

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550188

研究課題名(和文) 金属イオンによって誘起される光合成光捕集複合体の構造と機能変化

研究課題名(英文) Structure analysis and characterization of the LH1-RC complex induced by metal ions

研究代表者

大友 征宇 (Otomo, Seiu)

茨城大学・理学部・教授

研究者番号：10213612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：自然界最古のアンテナ・光電変換機能をもつ光合成分子機械の立体構造を原子レベルの分解能で決定した。その構造情報から光捕集と電荷分離の作動原理およびこれらの機能を制御する金属イオンの役割を明らかにした。また、光捕集を司るアンテナ複合体において色素分子間の幾何学的配置及び色素タンパク質間の相互作用も解明した。これにより、光捕集複合体から反応中心複合体への励起エネルギー移動ならびに反応中心からキノブールへの電子伝達を規定する構造因子を突き止めた。本研究より得られた成果は、今年のNature誌にArticleとして掲載され、当分野今後の研究の飛躍につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The crystal structure of a bacterial photosynthetic light-harvesting-reaction center core complex (LH1-RC) has been determined. The structure reveals a closed arrangement of LH1 complex around the RC, and the LH1 BChl a molecules form a partially overlapping ring with a shorter Mg-Mg spacing compared with that of B850 in LH2. Structural evidence is for first time provided for the possible ubiquinone pathway in the closed LH1 complex. The Ca²⁺-binding sites are identified. Molecular mechanisms of quinone transport, Ca²⁺-regulation and interaction between LH1 and RC are described below. The result has been published in Nature.

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 光捕集 反応中心 光電変換 色素膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

すべての光合成は光を集めることから始まる。緑色植物で代表される光生物は太陽光の希薄な密度のエネルギーを効率的に集めるため、多数の色素分子と膜タンパク質からなるアンテナのような光捕集複合体 (LH1, LH2) が用いられている。その特異なナノスケールの空間配置により、吸収された光エネルギーは色素間をフェムト秒からピコ秒単位で高速に移動し、ほぼ 100% の量子収率で反応中心 (reaction center, RC) に到達して光電変換反応を誘起する。

1985 年に、ドイツの研究グループ Deisenhofer らは紅色細菌 *Rhodospseudomonas viridis* 由来の RC の X 線結晶構造解析に成功し、立体構造 (分解能 3Å) を決定した [Nature 318, 618(1985)]。これが世界初の膜タンパク質複合体結晶構造解析の報告例であり、その功績で 1988 年にノーベル化学賞を受賞した。その後、紅色光合成細菌由来の周辺光捕集複合体 LH2 の立体構造が 1995 年にイギリスの研究グループによって解明された [Nature 374, 517(1995)]。しかし、RC を取り囲むコア光捕集複合体 LH1 は LH2 と RC との間に挟まれているため、良い結晶試料の作成が極めて困難で、長年に及ぶ努力にもかかわらず、原子レベルでの構造解析は国内外とも成功していなかった。

本研究代表者はこれまで光合成細菌の色素膜タンパク質複合体の構造と機能解明の研究に長く携わってきた。多くの光合成微生物を扱った中で、米国の温泉から採取した耐熱性紅色硫黄光合成細菌 *Thermochromatium (Tch.) tepidum* は他に見られない特徴をもっている。通常的光合成細菌の最適生育温度は約 25°C 前後に対して、*Tch. tepidum* は 48~50°C であり、最高生育温度が 60°C にも達している。また、反応中心 RC を取り囲むコアアンテナである LH1 複合体の近赤外領域における Q_y 遷移が常温菌では 880nm に位置するのに対して、*Tch. tepidum* 由来の LH1 複合体は約 35nm も長い 915nm に吸収極大をもっている。これらのユニークな性質の原因は長い間謎のままであった。前に本研究代表者らは *Tch. tepidum* の LH1 複合体の異常吸収挙動にカルシウムイオン (Ca²⁺) が深く関わっていることを突き止めた [J. Biol. Chem. 283, 13867 (2008)]。さらに、Ca²⁺ が LH1 複合体の熱安定性にも必要不可欠であることを明らかにした [J. Biol. Chem. 284, 93(2009)]。

2. 研究の目的

これまで我々の研究により光合成アンテナ機能の調節に特定の金属イオンが必要であることは判明された。しかし、その分子機構についてはまだ明らかになっていない。本研究では、*Tch. tepidum* 由来の LH1-RC 複合体を用いて研究期間中において

(1) 精密な立体構造の決定に、放射光 X 線

結晶構造解析を

(2) 金属イオンの結合と離脱に伴う結合部位での構造変化の検出に、共鳴ラマンと FTIR 分光測定を

(3) タンパク質と金属イオン間の相互作用の検出に、高感度の微量熱量分析計をそれぞれ用いて色素膜タンパク質と金属イオン間における特異的な分子認識機構を原子レベルで解明する。

3. 研究の方法

(1) LH1-RC 複合体の単離精製

クロマトフォアのペレットに 20mM Tris-HCl(pH8.5) 溶液を加えて懸濁し、A₈₅₀=50 になるように濃度を調整した。この懸濁液にアスコルビン酸ナトリウムを最終濃度 10mM、LDAO を最終濃度 0.35% となるように加え、室温で 60 分間穏やかに攪拌した。この溶液を 150000×g で 90 分間超遠心分離し、上清溶液に可溶化した LH2 が回収された。沈殿物を 20mM Tris-HCl(pH8.5) で再懸濁して、LH1 の Q_y ピーク (約 915nm) が A₉₁₅=25 になるように濃度を調整した。アスコルビン酸ナトリウムを最終濃度 10mM、OG を最終濃度 1.0% となるように加え、室温で 60 分間穏やかに攪拌する。この溶液を 150000×g で 90 分間超遠心分離し、上清を回収した。次に、陰イオン交換カラムによる精製を行った。カラムは TOSOH、TSK Gel DEAE-TOYOPEARL 650S 25×250 mm) を用いた。20mM Tris-HCl(pH8.5)、0.7% OG を用いて、流速 1.5ml/min でカラム体積の約 2.5 倍量程度で平衡化した後、試料をロードした。LH1-RC を溶出するための塩濃度勾配は 0mM~50mM までゆっくり濃度を上げていった。この精製法で高濃度 (A₉₁₅>20)、高純度 (A₉₁₅/A₂₈₀>2.1) の LH1-RC が得られた。

(2) LH1-RC 複合体の結晶化

LH1-RC の結晶化スクリーニングを行い、沈殿剤、界面活性剤、緩衝液、金属塩及び pH と温度など幅広い条件検索から X 線反射を有する結晶を得るための最適条件を見出した。最終的には、PEG3000 と界面活性剤 DPC から調整された良質な単結晶を使ってクライオ条件下で、回折データを収集した。

(3) 微量熱量分析による金属イオンと光捕集複合体 LH1 の相互作用解析

Ca 培地で培養した野生型 *Tch. tepidum* および Sr 培地で培養した Sr 置換型 *Tch. tepidum* から高純度の LH1-RC を精製し、EDTA により結合金属を除去した試料をそれぞれ B880 および B870 とした。B880 あるいは B870 由来 α β サブユニットに SrCl₂, BaCl₂, CaCl₂ 水溶液を 0.2~0.4 μl ずつ滴下し、アポタンパク質と金属カチオンの結合により生じる微小な熱量変化を計測した。得られた結果を One site model でフィッティングし、金属/タンパク質結合比、結合定数、エンタルピー変化、エン

トロピー変化、ギブズの自由エネルギー変化を算出した。

(4) 分光学的手法による金属イオンと LH1 の相互作用解析

各種イオン種の添加による LH1 複合体の熱安定性と Q_y 遷移の変化を吸収スペクトル、円偏光二色性スペクトル (CD)、磁気円偏光二色性スペクトル (MCD)、共鳴ラマンスペクトル及び FTIR で評価した。

4. 研究成果

(1) *Tch. tepidum* 由来の LH1-RC 複合体の全体構造

長年努力の結果、ついに LH1-RC の立体構造が姿を現した。その形は実にシンプルで、美しかった (図 1)。LH1 は α と β ポリペプチドが対となり、これにバクテリオクロロフィル BChl *a* とカロチノイドが結合したものが構造単位 (サブユニット) を構成している。RC の周りに 16 個のサブユニットが均一に配置し、リング構造を形成している。二重リングの間に色素分子と Ca イオンが配置している。RC をすっぽり収容できるように LH1 リングの形はやや楕円状になっている。長短軸の長さは約 10% 程度違うことがわかった。

LH1-RC 複合体中における RC の構造は、単独に精製されたもの (RC-only) とほぼ同じであるが、膜の外と表面に位置する C サブユニットと H サブユニットが全体的にわずかにずれている。特に、C サブユニット中の一部にコンフォメーションは大きく異なっていることがわかった。今まで報告された RC 中の補因子 BChl *a*、バクテリオフィオフィチン BPh *a*、メナキノン MQ、*cis*-spirilloxanthin に加え、*Tch. tepidum* の RC-only 結晶構造中に観測されなかったユビキノロン UQ の存在も Q_B サイトで確認された。

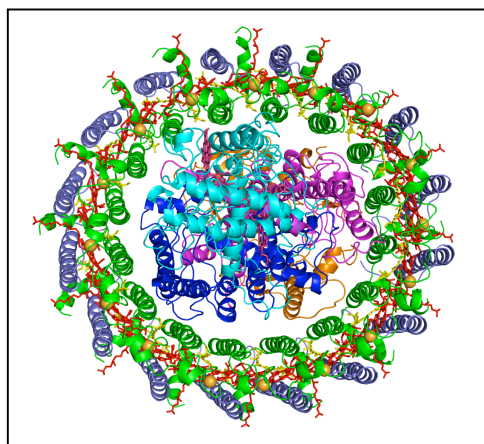


図 1 LH1-RC の全体構造

(2) 金属イオン結合部位

異常散乱の測定から LH1-RC の結晶構造中に Ca^{2+} の存在とその結合部位が同定された。 Ca^{2+} が隣り合う $\alpha\beta$ サブユニットの間に入っ

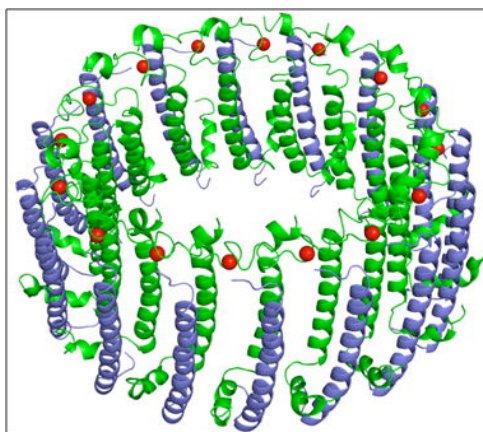


図 2 Ca イオンの結合部位

ている (図 2)。結合部位は α と β 鎖の C 末端領域に位置し、両タンパク質のアミノ酸によって Ca^{2+} が配位されている。 α 鎖の C 末端ループ領域に存在する α -Trp46、 α -Asp49、 α -Asn50 と隣のサブユニットに属する β 鎖の C 末端アミノ酸残基 β -Leu46 のカルボキシル基が配位子となっている。通常、生体内で Ca^{2+} が 7 配位構造をとる場合が多いことから、おそらく電子密度からまだ確認されていない水分子も関与している。 $\alpha\beta$ サブユニット同士が Ca^{2+} との結合によって結ばれたネットワークの形で LH1 全体の構造が安定化されていることが、LH1-RC の熱安定性に寄与したと考えられる。一方、この Ca^{2+} 結合部位が色素 BChl *a* の近傍に位置していることから、BChl *a* 自身のコンフォメーション及び BChl *a* 同士の配置に影響を及ぼすものと考えられる。このような Ca^{2+} 結合の効果は結果として *Tch. tepidum* LH1 の Q_y 遷移が通常のものより約 35nm 長波長側に現れることをもたらしたと解釈できる。

(3) 色素分子の配置

LH1 には 32 個の BChl *a* 分子がある。バクテリオクロリン環同士が部分的に重なりながら RC のスペシャルペアを中心とした楕円形を形成している (図 3)。さらに、16 個の Spirilloxanthin 分子がタンパク質との共有結合を持たずに α と β 鎖のリングの間に入っている。隣り合う BChl *a* 同士の Mg-Mg 間距離は 8.8Å である。この距離は LH2 のもの (約 9.2Å) より短いことから、LH1 の BChl *a* 間がより強い励起子相互作用をしていることがわかった。LH1 の Q_y 遷移が LH2 より長波長側に現れる理由はより大きなリングサイズと短い BChl *a* 間距離にあると考えられる。BChl *a* 分子の中心金属 Mg は α または β 鎖の His 残基によって配位結合されている。BChl *a* の C3 位アセチル酸素原子と α または β 鎖の C 末端側 Trp 残基 (α 46、 β 45) 側鎖との間に水素結合が形成されている。この結果は、後述の共鳴ラマンの測定で観測された C3 位アセチル基の挙動と良く一致している。

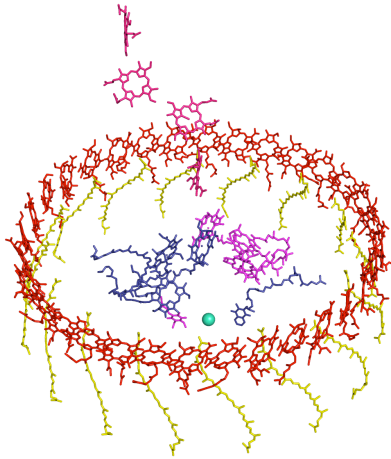


図3 LH1-RC中の色素配置

(4) ラマン分光による金属と色素タンパク質との相互作用の検出

前述したように *Tch. tepidum* 由来の LH1 複合体の Q_y 遷移が、他の菌体では 880nm に位置するのに対して、約 35nm も長い 915nm に位置する。これには Ca^{2+} が深く関与していることがわかっている。一方、金属キレート剤を添加することで Ca^{2+} を抜き取ることができる。これに伴い、LH1-RC の Q_y 遷移も 915 nm から 875 nm 付近までブルーシフトすることが当研究室から報告されている [Kimura *et al.*, *J. Biol. Chem.* **283**, 13867(2008)]. さらに、 Ca^{2+} が除去された LH1-RC に Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Mg^{2+} などの二価のカチオンを添加することで、約 10 nm ほどレッドシフトすることが確認されている。B915-LH1-RC では、BChl *a* 分子の C3 アセチルと C13 ケト基のラマン伸縮バンド ($C=O$) がそれぞれ 1637 cm^{-1} と 1675 cm^{-1} に現れるのに対して、 Sr^{2+} 置換で得られた B888-LH1-RC では、これらのバンドがそれぞれ 1643 cm^{-1} と 1673 cm^{-1} に変化した。この結果は B915-LH1-RC において、C3 アセチルと LH1 タンパク質との間に強い水素結合を形成し、金属置換によってこれらの水素結合様式が大きく変化したことを示唆している。さらに、色素とタンパク質間の相互作用だけでなく、他の構造因子も *Tch. tepidum* LH1 の異常 Q_y 遷移と熱耐性に影響を及ぼしていることがわかった。

(5) 赤外分光による金属と色素タンパク質との相互作用の検出

Tch. tepidum 由来の LH1 における色素とタンパク質間の相互作用に 2 価金属イオンの及ぼす影響を初めて ATR-FTIR で調べた。やはり、Ca-LH1-RC と Sr-LH1-RC との間で大きな違いが現れた。この 2 つの状態間で、金属イオン置換による FTIR 差スペクトルが図 4 のように完全に可逆的变化を示し、色素 BChl *a* を含む周辺のコンプォメーションが可逆的

に変化することがわかった。

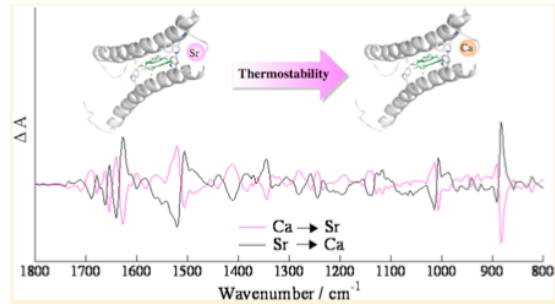


図4 ATR-FTIR 差スペクトル

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 6 件)

(1) Niwa, S., Yu, L.-J., Takeda, K., Hirano, Y., Kawakami, T., Wang-Otomo, Z.-Y. & Miki, K. Structure of the LH1-RC complex from *Thermochromatium tepidum* at 3.0 Å. *Nature* **508**, 228-232(2014). 査読有

(2) Li, Y., Kimura, Y., Arikawa, T., Wang-Otomo, Z.-Y. & Ohno, T. ATR-FTIR detection of the metal-sensitive structural changes in the light-harvesting 1 reaction center complex from the thermophilic purple sulfur bacterium *Thermochromatium tepidum*. *Biochemistry* **52**, 9001-9008(2013). 査読有

(3) Yu, L.-J., Unno, M., Kimura, Y., Yanagimoto, K., Oh-Oka, H., Wang-Otomo, Z.-Y. Structure analysis and characterization of the cytochrome *c*-554 from thermophilic green sulfur photosynthetic bacterium *Chlorobaculum tepidum*. *Photosynth. Res.* **118**, 249-258(2013). 査読有

(4) Hirano, Y., Kimura, Y., Suzuki, H., Miki, K. & Wang(Otomo), Z.-Y. Structure analysis and comparative characterization of the cytochrome *c'* and flavocytochrome *c* from thermophilic purple photosynthetic bacterium *Thermochromatium tepidum*. *Biochemistry* **51**, 6556-6567(2012). 査読有

(5) Kimura, Y., Inada, Y., Numata, T., Arikawa, T., Li, Y., Zhang, J.-P., Wang(Otomo), Z.-Y. & Ohno, T. Metal cations modulate the bacteriochlorophyll-protein interaction in the light-harvesting 1 core

complex from *Thermochromatium tepidum*.
Biochim. Biophys. Acta **1817**, 1022-1029(2012).
査読有

(6) Sekine, F., Horiguchi, K., Kashino, Y.,
Shimizu, Y., Yu, L.-J., Kobayashi, M. &
Wang(Otomo), Z.-Y.

Gene sequencing and characterization of the
light-harvesting complex 2 from thermophilic
purple sulfur bacterium *Thermochromatium*
tepidum.

Photosynth. Res. **111**, 9-18(2012). 査読有

[学会発表] (計5件)

(1) Z.-Y. Wang-Otomo, L.-J. Yu, S. Niwa, K.
Takeda, Y. Hirano, T. Kawakami, K. Miki

Crystal structure of a LH1-RC core complex
from *Thermochromatium tepidum*

16th International Congress on Photosynthesis
Research (第16回国際光合成会議)

August 11-16, 2013, St. Louis, MO, USA

(2) 于龍江、竹田一旗、平野優、丹羽智美、
川上知朗、大友征宇、三木邦夫

好熱紅色細菌の光捕集反応中心複合体の機
能解明と構造解析

第21回光合成セミナー、2013年7月6-7日、
名工大

(3) L. Yong, Y. Kimura, T. Numata, Y. Inada, T.
Arikawa, S. Otomo, T. Ohno

好熱性紅色硫黄細菌 *Thermochromatium*
tepidum 由来光捕集1複合体における BChl-a
と Trp 残基間の水素結合相互作用

日本生物物理学会、2012年9月22-24、名大

(4) 木村行宏、永麗、有川曜央、沼田朋子、
大友征宇、大野隆

紅色硫黄細菌由来光捕集1複合体における色
素-蛋白質間相互作用の解析

第20回光合成セミナー、2012年6月30日、
阪大

(5) 日下部広和、清水佑記、于龍江、大友征
宇

紅色細菌の光捕集タンパク質のリン酸化

第20回光合成セミナー、2012年6月30日、
阪大

[その他]

ホームページ等

<http://biophys.sci.ibaraki.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大友 征宇 (OTOMO SEIU)

茨城大学・理学部・教授

研究者番号：10213612

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

三木 邦夫 (MIKI KUNIO)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：110116105

木村 行宏 (KIMURA YUKIHIRO)

神戸大学・農学研究科・助教

研究者番号：20321755