

# 最近の研究から

## 高等植物の集光性複合体 (LHC-II) の結晶構造解析とその周辺

坂部貴和子, 坂部知平  
国際科学振興財団 研究開発部

### Crystal structure analysis of spinach major light-harvesting complex II and circumstance of the study

Kiwako SAKABE, Noriyoshi SAKABE  
Foundation for Advancement of International Science

#### 1. はじめに

今回は、イメージングプレート (IP) を検出器として開発された蛋白結晶構造解析用ビームライン BL-6B を使ってチャン (Wen-ruì Chang) 教授をリーダーとする中国科学院生物物理学研究所の蛋白結晶学グループが行ったホウレンソウ主要集光性複合体の分解能 2.72 Å の結晶構造解析を紹介する。解析経過や構造を紹介する前に生物学的な意義をご理解いただくためにバックグラウンドを少し述べる。

人類を含めた地球上の生命活動に消費されるエネルギーの源泉は、殆ど全ての場合、光合成により固定された太陽エネルギーである。光合成はその反応に伴う酸素発生 (電子供与体としての水の利用) の有無により区別される 2 つの型、植物型と細菌型に分類される。高等植物・藻類・シアノバクテリアなどによって営まれる前者の型に属する光合成は光化学反応系 I (PSI) と光化学反応系 II (PSII) の 2 種類の反応中心を有するのに対し後者の型ではただ 1 種類の反応中心を含んでいるのみである。細菌型につ

いてはマックスプランク研究所のミシェル (H. Michel) 博士, ダイゼンホファー (J. Deisenhofer) 博士, フーバー (R. Huber) 博士らが紅色光合成細菌の反応中心複合体の分解能 2.3 Å の X 線結晶構造解析に関する研究で 1988 年ノーベル化学賞を受賞された [1]。この成果はその後の光合成研究に大きな変革をもたらしたことはいうまでもない。

植物型についても 2 つの光化学反応系について X 線結晶構造解析が長年待たれていたが、膜蛋白であるため結晶化が難しくなかなか成功にいたらなかった。従って今回の成功は高等植物の光合成系では最初の高分解能 X 線結晶構造解析である。つまり、新たに高等植物の光合成系の構造にメスを入れた点でその功績は高く評価されている。今回解析された部分は葉緑体チラコイド膜中の全 PS II 粒子 (Fig. 1) 中に存在する光合成の初期反応において光を吸収する集光型アンテナ蛋白質複合体の Lhcb1+2+3 の部分である。ここで吸収された光のエネルギーは反応中心複合体 II (PSII) に渡され、ここで水が分解され酸素とプロトンが発生する。

#### 2. 解析に至るまでの経緯

高等植物の主要 LHC-II の結晶化のためにホウレンソウを材料に選ばれたことは大変幸運であった。この解析で苦労された点は先ず良質の結晶を得ること、つまりこの結晶も初期の段階の結晶は通常膜蛋白質の結晶と同様 X 線の回折能が大変低かったが改良を積み重ね、現在では回折斑点に異方性が少ない巨大な結晶が得られている。この結晶の空間群は R32 で格子定数が  $a=b=260$  Å,  $c=650$  Å,  $\alpha=\beta=90$  度,  $\gamma=120$  度であるが、問題は  $c$  軸の長さが 650 Å と非常に大きくラボの X 線回折計を使ってのデータ収集が事実上できなかったことであった。この結晶構造解析に当時 (1999 年頃) X 線の利用できる放射光実験施設を自国にもたない北京の中国科学院生物物理学研究所の Chang 教授をはじめ多くの研究者、大学院の学生さんやポスドクの方々、技官の方々が PF に来られてこのテーマに挑戦され、世界ではじめて高等植物の光合成蛋白質の高分解能の解析に成功されたことに対し心より敬意を払うと共に、長年同じ放射光共同利用実験グループのメンバーとして、データ収集の環境作りに協力できたことを大変誇りに思う。

膜蛋白の解析で Deisenhofer らがノーベル賞を受賞され

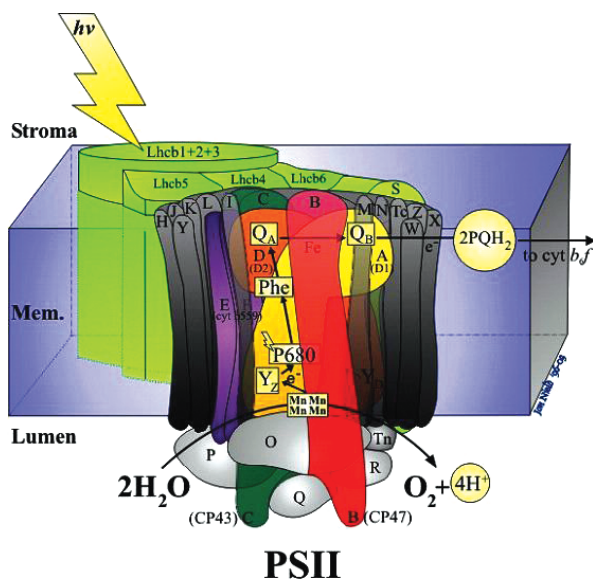


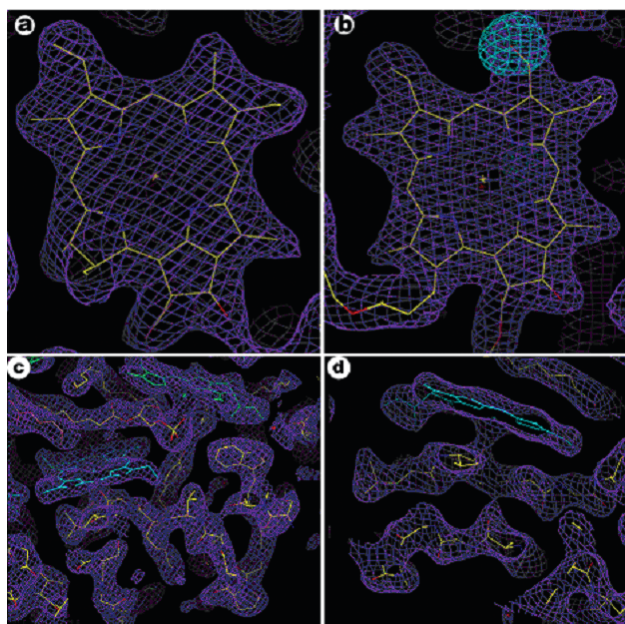
Figure 1

The whole PS II particle located in the thylakoid membrane of chloroplast. The marked part "Lhcb1+2+3" is protein LHC-II in the thylakoid membrane of chloroplast and the location of the major light-harvesting complex II. This figure is referenced from Nield, J.(1997) Ph.D. Thesis, University of London, UK.

た頃、すでに Chang 教授のグループでも膜蛋白の結晶化に挑戦しておられ、我々が教授のラボを訪れた時、「ドイツに先にやられちゃった」と残念そうに結晶を見せて下さったことを今もはっきりと覚えている。

最初の頃、彼らの持って来る膜蛋白の結晶は概して反射能が低かったので PF の感度の高いイメージングプレートを検出器とするデータ収集システムが大変威力を発揮していた。現在では北京と PF の間は国際宅急便で 3 日も待てば届くが、2 年程前までは 1 週間から 10 日以上かかりクライオの状態ですら送られてきたサンプルを使える状態で受け取ることは不可能だった。そこで最初の頃は PF のビームラインで結晶化条件とクライオ条件を検討しながらデータ収集を行うことを繰り返しておられ、毎年 1 回多いときには 2 回 PF に来られ、1 回の滞在期間も短くて 2 週間、長いときには 1 ヶ月近く頑張っておられ続けてこられた。勿論その期間全体を本研究に使われるのではなく約 40 名のメンバーからなるグループの方々の 1 年間に必要なデータを全て収集して帰られた。

この解析は PF の BL-6B で集められた分解能 3.5Å までの母結晶と 1 種類の重原子誘導体を使って位相決定がなされ、最後に北京高能物理研究所・放射光実験施設の蛋白用ビームラインで集められた分解能 3.5 ~ 2.72Å までのデータを加えて構造の精密化が行なわれた。分解能 2.7Å までの独立な 211,079 の反射による信頼度因子 (Rmerge) は 0.082 であった。この結果を用いて差フーリエを計算した結果、Fig. 2 に示すように LHC-II が膜蛋白であるにも拘



**Figure 2**

Electron-density map at 2.72 Å resolution.  $2Fo-Fc$  density ( $1.5 \times \sigma$  level) are all shown as royal purple. **a**, Chla and **b**, Chlb. The cyan cage in **b** shows  $Fo-Fc$  density ( $4.0 \times \sigma$  level). No residual  $2Fo-Fc$  or  $Fo-Fc$  density appears around Chla C7-methyl, while strong  $2Fo-Fc$  and  $Fo-Fc$  densities show up at the position of Chlb C7-formyl if it is omitted. **c**, N-terminal region including binding sites for a Chlb (cyan) and a phospholipid coordinated to a Chla (green). **d**, Two antiparallel polypeptide strands in the EC loop region with one Chlb bound.

わらず大変きれいな電子密度分布図が得られた。この手法を使って最終的に LHC-II 単量体に含まれる 232 アミノ酸残基の 94% が決定された。LHC-II の構造解析の難しさは単量体に含まれている光化学反応に関係する全ての物質の構造を正しく決定することが機能との関係を明らかにする上から必須であることであった。つまり、そこに至るまでは兎に角何が何でも良質な結晶を得る努力を続けねばならなかった訳である。幸い最終段階で LHC-II 単量体に含まれている 14 個のクロロフィル、4 個のカロチノイド、2 個のリピッド PG, DGDG (界面活性剤)、約 70 個の水分子等の位置が決定された。Table 1 に単量体の構成成分を示す。クロロフィル a (Chla) とクロロフィル b (Chlb) の構造のちがいは、Table 1 の化学構造式で示すように、7 の位置の R が Chla では  $\text{CH}_3$ 、Chlb では  $\text{CHO}$  であることだけである。そこで 14 個のクロロフィルは Fig. 2a 及び Fig. 2b のそれぞれ  $2Fo-Fc$  及び  $Fo-Fc$  の電子密度図を使って区別することができ、8 個は Chla、6 個は Chlb と同定された。この内 10 個はフィチル側鎖を含めてモデルを組み立てることが出来たが、残りの 4 個は部分的にしかモデルが組めなかった。また遷移双極子モーメントの配向についても、帰属することができた。4 個のカロチノイドのうち、3 個のカロチノイド分子は 2 個のルテインと 1 個のネオキサントフェンであることが分かり、残りの 4 個目はキサントフィルサイクルの種々のカロチノイドが混った電子密度として説明された。

Fig. 3 に結晶の  $c$  軸に沿って見た 12 面体 LHC-II DGDG

**Table 1** Composition of a monomeric LHC-II  
232-amino-acid residue-polypeptide

14 Chlorophiles

8 Chla, 4 Chlb

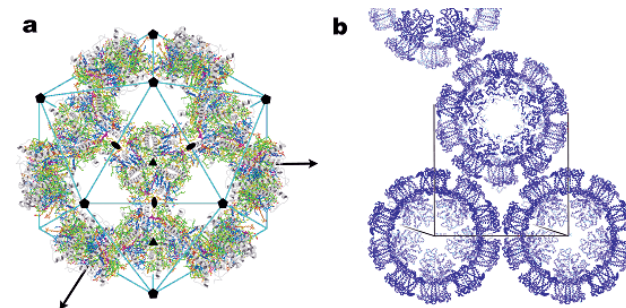
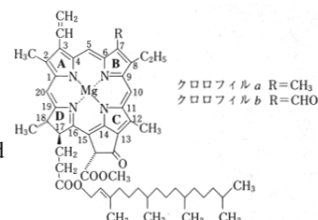
4 carotenoids

2 lutein, 1 neoxanthin,

1 xanthophyll-cycle carotenoid

2 lipid molecules

1PG, 1DGDG (detergent)



**Figure 3**

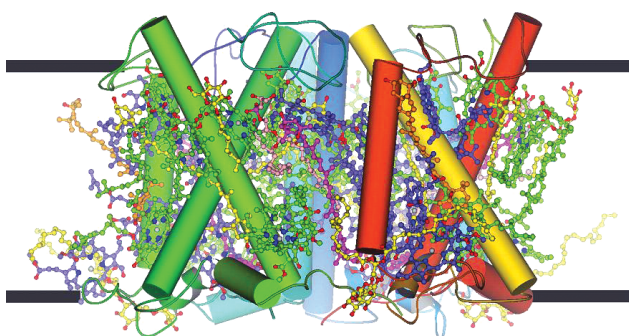
Organization and packing of the icosahedral particles. **a**, Schematic drawing of one-half of the LHC-II proteoliposome viewed along the  $c$  axis of the hexagonal cell. **b**, Packing diagram of 'Type III' membrane-protein crystal, showing the contacts between icosahedral spherical particles in the hexagonal cell. Only polypeptides are shown for clarity. The N-terminal domain and AC loop region located at the stromal surface are involved in the crystal packing.



プロテオリポソーム粒子の1/2 (Fig. 3a) と菱面体格子内でのリポソーム粒子間の接触の様子 (Fig. 3b) を示す。図中12面体粒子の1つのC<sub>3</sub>軸と2つのC<sub>2</sub>軸は結晶の対称性と完全に一致している。12面体プロテオリポソーム粒子のパッキングはこれまで Michel らにより報告されているものとは全く異なっており今回新しくタイプⅢのパッキングが見つかった。

### 3. 全 PSII 粒子を構成する LHC-II の構造モデル

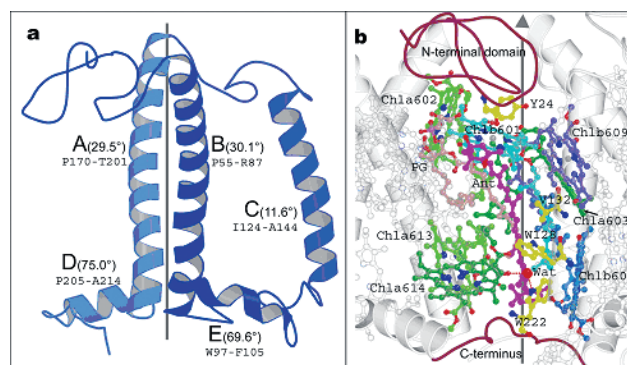
次に全 PS II 粒子 (Fig. 1) 中での LHC-II の構造モデルを考えてみよう。この解析が発表される前に藤吉好則ら [2] は電子顕微鏡を使って、豆の LHC-II の構造に関するアポプロテインの2次構造について発表しており、大筋では今回解析された構造と一致していた。Fig. 4 は膜内で



**Figure 4**

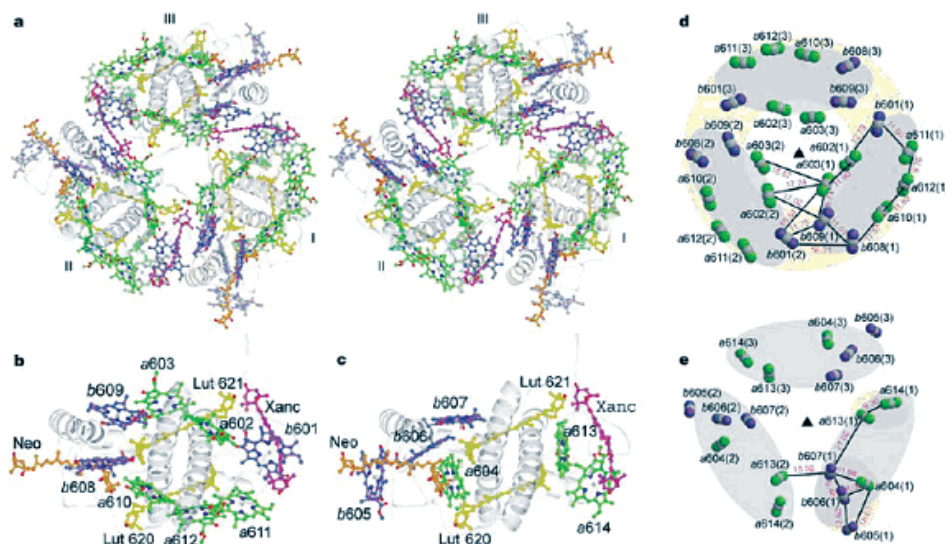
LHC-II trimer located in the biological membrane. The colored part is the center of the LHC-II trimer, including peptide, pigments and lipids. The two black lines at each side of LHC-II show the lipid bilayer of membrane. And the upside one shows the stromal layer of membrane, and down one shows the lumeral side of the lipid bilayer.

の LHC-II の3量体の構造モデルである。前述したように Fig. 1 に示した全 PSII 粒子のうち LHC-II は Lhcb1+2+3 に相当し、従って Fig. 4 に示した膜内での LHC-II の構造モデルは Lhcb1+2+3 部分に相当する。Fig. 4 の3量体のヘリックスは緑、青、赤及び黄色で色分けされている。手前の2本の赤と1本の黄色からなる単量体を Fig. 5a の単量体モデルと重ね合わせると、分子中で交叉する黄色と赤のヘリックスが擬似2回対称の関係になっている。3回軸まわ



**Figure 5**

Secondary structure of monomeric LHC-II apoprotein and trimerization. View in parallel with the membrane plane. **a**, The vertical line indicates the approximate direction of the membrane normal and the position of the pseudo-C<sub>3</sub> axis. Helices are labelled A–E. Helix E is newly defined, whereas others are labelled as before [2]. The inclination of each helix with respect to the membrane normal is shown in parentheses, along with the residue range marked below each value. **b**, The interface between two adjacent monomers is shown, yellow, amino-acid residues; green, Chl*a*; cyan and blue, Chl*b*; magenta, xanthophyll-cycle carotenoid; pink, PG; red, water; maroon, C<sub>α</sub> traces of N-terminal (Ser 14–Asp 54) and C-terminal (Asp 215–Gly 231) polypeptide chain. The vertical line represents the local C<sub>3</sub> axis of an LHC-II trimer.



**Figure 6**

Pigment arrangement in the trimeric and monomeric LHC-II. **a**, Stereo view showing the pigment arrangement pattern in the LHC-II trimer. View from the stromal side. Monomers are labelled I–III. For clarity, the chlorophyll phytol chains and lipids are omitted. Green, Chl*a*; blue, Chl*b*; yellow, lutein; orange, neoxanthin; magenta, xanthophyll-cycle carotenoid. **b**, **c**, Pigment pattern in a monomer at the stromal and luminal sides, respectively. Colour designation the same as in **a**. **d**, **e**, Arrangement of chlorophylls within a LHC-II trimer at the stromal and luminal sides, respectively. Chlorophylls are represented by three atoms: the central magnesium atom and two nitrogen atoms. The connecting line between the two nitrogens defines the directions of the Q<sub>y</sub> transition dipole. Green, Chl*a* nitrogen; blue, Chl*b* nitrogen; grey, magnesium; purple and blue ellipse, approximate monomer area. The magenta numerical note near the dark line connecting two chlorophylls indicates the distance (Å) of central magnesium.

りの最短距離にある2つの単量体中のピグメントの配列が Fig. 5b に示されている。Fig. 4 の中で黒い線は脂質二重層の両端を示しており、図中上側がストロマサイド、下側がルーメンサイドである。ストロマサイドはルーメンサイドと比較して分子が膜外に飛び出している。

ストロマサイドの構造は Fig. 6a, 6b に相当し、ルーメンのサイドは Fig. 6c に相当する。ストロマサイドにある8個のクロロフィルは Fig. 6d に示されたように単量体表面に円周に沿って分布しており、アンテナの役割を果たしていると考えられる。また、ルーメンサイドにも6個のクロロフィルが存在しており Fig. 6e に見られるように4個がクラスターを形成し2個が対を作っている。これらのクロロフィルは強い光が来た時構造が壊れないように non-photochemical quenching に関与していると考えられている [3]。近接する2つのクロロフィルは単量体間にも存在し、各々の距離は Fig. 6d と Fig. 6e に示されており、平均距離は 12Å である。クロロフィルの存在状態を示すため Mg<sup>2+</sup> との配位、C13<sup>l</sup>-ケトグループ及び Chlb の場合は C7-ホルミルグループとの水素結合を Table 2 に示した。クロロフィル-カロチノイド間の距離は光の効率的な移動と関係して特に興味があるが今回の報告では正確な値は明らかにされていない。結晶化剤として加えた脂質 DGDG は 12 面体プロテオリポゾーム粒子の形成に関与している。この脂質構造は液晶-ゲル相転移と関係していることが明らかになっており、温度変化と関係した構造変化を伴うので興味があるが解明は未だこれからである。Fig. 1 から明らかのように LHC-II 3 量体に相当する Lhcb1+2+3 は 3 回軸に平行な2つの面で明らかに異なった分子間接触がみられる。即ち一方は 2 重膜の内部に接触しており、他方は小 LHC-II 即ち Lhcb4, 5, 6 と接触している。この事から、LHC-II 3 量体を一つの剛体として見た場合、3 回回軸周りで回転のし易さと機能発現とを結び付けることができるかもしれない。即ち、それは接触面の性質に大いに関わっていると考えることができる。

ホウレンソウの光合成反応には PSI, PSII の 2 種類の超

分子複合体が関与しており、それぞれが固有の LHC をもっている。さらに PSI, PSII の両方に親和性のある移動性 LHC も存在している。最近バクテリア (*R. viridis*) の LHC-1 のコア複合体が原田一明らにより結晶化された [4]。まだ分解能が 8 Å と低いので結晶化への努力が要求されるが構造と機能との関係から興味がある。

今回解析されたものは LHC-II の主成分であるので他のものの解析は今後の課題として残されている。高等植物の反応中心複合体 II の構造研究は沈建仁らにより行われた [5]。彼らは結晶化に成功し、分解能 7 Å の 6 方晶系に属する結晶を得たが、回折パターンから *c* 軸長が 1,050 Å と非常に長く、その上 *ab* 面内には 3 倍の格子長の超格子に由来する回折スポットが存在し、未だ構造解析には至っていない。一方最近高等植物に非常に類似性の高いラン藻の PSII (LHC を含まない) の分解能 3.7 Å の構造が神谷信夫、沈建仁ら [6] により得られた。この構造を基礎として高等植物の PSII の構造が得られれば Chang らによる LHC-II と組み合わせる近い将来 LHC-II PSII の結合モデルを作ることが可能になるかもしれない。そうすればこれを使って高等植物の光合成のメカニズムがこれまでよりはっきりと理解できるようになると期待される。

ここで LHC-II で行われている反応について考えて見ると、初期反応は光とクロロフィル分子間の相互作用に始まり、フェムト秒からピコ秒の時間領域で起こる超高速過程がつづく [7]。可逆反応ではないので吸収される光の波長を変えて集光と移動過程における構造変化との関係を追求する時間分解による動的構造研究は、大変興味があるが残念ながら現在のところ不可能である。LHC-II について我々が一番知りたいことは、LHC-II が集合してできる 300 個のクロロフィル a,b や種々のカロチノイド等による巨大アンテナからどのようにして効率よく反応中心にある特別な 1 対のクロロフィル (P680) に光が運ばれて行くかである。今後結晶化について更に検討が加えられ、構造解析の精度が上げればクロロフィル、カロチノイドなどのピグメントを含む構造の揺らぎの解析、すなわちダイナミクス

**Table 2** Coordinations of chlorophylls and their interactions with local environments.

Chlorophylls	Central ligands	Hydrogen bond partner of Chlb C7-formyl	Hydrogen bond partner to chlorophyll C13 <sup>l</sup> -keto group
Chlb 601	Tyr 24 *	-	-
Chla 602	Glu 65	-	Tyr 44 N, Trp 46 N
Chla 603	His 68	-	Wat
Chla 604	Wat 309	-	Leu 113 N
Chlb 605	Val 119 *	Gln 122 N, Ser 123 N	-
Chlb 606	Wat 310	Wat 308 (ligand of Chlb 607)	-
Chlb 607	Wat 308	Gln 131 NE2	-
Chlb 608	Wat 302	Leu 148 N	Arg 70 NH1
Chlb 609	Glu 139	Gln 131 NE2	His 68 ND1
Chla 610	Glu 180	-	Gly 158 N
Chla 611	Phospho-diester	-	-
Chla 612	Asn 183	-	-
Chla 613	Gln 197	-	-
Chla 614	His 212	-	-

\* These residues contribute their backbone carbonyls to coordinate with the central magnesium of chlorophylls.



の研究が可能になり、その結果、光の移動過程、スイッチングメカニズム、消光等についても定量的に解明されることが期待される。このような解析には量子化学的な手法の導入が不可欠であり、超精密解析が必要になるであろう。Chang 教授のグループのこの基礎的で且つ非常に重要な研究を今後も応援したいと思っている。細かい構造や機能との関係についてはすでに Nature[3] に報告されているので是非お読み頂きたい。

#### 4. おわりに

ここで中国科学院生物物理学研究所の蛋白結晶学グループと我々のグループとのこれまでの関係を少し紹介する。

1972 年田中首相が初めて中国を訪問された、そして第 2 次世界大戦後、はじめて日中国交が樹立した。しかし同年京都で開催された国際結晶学会の時にはまだ、中国とは国交がなかったため、中国の研究者は出席できなかった。そこでオックスフォード大学のホジキン教授が中国を訪れ分解能 2.5 Å の非常に美しい 2 亜鉛インスリンの MIR による電子密度分布図の手書きのコピーを貰ってこられた。それをメインレクチャーの時中国の研究者に代わって、お示しになりその素晴らしさを話された。その後我々はホジキン教授のもとに留学し、1975 年帰国した。そして電子密度分布図の本物を見せて頂きたいと思い、当時研究所の所長であり、中国で国家プロジェクトとして行われていたインスリン結晶構造解析のリーダーを勤められていたリヤン (Dongcai Liang) 教授に申し込んだところ大変快く承諾し北京へ招待してくれた。1979 年ブタ 2 亜鉛インスリン構造の精密化をいっしょに行っていた佐々木教祐氏とともに北京を訪れ念願のマップを見ることが出来た。それから 27 年にわたる長いお付き合いをさせて頂いている。Chang 教授もその主要メンバーの一人である。

Liang 教授は我々が最初に知り合った時から中国科学院のメンバーであり 73 歳の今も研究を続けておられる。今年 Chang 教授が体調を崩されたので、Liang 教授が大学院の学生や技術者をつれて回折データ収集に来られた。その際、これまでとは別の材料から得られた LHC-II 結晶の回折データも BL-6B で収集された。我々は同じ結晶を頂き BL-6C に設置されている Galaxy[8] を使って回折データを収集し、その処理結果を北京に送った。

Chang 教授はまもなく研究所の定年を迎えられるが、LHC-II 関係の構造解析はまだまだ続くであろう。3 年前に北京でも高能研究所に蛋白用のビームラインができた。しかし、1 年に 1 ヶ月しか利用できないとのことである。上海に第 3 世代の放射光施設の建設が昨年認められたが、実際に動き出すのは 4 年先とのことである。少なくともそれまでの間、これまで通り彼らが研究を継続できるように PF で格子定数が 650 Å より大きな膜超分子結晶でも、超高分解能まで回折データが収集できるように、特に高感度高精度の測定器を整備されることをお願いする次第である。

#### 謝辞

最後に、この文章を書くにあたり、Chang 教授から図、表、資料の提供を受けました。先生のご好意に対し厚く御礼申し上げます。

#### 引用文献

- [1] Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. & Michel, H. : Nature (London) **318**, 618-624 (1985).
- [2] Kuhlbrandt, W., Wang, D., N. & Fujiyoshi, Y. : Nature (London) **367**, 614-621 (1994).
- [3] Liu, Z., Yan, M., Wang, K., Kuang, T., Zhang, S., Gul, L., An, X. & Chang, W. : Nature (London) **428**, 287-292 (2004).
- [4] Saijo, S., Sato, T., Kumasaka, T., Tanaka, N., Harata, K., & Odahara, T.: Acta Cryst. **F61**, 83-86 (2005).
- [5] Shen, Lian-Ren: Private Communication.
- [6] Kamiya, N & Shen, Lian-Ren: PNAS **100**, 98-103 (2003).
- [7] 柴田和雄, 右衛佐重雄, 原富之, 宮地重遠編, 光生物学上: 学会出版センター (1979).
- [8] Sakabe, N., Sakabe, K. & Sasaki, K.: J. Synchrotron Rad. **11** 12-16 (2004).

(2005 年 1 月 14 日原稿受付)

#### 著者紹介

坂部貴和子 SAKABE Kiwako  
 (財) 国際科学振興財団 研究開発部  
 〒 305-0801 つくば市大穂 1-1  
 Tel. 029-877-0019 Fax. 029-877-0018  
 e-mail ksakabe@sbsp.jp

坂部知平 SAKABE Noriyoshi  
 (財) 国際科学振興財団 研究開発部  
 〒 305-0801 つくば市大穂 1-1  
 Tel. 029-877-0020 Fax. 029-877-0018  
 e-mail nsakabe@sbsp.jp



北京郊外にあるラマ教寺院 (承德, 中国, 2004 年 9 月) [向かって右から, 坂部知平, Chang 教授, 坂部貴和子]