# 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<sup>1</sup>·沼尾昇吾<sup>2</sup>·船戸萌衣<sup>2</sup>

## 3D structure modeling of phycobilisome rod linker CpcC2 with AlphaFold2

Hiroto KIKUCHI<sup>1</sup>, Shougo NUMAO<sup>2</sup>, Moe FUNATO<sup>2</sup>

## 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.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> 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

<sup>2</sup>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<sup>[1,2,3,4,5,6,7,8]</sup>。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<sup>[9,10]</sup>)。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<sup>[11]</sup>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<sup>[12, 13, 14, 15]</sup>。

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<sup>[15]</sup>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(a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(a)は、フィコシアニンのa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α82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 a 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 a 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、 $\beta$  82及び $\beta$  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<sup>[16]</sup>。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<sup>[17, 18]</sup>。発色団のプロトン化は、その後の研 究でも確認され<sup>[19, 20, 21, 22, 23]</sup>,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)<sup>[24, 25, 26]</sup>。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β153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β82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β153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、 $\beta$ 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<sup>[27]</sup>。この場合、a82や $\beta$ 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<sup>[28, 29]</sup>によればエネルギー移動を起こすことができず、 $\beta$ 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、 $\beta$ 153の光吸収特性がa82や $\beta$ 82より若干短い波長の吸収特性をもつことがわかった<sup>[27]</sup>。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、β82 である。従って、リンカーとβ82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β82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<sup>[30,31]</sup>。

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 $\beta$  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 $\beta$  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<sup>[16, 27, 30]</sup>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<sup>[32]</sup>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<sup>[32, 33, 34, 35]</sup>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<sup>[36]</sup>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=0~0.1となっている。次に縦軸の値500~3700の区間は SI=0.1~0.3、軸の値3800~4200の区間は SI=0.3~0.4、軸の値4200~5000の区間は SI=0.4~0.5、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<sup>[37, 38]</sup>。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。

ー般的に, 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182~184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182~184番目の欠損部分周辺でも、rank1か ら rank5までの結果がほぼ一致していることがわかる。第233~235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 $\beta$  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 $\beta$  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

- Gantt, E. Phycobilisomes. Ann. Rev. Plant Biol. 32, 327-347 (1981). https://doi.org/10.1146/annurev.pp.32.060181.001551
- 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
- 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).
- 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\_9
- [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.jmb.2004.09.044
- [21] Wan, J., Xu, X., Ren, Y. & Yang, G. A Time Dependent Density Functional Theory Study of a-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 *a*-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  $\beta$  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)