

Screening and characterization of materials for stabilization of photosystem I membrane complex from a thermophilic cyanobacterium

松本, 和也
九州大学大学院生物資源環境科学府

<https://doi.org/10.15017/21693>

出版情報 : 九州大学, 2011, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

氏 名 : 松本 和也

論文題目 : Screening and characterization of materials for stabilization of photosystem I membrane complex from a thermophilic cyanobacterium
(好熱性藍藻の光化学系 I 膜複合体の安定化剤の検索とその特徴)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

蛋白質を生物工学的に有効利用する場合、溶液中でその正しい構造を保持させ、その生物活性を維持、増強する技術は極めて重要である。そのような蛋白質の安定化には、これまで様々な手法が利用されている。例えば、グリセロールやスクロースのような糖類(ポリオール)、Triton X-100 のような界面活性剤、アルコール、ペプチド、合成ポリマーなどが代表的な添加安定化剤として蛋白質の種類に応じて利用されてきた。優れた蛋白質の安定化剤の開発には、これら添加剤の蛋白質安定化の分子機構の解明が重要となる。多くの蛋白質は、それらが本来局在する細胞内外の環境下では、安定性が維持されるが、それらの環境とは異なる環境では安定性が低下することが多い。特に、細胞や細胞小器官を構成する水に不溶性の脂質二重膜から構成されている生体膜中に存在する、いわゆる膜蛋白質は脂質二重膜から取り出され、水溶液中に取り出される(可溶化)と立体構造が壊れ、変性失活を伴う凝集を引き起こすことが多い。

一方、本研究で機能開発を目指す光化学系 I (photosystem I; PS-I) は葉緑体等のチラコイド膜上に存在する膜貫通蛋白質複合体であり、光化学反応において光エネルギーを利用したプラストシアニンからフェレドキシンへの電子伝達を司る。好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* 由来 PS-I はホモ 3 量体であり、36 個の蛋白質成分と 381 個のコファクターからなる 1.07 MDa の巨大蛋白質である。各単量体は 34 個の膜貫通 α ヘリックスを持ち (PS-I 全体では 102 個)、脂質二重膜中に包埋されている。このように、PS-I が多数の膜貫通ヘリックスを持ち、且つチラコイド膜と広範囲で接触していることは、PS-I の効率的な精製、可溶化、機能と構造維持に大きな困難をもたらしている。本研究は PS-I をナノメートルスケールの光電素子として利用するために、PS-I の機能と構造の安定化剤の開発を行うため、安定化剤の分子デザインを行うことを主な目的とした。

まず、膜結合蛋白質の可溶化や安定化剤として一般的によく利用されている Triton X-100 のような界面活性剤より穏和な作用を持ち、且つ蛋白質との相互作用を制御できる両親媒性ペプチドの PS-I の安定化作用を解析した。目的の両親媒性ペプチドとして疎水性アミノ酸 6 個からなる尾部と親水性アミノ酸 1-2 個からなる頭部を有する短鎖ペプチドを選び、アミノ酸配列の構成と種類を変化させた各種両親媒性ペプチドを作製した。それらを PS-I に添加し、安定化効果を光応答電子移動活性の測定から評価した。その結果、acetyl-AAAAAAK-NH₂ や acetyl-VVVVVVRR-NH₂ 等のカチオン性アミノ酸残基からなる両親媒性ペプチドが、一般的な界面活性剤である Triton X-100 や *n*-dodecyl- β -D-maltopyranoside 等よりも、PS-I の活性を最大で 12 倍増大させることが分かった。一方、acetyl-AAAAAAD-OH 等のアニオン性両親媒性ペプチド、又は acetyl-AAAAAAK-OH 等の中性両親媒性ペプチドの添加では活性変動は見られなかった。AFM(Atomic force microscopy)分析による両親媒性ペプチド-PS-I 複合体の形態観察、及び両親媒性ペプチドのベシクル安定性の解析から、PS-I の安定化に伴う高活性維持には PS-I を抱埋したカチオン性両親媒性ペプチドのベシクル構造形成能が重要な役割をもつことが明らかになった。

カチオン性両親媒性ペプチドのベシクル形成能と PS-I を抱埋する高次構造形成能が PS-I 活性維

持と安定化に必要である場合、臨界ミセル濃度 (CMC) がその作用下限濃度となる。より低濃度で作用する安定化剤の開発を目指し、次に各種ポリアミノ酸による PS-I の安定化の強化を検討した。カチオン性のポリ-L-リジン (平均 15 残基) を使用した場合、PS-I の活性が 14 倍増大し、その作用濃度は acetyl-AAAAAAK-NH₂ の 1/10 と減少した。一方、ポリ-L-グルタミン酸等のアニオン性ポリアミノ酸とポリ-L-チロシンのような疎水性ポリアミノ酸では、活性化効果は全く見られなかった。AFM 分析によるポリアミノ酸-PS-I 複合体の形態観察から、ポリ-L-リジンは PS-I の 3 量体構造を維持できるのに対し、ポリ-L-グルタミン酸やドデシルマリトシドの添加は PS-I の 3 量体構造を単量体構造へ分散させることが分かった。このことから PS-I の本来の活性構造は 3 量体であり、その構造維持が活性発現に必要であることが明らかになった。また acetyl-AAAAAAK-NH₂ とポリ-L-リジンの PS-I 混合物は、乾燥後、溶液状態へ再度戻した後も PS-I の高い活性維持されることが分かった。

以上の結果、カチオン性両親媒性ペプチドやカチオン性ポリアミノ酸は水溶性状態の PS-I の活性発現と安定性維持に有効に作用することが明らかになり、今後、高活性な PS-I を光電素子として安定的に利用する基本技術の開発が可能になった。この技術により PS-I の高性能太陽電池やバイオセンサーへの応用の道が開かれるものとする。