



日本学術振興会・産学協力委員会

R022 量子構造生物学委員会

第5回研究会資料

2022年3月22日（火）

13:30～15:45

オンライン開催

**R022 量子構造生物学委員会
第5回研究会 プログラム**

2022年3月22日（火）
オンライン開催

13:30 – 13:35

はじめに

委員長・三木邦夫（京都大学）

講 演

司会：副委員長・中川敦史（大阪大学）

13:35 – 14:35 （講演 1）

時間分解 X 線溶液散乱法による光化学反応の構造可視化

高エネルギー加速器研究機構
足 立 伸 一

14:35 – 14:45 休 憩

14:45 – 15:45 （講演 2）

酸化還元状態に留意した精密構造解析と電子伝達複合体形成

大阪大学・蛋白質研究所
栗 栖 源 嗣

時間分解 X 線溶液散乱法による光化学反応の構造可視化

Visualizing Structural Dynamics of Photochemistry with Time-resolved X-ray Solution Scattering

高エネルギー加速器研究機構

足 立 伸 一

Shin-ichi Adachi

High Energy Accelerator Research Organization (KEK)

<https://research.kek.jp/people/adachis/>

【はじめに】

溶液中における光化学反応の研究では、これまで赤外から紫外域における時間分解レーザー分光法が主要な計測法として用いられてきたが、これらの時間分解分光法は価電子帯の電子状態や分子振動に関する情報を与える一方で、分子構造に関しては間接的な情報に限定される。液相の分子構造に関する直接的な情報を与える最も有力な測定法は、X 線による回折・散乱現象を利用した時間分解測定法である。我々はこれまでに、蓄積リング型放射光源施設や X 線自由電子レーザー (XFEL) 施設において、フェムト秒より長い時間領域での時間分解 X 線溶液散乱の計測手法を開拓し、液相における様々な分子構造変化を観測することを試みてきた。本講演では、蓄積リング光源と XFEL を用いた時間分解分子構造解析の例として、金 1 価錯体溶液中の化学結合形成過程の研究例を中心に紹介する。

【研究の概要】

分子内の化学結合が光励起に伴って切断される過程を時間分解で測定する例は良く知られているが、分子間に新たな化学結合が生成する過程を時間分解で追跡する測定については、報告例がほとんどない。その理由は、溶液中の 2 分子反応は原理的に拡散律速となるからである。化学結合が生成する過程を観測するためには、ある特定の時刻において 2 つの反応種が結合を形成するのに十

分近い距離に存在していることが条件となるが、一般に溶液中の2分子反応では拡散が律速過程となるため、そのような条件を溶液中の全ての分子種で満足させることはほぼ不可能である。しかしながら、本研究で用いたジシアノ金(I)錯体 $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ は、金原子間の弱い相互作用により、錯体濃度に依存して基底状態でオリゴマーの構造を形成し、基底状態のオリゴマーに励起光を照射すると、電子が金-金間の結合性軌道に励起され、金原子間に強固な共有結合が生成することが知られている。従って、このジシアノ金錯体の系は、拡散に律速されることなく、光をトリガーとして化学結合が生成する過程を観測することができる珍しい実験系であるといえる [1-3]。

本実験では、フェムト秒からナノ秒に至る幅広い時間領域において時間分解X線溶液散乱法を溶液光反応系に適用することにより、ジシアノ金(I)錯体3量体の基底状態の構造（屈曲型）が、特徴的な分子振動を経て励起状態の構造（直線型）に至る過程を追跡することに成功した [2,3]。なお、基底状態から励起状態への分子構造変化の解釈については、我々の測定から得られた結果と、時間分解過渡吸収測定から得られた結果の解釈が微妙に異なっており [1]、その解釈をめぐっては、まだ議論が続いているところである。本講演では、本実験法の詳細と将来展望について述べる。

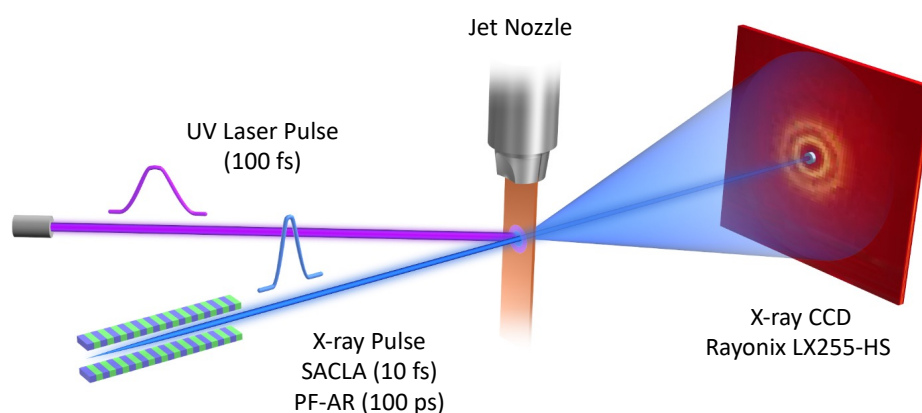


図. 時間分解 X 線溶液散乱実験の模式図

-
1. Iwamura, M., Nozaki, K., Takeuchi, S. and Tahara, T., *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 538 (2013).
 2. Kim, K. H., Kim, J. G., Nozawa, S., Sato, T., Oang, K. Y., Kim, T. W., Ki, H., Jo, J., Park, S., Song, C., Sato, T., Ogawa, K., Togashi, T., Tono, K., Yabashi, M., Ishikawa, T., Kim, J., Ryoo, R., Kim, J., Ihee, H. and Adachi, S., *Nature*, 518, 385 (2015).
 3. Kim, J. G., Nozawa, S., Kim, H., Choi, E. H., Sato, T., Kim, T. W., Kim, K. H., Ki, H., Kim, J., Choi, M., Lee, Y., Heo, J., Oang, K. Y., Ichiyangi, K., Fukaya, R., Lee, J. H., Park, J., Eom, I., Chun, S. H., Kim, S., Kim, M., Katayama, T., Togashi, T., Owada, S., Yabashi, M., Lee, S. J., Lee, S., Ahn, C. W., Ahn, D.-S., Moon, J., Choi, S., Kim, J., Joo, T., Kim, J., Adachi, S., and Ihee, H., *Nature*, 582, 520 (2020).

酸化還元状態に留意した精密構造解析と電子伝達複合体形成

Complex Formation and High-resolution Structural Analysis of the Electron Transfer Complex Considering the Exact Redox State of Each Protein Component

大阪大学 蛋白質研究所

栗 栖 源 嗣

Genji Kurisu

Institute for Protein Research, Osaka University

植物型フェレドキシン (Fd) は、[2Fe-2S]錯体をもつ水溶性の電子伝達蛋白質であり、阪大の田川邦夫名誉教授が米国カリフォルニア大学バークレー校の研究員時代に発見された [1]。葉緑体中でチラコイド膜中の光化学系 I 複合体 (PSI) から電子を受け取ってFd-NADP⁺-還元酵素 (FNR) などのFd依存性代謝酵素へと電子を受け渡す役割を担っている。Fdの最初の結晶構造は鳥取大学勝部研、阪大理学部松原研、そして阪大蛋白研角戸研による共同研究成果として1980年に報告されている [2]。私は1997年に大阪大学蛋白質研究所に助手として着任後直ぐに、植物型FdとFNR複合体の構造研究をスタートさせ、2001年に電子伝達複合体の2.59 Å分解能の結晶構造を報告した [3] (図1)。その後、我々を含むいくつかの研究グループから植物型Fdと別種Fd依存酵素の複合体結晶構造が報告されたが、FdとFd依存酵素の複合体形成では、酵素反応が進行すると複合体が解離してしまうため、全て「酸化型Fd」と「酸化型酵素」の非生理ペアを用いて構造解析が進められてきた [4-6]。本来、電子伝達複合体は酸化還元により解離・会合するのが正常な状態である。したがって[酸化型：酸化型]の複合体は、非生理的な複合体であり厳密な意味で生理的な構造を反映していないのではないか？という懸念を感じながら研究を進めていた。

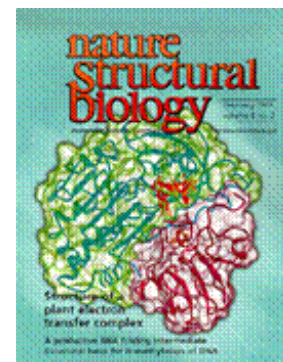


図1. FdとFNRの複合体構造

その後、米国留学で光合成膜蛋白質を対象とした構造解析のノウハウを習得し [7]、電子伝達複合体構造解析の幅をシアノバクテリア型PSIとFdの複合体へと広げた。PSIと野生型Fdの複合体結晶化にトライしたところ、結晶は比較的容易に得られるものの、Fd部分の電子密度が貧弱で構造解析できないという壁にぶち当たった。PSIとFdの構造解析が進まない状況に数年悩まされた後に辿り着いたのが、“酸化還元状態を厳密に取り扱うことの重要性”である。PSIとFdの複合体の場合、生理条件下の複合体形成はPSIが還元型でFdは酸化型である。酸化型FdとPSIとで結晶を作成してクライオ条件下で実験しても、X線照射によりFdが還元されPSIからの解離が始まってしまい、Fdが固定されずに高分解能構造には到達しないと考えたのである。そこで、望ましい酸化還元状態を維持する方法を検討した。

我々は、NMR構造解析のために導入していたFdのin vitro金属置換法を結晶構造解析に導入し、複合体形成の確率を上げることを試みた。X線とNMRを用いた構造解析、さらにアフィニティークロマトグラフィーとCDを用いた構造物性評価により、[2Fe-2S]クラスターを人工的に[2Ga-2S]に置換し再構成したガリウム置換Fd (GaFd) が、酸化型の野生型Fdと同じ立体構造 (側鎖を含めたr.m.s.d.= 0.3Å) をとり、redox活性を持たないことを確認した [8] (図2)。そこまで確認した上で、PSIとFdの複合体結晶化をPSIとGa置換Fdに置き換えて試したところ、主鎖をトレースできるレベルで電子伝達複合体のX線結晶構造解析に成功した [9]。Fdの結合していない構造との比較の結果、Fd結合による構造変化を捉えることにも成功し、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。

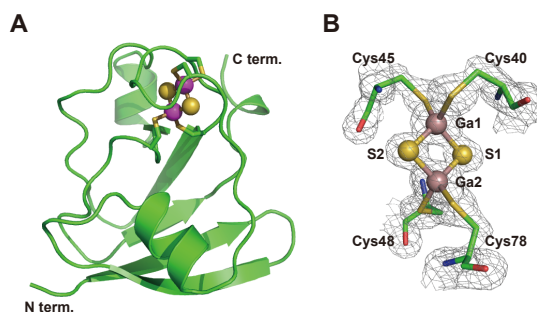


図2. GaFdの構造 (A) 全体構造と (B) [2Ga-2S]クラスターの電子密度

PSIにFdとプラストシアニン（PC）が両方結合したクライオ電子顕微鏡構造が、2020年にNathan Nelson教授のグループから報告された [10]。しかしFdとPCの酸化還元状態に留意していないため、野生型FdとPCの密度マップは非常に貧弱であり、なぜ電子伝達に伴って過渡的複合体が解離するのかが全く議論できていない構造であった。また、対象は異なるものの、光合成型NADH様複合体（Complex 1）とFdとの複合体構造も中国のMei Li教授とMin Lei教授のグループから相次いで報告された [11,12]。双方のケースとも、やはりFdは酸化型Native Fdを混合しただけの構造解析となっており、Fdの局所分解能は著しく低く厳密な議論ができる構造ではなかった。そこで、我々もクライオ電子顕微鏡を用いて、PSIにFd（Ga置換Fd）とCyt c_6 （シアノバクテリアの場合PCではなくCyt c_6 が電子供与体である）を結合した三重複合体の構造解析にトライすることとした。ここでも、酸化還元状態に留意した構造解析は威力を発揮し、PSI : Fd : Cyt c_6 の三重複合体のCryo-EM構造を1.97 Å分解能で構造解析することに成功した [13]（図3）。側鎖の構造変化や、水分子を介した相互作用まで

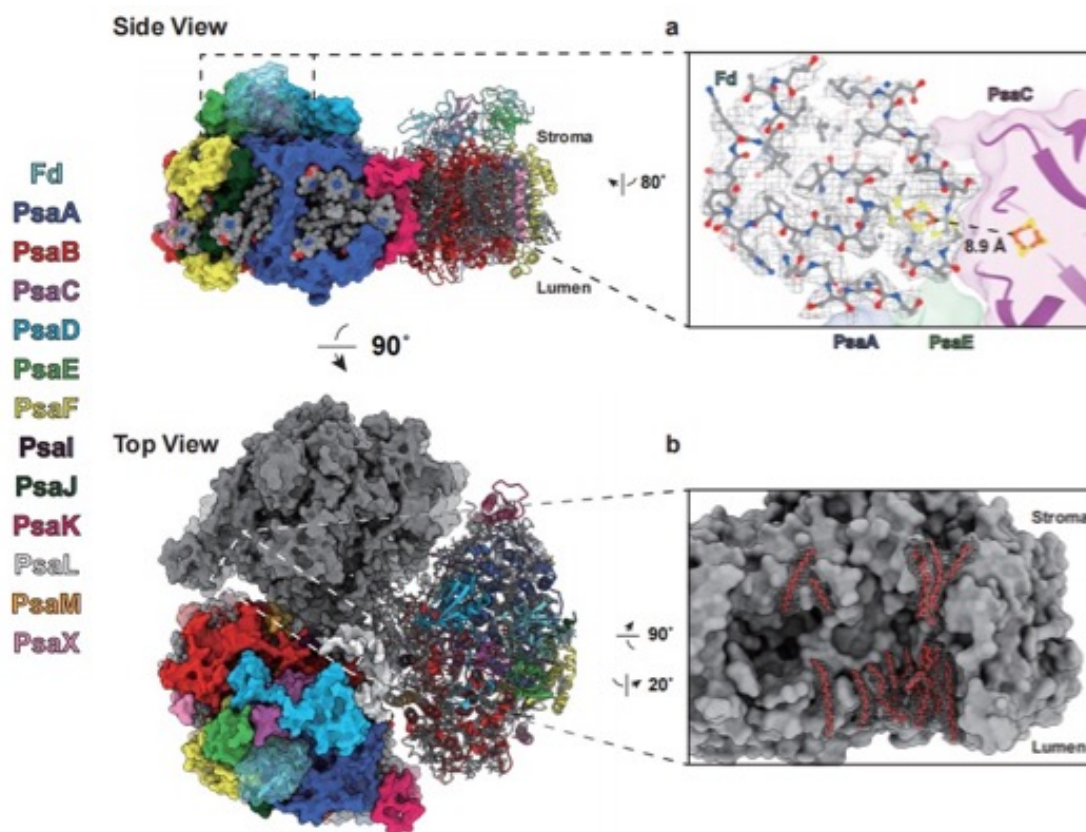


図3. PSIとFdそしてCyt c_6 との三重複合体のクライオ電顕構造

も可視化することができ、特にPSIとFdの複合体形成がエントロピー駆動型であることを明らかにすることができた。

“酸化還元に着目した構造解析”による違いを導き出す構造要因は具体的にどういった構造の違いなのであろうか。Fdの高分解能X線構造から酸化還元に伴う構造変化を議論しようと、数多くのX線結晶構造が報告されてきた。しかし、植物型Fdの酸化還元電位が約-400 mVと非常に低く、Protein Data Bank中の構造は、放射線損傷や不十分な還元剤ソーキングにより酸化型と還元型の混合状態であることが疑われる構造ばかりであった。そこで極めて薄い板状のFd結晶を作成し、顕微分光装置をもちいてX線照射量と結晶中のFdの酸化状態との相関を調べた。その結果、酸化型Fdに特有の吸収ピークがX線の照射に伴い徐々に減衰する様子が観測された [14]。この結果から、結晶の還元率とX線ドーズとの関係を見積もり、照射量を厳密に調整することでX線によるFd結晶の還元を防ぐ実験条件を確立した。確立した放射線量をもとに、厳密な還元型Fdと酸化型Fdの構造解析を0.7 Å分解能で行った。その結果、[2Fe-2S]クラスター周りの僅かな構造変化がドミノ倒しの様に分子内を伝搬し、伝搬される中で変化量が増幅して、分子表面近くのGlu93では2 Åを超える顕著な構造変化となることを明らかにした。

今現在は、酸化還元に伴う水素結合の構造変化を、水素結合の強弱まで可視化できる中性子結晶解析により明らかにしたいと考え、植物型Fd結晶の大型化に取り組んでいる。Fdの最初の結晶構造を解かれた月原先生と共に、40年にわたる植物型Fdの構造研究の歴史を短いレビューにまとめたので、興味のある方は是非ご一読いただきたい [15]。

1. Tagawa, K., Arnon, D.I. Ferredoxins as electron carriers in photosynthesis and in the biological production and consumption of hydrogen gas. *Nature*, 195, 537-543 (1962).

2. Fukuyama, K., Hase, T., Matsumoto, S., Tsukihara, T., Katsube, Y., Tanaka, N., Kakudo, M., Wada, K., and Matsubara, H. Structure of *S. platensis* [2Fe-2S] ferredoxin and evolution of chloroplast-type ferredoxins. *Nature*, 286, 522-5243 (1980).
3. Kurisu, G., Kusunoki, M., Katoh, E., Yamazaki, T., Teshima, K., Onda, Y., Kimata-Ariga, Y., and Hase, T. Structure of the electron transfer complex between ferredoxin and ferredoxin-NADP(+) reductase. *Nature Struct. Biol.*, 8, 117-121 (2001).
4. Dai, S., Friemann, R., Glauser, D.A., Bourquin, F., Manieri, W., Schürmann, P., Eklund, H. Structural snapshots along the reaction pathway of ferredoxin-thioredoxin reductase. *Nature*, 448, 92-96 (2007).
5. Kim, J.Y., Nakayama, M., Toyota, H., Kurisu, G., Hase, T. Structural and mutational studies of an electron transfer complex of maize sulfite reductase and ferredoxin. *J. Biochem.*, 160, 101-109 (2016).
6. Shinohara, F., Kurisu, G., Hanke, G., Bowsher, C., Hase, T., Kimata-Ariga, Y. Structural basis for the isotype-specific interactions of ferredoxin and ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase: an evolutionary switch between photosynthetic and heterotrophic assimilation. *Photosynth. Res.*, 134, 281-289 (2017).
7. Kurisu, G., Zhang, H., Smith, J.L., Cramer, W.A. Structure of the Cytochrome *b₆f* complex of Oxygenic Photosynthesis: Tuning the cavity. *Science*, 302, 1009-1014 (2003).
8. Mutoh, R., Muraki, N., Shinmura, K., Kubota-Kawai, H., Lee, Y.H., Nowaczyk, M.M., Rögner, M., Hase, T., Ikegami, T., Kurisu, G. X-ray Structure and Nuclear Magnetic Resonance Analysis of the Interaction Sites of the Ga-Substituted Cyanobacterial Ferredoxin. *Biochemistry*, 54, 6052-6061 (2015).
9. 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).
10. Caspy, I., Borovikova-Sheinker, A., Klaiman, D., Shkolnisky, Y., Nelson, N. The structure of a triple complex of plant photosystem I with ferredoxin and plastocyanin. *Nature Plants*, 6, 1300-1305 (2020).
11. Pan, X., Cao, D., Xie, F., Xu, F., Su, X., Mi, H., Zhang, X., Li, M. Structural basis for electron transport mechanism of complex I-like photosynthetic NAD(P)H dehydrogenase. *Nature Commun.*, 11, 610 (2020).

12. Zhang, C., Shuai, J., Ran, Z., Zhao, J., Wu, Z., Liao, R., Wu, J., Ma, W., Lei, M. Structural basis for electron transport mechanism of complex I-like photosynthetic NAD(P)H dehydrogenase. *Nature Commun.*, 11, 888 (2020).
13. Li, J., Hamaoka, N., Makino, F., Kawamoto, A., Lin, Y., Rögner, M., Nowaczyk, M.M., Lee, Y.-H., Namba, K., Gerle, G., Kurisu, G. Structure of cyanobacterial photosystem I complexed with Cytochrome c_6 and Ferredoxin at 1.97 Å resolution. *BioRxiv* (2022) doi: <https://doi.org/10.1101/2022.03.01.482405>
14. Ohnishi, Y., Muraki, N., Kiyota, D., Okumura, H., Baba, S., Kawano, Y., Kumasaka, T., Tanaka, H., and Kurisu, G. X-ray dose-dependent structural changes of the [2Fe-2S] ferredoxin from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biochem.*, 167, 549-555 (2020).
15. Kurisu G, Tsukihara T. Forty years of the structure of plant-type ferredoxin. *J. Biochem.*, 171, 19-21 (2022).