

ガリウム置換が可能にした光化学系I-フェレドキシン電子伝達複合体の結晶構造解析

河合(久保田)寿子

山形大学 理学部 理学科 〒990-8560 山形県山形市小白川町 1-4-12

村木則文

自然科学研究機構 分子科学研究所 〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町字東山 5-1

田中秀明

大阪大学 蛋白質研究所 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3 番 2 号

栗栖源嗣

大阪大学 蛋白質研究所 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3 番 2 号

要旨

光化学系 I (PSI) は光エネルギーを用いて光合成生物に必要な還元力を生み出す色素-タンパク質複合体であり、PSI から生じた還元力はフェレドキシン (Fd) という電子伝達タンパク質を介して細胞内に分配される。我々は、PSI から Fd への効率のよい分子間電子伝達の仕組みを解明することを目指して、シアノバクテリア由来 PSI-Fd 複合体の X 線結晶構造解析に取り組んだ。複合体結晶を作製するにあたり、天然型 Fd の酸化還元中心を構成する鉄をガリウムに置換した「ガリウム置換再構成 Fd」を利用したことがブレイクスルーとなり、4.2 Å で PSI-Fd 複合体結晶構造を決定することに成功した。そして、PSI と Fd が複合体界面に作り出すアミノ酸の環境と酸化還元中心間の距離から、PSI から Fd へ効率よく電子が伝達される構造基盤を解明した。さらに、Fd 結合前後の PSI の構造を比較することで、Fd の結合は PSI の構造変化を引き起こし、PSI の集光反応と酸化・還元反応の微調整を行っている可能性が示唆された。

1. はじめに

生命体を構成する主要元素のうち炭素、窒素、硫黄などの多くは、生体に摂取される前の大気や土壌中で酸化された無機酸化物として存在している。我々ヒトを含む動物は、無機酸化物を還元同化する能力を備えておらず、植物やシアノバクテリアが太陽光エネルギーを利用して無機酸化物から有機物を作り出す能力に依存して生命活動を行っている。

植物やシアノバクテリアの生体内で強力な還元力を作りだしているのは、チラコイド膜に埋め込まれた色素タンパク質超分子複合体、光化学系 I (Photosystem I: PSI) である。葉緑体の起源とされるシアノバクテリアの PSI 単量体は12種類のタンパク質サブユニットからなり、生体内では約1,000 kDa の三量体として存在している。2001年に好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* (*T. elongatus*)-BP1 がもつ PSI 三量体の X 線結晶構造が 2.5 Å 分解能で報告された¹⁾。それによると、太陽光エネルギーを効率よく吸収すべく約300分子のクロロフィルが PSI 内部にネットワークを形成していた。さらに、クロロフィルにより吸収されたエネルギーを利用して電荷分離反応を行うスペシャルペアクロロフィルや、フェオフィチ

ン、鉄-硫黄クラスターという電子伝達分子がタンパク質の骨格中に適切な距離と配向をもって正確に配置されていることが報告されていた。光化学系 II において水分子の酸化により生じた電子は PSI へ伝達され、スペシャルペアクロロフィルで再励起された電子が PSI 末端の F_{A/B} クラスターまで伝達されても、非常に低い酸化還元電位を示す ($E_m = -500$ mV)。この還元力は、最終的に生体内で炭素、窒素、硫黄などの還元同化反応に利用されるが、還元同化酵素群は PSI から直接電子を受け取ることができない。PSI に直接結合し、電子を受け取ることができるのは植物型フェレドキシン (Fd) と呼ばれる電子伝達タンパク質である。Fd は分子サイズ約11 kDa の酸性タンパク質であり、酸化還元中心として[2Fe-2S]クラスターを持つ。その酸化還元電位は -400 mV と低く、PSI から電子を受け取った還元型 Fd は強力な還元剤となり、生体内の様々な還元酵素に電子を分配する (Fig. 1)。このように、PSI を基点とした還元力の供給は Fd に依存し、分子状態素への還元力の漏洩を防ぎながら PSI から Fd へ効率よく電子を伝達するための巧妙な仕組みが存在すると考えられる。本研究では、PSI と Fd が実際に相互作用している複合体状態の立体構造を解析することで、光合成生物が最適化した電子伝達反応の仕組みを解き明かすことを目的とし

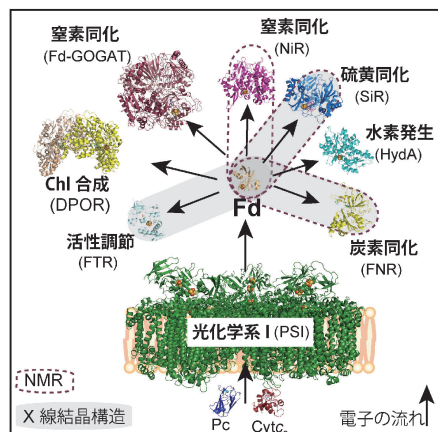


Fig. 1 (Color online) Fd mediates electron transfer between PSI and Fd dependent proteins. Electrons which produced by PSI are transferred by Fd. The complex-structural analysis revealed by NMR (Fd-FNR: Kurisu et al. 2001, Xu et al. 2010, Kimata-Arigo et al. 2010, Lee et al. 2011. Fd-SiR: Saitoh et al 2006. Fd-NiR: Sakakibara et al. 2012) and X-ray crystallography (Fd-FNR: Kurisu et al. 2001. Fd-FTR: Dai et al. 2005. Fd-SiR: Kim et al. 2016) are labeled by dotted line and gray respectively.

た。

これまでに Fd と Fd 依存酵素群, 例えば Fd-NADP⁺還元酵素 (FNR)²⁾, フェレドキシン-チオレドキシン還元酵素 (FTR)³⁾, 亜硫酸還元酵素 (SiR)⁴⁾などの複合体結晶構造が報告されている (Fig. 1)。多くの酵素で言われているような鍵と鍵穴の関係とはほど遠く, Fd はそれぞれのタンパク質と個別的な相互作用により複合体を形成して, 個別に電子伝達環境を最適化していることが明らかとなってきた。さらに, 電子伝達複合体を形成することで, Fd 側もしくは Fd 依存酵素側に複合体形成に誘導される構造変化が引き起こされる例も示されていた。

これらの先行研究は, 複数の構成成分を含む複合体であっても単結晶を得ることができれば構造解析することが可能であることを示している。しかし, 我々が目指した PSI-Fd 複合体の結晶構造解析は上記のような可溶性タンパク質同士の複合体ではなく, 弱い相互作用で一時的に形成される「膜タンパク質-可溶性タンパク質の過渡的電子伝達複合体」である。膜タンパク質の電子伝達複合体の解析例は, 酵母の cytochrome *b*_{c1} と cytochrome *c*₁ との複合体⁵⁾ やミトコンドリア cytochrome *c* 酸化酵素と cytochrome *c* との複合体構造⁶⁾ と限られており, 困難が予想された。実際, 以下に示す通り, PSI と Fd を含む結晶は得られたが, Fd のタンパク質部分の電子密度がブロードで分子モデルを構築できないという問題に直面した。この困難を克服するために, 我々は天然型 Fd の酸化還元反応中心にある鉄 (Fe) をガリウム (Ga) に置換した [2Ga-2S]型 Fd (Fd[Ga]) を導入した。これが突破口となり, PSI-Fd の複合体構造を解くことに成功した。本稿では

PSI と Fd[Ga] の試料調製や複合体結晶の調製法から構造解析について紹介する。

2. Fd と鉄硫黄クラスター

Fd の最大の特徴は鉄原子と硫黄原子から構成された鉄硫黄クラスターと呼ばれる天然の鉄錯体を有していることにある。Fd を構成するアミノ酸にはチオール基をもつシステインが 4 つあり, 2 原子の鉄に配位している。これらの鉄は 2 原子の無機硫黄によって架橋され, [2Fe-2S]型の鉄硫黄クラスターを形成している。このクラスターを利用して, Fd は低い酸化還元電位を生み出す PSI から電子を受け取る。電子を受け取って還元型になった Fd は, 鉄硫黄クラスターを取り巻くループ構造を変化させることが知られている。この構造変化によって, Fd は PSI から素早く解離すると考えられている。それゆえ, 本研究において PSI と Fd の安定な複合体を得るためには, PSI から電子を受け取ることができない Fd を調製する必要がある。しかし, Fd から鉄硫黄クラスターを除いてしまうと, 安定な構造を維持できない。鉄硫黄クラスターは酸化還元中心としての働きだけでなく, タンパク質構造の安定化にも寄与しているからである。そこで, 酸化型 Fd と同じ立体構造をもつ電子伝達活性を持たない金属置換体を作製することができれば, PSI-Fd 複合体調製に寄与できるのではないかと考えた。配位数 4 の Fe(III) のイオン半径 0.65 Å に近い金属種としてイオン半径 0.62 Å の Ga(III) が挙げられる。これまでも, 含鉄タンパク質において Fe の代わりに Ga を導入した金属置換タンパク質の構造解析例はあるものの, いずれも 1Ga に置換したという報告であった^{7,8)}。Fd も同様に 1Ga への置換例が多く, [2Ga-2S]型クラスターは EXAFS によって確認された一例のみである⁹⁾。そこで, 最初に Fd[Ga] を調製して結晶構造解析を行い, 目的通り天然型 Fd の代替となりうるかを調べた。

3. Ga 置換再構成 Fd(Fd[Ga]) の作製と結晶構造解析

Fd あるいは Fd に近縁な [2Fe-2S]型クラスターを持つタンパク質は細菌から植物, 動物にまで広く報告されており, いずれの生物も [2Fe-2S]型の鉄硫黄クラスターを生合成することができる^{10,11)}。我々は大腸菌を用いてシアノバクテリア由来の組換え体 Fd を調製した。Fd が酸性タンパク質であることを利用してイオン交換クロマトグラフィーなどを用いて単離精製した。単離精製した Fd は赤褐色を呈しており, [2Fe-2S]型の鉄硫黄クラスターを含んでいることが分光学的手法からも確認できた。これまでに報告されている Ga 置換体調製法にならい, 以下の手法でガリウムクラスター再構成を試みた^{8,9)}。まず, 単離精製した Fd 溶液に塩酸を加えて白色沈殿を得た。これは Fd

が鉄硫黄クラスターを失い、変性したことを意味する。沈殿を水に溶解し、そこに塩酸を加えるという作業を3回繰り返して系中から鉄と無機硫黄を除去した。ここで、試料を嫌気条件(99% 窒素, 1% 水素)に移し、可溶化バッファー(100 mM Tris-HCl pH8.0, 6 M グアニジン塩酸塩, 50 mM ジチオナイト)を加えて溶解した。グアニジン塩酸塩はタンパク質変性剤として働き、高濃度のジチオナイトはクラスターの配位子となるチオール基を還元状態に保つ。可溶化したタンパク質を150倍量のリフォルディングバッファー(2 mM Na₂S, 2 mM GaCl₃, 20 mM Tris-HCl, 2 mM DTT)に加え、4°Cで15時間静置した後、陰イオン交換クロマトグラフィーでタンパク質を回収した。その結果、およそ15%の収率でFd[Ga]が得られた。

Gaの再構成実験は嫌気条件下で行なったが、Fd[Ga]は天然型Fdと同様に酸素存在下でも安定であり、結晶化実験は一般的な好気条件下で行なった。天然型Fdの結晶は高濃度の硫酸アンモニウム溶液を沈殿剤溶液として用いられることが多く、Fd[Ga]も硫酸アンモニウムを用いた条件を中心に結晶化条件のスクリーニングを展開して、20°Cに静置し、1種類目の結晶を得た。得られた結晶は外形から単結晶であると思われたが、回折点から non-merohedral twin (反射が割れた双晶)であることがわかった。タンパク質は温度によって運動性が大きく変化するため、結晶化条件のスクリーニングを4°Cで再検討した結果、2種類目の結晶が得られた。2種類目の結晶は晶系が異なり、回折点からも単結晶であることがわかった。最終的に、20 mg/mlのFd[Ga]を用いて、3.24 M 硫酸アンモニウム、90 mM MES 緩衝液pH 6.5, 0.9% 3-メチル-1, 5-ペンタンジオール, 1.8% (w/v) ベンズアミジンを沈殿剤とする条件で良質な単結晶が得られたので、SPring-8におけるX線実験に供した。

まず、結晶を用いてFeとGaの吸収端近傍のXAFSを測定した。FeのK殻励起によるX線吸収端波長は1.7433 Åであるが、その近傍に顕著なピークは得られなかった。一方、GaのXAFSスペクトルではK殻励起によるX線吸収端波長の文献値1.1959 Å近傍の1.19513 Åに顕著なピークが検出された。すなわち、結晶中にFeは存在せず、Gaが存在することを示している。波長0.9000 Åと1.19513 Åにおいて、それぞれ回折データを収集した。天然型のFdの構造を参照して構造解析を進め、最終的に非対称単位中に一分子のFd(2-94 アミノ酸残基)と2原子のGa, 2原子の無機硫黄(S), 結晶化溶液に含まれていた硫酸イオンとベンズアミジン分子を確認した。Gaの位置は波長1.19513 Åで収集したGaの異常散乱データのピークでも確認している。結晶構造において、GaとSは[2Fe-2S]型クラスターと同様の平面型クラスター構造、すなわち[2Ga-2S]型クラスターを形成していた。

4. 天然型FdとFd[Ga]の構造比較

天然型FdとFd[Ga]の結晶構造を比較すると、タンパク質の主鎖炭素C_αのr.m.s.d.は0.286 Å, 全原子のr.m.s.d.は0.549 Åであり、最末端部の違いを除けば、全体構造は非常によく一致していた(Fig. 2A)。次に、金属クラスター構造に着目した。[2Ga-2S]型クラスターはタンパク質では初めての報告であるため、Fd[Ga]の構造精密化計算では、Cambridge Structural Database(CSD)に登録されている4配位Ga二核錯体[Et₄N]₂[Ga₂S₂(SPh)₄]の高分解能構造を参照した。CSDの構造では、Ga-Ga間の距離は2.943 Åである。このGa錯体に対応する4配位[2Fe-2S]錯体である(NEt₄)₂[Fe₂S₂(S-*p*-tol)₄]では、Fe-Fe距離はより長く、2.691 Åである。このような違いはFdの金属クラスターにも反映されており、天然型Fd結晶構造の[2Fe-2S]のFe-Fe間距離が2.68 Åであるのに対して、Fd[Ga]結晶構造のGa-Ga間距離はより長く、3.00 Åだった。尚、Ga-S間距離もFe-S間距離に比べて、やや長くなっている(Fig. 2B)。

次に、金属クラスター周辺の水素結合に着目した。Fdの[2Fe-2S]型クラスターは主鎖との間に複数のNH-S水素結合を形成している。この水素結合ネットワークはタンパク質構造の維持だけでなく、Fdの重要な特徴の一つである著しく低い酸化還元電位をもたらすとされている。FeからGaへの置換は金属クラスター周辺の水素結合の結合長と結合角に変化を与えた。最も顕著な差はCys44 SyとThr46 Oyの原子間距離で、天然型Fdでは3.68 Å, Fd[Ga]では3.02 Åだった。酸化還元電位のチューニングに重要とされるNH-S水素結合の中では、S2-Cys39間に

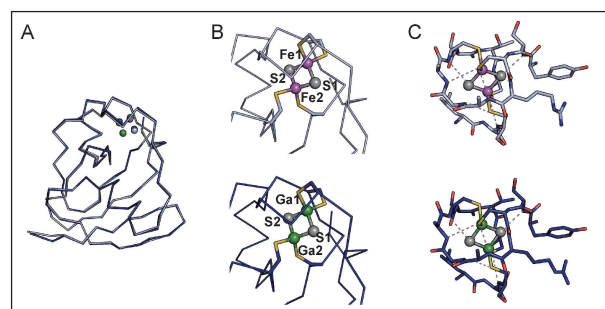


Fig. 2 (Color online) Structural comparison of native Fd and Fd[Ga].

A. Superimposed models of the overall structures of native Fd (light cyan) and Fd[Ga] (deep cyan) are shown in alpha carbon traces. The metal clusters are shown in sphere model in each color codes.

B. Close-up views of the structures around the metal cluster of native Fd (upper panel) and Fd[Ga] (down panel). The coordinating cysteine side chains are shown in stick model in both panels.

C. The hydrogen bond network around the metal cluster of native Fd (upper panel) and Fd[Ga] (down panel). The hydrogen bonds are shown in dotted lines.

顕著な差があり、天然型 Fd では 3.24 Å、Fd[Ga] では 2.88 Å だった。天然型 Fd で確認されている他の水素結合では、原子間距離に 0.1–0.2 Å 程度の差が見られたが、水素結合の数や方向性は保持されており金属クラスターを取り巻く水素結合ネットワークは維持されていると考えられる (Fig. 2C)。

このように、Fe から Ga への置換によって金属間距離や配位子である硫黄原子との結合距離に変化が見られた。しかしながら、Cys 側鎖の柔軟性や主鎖との水素結合ネットワークによって、主鎖構造には大きな影響を与えなかった。実際に、FNR を樹脂に固定したアフィニティークロマトグラフィーを用いて Fd[Ga] と Fd との結合親和性を検証したところ、天然型と同等の親和性を示した。以上の知見から、Fd[Ga] は分子認識能を維持しつつも酸化還元非活性な Fd として PSI との複合体構造解析に有用であると結論づけた¹²⁾。

5. PSI 三量体の結晶化サンプル調製

純度よくタンパク質を精製する手法の 1 つに、Ni アフィニティークロマトグラフィーが挙げられる。遺伝子工学に目的タンパク質に複数のヒスチジンをタグとして組み込む。ヒスチジンの側鎖を構成するイミダゾール基は二価の金属イオンに親和性が高いため、Ni などの金属イオンをキレートした樹脂を利用して特異的な精製が可能となる。筆者の一人は、光合成研究に古くから用いられている常温生シアノバクテリアの一種、*Synechocystis* sp. PCC6803 を用いて、ヒスチジンタグを付加した PsaF (PSI 構成サブユニットの 1 つ) を発現する株を作製し、高活性 PSI を純度よく大量に精製する方法¹³⁾ を確立した経験を持っていた。PSI と Fd との電子伝達複合体の結晶化を進める前に、まず PSI 単独の結晶化スクリーニングを開始した。多くの条件で単結晶が得られたが、いずれも結晶の厚みがなく異方性が高いという問題点があった。再結晶や結晶化法の改良によってモザイク性が改善されたが、回折分解能 5 Å の壁を乗り越えることが困難であった。そこで筆者らは生物種を変更するというアプローチをとった。使用したのは、既に PSI 単独の結晶構造が報告されている好熱性のシアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 である。*Synechocystis* と同様に PsaF に不変したヒスチジンタグを利用する手法をとった。細胞を破碎するには、超音波やビーズ、ガス圧を用いたものが知られている。*T. elongatus* BP-1 の細胞を破碎するには、その中でもマイルドなガス圧力式破碎が適しているとされてきたが、この方法ではチラコイド膜の収量が低いという問題点があった。そこで、筆者らが用いているビードビーターによるビーズ式細胞破碎と Parr Bomb によるガス圧力式細胞破碎の比較を行った。双方の方法で得られたチラコイド膜から PSI を精製し、複合体に含まれる脂質を分析した。そ

の結果、反応中心あたりの脂質分子数は、ビーズ式では 12 分子であるのに対し、ガス圧力式では 10 分子しか検出されなかった。このことから脂質分子をより多く結合しているビーズ式破碎方法を採用した。Ni アフィニティークロマトグラフィーとグリセロール密度勾配遠心法を用いて、*Synechocystis* での PSI 精製と同様に精製を行った。PSI と Fd の複合体を形成させるためには、PSI と酸化型 Fd を混合する必要がある。そこで、PSI による Fd の還元脱離を防ぐ目的でクロロフィルによる光エネルギーの吸収を抑えるために、525 nm の弱い緑色光下で全ての精製を行った。

6. PSI-Fd 複合体の結晶化

PSI と Fd は電子伝達反応を行う際に静電的な相互作用により過渡的に複合体を形成し、生体内では常に解離会合を繰り返していると考えられる。複合体形成の際、塩濃度が低すぎると非特異的な吸着が懸念されると同時に、Fd の構造が不安定化する。一方、塩が濃すぎる場合には静電相互作用が阻害され、複合体を形成できない。そこで PSI と Fd の共結晶を作製するにあたり、まず PSI と Fd の相互作用と塩濃度との関係を検討した。まず、Fd を共有結合で樹脂 (CNBr-activated Sepharose) に固定した Fd カラムを作製した。ÄKTA system (GE Healthcare) を利用して Fd カラムに PSI を吸着させ、NaCl の濃度を徐々に上げることで PSI を溶出させた。溶出のピークは NaCl 濃度が約 100 mM であり、この周辺の塩濃度で適切な複合体が形成されると考えた。

精製した三量体 PSI と Fd を 1:3 のモル比で混合したタンパク質溶液を作製した (44.3 mM HEPES-NaOH buffer (pH 7.8), 2 mM Tris-HCl (pH 7.5), 156 mM NaCl, 8.9 mM MgCl₂, 4.4 mM CaCl₂, 2.7% glycerol, 0.035% n-Dodecyl-β-D-maltopyranoside)。そして、結晶化溶液と 1:1 で混合し、蒸気拡散法 (4°C) にて結晶化スクリーニングを行った。800 条件のスクリーニングの後、複数条件で初期結晶が得られた。しかし、PSI のみの結晶と PSI-Fd 複合体結晶をその色から判断することはできないため、得られた結晶を溶かし SDS-PAGE にてサブユニット分析を行ったところ、1 条件のみではあったが Fd が含まれている共結晶が得られていることを確認できた。その後、結晶化条件の最適化を行い、最終的にバッチ法 (96well バッチプレートに 3 μL のタンパク質溶液と結晶化溶液を混合、透明のテープにて蓋をして 4°C 暗所に静置) にて良質の結晶を得た (結晶化溶液: 41% PEG 200, 100 mM acetate buffer (pH 4.6), 100 mM NaCl)。

回折実験をするにあたり、結晶の抗凍結処理が必須である。本研究では、SPring-8 生体超分子複合体構造解析ビームライン (BL44XU) にて回折実験を行い、抗凍結処理の効果を評価しながら条件を決定した。グルコース、

エチレングリコール、グリセロールなど一般的な抗凍結剤を添加すると結晶が溶解してしまったため、アルコール、塩、ポリエチレングリコール (PEG)、オイルの中から20種類について、その浸透方法、浸透時間を様々な組み合わせで詳細に検討した。最終的に見いだされた最適な条件は、結晶化条件にも含まれる PEG200の濃度を1分おきに1%ずつ38%まで上昇させ、直接液体窒素中に入れて結晶を凍結するという方法であった。抗凍結剤の濃度を上昇させる際は、まず結晶が含まれる体積 $6 \mu\text{L}$ のバッチウェルに安定化溶液よりも1%高い PEG200を含む溶液を直接添加した。1分後に添加した体積の溶液を抜きとり、その後さらに1%高い PEG200を含む溶液を添加した。この作業を最終的に PEG200が38%になるまで繰り返した。結晶を濃度の異なる抗凍結剤に直接移動させると急激な濃度変化にさらされることとなるが、この手法を用いることで抗凍結剤が緩やかに拡散し、よりリニアに濃度を上げることが可能になる。実際、濃度上昇のステップを2.5%、5%刻みにした場合は回折能向上には繋がらなかったため、抗凍結剤を緩やかに浸透させることが重要だったと考えられる。また、膜タンパク質の結晶は非常に柔らかいため、ワンドに取り付けたループで結晶をすくい、1分おきに何度も異なる抗凍結溶液に移し替えることで物理的にダメージを与えてしまう可能性が高まる。結晶が含まれるウェルの中で直接、抗凍結処理を行うことでそのリスクを減らすことができた。このように、結晶化と抗凍結条件の検討において、膨大な種類のスクリーニングができたのは、放射光施設において迅速に結晶の質を評価することができたためであった。

7. 回折実験・構造解析

得られた良質な単結晶を用いて、SPring-8 BL44XU にて最適な露光時間や振動角、X線照射箇所当たり何枚の回折データを取ることができるかを検討した。この結晶の空間群は $P2_1$ であったため全振動範囲 180° の X線回折強度データを収集した。その後、*T. elongatus* BP-1 の PSI 単独の結晶構造¹⁾ (PDB ID: 1JB0) をモデルとした分子置換法で初期位相を決定し、 4.3 \AA 分解能で構造を決定した。異常分散差マップを計算したところ、PSIの末端電子伝達成分 F_B から 8 \AA の距離に Fd の鉄硫黄クラスター由来と思われる強い異常散乱シグナルを確認できた。しかしながら、Fdの主鎖をトレースできるレベルではなかった (Fig. 3)。FdはPSIから電子が受け渡されて還元型となると構造が変化し、前述のような仕組みでPSIから解離する。野生型 Fd を用いた場合に Fd 分子モデルを構築出来なかった理由として、X線照射実験中に Fd が還元され、Fd の PSI からの解離が進んで Fd の占有率が低下したことが原因であると考えた。

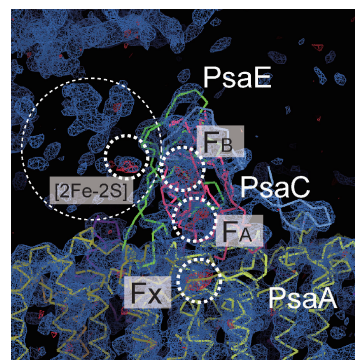


Fig. 3 (Color online) Electron density maps of the PSI and wild type Fd. Densities colored in blue and red are $2|F_o| - |F_c|$ and anomalous Fourier maps. $[2\text{Fe-2S}]$ of Fd, PsaC, PsaD, PsaE, F_A , F_B , and F_X are indicated.

8. PSI-Fd[Ga]複合体の結晶構造解析

そこで前述の生理条件下では酸化還元活性を持たない Fd[Ga]を導入することで、Fdが還元されることによる Fd[Ga]の構造変化を抑制できると期待した。Fd[Ga]を用いた場合も、天然型 Fd での結晶化、抗凍結条件をそのまま適用することができた。得られた単結晶に対して位置を変えて3箇所 X線を照射し、それぞれ振動範囲 180° の回折データを取得した。得られた3つの回折データをマージし SCALA を用いてスケーリングを行った。その後、1JB0を初期モデルとした分子置換法により PSI-Fd[Ga]複合体の構造を 6 \AA で決定した。その結果、見込み通り複合体の構造は安定化され、Fdのタンパク質部分の電子密度を得ることに成功した。 6 \AA の電子密度に Fd の分子モデル (PDB ID: 5AUI) を配置した後、CCP4 の dm を用いて電子密度の平均化および溶媒領域の平滑化を行いながら 4.2 \AA まで位相拡張を行った。今回得られた PSI-Fd[Ga]複合体構造は、分解能が高くないため、既に高分解能で構造決定されている PSI モデルを reference structure (参照構造) として ProSMART により立体化学的束縛制限をかけながら Refmac により精密化を行った。最終的に PSI-Fd[Ga]の全体構造を 4.2 \AA 分解能で決定した (PDB ID: 5ZF0) (Fig. 4A)。

9. 複合体の構造からみえてきたこと

結晶の非対称単位中には PSI 三量体が2分子含まれ、PSI がルーメン側を向かい合わせるように back-to-back でパッキングしていた。そして、全ての PSI プロトマーに Fd が結合していた。2セットの PSI-Fd 複合体は互いにはほとんど変わらない構造をしていたため、以下は上側と名付けた片方の PSI-Fd 構造について記述する。

これまでの通説では、FdはPSIの表在性タンパク質である PsaC, PsaD, PsaE と相互作用して PSI と複合体を

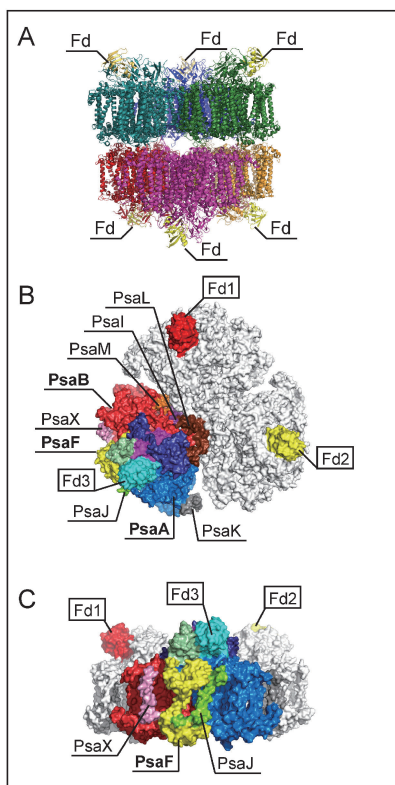


Fig. 4 (Color online) Overall structure of the PSI-Fd complex. A. Three-dimensional arrangement of the two sets of PSI-Fd trimers in the crystallographic asymmetric unit. B. A cytosolic view of the PSI-Fd complex. C. A side view of the PSI-Fd complex.

形成するとされてきた。しかし本構造から、PsaC, PsaE, また膜貫通サブユニットであるPsaAと相互作用して複合体を形成することが明らかとなった (Fig. 4B)。また、PSIからFdへの電子伝達はF_A/F_Bのどちらの[4Fe-4S]クラスターから伝達されるのか議論があったが、酸化還元中心間の距離からPsaCのF_BとFdの[2Fe-2S]クラスター(結晶構造中では[2Ga-2S]クラスター)間で起こることを確認できた。結晶構造中において、クラスター間の距離は、3つのプロトマーで異なり8.3 Åから9.6 Åの開きがあった。F_BとFdの[2Fe-2S]クラスター周辺の化学環境は、補欠分子属間で直接電子伝達を行うのに適した疎水的環境となっていた。さらにこの疎水性領域は、FdとPsaA, PsaEとの静電的相互作用と水素結合で取り囲まれ、複合体が安定化されていた。このようにPSIとFdは階層的な相互作用により分子状酸素への電子を漏洩することなく効率のよい電子伝達反応を行っていることが構造的に示された。

Protein Data Bankに登録されているPSIの単独の立体構造と、本複合体構造を比較することで、Fdの結合はPSI全体の構造変化を引き起こし、効率よく電子伝達や集光反応を行うための微調整を行っている可能性が見いだされたことできた。

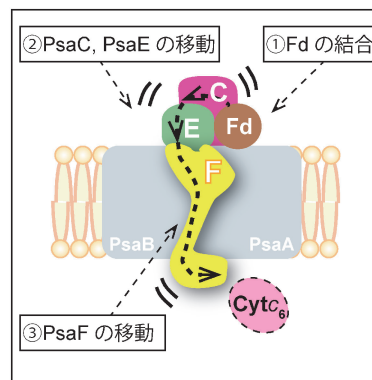


Fig. 5 (Color online) PsaF piston model. The binding of Fd induces the indirect conformational change to the transmembrane subunit PsaF to the luminal side. It may facilitate the efficient electron transfer by sharing the information from the Fd binding site to the Cyt c₆ docking site.

まず注目したのは、チラコイド膜を隔てた細胞質側とルーメン側をつなぐ垂直方向の構造変化である。Fdが細胞質側に存在するPsaCとPsaEに直接相互作用することで、それらがPSI三量体の疑似三回回転中心から外側に向かって移動する。その動きは、PsaEを介して膜貫通サブユニットであるPsaFに伝わり、PsaFが膜の上下に移動することで最終的にルーメン側まで構造変化が伝搬していた。PsaFのN末端近傍は、PSIを還元するcytochrome c₆と呼ばれる小型の電子伝達タンパク質が結合する部位である。PSIはPsaFを介してFdが結合しているという情報をチラコイド膜の反対側に伝えて別の電子伝達タンパク質の結合を制御する可能性が指摘でき、PsaFピストンモデルとして提唱した (Fig. 5)。

もう一つの興味深い構造変化は、チラコイド膜に対して水平方向の動きである。Fdが結合することで、PSI三量体を形成する各プロトマー間の距離が不均一になっていた。これは、PSIの三量体は各プロトマー間で光エネルギーを共有できるという生化学的知見¹⁴⁾を支持する構造変化であり、PSI三量体の各プロトマーが協調して効率よく電荷分離反応を行うための仕組みであるとも考えられる。

このように、PSI三量体はFdが結合したという情報を分子内で共有し、垂直・水平方向に構造を微調整することで効率のよい電子伝達反応及び集光反応を行っている可能性が示された。

10. おわりに

本稿では、PSI-Fd[Ga]複合体の4.2 Å分解能の結晶構造解析の過程を記述した。PSIとFdの複合体は、電子伝達の際に過渡的に形成され、Fdが還元されると直ちにPSIから解離する不安定な複合体である。生体内において

電子伝達後の複合体が迅速に解離することは、電子が淀みなく流れる上で重要であるが、その性質がゆえに電子伝達複合体を安定な単結晶として調製することは非常に困難であった。このような複合体の結晶構造解析を達成するためには、立体構造が天然型と同等であるが電子伝達活性を持たない「金属置換再構成タンパク質」の存在が欠かせなかった。このような手法で複合体形成の理解を深める研究は、本稿で紹介した例に留まらず、生体内の電子伝達反応を理解する上で有用なアプローチだと考えられる。実際、PSIを還元する電子伝達タンパク質であるプラストシアニン(PC)は、中心金属である銅をカドミウム(Cd)や亜鉛、銀(Ag)に置換することで構造は保持したまま電子伝達活性を失活させることが可能である。また、還元型アナログであるAg-PCは酸化型アナログであるCd-PCより24倍も強くPSIに結合することが報告されている^{15,16)}。今後PSI側の相互作用残基を同定することを目指す場合は、Ag-PCを利用したPSI-PC複合体のX線結晶構造解析が有効であろう。また、金属置換再構成タンパク質は、タンパク質が機能している中間体の構造解析にも利用できるかもしれない。その例として、ヘム輸送タンパク質や酸素センサータンパク質が挙げられる。生体内でヘム鉄を輸送する際、タンパク質同士が過渡的な複合体を形成してヘム鉄を受け渡すことによって、生体毒性をもつヘム鉄が細胞内外に漏れ出すことを防いでいる¹⁷⁾。また、一部の鉄硫黄クラスターは高い酸素感受性を有しており、鉄硫黄クラスターの構造変化を利用して酸素センサーとして機能するシグナルタンパク質も知られている¹⁸⁾。これらのタンパク質に不活性な金属を取り込ませることができれば、輸送反応や酸素センシングの中間状態を捉えられると期待できる。

生体内に存在する多種多様なタンパク質のうち、3割は何らかの金属を利用すると言われている¹⁹⁾。今後、金属置換再構成タンパク質を利用することがブレイクスルーとなり、生体内に存在する様々な金属タンパク質やその複合体の構造解析が飛躍的に進むことを期待している。

謝辞

本研究は、SPring-8 BL44XU ビームラインの関係者の方々の支援があって初めて達成されたものです。またFd [Ga]の調製は大阪大学の新村研究員、また本文中では触れていないがNMRによるPSIとFdの相互作用解析については横浜市立大学池上貴久教授と武藤梨沙博士(現、福岡大学理学部助教)に担当していただきました。これらの

方々に感謝申し上げます。また、ヒスチジntag付きのPSIを発現する株を提供して下さった、ルール大学ポーフムのMatthias Rögner教授とMarc M. Nowaczyk先生に御礼申し上げます。最後になりましたが、本稿執筆の機会を与えて下さった日本放射光学会、編集委員の方々に感謝申し上げます。

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金(13J03550, 26870354, 16H06560)、JST-CREST及び、大阪大学の国際共同研究促進プログラムの支援を受けたものです。

参考文献

- 1) P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger and N. Krauss: *Nature* **411**, 909 (2001).
- 2) G. Kurisu, M. Kusunoki, E. Katoh, T. Yamazaki, K. Teshima, Y. Onda, Y. Kimata-Arigo and T. Hase: *Nat Struct Biol* **8**, 117 (2001).
- 3) S. Dai, R. Friemann, D. A. Glauser, F. Bourquin, W. Manieri, P. Schurmann and H. Eklund: *Nature* **448**, 92 (2007).
- 4) J. Y. Kim, M. Nakayama, H. Toyota, G. Kurisu and T. Hase: *J Biochem* **160**, 101 (2016).
- 5) S. R. Solmaz and C. Hunte: *J Biol Chem* **283**, 17542 (2008).
- 6) S. Shimada *et al.*: *EMBO J* **36**, 291 (2017).
- 7) S. Kazanis, T. C. Pochapsky, T. M. Barnhart, J. E. Pennerhahn, U. A. Mirza and B. T. Chait: *J Am Chem Soc* **117**, 6625 (1995).
- 8) X. Xu, S. Scanu, J. S. Chung, M. Hirasawa, D. B. Knaff and M. Ubbink: *Biochemistry-U.S.* **49**, 7790 (2010).
- 9) E. Vo, H. C. Wang and J. P. Germanas: *J Am Chem Soc* **119**, 1934 (1997).
- 10) A. V. Grinberg, F. Hannemann, B. Schiffler, J. Muller, U. Heinemann and R. Bernhardt: *Proteins* **40**, 590 (2000).
- 11) Y. Kakuta, T. Horio, Y. Takahashi and K. Fukuyama: *Biochemistry-U.S.* **40**, 11007 (2001).
- 12) R. Mutoh *et al.*: *Biochemistry-U.S.* **54**, 6052 (2015).
- 13) H. Kubota, I. Sakurai, K. Katayama, N. Mizusawa, S. Ohashi, M. Kobayashi, P. Zhang, E. M. Aro and H. Wada: *Biochim Biophys Acta* **1797**, 98 (2010).
- 14) D. R. Baker, A. K. Manocchi, M. L. Lamicq, M. Li, K. Nguyen, J. J. Sumner, B. D. Bruce and C. A. Lundgren: *J Phys Chem B* **118**, 2703 (2014).
- 15) H. Jansson and O. Hansson: *Biochim Biophys Acta* **1777**, 1116 (2008).
- 16) E. Danielsen, H. V. Scheller, R. Bauer, L. Hemmingsen, M. J. Bjerrum and O. Hansson: *Biochemistry-U.S.* **38**, 11531 (1999).
- 17) J. R. Sheldon and D. E. Heinrichs: *FEMS Microbiol Rev* **39**, 592 (2015).
- 18) A. Volbeda, C. Darnault, O. Renoux, Y. Nicolet and J. C. Fontecilla-Camps: *Sci Adv* **1**, e1501086 (2015).
- 19) S. S. Hasnain: *J Synchrotron Radiat* **11**, 7 (2004).

著者紹介



河合(久保田)寿子

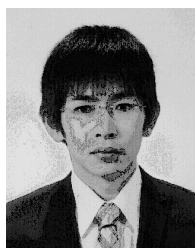
山形大学 理学部 理学科 助教

E-mail: hkawai@nibb.ac.jp

専門：植物生化学

【略歴】

2010年3月東京大学大学院総合文化研究科博士課程修了。2010年4月大阪大学蛋白質研究所 研究員, 2013年4月から大阪大学にて日本学術振興会特別研究員(PD), 2016年9月から基礎生物学研究所にてCREST 研究員, 2017年4月から基礎生物学研究所にて日本学術振興会特別研究員(RPD) を経て2018年10月から現職。



村木則文

自然科学研究機構 分子科学研究所 助教

E-mail: nmuraki@ims.ac.jp

専門：構造生物学, 生物無機化学, タンパク質結晶学

【略歴】

2010年5月東京大学大学院総合文化研究科博士課程修了。2010年6月から大阪大学において日本学術振興会特別研究員(PD), 2011年4月から日本学術振興会特別研究員(SPD)。2013年6月から分子科学研究所特任助教, 2016年4月から現職。



田中秀明

大阪大学 蛋白質研究所 准教授

E-mail: tana@protein.osaka-u.ac.jp

専門：構造生物学, タンパク質結晶学

【略歴】

2000年3月大阪大学大学院理学研究科高分子科学専攻博士後期課程単位取得退学。2002年4月大阪大学蛋白質研究所助手(2007年4月より名称変更により助教)。2014年4月より現職。



栗栖源嗣

大阪大学 蛋白質研究所 教授

E-mail: gkurisu@protein.osaka-u.ac.jp

専門：構造生物学, タンパク質結晶学

【略歴】

1997年3月大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了。1997年4月大阪大学蛋白質研究所助手。2002年4月から2003年10月まで米国Purdue大学で在外研究。2004年4月東京大学大学院総合文化研究科助教(2007年4月より名称変更により准教授)。2009年4月より現職。

Structural analysis of photosystem I-ferredoxin complex using gallium substituted ferredoxin

Hisako KUBOTA-KAWAI

Faculty of Science, Yamagata University
1-4-12 Kojirakawa-machi, Yamagata, Yamagata, 990-8560, Japan.

Norifumi MURAKI

Institute for Molecular Science, National Institute of Natural Sciences,
Higashiyama 5-1, Myodaiji, Okazaki, Aichi, 444-8787, Japan

Hideaki TANAKA

Institute for Protein Research, Osaka University
3-2 Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan

Genji KURISU

Institute for Protein Research, Osaka University
3-2 Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan

Abstract Photosystem I (PSI) is a large pigment-protein complex that mediates light-driven charge separation and generates the most negative redox potential in nature, to reduce the electron carrier protein ferredoxin (Fd). Here we report the X-ray crystal structure of cyanobacterial PSI-Fd complex using gallium substituted Fd. The structure provides a structural basis of electron transfer between PSI and Fd. Furthermore, the structural change of PSI induced by Fd binding revealed that Fd may tune the light harvesting and redox reaction of cyanobacterial PSI trimer.