

第6章 ホモダイマー型光合成反応中心の分子構築と反応機構

浅井智広*¹, 大岡宏造*²

1 はじめに

光合成は、生物が光エネルギーを利用し、地球上の生命活動を支えるのに必要な物質生産を行うとともに、地球全体の物質循環をも担っている複雑な反応システムである。とりわけ光合成膜（チラコイド膜あるいは細胞膜）に存在する光合成反応中心（Photosynthetic Reaction Center, RC）は光合成反応の初期過程を担う色素タンパク質複合体であり、光励起によってRCから放出された高エネルギーの電子は最終的にフェレドキシンあるいはNADP⁺まで伝達される。この電子伝達反応にともなって形成された膜内外のプロトンの電気化学ポテンシャル差は、ATP合成に利用される。したがってRCは光合成反応を駆動するエンジンであり、最も重要な光合成装置といえる。高い光エネルギー変換効率を実現するために、RCでの色素の立体配置や配向は最適化されている。本稿では原始的なホモダイマー型RCの分子構築と電子移動経路に関する知見を紹介し、高度に精密化されたRCの進化的成立過程を考えてみる。

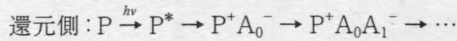
2 光合成反応中心による光エネルギー変換

2.1 電荷分離と電子移動

RCは、光誘起電荷分離反応と、それに続く電子移動反応を起こすことで、光合成反応を開始させる。まず周辺集光装置あるいはRC内部の集光性色素で捕捉された光エネルギーは励起エネルギーとなり、一次電子供与体として働く特別なクロロフィル色素二量体（スペシャルダイマー、P）に伝えられる。励起状態となった一次電子供与体P*は近傍にある一次電子受容体A₀との間で初期電荷分離反応（P⁺A₀⁻）を起こし、放出された高エネルギーの電子は後続の電子受容体へと逐次的に移動していく。一方、電荷分離で生じた酸化型の一次電子供与体P⁺は、後発の二次電子供与体D₁によって再還元される。これら一連の反応は、一般に以下のような反応式で表すことができる。

*1 Chihiro Azai 立命館大学 生命科学部 生命情報学科 助教

*2 Hirozo Oh-oka 大阪大学 大学院理学研究科 生物科学専攻 准教授



(ここで A_n は $n+1$ 次の電子受容体, D_n は $n+1$ 次の電子供与体を表す)

この光合成初期過程において, 反応量子収率は吸収される光の波長や生物種に依らずほぼ100%であり, 1光子の吸収で必ず1電子が動くことが特徴である。電子伝達系を生体内全体で見たとき, 還元側は還元力NADPHの生成に繋がっており, 酸化側は電子源となる化合物の酸化反応と結びつく(植物では水酸化反応であり, 光合成細菌では有機酸や硫化物の酸化反応である)。

2.2 電子移動理論

ここでRC内の電子移動経路を理解する上で必要となってくる電子移動理論について簡単に解説しておく。上で述べたように初期電荷分離反応によって $P^+A_0^-$ 状態が生じる。励起状態のクロロフィル色素 P^* の励起寿命はナノ秒オーダーであり, これに競合して初期電荷分離反応を進行させるためには, P と A_0 はタンパク質の内部で最適な位置と配向に固定されている必要がある。さらに生成した $P^+A_0^-$ 状態と電荷分離前の状態との間には最大で1.3~1.8 eVのエネルギー差があるため, そのままでは A_0^- と P^+ の間で電荷再結合反応が起こり, P の三重項励起状態(P^T)を経て, 基底状態に戻ってしまう。したがってRCが量子収率100%で光合成反応を駆動するためには, 安定な初期電荷分離状態の生成だけでなく, 電荷再結合反応を抑えて後続の電子移動反応を迅速に進行させる必要がある。

古典的なMarcus理論^{1,2)}によれば, 電子供与体(D)と受容体(A)の発エルゴニックな電子移動速度 k_{ET} は以下のように表される。

$$k_{ET} = \frac{2\pi}{\hbar} \frac{|V|^2}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \exp \left[-\frac{(\lambda + \Delta G)^2}{4\pi\lambda k_B T} \right] \quad (1)$$

ΔG は反応の自由エネルギー差, λ は反応前後の反応分子と溶媒の核の再配置エネルギー, k_B はボルツマン定数, \hbar はプランク定数, T は系の絶対温度である。 $|V|^2$ はD-A間の電子交換相互作用の強度を表し, D-A間の距離(R)の増加とともに指数関数的に減少する。電子移動速度は R が一定ならば, $\lambda = -\Delta G$ のとき最大となることが期待される。室温(293 K)での k_{ET} は, ΔG と λ の単位をeV, R の単位をÅ, D-A間の原子の充填率 ρ ($0 < \rho < 1$)として, 次のような経験式に書き換えることができることが分かっている³⁾。典型的なタンパク質の内部では $\rho = 0.76$ 程度である。

$$\log_{10} k_{ET} = 13 - (1.2 - 0.8\rho)(R - 3.6) - 3.1(\lambda + \Delta G)^2/\lambda \quad (2)$$

RC内部では電子移動速度が最大となるように λ は調整されており($-\Delta G$ と λ はほぼ等しい), その場合, 電子移動速度は R のみに依存することになる^{3,4)}。電子受容体間の距離は約5 Åから10 Å

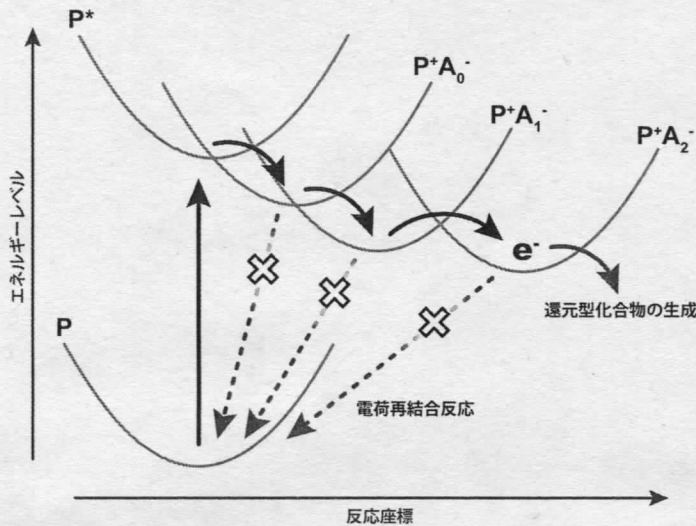


図1 RC内部での電子移動機構

各電子受容体間の迅速な電子移動反応(実線矢印)を実現することにより、電荷再結合反応(点線矢印)を抑えている。放物線は各状態のエネルギーレベルを示している。

程度であり、各ステップの電子移動反応はピコ秒からナノ秒のオーダーで完了するように配置されている⁵⁾。一方、各電子受容体とPの間の距離は15 Å以上あり、電荷再結合反応の速度はマイクロ秒オーダー以上の遅い時定数となる。このような反応機構により、電荷再結合反応を避けて電子移動の逐次反応が進行するようになっている(図1)。

3 光合成反応中心の分子的基盤

3.1 タイプI型とタイプII型

現在の地球上に存在する光合成生物のRCは、末端電子受容体の分子種によって2種類に大別することができる⁵⁾。鉄硫黄(FeS)クラスター([4Fe-4S]型クラスター)をもつRCをタイプI型(FeS型)、キノン分子(ベンゾキノン類あるいはナフトキノン類)をもつRCをタイプII型(Q型)と呼ぶ(図2)。タイプI型RCのFeSクラスターは非常に低い酸化還元電位をもち、NADP⁺を還元するのに十分な還元力を提供できる。一方、タイプII型RCは生成するキノール分子の還元力でNADP⁺を還元することは不可能であるが、逆に高いP⁺/Pの酸化還元電位を実現している。植物やシアノバクテリアが行う酸素発生型光合成では、この性質を巧みに利用し、タイプII型RCである光化学系II(Photosystem II, PS2)とタイプI型RCである光化学系I(Photosystem I, PS1)が直鎖状の電子伝達経路(Zスキーム)を構成し、水分子の酸化からNADP⁺の還元までの反応を進めている。それに対して光合成細菌が行う非酸素発生型光合成では、どちらか一方のRCのみ

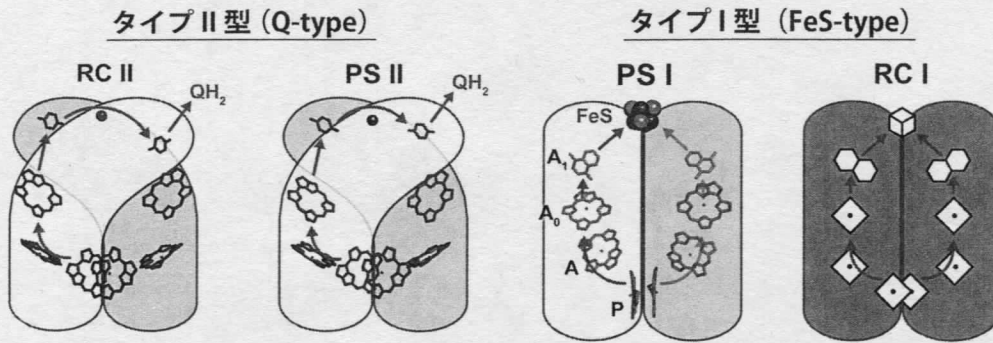


図2 4種類のRCの電子伝達経路とコアタンパク質の比較

P: スペシャルペア, A: アクセサリー色素, A₀: 一次電子受容体 (タイプI型ではクロロフィル, タイプII型ではフェオフィチン), A₁: 二次電子受容体 (キノン)。タイプI型は末端電子受容体として鉄硫黄クラスター (FeSクラスター) をもち, タイプII型はキノン分子もつ (二電子還元を受けてキノールとなる)。コアタンパク質は二量体構造をとっている。

をもつ。緑色硫黄細菌, ヘリオバクテリア, クロラシドバクテリアにはタイプI型RCが, 紅色細菌, 緑色糸状細菌にはタイプII型RCが存在する。それぞれはPS1およびPS2と機能的に似通っているものの, 光合成色素の分子種およびその色素を結合しているコアタンパク質の一次構造が大きく異なっている。本稿ではPS1やPS2と区別するために, それぞれをRC1およびRC2と呼ぶことにする。

PS1, PS2, RC1, RC2の計4種類のRCのうち, RC1以外の3種類では既に2.5 Å分解能以上の立体構造が決定されている。これら3種類のRCは光合成色素や構成サブユニットの多様性とは裏腹に, 電子伝達成分の配置やコアタンパク質のフォールディングモチーフは非常によく似ている (図2)。機能的に異なるRCが非常によく似た立体構造をもつことは, 共通の祖先型RCから進化してきたことを強く示唆している^{6,7)}。コアタンパク質は相同性の高い2本のコアポリペプチドから成るヘテロダイマーであり, その内部に電子伝達成分が軸対称 (C₂対称) な2本の電子伝達経路を形成するように配置されている。PS1では2本の経路のうち片方が優先的に使用される。PS2とRC2では2本の経路は機能的に完全に非対称で片方のみが機能し, 反応の最終段階では両経路をまたぐ電子移動が連続的に2回進行することで二電子還元を受けたキノールが生じる。このような非対称な電子移動は, ヘテロダイマーが2本の経路上で異なる物理化学的環境を作りあげていることに起因する⁴⁾。分子進化学的な視点から, 2本のコアポリペプチドは遺伝子の重複により生じ, 各RCにおいて独自にヘテロ化したものと考えられる⁷⁾。とりわけPS2とRC2においては, 30億年以上とも言われる長い光合成の進化の過程で, 全く同じ仕組みで作動する非対称な電子移動経路を作りあげたことは興味深い (この点については後述する)。

3.2 ヘテロダイマー型とホモダイマー型

PS1, PS2, RC2のコアタンパク質がヘテロダイマー構造であるのに対して, 緑色硫黄細菌, ヘリオバクテリア, クロラシドバクテリアがもつRC1のコアタンパク質は同一の2本のポリペプチドから成るホモダイマー構造をとる⁸⁻¹⁰。コアタンパク質がヘテロダイマー構造のRCはヘテロダイマー型, ホモダイマー構造のRCはホモダイマー型と呼ばれている。全てのRC1はホモダイマー型であり, PS1やタイプII型RC (PS2とRC2) にホモダイマー型RCは見つかっていない。現時点において, 残念ながらホモダイマー型RCの結晶構造は決定されていない。しかしヘテロダイマー型RC間の構造的類似性をもとに, ホモダイマー型RCのコアタンパク質は完全にC₂対称な構造をもち, 内部に存在する2本の電子伝達経路は構造的にも機能的にも完全に対称であると推測されている (図2)。

ホモダイマー型RCの中では緑色硫黄細菌のRCが最も古くから研究されており, ヘリオバクテリアのRCがそれに次いでよく研究されている。しかし, 緑色硫黄細菌とヘリオバクテリアは偏性絶対嫌気性の細菌であり, 酸素存在下ではRC内の[4Fe-4S]型クラスターや光合成色素が破壊されてしまうため, 両者のRCの研究には嫌気的な操作が必要になる^{8,9}。クロラシドバクテリアは2007年に新しく見つかった光合成細菌で, 好気的な環境で生育することができる¹³。そのRCは

表1 タイプ1型RCの生化学的性質の比較

	緑色硫黄細菌 (<i>Chlorobaculum tepidum</i>)	ヘリオバクテリア (<i>Helio bacterium modesticaldum</i>)	クロラシドバクテリア (<i>Candidatus Chloracidobacterium thermophilum</i>)	光化学系I (<i>Thermosynechococcus elongatus</i>)
サブユニット数	4	2	2	12
サブユニットの名称	PscA-D	PshA, B	PscA, B	PscA-F, J-M, I, X
コアタンパク質, 分子量	(PscA) ₂ , 82 × 2 kDa	(PshA) ₂ , 67 × 2 kDa	(PscA) ₂ , 99 × 2 kDa	PsaA/PsaB, 83 + 83 kDa
F _A /F _B タンパク質, 分子量	PscB, 24 kDa	PshB, 5 kDa	PscB, 19 kDa	PsaC, 9 kDa
色素組成	16 BChl <i>a</i> 4-6 Chl <i>a</i> _{PD} 6-8 carotenoids	22-40 BChl <i>g</i> 2 8'-OH-Chl <i>a</i> _F ~2 carotenoids	12-14 BChl <i>a</i> 2 Chl <i>a</i> _{PD} 2 Zn-BChl <i>a</i>	96 Chl <i>a</i> 22 carotenoids
一次電子供与体(P)	P840, (BChl <i>a</i>) ₂ or (BChl <i>a'</i>) ₂	P800, (BChl <i>g</i>) ₂ or (BChl <i>g'</i>) ₂	P840, (BChl <i>a</i>) ₂ or (Zn-BChl <i>a'</i>) ₂	P700, Chl <i>a</i> /Chl <i>a'</i>
一次電子受容体 (A ₀)	Chl <i>a</i> _{PD}	8'-OH-Chl <i>a</i> _F	Chl <i>a</i> _{PD} ?	Chl <i>a</i> _F
二次電子受容体 (A ₁)	MQ-7?	MQ-9?	?	PhQ
三次電子受容体 (F _x)	F _x , [4Fe-4S]	F _x , [4Fe-4S]	F _x , [4Fe-4S]?	F _x , [4Fe-4S]
末端電子受容体 (F _A /F _B)	F _A /F _B , 2[4Fe-4S]	F _A /F _B , 2[4Fe-4S]	F _A /F _B , 2[4Fe-4S]?	F _A /F _B , 2[4Fe-4S]
周辺集光装置	~6 FMO (8 BChl <i>a</i> /FMO)	-	~6 FMO (8 BChl <i>a</i> /FMO) ~12 CbpC (3 carotenoids/ CbpC)	-

酸素耐性をもつと考えられており、ホモダイマー型RCの新しい研究材料として注目されている。これら3種類の光合成細菌は門レベルで異なる生物群に分類されるため、同じタイプI型に分類されるホモダイマー型RCをもつとは言え、RCの色素やタンパク質にはそれぞれ特徴が見られる。表1にホモダイマー型RC1の生化学的な特徴をヘテロダイマー型PS1と比較して示している。

RC1はサブユニット数が少なく、PS1よりも単純な分子的基盤をもつ。コアタンパク質が結合する集光性色素の数(アンテナサイズ)はPS1の1/3~1/6程度である。また電子移動経路は、一次電子供与体から末端電子受容体のFeSクラスターに至るまでPS1とほぼ共通していると推測されている。Pはスペシャルペアと呼ばれるバクテリオクロロフィル(BChl)の二量体、 A_0 はクロロフィル(Chl) a 、 A_1 は存在が確定していないがメナキノン(後述)、 A_2 は[4Fe-4S]型クラスターの F_x 、末端電子受容体は親水性タンパク質(F_A/F_B タンパク質)が保持する2[4Fe-4S]型クラスターの F_A/F_B である⁸⁻¹⁰。光合成細菌は主要な光合成色素としてBChl分子をもつにも関わらず、全てのRC1で A_0 がChl a であることは興味深い(側鎖の構造は若干異なるが、物理化学的性質はほぼ同じと考えてよい)。紅色細菌や緑色糸状細菌がもつRC2はChl a を機能性分子として利用することはなく、 A_0 として働くChl a 分子の性質はRC1の機能に深く関わっていると推測される。Pは全てのRC1でBChlあるいはそのC13²位エピマーのホモダイマーであるが⁸⁻¹⁰、PS1のスペシャルペアP700はChl a とChl a' (Chl a のC13²位エピマー)のヘテロダイマーである。Pを構成する色素の異性体組成の違いは、コアタンパク質の構造的な違い(ホモダイマー型とヘテロダイマー型)を反映しているのであろう。

4 ホモダイマー型反応中心の構造機能相関

4.1 特異な電子移動反応

RC1とPS1のもつ電子伝達成分には共通した点が多いため、RC1での電子移動機構はPS1をモデルに理解される。電子移動反応は高速の過渡吸収変化や時間分解ESRの測定によって調べられており、各素反応は速度論的に解析されている^{8,9}。クロラシドバクテリアのRC1については[4Fe-4S]型クラスターをもつ標品の調製に成功しておらず、電子移動反応の速度論的な解析の報告はない。図3に緑色硫黄細菌とヘリオバクテリアのRCの電子移動反応スキームをPS1と比較している。

電子移動反応の経路や速度論は、RC1とPS1でよく似ているが、大きな相違点が2つある。ひとつは A_0^- の再酸化速度である。PS1では、 A_1 への電子移動に伴って A_0^- は20~30 ps程度で再酸化される。緑色硫黄細菌、ヘリオバクテリアでは A_0^- の再酸化速度はともに600 ps程度であり、 A_1 への電子移動と判断するには極めて遅い^{8,9}。このことからRC1には A_1 として働くキノンが存在しないと主張する研究グループがある。しかしながらこれまで述べてきたRCの分子的基盤をもとに考えるなら、RC1とPS1の立体構造は酷似しているはずである。さらに A_0 から F_x への直接の電子移動を仮定した場合、電子移動理論から導き出された式(2)を用いて推定した時定数は約1マイ

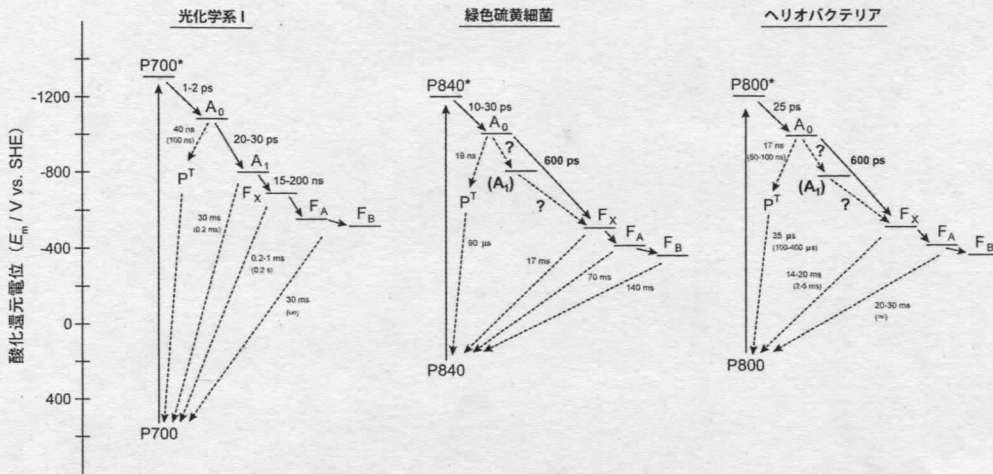


図3 タイプI型RCの電子移動反応スキームの比較

反応の方向を矢印で示し、時間は室温（カッコ内は低温77 K以下）での反応時間（時定数）である。

クロ秒 ($R = 15.5 \text{ \AA}$, $\rho = 0.76$) となり、実験で求められた時定数よりも圧倒的に遅くなってしまふ。この矛盾をどのように解決すればよいのであろうか。RC1の色素分析からは、RC当たり1~2分子程度のメナキノン分子が存在していることが分かっている^{8,9)}。またヘリオバクテリアのRCでは、極低温の時間分解ESR測定によって過渡的なセミメナキノンラジカルの生成も観測されている¹⁴⁾。我々はRC1には電子受容体として機能するキノン分子が存在すると考えているが、この問題に関しては依然として議論が続いている。

もう一つは、極低温での電子移動反応の挙動が異なる点である。PS1では、 A_1/F_x 間の電子移動反応の熱的なエネルギー障壁が高く、極低温で反応は完全に止まってしまう¹⁵⁾。しかし緑色硫黄細菌とヘリオバクテリアのRC1では初期電荷分離後、極低温下でも F_x までの電子移動が進行することが観測されている^{8,9)}。このような挙動は、PS1の立体構造をそのままRC1に当てはめて考えたとしても理解できない。

PS1のキノン分子は疎水的な結合ポケットに存在し、トリプトファン残基との π - π 相互作用により強く結合している。一方、PS1の結晶構造を基にRC1のキノン結合部位を分子モデリングすると、親水的な結合ポケットが得られる¹⁶⁾。このことはRC1のキノン分子周辺構造がPS1とは全く異なるか、結合部位自体が別な場所にあることを示唆しているのかも知れない。

4.2 未解明課題への挑戦

ここで紹介した特異な電子移動反応の機構を解明する直接的な糸口は、RC1の結晶構造解析であろう。多くの研究者がその結晶構造の解明を大いに待ち望んでいる。しかしながら全てのRCの電子移動機構の研究において、最も重要で本質的な課題は2方向の電子移動経路の非対称化機構

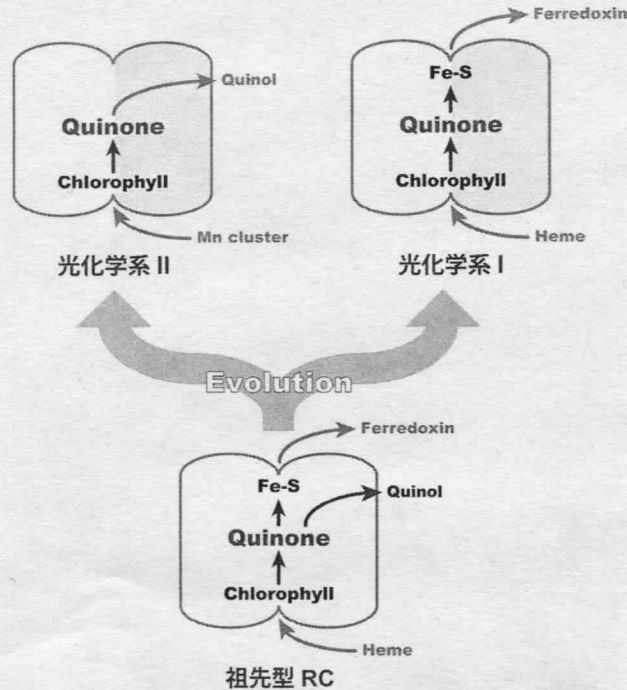


図4 「Selective-lossモデル」をもとにしたRCの進化過程

ホモダイマー構造の祖先型RCからヘテロダイマー構造のPS2(RC2)およびPS1が進化してきた。ここでは描いていないが、RC2の場合はChlorophyllの代わりにBacteriochlorophyllをもつ。

である。先に述べた分子進化学的背景から考えたとき、ホモダイマー型RCは非常に原始的な性質を保持していることが期待される⁶⁾。ホモダイマー型RCでの電子移動反応を原子レベルで理解し、2本の経路に機能的差異を与えるようなタンパク質変異を実験的に導入することが可能になれば、2方向の電子移動経路の非対称化機構を、進化的背景を考慮しながら調べることができるとは思われる。RC1の原子レベルでの電子移動反応の理解は、結晶構造の解明を待たねばならないが、我々は既に緑色硫黄細菌のRC1を人工的にヘテロダイマー化する実験系を確立している¹¹⁾。現在この手法を使い、対称な2本の電子伝達経路に機能的差異を与える因子を探索し始めている。

ここで電子移動経路の非対称化機構を考える上で、現在注目されている「Selective-lossモデル」と呼ばれるRCの進化モデルが参考になる。このモデルでは、ホモダイマー構造の祖先型RCがタイプI型とII型の両方の機能をもつことを仮定している^{6,12)}。この祖先型RCがヘテロダイマー化する際に、鉄硫黄クラスターとキノン分子のどちらか片方だけを末端電子受容体として残すことで、タイプI型とII型が分岐したと考える(図4)。これは言い換えれば現在のホモダイマー型RC1が、祖先型RCのようにタイプI型とII型の両方の機能をもつ可能性を指摘している。これまでPS1の単なるホモログと考えられてきたホモダイマー型RC1だが、共通点ではなく相違点に注

目することで、PS1とは異なる構造と機能を持つ可能性が見えてくる。RC1におけるキノン分子の機能と周辺構造を手がかりにすれば、これまで謎とされてきた、RCのヘテロダイマー化と機能分化の関係や全RCに共通した構築原理を解明できるかもしれない。

5 おわりに

RCにおける非対称な電子移動経路の存在は、電子移動反応の制御機構が構造と密接に関連していることを意味する。このことはRCの進化的成立過程を理解するための重要な鍵である⁶⁾。そのためには、コアタンパク質に生じたアミノ酸変異とそれによる電子移動反応の変化を特定する必要がある。しかしながら今まで述べてきたように、各RC間でコアポリペプチドの一次構造は多様化している上、光合成色素の分子種の変化も加わっており、一次構造上の変異部位と反応制御との関係を対応づけることは不可能である。現在、RCの非対称な電子移動機構の研究は、PS1、PS2、RC2の高分解能の結晶構造を基にした計算機上での理論的解析に限られている。このような閉塞した状況に対し、原子レベルでの実験的解析が可能な研究材料として我々が注目しているのがホモダイマー型RC1である。

文 献

- 1) R. A. Marcus, *J. Chem. Phys.*, **24**, 966 (1956)
- 2) R. A. Marcus *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **811**, 265 (1985)
- 3) C. C. Page *et al.*, *Nature*, **402**, 47 (1999)
- 4) M. Iwaki and S. Itoh, *Plant Cell Physiol.*, **35**, 983 (1994)
- 5) P. Heathcote *et al.*, *Trends. Biochem. Sci.*, **27**, 79 (2002)
- 6) M. F. Hohmann-Marriott and R. E. Blankenship, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **62**, 515 (2011)
- 7) S. Sadekar *et al.*, *Mol. Biol. Evol.*, **23**, 2001 (2006)
- 8) G. Hauska *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1507**, 260 (2001)
- 9) H. Oh-oka, *Photochem. Photobiol.*, **83**, 177 (2007)
- 10) Y. Tsukatani *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **287**, 5720 (2012)
- 11) C. Azai *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 803 (2011)
- 12) J. F. Allen, *FEBS Lett*, **579**, 963 (2005)
- 13) D. A. Bryant *et al.*, *Science*, **317**, 523 (2007)
- 14) R. Miyamoto *et al.*, *Biochemistry*, **47**, 4386 (2008)
- 15) K. Brettel, *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**, 322 (1997)
- 16) P. Heathcote *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, **358**, 231 (2003)