トピックス

6量体ヘムタンパク質を用いた人工光捕集系の開発

大洞光司^{1,2}¹大阪大学大学院工学研究科²JST さきがけ

1. 光合成における光捕集系およびそのモデル研究

光合成では、活性中心での酸化還元反応を円滑に進行させるために、大規模な光捕集系を用いて光子密度の低い太陽光エネルギーの効率的な利用を実現している。特に、紅色細菌の光化学系では光捕集系 (LH1 および LH2) と反応中心の構造が明らかにされており、これらは比較的単純な構造であるため、作用機序の解析が進んでいる¹⁾。光合成の初期段階において、光捕集に関わる LH2 内で環状に整列したクロロフィル分子は、光により励起したエネルギーを同一色素間での高速エネルギー移動 (エネルギーマイグレーション) を介して活性中心へと集約させ、太陽光エネルギー利用の効率化を達成している。この興味深い性質に着目して、これまでにポルフィリン等の光増感剤を集積させる合成化学的手法を駆使した研究が報告されている。また近年ではウイルスキャプシドやタンパク質の多量体に共有結合的に色素を化学修飾させた系が報告されている。しかしながら双方とも煩雑な手法を伴い、調製は容易ではない。一方で、我々のグループでは、ポルフィリン鉄錯体 (ヘム) を補因子とするヘムタンパク質において、ポルフィリン金属錯体とタンパク質 (ヘムポケット) の相互作用を利用したタンパク質集合化を実施しており^{2), 3)}、亜鉛ポルフィリンを用いたタンパク質集合系ではエネルギーマイグレーションを示唆する結果を得ている。本稿では、環状 6 量体構造を有する天然ヘムタンパク質を用い、ヘムから亜鉛ポルフィリノイドへの置換に基づいた光捕集系構築法⁴⁾ および化学修飾法をこれに適用した、亜鉛ポルフィリンを含めて 3 種類の色素からなる人工光捕集系の開発について紹介する⁵⁾。

2. ヘムタンパク質 6 量体への亜鉛ポルフィリンの導入

ヘムタンパク質環状 6 量体である Hexameric Tyrosine-coordinated Heme Protein (HTHP) は 2007 年に H. Dobbek

らにより報告された海洋細菌 *Silicibacter pomeroyi* 由来のヘムタンパク質である⁶⁾。結晶構造から、図 1 に示す通り 6 回対称軸を持つホモ 6 量体であることが明らかになっている。それぞれのドメインが 1 つのヘム分子を有しており、隣り合うドメイン内のヘム分子の鉄-鉄間距離は 18 Å である。またヘムはチロシンによる配位結合、疎水性相互作用、水素結合によりタンパク質マトリクス内に保持されている。このタンパク質の構造的特徴に注目し、再構成法によるヘムの亜鉛ポルフィリン (ZnPP) への置換により、光増感剤として機能する ZnPP が HTHP マトリクス内に固定された光捕集系の構築を実施した。HTHP は定法で再構成が可能であり、また 6 量体構造を保持していることがサイズ排除クロマトグラフィ、光散乱測定により明らかになっている。

ZnPP を含む再構成 HTHP に対して fs レーザーを用いた過渡吸収スペクトル測定を実施すると、光捕集系に特徴的な一重項同士の消滅による寿命の短い成分が観測された。一方で、モデルとして、1 つの ZnPP のみを 6 量体に含む HTHP ではこのような成分は観測されなかったことから、本系の光捕集系としての可能性が示唆された。次に、エネルギーマイグレーション

図 1 HTHP の結晶構造と人工光捕集系構築の模式図。

Artificial Light Harvesting System Using Hexameric Hemoprotein
Koji OOHORA^{1,2}

¹Graduate School of Engineering, Osaka University

²JST PRESTO

図 2
複数の色素を有する人工光捕集系構築の模式図。

が起こっているかを直接観察するために、メチルビオロゲン (MV^{2+}) を消光剤とする蛍光の消光実験を実施した。嫌気下でタンパク質に対して過剰量の MV^{2+} を添加した条件での測定を行い、その蛍光強度変化を Stern-Volmer プロットとして評価した。6つの ZnPP を含む HTHP および 1つの ZnPP のみを含む HTHP におけるこれらのプロットの傾きはそれぞれ 21 M^{-1} および 9.2 M^{-1} であった。また、蛍光寿命における時定数の変化に対しても同様に Stern-Volmer プロットを確認すると、蛍光強度の結果とは対照的に、双方において傾きは 0 であった。以上の結果から、非常に弱い結合で色素近傍に近づき一重項を失活させている静的消光であることが示された。したがって、蛍光強度における Stern-Volmer プロットの傾きは見かけの結合定数として解析でき、見かけの結合定数の値が約 2 倍であることから、ZnPP 間のエネルギーマイグレーションが示唆された。また本系の利点として、汎用性の高さがある。ZnPP の代わりに亜鉛クロリンを用いた場合でも、同様に光捕集系として機能することが明らかになっている。

3. | 複数種類の色素を有する光捕集系

前項の光捕集系にさらに化学修飾法を適用し、ZnPP を含めて 3 種類の色素からなる新規人工光捕集系を開発した。ZnPP のドナーおよびアクセプターとして機能する色素としてフルオレセインおよびテキサスレッドを選択した。また HTHP にはシステインを導入し、マレイミド基を有するフルオレセインおよびテキサスレッドを反応させた。まず、6 分子のフルオレセインのみ導入した ZnPP 含有 HTHP は、60% ほどの効率でフルオレセインから亜鉛ポルフィリンにエネルギー移動することがわかった。続いて、6 分子のテキサスレッドのみを修飾した ZnPP 含有 HTHP で

は、35% ほどの効率で亜鉛ポルフィリンからテキサスレッドへエネルギー移動することが明らかになった。次に、1 分子のテキサスレッドと 5 分子のフルオレセイン、6 分子の ZnPP を有する HTHP を調製した (図 2)。まずジスルフィド結合を有する 2 量体 6 量体をサイズ排除クロマトグラフィーで単離し、フルオレセインの修飾、ジスルフィド結合の開裂を経て、ヘムを ZnPP に置換した。同定は MALDI MS および吸収スペクトルにより行った。吸収スペクトルおよび励起スペクトルを比較し、エネルギー移動効率を評価した。この際、前述の 6 分子のフルオレセインあるいは 6 分子のテキサスレッドを有する光捕集系で得られた蛍光寿命、エネルギー移動効率および移動速度を近似的に割り当て、それぞれのエネルギー移動現象の速度を見積もった。結果として、フルオレセインからテキサスレッドに直接エネルギー移動するパス 1 と ZnPP を介して移動するパス 2 の比は 39:61 であることを示した。このことから本系が連続的なエネルギー移動によりアクセプターに幅広い波長の光励起エネルギーを捕集可能な系であることが示された。

以上のように、タンパク質を足場として新規な光捕集系を構築し、その複雑な挙動を詳細に評価した。今後の高効率な光捕集系の構築が期待される。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、ご協力いただいた大阪大学の林高史教授および真島剛史博士に厚く御礼申し上げます。fs レーザーを用いた光化学に関して、名城大学の福住教授および大阪大学の久保教授にご協力をいただいております。深く感謝致します。

文 献

- 1) Scholes, G. D. *et al.* (2011) *Nat. Chem.* **3**, 763-774. DOI: 10.1038/nchem.1145.
- 2) Oohora, K. *et al.* (2012) *Chem. Commun.* **48**, 11714-11726. DOI: 10.1039/C2CC36376C.
- 3) Oohora, K. *et al.* (2018) *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 10145-10148. DOI: 10.1021/jacs.8b06690.
- 4) Oohora, K. *et al.* (2015) *Chem. Commun.* **51**, 11138-11140. DOI: 10.1039/C5CC02680E.
- 5) Mashima, T. *et al.* (2018) *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3200-3209. DOI: 10.1039/C7CP05257J.
- 6) Jeoung, J.-H. *et al.* (2007) *J. Mol. Biol.* **368**, 1122-1131. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.02.079.

大洞光司

大洞光司 (おおほら こうじ)

大阪大学大学院工学研究科助教
2011 年博士 (工学) 大阪大学
研究内容: ヘムタンパク質の化学的改変
連絡先: 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1 大阪大学吹田キャンパス C4 棟林研究室
E-mail: oohora@chem.eng.osaka-u.ac.jp
URL: <http://www.chem.eng.osaka-u.ac.jp/~hayashiken/>