

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：13903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655120

研究課題名(和文)人工チラコイド膜の構築と機能評価

研究課題名(英文)Construction and Functional Analysis of Artificial Thylakoid Membranes

研究代表者

出羽 毅久(Dewa, Takehisa)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70335082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：光合成反応を行う高等植物のチラコイド膜や光合成細菌の光合成膜は三次元積層構造を形成しており、その中で高効率な光収穫やエネルギー移動が行われている。しかし、その三次元積層構造と機能の相関は明らかではない。本研究では、光合成アンテナ系複合体(LH2)を含む三次元積層膜の構築を目的とした。短鎖および長鎖脂質からなるディスク状脂質二分子膜が基板表面上で平面膜に転移することを見出した。この現象を利用し、平面膜を三次元に積層した。三次元積層膜構造は原子間力顕微鏡(AFM)により観察した。さらに光収穫系複合体(LH2)を膜中に導入することも可能となり、人工チラコイド膜の作成が可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Thylakoid and photosynthetic bacterial membranes possess three-dimensional multi-layered structures. These membranes efficiently captured transfer light energy. In order to reveal the three-dimensional structure-function relationship, we constructed multi-layered planar membrane containing photosynthesis antenna complex (LH2). Bicelles containing biotinyl lipids were tethered to a planar lipid bilayer via avidin-biotin interaction. Upon detergent removal, transformation from bicelle to planar membrane took place to form layered planar bilayer. The layered structure was observed by atomic force microscopy (AFM). Multi-layered membranes containing LH2 complex was also constructed by use of LH2-reconstituted bicelles. Thus, we successfully constructed artificial thylakoid membranes.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学 機能物質化学

キーワード：光合成膜 脂質二分子膜 人工チラコイド膜 積層膜

## 1. 研究開始当初の背景

光合成膜（チラコイド膜）は二分子膜が積層した構造を形成し、高効率な集光・電荷分離・電子移動が光合成タンパク質により達成されているが、その膜中での空間配置と機能との相関は全く明らかでない。チラコイド膜のような多層構造を人工的に構築し、そこに光合成タンパク質を組み込むことができれば、その機能解明および人工光合成デバイスの開発につながるが、現在のところ、チラコイド膜のようなタンパク質を含む多層構造を構築する手法は存在しない。

## 2. 研究の目的

バイセル（ディスク状脂質二分子膜）は長鎖および短鎖のリン脂質を一定の割合で混合することにより得られる相構造である。本研究では、バイセル（ディスク状脂質二分子膜ミセル）を用い、まず(1)バイセル/二分子膜転移現象を利用し、基板の上に多層構造を形成させる技術確立し、(2)そこに光収穫系複合体(Light-harvesting complex: LH2)をくみこんだ多層膜構造を構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)図1に示すように、まず清浄な基板（マイカ）にビオチン化脂質を含むバイセル溶液を置き、洗浄により短鎖脂質を除去することでバイセル/二分子膜転移を引き起こし、平面脂質二分子膜形成を原子間力顕微鏡(AFM)により確認する。この平面脂質二分子膜上にアビジン分子を添加し、ビオチン化脂質とアビジンを結合させる。さらに、ビオチン脂質を

含むバイセル溶液を添加することにより、バイセルを繋ぎ止め、再び洗浄操作によりバイセル/二分子膜転移により二層目の脂質二分子膜を形成する。これら一連の操作は AFM により観察する。

### (2) LH2 含有多層膜形成

バイセル形成時に光合成光収穫系複合体(LH2)を混合することにより、ディスク状脂質二分子膜中に LH2 を組み込む。この LH2 含有バイセルを用い、(1)と同様の操作により多層膜を形成する。膜形成は AFM により確認する。

## 4. 研究成果

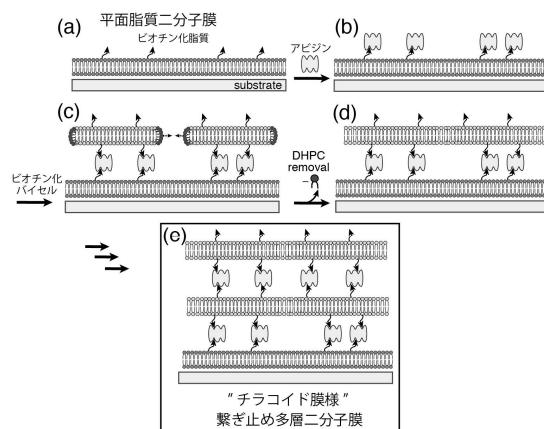


図1. バイセルを用いた多層膜（人工チラコイド膜）形成の模式図

(1)まずマイカ基板の上にバイセル溶液を置き、バイセルを AFM 観察した。その結果、粒径 10-30 nm 程度のディスク状バイセルが観察できた（図2A）。

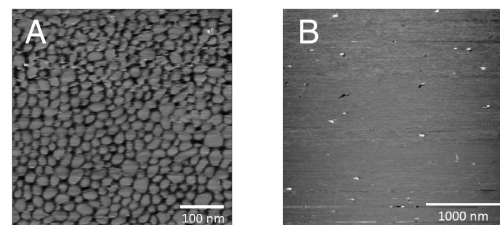


図2. マイカ基板の上に吸着したバイセルとバイセル/二分子膜転移により形成した平面脂質二分子膜の原子間力顕微鏡 (AFM) 像。

さらに、この吸着したバイセルに対し、溶液洗浄により短鎖リン脂質を除去すると、バイセルがマイカ基板上で融合し平面脂質二分子膜が形成することが見出された(図2B、図1a)。

この脂質二分子膜はビオチン脂質がふくまれており、この膜上にアビジンを添加することにより、膜状にアビジンが結合することが確認できた(図3A)。この上にさらにビオチン脂質を含むバイセル溶液を添加すると、アビジン-ビオチン相互作用によりバイセルが二層目として吸着する(B)。この段階では洗浄によりある程度短鎖リン脂質が除去されており、部分的にバイセルが融合し、二層目の平面膜が形成していることが認められた(C)。

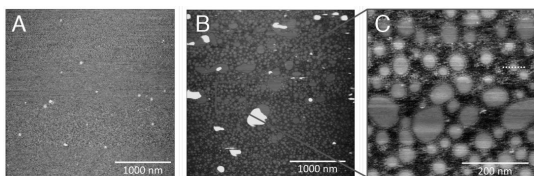


図3. 平面脂質二分子膜上に結合したアビジン(A)、二層目として吸着したバイセル(B)のAFM像.CはB中の四角部分の拡大像。

対照実験として、ビオチン脂質を含まない系で実験を行ったところ、アビジンの吸着は認められず、また二層目のバイセル溶液の添加により、不規則で制御不能な多層構造の形成が見られた。現在、アビジンとビオチン量の最適化により、脂質二分子膜による表面被覆率の高い二層目の構築を進めている。

## (2) 光合成膜タンパク質(LH2)を組み込んだバイセルによる多層構造の形成

バイセル形成時に LH2 を溶液中に添加することにより、バイセル中に LH2 を再構成することができた。吸収スペクトルから、LH2 に特徴的な吸収帯(バクテリオクロロフィル、

カロテノイド)に変化がないことから、LH2 がバイセル中に変性することなく導入されていることが分かった。この LH2 を含むバイセル溶液を(1)と同様にマイカ基板上で平面膜化した。この場合、アビジンおよびビオチン分子がなくても二層目が形成されることが分かった(図4)。

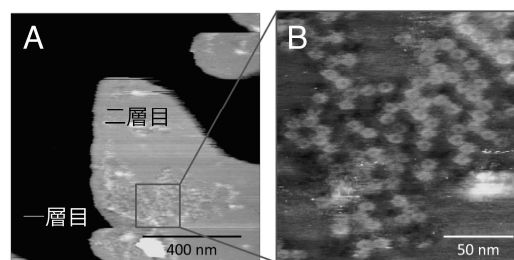


図4. 光合成光収獲系複合体(LH2)を導入したバイセルによる多層膜形成(A).Bは拡大図.LH2のリング構造が確認できる。

二層目の部分を詳細に AFM により観察したところ、LH2 の結晶構造と一致するリング状構造が見られた。この LH2 の存在により層間に相互作用が働き、二層目の形成が促進されているのではないかと推察される。

今後は条件をさらに精査することにより、層数を制御して LH2 層を形成する。また、表面プラズモン共鳴により、多層膜構造形成を定量的に評価する。調製した多層膜構造に対して、層間でのエネルギー移動を評価し、チラコイド膜での層構造-機能層間を調べるプラットフォームを確立する。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

(1) A. Sumino, D. Yamamoto, M. Iwamoto, T. Dewa, S. Oiki, Gating-Associated Clustering-Dispersion Dynamics of the KcsA Potassium Channel in a Lipid Membrane, *J. Phys.*

- Chem. Lett.* 5, 578-584 (2014). 査読有  
10.1021/jz402491t
- (2) T. Noji, M. Kondo, K. Kawakami, J. Shen, M. Nango, T. Dewa, Durability of Oxygen Evolution of Photosystem II Incorporated into Lipid Bilayers, *Res. Chem. Intermed. in press* 査読有
- (3) A. Sumino, T. Dewa, T. Noji, Y. Nakano, N. Watanabe, R. Hildner, N. Bösch, J. Köhler, M. Nango, Influence of Phospholipid Composition on Self-Assembly and Energy-Transfer Efficiency in Networks of Light-Harvesting 2 Complexes, *J. Phys. Chem. B* 117, 10395–10404 (2013). 査読有  
10.1021/jp4047819
- (4) T. Dewa, A. Sumino, N. Watanabe, T. Noji, M. Nango, Structure–Function Relationships of the Supramolecular Assembly of the Bacterial Photosynthetic Antenna Complexes in Lipid Membranes, *Res. Chem. Intermed. in press* 査読有り
- (5) S. Tubasum, S. Sakai, T. Dewa, V. Sundström, I. G. Scheblykin, M. Nango, T. Pullerits, Anchored LH2 Complexes in 2D Polarization Imaging, *J. Phys. Chem. B* 117, 11391–11396 (2013). 査読有り 10.1021/jp403863c
- (6) S. Sakai, T. Noji, M. Kondo, T. Mizuno, T. Dewa, T. Ochiai, H. Yamakawa, S. Itoh, H. Hashimoto, M. Nango, Molecular Assembly of Zinc Chlorophyll Derivatives by Using Recombinant Light-Harvesting Polypeptides with His-tag and Immobilization on a Gold Electrode, *Langmuir* 29, 5104–5109 (2013). 査読有り  
10.1021/la400059h
- (7) T. Dewa, A. Sumino, N. Watanabe, T. Noji, M. Nango, Energy Transfer and Clustering of Photosynthetic Light-Harvesting Complexes in Reconstituted Lipid Membranes, *Chem. Phys.*, 419, 200-204 (2013). 査読有り  
10.1016/j.chemphys.2012.12.039
- (8) A. Sumino, T. Sumikama, M. Iwamoto, T. Dewa, S. Oiki, The Open Gate Structure of the Membrane-Embedded KcsA Potassium Channel Viewed From the Cytoplasmic Side, *Scientific Reports* 3, 1063 (2013). 査読有り  
10.1038/srep01063
- (9) 出羽毅久, 光合成アンテナ膜タンパク質の分子集合構造と機能, 化学工業 Vol. 65, No.3, 44-49 (2014).
- (10) A. Sumino, T. Dewa, N. Sasaki, M. Kondo, M. Nango, Electron Conduction and Photocurrent Generation of a Light-Harvesting/Reaction Center Core Complex in Lipid Membrane Environments, *J. Phys. Chem. Lett.* 4, 1087–1092 (2013). 査読有  
10.1021/jz301976z
- (11) 出羽毅久, 光合成アンテナ膜タンパク質の集合構造と機能, 膜 MEMBRANE 38, 70-75 (2013). 査読有り
- (12) S. Yajima, R. A. Furukawa, M. Nagata, S. Sakai, M. Kondo, K. Iida, T. Dewa, M. Nango, Two-dimensional patterning of bacterial light-harvesting 2 complexes on lipid-modified gold surface, *App. Phys. Lett.*, 100, 233701(-1-4) (2012). 査読有り 10.1063/1.4726105
- [学会発表](計20件)
- (1) Durability of Oxygen Evolution of Photosystem II Incorporated into Lipid Bilayers

- T. Noji, M. Kondo, K. Kawakami, J. Shen, M. Nango, T. Dewa, The 16th International Congress on Photosynthesis, August 11-16, 2013, St. Louis, MO, USA.
- (2) Molecular assembly of zinc chlorophyll derivatives by recombinant light-harvesting polypeptides with His-tag and immobilization on a gold electrode, S. Sakai, T. Noji, M. Kondo, T. Mizuno, T. Dewa, T. Ochiai, H. Yamakawa, S. Itoh, H. Hashimoto, M. Nango, Light Harvesting Satellite Meeting 2013 (August 8-11, 2013) Washington University, St. Louis.
- (3) The Influence of the Phospholipid Composition on the Self-Assembly and the Energy-Transfer Efficiency in Networks of Light-Harvesting 2 Complexes, T. Dewa, A. Sumino, T. Noji, Y. Nakano, N. Watanabe, R. Hildner, N. Bösch, J. Köhler, M. Nango, Light-Harvesting Processes LHP 2013 April 7 - 11, 2013 Banz Monastery, Germany
- (4) Supramolecular Assembly and Energy Transfer of Photosynthetic Antenna Proteins in Lipid Bilayers, T. Dewa, A. Sumino, T. Noji, Y. Nakano, N. Watanabe, M. Kondo, M. Nango, The 9th SPSJ International Polymer Conference (IPC2012), Dec. 11-14, 2012 Kobe
- (5) Assembly Structures and Energy Transfer property of Photosynthetic Antenna-Reaction Center Complexes in various Lipid Bilayers, Y. Nakano, A. Sumino, T. Noji, N. Watanabe, M. Kondo, T. Dewa, M. Nango, The 9th SPSJ International Polymer Conference (IPC2012), Dec. 11-14, 2012 Kobe.
- (6) AFM Observation of Self-Assembled Nanostructure of Light-Harvesting Membrane Proteins in Artificial Lipid Bilayers, T. Dewa, A. Sumino, Y. Nakano, T. Noji, M. Nango, 3<sup>rd</sup> Kanazawa Bio-AFM Workshop November 5 - 8, 2012, Kanazawa.
- (7) Construction of Supramolecular Assembly of Photosynthetic Antenna Proteins in Lipid Bilayers: AFM Observation, Energy Transfer, and Photocurrent Generation. T. Dewa, Engineering Lipid Bilayers, Weetwood Hall, Leeds (UK) Sept6-9 (2012).
- (8) Reconstitution of photosynthetic antenna membrane protein assembly into lipid bilayers and its direct observation using AFM, A. SUMINO, T. DEWA, N. WATANABE, Y. NAKANO, T. NOJI, M. NANGO, July 09<sup>th</sup> - 11<sup>th</sup>, 2012 – Wills Memorial Building, Bristol, UK
- (9) バイセルを用いた三次元積層膜の構築と光合成アンテナ系複合体の導入, 山田 樹・角野 歩・南後 守・出羽 毅久日本化学会第94春季年会 2014年3月27-30日 名古屋大学
- (10) Functional Modulation of Photosynthetic Antenna Complex (LH2) Through Chemical Modification, T. DEWA, T. NOJI, N. MIZUTANI, Y. YONEDA, T. KATAYAMA, Y. NAGASAWA, H. MIYASAKA, M. NANGO, 日本化学会第94春季年会 2014年3月27-30日 名古屋大学
- (11) 蛍光色素の付加による光合成アンテナ系複合体(LH2)の機能改変, 水谷 尚登・野地 智康・小森 大輔・米田 勇祐・片山 哲郎・長澤 裕・宮坂博・南後 守・出羽 毅久 日本化学会

第94春季年会 2014年3月27-30日 名古屋大学

(12) チラコイド様光収穫系複合体の積層構造の構築 出羽毅久・山田樹・野地智康・水谷尚登・南後守 第7回バイオ関連化学シンポジウム 2013年9月27-29日 名古屋大学

(13) バイセルによるチラコイド様多層膜の構築と光合成アンテナ系複合体の導入 山田樹・角野歩・南後守・出羽毅久 第7回バイオ関連化学シンポジウム 2013年9月27-29日 名古屋大学

(14) 光合成膜タンパク質の集合構造と機能 出羽毅久・角野歩・野地智康・南後守 第62回高分子討論会 2013年9月11日-13日 金沢大学

(15) 蛍光発色団の付加による光合成アンテナタンパク質の機能改変 出羽毅久・野地智康・小森大輔・山川壽伯・伊藤繁・南後守 第23回バイオ高分子シンポジウム 2013年7月31日—8月1日 東京工業大学

(16) バイセルを用いた平面多層膜の作成とキャラクターゼーション 山田樹・角野歩・南後守・出羽毅久 第23回バイオ高分子シンポジウム 2013年7月31日—8月1日 東京工業大学

(17) 光合成膜タンパク質分子集合系の機構解明 出羽毅久 人工光合成研究の最前線:挑戦する若手研究者 JST さきがけ「光エネルギーと物質変換」研究領域研究成果報告会 3月22日 2013年 立命館大学

(18) 光合成アンテナタンパク質集合体の構築とキャラクターゼーション 出羽毅久・小森大輔・野地智康・角野歩・南後守 3月22-25日

2013年 日本化学会第93春季年会 立命館大学 南草津

(19) 光合成アンテナ-反応中心膜タンパク質の脂質膜中での光電流応答と電流計測 AFM測定 角野歩・出羽毅久・佐々木伸明・近藤政晴・橋本秀樹・南後守 3月22-25日 2013年 日本化学会第93春季年会 立命館大学 南草津

(20) 原子間力顕微鏡による光合成研究へのアプローチ 出羽毅久・角野歩 第20回光合成の色素系と反応中心に関するセミナー平成24年6月30日(土)—7月1日(日) 大阪大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

出羽毅久 (DEWA, Takehisa)  
名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号: 70335082

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

野地 智康 (NOJI, Tomoyasu)  
名古屋工業大学・大学院工学研究科・講師  
研究者番号: 40452205

角野 歩 (SUMINO, Ayumi)  
名古屋工業大学・大学院工学研究科・D3

山田 樹 (YAMADA, Tatsuki)  
名古屋工業大学・大学院工学研究科・M1