

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06524

研究課題名(和文) 高精密結晶構造解析による光合成電子伝達メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of photosynthetic electron transfer mechanism by ultra-high resolution x-ray structural analysis.

研究代表者

田中 秀明 (Tanaka, Hideaki)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：40346169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では電子伝達タンパク質フェレドキシン(Fd)とそのパートナータンパク質であるFNRをターゲットとして、両者の酸化還元状態に留意した超高分解能X線結晶構造解析と中性子結晶構造解析に取り組んだ。FdおよびFNRの酸化型結晶については、複数の結晶を用いてX線照射量が0.1MGyになるようにして高分解能回折強度データを収集することに成功した。Fdについては還元型の超高分解能回折強度データも収集することにも成功した。さらに、酸化型FNRの中性子結晶構造解析の実験では、J-PARCで中性子回折強度データをフルセット収集することに成功し、構造解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本来、電子伝達複合体は酸化還元により解離・会合するのが活性型である。本研究では、FdとFNRについて酸化還元状態に留意した構造解析(酸化型Fd、還元型Fd、酸化型FNR、還元型FNR)を進めてきた。これらの構造を水素原子の位置も含めて決定することで、実験の都合で無視されてきた、酸化還元状態と水素原子の構造を正確に記述することができ、アミノ酸だけでは議論することができなかった新規情報を提供することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we targeted the electron transfer protein ferredoxin (Fd) and its partner protein FNR, and worked on ultra-high resolution X-ray crystallography and neutron crystallography, paying attention to their redox states. For the oxide-type crystals of Fd and FNR, ultra-high resolution diffraction intensity data were successfully collected using multiple crystals with an X-ray irradiation of 0.1 MGy. For Fd, we also succeeded in collecting ultra-high resolution diffraction intensity data for the reduced form. Furthermore, in the experiment of neutron crystallography of oxidized FNR, a full set of neutron diffraction intensity data was successfully collected at J-PARC, and the structural analysis is in progress.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 中性子結晶構造解析 光合成電子伝達 フェレドキシン 精密構造解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光合成電子伝達系において、PS1 および PS2 で光励起された電子は、最終的に[2Fe-2S]クラスターを酸化還元中心にもつ電子伝達蛋白質 Fd へと伝えられる。電子を受け取った Fd は種々の Fd 依存レドックス代謝酵素と結合して電子伝達を行う。Fd から最も電子が伝達される酵素は FNR で、伝達されにくい酵素としてはヒドロゲナーゼ (HydA) が挙げられる。これまで、Fd 変異体を用いた相互作用実験から、種々の Fd 依存酵素は、それぞれ Fd の異なったアミノ酸残基を認識することが分かっている。依存酵素の種類によって Fd との電子伝達複合体の形成が個別的事実であることは、各レドックス代謝系への還元力分配の人工改変を目指す上で、構造レベルでの知見が必須であることを示唆している。我々の研究室では、Fd と様々な Fd 依存酵素複合体の構造研究・相互作用解析に取り組んできた。また、2018 年には光合成電子伝達系の末端にあり、光エネルギーを用いて Fd に電子を受け渡す膜タンパク質複合体 PS1 と Fd の複合体を 4.2 分解能で構造決定することに成功し、PS1 と Fd の相互作用様式を明らかにした (*Nature Plants* 4, 218-224, 2018)。国内外の他グループからも Fd-チオレドキシ還元酵素や HydA1 と Fd との相互作用解析が報告されており、蓄積してきた構造情報から、複合体形成様式についてアミノ酸レベルでの理解は深まってきたが、遺伝子組換えによって電子伝達効率を人工的に設計できる迄には至っていない。その原因として次の二つの問題点が考えられる。(1) これまで構造解析が試みられてきたのは、全て酸化型 Fd と酸化型酵素とで形成した非生理ペアであったという点。(2) もう一つは、X 線解析の技術的制約から、H⁺や H⁻を受け渡すフラビン廻りの構造変化、Fd の FeS クラスター廻りの NH₂・・・S 水素結合の再配置など、水素原子のレドックス状態に応じた構造情報を、ほとんど無視した形で構造研究が進められてきた点である。

2. 研究の目的

本研究では、まずは電子伝達タンパク質 Fd とそのパートナータンパク質である FNR について放射線損傷を考慮しながら X 線回折強度データを収集することで、酸化型および還元型 Fd、FNR の超高分解能結晶構造解析を目指す。また、各タンパク質について水素を含めた全原子座標の決定を目指し、中性子結晶構造解析にも取り組む。これら 2 つが完了したら、酸化型 Fd (Fd_{oxi}) を模した金属置換 Fd (GaFd) や還元型 Fd (Fd_{red}) を模した Fd 変異体 (S46G 変異体) を用いることで、電子伝達複合体を Productive な複合体状態で固定した状態で結晶化し、水素原子の位置を含めた構造を正確に検証することで、光合成電子伝達にリンクしたレドックス代謝反応の完全理解を目指す。最終的には、Fd が最もよく電子を渡す相手である FNR との複合体について、Fd が FNR に電子を渡す直前 (Fd_{red}-FNR_{oxi} 複合体) と渡した直後 (Fd_{oxi}-FNR_{red} 複合体) の構造を X 線と中性子を用いたハイブリッド構造解析によって決定し、アミノ酸レベルでは理解が難しかった電子の伝達や逆流防止メカニズムを水素原子も含めた全ての原子位置を基に理解し、関連研究に新風をもたらすことを目的とする。

3. 研究の方法

Fd や FNR のような電子伝達に関与するタンパク質はレドックス状態に応じて微細な構造変化を起こすことで電子伝達がスムーズに行えるような制御を行っている。したがって、超精密構造解析によってレドックス状態による微細な構造変化を捉えることが、Fd による電子伝達機構を真に理解するためには必要不可欠である。超精密構造解析をする上で無視することができないのが、X 線照射による損傷で起こるタンパク質の還元である。これまで、超高分解能の X 線回折強度データを得るためには、より質の高い結晶 (タンパク質が結晶中で精度良く並び、多くの回折点を示す結晶) を得て、より強い X 線をより長時間露光することが一般的であった。しかし、近年の研究で過剰な X 線照射による損傷がタンパク質の構造を変化させることが知られるようになり、これまでに得られている Fd や FNR の構造は全て酸化型と還元型が混ざった状態であると考えられている。したがって、まずは顕微分光を用いてタンパク質結晶のレドックス状態を確認し、最適な X 線照射量を見積る。その後、過剰な X 線照射による還元をなるべく抑えた条件で酸化型タンパク質 (Fd_{oxi} および FNR_{oxi}) の X 線回折強度データを収集し、構造解析と精密化を進める。還元型タンパク質 (Fd_{red} および FNR_{red}) については、ジチオナイトで還元した結晶を用いて X 線回折強度データを収集する。

中性子回折実験は、J-PARC・MLF に設置されている茨城県生命物質構造解析装置 (iBIX) を用いて行う。中性子線はフラックス数が低いため、回折強度が低くなる。そのため、最低でも 1mm³ を越えるサイズの結晶を準備する必要がある。各単体についての解析が終わったら、活性型電子伝達複合体の解析にも取り込む。

4. 研究成果

まず、顕微分光を用いてタンパク質結晶の酸化還元状態を確認した。SPring-8 の BL26XU にて結晶に X 線を照射した後、再び吸収スペクトルを測定するという作業を繰り返すことで、X 線の照射量と吸収スペクトルの関係を確認した。Fd と FNR の結晶は共に X 線照射量の増加に伴

って補欠分子である鉄-硫黄クラスタや FAD 由来の吸収スペクトル (460nm、490nm) が減少し、X線損傷により還元が起こることが明らかになった(図1)。どちらの結晶も数 MGy 程度のX線照射量で結晶中のタンパク質の大半が還元してしまうことから、超精密結晶構造解析を成し遂げるためには、顕微分光の結果に基づいて、複数の結晶を用いてできる限り放射線損傷の無い状態で超高分解能の回折強度データ収集を目指す必要があることが分かった (*J. Biochem.* **167**, 549–555(2020))。よって、この結果に基づいて放射線損傷による還元を出来る限り抑えたX線回折強度データの収集と構造解析を進めているところである。

また、X線と中性子を用いたハイブリッド構造解析についても取り組んだ。Fd に関しては十分な大きさの結晶が得られていないので、結晶化条件の最適化を継続して進めている。FNR については、3-5mm³ の十分な大きさの結晶が得られたので(図2)、結晶を重水置換した後に液体窒素で凍結し、J-PARC・MLF に設置されている茨城県生命物質構造解析装置(iBIX)を用いて中性子回折強度データの収集を行った。その結果、1.8 分解能のフルセットデータを得ることができた。その後、同じ結晶を用いて SPring-8 の BL44XU にてX線回折強度データも収集し、現在はX線と中性子のデータを用いたジョイントリファインメントによる解析を進めている。

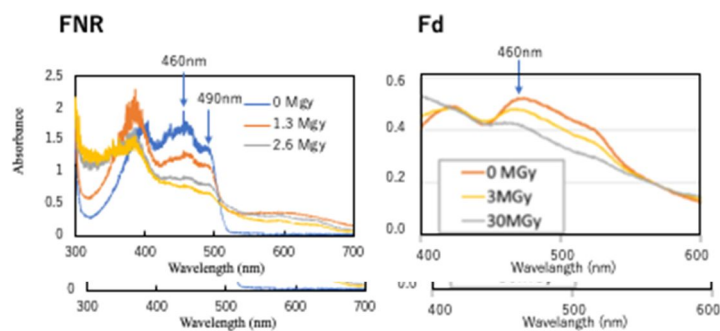


図1. 顕微分光による結晶の吸収スペクトル変化

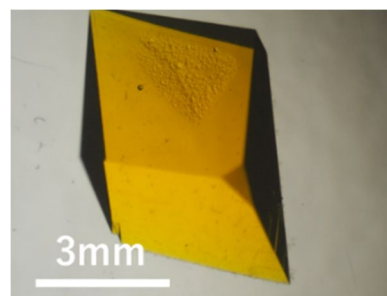


図2 . FNR の巨大結晶

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ohnishi Y, Muraki N, Kiyota D, Okumura H, Baba S, Kawano Y, Kumasaka T, Tanaka H, Kurisu G.	4. 巻 167
2. 論文標題 X-ray dose-dependent structural changes of the [2Fe-2S] ferredoxin from <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 549-555
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvaa045.	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8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中秀明
2. 発表標題 フェレドキシンによる電子伝達メカニズムの解明を目指して
3. 学会等名 2020年度第1回 iBIX研究会（主催：茨城件中性子利用研究会）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中秀明
2. 発表標題 精密構造解析による光合成電子伝達メカニズムの解明
3. 学会等名 原子分解能ホログラフィー・不規則系機能性材料合同研究会（主催：SPRUC原子分解能ホログラフィー研究会、不規則系機能性材料合同研究会）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大西裕介、田中秀明、栗栖源嗣
2. 発表標題 植物型フェレドキシンの酸化還元に伴う構造変化とその役割
3. 学会等名 令和2年度日本結晶学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 L.Juniar, H. Tanaka, K. Yoshida, T.Hisabori and G. Kurisu,
2. 発表標題 Structure basis for Thioredoxin isoform-based fine tuning of Ferredoxin-Thioredoxin Reductase activity.
3. 学会等名 令和2年度日本結晶学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東田怜、田中秀明、武藤梨沙、張旭紅、李映昊、小沼剛、池上貴久、右田たい子、栗栖源嗣
2. 発表標題 高等植物型ヘムオキシゲナーゼの構造・相互作用解析
3. 学会等名 令和2年度日本結晶学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中秀明、濱岡紀之、三角裕子、金宙妍、小沼剛、池上貴久、Engel Benjamin D.、Nowaczyc marc M.、栗栖源嗣
2. 発表標題 NDH様複合体とフェレドキシンの相互作用機構の解明
3. 学会等名 日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東田怜、田中秀明、武藤梨沙、右田たい子、栗栖源嗣
2. 発表標題 ダイズ由来植物型ヘムオキシゲナーゼ1の構造解析
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西裕介、田中秀明、奥村英夫、馬場清喜、河野能顕、熊坂崇、栗栖源嗣
2. 発表標題 藍藻由来フェレドキシンの[2Fe-2S]クラスター還元起因する構造変化の段階的可視化
3. 学会等名 日本放射光学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 田中秀明、栗栖源嗣	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 348-352
3. 書名 生体の科学 「環境変化に応じて光化学系Iが形成する様々な超複合体の構造」	

〔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