

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造  
生命科学と先端的基盤技術」  
研究課題「植物の環境適応を実現する過渡的超分  
子複合体の構造基盤」

## 研究終了報告書

研究期間 平成25年10月～平成31年3月

研究代表者：栗栖 源嗣  
(大阪大学蛋白質研究所、教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1)実施概要

植物の環境適応を実現する過渡的超分子複合体の構造基盤解明に向けて、継続性と再現性のある試料調製を行い、X線構造解析のための結晶作成と良質化・構造解析、電子顕微鏡用グリッドの作成と良質な顕微鏡像の取得・条件検討、複合体状態での NMR スペクトル測定条件の検討、相互作用解析を行った。研究開始時の提案では、光合成エネルギー変換超複合体を対象とし、光環境適応機構の中でも最重要な 2 つのしくみ、i) NADPH と ATP の合成バランスを制御する循環型電子伝達と、ii) 強光ストレスから光化学系を保護する非光化学的エネルギー消去機構 (non-photochemical quenching, NPQ) に焦点をあて、これらに關与する過渡的な超分子複合体の構造基盤解明を目指した。X線結晶構造解析を柱に、NMR 分光法や電子顕微鏡構造解析を複合的に用いることで、1) 光アンテナ集光装置を結合した膜タンパク質複合体[光化学系 I (PS1)+フェレドキシン (Fd), PS1-光捕集クロロフィル結合アンテナタンパク質 I (LHC1), 光化学系 II (PS2)-光捕集クロロフィル結合アンテナタンパク質 II (LHC II), NPQ 複合体]のうち、PS1+Fd, PS1-LHC1 の結晶構造を解析し、2) 循環型電子伝達を担う超分子複合体[Cyclic Electron Flow (CEF)超複合体, NADH dehydrogenase like complex I (NDH1 複合体)]のうち、NDH1 複合体の高分解能構造と Fd との相互作用機序について解明することに成功した。

巨大な膜タンパク質複合体の構造解析の場合には、試料の培養条件、チラコイド膜の調製条件などの再現性が、その後の構造解析・相互作用解析に大きく影響する。研究開始から一貫して、構造解析領域(栗栖グループ、川上グループ、Niield グループ)と、生化学領域(皆川グループ)とで、集中的な情報・意見交換を行い、試料調製の再現性を高めることに成功した。並行して、構造解析・機能解析の効率を高める技術手法の確立に努め、X線構造解析および NMR 相互作用解析に用いる金属置換フェレドキシンの高純度・高効率調製法を確立した。また、PS1-LHCI 複合体の X線構造解析においては、8 つある相同な光アンテナタンパク質が 9 つある分子種のどれに対応しているのか、結晶学的 R-factor サーチ法を考案することにより決定することに成功した。

中間評価後に積極的に取り組んだ電子顕微鏡構造解析では、PS1 および PS2 を中心とした超複合体の構造解析において、研究費で雇用した特任教員が開発した GraDeR 処理法(栗栖グループ)や Amphipol(皆川グループ、Niield グループ)を導入したことで、全体として低いバックグラウンドの粒子径のそろった画像を取得できるようになった。

各種超複合体の構造解析を目指す過程で、CEF 複合体形成に深く關与するカルシウム依存性レドックス制御因子を発見し、その構造・機能相関を解明するとともに、NPQ 機構に必須な LHCSR3 タンパク質の発現誘導に、光合成電子伝達と青色光によるフォトトロピン活性化の両方が必要であることも明らかにした。緑藻クラミドモナスは 4 タイプの LHC II をもち (Type I ~IV)、どのタイプによって LHC II trimer が構成され、さらにどのように PSII と相互作用しているのかが明らかになっていなかった。PS2-LHC II 超複合体の精製・結晶化と並行して、緑藻クラミドモナス由来 LHC II trimer の構成成分を明らかにするため、密度勾配超遠心後に得られる LHC II 画分を陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離し、合計 4 つの電荷の異なる LHC II trimer を得ることに成功した。

研究チーム全体として試料調製技術や構造解析技術の向上に努め、主要な巨大膜タンパク質複合体の全体構造と、弱い相互作用で結合する電子伝達タンパク質やアンテナタンパク質との複合体状態の構造を明らかにすることができた。さらに我々の研究チームでは、Fd や LHC II など、弱い相互作用で膜タンパク質と結合する分子の精密な構造解析・生化学解析を重視して研究を進めることにより、今後展開・応用可能な新しい知見を得ることに成功している。

## (2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

### 1. 循環電子伝達を担う NDH1 複合体の電子顕微鏡構造とフェレドキシン (Fd) との結合様式

概要: 結晶化用に改良した twin-strep タグにより精製したシアノバクテリア型 NDH1 を用いて、クライオ電子顕微鏡により光合成型 NDH1 の立体構造を世界で初めて解析した(図 1A, B: *Science* 2019)。Fd 結合部位と推測されている NdhS サブユニットを組換え体として別途調製しX線結晶解析すると共に、 $^{15}\text{N}$ -Fd と  $^{15}\text{N}$ -NdhS を用いた化学シフトパータベーション法により、相互作用部位を検証することができた(図 1C,D)。NMR 解析により想定される Fd との結合様式は、PS1 とは大きく異なり、FNR-Fd の相互作用に近い末端領域を釣糸のように使う“fly-fishing”型の相互作用が確認された。呼吸鎖の Complex I との類似点と相違点が明らかとなり、分子進化の視点でも重要な知見を与えている。

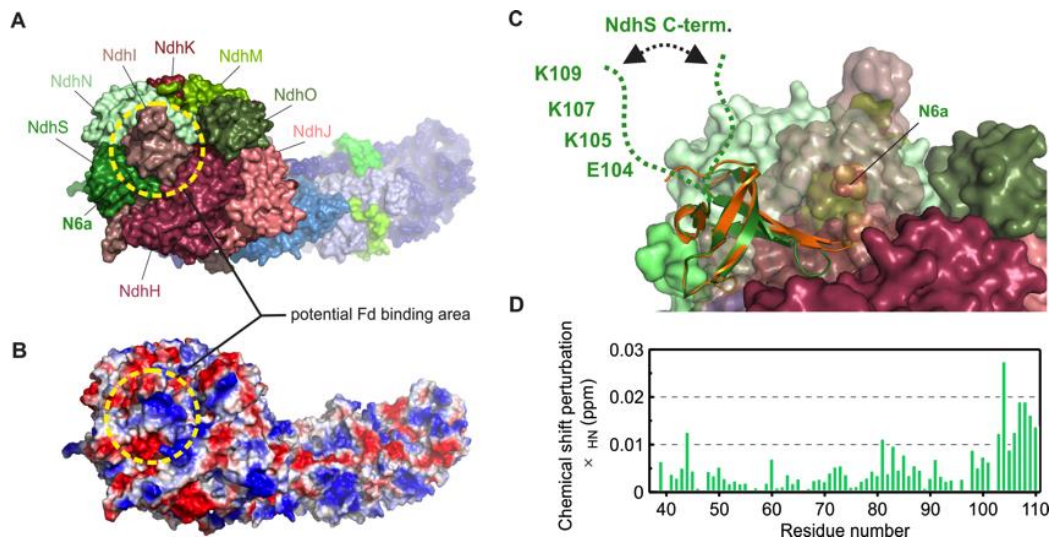


図 1: シアノバクテリア型 NDH1 の電顕構造 (A, B) と, NMR 解析による Fd との相互作用部位解析 (C, D)

### 2. レドックス制御因子の構造・機能解析, 超複合体形成へ寄与

概要: CEF 複合体の形成に深く関与する, 緑藻由来カルシウム依存性レドックス制御因子カルレドキシ (Crx) の同定と, 構造・機能解析を進めた。Crx は葉緑体内で初めて同定されたカルモジュリン様タンパク質で, カルシウム依存性の還元活性を示す。機能解析の結果, カルシウム依存的にペルオキシレドキシ (Prx1) を還元し, Crx の減少や欠損が CEF の形成を誘導することが示された。また, Crx の構造解析からカルシウム依存的に活性を発揮する構造基盤も解明した(図 2: *Nature Commun.* 2016)。その構造・機能相関は国際的に大きな注目を集めており(2016年8月国際光合成会議で口頭発表), 引き続き植物生理学を専門とするドイツ・ミュンスター大学のグループとの共同研究として, Crx と Prx1 との相互作用や CEF への関与を構造・機能解析の両面で検討していく予定である。

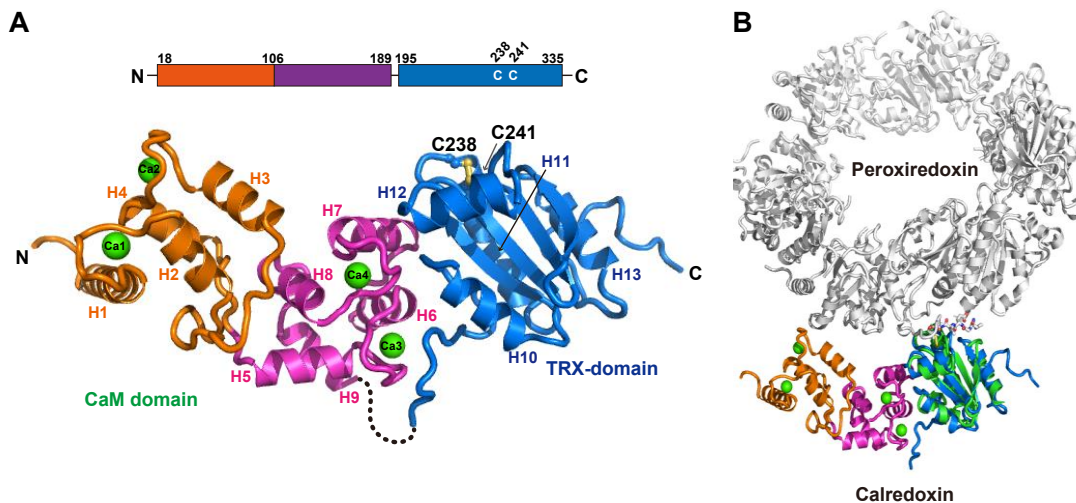


図 2: Crx の  $\text{Ca}^{2+}$  結合型結晶構造(A)と Prx との結合モデル(B)

### 3. NPQ 機構に必須な LHCSR3 タンパク質の発現誘導の仕組みを解明

概要: PS2-LHCII-LHCSR3 超複合体を構成する NPQ 機構に必須な LHCSR3 の発現誘導を調べる過程で、単に光が強だけでは誘導されず、光が強くても  $\text{CO}_2$  が豊富にあれば LHCSR3 の発現は誘導されないこと、光が弱くても  $\text{CO}_2$  が欠乏すれば LHCSR3 の発現が誘導されることがわかった。また、強光の波長も重要で、クロロフィルが吸収する赤もしくは青色光が必要という単純なものではなく、クロロフィルが吸収する波長は必要で、かつ青色光受容体であるフォトロピンを励起する青色光が必要であることが明らかとなった。この結果は、従前の光合成科学、光受容体科学の見方を変えうる大きな成果と考えている。

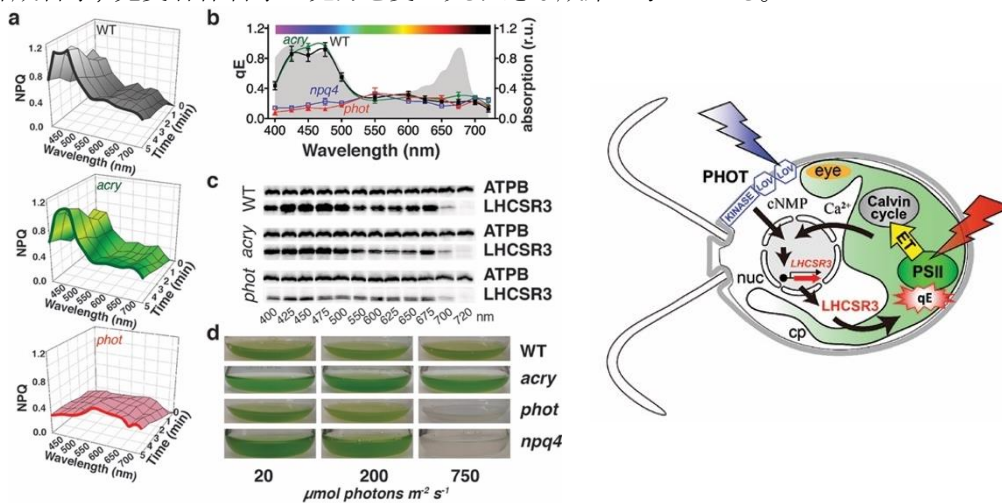


図 3: フォトロピンによる青色光吸収の効果を示した図 (a-d) と、細胞内情報伝達経路の模式図 (右)

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

#### 1. シアノバクテリア型 PS1 と電子受容体フェレドキシン (Fd) の複合体構造解析

概要: シアノバクテリア型 PS1 を用いて、電子受容体であるフェレドキシン (Fd) が結合した電子伝達複合体の構造解析し論文発表した (図 3: *Nature Plants* 2018)。上述の金属置換 Fd を用いることで活性型に固定した電子伝達複合体結晶を得る事に成功した。構造解析の結果、Fd 結合による構造変化を捉えることに成功し、膜貫通ヘリックスを持つ PetF サブユニットが膜を横切る方向に情報を伝達している新しいモデルを提唱することができた (図 3)。電子伝達の

仕組みが明らかになることで、光駆動型の有用酵素を産業利用されている藻類に導入する際、構造に立脚したデザインが可能となる。実際、ドイツ・ルール大学 Matthias Rögner 教授のグループで光駆動型水素ゲナーゼの試験導入が進められた。

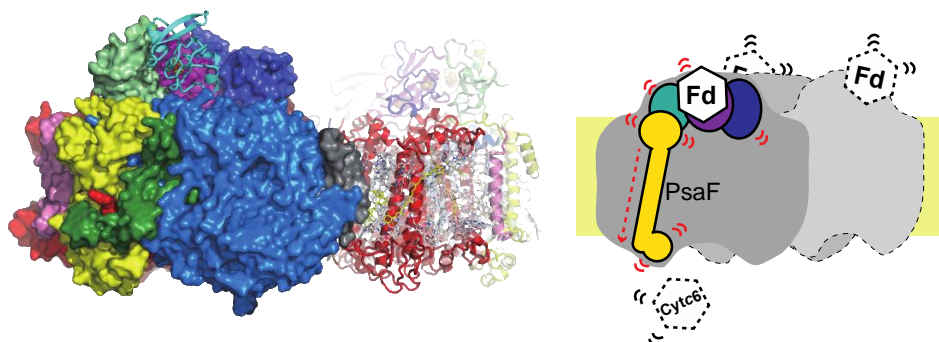


図 4:シアノバクテリア型 PS1 と Fd の複合体結晶構造(左)と、結合に誘起される構造変化の模式図(右)

<代表的な論文>

1. Petroustos, D.\*, Tokutsu, R.\*, Maruyama, S., Flori, S., Greiner, A., Magneschi, L., Cusant, L., Kottke, T., Mittag, M., Hegemann, P., Finazzi, G. & Minagawa, J. “A blue light photoreceptor mediates the feedback regulation of photosynthesis” *Nature*, **537**, 563-566, (2016) DOI:10.1038/nature19358. (\*equal contributions)
2. Kubota-Kawai, H., Mutoh, R., Shinmura, K., Sétif, P., Nowaczyk, M.M., Rögner M., Ikegami, T., Tanaka, H. & Kurisu, G. “X-ray structure of an asymmetrical trimeric ferredoxin–photosystem I complex” *Nature Plants*, **4**, 218–224 (2018) DOI:10.1038/s41477-018-0130-0
3. Schuller, J.M., Birrell, J.A., Tanaka, H., Konuma, T., Wulfhorst, H., Cox, N., Schuller, S.K., Thiemann, J., Lubitz, W., Sétif, P., Ikegami, T., Engel, B.D., Kurisu, G. & Nowaczyk, M.M. “Structural adaptations of photosynthetic complex I enable ferredoxin-dependent electron transfer.” *Science*, **363**, 257-260 (2019). doi: 10.1126/science.aau3613.

## § 2 研究実施体制

(1)研究チームの体制について

### ①「栗栖」グループ

研究代表者:栗栖 源嗣 (大阪大学蛋白質研究所、教授)

研究項目

- ・緑藻 *C. reinhardtii* 由来 PS1-LHC I 複合体の結晶化と構造解析
- ・緑藻 *C. reinhardtii* 由来 CEF supercomplex と関連因子の結晶化とX線構造解析
- ・好熱性ラン藻 *T. elongatus* 由来 NDH-1 複合体の試料調製と構造解析

### ②「皆川」グループ

主たる共同研究者:皆川 純 (基礎生物学研究所・環境生物学領域、教授)

研究項目

- ・PS2-LHC II 超複合体およびその NPQ 複合体の機能解析および構造解析用試料調製
- ・PS1-LHC I 複合体の機能解析および構造解析用試料調製
- ・フェレドキシン依存循環型電子伝達複合体の機能解析および構造解析用試料調製

### ③「川上」グループ

主たる共同研究者:川上 恵典 (大阪市立大学・複合先端研究機構、特任准教授)



研究項目

- ・緑藻クラミドモナス由来 PS2-LHCII 超複合体の結晶化

④ 「Nield」グループ

主たる共同研究者: Jon Nield (Queen Mary University of London, Principal Research Fellow)

研究項目

- ・PS2-LHC II 超複合体および PS2-LHC II-LHCSR3 複合体の構造解析
- ・好熱性ラン藻 *T. elongatus* 由来 NDH-1 複合体構造解析への助言

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について



Molecular Approaches in Biotechnology, Chemical and Molecular Biology

Bioinformatics plays a central role in the understanding of biological processes on molecular level. This symposium tries to underline this importance by eight selected topics involving directly or indirectly informatic processes; they range from small functionalized peptides up to large membrane protein complexes. State-of-the-art methods in combination with bioinformatic tools reveal structural information on atomic level which in turn is the basis for the correlation with functional properties and their application in biotechnological processes. Central topics are the interaction of water-soluble proteins with membrane-embedded protein complexes or the initiation of membrane-harbored processes by light. In both cases processes of significance for the survival of the cells are triggered and information is transferred or transmitted. The extensive use of data bases enables the recognition of similar structural/functional principles behind these processes and is the basis for their modification to optimize biotechnological processes such as the harnessing of energy or the improvement of medical treatments.

PARTICIPANTS	
Prof. Dr. Kazuya Kikuchi (Osaka University)	Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte (RUB)
Prof. Dr. Haruki Nakamura (Osaka University)	Prof. Dr. Klaus Gerwert (RUB)
Prof. Dr. Genji Kurisu (Osaka University)	Prof. Dr. Thomas Happe (RUB)
Prof. Dr. Toshihiko Shikama (Kyoto University)	PO Dr. Marek Nowaczyk (RUB)
AGENDA	
09:30 - 09:55	Nils Metzler-Nolte (Chair Inorganic Chemistry I, Bioinorganic Chemistry, Faculty of Chemistry & Biochemistry, RUB) "Impact of Metal Complexes on the Binding and Activation of G-Protein Coupled Receptor Binding Peptides"
10:05 - 10:30	Kazuya Kikuchi (Dept. of Material & Life Science, Grad. School of Engineering, Osaka Univ.) "New biological findings which were revealed by imaging studies based on chemical probes"
10:40 - 11:10	Coffee Break
11:10 - 11:35	Klaus Gerwert (Chair Biophysics, Faculty of Biology & Biotechnology, RUB) "Integrative Time-resolved FTIR spectroscopy and QM/MM simulations on bacteriorhodopsin and channelrhodopsin"
11:45 - 12:10	Haruki Nakamura (Institute for Protein Research, Lab. of Protein Informatics, Osaka Univ.) "Role of post-translational modification in intrinsically disordered regions to yield some specific interactions among many multi-modal ones"
12:20 - 14:00	Lunch Break
14:00 - 14:25	Genji Kurisu (Institute for Protein Research, Lab. of Protein Crystallography & Lab. of Protein Databases, Osaka Univ.) "Structural atlas of Ferredoxin-dependent proteins in the Protein Data Bank"
14:35 - 15:00	Thomas Happe (Photobiotechnology Group, Plant Biochemistry, Faculty of Biology & Biotechnology, RUB) "Engineering the chloroplast of microalgae as a chassis for the direct production of biohydrogen and chemicals"
15:10 - 15:40	Coffee Break
15:40 - 16:05	Toshihiko Shikama (Dept. of Botany, Graduate School of Science, Kyoto University) "Structure and assembly of the chloroplast NDH complex"
16:15 - 16:40	Marek Nowaczyk (Plant Biochemistry, Faculty of Biology & Biotechnology, RUB) "Structure-function of cyanobacterial Complex I (NDH-complex)"

図 6. 2 国間国際セミナーのポスター(左:2016 年)とウェブ(右:2018 年)

光合成研究者の集積しているフランス CEA-Saclay で Flash absorption spectroscopy の第一人者である Pierre Sétif 博士との共同を開始した。さらに光合成研究の著名な研究者である、ドイツ・ミュンスター大学の Michael Hippler 教授(植物生理学)および、ドイツ・ルール大学の Matthias Rögner 教授(植物生化学)との連携を進め、現在も大学院生や研究者の相互派遣を行っている(ほぼ、毎年 1 名の割合でドイツから大阪大学に来て、日本からもほぼ毎年 1 名がミュンスター大学とルール大学に行って実験を行った)。光合成研究、特に超複合体形成に着目した積極的なネットワーク形成を進めており、岡山大学の高橋裕一郎教授と共に、2016 年 2 月に 2 国間セミナーを開催した(図 6 左)。その後、京都大学の鹿内俊治教授らと連携を拡大し、2018 年 7 月にドイツ・ボーフムにて日独の 2 国間セミナーを開催した(図 6 右)。