

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570158

研究課題名(和文)膜蛋白質耐熱化のメタロミクス研究

研究課題名(英文)Metalloomics study for the enhanced thermal stability of membrane proteins

研究代表者

木村 行宏(KIMURA, YUKIHIRO)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20321755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体の祖先種である紅色光合成細菌の中で唯一熱を好んで生育する *Thermochromatium tepidum* は、カルシウムイオンを巧みに利用することにより、光を電気エネルギーに変換する光捕集反応中心蛋白質の安定性を高めている。本研究では、さまざまな物理化学的手法を用いて、金属-蛋白質間相互作用、金属-色素間相互作用、金属結合部位を解析することにより、*Thermochromatium tepidum* 由来光捕集反応中心蛋白質における耐熱性向上の分子機構について有益な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Purple sulfur photosynthetic bacterium *Thermochromatium* (Tch.) *tepidum* grows at the highest known temperature among purple bacteria. The light-harvesting 1 reaction center complex (LH1-RC) enhances the thermal stability by utilizing calcium ions. In the present study, metal-protein and metal-pigment interactions and metal-binding sites of the LH1-RC complex from Tch. *tepidum* were investigated by means of various physicochemical analyses. The results provided valuable information for understanding the molecular mechanism responsible for the enhanced thermal stability of the Tch. *tepidum* LH1-RC complex.

研究分野：光合成

キーワード：光合成細菌 膜タンパク質 耐熱性 カルシウム 全反射吸収赤外分光法 等温滴定熱量分析 共鳴ラマン分光法 原子吸光分光法

1. 研究開始当初の背景

葉緑体の祖先種である紅色光合成細菌では、光捕集蛋白質 (LH1) が反応中心 (RC) の周囲に密接して存在し、光捕集反応中心 (LH1-RC) 複合体を形成している (図 1)。LH1 は光合成に必要な光エネルギーの捕集と伝達、RC の防護、電子伝達成分であるキノン輸送のゲート等の重要な役割を担っていると考えられている。しかしながら、LH1-RC 複合体は多数の蛋白質サブユニットから成る分子量約 350kDa の超分子複合体であるため、その詳細な構造情報は報告されておらず、LH1 の構造的、機能的役割については十分な理解が得られていない。

好熱性紅色細菌 *Thermochromatium* (*Tch.*) *tepidum* は紅色細菌の中で唯一の耐熱菌 (生育温度: ~58) であり、LH1 に含まれるバクテリオクロロフィル (BChl a) 2 量体の Q_y 吸収極大が常温菌よりも異常に長波長シフトした低エネルギー吸収特性を示す。先行研究 (科研費・若手 B・課題番号 20770102) においてこれらの異常な性質が Ca^{2+} 結合によって誘起される LH1 蛋白質の構造変化によってもたらされることを見出した。しかしながら、 Ca^{2+} 結合部位、結合サイト数、どのような構造変化を経て膜蛋白質を安定化させ、且つ異常な低エネルギー吸収特性を示すのか、その分子機構の詳細については未だ不明である。その原因として、 Ca^{2+} の定量分析が非常に困難であること、 Ca^{2+} を除去あるいは他の金属イオンで生化学的に置換すると試料の損傷や金属イオンの混入を伴うことが挙げられる。我々は、*Tch.tepidum* が Sr^{2+} 培地においても正常に光合成生育することを示し、 Ca^{2+} を生合成的に Sr^{2+} 置換した Sr^{2+} 変異型 LH1-RC の調製手法を確立した (科研費・若手 B・課題番号 20770102)。 Sr^{2+} は非常元素であり、 Ca^{2+} よりも格段に定量分析が容易である。また、野生型と Sr^{2+} 変異型を試料の損傷やコンタミネーションの無い条件で詳細に比較することが可能である。 Sr^{2+} 変異体を用いることで Ca^{2+} イオンが制御する LH1-RC 複合体の構造機能相関が明らかになると考え、本課題の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、金属イオンにより顕著な耐熱性の向上、並びに低エネルギー吸収特性を示す好熱性光合成細菌由来の光捕集反応中心膜蛋白質複合体に焦点を絞り、4 通りのアプローチにより金属イオンが担う構造的、機能的役割を明らかにする。(1) 全反射吸収赤外 (ATR-FTIR) 分光法による蛋白質の構造変化、(2) 近赤外レーザー Raman 分光法による色素の配向変化、(3) 原子吸光分析による金属結合サイトの定量及び熱量分析による

金属-蛋白質間相互作用の解析、(4) プロテアーゼ処理による結合サイトの検証を行うことにより、金属イオンが超分子複合体のどの部位に結合し、どのような蛋白質の構造変化を誘発し、どのように巨大な膜蛋白質複合体の耐熱性を向上させているのか、そ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

野生型及び Ca^{2+} を生合成的に Sr^{2+} 置換した LH1-RC (Sr^{2+} 置換型 LH1-RC) 複合体について、(1) 蛋白質、(2) 色素、(3) 金属、(4) アミノ酸をプローブとして用い、*Tch.tepidum* 耐熱化の分子機構について検討した (図 1 参照)。

(1) では高感度 ATR-FTIR 分光システムを構築した。各種同位体置換や金属置換の効果を検証し、 Ca^{2+} 結合に伴う蛋白質の微細な構造変化を検出した。(2) では 1064nm 励起の近赤外レーザー Raman 分光法を用いて、野生型及び Sr^{2+} 置換型 LH1-RC における BChl-a 色素分子と蛋白質の相互作用を観測した。(3) では原子吸光分析により、野生型 LH1-RC 及び Sr^{2+} 置換型 LH1-RC に結合している Ca^{2+} 及び Sr^{2+} 金属イオンの定量分析を行い、結合サイト数を直接決定した。また、等温滴定カロリメトリー (ITC) を用いて金属イオンと蛋白質の結合に伴う熱量変化から、結合サイト数や金属-蛋白質間相互作用について詳細に調べた。(4) では、エンドペプチダーゼ及び LC-MS を用いたアミノ酸フラグメント分析を行い、LH1 ポリペプチド C 末端領域のどの部分が金属結合及び蛋白質の安定化に重要であるかを検証した。

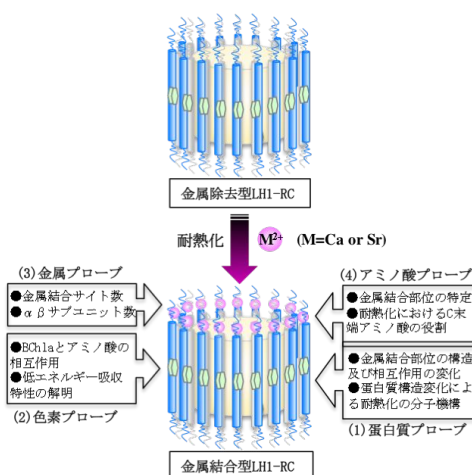


図 1. *Tch.tepidum* 由来 LH1-RC 複合体の金属結合による耐熱化モデルと本研究アプローチの概要

4. 研究成果

(1) ATR-FTIR 分光システムによる金属-蛋白質相互作用の解析

初めに ATR-FTIR システム (図 2) を構築した。現有の FTIR システム (高感度 MCT 検出器内蔵) に Ge バンドパスフィルターを組み

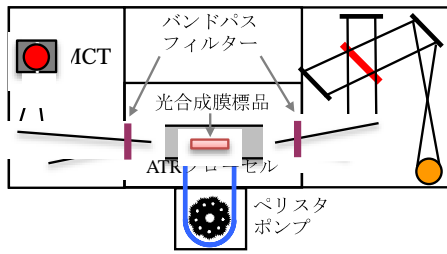


図2. ATR-FTIR分光システム

込み、S/N比を向上させた。ATRプリズムにフローセルユニットを接続し、ペリスタポンプで灌流を制御することにより、様々な条件での蛋白質の構造変化を迅速に観測可能なシステムを構築した。

ATRプリズム上に紅色細菌の分子膜を形成し、測定に応じて各種添加剤（金属キレート剤、金属カチオン）を含むバッファをフローさせ、その前後の赤外吸収差スペクトルを測定した。これにより金属結合に伴う蛋白質の微細な局所的構造変化や水素結合等の分子間相互作用の変化に関する有益な知見が得ることに成功した。

次に得られた赤外バンドに対する同位体置換の効果を調べた。*Tch. tepidum* を ^{13}C 炭素源、 ^{15}N 窒素源を含む培地で培養することにより、蛋白質の塩基性アミノ酸残基、ペプチド結合などに由来する赤外信号を観測した。また、 D_2O 置換の効果を調べることにより、蛋白質やアミノ酸の水素結合に関与する成分を暫定的に特定することに成功した（論文投稿準備中）。

（2）近赤外レーザー-Raman 分光法による BChl *a* 色素-蛋白質間相互作用の観測

野生型及び Sr^{2+} 置換型 LH1-RC の 1064nm 励起による前期共鳴ラマンスペクトルを測定し、BChl-*a* の骨格、カルボニル基に由来する特徴的な振動バンドを検出した。BChl-*a* と近傍 Trp 残基との水素結合を反映する CO 伸縮振動の波数に明確な差が観測されたことから、金属イオンの種類に応じて BChl-*a* と蛋白質の相互作用が変化すること、それによって BChl-*a* の配向状態が制御され、吸収ピークの位置が変化することを明らかにした。

（3）原子吸光分析による金属結合サイトの定量及び熱量分析による金属-蛋白質間相互作用の解析

原子吸光分析を用いて、野生型及び Sr^{2+} 置換型 LH1-RC 中の Ca^{2+} 及び Sr^{2+} 定量を行い、複合体を形成する BChl *a* との量比から結合サイトの数を決定した。その結果、野生型 LH1 には約 16 個の結合サイトがあることが判明したが、 Sr^{2+} 置換型 LH1 には約半分のサイトしか検出されなかった。次に、ITC を用

いて両者の金属結合サイトを調べたところ、野生型及び Sr^{2+} 置換型 LH1 の結合サイト数はともに約 16 であった。また、 Sr^{2+} の LH1-RC に対する結合力は Ca^{2+} の約 1/6 であり、原子吸光分析では、精製過程で Sr^{2+} が遊離している可能性が示唆された。

野生型及び Sr^{2+} 置換型 LH1-RC の Ca^{2+} 結合に伴う熱力学的パラメータには顕著な差が見られ、前者ではエンタルピー駆動、後者ではエントロピー駆動であることが判明した。従って、野生型及び Sr^{2+} 置換型 LH1-RC は単なる金属置換が起こっているだけでなく、合成の過程で何らかの構造的変化が生じている可能性が強く示唆された（論文投稿中）。

（4）プロテアーゼ及び LC-MS を用いた LH1 末端アミノ酸フラグメントの分析

複数のプロテアーゼを用いて LH1 末端部位に部分的酵素処理を施し、そのフラグメントを LC-MS により解析することで、金属結合能や耐熱性に関わる部位を調べた。その結果、リシルプロテアーゼを用いた場合に有意な耐熱性の低下が観測された。従って、LH1C 末端のリジン残基は耐熱性の制御に重要な役割を担っていることが示唆された（論文投稿準備中）。

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 5 件)

(1) Kimura, Y., Kasuga, S., Unno, M., Furusawa, T., Osoegawa, S., Sasaki, Y., Ohno, T., and Wang-Otomo, Z.-Y. "The Roles of C-terminal Residues on the Thermal Stability and Local Heme Environment of Cytochrome *c'* from the Thermophilic Purple Sulfur Bacterium *Thermochromatium tepidum*", *Photosynthesis Research* **124**, 19-29, 2015 (査読有)。

(2) Yong Li, Kimura, Y., Arikawa, T., Wang-Otomo, Z.-Y., and Ohno, T. "ATR-FTIR Detection of Metal-Sensitive Structural Changes Involved in the Enhanced Thermal Stability of Light-Harvesting 1 Reaction Center Complexes from the Thermophilic Purple Sulfur Bacterium *Thermochromatium tepidum*", *Biochemistry* **52**, 9001-9008, 2013 (査読有)。

(3) Yu, L.-J., Unno, M., Kimura, Y., Yanagimoto, K., Oh-oka, H., and Wang-Otomo, Z.-Y. "Structure Analysis and Characterization of the Cytochrome *c*-554 from Thermophilic Green Sulfur Photosynthetic Bacterium *Chlorobaculum tepidum*", *Photosynthesis Research* **118**, 249-258, 2013 (査読有) .

(4) Kimura, Y., Inada, Y., Yu, L.-J., Ohno, T., and Wang, Z.-Y. "Strontium ions are functionally replaceable with calcium ions in the light-harvesting 1 reaction center core complex from Thermophilic purple sulfur bacterium *Thermochromatium tepidum*", *Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future, Advanced Topics in Science and Technology in China*, 105-109, 2013 (査読無) .

(5) Hirano, Y., Kimura, Y., Suzuki, H., Miki, K., and Wang, Z.-Y. "Structural analysis and comparative characterization of the cytochrome *c'* and flavocytochrome *c* from thermophilic purple photosynthetic bacterium *Thermochromatium tepidum*", *Biochemistry* **51**, 6556-6567, 2012 (査読有) .

[学会発表](計 11 件)

(1) Kimura, Y., Hayashi, Y., Wang, Z.-Y., and Ohno, T.: Thermodynamic analysis of metal-protein interaction in the light-harvesting 1 reaction center complex from purple sulfur bacteria, The 52nd Annual Meeting of the BSJ, Sapporo, Sep. (2014).

(2) Yura, Y., Kimura, Y., Wang, Z.-Y., and Ohno, T.: Isotope-edited ATR-FTIR analysis of light-harvesting 1 reaction center complex from thermophilic purple photosynthetic bacteria, The 52nd Annual Meeting of the BSJ, Sapporo, Sep. (2014).

(3) Kimura, Y., Yura, Y., Yong Li, Wang, Z.-Y., and Ohno T.: "Metal cations modulate protein conformation and thermal stability of light-harvesting 1

reaction center complexes from purple sulfur photosynthetic bacteria", The 2nd Awaji International Workshop on Electron Spin Science & Technology, Awaji, Hyogo, June. (2014).

(4) 木村行宏、由良優季、永麗、大友征宇、大野隆：“同位体置換された好熱性紅色細菌 *Thermochromatium tepidum* 由来光捕集 1 反応中心複合体の振動分光学的解析”、第 22 回光合成セミナー：反応中心と色素系の多様性、名古屋、7 月 (2014) .

(5) 林勇介、木村行宏、大友征宇、大野隆：“好熱性紅色細菌由来光捕集 1 反応中心複合体のメタロミクス解析”、第 22 回光合成セミナー：反応中心と色素系の多様性、名古屋、7 月 (2014) .

(6) 木村行宏、永麗、有川曜央、大友征宇、大野隆：“好熱性紅色細菌由来光捕集 1 反応中心複合体の耐熱化を制御する構造変化の振動分光学的検出”、第 21 回光合成の色素系と反応中心に関するセミナー、名古屋、7 月 (2013) .

(7) 永麗、木村行宏、大友征宇、大野隆：“全反射吸収赤外分光法による紅色硫黄光合成細菌 *Thermochromatium tepidum* 由来光捕集 1 膜蛋白質複合体の構造解析”、日本化学会第 93 春季年会、草津、3 月 (2013) .

(8) 永麗、木村行宏、大野隆：“灌流誘起赤外分光法による光合成膜蛋白質複合体の構造解析”、第 477 回日本農芸化学関西支部講演会、神戸、12 月 (2012) .

(9) 永麗、木村行宏、沼田朋子、稲田勇太、有川曜央、大友征宇、大野隆：“好熱性紅色硫黄細菌 *Thermochromatium tepidum* 由来光捕集 1 複合体における BChl-a と Trp 残基間の水素結合相互作用”、第 50 回日本生物物理学会年会、名古屋、9 月 (2012) .

(10) 春日草千子、木村行宏、古澤敬、大野隆、大友征宇：“好熱性紅色硫黄細菌 *Thermochromatium tepidum* 由来 cytochrome *c'* における耐熱化メカニズムの検討”、第 50 回日本生物物理学会年会、名古屋、9 月 (2012) .

(11) 木村行宏、永麗、有川曜央、沼田朋子、

大友征宇、大野隆：“紅色硫黄細菌由来光捕集1複合体における色素-蛋白質相互作用の解析”、第20回光合成の色素系と反応中心に関するセミナー、豊中、7月（2012）。

〔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)研究代表者

木村 行宏 (KIMURA YUKIHIRO)

神戸大学大学院・農学研究科・助教

研究者番号：20321755

(2)連携研究者

大友 征宇 (OTOMO SEIU)

茨城大学・理学部・教授

研究者番号：10213612