

## 光合成細菌を利用する研究の今後を考える<sup>‡</sup>

首都大学東京 名誉教授  
嶋田 敬三\*

### 1. はじめに

光合成研究において光合成細菌は C.B. van Niel が光合成の一般式  $\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{A} \rightarrow (\text{CH}_2\text{O}) + \text{H}_2\text{O} + 2\text{A}$  を示すきっかけとなった実験をはじめとして、L. M. N. Duysens の光合成初発反応におけるクロロフィルの光酸化を示した実験、そして酸素発生型光合成生物よりかなり先じた反応中心タンパクの単離、構造決定というように、要所要所で光合成研究材料として重要な役割を果たしてきた。その後の酸素発生型光合成生物の反応中心構造決定により、すべての（狭義の）光合成生物の反応中心の基本的構造の共通性が示され、生物の行う光合成の際立った特徴である高効率の電荷分離反応の原理はすべての光合成生物に共通であろうという認識を与えた。すなわち、いまだ解決されたとは言いがたい電荷分離反応の効率の高さの理由を研究する材料として光合成細菌は依然有力な材料であると言える。さらに、やはり十分に解決されたとは言いがたい光捕集系における励起エネルギー転移機構の研究材料としても色素の存在状態が酸素発生型光合成生物ほど多様でない光合成細菌の利用は有効であるに違いない。

本稿ではこれらの光合成に関わる未解決問題への手がかりとなり得るような光合成細菌を材料とする研究課題を二つばかり紹介したいと思う。

### 2. 反応中心結合型チトクロム

光合成細菌を使った光合成機構の研究は、最初に反応中心結晶構造が決められた *Blastochloris viridis* を除いては、おおむね形質転換系の確立した *Rhodobacter* 属 (*Rba. sphaeroides*, *Rba. capsulatus*) を用いて研究が進められてきた。しかし近年、光合成細菌の光合成電子伝達系はかなり多様であり *Rhodobacter* 属のみを研

究材料とするのはやや問題があることが認識されてきた。そのひとつの例として反応中心結合型チトクロムの問題がある。ゲノム情報を含めて多くの光合成細菌の反応中心に関する情報が増えつつあるが、それによれば *Rhodobacter* 属のように反応中心結合型チトクロムを持たない種はむしろ少数派で、多くの種が反応中心複合体のサブユニットとしてヘム *c* を4つ持つチトクロムを持つことが解ってきた<sup>1)</sup>。反応中心結合型チトクロムを持たない種は紅色光合成細菌のうち通性嫌気性のものとプロテオバクテリア  $\alpha$ -4 サブクラスの好気性光合成細菌の中のみ見出されており、ほぼすべての嫌気性光合成細菌は反応中心に結合した4ヘム型チトクロムサブユニットを持ち、通性嫌気性や好気性の光合成細菌でも反応中心にチトクロムサブユニットを持つ種は少なくない（表1）。反応中心チトクロムサブユニットを持たない種が系統的にまとまっていないことから、少なくとも紅色光合成細菌反応中心の原型はチトクロムサブユニットを持ち、その中から酸素に適応したいくつかの種がそれぞれ独立にチトクロムサブユニットを欠失させたと考えられている。

このように、4ヘム型チトクロムサブユニットは光合成細菌に一般的に見られるものであるが、その存在意義は未だに判然としていない。すなわち、電荷分離後の反応中心スペシャルペアカチオンへの電子供与体としてスペシャルペアの近傍に高電位（中点電位 +250~400 mV 程度）のヘム *c* が存在すること自体は電荷再結合反応防止という意味で合理的であるが、なぜ4つもヘムが必要なのか、さらにこの4ヘムの中に必ず中点電位 -100~+100 mV 程度の低電位のヘムが含まれている意味が不明なのである。多くの場合これら4つのヘム *c* はスペシャルペア側から高電位、低電

<sup>‡</sup> 解説特集「光合成細菌 —研究材料としての魅力—」

\* 連絡先 E-mail: shimada-keizo@tmu.ac.jp

表1 代表的な光合成細菌の電子伝達タンパク

分類群	種名	酸素依存性	チトクロムサブユニット	電子供与体 (候補)
プロテオバクテリア				
α-1	<i>Pheospirillum molischianum</i>	嫌気性	4ヘム型	cyt c <sub>2</sub>
	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	通性	なし	cyt c <sub>2</sub>
	<i>Acidiphilium rubrum</i>	好気性	4ヘム型	?
α-2	<i>Rhodobium marinum</i>	通性	4ヘム型	HiPIP*, cyt c <sub>2</sub>
	<i>Blastochloris viridis</i>	嫌気性	4ヘム型	cyt c <sub>2</sub>
	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	通性	なし	cyt c <sub>2</sub>
α-3	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	通性	なし	cyt c <sub>2</sub>
	<i>Rhodovulum sulfidophilum</i>	通性	3ヘム型	cyt c <sub>2m</sub> , cyt c <sub>2</sub>
	<i>Roseobacter denitrificans</i>	好気性	4ヘム型	cyt c <sub>2</sub>
α-4	<i>Erythrobacter longus</i>	好気性	なし	cyt c <sub>549</sub> /cyt c <sub>550</sub>
β	<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	通性	4ヘム型	HiPIP, cyt c <sub>8</sub>
	<i>Rhodocyclus tenuis</i>	嫌気性	4ヘム型	HiPIP, cyt c <sub>8</sub>
γ	<i>Allochromatium vinosum</i>	嫌気性	4ヘム型	HiPIP, cyt c <sub>8</sub>
	<i>Thermochromatium tepidum</i>	嫌気性	4ヘム型	HiPIP, cyt c <sub>8</sub>
	<i>Ectothiorhodospira shaposinikovii</i>	嫌気性	4ヘム型	HiPIP
<i>Chloroflexi</i>	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	通性	4ヘム型	auracyanin

\*High Potential Iron-Sulfur Protein

位、高電位、低電位の順で配置されており (図1)、表面荷電アミノ酸残基の置換実験よりスペシャルペアから最も遠い低電位のヘムに可溶性C型チトクロムや高電位鉄イオウタンパク (HiPIP) などの電子伝達体からの電子が渡されることが示されている。したがって、電子は高電位可溶性電子伝達体 → 低電位ヘム → 高電位ヘム → 低電位ヘム → 高電位ヘム → スペシャルペアと移動すると考えられるが、この流れの中には2ヶ所も最大 300 mV 以上の電位に逆らう up-hill の過程が含まれることになる<sup>1)</sup>。

我々はこの4ヘムサブユニットの存在と構成の意義を明らかにすることは、光合成を含めた電子伝達システムの原理にも迫ることになると考え、好気培養が可能な *Rubrivivax gelatinosus* をプラットフォームとして、構造が解明されている *Blastochloris viridis* 反応中心結合型チトクロムの4つのヘムそれぞれの酸化還元中点電位を周辺アミノ酸残基の置換により変動させ、電子伝達速度に対する影響を見ているが、まだ低電位ヘムの存在意義は十分説明できるには至っていない<sup>2)</sup>。ひとつの手がかりとして、*Rhodobacter* 属に近縁で海洋性の *Rhodovulum* 属ではこの反応中心チトクロムサブユニットが4ヘム型ではなく、3ヘム型であるという事実がある。*Rhodovulum* 属の反応中心チトクロムサブユニットではスペシャルペア側から高電位、低電位というところまでは4ヘム型と同じである

が、3番目は高電位ではなく極端な低電位のヘムcで、さらに4ヘム型で可溶性電子伝達体からの電子の直接の受容体である4番目のヘムは欠失している。この3ヘム型反応中心は *Rhodovulum* 属に共通であるが、これが電子伝達体からどのように電子を受容しているか興味のあるところである。*Rhodovulum* 属の代表種である *Rhodovulum sulfidophilum* ではチトクロムc<sub>2</sub>も反応中心チトクロムサブユニットへの電子供与体として機能しうるが、むしろ我々がチトクロムc<sub>2m</sub>と呼んでいる膜結合型のチトクロムが主な電子供与体と思われる<sup>3)</sup>。このチトクロムc<sub>2m</sub>はN末端に膜貫通ヘリックスを一本持ちC末端側にチトクロムc<sub>2</sub>に相同なチトクロムドメインを持つが、特徴的なのはこの間のプロリン-グルタミン酸-アラニンに富むかなり長いスパーサー部分で、その長さの意味はまだ解っていない。

以上のように反応中心結合型チトクロムとその周辺の電子伝達系に関わる研究分野は電子伝達系そのものの本質的理解に対して多くのヒントを与える興味ある分野であると我々は考えている。

### 3. 細胞内膜の形態と構造

光合成細菌は光合成条件下で特徴的な細胞内膜 (intracytoplasmic membrane) を形成する種が多い。*Rhodobacter* 属や多くのγ-プロテオバクテリア光合成細菌 (紅色イオウ細菌) の持つ小胞状のクロマトフォア

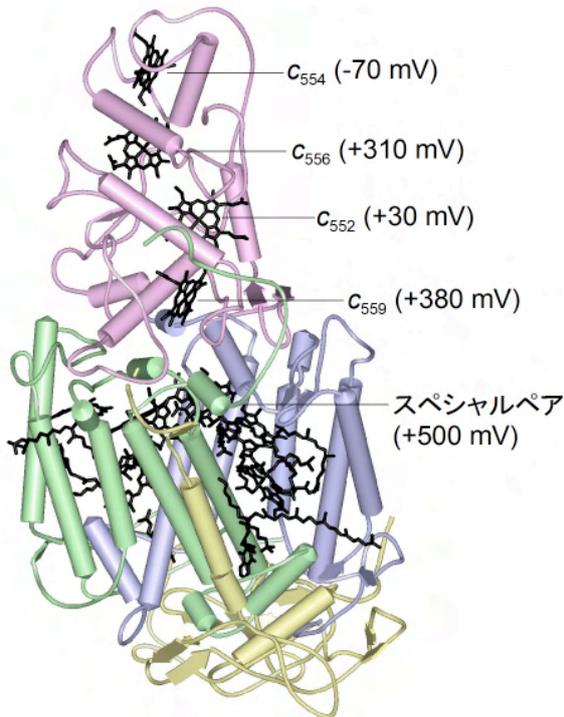


図1 紅色光合成細菌 *Blastochloris viridis* の反応中心複合体。チトクロムサブユニットに含まれる4つのヘムとバクテリオクロフィルの二量体（スペシャルペア）を酸化還元中点電位 ( $E_m$ ) と共に指し示した。ポリペプチド鎖の色は赤がチトクロム、青がL、緑がM、黄がHの各サブユニットをそれぞれ示している。構造データは Deisenhofer et al (1995) J. Mol. Biol. 246, 429-457 に基づいている。

と呼ばれる細胞内膜が有名であるが、*Rhodospseudomonas palustris* などプロテオバクテリア  $\alpha$ -2サブクラスの光合成細菌のようにラメラ状の細胞内膜を持つものも少なくない<sup>4)</sup>。プロテオバクテリア  $\alpha$ -1サブクラスのように近縁種でも内膜形態が小胞状 (*Rhodospirillum rubrum*)、あるいは重層ラメラ状 (*Rhodospirillum photometricum*) というように系統分類と対応しない場合もある。 $\alpha$ -プロテオバクテリアの通性嫌気性紅色細菌では好気条件から嫌気条件への変化に伴う光合成タンパクの合成と内膜合成がほぼ平行して起こることから、反応中心(RC)-LH1複合体やLH2が細胞内膜の主構成成分であることは確かと思われるが、膜脂質の合成も同時に起こっていることは忘れてはならない。内膜形成機構については1960から70年代にかけて盛んに研究されたが、材料とされた種がほとんど小胞状内膜を持つ種であったため膜形態に関する情報は得られていない。いくつかの光合成タンパクの変異体が異常な形態の細胞内膜を形成したことから、たとえばRC-LH1複合体やLH2の比といった

ようなものが形態に関係するとも考えられたが、たとえばLH2を合成しない種でも小胞状のもの (*Rhodospirillum rubrum*) もラメラ状のもの (*Rhodobium marinum*, *Blastochloris viridis*) もあるように、小胞状かラメラ状かの違いの原因については結局未だに明らかになっていない。さらに、*Rubrivivax* や *Rhodocyclus* などの $\beta$ -プロテオバクテリアでは光合成条件下でもあまり細胞内膜を作らないことが知られており、光合成タンパク自体は $\alpha$ -プロテオバクテリアの紅色細菌とほぼ同じであることを考えると、細胞内膜の合成および形態には光合成タンパク以外の要因を考えねばならないことになるだろう。たとえば膜脂質の種類や脂肪酸組成、さらに脂質の合成制御機構にも目を向ける必要がありそうであるが、いずれにせよ異なる内膜形態を持ついくつかの種を使う必要があると思われる。

光合成細菌の光合成膜（主に細胞内膜）の構成に関しては他にも未解決と思われる問題がある。それは、他の一般的生体膜にも共通する問題でもあるが各機能タンパクの膜内あるいは膜上における配置の問題である。

紅色細菌では光捕集系はLH2、RC-LH1から構成されるがLH2に吸収された光エネルギーはほぼロスなくRC-LH1に移動する<sup>5)</sup>。すなわちLH2を励起しても定常測定系ではLH2からの蛍光はほとんど観測されずLH1からの蛍光のみが観測される。時間分解測定ではLH2の励起後 3 ps 程度で励起エネルギーはRC-LH1に移動していることが知られている<sup>6)</sup>。このことはLH2は直接ないしは他のLH2を介して常にどれかのRC-LH1に機能的に繋がっていることを示している。つまりLH2は一瞬たりともRC-LH1あるいは隣のLH2から離れることがないことになり、それぞれの位置関係はかなり固定化されていることを意味すると考えざるを得ない。すなわち、細胞内膜などのいわゆる光合成膜では膜の流動性はほとんどなく、主要膜タンパクであるLH2、RC-LH1は固定化した光捕集ネットワークを形成していると考えられる。近年AFMなどの観察でRC-LH1、LH2とおぼしき粒子は観察されるが、 $b/c_1$ 複合体やATP合成酵素と思われる粒子が同じ領域にあまり見られないことが問題となっているが<sup>7)</sup>、これは上記の固定的アンテナ系の配置と無関係ではないと思われる。いずれにせよ膜タンパク間の相互作用がかなり強いものとするれば、その要因は明らかにすべきもの

であり、他の光合成生物のアンテナ系や一般的な膜におけるタンパク間の相互作用に対しても有用な情報となると考えられる。

これまで調べられた限りでは、通性嫌気性紅色細菌におけるRC-LH1とLH2の合成制御機構は異なっていることが知られており、RC-LH1のみが合成される条件はあるが、野性株でLH2のみが合成されることはない。しかし、我々は両者が合成される条件では相互の合成量は無関係ではないことを示しており<sup>8)</sup>、この相互の合成調節がタンパク合成レベルのものか、あるいは上記のような膜上でのアンテナネットワーク形成あるいはパッキングというような物理的要因であるかを確かめることも必要であると考えている。

葉緑体のチラコイド膜を含めて膜の形態や膜内でのタンパクの配置、相互作用を決めている要因については光合成に関わる研究課題のひとつかと思われるが、光合成細菌はやはりその有力な研究材料であろう。

#### 4. おわりに

筆者の光合成細菌との出会いは、実は光合成生物というよりも生体膜材料としてであった。しかし、生体膜材料としても色で存在が見やすいことは研究をずいぶん楽にしてくれたし、その後やや必然的に色素タンパクを扱うようになって、色が指標になるのは当初無色のタンパクを扱っていた身にとって大変ありがたいことだった。光合成そのものの研究でも光合成生物の持つ色素の存在は存分に利用されているが、上記のような膜タンパクの相互作用や構築過程を見る研究においても色のあること、色素の吸収や蛍光を指標とできることは他の材料よりかなり有利な点であると考えている。光合成生物の中で光合成細菌は水の酸化能力こそないものの、上述のように反応中心や電子伝達系、光合成膜構造の基本原則の解明のほか、たとえば色素タンパクの構築過程の研究材料としても、クロロフィルのフォーム（存在状態）が少なく見分けやすいことや、カロテノイドも共役系の長さの異なるものが使われていて分子種の見分けが容易と思われる点で酸素発生型光合成生物より有利な材料と思われる点があり、変異体作成の容易さも考慮すれば、今後も多くの研究課題にも活用できると信じている。

Received July 23, 2010, Accepted July 24, 2010, Published August 31, 2010

#### 謝辞

本稿で紹介した研究のうち、反応中心結合型チトクロムの研究に関しては永島賢治氏を中心となって行われているものであり、多くのご教示をいただいた。

#### 引用文献

1. Nitschke, W. and Dracheva, S. M. (1995) Reaction center associated Cytochromes, In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Blankenship, R. E., Madigan, M. T. and Bauer, C. E., Eds), pp231-257. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
2. Alric, J., Lavergne, J., Rappaport, F., Vermeglio, A., Matsuura, K., Shimada, K. and Nagashima, K. V. P. (2006) Kinetic performance and energy profile in a roller coaster electron transfer chain: a study of modified tetraheme-reaction center constructs. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 4136-45.
3. Kimura, Y., Alric, J., Vermeglio, A., Masuda, S., Hagiwara, Y., Matsuura, K., Shimada, K., Nagashima, K. V. P. (2007) A new membrane-bound cytochrome c works as an electron donor to the photosynthetic reaction center complex in the purple bacterium, *Rhodovulum sulfidophilum*. *J. Biol. Chem.* 282, 6463-6472.
4. Drews, G. and Golecki, J. R. (1995) Structure, molecular organization and biosynthesis of membranes of purple bacteria. In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Blankenship, R. E., Madigan, M. T. and Bauer, C. E., Eds), pp231-257. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
5. Shimada, K., Mimuro, M., Tamai, N. and Yamazaki, I. (1989) Excitation energy transfer in *Rhodobacter sphaeroides* analysed by the time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975, 72-79.
6. Robert, B., Cogdell, R. J. and van Grondelle, R. (2003) The light-harvesting system of purple bacteria, in *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis* (Green, B. R. and Parson, W. W., Eds), pp169-194. Kluwer Academic Publishers.
7. Sturgis, J. N. and Niederman, R. A. (2009) Organization and assembly of light-harvesting complexes in the purple bacterial membrane, in *The Purple Phototrophic Bacteria* (Hunter, C. N., Daldal, F., Thurnauer, M. C. and Beatty, J. T., Eds.), pp. 253-273. Springer Science + Business Media BV.
8. Itoh, M., Matsuura, K., Shimada, K. and Satoh, T. (1988) Changes in the content of pigment-protein complexes in *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *dentrificans* grown under photosynthetic and photo-

denitrifying conditions. *Biochim. Biophys. Acta* 936, 332-338.

## Prospect of Future Work Using Photosynthetic Bacteria

Keizo Shimada\*

Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University