

## 光合成反応中心の単離・精製・結晶化と分光学的測定による光合成色素の構造の研究

著者	小林 正幸
号	1707
発行年	1994
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/6980">http://hdl.handle.net/10097/6980</a>

氏 名	小 林 正 幸
授 与 学 位	博 士 ( 工 学 )
学位授与年月日	平成 7 年 3 月 24 日
学位授与の根拠法規	学位規則第 4 条第 1 項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 生物工学専攻
学 位 論 文 題 目	光合成反応中心の単離・精製・結晶化と分光学的測定 による光合成色素の構造の研究
指 導 教 官	東北大学教授 野澤 庸則
論 文 審 査 委 員	東北大学教授 野澤 庸則      東北大学教授 田中 實 東北大学教授 西野 徳三

## 論 文 内 容 要 旨

本博士論文は全編六章で構成されている。第一章では光合成明反応における光合成反応中心の機能・構造についての概要と本研究に用いた分光学的測定の原理について示している。第二章では耐熱性紅色硫黄光合成細菌 *Chromatium (C.) tepidum* 反応中心の単離・精製法と反応中心の分光測定の結果及び解析について、第三章では *C. tepidum* 反応中心の結晶化とその結晶の分光測定の結果及び解析について示している。第四章に於いては様々な種類の光合成色素の吸収スペクトルと磁気円偏光二色性スペクトルの測定を行いその結果から光合成色素の会合構造とスペクトル強度の定量化を行った。第五章では第四章の結果を踏まえて緑色植物反応中心内の色素会合構造の決定を行った。そして、第六章で本論文の総括を行っている。以下に本博士論文の要旨をまとめる。

### 第一章 緒 言

はじめに生体反応, 特に植物 (光合成細菌) が特異的に行い生命活動の根幹をなす光合成反応の特異性, 有用性を示した。次に, 光合成反応のうち光の関与する光合成明反応過程の基本的な反応を示し, この光合成明反応が極めて優れた生体反応であり, この反応を構築している膜タンパク質の構造的・機能的知見がその工学的応用に必須であることを示した。そして, 光合成明反応の要の反応 (光誘起電子移動反応) を行う色素-タンパク質複合体 "反応中心" の現在分かっている最新の機能, 構造を緑色植物反応中心, 細菌型反応中心について示した。また, 分光学的測定の原理を

吸収スペクトル，直線偏光二色性スペクトル，磁気円偏光二色性スペクトル，X線回折について述べている。

## 第二章 紅色光合成細菌 Chromatium tepidum 由来反応中心の単離・精製及びその分光学的性質

本章では耐熱性紅色光合成細菌 C. tepidum から光合成明反応過程において要の光誘起電子移動反応を行う膜タンパク質である光合成反応中心の単離・精製法を確立した過程を述べた。その方法は光合成膜を界面活性剤 (lauryl-N, N-dimethyl amine-N-oxide) により反応中心を水溶液中に可溶化し，DEAE-陰イオン交換カラムを用いた NaCl 濃度勾配法により得る方法である。従来，単離法における反応中心タンパク質可溶化のための界面活性剤による可溶化処理は一度しか行っていなかったが，可溶化処理を二度行うことが高純度でかつ大量の反応中心を得る方法であることを見いだした。次に，C. tepidum 反応中心が熱的・化学的に安定なタンパク質であることから，タンパク質の熱安定性と構造（特に色素構造）との関係を明らかにすべく反応中心の分光学的測定を行った。分光学的測定としては吸収スペクトル，直線偏光二色性 (LD) スペクトル，磁気円偏光二色性 (MCD) スペクトルを用いた。その結果，次のことが明らかとなった。吸収スペクトルからは耐熱菌である C. tepidum 由来の反応中心の色素構成は他の常温菌由来のそれと同じであることが分かった。そして LD スペクトル解析からは C. tepidum 由来反応中心（耐熱菌由来タンパク質）の内部に存在する反応中心内色素の遷移モーメントの配向角は常温菌由来反応中心の反応中心内色素の遷移モーメントの配向角と良好な一致を示した。また MCD スペクトルからは C. tepidum 反応中心の第一電子供与体（スペシャルペアー：バクテリオクロフィル<sub>a</sub>のダイマー）は常温菌由来反応中心のそれと同じ波長位置に高エネルギー帯と低エネルギー帯を持つ事が明らかとなり，スペシャルペアーの相互作用は耐熱菌と常温菌で変わらないことが示唆された。このように，C. tepidum 反応中心はその色素構造が特異であることで反応中心の色素構造の熱安定性を獲得したのではないことが強く示唆された。

## 第三章 紅色光合成細菌 Chromatium tepidum 由来反応中心の結晶とその分光学的性質

本章では耐熱性紅色光合成細菌 C. tepidum 反応中心の熱安定性と構造・機能の相関を明らかにすべく，C. tepidum 反応中心の結晶化条件の検索を行った。なお，C. tepidum 反応中心は前章の単離・精製法の手続きによって得られた反応中心を高度に精製して用いた。結晶化の方法としては蒸気拡散法を採用した。なお，結晶化に際し溶液の pH は 7.0，沈澱剤としては polyethyleneglycol 4000 を用いた。そして，X線回折像を示す反応中心の結晶化に成功した。この結晶の X線回折像には 17,724 の独立な回折点が存在し，分解能 3 Å の高分解能立体構造解析が可能となる。従って，C. tepidum 反応中心の立体構造解析から反応中心の耐熱性獲得部位の決定が期待できる。また，蒸気拡散法による C. tepidum 反応中心の結晶化の際には以下に示すことが結晶化のパラメータとなること分かり，それらの最適条件に関する知見を得た。まず，膜タンパク質の結晶化に特異に存

在するパラメータである界面活性剤と両親媒性小分子の種類と濃度に関する知見は以下の通りである。界面活性剤としては非イオン性界面活性剤である *n*-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside が *C. tepidum* 反応中心の結晶化には最適であり、その濃度は臨界ミセル濃度 (0.8% : w/v) 近傍であることが分かった。両親媒性小分子 (heptane-1, 2, 3-triol) はその添加量に関わらず反応中心を変性させたことから *C. tepidum* 反応中心の結晶化には適さないことが分かった。次に、無機化合物、可溶性タンパク質、膜タンパク質など一般的な物質の蒸気拡散法による結晶化に共通して存在する結晶化パラメータである protein-溶液と reservoir-溶液の沈澱剤濃度差、タンパク質濃度について得られた知見は以下の通りである。結晶化に最も影響を与える条件は reservoir-溶液の沈澱剤濃度であり、*C. tepidum* 反応中心の結晶化の際には沈澱剤濃度 22.5% (w/v) 近傍が良好であることが分かった。そして、反応中心タンパク質濃度は結晶化する結晶の大きさや質に影響を与えるのではなく形成する結晶の数に影響を与えることが分かった。我々はこれら従来言われていた結晶化の条件の他にタンパク質の凍結保存時間が X 線回折像を示す結晶化のための重要なパラメータとなることを発見した。つまり、凍結保存の有無によって得られた結晶が X 線回折像を示すか示さないかを左右することが明らかとなった。そして、凍結保存を行った反応中心を結晶化試料に用いた場合、結晶形成に時間を要し、得られた結晶は X 線回折像を示さないものの、得られた結晶の分光学的測定 (吸収スペクトル) から反応中心の色素構造、酵素活性能を十分に保持していることが明らかとなった。

#### 第四章 単離光合成色素及び光合成細菌由来の色素-タンパク質複合体を用いた吸収スペクトル及び磁気円偏光二色スペクトルによる色素会合状態の検討と定量化

本章では生体内部に存在する、または生体外に単離された光合成色素のモノマー状態及びダイマー状態 (更に高次な会合状態) の吸収及び MCD スペクトルの測定を行い、吸収強度と MCD 強度の定量化を行った。測定試料となる光合成色素及び色素-タンパク質複合体は緑色植物 (ほうれん草)、緑色硫黄光合成細菌及び紅色硫黄光合成細菌から単離・精製した。これらの測定結果に対するスペクトル強度の評価はスペクトルをガウス関数によってスペクトル分割し、そのガウス関数成分の強度を用いて行った。ここで、我々は光合成色素の最長波長遷移 ( $Q_y$  遷移) の磁気分子円二色度と分子吸光係の比 :  $\Delta \epsilon_M / \epsilon$  値 (MCD/Abs 値) を  $Q_y$  遷移に対する新たな指標として導入することにより以下の知見を得た。モノマー状態における光合成色素の  $\Delta \epsilon_M / \epsilon$  値は光合成色素の  $\pi$  電子系に大きく影響を受け、同じ  $\pi$  電子共役系であれば同じ  $\Delta \epsilon_M / \epsilon$  値を取ることが分かった。これは光合成色素において観測される MCD の起原が Faraday B 項 (測定分子の対称性が悪い場合磁場により縮退していた電子軌道の励起状態が Zeeman 分裂を起こすのではなく励起状態と別の励起状態が磁場により混ざり込みを起こすために観測された特徴的な MCD) に由来するためである。つまり、 $\Delta \epsilon_M / \epsilon$  値が  $\pi$  電子系に依存する原因は光合成色素の  $Q_y$  遷移に対応する励起状態の電子軌道は磁場により別のより高次の励起状態の電子軌道と混ざり込みを起こすが、この際  $\pi$  電子系が異なるためにその磁場による混ざり込みの度合いが異なり、このため  $\Delta \epsilon_M / \epsilon$  値が異なると結

論づけられた。また、モノマー状態に帰属されるガウス関数に比べダイマー状態に帰属されるガウス関数の幅が広く、その極大波長位置も長波長シフトすることが明らかとなった。また、ダイマー状態に帰属される光合成色素のMCD強度はモノマー状態のそれに比べ弱いことが分かった。これら光合成色素のダイマー状態に観測される挙動はモノマー状態の $\pi$ 電子に比べダイマー状態の $\pi$ 電子は二つの光合成色素に非局在化し安定化したためであると考えられる。つまり、モノマー状態での $\pi$ 電子はそのモノマー分子の $\pi$ 電子系に束縛されているが、ダイマー状態の $\pi$ 電子は元来束縛されていた $\pi$ 電子系かダイマーを形成することで新たに束縛される $\pi$ 電子系のいずれに束縛されているかは判断できないためこのような現象が起こったと考えられた。そして、モノマー状態とダイマー状態に帰属される光合成色素の $\Delta \epsilon_M / \epsilon$ 値の比は2:1と一定値をとり、この比は光合成色素の種類によらない値であることを発見した。

## 第五章 吸収スペクトル及び磁気円偏光二色性スペクトルによる緑色植物由来反応中心の色素構造の研究

本章では緑色植物（ほうれん草からその反応中心をエンリッチした試料（PS I enriched particle と PS II enriched particle）を植物の細胞内小器官であるクロロプラスト（葉緑体）より単離し、この吸収及びMCDスペクトルの測定を行った。次に、これらのスペクトルをガウス関数を用いてスペクトル分割を行い、第四章でその特性が明らかとなったMCD/Abs値を算出する事で反応中心内色素の会合構造の決定を行った。その結果、PS I 反応中心の第一電子供与体P700はクロロフィルaがダイマー構造を取っており、P700の酸化状態（電子を放出した状態）であるP700<sup>+</sup>はモノマー状態であることが分かった。そして、PS I 反応中心の第一電子受容体A<sub>0</sub>もモノマー状態である事が分かった。PS II 反応中心の色素構造決定結果は以下の通りである。PS II 反応中心の第一電気供与体P680はクロロフィルaのダイマー構造を取っており、この他にモノマー状態のクロロフィルa、フェオフィチンaを含んでいる事が明らかとなった。この結果は細菌型反応中心とPS II 反応中心の色素構造が非常に類似していることを示している。

## 第六章 総括

本章では本研究を通して得られた結論の総括を行った。

## 審査結果の要旨

生物が光エネルギーを獲得し生物の利用できるエネルギーへ変換を行う光合成明反応は様々なタンパク質が相互に関連し構築された生体膜で行われる複合反応である。この明反応過程に於ける要の反応である光誘起移動反応は反応中心と呼ばれる色素-タンパク質複合体で行われる。反応中心は光により200ピコ秒という極めて短時間のうちに40Å程の色素間に電子移動をおこし電荷分離を形成するという機能を有する生体素子である。このような機能の構造的基礎とこれを応用する際に重要となるタンパク質の安定性についてタンパク質工学ならびに分光学的手法を用いて研究することが本論文の目的である。本論文は6章からなる。

第1章は序論である。光合成反応中心の構造・機能についての研究の現状と本研究に用いた種々の分光法について述べ、本研究の意義および目的について述べている。

第2章では耐熱性紅色光合成細菌 *C. tepidum* 由来反応中心の分光学的検討からその色素構造には常温菌由来の反応中心と本質的にちがいが無いことを明らかにした。

第3章においては上記反応中心の X 線回折による立体構造解析のために反応中心の結晶化を行った研究を述べている。非常に困難な膜タンパク質の結晶化に成功し、さらにこの結晶の3Åの分解能を持つ X 線回折像を得ている。

第4章においては様々な光合成色素ならびに光合成色素タンパク質の磁気円偏光二色性 (MCD) の測定を行い、MCD 強度と電子吸収スペクトルの強度比が色素構造を決定する際の重要な指標となることを示した。すなわち、この強度比が光合成色素の共役構造を鋭敏に反映し、しかもダイマーとモノマーでは1:2となることを明らかにした。

第5章においては第4章において得られた知見を用いて、その構造の複雑さから従来研究が困難であった緑色植物の系 I および系 II の反応中心について MCD から検討を行い系 I 反応中心の第1電子供与体がダイマーでありその受容体がモノマーであること、また系 II 反応中心は細菌型の反応中心と類似性が高いことを明らかにした。

第6章は総括である。

以上要するに本論文は、その高い機能性から注目されている光合成反応中心の機能構造の解明を行い細菌型ならびに植物型の反応中心の色素構造の特徴を明らかにするとともにタンパク質の立体構造解析にとって重要な X 線回折像を示す反応中心の結晶化に成功したことを述べた論文で生体分子工学の発展に寄与するところが少なくない。