

〈一般研究課題〉 有害金属環境の改良手法における
光合成タンパク質の金属阻害作用の解明
助成研究者 名古屋大学 梅名 泰史



有害金属環境の改良手法における 光合成タンパク質の金属阻害作用の解明

梅名 泰史
(名古屋大学)

Study of Metal Inhibition in Photosynthetic Proteins for Improving Toxic Metal Pollution

Yasufumi Umena
(Nagoya University)

Abstract :

Toxic heavy metals in the environment affect all living organisms, leading to many problems such as poor growth and impaired activity. The effects of these toxic metals are brought about by their interactions with proteins. In plants, toxic metals cause photosynthetic disorders and death. This directly leads to social and environmental problems such as crop failure and reduction of green space. As some of the major effects of toxic metals on photosynthesis, many studies have reported that metals inhibit the electron and energy transfer of photosystem II proteins (PSII) and the antenna protein phycocyanin (PC). However, neither the specific binding sites nor the mechanism of inhibition are structurally known. If PSII and PC can be genetically modified to be less susceptible to inhibition by toxic metals, it will lead to the design of photosynthetic organisms that are resistant to toxic metals and can be proposed for use in environmental improvement with "bioremediation. In bioremediation, toxic metals can be captured by the proteins in their tissue bodies and collected from soil and water bodies, making it easy to extract the toxic metals.

In this study, we analyzed the crystal structure of phycocyanin (PC), which is an antenna protein that binds to the photosynthetic core protein PSII, as part of bioremediation research aimed at removing toxic metals in the environment. As a result, the crystal structure of phycocyanin (PC) bound to mercury (Hg) and lead (Pb) ions, which are well-known toxic metals, was determined, and

the specific binding mode of Hg in the PC crystal was successfully identified. Cyanobacteria possessing PC have existed since the primitive times and widely survive from underwater to the land, and from volcanic regions to the Antarctic. Since cyanobacteria are adapted to various environments, it is expected that cyanobacterial PCs can be used as a mechanism for uptake of toxic metals and for bioremediation in various environments.

1. はじめに

金属は生体の希少元素として生命活動に不可欠な存在であるが、種類によっては毒性を発揮して正常な活動の障害が生じる。環境中の有害金属を取り込んだ生物は、生育不良や活動障害など多くの問題が発生する。この有害金属による作用は生体内のタンパク質との相互作用に起因している。植物では、有害金属によって光合成が機能不全に陥り枯死するため、農作物の不作や緑地の減少など社会・環境問題に直結する。

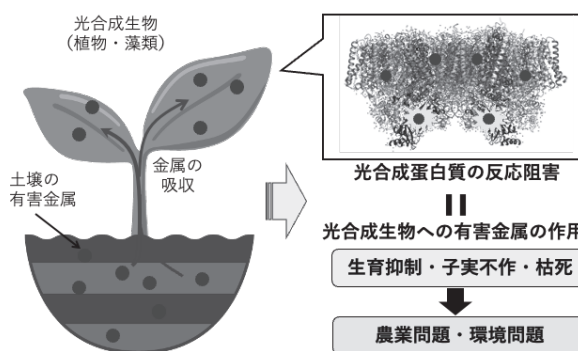


図1. 光合成生物への有害金属障害による影響

先行研究では、有害金属による光合成への影響の一つに、光合成における根源的な光エネルギー変換を担っている光化学系IIタンパク質(PSII)やアンテナ蛋白質フィコシアニン(PC)の電子やエネルギーの伝送が金属によって阻害されると報告しているが、具体的な結合部位や作用機構は構造化学的にわかっていない。もし有害金属阻害を受けにくいPSIIやPCに遺伝子改変ができれば、有害金属耐性を持つ光合成生物の設計に繋がる。また、これらのタンパク質に土壌や水域から有害金属を組織体内部に取り込ませ、収穫することで有害金属を簡単に回収する「バイオレメディエーション」による環境改良が提言できる。本研究では、PCと有害金属が結合した結晶構造解析から作用機構を解明し、有害金属耐性を持つ光合成生物への遺伝子改変するための部位の指針を明らかにする。この環境改善方法は、濾過装置のような高価な設備を必要としない安価で簡便な方式として、鉛や水銀などの環境汚染が深刻な発展途上国への国際貢献にも繋がると期待される。

シアノバクテリアのアンテナ蛋白質複合体のフィコビリソーム(PBS)は主要な構成タンパク質であるPCがロッド状に連なった構造体を形成し、光を捕集して光化学反応中心のPSIIにエネルギーを供給する光合成反応の初期反応を担っている[1]。PCは分子量2万の α と β サブユニットの単位ユニットが3量体を形成し、各単位ユニットには3つの色素分子のフィコシアノビルリン(PCB)が共有結合している[2]。PBSが捉えた光エネルギーはPBSからPSIIまで数百ピコ秒で損失なく高速に運ばれており、シアノバクテリアの活発な活動の源となっている[3]。

2. 試料および実験方法

2.1 試料調製

光合成タンパク質は50℃で大量培養した好熱性シアノバクテリア*Thermosynechococcus vulcanus*(TV)から抽出し、結晶化純度まで精製を行った。本研究で用いたフィコシアニンタンパク

質(PC)は、TV細胞を凍結融解法で細胞膜を破碎し、20%と50%の硫酸アンモニウムを使った分画法にてPCを粗精製し、陰イオン交換クロマトグラフィー法にてPCと他の夾雑タンパク質から分離し、高純度な結晶化試料を調製した。PCの試料の評価は、純度は280nmと620nmの吸光度の比率(Abs620/Abs280)、タンパク質濃度は620nmと652nmの吸光度から、次式を使って計算を行った[4]。

$$\text{フィコシアニンタンパク質濃度(mg/ml)}=(A_{620}-0.474A_{652})/5.34$$

先行研究において、PCへの金属イオンの吸収スペクトルの影響について報告されている[5]。本研究のTV由来のPC試料を用いて水銀及び鉛が加えられた場合の光吸収能への影響を可視吸収スペクトルで確認した。精製したPC試料0.1mg/mlに対して、それぞれの塩化物溶液を終濃度0.1mMから10mMの複数の条件で可視吸収スペクトルを280-730nmの範囲で行った。各測定は同じタンパク質濃度であるため、タンパク質の定量法に使われる280nmで各スペクトルを規格化した。

2.2 結晶構造解析

フィコシアニンタンパク質はポリエチレングリコール(PEG)3350と沈殿剤として塩化マグネシウムを添加剤として加えて20℃で結晶化を行った。得られたPC結晶を塩化水銀濃度が0.1,1,10mM、または塩化鉛濃度が10mMをそれぞれ含むエチレングリコールを主成分とする各抗凍結液を準備した。水銀イオンを含む溶液にPC結晶を約10分間、鉛イオンを含む溶液に約60分間浸漬し、クライオループでPC結晶を取り出し、液体窒素で瞬間凍結してX線回折実験まで液体窒素容器で保管した。放射光X線を使ったX線結晶構造解析は、大型放射光施設SPring-8のBL26B1及びBL41XUビームラインにてデータ収集を行った。このデータ収集に至るまで、他の放射光施設あいちSRのBL2S1ビームライン及びフotonファクトリーのNW12ビームラインにてPC結晶の結晶性のチェックを行い、十分なデータ収集ができることを確認し、大型施設SPring-8のビームタイムを確保した。測定条件は、水銀結合結晶では波長1.0Å、鉛結合PC結晶では波長0.94Åを用いて、360°回転させる振動撮影で回折強度の測定を行った。それぞれの結晶で波長を切り替えたのは、金属原子の結晶内の位置を同定するため、それぞれの元素固有の異常散乱因子を使った異常分散項差フーリエマップによる分析で原子座標を特定するためである。得られた回折強度データの解析し、構造精密化計算の後、それぞれの金属原子が結合したPCの立体構造分析を行った。

3. 実験結果

3.1 試料調製

36Lの大量培養されたTV細胞から、約10mgの精製されたPC結晶化の試料を調製した。得られたPC試料の吸光度A620/A280の比率は4.5となり、先行研究と比較して十分な純度であった[6]。精製した10mg/mlのPC試料と40mMの塩化マグネシウムを添加塩とした27%PEG3350の結晶化溶液で結晶化を行い、200から400μm程度の大きさのPC結晶が2,3日で得られた(図2)。得られた結晶は0.1mM, 1mM, 10mMの塩化水銀及

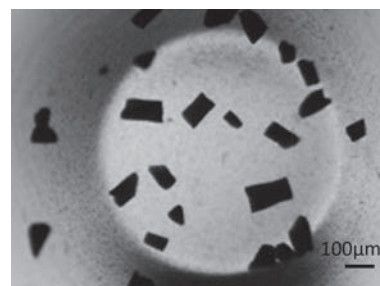


図2.フィコシアニン結晶

び塩化鉛を含む25 %のエチレングリコールと15 % PEG3350の抗凍結溶液に10分間浸漬しても結晶が崩壊しないことを確認し、液体窒素を使って急速凍結した。

3.2 可視吸光スペクトル分析

先行研究においては、グラム陰性シアノバクテリア*Spilulina platensis*では水銀イオンは、鉛イオンを含む他の金属に比べて可視吸光スペクトルが大きく減衰させることが報告されていた[5]。本研究の好熱性シアノバクテリア*Thermosynechococcus vulcanus*由来のPCにおいても同様に水銀イオンを含む条件ではスペクトルが大きく変化した(図3)。610 nmのピーク強度は水銀では20 %程度まで下がるのに対して、鉛では60 %程度に抑えられていた。600 nm付近のスペクトルの由来となる色素分子PBSへの作用が鉛イオンに比べて水銀イオンの方が大きいことを示していた。

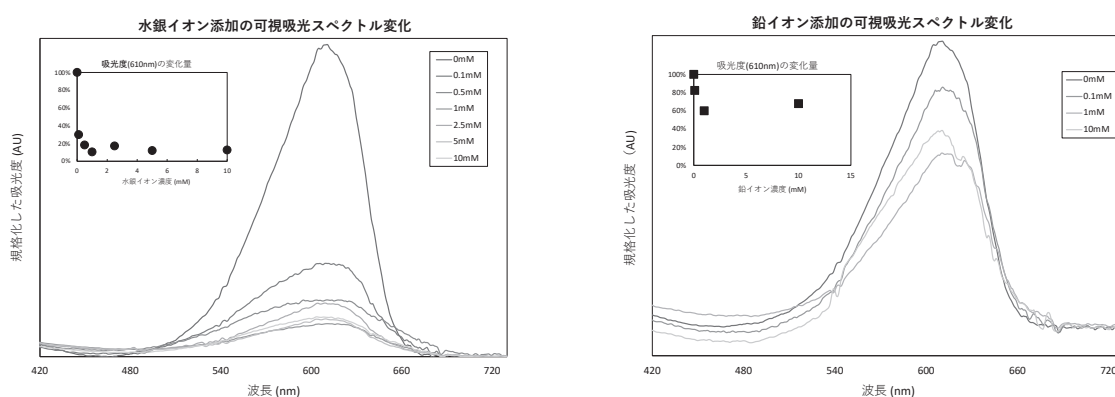


図3. 水銀イオンと鉛イオンによるPCの可視吸光スペクトルへの影響

3.3 結晶構造解析

放射光X線を使ったPC結晶の結晶構造解析の結果、水銀イオンを含む結晶で2Å前後、鉛イオンでは1.3 Å分解能の良好なデータが得られ、各金属が結合した状態の原子レベルの構造解析を行うことができた(表1)。なお、各重金属イオンを添加しないPC結晶の場合、最大で1.1Å分解能であるため、鉛イオンに比べて水銀イオンの添加は結晶へのダメージが生じていた。

鉛イオンを添加したPC結晶は、結晶性への影響は少なく、予備実験から10 mMの高濃度溶液に60分間の長時間浸漬することで、ようやく結合が確認された。結合していた鉛イオンは、色素分子PBSの周辺には存在せず、PBS及びにPCタンパク質の構造には大きな変化が確認されなかった。見つかった6個の鉛イオンは、PCタンパク質表面の負のアミノ酸残基と静電相互作用していたが、各鉛原子の占有率は10-20%と低いことから、緩やかな結合と思われる(図4)。

一方、水銀イオンを添加したPC結晶の場合、10分間程度の浸漬で結

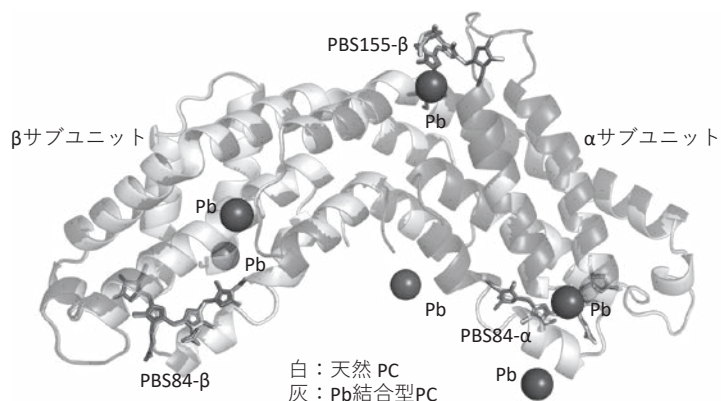


図4. 鉛イオンが結合したPCの結晶構造

晶に亀裂が生じる結晶性への影響が大きく、水銀イオンとPC分子の相互作用が大きいたことが試料調製の段階で示唆された。構造解析の結果、0.1mMにおいてもHgイオンの結合が異常散乱項差フーリエマップで確認された。1 mMでは、水銀イオンはシステイン残基(Cys109- β , Cys98- α)の硫黄原子と共有結合を形成していた。また、10 mMでは、システイン残基による結合に加えて色素分子PBS84- β が水銀イオンを取り囲むような大きな構造変化が起こり、それに伴って β サブユニットも大きく構造変化していた (図5左)。一方で、残りの2つのPBSには水銀イオンは結合せず、 α サブユニットにも大きな構造変化はなかった (図5右)。

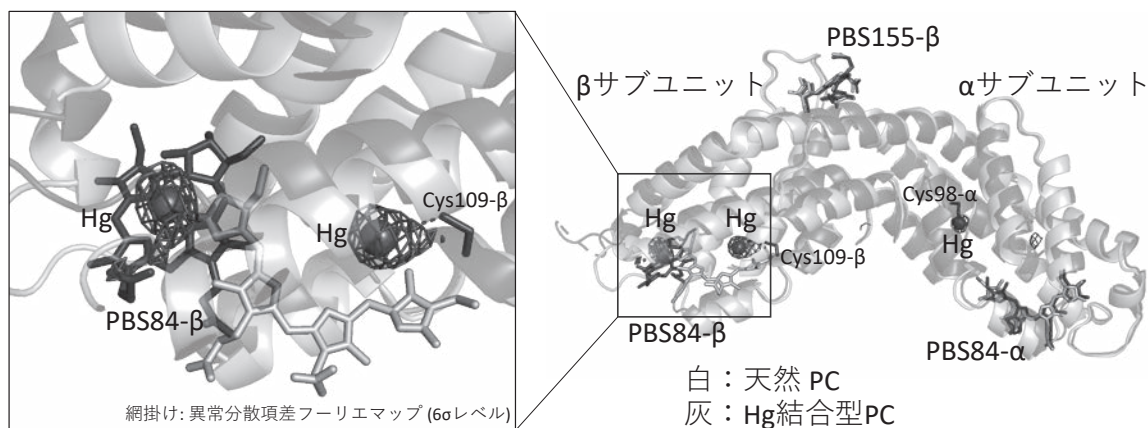


図5. 水銀イオンを取り込むPBSの構造変化(左)と水銀イオンが結合したPCの全体構造(右)

表1. 水銀及び鉛を結合させたPC結晶の結晶学的統計値

	HgCl ₂ conc.		PbCl ₂ conc.	
	0.1mM	1mM	10mM	10mM
Data collection				
Resolution	20-1.7 (1.73-1.70)	20-1.82 (1.86-1.82)	20-2.01 (2.06-2.01)	20-1.32 (1.34-1.32)
Obs reflection	1,159,714	947,755	217,637	1,875,962
Uniq reflection	56,974	46,928	33,394	92,097
Redundancy	20.4 (18.1)	20.2 (21.9)	6.5 (6.7)	20.4 (19.0)
Completeness (%)	98.2 (98.7)	98.9 (97.2)	99.6 (96.4)	100 (100)
R-merge (%)	9.4 (181)	12.6 (237)	8.3 (73.4)	5.1 (269)
I/sigma	18.7 (1.7)	16.5 (1.6)	12.7 (2.6)	26.9 (1.3)
Refinemet				
R /free R (%)	26.3 / 28.6	25.5 / 28.0	23.5 / 26.4	21.2 / 23.4
No of bound metals	1	3	4	6

4. 考察

本研究により、初めてPCがシステイン残基による結合とPBSによって水銀イオンを錯体構造として強固に取り込む構造を明らかにした。水銀イオンによって吸収スペクトルが減衰するのはPBS84- β の構造変化に起因しており、一方で吸光度が残存するのは残りのPBSが元の構造を保持しているためと思われる。先行研究から、PCが重金属由来のラジカル発生を抑える作用が報告されている[7]。これはPBSによる配位結合とシステイン残基による共有結合によって、金属イオンを無毒化している可能性が考えられる。水銀イオンを強固に取り込んだPCは3量体構造を維持しており、光吸収能が残っているため、もし本来の光エネルギーの伝達が可能であれば、シアノバクテリアによる水銀イオンで汚染された環境を改善する「バイオレメディエーション」として今後の研究が期待される。

参考文献

- [1] Adir, N. Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: reconstructing a giant. *Photosynth. Res.* **85**, 15–32 (2005).
- [2] Adir, N., Vainer, R., Lerner, N. Refined structure of C-phycocyanin from the cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 1.6° A: insights into the role of solvent molecules in thermal stability and co-factor structure. *Biochim Biophys Acta* **1556**, 168–174, (2002)
- [3] Nganou, C., David, L., Adir, N., Mkandawire, M. Linker proteins enable ultrafast excitation energy transfer in the phycobilisome antenna system of *Thermosynechococcus vulcanus*. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **15**, 31–44, (2016)
- [4] Bennett, A., Bogorad, L. Complimentary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga, *J. Cell Biol.*, **58**, 419–435, (1978)
- [5] Bhayani, K., Mitra, M., Ghosh, T., Mishra, S. C-Phycocyanin as a potential biosensor for heavy metals like Hg²⁺ in aquatic system. *RSC Adv.*, **6**. 111599–111605, (2016)
- [6] Ferraro, G., Imbimbo, P., Marseglia, A., Illiano, A., Fontanarosa, C., Amoresano, A., Merlino, A. A thermophilic C-phycocyanin with unprecedented biophysical and biochemical properties. *Int. J. Biol. Macromol.*, **150**, 38–51, (2020)
- [7] Chattopadhyay, P.K., Gaylord, B., Palmer, A., Jiang, N., Raven, M.A., Lewis, G., Reuter, M.A., Nur-ur Rahman, A.K.M., Price, D.A., Betts, M.R. and Roederer, M., Brilliant violet fluorophores: A new class of ultrabright fluorescent compounds for immunofluorescence experiments. *Cytometry*, **81A**, 456–46, (2012)