

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870354

研究課題名(和文) 金属置換再構成Pcを用いた光化学系I-Pc複合体の精密結晶構造解析

研究課題名(英文) structural analysis of PSI-Pc complex

研究代表者

河合 寿子(久保田寿子)(Kubota-Kawai, Hisako)

基礎生物学研究所・環境光生物学研究部門・特別研究員

研究者番号：10599228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、光化学系I(PSI)とPSIを還元する蛋白質プラストシアニン(Pc)が形成する電子伝達複合体のX線結晶構造解析を行い、PSI還元メカニズムの構造基盤を解明することである。具体的には、PSI構造とPSI-Pc複合体構造を比較し、複合体形成により構築された最適な電子伝達の反応場を原子レベルで直接的に捉え、効率よくPSIを還元する構造基盤を明らかにすることを目指している。これまでにシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803から精製したPSI三量体の結晶構造解析を行い、その立体構造を得た。現在PSI三量体とPcの共結晶化スクリーニングを進めている。

研究成果の概要(英文)：In oxygenic photosynthesis, three integral membrane protein complexes, Photosystem II, cytochrome b6/f complex and Photosystem I (PSI), accomplish electron transport and generation of the trans-membrane electrochemical proton gradient used for energy transduction. PSI mediates the oxidation of plastocyanin (Pc) and reduction of ferredoxin (Fd). The architecture of the PSI complexes had been described by X-ray crystallography, and the positions of most of their amino acids and prosthetic groups have been defined. But it was unclear how PSI and Pc or Fd make complex to accomplish the efficient electron transfer. To elucidate the electron transfer mechanism between PSI and Fd, we have made PSI-Fd complex crystal and solved the structure at 4.2Å. In this study, we tried to elucidate the electron transfer mechanism between PSI and Pc. We succeeded to make *Synechocystis* PSI crystals and solved the structure. Now we are trying to make PSI-Pc complex crystals.

研究分野：光合成

キーワード：光化学系I プラストシアニン

## 1. 研究開始当初の背景

植物や緑藻、シアノバクテリアが行う光合成反応では、効率よく太陽光エネルギーが化学エネルギーに変換される。その初期過程の明反応では 100%の量子収率を実現している。この明反応の最後のステップを担うのは、光化学系 I(photosystem I:PSI)という色素-蛋白質複合体である。PSI の反応は、[還元 光吸収 電荷分離 内部電子伝達 酸化]に分けることができる。これらの反応のうち、光吸収と PSI 内部の電子伝達反応については、PSI の結晶構造情報から詳細に明らかとなっている。2001 年に好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus elongatus* (*T. elongatus*)の PSI 三量体構造が 2.5Å 分解能で報告された構造(Jordan et al. 2001 Nature)によると、PSI 内部では、光電変換反応に関わる 2 分子の反応中心スペシャルペアクロロフィルやフェオフィチン、鉄-硫黄クラスターなどの電子伝達物質が蛋白質中に適切な距離と配向をもって正確に固定されていた。さらに、この反応に使われる太陽光エネルギーを効率よく吸収すべく何百というクロロフィル分子が PSI 内部にアンテナネットワークを張り巡らせていた。即ち PSI は「光吸収と電荷分離反応」が流れるように反応する一つの完成された系であるとの決着を得た。

しかしながら、PSI を酸化/還元するメカニズムの構造基盤は解明されていない。PSI はプラストシアニン(Pc)、またはシトクロム  $c_6$  (Cyt $c_6$ )によって還元され、Fd によって酸化される。これらは全て 10kDa 程度の水溶性電子伝達蛋白質であり、PSI と電子の受け渡しを行う際、一時的に弱い相互作用で電子伝達複合体を形成する。この複合体形成に誘導されて PSI と電子伝達蛋白質の双方が構造変化を起こし、電子伝達に最適な反応場が整えられる。その上で、双方の酸化還元反応中心が適切な距離と配向をもって配置されると考えられる。このように PSI は電子伝達蛋白質との複合体を形成することで、極めて効率よく電子伝達反応(PSI の還元と酸化反応)を行っている。

私達はこれまでに、PSI 酸化メカニズムを構造的に理解することを目指して PSI と Fd の複合体結晶構造解析を行った。そして、Fd の結合様式や酸化還元反応中心周辺環境から PSI 酸化の構造基盤を解き明かした。

PSI と Fd の複合体結晶を作製し、Fd の反応中心金属の電子密度を確認することに成功したが、当初は蛋白質部分が不安定で明確な電子密度を確認出来なかった。世界的に見て弱い相互作用で一時的に形成される「膜蛋白質-可溶性蛋白質の過渡的電子伝達複合体」の構造解析例は酵母の Cyt $b_1$  と Cyt $c$  の複合体(Sozanne et al. 2008)の一例だけであり、PSI-Fd 複合体構造解析が極めて困難であると予想できた。そこで、弱い相互作用で過渡的に形成される電子伝達複合体の結晶

を安定的に得るために、ガリウム置換再構成 Fd(Ga-Fd)を導入した。Fd の本来の反応中心金属は 2[Fe-S]クラスターであるが、2[Ga-S]に置換することで構造が保たれたまま電子の移動のみが阻害される。Ga-Fd の蛋白質構造やクラスター周辺の水素結合は Fe-Fd と全く変わらないこと、また他の Fd 依存酵素との相互作用に影響が無いことを確かめた上で、PSI-Fd 複合体を結晶化した。そして、Ga置換再構成 Fd を利用したことがブレイクスルーとなり、PSI-Fd 複合体の結晶構造解析に成功した。

本研究では、PSI を還元する反応である PSI と Pc 間の電子伝達反応に注目し、その構造基盤を得ることを目指している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、PSI と PSI を還元する蛋白質 Pc が形成する電子伝達複合体の X 線結晶構造解析を行い、PSI 還元メカニズムの構造基盤を解明することである。

## 3. 研究の方法

方法概要：シアノバクテリアの一種である *Synechocystis* sp. PCC6803 (*Synechocystis*) から PSI を、また *Synechocystis* 由来の Pc を発現する大腸菌から Pc をそれぞれ精製し、PSI-Pc 複合体結晶を作製する。その結晶を用いて結晶構造解析を行う。その際、安定的な複合体結晶を得るために、金属置換再構成 Pc を利用する。

Pc を選択した理由：PSI を還元する蛋白質は 2 種類存在し、紅藻や褐藻は Cyt $c_6$  を利用している一方、作物などの有益植物を含む高等植物は Pc を利用する。既に得られている PSI の高分解能結晶構造は *T. elongatus* 由来だが、この生物は Cyt $c_6$  を利用している。Cyt $c_6$  の反応中心はヘム鉄であり、鉄が配位したポルフィリン環がアミノ酸と共有結合しているために金属置換体を作製することが出来ない。そこで、反応中心金属が銅であり、金属置換再構成の実績がある Pc をターゲットとした。

*Synechocystis* を利用する理由：私が 2005 年より生化学的解析を行って来た *Synechocystis* は Cyt $c_6$  に加えて Pc も持ち合わせている。そこで本研究では *Synechocystis* を用いて実験を行うこととした。

## 4. 研究成果

Pc 結合前後の構造を比較する必要があるため、まず PSI 構造解析を行った。

*Synechocystis* から高純度 PSI を簡便に精製するために、PSI のサブユニットの一つである PsaF に His タグを付加した株(PsaF-His 株)を利用した。PsaF-His 株から精製したチラコイド膜を可溶化し、Ni カラム

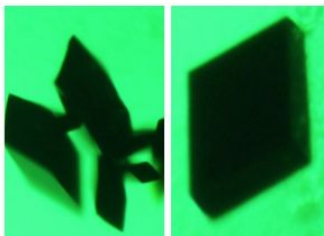
アフィニティークロマトグラフィーにより PSI を精製した後、密度勾配遠心法にて PSI の三量体と単量体を分離した。結晶化には、単量体よりも酸素吸収活性が高い三量体の PSI を使用した。結晶化スクリーニングを行い、PEG400 とメタノールを含む結晶化溶液にて結晶を得ることに成功した。結晶が薄く、異方性が高いという問題点はあったが、6.1 分解能で構造を決定した。

本研究で利用している *Synechocystis* とこれまでに PSI 構造の報告があった *T. elongatus* では蛋白質サブユニット組成が多少異なる。例えば *T. elongatus* は 1 種類の PsaK しか持たないが *Synechocystis* は PsaK1 と PsaK2 の 2 種類を持つ。そして光環境に応じてその割合を変化させていること、PsaK2 は三量体にしか結合しないことが知られていた。しかし、PsaK1 と PsaK2 は独立して PSI 複合体の異なる箇所には結合するのか、それとも PSI 内の特定の場所に競合的に結合するかについては明らかとなっていなかった。今回の解析により PsaK が結合すると予想される領域に 2 分子が入るスペースは無く、さらに PsaK 様の電子密度が他に存在しないことから、単量体当たりどちらか 1 分子のみが結合するという結論を得た。PSI 三量体の結晶を結晶化溶液でよく洗浄した後、溶かして SDS-PAGE を行うと、PsaK1 と PsaK2 とともに含まれており、結晶中ではヘテロな状態になっていると考えられる。そのため、分解能を向上させるためには、PsaK 結合部位にどちらか一方のみが存在している、均一なホモ三量体 PSI を得る必要があると考えられる。そこで、均質な PSI 三量体結晶化サンプルを得るアプローチとして、PsaK1/PsaF-His 株と PsaK2/PsaF-His 株を作製した。PsaF-His 株と同様に Ni アフィニティークロマトグラフィーを利用して PsaK1/PsaF-His 株から PSI を精製したところ三量体が不安定化して、多くが単量体となった。一方、PsaK2/PsaF-His 株の PSI は多くが三量体として存在していた。そこで PsaK2/PsaF-His 株から精製した PSI 三量体を利用して約 1600 条件の初期結晶化スクリーニングを行った。結晶が得られた 3 条件に於いて pH、塩の種類と濃度、沈殿剤の濃度や結晶化温度などをさらに検討した。最終的に厚みのある良質な結晶が得られた。その結晶を用いて X 線回折実験を行った。さらに好熱性シアノバクテリア、*T. elongatus* の PSI 構造を初期モデルとした分子置換により位相を決定し、構造を得た。

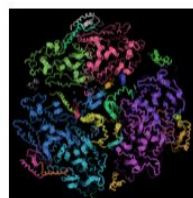
また、*Synechocystis* の Pc を発現する大腸菌を用いて IPTG や銅の濃度、培養の温度や時間など発現条件を詳細に検討した。効率よく精製するため、Pc が大腸菌のペリプラズム領域に移行するシグナルを利用している。精製して得られた蛋白質のアミノ酸シーケンスを行い、シグナル配列が切断された目的の Pc であることを確認した。現在 PSI-Pc 複

合体結晶化のスクリーニングを進めている。

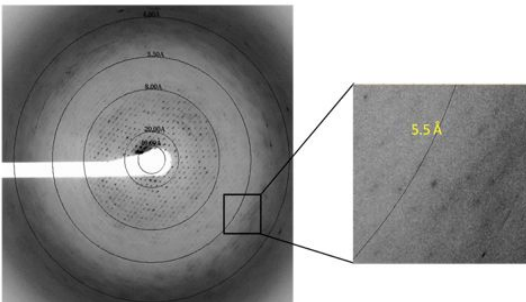
a, PSI結晶



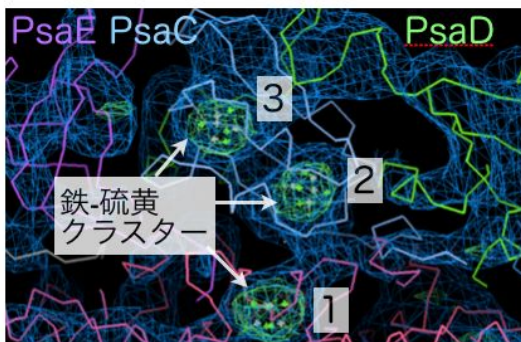
c, PSI三量体の全体構造



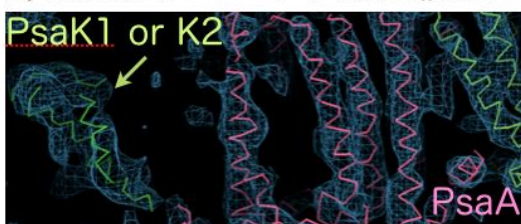
b, PSI結晶の回折点



d, 鉄-硫黄クラスター



e, PsaKサブユニット周辺構造



### *Synechocystis* PSI の構造解析

#### 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) 査読有り

Mutoh Risa, Muraki Norifumi, Shinmura Kanako, Kubota-Kawai Hisako, Lee Young-Ho, Nowaczyk Marc, Rögner Matthias, Hase Toshiharu, Ikegami

Takahisa, Kurisu Genji 「X-ray Structure and Nuclear Magnetic Resonance Analysis of the Interaction Sites of the Ga-substituted Cyanobacterial Ferredoxin」、『Biochemistry』、ACS publications、54(39)、pp6052-61、2015  
DOI:10.1021/acs.biochem.5b00601

〔学会発表〕(計 11 件)

国際学会口頭発表

Hideaki Tanaka, **Hisako Kubota-Kawai**, Risa Mutoh, Kanako Shinmura, Pierre Sétif, Marc Nowaczyk, Matthias Rögner, Takahisa Ikegami, and Genji Kurisu 「X-ray structure and NMR analysis of the electron transfer complex between Photosystem I and Ferredoxin」『14th International Conference of the Asian Crystallographic Association, MS7 Membrane and Membrane-associated Proteins』Hanoi, Vietnam (4-7 December 2016)

国内学会口頭発表

**河合(久保田)寿子**「シアノバクテリアの光化学系 I とフェレドキシンの電子伝達複合体構造」、『第 7 回日本光合成学会年会シンポジウム』シンポジウム 1 招待講演、東京都葛飾区、東京理科大学葛飾キャンパス(2016 年 5 月 27-28 日)

**河合(久保田)寿子**, 武藤梨沙, Pierre SETIF, Marc Nowaczyk, Matthias Rögner, 池上貴久, 田中秀明, 栗栖源嗣 「光化学系 I-フェレドキシンの電子伝達複合体構造から読み解く電子伝達の動的メカニズム (Structural basis for the dynamic electron transfer between photosystem I and ferredoxin)」『第 15 回日本蛋白質科学会年会』2WA1-5、徳島県徳島市、あわぎんホール(2015 年 6 月 24~26 日(ワークショップ口頭発表))

武藤梨沙、**久保田(河合)寿子**、田中秀明、池上貴久、栗栖源嗣「光化学系 I-フェレドキシン複合体の構造解析」、『第 22 回光合成セミナー2014: 反応中心と色素系の多様性』、愛知県名古屋市、名古屋工業大学(2014 年 7 月 12-13 日)

国内学会ポスター発表

加藤弘樹、得津隆太郎、**河合(久保田)寿子**、Ray Burton-Smith、皆川純 「Characterization of PSI-LHCI supercomplex in coral symbiotic algae *Symbiodinium minutum*. サンゴ共生褐虫藻における PSI-LHCI 超複合体の機能構造解析」『第 58 回日本植物生理学会年会』、鹿児島県鹿児島市、鹿児島大学 郡元キャンパス(2017 年 3 月 16-18 日)

倉持里佳子、片山光徳、遠藤嘉一郎、石井麻子、**河合(久保田)寿子**、小林康一、皆

川純、和田元、水澤直樹 「His タグを付加した CP47 変異株を用いた *Anabaena* sp. PCC 7120 光化学系 複合体の精製とその特性」『第 58 回日本植物生理学会年会』、鹿児島県鹿児島市、鹿児島大学 郡元キャンパス(2017 年 3 月 16-18 日)

**河合(久保田)寿子**、武藤梨沙、Pierre SETIF, Marc Nowaczyk, Matthias Rögner, 池上貴久、田中秀明、栗栖源嗣 「光化学系 I-フェレドキシンの電子伝達複合体構造から読み解く電子伝達の動的メカニズム (Structural basis for the dynamic electron transfer between photosystem I and ferredoxin)」『第 15 回日本蛋白質科学会年会』1P-024、徳島県徳島市、あわぎんホール(2015 年 6 月 24~26 日(ポスター発表))

**Hisako Kubota-Kawai**, Yuka Sakamoto, Hajime Wada, Hideaki Tanaka, Genji Kurisu 「Crystal Structure of Photosystem I from *Synechocystis* sp. PCC6803 at 5.1 Å Resolution」『日本化学会 第 95 春季年会』、2PD-03、千葉県船橋市、日本大学 理工学部 船橋キャンパス薬学部(2015 年 3 月 26 -29 日)

**河合(久保田)寿子**、武藤梨沙、池上貴久、Marc Nowaczyk, Matthias Rögner, 田中秀明、栗栖源嗣 「光化学系 I とフェレドキシンが形成する電子伝達複合体の構造基盤」『平成 26 年度日本結晶学会年会』PC068、東京都文京区、東京大学農学部(本郷キャンパス弥生地区)(2014 年 11 月 1~3 日)

Risa Mutoh, **Hisako Kubota-Kawai**, Marc Nowaczyk, Matthias Rögner, Hideaki Tanaka, Takahisa Ikegami, Genji Kurisu 「X-ray structure and NMR analysis of the electron transfer complex between photosystem I and ferredoxin」『第 51 回日本生物物理学会年会』1P251、北海道札幌市、札幌コンベンションセンター(2014 年 9 月 25-27 日)

**河合(久保田)寿子**、武藤梨沙、池上貴久、Marc Nowaczyk, Matthias Rögner, 田中秀明、栗栖源嗣 「光化学系 I と Fd が形成する電子伝達複合体の構造基盤」『第 5 回日本光合成学会年会』、P46、奈良県奈良市、近畿大学 農学部 奈良キャンパス(2014 年 5 月 30-31 日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

無し

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/photo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 寿子 (久保田寿子) (Kubota-Kawai, Hisako)

基礎生物学研究所・環境光生物学部門・特別

研究員  
研究者番号：1059228

(2)研究分担者  
無し  
(3)連携研究者  
無し  
(4)研究協力者  
無し