

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19579005

研究課題名 (和文) 緑色光合成細菌のアンテナ複合体クロロゾームの構造最適化

研究課題名 (英文) The Structural Optimization of Antenna Complexes 'Chlorosomes' from Green Photosynthetic Bacteria

研究代表者

柿谷 吉則 (KAKITANI YOSHINORI)

関西学院大学・理工学研究科・博士研究員

研究者番号：20454712

研究成果の概要：緑色光合成細菌のアンテナ複合体クロロゾームは、光合成における光捕獲装置の1つである。クロロゾーム内に含まれているロッドエレメントと呼ばれる構造物は、バクテリオクロフィル *c* 分子の高次会合体から成っているとされてきたが、その詳細な構造は永年の間決定されていなかった。研究代表者は種々の分光学と回折学とを駆使し、その構造を、実験事実を統一的に説明することの出来る層状の二量体積層構造であると決定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：光合成, クロロゾーム, 固体 NMR 分光, 電子吸収, 円偏光二色性, 粉末 X 線回折, 構造解析, 物理化学

1. 研究開始当初の背景

緑色光合成細菌に含まれるアンテナ複合体「クロロゾーム」は、太陽から降り注がれる光エネルギーを効率よく捉えて、光反応中心に一重項エネルギーを伝達している光捕獲装置である。クロロゾームは、脂質一重膜で覆われた袋の中に筒状の構造「ロッドエレメント」が存在しており(図 1 上)、バクテリオクロフィル *c* (BChl *c*) の高次会合体が蛋白を介さずに構造を形成した特異な構造物であると言われてきた。

このロッドエレメントの構造を解明するために、永年の間、研究が進められてきた。研究初期には電子顕微鏡を用いた形態学的な研究 (Cohen-Bazire et al., *J. Cell. Biol.* **22** (1964) 207; Staehelin et al., *Arch. Microbiol.* **119** (1978) 269 等) が盛んであったが、最近では BChl *c* 間の数 Å オーダー単位の情報を引き出すことが出来る「固体 NMR 分光」を駆使した構造解析が、主として進められている (Nozawa et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **66** (1994) 231; van Rossum et al., *Biochemistry* **40** (2001) 1587 等)。またごく最近になって「X 線回折」

の実験から、ロッドエレメントは筒状の構造ではなくラメラ構造であると主張するグループも出てきた(図1下; Pšenčík et al., *Biophys. J.* **87** (2004) 1165; *Biophys. J.* **91** (2006) 1433)。数十年に亘って研究が進められてきているものの、未だに議論の中心になり得る問題で、誰もが認めるような構造決定には至っていないというのが、研究開始当初の客観的な状況であった。

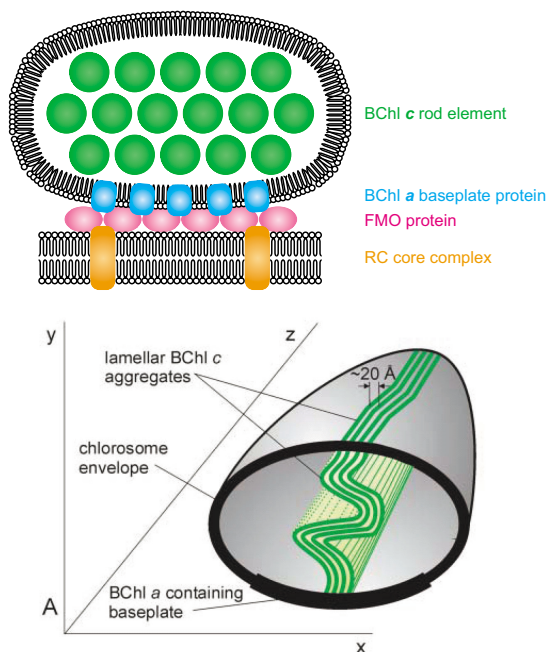


図1: クロロゾームの模式図。ロッドエレメントについて、上が筒状の構造、下がラメラ構造を示す(ラメラ構造は上述の論文より抜粋)。

研究代表者も他グループと同様に、固体NMR分光を用いた解析を進めてきていたが、他のグループとは決定的に異なる手法を取り入れて解析を進めていた。他グループの解析における欠点は、観測されたNMRの相関ピークを全く区別せずに解析している点にあった。つまり、会合構造の決定に必要な不可欠なものは、分子内相関ではなく分子間相関であるにも拘らず、それを区別して議論していない。

そこで固体 ^{13}C -NMRスペクトルから分子間相関を選択的に抽出する手法を確立した。 ^{13}C 濃度が100%および50%であるサンプルの ^{13}C -NMRスペクトルの相関強度を比較すると、分子内相関では強度が50%に減少するが、分子間相関では強度が25%に減少する。クロロゾームからBChl cのみを抽出して固化したサンプル(人工BChl c会合体)に関して、分子間相関の情報のみから会合構造を決定することに成功した(Kakitani et al., *Biochemistry* **45** (2006) 7574)。

次に問題となるのが、脂質一重膜の中などのようにして ^{13}C 濃度が異なるサンプルを調製するかという点である。この達成にはクロロゾーム構造の再構成法が必要不可欠であるので、その手法を確立した。クロロゾームと物理化学的にほぼ同じ性質を持った再構成クロロゾームを調製することに成功した(Kakitani et al., *Biochemistry* **46** (2007) 6513)。

上記2つの技術を組み合わせ、クロロゾーム内におけるBChl cの会合構造を、固体 ^{13}C -NMR分光を用いて決定するための準備が整っていた。本プロジェクト開始以前に、クロロゾーム内のBChl c会合構造は、二量体が階段状に積層した構造ではないかと研究代表者は予想していた。

2. 研究の目的

研究代表者がクロロゾーム内BChl cの会合構造の決定を行ったと主張するためには、独自に開発したNMRの解析技術とサンプル調製法を組み合わせ、 ^{13}C -NMRのみの解析ではなく、様々な側面から構造を検討し、それらを統一的に解釈していくことが必要不可欠であると考えた:

- (1) ^{13}C -NMRに加えて、固体NMR分光の新しい技術である「 ^{25}Mg -NMR」に挑戦する。BChl c分子は中心金属にMgを有しており、ロッドエレメントが化学的に環境の異なるBChl c分子をいくつか含んでいるのかを調べるには、最も有力な手法であるといえる。ロッドエレメントが二量体積層構造であるならば2種類のシグナルが観測されるはずであり、二量体積層構造である強い証拠の1つになり得る。
- (2) 分子の数Åオーダーの領域を反映するNMR分光に加え、数十Åオーダーの分子間相互作用を反映する電子吸収・CD分光を用いて、NMRの情報とフィードバックに解析を行うことにより、構造の最適化を行う。
- (3) 系内の繰り返し構造を反映する粉末X線回折による最適化を取り入れる。また、クロロゾーム構造には、水が重要な役割を担っているという予備的データを既に取得しているので、その点は注意を払う必要がある。

以上より、ロッドエレメントの会合構造を決定し、この問題に終止符を打つことが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

研究の方法は、研究の目的でも述べたように、 ^{13}C -NMR・ ^{25}Mg -NMR分光、電子吸収・CD分光および粉末X線回折を駆使して、全ての

情報をフィードバックさせながら、統一的に実験事実を説明出来る構造の提出を目指した。

また、本研究は以下のような体制で行われた：固体 NMR 分光に関しては、日本電子(株)との共同研究として行い、測定は日本電子(株)、解析は研究代表者が行った。電子吸収・CD 分光と粉末 X 線回折に関しては、測定も解析も研究代表者が行ったが、解析に必要なシミュレーションプログラムについては、神戸市外国語大の長江教授との共同研究で行った。

4. 研究成果

本プロジェクトの目的はほぼ達成された：

(1) ^{13}C -NMR・ ^{25}Mg -NMR

①研究開始当初の背景で述べたように、固体 ^{13}C -NMR スペクトルから分子間相関を選択的に抽出する技術とクロロゾームの再構成法を併用して、クロロゾーム内の BChl *c* の会合構造を明らかにした。

分子間 ^{13}C 磁気双極子相互作用の決定に関しては DARR の手法を用いた。脂質一重膜に覆われた袋の中に、 ^{13}C 濃度が 100% および 50% である BChl *c* 会合体を含有する再構成クロロゾームを調製し、 ^{13}C -NMR スペクトルの相関強度を比較したところ、相関強度が 25% に減少したものを分子間相関として同定することに成功した。それらの炭素原子が BChl *c* 分子上に広く存在したことより、この手法で正しく構造決定ができると考えた。現在までに明らかとなっている 6 つの BChl *c* の会合構造について、分子間に由来する近接炭素原子間距離と実測の分子間相関とを比較したところ、再構成クロロゾーム内の BChl *c* マクロサイクルの配列は、人工 BChl *c* 会合体の構造と基本的には同じであることが判った。その構造は、二量体が階段状に積層した図 2 のような構造であった。

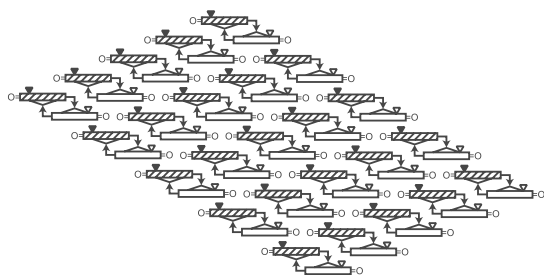


図 2 : ^{13}C -NMR 分光で決定した BChl *c* のマクロサイクルの配列。

② ^{25}Mg -NMR について、日本最大の磁場を有する固体 NMR 分光装置で測定を行い、S/N のよいスペクトルの取得に成功した(図 3)。クロロゾームの ^{25}Mg -NMR スペクトルに

は四極子相互作用の大きなシグナル(シグナル 1)と小さなシグナル(シグナル 2)が 1 種類ずつの二成分存在することを世界で初めて見出した。それに対して、人工 BChl *c* 会合体では四極子相互作用の大きなシグナル(シグナル 3)が 1 種類の単成分しか観測されなかった。 ^{13}C -NMR 分光では両者は基本的に同じであるという結論だったが、 ^{25}Mg -NMR では両者は明確に異なるという極めて重要な情報を得ることが出来た。

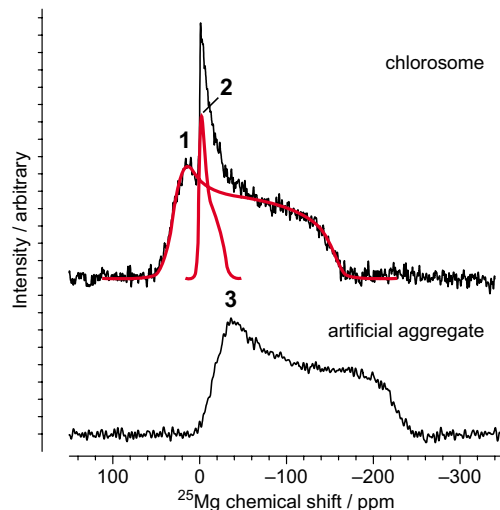


図 3 : クロロゾームと人工 BChl *c* 会合体の ^{25}Mg -NMR スペクトル。

さて、四極子相互作用の大きなシグナルは、Mg 原子の軸配位に関して電場の勾配が不均一であることを意味している。つまり、Mg 原子が 5 配位状態の場合は、Mg 原子の片方にだけ配位子が存在するので、電場勾配が大きくなる。これに起因して共鳴周波数が広がる為、幅の広いシグナルが観測される(四極子相互作用が大きい)。一方、Mg 原子が 6 配位状態の場合は、Mg 原子の両側に配位子が存在するので、電場勾配が小さい。そのため共鳴周波数は狭くなり、幅の狭いシグナルが観測される(四極子相互作用が小さい)。

つまり、図 3 の ^{25}Mg -NMR スペクトルは、人工 BChl *c* 会合体には幅の広いシグナルしか含まれないので、会合体中には 5 配位の Mg 原子しか存在しないが、クロロゾームには幅の広いものと狭いものが含まれるので、5 配位と 6 配位の 2 種類の Mg 原子が会合体中に存在していると解釈される。

^{13}C -NMR のみで決定した構造の中の Mg 原子は全て 5 配位状態である為(図 2 参照)、幅の狭いシグナルに起因できる Mg 原子は存在しない。研究代表者は、実験の過程で水がクロロゾーム内の会合構造を保持する上で重要な役割を果たしていることを発見し、クロロゾーム内の BChl *c* 会合構

造の中に水分子が関与していると考えた。そこで図 2 の構造中に水を配置できる場所を検討したところ、相対する C=O と O=C グループの上か下かの 2 箇所の可能性を見出した。ここで、図 4 を用いて「斜線を施したマクロサイクル」と「斜線のないマクロサイクル」のどちらが 6 配位構造を取り易いかを比較検討したところ、前者では、配位している緑色の矢印で示した「ヒドロキシエチル基」と青い矢印で示した「ファルネシル側鎖の折れ曲り部分」がマクロサイクル平面の両側に配置しているのに対し、後者では、同じ側に配置しているため、前者の方が立体反撥(図 4 中黒い矢印)を考慮した場合、容易であることが判った。

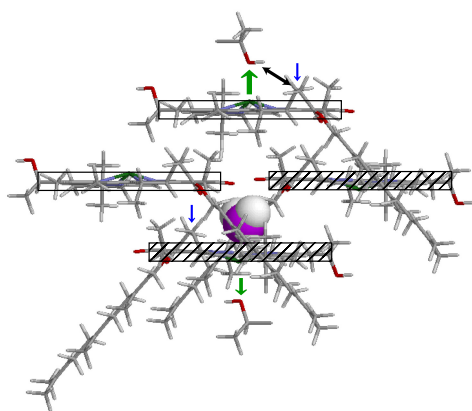


図 4：クロロゾーム内 BChl *c* 会合体中での水分子の結合部位。

従って、クロロゾーム内における BChl *c* マクロサイクルの二次元配列構造を図 5 のように決定した。矢印(i)の向きには「二量体」が階段状に並び、矢印(ii)と(iii)の向きには「単量体」が階段状に並んでいるのが判る。これらの共役系の階段構造は、マクロサイクルの π 電子系の重なりが大きいので、効率の良い 3 種類の「エネルギー伝達経路」を形成していると考えられる。また一点鎖線の分子の関係は、水のネットワークによって支えられた特別な関係になっていることが判る。

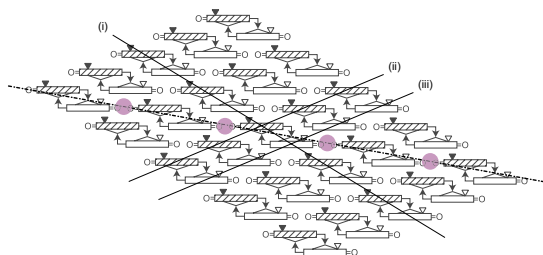


図 5：クロロゾーム内のマクロサイクルの二次元配列構造。紫丸は水分子を示す。

(2) 電子吸収・CD 分光

ラメラ構造を否定する為にシミュレーションを進めてきたが、筒状構造であってもラメラ構造であっても、層状構造の存在が本質であることが判った。曲率半径が大きくなれば、いずれの場合も層状構造として近似される。層状構造の中で Q_y 遷移双極子同士の間隔が小さいことと Q_y 遷移双極子があらゆる方向を向きながら規則正しい配列をしていることが重要であることが判った。全体構造(マクロな構造)を決定するためには、これまでのアプローチを変えて研究の方向性を見出す必要があると考えられる。

(3) 粉末 X 線回折

クロロゾームの粉末 X 線回折を測定したところ、低角側に高次構造に由来した特徴的なピークを得たのだが、このピークは含水量によってシフトする、あるいは、消えてしまうことが緻密な実験によって判った。クロロゾームを部分的に乾燥、凍結乾燥、凍結乾燥後更に真空乾燥していくと、そのピークはだんだん高角側へシフトしていき、最終的には消失した。人工 BChl *c* 会合体にはそのピークが存在せず、クロロゾームを凍結乾燥後更に真空乾燥したものと全く同一の回折パターンであったことから、クロロゾーム構造の保持には水が必要不可欠であること、また、基本的にクロロゾームと人工 BChl *c* 会合体は同様の積層構造を持っていることがここでも確認された。

現在までに判っている 6 つの構造について、それらが完全な二次元結晶であると仮定すると、格子ベクトルとその成す角を用いて一義的に各々を定義することが出来る(実際には多数の異性体が含まれるため結晶化は難しい)。それらの X 線回折パターンをシミュレーションにより計算したところ、低角側に実測されたピークは計算によって得られなかった。つまり、このピークは二次元的配列よりも更に高次の構造に由来すると結論付けることが出来る。それは BChl *c* 分子の二次元配列の層の間隔であると考えた。

6 つの構造のうち、低角のピークを除いて実測を説明できたものは、二量体積層構造の中で、二量体同士の重なりが小さな会合構造であった。この構造の内の 1 つが固体 NMR 分光によって決定された構造であった(図 5 参照)。

つまり、本プロジェクトで決定したクロロゾーム内の BChl *c* の会合構造は、 $^{13}\text{C-NMR}$ ・ $^{25}\text{Mg-NMR}$ 分枝、電子吸収・CD 分光および粉末 X 線回折の全てを統一的に説明する事が可能な構造である。その構

造は図5に示した通り、二量体が階段状に積層しているが、単量体が階段状に積層した場合に含まれる分子間の関係を含んだような非常に特異な構造であった。

(4) 総評

クロロゾームは研究開始当初の背景で述べたように、緑色光合成細菌の光捕獲装置の1つであり、高速レーザー分光を用いた機能の解析も盛んに進められてきている。研究代表者も過去1報の論文を発表している。しかし、その構造が解明されていない状況では、その解析が頭打ちの状態であった。クロロゾームの構造が完全に決定された今、構造に基づいた機能の解析を行うことが可能になった。光合成における緑色光合成細菌の研究の歴史上でブレークスルーを生み出し、発展的な研究を導くことが期待されるという意味において、大きなインパクトを与えると共に学術的に重要な貢献になったと考えている。

更に、当初は予定していなかったが、もう1つの重要な光合成色素であるカロテノイドの研究も行った。カロテノイドは一般的に補助集光作用と光保護作用を担っている。クロロゾーム内には多量のカロテノイドが含まれているが、何処に含まれているのか、何のために含まれているのか等、判っていない。なぜなら、クロロゾームそのものに光保護作用が存在しているからである。両方含まれている意味がどこにあるのだろうか。より詳しくカロテノイドの機能を調べる為に、カロテノイドの分野ではより研究が進んでいる紅色光合成細菌のアンテナ複合体やそこから抽出したカロテノイドについて、クロロゾームの機能を考察するための情報収集として研究を行い、有益な情報が集まってきている。

また、²⁵Mg-NMR 分光はまだ新しい技術である。本研究成果は、生体サンプルとして世界で初めて測定が成功した例になった。NMRの研究分野に対しても、本研究成果は大きな一歩となった。20世紀の研究発展を担った1つであるNMR分光の今世紀での可能性を大きく示すことになった。実際に研究代表者は、紅色光合成細菌のアンテナ複合体 LH2 にそれを応用し、既に1件の学会発表を行っている(主な発表論文等参照)。²⁵Mg-NMR 分光を用いたユニークな実験の準備も更に進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

① Yoshinori Kakitani, Yasushi Koyama, Yuichi

Shimoikeda, Toshihito Nakai, Hiroaki Utsumi, Tadashi Shimizu and Hiroyoshi Nagae, “Stacking of Bacteriochlorophyll *c* Macrocycles in Chlorosome from *Chlorobium limicola* As Revealed by Intermolecular ¹³C Magnetic-Dipole Correlation, X-Ray Diffraction, and Quadrupole Coupling in ²⁵Mg NMR”, *Biochemistry*, **48** (2009), 74–86 (査読あり)

② Hiroyoshi Nagae, Yoshinori Kakitani and Yasushi Koyama, “Theoretical description of diabatic mixing and coherent excitation in singlet-excited states of carotenoids”, *Chem. Phys. Lett.*, **474** (2009), 342–351 (査読あり)

③ Peng Wang, Li-Min Fu, Jian-Ping Zhang, Yoshinori Kakitani, Hidekazu Ishii, Hiroyoshi Nagae and Yasushi Koyama, “Strong carotenoid-to-peptide interaction immediately after triplet excitation triggering conformational changes in photo-reaction center-bound 15-*cis*-spheroidene as revealed by submicrosecond time-resolved Raman spectroscopy”, *Chem. Phys. Lett.*, **458** (2008), 175–179 (査読あり)

④ Takeshi Miki, Yoshinori Kakitani, Yasushi Koyama and Hiroyoshi Nagae, “Stimulated emission from the 1B_u⁻(0) level and the 1B_u⁺(0) + 1B_u⁻(1 and 2) diabatic levels upon excitation to the 1B_u⁺(0) level in neurosporene and spheroidene”, *Chem. Phys. Lett.*, **457** (2008), 222–226 (査読あり)

⑤ Grazyna E. Bialek-Bylka, Yoshinori Kakitani, Chunyong Li, Yasushi Koyama, Michitaka Kuki, Yumiko Yamano and Hiroyoshi Nagae, “Excitation followed by stimulated emission from diabatic states in all-*trans*- and 15-*cis*-β-carotenes: Effects of molecular symmetry and solvent polarity”, *Chem. Phys. Lett.*, **454** (2008), 367–373 (査読あり)

⑥ Yoshinori Kakitani, Ken-ichi Harada, Tadashi Mizoguchi and Yasushi Koyama, “Isotopic Replacement of Pigments and a Lipid in Chlorosomes from *Chlorobium limicola*: Characterization of the Resultant Chlorosomes”, *Biochemistry*, **46** (2007), 6513–6524 (査読あり)

⑦ Yoshinori Kakitani, Ritsuko Fujii, Yoshihiro Hayakawa, Masahiro Kurahashi, Yasushi Koyama, Jiro Harada and Keizo Shimada, “Selective Binding of Carotenoids with a Shorter Conjugated Chain to the LH2 Antenna Complex and Those with a Longer Conjugated Chain to the Reaction Center from *Rubrivivax gelatinosus*”, *Biochemistry*, **46** (2007), 7302–7313 (査読あり)

- ⑧Chunyong Li, Takeshi Miki, Yoshinori Kakitani, Yasushi Koyama and Hiroyoshi Nagae, “Negligible shift of $3A_g^-$ potential in longer-chain carotenoids as revealed by a single persistent peak of $3A_g^- \rightarrow 1A_g^-$ stimulated emission followed by $3A_g^- \leftarrow 1A_g^-$ transient-absorption”, *Chem. Phys. Lett.*, **450** (2007), 112–118 (査読あり)
- ⑨Adita Sutresno, Yoshinori Kakitani, Ping Zuo, Chunyong Li, Yasushi Koyama and Hiroyoshi Nagae, “Presence and absence of electronic mixing in shorter-chain and longer-chain carotenoids: Assignment of the symmetries of $1B_u^-$ and $3A_g^-$ states located just below the $1B_u^+$ state”, *Chem. Phys. Lett.*, **447** (2007), 127–133 (査読あり)

[学会発表] (計 10 件)

- ①柿谷吉則, 緑色光合成細菌のアンテナ複合体クロロゾームの構造解析, 日本植物生理学会 2009 年度年会, 2009 年 3 月 23 日, 名古屋大学
- ②クリスティアーナレベッカ, フェムト秒誘導発光によるカロテノイドの光学禁制 $1B_u^-(0)$, $3A_g^-(0)$ 振電準位と ^{25}Mg -NMR シグナルの線幅を用いたバクテリオクロロフィルの配位状態の決定: LH2 への応用, 日本植物生理学会 2009 年度年会, 2009 年 3 月 23 日, 名古屋大学
- ③小山泰, 紅色光合成細菌の光反応中心におけるサブピコ秒時間分解吸収分光を用いた電子伝達反応の追跡, 日本植物生理学会 2009 年度年会, 2009 年 3 月 23 日, 名古屋大学
- ④Yoshinori Kakitani, Subpicosecond Time-Resolved Raman Spectroscopy of Bacterial Carotenoids, Novel Methods in Exploring Carotenoid Excited State Dynamics (European Science Foundation DYNA Programme Workshop), 22 September 2008, Academic and University Center of Nove Hrad, Nove Hrad, Czech Republic
- ⑤Yasushi Koyama, Evidence for the Symmetry Notation of Carotenoid Singlet-Excited States, Novel Methods in Exploring Carotenoid Excited State Dynamics (European Science Foundation DYNA Programme Workshop), 22 September 2008, Academic and University Center of Nove Hrad, Nove Hrad, Czech Republic
- ⑥三木健嗣, フェムト秒時間分解吸収分光による光合成系カロテノイドの $3A_g^-$ 状態の検出, 日本植物生理学会 2008 年度年会, 2008 年 3 月 22 日, 札幌コンベンションセンター
- ⑦柿谷吉則, 共役二重結合数 $n = 9-13$ をもつカロテノイドの $1B_u^+(0)$ または $1B_u^+(1)$ 状態への励起直後の誘導放出: $1B_u^+$ 状態は $1B_u^-$ 状態と混合するが $3A_g^-$ 状態とは混合しないという観測が与えた禁制状態の対称性表記の裏付け, 第 21 回カロテノイド研究談話会, 2007 年 9 月 7 日, 大阪市立大学
- ⑧柿谷吉則, カロテノイドの $1B_u^+$ 状態と $3A_g^-$ 状態の混合(相互作用)に対する溶媒の極性の影響, 第 21 回カロテノイド研究談話会, 2007 年 9 月 7 日, 大阪市立大学
- ⑨Yoshinori Kakitani, Structure of Cylindrical Aggregate of Bacteriochlorophyll *c* in Reassembled Chlorosome from *Chlorobium limicola* as Determined by Intermolecular $^{13}\text{C}\cdots^{13}\text{C}$ Magnetic-Dipole Correlations, 14th International Congress on Photosynthesis: Satellite Workshop on Photosynthetic Light-Harvesting Systems, 20 July 2007, Buchanan Arms Hotel, Drymen, Scotland, UK
- ⑩Ping Zuo, Stimulated Emission upon Excitation to the $1B_u^+(0)$ and $1B_u^+(1)$ Levels in Carotenoids Having $n = 9-13$ Double Bonds: the $1B_u^+$ State Mixes with the $1B_u^-$ State but Not with the $3A_g^-$ State, Supporting the Symmetry Notation of the ‘Dark’ States, 14th International Congress on Photosynthesis: Satellite Workshop on Photosynthetic Light-Harvesting Systems, 20 July 2007, Buchanan Arms Hotel, Drymen, Scotland, UK

[図書] (計 1 件)

- ①G. Renger, Primary Processes of Photosynthesis, Part 1: Principles and Apparatus, RSC Publishing, 2008, 474 ページ

[その他]

- ①プレスリリース
<http://www.nims.go.jp/news/press/2009/04/p200904280.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
 柿谷 吉則 (KAKITANI YOSHINORI)
 関西学院大学・理工学研究科・博士研究員
 研究者番号: 20454712

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者