

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：34315

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25891025

研究課題名(和文) 緑色硫黄細菌の光合成反応中心におけるキノン分子の構造機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of quinone in the photosynthetic reaction center complex of green sulfur bacteria

研究代表者

浅井 智広 (Azai, Chihiro)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：70706564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：絶対嫌気性の光合成細菌である緑色硫黄細菌のプラスミドによる遺伝子発現系を構築し、Hisタグ付加コアタンパク質を過剰発現させることで、ホモダイマー型光合成反応中心を大量かつ簡便に調製する方法を確立した。

緑色硫黄細菌のホモダイマー型光合成反応中心で起こる電子移動反応を高速の過渡吸収スペクトル変化で観測し、測定時の溶液組成を変化させることで、通常末端電子受容体として機能している鉄硫黄クラスター以外の分子が、代替の最終電子受容体となる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：A gene expression system by a broad host range plasmid was established in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*, which is a strictly anaerobic photosynthetic bacterium. Large-scale preparation of the homodimeric photosynthetic reaction center (RC) complex of green sulfur bacteria was easily achieved by over-expression of the His-tagged RC core-protein and its affinity purification.

Electron transfer reactions in the green sulfur bacterial RC complex were observed by transient absorption spectroscopy from sub-nanosecond to millisecond time domains. The electron transfer pathway was affected by additives in the reaction solution; it was suggested that there is an unidentified cofactor serving as an alternate terminal electron acceptor of the normal iron-sulfur cluster in the green sulfur bacterial RC complex.

研究分野：生物物理学

キーワード：光合成反応中心 緑色硫黄細菌 広宿主域プラスミド Hisタグ 電子移動 過渡吸収 キノン

1. 研究開始当初の背景

光合成反応中心(RC)は、光合成初期反応において最も重要な機能を担う、色素と膜タンパク質の超分子複合体である。植物やシアノバクテリアの光合成では、「光化学系 I」と「光化学系 II」という機能の異なる 2 種類の RC が協調的に機能している。光化学系 I と II は、どちらもヘテロダイマー構造のコアタンパク質と色素によって形成された電子移動経路からなるが、その立体構造が酷似しており、両者はホモダイマー構造のコアタンパク質をもつ共通の祖先型 RC から進化したと考えられている (M.F. Hohmann-Marriott and R.E. Blankenship, *Annu. Rev. Plant Biol.* 2011)。一方、両者の機能的な違いには、電子受容体であるキノン分子の機能が関係している。光化学系 I ではキノンは二次電子受容体であるのに対し、光化学系 II では最終電子受容体および拡散性の電子伝達体として働く。従って、光化学系 I と II の進化的な成立には、キノン分子周辺の構造が深く関わっている (J.F. Allen, *FEBS Lett.* 2005)。

絶対嫌気性の光合成細菌である緑色硫黄細菌の RC は、コアタンパク質が原始的なホモダイマー構造である。その結晶構造は解かれていないが、電子移動経路に光化学系 I と共通点が多く、緑色硫黄細菌の RC では二次電子受容体はメナキノンであると考えられてきた。しかし、極低温 ESR では、メナキノンが還元状態であっても、最終電子受容体である鉄硫黄クラスターの光還元が観測される (G. Hauska et al., *BBA*, 2001, C. Azai et al., *BBA*, 2011)。また、メナキノン分子は親水的なポケットに弱く結合していると推定されている (P. Heathcote et al., *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 2003)。これらの状況証拠は、緑色硫黄細菌の RC において、メナキノンが二次電子受容体と最終電子受容体の両方として機能する可能性を示唆している。

これは、最新の RC の進化モデルである「Selective-loss モデル」で祖先型 RC に仮定された性質と同じである (J.F. Allen, *FEBS Lett.* 2005)。しかし、緑色硫黄細菌の RC では、メナキノン分子の機能や結合部位に関する実験的なデータがなく、モデルの実証には至っていない。メナキノンへの過渡的な電子移動反応を観測できていないことが最大の原因であるが、緑色硫黄細菌の RC の研究は、絶対嫌気性という性質によって可能な解析方法が制限されるため、既に新しい情報が得られない状況にある。

申請者は、この状況に対して、緑色硫黄細菌の RC に任意の変異が導入できる「*pscA* 遺伝子の偽二倍体化」という独自の方法を構築し、分子生物学的なアプローチによる打破を試みてきた (C. Azai et al., *BBA*, 2011)。この部位特異的な変異導入法を利用すれば、緑色硫黄細菌の RC におけるメナキノンの機能と結合部位を実験的に調べることができると考え、本研究課題を着想した。

2. 研究の目的

本研究課題では、緑色硫黄細菌の RC を分子生物学的に解析するための実験系を整備し、緑色硫黄細菌の RC でのメナキノン分子の結合部位の同定および電子受容体としての機能を解明することを主たる目的とする。緑色硫黄細菌の RC でのメナキノン分子の二次電子受容体と最終電子受容体として機能を検証することで、光化学系 I と II のキノン分子の機能分化を引き起こす構造要因の推定を目指した。

3. 研究の方法

緑色硫黄細菌の RC のメナキノンの結合部位と鉄硫黄クラスターの配位子を対象に、変異導入によってメナキノンの結合性や電子移動反応の速度論を変化させることで、電子受容体としての機能と結合部位の構造を解析する。

部位特異的な変異体 RC の調製と生化学的キャラクタリゼーションを行い、RC あたりのキノン含量が低下する変異を探索し、メナキノン結合部位の同定と結合強度を調べる。変異導入部位は、光化学系 I の結晶構造から作製した、緑色硫黄細菌の RC のホモロジーモデルをもとに、ターゲットを絞る。部位特異的な変異体 RC は全て、申請者が考案した「*pscA* 遺伝子の偽二倍体化」(C. Azai et al., *BBA*, 2011) をもちいて、好熱性の緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum tepidum* で作製する。

部位特異的な変異体 RC の電子移動反応の解析を行う。メナキノンの二次電子受容体としての機能は、レーザー誘起過渡吸収変化の測定で解析する。もし、メナキノンが二次電子受容体として機能するならば、光励起後の過渡的なメナキノンの還元と再酸化が観測されるはずである。これまでに、緑色硫黄細菌の RC でメナキノンへの過渡的な電子移動の観測に成功した例はないが、メナキノン結合部位の変異によって、電子移動反応の速度論が変化し、観測が可能になると考えられる。

メナキノンが最終電子受容体として機能する場合、FX が存在しなくても、光励起によって安定的な電荷分離状態が形成されるはずである。もし、メナキノンが二次電子受容体としてのみ機能するならば、電荷分離状態は維持されず、酸化した電子供与体との間で速やかな電荷再結合反応が起こる。従って、レーザー誘起過渡吸収変化の測定結果を速度論的に解析することで、電子受容体としてのメナキノンの機能を評価できる。

4. 研究成果

(1) 部位特異的な変異体 RC の大量調製

緑色硫黄細菌の RC を簡便且つ大量に調製するため、これまでの研究で作製に成功していた *C. tepidum* での部位特異的な変異体 RC の発現系の改良を行った。大腸菌との細菌間接合によって導入した RSF1010 由来の広宿主域プラスミドが *C. tepidum* において安定に保持されることを新たに発見した。この広宿主域プラスミドを基に *C. tepidum* の外来遺伝子

発現用プラスミドを作製し、His タグ付加 RC の高発現化変異株の作製に成功した。発現プラスミドをゲノムから Strep タグ付加 RC を発現する株に導入し、白熱球を光源とした照射大量培養、酸素分圧 1 ppm 以下での精製操作、His タグと Strep タグのタンデムアフィニティクロマトグラフィによって、高い光電荷分離活性を保持した RC 標品を大量に調製する方法を確立した。プラスミド上の遺伝子に変異を導入することで「*pscA* 遺伝子の偽二倍体化」による部位特異的変異体 RC の作製が可能であることも確認でき、*C. tepidum* の RC の生化学的操作を飛躍的に簡便化することができた。この技術により、予想キノ結合部位や鉄硫黄クラスター配位子の部位特異的変異体 RC の単離に成功した。また、簡便な遺伝子導入系が整備されたことで、RC 以外を対象とした緑色硫黄細菌の分子生物学的な研究の発展が期待される他、絶対嫌気性という特徴を利用して、酸素に対して不安定なタンパク質を大量調製するための遺伝子発現系としての応用が期待される。

(2) 過渡吸収分光法による電子移動解析

新しく確立したプラスミドによる発現系を利用した方法で機能的な *C. tepidum* の RC を大量調製し、そこで起こる電子移動反応をサブナノ秒からミリ秒までの時間領域、400 nm から 900 nm までの波長領域を網羅したレーザー誘起過渡吸収スペクトル変化の測定で追跡した。野生型の RC 標品の測定で得られた時間分解吸収スペクトルをグローバル解析し、減衰随伴差スペクトルおよび分子種随伴差スペクトルを計算した結果、RC 内部の末端電子受容体よりも前段に位置する還元型電子受容体との電荷再結合による酸化型の一次電子供与体の速い再還元由来する信号が検出された。この信号は、測定時に加える酸化還元メディエーターの分子種と溶液粘性に依存して、キネティクスが大きく変化し、酸化型一次電子供与体の再還元経路と最終電子受容体が変わることがわかった。速度論的な解析により、これまで末端電子受容体と考えられていた鉄硫黄クラスター F_A/F_B ではない未同定の電子受容体が、RC 外部の酸化還元メディエーターに電子を伝達する経路が存在することを見出した。外部電子受容体として機能した酸化還元メディエーターの分子構造がキノに類似していたことや酸化還元電位が比較的高いことから、未同定の電子受容体はメナキノ分子であることが推定された。これは緑色硫黄細菌の RC においてメナキノ分子が二次あるいは末端電子受容体として機能している可能性を示唆している。予想メナキノ結合部位の部位特異的変異体 RC やメナキノ除去 RC、種々のキノ分子再構成 RC での解析は、本研究では完了していないが、本研究の成果を手がかりに、メナキノの電子受容体としての機能の解明が期待される。

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1件)

C. Azai, J. Harada, H. Ohoka (2013). "Gene expression system in green sulfur bacteria by conjugative plasmid transfer." PLoS One 8(11): e82345. (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0082345

[学会発表](計12件)

浅井智広、近藤徹、伊藤繁、大岡宏造「タイプ 1 光合成反応中心の保存されたアンテナクロロフィルの役割」第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 16 日、東京農業大学 世田谷キャンパス(東京都)
大岡宏造、山本和矢、武藤梨沙、浅井智広、栗栖源嗣「緑色イオウ光合成細菌のシトクロム *bc* 複合体は Rieske/cytochrome *b* タイプである」第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 16 日、東京農業大学 世田谷キャンパス(東京都)

小林愛実、浅井智広、溝口正、民秋均、塚谷祐介、寺内一姫「光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* におけるジビニル還元酵素 BciA の C8 ビニル基還元活性解析」第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 16 日、東京農業大学 世田谷キャンパス(東京都)

横井川侑大、浅井智広、寺内一姫「緑色硫黄細菌におけるシアノバクテリア時計遺伝子の異種発現」第 9 回日本ゲノム微生物学会年会、2015 年 3 月 06 日、神戸大学神大会館(兵庫県)

水谷直哉、松田宏矢、阿部さゆり、浅井智広、寺内一姫「大腸菌におけるシアノバクテリア時計遺伝子の発現とその制御解析」第 9 回日本ゲノム微生物学会年会、2015 年 3 月 7 日、神戸大学神大会館(兵庫県)
吉村真史、寺本高啓、浅井智広、寺内一姫、難波秀利、太田俊明「糸状シアノバクテリアの元素選択的観察」第 28 回日本放射光学会年会、2015 年 1 月 12 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県)

Chihiro Azai, Toru Kondo, Shigeru Itoh, Hirozo Oh-oka "Two Disconnected Antenna Chlorophyll Pools in Type-1 Photosynthetic Reaction Center of Green Sulfur Bacteria" 第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 27 日、札幌コンベンションセンター(北海道)

Hirozo Oh-oka, Tomoya Yamamoto, Risa Mutoh, Chihiro Azai, Genji Kurisu "Isolation of Rieske/cytochrome *b* complex from a green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*" 第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 27 日、札幌コンベンションセンター(北海道)

Daiki Kiyota, Risa Mutoh, Chihiro Azai,

Hirozo Oh-oka, Genji Kurisu "Structural studies of [FeFe] hydrogenase maturation from green alga *Chlamydomonas reinhardtii*" 第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 25 日、札幌コンベンションセンター(北海道)

浅井智広、近藤徹、伊藤繁、大岡宏造「緑色硫黄細菌のタイプ I 型 RC は PS I とは異なるエネルギー移動系をもつ」第 5 回日本光合成学会年会、2014 年 5 月 30 日、近畿大学 奈良キャンパス(奈良県)

大山克明、張倍、三林芳太郎、浅井智広、寺内一姫「シアノバクテリア生物時計再構成系における KaiC の周期的構造変化解析」第 5 回日本光合成学会年会、2014 年 5 月 30 日、近畿大学 奈良キャンパス(奈良県)

近藤徹、浅井智広、大岡宏造、伊藤 繁「ヘリオバクテリア I 型反応中心のキノン反応・部位は PSI と異なる」第 5 回日本光合成学会年会、2014 年 5 月 30 日、近畿大学 奈良キャンパス(奈良県)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

浅井 智広 (AZAI, Chihiro)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：70706564