様式3

令和2年度愛媛大学プロテオサイエンスセンター共同研究報告書

令和3年2月26日

国立大学法人愛媛大学

プロテオサイエンスセンター長殿

研究代表者

<u>所属機関:</u>	立命館大学
部局·職名:	生命科学部·教授
氏 名:	長澤 裕

1. 研究課題

フェムト秒レーザー時間分解分光法を用いた光合成光化学系 II の励起、電荷分離速度解析と 制御機構の解明

2	石	₽空	絈	繬
~	. ну	1 2 4	<u>ин</u>	111166

氏名	所属機関・部局	職名	分担内容
研究代表者 長澤 裕	立命館大学・生命 科学部 応用化学 科	教授	フェムト秒レーザー時間分解分光測定
研究分担者 杉浦 美羽	愛媛大学・プロテ オサイエンスセンタ ー	准教授	光化学系 Ⅱ 試料作製、データ解析、研 究総括

3. 研究成果

別紙のとおり

【研究目的】

光合成による光エネルギーの生体エネルギーへの変換反応は、葉緑体チラコイド 膜に並んだ複数のタンパク質複合体による電子伝達によって行われる。これらの反 応は、光化学系 II 複合体の P680 が光励起されて電荷分離し、Pheopi に電子供与す

ることによって始まる (図 1)。P680 は光合 成反応の要となる最も重要な役割を担って いるにもかかわらず、光化学系 II の反応中 心タンパク質に結合した複数の特定のクロ ロフィル分子であること、少なくとも 2 分 子のクロロフィルに正電荷が偏って分布す ること程度しか分かっておらず、分子の特 定すらされていない。この原因として、1) ピコ秒レベルで起こる電荷分離速度よりも 31 分子の周辺クロロフィルの蛍光寿命が 長く励起と電荷分離反応するクロロフィル を特定できないこと、2) 反応に関与するク ロロフィル分子と関与しない分子の極大吸 収波長を分けることができないために反応 を追跡できないこと、などが挙げられる。



図1 光化学系 II 反応中心に配置するコファ クターと電子伝達経路。矢印は電子移動を示 す。同じコファクターが D1 と D2 に結合してい るが、電子移動は主に D1 側で起こる。

最近、研究分担者の杉浦らは、反応中心の4分子クロロフィルのリガンドを特異 的に置換した好熱性シアノバクテリアの光化学系 II を作製して詳細に解析し、そ れぞれのクロロフィル分子の極大吸収波長を特定することに成功した。そして、こ れらのうちの Chl_{D1} が最もエネルギーレベルの低い分子で、これが励起されること を初めて見出した¹⁾。一方、超高速時間分解分光装置開発を専門にする研究代表者 の長澤らは、クロロフィルの励起波長よりも短波長で励起させた光化学系 II のフ ェムト秒時間分解分光測定において、時間変化するクロロフィル分子の吸収変化を 見出した²⁾。このように、研究分担者は研究が進まなかった原因のうちの 2)を、研 究代表者は 1)を解決した。そこで本共同研究では、野生型および部位特異的変異導 入した光化学系 II についてフェムト秒時間分解分光測定を行い、励起、電荷分離を 含めた P680 の反応機構を明らかにすることを試みた。

【研究材料と方法】

本研究では、好熱性シアノバクテリア Thermosynechococcus elongatus ゲノムの 組換えによって作製した Chl_{D1}の変異体 (D1/T179H)¹¹、P_{D1}の変異体 (D1/H198Q)³¹、Chl_{D2} の変異体 (D2/I178H)、および、野生型から精製した分子量が約 750,000 の膜タンパ ク質である光化学系 II 複合体を解析材料に用いた。それぞれのクロロフィル分子 の吸収波長を同定するために 77 Kで light-*minus*-dark 差吸収スペクトル (U-3900, Hitachi High Tech) を測定した。低温制御のために Cryostat Optistat (Oxford Instrument)を用いた。P₆₈₀の反応は、長澤らが開発したフェムト秒時間分解分光装 置を用いて、ポンププローブ法によって測定した。得られた吸収スペクトルをグロ -バル解析 (DAS) して反応の時定数を得た。また、スペクトル波形変化をガウス解 析し、波長と面積からクロロフィル上の正電荷分布を見積もった。

【研究成果】

異なる4分子のクロロフィルの吸収波長を同 定するために、野生型、および、組換え体から精 製した光化学系IIについて、77 Kでlight*minus*-dark差吸収スペクトル測定を行った。そ の結果、変異体においてChl⁺Q_A-のエレクトロク ロミズムの波長シフトが観察され、長波長側の 極大吸収波長からChl_{D1}、P_{D1}-P_{D2}、Chl_{D2}であること が分かった(図2)。

次に、フェムト秒時間分解分光測定を行い、励 起および電荷分離の反応速度の解析を試みた。 図3に示すように、クロロフィルのQyバンドであ る680 nm付近に時間と共に吸光度と吸収波長が



図 2 野生型、および、P680 クロロフィ ル変異体における 77 K での lightminus-dark 差吸収スペクトル。

変化するクロロフィルのブリーチングバンドが観察された。これらの反応に関わる 成分と反応速度を明らかにするためにグローバル解析(Decay Associated Spectra: DAS)を行い、P680の反応の時定数を得た(図4)。その結果、野生型では138 fsでChl_{D1} が励起され、その3.8 ps後にChl_{D1}が電荷分離されることが分かった。一方、Chl_{D1}変 異体では、まず112 fsでP_{D1}が励起された後に続いて508 fsでChl_{D1}が励起され、17 ps 後に電荷分離された。つまり、クロロフィルの中心金 属のリガンドを置換したChl_{D1}変異体では電荷分離が 野生型よりも13 psも遅くなっていた。反対側のクロ ロフィルの変異体であるChl_{D2}変異体の励起、電荷分 離の分子、反応速度については野生型と殆ど同じ結 果であった。Chl_{D1}変異体において認められた2分子の クロロフィル励起と著しい電荷分離速度の減少は、 Chl_{D1}のエネルギーレベルの低下が原因であると考え られる。Chl_{D1}変異体については、light-*minus*-dark 差吸収スペクトルにおける長波長シフトのみなら ず、熱発光測定においてChl_{D1}変異体の*Chl_{D1}のギブス エネルギーが上昇し、*Chl_{D1}のギブスエネルギーが低 下し、*Chl_{D1}-Chl_{D1}*のエネルギー差が野生型に比べて



図3 野生型光化学系 II のフェ ムト秒時間分解吸収スペクトル (一部抜粋)。桃色で示したとこ ろは Chl⁺由来のバンド。

大きくなることを見出している¹⁾。これらのことから、先にP_{D1}が励起されてからChl_{D1} にエネルギー移動が起こった原因は、Chl_{D1}のエネルギーレベルが低くなりすぎたた めであると考えられる。そして、電荷分離速度の著しい低下は、*Chl_{D1}-Chl_{D1}*のエネ ルギー差、つまり、電荷分離のギブスエネルギー差が大きくなったために電荷分離 速度が遅くなったと考えられる。



図 4 時間分解スペクトルのグローバル解析の結果。(A) 野生型(点線)および Chl_{D1} 変異体(実線)、(B) 野生型(点線)および Chl_{D2} 変異体(実線)。時定数をそれぞれの右に示した。

野生型のDAS解析では、野生型および変異体で電荷分離の約300 ps (図4の青)と 2 ns後 (図4の紫) に反応の時定数が得られた。いずれもクロロフィルのブリーチバ ンドであり、正に耐電したクロロフィルの反応を示している。これらのスペクトル 波形が時間と共に変化してい るため、クロロフィル上の正電 荷移動を示唆していると考え られる。そこで、それぞれの時 定数の吸収スペクトルをガウ ス解析し、4分子クロロフィル の極大吸収波長を指標に、正電 荷分布を解析した。得られた結 果のイメージ図を図5に示す。 野生型では300 psでPo1とPo2に 約90%と10%に、1.6 nsで約80%と 20%に正電荷が移動することが 明らかになった。一方、Chlo1変 異体では、300 psで正電荷がPo1



図 5 電荷分離後のクロロフィル上の正電荷分布。時定数の 吸収スペクトルのガウス解析によって計算した。

とP_{D2}に約40%と60%に広がるものの、1.6 nsでChl_{D1}とP_{D2}に20%と80%に大きく広がり、 野生型とは大きく異なる正電荷分布になっていた。Chl_{D2}変異体では、330 psで正電 荷がP_{D1}とP_{D2}にそれぞれ約60%と40%に広がり、1.6 nsでChl_{D1}-P_{D1}とP_{D2}に30%と70%に大 きく広がっていた。これらの結果から、天然の光合成反応では、電荷分離後に正電 荷はP_{D1}からP_{D2}に経時的に広がり、Tyrzから電子受容する時間にはクロロフィル上の 正電荷は主にP_{D1}に分布することが本研究で初めて明らかになった。また、Chl_{D1}およ びChl_{D2}のリガンドを別の原子に置換すると、正電荷分布はP_{D2}に偏ってしまうため、 Pheo_{D1}への電子供与とTyrzからの電子受容効率が低下して、光合成反応に不利になる ことが明らかになった。

以上、本研究により、光合成初期反応では光化学系IIの Chl_{D1}が励起され、続いて 3.8 psで電荷分離し、その後、正電荷が経時的にChl_{D1}→P_{D2}→P_{D2}に広がり、Tyr_Zから 電子受容する時にはP_{D1}とP_{D2}の正電荷が80%対20%になることが世界で初めて明らか にされた。また、光化学系II反応中心に配置された4分子のクロロフィルのうち、両 端のChl_{D1}とChl_{D2}の特殊なリガンド環境は、正電荷分布を制御するためであることが 明らかになった。

【成果発表】

本研究成果は、2021年1月22日-23日に行われた第3回新学術領域「革新的光-物質 変換」公開シンポジウム(Zoomオンライン)で、成果の研究成果の一部として発表 した。また、本成果を含む研究成果については論文準備中である。

【今後の課題】

図1に示したように、光化学系 II 反応中心にはコファクターが対称的に配置さ れている。にも関わらず、電子移動は左側のコファクターのみで起こる。それは P680 が電荷分離後に電子を左側の PheoD1 に供与するためであるが、これの反応制 御機構については不明である。本研究成果である、正電荷の不均一な分布制御機構 がその鍵を握っていると考えられる。光合成反応の脅威ともいえる高効率な反応機 構を明らかにするために、電子分配の制御機構解明の課題が残る。

【参考文献】

- Y. Takegawa, M. Nakamura, S. Nakamura, T. Noguchi, J. Sellés, A. W. Rutherford, A. Boussac, and M. Sugiura, *Biochim. Biophys. Acta(Bioenergetics)* 1860 (2019) 297-309.
- 2. Y. Yoneda, Y. Nagasawa, Y. Umena, and H.Miyasaka, J. Phys. Chem. Lett. 10 (2019) 3710-3714.
- 3. Sugiura, M., Boussac, A., Noguchi, T., and Rappaport, F., *Biochim. Biophys. Acta* (*Bioenergetics*), (2008) 1777, 331-342.