

機関番号：14501

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20770102

研究課題名 (和文) 好熱性紅色光合成細菌のカルシウムイオンによる耐熱性獲得機構の解明

研究課題名 (英文) Structural and functional roles of Ca<sup>2+</sup> in the light-harvesting 1 complex from thermophilic purple sulfur bacterium *Thermochromatium tepidum*

研究代表者

木村 行宏 (KIMURA YUKIHIRO)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点研究部・助教

研究者番号：20321755

研究成果の概要 (和文)：Ca<sup>2+</sup>との相互作用により耐熱性と異常な吸収特性を示す好熱性紅色細菌 *Thermochromatium tepidum* 由来光捕集反応中心複合体の分光学的、熱力学的解析を行い、光捕集複合体C末端近傍とCa<sup>2+</sup>の相互作用により顕著な構造変化は起こさず、色素の配向状態や蛋白質の熱安定性が精密に制御されていることを明らかにした。また、Sr<sup>2+</sup>が生合成的にCa<sup>2+</sup>と置換し得ることを見出し、その特性評価を行った。

研究成果の概要 (英文)：Ca ions are responsible for unique properties of the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thermochromatium tepidum* which is a moderate thermophile grown at the highest temperature among purple bacteria and shows an unusual LH1 Q<sub>y</sub> absorption. The present spectroscopic and thermodynamic analyses revealed that the Ca<sup>2+</sup>-binding little affects secondary structures of the LH1 proteins but precisely modulates conformation of BChl *a* and thermal stability of the LH1-RC complex. Furthermore, we discovered that Sr ion is an alternative cofactor biofunctionally replaceable with Ca ion in this thermophilic organism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：光合成

科研費の分科・細目：生物科学・金属タンパク質

キーワード：紅色光合成細菌、耐熱性、カルシウム、ストロンチウム

## 1. 研究開始当初の背景

紅色光合成細菌の光捕集反応中心複合体 (LH1-RC) は光化学系 II 酸素発生複合体の祖先であり、その構造・機能解明の学術的意義

は重大である。LH1-RC の光捕集器官 (LH1) は光エネルギーを吸収して反応中心 (RC) に伝達するアンテナ的な役割だけでなく、構造的

にも重要な役割を担っていると考えられているが、報告されている LH1-RC 結晶構造の分解能が低く (4.8 Å)、詳細な構造は明らかにされていない。

好熱性紅色硫黄細菌 *Thermochromatium* (*Tch.*) *tepidum* は紅色光合成細菌の中で最も高い生育至適温度を示し、且つ LH1 に含まれるバクテリオクロフィル (BChl *a*) 2 量体の  $Q_y$  吸収極大が常温菌よりも異常に長波長シフトした吸収特性を示す菌体である。これまでに RC に関しては高分解能での結晶構造が報告されているが、LH1 構造の詳細は未だ得られていない。一方、LH1 リングの消失により TTP の耐熱性が著しく低下することから、LH1 の構造的役割の重要性が推測される。本申請者らは *Tch. tepidum* 由来 LH1-RC の特性評価を行い、 $Ca^{2+}$  が LH1-RC の構造安定化に極めて重要な役割を担うことを見出した。LH1 を構成する  $\alpha$   $\beta$  ポリペプチド鎖には、 $Ca^{2+}$  結合蛋白質で見られるような酸性アミノ酸残基で構成される部位が存在する。従って、耐熱性獲得機構を解明するためには、 $Ca^{2+}$  が LH1 のどの部位とどのような相互作用して熱安定性を高めているのか、その詳細を明らかにする必要がある。このような経緯から本課題の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、振動分光法、熱量分析法、核磁気共鳴法等を用いて、 $Ca^{2+}$  結合に誘起される LH1-RC の構造、熱力学特性の変化を観測し、*Tch. tepidum* 由来 LH1-RC 複合体の耐熱性獲得機構解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 紅色光合成細菌 *Tch. tepidum* 培養・精製システムの構築：48-50°C に至適生育温度を有する TTP の培養システムを構築した。約 10 日間培養した菌体を用いて超音波破碎、界面活性剤処理、陰イオン交換カラム精製の条件を最適化した。

(2) 赤外分光法による解析：精製した LH1-RC から  $Ca^{2+}$  を除去、或は他の金属カチオン ( $Mg^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ) で置換した効果を調べた。また、ケージ化  $Ca^{2+}$  化合物を用いて、光誘起  $Ca^{2+}$  放出に伴う微小変化の検出を試みた。

(3) 共鳴ラマン分光法による解析：現有のラマン分光装置を用いて LH1-RC のカロテノイドに由来する共鳴ラマン信号を観測し、金属除去及び金属置換の影響を調べた。

(4) 熱量分析による熱耐性評価：精製した

LH1-RC に対する金属カチオンの影響を示差走査熱量分析計、等温滴定熱量分析計を用いて調べた。

(5)  $^{113}Cd$ -NMR による解析： $^{113}CdCl_2$  (>90%  $^{113}Cd$ -enrichment) を用いて  $^{113}Cd^{2+}$  置換型 LH1-RC のペレットを調製し、CP-MAS 固体 NMR スペクトルの測定を試みた。

(6) ストロンチウム置換型 *Tch. tepidum* の特性評価：ストロンチウムイオン ( $Sr^{2+}$ ) を  $Ca^{2+}$  と生合成的に置換させ、その金属変異体から精製した LH1-RC の特性評価を行った。

## 4. 研究成果

(1) 培養、精製条件を最適化し、各実験に必要な高純度の LH1-RC を供給可能な精製システムを確立した。弱光照射条件での培養が LH1-RC 複合体の濃度を向上させるのに重要であることが明らかになった。 $Ca^{2+}$  を金属置換した培地での培養では、 $Sr^{2+}$  のみが正常な光合成生育を示した。

(2) 赤外分光法を用いた解析では  $Ca^{2+}$  結合サイトを構成するアミノ酸配位子由来の構造変化や蛋白質の二次構造変化が期待されたが、今回の測定条件では  $Ca^{2+}$  除去及び金属置換による明確な変化は観測されなかった。このことから、 $Ca^{2+}$  結合は LH1 を構成する  $\alpha$   $\beta$  ポリペプチドの末端部位で起こり、LH1 全体に及ぶ著しい構造変形を伴わないことが示唆された。

ケージ化  $Ca^{2+}$  化合物 (Dimethoxy nitrophenamine) を用いて、 $Ca^{2+}$  結合による蛋白質の微小な構造変化の検出を試みたが、試料形態、温度制御、低スループットに由来するノイズレベルの増加により、有意の信号を検出することはできなかった。

(3)  $Ca^{2+}$  結合サイトは BChl *a* が位置する LH1- $\alpha$   $\beta$  ポリペプチドの C 末端近傍、あるいは N 末端に存在すると考えられる。LH1-RC カロテノイドの共鳴ラマン信号に及ぼす金属除去及び金属置換の影響が観測されなかったことから、カロテノイドは金属結合サイトの構造変化に関与しない、即ち結合サイトが C 末端側に存在する可能性が示唆された。

(4) 野生型由来の LH1-RC から  $Ca^{2+}$  を除去し、 $Ca^{2+}$  再結合反応の等温滴定熱量分析を行った。その結果、 $Ca^{2+}$  は  $\alpha$   $\beta$  サブユニットと 1 : 1 で結合し、その結合定数は  $\sim 10^5 M^{-1}$  であることが明らかになった。

示差走査熱量分析計を用いた解析の結果からは、熱変性温度が野生型 LH1-RC で 75.0°C、 $Sr^{2+}$  変異体で 67.3°C であり、両者とも同じ温

度で光合成生育を示すが、Sr<sup>2+</sup>変異体の方が耐熱性が低いことが明らかになった。従って、生合成的Sr<sup>2+</sup>置換によりLH1 複合体の金属結合部位に微小な変化が生じ、蛋白質全体の構造安定性が低下したと考えられる。

(5) LH1-RCのCa<sup>2+</sup>を生化学的に<sup>113</sup>Cd<sup>2+</sup>で置換したLH1-RCペレットを調製し、CP-MAS固体NMRスペクトルの測定を試みたが、有意のNMR信号は検出されなかった。原因として、ペレット調製に大量の試料が必要である、Cd<sup>2+</sup>置換試料の安定性が低く、試料調製の段階や積算の間に試料の劣化が起こったことなどが考えられる。試料調製段階でのサンプルの不安定化を克服するため、Cd<sup>2+</sup>を生合成的に組み込んだ菌体の培養を試みたが、Cd<sup>2+</sup>では正常な生育が見られなかった。

(6) (5)のCd<sup>2+</sup>生合成的置換の試みにおいて、複数の金属カチオンを用いて培養を行った結果、Sr<sup>2+</sup>のみが生合成的にCa<sup>2+</sup>と置換し、耐熱性を保持したまま吸収特性を大きく変化させることを見出した。金属イオンによる集光システムの構造・機能制御は他の紅色細菌には見られない興味深い現象であることから、Sr<sup>2+</sup>置換型LH1-RCの特性評価を進めた。

Sr<sup>2+</sup>置換型の細胞は野生型と同じ50°Cで光合成生育を示した。Ca<sup>2+</sup>非存在下、あるいはCa<sup>2+</sup>、Sr<sup>2+</sup>以外の金属カチオンでは正常な光合成生育は観測されなかった。精製したSr<sup>2+</sup>置換型LH1複合体ではQ<sub>y</sub>吸収極大が888nmに出現し、野生型の915nmよりも27nmブルーシフトしていた。このことから、*Tch. tepidum*においてSr<sup>2+</sup>がCa<sup>2+</sup>と生合成的に置換し、これによりバクテリアオクロフィルの吸収特性が制御されていることを強く示唆する結果が得られた。

生化学的な手法と比較すると生合成的な金属置換は試料の損傷を伴わず、コンタミネーションの問題も解消できるため、金属イオンの役割を明らかにする上で非常に有用な手法である。本研究で確立した生合成的試料調製法を用いて、今後様々な分光学的、熱力学的解析を行う予定であり、蛋白質の熱耐性獲得機構における金属イオンの役割を明らかにする上で、有力な知見が得られると期待される。

## 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4件)

(1) Kimura, Y., Inada, Y., Yu, L.-J., Wang, Z.-Y., and Ohno, T. “A Spectroscopic

Variant of the Light-Harvesting 1 Core Complex from the Thermophilic Purple Sulfur Bacterium *Thermochromatium tepidum*”, *Biochemistry*, **50**, 3638-3648, 2011(査読有).

(2) Kimura, Y., Inada, Y. Yu, L.-J., Ohno, T., and Wang, Z.-Y.: “Strontium ions are functionally replaceable with calcium ions in the light-harvesting 1 reaction center core complex from Thermophilic purple sulfur bacterium *Thermochromatium tepidum* ” , proceedings of 15<sup>th</sup> International Congress on Photosynthesis, Beijing, Aug., in press(査読無).

(3) Kimura, Y., Yu, L.-J., Hirano, Y., Suzuki, H., and Wang, Z.-Y.: “Calcium ions are involved in the thermostability and the unusual red-shift of LH1 Q<sub>y</sub> transition of the core complex from Thermophilic purple sulfur bacterium *Thermochromatium tepidum*” , proceedings of 15<sup>th</sup> International Congress on Photosynthesis, Beijing, Aug., in press(査読無).

(4) Kimura, Y., Yu, L.-J., Hirano, Y., Suzuki, H., and Wang, Z.-Y. “Calcium Ions Are Required for the Enhanced Thermal Stability of the Light-harvesting-Reaction Center Core Complex from Thermophilic Purple Sulfur Bacterium *Thermochromatium tepidum*” , *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 93-99, 2009(査読有).

[学会発表] (計12件)

(1) Kimura, Y., Inada, Y., Hirano, Y., Yu, L.-J., Wang, Z.-Y. and Ohno, T.: “Structural and functional roles of metal cations in the Photosynthetic core complex from thermophilic purple sulfur bacterium *Thermochromatium tepidum*”, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, U.S.A, Dec. (2010).

(2) Kimura, Y., Inada, Y., Yu, L.-J., Ohno, T., and Wang, Z.-Y.: “Strontium Ions Are Functionally Replaceable with Calcium Ions in the Light-Harvesting 1 Reaction Center Core Complex from Thermophilic Purple Sulfur bacterium *Thermochromatium tepidum*”, 15<sup>th</sup> International Congress on Photosynthesis, Beijing, China, Aug. (2010).

(3) Kimura, Y., Yu, L.-J., Hirano, Y, Suzuki, H., and Wang, Z.-Y.: “Calcium Ions Are Involved in the Thermostability and the Unusual Red-Shift of LH1  $Q_y$  Transition of the Core Complex from Thermophilic Purple Sulfur Bacterium *Thermochromatium tepidum*”, 15<sup>th</sup> International Congress on Photosynthesis, Beijing, China, Aug. (2010).

(4) 木村行宏、稲田勇太、春日草千子、佐々木悠子、Long-jiang Yu、Zheng-Yu Wang、大野隆：“生合成的に $Sr^{2+}$ 置換された好熱性紅色硫黄細菌*Thermochromatium tepidum*における色素蛋白質複合体の特性評価”、第48回日本生物物理学会年会、仙台、9月(2010)

(5) 木村行宏、平野優、鈴木秀明、佐々木悠子、大野隆、三木邦夫、Zheng-Yu Wang：“好熱性紅色光合成細菌由来Cytochrome  $c'$ の耐熱性に関する研究”、特定領域研究「生体超分子構造」第6回公開シンポジウム、豊中、12月(2009)

(6) 平野優、Long-jiang Yu、木村行宏、鈴木宏昭、Zheng-Yu Wang、三木邦夫：“好熱性光合成細菌*Thermochromatium tepidum*由来光捕集タンパク質-反応中心複合体の構造解析”、特定領域研究「生体超分子構造」第6回公開シンポジウム、豊中、12月(2009)

(7) 加藤悟吾、Long-jiang Yu、平野優、木村行宏、Zheng-Yu Wang：“光合成光捕集反応中心複合体における $Ca^{2+}$ 結合部位の検証”、特定領域研究「生体超分子構造」第6回公開シンポジウム、豊中、12月(2009)

(8) 源氏梨恵、平野優、木村行宏、木村綾乃、

三木邦夫、大友征宇：“好熱性光合成細菌由来のFlavocytochrome  $c$ とCytochrome  $c'$ の結晶構造解析と機能評価”、第9回日本蛋白質科学会年会、熊本、5月(2009)

(9) 木村行宏、平野優、Long-jiang Yu、鈴木宏昭、河村悠貴、大野隆、Jian-Ping Zhang、Zheng-Yu Wang：“好熱性紅色光合成細菌*Thermochromatium tepidum*由来光捕集反応中心複合体におけるカルシウムイオンの構造的、機能的役割”、第46回日本生物物理学会年会、福岡、12月(2008)

(10) 平野優、木村行宏、高崎将充、牛島杏子、木村綾乃、源氏梨恵、鈴木秀明、三木邦夫、大友征宇：“好熱性紅色光合成細菌*Thermochromatium tepidum*由来cytochrome タンパク質 flavocytochrome  $c_{551}$ 、cytochrome  $c'$ の結晶構造”、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、神戸、12月(2008)

(11) 木村行宏、平野優、Long-jiang Yu、大野隆、Zheng-Yu Wang：“好熱性紅色光合成細菌*Thermochromatium tepidum*光捕集反応中心複合体のカルシウムイオンによる熱耐性獲得機構”、特定領域研究「生体超分子構造」第5回公開シンポジウム、筑波、12月(2008)

(12) Long-jiang Yu、平野優、木村行宏、Zheng-Yu Wang：“好熱性光合成細菌の光捕集反応中心複合体の結晶構造解析とカルシウム結合部位の特定”、特定領域研究「生体超分子構造」第5回公開シンポジウム、筑波、12月(2008)

[図書] (計1件)

(1) Yamauchi, Y. and Kimura, Y.: “Photosystem at high temperature -mechanisms of adaptation and damage”, NOVA Science, *in press*.

[その他]

ホームページ等

<http://www.edu.kobe-u.ac.jp/ans-bpc/seika.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 行宏 (KIMURA YUKIHIRO)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点

研究部・助教

研究者番号：20321755