

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24370021

研究課題名(和文) 葉緑体のレドックス代謝を駆動する蛋白質群の弱い分子間相互作用の包括的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of molecular interaction of ferredoxin and enzymes involved in redox metabolisms in chloroplast

研究代表者

長谷 俊治 (Hase, Toshiharu)

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：00127276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：光合成電子伝達鎖の末端に位置するフェレドキシン(Fd)は、葉緑体の還元同化反応を司る多様な酵素群への電子供与体として働いている。電子授受のパートナーとなる酵素蛋白質群と過渡的な複合体を形成し、分子間電子伝達速度や収量が優れた生体反応のプロセスに寄与している。この作動原理を理解するために、Fd側と酵素側にどのようなレドックス特性と蛋白質-蛋白質間相互作用の機能構造要因が備わっているのかを、植物生理学、生化学、構造生物学、生物物理学の観点から明らかにした。得られた知見は、Fdが葉緑体内で多機能の電子伝達蛋白質として生理機能を営むための包括的な理解を与えるものであった。

研究成果の概要(英文)：We have been studying electron transfer between Fd and these enzymes by X-ray crystallography, NMR analysis and isothermal calorimetry to obtain an insight into electron partitioning in chloroplasts. In all cases, their protein-protein interactions are not so strong with K_d values around micro-molar to several tens micro-molar; a set of positively charged residues of the partner enzymes is closed to acidic residues of Fd in a spatially matching manner to produce an electrostatic interaction force. Whole acidic surface of Fd is not utilized for complex formation with partner enzymes and the interaction region appears to be at least partly unique for each enzyme. This topological variety of the molecular recognition between Fd and partner enzymes would be significant for function of Fd as a hub protein in a network of redox metabolisms. We further found the intermolecular interaction of some Fd-dependent enzymes with Fd varied when each enzyme was bound to their substrate.

研究分野：植物生化学

キーワード：葉緑体 レドックス代謝 フェレドキシン 酸化還元酵素 分子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

植物の光合成で生じる強い還元力は、電子キャリアー蛋白質であるフェレドキシン (Fd) を電子供与体とする炭素、窒素、硫黄等の同化を司るレドックス代謝ネットワークに供給される。この物質同化の特性とそれを支える酵素蛋白質の作動原理を、電子の分子間授受と葉緑体内での還元力の分配機構という切り口から解明することを目指して研究に取り組んで来た。これまでの知見を今回の課題設定の背景としてまとめた。

(1) Fd:NADPH 酸化還元酵素 (FNR)、亜硫酸還元酵素 (SiR)、グルタミン酸合成酵素 (GOGAT) は、Fd との間で電子伝達複合体を作り、その際には酸化還元中心間の距離は 10 前後となって電子の授受が直接行なわれると予想される。

(2) Fd は多くの酵素との分子間相互作用領域を分子表面に広く備えている。一方、酵素群は分子サイズが Fd よりはるかに大きく酸化還元中心の種類も多様であり、共通した Fd の結合モチーフはない。酵素毎に特有の結合部位が存在して、Fd と複合体を形成すると考えられる。

(3) 葉緑体内での Fd の濃度は数 10 μM から 100 μM である。電子授受のパートナーとなる酵素群の総量は、Fd と同程度かそれ以上であると見積もられる。Fd がまんべんなく酵素群に行き渡るわけではないので、各々の酵素が電子キャリアーをめぐって競争関係にあると推定される。

(4) Fd と酵素の複合体の解離定数は酵素ごとに異なるが、数 μM から数 10 μM の範囲内にあり、全体として比較的弱い相互作用である。酵素側に Fd との親和性に変化が生じる状況が葉緑体内で起こるならば、レドックス代謝を駆動している電子分配に大きな影響が生じる。

(5) GOGAT はグルタミン合成酵素 (GS) と酵素サイクルを構成しており、アンモニアを炭素骨格である 2-OG を受容体としてアミノ酸へ取り込む。このサイクルは炭素・窒素同化の連結点にあり、還元力供給が同化バランスを制御する重要な要因となっている。

(6) レドックス代謝の生化学・構造生物学的研究において、これまでは Fd が主な対象であったが、今後は酵素側からの知見が重要になると判断され、酵素側の構造・機能および葉緑体内での存在状態や挙動を解析する必要性が生じている。

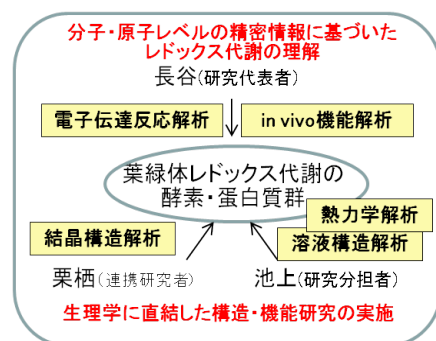
2. 研究の目的

葉緑体のレドックス代謝を司る酵素・蛋白質群の構造や機能の制御機構を分子レベルで解明する研究は、基礎植物科学の重要課題である。その成果は応用的観点からも波及効果が

大きい。本研究は、植物生化学に実績を持つ研究者と x 線結晶解析法や NMR 分光法を熟知する研究者とが連携して、レドックス代謝を駆動する電子キャリアーと酵素群との個々の組み合わせで形成される電子伝達複合体を対象として、蛋白質・蛋白質間の弱い相互作用と電子授受の構造・機能研究を行う。そして、明らかになる知見を *in vivo* の事象の解明に適用して、生理状態に应答してダイナミックに変動する葉緑体の電子分配の制御機構を、構造生物学から生理学にまたがる新たな切り口で包括的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 下図に示したような研究協力体制をとる。長谷は全体を総括すると共に、生化学、植物生理学の観点からレドックス代謝酵素群の研究を行う。ターゲットとするレドックス酵素群の反応特性の詳細を明らかにし、構造解析に供する場合には必要な試料の大量精製を行う。池上は NMR 解析、栗栖は x 線結晶構

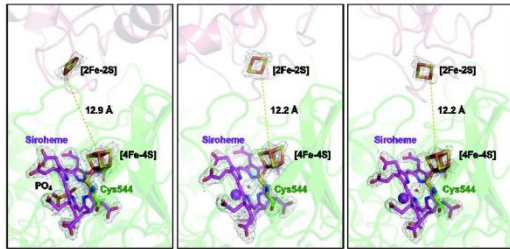


造解析を分担し、得られる機能・構造の情報は共有化する。改変タンパク質の分子デザインを発案・議論し、さらなる構造機能研究を追求する。改変のターゲットは、電子伝達複合体の分子間相互作用に関わる分子表面とそれぞれの酵素の活性中心の 2 領域とする。研究目的に合致した分子改変が達成するまでこのプロセスを繰り返し、実験的な検証を行う。これらは基礎的研究として位置づける。

(2) 研究の第 2 段階はオルガネラレベルの発展的研究を行う。緑葉や単離した葉緑体を用いて、炭素、窒素、硫黄の同化系の光合成機能が、全体としてあるいは個々に駆動する条件下において、該当するレドックス酵素・蛋白質がどのような組み合わせで複合体を形成しているのか、その複合体の親和力を *in vivo* に近い状態で見積もる解析を行う。必要に応じて、ターゲットとする蛋白質をノックダウンした変異体植物を材料にする。この 2 つの段階の計画の実行の時系列は必ずしも前後関係があるわけではないので、研究の進捗状況に応じて平行して行うこととした。

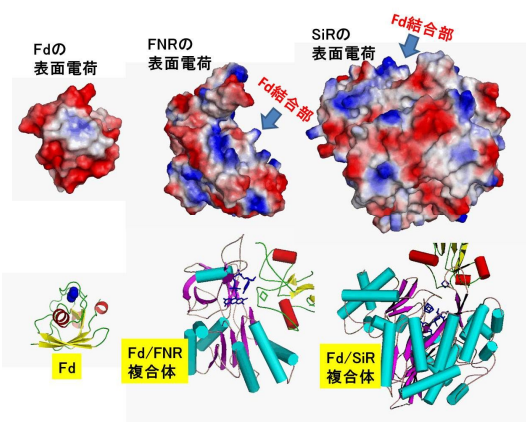
4. 研究成果

(1) X線結晶構造解析による複合体の結晶構造の決定とその評価: Fd と SiR の複合体の結晶構造が下図に示すように3種類得られたが、いずれの構造においても Fd の[2Fe-2S]

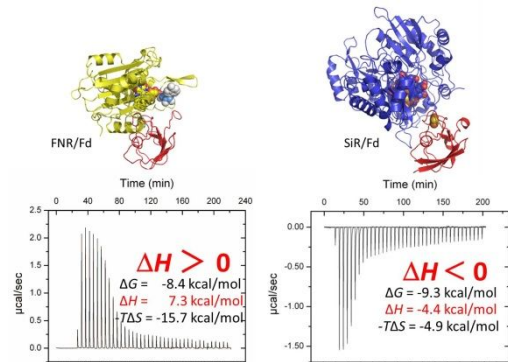


クラスターと SiR の[4Fe-4S]クラスターの距離が12 オングストローム程度で、分子間の電子伝達の位置関係として大差はない。その構造情報の解釈を慎重に行うと共に、酵素側の相互作用領域の網羅的変異体の機能特性を解析して、3種の構造が共に電子伝達複合体として成り立つことを提案した(発表論文)。このような複数の構造が電子伝達複合体として存在しうることに着想が至ったことは当初の予想を超えたものであった。この酸化還元中心の配置を決定している Fd と Fd-依存性酵素との分子間相互作用に着目して、Fd 側と酵素側からみた部位特異的変異体の生化学的解析を行った。Fd 側の酸性残基群と酵素側の塩基性残基群の網羅的改変により静電力の寄与の重要性を確認し、特に酵素側の改変が電子授受の大きな低下を引き起こすことが判明した。一方、Fd と酵素の接触部位に存在する非荷電性残基や疎水性残基の改変では、一律的な酵素反応の変化や複合体の親和力の低下は認められず、非静電的な相互作用力は複合体の最適構造の形成に寄与する微調整の役割を果たしていることが示唆された(発表論文、)。

(2) 複合体の物理化学的特性の解明: Fd とそのパートナー酵素である FNR あるいは SiR との結晶構造が得られた。下図に示すように酵素側の Fd との相互作用部位は、正電荷に富んだ凹型部位であり、酵素の分子形状としての共通性が明らかになった。両者の蛋白質複

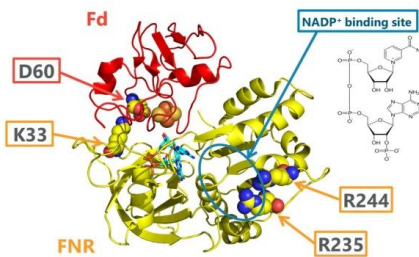


合体の分子間相互作用を NMR と等温滴定の熱測定により精密な解析を行い、物理化学的な特性を明確にした。その結果、FNR/Fd 複

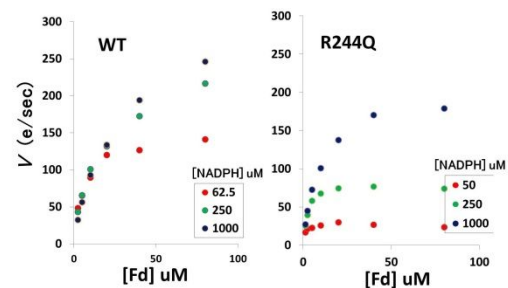


合体形成は吸エルゴン反応、SiR/Fd 複合体は発エルゴン反応であり、複合体形成における熱力学的パラメーターの特徴に大差があることが判明した。FNR/Fd 複合体形成では大きなエントロピー増大が伴う。これはおそらく酵素側の構造変化と関連するものであると予想される。この成果はこの分野の研究に多くの示唆を与えるものと評価する(学会発表、)。

(3) FNR と Fd との相互作用の調節因子としてのピリジヌクレオチドの作用機作: FNR の基質である Fd と NADP(H) は、互いに負の協働性を有しており、一方の濃度が高まり FNR と強く結合すると、他方と FNR の結合力は弱まる関係にある。この負の協働性を詳しく解析し、その現象が生じる Fd と FNR の濃度は生理的な濃度域にあり、葉緑体内でのこの現象



が起こる可能性を示した。FNR の各種の部位特異的変異体を用いて、NADP(H) の 2' 5' ADP のリン酸が結合する部位の FNR 変異体が負の



協働性を大きく損なわれることを見出した。これは NADP(H) の 2' 5' ADP のリン酸が FNR に結合すると、そこから遠く離れた Fd との相互作用部位に何らかの構造変化を誘起するア

ロステリック効果のような現象が起こるので
はないかと想定される(学会発表、)。

(4) 葉緑体内におけるレドックス代謝酵素
の存在様式: いろいろな塩強度下での相互作用
解析に(2)の手法を適用して、生理的な
条件下での分子間相互作用の研究を行う重要
性を明確にした。光合成関連の炭素・窒素同
化系の酵素の生化学や生理学的な新知見を得
た(発表論文、)。Fdファミリーに属する
FdC2分子の葉緑内での発現や分布を詳しく解
析し、この分子は葉緑体の分化・発達が盛ん
な部位で多く蓄積することを見出した。この
結果は、FdC2ha 光合成の電子伝達に直接か
かわるよりは、葉緑体の生合成に關与する可
能性を示唆するものである(学会発表)。

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16件)

Gaufichon L., Marmagne A., Yoneyama T.,
Hase T., Clément G., Trassaert M., Xu X.,
Shakiebaei M., Najihi A., and Suzuki A.
(2016) Impact of the disruption of ASN3
encoding asparagine synthetase on
Arabidopsis development. *Agronomy*, 6, 12,
doi.10.3390/agronomy6010012 査読あり
Kim J.Y., Nakayama M., Toyota H., Kurisu
G., and Hase T. (2016) Structural and
mutational studies of an electron transfer
complex of maize sulfite reductase and
ferredoxin. *J. Biochem.* In press, DOI:
10.1093/jb/mvw016 査読あり
Sawitri W.D., Narita H., Ishizaka-Ikeda E.,
Sugiharto B., Hase T., and Nakagawa
A. (2016) Purification and characterization of
recombinant sugarcane sucrose phosphate
synthase expressed in *E. coli* and insect Sf9
cells: An importance of the N-terminal
domain for an allosteric regulatory property.
J. Biochem. In press, DOI:
10.1093/jb/mvw004 査読あり
Mutoh R., Muraki N., Shinmura K.,
Kubota-Kawai H., Lee YH., Nowaczyk MM.,
Rögner M., Hase T., Ikegami T., and Kurisu
G. (2015) X-ray structure and nuclear
magnetic resonance analysis of the
interaction sites of the Ga-substituted
cyanobacterial ferredoxin. *Biochemistry*, 54,
6052-6061, DOI:
10.1021/acs.biochem.5b00601 査読あり
Kinoshita M., Kim JY., Kume S., Sakakibara
Y., Sugiki T., Kojima C., Kurisu G., Ikegami
T., Hase T., Kimata-Arigo Y. and Lee YH.
(2015) Physicochemical nature of interfaces
controlling ferredoxin NADP⁺ reductase
activity through its interprotein interactions

with ferredoxin. *Biochim Biophys Acta*,
1847, 1200-1211, DOI:
10.1016/j.bbabi.2015.05.023 査読あり
Yoneyama T., Fujimori T., Yanagisawa S.,
Hase T., and Suzuki A. (2015) ¹⁵N-tracing
studies on in vivo reactions of
ferredoxin-dependent nitrite reductase and
glutamate synthase using reconstituted
electron donation systems. *Plant Cell*
Physiol. 56, 1154-1161, DOI:
10.1093/pcp/pcv039 査読あり
Lin, Y-H., Huang L-F, Hase T., Huang H-E.,
and Feng T-Y. (2015) Expression of plant
ferredoxin-like protein (PFLP) enhances
tolerance to heat stress in *Arabidopsis*
thaliana. *New Biotechnology*, 32, 235-242,
DOI: 10.1016/j.nbt.2014.12.001 査読あり
Suwito H., Jumina, Mustofa, Pudjiastuti P.,
Fanani M.Z., Kimata-Arigo, Y., Kathira R.,
Kawakami T., Fujiwara T., Hase T., Sirat
H.M., and Puspaningsih N.N.T. (2014)
Design and synthesis of Chalon derivatives
as inhibitors of the ferredoxin -
ferredoxin-NADP⁺ reductase interaction of
Plasmodium falciparum: Pursuing new
antimalarial agents. *Molecules*, 19,
21473-21488, DOI:
10.3390/molecules191221473 査読あり
Kimata-Arigo Y. and Hase T. (2014)
Multiple complexes of nitrogen assimilatory
enzymes in spinach chloroplasts: possible
mechanisms for the regulation of enzyme
function. *PLoS ONE* 9 (10): e108965.
doi:10.1371 査読あり
Kimata-Arigo Y., Kubota-Kawai H., Lee Y.
-H., Muraki N., Ikegami T., Kurisu G., and
Hase T. (2013) Concentration-dependent
oligomerization of cross-linked complexes
between ferredoxin and ferredoxin-NADP⁺
reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
434, 867-872, DOI:
10.1016/j.bbrc.2013.04.033 査読あり
Gaufichon L., Masclaux-Daubresse C.,
Tcherkez G., Reisdorf-Cren M., Sakakibara
Y., Hase T., Clément G., Avicé J. C.,
Grandjean O., Marmagne A., Boutet-Mercey
S., Azzopardi M., Soulay F., and Suzuki A.
(2013) Arabidopsis thaliana ASN2 encoding
asparagine synthetase is involved in the
control of nitrogen assimilation and export
during vegetative growth. *Plant Cell Environ.*
36, 328-342, DOI:
10.1111/j.1365-3040.2012.02576.x 査読あ
り
Rahman M. M., Nakanishi N., Sakamoto Y.,
Hori H., Hase T., Park S-Y., and Tsubaki M.
(2013) Roles of conserved Arg72 and Tyr71
in the ascorbate-specific transmembrane
electron transfer catalyzed by *Zea mays*
cytochrome b561. *J. Biosci. Bioeng.* 115,
497-506, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.11.013

査読あり

Liauw P., Mashiba T., Kopczak M., Wiegand K., Muraki N., Kubota H., Kawano Y., Ikeuchi M., Hase T., Rögner M., and Kurisu G. (2012) Cloning, expression, crystallization and preliminary X-ray studies of the ferredoxin-NAD(P)⁺ reductase from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. Acta Crystallographica Section F, 68, 1048-1051, DOI: 10.1107/S1744309112031910 査読あり

Altmann B., Twachtman M., N. Muraki N., Voss I., Okutani S., Kurisu G., Hase T., and Hanke G.T. (2012) N-terminal structure of maize ferredoxin:NADP⁺ reductase determines recruitment into different thylakoid membrane complexes. Plant Cell, 24, 2979-2991, DOI:

10.1105/tpc.111.094532 査読あり

Sakakibara Y., Kimura H., Iwamura A., Saitoh T., Ikegami T., Kurisu G., and Hase T. (2012) A new structural insight into differential interaction of cyanobacterial and plant ferredoxins with nitrite reductase as revealed by NMR and X-ray crystallographic studies. J. Biochem. 151, 483-492, DOI: 10.1093/jb/mvs028 査読あり

Shinmura K., Muraki N., Yoshida A., Hase T., and Kurisu G. (2012) Crystallization and preliminary X-ray studies of an electron-transfer complex of ferredoxin and ferredoxin-dependent glutamate synthase from the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. Acta Crystallographica Section F, 68, 324-327, DOI:

10.1107/S1744309112003387 査読あり

[学会発表](計17件)

藤田和也、植物亜硫酸還元酵素に見出される Tyr-Cys 分子内架橋の構造機能相関について、第 85 回日本生化学会、2012 年 12 月 15 日 18 日、福岡国際会議場

金宙妍、フェレドキシンと亜硫酸還元酵素の電子伝達複合体の構造と分子間相互作用の解析、第 85 回日本生化学会、2012 年 12 月 15 日 -18 日、福岡国際会議場

弘中祐介、シアノバクテリア亜硝酸還元酵素の大腸菌発現系で生じる 2 成分の組換え酵素について、第 85 回日本生化学会、2012 年 12 月 15 日-18 日、福岡国際会議場

木下岬、フェレドキシンとその依存性酵素 SiRtoFNR 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、第 85 回日本生化学会、2012 年 12 月 15 日-18 日、福岡国際会議場

筑摩悠太郎、ピリジンヌクレオチドにより調整されるフェレドキシンとフェレドキシン: NADP⁺還元酵素の分子間相互作用について、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日-13 日、パシフィコ横浜

尾崎健、植物グルタミン合成酵素のグルタミン酸認識と基質類縁体の阻害力に異なる影響をもたらす部位特異的変異酵素について、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日-13 日、パシフィコ横浜

J. Y. Kim、Intermolecular electrostatic interaction between ferredoxin and sulfite reductase studied by isothermal titration calorimetry and nuclear magnetic resonance、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日 -13 日、パシフィコ横浜

Ju Yaen Kim、Structure of an electron transfer complex of ferredoxin and sulfite reductase and analysis of their molecular interaction、9th international workshop, Sulfur metabolism in plants、2014 年 4 月 14 日-17 日、Freiburg, Germany

新村佳奈子、Structural studies on the transient electron transfer complex between cyanobacterial Fd and Fd-GOGAT、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15 日 -18 日、京都国際会議場

木下 岬、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、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15 日-18 日、京都国際会議場

有賀(木股)洋子、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、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15 日-18 日、京都国際会議場

金宙妍、Study on a hydrophobic and non-charged interaction between sulfite reductase and ferredoxin、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15 日-18 日、京都国際会議場

Y. Chikuma、New factor modulating activity of ferredoxin:NADPH reductase in chloroplast、第 56 回日本植物生化学会、2015 年 3 月 16 日-18 日、東京農業大学、世田谷キャンパス

K. Ohta、Study on FdC2, a ferredoxin homologue ubiquitously present in oxygenic photosynthetic organisms、第 56 回日本植物生化学会、2015 年 3 月 16 日-18 日、東京農業大学、世田谷キャンパス

T. Hase、Our understanding of molecular mechanism of Protein-protein interaction between Fd and redox enzymes in plant photosynthesis、MCLS2015、2015 年 5 月 7 日 8 日、Surabaya, Indonesia

T. Hase、Modulation of protein-protein interaction of Fd and Fd-dependent enzymes、第 68 回山田コンファレンス、2015 年 10 月 29 日 31 日、奈良市公会堂

長谷俊治、植物 Fd と Fd 依存性酵素群の複合体構造からみた越硫黄蛋白質の電子伝達特性、BMN2015、2015 年 12 月 1 日 5 日、神戸国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷 俊治 (HASE, Toshiharu)

大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号：00127276

(2)研究分担者

池上 貴久 (IKEGAMI, Takahisa)
横浜市立大学・生命医学研究科・教授
研究者番号：20283939

(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