

令和元年6月3日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07295

研究課題名(和文) 近赤外光応答性uphill型光合成反応におけるカルシウムイオンの役割

研究課題名(英文) Roles of Ca²⁺ in uphill energy transfer of purple photosynthetic bacteria

研究代表者

木村 行宏 (KIMURA, YUKIHIRO)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：20321755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：好熱性紅色光合成細菌Thermochromatium(Tch.) tepidumは、光捕集1アンテナ複合体が吸収した低エネルギーの近赤外光をエネルギーの高い反応中心に伝達(uphillエネルギー移動)して、光合成を行うことが可能であり、この現象にはCa²⁺が密接に関与していると考えられる。本研究の結果から、Ca²⁺が電子伝達に関わるCサブユニットとRCをつなぐバインダーの役割を担っており、RCのエネルギーを低下させることにより、低エネルギーの光捕集1アンテナ複合体から高い反応中心へと円滑にエネルギーを伝える役割をしていることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近赤外光は地球に降り注ぐ太陽光の約4割を占める未利用のエネルギー資源である。水は低きに流れるが、紅色光合成細菌は低エネルギーの近赤外光をより高いエネルギーに変換(uphillエネルギー移動)して有効なエネルギー源をつくり出している。本研究では、紅色細菌の中でもより低い近赤外光を利用可能な菌に着目し、この種がCaを利用して色素分子の配向状態を制御し、低エネルギー吸収を可能にしていること、およびuphillエネルギーギャップを小さくしていることを明らかにした。本研究で得られた知見は、学術的な意義も大きい。近赤外光応答型人工光合成による新しいエネルギー資源の創出へとつながる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Thermophilic purple sulfur bacterium Thermochromatium tepidum exhibits its light-harvesting 1 (LH1) Qy absorption at 915 nm in the near-infrared region. The LH1 complex transfers the low light energy into a reaction center (RC) against the energy barrier (uphill energy transfer) to initiate the photosynthetic charge separation. Interestingly, Ca²⁺ is a possible factor to be involved in this uphill energy transfer to function as a binder of the RC and a redox-active C-subunit. The binding of the C-subunit to the RC results in the lowering of the Qy transition energy of the special pair to enable the uphill energy transfer smoothly.

研究分野：生物物理学 光生物

キーワード：光合成細菌 光捕集タンパク質 uphill型エネルギー移動 カルシウム 赤外分光法 ラマン分光法 超高速分光法 熱量分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

約 140 種類以上確認されている紅色細菌の中で *Tch.tepidum* は唯一の耐熱菌(生育温度: ~58 °C) であり、LH1-RC(図 1)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 35nm 長波長シフトした低エネルギー吸収特性を示す。本研究代表者らはこれらの異常な特性が Ca^{2+} を巧みに利用した分子構築により発現していることを見出した(Kimura et al., *J. Biol. Chem.* 283, 13867–13873, 2008、Kimura et al., *J. Biol. Chem.* 284, 93–99, 2009.)。実際、最近報告された *Tch.tepidum* 由来 LH1-RC 結晶構造(Niwa et al., *Nature* 508, 228-232, 2014.)において、予測された LH1 $\alpha\beta$ サブユニットの C 末端部位に Ca^{2+} の存在が証明されたが、興味深いことに LH1 だけでなく RC の C、M サブユニットの境界にも新たに 1 つの Ca^{2+} が確認された。この Ca^{2+} は光合成電荷分離反応を担う RC スペシャルペア(BChl-*a* 2 量体)から約 18Å 離れた位置で複数のアミノ酸残基に配位されているが、その役割は不明である。*Tch.tepidum* では集光性アンテナである LH1(Q_y ピーク:915nm)から RC スペシャルペア(Q_y ピーク:890nm)へのエネルギー勾配を大きく遡る uphill エネルギー移動が起こっており、この過程を制御する因子として RC の Ca^{2+} が密接に関与している可能性が非常に高い。また、光合成電荷分離反応により生じた電子はキノン分子により LH1 の外に運搬され、炭酸固定反応に利用されるが、RC はリング状の LH1 に囲まれており、RC で還元されたキノン分子の搬出経路、即ちキノンゲートについては国内外における長年の研究にも関わらず、未だ明らかにされていない。加えて、この一連のキノン輸送の過程にも Ca^{2+} が関与している可能性についても検証する必要がある。

2. 研究の目的

好熱性紅色光合成細菌 *Thermochromatium(Tch.) tepidum* は、他の紅色細菌よりも低エネルギーの近赤外光を利用して光合成を行うことが可能である。この異常な特性は、光捕集 1(LH1)複合体から光合成反応の心臓部である反応中心(RC)へのエネルギー勾配を遡る uphill エネルギー移動によるものであり、この現象には Ca^{2+} が密接に関与していると考えられる。本研究では *Tch.tepidum* 由来 RC の構造に新規に見出された Ca^{2+} に着目し、野生型および Sr²⁺置換型 LH1-RC の灌流誘起全反射吸収赤外分光(ATR-FTIR)、超高速分光、熱量分析により、RC の構造安定化、エネルギー移動、電荷分離反応、キノン分子を含めた電子伝達反応における Ca^{2+} の役割、並びに *Tch.tepidum* 由来 LH1-RC における uphill エネルギー移動の分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Ca 結合型(野生型)および Sr 置換型 *Tch. tepidum* から高純度の LH1-RC を精製した。灌流誘起 ATR-FTIR 分光システムは以前に報告したもの(Yong Li et al., *Biochemistry* 52, 9001-9008, 2013.)を改良して用いた。超高速分光による uphill エネルギー移動速度の測定は、秋本准教授の協力を得て、野生型 *Tch.tepidum* LH1-RC 由来の LH1 をピコ秒レーザーで励起し、RC への uphill エネルギー移動の後、RC の蛍光寿命を観測することにより LH1 から RC へのエネルギー移動速度を計測した。

4. 研究成果

本研究では、(1) RCタンパク質の構造安定化におけるCa²⁺の役割検証、(2) Ca²⁺によるRCスペシャルペアの分光学的特性変化の解析、(3) LH1からRCへのuphillエネルギー移動の直接観測、(4) キノン分子の検出および移動経路のモニタリングについて研究を行った。

(1)に関しては、Cサブユニットが結合したRCとCサブユニットが遊離したRCを精製し、両者の安定性におけるCa²⁺の効果を紫外・可視分光法により解析した。Ca²⁺存在下でCサブユニットが結合することから、Ca²⁺はCサブユニットをRCにつなぎとめる役割を担っており、RCの構造安定化に重要な役割を担っていることが判明した。最近報告された1.9Å分解能の*Tch. tepidum*由来LH1-RCの構造では、このRCのCa²⁺はMg²⁺で置換されていた。従って、RCとCサブユニットのバインダーとして2価の金属イオンが機能している可能性が考えられる。Mg添加系におけるRCの安定性については明確な結果が得られず、今後の検討する予定である。

(2)に関しては、RCからCサブユニットを除去することにより、RCのQy吸収バンドが~890 nmから~880 nmにブルーシフトした。このCサブユニット除去型RCにCa²⁺を添加してもスペクトルに変化は見られなかったことから、Ca²⁺とCサブユニットの協同的な作用により、反応中心の吸収特性が制御されていることを見出した。さらに、光誘起赤外分光法を用いた解析を行い、LH1-RCとRCの状態スペシャルペアの配向状態に有意な差があることが判明した。しかしながら、野生型およびSr置換型のスペシャルペアについては顕著な差はみられず、RCに結合したCa²⁺(またはMg²⁺)がスペシャルペアの分子配向状態に及ぼす影響はほとんどないことが示唆された。また、Cサブユニットの存在がスペシャルペアの配向状態に影響を及ぼしていることが強く示唆する結果を得た。これらについては論文化に向けて追加実験を行っている段階である。

(3)のLH1からRCへのuphillエネルギー移動速度の測定については、RCとLH1の大きなuphillエネルギーギャップにも関わらず、他の紅色細菌と同様のエネルギー移動速度を示すこと、その速度や効率はCaの有無やカロテノイドの種類に依存すること、*Tch. tepidum*においてはエネルギー移動速度に温度効果が認められ、至適生育温度付近で最大値を示す傾向にあることが判明した。

(4)では、光誘起FTIR分光装置の立ち上げ、測定条件の最適化を行い、キノン分子の変化を捉えることに成功した。光合成電荷分離反応に伴うキノンからキノールへの変化を検出し、各種同位体置換体を用いた解析によりキノンおよびキノールのマーカーバンドを特定した。側鎖の異なるキノンやキノン同位体を用いたモニタリングにより、キノン輸送メカニズムの解明に重要な知見を得ることができた。一方、キノン還元においてはCa²⁺の効果はほとんどないことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

1. Kimura, Y.*, Hashimoto, K., Akimoto, S., Takenouchi, M., Suzuki, K., Kishi, R., Imanishi, M., Takenaka, S., Madigan, M. T., Nagashima, K. V. P., and Wang-Otomo, Z.-Y., “Biochemical and Spectroscopic Characterizations of a Hybrid Light-Harvesting Reaction Center Core Complex”, *Biochemistry* **57**, 4496–4503, 2018.
2. Kimura, Y.*, Kawakami, T., Arikawa, T., Yong Li, Yu, L.-J., Ohno, T., Madigan, M.T., and Wang-Otomo, Z.-Y., “C-Terminal Cleavage of the LH1 □-Polypeptide in the Sr²⁺-Cultured *Thermochromatium tepidum*”, *Photosynth. Res.* 135, 23–31, 2018.
3. Nagashima, K. V. P., Sasaki, M., Hashimoto, K., Takaichi, S., Nagashima, S., Yu, L.-J.,

- Abe, Y., Goto, K., Kawakami, T., Takenouchi, M., Shibuya, S., Yamaguchi, A., Ohno, T., Shen, J.-R., Inoue, K., Madigan, M.T., Kimura, Y.* and Wang-Otomo, Z.-Y., “Probing Structure–Function Relationships in Early Events in Photosynthesis Using a Chimeric Photocomplex”, *Proc. Nat. Aca. Sci.*, 114, 10906–10911, 2017.
4. Kimura, Y.*, Lyu, S., Okoshi, A., Okazaki, K., Nakamura, N., Ohashi, A., Ohno, T., Kobayashi, M., Imanishi, M., Takaichi, S., Madigan, M. T., Wang-Otomo, Z.-Y., “Effects of Calcium Ions on the Thermostability and Spectroscopic Properties of the LH1-RC complex from a New Thermophilic Purple Bacterium *Allochromatium tepidum*”, *J. Phys. Chem. B* **121**, 5025–5032, 2017
 5. Kimura, Y.*, Yura, Y., Hayashi, Y., Yong Li, Onoda, M., Yu, L.-J., Wang-Otomo, Z.-Y., Ohno, T., “Spectroscopic and Thermodynamic Characterization of the Metal-Binding Sites in the LH1-RC Complex from Thermophilic Photosynthetic Bacterium *Thermochromatium tepidum*”, *J. Phys. Chem. B* **120**, 12466–12473, 2016.
 6. Yu, L.-J., Kawakami, T., Kimura, Y., and Wang-Otomo, Z.-Y. “Structure Basis for the Unusual Qy Red-shift and Enhanced Thermostability of the LH1 Complex from *Thermochromatium tepidum*”, *Biochemistry* **55**, 6495–6504, 2016.

〔学会発表〕(計 24 件)

1. Wang-Otomo, Z.-Y., and Kimura, Y., “Where is the quinone gate in purple photosynthetic bacterial LH1-RC complex?”, The 56th Annual Meeting of the BSJ, Okayama, Sep. (2018).
2. Imanishi, M., Kobayashi, M., Takenaka, S., Madigan, M.T., Wang-Otomo, Z.-Y., and Kimura, Y., “Origin of the anomalous uphill energy gap in the light-harvesting reaction center from purple photosynthetic bacterium strain 970”, The 56th Annual Meeting of the BSJ, Okayama, Sep. (2018).
3. Kishi, R., Imanishi, M., Hashimoto, K., Nagashima, V.P.K., Kobayashi, M., Takenaka, S., Wang-Otomo, Z.-Y., and Kimura, Y., “Light-induced FTIR spectroscopic studies on quinone exchange mechanism of the LH1-RC complexes from native and chimeric purple bacteria”, The 56th Annual Meeting of the BSJ, Okayama, Sep. (2018).
4. 今西三千絵、竹之内瑞貴、小林正幸、竹中慎治、M.T. Madigan、J. Overmann、大友征宇、木村行宏：“紅色光合成細菌 *Thiorhodovibrio* Strain 970 が示す異常な LH1 Qy レッドシフトの起源”、第 26 回光合成セミナー：反応中心と色素系の多様性、神戸、7 月 (2018)。
5. 木村行宏、今西三千絵、永麗、大野隆、中川支央里、佐賀佳央、M.T. Madigan、大友征宇：“同位体標識化された好熱性紅色硫黄細菌由来 LH1-RC 複合体の振動分光学的解析”、第 26 回光合成セミナー：反応中心と色素系の多様性、神戸、7 月 (2018)。
6. 岸利華子、今西三千絵、小林正幸、永島賢治、竹中慎治、M.T. Madigan、大友征宇、木村行宏：“光誘起 FTIR 分光法を用いた紅色細菌由来 LH1-RC 複合体におけるキノン分子の追跡”、第 26 回光合成セミナー：反応中心と色素系の多様性、神戸、7 月 (2018)。

7. 能島伸吾、小林正幸、竹中慎治、M.T. Madigan、大友征宇、木村行宏：“好熱性および好塩性を示す *Halorhodospira halochloris* 由来光捕集反応中心複合体の特性解析”、第 26 回光合成セミナー：反応中心と色素系の多様性、神戸、7 月（2018）。
8. 竹之内瑞貴、川上知朗、高市真一、木村行宏、M.T. Madigan、J. Overmann、大友征宇：“963 nm に Q_y 遷移をもつ紅色細菌 *Thiorhodovibrio* strain 970 由来 LH1-RC の特性評価”、第 9 回日本光合成学会、仙台、5 月（2018）。
9. Lyu, S., Imanishi, M., Nojima, S., Kobayashi, M., Ohno, T., Wang-Otomo, Z.-Y., and Kimura, Y. “Spectroscopic and thermodynamic analyses of the LH1-RC complexes from a new thermophilic purple bacterium *Allochromatium tepidum*” in the 5th Awaji International Workshop on Electron Spin Science & Technology, Hyogo, Japan, June, 2017.
10. Imanishi, M., Kishi, R., Kobayashi, M., Wang-Otomo, Z.-Y., and Kimura, Y., “Monitoring of quinone reduction in the thermophilic purple bacterium *Thermochromatium tepidum* by means of isotope-edited FTIR spectroscopy”, The 55th Annual Meeting of the BSJ, Kumamoto, Sep. (2017).
11. Kawakami, T., Liang, T., Okazaki, K., Kimura, Y., and Otomo, S., “Co-crystallization of a bacterial photosynthetic electron-transfer complex”, The 55th Annual Meeting of the BSJ, Kumamoto, Sep. (2017).
12. 木村行宏、秋本誠志、今西三千絵、岸利華子、橋本佳奈子、大野隆、永島賢治、大友征宇：“*Thermochromatium tepidum* および *Rhodobacter sphaeroides* 由来 LH1-RC キメラ複合体の特性解析”、第 25 回光合成セミナー：反応中心と色素系の多様性、神戸、7 月（2017）。
13. 岸利華子、今西三千絵、小林正幸、大野隆、大友征宇、木村行宏：“同位体標識化された好熱性紅色細菌 *Thermochromatium tepidum* におけるキノール分子の振動分光学的検出”、第 25 回光合成セミナー：反応中心と色素系の多様性、神戸、7 月（2017）。
14. 能島伸吾、今西三千絵、呂淑文、小林愛実、大野隆、大友征宇、木村行宏：“新規好熱性紅色細菌 *Allochromatium tepidum* 由来 LH1-RC 複合体における Ca 依存型耐熱化機構の ATR-FTIR 分析”、第 25 回光合成セミナー：反応中心と色素系の多様性、神戸、7 月（2017）。
15. Kimura, Y. “Spectroscopic and thermodynamic characterization of LH1-RC complexes from Thermophilic purple bacteria” in 8th OCARINA International Symposium, Osaka, Japan, March, 2017.
16. Kimura, Y., Yura, Y., Hayashi, Y., Yong Li, Onoda, M., Wang-Otomo, Z.-Y., and Ohno T.: “Spectroscopic and thermodynamic characterization of the metal-binding sites in the LH1-RC complex from thermophilic purple sulfur bacterium *Thermochromatium tepidum*”, 17th International Congress on Photosynthesis, Maastricht, The Netherlands, Aug. (2016).
17. Kimura, Y., Matsuzaki, M., Yura, Y., Wang-Otomo, Z.-Y., and Ohno T.: “Effects of metal cations on charge separated states of the reaction center from thermophilic purple photosynthetic bacterium *Thermochromatium tepidum*”, The 4th Awaji International Workshop on Electron Spin Science & Technology, Awaji, Hyogo, Jun. (2016)

18. 今西三千絵,橋本佳奈子,永島賢治,小林正幸,由良優季,大野隆,大友征宇,木村行宏 :
“FTIR 分光法を用いた好熱性紅色細菌 *Thermochromatium tepidum*における光合成
電子伝達反応のモニタリング”、第58回日本植物生理学会年会、鹿児島、3月(2017)
19. 橋本佳奈子、秋本誠志、永島賢治、大友征宇、木村行宏、大野隆：“ヘテロ複合体
発現系を用いた uphill 型光合成反応機構の解析”、第497回日本農芸化学会関西支部
講演会、神戸、12月(2016)
20. 呂淑文、大友征宇、M.T. Madigan、木村行宏、大野隆：“新規好熱性紅色光合成細
菌 *Allochromatium tepidum* 由来 LH1-RC の耐熱性制御機構”、第497回日本農芸化学会
関西支部講演会、神戸、12月(2016)
21. Imanishi, M., Kobayashi, M., Kobayashi, M., Matsuzaki, M., Yura, Y., Ohno T., Wang, Z.-Y.,
and Kimura, Y.: Functional and structural roles of calcium ion in the reaction center
complex from thermophilic purple photosynthetic bacterium, *Thermochromatium tepidum*,
The 54th Annual Meeting of the BSJ, Tsukuba, Nov. (2016).
22. Hashimoto, K., Nagashima, V.P.K., Akimoto, S., Ohno T., Wang, Z.-Y., and Kimura, Y.:
Spectroscopic characterization of site-directed mutants in light-harvesting 1 complex from
Thermochromatium tepidum, The 54th Annual Meeting of the BSJ, Tsukuba, Nov. (2016).
23. 呂淑文、木村行宏、大野隆、M.T. Madigan、大友征宇：“新規好熱性紅色硫黄細菌
Allochromatium tepidum 由来 LH1-RC の特性解析”、第24回光合成セミナー：反応中心
と色素系の多様性、京都、7月(2016)。
24. 木村行宏、由良優季、永麗、大野隆、大友征宇：“好熱性紅色細菌 *Thermochromatium
tepidum* 由来光捕集 1 反応中心複合体における吸収特性および耐熱性制御の分子
機構” 植物生理学会年会 第1回光合成細菌ワークショップ、盛岡、3月, 2016.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究分担者：無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大友征宇

ローマ字氏名：Otomo Seiu

研究協力者氏名：秋本誠志

ローマ字氏名：Akimoto Seiji