

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25810099

研究課題名(和文)環状ヘムタンパク質集合体を鋳型とする光増感剤の精密集積化と光駆動触媒系への展開

研究課題名(英文)Construction of an array of photosensitizers within a ring-shaped hemoprotein assembly toward a light harvesting system

研究代表者

大洞 光司(Oohora, Koji)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10631202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、タンパク質を基盤とした光増感色素の集積化により調製した光捕集系を各種分光学的測定を用いて詳細に評価した。具体的には可逆に結合したヘム(鉄ポルフィリン)を有するタンパク質6量体について、ヘムの除去を行い、調製したアポ体に、ヘムと類似の構造を有する光増感剤である亜鉛プロトポルフィリンおよび亜鉛クロリンe6を挿入し、光捕集系の構築を実施した。分光学的評価により、色素間でのエネルギーマイグレーションが起こっていることが示され、本系が天然光捕集系と同様に機能することが示された。これらの成果を利用し、効率的な光の化学エネルギー等への変換が期待される。

研究成果の概要(英文)：A hexameric tyrosine-coordinated heme protein (HTHP) containing photosensitizer molecules was prepared in an effort to construct a biomolecule with engineered photochemical properties. Zn protoporphyrin IX (ZnPP) and Zn chlorin e6 (ZnCe6) are inserted into the apoprotein of HTHP to yield reconstituted proteins which maintain the original hexameric structure of HTHP. The fluorescence quenching efficiencies provided by methyl viologen as an electron acceptor for the completely reconstituted proteins with ZnPP and ZnCe6 are 2.3 and 2.6 fold-higher than that of the corresponding partially photosensitizer-inserted proteins, respectively. This indicates that energy migration occurs among the photosensitizers bound within the protein matrices. These findings are expected to lead to development of new protein-based artificial light harvesting systems to demonstrate the light-driven energy conversion.

研究分野：生体関連化学

キーワード：光捕集 ヘムタンパク質 超分子 光増感剤

1. 研究開始当初の背景

光合成では、活性中心での酸化還元反応を円滑に進行させるために、大規模な光捕集系を用いて光子密度の低い太陽光エネルギーの効率的な利用を行っている。特に、紅色細菌の光化学系では光捕集系 (LH1 および LH2) と反応中心の構造が明らかにされており、これらは比較的単純であるため、作用機序の解析が進んでいる。光合成の初期段階において、光捕集に関わる LH2 内で環状に整列したクロロフィル分子は、光により励起したエネルギーを同一色素間での高速エネルギー移動 (エネルギーマイグレーション) を介して活性中心へと集約させ、太陽光エネルギー利用の効率化を達成している。

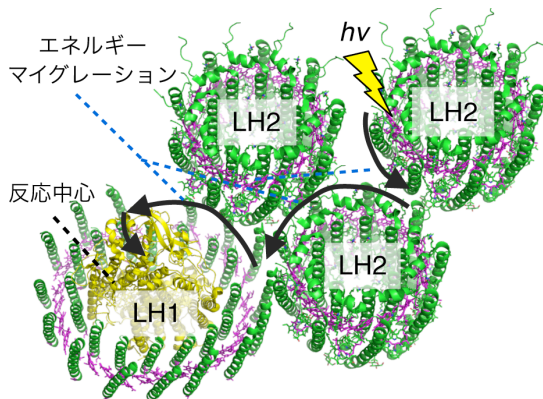


図1. 紅色細菌が有する光化学系における光捕集系 (LH1 および LH2) と活性中心の模式図。

天然光捕集系の興味深い性質に着目して、これまでに合成化学的手法によりポルフィリン等の光増感剤を共有結的に連結したモデル構造体が報告されている。また集積化を超分子化学的相互作用により達成した系も報告されており、それらの中には高い光捕集能を示すものもある。しかしながら、これらの系は難易度の高い有機合成を駆使した研究が多く、様々な光増感色素への応用が難しい。また近年ではウイルスキャプシドやタンパク質の多量体に共有結的に色素を化学修飾させた系が報告されている。しかしながらタンパク質の化学修飾は必ずしも容易ではなく、また柔軟な連結部位により一点で固定化されるため、色素の配向を制御させることは困難である。したがって、様々な色素への応用が容易で、汎用性の高い光捕集系の簡便な調製法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、光の化学エネルギーへの変換をめざして、より簡便かつ汎用性の高い人工光捕集系の構築をめざした。特にヘムタンパク質におけるヘムとタンパク質の特異的かつ強い超分子相互作用に注目した。ヘムの配位子骨格であるポルフィリンは光増感剤として優れており、またその亜鉛錯体はヘムタンパク質内に挿入可能であり光増感剤とし

て機能することが知られている。これまでヘムタンパク質の多量体のヘムのポルフィリノイド誘導体による置換は例が限られていたが、本研究では、適切なヘムタンパク質多量体を選択し、これらの相互作用を利用した光捕集系の開発を目的とした。

3. 研究の方法

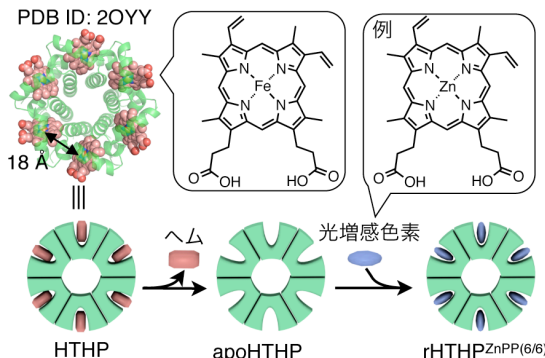


図2. HTHP の結晶構造と光捕集系作成 (ヘムの光増感剤への置換) の模式図。

本研究で用いるヘムタンパク質多量体として、ヘムタンパク質環状6量体 HTHP (Hexameric Tyrosine-coordinated Heme Protein) を選択した。HTHP は 2007 年に H. Dobbek らにより報告された海洋細菌 *Silicibacter pomeroyi* 由来のヘムタンパク質である。結晶構造から、図2に示す通り6回対象軸を持つホモ6量体であることが明らかになっている。それぞれのドメインが1つのヘム分子を有しており、隣り合うドメイン内のヘム分子の鉄-鉄間距離は 18 Å である。またヘムはチロシンによる配位結合、疎水性相互作用、水素結合によりタンパク質マトリクス内に保持されている。しかしながら、カタラーゼ様の配位環境を持っている一方で、生体内での機能については不明である。このヘムタンパク質多量体よりヘムを除去して、アポタンパク質を調製し、光増感剤として機能するポルフィリノイド化合物を挿入する再構成法を用いて、新規光捕集系の構築を実施した。得られる光捕集系は、各種分光学的測定、サイズ排除クロマトグラフィ、動的光散乱等を用いて同定した。光学的性質に関しては、蛍光消光滴定やフェムト秒レーザーを用いた過渡吸収変化により算出した。

4. 研究成果

ヘムタンパク質環状6量体に亜鉛ポルフィリンを導入した光捕集系の構築
 遺伝子組み替え大腸菌を用いた IPTG 誘導型の発現により HTHP を調製し、陰イオン交換カラムおよびゲル濾過カラムを用いて精製した。得られたタンパク質の SDS-PAGE では、純度の高い単量体に一致する分子量のバンドが観測され、報告されている結晶構造と同様に6分子のヘムが結合した6量体の分

分子量が ESI MS を用いた質量分析結果により確認された。次に、HTHP からヘムの除去を行なった。pH1.7 でヘムを遊離させ、2-ブタノンを用いて抽出し、中和した後の吸収スペクトルを図 3a に示す。軸配位子としてチロシンが配位したヘム由来の 402 nm の吸収は消え、観測されたのは芳香族アミノ酸由来の 280 nm の吸収のみであり、タンパク質からヘムを除去したアポ HTHP の調製が確認された。このアポ HTHP に光増感剤として機能する亜鉛ポルフィリン (ZnPP) を小過剰量加え、陰イオン交換カラムを用いて遊離の ZnPP を除去すると、再構成体 $r\text{HTHP}_{\text{ZnPP}(6/6)}$ が得られた。既報のアルコールが配位した ZnPP の吸収極大と一致する 421 nm に特徴的な吸収ピークが観測され、タンパク質マトリクス内に保持されていることが示された。続いて、アポ体および再構成体が 6 量体構造を保っているかを確認するため、サイズ排除クロマトグラフィによる分析を実施した (図 3b)。標準サンプルと比較すると、HTHP の 6 量体に合致する分子量の成分が HTHP およびそのアポ体、ZnPP を含む再構成体において確認された。また動的光散乱により、おおよそ 5-6 nm のサイズであることが確認され、結晶構造から予測される 6 量体の大きさとよく一致した。これらの結果から HTHP のアポ体および $r\text{HTHP}_{\text{ZnPP}(6/6)}$ も 6 量体構造を形成していることが明らかとなった。以上の結果から、HTHP がポルフィリノイド色素を集積化する上で有用なマトリクスとして働くことを示した。

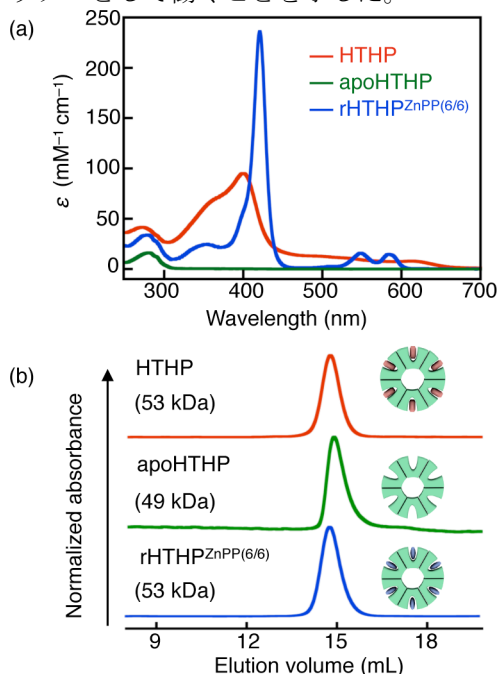


図 3. HTHP、apoHTHP、 $r\text{HTHP}_{\text{ZnPP}(6/6)}$ の (a) 吸収スペクトルおよび (b) サイズ排除クロマトグラフィによる分析

HTHP を用いた光捕集系の光化学特性評価

前項で調製した $r\text{HTHP}_{\text{ZnPP}(6/6)}$ に関してアポ体を任意の量加えると、結合が平衡であるた

め集積状態が解消され、ZnPP が分散すると仮定した。アポ体を添加したところ、ZnPP 由来の吸収スペクトルに変化はなかった。加えるアポ体の量による ZnPP の分散を確認するために Soret 帯の円二色性 (CD) スペクトルを測定した (図 4a)。興味深いことに、アポ体をヘム結合部位数換算で 5 当量加えたサンプルでは、吸収極大と同じ 421 nm のみに極大を持つ正のコットン効果のみが観測されたが、 $r\text{HTHP}_{\text{ZnPP}(6/6)}$ では 2 つの極大を持つ正のコットン効果が観測され、これらの違いから部分的な再構成体である $r\text{HTHP}_{\text{ZnPP}(1/6)}$ の生成が示唆された。 $r\text{HTHP}_{\text{ZnPP}(1/6)}$ におけるコットン効果は ZnPP に対してキラルに配置されたタンパク質のアミノ酸残基との相互作用によるものと考えられ、他のヘムタンパク質でも観測される典型的なものである。 $r\text{HTHP}_{\text{ZnPP}(6/6)}$ の CD スペクトルにもこのコットン効果が含まれていると考え、差スペクトルを算出した。結果として、極大吸収で正と負に分裂する特徴的なコットン効果が得られ、これまでに報告されているポルフィリンの 2 量体等で観測される空間的に固定された色素同士の励起子カップリングによるものと帰属できる。従って、HTHP 内でヘム結合部位に特定の配向で集積しているため、励起子カップリングを含むコットン効果が現れ、また $r\text{HTHP}_{\text{ZnPP}(1/6)}$ では ZnPP の分散が確認できた。

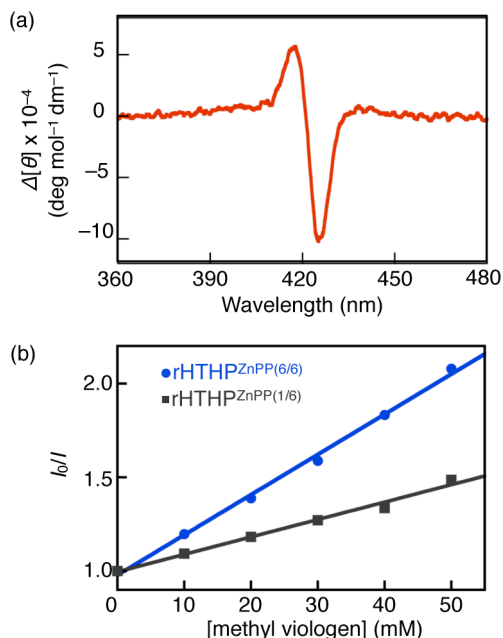


図 4. (a) $r\text{HTHP}_{\text{ZnPP}(6/6)}$ の CD スペクトルから $r\text{HTHP}_{\text{ZnPP}(1/6)}$ の CD スペクトルを差し引いた差 CD スペクトルと (b) MV²⁺ を消光剤とする Stern-Volmer プロット。

続いて、 $r\text{HTHP}_{\text{ZnPP}(6/6)}$ および $r\text{HTHP}_{\text{ZnPP}(1/6)}$ について蛍光寿命測定を行った。結果として、その時定数はそれぞれ 1.43 ns および 1.56 ns であった。蛍光寿命が短く

なり 1 重項励起状態同士の消光によるものと考えられる。次に、天然の光捕集系では 1 重項励起状態の消滅が、より短い時間領域で起こることが知られているので、フェムト秒パルスレーザーを用いた過渡吸収スペクトル測定を実施した。rHTHP^{ZnPP(1/6)}においては 2 成分系として解析可能であり、約 100 ps と 1.5 ns の時定数の成分が観測された。100 ps の成分は、溶媒分子やアミノ酸残基へのエネルギー移動と予測される。これに対して rHTHP^{ZnPP(6/6)}では約 100 ps と 1.4 ns の時定数の成分に加えて、非常に速い 10 ps の時定数の失活成分が確認された。またその時定数はこれまで報告されているモデル系 (0.5–20 ps) と近い値であり妥当な結果と言える。従って、本系はこれまでのモデル系と比較して、比較的単純な手法で調製できるにもかかわらず、同等の性質を有していることが示唆された。

次にメチルビオロゲン (MV²⁺) を消光剤とする蛍光の消光滴定実験を実施し、エネルギーマイグレーションが起こっているかを観察した。嫌気下でタンパク質に対して過剰量の MV²⁺を添加した条件での滴定を行い、その蛍光強度変化の Stern-Volmer プロットが図 4b である。これらのプロットにおける rHTHP^{ZnPP(6/6)}と rHTHP^{ZnPP(1/6)}の傾きはそれぞれ 21 M⁻¹および 9.2 M⁻¹であった。また蛍光寿命における時定数の変化に対して、同様に Stern-Volmer プロットを確認すると蛍光強度の結果とは対照的に rHTHP^{ZnPP(6/6)}と rHTHP^{ZnPP(1/6)}の双方において傾きは 0 であった。また吸収スペクトル変化からも結合定数を見積もったところ、双方で 9 M⁻¹であった。以上の結果から、非常に弱い結合で色素近傍に近づき、1 重項を失活させている静的消光であることが示された。したがって、蛍光強度における Stern-Volmer プロットの傾きは見かけの結合定数として解析でき、rHTHP^{ZnPP(6/6)}の見かけの結合定数の値が rHTHP^{ZnPP(1/6)}の値の約 2 倍であることから、色素間のエネルギーマイグレーションが示唆された。

HTHP を基盤とする光捕集系の他のポルフィリノイド色素への応用

本手法の汎用性を確認するために、天然のクロロフィルと骨格構造の近い亜鉛クロリン e6 (ZnCe6) を用いてアポ体の HTHP の再構成を行ない、rHTHP^{ZnCe6(6/6)}を調製した。サイズ排除クロマトグラフィおよび動的光散乱から ZnPP の場合と同様に 6 量体構造を維持していることを確認した。CD スペクトルにおいても rHTHP^{ZnCe6(6/6)}と rHTHP^{ZnCe6(1/6)}の差スペクトルは正と負の分裂型のコットン効果を示し、ヘム結合サイトに取り込まれていることが明らかとなった。また rHTHP^{ZnCe6(6/6)}の蛍光寿命が rHTHP^{ZnCe6(1/6)}よりも短く、フェムト秒レーザーによる励起ではピコ秒オーダーの 1 重項

の失活を確認している。MV²⁺を消光剤とする Stern-Volmer プロットにおいても、静的消光により決定できる rHTHP^{ZnCe6(6/6)}と rHTHP^{ZnCe6(1/6)}の見かけの結合定数はそれぞれ 1.2 mM⁻¹および 0.47 mM⁻¹であり、色素集積化により見かけの結合定数の 2.6 倍の向上が見られ、ZnCe6 においても HTHP マトリクス中でエネルギーマイグレーションが起こっていることが示された。

本研究の成果により 6 量体環状ヘムタンパク質である HTHP がポルフィリノイド系の光増感色素の集積化に有用であることを明らかにした。特に、タンパク質を鋳型あるいは足場とする系でエネルギーマイグレーションを示した系は少なく、超分子的で簡便な本手法は、様々なポルフィリノイド光増感剤のための有用な調製法となる可能性がある。今後、本系はさらに酸化還元触媒と組み合わせた太陽光エネルギーの化学エネルギーへの変換系の開発および天然光合成の作用機序への理解に貢献できると期待される。

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 2 件)

① Koji Oohora, Tsuyoshi Mashima, Kei Ohkubo, Shunichi Fukuzumi, and Takashi Hayashi, “Energy Migration within Hexameric Hemoprotein Reconstituted with Zn Porphyrinoid Molecules” 査読有, Chem. Commun. Vol. 51, 2015, pp. 11138-11140, DOI: 10.1039/C5CC02680F.

② Koji Oohora, and Takashi Hayashi, “Hemoprotein-based Supramolecular Assembling Systems” 査読有, Curr. Opin. Chem. Biol. Vol. 19, 2014, pp. 154-161, DOI:10.1016/j.cbpa.2014.02.014.

[学会発表] (計 8 件)

① Tsuyoshi Mashima, Koji Oohora, Takashi Hayashi, A Zn Porphyrin Array with a Hexameric Hemoprotein Matrix Modified by Donor Photosensitizers toward an Artificial Light Harvesting System, 錯体化学第 65 回討論会、2015. 9. 23, 奈良女子大学 (奈良市)

② 平山翔太、大洞光司、林 高史、ピレン分子を修飾した六量体ヘムタンパク質 HTHP の超分子集積化、錯体化学第 65 回討論会、2015. 9. 23, 奈良女子大学 (奈良市)

③ 大洞光司、真島剛史、平山翔太、林 高史、亜鉛置換型ヘムタンパク質環状六量体の光化学的性質、第 13 回ホストゲスト化学シンポジウム、2015. 6. 7, 東北大学 (仙台市)

④ Koji Oohora, Tsuyoshi Mashima, Takashi Hayashi, Artificial Harvesting System by Reconstitution of Hexameric Hemoprotein with Zn Porphyrinoids, 5th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CanBIC5), 2015. 5. 22, Parry Sound (Canada)

⑤ 真島剛史、大洞光司、林 高史、ヘムタンパク質環状六量体を用いた亜鉛クロリン e6 の集積化, 2015. 3. 29, 日本大学 (船橋市)

⑥ 真島剛史、大洞光司、林 高史、ヘムタンパク質環状六量体を用いた光増感色素集積体の構築とその光捕集能, 2014. 9. 18, 中央大学 (東京都文京区)

⑦ 大洞光司、真島剛史、林 高史、ヘムタンパク質環状集合体の補因子置換による光捕集系の構築, 第8回バイオ関連化学シンポジウム, 2014. 9. 11, 岡山大学 (岡山市)

⑧ 真島剛史、大洞光司、林 高史、ヘムタンパク質環状六量体を用いた光増感色素の集積化、日本化学会第94春季年会, 2014. 3. 30, 名古屋大学 (名古屋市)

[図書] (計1件)

① Koji Oohora, and Takashi Hayashi, Springer “Incorporation of modified and artificial cofactors into naturally occurring protein scaffolds” In Protein Design, pp. 251-263, 2014.

[その他]

ホームページ等

大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻林研究室

<http://www.chem.eng.osaka-u.ac.jp/~haya shiken/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大洞 光司 (OOHORA, Koji)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：10631202

(2) 研究協力者

林 高史 (HAYASHI, Takashi)

真島 剛史 (MAHISMA, Tsuyoshi)