トピックス

光化学系 I-アナログフェレドキシン複合体の構造解析

武藤梨沙 福岡大学理学部

河合(久保田)寿子 山形大学理学部理学科

池上貴久 横浜市立大学生命医科学研究科

1. はじめに

酸素発生型の光合成初期反応では、光化学系 II において水を分解して得られた電子は、シトクロム b_6f 複合体、光化学系 I (PSI) へと伝達され、電子伝達タンパク質であるフェレドキシン (Fd) へと伝えられる。Fd へと伝わった電子は、様々な Fd 依存性酵素 (Fd-NADP⁺還元酵素 (FNR)、亜硝酸還元酵素、亜硫酸還元酵素など) へと分配される。Fd と Fd 依存性酵素の相互作用解析や複合体構造解析は、核磁気共鳴 (NMR) 法や X 線結晶構造解析などを用いて行われ¹⁾⁻³⁾、Fd から Fd 依存性酵素への電子伝達機構が明らかになりつつある。一方、細胞内へ電子を分配するための起点となる PSI と Fd の相互作用解析は、変異体を用いた生化学的解析が中心となっており、複合体の構造解析によって直接的に相互作用を解析した例はなかった。それは、PSI が約 1 MDa (シアノバクテリアの細胞内では主に三量体で存在し、単量体では約 360 kDa) の巨大な膜タンパク質であることや、わずかな光でも PSI-Fd 複合体が解離してしまうことなど、高難度の問題があったためである。我々は、Fd が PSI から高効率で電子を受け取る仕組みを解明するため、NMR 法と X 線結晶構造解析を併用し PSI と Fd との電子伝達複合体を直接的に捉えることに成功した⁴⁾。

2. アナログ Fd の構造と活性

植物型 Fd は [2Fe-2S] クラスターを保持する。Fd は約 10 kDa と小さく NMR 解析に適しており、これまでに Fd と Fd 依存性酵素の構造解析が頻繁に行われてきた^{2), 3)}。しかし、Fd は常磁性の Fe を含むため活性中心であるクラスター周辺からの NMR シグナルを得ることはできなかった。また、酸化型 Fd は PSI から電子を受け取ると、還元型 Fd となり PSI から容易に解離するため安定な複合体を得ることは難しかった。

そこで、電子伝達活性を持たないアナログ Fd を用いることで、安定な PSI-Fd 複合体を得ることを目指した。

アナログ Fd は、今から 20 年以上も前に作製法が提案され⁵⁾、これまでに [2Fe-2S] クラスターの Fe をガリウム (III) に置換したガリウム Fd (GaFd) が実験に用いられてきた^{6), 7)}。しかし、Ga に置換したクラスターが単核の [Ga] クラスターなのか、それとも [2Ga-2S] クラスターなのかの議論の決着はついていなかった。そこで、我々は GaFd の X 線結晶構造解析によって、GaFd は [2Ga-2S] クラスターを保持することを明らかにした (図 1)⁸⁾。さらに、FNR アフィニティークロマトグラフィー法や CD スペクトルにより、GaFd と Fd に電子の授受以外の物理的な差異がないことも確認した⁸⁾。よって、GaFd は Fd と同等の構造と分子認識能を持っており、Fd の代替として相互作用解析に有用であると言える。

3. GaFd と PSI の NMR 解析

¹⁵N 安定同位体で標識した GaFd ([¹⁵N]-GaFd) を用いて PSI との二次元 ¹H-¹⁵N 相関 NMR スペクトルの測定を行った。GaFd が PSI と複合体を形成すると、分子量の合計が約 1 MDa を超える巨大分子になるため、そのままでは NMR での観測が難しい。PSI の濃度を

図 1 GaFd の構造 (PDB ID: 5AUK)。[2Ga-2S] クラスターは球状モデルで示した (赤:Ga, 黄色:S)。

Structural Analyses of Photosystem I-Ferredoxin Complex

Risa MUTOH¹, Hisako KAWAI-KUBOTA² and Takahisa IKEGAMI³¹Fukuoka University²Yamagata University³Yokohama City University

変化させる滴定実験を行ったが、巨大分子になることでNMRシグナルが消失するか、または複合体の割合が少なく遊離したGaFd単体でのNMRシグナルのみの観測になってしまうかのいずれかであった。過渡的な複合体形成をNMRで捉えるためには、タンパク質同士の結合・解離の速度を極めて速める必要がある。そこで、我々は溶液条件や測定温度など様々な測定条件の検討を行った。その結果、測定温度を298 Kから323 Kに上げることで、PSI存在下での ^{15}N -GaFdのNMRシグナルの化学シフトの変化を観測することに成功した（本実験で用いているFdとPSIは好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 由来のため、ある程度の高温でもタンパク質は安定である）。しかし、約1割の残基でピークの消失が見られた。その理由として、結合・解離の交換によって ^{15}N -GaFdの相互作用部位のピークがブロード化したことや、PSIのサブユニットであるPsaCの[4Fe-4S]クラスターに近づいたGaFdの部位のピークが常磁性効果によってブロード化したことが考えられる。いずれにしてもそれらの残基はPSIとの相互作用に重要な残基であると推察される。

この実験条件をもとに、転移交差飽和（TCS）法を用いてGaFd上のPSIとの相互作用部位の同定を行った。化学シフト摂動法では、相互作用するアミノ酸残基のほかにも、相互作用に伴ってinduced-fitなどにより構造変化したアミノ酸残基も捉えてしまうのに対し、TCS法では直接の相互作用界面に存在するアミノ酸残基を同定することが可能である⁹⁾。この実験には、 ^2H , ^{15}N で標識したGaFdと非標識のPSIを用いた。 $[\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -GaFdは軽水中で精製するため、分子表面のアミド基水素は ^1H に置換されている。測定では、まず脂肪族 ^1H の共鳴周波数を持つラジオ波を試料に照射し、PSIの脂肪族の ^1H 核スピンを選択的に飽和させ、このシグナル飽和をPSI全体に伝播させる。この飽和はPSIのみにとどまらず、 $[\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -GaFdの分子表面のアミド基水素（ $^1\text{H}^{\text{N}}$ ）へも伝播する。この際に飽

和がGaFdへ一気に広がるのを防ぐために、90%重水中で測定を行った。 ^1H - ^{15}N の相関スペクトルを観測した際に、飽和が伝播したアミノ酸残基のNMRシグナル強度は減少し、それらのアミノ酸残基が複合体境界面に存在する残基であると同定できる。照射によって減少したピーク強度の割合を求め、溶液中でのGaFd上のPSIとの相互作用部位を同定した（図2A, B）。ただし、GaFdのメチル基に混在した ^1H からの飽和が混ざってしまうため、GaFd上へ相互作用部位をマッピングする際にIle, Leu, Val, およびその直後の残基はデータから除外した。

4. PSI-GaFd 複合体のX線結晶構造解析

溶液中での相互作用を検証できるNMRに加えて、巨大な分子であっても相互作用を捉えることができるX線結晶構造解析にも取り組んだ。PSI三量体とFdの結晶化を行い、得られた結晶をもとに大型放射光施設SPring-8のビームラインBL44XUにてX線回折データを収集し、*T. elongatus*のPSIの構造（PDB ID: 1JB0）をモデルとした分子置換法により初期位相を決定した。分解能4.3 Åで結晶構造を決定したが、Fdの主鎖構造を決定するまでには至らなかった。そこで、この結晶化条件をもとにGaFdを用いてPSI-GaFd複合体の結晶構造解析を行った。その結果、4.2 ÅでPSI-GaFd複合体の構造を決定し、GaFdの主鎖構造までも明らかにした⁴⁾。PSI三量体すべてのプロトマーにGaFdが結合しており、それら3分子のFdをFd1～Fd3とした（図3A）。これまで、FdはPSIの表在性タンパク質PsaC, PsaD, PsaEと相互作用するとされていた。しかし、本構造において、FdはPsaC, PsaE, および反応中心タンパク質PsaAと相互作用しており、PsaDとの接触は見られなかった（図3B）。各プロトマーのGaFdの[2Ga-2S]クラスターとPsaCの[4Fe-4S]クラスター間の距離は8.3-9.6 Åと違いがあるものの、どのプロトマーにおいても直接電子を伝達できる距離であった。さらに、これらクラスター周辺は、双方のアミノ酸が電子伝達に適した疎水的な環境を作り上げていた。Fd1～Fd3でクラスター間の距離に差があることから、FdとPSIとの結合には強弱があることが示唆された。この強弱の違いは、Fdの異常分散差フーリエマップのピークの高さやPSIと相互作用するアミノ酸残基の数とも一致し、いずれもFd3がFd1あるいはFd2に比べてPSIと強固に結合することが示唆された。結晶構造から得られたFd上のPSI相互作用部位と溶液中の相互作用部位を比較したところ、溶液中ではPSI三量体それぞれに結合したFdの平均的な情報であるが、どちらも同じような相互作用部位であることが確認された（図2A, 3C）。

図2 (A) TCSによるFd上のPSI相互作用領域。(B) 各アミノ酸残基のシグナル強度の割合（灰色:PSI非存在下, 青:PSI存在下）。

図 3
(A) PSI-GaFd 複合体構造を細胞質側から表示した図 (PDB ID: 5ZF0). (B) Fd 結合部位の拡大図. (C) Fd1-3 の PSI との相互作用領域. 桃色は PsaC, 青色は PsaA, 緑色は PsaE との相互作用領域.

5. おわりに

我々は NMR 法と X 線結晶構造解析を併用し PSI から Fd へ電子が伝達される構造基盤を解明した. 複合体結晶構造中において, Fd の PSI への結合は 3 つの Fd で異なっていた. このことは, Fd には 2 つ, または 3 つの結合状態が存在することを示唆している. さらに我々は, Fd アフィニティークロマトグラフィー法と NMR の化学シフト摂動法によって, PSI の単量体と三量体それぞれの Fd に対する相互作用を検証した. Fd アフィニティークロマトグラフィーの結果から, PSI 三量体は単量体よりも Fd への親和性が高いことが示された. また, NMR の化学シフト摂動法による化学シフト変化量は, PSI 三量体存在下では単量体存在下よりも明らかに大きいことがわかった. これらの結果は, Fd と PSI の結合状態が複数存在することを支持している.

PSI 三量体は完全に等価な構造を取っているが, Fd の結合によってその対称性が崩れ, Fd と直接相互作用しない領域にも構造変化が及ぶことがわかった. 例えば, Fd の結合により PSI 三量体を構成する各プロトマー間の距離が縮まっており, この構造変化は PSI 三量体中の各プロトマー間で光エネルギーを共有するという先行研究¹⁰⁾を支持する. また, PSI を還元するシトクロム c_6 と結合する膜貫通タンパク質 PsaF がルーメン側に移動しており, Fd は PSI の酸化還元反応を効率よく行うための微調整を行っている可能性が示された.

謝 辞

本研究は, 主に大阪大学蛋白質研究所で行われたものであり, 結晶構造解析については大阪大学 栗栖源嗣教授のもとで行われました. 最終の結晶構造解析は

大阪大学 田中秀明准教授に担当していただきました. そのほか蛋白質結晶学研究室の皆様をはじめ本研究に携わってくださった方々, ならびに SPring-8 BL44XU ビームライン関係者の方々に感謝いたします.

文 献

- 1) Kurisu, G. *et al.* (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**, 117-121. DOI: 10.1038/84097.
- 2) Sakakibara, Y. *et al.* (2012) *J. Biochem.* **151**, 483-492. DOI: 10.1093/jb/mvs028.
- 3) Kim, J. Y. *et al.* (2016) *J. Biochem.* **160**, 101-109. DOI: 10.1093/jb/mvw016.
- 4) Kawai-Kubota, H. *et al.* (2018) *Nat. Plants* **4**, 218-224. DOI: 10.1038/s41477-018-0130-0.
- 5) Kazanis, S. *et al.* (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 6625-6626. DOI: 10.1021/ja00129a040.
- 6) Vo, E. *et al.* (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 1934-1940. DOI: 10.1021/ja961330f.
- 7) Xu, X. *et al.* (2010) *Biochemistry* **49**, 7790-7797. DOI: 10.1021/bi100712g.
- 8) Mutoh, R. *et al.* (2015) *Biochemistry* **54**, 6052-6061. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00601.
- 9) Takahashi, H. *et al.* (2000) *Nat. Struct. Biol.* **7**, 220-223. DOI: 10.1038/73331.
- 10) Baker, D. R. *et al.* (2014) *J. Phys. Chem. B* **118**, 2703-2711. DOI: 10.1021/jp407948p.

武藤梨沙

武藤梨沙 (むとう りさ)

福岡大学理学部助教
2011 年名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻で博士 (理学) 取得後, 大阪大学蛋白質研究所研究員, 助教を経て現職.
研究内容: 核磁気共鳴法, 電子スピン共鳴法, 高速原子間力顕微鏡を用いたタンパク質間相互作用の解析
連絡先: 〒 814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1
E-mail: mutoh@fukuoka-u.ac.jp

河合(久保田)寿子

河合(久保田)寿子 (かわい ひさこ)

山形大学理学部理学科助教
2010 年東京大学大学院総合文化研究科で博士 (学術) 取得後, 大阪大学蛋白質研究所研究員, 日本学術振興会特別研究員 PD, CREST 研究員, 日本学術振興会特別研究員 RPD を経て現職.
研究内容: 光合成関連タンパク質の構造・機能の研究
連絡先: 〒 990-8560 山形市小白川町 1-4-12
E-mail: hkawai@sci.kj.yamagata-u.ac.jp

池上貴久

池上貴久 (いけがみ たかひさ)

横浜市立大学教授
1999 年大阪大学理学研究科で論文博士 (理学, 生物化学) 取得後, 大阪大学蛋白質研究所准教授を経て現職.
研究内容: 主に核磁気共鳴法によるタンパク質の構造や相互作用の解析
連絡先: 〒 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-29
E-mail: ikegamit@yokohama-cu.ac.jp