

研究紹介

緑色硫黄細菌の光合成反応中心への部位特異的な変異導入[§]

¹立命館大学 生命科学部 生命情報学科
²大阪大学 大学院理学研究科 生物科学専攻
 浅井 智広^{1,*} 大岡 宏造²

緑色硫黄細菌やヘリオバクテリアがもつ、ホモダイマー型光合成反応中心 (RC) の構造と機能の解明は、RCの進化過程を理解するための鍵であり、残された最後の難題でもある。ホモダイマー型RCには、すでに解明された他の光合成反応中心の結晶構造からは類推できない特異的な性質が数多くある。部位特異的な変異導入は分子レベルでの解析においては常套手段だが、ホモダイマー型RCの研究に適用することは不可能であると考えられてきた。ここでは、ホモダイマー型RCを研究する意義を解説し、私たちが考案した部位特異的な変異の導入方法を紹介したい。現在この方法で、緑色硫黄細菌のRC内への変異導入と解析を進めており、今後の研究の新展開が期待される。

1. 緑色硫黄細菌のRCを研究する意義

光合成反応中心 (RC) は、多数の色素と膜貫通タンパク質からなる超分子複合体である。RCは、光誘起電荷分離反応とそれに続く電子移動反応によって、光合成電子伝達系を駆動するという、光合成初期反応において最も重要な役割を担っている。葉緑体とシアノバクテリアが行う酸素発生型の光合成では、光化学系I (PS1) と光化学系II (PS2) という2種類のRCが協調的に機能している。一方、シアノバクテリア以外の原核光合成生物が行う非酸素発生型の光合成では、PS1かPS2のどちらかに似た1種類のRC (RC1、

RC2) が機能している。これら計4種類のRCには構造と機能に数多くの共通点が見られ^{1,2)}、全てのRCは共通の祖先型RCから進化してきたと考えられている³⁾。現在の進化モデルにおける祖先型RCの最大の特徴は、電子伝達コファクターを結合するコアタンパク質がホモダイマー構造をもつことである。結晶構造が明らかになっている3種類のRC (PS1、PS2、RC2) はヘテロダイマー構造であり、そこには、使用頻度が異なる2本の電子移動経路が対称的に配置されている⁴⁾ (図1)。従って、RCは進化の過程でコアタンパク質をヘテロダイマー化し、2本の電子移動経路を機能的に非

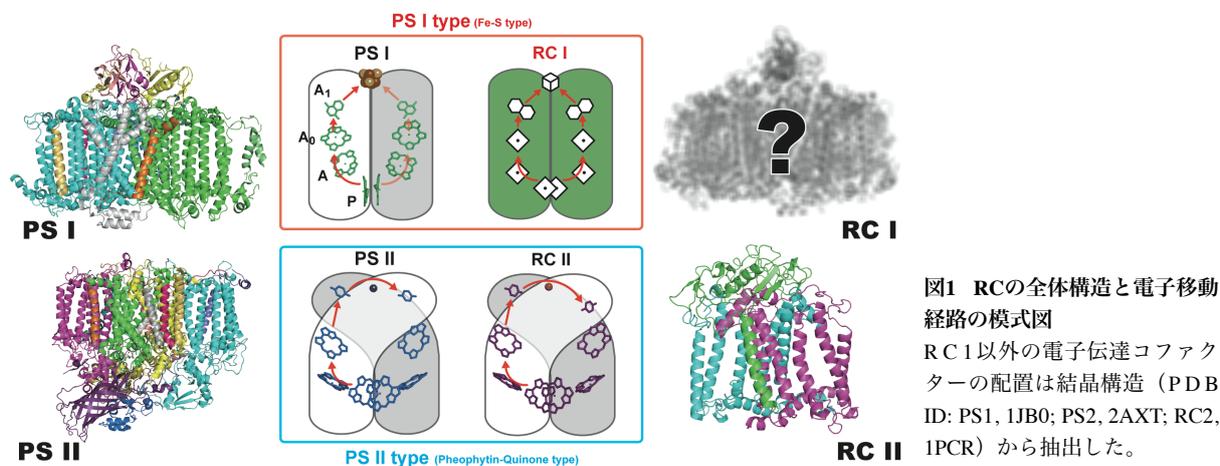


図1 RCの全体構造と電子移動経路の模式図
 RC1以外の電子伝達コファクターの配置は結晶構造 (PDB ID: PS1, 1JB0; PS2, 2AXT; RC2, 1PCR) から抽出した。

[§] 第3回日本光合成学会シンポジウム ポスター発表賞受賞論文
 * 連絡先 E-mail: cazai@fc.ritsumei.ac.jp

対称化してきたと推測されている³⁾。

緑色硫黄細菌は絶対嫌気性の光合成細菌で、還元型の硫黄化合物を電子源とした非酸素発生型の光合成で生育する。そのRCはRC1に分類されるが、1種類のポリペプチドから成るホモダイマー構造のコアタンパク質をもつ⁴⁾。そのためRCの構造と機能には祖先型RCと共通した性質が数多く残されていると考えられ、祖先型RCのモデル分子として古くから研究されてきた。しかし、緑色硫黄細菌のRCは酸素に対して極度に不安定であり、生化学や分光学による解析が難しく、可能な研究方法には限界がある。そのため、現時点で結晶構造および電子移動反応の全容は未解明のままであり、祖先型RCのモデルとしての役割を果たせていない。この状況を打破するために、私たちは、好熱性の緑色硫黄細菌*Chlorobaculum (Cba.) tepidum*において独自に遺伝子発現系を構築し、分子生物学的な研究手法の導入を模索してきたことを、過去に本誌でも紹介している⁵⁾。

2. ホモダイマー型RCの構造をめぐる謎

RCコアポリペプチドのアミノ酸配列を4種類のRC間で比較すると、10-20%程度の低い相同性しか示さない²⁾。一方、一次構造の高度な多様性とは裏腹に、現在明らかになっているヘテロダイマー型RCの結晶構造では、2本の電子移動経路を構成するコファクターの分子種や配置、その周辺のタンパク質構造はよく似ている¹⁾ (図1)。これは、RCの機能である光誘起電子移動反応の制御がいかにか強い進化的な選択圧であるかを物語っている。したがってホモダイマー型RCも類似の構造をもつと考えられているが^{1,4)}、このことによってホモダイマー型RCの不思議な特徴が浮かび上がってくる。

最大の特徴は、RC1に分類される全てのRCがホモダイマー型となる点である⁶⁾。コアタンパク質のヘテロダイマー化はPS1、PS2、RC2において独立に起こったと考えられているので^{2,3)}、ヘテロダイマー化は比較的起こりやすい事象であり、2本の電子移動経路は必ずしも対称である必要はないことになる。実際、PS1では2本の経路の使用頻度が生物種で異なっており、経路の対称性は光誘起電子移動反応の効率には影響していない。全てのRC1が30億年以上もホモダイマー構造を保っているという事実は、電子移動経路の対称性とRC1の機能に密接な関係があることを示唆している。

もう一つの大きな特徴は、二次電子受容体として機能するキノン分子の結合部位が見当たらない点である^{4,6)}。キノンはRC1を除く全てのRCで電子受容体として存在することが確認されており、PS1においてはフィロキノンが疎水的な結合ポケットに強く結合している。この結合にはTrp残基が主要な役割を果たしており、側鎖のインドール環とフィロキノンのナフトキノン環が π - π スタッキングしている^{1,6)} (図2A)。また、フィロキノンの4位のケトカルボニル基は、近接したLeu残基の主鎖のアミド基と水素結合を形成している^{1,6)}。ホモダイマー型RCでは、Leu残基は保存されているものの、疎水ポケットを形成するTrp残基は親水的なArg残基に置き換わっている^{4,6)} (図2B)。従って、ホモダイマー型RCにキノン分子は結合していないと主張する研究者もいる。一方、極低温ESR測定では電子受容体として機能するキノン分子の存在が示されており⁴⁾、構造予測から導き出される主張と矛盾する。

さらに緑色硫黄細菌のRC自体が内包する特異な謎もある。光誘起FTIR差スペクトルでは、一次電子供与体P840を構成するバクテリオクロロフィル (B Chl) *a*'の13¹位ケトカルボニル基に帰属されるピーク

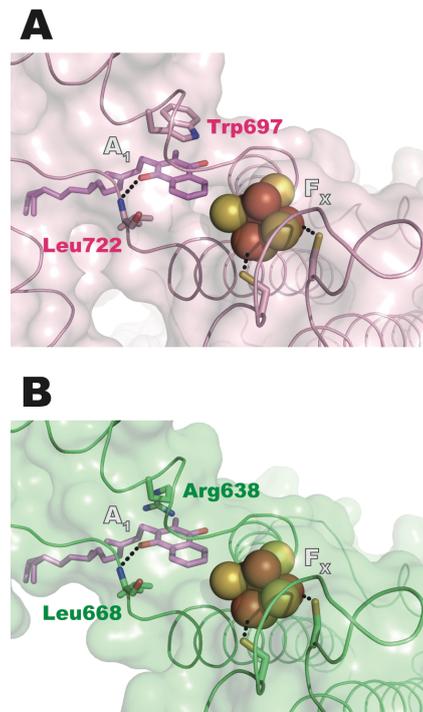


図2 キノン電子受容体と末端電子受容体F_x周辺の構造モデル

(A) PS1の結晶構造 (PDB ID: 1JB0) と (B) 緑色硫黄細菌*Cba. tepidum* RCのホモロジーモデル。

が、酸化状態 (P840⁺) で2本に分裂する⁷⁾。同様の現象はヘテロダイマー型RCでも観測されるが、この原因は非対称なタンパク質構造によって一次電子供与体を構成する2つの(B)Chl *a* に正電荷が不均等に分布するためと考えられている⁸⁾。しかし、ホモダイマー構造である緑色硫黄細菌のRCには、このような解釈は適用できない。

3. ホモダイマー型RCの部位特異的変異体の作製

前項で述べたホモダイマー型RCの特徴は、ヘテロダイマー型RCの結晶構造をもとにしたモデルでは解釈し難い。しかし部位特異的な変異導入によって、関係するアミノ酸残基ひとつひとつの機能を解析できるならば、コファクターの結合部位の決定やスペクトルの帰属は容易であろう。また、ホモダイマー型RCで、片方のコアポリペプチドだけに変異を導入できるならば、局所的なヘテロダイマー化が機能にどのように影響するかを調べることもできる。

しかしながら、ホモダイマー型RCの部位特異的変異体の作製はこれまで不可能と考えられてきた。その主な理由は、ホモダイマー型RCを持つ生物種の中で、唯一形質転換が可能な*Cba. tepidum* は光独立栄養細菌であり、RC上の重要な機能変異はほぼ全て致死となるためである。私たちは過去に、「RCコアタンパク質遺伝子の偽二倍体化」という方法を考案し⁹⁾、これを克服できる可能性を示した。変異導入したRCコアタンパク質遺伝子 (*pscA*遺伝子) を本来とは異なる遺伝子座に組み込むことで、本来の遺伝子座から発現する野生型RCで生育を補償しつつ、任意の変異型RCを発現させる方法である。この方法では、実際に野生型と変異型のコアポリペプチドから成る人工的なヘテロダイマーRCを創出することができるが⁹⁾、その解析には、野生型のホモダイマー、変異体のヘテロダイマー、変異体のホモダイマーの3種類のRCを生化学的に分離することが不可欠である。過去に私たちは、*Cba. tepidum*においてRCコアポリペプチドPscAのN末端に6xHisタグを付加することで、高い光活性を保持したRC複合体を高純度に精製できることを報告した⁹⁾。そこで、本来の遺伝子座にある野生型*pscA*遺伝子にはN末端にStrepタグを付加し、変異型*pscA*遺伝子にはN末端6xHisタグを付加して導入することで、HisタグとStrepタグのタンデムアフィニティクロマトグラフィーによって3種類のRCを分離する方法を考えた (図3)。

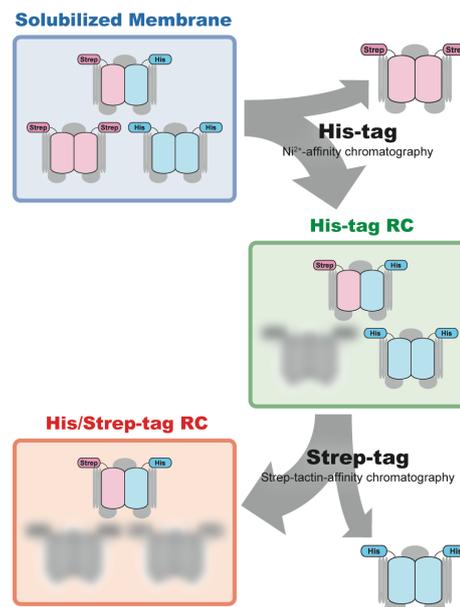


図3 HisタグとStrepタグのタンデムアフィニティクロマトグラフィーによる変異体RCの特異的精製の戦略

「RCコアタンパク質遺伝子の偽二倍体化」では、3種類のRCが発現する (Solubilized Membrane)。Hisタグ精製ではStrep/Strep-RCが脱落し (His-tag RC)、その後のStrepタグ精製ではHis/His-RCが脱落する (His/Strep-tag RC)。

今回、試行実験として、本来の遺伝子座にStrepタグ付き*pscA*遺伝子を持つ株に、変異を加えていないHisタグ付き*pscA*遺伝子を別の遺伝子座に導入し、3種類のRCの分離を試みた。別の遺伝子座から発現したPscAにはHisタグが付加されていることを利用し、粗精製膜標品を可溶化後、まずNi²⁺固定化樹脂に吸着する画分をHis-RC標品として回収した。次に、His-RC標品中のホモダイマーにはHisタグしか付加されていないこと、ヘテロダイマーにはさらにStrepタグも付加されていることを利用し、His-RC標品をStrep-tactin固定化樹脂に掛け、吸着画分 (His/Strep-RC) と素通りした画分 (His/His-RC) に分けた。精製操作を全て嫌気的な環境で行うことで、過去に報告されたRC標品に匹敵する十分な光活性を有する標品が得られた。HisタグとStrepタグに対する特異的抗体をもちいたウェスタンブロット解析では、His/Strep-RCにはHisタグとStrepタグがほぼ同量検出された (図4)。また、His/His-RC画分に混入したHis/Strep-RCは1%以下と見積もられ、99%以上の純度でHis/His-RCを精製できることがわかった。これは、HisタグとStrepタグのタンデムアフィニティ精製によって、3種類のRCを厳密に分離できることを示している。

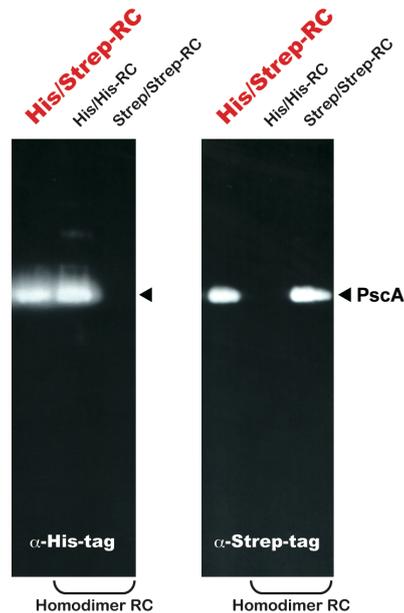


図4 His/Strep-RCのウェスタンブロット解析

His/His-RCとStrep/Strep-RCは、それぞれのタグ付きPscAのみを発現する変異株から精製し、コントロールとして用いた。各標品中のRC濃度を Q_y 吸収ピークで揃え、各レーンには等モルのRCを泳動した。左は抗Hisタグ抗体、右は抗Strepタグ抗体でそれぞれ免疫染色している。

4. 今後の展望

今回、緑色硫黄細菌において、ホモダイマー型RCの部位特異的変異体を作製、精製できる方法を紹介した。現在、P840の周辺構造を改変した変異体RCの作製に成功し、FTIRや分光電気化学による解析から緑色硫黄細菌RCの構造に関する新たな知見が得られはじめている。それ以外の変異体RCの作製も進めており、ホモダイマー型RCの構造機能相関を分子レベルで解明していきたいと考えている。

謝辞

本稿を執筆するにあたり、名古屋大学理学研究科の野口巧博士と加藤祐樹博士には、適切なお助言をいただくことができた。この場を借りて、両氏に深く感謝

したい。

Received July 12, 2013, Accepted July 17, 2013, Published August 31, 2013

参考文献

1. Heathcote, P., Fyfe, P. K., and Jones, M. R. (2002) Reaction centres: the structure and evolution of biological solar power. *Trends Biochem. Sci.* 27, 79-87.
2. Sadekar, S., Raymond, J., and Blankenship, R. E. (2006) Conservation of distantly related membrane proteins: photosynthetic reaction centers share a common structural core. *Mol. Biol. Evol.* 23, 2001-2007.
3. Hohmann-Marriott, M. F. and Blankenship, R. E. (2011) Evolution of photosynthesis, *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 515-548.
4. Hauska, G., Schoedl, T., Remigy, H., and Tsiotis, G. (2001) The reaction center of green sulfur bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1507, 260-277.
5. 浅井 智広、大岡 宏造 (2011) 絶対嫌気性の光合成細菌 *Chlorobaculum tepidum* における外来遺伝子発現系. 光合成研究 21, 95-101.
6. Heathcote, P., Jones, M. R., and Fyfe, P. K. (2003) Type I photosynthetic reaction centres: structure and function. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 358, 231-243.
7. Noguchi, T., Kusumoto, N., Inoue, Y., and Sakurai, H. (1996) Electronic and vibrational structure of the radical cation of P840 in the putative homodimeric reaction center from *Chlorobium tepidum* as studied by FTIR spectroscopy. *Biochemistry* 35, 15428-15435.
8. Noguchi, T. (2010) Fourier transform infrared spectroscopy of special pair bacteriochlorophylls in homodimeric reaction centers of heliobacteria and green sulfur bacteria. *Photosynth. Res.* 104, 321-331.
9. Azai, C., Kim, K., Kondo, T., Harada, J., Itoh, S., and Oh-oka, H. (2011) A heterogeneous tag-attachment to the homodimeric type 1 photosynthetic reaction center core protein in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 803-812.

Site-directed Mutagenesis on the Photosynthetic Reaction Center of Green Sulfur Bacteria

Chihiro Azai^{1,*}, Hirozo Oh-oka²,

¹Department of Bioinformatics, College of Life Sciences, Ritsumeikan University

²Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University