

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目： 特定領域研究  
 研究期間： 2004～2009  
 課題番号： 16087201  
 研究課題名（和文） 光合成細菌の集光性アンテナ・反応中心タンパク質複合体における高度な機能制御機構  
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of the functional regulation of the bacterial photosynthetic light-harvesting-reaction center complexes  
 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

研究成果の概要（和文）：自然界で最もシンプルなアンテナ・光電変換機能をもつ光合成分子機械の作動原理について各種物理化学的手法を駆使して調べてきた。その結果、光捕集を司るアンテナ複合体の構造単位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を原子レベルで解明した。また、アンテナ反応中心超分子複合体の結晶化に成功した。一方、極限環境下で生息する光合成微生物のアンテナ機能に金属イオンの果たす意外な役割を突き止め、光生物における環境適応戦略の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The bacterial photosynthesis that provides a simplified model system ideally for studying the light energy conversion has been investigated using various physicochemical methods. We have determined the pigment geometry and structures of the polypeptides in an antenna structural subunit. A core light-harvesting-reaction center complex has been crystallized. The unusual spectroscopic behavior and enhanced thermostability of the core complex from a thermophilic bacterium has been clarified, revealing the adaptive strategy of the photosynthetic organism to survive in extreme environments using natural resources.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2004 年度	15,700,000	0	15,700,000
2005 年度	16,600,000	0	16,600,000
2006 年度	15,100,000	0	15,100,000
2007 年度	15,100,000	0	15,100,000
2008 年度	12,400,000	0	12,400,000
2009 年度	4,100,000	0	4,100,000
総計	79,000,000	0	79,000,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物科学

キーワード：光合成、光捕集反応中心複合体、色素膜タンパク質、光電変換

## 1. 研究開始当初の背景

緑色植物を含む光生物は数十億年の進化により、現在地球上で最も大規模に太陽の輻射エネルギーから化学エネルギーへの変換を効率良く行なうもので、地球環境の形

成及び大気組成の保持に決定的な役割を演じている。太陽エネルギーの利用を物理化学的に行なおうとするとき、生物の光エネルギー獲得の仕組みを理解することが前提となる。光合成反応における光-化学エネ

ルギー変換は、太陽光の集光、そのエネルギーによる光誘起電子移動反応、生体膜を介した電気化学的ポテンシャル（プロトン濃度勾配と電場ポテンシャル）の形成反応を通して行われ、これにより保存されたエネルギーが ATP（アデノシン 3 リン酸≡生化学的エネルギー）の合成、イオンの輸送、運動、保温のためのエネルギーとして、生命活動を支えている。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。RC については、我々の研究を含め既に原子レベルの構造解析の結果があるが、アンテナについては未解決である。特に、反応中心を直に取り囲み、反応中心に直接光エネルギーを伝達しているコアアンテナ LH1 については光合成初期過程の制御機構解明のためにその詳細な構造解明が待たれている。LH1 複合体の研究における難しさは、LH1 とそれが取り囲む RC との間に強い相互作用が存在するため、RC を除去して LH1 のみを取り出そうとすると LH1 自身もダメージを受けやすいところにある。そしてアンテナにおける励起エネルギー伝達機構、反応中心における光誘起電子移動制御機構を解明するためには、アンテナ、反応中心それぞれの詳細な構造解明のみならず、それらが形成する超分子-アンテナ・反応中心複合体(LH1-RC)-の構造解明が前提となる。現在世界で幾つかの研究グループが光捕集・反応中心複合体 LH1-RC の形で結晶化を競っている所である。その中で、イギリスのグループは *Rps. palustris* [Science 302, 1969(2003)]、フランスのグループは *Rb. veldkampii* [Biochemistry 45, 10512(2006)]、ドイツのグループは *Rsp. rubrum* [Journal of Molecular Biology 282, 819(1998)]、米国のグループは *Rb. sphaeroides* [Photosynthesis Research 86, 61(2005)] のように、すべて常温光合成細菌株由来の LH1-RC の結晶構造解析をそれぞれ精力的に行っている。我々の研究は好熱性光合成細菌も用いることから単離精製される光合成色素タンパク質が熱に対して極めて安定であり、実験に好適だけではなく今後期待される工学的応用にも優れていると考えられる。本研究で用いられる高熱性紅色硫黄光合成細菌 *Thermochromatium(Tch.) tepidum* の最適生育温度は 48-50°C であり、最高生育温度が

60°C にも達している。また、反応中心を取り囲む LH1 複合体の近赤外領域における吸収波長が常温菌では 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今まで不明のままであった。

## 2. 研究の目的

本研究では、光-化学エネルギー変換系において要の反応である光合成の初期過程、すなわち光エネルギーを集めるアンテナとそのアンテナが集光したエネルギーを利用して電子移動を起こす反応中心という色素とタンパク質からなる超分子色素タンパク質 LH1-RC の構造・機能の解明を行う。まず LH1 の構成成分の詳細な構造を決定し、続いて LH1 全体の立体構造を天然に存在するインタクトな形で反応中心 RC との複合体として原子レベルで明らかにしたい。一方、好熱菌由来 LH1-RC の耐熱機構ならびに LH1 の特異的な吸収極大の原因を突き止めたい。

## 3. 研究の方法

### (1) LH1 構成タンパク質の構造解析

LH1 を構成する  $\alpha$ ,  $\beta$  および PufX 膜タンパク質は水には溶けないものの、メタノール/クロロホルム混合溶媒に溶解することが知られている。これらの溶媒における単独の膜タンパクの多次元 NMR 測定を行う。天然存在比の試料でも観測可能であるが、シグナル同定のために選択標識の試料を用いる。測定はまず、 $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  で均一に標識した試料を用いて三重共鳴法 (3D HNCA 等) を行い、配列特異的にアミノ酸主鎖のシグナルを帰属した。側鎖のシグナルは 3D  $^{15}\text{N}$  TOCSY-HSQC スペクトル等から帰属する。続いて、メタノール- $d_4$  中において 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  相関 (HSQC) を測定し、溶媒の重水素との交換速度から各残基のアミドプロトンの水素結合を同定する。次に 3D HNHA スペクトルの測定から、ペプチド結合の二面角  $\phi$  に依存するスピン結合定数  $^3J_{\text{HNH}}$  を算出する。さらに、3D  $^{15}\text{N}$  NOESY-HSQC スペクトルの測定から、各残基のアミドプロトンと空間的に近接したプロトンとの間の核オーバーハウザー効果 (NOE) を観測し、水素原子間距離を見積る。以上の測定より得られた水素原子間距離制限、二面角制限、水素結合間距離制限をもとに、ディスタンス・ジオメトリー法よりタンパク質の立体構造計算を行う。

### (2) LH1-RC の結晶化と構造解析

LH1-RC の結晶化スクリーニングには、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を行う。X 線反

射を有する結晶を得るための最適条件を見いだす。最終的には、良質な単結晶を使いクライオ装置を用いて低温での測定を行い、回折データを収集したい。

(3) 金属イオンとの結合による光捕集複合体 LH1 の熱耐性と分光学的性質への影響

各種イオン種の添加による LH1 複合体の熱安定性を吸収スペクトル、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 NMR で評価する。この場合、色素結合部位周辺については近赤外領域の変化、タンパク質の二次構造については紫外領域でのスペクトル変化に注目する。一方、示差走査マイクロカロリーメトリー (DSC) 法はタンパク質複合体の温度転移 (熱変性) に伴う熱力学量を定量的かつ高感度で測定することができる。この方法を用いて各種イオン種の添加による LH1 複合体の変性中点温度 ( $T_m$ ) と変性エンタルピー変化を求める。

#### 4. 研究成果

(1) 好熱菌由来 LH1-RC 複合体精製法の確立

光合成膜タンパク質 LH1-RC 複合体を色素分子とともにインタクトな構造を保ったままで単離精製することが必要であるため、界面活性剤の種類、濃度、溶液 pH を様々に変えて試みた。試行錯誤の実験を繰り返した結果、最終的に好熱性紅色硫黄光合成細菌 *Tch. tepidum* 由来の LH1-RC 複合体の単離・精製に成功し、高い光学活性をもつ極めて高純度・高濃度の色素・膜タンパク質複合体の調製方法を確立した。電気泳動の結果から LH1 を構成する  $\alpha$  と  $\beta$  サブユニット及びチトクロムを含む RC の 4 つのサブユニットタンパク質が全て確認された。吸収スペクトルから、通常の LH1 のもつ近赤外の吸収極大波長が 875nm であるのに対して、*Tch. tepidum* より単離精製した LH1 はさらに 40nm 長波長側の 915nm に吸収極大をもつという極めて興味深く、意外な結果が得られた。これは、LH1 中にある色素バクテリオクロロフィル分子とタンパク質との特異な相互作用、または LH1 を構成するサブユニット構造単位が通常のものとは異なる会合構造を形成していることによるものと考えられる。

(2) LH1 サブユニットの構造と機能解明

光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* 由来 LH1 の構成単位の立体構造を NMR 法により原子レベルで決定した。両膜タンパク質は溶液中で長期間 (10 日以上) にわたって安定な二次構造を保持しており、膜貫通領域に対応する部分はシングルヘリックス構

造であることが明らかとなった。 $\alpha$  タンパク質においては、色素バクテリオクロロフィル分子に配位結合している His38 はヘリックスドメインの C 末端付近に存在しているのに対し、 $\beta$  では His29 がヘリックス領域のほぼ中央に位置していることがわかった。また、 $\beta$  タンパク質の His38 と Trp47 が互いに近接していることから、複合体形成時には Trp47 のインドール基と色素の C3 カルボニル基との間で水素結合が形成されていると予想される。

(3) LH1-RC の 2 量化に関わる PufX の構造解析と機能解明

PufX は LH1-RC 2 量体化及び電子伝達体であるキノン分子が LH1-RC と Cytochrome  $bc_1$  複合体の間に輸送されることに関与している。しかし、天然の PufX の発現量が極めて少なく、その構造や 2 量体形成のメカニズムはわかっていない。そこで、我々は大腸菌発現系を構築し、PufX の大量発現を試みた。その結果、活性をもつ PufX タンパク質が大量に得られた。これに続き、PufX の同位体標識を行い、その立体構造を核磁気共鳴法で決定した。PufX は膜一回貫通のヘリックス構造を示し、その中央部分にグリシンとアラニン残基に富む領域が存在することを判明した。他の実験結果と合わせて、この領域がキノン輸送とタンパク質間相互作用を司る PufX の活性部位であることを推定した。これらの知見は今後 LH1-RC の結晶構造解析にも大いに役立つものと考えられる。

(4) LH1-RC 複合体の結晶化

LH1-RC 超分子複合体の単離精製法の確立に続き、結晶化条件のスクリーニングを行った。沈殿化剤、界面活性剤など多くの組合せから定常的に結晶が得られる条件を見出した。その結果、*Tch. tepidum* から単離精製した LH1-RC 試料より比較的大きな結晶形成が観測された。一方、常温紅色非硫黄光合成細菌 *Rsp. rubrum* より単離した LH1-RC から結晶が得られた。LH1-RC の結晶化に続き、回折実験に必要な凍結条件のスクリーニングも行った。特定の界面活性剤存在の条件下で得られた結晶のサイズは大きいものの、膜タンパク質複合体に特有な性質として結晶が非常に弱く、低温測定に必要な凍結過程で壊れてしまう問題点が現れた。現在これら複合体の結晶化と凍結条件の最適化を調べている。

(5) LH1-RC 複合体の分光学的挙動に及ぼす金属イオンの影響

*Tch. tepidum* 由来の LH1-RC 複合体の結晶化実験と並行して、我々は同複合体のも

つ幾つかのユニークな性質の原因解明も進めてきた。この耐熱菌体より精製された LH1-RC 複合体は 60°C まで安定に存在でき、LH1 のもつ近赤外の吸収極大波長 ( $Q_y$ ) が常温菌から得られたものより 35nm 長波長側の 915nm にあることを見出した。その原因としてカルシウムイオンが関与していることを突き止めた。つまり、NaCl を用いた陰イオン交換カラムで精製した *Tch. tepidum* 由来の LH1-RC に、各種濃度の  $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Sr^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$  塩を添加したところ、 $Ca^{2+}$  塩を除く全ての塩で LH1  $Q_y$  遷移のブルーシフトが観測され、LH1 中の色素の配向状態に変化が起きたことを表している。そこで  $CaCl_2$  を用いて精製した LH1-RC に対して同様の実験を行ったところ、全ての塩において LH1  $Q_y$  遷移の変化が認められなかった。このことは LH1-RC 内に  $Ca^{2+}$ -binding site が存在し、いったん  $Ca^{2+}$  と結合すると LH1 中の色素の配向構造が強く保持され、色素膜タンパク質複合体全体としての構造安定性が高められたことを示唆している。

#### (6) LH1-RC 複合体の熱耐性に及ぼす金属イオンの影響

*Tch. tepidum* より精製された LH1-RC 複合体は 60°C まで安定に存在でき、LH1 のもつ近赤外の吸収極大波長 ( $Q_y$ ) が常温菌から得られたものより 35nm 長波長側の 915nm にあることが知られている。後者の原因として  $Ca^{2+}$  が関与していることを見出し、その後 LH1-RC 複合体の熱安定性にも  $Ca^{2+}$  が必要であることを突き止めた。天然の LH1-RC 複合体から  $Ca^{2+}$  を除去することにより熱安定性が常温菌由来のものと同程度に下がり、また一旦除去した LH1-RC に  $Ca^{2+}$  を添加すると再び熱安定性が天然型と同じに回復することがわかった。示差走査微量熱量分析より、天然型 LH1-RC の熱変性温度が  $Ca^{2+}$  を除去したものより約 15 度高いことが示された。さらに、 $Ca^{2+}$  の替わり、他の二価金属イオン  $Cd^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Sr^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$  を添加したところ、LH1-RC の熱耐性は天然型と  $Ca^{2+}$  添加のものより低く  $Ca^{2+}$  を除去したものより高いことから、これらの金属イオンもある程度 LH1 複合体と結合できることを示唆した。この結果はこれまで推測していた「LH1-RC 内に  $Ca^{2+}$ -binding site が存在し、いったん  $Ca^{2+}$  と結合すると LH1 中の色素の配向構造が強く保持され、色素膜タンパク質複合体全体としての構造安定性が高められた」ことを強く支持している。これらの知見は今後同複合体の結晶化と構造解析にも役立つものと考えられる。

#### (7) 時間分解レーザー分光測定による

#### LH1 と RC 間のエネルギー移動解析

*Tch. tepidum* 由来の光捕集複合体 LH1 の近赤外領域における  $Q_y$  遷移の異常レッドシフトの原因として  $Ca^{2+}$  イオンが関与していることを明らかにしたのにつき、カルシウム結合状態と非結合状態の複合体において、LH1 内の色素カロチノイドからバクテリオクロフィルへの励起エネルギー移動ならびに LH1 から反応中心 RC へのエネルギー移動の動力学を調べた。その結果、両状態の複合体においてカロチノイドからバクテリオクロフィルへの励起エネルギー移動効率はともに約 20% であり、他の菌体由来の複合体の値 (35%) に比べてかなり小さいことがわかった。一方、LH1  $Q_y$  遷移の大きな違いにもかかわらず、還元及び酸化状態の RC へのエネルギー移動速度の時定数は他の菌体由来のものと同程度であることが明らかとなった。

#### 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 13 件)

本申請者大友征宇の英語名は Wang, Z.-Y. となっています。

(1) Calcium ions are required for the enhanced thermal stability of the light-harvesting-reaction center core complex from thermophilic purple sulfur bacterium *Thermochromatium tepidum*.

Kimura, Y., Yu, L.-J., Hirano, Y., Suzuki, H. & Wang, Z.-Y., *J. Biol. Chem.* 査読有 **284**, 93-99(2009).

(2) Overexpression, characterization, and crystallization of the functional domain of cytochrome  $c_2$  from *Chlorobium tepidum*.

Higuchi, M., Hirano, Y., Kimura, Y., Oh-oka, H., Miki, K. & Wang, Z.-Y., *Photosynth. Res.*, 査読有 **102**, 77-84(2009)

(3) Specific  $Ca^{2+}$ -binding motif in the LH1 complex from photosynthetic bacterium *Thermochromatium tepidum* as revealed by optical spectroscopy and structural modeling. Ma, F., Kimura, Y., Yu, L.-J., Wang, P., Ai, X.-C., Wang, Z.-Y. & Zhang, J.-P., *FEBS Journal* 査読有 **276**, 1739-1749(2009)

(4) Calcium ions are involved in the unusual red-shift of the light-harvesting 1  $Q_y$  transition of the core complex in thermophilic purple sulfur bacterium *Thermochromatium tepidum*. Kimura, Y., Hirano, Y., Yu, L.-J., Suzuki, H.,

- Kobayashi, M. & Wang, Z.-Y., *J. Biol. Chem.* 査読有 **283**, 13867-13873(2008).
- (5) Excitation dynamics of two spectral forms of the core complexes from photosynthetic bacterium *Thermochromatium tepidum*. Ma, F., Kimura, Y., Zhao, X.-H., Wu, Y.-S., Wang, P., Fu, L.-M., Wang, Z.-Y. & Zhang, J.-P., *Biophys. J.*, 査読有 **95**, 3349-3357(2008).
- (6) Solution structure of the *Rhodobacter sphaeroides* PufX membrane protein: Implications for the quinone exchange and protein-protein interactions. Wang, Z.-Y., Suzuki, H., Kobayashi, M. & Nozawa, T. *Biochemistry* 査読有 **46**, 3635-3642(2007).
- (7) Purification, characterization and crystallization of the core complex from thermophilic purple sulfur bacterium *Thermochromatium tepidum*. Suzuki, H., Hirano, Y., Kimura, Y., Tataich, S., Kobayashi, M., Miki, K. & Wang, Z.-Y. *Biochim. Biophys. Acta* 査読有 **1767**, 1057-1063(2007).
- (8) Overexpression and characterization of the *Rhodobacter sphaeroides* PufX membrane protein in *Escherichia coli*. Onodera, S., Suzuki, H., Shimada, Y., Kobayashi, M., Nozawa, T. & Wang, Z.-Y. *Photochem. Photobiol.* 査読有 **83**, 139-144(2007).
- (9) Solution structures of the core light-harvesting a and b polypeptides from *Rhodospirillum rubrum*: Implications for the pigment-protein and protein-protein interactions. Wang, Z.-Y., Gokan., Kobayashi, M. & Nozawa, T. *J. Mol. Biol.* 査読有 **347**, 465-477(2005).
- (10) Isotopic labeling of proteins by utilizing photosynthetic bacteria. Suzuki, H., Shimada, Y., Kobayashi, M., Kudo, M., Nozawa, T. & Wang, Z.-Y. *Anal. Biochem.* 査読有 **347**, 324-326(2005).
- (11) Electronic properties and thermal stability of soluble redox proteins from a thermophilic purple sulfur photosynthetic bacterium, *Thermochromatium tepidum*. Kobayashi, M., Saito, T., Takahashi, K., Wang, Z.-Y. & Nozawa, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 査読有 **78**, 2164-2170(2005).
- (12) Reconstitution of photosynthetic reaction centers and core antenna-reaction center complexes in liposomes and their thermal stability. Kobayashi, M., Fujioka, Y., Mori, T., Terashima, M., Suzuki, H., Shimada, Y., Saito, T., Wang, Z.-Y. &

Nozawa, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有 **69**, 1130-1136(2005).

[学会発表] (計 23 件)

- (1) 小林美穂、清水佑記、堀口健太郎、大島史一、于龍江、平野優、大友征宇  
好熱性光合成細菌由来の光捕集光電変換タンパク質の単離精製と結晶化  
茨城地区交流会、2009.11.6、日立
- (2) 大友征宇、平野優、樋口誠、木村行宏、大岡宏造、三木邦夫  
緑色光合成細菌由来のチトクロム cz の構造的、分光学的特徴について  
光合成セミナー、2009.7.11、京大
- (3) 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  
蛋白質学会、2009.5.20~22、熊本
- (4) 平野優、竹田一旗、大友征宇、三木邦夫  
超高エネルギー X 線を利用した高電位鉄イオウタンパク質 HiPIP の超高分解能結晶構造解析  
蛋白質学会、2009.5.20~22、熊本
- (5) 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  
好熱性光合成細菌 *Thermochromatium tepidum* 由来 cytochrome タンパク質 flavocytochrome c552, cytochrome c' の結晶構造  
日本生化学会、2008.12.9、神戸ポートアイランド
- (6) Y. Kimura, L.-J. Yu, Y. Hirano, H. Suzuki, Y. Kawamura, T. Ohno, J.-P. Zhang, S. Otomo  
好熱性光合成細菌 *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  
日本生物物理学会、2008.12.3、福岡
- (7) 樋口誠、逸見光、平野優、大岡宏造、大友征宇  
好熱性緑色光合成細菌由来 Cytochrome cz の大量発現と NMR による構造機能評価  
第 47 回 NMR 討論会、2008.11.12、筑波大

[[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

小林 正幸 (KOBAYASHI MASAYUKI)  
有明工業高等専門学校・物質工学科・准教授  
研究者番号：70271864