

紅色光合成細菌の光反応中心タンパク複合体の FT-IR 分光測定

柴田江身子、藤井律子、橋本秀樹
大阪市立大学大学院 理学研究科

FT-IR DIFFERENCE SPECTRUM OF A 15-CIS CAROTENOID BOUND TO THE REACTION CENTRE FROM A PURPLE PHOTOSYNTHETIC BACTERIUM *RHODOBACTER SPHAEROIDES*

Emiko Shibata, Ritsuko Fujii, and Hideki Hashimoto

JST-CREST and Department of Physics, Graduate School of Science, Osaka City University

FT-IR difference spectroscopy was applied to the reaction centers (RCs) from a purple photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* in order to extract precise structural information of 15-cis spheroidene bound to the RC, by comparing FT-IR spectra of RCs with or without carotenoid. After controlling an effect of unstable background of water absorption by using Polyvinyl alcohol (PVA), we were successful to obtain highly-reproducible FT-IR difference spectra of the RCs. The result shows that twist at C15=C15' of the RC-bound carotenoid, which is previously proposed by using resonance Raman spectroscopy, could also be confirmed by using FT-IR spectroscopy.

1. 序論

紅色光合成細菌の光反応中心 (RC) に結合した 15-*cis* カロテノイドは、過剰なエネルギーを散逸させるという光保護作用を担っている[1]。この 15-*cis* という特徴的な構造が、この機能発現に不可欠なものなのか、単に RC のタンパク質がちょうど 15-*cis* を要請する形で形成されているだけなのかという議論にはまだ終止符が打たれていない[2,3]。

RC 中のカロテノイドが 15-*cis* 構造をとっていることは、RC の共鳴ラマン分光によって報告され[4]、次いで X 線結晶構造解析によって確認された[5,6]。現在では、RC の X 線結晶構造解析の分解能は 1.87Å に達している[7]が、大きなアポ蛋白に結合している一つのヘテロ分子の詳細な構造を議論するのは難しい。加えて、良い X 線回折を得る RC 結晶の歩留まりは非常に悪い。故

に RC に結合するカロテノイドの詳細な構造を議論する上で、振動分光から得られる情報は依然として有効である。

共鳴ラマン分光法は、カロテノイドの非常に強い対称伸縮モードを検出することにより、色素蛋白複合体中からカロテノイドの構造の情報を抽出する確立した手法である。一方、赤外分光法は非対称の振動モードを強く示すため、ラマン分光の情報とは相補的な振動モードを観測できる。さらに ATR (全反射) 法を組み込んだ FT-IR (フーリエ変換赤外分光) 装置を用いることで、短時間・高 S/N 比の測定が可能である。よって本研究では、FT-IR を用いて RC に結合しているカロテノイドの情報を抽出する手法の確立を試みた。

今回、紅色光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の RC を用いた。カロテノイドを結合した RC とカロテノイド欠損株の

RC の FT-IR スペクトルの差をとることで、RC に結合している 15-*cis* spheroidene の振動情報を抽出した。しかし、IR 領域ではバッファーである水の吸収が強く現れるため、湿度変化でベースラインが不安定になり、シグナルかノイズかを判別することが非常に困難であった。この問題を解決するために、RC を PVA に分散させるという手法を用いて、再現性の高い差スペクトルを得ることができた。この差スペクトルにあらわれたシグナルより、15-*cis* spheroidene に特徴的な振動モードの経験的帰属を行うことができた。

2. 試料と実験方法

2-1 試料調製

光合成細菌を半嫌氣的に培養し、遠心分離で集菌した。得られた光合成細菌を French Press により破碎し、遠心・超遠心により 17300xg・25700xg 画分としてクロマトフォア（光合成膜）を得た。クロマトフォアから RC を分離するため、界面活性剤である LDAO (lauryldimethylamine oxide) を加え、可溶化し、硫酸アンモニウム分画により RC を単離した。更に DE52 (Whatman) を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー (HiLoad26/60 superdex200PG) によりさらに精製した。バッファーとして 0.1% LDAO 20mM Tris-HCl pH8.0 を用いた。

2-2 FT-IR 測定方法

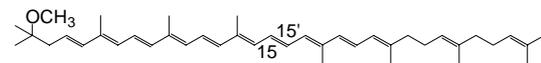
バッファー中の RC の濃度が OD ~15 になるように調製した。RC 溶液に対し 3 (w/v) %の PVA (ポリビニルアルコール・粉末) を入れて 4℃で6時間攪拌したものを試料とした。窒素雰囲気下で、この試料を滴下した PTFE (テフロン) シート (~1 cm 角) の両側にシートよりわずかに厚み

のあるスペーサーを置き、それらの上でガラス棒を転がすことで試料の厚みを調整した。これを 4℃で真空乾燥した。700~1800cm⁻¹の範囲で、分解能 2cm⁻¹で ATR 法により赤外吸収スペクトルを測定した (JASCO FT/IR6200)。カロテノイドを結合した RC とカロテノイド欠損株の RC のスペクトルの差をとり、FT-IR 差スペクトルを取得した。

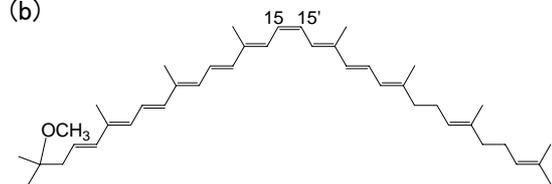
2-3 経験的帰属

RC に結合した 15-*cis* spheroidene を経験的に帰属するために、類似の構造をもつ β -carotene の赤外吸収スペクトル [8] と RC に結合した 15-*cis* spheroidene のラマンスペクトルの測定及び基準振動解析 [2] の文献値を参考にした。

(a)



(b)



(c)

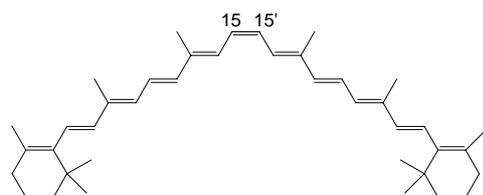


図1 spheroidene と β -carotene の分子構造
(a) *all-trans* 構造の spheroidene (b) 15-*cis* 構造の spheroidene (c) 15-*cis* 構造の β -carotene

3. 実験結果と考察

まず、図2に PVA を用いない場合の赤外吸収スペクトルと差スペクトルを示す。ここでは、ATR のプリズムに 5 μ l、OD ~

70のRC溶液を滴下し、自然乾燥をしたものについて測定を行った。積算回数は2000回である。(a)は *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 [RC に spheroidene 有り]、*Rhodobacter sphaeroides* R26.1 [spheroidene 無し] (以下、2.4.1 と R26.1) のRCの赤外吸収スペクトル、(b)は 2.4.1RC - R26.1RC の差スペクトルである。

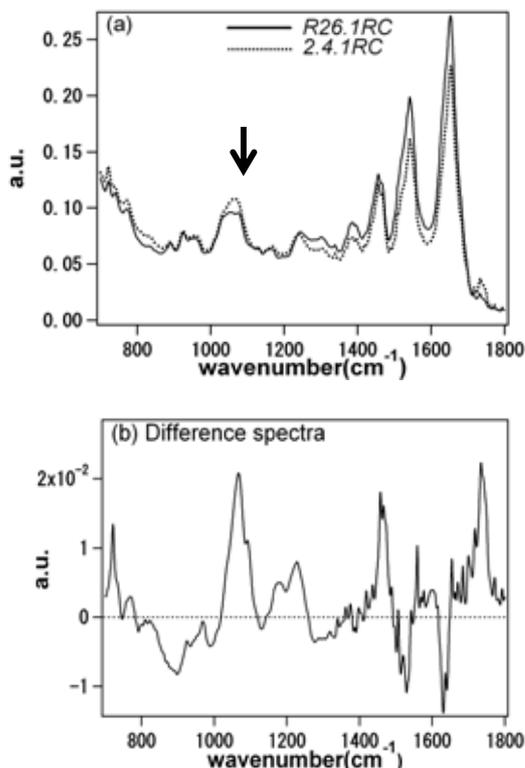


図2 PVAを用いない方法で測定したRCスペクトル。(a)2.4.1RCとR26.1RCの赤外吸収スペクトル (b)2.4.1RC-R26.1RCの差スペクトル

この方法では、図2(a)に示した生スペクトルにおいて、サンプル毎に 800cm^{-1} より低波数でのベースラインの高さ及び、 $1000\sim 1500\text{cm}^{-1}$ 付近のバッファー由来のピーク(矢印)の形、強度について非常に再現性が悪いという問題点が生じた。このため、差スペクトル(図2(b))をとると、ベースラ

インが大きく正負に振れ、サンプルの差に由来するシグナルかどうかをみきわめるのが困難であった。

次にRCをPVAに分散させたもののスペクトルを図3に示す。積算回数は52回である。

図3(a)に示した2.4.1RCとR26.1RCの赤外吸収スペクトルはほぼ重なっており、再現性の高い測定であるといえる。(b)に示した2.4.1RC-R26.1RCの差スペクトルにおいても、図2(b)に比べて縦軸のオーダーが一桁下がり、 $1000\sim 1500\text{cm}^{-1}$ 付近のバッファー由来のピークが完全に差し引かれていることがわかる。その他の領域においてもベースラインがほぼゼロになり、図2(b)に見られた大きな正負のふらつきはなくなった。更に、積算回数も大きく減り、測定時間も短縮された。

以上の結果よりPVAにRCを分散させる方法により、再現性の高いデータをとることができたため、この差スペクトルの経験的帰属を行った。

R26.1RCと2.4.1RCはタンパク質もわずかながら異なるので、差スペクトルにはタンパク質と15-*cis* spheroidene由来のピークが現れると考えられる。高波数側からそれらの特徴的なピークを帰属した。

1654cm^{-1} と 1541cm^{-1} に頂点をもつ二つの大きなピークのある領域はアミドI、アミドII、つまりタンパク質の振動モードが観測される領域である。加えて、 $1550\sim 1700\text{cm}^{-1}$ の炭素の二重結合(C=C)の伸縮振動が観測される領域にも重なっている。C=C伸縮振動のピークの中でも 1558 、 1541cm^{-1} はC13=C14, C11=C12, C13'=C14', C11'=C12'の伸縮振動に、

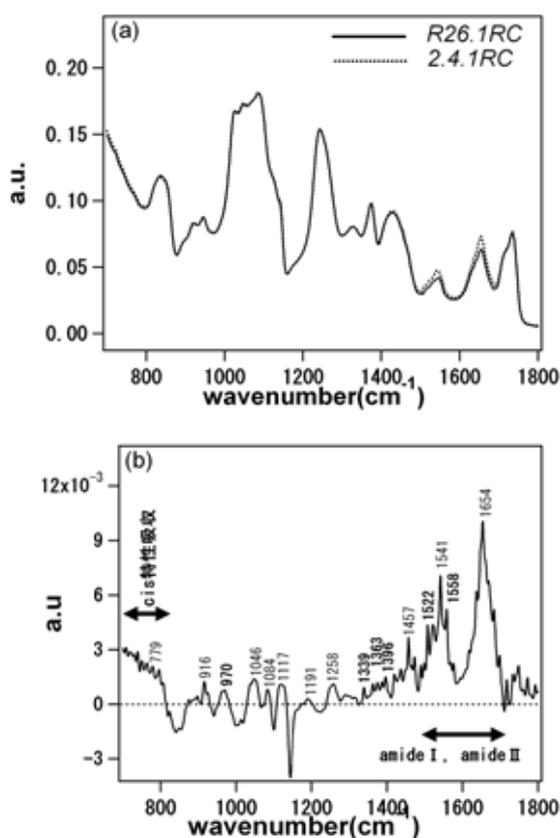


図3 PVAにRCを分散した方法で測定したRCスペクトル。(a)2.4.1RCとR26.1RCの赤外吸収スペクトル (b)2.4.1RC-R26.1RCの差スペクトル

1522cm⁻¹はC15=C15'の伸縮振動に帰属できる。

1340~1500cm⁻¹付近はメチル基の振動モードが観測される領域で、1396cm⁻¹は13C、13'C、9C、9'Cにそれぞれ結合しているメチル基の対称的な変形振動に、1396cm⁻¹は9C-メチル基、1339cm⁻¹は13C-メチル基、1339cm⁻¹は13C'-メチル基の伸縮振動に帰属される。

800~1000cm⁻¹付近は面外変角振動が観測される領域で、970 cm⁻¹はC15-H、C15'-H、C12-Hの面外縦ゆれ、C15=C15'、C11=C12、C11'=C12'のねじれ振動に帰属される。これによりラマンスペクトルの結果より示唆されたRCに結合した15-*cis*

spheroideneのC15=C15'部分のねじれ構造[2]を支持する結果が得られたといえる。

700~850cm⁻¹はcis体の特性吸収が観測される領域で、いくつかのピークが見られる。これは差スペクトルによって抽出された物質がcis構造であることを示している。

4. まとめ

RCをPVAフィルムに分散させることで、カロテノイドを結合したRCとカロテノイド欠損株のRCの再現性の高いFT-IR差スペクトルを取得できた。そしてRCに結合している15-*cis* spheroideneの特徴的な振動モードを経験的に帰属することができた。ラマンスペクトルの示唆されたC15=C15'部分のねじれ構造[2]を支持する結果が得られた。

参考文献

- [1] H. A. Frank, R. J. Cogdell, In *Carotenoids in Photosynthesis*, A. Young, G. Britton (Eds.), pp. 253-326, Chapman & Hall, London, (1993).
- [2] Y. Mukai-Kuroda, R. Fujii, N. Ko-chi, T. Sashima, Y. Koyama, M. Abe, R. Gebhard, I. Van der Hoef, J. Lugtenburg. *J. Phys. Chem. A* **106**, 3566-3579 (2002).
- [3] J. A. Bautista, V. Chynwat, A. Cua, F. J. Jansen, J. Lugtenburg, D. Gosztola, M. R. Wasielewski, H. A. Frank. *Photosyn. Res.* **55**, 49-65 (1998).
- [4] M. Lutz, J. Kleo, F. Reiss-Husson. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **69**, 711 (1976).
- [5] T. O. Yeates, H. Komiya, D. C. Rees, J. P. Allen, G. Feher. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 6438-6442 (1987).
- [6] T. O. Yeates, H. Komiya, A. Chirino, D. C. Rees, J. P. Allen, G. Feher. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 7993-7997 (1988).
- [7] J. Koepke, E.-M. Krammer, A. R. Kligen, P. Sebban, G. M. Ullmann, G. Fritzsche. *J. Mol. Biol.* **371**, 396-409 (2007).
- [8] S. Saito, M. Tasumi. *J. Raman Spectrosc.* **14**, 310-321 (1983)