

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 20 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ~ 2011

課題番号：22750017

研究課題名（和文） クロロフィル類の微細な分子構造からみた光合成調節機構の解明

研究課題名（英文） The structure and distribution of chlorophylls in photosynthesis

研究代表者 溝口 正（MIZOGUCHI TADASHI）

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号：90343665

研究成果の概要（和文）：

緑色光合成細菌をモデル生物として、セルソータを用いることでその単一細胞を単離した。蛍光発光型検出器(クロロフィル類の検出に特化したプロトタイプに改造)を HPLC に接続することで、単一細胞中の目的色素の検出に成功した。更なる検出感度・精度の改善を実施し、クロロフィル色素に関しては、世界一の検出感度を実現した。同時に、色素の絶対量を評価するため、その検量線の作成を行い、単一細胞中のクロロフィル色素の総数を見積もることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

The structure and distribution of chlorophyll pigments with various long hydrocarbon chains in photosynthetic organisms were investigated by ultra-high-sensitive HPLC at the sub-fmol level.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生物物理化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：クロロフィル・色素蛋白質複合体・光合成・超精密計測

1. 研究開始当初の背景

光合成生物では、クロロフィルやカロテノイドなどの光合成色素類が、蛋白質組織体を反応場とする見事な光捕集アンテナ部と反応中心部を構築し、現存する系で最高の光電変換効率を実現している。これらの「光合成色素蛋白質複合体」は、様々な環境に適応する

自然の戦略を具現化した器官である。

光合成色素蛋白質複合体は、脂質分子が作り出す細胞膜内在性の疎水性膜蛋白質であり、疎水性相互作用に基づく色素類の見事な固定化と配置が成されている。光合成諸反応の実現にはこれらの色素類の精密な分子構造とその配置が必須であり、更に色素類は蛋

白質による変調を受けることで多様な機能発現を可能としている。

太陽光の捕集とそれに後続する超高速かつ高効率なエネルギー伝達・電子伝達などの光合成諸反応に関する研究は、環境応答の小さな一部の紅色光合成細菌をモデル生物としたものが先行してきた。これは、X線結晶構造解析によりそのアンテナ部や反応中心部の構造が原子レベルで解かれたことに起因する。しかしながら、光合成諸反応を担保する「アンテナ部と反応中心部の単一細胞内における化学量論比」や「色素蛋白質複合体の疎水性相互作用に基づく構造安定化」に関しては、もっとも基本的な物理量・概念の一つであるにも関わらず、その解答を見出そうとする機運すら存在しないのが実状であった。

2. 研究の目的

植物や細菌の行う光合成では、これらの生物が生存する環境下で最も効率よくエネルギー利用できるように、自発的な光合成の最適化がなされている(光合成調節機構と定義)。特に光捕集を担うアンテナ系色素蛋白質複合体では、多彩で巧みな調節機構が具現化されている。本研究では、光合成細菌をモデル生物とした色素類(クロロフィル色素: 図1(a)参照)の微細構造(色素蛋白質複合体の形成時にアンカーとして機能する疎水性長鎖エステル基: 図1(b)参照)に着目し、単一細胞レベルまで解析対象の分解能をあげ、複合超分子系における超高感度色素解析に挑戦することを計画した。

3. 研究の方法

(1) 光合成細菌をモデル生物とし、その培養液からマニピュレータ等を用いた単一細胞のピッキングを行い、単一細胞内に含まれるクロロフィル色素を超高感度に定量解析する。単一細胞を用いた光合成色素類の解析例はないので、分析に用いる細胞数を、100個 → 50個 → 10個 → 1個と順次減らしていき、色素の検出感度を評価後、最終的に単一細胞の分析を目指す。

(2) 高速液体クロマトグラフ(HPLC)にオンライン接続する検出器の感度・特性を評価後、システムのみクロ化を行う。

光合成細菌の選定: 単位細胞あたりの色素密度が高く、かつ多彩なアンテナ部の発現を示す緑色光合成細菌より着手する。緑色細菌は、クロロフィル色素自己会合体より成る特異な光捕集アンテナ部(クロロゾームと呼ばれる)を有し、微細構造の異なるクロロフィル色素の組成比制御によるアンテナ部の最適化がなされている。

検出器の選定: これまでの研究データの蓄

積から色素類の同定は不要のため、検出感度の向上に特化する。HPLCは、様々な検出器をオンラインで接続できる利点を最大限に活用する。従来の紫外可視吸収法(PDA型と略す)に加え、蛍光発光法(RF型)、質量分析法(MS型)も積極的に利用する。RF型検出では、サブフェムトモルレベルまでの感度の向上を見込む(理論的シュミレーション)。

超高感度解析システムの構築: 装置及びカラムのみクロ化と上記(2)項の検出器の組み合わせを行う。装置・カラムのみクロ化を実施し、感度の向上に努める(サブフェムトモルレベルを当面の目標とする)。

(3) 色素蛋白質複合体の構造安定化機構

紅色光合成細菌の一部でも光合成調節機能が顕著に発現しており、クロロフィルやカロテノイドの疎水部構造が異なる色素類を過剰蓄積することを、バルクの培養液(個々の細胞の平均値)を用いた実験系で確認してきた。色素類の微細構造とその生体内での分布を光合成器官の種類ごとに詳細に解析することで、色素類の微細な構造から見た光合成の最適化戦略に関する知見を得ることを目指す。

4. 研究成果

(1) 単一細胞の単離: 緑色細菌をモデル生物として、セルソータを用いることで単一細胞を単離した。

(2) 超高感度解析システムの構築: 蛍光発光型検出器(=クロロフィル類の検出に特化したプロトタイプに改造)をHPLCに接続することで、単一細胞中の目的色素の検出に成功した。検出感度・精度の向上を指向した更なる装置の改良を実施し、クロロフィル色素に関しては、世界一の検出感度を実現した。同時に、色素の絶対量を評価するため、その検量線の作成を行い、単一細胞中のクロロフィル色素の総数を見積もることに成功した。

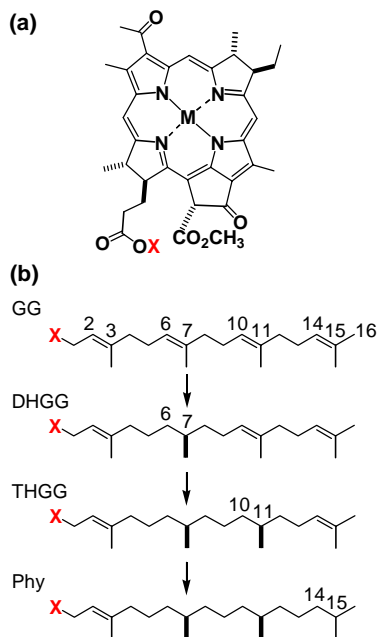


図 1. 紅色細菌が生産するクロロフィル色素の構造(a)とアンカーとして機能する長鎖エステル基の多様性(b).

(3) 紅色細菌の光合成調節機構：紅色細菌の一種では光合成調節機構が顕著に発現し、特異なクロロフィル類(色素蛋白質複合体への結合時にアンカーとして機能する疎水性長鎖エステル)の微細構造が異なる(図 1 参照)が過剰蓄積していた。この種の反応中心部の単離例はなかったため、硫酸分画法により酸化還元活性を維持したインタクトな状態での単離を行い、得られた反応中心部のクロロフィル色素組成を詳細に解析した。色素蛋白質複合体の形成にアンカーとして機能するエステル鎖の分布は、光収穫アンテナ、反応中心部で大きく異なることが判明し、クロロフィル色素の微細構造に依存した光合成器官の構築戦略が示唆された。

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 14 件)

著者名：Tohru Tsuchiya, Seiji Akimoto, Tadashi Mizoguchi, Kazuyuki Watabe, Hayato Kindo, Tatsuya Tomo, Hitoshi Tamiaki and Mamoru Mimuro、論文標題：Artificially produced [7-formyl]-Chl *d* functions as an antenna pigment in the photosystem II isolated from the chlorophyllide *a* oxygenase-expressing *Acaryochloris marina*、雑誌名：Biochim. Biophys. Acta、査読：有、発行年：2012、ページ：in press

著者名：Hitoshi Tamiaki, Meiyun Xu and Tadashi Mizoguchi、論文標題：Photoreduction of zinc 3-acetyl-chlorophyll derivative to prepare chemically stable isobacteriochlorin、雑誌名：Tetrahedron Lett.、査読：有、発行年：2012、ページ：in press

著者名：Tadashi Mizoguchi, Megumi Isaji, Jiro Harada and Hitoshi Tamiaki、論文標題：Isolation and pigment composition of the reaction centers from purple photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* species、雑誌名：Biochim. Biophys. Acta、査読：有、巻：1817、発行年：2012、ページ：395 - 400

著者名：Tohru Tsuchiya, Tadashi Mizoguchi, Seiji Akimoto, Tatsuya Tomo, Hitoshi Tamiaki and Mamoru Mimuro、論文標題：Metabolic engineering of a chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina*: production of a novel chlorophyll species by the introduction of chlorophyllide *a* oxygenase gene、雑誌名：Plant Cell Physiol.、査読：有、巻：53、発行年：2012、ページ：518 - 527

著者名：Ritsuko Fujii, Mamiko Kita, Matsumi Doe, Yoshiro Inuma, Naohiro Oka, Yuki Takaesu, Tomonori Taira, Masahiko Iha, Tadashi Mizoguchi, Richard J. Cogdell and Hideki Hashimoto、論文標題：The pigment stoichiometry in a chlorophyll *a/c* type photosynthetic antenna、雑誌名：Photosynth. Res.、査読：有、巻：111、発行年：2012、ページ：165 - 172

著者名：Tadashi Mizoguchi, Yuki Kimura, Taichi Yoshitomi and Hitoshi Tamiaki、論文標題：The stereochemistry of chlorophyll-*c*₃ from the haptophyte *Emiliania huxleyi*: The (13²*R*)-enantiomers of chlorophylls-*c* are exclusively selected as the photosynthetically active pigments in chromophyte algae、雑誌名：Biochim. Biophys. Acta、査読：有、巻：1807、発行年：2011、ページ：1467 - 1473

著者名：Tadashi Mizoguchi, Taichi Yoshitomi, Jiro Harada and Hitoshi Tamiaki、論文標題：Temperature- and time-dependent changes in the structure and composition of glycolipids during the growth of the green sulfur photosynthetic bacterium *Chlorobium tepidum*、雑誌名：Biochemistry、査読：有、巻：50、発行年：2011、ページ：4504 - 4512

著者名：Taichi Yoshitomi, Tadashi Mizoguchi, Michio Kunieda and Hitoshi Tamiaki、論文標題：Characterization of

glycolipids in light-harvesting chlorosomes from the green photosynthetic bacterium *Chlorobium tepidum*、雑誌名：Bull. Chem. Soc. Jpn.、査読：有、巻：84、発行年：2011、ページ：395 - 402

著者名：Hitoshi Tamiaki, Jun Komada, Michio Kunieda, Kazuhiro Fukai, Taichi Yoshitomi, Jiro Harada and Tadashi Mizoguchi、論文標題：In vitro synthesis of bacteriochlorophyll-*f* and no detection of BChl-*f* in green photosynthetic bacteria producing BChl-*e*、雑誌名：Photosynth. Res.、査読：有、巻：107、発行年：2011、ページ：133 - 138

著者名：Risato Nishimori, Tadashi Mizoguchi, Hitoshi Tamiaki, Shigenori Kashimura and Yoshitaka Saga、論文標題：Biosynthesis of unnatural bacteriochlorophyll *c* derivatives esterified with α,ω -diols in the green sulfur photosynthetic bacterium *Chlorobaculum tepidum*、雑誌名：Biochemistry、査読：有、巻：50、発行年：2011、ページ：7756 - 7764

著者名：Hitoshi Tamiaki, Daisuke Takekoshi and Tadashi Mizoguchi、論文標題：Reduction of vinyl groups in naturally occurring chlorophylls、雑誌名：Bioorg. Med. Chem.、査読：有、巻：19、発行年：2011、ページ：52 - 57

著者名：Norifumi Muraki, Jiro Nomata, Kozue Ebata, Tadashi Mizoguchi, Tomoo Shiba, Hitoshi Tamiaki, Genji Kurisu and Yuichi Fujita、論文標題：X-ray crystal structure of the light-independent protochlorophyllide reductase、雑誌名：Nature、査読：有、巻：465、発行年：2010、ページ：110 - 114

著者名：Tadashi Mizoguchi, Yuki Kimura and Hitoshi Tamiaki、論文標題：Exclusive observation of the 13²-*R* epimer in a diatom *Chaetoseros calcitrans*、雑誌名：Photochem. Photobiol.、査読：有、巻：86、発行年：2010、ページ：311 - 315

著者名：Hidetada Morishita, Tadashi Mizoguchi and Hitoshi Tamiaki、論文標題：Synthesis of ¹⁸O-labelled photosynthetically active chlorophylls at the 3- or 7-carbonyl group with high regioselectivity、雑誌名：Photosynth. Res.、査読：有、巻：105、発行年：2010、ページ：257 - 263

[学会発表](計41件)

発表者名：溝口 正、伊佐治 恵、原田 二郎、民秋 均、発表標題：紅色光合成細菌 *Rhodospseudomonas palustris* 種から

の反応中心の単離とそのクロロフィル色素組成、学会名等：第53回日本植物生理学会年会、発表年月日：2012年3月18日、発表場所：京都産業大学(京都府)発表者名：H. Tamiaki, Y. Kimura, T. Mizoguchi、発表標題：Chemistry of naturally occurring chlorophylls-*c* isolated from chromophyta algae、学会名等：光合成器官のテトラピロール光受容体に関する国際会議(ICTPPO2012)、発表年月日：2011年7月27日、発表場所：ベルリン(ドイツ)

発表者名：溝口 正、吉富太一、原田 二郎、民秋 均、発表標題：緑色硫黄細菌の糖脂質解析：生育環境に応答した構造変換、学会名等：第19回光合成の色素系と反応中心に関するセミナー(2011)、発表年月日：2011年7月10日、発表場所：大阪大学豊中キャンパス(大阪府)

発表者名：T. Mizoguchi, Y. Kimura, T. Yoshitomi, H. Tamiaki、発表標題：The stereochemistry of porphyrinoid chlorophylls-*c*: The (13²-*R*)-enantiomers are exclusively selected as the photosynthetically active pigments in chromophyte algae、学会名等：超分子系と配位化合物の光化学と光生物学に関する国際研究集会(SNCP11)、発表年月日：2011年6月11日、発表場所：立命館大学(滋賀県)

発表者名：溝口 正、発表標題：光合成系における機能性生体分子の精密構造解析、学会名等：光合成学会若手の会第3回セミナー、発表年月日：2010年10月16日、発表場所：東京大学本郷キャンパス(東京都)

発表者名：J. Harada, S. Miyago, T. Mizoguchi, H. Tamiaki, H. Oh-oka、発表標題：Reduction manner of geranylgeranyl group in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*、学会名等：第15回国際光合成会議(PS2010)、発表年月日：2010年8月24日、発表場所：北京(中国)

発表者名：H. Tamiaki, Y. Kimura, T. Mizoguchi、発表標題：Stereochemistry of natural chlorophylls-*c* from diatoms and brown algae、学会名等：第6回ポルフィリン-フタロシアニン国際会議、発表年月日：2010年7月6日、発表場所：ニューメキシコ(アメリカ)

発表者名：T. Mizoguchi, H. Tamiaki、発表標題：The structure of 17-propionate on (bacterio)chlorophylls: Biological implication of their long esterifying chains in light-harvesting antenna systems、学会名等：超分子系と配位化合物の光化学と光

生物学に関する国際研究集会(SNCPPI0)、
発表年月日：2010年6月12日、発表場
所：立命館大学（滋賀県）

〔図書〕（計0件）

6．研究組織

(1)研究代表者

溝口 正 (MIZOGUCHI TADASHI)

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号：90343665