの軽元素の異常散乱を利用した native-sad 法を用いて決定し、プログラム PHENIX をもちいて、モデル構築・構造精密化を行い、構造を決定した。

(2) PSI-アンテナタンパク質 PBS 超複合体の Cryo-EM 単粒子構造解析

安定な PSI-アンテナタンパク質超複合体を調整するためにさまざまな培養条件を検討した結果、鉄欠乏条件下で生育したアナベナから PSI 単量体と PBS の超複合体 (PSI-monomer-PBS) および PSI 二量体と PBS の超複合体 (PSI-dimer-PBS) を安定に調製できることを見出した。鉄を欠乏した条件下で生育したアナベナから調製したチラコイド膜を可溶化後、陰イオン交換カラムによって分離したのち、トレハロース密度勾配超遠心に供した。得られた PSI-PBS 超複合体それぞれについて、SPring-8 の Cryo-EM を使用して、PSI-monomer-PBS は約 2 万枚、PSI-dimer-PBS は約 8 千枚のクライオ電顕画像を取得し、現在、単粒子解析を行っている。

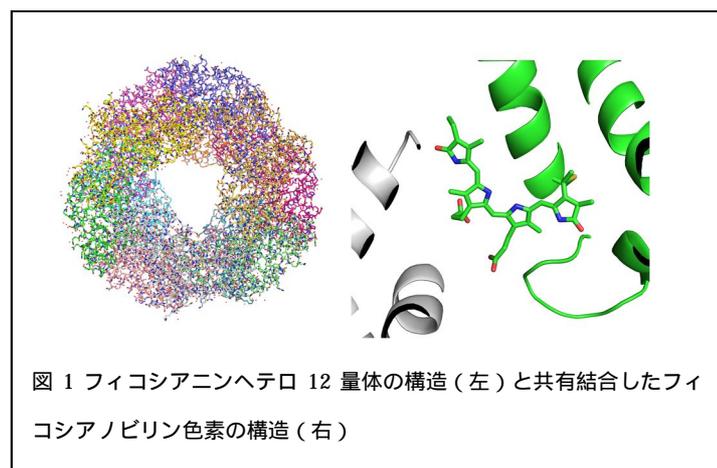
(3) PSI-アンテナタンパク質 isiA 超複合体の Cryo-EM 単粒子構造解析

シアノバクテリアは鉄欠乏環境下にさらされると特殊な膜貫通型の集光性色素タンパク質 IsiA を発現する。陸上植物や藻類は主として膜貫通型の集光性色素タンパク質を保有するため、多くの光合成生物にとって膜貫通型集光性色素タンパク質は保存されている形質である。IsiA は PSI に結合することにより PSI-IsiA 超複合体を形成することが知られている。既知の構造は PSI 三量体に対して、18 個の IsiA が結合してリングを形成する。しかし本研究対象であるアナベナは IsiA 遺伝子を複数持っており、その構造を解明すべく、構造解析を行った。精製は上記の同様に行った。SPring-8 の米倉先生の Cryo-EM を使用させていただき、約 2 万枚のクライオ電顕画像を取得した。単粒子構造解析を行い、2.6 分解能で構造を決定した。

4. 研究成果

(1) フィコシアニンの X 線結晶構造解析

アンテナタンパク質 PBS のサブコンプレックスであるフィコシアニンを、個別に陰イオン交換カラム等を用いて精製を行った。その精製標品と市販の結晶化スクリーニングキットを用いて約 500 条件で結晶化し、硫酸アンモニウムを沈殿剤とした、いくつかの条件で結晶が得られた。それらの結晶を用いて、SPring-8 のビームライン BL41XU 及び、

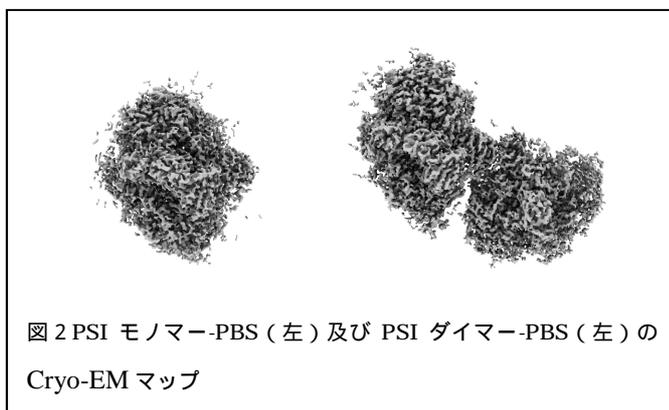


BL44XU にて、X 線回折実験を行い、1.5 分解能の回折強度データを収集した。さらに、天然のタンパク質が持つ硫黄などの軽元素の異常散乱を利用した native-sad 法を用いて決定した。その全体構造は c-フィコシアニン 及び サブユニットが、それぞれ 6 個からなるヘテロ 12 量体で形成されるドーナツ状構造していた。その構造にはシステイン残基に共有結合したフィコシアノビルン色素もはっきりと確認することができた (図 1)。しかしながら、つい最近になって別のグループから Cryo-EM を用いたアナベナの PBS の全体構造が 3.9 分解能で報告された (<https://doi.org/10.1038/s41467-021-25813-y>)。この構造は、我々が予想していたように、

分解能が低く、電顕マップが不鮮明であるため、色素などの位置や構造が我々の構造とは大きく異なっていた。現在、我々が決定したフィコシアニン構造の論文執筆を進めている。

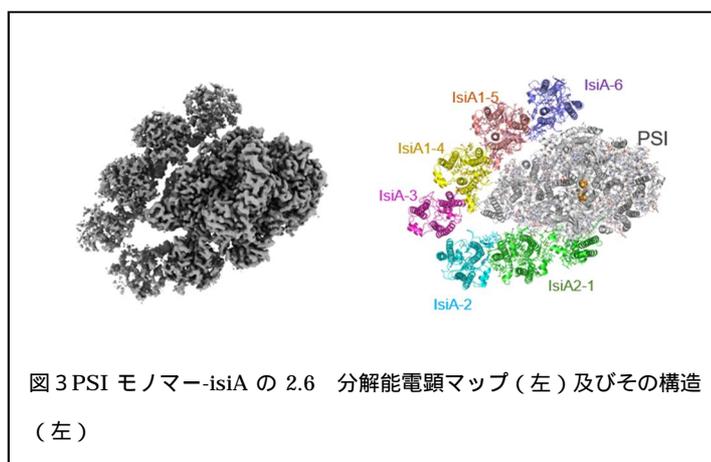
(2) PSI-アンテナタンパク質 PBS 超複合体の Cryo-EM 単粒子構造解析

安定なPSI-アンテナタンパク質超複合体を調整するためにさまざまな培養条件を検討した結果、鉄欠乏条件下で生育したアナベナからPSI単量体とPBSの超複合体 (PSI-monomer-PBS) およびPSI二量体とPBSの超複合体 (PSI-dimer-PBS) を安定に調製できることを見出した。鉄を欠乏した条件下で生育したアナベナから調製したチラコイド膜を可溶化後、陰イオン交換カラムによって分離したのち、トレハロース密度勾配超遠心に供した。その結果、鉄が十分な条件下で培養したアナベナでは得られなかった高分子量の画分が得られた。この画分の吸収スペクトルには、PSIとPBSの特徴的なバンドが見られ、また、蛍光スペクトルから、PBSがPSIコアへエネルギーを伝達している可能性が示された。さらに、BN-PAGE /2D-SDS-PAGE分析によって、リンカータンパク質であるCpcLがPSIの単量体および二量体と結合していることが明らかになった。得られたPSI-PBS超複合体それぞれについて、SPring-8のCryo-EMを使用して、PSI-monomer-PBSは約2万枚、PSI-dimer-PBSは約8千枚のクライオ電顕画像を取得し、現在、どちらの構造も3.0 分解能程度まで伸びており、順調に単粒子解析を進めている (図2)。今後、構造解析や各種スペクトルを用いた機能解析によって、その構造と機能を明らかにしていく。



(3) PSI-アンテナタンパク質 isiA 超複合体の Cryo-EM 単粒子構造解析

鉄ストレス誘導型Aタンパク質 (IsiA) は、鉄欠乏状態のシアノバクテリアで発現している。シアノバクテリアであるアナベナは4つのisiA遺伝子を持つが、PSIにおけるその結合特性や機能的役割はまだ不明であった。我々は、鉄欠乏状態で増殖したアナベナから単離したPSI-IsiA超複合体の構造をCryo-EM単粒子解析にて2.6 分解能で決定した (図3)。PSI-IsiA構造は、PSIコアモノマーのPsaA側に6つのIsiAサブユニットが結合している。6つのIsiAサブユニットのうち3つはIsiA1およびIsiA2として同定された。IsiA2-1の構造は、N末端IsiAとC末端PsaL様ドメインを示し、PsaLをC末端PsaL様ドメインに置換することでPSIに結合する。アナベナではIsiAがPSIに結合するとPSIのオリゴマー化が阻害され、6つのIsiAサブユニットが結合した単量体のPSIコアが形成される。典型的なPSIトリマー-IsiA構造とは異なり、IsiAサブユニットはPsaA側には結合しているが、PsaB外側には結合していない。このことは、PSI-trimer-IsiA超複合体を持つアナベナと他のシアノバクテリアとの間で、IsiA間および



IsiAとPSIコアとの相互作用に違いが生じる可能性がある。これらの構造的知見は、isiA遺伝子を複数コピーするシアノバクテリアを特徴づけるものであり、そのようなシアノバクテリアが鉄制限条件下で生き残るための戦略を提供する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kato Koji, Nagao Ryo, Ueno Yoshifumi, Yokono Makio, Suzuki Takehiro, Jiang Tian-Yi, Dohmae Naoshi, Akita Fusamichi, Akimoto Seiji, Miyazaki Naoyuki, Shen Jian-Ren	4. 巻 13
2. 論文標題 Structure of a tetrameric photosystem I from a glaucophyte alga <i>Cyanophora paradoxa</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-29303-7	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 -

1. 著者名 Nagao Ryo, Kato Koji, Kumazawa Minoru, Ifuku Kentaro, Yokono Makio, Suzuki Takehiro, Dohmae Naoshi, Akita Fusamichi, Akimoto Seiji, Miyazaki Naoyuki, Shen Jian-Ren	4. 巻 13
2. 論文標題 Structural basis for different types of hetero-tetrameric light-harvesting complexes in a diatom PSII-FCPII supercomplex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-29294-5	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 -

1. 著者名 Kato Koji, Hamaguchi Tasuku, Nagao Ryo, Kawakami Keisuke, Ueno Yoshifumi, Suzuki Takehiro, Uchida Hiroko, Murakami Akio, Nakajima Yoshiki, Yokono Makio, Akimoto Seiji, Dohmae Naoshi, Yonekura Koji, Shen Jian-Ren	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural basis for the absence of low-energy chlorophylls in a photosystem I trimer from <i>Gloeobacter violaceus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.73990	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 -

1. 著者名 Nagao Ryo, Yokono Makio, Ueno Yoshifumi, Nakajima Yoshiki, Suzuki Takehiro, Kato Ka-Ho, Tsuboshita Naoki, Dohmae Naoshi, Shen Jian-Ren, Ehira Shigeki, Akimoto Seiji	4. 巻 1863
2. 論文標題 Excitation-energy transfer in heterocysts isolated from the cyanobacterium <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 as studied by time-resolved fluorescence spectroscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 148509 ~ 148509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2021.148509	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 Kato Koji, Miyazaki Naoyuki, Hamaguchi Tasuku, Nakajima Yoshiki, Akita Fusamichi, Yonekura Koji, Shen Jian-Ren	4. 巻 4
2. 論文標題 High-resolution cryo-EM structure of photosystem II reveals damage from high-dose electron beams	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01919-3	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 -

1. 著者名 Nagao Ryo, Yokono Makio, Ueno Yoshifumi, Suzuki Takehiro, Kato Koji, Kato Ka-Ho, Tsuboshita Naoki, Jiang Tian-Yi, Dohmae Naoshi, Shen Jian-Ren, Ehira Shigeki, Akimoto Seiji	4. 巻 1862
2. 論文標題 Molecular organizations and function of iron-stress-induced-A protein family in Anabaena sp. PCC 7120	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 148327 ~ 148327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2020.148327	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 Nagao Ryo, Yokono Makio, Ueno Yoshifumi, Kato Ka-Ho, Tsuboshita Naoki, Shen Jian-Ren, Akimoto Seiji	4. 巻 1862
2. 論文標題 Basic pH-induced modification of excitation-energy dynamics in fucoxanthin chlorophyll a/c-binding proteins isolated from a pinguiphyte, <i>Glossomastix chrysoplasta</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 148306 ~ 148306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2020.148306	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 Nagao Ryo, Yokono Makio, Ueno Yoshifumi, Suzuki Takehiro, Kumazawa Minoru, Kato Ka-Ho, Tsuboshita Naoki, Dohmae Naoshi, Ifuku Kentaro, Shen Jian-Ren, Akimoto Seiji	4. 巻 1862
2. 論文標題 Enhancement of excitation-energy quenching in fucoxanthin chlorophyll a/c-binding proteins isolated from a diatom <i>Phaeodactylum tricornutum</i> upon excess-light illumination	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 148350 ~ 148350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2020.148350	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤 公児, 長尾 遼, 沈 建仁, 秋田 総理, 宮崎 直幸
2. 発表標題 高分解能クライオ電顕マップを用いた補因子の同定
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 公児
2. 発表標題 立体構造解析のイロハ ~ 光化学系膜タンパク質複合体を例に ~
3. 学会等名 第28回光合成セミナー2021（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坪下直樹、加藤公児、沈建仁、長尾遼
2. 発表標題 立体構造解析に向けた <i>Gloeobacter violaceus</i> 由来フィコビリソームの精製
3. 学会等名 第28回光合成セミナー2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水翔太、加藤公児、沈建仁、長尾遼
2. 発表標題 Anabaenaから調製されたPSI-PBS超複合体の特性解析
3. 学会等名 第28回光合成セミナー2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水 翔太、加藤 公児、鈴木 健裕、堂前 直、沈 建仁、長尾 遼
2. 発表標題 鉄欠乏条件下で誘導されるフィコビリソームと光化学系Iの強固な結合
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長尾遼
2. 発表標題 機能構造研究に基づく光合成色素蛋白質の分子進化
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長尾遼
2. 発表標題 光合成を支える葉緑体色素タンパク質複合体の機能・構造・進化
3. 学会等名 第23回植物オルガネラワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究代表者のwebページ https://researchmap.jp/katokoji プレスリリースのwebページ https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id952.html プレスリリースのwebページ https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id950.html プレスリリースのwebページ https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id948.html 研究代表者のwebページ https://researchmap.jp/katokoji

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	長尾 遼 (Nagao Ryo) (30633961)	静岡大学・農学部・准教授 (13801)	

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