

氏名	すずき ひろ あき 鈴木 宏 昭
授与学位	博士 (工学)
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 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	人工光合成システム構築に向けた 光捕集反応中心超分子複合体の構造解明及び機能化
指導教員	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 熊谷 泉 東北大学教授 末永 智一

論文内容要旨

第 1 章 序論

現在大気中の温室効果ガス濃度上昇に伴う地球温暖化問題は深刻な状況を迎えている。特に化石燃料の燃焼などにより人為的に排出される二酸化炭素の地球温暖化への直接寄与度は約 60%と試算され、早急な対策が求められている。また近年、生体内の酵素反応を有用物質生産や分析に利用するバイオリアクター技術が盛んに研究され急速に発展している。しかし、高エネルギー化合物の連続的な供給を必要とする酵素は利用できないため、バイオリアクターの構築に大きな制限が存在する。

これらの課題を解決するために光合成反応の高度利用が期待されている。光合成反応は無尽蔵の太陽エネルギーを利用して二酸化炭素を固定し各種有機化合物を合成することから、次世代クリーンエネルギーの候補として注目を集めている。また、酵素反応に必要な高エネルギー化合物の循環的な供給を行うシステムの構築が期待できるため、バイオリアクター技術の汎用性を高め飛躍的な発展が望める。

本論文では工業的に応用可能なユニークな特性を持つ人工光合成システムの構築を目的とする。光合成タンパク質に反応の場を与える脂質二重膜(LUV)と、光合成明反応において光捕集と電荷分離を担う中心酵素である光捕集反応中心超分子複合体(LH1-RC)の機能・特性をそれぞれ詳細に検討し、これらを組み合わせて人工光合成システムの構築を目指す。

第 2 章 脂質二重膜を利用した電気化学ポテンシャルの評価法の確立

生体のエネルギー生産反応において、高エネルギー化合物アデノシン 3 リン酸 (ATP) 合成に先立ち、生体膜を介したイオン輸送が行われる。光合成反応では光照射により H^+ 輸送が誘起され、光合成膜内外に H^+ 濃度差に起因する電気化学ポテンシャルが形成される。この電気化学ポテンシャルを利用して、ATP 合成酵素により ATP を合成し種々の生体反応に使用する。本章では、多核種核磁気共鳴法(NMR)および蛍光法を用いて、LUV を介したイオン輸送を検出することで電気化学ポテンシャル形成の評価を行った。

大豆由来リン脂質を使用して逆相蒸発法により LUV を作成し超遠心分離で回収した後、異なる組成の溶液に再懸濁することにより LUV 内外を異なる溶液組成に変えた。 H^+ の濃度変化に高感度な ^{31}P

NMR により LUV 内外の H⁺輸送を評価した。コレステロールを添加した LUV では高い H⁺保持能力を有することを明らかにした。また、²³Na、³⁹K NMR とイオノフォアを組み合わせ、Na⁺および K⁺の LUV 内外の輸送を高精度で評価した (図 1)。一方、pH 感受性蛍光色素 2',7'-bis(carboxyethyl)-4 or 5-carboxyfluorescein (BCECF) とイオノフォア

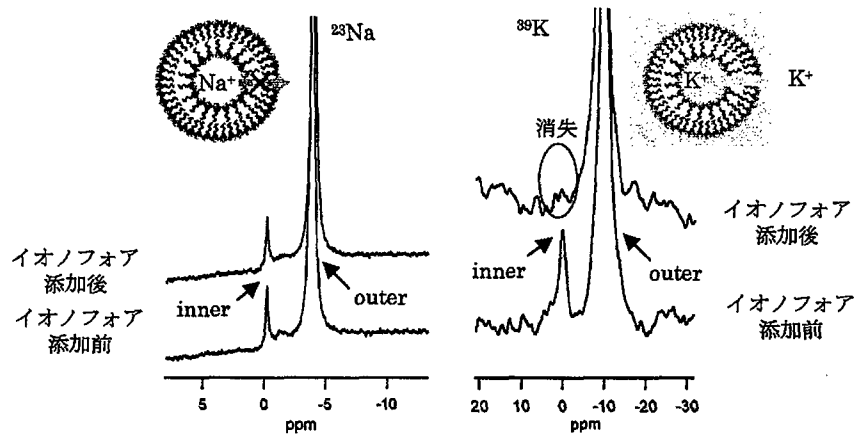


図 1. K⁺選択性イオノフォアによるイオン輸送の様子
²³Na NMR スペクトル(左)、³⁹K NMR スペクトル(右)
 イオノフォアの添加に伴い脂質二重膜内の K⁺を示すシグナルが消失し、イオン輸送が確認された

を組み合わせることで、少量の試料で簡単に LUV 内外の H⁺輸送を評価することができた。

以上のイオン種は電気化学ポテンシャルの形成において主要な役割を果たす。多核種 NMR によるイオン輸送の検出は高い定量性が得られるが、高濃度の試料が必要となる。一方、蛍光法によるイオン輸送の検出は微量の試料で簡単に評価できるが、定量性は多核種 NMR よりもやや劣る。それぞれに長所と短所を併せ持つが、これらを組み合わせることで互いの短所を補い合い正確な評価ができることを示した。イオン輸送に伴う電気化学ポテンシャル形成の評価法を確立した。

第 3 章 光捕集反応中心超分子複合体の高純度精製法の確立

本章では、耐熱性紅色硫黄光合成細菌 *Thermochromatium(Tch.) tepidum* 由来 LH1-RC の純度分析および高純度精製法を行った。*Tch. tepidum* は高い耐熱性を有していることから工業的な応用に適しているため、人工光合成膜に組み込む対象として選択した。また、LH1-RC はその構造・機能に未解明の領域が多く存在するため、立体構造解析が強く望まれている。LH1-RC の高純度精製は立体構造解析のために必須の条件である。

Tch. tepidum を超音波破碎することで作成した光合成膜顆粒を、界面活性剤である 1% n-octyl β-D-glucopyranoside(OG)溶液で処理することで LH1-RC を可溶化し、DEAE 陰イオン交換カラムにより LH1-RC の精製を行った。精製した LH1-RC を電気泳動法で純度分析し、2 種類の未知タンパク質の存在を確認した。ヘム染色、エドマン分解法、シヨ糖密度勾配法の結果から、これらのタンパク質は LH1-RC 構成要素ではないと判断した。精製に使用する溶液の pH および界面活性剤濃度をスクリーニングし、夾雑タンパク質の完全な除去を実現した (図 2)。LH1-RC の精製度を示す吸光度比 Ratio(A₉₁₅/A₂₈₀)は 2.31 に達し、高純度 LH1-RC の精製に成功した。LH1-RC の高純度精製法を確立した。

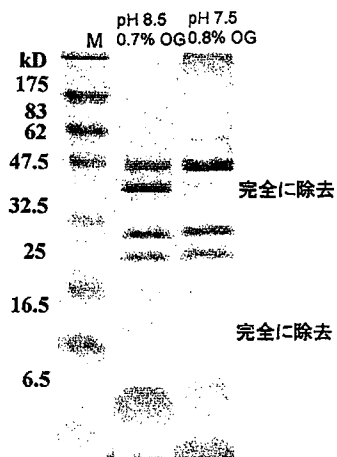


図 2. 精製した LH1-RC の SDS-PAGE
 (左) 分子量マーカー
 (中) 従来の精製法で精製した LH1-RC
 (右) 高純度精製した LH1-RC

第4章 立体構造解析に向けた光捕集反応中心超分子複合体の結晶化

タンパク質はその機能の多くを構造に依存する。タンパク質の持つ機能を高度利用するにはその構造に関する知見が必須となる。X線結晶構造解析は物質の原子的構造を知るための最も直接的な方法である。現在の生体高分子の確実な立体構造の情報はほとんどがX線結晶構造解析の結果に基づいている。しかし、生体の全構成タンパク質の1/3を占め、生命活動において非常に重要な役割を担っている膜タンパク質は、取り扱いおよび結晶化が困難であるため結晶構造解析が行われた報告は僅かしかない。本章では、*Tch. tepidum* 由来 LH1-RC の高分解能 X線結晶構造解析を目指し結晶化実験を行った。LH1-RC の高分解能 X線結晶構造解析は未だ報告例が無く、その立体構造の解明は生体エネルギー生産反応機構の解明に繋がることから高い関心を集めている。

OG 中で結晶化条件のスクリーニングを行い、polyethylene glycol(PEG)を沈殿剤とする条件で良質な結晶を得た(図3)。この結晶を SPring-8 BL38B1 で回折実験を行い、15Åの分解能の回折像を得た。膜タンパク質の結晶化では最適界面活性剤の選択が重要となる。6種類のマルトース系界面活性剤中で結晶化を行い、nonyl、decyl、および undecyl-β-D-maltopyranoside の3種類において PEG を沈殿剤とする条件で同様に結晶を得た。この結晶を回折実験することで、15Åの分解能の回折像を得た。

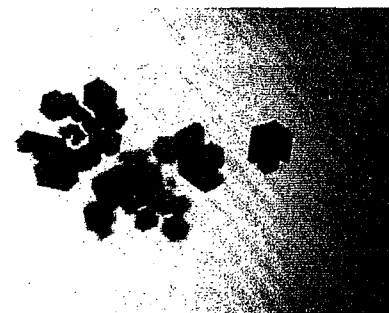


図3. OG 中での LH1-RC 結晶形成
Inner solution (8ml)
17mg/ml LH1-RC / 20mM Tris-HCl pH 8.5
150mM CaCl₂ / 12%(w/v) PEG1540
0.7% (w/v) OG / 1mM Ascorbic acid
Outer solution (1000ml)
300mM CaCl₂ / 20%(w/v) PEG1540

第5章 配向性制御による人工光合成システムの構築

膜タンパク質はその反応に方向性を持つ。生体膜上で膜タンパク質が正しく配向しないと共役反応は進行しない。LUV 上で光合成反応を実現するためには高い配向性で膜タンパク質を再構成する必要がある。本章では、LUV に LH1-RC を高い配向性で再構成することにより人工光合成システムの構築を試みた。

LUV に種々の濃度の界面活性剤を作用させ、その構造変化を 540nm の吸光度(濁度)で評価した。界面活性剤で構造変化を誘起した LUV に LH1-RC を添加し、界面活性剤のみを選択的に吸着するパイオビーズ SM-2 で処理することにより LUV に LH1-RC を再構成した。LUV の構造と LH1-RC の形状に注目し配向性を高めるための再構成条件を決めた。この試料を化学的に酸化還元処理し LH1-RC 内色素の酸化還元状態を分光学的手法に解析することで、LUV に再構成された LH1-RC の配向性評価を行った。LH1-RC が電子供与を担う C サブユニットを内側に向けた状態で配向性を揃えて再構成されていることが明らかとなった。LH1-RC の配向性制御に成功した。

第6章 総括

本章では、本論文を総括した。

論文審査結果の要旨

本学位論文は人工光合成システム構築を目指した光合成アンテナ・反応中心超分子複合体の構造解明と機能化に関する研究について述べたものである。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。生物系において太陽光を効率よく取り込んでいるアンテナ器官ならびに取り込んだエネルギーを電気化学的エネルギーに変換している反応中心は光エネルギーの有効活用を目指す人工光合成系の構築に欠かせない重要な構成要素である。本論文はこのような機能をはたしている色素・タンパク質錯体であるアンテナ・反応中心超分子複合体の構造解明と脂質膜（リポソーム）への組み込み、そして、機能化に際し必要とされる生体膜を介する電気化学ポテンシャルの計測法について研究した論文で、全6章から構成されている。

第1章は序論であり、本研究の背景および目的について述べている。

第2章は人工光合成システム構築に欠かすことの出来ない生体膜を境とする電気化学ポテンシャルの計測法について、脂質膜リポソームをモデルとして研究した過程を述べている。 ^{31}P 、 ^{23}Na 、 ^{39}K の核磁気共鳴スペクトルを利用する方法、そして蛍光色素を用いる方法を検討し、それらの長所短所を明らかにすることにより、実用にはそれらを適宜選択して用いるという評価法を提示することができた。

第3章では耐熱性の光合成細菌 *Thermochromatium tepidum* の膜内アンテナ (LH1) と光合成反応中心 (RC) の超分子複合体 (LH1-RC) のX線構造解析を目指した高純度精製法の研究について述べている。通常行われている精製法に加えて、デタージェントとpHの最適化を行うことにより、結晶化にたえうる高純度LH1-RCが精製可能であることを示した。

第4章は第3章で確立した高純度精製法を用いて *Thermochromatium tepidum* のLH1-RCを大量に精製し、それを用いたLH1-RCの結晶化とX線回折による評価結果について述べている。結晶化に用いるデタージェント、沈殿剤の種類、濃度を様々に変化させ結晶化を試みた。その結果、デタージェントとしてオクチル- β , D-グルコピラノサイド (OG)、n-Nonyl、n-Decyl、およびn-Undecyl- β , D-マルトピラノシドを用いた場合に結晶が得られることを示した。得られた結晶を用いての回折実験で現在15 Åの分解能まで得られていることが述べられている。

第5章では高純度精製した *Thermochromatium tepidum* 由来LH1-RCを脂質リポソームに再構成する方法と結果について述べている。デタージェントをOG、あるいはTritonX-100として、ポリスチレンビーズを用いるデタージェント除去法でLH1-RCの再構成に成功し、それが方向性を揃えて膜内配向していることが示され、人工光合成システム構築のための重要な成果を与えた。

第6章は以上を総括している。

以上要するに本論文では、人工光合成システムの構成要素としての光エネルギーの化学的エネルギー変換に必須な光捕集タンパク質と反応中心の超分子複合体 (LH1-RC) の高純度精製と結晶化、そして、リポソームへの配向を制御した組み込み法に関する成果をまとめた論文で、光合成膜タンパク質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。