

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790029  
 研究課題名 (和文) 相互作用に基づく光合成明反応膜蛋白質と電子輸送蛋白質の高効率電子輸送機構の解明  
 研究課題名 (英文) Structural elucidation of the efficient electron transport between photosynthetic membrane proteins and electron carrier  
 研究代表者  
 上田 卓見 (UEDA TAKUMI)  
 東京大学・大学院薬学系研究科・助教  
 研究者番号：20451859

## 研究成果の概要 (和文)：

プラストシアニン (Pc) は、膜蛋白質複合体である光化学系 I (PSI) に素早く電子を輸送することにより、光合成明反応を効率良く進めている。本研究では、酸化型アナログであるカドミウム置換体 (Cd-Pc) の調製法を確立して、当研究室で確立した転移交差飽和法 (TCS) を用いて、Cd-Pc の PSI 結合部位を同定した。その結果、Pc 上の銅原子の酸化に伴って、Loop1 のコンフォメーションが変化することにより、Loop1 を介した PSI との相互作用が減弱し、電子移動後の PSI からの素早い解離が実現され、効率的電子輸送反応が起こることが明らかとなった。

## 研究成果の概要 (英文)：

Plastocyanin (Pc) efficiently proceeds the photosynthetic light reaction by rapidly transport an electron to photosystem I (PSI). In this study, we successfully prepared cadmium-substituted spinach Pc (Cd-Pc), and determined its PSI-binding site by transferred cross-saturation (TCS) experiments. Our study revealed that oxidation of the copper ion on Pc resulted in conformational change in loop 1, which causes reduction of the affinity between Pc and PSI, and the reduction of the affinity would enable the rapid dissociation of Pc from PSI, which is important for the efficient electron transport.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学：物理系薬学

キーワード：構造生物学、生化学、膜タンパク質、核磁気共鳴法、光合成反応、タンパク質-タンパク質相互作用、電子移動反応、転移交差飽和法

### 1. 研究開始当初の背景

光合成明反応の一部を形成する、プラストシアニンから光化学系 I への電子輸送反応の効率は、植物の生育に直接影響することが示唆されている。したがって、その電子輸送機構の解明は、有益な植物の生育を促進する方法を確立する上で重要である。

還元型のプラストシアニンが光化学系 I に電子を渡して酸化型になると、光化学系 I への親和性が 10 倍程度低くなることが示されている。このことは、プラストシアニンが電子を光化学系 I に渡した後に、素早く解離することにより、次のプラストシアニン分子が迅速に結合することを可能として、その結果、全体として電子輸送を効率よく行うことを可能としていると考えられる。

プラストシアニンの光化学系 I への親和性が酸化型と還元型で異なる機構を解明するためには、酸化型と還元型のプラストシアニンにおける、光化学系 I との相互作用様式を、原子レベルで比較する必要がある。このような知見の獲得には、X線結晶構造解析やNMRなどの構造生物学的手法が有効である。しかし、光化学系 I は高分子量膜蛋白質複合体である上、複合体の寿命は短いため、これらの手法の適用には限界がある。

近年、申請者の所属する研究室は、巨大分子量を有する受容体に対する、リガンド蛋白質中の結合界面を NMR を用いて同定する、「転移交差飽和法」を開発した。転移交差飽和法は、光化学系 I とプラストシアニンの複合体のような、巨大かつ短寿命の複合体にも適用可能である。したがって、転移交差飽和法を適用して、還元型および酸化型プラストシアニンにおける光化学系 I との結合界面を同定し、両者を比較することにより、酸化型と還元型のプラストシアニンにおける、光化学系 I との結合様式の違いを解明することが可能となることが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、転移交差飽和法を用いて、還元型および酸化型プラストシアニンの光化学系 I との結合界面を同定して、両者の光化学系 I 結合様式の違いを明らかにすることにより、プラストシアニンから光化学系 I へ効率よく電子が輸送される機構を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

- (1) プラストシアニンを酸化型に均一化する方法を確立する。
- (2) 酸化型プラストシアニンアナログである、カドミウム置換体の調製法を確立する。
- (3) 酸化型プラストシアニン、カドミウム置換体の主鎖 NMR シグナルを帰属する。
- (4) 還元型、カドミウム置換体、および酸化型プラストシアニンと、光化学系 I ミセルを用いた転移交差飽和実験により、光化学系 I 結合界面を同定する。
- (5) (4)の結果を比較することにより、酸化型プラストシアニンと還元型プラストシアニンの光化学系 I 結合様式の違いを決定する。

### 4. 研究成果

最初に、Pc を酸化型に均一化する方法ならびにカドミウム置換 Pc 調製法の確立を行った。NMR 解析に通常使用されるリン酸バッファでは、フェリシアン化カリウム添加により Pc を酸化しても、約半日後に還元型 Pc が出現した。そこで、バッファ条件を検討した結果、Bis-Tris バッファを用いることにより、1 日以上 Pc を酸化型に均一化することに成功した。また、先行論文 (Eur. J. Biochem. (1996) 242, 132-147) にしたがってカドミウム置換 Pc を調製して、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定した。その結果、構造をとっていない Pc の混入が認められた。そこで、精製法を検討した結果、陰イオン交換クロマトグラフィーにより、カドミウム置換 Pc を単離することに成功した。そこで次に、 $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$

均一標識を施した酸化型 Pc ならびにカドミウム置換 Pc を調製し、三重共鳴実験に基づく NMR シグナルの連鎖帰属を行った。さらに、 $[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$  標識カドミウム置換 Pc を、ミリグラム単位で調製することに成功した。

調製法を確立した  $[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$  標識 Cd-Pc と可溶化 PSI を混合して、TCS 実験を行った。カドミウム置換 Pc と可溶化 PSI の量比や測定温度、ラジオ波照射時間を最適化した結果、N32, E59, E60, N64, H87, Q88, A90, G91 のシグナルに、ラジオ波照射に伴う有意な強度減少が観測され、PSI との結合界面であることが示された。還元型 Pc の PSI 結合界面と比較すると、Loop1 上の G10, S11, L12 が結合界面となっていない点と、acidic patch 上の E59, E60 が結合界面に含まれている点が異なっていた。次に、 $[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$  標識酸化型 Pc と可溶化 PSI を混合して、TCS 実験を行った。その結果、常磁性緩和増大のため、銅イオン近傍のシグナルの大部分は観測されなかったが、N64 に有意な強度減少が観測されたことから、Cd-Pc は酸化型 Pc と同様の結合様式を保持していると考えた。以上の結果および先行論文で報告されている非結合状態の還元型・酸化型 Pc の立体構造の比較から、Pc に配位している金属の電荷の増大に伴って、金属原子と H87 の距離が小さくなることにより、近傍の L12 との相互作用が変化して、Loop1 のコンフォメーションが変化することにより、Loop1 を介した PSI との相互作用が減弱し、電子移動後の PSI からの素早い解離が実現され、効率的電子輸送反応が起こると考えた。

#### 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 5 件)

① Masahiko Matsumoto, Takumi Ueda, Ichio Shimada, theoretical analyses of the transferred cross-saturation method, *J. Magn. Reson.* (2010), 査読有, in press.

② Chie Yoshiura, Yutaka Kofuku, Takumi Ueda, Yoko Mase, Mariko Yokogawa, Masanori Osawa, Yuya Terashima, Kouji Matsushima, Ichio Shimada, NMR analyses of the interaction between CCR5 and its ligand using functional reconstitution of CCR5 in lipid bilayers, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, Vol. 132 (2010),

pp. 6768-77

③ Yutaka Kofuku, Chie Yoshiura, Takumi Ueda, Hiroaki Terasawa, Takahiro Hirai, Sae Tominaga, Masako Hirose, Yoshitake Maeda, Hideo Takahashi, Yuya Terashima, Kouji Matsushima, Ichio Shimada, Structural basis of the interaction between chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 and its G-protein-coupled receptor CXCR4, *J. Biol. Chem.*, 査読有, Vol. 284 (2009), pp. 35240-35250

④ Toshihiko Sugiki, Yutaka Kofuku, Takumi Ueda, Ichio Shimada, Hideo Takahashi, High-throughput screening of optimal solution conditions for structural biological studies by fluorescence correlation spectroscopy., *Protein Science*, 査読有, Vol. 18 (2009), pp. 1115-1120

⑤ Ichio Shimada, Takumi Ueda, Masahiko Matsumoto, Masayoshi Sakakura, Masanori Osawa, Koh Takeuchi, Noritaka Nishida, Hideo Takahashi, Cross-saturation and transferred cross-saturation experiments, *Prog. Nuc. Mag. Res. Spectroscopy*, 査読有, Vol. 54 (2008), pp.123-140

[学会発表] (計 7 件)

① 富永 紗衣, TCS 法を用いた COPI 小胞形成機構の解明, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 9 日~12 日, パシフィコ横浜

② 湊 雄一, 細菌の走化性における膜外から膜内へのシグナル伝達機構の構造生物学的解明, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 9 日~12 日, パシフィコ横浜

③ 古我 征道, プラストシアニンと光合成膜反応膜蛋白質の高効率電子輸送機構の構造生物学的解明, 第 48 回 NMR 討論会, 2009 年 11 月 10 日~12 日, 九州大学馬出病院キャンパス医学部百年講堂 (福岡)

④ 吉浦 知絵, CCR5-リガンド間相互作用に関する構造生物学的解析, 第 48 回 NMR 討論会, 2009 年 11 月 10 日~12 日, 九州大学馬出病院キャンパス医学部百年講堂 (福岡)

⑤ 幸福 裕, NMR 法を用いたケモカイン SDF-1/CXCL12 とケモカイン受容体 CXCR4 との相互作用様式の解明, 第 82 会日本生化学会大会, 2009 年 10 月 21 日~24 日, 神戸ポートアイランド(神戸)

⑥ 町山 麻子, 膜貫通受容体 Chemoreceptor から細胞内キナーゼ CheA へのシグナル伝達機構の構造生物学的解明, 第 82 会日本生化学会大会, 2009 年 10 月 21 日~24 日, 神戸ポートアイランド(神戸)

⑦ Naoko Nomoto, Structural elucidation of the recognition mechanism of

photosystem I and ferredoxin by  
transferred cross-saturation method,  
XXIIIrd ICMRBS, 2008.8.24-29, San Diego

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 卓見 (UEDA TAKUMI)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：20451709

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者