

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02417

研究課題名(和文)酸化還元状態に厳密に留意した植物型Fdと光合成蛋白質との複合体構造解析

研究課題名(英文)Structural analysis of the complex between Fd and Fd-dependent proteins considering their redox states strictly

研究代表者

栗栖 源嗣(Kurusu, Genji)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：90294131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では過渡的に形成する電子伝達複合体を対象に3つの項目で研究を遂行した。1) 緑藻型光化学系I複合体(PS1:LHC1)とGa置換Fdとの複合体については、3状態での構造解析を行いGa置換Fdの結合前と後での構造変化やサブユニットの結合・解離について新しい発見があった。2) シアノバクテリア型光化学系I(PS1)とGa置換Fdとの複合体構造の高分解能化、については当初の目論見通り1.97Åという非常に高分解能での解析に成功した。3) 還元状態にしたNative Fdと配位子置換再構成HydA1(odt型)との複合体構造解析については、技術的な困難もあり構造解析には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高度化してきた再構成金属タンパク質の活用をベースに、原理的に不可能と考えられてきた「酸化型」と「還元型」とで形成する活性型複合体の精密構造解析を行った。具体的には、2種類の光化学系IとFdとの構造解析を高分解能で行い、構造決定が待たれている緑藻型のFd依存性[FeFe]ヒドロゲナーゼの構造解析にも同様の方法を展開した。前者については、想定通りの結果を得て論文発表を行ったが、緑藻型[FeFe]ヒドロゲナーゼについては結晶化することができなかった。結晶化不要のCryo-EMに切り替えて活性型構造解析を展開している。本研究により、Redox状態を厳密にコントロールすることの重要性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, I have investigated the electron-transfer complexes formed transiently in three pairs: 1) the structure of photosystem I complex (PS1: LHC1) with Ga-substituted Fd from Green Alga was analyzed in three states, and new findings were made on the structural changes and dissociation of the new subunits from the PS1 upon binding of Ga-substituted Fd. 2) For the structural analysis of cyanobacterial photosystem I (PS1) complexed with Ga-substituted Fd, we succeeded in obtaining a very high resolution of 1.97 Å, as initially expected. 3) For the structural analysis of the complex of Native Fd in the reduced state and reconstituted permanently oxidized HydA1 (odt type) was not completed due to technical difficulties in obtaining the suitable crystals for X-ray analysis.

研究分野：構造生物化学

キーワード：構造生物学 光合成 電子伝達 金属蛋白質 レドックス代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究は、原理的に不可能と考えられてきた活性複合体 (Productive Complex) の構造解析を“活性は保持しないが構造は同じ再構成タンパク質”を用いて可能にしようとする非常にユニークな構造研究である。金属置換酵素の利用は構造解析以外にも展開可能で、Flash absorption spectroscopy を用いた kinetics 解析や (Migné, C. et al., Photosynth. Res., 2017, Sétif, P., et al., Biochim. Biophys. Acta Bioenerg 2017) 光合成活性の有無を評価する試薬として海外を含めた複数の研究グループから高純度試料の分与依頼があり有用性が高く評価されていた。研究開始当初、結晶化レベルの純度で金属置換酵素を提供できる研究室はなく、研究代表者のグループの優位性を確保して研究を遂行することが可能であった。

2. 研究の目的

葉緑体内のレドックス代謝反応の多くは、電子伝達タンパク質フェレドキシン (Fd) に依存して駆動される。しかし、Fd とレドックス代謝酵素の複合体形成は過渡的で、酵素反応が進行すると複合体は解離してしまう。そのため構造解析には困難と妥協が伴った。研究代表者は、自身のこれまでの研究の蓄積から Fd の酸化還元状態は比較的小さな構造変化であっても、過渡的複合体形成を考える上では非常に重大であると考えに至った。そこで、高度化してきた再構成金属タンパク質の活用をベースに、原理的に不可能と考えられてきた「酸化型」と「還元型」とで形成する活性型複合体の精密構造解析を行うこととした。具体的には、2 種類の光化学系 I と Fd との構造解析を高分解能で行い、並行して、構造決定が待たれている緑藻型の Fd 依存性 [FeFe] ヒドロゲナーゼの構造解析にも同様の方法を展開して“だから判らなかつたのか!”という新規情報を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

具体的に、(1) 緑藻型光化学系 I 複合体 (PSI : LHC1) と Ga 置換 Fd との複合体構造解析、(2) シアノバクテリア型光化学系 I (PS1) と Ga 置換 Fd との複合体構造の高分解能化、(3) 還元状態にした Native Fd と配位子置換再構成 HydA1 (odt 型) との複合体構造解析の 3 つの構造解析を進める。酸化還元状態を固定する努力を最大限に行った上で、X 線による還元を考慮して構造解析を行う。

4. 研究成果

(1) 緑藻型光化学系 I 複合体 (PSI : LHC1) と Ga 置換 Fd との複合体構造解析

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を強光状態で培養しステート遷移状態を固定し、チラコイド膜ルーメンが酸性化した状態の膜から pH の異なる精製条件で 2 種類の光化学系 I 複合体を調製した。この光化学系 I に電子伝達蛋白質フェレドキシンを添加し、フェレドキシン添加前後の構造変化を X 線結晶解析とクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析により解析した (図 1)。その結果、フェレドキシンの結合が可溶性の結合蛋白質の光化学系 I への結合を制御する新しい活性調節メカニズムを提唱することができた。¹

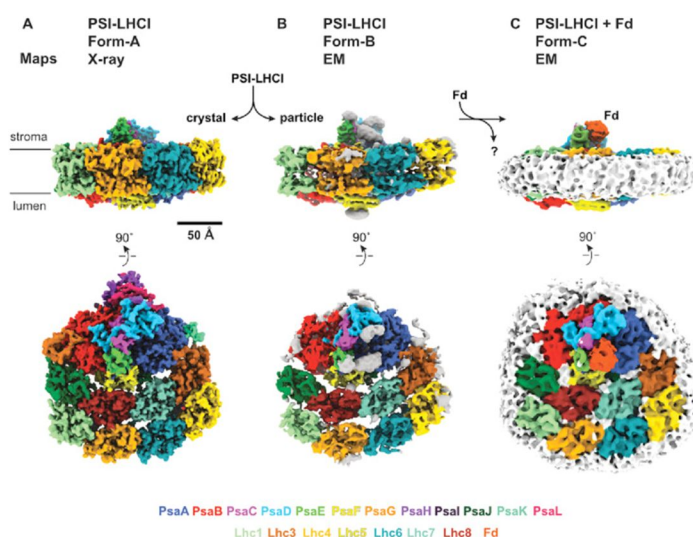


図 1. 光環境状況の異なる 3 種類の光化学系 I 複合体の X 線 (A) およびクライオ EM 構造 (B, C)

(2) シアノバクテリア型光化学系 I (PSI) と Ga 置換 Fd との複合体構造の高分解能化

電子伝達に伴う機能的構造変化や、効率的な電子伝達機構を明らかにする目的で、好熱性シアノバクテリア PSI と電子受容体である Fd および電子供与体であるシトクロム c6 (Cyt c6) を結合した三重複合体の構造解析に挑戦した。各電子伝達蛋白質の酸化還元状態に留意した試料調整を行い、PSI:Fd:Cyt c6 の三重複合体の Cryo-EM 構造を 1.97 Å 分解能で構造解析することに成功した(図2)。側鎖の構造変化や、水分子を介した相互作用までも可視化することができ、特に PSI と Fd とで ITC 測定を併用することで、複合体形成がエントロピー駆動型であることを明らかにすることができた。²

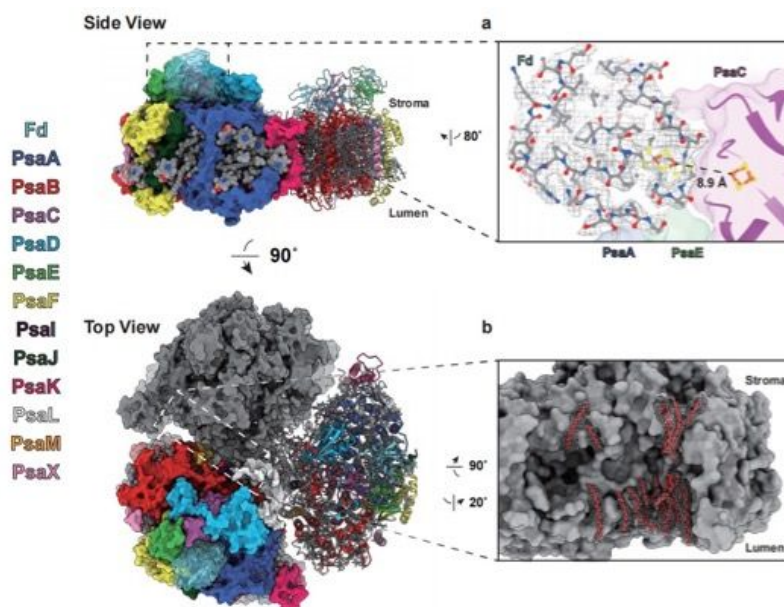


図2. PSI と Fd , Cyt c6 の三重複合体の Cryo-EM 構

(3) 還元状態にした Native Fd と配位子置換再構成 HydA1 (odt 型) との複合体構造解析

緑藻型[FeFe]ヒドロゲナーゼ (HYDA1) については、ホ口型を結晶化してもアポ型の結晶になってしまうという課題があり、ホ口型 HYDA1 の構造を解析することができなかった。そこで、結晶化の際にホ口型 HYDA1 から鉄硫黄クラスター (odt) が脱離してしまう原因を解明することを目指した実験を実施した。結晶が析出する前にアポ型に変換してしまう場合は、pH や沈殿剤濃度の変化が odt 脱離の原因と考えられるため、溶液条件を最適化し結晶を再び odt にソーキングすることでホ口型の結晶を作り出せる可能性があると考えた。一方で、結晶化 (パッキング) 自体が原因となってアポ型に変換されてしまう場合は、結晶解析ができないため代替案として結晶化を必要としないクライオ電子顕微鏡によって構造を明らかにする必要があるとも考えた。アポ型になってしまう理由は厳密には特定できなかったが、酸素耐性をもつ[FeFe]ヒドロゲナーゼ(図3:CbA5H)の活性型の立体構造をクライオ電子顕微鏡をもちいて 2.21 Å 分解能で決定することには成功した。新しく Zn 結合ドメインを同定し、酸素耐性をもたらす分子メカニズムを構造に基づいて議論することができた(論文投稿中)。

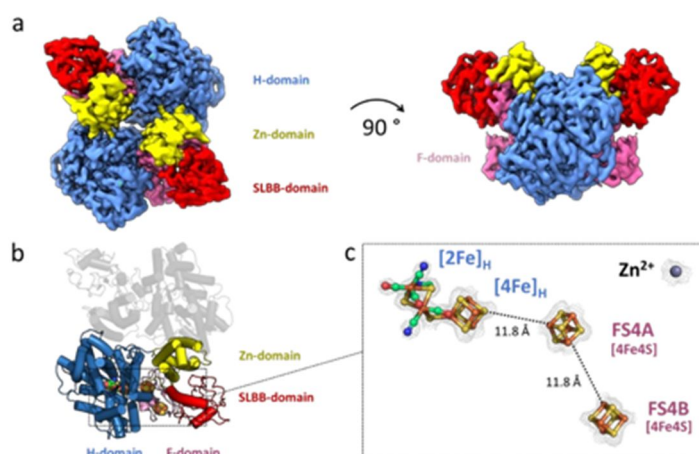


図3. クライオ電子顕微鏡で構造解析した CbA5H

<引用文献>

- Three structures of PSI-LHCI from *Chlamydomonas reinhardtii* suggest a resting state re-activated by ferredoxin.
Gerle C, Misumi Y, Kawamoto A, Tanaka H, Kubota-Kawai H, Tokutsu R, Kim E, Chorev D, Abe K, Robinson CV, Mitsuoka K, Minagawa J, Kurisu G. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* **2023** 1864:148986. doi: 10.1016/j.bbabi.2023.148986.
- Structure of cyanobacterial photosystem I complexed with ferredoxin at 1.97 Å resolution.
Li J, Hamaoka N, Makino F, Kawamoto A, Lin Y, Rögner M, Nowaczyk MM, Lee YH, Namba K, Gerle C, Kurisu G. *Commun Biol.* **2022** 5:951. doi: 10.1038/s42003-022-03926-4.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Zakharov Stanislav D., Savikhin Sergei, Misumi Yuko, Kurisu Genji, Cramer William A.	4. 巻 121
2. 論文標題 Isothermal titration calorimetry of membrane protein interactions: FNR and the cytochrome b6f complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 300 ~ 308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2021.12.014	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 該当する
1. 著者名 Kondo Toru, Mutoh Risa, Arai Shun, Kurisu Genji, Oh-oka Hirozo, Fujiyoshi Satoru, Matsushita Michio	4. 巻 156
2. 論文標題 Energy transfer fluctuation observed by single-molecule spectroscopy of red-shifted bacteriochlorophyll in the homodimeric photosynthetic reaction center	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 105102 ~ 105102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0077290	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 -
1. 著者名 Gerle Christoph, Kishikawa Jun-ichi, Yamaguchi Tomoko, Nakanishi Atsuko, Coruh Orkun, Makino Fumiaki, Miyata Tomoko, Kawamoto Akihiro, Yokoyama Ken, Namba Keiichi, Kurisu Genji, Kato Takayuki	4. 巻 71
2. 論文標題 Structures of multisubunit membrane complexes with the CRYO ARM 200	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 249 ~ 261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfac037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Dey Debayan, Nishijima Masayoshi, Tanaka Ryouichi, Kurisu Genji, Tanaka Hideaki, Ito Hisashi	4. 巻 31
2. 論文標題 Crystal structure and reaction mechanism of a bacterial Mg dechelataase homolog from the Chloroflexi Anaerolineae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 e4430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.4430	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 -

1. 著者名 Nakayoshi Tomoki, Ohnishi Yusuke, Tanaka Hideaki, Kurisu Genji, Kondo Hiroko X., Takano Yu	4. 巻 23
2. 論文標題 Effects of Active-Center Reduction of Plant-Type Ferredoxin on Its Structure and Dynamics: Computational Analysis Using Molecular Dynamics Simulations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 15913 ~ 15913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232415913	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Seki Soichiro, Nakaniwa Tetsuko, Castro-Hartmann Pablo, Sader Kasim, Kawamoto Akihiro, Tanaka Hideaki, Qian Pu, Kurisu Genji, Fujii Ritsuko	4. 巻 2
2. 論文標題 Structural insights into blue-green light utilization by marine green algal light harvesting complex II at 2.78 Å	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BBA Advances	6. 最初と最後の頁 100064 ~ 100064
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadv.2022.100064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Li Jiannan, Hamaoka Noriyuki, Makino Fumiaki, Kawamoto Akihiro, Lin Yuxi, Roegner Matthias, Nowaczyk Marc M., Lee Young-Ho, Namba Keiichi, Gerle Christoph, Kurisu Genji	4. 巻 5
2. 論文標題 Structure of cyanobacterial photosystem I complexed with ferredoxin at 1.97 Å resolution	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03926-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ko Seolmin, Toda Akiyuki, Tanaka Hideaki, Yu Jian, Kurisu Genji	4. 巻 597
2. 論文標題 Crystal structure of the stalk region of axonemal inner arm dynein d reveals unique features in the coiled coil and microtubule binding domain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2149 ~ 2160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14690	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Gerle Christoph, Misumi Yuko, Kawamoto Akihiro, Tanaka Hideaki, Kubota-Kawai Hisako, Tokutsu Ryutaro, Kim Eunuchul, Chorev Dror, Abe Kazuhiro, Robinson Carol V., Mitsuoka Kaoru, Minagawa Jun, Kurisu Genji	4. 巻 1864
2. 論文標題 Three structures of PSI-LHCI from Chlamydomonas reinhardtii suggest a resting state re-activated by ferredoxin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 148986 ~ 148986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbatio.2023.148986	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yagi Toshiki, Toda Akiyuki, Ichikawa Muneyoshi, Kurisu Genji	4. 巻 20
2. 論文標題 Regulation of motor activity of ciliary outer-arm dynein by the light chain 1; Implications from the structure of the light chain bound to the microtubule-binding domain of the heavy chain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v20.0008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kishimoto Hiraku, Azai Chihiro, Yamamoto Tomoya, Mutoh Risa, Nakaniwa Tetsuko, Tanaka Hideaki, Miyanoiri Yohei, Kurisu Genji, Oh-oka Hirozo	4. 巻 5
2. 論文標題 Soluble domains of cytochrome c-556 and Rieske iron-sulfur protein from Chlorobaculum tepidum: Crystal structures and interaction analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Research in Structural Biology	6. 最初と最後の頁 100101 ~ 100101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crstbi.2023.100101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Ryusei, Yoshioka Saho, Yuasa Miho, Morita Yoshitsugu, Kurisu Genji, Fujieda Nobutaka	4. 巻 14
2. 論文標題 An artificial metallolyase with pliable 2-His-1-carboxylate facial triad for stereoselective Michael addition	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 3932 ~ 3937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2sc06809e	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tomoki Nakayoshi, Yusuke Ohnishi, Hideaki Tanaka, Genji Kurisu, Yu Takano
2. 発表標題 Computational analysis of the structure and motion of the plant-type ferredoxin using long-time molecular dynamics simulations
3. 学会等名 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroto Negoro, Hideaki Tanaka, Ginga Shimakawa, Hiroyasu Koteishi, Akihiro Kawamoto, Yusuke Matsuda, Genji Kurisu
2. 発表標題 Structural and functional analysis of the carbonic anhydrase from marine diatom <i>Phaeodactylum tricornutum</i>
3. 学会等名 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nawee Jantarit, Hideaki Tanaka, Genji Kurisu
2. 発表標題 Structural study on the bacteriosin pectocin M1 from <i>Pectobacterium catorovorum</i>
3. 学会等名 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jiannan Li, Noriyuki Hamaoka, Fumiaki Makino, Akihiro Kawamoto, Keiichi Namba, Christoph Gerle, Genji Kurisu
2. 発表標題 Structure of cyanobacterial photosystem I complexed with ferredoxin and cyrtochrome c6 at 1.97 Å resolution
3. 学会等名 日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上中みどり, 大西裕介, 田中秀明, 栗栖源嗣
2. 発表標題 フェレドキシンNADP+還元酵素の中性子結晶構造解析
3. 学会等名 日本結晶学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Uenaka M, Ohnishi Y, Tanaka H, Kurisu G
2. 発表標題 Neutron crystallographic study of ferredoxin-NADP+ reductase
3. 学会等名 26th Congress of the International Union of Crystallography (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Negoro H, Tanaka H, Shimakawa G, Kawamoto A, Matsuda Y, Kurisu G.
2. 発表標題 Structural and functional analysis of the carbonic anhydrase from marine diatom Phaeodactylum tricornutum
3. 学会等名 26th Congress of the International Union of Crystallography (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 李劍南, 浜岡紀之, 久保田一河合寿子, 武藤梨沙, 田中秀明, 牧野文信, 川本晃大, 難波啓一, Christoph Gerle, 池上貴久, 栗栖源嗣
2. 発表標題 シアノバクテリア型光化学系 I 複合体とフェレドキシンおよびシトクロム c 6 との過渡的複合体構造
3. 学会等名 日本蛋白質科学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jiannan Li、浜岡紀之、牧野文信、川本晃大、難波啓一、Christoph Gerle、栗栖源嗣
2. 発表標題 Structure of cyanobacterial photosystem I complexed with Cytochrome c6 and Ferredoxin
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Midori UENKA, Yusuke OHNISI, Hideaki TANAKA, Genji KURISU
2. 発表標題 Neutron crystallographic analysis of ferredoxin-NADP+ reductase
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hatsuki Tanabe, Shinichiro Ozawa, Akihiro Kawamoto, Hideaki Tanaka, Yuichiro Takahashi Genji Kurisu
2. 発表標題 Cryo-EM structure of cytochrome b6/f complex from Chlamydomonas reinhardtii reveals the functional domain movement of Rieske ISP
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taiki Fukuzawa, Rei Toda, Hermanus Nawely, Natumi Morishima, Ryosuke Okubo, Yoshinori Tsuji, Kawamoto Akihiro, Hideaki Tanaka, Christoph Gerle, Yusuke Matuda, Genji Kurisu
2. 発表標題 Structural study of RubisCO from diatom Thalassiosira pseudonana and its interaction with novel pyrenoid proteins
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上中みどり、大西裕介、田中秀明、栗栖源嗣
2. 発表標題 フェレドキシン NADP+ 還元酵素の中性子結晶構造解析
3. 学会等名 日本結晶学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福澤大喜、東田怜、Hermanus Nawaly、森嶋菜摘、大久保亮佑、田中秀明、川本晃大、Christoph Gerle、松田祐介、栗栖源嗣
2. 発表標題 珪藻Thalassiosira pseudonana由来ルビスコのX線結晶構造解析
3. 学会等名 日本結晶学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浜岡 紀之、三角 裕子、川本 晃大、田中 秀明、小沼 剛、池上 貴久、栗栖 源嗣
2. 発表標題 光合成複合体Iの高分解能構造解析を目指した高純度精製
3. 学会等名 日本結晶学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田辺 初希、小澤 真一郎、川本 晃大、田中 秀明、高橋 裕一郎、栗栖 源嗣
2. 発表標題 緑藻クラミドモナス由来シトクロムb6f複合体のpH依存的活性調節機構の構造基盤
3. 学会等名 日本結晶学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学蛋白質研究所蛋白質結晶学研究室
<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/crystallography/>
大阪大学蛋白質研究所蛋白質結晶学研究室
<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/crystallography/LabHP/en/>

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
---------	---------