

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03194

研究課題名(和文) 褐藻由来光化学系アンテナ超複合体の単粒子構造解析

研究課題名(英文) Single particle analysis of photosynthetic supercomplex from brown algae

研究代表者

秋田 総理 (Akita, Fusamichi)

岡山大学・異分野基礎科学研究所・准教授

研究者番号：50751418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、褐藻から光化学系I-フコキサンチンクロロフィルa/cタンパク質超複合体(PSI-FCPI)を単離し、その原子構造をクライオ電子顕微鏡単粒子解析法によって決定することを目的に研究を行った。

褐藻Cladosiphon okamuranusを破碎し、回収したチラコイド膜をフレンチプレスにかけることで、界面活性剤による可溶化効率が改善されることがわかった。チラコイド膜の濃度・界面活性剤の種類・界面活性剤の濃度・温度・可溶化の時間などを様々に変え、PSI-FCPIがより可溶化される条件を決定した。このサンプルを使って、クライオ電顕のデータを収集しデータの解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、赤色系統の光合成生物である褐藻から光化学系I-フコキサンチンクロロフィルa/cタンパク質超複合体(PSI-FCPI)を単離し、その原子構造から複合体中の色素の配置や結合様式、タンパク質サブユニット間の相互作用、エネルギー伝達様式を解明することを目的とした。また、解明した構造を緑色系統の光合成生物が持つPSI-光捕集タンパク質超複合体(PSI-LHCI)と比較する事で、異なる波長の光を吸収するために、赤色系統の光合成生物がどの様に光合成分子装置を進化させてきたかを明らかにすることを目的とした。これらの知見が持続可能な社会を構築するための光合成触媒へ応用されることを期待している。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to isolate Photosystem I-fucoxanthin chlorophyll a/c protein supercomplex (PSI-FCPI) from brown algae and to determine its atomic structure by cryo-EM single particle analysis.

The efficiency of solubilization by detergents was improved by crushing the brown alga Cladosiphon okamuranus and subjecting the recovered thylakoid membranes to French press. The concentration of thylakoid membrane, type of detergent, concentration of detergent, temperature, and time of solubilization were varied to determine the conditions under which PSI-FCPI was better solubilized. Using this sample, cryo-EM data was collected and data analysis is in progress.

研究分野：構造生物学

キーワード：光合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

赤色系統の光合成生物である褐藻は、海中の潮下帯に生息し、地球上の重要な一次生産者となっているが、その光合成反応の中心を担っている光化学系 I (PSI) および光化学系 II (PSII) 複合体の構造と機能はよく分かっていない。特に褐藻で働いているアンテナ色素には、クロロフィル *c* とフコキサンチンが結合しており、緑色植物が利用できない青～緑色の光を高効率で利用できるのに加え、絶えず大きく変化する光環境に適応した高い光保護能力を備えている。光捕集アンテナタンパク質は、光合成生物の生息する光の強さ等の環境によって柔軟に変化し、光化学系コアとの相互作用は非常に脆弱なものである。そのため、不安定で巨大な、光化学系コアとアンテナタンパク質からなる膜タンパク質超分子複合体を完全かつ均一な状態で精製するのは非常に難しく、結晶化・構造解析は極めて困難であった。ところが、近年クライオ電顕単粒子構造解析法の発展により、そのような不安定な複合体を結晶化することなく、少量の試料で構造解析が可能となり、構造生物学は新しい段階に移ってきた。光合成の分野でも、巨大アンテナタンパク質フィコビリソーム(Zhang et al., *Nature*, 2017)、紅藻 PSI-LHCI 複合体 (Pi et al. *PNAS*, 2018)、植物 PSI-LHCI-LHCII 複合体 (Pan et al., *Science*, 2018) や PSII-LHCII 複合体 (Wei et al., *Nature*, 2016; Su et al., *Science*, 2017) 等多くの超複合体の構造解析が報告された。一方、国内の我々の研究グループでは、珪藻由来の PSI-FCPI と PSII-FCPII 複合体の解析を行い、それぞれ 2.4 Å および 3.8 Å 分解能の構造解析に成功し、そのアンテナシステムの機能を明らかにした(Nagao et al., *Nature Plants* 2019, *Nature communications* 2020)。そして、赤色系統で珪藻とは別のクレードにある褐藻の光合成装置の構造を明らかにすることで、赤色系統生物の光合成装置の構造基盤を築くことを目指している。褐藻由来の PSI-FCPI と PSII-FCPII についても、培養系は確立しており、精製に関しては珪藻と同様に、ガラスビーズを用いた細胞の破碎、界面活性剤による可溶化、ショ糖密度勾配遠心分離、イオン交換クロマトグラフィーによって達成可能であると考えていた。データ収集条件や解析法に関しては、上記珪藻の方法をそのまま応用することができると考えていた。

2. 研究の目的

珪藻や褐藻などの赤色系統生物では研究が遅れていた。緑色系統のアンテナタンパク質には、クロロフィル *a/b* が結合しているが、褐藻や珪藻の赤色系統のアンテナタンパク質はクロロフィル *b* の代わりにクロロフィル *c* を結合し、フコキサンチンクロロフィル *a/c* タンパク質(FCP)と呼ばれている。また、カロチノイドとしてフコキサンチンを多数結合し、クロロフィル *c* と合わせて、緑色植物では利用効率が低い青～緑色の光を効率よく利用できるようになっている。これは、赤色系統生物が生息する水深が深い海域では、長波長の光が吸収され、短波長の光しか届かなくなるからである。さらに水中環境における光環境の激しい変動に適応するため、FCP は過剰な光エネルギーをうまく散逸させる優れた光保護機能を持っている。このような赤色系統光合成生物の PSI-FCPI や PSII-FCPII 超複合体の構造はこれまで全く解析されておらず、その詳細な集光・エネルギー伝達機構も分かっていなかった。我々は、珪藻から PSI-FCPI および PSII-FCPII を精製し、クライオ電顕単粒子解析によって、それぞれ 2.4 Å、3.8 Å 分解能で構造を解析することに世界で初めて成功した(Nagao et al., *Nature Plants* 2019; PSI-FCPI に関しては論文作成中)。そして、全く予期してなかったことに、珪藻のアンテナタンパク質 FCPII は、PSII-FCPII 複合体中で 4 量体と単量体が集合して機能していることが判明した(図 1)。これは、緑色植物のアンテナタンパク質 LHCII が 3 量体と単量体とが集合して機能しているのとは全く異なる

る新規の知見である。

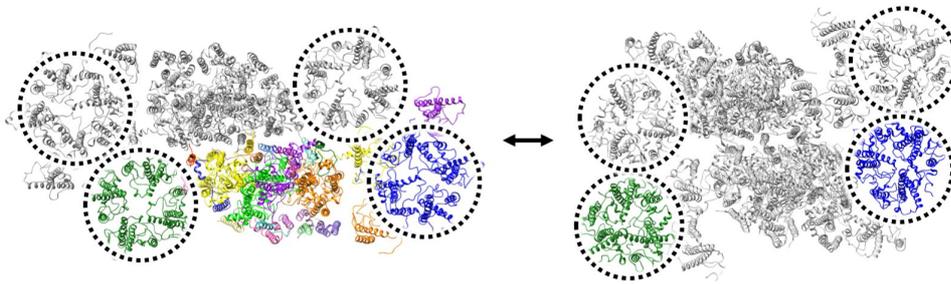


図 1. 珪藻 PSII-FCPII (左) と緑色植物 PSII-LHCII (右) の原子モデルの比較
丸で囲んだ部分はそれぞれ 4 量体 (左) と 3 量体 (右)

この様に、光合成生物は進化の過程で様々な光環境に適応するため、多様な色素アンテナタンパク質を獲得し、進化させてきた。しかし、珪藻で得られた知見を広く、赤色系統生物に一般化できるかは不明である。そこで、我々は赤色系統光合成生物の超分子複合体の更なる知見を得るため、同じく赤色系統に属する、光合成生物である褐藻から構造未知の PSI-FCPI と PSII-FCPII 超複合体を単離し、その原子構造をクライオ電顕単粒子解析法で決定することを思いついた。褐藻は進化的に珪藻より新しいグループに属するため、緑色系統光合成生物に近い構造をとる可能性もあり、非常に興味深い。褐藻の PSI-FCPI と PSII-FCPII 超複合体の構造を解析することで、珪藻で見られた特徴が赤色系統光合成生物に共通のものかどうかを明らかにする。また、赤色系統光合成生物である褐藻や珪藻の PSI-FCPI と PSII-FCPII 超複合体の構造と緑色系統光合成生物の PSI-LHCI と PSII-LHC 超複合体の構造を比較することで、それらタンパク質の結合様式やエネルギー伝達様式の違いを明らかにし、赤色光合成生物が青～緑色の光を高効率に利用する仕組みや光阻害に対する高い保護能力の分子基盤を明らかにする。それによって、両者がどのように光合成分子装置を進化させてきたかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、すでに全ゲノムが解読されている褐藻 *Cladosiphon okamuranus* を材料として用いた。サンプルは株式会社サウスプロダクトから購入した。褐藻をビーズショッカーで破碎した後、遠心分離で回収したチラコイド膜から異なる界面活性剤を用いて PSI-FCPI と PSII-FCPII をそれぞれ可溶化し、ショ糖密度勾配遠心分離法によって精製する。更に、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて高純度の PSI-FCPI と PSII-FCPII を精製する。サンプルの評価は SDS-PAGE、Native-PAGE、吸収スペクトル、酸素電極による活性測定、負染色試料の電顕観察等により行い、cryoEM での構造解析に適した試料作製法を確立する。また、精製サンプルのエネルギー移動や散逸のメカニズムを時分割分光測定法などで解析する。クライオグリッド作成装置 (Vitrobot) を用いて、精製した PSI-FCPI と PSII-FCPII のクライオグリッドを作製する。試料の精製法と並んでこの電顕グリッドの作製条件は、構造解析の成否を決定する重要なステップである。最適なグリッドを作製するためには、タンパク質濃度、溶液条件などの更なる検討が必要である。cryoEM のデータ収集は、理研播磨の共用 200kV と 300 kV CRYOARM を主に利用する。収集したイメージの試料微動を補正し、コントラスト伝達関数の見積もりと補正を行ない、タンパク質粒子像をピックアップする。次に 2 次元および 3 次元のクラス分類を行って、インタクトな光合成超分子複合体の粒子像を選択する。そして、cryoEM の 3 次元密度図の精密化を進め、高分解能の密度図を得る。得られた 3 次元密度図に対して原子モデルを構築し、原子モデル精密化を行なう。プログラムは、SPA については、RELION を使い、モデルの構築・精密化には Coot, Servalcat などを用いる。

4 . 研究成果

褐藻をビーズショッカーで破碎した後、遠心分離で回収したチラコイド膜から異なる界面活性剤を用いて PSI-FCPI を可溶化し、ショ糖密度勾配遠心分離法によって精製した。しかしながら、複合体の収量が明らかに低いため、破碎から可溶化の工程に問題があると考え、回収したチラコイド膜を更にフレンチプレスにかけることで、可溶化の効率を改善した。サンプルを SDS-PAGE、Native-PAGE、吸収スペクトル、負染色試料の電顕観察等により評価した。次に、Vitrobot を用いて、精製した PSI-FCPI のクライオグリッドを作製した。最適なグリッドを作製するために、タンパク質濃度、溶液条件などの検討を行った。cryoEM のデータ収集は、理研播磨の共用 200kV と 300 kV CRYOARM を主に利用した。現在は最適なグリッド条件の検討と収集したデータの単粒子構造解析を並行して行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

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 1-12
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, 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 1-11
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Huaxin Yu, Tasuku Hamaguchi, Yoshiki Nakajima, Koji Kato, Keisuke Kawakami, Fusamichi Akita, Koji Yonekura, Jian-Ren Shen
2. 発表標題 Structural analysis of monomeric photosystem II at 2.78 angstrom resolution using Cryo-electron microscopy
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

〔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	加藤 公児 (Kato Koji) (30452428)	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・テニュアトラック研究員 (84502)	

6. 研究組織（つづき）

	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	宮崎 直幸 (Miyazaki Naoyuki) (00634677)	筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・助教 (12102)	

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