

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570183

研究課題名(和文) 光合成反応中心において2方向の電子移動を制御する分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms to control two electron transfer directions in photosynthetic reaction centers

研究代表者

大岡 宏造 (Oh-oka, Hirozo)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30201966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：緑色イオウ細菌反応中心PscAのL688とV689をCysに置換し、光誘起FTIR差スペクトルによる解析を行った。L688C変異体において、S-H伸縮振動バンドに由来するシグナルを同定した。導入したシステイン残基はスペシャルペアと新たに水素結合のネットワークを形成することを意味し、タイプ1反応中心ではスペシャルペア周辺の構造は高度に保存されているらしい。また極低温下、ヘリオバクテリア反応中心の閃光照射によるESRスペクトルの経時変化を測定した。その結果、P+A1-に由来するESP信号を検出することができた。この信号はエーテル処理により消滅し、A1として機能するキノンの存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We mutated PscA-Leu688 and PscA-Val689 to cysteine residues in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*; these residues were predicted to interact with the special pair P840, based on sequence comparison with PS I. Light-induced Fourier transform infrared difference measurements showed that the L688C mutation induced a differential signal of the S-H stretching vibration in the P840+/P840 spectrum, as reported in P800+/P800 difference spectrum in a heliobacterial RC. This suggests that there is a common spatial configuration around the special pair sites among type 1 RCs. We identified a new transient electron spin-polarized electron paramagnetic resonance (ESP-EPR) signal, arising from the radical pair of the oxidized electron donor and the reduced electron acceptor (P800+MQ-), in the heliobacterial RC (hRC) core complex. The result revealed the quinone usage as the secondary electron acceptor in hRC, as in the case of PS I.

研究分野：生物物理

キーワード：光合成 反応中心 緑色イオウ細菌 ヘリオバクテリア ホモダイマー 光化学系I フーリエ赤外分光法 電子スピン共鳴

1. 研究開始当初の背景

光合成反応中心は、電子移動経路を構成する末端電子受容体の種類により、PS II タイプと PS I タイプに分類される。高等植物やシアノバクテリアではこれら両タイプ(それぞれ PS II および PS I に相当する)が連結した反応経路を構成するが、非酸素発生型の光合成細菌はどちらか一方のみをもつ。紅色細菌は PS II タイプのみ、緑色イオウ細菌、ヘリオバクテリアは PS I タイプのみである。反応中心内のエネルギー移動および電子移動反応の機構は、これまで様々な物理化学的・分光学的手法を用いて解析されている。特に近年のタンパク質 X 線結晶構造解析は、反応中心の精緻な超分子構造を原子レベルで明らかにすることに成功し、一見複雑に見える構造と機能の相関性には共通の構築原理が存在することを示している。一方、緑色イオウ細菌、ヘリオバクテリアの反応中心は末端電子受容体 Fe-S が酸素に対して不安定であるために標品調製が難しく、構造解析には至っていない。報告されている分光学的知見も断片的で、今後の研究の進展が大いに期待されている研究領域である。標品を安定的に取り扱えるのは、国内外において申請者のグループのみである。

今日まで紅色細菌の反応中心、植物型の PS II および PS I 反応中心の詳細な立体構造が報告されてきた。これら反応中心コアタンパクはすべてヘテロダイマーであり、2方向の電子移動経路のうち一方のみが優先的に使われている(PS I では左右の電子移動の比率が異なる)。スペシャルペア(P)から放出された電子の移動方向を制御する機構については実験・理論の両面から議論されてきたが、ヘテロダイマーであるがゆえに様々な因子が複雑に絡み合い、統一的理解は得られていない。キノン(A_1)結合領域周辺の環境が、2方向の電子移動の比率を制御するとの報告もある。一方、緑色イオウ細菌、ヘリオバクテリアの PS I タイプ反応中心はホモダイマー型であり、2方向の電子移動経路は等価であることが期待されている。電子移動機構解析に適した優れたモデル実験系であるにも関わらず、標品調製の困難さから研究材料として有効に生かされていない。申請者は、ホモダイマー型反応中心を人工的にヘテロダイマーに改変できるならば、2方向の電子移動を制御する因子を特定する実験系を確立することができるのではないかと着想するに至った。

2. 研究の目的

地球上の生命活動を支えている光合成反応中心は、エネルギー変換反応にとって最も重要な生体超分子の一つである。電子移動経路は2回対称軸(C2軸)に沿って2方向存在するが、立体構造が明らかにされてきたヘテロダイマー型反応中心では一方が優先的に機能している。一方、緑色イオウ細菌および

ヘリオバクテリアの持つホモダイマー型反応中心は未だに構造解析には至らず、2方向の電子移動経路は等しく機能していると考えられている。申請者は最近、ホモダイマー型反応中心を人工的にヘテロダイマー化するプラットフォームを構築することに成功した。本研究の目的は、光合成反応中心の構造機能相関に基づき、2方向の電子移動を制御する分子機構を明らかにするとともに、立体構造解析を行うことにある。

3. 研究の方法

緑色イオウ細菌の反応中心は同一のサブユニットから構成されるホモダイマー(A/A')である。すでに好熱性緑色イオウ細菌(*Cba. tepidum*)のゲノム上の recA 遺伝子領域に精製用タグ(His-tag)を付加した第2のコアタンパク遺伝子(pscA mutant: pscA')と薬剤マーカー(Gm^r)を挿入し、反応中心を人工的にヘテロダイマー化(A/A')するプラットフォームを構築することに成功している。本研究では A' にさまざまな部位特異的変異を導入し、2方向の電子移動を制御する機構を分子レベルで解明していく。また立体構造の解明を目指し、好熱性緑色イオウ細菌(*Cba. tepidum*)およびヘリオバクテリア(*Hbt. modesticuldum*)の反応中心の結晶化条件探索と微結晶標品の改良を行っていく。併せてホモダイマー型反応中心の生化学的、物理化学的解析も推し進める。

(1) ヘテロダイマー反応中心(A/A')の分取
Ni-NTA カラムによる反応中心のアフィニティー精製を行ったところ、PscA/His-PscA'型と His-PscA' / His-PscA'型の混合物であることを LC/MS/MS 解析により確認している。両型を区別して分取するために、もとのコアタンパク遺伝子(pscA)に Strept-tag を付加する。タンデム・アフィニティー精製により Strept-PscA / Strept-PscA、Strept-PscA / His-PscA'、His-PscA / His-PscA'型の分取を行う。

(2) 部位特異的変異による電子移動解析

野生型の pscA 遺伝子の発現が光合成による生育を保証するので、pscA' 遺伝子には任意の変異を導入できる。

初期電荷分離反応における制御機構：電子が2つの経路のどちらを移動するかは、一次電子供与体と一次電子受容体の間で初期電荷分離状態が形成されるまでに決まる。それには、一次電子供与体(P)、アクセサリクロロフィル(A)、一次電子受容体クロロフィル(A_0)が関わっている。変異導入部位は、PSI との構造機能相関に基づいて決定する。特に PSI において一次電子供与体(P)から 4 Å 以内にあり、一方の経路上のみに存在する5個のアミノ酸残基は、電子移動の非対称化に直接関与する構造的要因の可能性がある。PscA 上のアミノ酸残基を変異後、野生型および変異型反応中心の過渡吸収測定と時間分解 ESR 測定による速度論的な解析を行う。反

応場の分子環境変化と構造的歪みにより、反応時定数が1相性(対称な電子移動)から2相性(非対称な電子移動)へと変化することが期待される。

二次電子受容体以降の電子移動反応の制御機構:二次電子受容体(A_1)であるキノン分子周辺の分子環境に着目する。PS I では疎水的なポケットにキノン分子が強く結合しているが、緑色硫黄細菌やヘリオバクテリアでは極めて親水的であると推測されている。この領域の改変により、2方向の電子移動の割合が変化することが期待される。

(3) 電子伝達成分間の配向性と距離の算出およびキノンの分子種同定

緑色硫黄細菌およびヘリオバクテリアから調製した膜標品をOHPシート上に塗布して乾燥させることにより、膜をOHPシート面に対して配向させる。このように調製した配向膜標品を用いて、パルスESRによる分光法(スピンエコー)により、ラジカル間の配向性や距離を算出することが可能である。すでに標品の酸化還元状態をコントロールすることにより、反応中心内の一次電子供与体(P)と二次電子受容体(キノン: A_1)あるいは三次電子受容体(F_X)との電荷分離状態に由来する分極信号の検出に成功している。これにより P^+ と A_1^- 、および P^+ と F_X^- 間の配向性と距離を求めることができる。また膜標品中には、複数種類のメナキノン型のキノン分子が存在する。反応中心から二次電子受容体(A_1)として機能するキノンを有機溶媒により抽出し、LC/MSによる分子種の同定と定量も行う。

(4) 反応中心の結晶化と立体構造解析

緑色イオウ細菌(*Cba. tepidum*)およびヘリオバクテリア(*Hbt. modesticuldum*)の反応中心の結晶化に取り組む。遺伝子操作が可能なのは緑色イオウ細菌であるが、両反応中心はホモダイマー型であり、電子移動経路と反応機構は基本的に同じと考えてよい。現在、ヘリオバクテリア反応中心については微結晶(長さ約30-50 μ m)が得られている。しかしX線回折像実験では分解能が低く、構造解析には至っていない。良質な結晶標品を得るために、結晶化条件を詳しく検討する。緑色イオウ細菌の反応中心についても結晶化に着手する。

4. 研究成果

本研究計画では、ホモダイマー型反応中心を人工的ヘテロダイマーに改変するために、片側の電子移動経路のみに部位特異的変異を導入するためのプラットフォーム構築に取り組むことが当初の主要な目的であった。しかしながら Strep-PscA/His-PscA 型反応中心の収率が期待していたよりも低いことが分かり、様々な改善を試みたが、成功する見込みが得られないまま1年目が経過した。少量の Strep-PscA/His-PscA 型標品を調製する

ことも代案として考慮したが、分光学的解析に必要な量を確保することは困難であった。それゆえ本研究では予定を小幅変更し、変異を導入したホモダイマー型反応中心についてのデータ収集を行うことにした。

(1) ホモ変異体 L688C, V689C の FTIR 解析

光化学系1反応中心およびヘリオバクテリア反応中心の一次構造とのアライメントから、緑色イオウ細菌反応中心の一次電子供与体 P840 の近傍にあるアミノ酸残基、L688 と V689 の Cys 置換体を作製した。P840 の FTIR 解析では、バクテリオクロロフィル a の 13^1 位ケトン基の C=O 伸縮振動バンドの低波数シフトが観測された。また P840 $^+$ /P840 の酸化還元電位の測定では、約 30 mV のアップシフトが観測された。これらの結果は、変異導入による P840 周辺の電場構造変化を示しており、構築した部位特異的変異導入系がホモダイマー型反応中心の分子生物学的解析に有効であることを示している。また収集データの精密化と S/N 比の改善を行ったところ、1回目の解析ではノイズに埋もれていた S-H 伸縮振動バンドに由来するシグナルを L688C 変異体において同定することができた。この L688C 変異体は、ちょうどヘリオバクテリア反応中心コアタンパク PshA の Cys601 に相当する変異体である。我々は 1997 年、ヘリオバクテリア反応中心において水素結合のネットワークを介して P800 と共役している SH 基の存在を明らかにしている。またこの SH 基に由来する伸縮バンドは容易に 50%D₂O 緩衝液中で S-D 伸縮バンドに置き換わることがなく、50%D₂O 中での培養でのみ置き換わる性質をもっていた。それゆえ PS I との構造機能相関を基に、該当 Cys 残基は P800 周辺の近傍の比較的疎水的な膜貫通領域に存在する PshA/Cys601 ではないかと推測していた。今回、L688C 変異体の FTIR 解析データは、タイプ1反応中心において、スペシャルペア周辺の構造(フォールディングモチーフ)が極めて似かよっていることを強く示唆する結果となった。さらにこの結果は、エネルギー変換装置の基本的な構築原理は、光合成反応中心のごく初期の成立過程から不変であることを意味している。緑色硫黄細菌反応中心タンパクの変異体解析は世界でも初めての報告であり、進化的な考察を加えることにより論文としてまとめることができた。

(2) ヘリオバクテリア反応中心の $P+A_1^-$ に由来する電子スピン分極(ESP)信号の検出

極低温下、ヘリオバクテリア反応中心に閃光照射することにより、ESR スペクトルの経時変化を測定した。その結果、 $P+A_1^-$ に由来する電子スピン分極(ESP)信号を極低温下(5-20K)でのみ検出することができた。またこの信号はエーテル処理により消滅した。第二次電子受容体 A_1 としてキノンが機能することは、間違いないことが明らかとなった。

現在、さらに解析を推し進め、 P^+ と A_1^- 、および P^+ と F_X^- 間の配向性と距離について、デー

タをもとに考察中である。

(3) ヘリオバクテリア反応中心の酸化還元状態に依存した分光学的解析

閃光照射後の過渡吸収測定では F_x からの電荷再結合が観測されるが、強還元条件下にすると A_1 ではなく、 A_0 からの電荷再結合が観測されることが報告されている。この点は同じタイプ 1 反応中心である PS I と大きく異なる点である。今回、強還元条件下 (pH10、ジチオナイト) で低温吸収スペクトル (77 K) を測定したところ、810 nm の肩が消失することが分かった。ヘリオバクテリア反応中心には 6 個のシステイン残基が存在するが、そのうち F_x 配位に関与している 2 個のシステイン残基 (Cys432, Cys441) を除き、残り 4 個のシステイン残基のもつ SH 基の解離が影響していることが推測された。過渡吸収測定との相関性を考察するために、酸化還元状態に依存した分光学的解析を推し進めていく必要性が示唆された。

(4) ヘリオバクテリア反応中心の結晶化・構造解析

回折実験可能な回折強度データが得られているが (未発表)、さらなる分解能向上を目指し、界面活性剤、沈殿剤、緩衝液 pH、抗凍結剤等、諸条件の再検討を行っている。位相決定を目指し、鋭意努力中である。

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 6 件)

1. C. Azai, Y. Sano, Y. Kato, T. Noguchi and H. Oh-oka (2016) Mutation-induced perturbation of the special pair P840 in the homodimeric reaction center in green sulfur bacteria. *Sci. Rep.* DOI: 10.1038/srep19878 (査読有)

2. T. Kondo, S. Itoh, M. Matsuoka, C. Azai and H. Oh-oka (2015) Menaquinone as the secondary electron acceptor in the type I homodimeric photosynthetic reaction center of *Heliobacterium modesticaldum*. *J. Phys. Chem. B* 119: 8480-8489. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b03723 (査読有)

3. C. Azai, J. Harada and H. Oh-oka (2013) Gene expression system in green sulfur bacteria by conjugative plasmid transfer. *PLOS ONE* 8(11): e82345. doi:10.1371/journal.pone.0082345 (査読有)

4. L.-J. Yu, M. Unno, Y. Kimura, K. Yanagimoto, H. Oh-oka and Z.-Y. Wang-Otomo (2013) Structure analysis and characterization of the cytochrome *c*-554 from thermophilic green sulfur photosynthetic bacterium *Chlorobaculum tepidum*. *Photosynth. Res.* 118: 249-258. (査読有) Doi:10.1007/s11120-013-9922-2 (査読有)

5. 浅井智広、大岡宏造 (2013) 「緑色イオウ細菌の光合成反応中心への部位特異的な変異導入」*光合成研究* 23(2) pp.100-108 (査読有)

6. H. Oh-oka and R. E. Blankenship (2013)

Green Bacteria: Secondary Electron Donor (Cytochromes) In *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 2nd Edition Vol 2, 510-512 (査読有)

[学会発表] (計 35 件)

1. 大岡宏造、小島理沙、浅井智広、武藤梨沙、栗栖源嗣、伊藤繁「ヘリオバクテリア光合成反応中心の低温蛍光解析」第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18-20 日、岩手大学・上田キャンパス (岩手県・盛岡市)

2. H. Oh-oka "Homodimeric type 1 reaction centers in green sulfur bacteria and heliobacteria" IPR International Workshop、2016 年 2 月 2-3 日、大阪大学蛋白質研究所 (大阪府・吹田市)

3. 大岡宏造、野地智康、浅井智広、武藤梨沙、栗栖源嗣、伊藤繁「多孔性シリカ粒子のナノ空間に埋め込まれたヘリオバクテリア反応中心コアタンパクの安定性と分光学的特性」第 53 回日本生物物理学会年会、2015 年 9 月 13-15 日、金沢大学・角間キャンパス (石川県・金沢市)

4. H. Oh-oka, T. Yamamoto, R. Mutoh, C. Azai and G. Kurisu "A Rieske/cytochrome b complex in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*", 15th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, 2015 年 8 月 2-6 日、Tübingen 大学 (Germany)

5. 浅井智広、近藤徹、伊藤繁、大岡宏造「タイプ 1 光合成反応中心の保存されたアンテナクロロフィルの役割」第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 16-18 日、東京農業大学・世田谷キャンパス (東京都・世田谷区)

6. 大岡宏造、山本和矢、武藤梨沙、浅井智広、栗栖源嗣「緑色イオウ細菌 *Chlorobaculum tepidum* の Rieske/cyt b 複合体単離の試み」第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 25-27 日、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

7. 浅井智広、近藤徹、伊藤繁、大岡宏造「緑色硫黄細菌のタイプ 1 光合成反応中心は 2 系列のエネルギー移動系をもつ」第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 25-27 日、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

8. 浅井智広、近藤徹、伊藤繁、大岡宏造「緑色硫黄細菌のタイプ I 型 RC は PS I とは異なるエネルギー移動系をもつ」第 5 回日本光合成学会年会、2014 年 5 月 30-31 日、近畿大学農学部・奈良キャンパス (奈良県・奈良市)

9. 浅井智広、溝口正、民秋均、大岡宏造「緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum tepidum* において *bchX* 遺伝子はバクテリオクロロフィル a 生合成に必須ではない」第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18-20 日、富山大学・五福キャンパス (富山県・富山市)

9. 大岡宏造、野地智康、浅井智広、武藤梨沙、栗栖源嗣、伊藤繁「多孔性シリカ粒子に吸着したヘリオバクテリア反応中心コアタンパクの分光学的諸性質」第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18-20 日、富山大学・

五福キャンパス(富山県・富山市)

10. C. Azai, Y. Sano, Y. Kato, T. Noguchi and H. Oh-oka "Site-specific Structural Modification around the Special Pair of Homodimeric Photosynthetic Reaction Center in Green Sulfur Bacteria", 16th International Congress of Photosynthesis, 2013年8月11-16日、St. Louis (USA)

11. H. Oh-oka, T. Noji, C. Azai, R. Mutoh, G. Kurisu and S. Itoh "Heliobacterial Reaction Center Core Complex in Nanoporous Silica Material", 16th International Congress of Photosynthesis, 2013年8月11-16日、St. Louis (USA)

12. 浅井智広、佐野裕子、加藤祐樹、野口巧、大岡宏造「部位特異的変異導入によるホモダイマー型光合成反応中心の構造改変」第54回日本植物生理学会年会、2013年3月21-23日、岡山大学・津島キャンパス(岡山県・岡山市)

13. 浅井智広、佐野裕子、野口巧、大岡宏造「緑色硫黄細菌のホモダイマー光合成反応中心において部位特異的変異が一次電子供与体周辺の構造に与える影響」第50回日本生物物理学会年会、2012年9月22-24日、名古屋大学・東山キャンパス(愛知県・名古屋市)

14. 浅井智広、佐野裕子、野口巧、大岡宏造「緑色硫黄細菌の光合成反応中心の部位特異的変異体：一次電子供与体周辺の水素結合構造の改変を例として」第3回日本光合成学会年会、2012年6月1-2日、東京工業大学・すずかけ台キャンパス(神奈川県・横浜市)

15. C. Azai and H. Oh-oka "The gene expression system in the green sulfur bacterium chlorobaculum tepidum by conjugative plasmid transfer", 14th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, 2012年8月5-10日、Porto (Portugal)

〔図書〕(計 5件)

1. 大岡宏造(2016年)光と生命の事典「No. 30 光合成細菌」、朝倉書店

2. 大岡宏造(2015年)光合成のエネルギー変換「17章 ヘムと鉄硫黄クラスター」pp. 169-178、化学同人

3. 大岡宏造(2015年)WEB版光合成事典(編集委員)、日本光合成学会

4. 浅井智広、大岡宏造(2014年)光合成のエネルギー利用と環境応用「第6章 ホモダイマー型光合成反応中心の分子構築と反応機構」pp.53-61、シーエムシー出版

5. 浅井智広、大岡宏造(2014年)ホモダイマー型光合成反応中心の分子構築と反応機構 pp.40-47、月刊バイオインダストリー 2013年12月号

〔その他〕

ホームページ等

「光合成反応の分子機構」

<http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/~ohoka/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大岡 宏造(OH-OKA HIROZO)

大阪大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：30201966

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし