

論文の内容の要旨

論文題目 フェレドキシンと光合成膜タンパク質の電子伝達機構の構造生物学的解明

氏名 野本 直子

【序】

光合成明反応は、光エネルギーを利用して、葉緑体チラコイド膜上のタンパク質間の電子伝達を駆動することにより、生命維持に必須な化学エネルギーである ATP と、NADPH を産生する反応である。光合成型フェレドキシン (Fd) は、光化学系 I (PS I) より電子を受け取り、フェレドキシン:NADP⁺還元酵素 (FNR) や、シトクロム *b₆f* (cyt *b₆f*) に電子を渡す (Fig.1)。

Fd および FNR は、葉緑体ストロマに存在する可溶性タンパク質である。PS I および cyt *b₆f* は、ともに、複数のサブユニットおよび補酵素を有するチラコイド膜貫通タンパク質複合体である。Fd、FNR、PS I ならびに cyt *b₆f* の単独状態における立体構造、および Fd/FNR 複合体の立体構造が報告されている。

in vivo における電子伝達速度解析より、Fd-FNR および Fd-cyt *b₆f* 間電子伝達が互いに競合することにより、ATP と NADPH の産生量の調節が可能となることが示唆されている。また、PS I-Fd-FNR 間電子伝達速度解析に基づいて、Fd が PS I および FNR と三者複合体を形成することにより、PS I から NADP⁺ までの電子伝達が効率よく進行するという仮説が提唱されている。

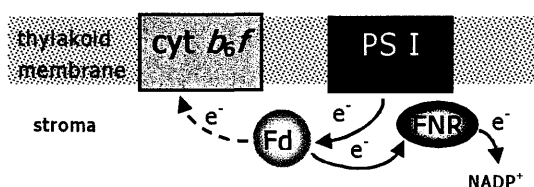


Fig.1 光合成明反応における電子移動経路の模式図。フェレドキシン (Fd) は、電子を光化学系 I (PS I) から受け取り、Fd:NADP⁺還元酵素 (FNR) に渡す (実線矢印)。シトクロム *b₆f* (cyt *b₆f*) は、Fd から直接または間接的に電子を受容する (点線矢印)。

Fd と、光合成膜タンパク質である PS I および *cyt b₆f* との相互作用様式は、これらの電子伝達機構を解明する上で重要である。しかしながら、PS I および *cyt b₆f* が複数のサブユニットからなる、分子量数十万の巨大な膜タンパク質であることに加えて、電子伝達複合体の寿命が短いことから、従来の構造生物学的手法による解析は困難であった。そこで本研究においては、上記のような複合体にも適用できる溶液 NMR 手法である、転移交差飽和 (TCS) 法を用いて、Fd、FNR、PS I および *cyt b₆f* の結合様式を明らかとすることにより、光合成電子伝達機構を解明することを目的とした。

【方法】

光合成膜タンパク質の単離・精製

ホウレンソウの葉よりチラコイド膜を調製し、*n*-dodecyl- β -D-maltoside で可溶化した後、DE52 陰イオン交換クロマトグラフィーおよび密度勾配超遠心で精製することにより、PS I ミセルを調製した。また、ホウレンソウの葉よりチラコイド膜を調製し、コール酸および *n*-octyl- β -D-glucoside で可溶化した後、硫安沈殿、Macroprep Methyl 疎水性クロマトグラフィーおよび密度勾配超遠心で精製することにより、*cyt b₆f* ミセルを調製した。

調製した PS I ミセルおよび *cyt b₆f* ミセルの純度およびサブユニット構成は、SDS-PAGE 解析により確認した。電子伝達活性は、PS I の活性中心 P700 の還元に伴う吸光変化、シトクロム *f*、*b₆*還元反応により確認した。

Fd の発現・精製・ガリウム置換

安定同位体標識を施した *Anabaena* (vegetative form) 由来 Fd I は、大腸菌 BL21(DE3)/pLysS を用いて大量発現させ、超音波破碎後可溶性画分より Q-sepharose FF、Hiload Superdex 75、MonoQ 5/50GL カラムを用いて精製した。Fd の [2Fe-2S] クラスタに含まれる不對電子の影響を排除するために、鉄を、非磁性金属であるガリウム (Ga) に置換した Fd (GaFd) を、先行論文の方法に従って調製した。Ga 置換前後の Fd の立体構造が保持されていることを、NMR スペクトルにより確認した。

以上のようにして調製した PS I、*cyt b₆f* および GaFd を用いて NMR 実験を行った。

【結果】

Fd-PS I 間相互作用

まず、PS I と GaFd の相互作用のタイムスケールを見積もるために、GaFd に対して PS I ミセルを添加する NMR 滴定実験を行った。均一 [¹⁵N]標識 GaFd 70 μ M に対し、PS I ミセルを終濃度 10 μ M となるように添加した時の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルでは、ほぼ全てのシグナルの強度が、PS I ミセル非添加時の 2 分の 1 程度に減少した。このことより、PS I は GaFd と、NMR のタイムスケールに比較して速い交換速度で相互作用していることが明らかとなった。次に、GaFd が、native Fd と同様の結合様式にて、PS I と相互作用しているか調べるため、native Fd による競合実験を試みた。上記の均一 [¹⁵N] 標識 GaFd と PS I ミセルの混合サンプルに対し、終濃度 100 μ M 非標識 native Fd を添加した時、多くのシグナルで、シグナル強度が有意に増加した。以上の結果から、GaFd が、native Fd と同様の結合様式にて、PS I と結合することが判明した。

つづいて、Fd 上の PS I 結合界面を明らかとするために、GaFd と PS I ミセルを用いて、TCS 実験を行った。その結果、ラジオ波照射に伴うシグナル強度減少が大きな残

基は、金属クラスター結合ループ (L37-S47) および $\beta 1'$ - $\alpha 2$ ループ (Q60-F65) に集中して存在し、Fd 分子表面に連続した界面を形成した (Fig.2B)。PS I 結合界面は、疎水性残基と中性残基で構成される Fd の金属クラスター近傍とその縁に存在する E31 および D62 近傍の酸性領域から構成されていた (Fig.2E)。

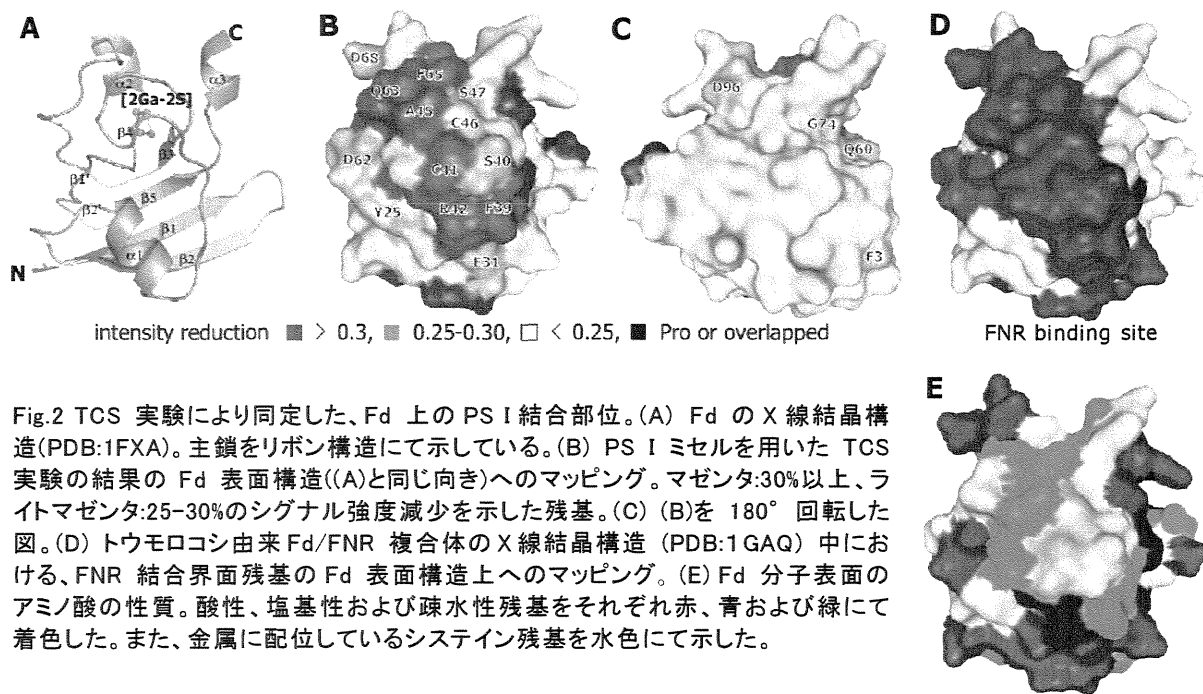


Fig.2 TCS 実験により同定した、Fd 上の PS I 結合部位。(A) Fd の X 線結晶構造 (PDB:1FXA)。主鎖をリボン構造にて示している。(B) PS I ミセルを用いた TCS 実験の結果の Fd 表面構造((A)と同じ向き)へのマッピング。マゼンタ:30%以上、ライトマゼンタ:25-30%のシグナル強度減少を示した残基。(C) (B)を 180° 回転した図。(D) トウモロコシ由来 Fd/FNR 複合体の X 線結晶構造 (PDB:1GAQ) 中における、FNR 結合界面残基の Fd 表面構造上へのマッピング。(E) Fd 分子表面のアミノ酸の性質。酸性、塩基性および疎水性残基をそれぞれ赤、青および緑にて着色した。また、金属に配位しているシステイン残基を水色にて示した。

Fd-cyt b_6f 間相互作用

Fd 上の cyt b_6f 結合界面を明らかとするために、GaFd と cyt b_6f ミセルを用いて、TCS 実験を行った。その結果、ラジオ波照射に伴うシグナル強度減少が大きな残基は、 $\alpha 1$ -ヘリックス (Y25-Q33)、金属クラスター結合ループ (F39-S47) および $\alpha 2$ -ヘリックス (F65-Q70) に集中して存在し、Fd 分子表面に連続した界面を形成した (Fig.3A)。cyt b_6f 結合界面は、金属クラスター近傍の疎水性領域と、その縁に存在する E31、D68 および E95 近傍の酸性領域から構成されていた。

cyt b_6f に対する基質アナログであるアンチマイシン A (AA) は、cyt b_6f に対する他の阻害剤と異なり、Fd からの電子伝達のみを選択的に阻害する。したがって、AA による Fd-cyt b_6f 間電子伝達の阻害様式の解明は、Fd-cyt b_6f 間相互作用様式の解明に有用な知見を与えると考えた。そこで、AA 存在下および非存在下における Fd-cyt b_6f 間相互作用および電子伝達様式を比較することとした。

まず、Fd に対して cyt b_6f ミセルおよび AA を添加する NMR 滴定実験を行った。

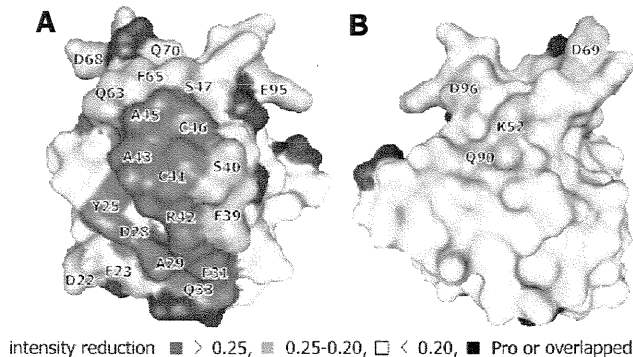


Fig.3 TCS 実験により同定した、Fd 上の cyt b_6f 結合部位。(A) cyt b_6f ミセルを用いた TCS 実験の結果の Fd 表面構造上へのマッピング。マゼンタ:25%以上、ライトマゼンタ:20-25%のシグナル強度減少を示した残基。(B) (A)を 180° 回転した図。

均一 $[^{15}\text{N}]$ 標識 Fd 100 μM に、*cyt b₆f* ミセルを終濃度 10 μM となるように添加したときの $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC スペクトルでは、ほぼ全てのシグナルの強度が、*cyt b₆f* ミセル非添加時の 2 分の 1 程度に減少した。このサンプルに対し、AA を終濃度 100 μM となるように添加したときの $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC スペクトルでは、AA 添加前と比較して、ほぼ全てのシグナルの強度が増加した。このことは、AA が、Fd と *cyt b₆f* の複合体形成を阻害することを示している。

つづいて、TCS 実験により、AA 非存在下と存在下における Fd-*cyt b₆f* 相互作用様式の比較を行った (Fig.4)。ラジオ波照射に伴い 15%以上シグナル強度減少した残基は、AA 非存在下では 48 残基、AA 存在下では 37 残基であったことより、AA 添加に伴って、全体的なシグナル強度減少が減弱することが明らかとなった。この結果は、AA が Fd と *cyt b₆f* の複合体形成を阻害することを支持している。19%以上シグナル強度減少した残基は、AA の有無に関わらず、 α 1-ヘリックス (Y25-E31)、金属クラスター結合ループ (F39-S47) および α 2-ヘリックス (F65-Q70) に集中して存在していたが、金属クラスター近傍に連続した界面を形成する S47、Q63、F65 および D67 (Fig.4 赤)、ならびに C41、Y25 および S40 (Fig.4 水色) において、AA 添加に伴うシグナル強度減少の減弱が観測された。この結果は、Fd-*cyt b₆f* 相互作用におけるこれらの残基の重要性を示している。

さらに、AA による Fd-*cyt b₆f* 間電子伝達の阻害様式を調べるために、*in vitro* における Fd-*cyt b₆f* 間電子伝達活性を測定した。AA 非存在下および存在下において、観測された最大吸光度は同等であった一方、ヘム *b₆* 還元に伴う吸光変化が飽和に達するまでの時間は、それぞれ Fd 添加後約 10 および 20 分であった (Fig.5)。この結果は、AA が、Fd から *cyt b₆f* への電子伝達を比較的弱く阻害することを示している。

【考察】

本研究においては、TCS 実験により、Fd 上の PS I および *cyt b₆f* 結合界面を同定した。Fd 上の PS I 結合界面は、金属クラスター結合ループ (L37-S47) および β 1'- α 2 ループ (Q60-F65) であった。一方、Fd 上の *cyt b₆f* 結合界面は、 α 1-ヘリックス (Y25-E31)、金属クラスター結合ループ (F39-S47) および α 2-ヘリックス (F65-Q70) であることが明らかとなった。PS I 結合界面および *cyt b₆f* 結合界面は、いずれも金属クラスター近傍の疎

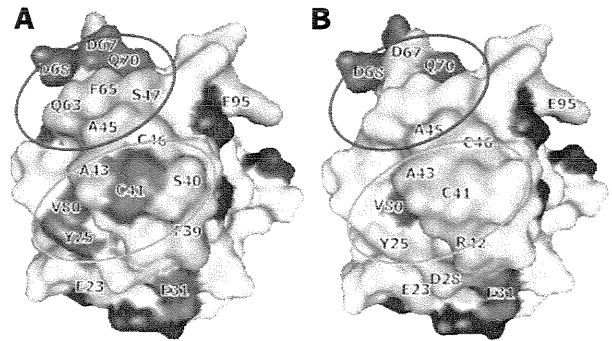


Fig.4 TCS 実験による、AA 非存在下または存在下における Fd-*cyt b₆f* 相互作用様式の比較。(A) AA 非存在下、(B) AA 存在下における TCS 実験において、顕著なシグナル強度減少を示した残基の、Fd 表面構造へのマッピング。マゼンタ:23%以上、ライトマゼンタ:23-19%のシグナル強度減少を示した残基。AA 添加に伴い、シグナル強度減少率が減弱した領域を赤および水色の楕円で示している。

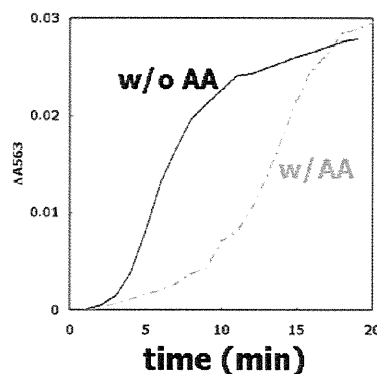


Fig.5 *in vitro* Fd-*cyt b₆f* 間電子伝達反応。ヘム *b₆* の還元に伴う 563nm の吸光度の経時変化を観測した。AA 非存在下および存在下の結果を、それぞれ黒の実線および赤の破線で示している。

水性領域およびその縁に存在する酸性残基を含んでおり、Fd 分子表面に連続した界面を形成していた。金属クラスター近傍の疎水性領域は、疎水性相互作用による Fd と PS I または *cyt b₆f* との複合体の安定化に加えて、電子移動経路としても重要であると考えられる。一方、この領域を取り囲む複数の酸性残基のうち、特に D62 近傍および D68 近傍の酸性クラスターが、それぞれ PS I および *cyt b₆f* との特異的相互作用残基であることが示唆された。これらの酸性残基は、静電相互作用により、PS I-Fd および Fd-*cyt b₆f* 複合体形成ならびに配向決定に寄与すると考える。

本研究において同定した Fd 上の PS I および *cyt b₆f* 結合界面、ならびに X 線結晶構造中における FNR 結合界面 (Fig.2D) は、金属クラスター近傍の疎水性領域を含め、比較的多くの残基が共通している。このことは、チラコイド膜中において、Fd を含む tight な超分子電子伝達複合体が存在しないことを示唆し、Fd はストロマ中を拡散することにより、PS I から FNR および *cyt b₆f* への電子伝達を触媒すると考えられる。一方、Fd-PS I および Fd-FNR 間相互作用が静電相互作用に強く依存することが報告されている。これらの知見に基づき、PS I-Fd-FNR 間高効率電子伝達を可能とする、PS I/Fd/FNR 三者複合体モデルとして、静電相互作用により、PS I 近傍における Fd と FNR の局所濃度が高まる結果、Fd と FNR の会合速度が上昇する機構を提唱する。

これまでに、AA が、Fd から葉緑体中の *cyt b₆f* への電子伝達を阻害することが報告されている一方、単離された *cyt b₆f* との相互作用ならびに電子伝達への AA の作用に関する知見は報告されていなかった。そこで本研究においては、Fd-*cyt b₆f* 間相互作用ならびに電子伝達に対する AA 競合実験より、AA が Fd と *cyt b₆f* の電子伝達複合体の形成を阻害することにより、Fd から *cyt b₆f* への電子伝達を阻害することを明らかとした。一方、*cyt b₆f* に対する AA の結合は比較的弱いことが示唆された。この結果は、先行報告による葉緑体中の *cyt b₆f* に対する AA の作用と合致することより、本研究において明らかとなった Fd-*cyt b₆f* 間相互作用様式および AA による阻害様式は、生理的条件下における Fd-*cyt b₆f* 間電子伝達にも関与していると考えられる。