

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06502

研究課題名(和文)シアノバクテリアにおける鉄欠乏誘導性蛋白質の構造基盤解明

研究課題名(英文)Structural basis for iron-stress-induced protein of cyanobacteria

研究代表者

河合 寿子(久保田寿子)(KUBOTA-KAWAI, HISAKO)

山形大学・理学部・准教授

研究者番号：10599228

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):シアノバクテリアの光化学系I(PSI)は、通常、分子内に含まれるクロロフィルを利用して集光反応を行うが、細胞が鉄欠乏状態にさらされると、鉄ストレス誘導性クロロフィル結合タンパク質であるIsiA(iron stress induced gene A)を合成して集光を助ける。本研究では、原子間力顕微鏡法(AFM)を用いてAnabaenaのPSI周囲にIsiAがどのように配置されるかを可視化し、巨大なアンテナネットワークによる集光メカニズムの解明を試みた。これまでにPsaC-EからなるPSI表在性タンパク質が明瞭に観察され、PSI四量体がどのようにチラコイド膜上に配置されているかを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、日本を含めた120以上の国や地域が「2050年カーボンニュートラル(温室効果ガスの排出を全体としてゼロにする)」という目標を掲げている。このような国際的潮流が加速している中、人工光合成による効率的な太陽光エネルギーの利用が求められている。

本研究で得られた、巨大なPSI複合体をもつAnabaenaが効率よく光を集めるためにどのようにPSI四量体をチラコイド膜上に配置しているかという基礎科学的な情報は、人工光合成における光捕集効率の向上に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文): In low-iron stress environments, cyanobacteria express IsiA (iron stress induced gene A), which donates energy to PSI core. In this study, we used atomic force microscopy (AFM) to visualize the native organization of PSI and IsiA within the thylakoid membranes from cyanobacterium Anabaena. AFM images showed that PSI complexes were densely packed in thylakoid membranes. The PSI tetramer has a protruding height of 2-3 nm above the membrane surface and possesses a characteristic cytoplasmic side structure composed of PsaC, PsaD and PsaE. The organization of IsiA around PSI remains to be further investigated.

研究分野：光合成生物学

キーワード：光合成 光化学系 鉄欠乏

1. 研究開始当初の背景

生命を特徴づける炭素や窒素などの元素は、大気や土壤中に二酸化炭素などの無機酸化物として存在している。生物がこれら無機物を糖やアミノ酸のような有機物として利用するためには、それらを還元同化する必要がある。そのための強力な還元力を持つ電子を作り出しているのは光合成生物のチラコイド膜に存在する光化学系 I(PSI)である。シアノバクテリアの PSI は内部に 100 分子近いクロロフィルを持ち集光している。加えて、フィコビリソームというクロロフィル以外の色素を含む可溶性の集光アンテナタンパク質を利用している。しかし、生育環境の変動によって鉄が枯渇すると、フィコビリソームを分解すると同時に、IsiA という鉄イオンストレス誘導性クロロフィル結合タンパク質が合成される(図 1)。近年、シアノバクテリアの一種である *Synechocystis* の PSI 三量体と IsiA の複合体構造が報告された。PSI 単量体は中心角 120° の扇形をしているため、三量体でちょうど円形となり、その周りを 18 分子の IsiA がリングのように取り囲んでいる様子が捉えられた。一方、私は別種のシアノバクテリア *Anabaena* の PSI が四量体を形成することを報告しており、その立体構造も報告された。それによると、4 分子の PSI 扇形がいびつに組み合わさっていた。PSI 四量体は 1.5 MDa 近い巨大な複合体であり、IsiA が結合すると、光合成生物の中でも最大のクロロフィルネットワークからなる集光システムが構築されると予想される。

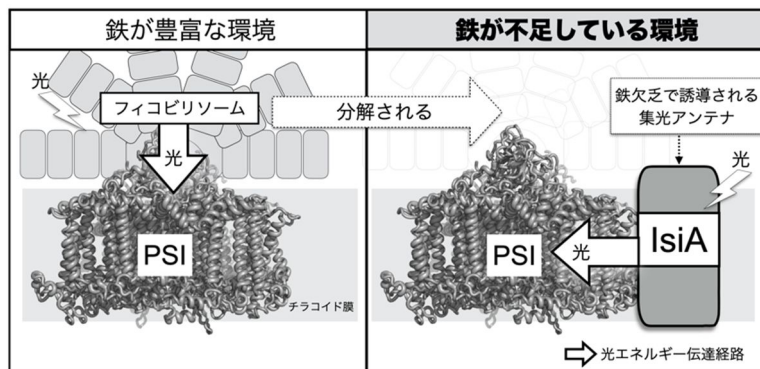


図 1. 鉄欠乏時は IsiA を使って集光する

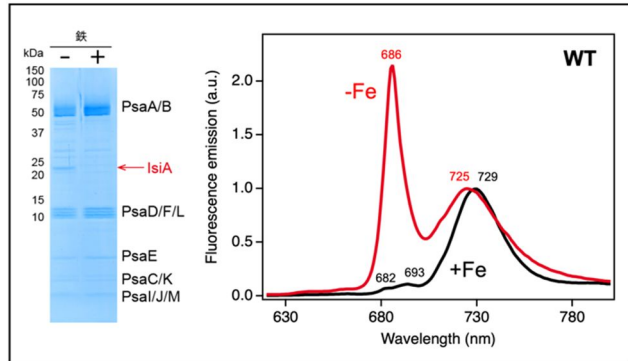
2. 研究の目的

近年、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析により *Synechocystis* の IsiA は PSI 周囲に一層のリングを形成していることが報告された(Akita et al. 2020)。一方で、AFM を用いた解析により、チラコイド膜の中では IsiA が PSI の周囲に何重にもなるリングを形成していたことが報告された(Zhao et al. 2020)。このことから、界面活性剤によりチラコイド膜から可溶化すると多くの IsiA が解離してしまうと考えられる。そこで本研究では、鉄欠乏条件下で培養した *Anabaena* のチラコイド膜を AFM により観察し、PSI 周囲に IsiA がどのように配置されるかを可視化することで、巨大なアンテナネットワークによる集光メカニズム解明することを目的とした。

3. 研究の方法

鉄欠乏培地にて培養した *Anabaena* からチラコイド膜を精製した。次に、IsiA の存在を質量分析にて確認した。まずチラコイド膜を可溶化し、ショ糖密度勾配遠心法にて複合体を分離した。その後、PSI 画分を回収し SDS-PAGE にて分離すると通常の培養では見

られないバンドが確認された(図 2-左)。質量分析の結果、このバンドは IsiA であることが確認された。また、このチラコイド膜を使って 77K クロロフィル低温蛍光測定し IsiA 由来の 686 nm のピークを確認することで IsiA がクロロフィルを配位し、集光能力を持つことを確かめた(図 2 右)。



このチラコイド膜を AFM サンプルとし、クロロフィルを励起させない 980nm の半導体レーザーを用いてカンチレバーの振幅変調を計測した。

図 2. 左. 密度勾配後のサンプルの SDS-PAGE による分離。右. クロロフィル低温蛍光測定。赤ライン：鉄欠乏培養細胞、黒ライン：通常培養細胞

4. 研究成果

本研究では、これまでにチラコイド膜上に存在する PSI 四量体を観察することに成功した。研究開始当時は、チラコイド膜がマイカに張り付かないという問題点があった。そこでマイカの表面をよく観察すると、可溶性のタンパク質粒子で覆われていることがわかった。これは、可溶性の集光色素フィコビリソーム由来であると推定できた。そこで細胞破碎後に 2000g で未破碎細胞を除いた後に、さらにショ糖密度勾配遠心法にて膜に弱い力で結合している蛋白質を取り除くステップを追加した。その結果、図 3 のようにフィコビリソームの青い画分が分離され、 のように緑のバンド(チラコイド膜)を得ることができた。そのサンプルを用いて再度マイカへの吸着を試みた結果、チラコイド膜をマイカ上に貼り付けることに成功した。さらに、細胞破碎方法についてはガラスビーズ破碎、リゾチウム処理後の浸透圧破碎、ソニケーション破碎を検討した結果、ソニケーション破碎サンプルの場合に最もリポソームの吸着が少なく観察に適していることが見いだされた。また、ショ糖密度勾配遠心法で分離したチラコイド膜は図 3 の

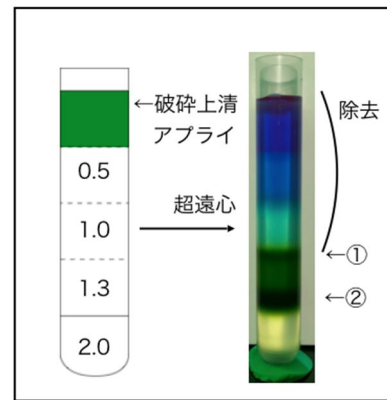


図 3. ショ糖密度勾配遠心法による可溶性タンパク質の除去

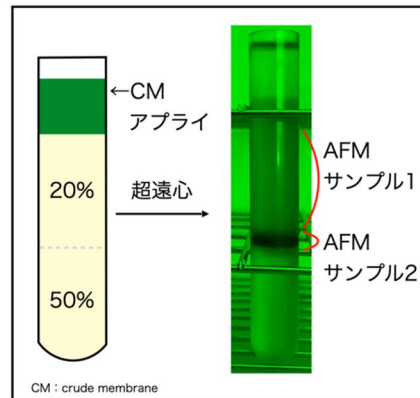


図 4. AFM サンプルの調製

の用に 2 つのバンドとして分離されるが、 サンプルはリポソームも多く張り付いた。一方、 サンプルでは 15~25nm 程度の薄い膜を広範囲に貼ることができた。ここで得られたチラコイド膜(crude membrane)を用いて AFM 観察を行ったが、分解能が上がらなかったため精製方法の改良をおこなった。具体的には crude membrane を wash 後にさらに界面活性剤を含むショ糖密度勾配遠心法にて分離した。そして、図 4 の 20% 溶液(AFM サンプル 1)および 20%と 50%の境界面のバンド(AFM サンプル 2)を回収して AFM 観察を行なった。その結果、サンプル 2 はリポソーム状の膜が多く張り付いており観察に適していなかったが、サンプル 1 は 10-15 nm 程度の高さの膜が多く、その表面には図 3A の AFM 画像のように多くの粒子が観察された。こ

の粒子を拡大すると菱形の構造をしており、4分子でおおよそ 230 x 280 程の大きさであった(図 5B, D)。この大きさはクライオ顕微鏡を用いた PSI 四量体の構造解析より報告されている 220 x 270 とほぼ一致することから、これらの菱形は PSI であると考えられた(図 5D)。また、PSI はチラコイド膜の表面に PsaC、PsaD、PsaE からなる表在性タンパク質が存在しており、PSI から電子を受け取るフェレドキシンというタンパク質が結合するポケットを形成している。先行研究では、PsaC、PsaD、PsaE の高さは 2.6 nm と報告されており、今回の測定ではどの PSI の表在性部分もおおよそ 2~3 nm の範囲に入っていた(図 5C)。このように、今回の AFM による観察ではチラコイド膜上の PSI 粒子、その表在性タンパク質、さらにそれらが形成するポケットの向きを捉えることに成功した。今後は、PSI の表在性タンパク質よりも高さがない IsiA を観察し、PSI の周囲にどのように配置されているかを明らかにする。

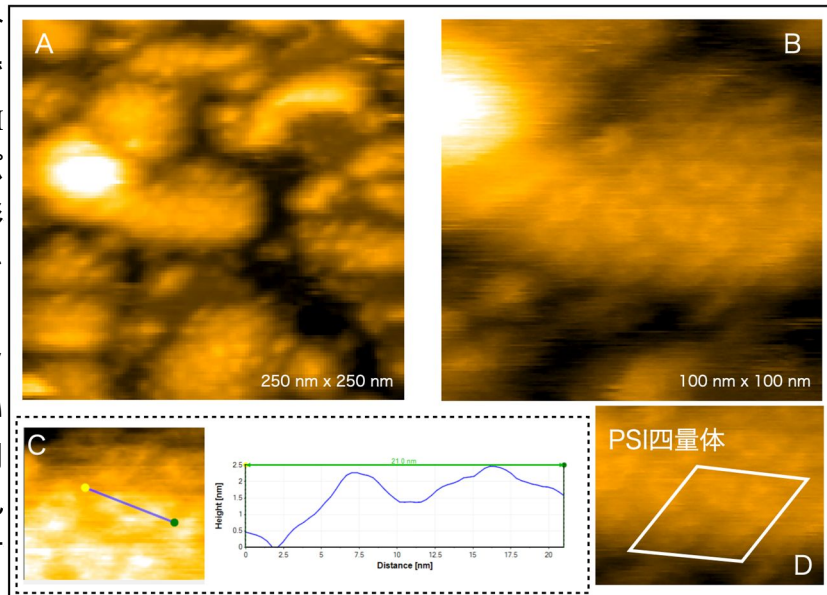


図 5. チラコイド膜上の PSI の AFM 画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Keisuke Kimura, Fumihiro Kawai, Hisako Kubota-Kawai, Yasunori Watanabe, Kentaro Tomii, Rieko Kojima, Kunio Hirata, Yu Yamamori, Toshiya Endo, Yasushi Tamura	4. 巻 171
2. 論文標題 Crystal structure of Tam41 cytidine diphosphate diacylglycerol synthase from a Firmicutes bacterium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 429-441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvab154	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 Hiroki Kato, Ryutaro Tokutsu, Hisako Kubota-Kawai, Raymond N. Burton-Smith, Eunchul Kim, Jun Minagawa	4. 巻 183
2. 論文標題 Characterization of a giant photosystem I supercomplex in the symbiotic dinoflagellate Symbiodiniaceae	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1725-1734
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/pp.20.00726	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 Eunchul Kim, Hisako Kubota-Kawai, Fumihiro Kawai, Makio Yokono, Jun Minagawa	4. 巻 126,
2. 論文標題 Conformation of Light-Harvesting Complex II Trimer Depends upon Its Binding Site	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 5855-5865
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpcc.2c04061	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4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hisako Kubota-Kawai
2. 発表標題 Structure and function of photosystem I complex
3. 学会等名 First International Conference on Technologies for Smart Green Connected Society 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hisako Kubota-Kawai
2. 発表標題 Investigation on the thermodynamic dissociation kinetics of Photosystem I trimer to determine the binding strengths of each protomer
3. 学会等名 第59回 日本生物物理学会年会シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村啓介, 河合文啓, 河合寿子, 小島理恵子, 渡邊康紀, 遠藤斗志也, 田村康
2. 発表標題 Firmicutes bacterium 由来のCDP-DAG合成酵素Tam41の結晶構造の解明
3. 学会等名 第28回 山形分子生物学セミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村 啓介, 河合 文啓, 平田 邦生, 河合 寿子, 小島 理恵子, 渡邊 康紀, 遠藤 斗志也, 田村 康
2. 発表標題 Crystal Structure of Tam41 CDP-DAG synthase from Firmicutes bacterium
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------