

機関番号：13903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 年度～2010 年度

課題番号：20550151

研究課題名（和文） 光合成膜タンパク質集合体の分子レベルでの構築とその直接観察

研究課題名（英文） Construction and Direct Observation of Molecular Assembly of Photosynthetic Membrane Proteins

研究代表者

出羽 毅久 (Dewa Takehisa)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：70335082

研究成果の概要（和文）：光合成の初期過程での光エネルギー収穫とそれに引き続くエネルギー移動・電荷分離を担う 2 種類の光合成膜タンパク質(LH2, LH1-RC)を単離精製し、人工的に再構成し、さらにその再構成系でのそれぞれの膜タンパク質の集合状態を原子間力顕微鏡による分子レベルで観察・評価することに成功した。光エネルギーの有効活用という観点から、光合成での高効率な物質変換システムへの応用につながる。

研究成果の概要（英文）：Photosynthetic membrane proteins (LH2 and LH1-RC) that play important roles of light harvesting and charge separation were successfully reconstituted into lipid bilayer membrane to investigate the relationship between the assembly structure and their function. The structure of the assembly consisting of LH2 and LH1-RC were clearly observed by atomic force microscopy at the molecular level. The structure likely correlates the function, e.g., energy transfer from LH2 to LH1-RC. The basic findings should provide useful information for highly efficient construction of photoenergy conversion system.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：光合成・膜タンパク質・集合構造・脂質二分子膜・再構成・原子間力顕微鏡・光エネルギー変換

## 1. 研究開始当初の背景

光合成の初期過程は光エネルギーの吸収（収穫）とそれに引き続くエネルギー移動と電荷分離は諸種の色素（クロロフィル類縁体、カロテノイド）を含む膜タンパク質（LH2, LH1-RC）により高効率に達成されている。しかしながら、LH2 による光収穫と LH1-RC での集光・電荷分離において、これら 2 つの連動して機能する膜タンパク質の集合構造

（光合成膜中での分散状態）と機能の関係は全く明らかでない。

## 2. 研究の目的

上述の問題点を解明できれば、太陽光エネルギーの有効利用という観点から、集光・電荷分離のキープロセスに関する重要な知見が得られると期待出来る。そこで、光合成初期過程を担う LH2 および LH1-RC を(1)人工的に分散状態を制御しながら組織化し、(2)その

構造と機能との相関に関する知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

LH2およびLH1-RCは諸種の紅色光合成細菌より単離精製することにより得た。脂質二分子膜への再構成は、膜タンパク質とリン脂質・界面活性剤との共ミセルから透析法により膜タンパク質が組み込まれたリポソームを調製し、(1)様々に化学修飾を施した固体表面に組織化した。(2)固体表面での膜タンパク質の直接観察は、原子間力顕微鏡(AFM)および全反射型蛍光顕微鏡(TIRFM)により行い、機能評価は近赤外定常蛍光によるエネルギー移動、および透明電極(ITO)上に組織化した集合体に対して光電流計測を行った。

### 4. 研究成果

(1) 表面修飾を施したガラス基板上的のLH2/LH1-RC集合体の形成:脂質ドメイン形成による位置選択的組織化

Bahatyrovaらにより2004年Natureに掲載された*Rb. sphaeroides*の光合成膜のAFM像は、LH2およびLH1-RCがそれぞれ相分離した構造を示した。これを人工的に模倣する試みを下記のように行った。

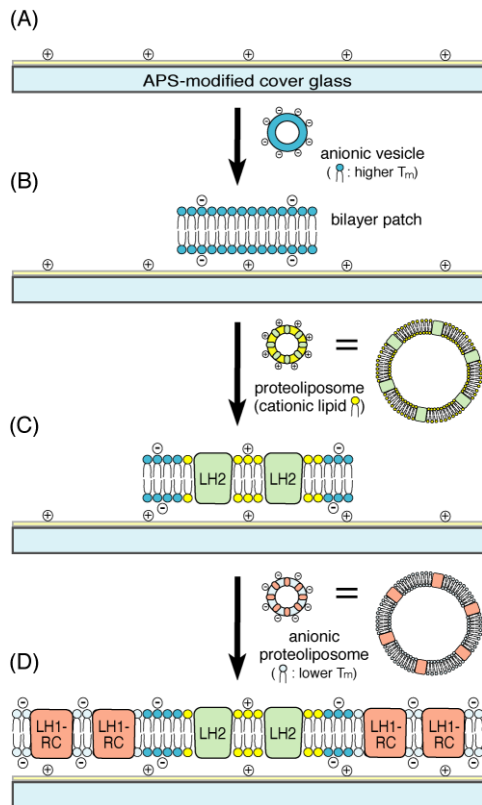


図1. 脂質ドメインを利用した LH2/LH1-RC の位置選択的組織化

カバーガラス上をカチオン化処理し、アニオン性脂質二分子膜を部分的に固定化させる

(図1A-B)、その後、正電荷を帯びたリポソーム中に組み込んだLH2を添加することにより、静電相互作用によりアニオン性脂質膜と選択的に膜融合が起こる(図1C)。その後、正電荷が露出したガラス基板の上にアニオン性脂質膜に組み込んだLH1-RCを添加すると、LH2以外の部分にLH1-RCが選択的に配置される。この組織化の様子を原子間力顕微鏡(AFM)および全反射型蛍光顕微鏡(TIRFM)により確認した。図2(A,B)は脂質二分子膜中のLH2およびLH1-RCのAFM像である。それぞれ既存の結晶構造に対応する集合像が分子レベルの解像度で得られた。

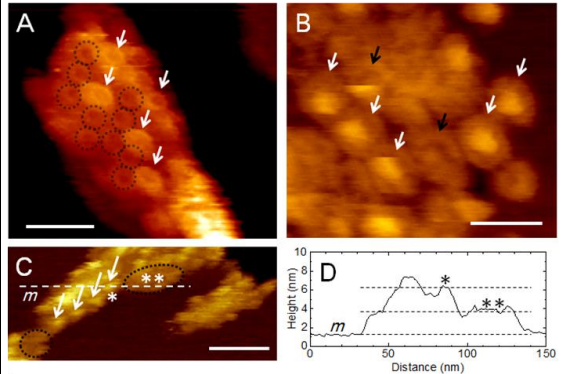


図2. LH2(A), LH1-RC(B),および LH2/LH1-RC 共集合系のAFM像。

図1B-Cの過程の検証をAFMで行ったところ、図3に示すように、膜融合によりLH2は平面二分子膜中に組み込まれている様子が確認できた。

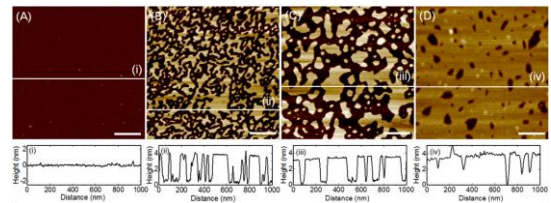


図3. 平面膜形成(A-B)および膜融合後の二分子膜のAFM像(C-D). D中の突出部分はLH2分子に対応する。

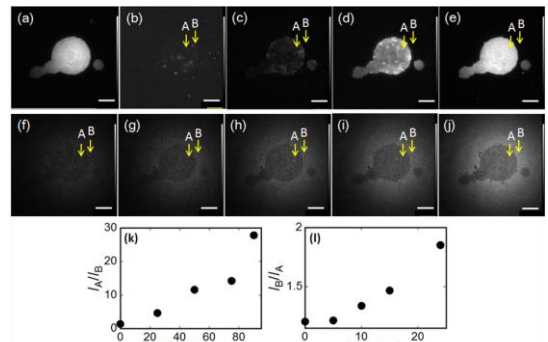
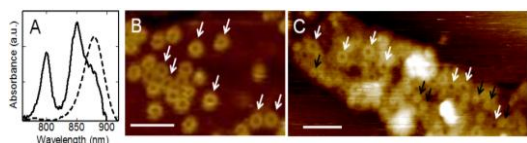


図4. ガラス基板上的のLH2ドメインの形成(a-e)およびそれに引き続くLH1-RCドメインの形成(f-j)。

図4では、全反射型蛍光顕微鏡によるLH2ドメイン形成およびLH1-RCドメイン形成の様

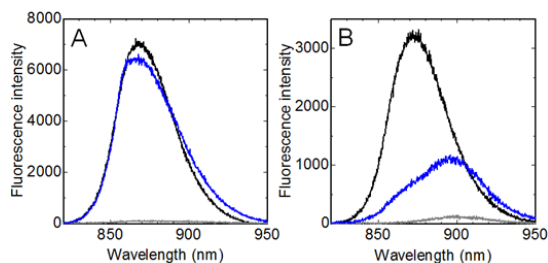
子を示す。それぞれ、脂質の電荷に対応して、**図 1** に示すプロセスで LH2 および LH1-RC が位置選択的に配置されることがわかった。また、LH1 および LH2 の共集合系についても、AFM により高い解像度で得ることに成功した。**(図 5)**



**図 5.** LH1 (B) および LH1/LH2 共存系の AFM 像, (A) は共存系の吸収スペクトル (実線) および LH1 のみの吸収スペクトル.

**(2) LH2/LH1-RC 共集合系での機能評価:** エネルギー移動 (LH2→LH1-RC) および光電流発生

**図 6** に LH2 から LH1-RC へのエネルギー移動を定常蛍光スペクトルにより観測した結果を示す。



**図 6.** ミセル系 (A) および脂質二分子膜系 (B) での LH2 から LH1-RC へのエネルギー移動.

黒線および灰色線はそれぞれ LH2 および LH1-RC を 800 nm で励起した場合の蛍光スペクトルである。B800 バンド励起による LH2 は顕著な発光バンド (黒線) を示すのに対し、800 nm が吸収端となる LH1-RC ではほとんど発光しない。ミセル系で LH2 と LH1-RC が共存することにより、わずかに発光バンドが幅広となり、LH2 から LH1-RC へのエネルギー移動がわずかに起こっていることがわかる。一方、脂質二分子膜中に組織化することにより、発光バンド (青色) は顕著なブロード化、および長波長領域に顕著な発光を示すことより、LH2 から LH1-RC への効率の良いエネルギー移動が起こっていることが認められた。

この LH2/LH1-RC 共存系での脂質二分子膜を表面修飾した ITO 電極に組織化することにより、LH2 励起による LH1-RC からの光電流が観測された。上述のエネルギー移動の結果とあわせて考えると、LH2 励起により LH1 へとエネルギー移動が起こり、さらに LH1 から RC へとエネルギーが伝達され RC での電荷分離が起こり、光電流が観測されたと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 18 件)

(1) Sumino, Dewa, (他 6 名) Selective Assembly of Photosynthetic Antenna Proteins into a Domain-Structured Lipid Bilayer for the Construction of Artificial Photosynthetic Antenna Systems: Structural Analysis of the Assembly using Surface Plasmon Resonance and Atomic Force Microscopy

(査読有り) *Langmuir* 27, 1092-1099 (2011).

(2) Sumino, Dewa, (他 6 名) Reconstitution and AFM Observation of Photosynthetic Membrane Protein Assembly in Planar Lipid Bilayers (査読有り) *e-J. Surf. Sci. Nanotech.* 9, 15-20 (2011).

(3) Uchiyama, Dewa (第 5 著者), Matsushita (他 4 名) Reconstitution of bacterial photosynthetic unit in lipid bilayer studied by single-molecule spectroscopy at 5 K

(査読有り) *Physical Chemistry Chemical Physics* (2011) in press

(4) Ochiai, Dewa (第 6 著者) (他 6 名) Immobilization of Porphyrin Derivatives with a Defined Distance and Orientation onto a Gold Electrode Using Synthetic Light-Harvesting  $\alpha$ -Helix Hydrophobic Polypeptides (査読有り) *Langmuir*, 26, 14419-14422 (2010).

(5) Dewa (他 11 名) Liposomal Polyamine-Dialkyl Phosphate Conjugates as Effective Gene Carriers: Chemical Structure, Morphology, and Gene Transfer activity (査読有り) *Bioconjugate Chem.* 21, 844-852 (2010)

(6) Mikayama, Dewa (第 4 著者) (他 6 名) The Electronic behavior of a Photosynthetic Reaction Center Monitored by Conductive Atomic Force Microscopy (査読有り) *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9, 97-107 (2009).

(7) Oikawa, Dewa (第 3 著者) (他 3 名) How Deep Is the Potential Well Confining a Protein in a Specific Conformation? A Single-Molecule Study on Temperature Dependence of Conformational Change between 5 and 18 K (査読有り) *J. Am. Chem. Soc.*, 130 4580-4581 (2008).

〔学会発表〕 (計 69 件)

(1) 出羽毅久ら 光合成膜タンパク質分子集合体の構築と機構評価 日本化学会第 91 春季年会 2011.3.28 (神奈川大学)

(2) Dewa, Organization and AFM observation of photosynthetic membrane proteins assembly in planar lipid bilayer, 13th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy, 167 Committee satellite workshop

on SPM (招待講演) 2010.8.4 金沢

(3) Dewa, et al. Supramolecular Assembly of Bacterial Light-harvesting/reaction center complexes (LH2/LH1-RC) in Planar Lipid Bilayers: AFM Observation, Energy Transfer, and Photocurrent Generation. The 70<sup>th</sup> Okazaki Conference 2010.12.5 Okazaki

(4) Dewa, et al. Functional Analysis of Polyamine-Lipid/DNA Complex (Lipoplex) as Gene Carrier: Relationship Between Metamorphosis of Lipoplex and its Function. The 4<sup>th</sup> International Symposium: Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions. 2010.11.30 (滋賀)

(5) Dewa, et al. Liposomal Polyamine-dialkyl Phosphate Conjugates as Effective Gene Carriers: Chemical Structure, Morphology, and Gene Transfer Activity. International Liposome Research Days and Lipids, Liposomes & Membrane Biophysics 2010.8.6 (Vancouver)

(6) 出羽毅久ら 光合成膜タンパク質集合体の構築と機能解析 第59回高分子討論会 (依頼講演) 2010.9.15 北海道大学

(7) Dewa, et al. Organization and Functional Analysis of Supramolecular Assembly of Photosynthetic Membrane Proteins. International Symposium on Chemical Conversion of Light Energy. 2010.3.28 (大阪)

(8) Dewa, et al. Morphological analysis of polyamine-lipid/DNA complexes as effective gene carriers. The third international symposium on “molecular Science of Fluctuations toward Biological function. 2009.12.20 (名古屋)

(9) Dewa, et al. AFM Observation of Photosynthetic Membrane Protein Assembly in Planar Lipid Bilayer. Watching Biomolecules in Action (WBMA'09)–Single Molecule Biology Symposium 2009.12.16 (大阪)

(10) Dewa, et al. Liposomal Polyamine–Dialkyl Phosphate Conjugates as Effective Gene Carriers: Chemical Structure, Morphology, and Gene Transfer Activity. International Symposium on Nanomedicine 2009-2 2009.11.5 (岡崎)

(11) 出羽毅久, 膜タンパク質研究のための平面脂質二分子膜の構築. 第40回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 (依頼講演) 2009.11.7 (岐阜大学)

(12) 出羽毅久ら平面脂質二分子膜中に導入した光合成アンテナ・反応中心複合体の原子間力顕微鏡による直接観察. 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム 2008.9.19 (東工大)

(13) 出羽毅久ら 形態観察を目的とした光合成アンテナ膜タンパク質の発現と複合体形成. 第18回バイオ・高分子シンポジウム 2008.7.26 (上智大学)

[図書] (計2件)

(1) K. Iida, T. Dewa, M. Nango, Assembly of bacterial light harvesting complexes on solid substrates. “The Purple Photosynthetic Bacteria” (Advances in Photosynthesis and Respiration) p.861-875, 2009

(2) M. Nango, M. Nagata, K. Iida, T. Dewa, Molecular Assembly of Bacteriochlorophyll a Complexes Using Light-harvesting (LH) Polypeptide from Photosynthetic Bacteria and Its Model Synthetic Polypeptides” Bottom-up Nanofabrication: Supramolecules, Self-Assemblies, and Organized Films, American Scientific Publishers (ASP), Chapter 6 p177-198 (2009).

[産業財産権]

無し

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出羽 毅久 (DEWA TAKEHISA)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：70335082

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

南後 守 (NANGO MAMORU)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：90109893

(4) 研究協力者

杉浦 隆太 (SUGIURA RYUTA)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・博士前期課程

竹内 俊和 (TAKEUCHI TOSHIKAZU)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・博士前期課程

廣 昭人 (HIRO AKITO)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・博士前期課程

角野 歩 (SUMINO AYUMI)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・博士後期課程

佐々木 伸明 (SASAKI NOBUAKI)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・博士前期課程

渡部 奈津子 (WATANABE NATSUKO)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・博士前期課程