

# 研究報告書

## 「光合成タンパク質における規則的ナノ空隙群の創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成26年10月～平成30年3月

研究者: 佐賀 佳央

### 1. 研究のねらい

光合成は天然の優れた太陽光エネルギー変換システムであり、地球規模でのエネルギー・物質変換において重要な役割を果たしている。この光合成の初期過程では、光機能性色素分子を結合している光捕集アンテナタンパク質が太陽光エネルギーを吸収し、電荷分離を行う反応中心タンパク質に励起エネルギーを伝達する。これらの光合成アンテナタンパク質の優れた光エネルギー捕集・伝達機能の分子的基盤は、クロロフィルなどの光機能性色素分子がタンパク質マトリックス中に保持され精密に配列し連携した色素集積構造である。このような光合成タンパク質の構築原理を理解し活用することは、人工的に太陽光変換デバイスを構築するうえで有用と考えられる。

本研究では、光合成の高効率の太陽光エネルギー変換の分子基盤である、色素分子がタンパク質に埋め込まれ空間的に精密に配置した色素集積構造に着目した。このような秩序だった色素配列構造を有する光合成タンパク質から一部の色素を選択的に脱離させることが可能となれば、タンパク質内に秩序だって配列し機能的に連携したナノ空隙群を創出することが期待できる。また、これらのナノ空隙群は、タンパク質中に残存する光機能性色素と近接し機能的に密接にリンクしているため、ナノ空隙と残存色素を機能的に連携させることが可能である。したがって、光合成タンパク質のナノ空隙は、機能性物質の導入や適切な空隙の修飾によって高効率な光捕集・光化学反応場や高選択的センシングのための場に応用できると考えられる。そこで、対称性の高い光合成タンパク質からの色素の選択的脱離によって規則的に配列したユニークなナノ空隙群を創り出す技術を開発することを最初のねらいとした。また、光合成タンパク質に創りだした規則的ナノ空隙群を利活用した新機能創成もねらいとした。これらによって、光合成タンパク質の主役である光機能性色素を外すという独自性の高いコンセプトによる新たな空間創成と機能開拓を目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、対称性の高い光合成タンパク質として、紅色光合成細菌の光捕集タンパク質 LH2 をターゲットに設定した。LH2 タンパク質は、膜貫通ペプチドが環状に配置している美しい構造をとっている。光機能性色素であるバクテリオクロロフィル (BChl) a がこれらのペプチドに支えられて配列している (図 1)。LH2 タンパク質内部では BChl a は 2 種類の状態で存在しており、最長波長吸収帯 (Q<sub>y</sub> 吸収帯) の位置が異なる。この 2 種類の BChl a のうち、Q<sub>y</sub> 吸収帯を 800 nm 付近に示す BChl a は B800 BChl a、Q<sub>y</sub> 吸収帯を 850 nm 付近に示す BChl a は B850 BChl a と呼ばれている。B800 BChl a は

タンパク質内部で単量体の状態で存在しているのに対して、B850 BChl *a* はひとつのユニット内で 2 量体を形成している。LH2 タンパク質の内部では、B800 BChl *a* から B850 BChl *a* に高速かつ高効率の励起エネルギー移動が起こる。

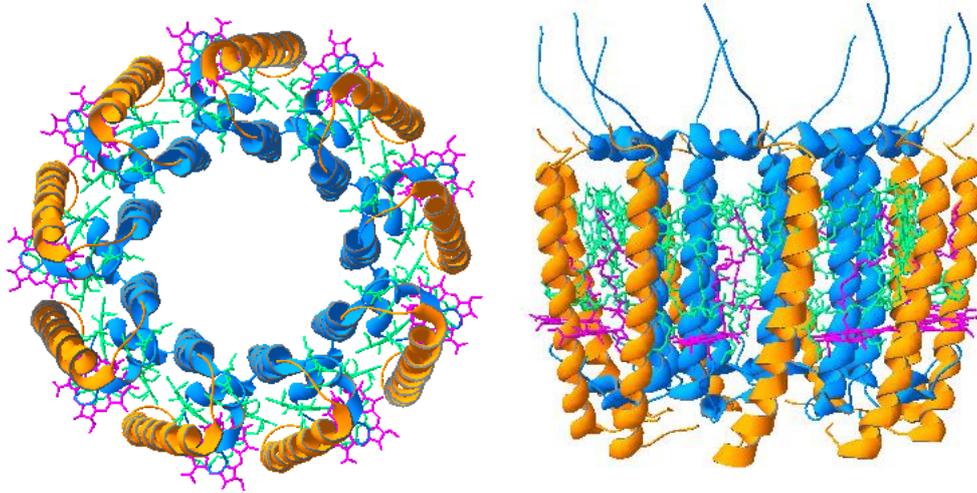


図 1. 紅色光合成細菌の光捕集タンパク質 LH2 の構造. 左：光合成膜の上から見た構造. 右：光合成膜の横から見た構造. 青とオレンジが膜貫通ペプチド、マゼンダが B800 BChl *a*、緑が B850 BChl *a* である。

本研究では、LH2 タンパク質からの B800 BChl *a* の脱離によるナノ空隙群の創成法(図 2) を、構造解明されている 2 種類の紅色光合成細菌に由来する LH2 タンパク質で確立するとともに、これら 2 種類の LH2 タンパク質では B800 BChl *a* の脱離挙動が大きく異なることを明らかにした。また、ナノ空隙群を有する LH2 タンパク質の構造と物性を明らかにすることに成功した。

また、B800 BChl *a* を脱離させることで生じるナノ空隙群を利用した LH2 タンパク質の機能化として、太陽光で最も光子数が多い波長領域にも関わらず LH2 タンパク質が吸収できない赤色光を捕集できるような機能改変を目指した。その結果、LH2 タンパク質へのナノ空隙群へ酸素発生型光合成生物の主要色素であるクロロフィル類を導入することに成功するとともに、得られたタンパク質の構造と物性に関する情報を得た。

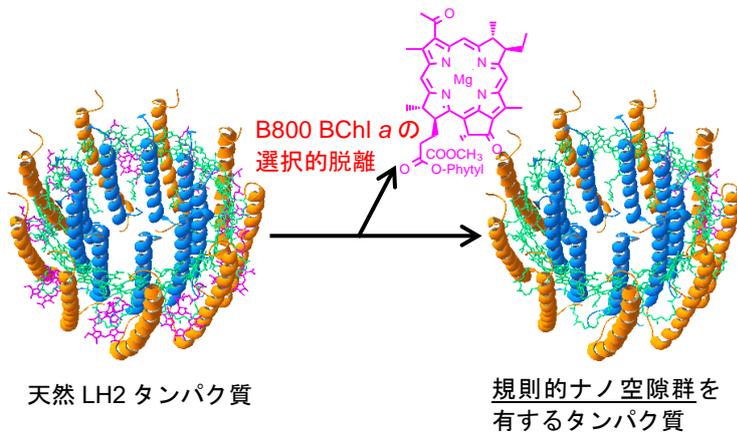


図 2. 本研究における、B800 BChl *a* の選択的脱離による規則的ナノ空隙群の創成の模式図。

## (2) 詳細

### 「LH2 タンパク質からの色素の選択的脱離によるナノ空隙群の創成とキャラクタリゼーション」

LH2 タンパク質の構造を基盤としたナノ空隙群の創成には、B800 BChl *a* を選択的に脱離させる方法論の確立、および B800 BChl *a* を脱離させたタンパク質の構造と物性の解明が重要である。そこで、現在、立体構造が解明されている 2 種類の紅色光合成細菌 *Rhodoblastus (Rbl.) acidophilus* と *Phaeospirillum (Phs.) molischianum* から単離精製した LH2 タンパク質 (論文 3) を対象として研究を推進した。構造が原子分解能レベルで明確なこの 2 種類のタンパク質は LH2 タンパク質の代表的存在であり、その他の LH2 タンパク質はこの 2 種類の LH2 タンパク質のどちらかに特徴が類似していることが報告されているため、この 2 種類のタンパク質について B800 BChl *a* 脱離を達成し得られたタンパク質の構造・物性を明らかにすることは本研究のコンセプトを確立するうえで重要である。本研究では、両方の LH2 タンパク質について B800 BChl *a* を選択的に脱離させる方法論を確立した (論文 2、および論文投稿準備中)。また、得られた B800 脱離タンパク質、および色素脱離によって生じたナノ空隙群へ別途調製した BChl *a* を挿入して得た再構成タンパク質の物性解析を行い、スペクトル特性と全体構造の特徴、および可逆的変化を明らかにした。

これら 2 種類の LH2 タンパク質から B800 BChl *a* を脱離させても、残存する B850 BChl *a* の局所構造や膜貫通ペプチドの $\alpha$ -ヘリックス含量は変化しないことを明らかにした。また、B800 脱離 LH2 タンパク質の原子間力顕微鏡 (AFM) 計測に成功し、タンパク質の環状配列構造は変化しないことを明らかにした (図 3)。これらの結果から、B800 BChl *a* の脱離は LH2 タンパク質構造を大きく崩すことはなく、また生じたナノ空隙群は外部の BChl *a* を容易に取り込める柔らかな空間であることが示された。このようなナノ空隙群の物性の観点から、紅色光合成細菌の光捕集タンパク質の進化に関する考察も行った。

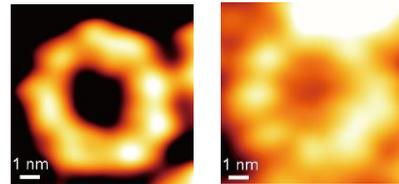


図 3. *Rbl. acidophilus* 由来の天然 LH2 タンパク質 (左) と B800 脱離 LH2 タンパク質 (右) の AFM 像。

また、本研究で対象とした 2 種類の紅色光合成細菌 *Rbl. acidophilus* と *Phs. molischianum* に由来する LH2 タンパク質では、B800 BChl *a* の脱離挙動が大きく異なることを明らかにした。この B800 BChl *a* の脱離挙動の相違について、B800 結合部位周辺 (図 4) の構造的観点からの考察を行った。

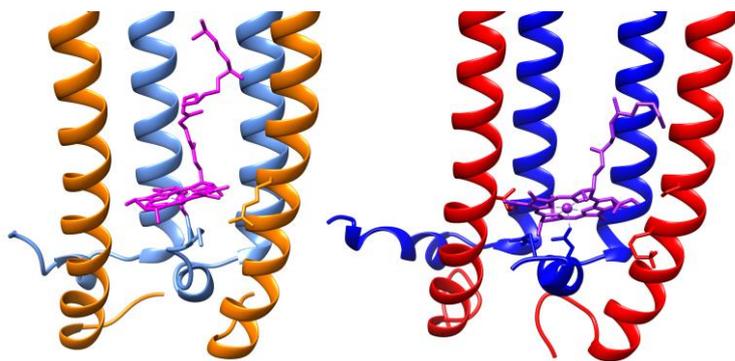


図 4. *Rbl. acidophilus* 由来の LH2 タンパク質 (左) と *Phs. molischianum* 由来の LH2 タンパク質 (右) の B800 BChl *a* (マゼンタと紫) の結合部位周辺の構造。

「LH2 タンパク質のナノ空隙群への異種色素導入による機能化」

LH2 タンパク質は、太陽光で最もフォトン数が多い赤色光を吸収することができない (図 5)。この Red Gap を埋め、赤色光を効率よく捕集することは太陽光エネルギーの有効利用に資する。そこで、LH2 タンパク質に創りだしたナノ空隙群へ、植物などの酸素発生型光合成生物が用いているクロロフィル類を導入し、捕集可能な波長領域の改変を実現した。クロロフィル類は、LH2 タンパク質が本来有している BChl a とはテトラピロール環骨格が異なり、赤色光領域に強い吸収帯を有する。本研究では、クロロフィル類を LH2 タンパク質のナノ空隙群に導入する方法論を確立し、それらの色素の導入効率を明らかにするとともに、クロロフィル類を導入したタンパク質の物性を解析した。

LH2 タンパク質に導入した天然産クロロフィル類として、高等植物の主要色素であるクロロフィル (Chl) a と特殊なシアノバクテリアが保持している Chl d を用いた (図 6)。また、タンパク質部分との相互作用を統一してテトラピロール環構造の影響を明確にするため、3 位置換基が BChl a と同じアセチル基である 3-アセチル Chl a を BChl a の酸化によって調製し用いた (図 6)。これらのクロロフィル類を LH2 タンパク質のナノ空隙群に導入することに成功し、赤色光を吸収して残存する B850 BChl a にそのエネルギーを受け渡すことが可能であることを示した。これらの色素の導入によってタンパク質構造には変化がないことをあわせて示した。また、Chl a の 13<sup>2</sup> 位のメトキシカルボニル基が欠損した誘導体 (ピロクロロフィル (pyroChl) a) を別途調製し、B800 脱離 LH2 タンパク質への再構成挙動を調べたところ、pyroChl a もナノ空隙群に導入はされるが、導入量は Chl a よりも少なく、このメトキシカルボニル基が B800 BChl a の脱離で生じたナノ空隙群への親和性に影響を与える可能性が示された (論文 1)。バクテリア型の LH2 タンパク質に植物型の色素が導入可能であることが示されたことから、非酸素発生型から酸素発生型への光合成進化の過程で起こったと考えられる色素構造の変化をバクテリア型タンパク質が許容できる

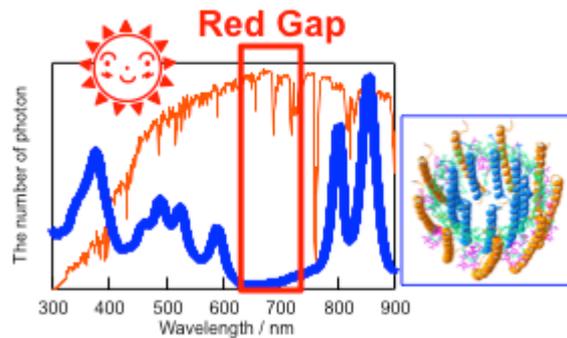


図 5. 地表に到達する太陽光スペクトル (オレンジ) と LH2 タンパク質の吸収スペクトル (青) .

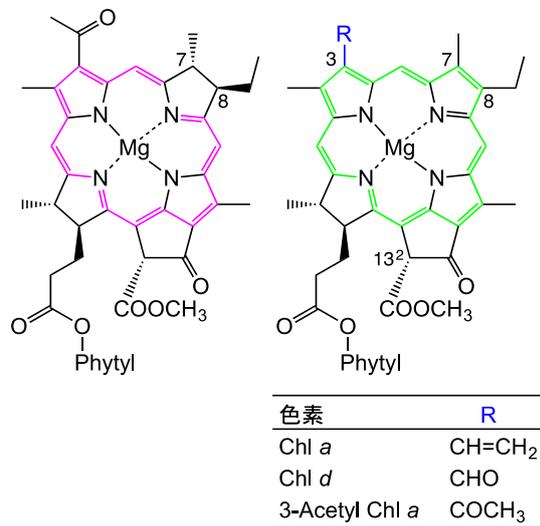


図 6. LH2 タンパク質が本来保持している BChl a (左) と LH2 タンパク質に導入可能であったクロロフィル類 (右) の分子構造. BChl a は 7 位と 8 位の間が単結合であるのに対して、クロロフィル類はその部分が 2 重結合である.

ことが示唆された。

### 3. 今後の展開

本研究において、光合成タンパク質からの色素脱離によるナノ空隙群の創成という独自性の高いコンセプトと技術の確立に成功した。今後は、ナノ空隙群への機能性物質の導入による太陽光利用システムや新規光学素子、生体機能制御・センシングのナノバイオ材料の構築へ目指すとともに、空間的概念を導入した光合成色素タンパク質の構築原理の解明へと展開する。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究において、光合成タンパク質からの色素脱離によってナノ空隙群を創りだすことに成功し、得られたタンパク質の構造・機能を明らかにした。また、ナノ空隙群へ本来の色素とは分子構造と分光特性が異なる異種色素を導入することで、光合成タンパク質の光捕集機能を改変することに成功した。したがって、光合成タンパク質構造を基盤とした規則的ナノ空隙群の創成に関するボトムアップ型テクノロジーの基礎を確立できたと考える。これらの成果は、光合成科学やタンパク質科学の発展に寄与しうるため、当該分野への波及効果はあると考える。しかしながら、本研究で創成したユニークなナノ空隙群の特徴を生かすことができる機能の絞りこみが遅れたことから、本研究での機能開拓は不十分だったと考える。

領域会議で研究総括、アドバイザー、およびさがけ研究者から頂いたご意見は、本研究の推進にたいへん有用であった。とくに、領域会議を含めた議論から、同じ領域に所属する浅川雅研究者（2期生）との共同研究が生まれ、ナノ空隙群を有するLH2タンパク質の高分解能AFM計測に成功し、研究の質の向上につながった。この共同研究は追加支援を受けることができ、本研究を加速させる効果があった。また、本研究実施期間の後半では、さがけの他領域の研究者との共同研究が生まれたことも、本研究を推進するうえで有益であった。

今後は、光合成タンパク質に創成した規則的ナノ空隙群の特徴を生かした光エネルギー捕集材料や新規光学素子、生体機能制御・センシングのナノ材料などの新たな機能開拓を推進し、将来的には社会的に有用な科学技術の発展への貢献を目指す必要があると考える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

光合成タンパク質からの色素脱離がもたらすユニークな空間創製を達成しましたが、その

空間を活用する機能創成については、今一步のところだと思えます。しかし、異なる複数の分光特性を有する色素の導入に成功し、新たな光合成系への展開の手がかりを見いだした点は大きく評価できます。この概念の一般化により、様々な色素導入が可能となれば、タンパク質を基盤とした機能性材料の開拓に繋がるものと期待されます。

研究の進め方については、さきがけ研究者との共同研究によるタンパク質環状構造の可視化など有用な情報獲得につながり、また、領域アドバイザーで構成するバーチャルラボを活用して目標の達成に繋げることができました。論文や学会発表にも積極的に取り組んでいる点も評価に値します。

人工色素の導入によるハイブリッド材料の創製に関わる基礎研究であることを考えると、社会・経済への波及には時間を要することが予測されます。しかしながら、研究成果をシステムに組み込み、具体的な機能を示すことができれば、社会へのインパクトは大きいと思えます。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Y. Saga, K. Amari, K. Miyagi, Insertion of Chlorophyll *a* Derivatives into the Binding Sites of B800 Bacteriochlorophyll *a* in Light-Harvesting Complex 2 of the Purple Photosynthetic Bacterium *Rhodoblastus acidophilus*, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **353**, 591–596 (2018).
2. Y. Saga, K. Hirota, H. Asakawa, K. Takao, T. Fukuma, Reversible Changes in the Structural Features of Photosynthetic Light-harvesting Complex 2 by Removal and Reconstitution of B800 Bacteriochlorophyll *a* Pigments, *Biochemistry* **56**, 3484–3491 (2017).
3. Y. Saga, K. Hirota, Determination of the Molar Extinction Coefficients of the B800 and B850 Absorption Bands in Light-Harvesting Complexes 2 Derived from Three Purple Photosynthetic Bacteria *Rhodoblastus acidophilus*, *Rhodobacter sphaeroides*, and *Phaeospirillum molischianum* by Extraction of Bacteriochlorophyll *a*, *Anal. Sci.* **32**, 801–804 (2016).
4. Y. Saga, K. Hirota, J. Harada, H. Tamiaki  
*In vitro* Enzymatic Activities of Bacteriochlorophyll *a* Synthase Derived from the Green Sulfur Photosynthetic Bacterium *Chlorobaculum tepidum*, *Biochemistry* **54**, 4998–5005 (2015).

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (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)

1. 佐賀佳央, 光合成タンパク質からの色素脱離による機能開拓, 光化学 48, 166-169 (2017). [著作物]
2. 佐賀佳央, 光合成タンパク質の色素集積構造を利用した機能開拓, 日本化学会第 11 回東海支部若手研究者フォーラム, 名古屋 (2017). [依頼講演]
3. Y. Saga, K. Hirota, Removal of B800 Bacteriochlorophyll *a* from Structure-Determined Light-Harvesting Proteins 2 in Purple Photosynthetic Bacteria, Biophysical Society 62th Annual Meeting, San Francisco, USA (2018). [学会発表]
4. Y. Saga, K. Hirota, K. Miyagi, H. Asakawa, Spectroscopic and Structural Features of the Light-Harvesting Complexes 2 in Purple Photosynthetic Bacteria Induced by Removal of B800 Bacteriochlorophyll *a*, 13th International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors of Photosynthetic Organisms, Chicago, USA (2017). [学会発表]
5. 佐賀佳央, 甘利健太, 宮城貫志, 廣田圭耶, 浅川雅, 紅色光合成細菌の光捕集タンパク質 LH2 からの色素脱離によって生成した空隙群へのクロロフィル誘導体の挿入, 第 15 回ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム, 草津 (2017). [学会発表]