

「パターン化人工膜を用いた光合成分子機構の研究」

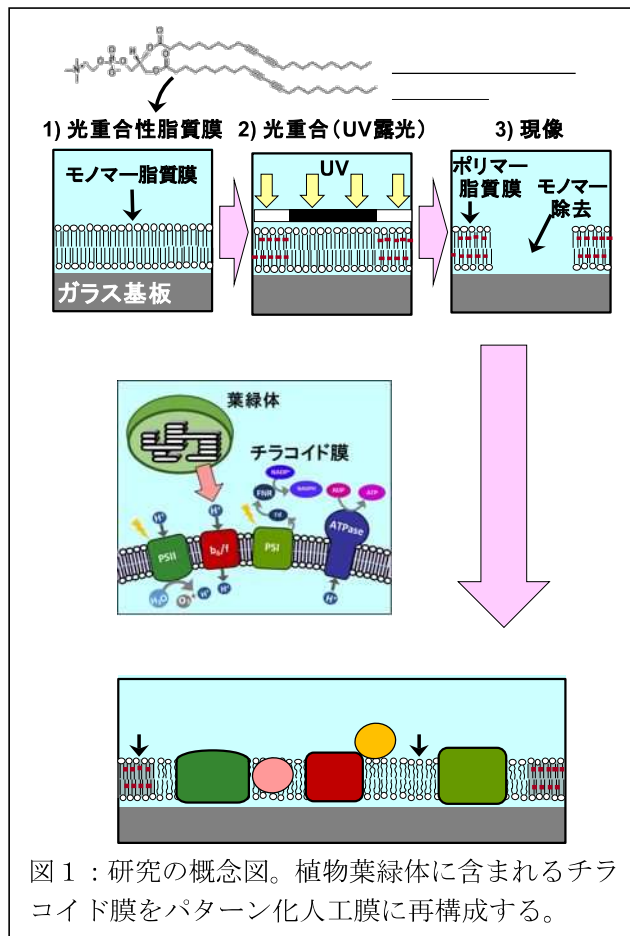
神戸大学バイオシグナル総合研究センター

森垣 憲一

1 研究の背景と目的

世界的な気候変動や食糧需要の爆発的増加の中、栽培植物の光合成効率や光耐性を改善して食糧生産を確保することは重要な課題である。光合成では光エネルギー変換と光傷害が拮抗しており、損傷を抑制するためにチラコイド膜内での分子分布が光合成機能をどのように制御するかを分子レベルで理解することは重要である。高等植物において光合成を行うチラコイド膜は、光化学系 II (PSII)、光化学系 I (PSI) など多様なタンパク質群が膜内に配置された超分子系である。チラコイド膜での膜タンパク質や脂質のヘテロで動的な分布は、光合成過程のエネルギー利用効率や酸化傷害からの保護に重要な役割を果たす (Sacharz, Nat. Plants 3: 16225 (2017))。しかし、従来の光合成研究は、植物体そのものを用いた分子遺伝学手法と、個別分子や複合体を分離精製して構造や機能を調べる生化学手法に二極分化しており、2次元膜内における動的な分子分布を検証する有効な手法がない。分子遺伝学手法においては、チラコイド膜の組成改変が植物の生育を阻害し解析材料を獲得できないという手法的障壁がある (Kobayashi, 2007 Proc. Natl. Acad. Sci. 104: 17216)。

そのような状況の中、研究代表者（森垣）は、ポリマー脂質膜と生体脂質膜を組み合わせたパターン化人工膜を独自に開発し、膜タンパク質の膜内局在と機能を定量的に評価する技術確立した (Biophys. J. 109: 2307 (2015))。近年、植物由来チラコイド膜を、リン脂質ベシクルと混合して人工膜に再構成し、PSII と PSI の光合成活性を計測することに成功した (Langmuir 36: 5863, (2020)) (図 1)。多様な膜タンパク質群を含むチラコイド膜を、流動性を持った2次元膜として基板表面に再構成した例はなく、極めてユニークな系である。この系を用いて脂質組成や膜タンパク質分布が光合成機能に与える影響を詳細に解析できれば、従来手法では調べることが困難であったチラコイド膜のヘテロな2次元膜が光合成に果たす役割を明らかにできると期待される。本研究は、パターン化人工膜を用いて、ガラス基板表面にチラコイド膜を2次元膜として再構成し、脂質と膜タンパク質の組成や2次元分布が光合成機能に与える影響を解析する新規技術を開発することをめざした。



2 研究方法・研究内容

(1) パターン化チラコイド膜の作製

光リソグラフィー技術を用いて光重合性脂質をガラス基板表面にパターン化重合し、モノマーを除去して形成された区画にハウレンソウから単離したチラコイド膜を導入する(図1)。脂質ベシクルを融合促進剤として添加することで、チラコイド膜を2次元膜としてパターン化導入できることが分かっている(Langmuir 36: 5863, (2020))。ハウレンソウは人工気象室においてコントロールされた生育環境で栽培された。パターン化膜に、脂質ベシクルを融合促進剤として添加することで、2次元膜としてチラコイド膜(ハイブリッド膜)を導入した。導入の際、脂質ベシクルとチラコイド膜の割合をコントロールすることで、チラコイド膜の構造や分子間相互作用がどのように変化するかを研究したい。チラコイド膜と脂質ベシクル(DOPC)の割合を脂質含有量換算で1:2, 1:1, 2:1となるように調製した。膜の流動性の有無を調べるために、FRAP(Fluorescence recovery after photobleaching)によって評価した。チラコイド膜の割合によってどのように蛍光値が変化するかを調べた。チラコイド膜からはクロロフィル由来の、脂質ベシクル(DOPC)からは蛍光色素(NBD-PE)由来の蛍光値を顕微鏡で測定した。

(2) 低温蛍光スペクトル測定

ハイブリッド膜内においてチラコイド膜由来タンパク質の有無、膜タンパク質の複合体形成などの状態を調べるために、スペクトル測定を行った。低温(77K)で行うことで、PSIIとPSIのピーク分解能を上げた。ハイブリッド膜をNMRチューブ内の側面に形成させ、液体窒素で凍らした後、スペクトルを測定した。440nmおよび459nmの波長で励起させた。対照実験として、チラコイド懸濁液のスペクトルも測定した。NMRチューブ内のハイブリッド膜もFRAPで膜の流動性の有無を評価した。さらに、PSII, PSIにおける光励起・エネルギー移動を評価するために、研究分担者(柴田)が独自に開発した低温蛍光顕微鏡(77K)により、PSIIおよびPSIを時間分解蛍光分光、イメージングで解析した。

3 研究成果

(1) チラコイド膜再構成
チラコイド膜とDOPCの混合膜をパターン化ポリマー膜の区画内に導入した蛍光顕微鏡画像を図2に示す。チラコイド膜由来のクロロフィル色素の蛍光とDOPC由来のNBD-PEの蛍光がともに観測された。チラコイド膜の含有量が増えるに従ってクロロフィル蛍光が増大しNBD-PE蛍光が弱くなった。各区画のクロロフィル蛍光強度と

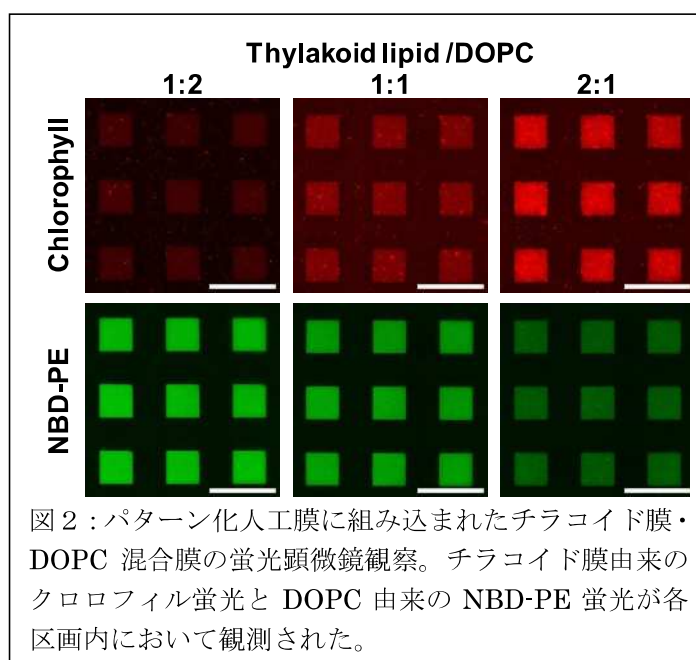


図2: パターン化人工膜に組み込まれたチラコイド膜・DOPC 混合膜の蛍光顕微鏡観察。チラコイド膜由来のクロロフィル蛍光と DOPC 由来の NBD-PE 蛍光が各区画内において観測された。

NBD-PE 蛍光強度をプロットすると両者には強い負の相関が見られた。このことは、混合膜においてチラコイド膜と DOPC 由来の膜成分含有量を制御できることを示している。FRAP を行ったところ退色部分の蛍光値が回復したことから、2次元に連続した膜が形成されていることが分かった。今回検討したどの割合においてもこのような流動性が観測された。一方、チラコイド膜含有量が多くなるに従って区画内に凝集体が見られるようになった(図2)。1枚のパターン化人工膜においても区画ごとに蛍光値の大きなばらつきが観測された。これはグラナなどの凝集構造がそのまま吸着しているものと考えられる。

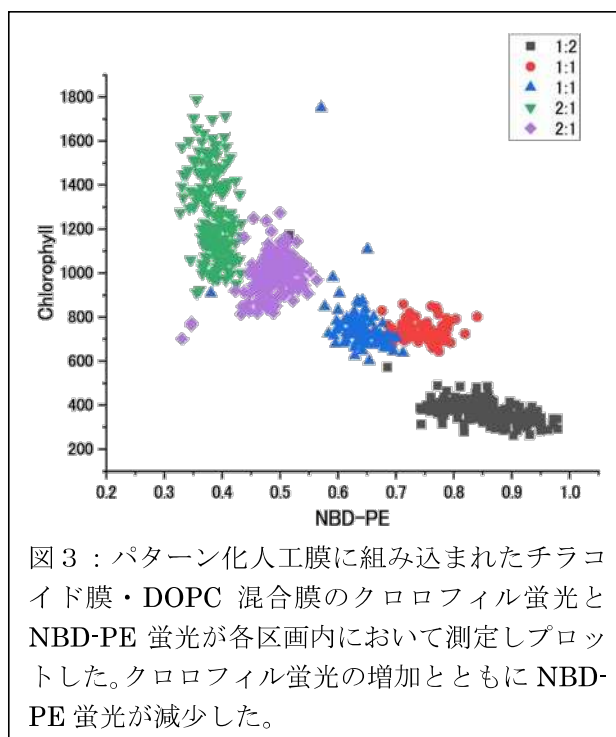


図3：パターン化人工膜に組み込まれたチラコイド膜・DOPC 混合膜のクロロフィル蛍光と NBD-PE 蛍光が各区画内において測定しプロットした。クロロフィル蛍光の増加とともに NBD-PE 蛍光が減少した。

(2) 低温蛍光スペクトル
パターン化人工膜に組み込まれたチラコイド膜由来のタンパク質がどのような凝集構造を持っているかを調べるために、低温(77K)で蛍光分光を測定した。図4に示すように NMR 測定用のガラスチューブの内部にチラコイド膜と DOPC のハイブリッド膜を形成した。ハイブリッド膜が NMR チューブ内で2次元に連続した脂質膜を形成していることを検証するために、FRAP で蛍光回復を観測し膜流動性を確認した(図4)。図5に低温蛍光スペクトルを示す。チラコイド懸濁液のスペクトルでは、690nm、740nm あたりにそれぞれ PSII と PSI 由来の蛍光ピークが見られた。一方、ハイブリッド膜のスペクトル(励起波長

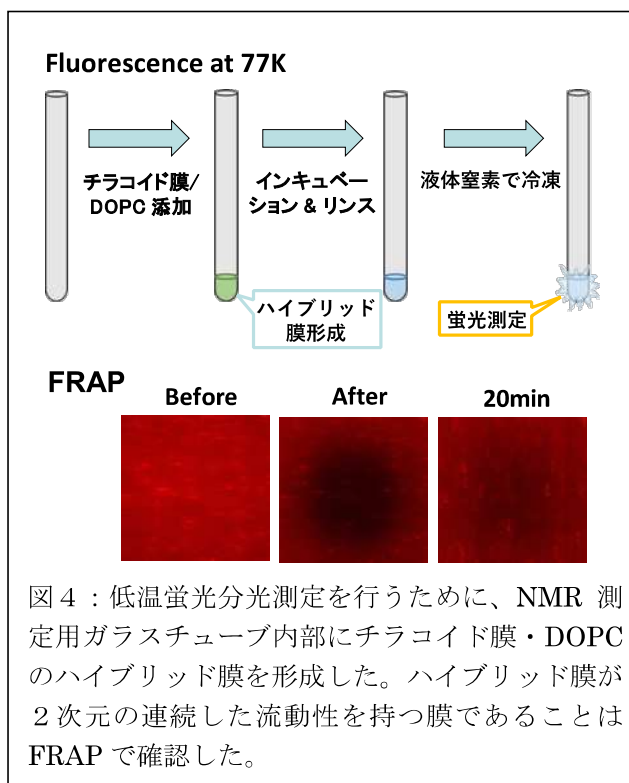


図4：低温蛍光分光測定を行うために、NMR 測定用ガラスチューブ内部にチラコイド膜・DOPC のハイブリッド膜を形成した。ハイブリッド膜が2次元の連続した流動性を持つ膜であることは FRAP で確認した。

440nm) では、670nm、680nm、730nm あたりにそれぞれピークが見られた。670nm は遊離したクロロフィル分子、680nm は LHCII、730nm は PSI 由来であると考えられる。このことより、ハイブリッド膜においてはチラコイド膜と DOPC が混合することにより、クロロフィル色素の遊離、LHCII と PSII との脱離が起きるも

のと考えられる。励起波長 459nm では 690nm に蛍光が観測された。ハイブリッド膜において複合体の可逆的な形成・脱離が起きることを今後、さらに詳細に検証する必要がある。

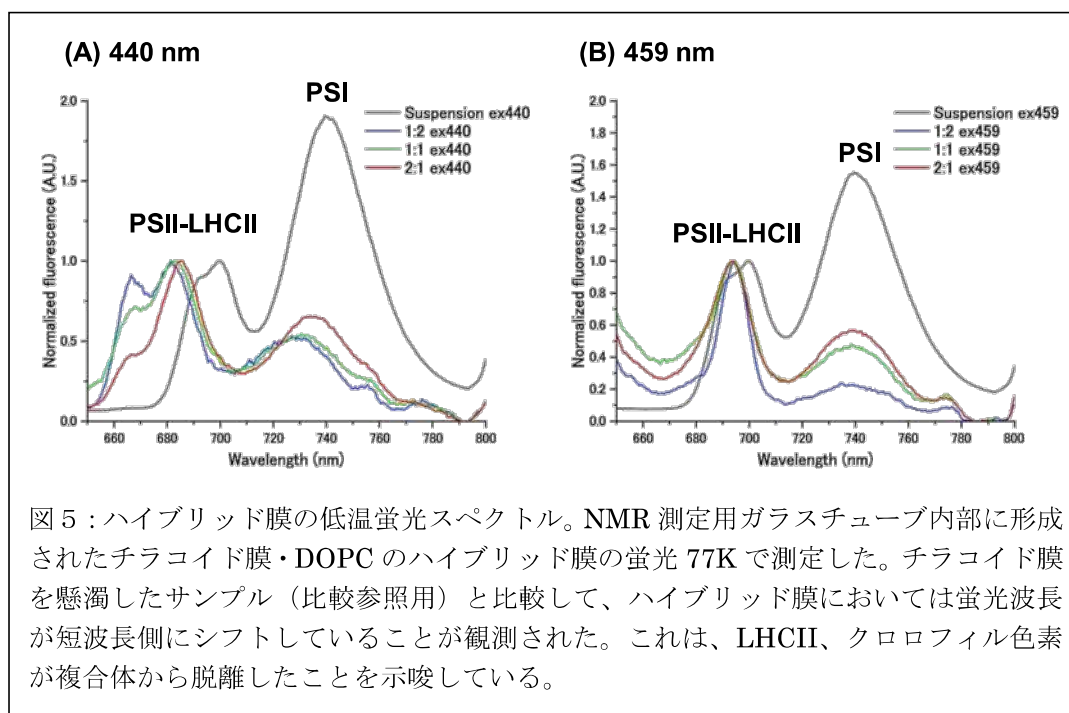


図 5 : ハイブリッド膜の低温蛍光スペクトル。NMR 測定用ガラスチューブ内部に形成されたチラコイド膜・DOPC のハイブリッド膜の蛍光 77K で測定した。チラコイド膜を懸濁したサンプル（比較参照用）と比較して、ハイブリッド膜においては蛍光波長が短波長側にシフトしていることが観測された。これは、LHCII、クロロフィル色素が複合体から脱離したことを示唆している。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究は、チラコイド膜内における分子分布が光合成機能に果たす役割を詳細に解析する新規手法論を開発した。そのためにポリマー脂質膜によって形成されたパターン化人工膜の区画内にチラコイド膜とリン脂質膜（DOPC）を混合して導入した。組み込まれたハイブリッド膜においては、天然のチラコイド膜と比較して複合体などの膜タンパク質が希釈され LHCII、クロロフィル色素の一部が複合体から脱離していることが示唆された。今後、複合体の構造をより保った状態でチラコイド 2 次元膜を再現する技術の開発に取り組む。チラコイド 2 次元膜内における分子分布が電子・エネルギー伝達をどのように制御するかは、光合成機能に本質的に重要でありながら従来の技術では分子レベルでの理解が充分にできていない難問題である。将来、ガラス基板表面に形成された 2 次元膜を用いてこれを解明することができれば、栽培植物の光合成効率や光耐性を改善する技術につながるものと考えられる。そして、食糧生産の増加を通じて気候変動や人口増加に直面する社会に大きく貢献できるものと期待される。