

	もり たかゆき
氏 名	森 貴幸
授 与 学 位	博士 (工学)
学位授与年月日	平成15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	光合成反応中心の耐熱化構造と機能に関する研究
指 導 教 官	東北大学教授 野澤 庸則
論文審査委員	主査 東北大学教授 野澤 庸則 東北大学教授 西野 徳三 東北大学教授 熊谷 泉

## 論文内容要旨

### <第1章 序論>

紅色光合成細菌の光合成明反応は細胞膜が細胞質側に陥入した光合成膜で行われる。光合成膜には光捕集器官である LH(Light Harvesting)1, LH2、光電変換機能を有するタンパク質である反応中心(RC)、プロトン濃度勾配を形成する *cyt b/c<sub>1</sub>* 複合体、プロトン濃度勾配を駆動力として ATP を生成する H<sup>+</sup>-ATPase 等の膜タンパク質が内在しており、循環的な光合成電子伝達系が形成されている。紅色硫黄光合成細菌 *Thermochromatium(Tch.)tepidum* は最適生育温度が 48℃ と紅色光合成細菌の中で最も高く、その反応中心も耐熱性を有していると考えられ、その熱安定化構造を解明することが本研究目的である。*Tch.tepidum* 反応中心の単離・精製及び結晶化、反応中心の構成サブユニット(L, M, H, Cyt)のうち L, M, Cyt サブユニットの一次構造の決定は当研究室の研究によって既になされている。本論文では未決定である H サブユニットの一次構造を決定し X 線結晶解析から反応中心の立体構造を決定に導き、更に *Tch.tepidum* 及び常温菌由来反応中心の熱安定性を解析し、構造面からの知見と合わせて *Tch.tepidum* 反応中心の熱安定化要因を検討した。

## <第2章 常温菌由来反応中心の熱安定性の解明>

本章では常温で生育する紅色光合成細菌 *Blastochloris viridis*, *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides* の光合成膜顆粒(ICM)とリポソームに再構成された反応中心を用いて、吸収スペクトル、明暗差スペクトルより得られた色素構造, photo-activity の温度依存性から常温菌由来反応中心の熱安定性を解明した。その結果、常温菌由来反応中心の熱安定性は光合成膜中に存在している状態と反応中心単独で脂質膜中に存在している状態に変化しないことが分かった。また、常温菌由来反応中心やLHIは生育温度以上でも色素構造を維持していることが示された。

## <第3章 光合成反応中心Hサブユニット構造遺伝子の決定>

紅色非硫黄細菌においてHサブユニット構造遺伝子(*puhA*)は他の反応中心構造遺伝子の約30kbp上流に位置しており、周囲の遺伝子の情報も乏しい。そこで本章では他菌体の情報を必要としないカセットPCR法を用いて、紅色硫黄細菌に対して初めて *Tch.tepidum* 及び *Allochromatium (Ach.) vinosum* のHサブユニットの一次構造を塩基配列から決定した。その結果、*Tch.tepidum* 反応中心において一次構造の情報が全て揃いX線結晶解析から反応中心の立体構造が決定された(図1)。

*Ach. vinosum puhA* 周辺には他菌体と同一性を有する構造遺伝子が存在し、反応中心やLHIの形成や機能発現に関する遺伝子

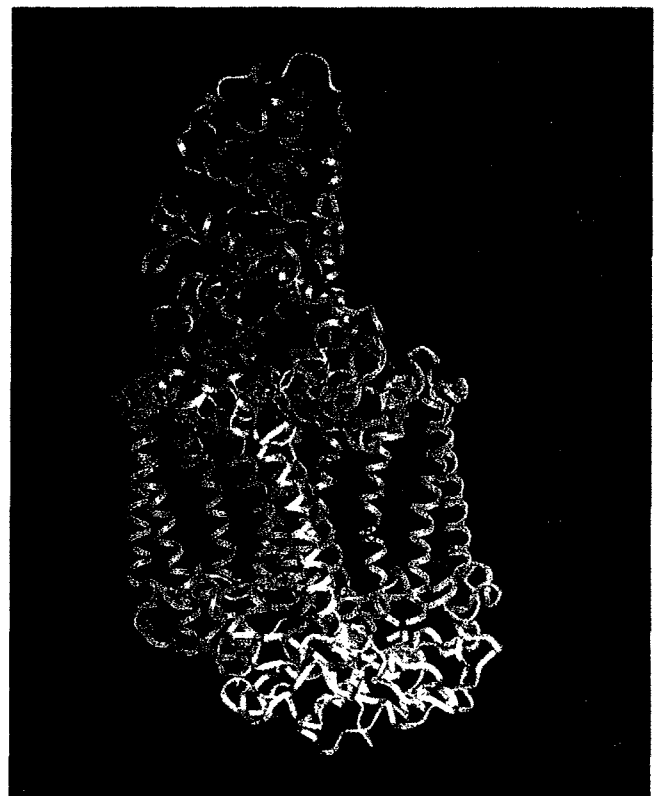


図1 *Tch.tepidum* 反応中心の

X線結晶解析より得られた立体構造

を保持していることが示唆された。反応中心と反応中心結合性の Phosphatidyl-Ethanolamine との相互作用はLM-Hサブユニット間の結合性に関与していることが示唆された。また、*Tch.tepidum* 反応中心には *Rba.sphaeroides* 反応中心のプロトン輸送経路の入り口と同様のモチーフが存在しており、この局所的な構造がプロトン輸送経路の入り口を形成していることが示唆された。

#### <第4章 *Tch.tepidum* 反応中心の熱安定性の解明>

本章では *Tch.tepidum* の ICM とリポソームに再構成された反応中心及び LH1-RC を用いて、吸収スペクトル、明暗差スペクトル(photo-activity)より得られた色素構造の温度依存性から *Tch.tepidum* 反応中心の熱安定性を解明した。その結果、以下のように

- (1) *Tch.tepidum* Cyt サブユニットはスペシャルペアカチオンに電子を供給するほかに、色素を保護する役割も果たしている。
- (2) *Tch.tepidum* 反応中心はその周囲に LH1 が存在することによって熱安定性が増加する。
- (3) *Tch.tepidum* LH1 $\alpha$  サブユニットの膜界面に負電荷が局在化する。
- (4) *Tch.tepidum* 反応中心は膜界面に特異的な Arg 残基が増加している。

(1)~(4)が明らかとなった。

(2)~(4)と第2章で得られた「常温菌由来反応中心の熱安定性は反応中心の周りに LH1 が存在している状態(LH1-RC)と存在しない状態(反応中心のみ)との間で熱安定性に大きな違いがない。」を併せて検討し、*Tch.tepidum* 反応中心と LH1 の間の特異的な静電的相互作用が熱安定化獲得の要因であることを見出した(図2)。

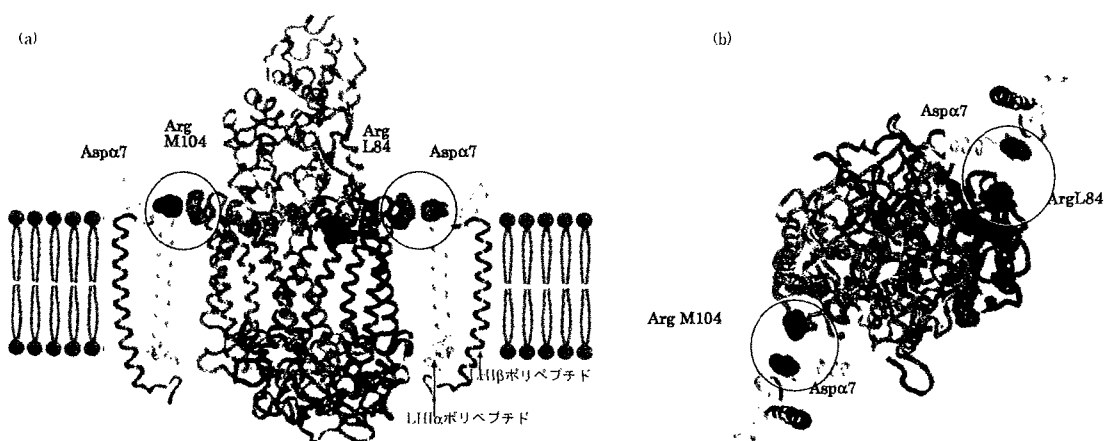


図2 *Tch.tepidum* LH1-RC における

Asp $\alpha$ 7 と Arg L84, Arg M104 の相互作用構造モデル

# 論文審査結果の要旨

本学位論文は光合成器官の構造・機能解明とその応用を目指した反応中心タンパク質の耐熱化構造とその機能を研究したものである。資源・エネルギーの枯渇など我々を取り巻く様々な問題の解決を目指す研究の一環として光合成反応の積極的な活用方法が模索されている。このような大きな流れの中で、本論文は光合成反応とりわけその明反応過程で本質的な役割をはたしている色素・タンパク質錯体である光合成反応中心(RC)の諸性質、特に、耐熱化構造と機能を光合成細菌について研究した論文で、全5章から構成されている。

第1章は緒論であり、本研究の背景および目的について述べている。

第2章は常温光合成細菌由来反応中心の熱安定性の解明について述べている。紅色光合成細菌に分類される、*Blastochloris (Blc.) viridis*、*Rhodobacter (Rba.) sphaeroides*から、細胞質内膜(ICM)を調製し、これからRCを単離精製して、後者を自身の脂質を用いたリポソームに再構成したものを作製した。各温度で熱処理をした後に残っている、光合成活性、および、特異な色素構造に由来する吸収スペクトルの大きさから、それぞれの状態で熱安定性を評価した。その結果、*Blc. viridis*、*Rba. sphaeroides*それぞれの反応中心は、単独でリポソームに存在している時と、ICM中で、周りをアンテナタンパク質LH1で囲まれている時で、その安定性は本質的に同じであることが分かった。

第3章においては、紅色光合成細菌の耐熱種 *Thermochromatium (Tch.) tepidum* RCのそれまで決定されていなかったHサブユニットの1次構造を決定することにより、*Tch. tepidum* RCのX線構造解析の完成に貢献し、その構造を詳細に検討した。その結果、*Tch. tepidum* RCには、常温菌の *Allochromatium (Ach.) vinosum* や、*Blc. viridis*、*Rba. sphaeroides* には存在しない、膜界面に存在する特異的なアルギニン残基が3つ存在していることを見いだした。

第4章においては、耐熱性紅色イオウ光合成細菌 *Tch. tepidum* RCの熱安定性の検討を行った。*Tch. tepidum* RCはICMの状態において、他のどの常温菌のものと比較してもその熱安定性が高いことが見いだされた。一方、リポソームに再構成した段階では、必ずしも、常温菌のRCと比較して、その熱安定性は高くはなかった。そこで、ICM状態に近いRCの周りをLH1が取り囲んだ状態である、LH1-RCとしての熱安定性をリポソーム再構成状態で評価したところ、この状態においては、単独でリポソームに再構成されたものと比較して、*Tch. tepidum* が著しい安定性の向上を示すことを見いだした。このことから、耐熱菌である *Tch. tepidum* 反応中心の安定性にはRCとLH1の相互作用が重要であることが示唆された。そこで、LH1を構成するタンパク質サブユニットのうち、RC側に存在すると考えられる $\alpha$ サブユニットの膜界面に注目して、他の常温菌との1次構造の比較を行ったところ、耐熱菌のLH1に特徴的なアスパラギン酸残基が見いだされ、これは近傍のアミノ酸の陽電荷にうち消されることなく正味の負電荷を持つことを見いだした。このことから、膜界面に存在するLH1との静電的な相互作用がこのRCの熱安定性に重要であるとの結論を導き、これが、膜タンパク質一般の耐熱化にも重要な要素となる可能性を提案しており、高く評価できる。

第5章は以上を総括している。

以上要するに本論文では、光生物が効率的に光エネルギーを変換利用する際に本質的に重要な膜タンパク質である光合成反応中心タンパク質を、構造化学的ならびに分光学的研究から、その耐熱化機構について新しい知見を見だし、それらの工学的応用のための新しい知見を与えたものであり、生物工学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。