光合成反応中心と集光アンテナタンパク質との複合体 (LH1-RC) の結晶構造

京都大学大学院理学研究科 竹田一旗, 丹羽智美, 三木邦夫

Kazuki TAKEDA, Satomi NIWA and Kunio MIKI: Crystal Structure of the Complex between the Light Harvesting Core Antenna and the Photosynthetic Reaction Center (LH1-RC Complex)

For efficient use of sunlight, the light-harvesting core antenna (LH1) and the reaction center (RC) form a supramolecular complex (LH1-RC) in photosynthetic bacteria. We determined the crystal structure of a LH1-RC complex from a purple bacterium, *Thermochromatium tepidum*. The structure reveals that the RC is completely surrounded by 16 $\alpha\beta$ -heterodimers. Calcium ions are bound at the periplasmic side of LH1. 32 bacteriochlorophyll and 16 spirilloxanthin molecules form an elliptical assembly in LH1. The pigment geometry involved in the absorption characteristics and excitation energy transfer is determined. In addition, ubiquinone channels and lipid molecules are observed in the complex.

1. 序 論

「光合成－地球上で最も重要な化学反応」。光合成細菌の反応中心複合体 (RC) の結晶構造の決定¹⁾ に対して 1988 年のノーベル化学賞が授与されたとき、スウェーデン王立科学アカデミーが伝える第一報冒頭にこのように記されている。言うまでもなく、光合成は地球上の生物がその生きるためのエネルギーを獲得するための最も重要な反応である。光合成は、光エネルギーを化学エネルギーに変換して NADPH と ATP を合成する光化学反応と、NADPH と ATP をもちいて炭水化物を合成する炭酸固定反応に分けることができる。光合成の分子機構については古くから研究が行われ、長い歴史をもっている。光合成は高等植物のみならず原始的な光合成細菌でも行われ、光化学反応の仕組みは基本的に同じである。反応に関与するタンパク質も類似しているが、光合成細菌のほうがより単純な分子構造やサブユニット構成をもっているため、理論的な研究や分光学での研究にしばしば利用されてきた。

高等植物の光合成は葉緑体で行われるが、細菌型の光合成はクロマトフォアと呼ばれる球殻状の細胞内構造体で行われる (図 1a)。光化学反応はいずれも、脂質膜に存在するタンパク質およびその複合体が担っている。光合成細菌のクロマトフォア膜には、集光アンテナタンパク質 (コアアンテナ LH1 および周辺アンテナ LH2) や RC、シトクロム bc_1 複合体 (bc_1) などのタンパク質複合体が存在する (図 1b)。光合成の初期過程反応は、最も多く存在する LH2 が光エネルギーを捕捉することで始

まる。これによって、LH2 に結合しているバクテリオクロロフィル (BChl) が電子励起される。励起エネルギーは LH2, LH1, RC の順に移動する。このエネルギーにより、BChl 二量体である RC のスペシャルペアにおいて高エネルギー電子の発生 (電荷分離) が起こり、最終的には RC に結合したユビキノンを還元される。2 個の電子と 2 個のプロトンにより還元型となったユビキノンは LH1-RC 複合体の外に移動し、 bc_1 に電子とプロトンを渡す。

光合成初期過程の反応機構の解明には、タンパク質結晶学が大きな貢献を果たしてきた。冒頭に示した RC の結晶構造は、紅色光合成細菌 *Blastochloris viridis* (当時は *Rhodospseudomonas viridis* と呼ばれていた) 由来のもので、膜タンパク質として初めて構造解析された。¹⁾ その構造は、スペシャルペアの二量体化様式をはじめ、キノンを含む補因子群の RC 内での相互配置、補因子を取り囲むタンパク質サブユニットとの相互作用など、光化学反応の分子論的な理解に多くの情報を与えた (図 2a)。²⁾ これらの電子伝達体である補因子群の基本的な構造と分子配置は、植物型の光合成における 2 つの光化学系 (PS) と (とくに PS-II と) 共通性/類似性が高いことが、その後解析された PS-I^{3),4)} や PS-II⁵⁾⁻⁷⁾ の結晶構造から明らかになった。これにより、光合成研究における光合成細菌のモデル生物としての優位性があらためて認識されることになった。RC の構造が明らかになって以降、紅色光合成細菌由来のタンパク質を対象として、膜に存在する LH2⁸⁾ (図 2b) や bc_1 ⁹⁾ (図 2c)、および各種の電子伝達タンパク質などについての結晶構造が報告された。LH1 や LH1 と複合体を形成した状態の RC (LH1-RC 複合体) の

図1 紅色光合成細菌における光合成初期過程. (The primary process of photosynthesis in purple photosynthetic bacteria.) (a) 紅色光合成細菌のクロマトフォアの模式図. 直径は約60 nmである. (b) クロマトフォアに含まれる光合成タンパク質. 最も多く存在するLH2が光エネルギーを捕捉し, LH2, LH1, RCの順に励起エネルギーが移動する. この励起エネルギーによりRCのスペシャルペアにおいて電荷分離が起き, RCに結合したユビキノ (Q) が還元される. 2個の電子と2個のプロトンにより還元型となったユビキノンはLH1-RC複合体の外に移動し, bc1に電子とプロトンを渡す. bc1はプロトン輸送を行い, クロマトフォアの内外にプロトンの濃度差が形成される. このプロトンにより, ATP合成酵素が駆動される. bc1を通過した電子は, 高電位鉄イオウタンパク質 (HiPIP) によってRCへと運搬され, スペシャルペアを再還元する.

図2 紅色光合成細菌の光合成タンパク質の結晶構造. (Crystal structures of photosynthetic proteins from purple photosynthetic bacteria.) (a) *B. viridis* 由来のRCの構造. (b) *Rhodoblastus acidophilus* 由来のLH2の構造. (c) *Rhodobacter sphaeroides* 由来のbc1の構造.

構造解析もさまざまな手法で試みられてきた. しかしながら, いずれも低分解能の解析にとどまっており, LH1の正確な構造, とりわけ効率的な集光やエネルギー移動の機構を解明するために必要なLH1とRCの相互作用や色素などの補因子の配置についてはほとんど未解明であった.

2. 構造解析

紅色光合成細菌 *Thermochromatium tepidum* の生育温

度は約50℃であり, 熱安定性の高い光合成タンパク質をもつ. この細菌由来のRCの結晶構造については, 以前に2.2 Å分解能で報告している.¹⁰⁾ LH1-RC複合体についても, この細菌から精製したものを結晶化に使用した. 界面活性剤としてデシルホスホコリン (DPC) を使用することで, 良質の結晶を得た. 放射光X線を利用して, 3.0~3.5 Å分解能のX線回折データを収集することができた. しかしながら, これらは互いに同型性が悪く, 回折データのマージが困難であった.

図3 LH1-RCのX線解析における電子密度の改善の様子. (Improvement in the electron density map of LH1-RC.) (a) 補正前のマップ (1 σ). (b) 異方性の補正後のマップ (1 σ). (c) 結晶間平均化後のマップ (1 σ). (d) 精密化後の σA -weighted $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ マップ (1 σ).

RCの構造をサーチモデルにした分子置換法から最初の位相を得て、重原子誘導データから重原子位置を決定した。この重原子位置をもとに改めて重原子同型置換法を行うことで、モデルバイアスのない位相情報を得た。しかしながら、回折データ強度の分布に存在する強い異方性が、電子密度にも影響を与え、膜貫通ヘリックス部分でさえ、とぎれとぎれとなってしまった(図3a)。そこで、等方的になるように補正したところ、ポリペプチド鎖のつながりが向上し、すべてのヘリックスが確認できるようになった(図3b)。さらに、2つの異なる空間群($P2_1$ および $C2$)に属する合計6個のnativeデータセットを使用して結晶間平均化を行った結果、ポリペプチド部分の側鎖が認識できるようになった(図3c)。この電子密度は、精密化後の構造からの位相をもちいて計算した電子密度と比べても遜色のないものであった(図3c, d)。このようにして、LH1-RC複合体の構造を、多数含まれている補因子も含めて、実験的に決定した電子密度に基づいて解析することができた。¹¹⁾

3. 構造

3.1 全体構造

*T. tepidum*のLH1-RCは、RCの部分が生クロム(Cyt), H, LおよびMの4種類のサブユニット、LH1部分がそれぞれ16個の α サブユニットと β サブユニットから構成されていた。また、BChlやバクテリオフェオフィチン(BPheo)、スピリロキサンチン(Spx)などの補因子を合計で80個確認できた。RCはLH1のリングに完全に取り囲まれていた(図4a, b)。LH1リングの膜貫通ヘリックスとRCとの間の相互作用はヘリックスの両末端、特にペリプラズム側に多くみられるが、膜貫通ヘリックスの中央部分にはほとんどみられなかった。

3.2 ほかのLH1-RC複合体との比較

LH1リングの形状は光合成細菌の種類によって異なる。これまでに、2つのLH1-RC複合体の結晶構造が低分解能で決定されていた。4.8 Å分解能で解析されている*Rhodospseudomonas palustris*由来のLH1-RCの構造では、

LH1リングは15組の $\alpha\beta$ ヘテロ二量体から構成されており、protein Wという一回膜貫通型のサブユニットによりリングに切れ目が生じている(図4c)。¹²⁾ また、8.0 Å分解能の*Rhodobacter sphaeroides*由来のLH1-RCの構造では、14組の $\alpha\beta$ ヘテロ二量体と1個のPufXサブユニットから構成されるC字型リングが、2個組み合わせられてS字型の二量体を形成している(図4c)。¹³⁾ PufXサブユニットは2つのC字型リングの接合部分に位置している。一方、今回構造決定した*T. tepidum*由来LH1-RCでは、LH1リングはこれらとほぼ同じ概形とサイズであるにもかかわらず、16組の $\alpha\beta$ ヘテロ二量体で構成されており、完全に閉じたリングを形成している(図4c)。¹¹⁾

3.3 補因子の配置

LH1リング中では、32分子のBChlは16分子のSpxとともに楕円状の色素分子集合体を形成していた(図5a)。 α -His36に結合しているBChlは、 α -Trp46の側鎖と水素結合を形成していた(図5b)。一方、 β -His36に結合しているBChlは、 α -Gln28、 β -Trp28および β -Trp45と水素結合を形成していた。BChl間の距離は、Mg原子間で測定して平均で8.75 Åであった。この値は、これまでに報告されている光合成細菌のLH1およびLH2の中では最短である。

LH1のBChlは、RCのスペシャルペアBChlと膜内の同じ高さに位置する。また、 $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\alpha 9$ および $\beta 9$ に結合しているBChlは、スペシャルペアBChlと平行である。これらの平行なBChlの位置は、分子集合体の楕円状リングの短軸からは約30°はずれている。また、スペシャルペアBChlとの間の距離は、39.4 ~ 43.5 Åである。励起エネルギー移動には、色素間の距離だけではなく配向も重要であり、これらの平行なBChlがLH1からRCへの励起エネルギー移動に重要な役割を果たしている可能性がある。

3.4 カルシウムイオンの結合

LH1リングのペリプラズム側において、 n 番目の α サブユニットと $n+1$ 番目の β サブユニットが金属イオンを介して相互作用していた(図6)。カルシウムのK吸収端近傍のX線($\lambda = 2.70$ Åおよび $\lambda = 3.15$ Å)を使用して

図4 *T. tepidum* 由来 LH1-RC の全体構造. (Overall structure of LH1-RC from *T. tepidum*.) (a) ペリプラズム側から見た LH1-RC 複合体の構造. 1 個の $\alpha\beta$ ヘテロ二量体の α サブユニットと β サブユニットにラベルを付した. (b) 膜断面方向から見た LH1-RC 複合体の構造. (c) *Rps. palustris* 由来 LH1-RC および *R. sphaeroides* 由来 LH1-RC 二量体との比較. 数字は $\alpha\beta$ ヘテロ二量体につけられた番号を表す. また, W および X は, protein W および PufX をそれぞれ示す.

図5 *T. tepidum* 由来 LH1-RC の補因子. (Cofactors in LH1-RC from *T. tepidum*.) (a) 補因子の配置. (b) LH1 リングにおける BChl 近傍の相互作用の様子.

回折データを測定し, 異常散乱差フーリエマップを計算することにより, 金属がカルシウムであることを確認した. LH1 リングに存在する 16 カ所のカルシウム結合部位において, カルシウムイオンは α -Asp49 と α -Asn50 の側鎖, α -Trp46 の主鎖のカルボニル基, および隣接した $\alpha\beta$ ヘテロ二量体の β -Leu46 の C 末端カルボキシル基に配位していた. α -Asp49 と α -Asn50 はほかの紅色光合成細菌

図6 LH1 リングにおけるカルシウムイオン結合部位. (The calcium binding site in the LH1 ring.) 波長 2.70 Å の X 線で測定した回折データから計算した異常分散差フーリエマップを, 3 σ レベルで表示した.

では保存されておらず, カルシウム結合部位の存在は *T. tepidum* に特有である. このカルシウムイオンを介した

図7 ユビキノンの移動経路。(Transfer channel of ubiquinone.)

相互作用により, *T. tepidum* 由来 LH1-RC の高い耐熱性を説明することができる。

T. tepidum 由来の LH1 に結合している BChl は 915 nm に吸収極大があり, 880 nm に吸収をもつ他種の LH1 よりも 35 nm も長波長側にある。EDTA をもちいてカルシウムイオンを除去すると吸収波長は 880 nm に変化し, カルシウムイオンを添加すると再び 915 nm に戻る。¹⁴⁾ カルシウムイオンにより, BChl どうしの密な重なり合いが生じて, 吸収波長のシフトをもたらししていると考えられる。

3.5 ユビキノンの移動経路

光のエネルギーにより RC のスペシャルペアから生じた電子は最終的に還元型ユビキノンとして化学エネルギーの形に変換され, LH1-RC 複合体の外へと運び出される。今回決定した LH1-RC 複合体の構造からは, 完全に閉じた LH1 リングにおけるユビキノンの移動メカニズムも考察することができた。LH1 リングの隣接した $\alpha\beta$ ヘテロ二量体の間には, ユビキノンの通り道となりうる隙間がみられた。この 16 個の隙間は, 膜貫通ヘリックスの細胞質側に位置している。この隙間の位置は, RC のユビキノ結合部位と膜内での高さが同じである (図7)。また, この隙間のサイズは, ユビキノンのベンゾキノ基とほぼ同じである。隙間の最も狭い部分は BChl や Spx, α サブユニットの疎水性残基の側鎖によって形成されていて, 柔軟性が高く非常に疎水的である。LH1 リングでは, ペリプラズム側に比べて, 細胞質側にはサブユニット間の相互作用があまり見られない。このため, ユビキノンの通り道のある膜貫通ヘリックスの細胞質側のほうがより柔軟性が高いと考えられる。このような LH1 の動きがユビキノンの交換に重要であることは, 以前に報告されている分光光学や分子動力学による研究結果からも予想されていた。¹⁵⁾⁻¹⁷⁾

3.6 脂質

分子モデルの構築を行った後にも, LH1 リングと RC

図8 LH1-RC複合体に結合した脂質分子の分布。(Distribution of lipid molecules bound to the LH1-RC complex.) 脂質分子とリン酸イオンをスティックモデルとCPKモデルでそれぞれ表示した。

に挟まれた隙間には, アミノ酸では説明が不可能な細長い電子密度が残った。このような電子密度は, 脂質分子としてモデリングすることができた。また, いくつかの強い残余電子密度が, 正電荷をもつアミノ酸の近傍にみられた。これらはリン酸イオンとして解析したが, リン脂質の一部のみが現れたものと思われる。脂質分子もリン酸イオンも, LH1 リングの内側に結合していた (図8)。これまでに解析されている RC にも脂質分子が結合しているが, 今回の LH1-RC の構造にみられる脂質分子およびリン酸イオンの位置とよく一致していた。これらのなかには, RC と LH1 の両方と相互作用している脂質分子も含まれており, LH1-RC 複合体の安定化に寄与しているものと思われる。

4. おわりに

今回, 3.0 Å 分解能で LH1-RC 複合体の全体構造を解明できたことにより, LH1 の構造をはじめ, LH1 と RC の相互作用や補因子の配置を正確に決定することができた。今回の構造解析で得られた分子構造をもとにして, 光合成のエネルギー伝達に関する理論的な解明が期待される。今後, 分光学的な特性に影響を与える色素分子の歪を正確に決定できるレベルに座標精度を高めていきたい。さらには, クロマトフォアに埋め込まれた状態の LH1-RC 複合体の構造や, ほかの光合成タンパク質との相互作用についても明らかにしていきたいと考えている。

謝 辞

この LH1-RC の構造研究は, 茨城大学理学部の大友征宇博士, 于 龍江博士, 川上知朗氏, 京都大学大学院理

学研究科の平野 優博士（現・日本原子力研究開発機構）との共同研究である。¹¹⁾

文 献

- 1) J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel: *J. Mol. Biol.* **180**, 385 (1984); idem: *Nature* **318**, 618 (1985).
- 2) 三木邦夫: 日本結晶学会誌 **32**, 162 (1990).
- 3) S. Sadekar, J. Raymond and R. E. Blankenship: *Mol. Biol. Evol.* **23**, 2001 (2006).
- 4) P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger and N. Krauss: *Nature* **411**, 909 (2001).
- 5) A. Amunts, O. Drory and N. Nelson: *Nature* **447**, 58 (2007).
- 6) K. N. Ferreira, T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber and S. Iwata: *Science* **303**, 1831 (2004).
- 7) Y. Umena, K. Kawakami, J. R. Shen and N. Kamiya: *Nature* **473**, 55 (2011).
- 8) G. McDermott, S. M. Prince, A. A. Freer, A. M. Hawthornthwaite-Lawless, M. Z. Papiz, R. J. Cogdell and N. W. Isaacs: *Nature* **374**, 517 (1995).
- 9) L. Esser, M. Elberry, F. Zhou, C. A. Yu, L. Yu and D. Xia: *J. Biol. Chem.* **283**, 2846 (2008).
- 10) T. Nogi, I. Fathir, M. Kobayashi, T. Nozawa and K. Miki: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13561 (2000).
- 11) S. Niwa, L. J. Yu, K. Takeda, Y. Hirano, T. Kawakami, Z. Y. Wang-Otomo and K. Miki: *Nature* **508**, 228 (2014).
- 12) A. W. Roszak, T. D. Howard, J. Southall, A. T. Gardiner, C. J. Law, N. W. Isaacs and R. J. Cogdell: *Science* **302**, 1969 (2003).
- 13) P. Qian, M. Z. Papiz, P. J. Jackson, A. A. Brindley, I. W. Ng, J. D. Olsen, M. J. Dickman, P. A. Bullough and C. N. Hunter: *Biochemistry* **52**, 7575 (2013).
- 14) Y. Kimura, Y. Hirano, L. J. Yu, H. Suzuki, M. Kobayashi and Z. Y. Wang: *J. Biol. Chem.* **283**, 13867 (2008).

- 15) F. Comayras, C. Jungas and J. Laverne: *J. Biol. Chem.* **280**, 11214 (2005).
- 16) C. Mascle-Allemand, J. Laverne, A. Bernadac and J. N. Sturgis: *Biochim. Biophys. Acta* **1777**, 1552 (2008).
- 17) A. Aird, J. Wrachtrup, K. Schulten and C. Tietz: *Biophys. J.* **92**, 23 (2007).

プロフィール

竹田一旗 Kazuki TAKEDA
京都大学大学院理学研究科
Graduate School of Science, Kyoto University
〒606-8502 京都市左京区北白川追分町
Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan
e-mail: ktakeda@kuchem.kyoto-u.ac.jp

丹羽智美 Satomi NIWA
京都大学大学院理学研究科
Graduate School of Science, Kyoto University
〒606-8502 京都市左京区北白川追分町
Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan
e-mail: s.niw@kuchem.kyoto-u.ac.jp

三木邦夫 Kunio MIKI
京都大学大学院理学研究科
Graduate School of Science, Kyoto University
〒606-8502 京都市左京区北白川追分町
Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan
e-mail: miki@kuchem.kyoto-u.ac.jp