

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：57101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24870030

研究課題名(和文) 光合成集光装置の細胞内構築に関わる新規鉄硫黄タンパク質の構造と機能の解明

研究課題名(英文) Structural and functional analysis of a novel iron-sulfur protein involved in the intracellular assembly of light-harvesting antenna

研究代表者

萩原 義徳 (Hagiwara, Yoshinori)

久留米工業高等専門学校・生物応用化学科・助教

研究者番号：10628548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内で超分子複合体を構築する分子メカニズムの解明を目指した。特に、シアノバクテリアがチラコイド膜上に有する光捕集アンテナ複合体に着目し、その形成に関与するタンパク質の構造と機能を明らかにすることを目的として研究を行った。

その結果、シアノバクテリア由来Ycf34タンパク質の発現プラスミドベクターを構築することができ、さらに、目的タンパク質の発現・精製にも成功した。そして、精製タンパク質には鉄硫黄クラスターが含まれていることが明らかとなった。また、変異導入実験によって、タンパク質内の5つすべてのシステイン残基が鉄硫黄クラスターの保持に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the molecular mechanism of the intracellular assembly of supramolecular complex. Especially, we studied the structure and function of the protein, involved in the assembly of cyanobacterial light harvesting antennae complex on the thylakoid membrane. We constructed cyanobacterial Ycf34 expression plasmids and purified those proteins. We found the expressed Ycf34 holds iron-sulfur cluster in the protein. The mutation analysis indicated that each of five cysteine residues of Ycf34 involved in the holding of iron-sulfur cluster in the protein.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：機能生物化学

キーワード：鉄硫黄タンパク質 光合成 X線結晶構造解析

### 1. 研究開始当初の背景

シアノバクテリアは古くから細胞内共生説における葉緑体の始原として考えられ、近年のゲノム解析でも、シアノバクテリアがコードする遺伝子の多くが葉緑体ゲノムにもオルソログとして存在することがわかっている。両ゲノム間で保存された遺伝子はその機能から3つに大別でき、遺伝子発現、光合成、そして機能未知のグループとなっている。機能未知のグループは *ycf* (hypothetical chloroplast open reading frame) と呼ばれ、その多くが光合成に関与すると考えられている。このうちの *Ycf27* は、シアノバクテリアや紅藻が持つ集光装置フィコピリソーム (PBS) から光合成反応中心への光エネルギー伝達を調節する (Ashby M. K., et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999)。PBS はチラコイド膜にアンカーされたドーム型の光捕集アンテナであり、フィコピリタンパク質とそれらを結ぶリンカータンパク質で構成される。フィコピリタンパク質にはピリンと呼ばれる光合成色素が共有結合している。PBS は分子量が100万にも達する集光性超分子複合体であるが、効率的な光合成のためにそのサイズや数、そしてフィコピリタンパク質の構成比が光環境によってフレキシブルに調節される (補色馴化)。さらに、栄養飢餓条件下では PBS が分解されることによってアミノ酸源ともなり、環境変化に巧妙に対応する PBS の構築・分解メカニズムの存在が伺える。このように PBS に関する多くのことが明らかとなっているが、構築・分解の制御機構における統一的な理解は得られていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞内で超分子複合体を構築するメカニズムの解明を目指した。特に、シアノバクテリアの光捕集アンテナに着目し、その形成に関与するタンパク質の構造と機能を明らかにすることを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

シアノバクテリアのゲノムを用いて、目的タンパク質を発現する遺伝子を PCR によって増幅する。得られた遺伝子をプラスミドベクターに組み込み、タンパク質発現用の大腸菌を形質転換する。遺伝子組換え大腸菌を大量培養し、目的タンパク質の発現誘導をかけ、大腸菌細胞内に目的タンパク質を過剰発現させる。得られた菌体を破碎し、発現タンパク質を精製タグによるアフィニティークロマトグラフィーで精製する。精製タグを特異的に除去し、精製サンプルとする。得られたサンプルを用いて、生化学的および構造生物学的研究を進め、パートナータンパク質の探索や X 線結晶構造解析を行う。

### 4. 研究成果

(1) シアノバクテリア由来 *Ycf34* 発現プラ

ズミドを構築するため、*Synechocystis* sp. PCC6803 (以下 6803) および *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (以下 BP-1) 由来の *ycf34* の塩基配列データをデータベースから入手し、GC 含有率が 40~60%、 $T_m$  値が 55~66 になるようにそれぞれ 2 種類のプライマーを設計した。PCR によって目的遺伝子を増幅し、電気泳動で増幅産物のサイズを確認した。得られた遺伝子をプラスミドベクターにライゲーションし、制限酵素による切断チェック (Fig.1) および DNA シーケンシングによって、ライゲーションのミスや目的遺伝子の配列に変異がないことを確認した。

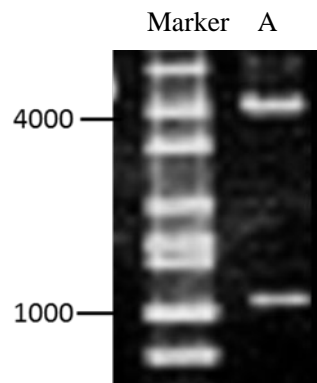


Fig.1 発現ベクターへの目的遺伝子挿入確認実験。Marker の単位は bp。A: 6803 *ycf34* 遺伝子組込みベクターの制限酵素処理サンプル。

(2) 6803 *ycf34* 及び BP-1 *ycf34* がそれぞれ組込まれた発現プラスミドベクターを、タンパク質発現用の大腸菌である BL21 (DE3) に形質転換した。遺伝子組換え大腸菌の培地に IPTG を添加し、目的タンパク質の発現チェックを試みた。大腸菌破碎液の SDS-PAGE の結果、目的タンパク質と融合させている精製タグである Glutathione S-transferase (GST) の総分子量に相当するおよそ 35,000 の泳動度の位置に染色バンドが可溶性画分のレーンで見られたため、目的タンパク質の過剰発現に成功した。

(3) 遺伝子組換え大腸菌を大量培養し、目的タンパク質の精製実験を行った。まず、大量培養で得られた菌体を超音波破碎し、その破碎液を高速遠心によって、不溶性の細胞膜画分と可溶性の細胞質画分に分けた。可溶性画分をアフィニティークラムに流し、GST タグ融合 *Ycf34* を特異的に吸着させた。カラムを緩衝液で洗浄後、還元型グルタチオンを含む緩衝液を用いて、GST タグ融合 *Ycf34* をカラムから溶出させた。GST タグ部分をプロテアーゼ処理し、再びアフィニティークラムにサンプルを通すことによって、*Ycf34* タンパク質の単離に成功した。得られたタンパク質の

分光学的特性を調べるために、紫外可視吸光スペクトルを測定した (Fig.2)。そのスペクトル形状より、発現・精製した Ycf34 には鉄硫黄クラスターが含まれることが強く示唆された。

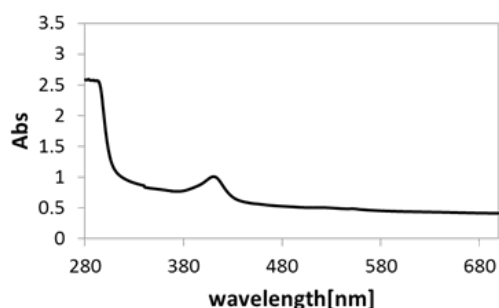


Fig.2 BP-1Ycf34 紫外可視吸光スペクトル

(4) 目的タンパク質内のどのアミノ酸残基が鉄硫黄クラスターのリガンド残基として機能しているかを明らかにするために、変異導入実験を行った。部位特異的変異導入プライマーを設計し、PCR 反応を利用して、Ycf34 発現プラスミドベクターを部位特異的に変異させた。得られた変異プラスミドベクターを DNA シーケンシングし、変異が導入されていることを確認した。これにより、目的タンパク質内の 5 つのシステイン残基がそれぞれセリン残基に置換された変異 Ycf34 タンパク質発現プラスミドベクターを得た。それらのプラスミドベクターをタンパク質発現用大腸菌にトランスフォーメーションした。これらの遺伝子組換え大腸菌を用いて、変異タンパク質を発現・精製し、生化学的及び分光学的解析を行ったところ、5 つすべてのシステインが鉄硫黄クラスターの保持に関わることを示唆した (Fig.3, 4)。

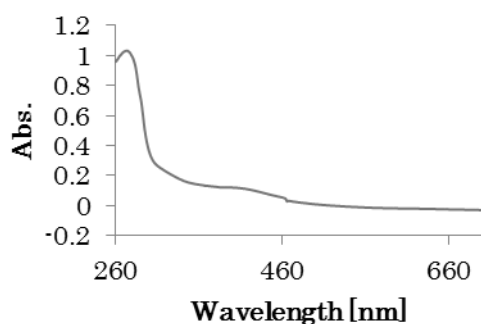


Fig.3 C4S BP-1Ycf34 紫外可視吸光スペクトル

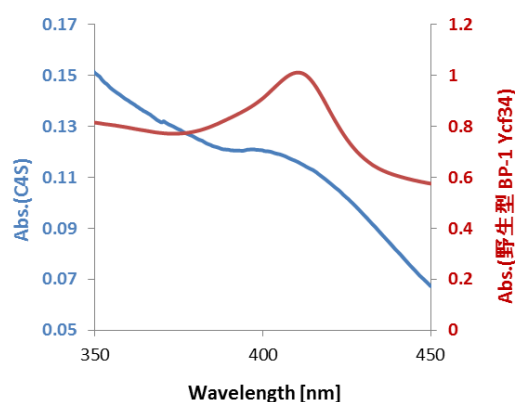


Fig.4 野生型 BP-1Ycf34 および C4SYcf34 の紫外可視吸光スペクトルの比較

今後は、野生型および変異型 Ycf34 の結晶化を試み、X 線結晶構造解析を目指す。

## 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 1 件)

Thomas Wallner、Yoshinori Hagiwara、Gabor Bernat、Roman Sobotka、Edward J. Reijerse、Nicole Frankenberg-Dinkel and Annegret Wilde、Inactivation of the conserved open reading frame *ycf34* of *Synechocystis* sp. PCC 6803 interferes with the photosynthetic electron transport chain、*Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*、査読有、1817、11、2012、pp.2016-2026.

DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.06.002

[学会発表](計 2 件)

土屋順司、碓井美咲、小崎香奈、萩原義徳、光受容色素の合成に關与するタンパク質の発現および精製、第 19 回高専シンポジウム in 久留米、平成 26 年 1 月 25 日、久留米工業高等専門学校 (福岡県)

萩原義徳、津村優太、平山亜理沙、杉野美里、Nicole Frankenberg-Dinkel、光合成集光装置の細胞内構築に關わる新規鉄硫黄タンパク質の発現系の構築と精製、第 19 回高専シンポジウム in 久留米、平成 26 年 1 月 25 日、久留米工業高等専門学校 (福岡県)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://apollo.cc.kurume-nct.ac.jp/~hagiwara/>

6．研究組織

(1)研究代表者

萩原 義徳 (HAGIWARA, Yoshinori)  
久留米工業高等専門学校・生物応用化学  
科・助教  
研究者番号：10628548

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし