



# Structural and functional roles of calcium ion in photosynthetic membrane protein complexes

Yong, Li

---

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2014-03-25

(Date of Publication)

2020-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6024号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006024>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



### 博士論文内容の要旨

氏 名 永 麗

専攻・講座 生命機能科学専攻・応用生命化学講座

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

#### Structural and functional roles of calcium ion in photosynthetic membrane protein complexes

(光合成膜蛋白質複合体におけるカルシウムイオンの構造  
的および機能的役割)

指導教員 大野 隆

Photosystem II (PSII) from oxygenic phototrophs is evolutionarily related to anoxygenic purple bacteria, as evidenced by the similarities in their heterodimeric reaction center (RC) and quinone-mediated electron transport system (type-II RC). The purple bacterial photosystem lacks  $Mn_4CaO_5$  cluster, the catalytic center of the photosynthetic water oxidation, and certain extrinsic proteins which reside ubiquitously in the periphery of PSII. In purple bacteria, a circular light-harvesting pigment-protein complex known as LH1 is closely associated with the RC to maintain the structure and function of the bacterial photosystem. In the photosynthetic organisms with type-II RCs, calcium ion is an essential cofactor and intimately related with the differences between the ancestral and the evolved phototrophs. The roles of  $Ca^{2+}$  are significant for understanding how the photosynthetic organisms have utilized Ca ions in response to their living environment and during the process of the evolution.

In Chapter 2, the structural and functional roles of Ca ions in purple bacteria, the ancestral phototrophs with type-II RCs, were investigated. The LH1-RC complex from purple sulfur bacterium *Thermochromatium (Tch.) tepidum* is believed to enhance the thermal stability upon the binding of  $Ca^{2+}$  to the C-terminus of LH1-polypeptides although their molecular mechanisms are largely remained to be resolved. Here, I applied perfusion-induced ATR-FTIR spectroscopy to highly purified LH1-RC complexes from *Tch. tepidum*, and detected for the first time metal-sensitive fine structural changes involved in the enhanced thermal stability of this complex. The *Tch. tepidum* LH1-RC complex exhibited  $Sr^{2+}/Ca^{2+}$  ATR-FTIR difference bands that reflect changes of polypeptide backbones and amino acid residues upon the replacement of native  $Ca^{2+}$  with  $Sr^{2+}$ . The difference bands also appeared in the following  $Ca^{2+}/Sr^{2+}$  difference spectra with almost identical intensities but inverse signs, demonstrating that the structural changes induced by the metal exchange are fully reversible. A comparative

analysis using LH1 complexes lacking the RCs strongly indicated that the metal-sensitive bands originate from polypeptide backbones and amino acid residues at the putative  $\text{Ca}^{2+}$ -binding site in the C-terminal region of *Tch. tepidum* LH1 complexes.  $\text{Cd}^{2+}$ -substitution exhibited unique structural modifications, which may be responsible for the severely deteriorated thermal stability of  $\text{Cd}^{2+}$ -substituted complexes. Furthermore, the observed FTIR signals were tentatively assigned based on the isotopic shifts by uniform  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^2\text{H}$ -labelings of LH1-RC complexes. The molecular mechanism enhancing the thermal stability of *Tch. tepidum* LH1-RC proteins are proposed on the basis of the possible assignments of the ATR-FTIR signals and the recent structural information on the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding site.

In Chapter 3, the structural and functional roles of Ca ions in PSII from higher plants, the evolved phototrophs with type-II RCs, were investigated in connection with the extrinsic proteins that are lacking in the ancestral purple bacteria. Photosynthetic oxygen evolution occurs in an oxygen-evolving complex (OEC) of PSII although details of the reaction mechanism are not fully understood. Generally, one OEC includes one or two  $\text{Ca}^{2+}$ , depletion of which results in the loss of oxygen-evolving ability. In addition, an extrinsic protein PsbP is closely related with binding properties of the functional  $\text{Ca}^{2+}$ . Therefore, it is significant to understand functional and structural roles of  $\text{Ca}^{2+}$  and extrinsic proteins for elucidating the reaction mechanism of the photosynthetic oxygen evolution. In the present study, effects of depletion of  $\text{Ca}^{2+}$  and/or extrinsic proteins from the PSII on the oxygen-evolving ability and thermal stability of the OEC were examined using  $\text{Ca}^{2+}$ -depleted PSII samples prepared by different biochemical procedures. The oxygen-evolving activity of NaCl/EDTA preparation in which  $\text{Ca}^{2+}$  and extrinsic proteins (PsbP and PsbQ) are depleted was decreased to ~20% compared with untreated PSII. However, the oxygen evolution was completely suppressed when

only  $\text{Ca}^{2+}$  was removed from the PSII by Low-pH treatment. In addition, Low-pH preparation was less stable than NaCl/EDTA preparation. Based on these and other findings, it was proposed that the extrinsic protein, particularly PsbP, plays key roles to protect the OEC in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , whereas the PsbP may act as a metal-binding protein in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  to decompose the catalytic  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$  cluster, resulting in the loss of  $\text{O}_2$ -evolving activity and the deterioration of the structural stability.

氏名	永 麗		
論文 題目	Structural and functional roles of calcium ion in photosynthetic membrane protein complexes (光合成膜蛋白質複合体におけるカルシウムイオンの構造的および機能的役割)		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	大野 隆
	副査	教授	杉本 幸裕
	副査	准教授	金丸 研吾
	副査		
			印
			印

## 要 旨

光合成生物は集光性蛋白質により光エネルギーを捕集し、反応中心複合体における電荷分離反応および一連の光合成電子伝達反応を駆動させる。光合成の反応中心は、その電子伝達反応機構の型により鉄-硫黄クラスターを用いる Type-I とキノン分子を用いる Type-II に大別される。Type-II の反応中心を有する光合成生物には、酸素を発生しない紅色光合成細菌、酸素を発生する高等植物やシアノバクテリア由来の光化学系 II が含まれる。両者の光捕集反応中心複合体において  $\text{Ca}^{2+}$  は水の光酸化反応機構、複合体の構造形成、光エネルギー吸収特性の制御、耐久性等に関わる重要な因子であることが知られているが、これらの作用をもたらす分子機構の詳細については明らかにされていない。

学位申請者である永麗氏は、進化的に密接なつながりのある紅色光合成細菌由来の光捕集 1 反応中心 (LH1-RC) 膜蛋白質複合体と高等植物由来の光化学系 II 膜蛋白質複合体に着目し、これらの Type-II 反応中心膜蛋白質複合体の構造形成と機能保持に  $\text{Ca}^{2+}$  がどのように関わっているか、その作用機序を物理化学的な視点から解析し、得られた成果をまとめている。

本学位論文は 4 つの章から構成されている。第 1 章では光合成生物、特に Type-II の光合成反応中心を有する紅色光合成細菌由来の LH1-RC および高等植物やシアノバクテリア由来の光化学系 II について概説し、Type-II 反応中心における  $\text{Ca}^{2+}$  の役割について、これまでの研究背景を記述している。

第 2 章では好熱性紅色硫黄光合成細菌 *Thermochromatium (Tch.) tepidum* 由来の LH1-RC について、 $\text{Ca}^{2+}$  による耐熱化の分子機構を金属置換ならびに同位体置換を組み合わせた灌流誘起全反射吸収赤外分光法 (ATR-FTIR) により解析している。*Tch. tepidum* は非酸素発生型光合成を行う紅色光合成細菌の中で最も高い温度 (58°C) で生育する好熱菌である。*Tch. tepidum* 由来の LH1-RC はその光捕集蛋白質が反応中心の電荷分離反応に要する光よりも低エネルギーの光を吸収する特異的な性質を示すこと、および顕著な耐熱性を示すことが知られている。前者に関しては共鳴ラマン分光法を用いた研究プロジェクトに参画し、その成果は参考文献 (Biochimica et Biophysica Acta, vol.1817, pp.1022-1029, 2012) にまとめられている。一方、後者に関しては、*Tch. tepidum* 由来の LH1-RC が  $\text{Ca}^{2+}$  の除去により常温菌 *Allochromatium (Alc.) vinosum* 由来の LH1-RC と同程度の耐熱性に低下し、 $\text{Ca}^{2+}$  の再添加により回復することが報告されているが、 $\text{Ca}^{2+}$  結合サイトや、 $\text{Ca}^{2+}$  が超分子複合体中のどのような構造変化を誘起することにより耐熱性が向上するのか、その詳細な分子メカニズムについては不明であった。そこで、様々な環境変化による生体分子の構造変化を官能基レベルで詳細に解析することが可能な灌流誘起 ATR-FTIR 分光システムを構築し、計測条件を最適化することにより、溶媒環境中において金属置換に伴う LH1-RC 膜蛋白質複合体の微細な変化を検出することに初めて成功した。ATR プリズム上に野生型 LH1-RC の膜標品を形成し、ペリスタポンプを接続した自作のアクリルフローセルで密閉し、 $\text{Ca}^{2+}$  を含むバッファーから  $\text{Sr}^{2+}$  を含むバッファーに置換することにより、 $\text{Sr}^{2+}$  置換に伴う LH1-RC 蛋白質の主鎖およびアミノ酸側鎖に由来する特徴的な振動成分を観測した。これらの変化は  $\text{Sr}^{2+}$  から  $\text{Ca}^{2+}$  への再置換によりほぼ同じ強度で逆符号のバンドとして観測されたことから、これらの金属置換による構造変化が可逆的に起こることを見出した。このような金属カチオン依存的な構造変化は、類縁菌である *Alc. vinosum* 由来の LH1-RC では観測されなかったことから、*Tch. tepidum* 特有の現象であることを示した。

次に RC を含まない LH1 複合体を単離して同様の測定を行った結果、LH1-RC とほぼ同様のスペクトル

氏名	永 麗		
論文 題目	Structural and functional roles of calcium ion in photosynthetic membrane protein complexes (光合成膜蛋白質複合体におけるカルシウムイオンの構造的および機能的役割)		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	大野 隆
	副査	教授	杉本 幸裕
	副査	准教授	金丸 研吾
	副査		
			印
			印

が観測されたことから、金属結合部位ならびに金属結合に誘起される構造変化が LH1 に由来することを特定した。各バンドを帰属するため、生合成的に  $^{15}\text{N}$ -あるいは  $^{13}\text{C}$ -同位体標識した LH1-RC や、野生型 LH1-RC を生化学的に  $^2\text{H}$ -あるいは  $^{44}\text{Ca}$ -同位体標識した試料を用いて系統的に同位体置換の効果を検証した。その結果、同位体シフトの種類とシフト量から検出されたバンドの帰属を推定した。他の金属イオンによる影響を明らかにするため  $\text{Ba}^{2+}$  および  $\text{Cd}^{2+}$  置換の効果調べたところ、 $\text{Ba}^{2+}$  では  $\text{Sr}^{2+}$  とほぼ同様の変化が観測されたのに対し、 $\text{Cd}^{2+}$  では蛋白質のアミド結合およびカルボキシレート配位子に顕著な変化が見られた。同様の傾向は、酢酸の金属塩を用いたモデル解析でも確認された。 $\text{Cd}^{2+}$  置換によるバンドシフトの位置と変化量、先行研究で報告されている  $\text{Ca}^{2+}$  置換型 LH1-RC の著しい耐熱性の低下、および最近報告された  $\text{Ca}^{2+}$  結合サイトの情報を考慮した結果、 $\text{Ca}^{2+}$  が隣接する 2 つの  $\alpha\beta$  サブユニットのバインダーとしてサブユニット間の相互作用を向上させ、リング状 LH1 複合体の構造を強化することにより LH1-RC の耐熱性を向上させる分子機構を提唱した。本章の内容は *Biochemistry*, vol. 52, pp.9001-9008, 2013 に掲載されている。

第 3 章では高等植物由来の光化学系 II 膜蛋白質複合体について、光合成酸素発生反応機構における  $\text{Ca}^{2+}$  の構造的、機能的役割を在性蛋白質との関連性を含めて、種々の物理化学的手法により解析している。地球の酸化的大気環境を形成し、酸素呼吸型生物の進化を可能にした光合成酸素発生反応は葉緑体のチラコイド膜に存在する光化学系 II で起こり、その本質は 4 つのマンガンイオンと 1 つの  $\text{Ca}^{2+}$  が 5 つの酸素で架橋された  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$  クラスターによる水の光酸化反応である。しかしながら、その詳細な反応機構は明らかにされていない。これまでに光化学系 II あたり 1~2 個の  $\text{Ca}^{2+}$  が酸素発生に関与すること、 $\text{Ca}^{2+}$  の結合に在性蛋白質 PsbP が関与することが知られているが、 $\text{Ca}^{2+}$  や在性蛋白質が酸素発生反応において担う役割の詳細は不明である。本章では高等植物の光合成酸素発生反応における  $\text{Ca}^{2+}$  や在性蛋白質の構造的、機能的役割を明らかにするため、2 つの異なる手法で調製した  $\text{Ca}^{2+}$  除去標品について酸素発生能、熱安定性、 $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$  クラスターの酸化還元電位、在性蛋白質の金属結合能について比較することにより、酸素発生複合体の構造と機能における  $\text{Ca}^{2+}$  及び在性蛋白質の効果について検討した。

酸素電極やパルス変調クロロフィル蛍光計測システムを用いて各種光化学系 II 標品の酸素発生能を比較したところ、 $\text{Ca}^{2+}$  非存在下で在性蛋白質が結合した場合に酸素発生能が著しく抑制されることを見出した。精製した在性蛋白質 PsbP でも同様の効果が確認されたことから、 $\text{Ca}^{2+}$  非存在下において PsbP は酸素発生を阻害する効果があることを明らかにした。熱発光分析を行い、 $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$  クラスターの酸化還元電位を測定した。 $\text{Ca}^{2+}$  及び在性蛋白質非存在下ではクラスターは未処理の光化学系 II 標品と同様の酸化還元電位を示したのに対し、 $\text{Ca}^{2+}$  のみが除去された標品では酸化還元電位の顕著な低下が観測されたことから、 $\text{Ca}^{2+}$  非存在下では在性蛋白質の結合がクラスターの異常な性質を誘発することが強く示唆された。ATR-FTIR 分光法を用いて精製した在性蛋白質 PsbP と  $\text{Ca}^{2+}$  の相互作用を調べた結果、 $\text{Ca}^{2+}$  添加により PsbP の 2 次構造に顕著な変化が観測され、この蛋白質が金属結合蛋白質であることを支持する結果を得た。また、各種光化学系 II 標品の熱安定性を比較したところ、 $\text{Ca}^{2+}$  非存在下で在性蛋白質が結合した場合に著しく安定性が低下することを見出した。上記の結果とこれまでの報告をもとに、 $\text{Ca}^{2+}$  非存在下において金属結合蛋白質である PsbP が光化学系 II 反応中心に結合することにより、酸素発生複合体の異常な性質を誘発し、安定性を著しく低下させると結論づけた。本章の内容は *Molecular Photochemistry-Variou Aspects, InTech*, ISBN:978-953-51-0446-9, 2012 に掲載されている。

第 4 章では 2 章および 3 章の内容を総括し、Type-II 反応中心を持つ紅色光合成細菌由来の LH1-RC および高等植物由来の光化学系 II それぞれにおける  $\text{Ca}^{2+}$  の構造的および機能的役割について要約している。

本研究では、進化的に密接な関連性のある紅色光合成細菌ならびに光化学系 II における  $\text{Ca}^{2+}$  の重要性について検討した。具体的な進化の過程については未解明であるが、これらの Type-II 反応中心を有する光合成生物が構造形成および機能発現に必須の補因子として  $\text{Ca}^{2+}$  を利用している点は非常に興味深く、それらの役割の一端を明らかにしたことは重要な成果である。また、灌流誘起 ATR-FTIR 分光システムを構築し、水溶液系で金属置換による生体分子の微細な構造変化を検出可能にしたこと、そして同位体置換を組み合わせた詳細な分子機構の解析により極めて有益な知見をもたらしたことは特筆すべき成果であり、価値ある集積である。よって、学位申請者の永麗氏は、博士 (農学) の学位を得る資格があると認める。