

研究報告書

「光合成膜タンパク質集合系の機構解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 出羽 毅久

1. 研究のねらい

光合成の初期過程では、光捕集および電荷分離反応が高効率で行われている。この過程を正確に理解することにより、人工光合成系の構築のための重要な知見を得ることができる。光捕集および電荷分離は光合成膜中に埋め込まれた色素-タンパク質複合体により行われており、紅色光合成細菌では光捕集タンパク質(LH2, LH1)および反応中心複合体(RC)が光合成膜中で高密度に配置されているが、その集合構造と機能との相関については不明である。これを明らかにするために、光捕集・電荷分離システムを人工的に構築し、その集合構造と機能を調べる。本研究では、諸種の平面脂質二分子膜系を構築し、その膜中での LH2 および LH1-RC の集合構造を原子間力顕微鏡(AFM)により分子レベルで詳細に観察する。また、LH2 から LH1-RC へのエネルギー移動および光電流計測により、集合体の機能を調べ、集合構造-機能相関の解明を行う。本研究により、究極の物質変換システムである光合成メカニズムを理解し、分子集合系が関与する膜タンパク質(酸素発生系光合成膜タンパク質(PSI, PSII)、チャネル、受容体など)の分子レベルでの機構解明のプラットフォームの構築へと展開する。

2. 研究成果

(1) 概要

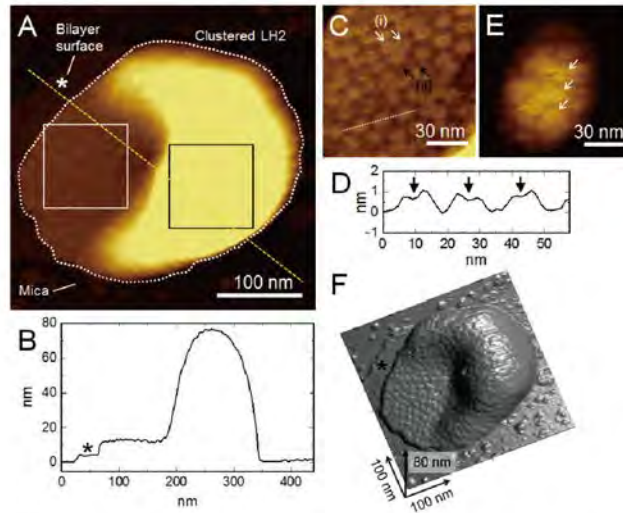
分子集合系を構築するために、(1)架橋反応による LH2 多量体の合成、(2)諸種の脂質二分子膜中での LH2 および LH1-RC の組織化を行い、集合構造と LH2 間のエネルギー移動効率との相関を明らかにした。(3)分子レベルでの LH1-RC の機能を評価するために、電流検出 AFM により、脂質二分子膜中で集合体形成した LH1-RC 分子の整流特性の検出に成功した。また、LH1-RC の光電流計測から、LH1-RC の配向と一致した光電流が観察された。(4)固体表面上に新規な手法による平面脂質二分子膜の形成に成功し、膜タンパク質(LH2/LH1-RC)集合系の機能解析のためのプラットフォームを作成した。

(2) 詳細

研究テーマ A「LH2・LH1-RC 分子集合体の形成とその機能評価」

【脂質二分子膜の効果】LH2 を諸種のリン脂質からなる脂質二分子膜中に再構成したところ、脂質種に依存した LH2 の集合構造が原子間力顕微鏡により観察された。ホスファチジルグリセロール(PG)膜中では、LH2 は単一分散あるいは2-4分子程度の小さなクラスターを形成する。ホスファチジルコリン(PC)膜中では、単一分散から密にクラスター化した状態まで不均一な分散状態となる。興味深いことに、光合成膜を模倣した脂質組成(PE/PG/CL)の膜中では、

LH2 の巨大なクラスター構造が観察された(図1)。LH2 を再構成した小胞(プロテオリポソーム)は、マイカ基板上で歪んだ小胞となって吸着する。高さプロファイル(B)より、LH2 を含まない脂質のみからなる二分子膜が最下層に存在することが分かる(*印)。その層の上に、LH2 が密に充填した層が形成されている(C)。タンパク質に富むこの層は非常に堅く、平面膜層からドーム型の膜層に続いている(C, E)。ドームの内



部は水層である。LH2 が密に充填した部分の AFM 像から、LH2 間距離(edge-to-edge)は約 2 nm であった(D)。この距離は、LH2 が直接接触して充填されているのではなく、脂質分子を介して集合していることを示している。このことから、LH2 の密な集合構造には脂質-タンパク質間相互作用が重要な役割を果たしていることが分かった。この相互作用にはリン脂質の PE または CL が寄与していると推察される。

上記 3 種類の膜系での蛍光寿命測定から、LH2 間のエネルギー移動に伴う早い蛍光減衰(励起一重項消滅)が認められた。そのエネルギー移動効率には PG < PC < PE/PG/CL となり、より大きなクラスターほどより高いエネルギー移動効率を示した。脂質膜中で脂質-タンパク質間相互作用の違いにより、LH2 の集合状態が変化し、これによりエネルギー移動効率が調節されていることを示唆した。以上の結果から、脂質依存的に LH2 の集合構造が形成され、脂質のみの領域と密に充填されたタンパク質領域が共存する天然の光合成膜類似構造をもつ再構成膜系を構築することができた。

【LH2 多量体の形成とエネルギー移動】LH2 の多量体形成を化学架橋により行ったところ、6-9量体の LH2 が得られた。この LH2 多量体の蛍光寿命を調べたところ、LH2 間のエネルギー移動に伴う早い蛍光減衰は観測されなかった。この多量体を PG 膜中に導入することにより、LH2 間のエネルギー移動が認められた。この結果より、LH2 間のエネルギー移動は、脂質膜環境下において促進されると推察された。

【LH2/LH1-RC 共存膜系での集合構造とエネルギー移動】

LH2 および LH1-RC の共存系を諸種の再構成膜を用いて行った。上述の LH2 単独系と同様に、PG 膜、PC 膜、PE/PG/CL 膜中での集合体構造を AFM により観察した(図2)。PG 膜中では、LH2 と LH1-RC はほぼ均一に膜中に分散した(A, B)。PC 膜(C)および PE/PG/CL 膜中(D,

E)中では、LH2とLH1-RCは密に集合した構造が見られた。PE/PG/CL 膜系では、巨大なクラスター構造が観察され、そのクラスター内でLH1-RC同士がペアリングして存在している。これは、天然の光合成膜系でも見られる構造である。

LH2 から LH1-RC へのエネルギー移動を定常蛍光測定から調べたところ、エネルギー移動効率は PG < PC, PE/PG/CL の順となり、クラスター化がエネルギー移動に顕著な影響を及ぼしていることが分かった。

研究テーマ B「電流検出 AFM による LH1-RC 集合体の分子レベルでの導電特性」

LH2/LH1-RC 分子集合体中での LH1-RC の機能を分子レベルで調べるこ

とは、集合体の構造-機能相関の解明において極めて重要である。ここでは、その第一段階として、脂質膜中で形成したLH1-RC集合体に対して、電流検出 AFM により、その導電特性を調べた。図 3A に計測の模式図を示す。膜中に再構成した LH1-RC は図のように配向していることが AFM 観察から明らかになっている。LH1-RC 集合体(図 B の島状部分)上の赤印部分に電極となるカンチレバーを置き、バイアス電圧を走引すると、図 C の赤線の I-V 曲線が得られ、整流特性が観察された。これは図 A において、電極基板からカンチレバー方向への電子の流れに対応し、反応中心 RC での電子移動の方向と一致する。また、カンチレバーと接触圧との関係についても詳細に調べ、タンパク質分子集合体の分子レベルでの機能評価への道を開いた。

電極上に脂質膜と共に組織化した LH1-RC の光電流発生を調べたところ、図 A に示す方向への光電流が認められ、吸収スペクトルと一致するアクションスペクトルが得られた。これより、LH1-RC は脂質膜中で安定に且つ分子配向して存在し、機能することが認められた。

研究テーマ C「膜タンパク質集合体機能解析のための新規な平面脂質二分子膜の作成」

固体平面上に膜タンパク質を組織化することにより、諸種の表面科学的手法による構造、機能解析が可能になる。脂質膜中に再構成された LH2 および LH1-RC の機能解析のための

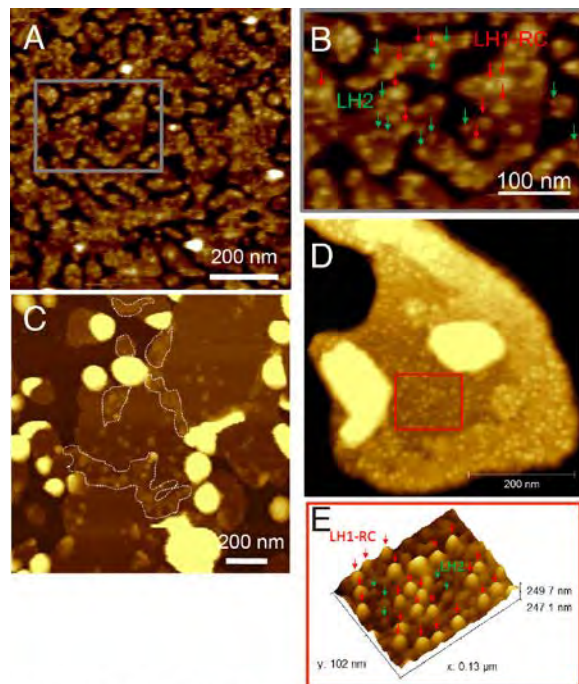


図2. 諸種の脂質膜(A, PG; C, PC; D, PE/PG/CL)中に再構成したLH2/LH1-RCの集合構造のAFM像。BとEはそれぞれAおよびDの拡大像。

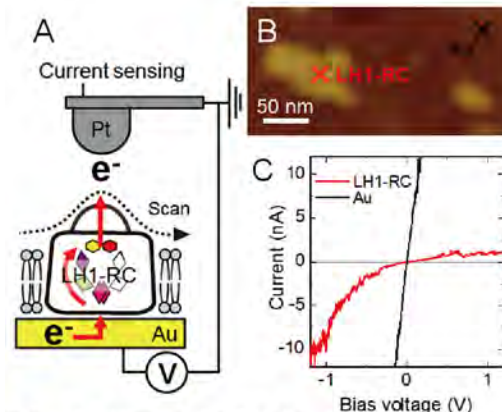


図3. (A) 電流検出 AFM による LH1-RC の導電性計測の模式図。(B) LH1-RC の再構成膜の Au- マイカ上での AFM 像。(C) LH1-RC の電流-電圧曲線。

新規な平面脂質二分子膜を開発した。

【脂質ドメイン中への LH2 および LH1-RC の選択的組織化】ある種の紅色光合成細菌では、LH2 と LH1-RC がそれぞれドメインを形成し存在していることが知られている。そこで、ここでは脂質が形成するドメインを利用し、ドメイン選択的に LH2 と LH1-RC を配置する手法を開発した。図 4 に示すように、カチオン化したカバーガラス(A)上に、アニオン性の脂質二分子膜をパッチ状に形成させる(B)。その後、LH2 を組み込んだカチオン性リポソームを作用させることにより、膜融合により脂質膜パッチに選択的に LH2 が導入される(C)。パッチの外部領域に対し、LH1-RC を組み込んだアニオン性リポソームを作用させると、LH2ドメインの外側に選択的にLH1-RCを含む平面脂質膜が形成された(D)。それぞれのプロセスは蛍光顕微鏡および AFM により確認した。ドメインサイズをナノレベルに制御することにより、天然の光合成膜類似の構造を有する人工膜の形成が期待出来る。

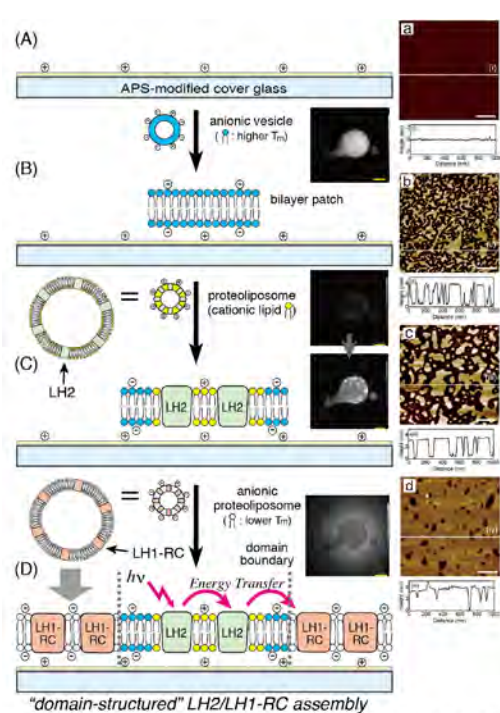


図4. ドメイン構造を有する LH2/LH1-RC 集合体の作成。ガラス基板上に、段階的に脂質膜と共にドメイン状に LH2 および LH1-RC を組織化できる。

【細胞膜と類似構造を有する繋ぎ止め平面脂質二分子膜の形成】膜タンパク質の大きな膜外ドメインは、固体表面との接触により機能を失うことが問題である。そこで、固体表面にアビジン分子を固定化し、その上に脂質二分子膜を形成させることにより、固体基板と膜外ドメインとの接触を回避することができた。図 5 にその模式図を示す。アビジン修飾基板上にピオチン化脂質を導入した LH2 および LH1-RC 含有リポソームを添加すると、基板上でリポソームがアビジン-ピオチン結合により繋ぎ止められる。その後、リポソーム同士を膜融合させることにより、基板上に繋ぎ止められた脂質二分子膜が形成する。膜外ドメインを有する LH1-RC は、基板と直接接することなく、側方拡散することが認められた。また、この膜中での LH2 から LH1-RC へのエネルギー移動も認められた。

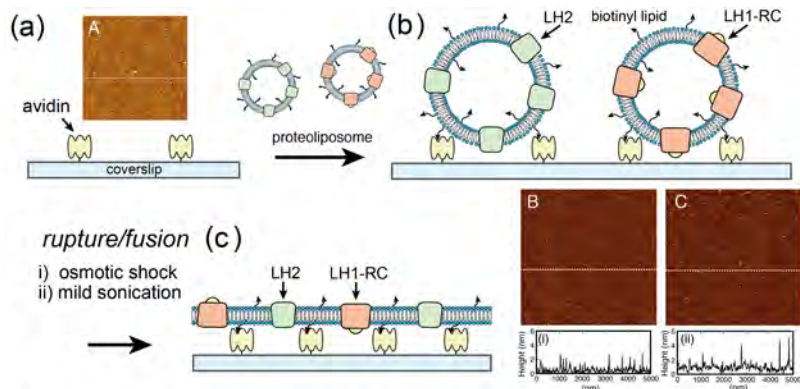


図5. 光合成膜タンパク質(LH2, LH1-RC)を含む繋ぎ止め脂質二分子膜の形成。ガラス基板と二分子膜間に約5nmの空間があり、生体膜類似の構造をもつ膜の形成に成功した。

3. 今後の展開

LH2/LH1-RC 集合系の最も興味深い点は光捕集から電荷分離のプロセスにおいて集合構造がどのように寄与しているかである。電流検出 AFM や光電流計測により、集光から電荷分離

の機能解析を行うことにより、天然の集合系の分子レベルでの機構解明に切り込めると期待出来る。また、高等植物系の光合成タンパク質(光化学系 II/光化学系 I)に対しても再構成法を用いて、集合構造と機能との相関の解明に繋げたい。得られた知見を元に、無機材料とのハイブリッド化による機能材料の創製に展開したい。

4. 自己評価

さきがけ研究期間では LH2 あるいは LH1-RC 単独系での構造体の構築と機能評価を重点的に行い、分子レベルでの集合構造と機能との関係に切り込むことができた。LH2/LH1-RC 集合系の最も興味深い「集光から電荷分離までのプロセス」の検討は今後の課題となった。

5. 研究総括の見解

人工光合成の研究展開において、「光合成の不思議」を1)理解し、2)学び、真似ながら、3)自然を超える、という研究姿勢、アプローチは肝要なものである。出羽博士は、天然の光合成反応の最も重要な機能である光捕集→電荷分離に焦点を当て、光捕集系II(LH II), 光捕集系 I (LHI)―反応中心(RC)を細胞外にいったん分離し、人工的な再構成により機能発現に相互がどのように連携寄与するかに切り込もうとする意欲的な研究提案をし採択された。研究開始直後は若干の誘導期間があったが、困難を解決しながらLHII単独系でリン脂質膜中に固定化することに成功し、エネルギー伝達について興味深い知見を得ている。また、LHII、LHI-RC 共存系でもリン脂質膜中への固定化に成功し、それぞれの集合状況、エネルギー伝達挙動を観測することを可能にしている。電流検出AFMでRC系での光電流検出にも挑戦した。さらに進んでは、できるだけ天然系に近い系を再構成する試料調整法の開発に挑戦し、LHII、LH I-RC 相互の光捕集、エネルギー伝達挙動の観察が可能になる人工膜合成への手掛かりを得ている。さきがけ 3年間で必ずしも所期の提案計画通りの目的達成までには至っていないが、多くの未知への挑戦を行い、困難を克服しながら今後の研究展開への着実な手掛かりを得たことは評価される。今後の一層の研究進展を期待したい。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. A. Sumino, T. Dewa, N. Sasaki, M. Kondo, M. Nango “Electron Conduction and Photocurrent Generation of a Light-Harvesting/Reaction Center Core Complex in Lipid Membrane Environments” *J. Phys. Chem. Lett.* 2013, 4, 1087–1092.
2. T. Dewa, A. Sumino, N. Watanabe, T. Noji, M. Nango “Energy Transfer and Clustering of Photosynthetic Light-Harvesting Complexes in Reconstituted Lipid Membranes” *Chemical Physics*, 2013 in press
3. A. Sumino, T. Sumikama, M. Iwamoto, T. Dewa, S. Oiki “The Open Gate Structure of the Membrane-Embedded KcsA Potassium Channel Viewed From the Cytoplasmic Side” *Scientific Reports* 2013, 3: 1063 | DOI: 10.1038/srep01063
4. A. Sumino, T. Dewa, T. Takeuchi, R. Sugiura, N. Sasaki, N. Misawa, R. Tero, T. Urisu, A. T. Gardiner, R. J. Cogdell, H. Hashimoto, M. Nango “Construction and Structural Analysis of

Tethered Lipid Bilayer Containing Photosynthetic Antenna Proteins for Functional Analysis”
Biomacromolecules, 2011, 12, 2850–2858.

5. A. Sumino, T. Dewa, M. Kondo, T. Morii, H. Hashimoto, A. T. Gardiner, R. J. Cogdell, M. Nango “Selective Assembly of Photosynthetic Antenna Proteins into a Domain-Structured Lipid Bilayer for the Construction of Artificial Photosynthetic Antenna Systems: Structural Analysis of the Assembly using Surface Plasmon Resonance and Atomic Force Microscopy”
Langmuir, 2011, 27, 1092–1099.

(2)特許出願

特になし。

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際会議

AFM Observation of Self-Assembled Nanostructure of Light-Harvesting Membrane Proteins in Artificial Lipid Bilayers, T. Dewa, A. Sumino, Y. Nakano, T. Noji, and M. Nango
3rd Kanazawa Bio-AFM Workshop November 5 – 8, 2012, Kanazawa, Japan

Construction of Supramolecular Assembly of Photosynthetic Antenna Proteins in Lipid Bilayers: AFM Observation, Energy Transfer, and Photocurrent Generation., Takehisa Dewa
Engineering Lipid Bilayers, Weetwood Hall, Leeds (UK) Sept6–9 (2012) Invited

サイエンスカフェ

「光合成で協力して働く分子たち ~ソリストな分子とオーケストラな分子たち~」

平成22年3月18日(木)サイエンスカフェ・ガリレオ・ガリレイ 名古屋ルーセントタワー1F

総説

光合成アンテナ膜タンパク質の集合構造と機能, 出羽毅久, *Membrane*, 2013, 38, 70–75.