

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570165

研究課題名(和文) フェレドキシンとそのパートナー蛋白質群との連結による電子伝達・分配への摂動

研究課題名(英文) Perturbation to the electron transfer and distribution due to the connection between ferredoxin and its partner proteins

研究代表者

有賀 洋子(木股洋子)(ARIGA, YOKO)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：60255429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物は光から獲得したエネルギーを、成長過程や環境変化に応じて多種の生合成反応に臨機応変に分配して生命活動を維持しているが、その巧妙なエネルギー分配の仕組みは明らかでない。本研究ではこのエネルギー(高エネルギー電子)分配の担い手であるフェレドキシンという蛋白質とその電子受容蛋白質群との架橋複合体や相互作用変異体を作成し、それらの原子レベルでの立体構造解析やin vitro及びin vivo系での電子伝達機能や相互作用制御の解析を行った。その結果、フェレドキシンと電子受容蛋白質群との新規な相互作用制御のメカニズムに至る幾つかの興味深い知見が得られた。

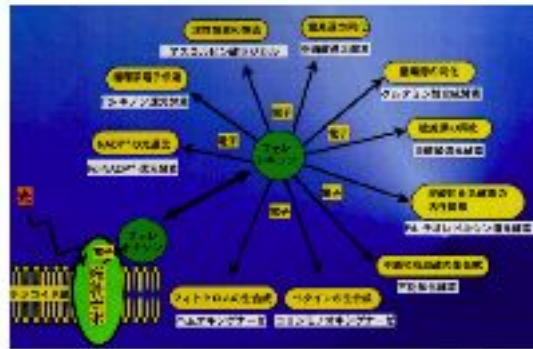
研究成果の概要(英文)：Plants maintain life activity by flexibly distributing the energy acquired from the light to a various biosynthesis reactions according to the growth process and the environmental change, but the mechanism of its clever energy distribution isn't clear. In this study, we prepared a series of cross-linked complexes and interaction mutants of ferredoxin, an energy (high energy electron) distributing protein, and its electron acceptor proteins, and their three-dimensional structures by those atomic levels, electron transfer function and protein-protein interaction in vitro and in vivo system were investigated. As a result, several interesting observations leading to novel regulatory mechanisms of interaction between ferredoxin and the electron acceptor proteins were obtained.

研究分野：生物学、生物科学・機能生物化学

キーワード：生体エネルギー変換 光合成

1. 研究開始当初の背景

光合成生物は、光エネルギーを使って炭素、窒素、硫黄の無機物から生体物質を合成することができる。これら同化系代謝反応は、植物の生理状態や外部環境に対応しながら、巧に統御されている。我々は、電子伝達蛋白質フェレドキシン(Fd)が電子分配の制御によってこれらの代謝間バランスの調節を担うメカニズムの解明を目的として、様々な Fd のパートナー蛋白質を単離して電子伝達速度論的解析、Fd との相互作用の解析、複合体の立体構造解析などを行ってきた。



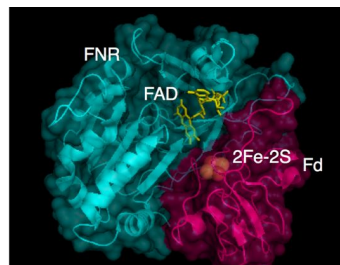
本研究に関する知見は、

(1) NMR 化学シフト変動解析<sup>1)</sup>などから、Fd がパートナー蛋白質との結合に用いる分子表面上のアミノ酸残基は、異なるパートナーに対して重複しながらも部分的に異なることが示され、それらの残基が差別的な結合制御のポイントになる可能性が指摘された。

(2) 植物電子伝達複合体の先駆的な成果となった、Fd と FNR

葉型 Fd:FNR X 線結晶構造

(Fd-NADP+ reductase) との複合体の X 線結晶構造解析<sup>2)</sup>では(右図)アミノ酸残基間の特異的な相互作用により、両者の酸化還元中心間の距離が近接して保たれている詳細が示された。また、植物の葉と根では異なる分子種の Fd と FNR が存在するが、これら 2 種の複合体における Fd:FNR 結合様式は大きく異なることから、Fd と FNR の結合様式は基本的にはフレキシブルであり、生理機能に応じて進化の過程で特異的な変化をした可能性が示された。



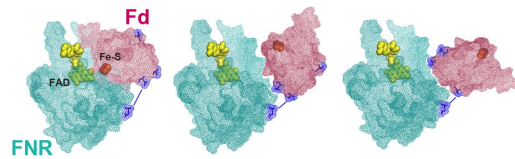
(3) 葉組織には更に複数の Fd と FNR の分子種が存在し<sup>3)</sup>、葉緑体内で FNR 分子種により局在部位が異なることが示された<sup>4)</sup>。従って生理的な電子伝達のペアが、何らかのメカニズムで共同在する可能性が考えられ、このような物理的な近接効果が、生体内電子伝達

を制御するポイントの一つになる可能性が考えられた。

(4) バクテリアでは Fd ドメインと FNR ドメインが同一のポリペプチド鎖上に存在する例が幾つかあり、植物において Fd と FNR が独立して存在する理由が問われる。

これらの知見をうけて我々は最近、Fd-FNR 間の相互作用様式と電子伝達効率との相関を知る目的で、Fd と FNR の表面に人工的にシステイン残基を導入し、2 者が異なる相対配置で繋がるような一連のクロスリンク複合体を作製した<sup>5)</sup>(下モデル図、13 種のうちの 3 例)。

Fd-FNR 架橋複合体のモデル図



これら架橋複合体は、様々な Fd-FNR 間電子伝達活性を示す一方、他の Fd パートナー蛋白質である、亜硝酸還元酵素や光化学系 I 蛋白質との電子伝達は、Fd-FNR 間とはほぼ逆転する活性を示した<sup>5)</sup>。このことから、これら架橋複合体の電子伝達機能の構造基盤を解明し、更なる改良を加えた遺伝子融合複合体を植物に導入することにより、Fd とそのパートナー蛋白質群との電子分配様式に、意図した変動を加えることができると考えた。

2. 研究の目的

フェレドキシン(Fd)は、光合成電子伝達系からの電子を様々な酸化還元酵素に供給しており(左上図)、これらの酵素との相互作用を基盤とした電子分配が、葉緑体内の代謝間バランスを統御する主要因である。本研究は、Fd からの電子分配バランスに摂動をかけることを目的として、Fd とそのパートナー蛋白質との電子伝達効率を様々な変化させる人工連結複合体をデザイン、作製する。そしてそれらが植物の代謝反応や遺伝子発現へ与える影響を解析することにより、マルチ電子キャリアー-Fd による、葉緑体内の代謝間調節統御のメカニズムを解明することを目標とする。

具体的には、

(1) 現在得られている一連の Fd-FNR 架橋複合体の立体構造と電子伝達速度を解析し、複合体間で異なる Fd-FNR 間電子伝達効率の分子基盤—Fd-FNR 間の電子伝達速度と、酸化還元中心間の距離との相関、及びそれへの Fd-FNR 結合様式や酸化還元中心の配向の寄与—を明らかにしたい。

(2) 代表的な架橋複合体の立体構造が得られ

れば、それらの知見を用いて、更に様々な目的に叶った電子分配制御に適する連結融合複合体のデザインを検討、作製し、*in vitro*系での機能評価を行う。その結果をふまえ、*in vivo*複合系への導入を行い、電子分配バランスの変動が生体系に与える影響を解析することにより、電子分配調節メカニズムの解明を目指す。

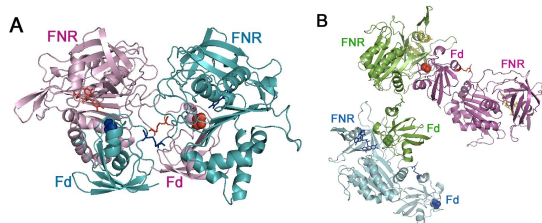
### 3. 研究の方法

(1) 現在得られている一連の Fd-FNR 架橋複合体のうちで代表的なものの立体構造解析 (X線結晶構造及びNMR化学シフト変動)と、並行して電子伝達機能解析を行い、その結果から Fd-FNR 間電子伝達効率及び、パートナー蛋白質との相互作用の、構造基盤を明らかにする。

(2) 上記の知見を用いて目的に応じた連結融合複合体をデザイン、作製し、その機能の評価を *in vitro* 系で評価、及び *in vivo* 複合系への導入を行い、葉緑体での電子伝達や代謝反応への影響を解析する。

### 4. 研究成果

(1) Fd とその依存酵素 Fd-NADP+還元酵素 (FNR)の様々な部位で架橋した複合体は、Fd:FNR 間の電子伝達活性から3つに大別され、そのうち2つのグループで代表的な複合体の X 線結晶構造を得た。これらは予想外にいずれも Fd と FNR のドメインが分子間スワッピングしており、一方はダイマー間で互い違いに、もう一つはマルチマー間で連続してスワッピングするポリマー構造をとっていた。



これらの Fd:FNR 間の電子伝達は分子内で行われると示唆されていたため、得られた分子間ドメインスワッピング構造が結晶化パッキングによるアーティファクトである可能性が考えられ、溶液中でもスワッピングが起こるかを、動的光散乱法 (DLS)、ケミカルクロスリンク、NMR 解析により検証した。その結果、これらの分子はタンパク質濃度に依存して溶液中でもドメインスワッピングすることがわかった。Fd と FNR の連結様式の異なる2種の Fd-FNR 架橋複合体の間で、そのタンパク質濃度依存性は大きく異なっており、これらが分子内の Fd-FNR 間電子伝達のみならず、分子がおかれる環境によってはドメインスワッピングによる分子間電子伝達を行う可能性が提示された。これら架橋複合体の Fd-FNR 間電子伝達効率及び相互作用の構造基盤や、溶媒環境等の状況に応じた電子分配制御の

可能性について考察し、BBRC に論文発表した。

意義：天然でドメインスワッピングした分子構造は現在60以上知られている。また、Fd と Fd 依存酵素 (シアノバクテリアの亜硝酸還元酵素) が天然で連結しているものも見つかり、Fd からの電子分配が、タンパク質濃度という因子によっても制御される新たな可能性を示した。

重要性：近年生体内で、マルチドメインを持つ様々なタンパク質においてスワッピングを行う例が見つかり、酵素活性などの機能制御や病的なアミロイドーシスなどの発症と関連して、その生理的な重要性が指摘されている。しかし、生理的条件下でのスワッピングのメカニズムに迫る詳細なカイネティクスは殆ど調べられておらず、我々が得ている様々な連結様式を持つ Fd-FNR 架橋複合体は、そうしたカイネティクスを詳細に調べる為の格好のモデルとなると考える。

(2) 上記で得られたフェレドキシン (Fd) と Fd-NADP+還元酵素 (FNR)の部位特異的架橋複合体の立体構造と電子伝達効率の知見に基づき、更に目的を特化した架橋複合体をデザイン、作製し、電子伝達機能解析を行った。

Fd と FNR 間の架橋による近接効果と静電的引力の電子伝達能への寄与を調べるため、相互作用変異を持つ Fd と FNR との架橋複合体を作製した。その結果、FNR との  $K_m$  が野生型 Fd と比べて10倍高い相互作用変異 Fd は、FNR と部位特異的架橋することにより野生型架橋複合体の8割まで電子伝達効率が回復することがわかった。

Fd と FNR 間の距離と電子伝達効率の関係を調べるため、様々なリンカーの長さを持つ -SH 基クロスリンカーを用いて部位特異的な架橋複合体を作製した。その結果、リンカー距離が8~18オングストロームの間では電子伝達効率は有意には落ちない、つまり近接効果が保たれる範囲であることがわかった。

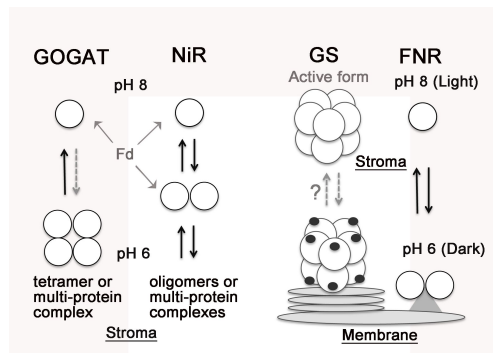
重要性：静電的相互作用の長距離分子間引力に対する影響は、理論上では議論されているものの、実験的な証明はなされていないが、今回の我々の系によってそれを定量的に解析しうると考えられ、その予備的な知識が得られた。更にデザインを精査し単離葉緑体の複合系での電子伝達機能の評価を行いたい。

(3) Fd と種々の Fd 依存酵素群への電子分配を制御する構造因子を見いだす目的で、Fd の酸化還元中心近傍にある保存された幾つかの非荷電アミノ酸残基の種々の変異体を作製して、Fd 依存酵素群との電子伝達活性を調べた。その結果、Fd の Ser43 の様々な変異が電子伝達に与える影響が、FNR と他の依存酵素である亜硫酸還元酵素 (SIR) の間で大きく異なっており、これらの酵素と Fd との電子伝達メカニズムの違いが示唆されると共に、

この Ser43 が電子分配バランスの制御に関与すると考えられた。こうした現象を説明する構造的・物理化学的基盤を調べる為に、NMR による蛋白質間相互作用部位解析と等温滴定量熱測定計 (ITC) を用いた熱力学的解析を行った。その結果、これまで Fd とパートナー蛋白質との結合において重要とされていた静電的相互作用に加え、酸化還元中心近傍の非荷電残基が結合の強さや結合配向の fine-tuning に重要と思われた。そしてこの残基の電子伝達や結合への寄与がパートナー蛋白質によって異なることから、溶媒環境等の状況に応じた電子分配制御の可能性が示唆され、BBA に論文発表した。

重要性：Fd 酸化還元中心近傍の 1 つの非荷電アミノ酸残基が依存酵素群への電子伝達に対して異なる役割を持ち、電子分配制御に関与していることを示した。この領域の他の非荷電残基についても重要な役割を持つことが推測され、同様の解析を要する。

(4)Fd パートナー蛋白質群への電子分配を制御する in vivo でのメカニズムに関する知見を得るため、単離葉緑体におけるパートナー蛋白質群の存在様式解析を行った。葉緑体内で炭酸同化を行うカルビンサイクルの酵素群が可逆的な複合体を形成することが知られており、これらの酵素は光条件に反応して速やかに解離会合して酵素活性のオンオフを行っている。また、近年 FNR では光条件に応じて膜と可溶性画分の間を移動して機能調節されることがわかり、膜画分への移行に関わる相互作用蛋白質の同定を含む詳細な解析がなされている。本研究では Fd パートナー蛋白質を含む 3 つの葉緑体内窒素同化系酵素で、各酵素に特有な高次複合体を形成することと、溶媒条件によりその局在性の変化や解離会合が起きることを見いだした。これらが光条件などの環境変化に反応した窒素同化系酵素の活性制御に関わるメカニズムを提唱し (図) PLOS ONE に論文発表した。



重要性：植物葉緑体内での炭素及び窒素・硫黄同化系代謝が統御される仕組みを、これら酵素群の局在・高次複合体形成といった生理的存在形態とそれらの環境による制御という観点から解析した。今回見いだされた新規

な複合体はその解離会合や局在様式が溶媒条件により変動し、生理的な酵素活性の制御に関与することが示唆された。

今後は、今回見いだされた新規酵素複合体の生理的な機能を探索する目的で、様々な条件変化を施したトウモロコシ葉を用いて酵素複合体の解離会合様式とその局在変化の解析を行い、それらの生理的意義の解明を行う。更にこれら酵素複合体の単離を試み、その蛋白質組成や構造の解明を行いたい。

<引用文献>

- 1) Saitoh T, Ikegami T, Nakayama M, Teshima K, Akutsu H and Hase T (2006) *JBC*, **281**, 10482-88
- 2) Kurisu G, Kusunoki M, Katoh E, Yamazaki T, Teshima K, Onda Y, Kimata-Arigo Y and Hase T (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**: 117-121
- 3) Kimata-Arigo Y, Matsumura T, Kada S, Fujimoto H, Fujita Y, Endo T, Mano J, Sato F, Hase T (2000) *EMBO J.* **19** 5041-50, Kimata Y and Hase T (1989) *Plant Physiol.* **89**, 1193-97, etc.
- 4) Okutani S, Hanke GT, Satomi Y, Takao T, Kurisu G, Suzuki A, Hase T (2005) *Plant Physiol.* **139**, 1451
- 5) Kimata-Arigo Y, Sakakibara Y, Ikegami T and Hase T (2010) *Biochemistry* **49**: 10013-10023
- 6) Maeda M, Lee YH, Ikegami T, Tamura K, Hoshino M, Yamazaki T, Nakayama M, Hase T and Goto Y (2005) Identification of the N- and C- terminal substrate binding segments of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase by NMR. *Biochemistry* **44**:10644-10653.
- 7) Suzuki S, Izumihara K and Hase T (1991) Plastid import and iron-sulfur cluster assembly of photosynthetic and nonphotosynthetic ferredoxin isoproteins in maize. *Plant Physiol.* **97**, 375-80
- 8) Hanke GT. and Hase T. (2008) Variable photosynthetic roles of two leaf type ferredoxins in Arabidopsis, as revealed by RNA interference. *Photochem. Photobiol.* **84**, 1302-1309

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 3 件)

1. Misaki Kinoshita, Ju yaen Kim, Satoshi Kume, Yukiko Sakakibara, Toshihiko Sugiki, Chojiro Kojima, Genji Kurisu, Takahisa Ikegami, Toshiharu Hase, Yoko Kimata-Arigo, Young-Ho Lee, Physicochemical natures of interfaces control activity of ferredoxin NADP<sup>+</sup> reductase through

its interprotein interactions with ferredoxin, BBA - Bioenergetics, 査読有、2015, in press

2. Yoko Kimata-Ariga, Toshiharu Hase, Multiple complexes of nitrogen assimilatory enzymes in spinach chloroplasts: possible mechanisms for the regulation of enzyme function. PLOS ONE, 査読有、2014, 9 (10):e108965, DOI:10.1371/journal.pone.0108965
3. Yoko Kimata-Ariga, Hisako Kubota-Kawai, Young-Ho Lee, Norifumi Muraki, Takahisa Ikegami, Genji Kurisu, Toshiharu Hase, Concentration-dependent oligomerization of cross-linked complexes between ferredoxin and ferredoxin-NADP+ reductase, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有、2013, 434:867-872, DOI:10.1016/j.bbrc.2013.04.033

〔学会発表〕(計4件)

1. 有賀(木股)洋子、長谷俊治、葉緑体における窒素同化系酵素群の高分子量複合体形成とそのダイナミクス、日本生化学会大会、2014年10月15-18日、国立京都国際会館(京都市)
2. 木下岬、李映昊、後藤祐児、長谷俊治、有賀(木股)洋子、Ferredoxin と ferredoxin-NADP+ reductase の複合体形成における疎水性相互作用の役割、日本生化学会大会、2014年10月15-18日、国立京都国際会館(京都市)
3. 木下岬、有賀(木股)洋子、榊原由紀子、長谷俊治、フェレドキシンとその依存酵素 SiR と FNR への電子伝達様式の差異を生み出す 43Ser の 1 アミノ酸置換による解析、日本生化学会大会、2012年12月15日、福岡国際会議場(福岡県)
4. 有賀洋子、久保田 寿子、村木則文、李 映昊、栗須源嗣、長谷俊治、Fd-FNR クロスリンク複合体の構造と電子伝達機能の解析、日本生化学会大会、2011年9月22日、国立京都国際会館(京都府、京都市)

〔その他〕

ホームページ等

[http://jglobal.jst.go.jp/detail.php?JGL\\_OBAL\\_ID=200901024571319432&from=sangaku\\_plaza](http://jglobal.jst.go.jp/detail.php?JGL_OBAL_ID=200901024571319432&from=sangaku_plaza)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

有賀 洋子(木股 洋子)(ARIGA, Yoko)  
大阪大学・蛋白質研究所・助教  
研究者番号: 60255429

### (2) 研究分担者

長谷 俊治(HASE, Toshiharu)  
大阪大学・蛋白質研究所・教授  
研究者番号: 00127276

### (3) 連携研究者

栗栖 源嗣(KURISU, Genji)  
大阪大学・蛋白質研究所・教授  
研究者番号: 90294131

### (4) 研究協力者(大学院生)

木下 岬(KINOSHITA, Misaki)