AlphaFold2 によるフィコビリソーム ロッドリンカー CpcC2 の 3 次元構造モデリング

菊地浩人・沼尾昇吾・船戸萌衣

3D structure modeling of phycobilisome rod linker CpcC2 with AlphaFold2

Hiroto KIKUCHI, Shougo NUMAO, Moe FUNATO

日本医科大学基礎科学紀要 第53号 抜刷 令和7年1月31日 編集 日本医科大学基礎科学紀要編集委員会 発行 日本医科大学 〈研究論文〉

AlphaFold2 によるフィコビリソーム ロッドリンカー CpcC2の3次元構造モデリング

菊地浩人1·沼尾昇吾2·船戸萌衣2

3D structure modeling of phycobilisome rod linker CpcC2 with AlphaFold2

Hiroto KIKUCHI¹, Shougo NUMAO², Moe FUNATO²

Abstract

Phycobilisomes are supramolecular light-harvesting complexes found in cyanobacteria and red algae. A detailed understanding of their highly efficient light energy transfer requires knowledge of the three-dimensional (3D) structure of the linker proteins that form the phycobilisome rods. In the 3D structural data of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (PDB ID: 7SC8), where the complete phycobilisome structure has been determined, the linker protein CpcC2 is missing several amino acids. To address this, we used AlphaFold2 to model the full 3D structure of CpcC2, ensuring that it is available for future research. Additionally, we briefly discuss the structural properties of its two domains.

-

¹ 日本医科大学・物理学教室 / 数理データサイエンス AI 教育センター Department of Physics/ Center for Mathematics, Data Science, and Artificial Intelligence Education, Nippon Medical School

²日本医科大学

1. Introductio

フィコビリソーム (Phycobilisome, PBS) は、大気の酸素を長い年月かけて作り上げたシアノバクリア (藍藻ともいう) や紅藻のチラコイド膜の細胞質側に存在する集光性超分子会合体で、その代表的な形は、半円盤状 (hemidiscoidal型)をしている。その中心部分は、アロフィコシアニンとリンカータンパク質から成る「コア (core)」と呼ばれる3つのシリンダー形状をした部分で構成され、その側面からフィコシアニンとリンカータンパク質から成る「ロッド (rod)」と呼ばれる6つのシリンダー形状をした部分が結合している(図1参照)。フィコシアニンやアロフィコシアニンには、フィコシアノビリンと呼ばれる可視光を吸収する発色団(色素)が結合している。これらの発色団は可視光を吸収する発色団(色素)が結合している。これらの発色団は可視光を吸収すると電子励起状態になるが、その後発光することはない。発色団によって吸収された光のエネルギーは、何らかの励起エネルギー移動機構によって膜内部にある反応中心まで移動し、化学エネルギーとして利用される「1.2.3.4.5.6.7.8」。発色団の光吸収特性は、第1に分子の幾何学的構造による電子状態に起因し、第2に発色団

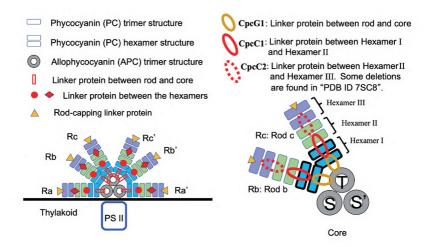


図1. 標準的なフィコビリソーム (Phycobilisome (PBS)) の概観図。PS II は光化学系 II 型反応中心を表す。コアの S, S', 及び T は, コアを形成するシリンダー名。コアのシリンダーは, 紙面表から裏に配置されている。Hexamer I, Hexamer II, Hexamer III は, 著者が説明するために付けた名称。コアに近い側から I, II, III と番号をふっている。

がプロトン化しているか,脱プロトン化しているかなどの発色団分子全体の電荷が中性か否かが重要な要素となり,第3として,発色団周囲の電気的環境によって発色団の位置に作られる電場が重要となる。はじめの2つは,太陽光から光エネルギーを獲得するための大体の吸収波長領域を決定している要素である。第3番目は第1,第2番目で決まる吸収波長領域をより狭い領域に絞る要素である。別の表現をすると,励起エネルギー移動という機構を考えるとき,第3番目は高効率のエネルギー移動を実現するために PBS 内の複数の発色団の電子状態を巧みに調整する役割を果たしているはずである (PBS ではエネルギー効率が95%との報告もある [9.10])。このように,分子進化によって作り出された PBS は,小型で且つ高性能なアンテナ,チューナー,及びエネルギー伝達装置であり,その機構の科学的解明は学問的な知見のみならず,グリーンバイオテクノロジーのプラットフォーム [11] や,人工光合成の開発などのテクノロジーの発展に繋がるものでもある。

PBS の 3次元構造は,1980年代から X 線結晶解析によって明らかにされてきたが,初期の頃はフィコシアニンやアロフィコシアニンの 3次元構造に限られていた。 クライオ電子顕微鏡の進歩により,2020年 3月に紅藻 Porphyridium purpureum の PBS 全 3次元構造が解明されたのを皮切りに,その後立て続けに 3 つの PBS 全 3次元構造が解明された [12,13,14,15]。

図2は、M. A. Domínguez-Martín et al. によって解明されたシアノバクテリア Synechocystis sp. PCC 6803の3次元構造データ [15] を用いて、PBS のロッドのより詳しい3次元構造の説明のために描いたものである。PBS を構成している6 つのロッドは、コアとの接続部分を除いて、全て同じ3次元構造をしている。ロッドは、2種類のフィコシアニン (α サブユニットと β サブユニットと呼ばれている)と4つのリンカータンパク質 (以後リンカーと記述する)から構成されている。図2 (α)は、フィコシアニンの α サブユニットと β サブユニットが結合した部分構造(併せてモノマーと呼ばれている)が3回の対称性をもつ3量体を構成している様子を示したものである。この3量体は、PBS を組み立てている1つの基本構造単位となっている。

発色団フィコシアノビリンは、 α サブユニットでは第82番目のシステイン (CYS) とチオエーテル結合をしていて α 82と呼ばれている。また、 β サブユニットでは、 α サブユニットと同様に第82番目の CYS とチオエーテル結合をしていることに加えて、もう一つの発色団がロッドの側面に存在する第153番目の

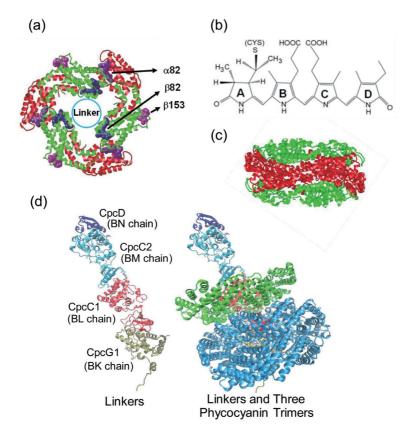


図2. PBS のロッドのより詳しい3次元構造。(a) フィコシアニンの3量体構造 (cartoons 表示)と発色団 (spacefill 表示)。赤が α サブユニットで緑が β サブユニット。中空の部分にリンカーが存在している。(b) 発色団であるフィコシアノビリンの構造式。(c) フィコシアニンの6量体構造 (cartoons 表示)。赤が α サブユニットで緑が β サブユニット。(d) 左はロッドにある4つのリンカー(cartoons 表示)。下側がコアと接続し,上側がPBS の外側に配置される。右側の図は,左側の図にフィコシアニン3量体をコア側から3つ付加したもの。Hexamer I と Hexamer II と本論文で名付けたのコア側3量体が cartoons 表示で描かれている。詳しい説明は,本文を参照。

CYS とチオエーテル結合をしている。これらは、それぞれ、 β 82及び β 153と呼ばれている。図2(b)において、発色団フィコシアノビリンの構造式が描かれている。4つのピロール環はCYSと結合している方から、A リング、B リング、

Cリング,及びDリングと呼ばれている。光吸収波長を決める最も大きな因子は,4つのピロール環とその間の結合で作られる結合交替の共役二重結合系の長さである。図2 (b) に示すように,フィコシアノビリンの構造式(電気的に中性)においては,Cリングの窒素原子はプロトン化していない。しかし,1997年に著者の一人である Kikuchi によって,Cリングの窒素原子も,近くに存在する ASP 側鎖の影響でプロトン化していることが初めて理論計算を通して予測された [16]。また,この ASP 側鎖の揺らぎの大きさがフィコシアニン内で小さく押さえられていることが,基準振動解析によって明らかにされ,プロトン化の安定に寄与していることが指摘された [17.18]。発色団のプロトン化は,その後の研究でも確認され [19.20.21.22.23],現在コンセンサスが取れている。ちなみに,発色団の電気双極子モーメントはエネルギー移動にとって重要な役割を担う物理量である。

基本構造体である3量体を円柱と見立てたとき、その上面と下面は幾何学的な円柱とは異なり、実際には異なる表面構造をしている。この3量体でPBSを組み立てるとき、上面と下面が接して会合体は作られない。上面と上面、また下面と下面が接して会合体を作る。即ち、3量体の上位構造として6量体を作り、PBSを構築している。PBSは一旦形成された後でも、光の強度が小さい環境下でロッドが長くなったり、逆に光の強度が大きい環境下でロッドが短くなったりする。また、光の波長分布の変化に対応して、フィコシアノビリンではなく、異なる発色団を結合した6量体が結合したりする(補色適応) [24, 25, 26]。このような現象では、3量体単位ではなく、必ず6量体単位で機能している。図2(c)は、6量体を側面から描いたものである。

コアも向きは異なるが、ロッドと似た3量体を基本構造として成立している。但し、フィコシアニンではなく、アロフィコシアニンと呼ばれるタンパク質の3量体から構築されている。アロフィコシアニンの3次元構造は、フィコシアニンのそれとほぼ同じであり、主な違いは、 β サブユニットの発色団 β 153が結合するターン部分がなく、従って β サブユニットも発色団が β 82だけであることである。基本構造の3量体の内側には、発色団を付加させる空間的な余裕はない。より多くの光エネルギーを吸収しようとするとき、発色団の数が多い方が有利であるが、ロッドの β 153はより多くの光を吸収できるように進化の過程で生じたものであると推測される。

Kikuchi は、3量体の系において、周囲の電気的な環境の影響を考えてβ153

の光吸収特性を理論計算したところ, β 153が周囲の水の影響で大幅に短波長シフトすることを見出した [27]。この場合, α 82や β 82の光吸収特性と吸収強度のピークが離れ過ぎるために,フェルスターの公式 [28, 29] によればエネルギー移動を起こすことができず, β 153で吸収した光エネルギーは無駄になってしまう。しかし,6量体を作っているもう一つの3量体が作る電気的な影響を考慮すると,水の影響で短波長シフトする状況を揺り戻して, β 153の光吸収特性が α 82や β 82より若干短い波長の吸収特性をもつことがわかった [27]。この理論研究結果は,PBS が6量体を構成して,その6量体単位で機能していることと符号している。

図2 (d) の左側は、ロッドを構成している3量体の中空部分を埋めるように存在しているリンカーを描いたものである。リンカーは4つの鎖から成っていて、図中下側は PBS の中心方向であり、上側は PBS の外側方向である。コアに近い方から、CpcG1、CpcC1、CpcC2、CpcD と名付けられている。括弧内の BK、BL、BM、BN は、蛋白質データバンクに登録されている PDB ID: 7SC8 に記されている鎖名である。図2 (d) 右側は、4つのリンカーに、コア側から数えて3つの3量体を付加して、その様子を示したものである。

本研究テーマの大きな目標は、PBSの構築原理と機能との間の関係を意識しつつ、PBSのロッド内における励起エネルギー移動機構を理論的に解明することである。これまで示してきたことからわかる通り、光吸収特性と励起エネルギー移動には、発色団の電子状態が密接に関係している。また、発色団の電子状態は、その周囲の電気的環境で調整されているので、周囲の電気的環境を明らかにして発色団の電子状態を考える必要がある。

PBS のロッドに関して、リンカーを考慮せずフィコシアニン3量体或いは6量体だけを考えると、PBS のコア側とその反対側 (PBS の外側) との方向性の区別は全くない。ということは、それを区別し、違いを与え、コアへのエネルギー移動機能を作り出しているのは、リンカーということになる。図2 (a) から明らかなように、このリンカーから距離が近く、強い影響を受けているのは、 β 82である。従って、リンカーと β 82との間の相互作用には、特に重きをおいて研究を遂行する必要がある。この点において、ロッドにおいて最も低い電子励起エネルギー状態である β 82だけに関しては、既に理論計算と分光実験から明らかにされている [30.31]。

ところで、M. A. Domínguez-Martín et al. によって解明されたシアノバクテ

リア Synechocystis sp. PCC 6803のロッドの3次元構造データ (PDB ID: 7SC8) のリンカー CpcC2には、N 末端のメチオニン、第182番目から第184番目のグルタミン、グリシン、アスパラギン、第233番目から第235番目のプロリン、グリシン、アルギニン (以後 MET1, GLN182, GLY183, ASN184, PRO233, GLY234, ARG235 と記述する)が欠損している。図3に、第182番目から第184番目の欠損部分と第233番目から第235番目の欠損部分を丸枠で示した。

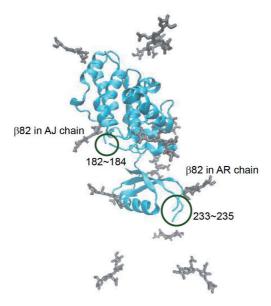


図3. リンカー CpcC2 (Cartoons 表示) の欠損部分の位置と発色団 (Licorice 表示) の位置。丸枠以外に、N末端の MET も欠損している。描かれている12個の β 82発色団のうち、上側6つが Hexamer III に、下側6つが Hexamer II に 存在している。

第182番目から第184番目の欠損部分の直前である第175番目から第181番目までのアミノ酸残基が、AJ鎖の水素を除いた β 82から6Å以内にあることが、本研究の準備計算によって明らかとなった (6Å以内には、それ以外のアミノ酸残基部分もある)。また、同様に、第233番目から第235番目の欠損部分周辺のアミノ酸残基の複数が、AR鎖の水素を除いた β 82から6Å以内にあることが判明した。なお、AJ鎖及びAR鎖の名称は、7SC8 (PDBのID)のファイルで使用されている名称である。水素原子を付けた発色団から6Å(水素を付けていな

い発色団からは6Å以上の距離を意味する)以内にある原子からの電気的な影響は、発色団の電子状態に影響を与えることが過去の研究 [16,27,30] からわかっているので、欠損部分が発色団の電子状態に影響を与え、エネルギー移動の機構に何らかの関与をしている可能性が十分にある。

そこで本論文では、本研究テーマの大きな目標を到達するための1つのステップとして、M. A. Domínguez-Martín *et al.* によって解明されたシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803のロッドの系を対象とし、リンカー CpcC2の3次元構造を AlphaFold2 [32] を利用してモデリングする。本論文の結果のデータは、実験で得られたデータの欠損部分を補い、後続の研究で利用するものとなる。

2. Data and Method

3次元構造データ (PDB ID: 7SC8) のデータを用いた。Google Colaboratory 上で動作する, ColabFold v1.5.5: AlphaFold2 using MMseqs2 [32, 33, 34, 35] を利用して、CpcC2のアミノ酸配列からその3次元構造を予測した。

3. Results

AlphaFold2を利用する際の一般的な方法は、タンパク質のアミノ酸配列(クエリ配列と呼ぶ)を入力するだけである。本研究でも、CpcC2の273個のアミノ酸配列を入力し、計算結果として3次元構造の予測の妥当性の高い rank 順に20個の3次元構造を得た。その中で高い rank 順に10個を、Kabsch の方法 [36] で7SC8の座標に重ね合わせ、RMSD(Root Mean Square Displacement: 平均2乗変位)の値を求めた。その結果を表1に示す。計算は、7SC8のアルファ炭素座標とそれに対応した AlphaFold2の結果のアルファ炭素座標で行われた(欠損部分は計算に反映されていない)。

Rank	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RMSD	0.587	0.594	0.881	0.883	0.627	0.873	0.873	0.877	6.301	6.946

表 1: AlphaFold2 の結果の rank ごとの RMSD の値。欠損部分は計算に反映されていない。

この結果、rank 1から rank 8までの RMSD の値は非常に小さいことがわかり、3次元構造が実験結果とほぼ一致していることを意味している。特に、rank 1と rank 2は水素原子の半径程の違いでしかない。rank 9以降は、急激に RSMD の値が大きくなった。本論文の結果のデータは、7SC8の欠損データを補足する役割がある。従って、RMSD の値が小さい上位 8 個のデータが、今後の研究に利用する候補ということになる。

次に、AlphaFold2の結果から得られた多重配列アライメント (Multiple Sequence Alignment, MSA) の結果を示す。

図4の説明をする。右側の backbone 図では、第2番目から第181番目のアミノ酸を青色で、第185から第273番目のアミノ酸を黄土色で描いている。図左のグラフの縦軸はアミノ酸配列インデックスとなっていて、この図であれば、約5500個の類縁配列が得られたことを意味している。横軸は、アミノ酸の残基番号である。得られた類縁配列各々に対して、細い横の直線が色つきで引かれている。一般に縦軸の上部に行けば行くほどクエリ配列に似ている配列で、下部に行けば行くほどクエリ配列と似ていない配列になっている。白くなっていて何も線が引かれていないように見えるところは、クエリ配列の名残が全くない所、あるいはそもそも配列がない所であると考えて良い。また、黒線で表されているのは、類縁配列における配列被覆率(coverage)を表している。第20番

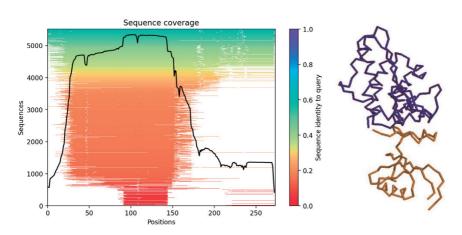


図4. リンカー CpcC2の多重配列アライメント (MSA)。右側は、CpcC2の Backbone 表示。

目から第170番目位は,5500の類縁配列の内多くの相同配列が存在していることを意味している。次に,白黒で印刷されることも想定し,詳しく色を示していく。色は赤から青と表現されていて,その色は "Sequence identity to query" (ここでは以後 SI と省略する)を表している (赤が低く青が高い)。まず縦軸の下部から 500 位は残基番号が 95 から 145 付近だけが SI= $0\sim0.1$ となっている。次に縦軸の値 $500\sim3700$ の区間は SI= $0.1\sim0.3$,軸の値 $3800\sim4200$ の区間は SI= $0.3\sim0.4$,軸の値 $4200\sim5000$ の区間は SI= $0.4\sim0.5$,軸の値 5000 以上の区間が SI>0.5 となっている。

C末端から20番目までの配列に関する議論をここでは保留することにすると、リンカー CpcC2は、2つの異なる性質を持つ部分から成り立っていると考えることができる。第182番目から第184番目の3つのアミノ酸が欠損していたが、丁度その辺りを境にして、性質が分かれていることがわかる(図4右側にアミノ酸番号の第181番目までを青色で示し、第185番目以後を黄土色で示した)。この2つに分けた前者は、pfam00427ドメイン、後者はpfam01383ドメインと名前が付けられている [37.38]。青色で示したpfam00427ドメインは、類縁配列における配列被覆率(coverage)が高いことがわかる。但し、配列相同性(sequence

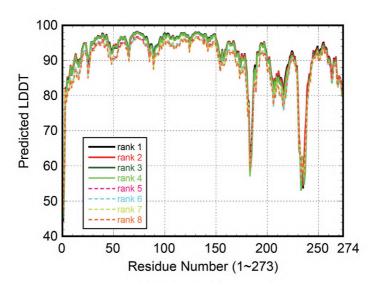


図5. リンカー CpcC2の各アミノ酸のアルファ炭素の predicted local distance different test (pLDDT) の値。rank 1から rank 8までの結果を示した

identity)が高いのはまれなので、アミノ酸単位での変位が起こりやすいことがわかる。また、pfam01383ドメインは、多くの類縁配列の内、この領域をもたないものが多いという結果となった。ここの所は、Discussionでもう少し深く議論したい。

最後に、3次元構造に関して、精度の指標となるアルファ炭素の predicted local distance different test (pLDDT) の結果を示し、予測された構造の図を描いておく。図5は、CpcC2の各アルファ炭素における pLDDT の値をグラフにしたものである。

一般的に、pLDDTの値は、「90以上で3次元構造予測の信頼度が非常に高い」、「70~90では主鎖原子に関しては高い」、「50~70ではやや低い、誤っている可能性を考慮する」、「50以下ではディスオーダー領域の可能性がある。または

残基番号	rank 1	rank 2	rank 3	rank 4	rank 5
1	44.5	45.81	44.88	45.47	48.44
2	59.47	60.09	59.91	59.75	60.91
3	82	82.31	81.81	81.69	81.81
180	86.56	86.12	85.44	84.88	81.62
181	78.81	78.44	76.69	75.56	74.25
182	78	76.44	75.25	73.75	76.25
183	60.94	58.91	59.12	57.19	59.56
184	63.53	60.88	60.78	59.78	60.91
185	69.06	65.56	66.12	63.59	67.38
186	76.56	74.38	74.88	73.31	72.75
187	86.81	86.19	86.25	85.75	82.69
230	80.12	79.62	76.75	76	78.94
231	68.69	68.44	64.56	64.12	67.31
232	64.75	64.75	63.41	63.38	64.81
233	54.38	54.47	53.22	53.25	56
234	60.69	61.47	62.56	62.75	61.16
235	53.78	54.66	58.53	58.84	60.84
236	61.97	62.31	55	55	58.12
237	69.12	69.81	58.56	58.47	68.44
238	73.69	74.31	68.88	68.5	68.25
239	82.31	82.81	79.25	78.75	79.31

表2: リンカー CpcC2の欠損部分周辺の pLDDT の値。青色が欠損しているアミノ酸残基番号。

信用しなくてよい」との評価である。

8つの結果 (rank 1 から rank 8) まで、全てが同じ傾向を示し、rank が低くなると、若干値が小さくなる残基がある程度の結果となった。50を若干切ったのは、欠損していた第1番目の MET だけであった。また、第182~184番目、第233~235番目の欠損領域は、50~70の値となった。その他はいずれも70以上の値を示していて、クライオ電子顕微鏡によるデータと一致する良好な結果となった。pfam01383ドメインの値が pfam00427ドメインの値よりも全体的に低く出ているのは、pfam01383ドメインの配列被覆率が pfam00427ドメインの値よりも低く、AlphaFold2におけるサンプル数が少ないことに起因していると考えられる。また、この領域の3次元構造の安定性が低いことを示しているのかもしれない。

欠損領域に関しては、信頼性が高くは出なかったので、今回得られたデータ を後続の研究に利用する際には注意が必要である。より詳しく記録しておくた

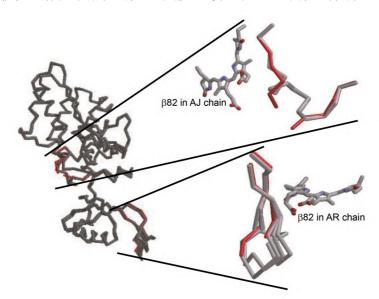


図6. リンカー CpcC2 に関して、PDB ID: 7SC8 の構造と AlphaFold2 で得られた rank 1から rank 8までの構造を重ね合わせたもの。欠損部分周辺である第 175~190番目及び第228~243番目の PDB ID: 7SC8の構造を赤色にした。 右側は欠損部分周辺を拡大して示したもので、rank 1から rank 5までの5つ の構造が PDB ID: 7SC8 の構造に重ね合わされている。

めに、欠損部分周辺の pLDDT の値を表にしておく。

本セクションの最後に、得られた 3次元構造を重ね合わせて示す。図6の左側は、AlphaFold2によって構造予測された rank 1から rank 8までを重ね合わせて backbone 表示させたものである。また、右側は、欠損部分周辺を拡大して示したものである。但し、重ね合わせは rank 1から rank 5までにしてある。実験で得られている PDBID: 7SC8の構造は赤色で示している。リンカー CpcC2の部分を重ね合わせたとき、欠損部周辺以外は、ほぼ実験で得られた 3次元構造と一致していることがわかる。特に、欠損部分である第 $182 \sim 184$ 番目よりも若い残基番号の部分(図4において青色で示した部分)は、あたかも 1つの鎖だけを描いている様に見える。また、第 $182 \sim 184$ 番目の欠損部分周辺でも、rank 1 から rank 5 までの結果がほぼ一致していることがわかる。第 $233 \sim 235$ 番目の欠損部分周辺では、5つの鎖が 3つの鎖に見える。

4. Discussion

PBSのロッドにおけるエネルギー移動の機構を理論的に解明するためには、その周囲の電気的環境を考慮に入れた全ての発色団の電子状態を明らかにする必要がある。まずは、発色団が影響を受ける周囲の電気的環境を考慮するために、リンカーの3次元構造を知らなくてはならない。クライオ電子顕微鏡を利用し、M. A. Domínguez-Martín et al. によって解明されたシアノバクテリア Synechocystis sp. PCC 6803のロッドには、リンカー CpcC2の3次元構造に欠損があるため、本研究では AlphaFold2を利用してその CpcC2の3次元構造の予測を行った。その結果、8つの予想3次元構造が得られ、これらの構造は欠損箇所以外に関して、クライオ電子顕微鏡で明らかにされた構造と全く同じといって良い3次元構造であった(アルファ炭素に関する RMSD の値で1.0Å 未満)。

欠損箇所の構造予測に関して、GLN182、GLY183、ASN184の部分は、8つの候補が全て同じ3次元構造を示し、3次元構造の精度の指標となる pLDDT の値は57~78であった。また、PRO233、GLY234、ARG235の部分は、複数の候補が同じ3次元構造を示したが、微妙に違う3次元構造も存在し、pLDDT の値は、53~63であった。これらの値は、モデリングした3次元構造が信用できないとまでは言えない値であり、後続の研究で利用する際には、本研究結果の評価を踏まえて取り扱う必要がある。C 末端の MET1 に関しては、鎖の末端で揺らぎが

他の位置に比べて大きいことが考えられるので、そのことを考慮して得られたデータを利用すれば良いだろう。具体的には、今回求められたデータを初期条件とし、未決定の部分以外を固定した分子動力学計算や分子軌道法を用いた計算を行って、より適切と思われる3次元構造を模索していくことが考えられる。

GLN182, GLY183, ASN184の欠損周辺部分は, AJ 鎖の β 82の電子状態に影響を与えそうであり、PRO233, GLY234, ARG235の欠損周辺部分は, AR鎖の β 82の電子状態に影響を与えそうであったが、AlphaFold2の結果による構造からも、正に、ロッド内のエネルギー移動に関してリンカー CpcC2が重要な影響を与えていることは確実であろう。後続の研究が待たれる。

リンカー CpcC2の MSA の結果、pfam00427ドメインと pfam01383ドメインの性質の違いがはっきりと表れていた。pfam00427ドメインは、類縁配列として存在している一方、pfam01383ドメインは類縁配列として存在しているものが少ない。この領域すらなくなってしまっている類縁配列も多い。PBS のリンカーを想定したとき、pfam00427ドメインは基本的に存在し、pfam01383ドメインは、3次元構造の変化によって発色団への影響を変化させているのではないかと予想される。また、類縁配列は存在するが、pfam00427ドメインはアミノ酸単位における変位は多いと考えられるので、pfam00427ドメインでは、発色団に対して、3次元構造は変化せずにアミノ酸の変異によって影響を与えるので

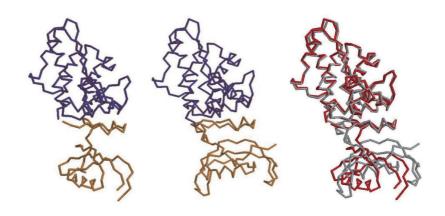


図7. CpcC2 (左) と CpcC1 (中) の3次元構造の比較のための backbone 表示。一番右は, pfam00427ドメイン部分 (上部青色) で CpcC2 (赤色) と CpcC1 (灰色) を重ね合わせた backbone 表示。

はないかと考えられる。

CpcC2よりも1つコアに近い位置に存在するリンカー CpcC1も, 基本的に pfam00427ドメインと pfam01383ドメインとから成り立っている。図7は, CpcC2の backbone 表示 (左), CpcC1の backbone 表示 (中), 及び CpcC2と CpcC1を pfam00427ドメイン部分で重ね合わせた backbone 表示 (右)である。

CpcC2と CpcC1の pfam00427ドメインを重ねると、ほぼ一致することが図7の(右)からわかる。一方、CpcC2と CpcC1の pfam01383ドメインの構造が一致していないことはやはり図7からわかる。CpcC2の MSA の結果から予想される pfam00427ドメインと pfam01383ドメインの特徴が、既に同一 PBS 内の隣り合うリンカーに表れている。また、一番コアに近いリンカー CpcG1には、pfam00427ドメインが存在するが、pfam01383ドメインは存在しない。まとめておくと、「pfam00427ドメインは3次元構造を保持したままでアミノ酸の変異によって発色団に電気的な影響を与え、pfam01383ドメインは、構造自体の変化まで通して発色団への影響を与えている、」と MSA の結果(分子進化の観点)を通じて推測することができる。分子進化が発色団に影響を与えて機能を生む方法が垣間見える観点である。

本研究で得られたデータは、具体的に PBS ロッド内の全発色団の電子状態を計算して求めていく等の後続の研究に利用されることになるであろう。また、リンカーの2つのドメインの分子進化による3次元構造と発色団 β 82の電子状態との間の関係は、PBS ロッドにおけるエネルギー移動に関して重要な知見を与えるように思われる。

References

- [1] Gantt, E. Phycobilisomes. *Ann. Rev. Plant Biol.* **32**, 327-347 (1981). https://doi.org/10.1146/annurev.pp.32.060181.001551
- [2] Gantt, E. Supramolecular Membrane Organization. Supramolecular Membrane Organization. in *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (ed. Bryant, D. A.) 119-138 (Springer, Dordrecht, the Netherlands, 1994). https://doi.org/10.1007/978-94-011-0227-8_6
- [3] Sidler, W. A. Phycobilisome and Phycobiliprotein Structures. in *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (ed. Bryant, D. A.) 139-216 (Springer, Dordrecht, the Netherlands, 1994).
 - https://doi.org/10.1007/978-94-011-0227-8 7

- [4] Mimuro, M, Murakami, A. & Kikuchi, H. Phycobilisomes: supramolecular assembly in cyanobacteria for capturing of light energy. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 42, 2613-2625 (1995).
 - https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ac0tkksb&vo=42&nu=16&st=2613
- [5] Bryant, D. A. & Canniffe, D. P. How nature designs light-harvesting antenna systems: design principles and functional realization in chlorophototrophic prokaryotes. *J. Phys. B: Atomic, Molecular and Optical Physics* **51**, 033001 (2018). https://dx.doi.org/10.1088/1361-6455/aa9c3c
- [6] Adir, N., Shira, B. -Z. & Harris, D. The amazing phycobilisome. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 1861, 148047 (2020). https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2019.07.002
- [7] Blankenship, R. E. Molecular Mechanisms of Photosynthesis (John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, 2021). https://books.google.co.jp/books?id=-ns5EAAAQBAJ
- [8] Sanchez-Baracaldo, P., Bianchini, G., Wilson, J. D. & Knoll, A. W. Cyanobacteria and biogeochemical cycles through Earth history. *Trends Microbiol.* 30, 143-157 (2022). https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.05.008
- [9] Glazer, A. N. Light guides: Directional energy transfer in a photosynthetic antenna.
 J. Biol. Chem. 264, 1-4 (1989).
 https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)31212-7
- [10] MacColl, R. Cyanobacterial Phycobilisomes. J. Struct. Biol. 124, 311-334 (1998). https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.4062
- [11] Kumar, J., Singh, D., Tyagi, M. B. & Kumar, A. Cyanobacteria: Applications in Biotechnology. in *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications* (eds. Mishra, A. K., Tiwari, D. N. & Rai, A. N.) 327-346 (Academic Press, London, United Kingdom, 2019).
- [12] Ma, J. et al. Structural basis of energy transfer in Porphyridium purpureum phycobilisome. Nature 579, 146-151 (2020). https://doi.org/10.1038/s41586-020-2020-7
- [13] Kawakami, K. et al. Structural implications for a phycobilisome complex from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus vulcanus*. Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics 1862, 148458 (2021). https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2021.148458
- [14] Zheng, L. et al. Structural insight into the mechanism of energy transfer in cyanobacterial phycobilisomes. Nat. Commun. 12, 5497 (2021). https://doi.org/10.1038/s41467-021-25813-y
- [15] Domínguez-Martín, M. A. et al. Structures of a phycobilisome in light-harvesting

- and photoprotected states. *Nature* **609**, 835-845 (2022). https://doi.org/10.1038/s41586-022-05156-4
- [16] Kikuchi, H., Sugimoto, T. & Mimuro, M. An electronic state of the chromophore, phycocyanobilin, and its interaction with the protein moiety in C-phycocyanin: protonation of the chromophore. *Chem. Phys. Lett.* 274, 460-465 (1997). https://doi.org/10.1016/S0009-2614(97)00659-3
- [17] Kikuchi, H., Wako, H., Yura, K., Go, M. & Mimuro, M. Significance of a Two-Domain Structure in Subunits of Phycobiliproteins Revealed by the Normal Mode Analysis. *Biophys. J.* 79, 1587-1600 (2000). https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76409-5
- [18] Mimuro, M. & Kikuchi, H. Antenna Systems and Energy Transfer in Cyanophyta and Rhodophyta in *Light-Harvesting Antennas in Photosyn- thesis* (eds. Green, B. R. & Parson, W. W.) 281-306 (Springer, Dordrecht, the Netherlands, 2003). https://doi.org/10.1007/978-94-017-2087-8
- [19] Kneip, C., Hildebrandt, P., Németh, K., Mark, F. & Schaffner, K. Interpretation of the resonance Raman spectra of linear tetrapyrroles based on DFT calculations. *Chem. Phys. Lett.* 311, 479-484 (1999). https://doi.org/10.1016/S0009-2614(99)00868-4
- [20] Alexander, D. B. et al. Developing a Structure-Function Model for the Cryptophyte Phycoerythrin 545 Using Ultrahigh Resolution Crystallography and Ultrafast Laser Spectroscopy. J. Mol. Biol. 344, 135-153 (2004). https://doi.org/10.1016/j.imb.2004.09.044
- [21] Wan, J., Xu, X., Ren, Y. & Yang, G. A Time Dependent Density Functional Theory Study of α-84 Phycocyanobilin Chromophore in C-Phycocyanin. J. Phys. Chem. B 109, 11088-11090 (2005). https://doi.org/10.1021/jp0515380
- [22] Mroginski, M. A., Mark, F., Thiel, W. & Hildebrandt, P. Quantum Mechanics/ Molecular Mechanics Calculation of the Raman Spectra of the Phycocyanobilin Chromophore in α-C-Phycocyanin. *Biophys. J.* 93, 1885-1894 (2007). https://doi.org/10.1529/biophysj.107.108878
- [23] Corbella, M., Toa, Zi S. D., Scholes, G. D., Luque, F. J. & Curutchet, C. Determination of the protonation preferences of bilin pigments in cryptophyte antenna complexes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20, 21404-21416 (2018). http://dx.doi.org/10.1039/C8CP02541J
- [24] Yamanaka, G. & Glazer, A. N. Dynamic aspects of phycobilisome structure. Arch. Microbiol. 124, 39-47 (1980). https://doi.org/10.1007/BF00407026

- [25] Grossman, A. R., Schaefer, M. R., Chiang, G. G. & Collier, J. L. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 57, 725-749 (1993). https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/mr.57.3.725-749.1993
- [26] Mimuro, M., Kikuchi, H. & Murakami, A. Structure and Function of Phycobilisomes. in *Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis* (eds. Singhal, G. S., Renger, G., Sopory, S. K., Irrgang, K.-D. & Govindjee) 104-135 (Springer, Dordrecht, the Netherlands, 1999). https://doi.org/10.1007/978-94-011-4832-0_5
- [27] Kikuchi, H. Functional roles of the hexamer structure of C-phycocyanin revealed by calculation of absorption wavelength. *FEBS Open Bio* 11, 164-172 (2021). https://doi.org/10.1002/2211-5463.13038
- [28] Förster, T. Wischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* **2**, 55-75 (1948).
- [29] Förster, T. Chapter II Mechanisms of Energy Transfer. in *Bioenergetics* (eds. Florkin, M. & Stotz, E. H.) Comprehensive Biochemistry Vol. 22 61-80 (Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 1967). https://doi.org/10.1016/B978-1-4831-9712-8.50010-2
- [30] Kikuchi, H. Redshifting and Blueshifting of β 82 Chromophores in the Phycocyanin Hexamer of *Porphyridium purpureum* Phycobilisomes Due to Linker Proteins. *Life* 12, 1833 (2022). https://www.mdpi.com/2075-1729/12/11/1833
- [31] Sohoni, S. et al. Phycobilisome's Exciton Transfer Efficiency Relies on an Energetic Funnel Driven by ChromophoreLinker Protein Interactions. J. Am. Chem. Soc. 145, 11659-11668 (2023). https://doi.org/10.1021/jacs.3c01799
- [32] Jumper, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature 596, 583-589 (2021). https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2
- [33] Steinegger, M. & Söding, J. MMseqs2 enables sensitive protein sequence searching for the analysis of massive data sets. *Nat. Biotechnol.* **35**, 1026-1028 (2017). https://doi.org/10.1038/nbt.3988
- [34] Mirdita, M., Steinegger, M. & Söding, J. MMseqs2 desktop and local web server app for fast, interactive sequence searches. *Bioinformatics* 35, 2856-2858 (2019). https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty1057
- [35] Mirdita, M. *et al.* ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat. Methods* **19**, 679-682 (2022).

- https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1
- [36] Kabsch, W. A solution for the best rotation to relate two sets of vectors. acta cryst. A32, 922-923 (1976).
 - https://doi.org/10.1107/S0567739476001873
- [37] Parbel, A. & Scheer, H. Model for the phycobilisome rod with interlocking disks based on domain-weighted linker-polypeptide sequence homologies of *Mastigocladus laminosus*. *Int. J. Photoenergy* 2, 724545 (2000). https://doi.org/10.1155/S1110662X00000052
- [38] Gao, X. et al. Crystal structure of the N-terminal domain of linker L_R and the assembly of cyanobacterial phycobilisome rods. Mol. Microbiol. 82, 698-705 (2011). https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07844.x

(受付日 令和7年 2月 7日) (受理日 令和7年 3月 7日)