

ヘムタンパク質の化学的改変による人工光捕集系の開発



研究ノート

大 洞 光 司*

Construction of Hemoprotein-based Artificial Light Harvesting Systems
by Chemical Approach

Key Words : Heme, Porphyrin, Energy transfer, Supramolecular assembly

はじめに

鉄ポルフィリン錯体であるヘムは、タンパク質に結合し、ヘムタンパク質として生体内で様々な役割を担っている。特にタンパク質が作り出す環境は、鉄中心の反応性や物理化学的性質は高度に制御し、単純な電子移動反応から複雑な触媒反応までの機能を示している。生物無機化学の分野では、これらのヘムタンパク質を含む金属タンパク質の生理学的な役割に加えて、構造や物理化学的性質に基づく詳細な作用機序の解明などを明らかにし、学理を構築してきた¹⁾。最近では、それらの知識や技術を適用し、ヘムタンパク質の変異体を非天然反応に応用する研究が盛んに行われている。またヘムタンパク質においては生化学的な変位導入だけでなく、合成化学的なアプローチとして、合成したヘム類縁体をヘムと置換する再構成法により、その性質を大きく改変して人工金属酵素へと展開できる²⁾。本稿では、最近の取り組みとして、再構成法を用いたヘムタンパク質を基盤とする人工光捕集系の構築について記す^{3,4)}。

光捕集系は天然光合成系に含まれる色素の集合体である。光子密度の低い太陽光において、局所プロトン濃度の勾配を作り出すプロトンポンプの駆動や水の酸化など多電子移動反応を実現するために光捕集系は必須の要素である。光捕集系は同一の色素が、

多数、タンパク質により並べられた構造をしている。特に紅色光合成細菌の光捕集系である LH2 は、よく研究されており、環状に整列されたクロロフィル分子が同一色素間の連続的なエネルギー移動であるエネルギーマイグレーションを高い効率で実現し、反応中心に光励起エネルギーを移動させている (図 1)。一方で、LH2 をはじめとする光捕集系は膜タンパク質でありその取り扱いが容易ではない。この観点から、様々な手法で人工光捕集系の構築が試みられてきた。合成化学的に色素を集合化する手法やウイルスキャプシドなどのタンパク質多量体へ共有結合的に色素を修飾する手法などが実施されてきた。著者らは、ヘムとクロロフィルの構造および性質の類似性に着目し、適切なヘムタンパク質を土台とすれば、ポルフィリン系の色素を再構成法により集合化した人工光捕集系が構築できると考えた (図 2)。

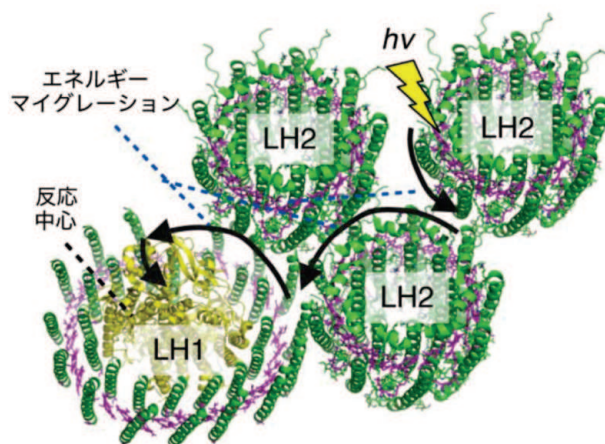


図 1 紅色光合成細菌における光捕集系とエネルギーマイグレーションの模式図

ヘムタンパク質六量体の再構成による人工光捕集系構築

タンパク質の構造データベース (Protein Data Bank) より、構造既知のヘムタンパク質の中で、天



* Koji OOHORA

1985年3月生まれ
大阪大学大学院 工学研究科 応用化学
専攻 博士後期課程 (2011年)
現在、大阪大学大学院 工学研究科応用
化学専攻 准教授 博士 (工学)
TEL : 06-6879-7929
FAX : 06-6879-7930
E-mail : oohora@chem.eng.osaka-u.ac.jp

然の多量体をピックアップし、その中からヘム-ヘム間距離が短く、比較的分子量の小さいものを探索したところ、2007年に Dobbek らにより報告された Hexameric tyrosine-coordinated heme protein (HTHP, PDB ID: 2OYY) が該当するヘムタンパク質の一つとして見つかった (図2)。

HTHP は、海洋性細菌に共通する遺伝子配列に保存されており、天然の機能や役割は不明である一方で、六回対称軸を持つ同一のポリペプチド鎖からなるホモ六量体であり、一つのポリペプチド鎖に非共有結合的にヘムが一分子結合したユニークな構造をしている。また熱安定性が非常に高く、120℃でも変性しない。まず、この HTHP の発現系を大腸菌により構築し、実際に調製した。既報の結晶構造に一致する六量体の分子量が ESI MS により観測され、また動的光散乱やサイズ排除クロマトグラフィーにおいても予測値と一致するサイズを示した。次に、酸性条件下でのヘムの脱離と有機溶媒を用いたヘムの抽出によるアポタンパク質の調製を試みた。ヘムタンパク質のアポタンパク質は、必ずしも安定に得られるわけではなく、酸性条件下でヘムが脱離しない、アポタンパク質が著しく不安定などの要因により、得られないこともある。幸いなことに HTHP の場合は、pH 1.8 程度でヘムを抽出可能であり、アポタンパク質も六量体を保ったまま安定であることがわかった。光捕集系として扱うために、得られたアポタンパク質 (apoHTHP) に光増感色素として機能する亜鉛ポルフィリンを挿入した。チロシンが配位した亜鉛ポルフィリンに特徴的な可視紫外吸収スペクトルが確認され、再構成 HTHP (rHTHP) の形成が示された。また対照実験に用いるために、完全に再構成された rHTHP に apoHTHP を添加することで、亜鉛ポルフィリンが不足した rHTHP を調製した。円二色性スペクトルにおいて大きな違いが観測され、完全に再構成された rHTHP では、亜鉛ポルフィリン間の励起子相互作用による分裂型のコットン効果を示すことが明らかになり、想定した構造の rHTHP が得られ、十分にエネルギー移動可能であることが示唆された。本系について、消光剤の添加を行い、蛍光スペクトルと吸収スペクトル測定において滴定実験を実施したところ、蛍光スペクトルから観測される結合定数が、吸収スペクトルから得られる結合定数の 2.3 倍であ

った。このずれは、蛍光スペクトルから算出した結合定数がエネルギーマイグレーションを介した消光を含んでいるためと考えられる。実際、部分的に再構成された rHTHP ではこれらの結合定数は一致し、エネルギーマイグレーションが観測されないことがわかっており、完全に再構成された rHTHP が人工光捕集系として機能することを示している。また励起後の過渡吸収スペクトル測定においては重項励起状態同士のアニヒレーションが起こっており、天然光捕集系に観られる特徴と一致している。本系は、超分子的なタンパク質と色素の相互作用を利用しているため、ウィルスキヤプシド等の共有結合で色素を修飾するタイプの人工光捕集系に比べて、簡便に調製可能であり、また色素の合成の観点でも有利である。実際、亜鉛ポルフィリン以外でも亜鉛クロリン誘導体においても機能することを確認しており、汎用性が高いことを明らかにしている。

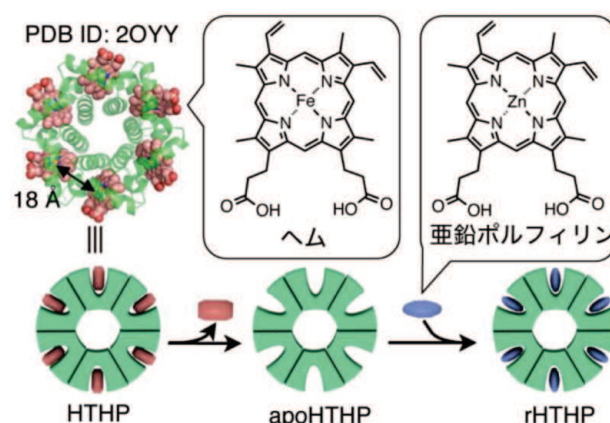


図2 HTHP の結晶構造とヘムの亜鉛ポルフィリンによる置換による人工光捕集系の開発

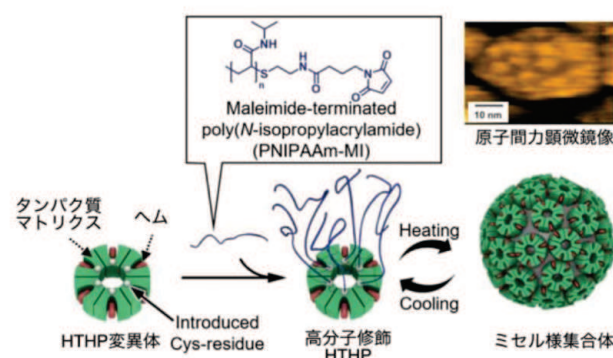


図3 HTHP の巨大集合体構築の模式図と原子間力顕微鏡像

タンパク質の集合化による巨大光捕集系の開発

光捕集系は太陽光の光子密度の低い光を集める必要があるため、大きな構造が必要である。前項で示したrHTHPは5 nmほどの大きさしか有さないため、さらなる巨大化が必要である。目的にも依るが数十～数百 nm ほどの大きさが少なくとも必要である。タンパク質の集合化の研究は、この二十年ほどで飛躍的に発展しており、生化学的、化学的アプローチ、共に多数の報告がある。HTHP が熱安定性に優れていることから、温度応答性高分子を用いたミセル様集合化を考えた。加温時において、高分子が親油性部位、HTHP が親水性部位になると考えた。HTHP に反応点としてシステインを導入した変異体を遺伝子組み換えした大腸菌により調製し、マレイミド基を有するポリイソプロピルアクリルアミドを修飾した (図 3)。設計通り、加熱時に、濃度に依存せず、50 nm ほどの大きさの集合体を形成することが動的光散乱により明らかになり、また高速原子間力顕微鏡を用いることで5 nm ほどのユニットが表面に提示された50 nm ほどの球状集合体を直接観測した (図 3)。ヘムを亜鉛ポルフィリンや亜鉛クロリンに置換した集合体を調製したところ、集合前に比べて約三倍の光捕集能を示した。巨大集合体一つあたり、数百の色素分子を含んでいると見積もられる。約十分子ほどの色素から光を一箇所に集めることができる光捕集能が示唆された。

おわりに

本稿では、ヘムタンパク質六量体を基盤とする人工光捕集系の開発と、数百の色素が集合化した巨大光捕集系への展開を記述した。今後は、さらなる光

捕集能の効率化と触媒分子の融合による人工光合成への展開が期待される。本稿で紹介した系以外でも、タンパク質の集合化に取り組んでおり、タンパク質の構造や機能、特性を活かした新しいバイオマテリアルの開発をめざしている。タンパク質は大規模な工場を必要とせずに生産することができ、有機溶剤等も使用せず、環境への負荷も小さい。将来的に、人工タンパク質によってエネルギーや高機能材料の自在な生産が可能になれば、石油資源に依存しない、新しい形の持続可能社会が描けると期待している。

謝辞

本稿における研究は、大阪大学大学院工学研究科林高史教授の主催する研究室で実施されました。林教授はじめ、研究に従事した学生および共同研究者に深く感謝します。また研究の一部は、科学研究費補助金 (JP16H06045) の支援を受けて行われたものであり、深謝いたします。

参考文献

- 1) 城宜嗣・青野重利・齋藤正男:「ヘムタンパク質の科学～生理機能の理解とその展開に向けて～」, エヌ・ティー・エス (2022)
- 2) K. Oohora, T. Hayashi, *Dalton Trans.* **2021**, 51, 1940–1949.
- 3) K. Oohora, T. Mashima, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, T. Hayashi, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 11138–11140.
- 4) S. Hirayama, K. Oohora, T. Uchihashi, T. Hayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142, 1822–1831.

