

タイプ1 反応中心の構造と機能－進化を通して考える構築原理－

大阪大学大学院理学研究科・大岡宏造

1. はじめに

光化学反応中心は、光合成の初期過程である光エネルギーの電気化学エネルギーへの変換を行う場であり、生体膜中に色素タンパク質複合体として存在する。複合体内には光エネルギーを吸収する（バクテリア）クロロフィル色素や一連の酸化還元反応に関与する電子伝達成分が存在するが、これらは決してでたらめに配向しているわけではない。タンパク質のある特定アミノ酸残基と相互作用することにより整然と配置されており、非常に高い量子収率（ $\psi = (\text{移動した電子の数}) \div (\text{吸収された光子の数}) \approx 1$ ；ほぼ 100%を意味する）で光エネルギー変換が行われている。光合成生物のもつこのような素晴らしい光化学反応系は、太古の地球上においていかに出来上がり、そして進化してきたのであろうか？我々はタイプ1（Fe-S 型）反応中心の構造と機能について、生物進化というシナリオの中で理解を深めていく作業を試みている。本講演では、始源型反応中心をもつと考えられる緑色イオウ細菌とヘリオバクテリアの反応中心に関する研究成果を紹介し、タイプ1 反応中心の構築原理を考察する。

2. 光化学反応とは

光化学反応は、ある特殊環境におかれたクロロフィル色素の二量体（P）が光エネルギーによって励起され（P*）、一次電子受容体（A）との間で初期電荷分離（P⁺A⁻）を引き起こすことにより始まる。生じた高いエネルギー状態の電子は、バケツリレーのごとく次々といろいろな電子伝達成分（B, C, …）に渡されていき、最終的には同化反応等に必要な還元力（NADPH）を作り出す。個々の反応の素過程（電子伝達反応）に要する時間はきわめて短く、初期電荷分離には約 3 ピコ秒、全体の反応でも約 100 マイクロ秒ぐらいで終結してしまう。

$h\nu$ （光エネルギー）

<反応スキーム> : PABC → P*ABC → P⁺A⁻BC → P⁺AB⁻C → … → NADPH

3. 2つのタイプの反応中心

光化学反応中心は、還元側の最終的な電子受容体（三次電子受容体）によってタイプ2（キノン型）とタイプ1（Fe-S 型）の2種類の反応中心に大別される（図1）。高等植物やシアノバクテリアの光合成電子伝達系はこれら両タイプの反応中心（それぞれ光化学系 II、I と呼ぶ）が b_6/f 複合体を介して直列につながっていて、水分子から電子をひきぬくことができる強い酸化力と、NADP⁺ を還元する強い還元力とを、同時に生み出すことが可能な仕組みになっている。一方、光合成細菌はどちらか 1 種類だけの反応中心しか持たず、紅色細菌はタイプ2、緑色イオウ細菌やヘリオバクテリアはタイプ1である。紅色細菌の反応中心は比較的安定で取り扱いが容易であったため、膜蛋白質複合体として、世界ではじめて X 線結晶構造解析が成功した（1985 年）。さらに 2001 年、シアノバクテリアの光化学系 I および II の立体構造が高分解能（それぞれ 2.5Å と 3.4Å）で報告された。当然ながら今後は構造的側面から分光学データの解釈へと大きく進展していくものと期待される。

しかしここで驚くべきことには、光化学系 I 反応中心を構成するコアタンパクのフォールディングモチーフや電子伝達成分の空間配置が、紅色細菌反応中心および光化学系 II 反応中心の

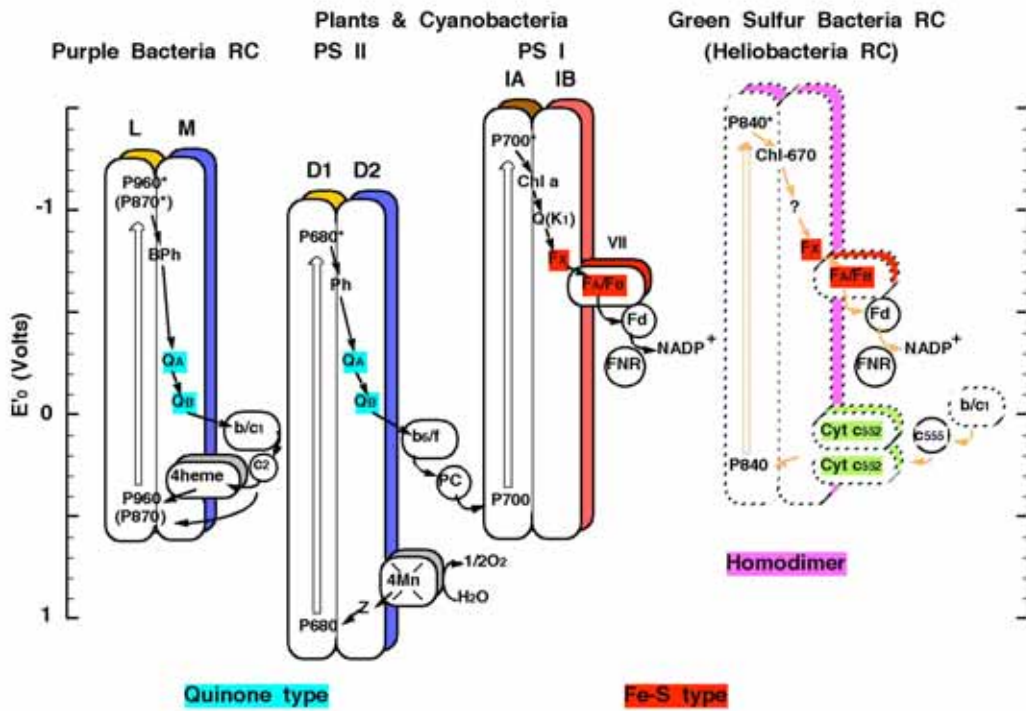


図1 タイプ2 (キノン型) とタイプ1 (Fe-S型) 反応中心

それらときわめて酷似していた。反応中心を構成するコアタンパクの一次構造を互いに比較すると、タイプ2 どちら（紅色細菌反応中心と光化学系 II 反応中心）では 10-20% のホモロジーは存在するが、タイプ1・2 間には全くホモロジーは見受けられない。一般に数億年から十数億年という長い時間スケールでの進化を知るには、タンパク質のアミノ酸配列よりも変化の遅い立体構造の情報が役に立つ。反応中心の場合もその例外ではなく、互いのアミノ酸配列に類似性がなくとも何らかの機能的制約を受けながら立体構造は保存されてきたと考えられる。タイプ2 とタイプ1 の反応中心は、同一の祖先型からそれぞれ独自の進化を遂げてきたことがうかがえる。構造はまさしく進化の出来事を記憶していたといえる。

3. ホモダイマー型反応中心の謎

ここで興味深い問題がある。タイプ2 反応中心のコアタンパクは、紅色細菌では L, M サブユニット、光化学系 II は D1, D2 サブユニットからなるヘテロダイマー構造をとる。同じくタイプ1 反応中心の光化学系 I は A, B サブユニットからなるヘテロダイマー構造である。意外なことに起源を同じくしているはずの緑色イオウ細菌およびヘリオバクテリアのコアタンパクは1 種類のサブユニットから構成され、ホモダイマー構造をとっている。実はこ

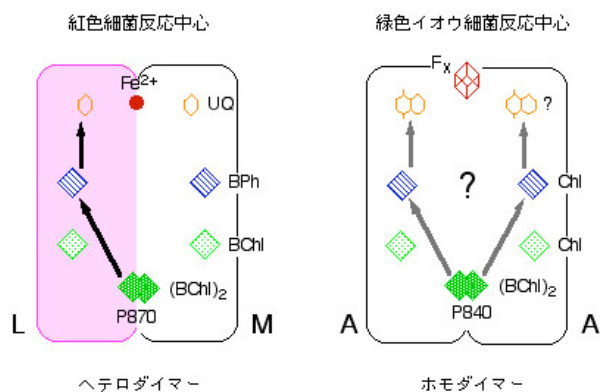


図2 ヘテロダイマーとホモダイマー

のことが、電子移動経路に重要な問題をなげかけている。紅色細菌型反応中心や植物・シアノバクテリアの光化学系 I および II の構造を見ると、ほぼ対称的な2つの反応経路が形成されている。ヘテロダイマーという非対称的なタンパク環境により、一方の経路のみを使って電子移動反応は行なわれている。もし緑色イオウ細菌およびヘリオバクテリアの反応中心が、対称的な蛋白環境を形成するホモダイマー構造をとっているとするならば、電子伝達成分の空間配置やその反応経路等、いったいどのようになっているのであろうか。長い進化の過程で、なぜヘテロ化が生じなかったのだろうか。ホモダイマー型反応中心の電子移動機構には、まだ誰も解き明かすことができていない謎が隠されている。

4. 緑色イオウ細菌の反応中心

絶対嫌気性である緑色イオウ細菌クロロビウム *Chlorobium* の光化学反応中心は酸素に対して非常に不安定であり、1990年代に入るまでその生化学的解析は手つかずの状態であった。すでに述べたが、1985年に報告された紅色細菌の反応中心の立体構造は、一次構造の情報と相俟って、シアノバクテリアや高等植物の光化学系 II との構造・機能上の類似性が認識され、反応中心の進化的連続性を明らかにした。それゆえに緑色イオウ細菌の反応中心に関してもそれを解析していくことの重要性が指摘され、研究の機運が一気に盛り上がった。我々も緑色イオウ細菌から反応中心複合体を単離する研究に着手した。いろいろな試みが挫折する中、嫌気的手法の導入によってようやく好熱性の緑色イオウ細菌 (*Chl. tepidum*) から安定な標品を得ることに成功した。

複合体の構成サブユニットは *pscA*~*D* の遺伝子によりコードされ、それぞれコアタンパク (PscA)、 F_A/F_B タンパク (PscB)、シトクロム c_z (PscC: モノヘム型で反応中心内に2分子存在する)、機能未知の18-kDaポリペプチド (PscD) の4種類からなる。これに集光性の*FMOタンパク質が結合しているが、現在得られている標品では励起エネルギーの移動効率が極めて低く、その原因はよく分かっていない。コアタンパクのアミノ酸配列は光化学系 I のそれと比較し16-18%程度の similarity であるが、タンパク構造の基本的なフォールディングモチーフや電子伝達成分の空間配置は極めて似かよっているものと想像される。そしてこの標品を用いて分子構築や分光学的諸性質および新規なクロフィル分子の構造を報告してきた。

1) 反応中心に存在する2分子のシトクロム c_z

すでに粗精製段階において、反応中心には Fe-S センター (F_A , F_B , F_X) の存在していることを報告していたが、酸化還元差スペクトルは P840 あたり2個のヘム c の存在を示唆していた。そこで我々が最終的に単離・精製した完全な標品を用い、連続フラッシュ照射実験から、この複合体標品にはモノヘム型のシトクロム c_z が2分子結合していることを明らかにした。今回の講演では触れないが、反応中心 P840 への電子供与体として働くシトクロム c_z が、構造的に大きく"揺らぎ"ながら機能していることを見いだした。生理学的にも意味があり、可溶性の電子伝達タンパクを介さずに、キノール酸化還元酵素 (b/c 複合体) から直接電子を受けとっていることを証明している。いずれこの2分子のシトクロム c_z の反応特性については、詳細に研究したいと考えている。

2) 一次電子受容体 (A_0) の分光特性

複合体標品には複数個 (約 8-9 個) のクロフィル色素 ($Chl\ a_{670}$) が含まれている。これらの機能と存在状態について、ウレア処理標品の閃光照射後のスペクトル変化を解析することにより調べた。その結果、一次電子受容体 (A_0) 成分として機能する一方、その他の $Chl\ a_{670}$ は

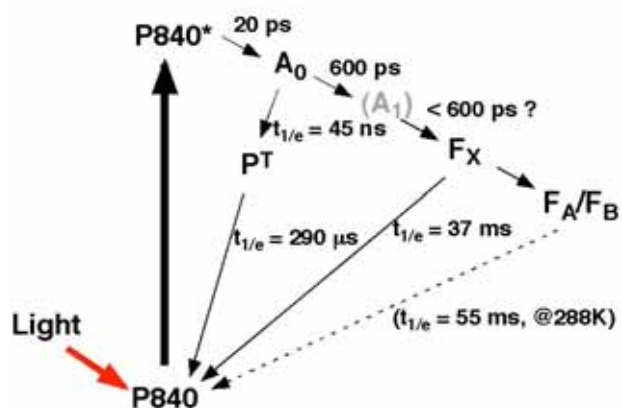


図3 緑色イオウ細菌の電子移動経路

アクセサリ色素として P840 周辺に存在していることが示された。ここで興味深いことがある。このウレア処理はウレア濃度を徐々に上げながら Fe-S センターを破壊する。この手法により光化学系 I では二次電子受容体 (A_1 : キノン分子) から P700 への電荷再結合が観測されている。緑色イオウ細菌反応中心では一次電子受容体 (A_0) と P840 との電荷再結合しか観測されず、キノンはウレア処理中に遊離したのか、あるいはもともと存在していないので

はないかと推測された。このことについては後で、電子移動理論の観点から考察する。

3) 新規なクロフィル分子の構造

クロフィル色素 (Chl a_{670}) は、1980 年代はじめにはすでにその存在が報告されていたが、その構造は不明であった。クロフィル a と同じ吸収スペクトルを示し、バクテリオクロフィル 663 (BChl 663, 663nm に Q_y ピークを示す) と呼ばれていたに過ぎない。一次電子受容体 (A_0) として機能するこの色素分子の構造を NMR により明らかにした。興味深いことに、この色素の環構造はバクテリアの光化学反応中心から抽出されたものであるに関わらず、植物型の光化学反応中心に見いだされる色素と同じクロリン環 (Chl a タイプ) であり、唯一異なるのはアルコール側鎖には二重結合がさらに 1 個付加していたことであった。タイプ 1 (Fe-S タイプ) 反応中心の一次電子受容体 (A_0) として機能する色素は、すべて植物型であることが判明した。

5. ヘリオバクテリアの反応中心

ヘリオバクテリアは 1983 年にはじめて見つかった光合成細菌で、研究の歴史そのものが新しい。このヘリオバクテリアのもつ反応中心もシアノバクテリアや高等植物の光化学系 I と同じタイプ 1 である。この光合成細菌はグラム陽性であり、集光性タンパクやアンテナ色素会合体をもたない。反応中心コアタンパクはホモダイマー構造と推測されているが、含まれる電子伝達成分やそれらの分子内配置・配向性は光化学系 I と同じであることが期待される。しかしながら報告されている測定データは断片的なものが多く、個々のデータは非常に曖昧なものが多い。その理由はこの反応中心が酸素に対して不安定であり、場当たりの測定が多く、緻密な測定結果に基づいた結論でないことに起因している。我々はタイプ 1 反応中心の構造と機能を統一的に理解するにはヘリオバクテリアに関する情報がどうしても必要であると考え、ヘリオバクテリアの反応中心の生化学的・分光学的解析にも着手することにした。

我々がまず行ったことは、緑色イオウ細菌の場合と同様に嫌気的手法を導入したことである。そして閃光照射等による吸収変化測定と ESR 測定の結果を互いに関連づけるような実験系を組み、これまで報告されている断片的なデータの再検証を行うことから始めることにした。幸い我々は、好熱性の *Heliobacterium modesticaldum* から安定なコアタンパク標品を単離することにも成功した。ここでは膜標品とコアタンパク標品の分光特性を比較しながら、ヘリオバクテリアの反応中心の構造と電子移動機構について考察する。

1) 膜結合型チトクロム c (PetJ)の反応特性

膜結合型チトクロムc (PetJ)は反応中心P798に直接電子を渡すことができる。しかしながらこれまで、その光酸化活性が非常に低くて不安定であることが問題であった。これについては2価カチオン (Mg^{2+}) の添加により著しく酸化活性が回復することを見だし、その反応特性について詳細に報告した。また膜結合型チトクロムc (PetJ) を介し、反応中心とキノール酸化還元酵素とが直接つながっていることを実験的に証明することにも成功した。チトクロムc (PetJ) のN末端システイン残基には脂肪酸が共有結合していて、膜にアンカーしていると推測されている。

2) FeSセンターの観測

膜標品とコアタンパクを用いて、ESRによるFe-Sセンターの観測を行った。膜標品ではジチオナイト添加によりセンターA、B (F_A および F_B) のシグナルが観測された。これはすでにNitschkeら (1990年) により報告されているとおりであった。極低温における光照射を試みたところ、膜標品においてセンターX (F_X) に由来すると思われるシグナルが初めて観測された。極低温においては F_X^- と $P798^+$ は電荷再結合を引き起こすらしく、後で述べる低温閃光照射実験で観測された3 msの成分は F_X との電荷再結合に由来することが明らかとなった。現在のところコアタンパクではセンターX (F_X) を観測することに成功できていない。

3) 電荷再結合の温度依存性

膜標品を用いた閃光照射実験では、 $P798^+$ の電荷再結合の半減期が室温から低温 (77K) にかけて徐々に短くなることが分かった。30ms の成分は F_A/F_B との電荷再結合であり、3ms の成分は F_X との電荷再結合に由来すると思われる。

同じくコアタンパク標品を用いた閃光照射実験においても、 $P798^+$ の電荷再結合の半減期が室温から低温 (77K) にかけて徐々に短くなることが分かった。20msと3msの成分は両者とも F_X との電荷再結合に由来すると思われる。しかしながらなぜ温度低下とともに電荷再結合の半減期が短くなっていくのかは現在のところ不明である。

4) 一次電子受容体 (A_0) の分光特性

コアタンパクでは低温 77K での $P798^+$ の電荷再結合は $t_{1/2} = 3 \text{ ms}$ であった。この標品をしばらく空気にさらしてから同様の実験をしたところ2段階($t_{1/2} = 100 \text{ ns}$, 3 ms) で減衰し (それぞれの大きさの比は約 1 対 2)、速い成分は一次電子受容体 (A_0) との電荷再結合であることが分かった。しかし二次電子受容体であるキノンの存在を示すデータは得られなかった。緑色イオウ細菌の反応中心の場合と同じく、ヘリオバクテリアにおいても電子伝達経路上にキノンが存在するかどうかは未だに不明である。

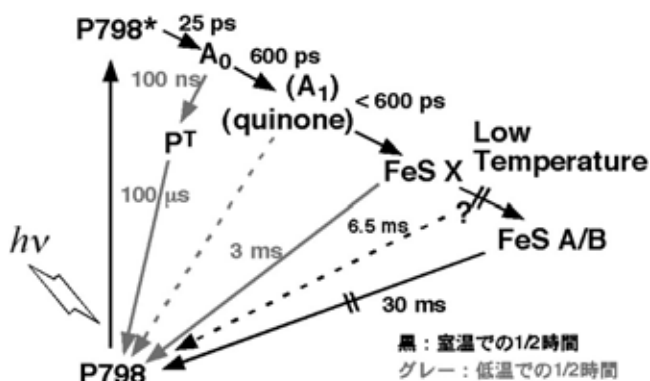


図4 ヘリオバクテリアの電子移動経路

6. キノンが握るタイプ1反応中心の本質

今まで述べてきたが、最終的にキノンの存在がホモダイマー型反応中心の大きな謎として残

った。光化学系 I 反応中心 (*Synechococcus elongatus*) の立体構造 (分解能 2.5Å) の座標情報を用いてキノン結合部位のホモロジーモデリングを実施したところ、キノンが結合すると思われる領域は非常に親水性のポケットを形成

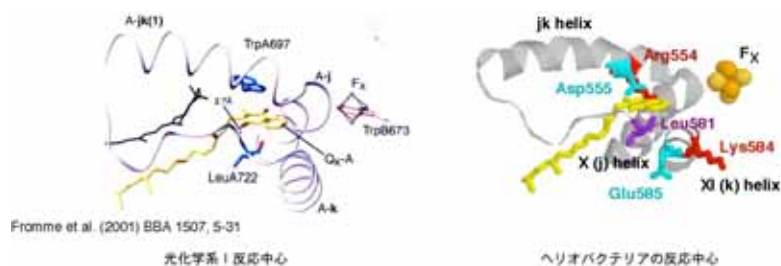


図5 キノン結合部位のモデリング

することが推測された。光化学系 I ではキノンはトリプトファンとの π - π interaction を通して強く結合していることが明らかとなっている。一方ヘリオバクテリアではトリプトファンの代わりにアルギニンが存在し、また、周辺には電荷をもつアミノ酸、Asp555、Lys584、Glu585 が存在していることが分かる。ヘリオバクテリアおよび緑色イオウ細菌ではキノンは存在していないのか、あるいは存在していたとしてもかなりゆるい結合で簡単にはずれてしまうのではないだろうか。

しかしながらこのモデリング結果だけからは性急な結論を導き出すのは当然危険である。初期電荷分離 ($P^+A_0^-$) 後の A_0^- の減衰は 600ps との報告がすでにある (つまり 600ps で次の電子受容体に電子が渡される) が、直接、 F_x に電子移動すると考えるにはかなりの無理がある。つまり電子移動理論からは、600ps という A_0^- の減衰を実現するには A_0 と F_x の間に何らかの電子伝達成分を想定するしかない。この約 10 年はある意味では地道な研究活動ではあったが、信頼度の高い標品の単離・精製に取り組みながら、さまざまな分光学的手法を用いてホモダイマー反応中心の電子移動機構の解析に取り組んできた。紅色細菌の反応中心がそうであったように、緑色イオウ細菌やヘリオバクテリアの反応中心は必ずや光化学系 I へ進化的に繋がっているはずである。最後に残ったキノンの問題は、タイプ 1 反応中心の構造と機能を本質的に解き明かす鍵を握っているような気がしている。

(参考文献)

1. H. Oh-oka, S. Kamei, H. Matsubara, M. Iwaki and S. Itoh (1995) *FEBS. Lett.* **365** (30-34)
2. H. Oh-oka, M. Iwaki and S. Itoh (1997) *Biochemistry* **36** (9267-9272)
3. T. Noguchi, Y. Fukami, H. Oh-oka and Y. Inoue (1997) *Biochemistry* **36** (12329-12336)
4. H. Oh-oka, S. Kamei, H. Matsubara, S. Lin, P.I. van Noort and R.E. Blankenship (1998) *J. Phys. Chem. B* **102**: 8190-8195
5. H. Oh-oka, M. Iwaki and S. Itoh (1998) *Biochemistry* **37** (12293-12300)
6. S. Takaichi and H. Oh-oka (1999) *Plant Cell Physiol.* **40**: 691-694
7. M. Iwaki, S. Itoh, S. Kamei, H. Matsubara and H. Oh-oka (1999) *Plant Cell Physiol.* **40**: 1021-1028
8. M. Kobayashi, H. Oh-oka, S. Akutsu, M. Akiyama, K. Tominaga, H. Kise, F. Nishida, T. Watanabe, J. Amesz, M. Koizumi, N. Ishida and H. Kano (2000) *Photosynth. Res.* **63**: 269-280
9. H. Oh-oka, M. Iwaki and S. Itoh (2002) *Photosynth. Res.* **71**: 137-147
10. H. Oh-oka and R. E. Blankenship (2004) *In Encyclopedia of Biological Chemistry (in press)*