

内 94-55

早稲田大学大学院理工学研究科

# 博 士 論 文 概 要

## 論 文 題 目

緑色硫黄光合成細菌 *Chlorobium tepidum*  
光化学反応中心複合体の  
構造と機能に関する研究

申 請 者

楠元 範明

Noriaki Kusumoto

物理学及応用物理学専攻  
植物生理学研究

1994年 12月

光合成における中心的反応は、光化学反応中心における励起された反応中心色素の光酸化と電子受容体の還元からなる光エネルギーの化学エネルギーへの変換である。吸収した光によって反応中心色素Pは励起され、励起されたPは電子受容体A<sub>1</sub>に電子を渡し、自身は酸化されてP<sup>+</sup>となる。P<sup>+</sup>は電子供与体から電子を受け取り、再還元されてPに戻り、次の励起が可能となる。一方、電子はA<sub>1</sub>から2次、3次の電子受容体に渡され、安定した電荷の分離が実現される。光合成の特徴は効率が極めて高いことであるが、紅色光合成細菌 *Rhodospseudomonas viridis*, *Rhodobacter sphaeroides* 光化学反応中心の微細構造がX線結晶解析によって明らかにされた結果、高い効率を支える構造と機能に関する理解が急速に進んだ。光化学反応中心には光化学反応系I (P S I)、緑色硫黄細菌型、光化学反応系II (P S II)、紅色細菌型の4種があり、これらは主要な2次電子受容体の面から、2つの型にまとめられる。すなわち鉄硫黄型 (P S I、緑色硫黄細菌型) と、キノン型 (P S II、紅色細菌型) である。これら4つの光化学反応系のうち、緑色硫黄細菌型は、多くの研究者による長年の努力にもかかわらず研究が最も遅れた分野で、反応系の酸素に対する感受性が高く、活性の高い光化学反応中心複合体が得られなかったために、2次電子伝達のkineticsも断片的報告がなされていたにすぎなかった。光合成の高い効率を支える構成原理の理解のためには、さまざまな型の反応中心複合体の構造と機能を比較研究することにより、一般原理を導き出すことが有効だと考えられる。

著者は、このような観点から緑色硫黄細菌反応中心の研究に取り組み、精製時の嫌気条件維持に細心の注意を払うことにより活性の高い反応中心粒子の調製に成功し、その諸性質を各種測定によって明らかにした。

本論文は5章で構成されている。

第1章では、光化学反応の概略を述べ、最後に本研究の目的を述べた。

2つの型の光化学反応中心のうちキノン型については、紅色細菌型の光化学反応中心の微細構造がX線結晶解析により明らかにされ、これと相同性の高いP S IIについても反応中心色素と電子受容体側の構造と機能がかなり理解できるようになった。これらは、主要な電子受容体としてフェオフィチンおよび2個のキノンをもち、P S IIが付加的な酸素発生系を持つ点を除けば多くの点で共通な性質を持っている。鉄硫黄型であるP S Iは主要な電子受容体としてChl、フィロキノン、3種のFe-Sセンターを持つ。そのエネルギー伝達および電子伝達kineticsに関しては分光学的研究が進み、また結晶解析も6Åの分解能まで進んで、機能と構造の両面での解明が進みつつある。

緑色硫黄細菌型反応中心は、主要な電子受容体がFe-Sセンターである点でP S Iと相同性があり、初発電子受容体がそれぞれBChl、Chlである点が類似していることも指摘されていたが、電子受容体のそれ以上の性質および電子伝達のkineticsに関する研究は進んでいなかった。これはFe-Sセンターの酸素感受性のため、

安定した活性を持つ反応中心標品が得られていなかったためである。筆者は、P S IのFe-Sセンターが酸素に対して感受性であること、および緑色硫黄光合成細菌が生育に絶対嫌気的条件を必要とすることに注目し、精製の全過程を通じて酸素の除去に細心の注意を払うことにより、活性の高い光化学反応中心複合体の精製を目指した。

なお、筆者の研究開始後、緑色硫黄細菌光化学反応中心ペプチドがホモダイマーであることが明らかにされた。他の型の反応中心はすべてヘテロダイマー構造で、紅色細菌反応中心では、ヘテロダイマータンパク質分子により形成される電場の異方性によって電荷分離と方向性が与えられるが、緑色細菌型のホモダイマー構造では異方性が期待できず、その構造と機能の解明が重要となっている。

第2章では、光化学反応中心複合体の精製方法を述べ、各精製段階での精製状況を吸光分光、SDSゲル電気泳動法により示した。さらに得られた光化学反応中心複合体のサブユニットを同定した。

嫌気条件下で集菌した細胞は、細胞破碎装置バイオネブライザーによって嫌氣的に破碎し、遠心分画により膜断片を得た。光化学反応中心は膜断片よりTriton X100によって可溶化し、分画超遠心により光化学反応中心を含む上清と集光装置クロロソームを含む沈殿とに分離し、これに続く20万xg、24時間のショ糖密度勾配超遠心により反応中心に富む画分を得た。さらにDEAE、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを経て最終精製標品を得た。各段階の吸収スペクトルより、ショ糖密度勾配超遠心はクロロソームから遊離したと考えられるBchl cモノマーと光化学反応中心複合体との分離に効果的であること、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーが集光性FM0タンパクの除去に効果的であることが示された。最終精製標品には、551nmにCyt c<sub>551</sub>のα吸収帯ピークが観察され、830 nm近辺に光化学反応中心の特徴である吸収の肩が認められた。

最終精製標品のSDSゲル電気泳動CBB染色による解析から、この標品が約100、65、42、32、24、18 kDaの6バンドからなることが示された。このうち65kDaはこれまでの研究により光化学反応中心コアペプチド、100kDaはその会合体であると考えられた。42kDaはN末端アミノ酸配列分析によりFM0タンパク、24kDaはN末端アミノ酸組成分析およびヘム染色によりCyt c<sub>551</sub>であることが判明した。Cys残基を蛍光標識するA B D-Fを用いた実験から、32 kDaはFe-S結合タンパクであることが強く示唆された。

第3章では、得られた光化学反応中心複合体の光化学反応中心P840、Cyt c、およびFe-Sを機能の面から研究した。

P840および結合型Cyt cの機能を調べるために、光化学反応中心複合体の連続光照射による吸光度変化を2波長分光光度計を用いて測定した。飽和光の照射によりP840、Cyt cの吸光の減少がそれぞれ830nm付近、551nmに観測され、P840の光酸化活性とCyt cの光誘起酸化活性が確認された。Fe-Sセンターの光誘起還元活性は

極低温EPRを用いて研究した。この結果、この標品は光還元される少なくとも3種のFe-Sセンター $CF_A$ 、 $CF_B$ 、 $CF_X$ を結合していること、このうち $CF_A$ 、 $CF_B$ はpH10、20mMジチオナイトの存在下で完全に還元される程度の $E_m$ を持つことがわかった。

結合Cyt cの全量を見積もるためにフェリシアニド-アスコルビン酸の化学的酸化還元差スペクトルを測定した。その結果、この結合型Cyt cの $\alpha$ 吸収帯ピークが551nmに観察され、吸光度変化の比較から、先の連続光によって光酸化されたCyt c量は全Cyt c量の60%と見積もられた。

第4章では、反応中心に結合している2次電子伝達体の酸化還元kineticsおよび差スペクトルのミリ秒閃光分光による測定について述べている。

mPMSはPMS、DPIPに比べて光に対して安定な人工電子供与体であるが、閃光照射後の $\Delta A_{551}$ のdecayはmPMS濃度に依存して速くなることが観測された。またこのときのdecay kineticsは、どのmPMS濃度においても1成分だと解析され、Cyt cの $\alpha$ 吸収帯ピークが551nmであることから、551nmにおけるdecayはCyt cの再還元由来すると結論づけられた。430nm付近では添加したmPMSによるCyt cのソーレ吸収帯由来と考えられる成分の他に、decay速度がmPMSにほとんど影響されない成分が観察され、後者をmPMS非依存性成分と呼んだ。閃光照射による最大総吸収変化(a)、そのうちのmPMS非依存性成分の吸光度変化(b)、 $(c)=(a)-(b)$ のそれぞれを波長に対してプロットしたところ、(b)はおよそ430~435nmになだらかな負のピークを持つスペクトルを示した。PSIにおいては20年以上前にFe-SセンターA、Bの1電子還元状態である $(F_A, F_B)^-$ 由来の酸化還元差スペクトルが測定され、P430として知られていたが、(b)のスペクトルはこれによく似ていた。このことから(b)のスペクトルはFe-Sセンター $(CF_A, CF_B)^-$ 由来のスペクトルであると考えられた。(c)のスペクトルは明らかにCyt cに特徴的なスペクトルで、551nm、~520nm、~420nmに各吸収帯のピークを持ち、酸化型・還元型の等吸収点はこの測定では~438nmにあった。

ビオローゲンなどの人工電子受容体はFe-Sセンターを酸化することが期待されるので、mPMS非依存性吸光成分に対する影響を438nmにおいて測定したところ、B V( $E_m$ : -340mV)、MV( $E_m$ : -430mV)は比較的低濃度でdecayの速度を高めた。しかし $E_m$ : -520mVのTriquatはその効果が前2者よりも低いことがわかった。効果が低いことの一因としては、Triquatの $E_m$ が低いことによる可能性が考えられる。このように人工電子受容体の添加によって、mPMS非依存性成分のdecayが速くなったことから、このdecayの成分がFe-Sセンター由来であるとした我々の結論がさらに裏付けられた。

第5章はまとめであり、本研究で得られた知見を要約し、今回得られた緑色硫黄細菌型の光化学反応中心の諸性質について述べ、今後の緑色細菌型光化学反応中心の研究の方向性を示している。