

平成21年 4月22日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19614008
 研究課題名（和文） 光合成細菌の持つタイプ1反応中心内のキノン分子の探索と
 反応特性の解析
 研究課題名（英文） Analysis of reaction properties of quinone molecule in the type
 1 reaction center from photosynthetic bacteria
 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

研究成果の概要：

緑色イオウ細菌反応中心の改変によるキノン分子の分光学的検出を試みた。キノン合成遺伝子 *menG* の破壊株はすべて merodiploid となり、コアタンパクのキノン結合領域への変異導入株も得られなかった。光合成反応に必須である遺伝子への変異導入には特別な実験系の確立が必要である。ヘリオバクテリア反応中心のキノン A₁ の配向を調べたところ、よい相関性を示すシミュレーション結果が得られなかった。少なくとも PS I や紅色細菌で得られているキノンの配向角度とは異なることは間違いないが、今後、さらなるデータの精密化とともに測定条件の検討が必要である。またキノン含量を HPLC により解析したところ、反応中心あたり約1分子のメナキノン-9 (MQ-9) の存在が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：光合成

科研費の分科・細目：光生命科学

キーワード：光合成反応中心

1. 研究開始当初の背景

光化学反応中心は、光合成の初期過程である光エネルギーの電気化学的エネルギーへの変換を行う反応場であり、生体膜中に色素タンパク質複合体として存在する。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、タイプ2（キノンタイプ）とタイプ1（Fe-S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

（それぞれ光化学系IIおよびIに相当する）が連結した反応経路を構成するが、いわゆる無酸素発生型の光合成細菌はどちらか一方のみをもつ。紅色細菌はタイプ2のみ、緑色イオウ細菌、ヘリオバクテリアはタイプ1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基本的な構築原理が存在することが分かってきた。

1985年に報告された紅色細菌の立体構造は、反応機構を分子レベルで議論することを可能ならしめたのみならず、光化学系II反応中心との進化的連続性をも明らかにした。さらに2001年には、シアノバクテリアの光化学系IIおよびI複合体の詳細な立体構造が相次いで報告されるに至り、複合体を構成するドメイン構造やフォールディングモチーフ、および電子伝達成分の分子内配置・配向性が、タイプ2、タイプ1の両者において極めてよく似ていることが明らかとなった。一方、緑色イオウ細菌、ヘリオバクテリアの反応中心は酸素に対して非常に不安定であるために標品調製が難しく、未だに構造解析には至っていない。

タイプ1反応中心の電子移動機構を本質的に理解するには、緑色イオウ細菌、ヘリオバクテリアの反応中心に関する構造的情報は不可欠である。それゆえ著者は両反応中心の安定な標品調製を試みるとともに、それらの生化学的・分光学的解析を推し進めてきた。両反応中心はホモダイマー構造をもち、2回対称軸(C2軸)に沿って存在する対照的な2つの反応経路が同等に機能しているものと推測されている。これまで複合体を構成するサブユニットを明らかにし、含まれる電子伝達成分の同定と分光学的諸性質を報告してきた。しかしながら光化学系I複合体との構造的・機能的類似性からその存在が強く示唆されているキノン分子(A₁:Q)については、分光学的証拠を得ることができず長く論争の的となっていた。光合成細菌のタイプ1反応中心は、シアノバクテリアや高等植物の光化学系I反応中心と進化的に断絶しているようにも思われた。

2. 研究の目的

本研究は、光合成反応にとって最も重要な光化学反応中心の構造機能相関に着目し、未だに不明の光合成細菌タイプ1反応中心の電子移動経路を明らかにすることを目的とした。具体的には好熱性緑色イオウ細菌である*Chl. tepidum*、および好熱性ヘリオバクテリアである*Hbt. modesticaldum*を用い、未だに不明の二次電子受容体キノンの存在と、その物理化学的性質に基づく反応特性の詳細を明らかにすることを計画した。

本研究計画の立案時には、著者は酸素にきわめて不安定な両細菌の反応中心標品の精製方法を確認し、緑色イオウ細菌については分子生物学的手法による解析をすでに進め

ていた。さらに分光学的にはキノン分子の存在をESR分極信号として確認もしていた(2006年)。このようにすべての条件がそろい、光合成細菌のタイプ1反応中心内で機能するキノン分子の化学種の同定をはじめ、生化学的、分光学的解析により、反応中心の電子移動経路と分子構築の本質を理解していく絶好の機会が到来していると考えに至った。

3. 研究の方法

(1) 緑色イオウ細菌反応中心の改変とキノンの分光学的検出

ホモダイマー型反応中心において未だにキノンの過渡シグナルが検出できない理由として、電子移動の速度定数 k_1 、 k_2 がほぼ等しいか $k_1 < k_2$ であるために観測されない可能性が考えられた。そこで2次電子受容体A₁(キノン)と3次電子受容体F_Xの間の熱力学的平衡状態をずらすことができるならば(たとえば $k_1 > k_2$ となったときに)、キノンのシグナル観測が期待された。

①. キノン合成遺伝子*menG*の破壊株作成

緑色イオウ細菌*Chl. tepidum*の*menG*はSAMを基質とするメチル基転移酵素をコードし、キノン合成の最終段階で働く。シアノバクテリアの*menG*破壊株の光化学系I反応中心には、C2位のメチル基が脱離したキノンが結合することにより、2次電子受容体A₁(キノン)から3次電子受容体F_Xへの電子移動速度が約2倍遅くなることが報告されている。この原因はキノンの酸化還元電位が約50-60mV大きくなり、 k_2 がより小さくなったためと解釈されている。この変異株から調製された反応中心標品はキノンの過渡シグナルが検出できる可能性が高い。

②. 2次電子受容体A₁(キノン)結合領域の改変

緑色イオウ細菌反応中心のキノン結合部位と推測される領域はきわめて親水性である。この領域のアミノ酸残基の一部を、非電荷あるいは疎水性残基に置換することを試みる。キノン結合部位の環境変化により、キノン分子の酸化還元電位が変化することは光化学系I反応中心で実証済みである。またキノンの結合部位はトリプトファン残基である可能性が非常に高く、周辺領域のトリプトファン残基をフェニルアラニンに置換することを試みる。

(2) ヘリオバクテリア反応中心の分光学的性質

①. 電子伝達成分間の配向性と距離の算出

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。

②. キノン分子の化学的同定

ヘリオバクテリアの膜標品中には、2-3 種類のメナキノン型のキノン分子が存在することが分かっている。コアタンパク標品を調製し、有機溶媒で抽出後、HPLC を用いてキノン分子の分析、同定を行う。

③. キノン置換実験

光化学系 I 反応中心では、水飽和エーテルによりキノン分子を特異的に抽出後、人工キノンに置換することが可能である。様々な人工キノンへの入れ替えにより電子移動速度が変化するならば、キノン結合部位周辺の環境を探ることが可能となる。

4. 研究成果

(1) キノン合成遺伝子 *menG* の破壊株作成

緑色イオウ細菌のキノン合成遺伝子 *menG* を破壊することを試みた。*menG* は SAM を基質とするメチル基転移酵素であり、メチル基をなくしたキノンの酸化還元電位は大きく変化し、電子移動速度が変化することが期待された。しかしながら *menG* 破壊株は merodiploid となり、どうしても破壊できない必須遺伝子であることが示された。

(2) 2次電子受容体 A₁ (キノン) 結合領域の改変

コアタンパクのキノン結合領域の改変を試みたが、すべての変異導入に対して目的とする変異株を取得することができず、得られた株は遺伝型・表現型とも野生型と同一であった。緑色イオウ細菌は光合成的にしか生育できない。コアタンパク遺伝子 *pscA* が光合成反応に必須であり、導入しようとした変異遺伝子が相同組み換え機構により修正されてしまうことが考えられた。そこで次の計画として、相同組み換えに必須な *recA* 遺伝子の破壊 (*recA* 株) を兼ね、精製用タグを付加した第2のコアタンパク遺伝子 (*pscA* mutant: *pscA'*) と薬剤マーカー (*Gm^r*) を *recA* 遺伝子に挿入することを立案中である。この第2のコアタンパク遺伝子に変異を導入することは可能と思われる。

(3) ヘリオバクテリア反応中心のキノン A₁ の配向

コア複合体標品に還元剤ジチオナイトを加えた後、極低温下での閃光照射により再現性よく P⁺A₁⁻の電荷分離状態に由来する電子スピン分極 (ESP) 信号が得られるようになった。この分極信号は A/E/A 型を示し、光化学系 I 反応中心 (PS I) の E/A/E 型とは異なっていた。これはキノン結合部位周辺のタンパク質環境および配向性の違いを反映して

いると考えられた。実際、アミノ酸配列からはヘリオバクテリアのキノン分子 (A₁) 結合サイトは電荷をもったアミノ酸残基が多く存在し、PS I に比べてより親水的な構造であると推測されている。さらにキノン A₁ の膜面垂直軸に対する配向角度を調べるために膜標品を調製後、ポリエステルフィルム上で乾燥させることにより配向性膜標品を調製した。外部磁場と膜面垂直軸との角度を変化させることにより ESP 信号強度の角度依存性を調べた。しかしながら得られたデータをもとにキノンの配向に関するシミュレーションを行ったが、よい相関性を示す結果が得られなかった。現在のところ少なくとも PS I や紅色細菌で得られているキノンの配向角度とは異なることは間違いないが、さらなるデータの精密化とともに測定条件の検討が必要である。

(4) キノン分子の化学的同定

ヘリオバクテリア反応中心標品のキノン含量を HPLC により解析したところ、反応中心あたり約 1 分子のメナキノン-9 (MQ-9) の存在が明らかとなった。

(5) キノン置換実験

キノンが二次電子受容体として機能しているかどうかを、再構成実験を通じて確認していくことにした。そこでヘリオバクテリアの膜標品をエーテル処理することにより、キノン分子を選択的に抽出することを試みた。現在のところ、未処理標品と比較してキネティックスには著しい違いは見出せないが、キノン含量を調べる必要がある。

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 9 件)

1. Y. Tsukatani, C. Azai, T. Kondo, S. Itoh and H. Oh-oka: Parallel electron donation pathways to cytochrome *c₂* in the type I homodimeric photosynthetic reaction center complex of *Chlorobium tepidum* (2008) *Biochim. Biophys. Acta* 1777: 1211-1217
2. T. Mizoguchi, J. Harada, M. Isaji, S. Yoshida, H. Oh-oka and H. Tamiaki: Preferential binding of hydroxy-carotenoids to the peripheral antenna and methoxy-analogs to the core complexes in the purple photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas* sp. Rits (2008) *Carotenoid Sci.* 13: 33-37 (査読有)
3. Y. Saga, J. Harada, H. Hattori, K. Kaihara, Y. Hirai, H. Oh-oka and H. Tamiaki: Spectroscopic Properties and Bacteriochlorophyll *c* Isomer Composition of

- Extramembranous Light-Harvesting Complexes in the Green Sulfur Photosynthetic Bacterium *Chlorobium tepidum* and Its CT0388-Deleted Mutant under Vitamin B12-Limited Conditions (2008) *Photochem. Photobiol. Sci.* 7: 1210-1215 (査読有)
4. J. Harada, S. Miyago, T. Mizoguchi, C. Azai, K. Inoue, H. Tamiaki, and H. Oh-oka: Acumulation of chlorophyllous pigments esterified with the geranylgeranyl group and photosynthetic competence in the CT2256-deleted mutant of the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* (2008) *Photochem. Photobiol. Sci.* 7: 1179-1187 (査読有)
 5. Y. Tsukatani, C. Azai, T. Kondo, S. Itoh and H. Oh-oka: Parallel electron donation pathways to cytochrome c_z in the type I homodimeric photosynthetic reaction center complex of *Chlorobium tepidum* (2008) *Biochim. Biophys. Acta* 1777: 1211-1217 (査読有)
 6. R. Miyamoto, H. Mino, T. Kondo, S. Itoh, and H. Oh-oka: An electron spin-polarized signal of the $P800^+A_1(Q)^-$ state in the homodimeric reaction center core complex of *Heliobacterium modesticaldum* (2008) *Biochemistry* 47: 4386-4393 (査読有)
 7. J. Harada, T. Mizoguchi, S. Yoshida, M. Isaji, H. Oh-oka, and H. Tamiaki: Composition and localization of bacteriochlorophyll *a* intermediates in the purple photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas* sp. Rits (2008) *Photosynth. Res.* 95: 213-221 (査読有)
 8. S. Kumazaki, M. Hasegawa, M. Ghoneim, Y. Shimizu, K. Okamoto, M. Nishiyama, H. Oh-oka, and M. Terazima: A line-scanning semiconfocal multiphoton fluorescence microscope with a simultaneous broadband spectral acquisition and its application to the study of the thylakoid membrane of a cyanobacterium *Anabaena* PCC7120 (2007) *Journal of Microscopy* 228: 240-254 (査読有)
 9. H. Oh-oka: Type 1 Reaction Center of Photosynthetic Heliobacteria (2007) *Photochem. Photobiol.* 83: 177-186 (査読有)
- [学会発表] (計 2 1 件)
1. 原田二郎、宮郷正平、溝口正、民秋均、大岡宏造: 「緑色硫黄細菌 *Chlorobium tepidum* における geranylgeranyl 還元過程の解析」、日本植物生理学会 2008 年度年会、2009 年 3 月 21-24 日、名古屋大学
 2. 浅井智広、原田二郎、近藤徹、伊藤繁、大岡宏造: 「緑色硫黄細菌 *Chlorobium tepidum* の光合成反応中心複合体のアフィニティクロマトグラフィによる調製」、日本植物生理学会 2008 年度年会、2009 年 3 月 21-24 日、名古屋大学
 3. 大岡宏造、宮郷正平、原田二郎、溝口正、高橋俊介、浅井智広、井上和仁、民秋均: 「緑色硫黄細菌のもつクロロフィル色素 Chl a_{PD} の側鎖の生合成経路」、第 81 回日本生化学会大会、2008 年 12 月 9-12 日、神戸国際会議場
 4. 近藤徹、松岡昌弘、浅井智広、吉岡哲記、三野広幸、大岡宏造、伊藤繁: 「対称型光合成反応中心タンパク質複合体内で機能する電子伝達体の配位構造」、日本生物物理学会第 46 回年会、2008 年 12 月 3-5 日、福岡国際会議場
 5. H. Ohoka, T. Kondo, H. Mino and S. Itoh: "Insights into Structure and Function of Bacterial Type 1 Reaction Center", 4th Asia Oceania Conference on Photobiology, 24-26 November 2008, Varanasi, India
 6. 大岡宏造、藤田祐一: 「光合成細菌から見る植物型光合成: いま、なぜ光合成細菌なのか」、第 8 回日本光合成研究会シンポジウム、2008 年 5 月 29-30 日、名古屋大学
 7. 原田二郎、宮郷正平、溝口正、高橋俊介、浅井智広、井上和仁、民秋均、大岡宏造: 「緑色イオウ細菌 *Chl. tepidum* における geranyl geranyl 還元酵素の同定: BChl a_P と Chl a_{PD} の生合成経路に関する知見」、第 8 回日本光合成研究会シンポジウム、2008 年 5 月 29-30 日、名古屋大学
 8. 浅井智広、原田二郎、大岡宏造: 「ホモダイマー反応中心への変異導入に向けた緑色硫黄細菌 *Chlorobium tepidum* の遺伝子発現系の構築」、第 8 回日本光合成研究会シンポジウム、2008 年 5 月 29-30 日、名古屋大学
 9. 近藤徹、松岡昌弘、浅井智広、宮本良、三野広幸、大岡宏造、伊藤繁: 「ホモダイマー型光合成反応中心内での電子伝達系: ヘリオバクテリア反応中心内で機能する電子伝達体の配位構造」、第 8 回日本光合成研究会シンポジウム、2008 年 5 月 29-30 日、名古屋大学
 10. 宮郷正平、原田二郎、溝口正、井上和仁、福山恵一、民秋均、大岡宏造: 「緑色硫黄細菌の Chl a_{PD} 合成における長鎖アルコールの還元過程」、日本植物生理学会 2007 年度年会、2008 年 3 月 20-22 日、名古屋大学、札幌コンベンションセンター
 11. 浅井智広、原田二郎、大岡宏造: 「緑色硫黄細菌 *Chlorobium tepidum* のホモダイマー型光化学反応中心への変異導入法の検討」、日本植物生理学会 2007 年度年会、2008 年 3 月 20-22 日、名古屋大学、札幌コンベンションセンター
 12. 原田二郎、溝口正、伊佐治恵、大岡宏造、民秋均: 「紅色細菌 *Rhodospseudomonas* sp. Rits の培養期間中における色素組成の変

- 化」、日本植物生理学会 2007 年度年会、2008 年 3 月 20-22 日、名古屋大学、札幌コンベンションセンター
13. 近藤徹、松岡昌弘、浅井智広、宮本良、三野広幸、大岡宏造、伊藤繁：「ホモダイマー型光合成反応中心内での電子伝達系：ヘリオバクテリア反応中心内で機能する電子伝達体の配位構造」、日本生物物理学会第45回年会、2007年12月21-23日、横浜パシフィコ
14. J. Harada, S. Miyago, T. Mizoguchi, K. Inoue, H. Tamiaki, H. Oh-oka: "Biosynthetic pathway of chlorophyll a esterified with Δ 2,6-phytyadienol located in the reaction center of green sulfur bacteria", 7th International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors in Photosynthetic Organisms, 9-14 December 2007, Kyoto, Japan
15. T. Kondo, H. Mino, M. Matsuoka, C. Azai, H. Oh-oka, and S. Itoh: "Detection of quinone function in the homodimeric type-I reaction center of *Heliobacterium modesticaldum*", 4th International Congress of Photosynthesis, 22-27 July 2007, Glasgow, UK
16. C. Azai, Y. Tsukatani, S. Itoh, and H. Oh-oka: "Bifurcated electron donations from quinol oxidoreductase and soluble CycA to cytochrome c_z of the photosynthetic reaction center complex in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*", 4th International Congress of Photosynthesis, 22-27 July 2007, Glasgow, UK
17. H. Oh-oka, M. Higuchi, T. Kondo, H. Mino, S. Itoh, and Z.-Y. Wang: "The Heme-containing portion of cytochrome c_z from *Chlorobium tepidum*: Its over-expression in *Escherichia coli* and spectroscopic studies", 4th International Congress of Photosynthesis, 22-27 July 2007, Glasgow, UK
18. 宮郷正平、原田二郎、溝口正、井上和仁、民秋均、大岡宏造：「緑色硫黄細菌 *Chlorobium tepidum* の反応中心に存在する Chl a_{PD} の合成系： Geranylgeranyl の還元に関わる遺伝子の解析」、第7回日本光合成研究会シンポジウム、2007年5月25-26日、岡山大学
19. 浅井智広、塚谷祐介、宮本良、近藤徹、村上広海、伊藤繁、大岡宏造：「緑色硫黄細菌の光合成反応中心への分岐した電子伝達経路」、第7回日本光合成研究会シンポジウム、2007年5月25-26日、岡山大学
20. 大岡宏造、樋口誠、近藤徹、三野広幸、伊藤繁、大友征宇：「緑色硫黄細菌 *Chlorobium tepidum* 反応中心の cytochrome c_z : 大量発現系構築と分光学的諸性質」、第7回日本光合成研究会シンポジウム、2007年5月25-26日、岡山大学
21. 原田二郎、溝口正、吉田沙耶佳、伊佐治恵、大岡宏造、民秋均：「紅色細菌 *Rhodospseudomonas* sp. strain Rits の光強度によって変化する光合成色素の生体内における分布」、第7回日本光合成研究会シンポジウム、2007年5月25-26日、岡山大学

[その他]

ホームページ等

<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