

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25810097

研究課題名(和文) ペプチドタグを利用した光合成関連タンパク質の集合体形成と機能解析

研究課題名(英文) Molecular Assembly of Photosynthetic Proteins using Peptide-tags

研究代表者

近藤 政晴 (Kondo, Masaharu)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20571219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：生物が行なう光合成反応では、光エネルギーを利用して電子を流す(電流を発生させる)コアアンテナ-反応中心膜タンパク質(LH1-RC)と、LH1-RCが利用できない短い波長の光エネルギーを集め、LH1-RCの使えるエネルギーレベルに下げ、LH1-RCへ伝達する周辺アンテナ膜タンパク質(LH2)が、隣接し協同的にはたらくことで、広い波長域での光エネルギー電流変換を実現している。本研究では、LH1-RCとLH2をペプチドタグにより人為的に基板の上に集積化(固定化)させた。電気化学計測で光照射時と非照射時で電流値に差がみられかつ、LH1由来の吸収帯の光によって電流が誘起されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In bacterial photosynthetic membranes, light-harvesting complexes (LH1) absorb solar energy and transfer it to the reaction center (RC) at the primary photosynthetic process. The RC converts the absorbed energy into electrochemical energy. These reactions take place within a 'core complex' consisting of LH1 complex and RC. We are interested in understanding the rapid and efficient energy transfer between LH and RC, and have been aiming to construct an artificial solar energy device based on a natural solar energy conversion system. In this study, we prepared peptide tags were fused to the LH1 and LH2 from Rhodospirillum rubrum, to allow immobilization of the LH1-RC, and LH2 complex on a substrate. The photocurrent generated by the adsorbed LH1-RC complexes depended on the wavelength of the irradiation light and His-tagged position of LH1-RC. The results indicated that the LH1-RC complexes were assembled by peptide-tags with retaining photochemical activity on the substrate.

研究分野：生体関連化学

キーワード：光合成細菌 光収穫系 アンテナ系 膜タンパク質 色素 電極基板 光電流計測 自己組織化

1. 研究開始当初の背景

近年の生物学の進展により、植物や細菌の行なう光合成反応に関与する生体高分子(タンパク質など)の構造や反応機構から、生体高分子が優れたエネルギー変換機能をもつことが明らかになりつつある。2003年に光合成反応を行なう細菌(光合成細菌)の光エネルギーで電子を流すコアアンテナ-反応中心膜タンパク質複合体(LH1-RC)(**図1**)と、1995年にLH1-RCが利用できない短い波長の光エネルギーを集め、LH1-RCの利用可能なエネルギーに変えて伝達する周辺アンテナ膜タンパク質のX線結晶構造解析結果が発表された。これらの機能は、クロロフィル色素の分子配向、色素間距離、色素周りの環境などが、膜タンパク質により制御されることで発現されており、これらの膜タンパク質の構造を保ったままを基板上へ固定化し、その機能を発揮することができれば、超微細デバイスの開発が可能になる。

このような背景のもと、申請者は、光合成細菌のLH1-RCのX線結晶構造解析を行なったR.J.Cogdell(UK)の研究室へ留学し、LH1-RCの単離、精製法を学んだ。一般的に膜タンパ

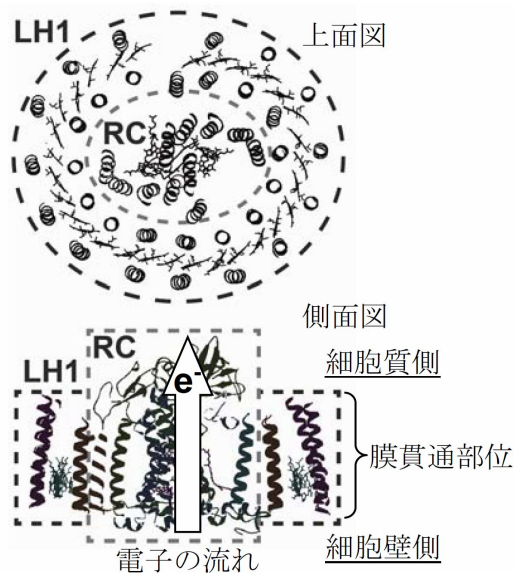


図1 光合成細菌のLH1-RCの構造

コアアンテナ LH1 は、反応中心 RC の周りを囲んでいる。LH1 を構成する LH1- α と β の二種類の膜タンパク質によりクロロフィル色素が、リング状に配置されることで RC への超高速のエネルギー伝達を行なう。RC では、クロロフィル色素が、酸化還元電位の高い順番に配列されることで生体膜をはさんで細胞壁側から細胞質側へ一方向の高効率な電子移動を行なう。(PDB ID 1PYH)

ク質の構造、機能を保ったまま生体膜から取り出す際には、界面活性剤の種類、濃度などのノウハウがある。留学の成果として、LH1とRCを別々ではなくLH1-RC複合体として単離、精製に成功し、次にアミノ基で表面修飾した基板上へのLH1-RCの固定化に成功した。光照射時においてLH1-RCの由来の電流応答が見られ、LH1-RCの機能を保ったまま基板上に固定化すなわち組織化を確認した。(M.Kondo et al. *Biomacromolecules* (2008)).

2. 研究の目的

生物が行なう光合成反応では、光エネルギーを利用して電子を流す(電流を発生させる)コアアンテナ-反応中心膜タンパク質(LH1-RC)と、LH1-RCが利用できない短い波長の光エネルギーを集め、LH1-RCの使えるエネルギーレベルに下げたLH1-RCへ伝達する周辺アンテナ膜タンパク質(LH2)が、隣接し協同的にはたらくことで、広い波長域での光エネルギー電流変換を実現している。本研究では、LH1-RCとLH2をペプチドタグにより人為的に基板上に集積化(集合化)させ、その集合体の物性評価から得られる知見をもとに、生体高分子を用いた光エネルギー電流変換素子の構築を目指す。LH1-RC, LH2を集積化させる際には、ニッケル錯体を修飾した基板を用いた。

3. 研究の方法

本研究ではLH1-RC, LH2集合体を基板上に調製し、その機能評価を行なうことで生体高分子を用いたデバイス作製を行なうために本研究計画では、以下の3点の研究方法で進めた。

- (1) His-tagの導入されたLH1-RC, LH2の調製
- (2) His-tagによるLH1-RC, LH2の基板上への固定化
- (3) 蛍光スペクトル測定、光誘起電流測定によるLH1-RC-LH2間のエネルギー移動の評価、光電変換能を評価

- (1) His-tagの導入されたLH1-RC, LH2の調製

His-tagを導入するLH1-RC, LH2は、遺伝子情報が明らかな光合成細菌 *Rba. sphaeroides* を用いた。申請者が既にHis-tag LH1-RC複合体を調製した手法を応用して実験を進めた。ここでは、1回膜貫通型のLH1, LH2膜タンパク質に注目し、LH1のN末端(細胞質側)とC末端(細胞壁側)(LH1に関して**図1**を参照)の膜外領域にHis-tagとしてはたらくアミノ酸を導入した。His-tagをもつLH1, LH2を発現する光合成細菌が得られた後に、培養を行ないLH1-RC, LH2の分離、精製作業を行なった。LH1-RC, LH2は膜タンパク質であるので、界面活性剤を用いて生体膜から水溶液中に可溶化される。LH1, LH2にはHis-tagが導入されているので、ニッケルアフ

<i>Rba. sphaeroides</i> IL106							
	-40	-30	-20	-10	0	+10	+20
Native							
LH1- α		MSKFYKIWMI	FDPRRVFVAQGVFLFLLAVMIHLILLSTPSYNWLEISA				AKYNRVAVAE
LH1- β		ADKSDLGYTGLTDEQAQELHSVYMSGWLWLFSAVAIVAH					LAVYIWRPWF
Mutant LH1							
LH1- α C-His		MSKFYKIWMI	FDPRRVFVAQGVFLFLLAVMIHLILLSTPSYNWLEISA				AKYNRVAVAEHHHHHH
LH1- α N-His		MHHHHH	SKFYKIWMI	FDPRRVFVAQGVFLFLLAVMIHLILLSTPSYNWLEISA			AKYNRVAVAE
Native							
LH2- α		MTNGKIWL	VVKPTVGVPLFLSAAVIA				SVVVHAAVLTTTTLWLPDY
LH2- β		TDDL	LNKVVWPSGLTVAAEAEVHKQLILGTRVFGGMALIAHFLAAAATPWL				G
Mutant LH2							
LH2- α C-His		MTNGKIWL	VVKPTVGVPLFLSAAVIA				SVVVHAAVLTTTTLWLPDY
LH2- β N-His		TDDL	LNHHHHHKVVWPSGLTVAAEAEVHKQLILGTRVFGGMALIAHFLAAAATPWL				G

図2 光合成細菌 *Rhodobactor sphaeroides* の LH1, LH2 の天然のアミノ酸配列と変異 LH1, LH2 のアミノ酸配列 バクテリオクロロフィル(BChl a)が軸配位するヒスチジン; H を 0 とした。

イニテーターカラムを用いて精製を行なった。LH1-RC, LH2 の精製確認は、近赤外 - 可視吸収スペクトル、電気泳動や高速液体クロマトグラフィーで分離したそれぞれのタンパク質を質量分析することで行なった。

(2) His-tag による LH1-RC, LH2 の基板上への固定化

His-tag の導入された LH1-RC, LH2 は、His-tag とニッケル錯体と配位結合を形成するため、ニッケル錯体を含む自己組織化単分子膜分子 Dithiobis(C2-NiNTA)で修飾した基板表面へ固定化することが可能になる。LH1-RC, LH2 の基板上への固定化の確認は、それぞれの吸収帯を可視吸収スペクトルで行なった。また、水晶発振子マイクロバランス法を利用した固定化量の評価も行なった。

(3) 蛍光スペクトル測定、光誘起電流測定により LH1-RC - LH2 間のエネルギー移動の評価、光電変換能の評価

(2)の実験で基板上へ固定化した LH1-RC, LH2 の集積体内部での LH1-RC - LH2 間のエネルギー移動の評価は、蛍光スペクトル測定、光誘起電流測定から行なう。蛍光スペクトル測定では、LH2 の蛍光発光強度の変化からエネルギー移動効率を評価する。LH2, LH1-RC が隣接集合化することで、LH2 から LH1-RC へエネルギー移動が起こるため、LH2 のエネルギー損失(蛍光発光)が起こりにくくなるので、LH2 の蛍光発光の強度が低下する。(基板上での LH1-RC, LH2 のエネルギー移動の評価は、蛍光発光の検出強度が不十分であったため達成できなかった。)また、光誘起電流測定では、光照射時の電流値の変化と照射した光の光子数で、光電変換効率を評価する。LH1-RC と LH2 の単量体と集積化した LH1-RC, LH2 を比較することで、隣接する LH2 - LH1-RC 間でのエネルギー伝達の効果を評価することが可能になる。

4. 研究成果

平成 25-26 年度では、紅色光合成細菌 *Rba.sphaeroides* の LH1, LH2 の遺伝子に改変を加え、変異株を作製した。作製した変異株は、LH1- α の N 末端、C 末端、LH2- α の C 末端、LH2- β の N 末側にそれぞれヒスチジンタグを導入した。ヒスチジンタグの導入された LH1-RC, LH2 をそれぞれ Dithiobis(C2-NiNTA)で表面修飾した ITO 電極、金電極に固定化した。電極上の LH1-RC, LH2 と水溶液中の LH1-RC, LH2 の吸収スペクトルは、良く一致し電極上で LH1-RC, LH2 は変性していないことが明らかになった。また、電極上に固定化した LH1-RC に LH1-RC の最大吸収波長を照射することにより、引き起こされる電子の流れを計測した。観測された電子の流れは、ヒスチジンタグにより分子配向された LH1-RC の分子配向と一致したため、ヒスチジンタグにより LH1-RC の分子配向が制御可能であることを明らかにした。平成 27 年度では、膜タンパク質の基板上への固定化量を明らかにするため、金をコートした水晶発振子上への LH1-RC の固定化を進めた。LH1-RC の固定化量を求めたところ、単分子レベルで吸着している量とよく一致し、吸収スペクトルから求められる吸着量とほぼ一致した結果が得られた。

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 3 件)

Masaharu Kondo, Mizuki Amano, Fujii Kaoru, Ayumi Okuda, Shuichi Isigure, Takeshisa Dewa, Yutaka Amao, Hideki Hashimoto, Mamoru Nango, *Research on Chemical Intermediates* 2014, 40 (9),

3277-3285. 査読あり
DOI:10.1007/s11164-014-1822-3.
Masaharu Kondo, Mizuki Amano, Takashi Joke, Shuichi Ishigure, Tomoyasu Noji, Takehisa Dewa, Yutaka Amao, and Mamoru Nango, *Research on Chemical Intermediates* **2014**, 40 (9), 3287-3293. 査読あり
DOI: 10.1007/s11164-014-1833-0.
Masaharu Kondo, Shuichi Ishigure, Yuko Maki, Takehisa Dewa, Mamoru Nango, Yutaka Amao, *International Journal of Hydrogen Energy* **2015**, 40, 5313-5318. 査読あり
DOI: 10.1016/j.ijhydene.2015.01.158

〔学会発表〕(計 5件)

近藤政晴、水野稔久、永島咲子、永島賢治、出羽毅久、南後 守：「光合成アンテナ系膜タンパク質の基板上への組織化」日本化学会第 94 春季年会 名古屋大学 (発表番号 2G5-41) (2014. 3. 27-30)

近藤政晴：「光合成タンパク質 - 色素複合体を用いた光電変換素子の作製」第 63 回高分子学会年次大会 名古屋国際会議場 (発表番号 2H15ILY) (2014. 5.28-30)

近藤政晴、今中洋行、吉田香織、黒田洋詩、高橋裕一郎：「金親和性ペプチドを用いた光化学系 I の金基板上への固定化と機能評価」第 8 回バイオ関連化学シンポジウム 岡山大学 (発表番号 1B-15) (2014. 9. 11-13)

近藤政晴、川上知朗、大友征宇、出羽毅久：「光合成関連タンパク質の電極上への固定化と機能評価」第 23 回反応中心セミナー 2015 龍谷大学 (発表番号 P17) (2015. 7. 11-12)

近藤政晴、川上知朗、大友征宇、出羽毅久：「光合成関連タンパク質の電極上への組織化と機能評価」第 9 回バイオ関連化学シンポジウム 熊本大学 (発表番号 2P-045) (2015. 9. 10-12)

〔図書〕(計 2件)

近藤政晴、南後 守 “光合成のエネルギー利用と環境応用 Application of Photosynthesis: Energy and Environment” (共著) シーエムシー出版 2014 年 1 月 31 日 第 1 刷発行

近藤政晴、“光合成研究最前線” ~ 光エネルギー変換の基礎から二酸化炭素濃縮・人工光合成・高効率有機太陽電池の構築まで ~ (共著) エヌ・ティー・エス出版 2014 年 12 月 15 日 第 1 刷発行

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2件)

名称：光化学反応装置、その製造方法および光化学反応方法

発明者：近藤政晴、野地智康、出羽毅久、神 哲郎
権利者：国立大学法人名古屋工業大学、独立行政法人産業技術総合研究所
種類：特許
番号：特願 2013-161622
出願年月日：2013 年 8 月 2 日
国内外の別：国内

名称：PHOTOCHEMICAL REACTION DEVICE, METHOD FOR MANUFACTURING SAME, AND PHOTOCHEMICAL REACTION METHOD (光化学反応装置、その製造方法および光化学反応方法)

発明者：近藤政晴、野地智康、出羽毅久、神 哲郎
権利者：国立大学法人名古屋工業大学、独立行政法人産業技術総合研究所
種類：特許
番号：14/909,601
出願年月日：2014 年 7 月 30 日
国内外の別：米国

〔その他〕

ホームページ等

<http://wakate.adm.nitech.ac.jp/node/221>

<http://wakate.adm.nitech.ac.jp/en/node/384>

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 政晴 (Kondo Masaharu)

名古屋工業大学・工学部・生命・応用化学科・助教

研究者番号：20571219