

2009B 期の萌芽的研究課題 研究成果報告書

岡山大学大学院 自然科学研究科 バイオサイエンス専攻
0019518 足立秀行

課題番号 2009B1700

利用ビームライン BL41XU

課題名 紅藻 *Cyanidium caldarium* 由来光化学系 II 複合体の X 線結晶構造解析

研究概要

研究背景・目的

酸素発生型光合成は、太陽の光エネルギーを利用し、水と二酸化炭素から生物の生存に不可欠な酸素と有機物を作り出す過程である。このうち、光合成の初期反応である光エネルギーの吸収、生物利用可能な化学エネルギーへの変換は、植物・藻類のチラコイド膜上で行われ、光化学系 I、光化学系 II(以下 PSII とする)と呼ばれる二つの光化学系によって触媒される。PSII は 17 種類の膜貫通タンパク質と 3 種の膜表面性タンパク質を含む、分子量 350 kDa の超分子複合体であり、光エネルギーを利用して一連の電子伝達を行い、水を分解し、酸素を放出する反応を触媒している。PSII における水分解反応は、 Mn_4Ca クラスタによって触媒されるが、PSII の表面性タンパク質は Mn_4Ca クラスタを覆うように存在し、その構造を安定化することで、酸素発生反応に重要な役割を持っている。これらの表面性タンパク質は、原核生物であるシアノバクテリアから高等植物まで異なっている。これまでシアノバクテリア PSII の結晶構造は 3.7-2.9 Å 分解能で報告されているが[1-3]、真核生物由来 PSII の結晶構造は解析されていない。したがって、真核生物 PSII の構造を解明することは、重要な課題の一つとなっている。

紅藻は進化的に最も原始的な真核生物の藻類の一つであり、その光化学系はラン色細菌から高等植物へ移行している段階にある。その PSII の表面性タンパク質はラン色細菌のものと類似している部分もあるが、PSII への結合パターンなど異なっているところもある。さらに紅藻 *Cyanidium caldarium* には、分子量 20kDa の 4 つ目の表面性タンパク質が存在することが報告されている[4-5]。したがって紅藻 PSII の結晶構造もラン色細菌由来のものと異なっているはずであり、それらの構造上の違いを明らかにするためには紅藻 PSII の構造解析が必要である。

本研究の目的は、好熱好酸性紅藻 *Cyanidium caldarium* より PSII を精製、結晶化し、X線構造解析を行うことにより、真核生物由来 PSII と原核生物であるシアノバクテリア PSII の構造を比較し、構造上の違いを明らかにすることである。同時に、紅藻 PSII の酸素発生活性部位を覆っている表面性 20kDa タンパク質の結合様式とその機能を解明する。我々はこれまですでに、紅藻由来 PSII の精製方法を確立し、その結晶化に成功した[6]。その結果、二つの異なる空間群、すなわち、それぞれ $P2_12_12_1$ と $P222_1$ の結晶が得られ、さらに結晶の脱水処理により分解能を向上させ、空間群 $P2_12_12_1$ の結晶については分解能 3.5 Å、空間群 $P222_1$ では 3.8 Å 分解能の回折データを収集した。本申請では、再結晶化による PSII 標品の純度の向上、及び結晶の脱水処理条件の改良による分解能の向上を図った。また重原子同型置換体を作成し、実験位相の取得を試みた。

方法・材料

紅藻 PSII の調製

50l で培養した紅藻 *Cyanidium caldarium* の細胞をガラスビーズによって破碎し、チラコイド膜を調製した。このチラコイド膜を界面活性剤である DM (n -Dodecyl- β -D-maltoside) によって可溶化し、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより PSII 二量体を単離した。

再結晶化

単離した紅藻 PSII 二量体を界面活性剤である sucrose monolaurate を用いて再可溶化し、結晶化 Buffer を添加後、エッペンチューブ内で結晶化を行った。6 時間後に微結晶が析出したので、結晶化溶液を遠心し、沈殿した微結晶を回収・再溶解させた。この作業を 2-3 回繰り返し、得られた PSII 二量体を最終標品とした。

結晶化

再結晶化した PSII 標品は、従来の結晶化溶液組成[6]を用いて、オイルバッチ法により 4°C で結晶化を行った。結晶は約 7 日で 0.4-0.6 mm のひし形に成長し、この結晶を用いて後述の脱水処理・重原子置換を行った。

脱水処理の改良

紅藻 PSII 結晶を透析により緩やかに 35% ポリエチレングリコール(分子量 3000)に置換し、4 日後に相対湿度を 59% に保った状態で air dehydration を行った。またフリーマウンティングシステム(大阪大学蛋白質研究所超分子構造解析学研究系 中川敦史研究室)を用いた脱水処理では、前述の透析による脱水処理まで行った結晶を用いて、相対湿度を変化させた。これらの処理を行った結晶は実験室 X 線装置を用いて予備回折実験を行い、良質な結晶について Spring-8 の BL41XU において回折実験・データ収集を行った。

重原子置換体作成

重原子同型置換体作成は、結晶を脱水処理開始前から重原子溶液に漬け、Native 結晶と同様に抗凍結剤への置換、脱水処理を行った。また重原子種は市販のスクリーニングキットの他に Ta₆Br₁₂、H₃[PW₁₂O₄₀]を用いた。得られた結晶は実験室 X 線装置と Spring-8 BL38B1 で予備回折実験を行い、回折データ収集可能な置換態については BL41XU を利用して回折データを収集した。

結果

再結晶化法による PSII 標品の純度の向上

紅藻 PSII 結晶の分解能を向上させるため、まず標品の純度を向上させるための再結晶化法を確立した。エッペンチューブ内で微結晶を作成し、遠心分画により結晶のみを分離した。Figure 1 は再結晶化前後の標品の SDS-PAGE を示したものであり、再結晶化により PSII を構成するタンパク質以外のタンパク質が除去され、純度が著しく向上したことが示されている。この手法により短時間で高純度の PSII 二量体標品を得ることに成功した。

再結晶化によって純度が向上した標品を用いて結晶化を行ったところ、Figure 2 のような結晶が得られた。この結晶を用いた X 線回折実験の結果、結晶の品質を示すパラメータの一つである *mosaicity* が従来の精製方法で作成した結晶より改善される傾向が見られた。また高分解能を与える結晶の再現性も高く、従来よりも高品質の結晶を得ることができた。

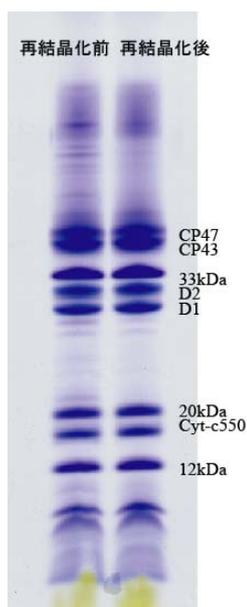


Figure 1. 再結晶化前と後の紅藻 PSII 標品の SDS-PAGE パターン



Figure 2. 再結晶化を行った紅藻由来 PSII の結晶

脱水処理条件の改良

紅藻 PSII の結晶は、脱水処理により分解能が大きく向上することがこれまでの研究で分かっている。分解能をさらに向上させるため、脱水処理を行う際の溶液の組成、脱水処理方法の最適化を試みた。

脱水処理に用いるポリエチレングリコールの分子量のスクリーニングを行った結果、平均分子量 3000 のものが最もよい回折像を与えた。また脱水処理を透析と air dehydration の 2 段階で行うことにより、再現性良く高分解能の回折像を与える結晶を得

ることができた。Spring-8 BL41XU で回折実験を行い、これら結晶化・脱水処理を改良した結晶で最高到達点が 2.5 \AA を超える回折像が得られ、 2.9 \AA の回折データを収集することに成功した(Figure 3, Table 1)。

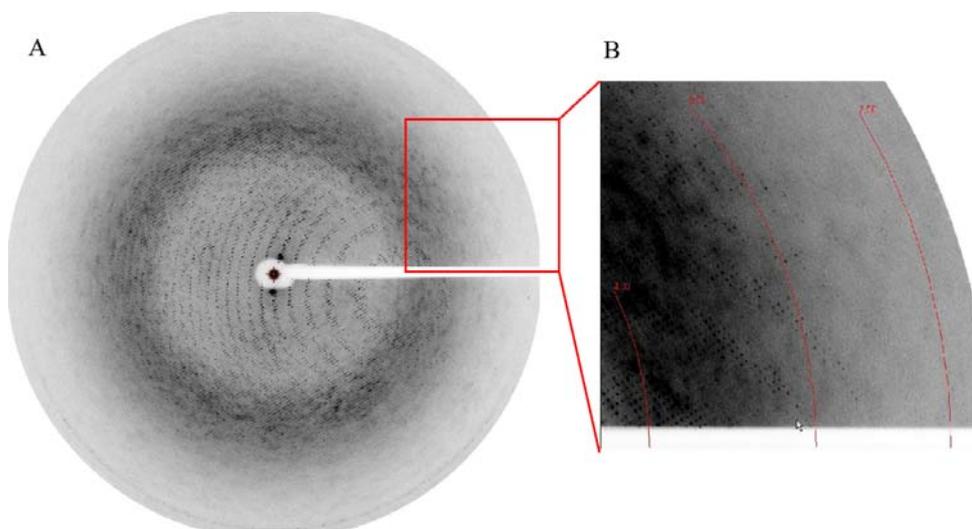


Figure 3. 紅藻 PSII 結晶の X 線回折像

脱水処理条件を改良する試みの 1 つとして、フリーマウンティングシステムによる脱水処理を試みた。脱水処理を全く行っていない紅藻 PSII 結晶では、実験を行う温度である $15^\circ\text{C} \cdot 20^\circ\text{C}$ 条件で溶解してしまうため、透析によって抗凍結剤に置換した結晶を用いた。結晶周囲の相対湿度の変化条件を検索した結果、相対湿度 93% から 80% に $0.1\% / 500\text{sec}$ の速度で脱水させた際に最も良い回折像を与えた(Figure 4)。この結晶を Spring-8 の BL41XU で測定したが、紅藻 PSII 最高分解能である 2.9 \AA には及ばなかった。

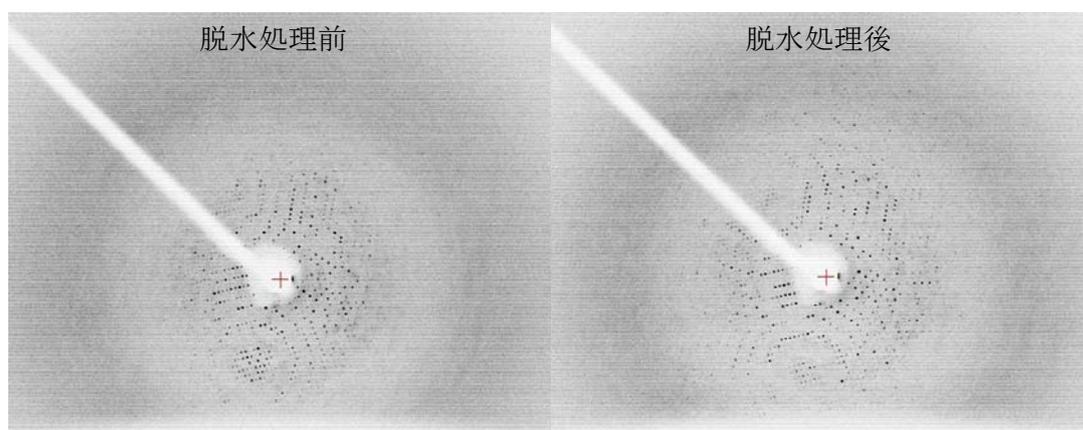


Figure 4. フリーマウンティングシステムを用いた脱水処理を行った結晶の X 線回折像。脱水処理はフリーマウンティングシステムを用いて、相対湿度を 93% から 80% まで、 500sec に 1% の速度で減少させることによって行った。

重原子同型置換体作成

紅藻 PSII の重原子同型置換体を作成するため、各種重原子化合物のスクリーニングを行った。その結果、結晶の安定性・分解能・同型性から $\text{Ta}_6\text{Br}_{12}/\text{K}\{\text{Au}\{\text{CN}\}_2\}/\text{Hg}\{\text{OOCCH}_3\}_2/\{\text{NH}_4\}_2\text{WS}_4/\text{K}\{\text{Pt}\{\text{CN}\}_6\}$ の化合物を選別した。これら重原子置換体結晶の回折データを収集し、 $\text{Ta}_6\text{Br}_{12}$ 誘導体から初期位相を得ることに成功した。

考察

本研究では、真核生物として初めての紅藻 PSII の結晶構造解析を行うため、結晶の分解能向上と重原子同型置換体の検索を行った。

分解能の向上においては、再結晶化法による PSII 標品純度の向上、脱水処理条件の改良を行い、2.9 Å 分解能の回折データを収集することに成功した。またフリーマウンティングシステムによる脱水処理の結果、これまでの最高分解能には届かなかったが、従来の脱水処理よりも回折パターンの異方性が小さい傾向が見られた。今後さらなる脱水処理条件の探索により、より高分解能を与える結晶が得られる可能性が高いと思われる。

重原子同型置換体作成においては、各種重原子のスクリーニングを行い、初期位相を与える重原子置換体のデータを得ることができた。しかし、長時間重原子溶液の漬け置き・air dehydration を行ったために、同型性の悪い結晶が多く、 $\text{Ta}_6\text{Br}_{12}$ 以外の重原子から位相取得に使用できる置換体を得ることはできなかった。今後同型性を高めるため、脱水処理の手法を改良する必要があると思われる。

本申請の研究結果、紅藻 PSII の分解能を 3.5 Å から 2.9 Å に大きく向上させることに成功した。重原子同型置換法による構造解析では十分なデータは得られていないが、現在分子置換法による構造解析を進めており、詳細な真核生物由来 PSII の構造解析が期待される。

Table 1 紅藻 PSII 結晶の結晶学的統計データ

Data set	crystal-1	crystal-2	改良 crystal-2
X-ray source	BL41XU	BL41XU	BL41XU
Resolution/Å	50-3.8	50-3.5	50-2.9
Unique Reflections	84400	194038	330716
Redundancy	6.7 (6.7)	7.4(7.3)	6.0(4.8)
$I/\sigma(I)$	19.6 (1.95)	21.7(2.15)	23.6(1.89)
Completeness(%)	91.0 (86.1)	99.9(100.0)	99.4(98.1)

Space Groups	$P222_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Unit cell dimensions(Å)	$a=146.8$	$a=209.2$	$a=209.6$
	$b=176.9$	$b=237.5$	$b=239.4$
	$c=352.7$	$c=299.8$	$c=299.4$
Unit cell volumes (Å ³)	9.19×10^6	1.49×10^7	1.49×10^7

参考文献

- [1] Kamiya N. and Shen JR (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 98-103.
- [2] Ferreira KN, Iverson TM, Maghlaoui K, Barber J and Iwata S (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* 303:1831-1838.
- [3] Guskov A, Kern J, Gabdulkhakov A, Broser M, Zouni A, Saenger W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat Struct Mol Biol.* 3, 334-42
- [4] Enami I, Iwai M, Akiyama A, Suzuki T, Okumura A, Katoh T, Tada O, Ohta H, Shen JR (2003) Comparison of binding and functional properties of two extrinsic components, Cyt c550 and a 12 kDa protein, in cyanobacterial PSII with those in red algal PSII. *Plant Cell Physiol* 44: 820-827.
- [5] Enami I, Kikuchi S, Fukuda T, Ohta H, Shen JR (1998) Binding and functional properties of four extrinsic proteins of photosystem II from a red alga, *Cyanidium caldarium*, as studied by release-reconstitution experiments. *Biochemistry* 37: 2787-2793.
- [6] Hideyuki Adachi, Yasushi Umena, Isao Enami, Takahiro Henmi, Nobuo Kamiya, Jian-Ren Shen (2009) Towards structural elucidation of eukaryotic photosystem II: Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of photosystem II from a red alga. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 121-128.