

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名：光合成系の人為操作及び光反応制御

### 2 研究者氏名：橋本 秀樹

研究員：佐島 徳武（平成 15 年 2 月～平成 17 年 10 月）

研究員：陳 岐岱（平成 17 年 2 月～平成 18 年 3 月）

### 3 研究の狙い：

植物の光合成反応は、地球上に降り注ぐ太陽光エネルギーを有効利用している、現存する最高の光エネルギー変換機構である。光合成反応に寄与する色素タンパク超分子複合体の構造が原子スケールで明らかにされたこと、および超高速レーザー分光計測技術の進歩により、生命が 38 億年の進化の過程において獲得したバイオナノマシンの全容が解明されつつある。人類は光合成反応そのものを、より有用な形に制御できる段階に突入した。本研究では、光合成系を構築する機能性色素・タンパク質を人為的に改変し再構築すること、および極超短パルス光の位相制御（チャープ制御）を行うことにより「生命の青写真（自然の巧妙さ）」を能動的に探索することを目指す。

### 4 研究成果：

#### 4.1 アナログカロテノイドを再構築した人工の光合成光反応中心複合体の単結晶X線構造解析と光機能性の評価

光合成色素カロテノイドの光励起状態の準位エネルギーは、共役二重結合の数により変化する。エネルギー伝達や電子伝達などの光機能の詳細を解明するためには、カロテノイドの共役二重結合数と光機能との関係について系統的に調査することが必要である。このことを実現するためのもっとも確実な方法は、①天然カロテノイドと同一の炭化水素骨格を有するが、共役二重結合数が異なる一連のアナログ体を合成し、②生化学的手法を用いることによりアポ蛋白質に再構築を行い、③光機能の差異について系統的に調査することである。

光合成細菌 *Rb. sphaeroides* のカロテノイド欠損突然変異株、R26.1 ミュータントから調製した光反応中心複合体 (RC) に有機合成により調製したアナログカロテノイドを再構築した、人工の光反応中心複合体を創成し、単結晶成長とそれに続く X 線結晶構造解析を行った。カロテノイド周辺の電子密度分布に焦点をあてた場合 (図 1 参照)、人工 RC の場合においても天然と同様にアナログカロテノイドが 15 シス構造を取って RC に結合すること、カロテノイドの有無でアミノ酸残基 (フェニルアラニン M162) の位置がフリップすること、及びカロテノイドに存在するメキシ基とアミノ酸残基 (トリプトファン M75) とが水素結合していることが明らかになった。カロテノイドを RC に再構築するには、一定の方向性が存在し、フェニルアラニン M162 は門番としての、トリプトファン M75 は鍵としての役割を果たしていることが明らかになった。

光反応中心複合体に結合したカロテノイドは、過剰な光照射により生成するバクテリオクロフィルの三重項励起状態を除去し、光合成系を光破壊から保護する重要な役割を担っている。再構築したアナログカロテノイドの光機能を評価するために、ナノ秒時間分解吸収分光測定を行った。カロテノイドの三重項励起状態に由来する過渡吸収信号が検出できれば、再構築したカロテノイドが光保護機能を果たしていることの直接的な証拠となる。得られたスペクトルデータセットに対して、特異値解析 (SVD) を適用することにより、微弱な信号変化を精度良く検出することが可能となった。従来は共役二重結合数が 10 個以上のカロテノイドが光保護機能を有することが定説と

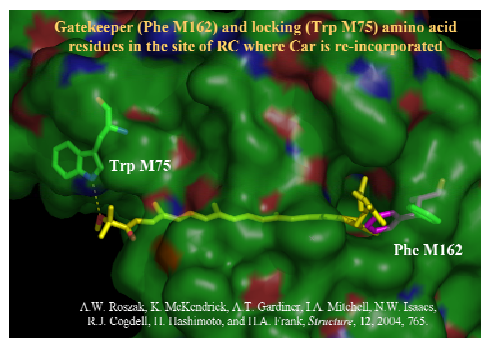


図 1 アナログカロテノイドを再構築した人工の光反応中心の単結晶X線構造解析の結果

なっていた。これに対して、今回の実験により共役二重結合数が 9 および 8 のアナログカロテノイドを再構築した系でも、カロテノイドの三重項励起状態に帰属できる信号が検出されると言う、従来概念を覆す結果が得られた。

#### 4.2 光合成色素蛋白複合体の電場変調吸収分光

光合成色素と周囲のアポ蛋白質との静電的相互作用(タンパク質の運動に起因する動的な効果)を検出する有効な研究手段として、二位相ロックインアンプを用いた計測方法が有効であることを提案し、解析方法の構築と、実際に光合成細菌 *Rb. sphaeroides* G1C の LH2 アンテナ色素タンパク複合体を用いた測定による新解析方法の有効性を検証した。LH2 複合体に結合した B850 バクテリオクロロフィル二量体の吸収バンドに注目し、位相遅れ成分( $\pi/2$  成分)の温度依存性、及び周波数依存性を測定することにより、色素とアポタンパク質との動的な静電相互作用の検出に成功した。

カロテノイド欠損光合成細菌 *Rb. sphaeroides* R-26.1 から調製した光反応中心複合体(RC)と、系外から有機合成により調製したアナログカロテノイドを再構築した人工の RC の電場変調吸収分光測定(室温及び低温)を行い、カロテノイド分子の有無により周囲に存在するバクテリオクロロフィル分子周辺の静電環境にどのような差異が生じるのかを初めて定量化した。室温(生理温度)で測定した場合、カロテノイド分子から 16 Å 離れて存在するスペシャルペアバクテリオクロロフィル分子の周辺の静電場に、カロテノイド分子の有無により 10 % 程度の差異が生じることを明らかにした。

#### 4.3 LH1 アンテナ複合体の再構築とその電場変調吸収分光

紅色光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* から、共役二重結合鎖  $n = 13$  のカロテノイド(all-*trans*-spirilloxanthin)を単離精製した。単離したカロテノイドを、Triton X-100 ミセル中で、カロテノイドを除去した B880 色素蛋白複合体の単量体サブユニットと再会合することにより、*Rs. rubrum* LH1 複合体を人為的に再構築した。吸収スペクトル、蛍光励起スペクトルおよび電場変調吸収スペクトルを測定することで、再構成体と天然由来の LH1 複合体についての比較検討を行った。LH1 complex 再構成体は、B880 吸収帯が 3 nm 短波長シフトしている点とカロテノイド部分の振動構造がより明瞭になっている点を除けば、天然体と基本的に同様な吸収スペクトルを与えた。蛍光励起スペクトルの測定により、カロテノイドからバクテリオクロロフィルへの励起エネルギー移動効率を決定したところ、天然 LH1 では 35%であったのに対し、再構成 LH1 はこれより有意に高い 40%の効率を与えた。電場変調吸収分光測定によって、LH1 複合体中のカロテノイド及びバクテリオクロロフィル分子の非線形光学パラメータ(光誘起分極率変化 $\Delta\alpha$ ・光誘起双極子モーメント変化 $\Delta\mu$ )を決定したところ、バクテリオクロロフィル分子では天然体と再構成体とで同様の値を与えるのに対して、カロテノイド分子では大きな差異が検出された。この結果は再構成 LH1 複合体中のカロテノイド分子周辺の静電的環境が、天然 LH1 の場合とは明らかに異なっていることを示している。電場変調吸収分光法は、再構成体の構造に関して有意な情報を与える分光学的手法であることが明らかになった。

#### 4.4 光合成色素蛋白複合体の配列制御と2次元結晶化

光合成細菌の光合成系は、二種類のアンテナ色素蛋白複合体(LH1 及び LH2)と光反応中心(RC)の3つの色素蛋白複合体が、有機的に結合した超分子配置を形成することにより生理機能を発現している。紅色光合成細菌 *Blc. viridis*(色素蛋白複合体として RC-LH1 コア複合体のみを持つ)に注目し、この光合成細菌からの RC-LH1 コア複合体の単離精製と、精製したコア複合体をリン脂質二重層膜(卵黄由来のフォスファチジルコリン)に再構築することに焦点を絞り、研究を展開した。透過型電子顕微鏡を用いた観測により、人為的に再構築した人工光合成膜において、LH1 複合体の直径 10 nm に対応する環状の構造体

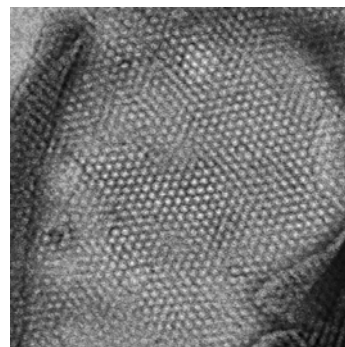


図 2 光合成細菌 *Blc. viridis* から単離精製した RC-LH1 コア複合体を脂質二重層膜中で二次元結晶化させた人工光合成膜の TEM 像

が細密充填構造(2次元結晶)を取り配列している画像を取得した(図 2 参照)。その画像をフーリエ変換し回折像を取得することにより、6つの明瞭な回折点を得た。この結果は、人為的に再構築した人工の光合成膜の中で、RC-LH1 コア複合体が細密充填構造を取ることを示している。

同様の手法を用いて他の光合成細菌(*Rps. acidophila*)から調製した LH2(単結晶X線構造解析により 1.9 Å 分解能で構造が決定されている)および上述の *viridis* から調製した RC-LH1 複合体を同時に任意比率で再構築することにより、ヘテロな人工光合成膜を調製することに成功した。蛍光スペクトルの測定により、この人為的に再構築した光合成膜内においても、LH2 から LH1 へのエネルギー移動が起こっていることが明らかになった。本研究結果により、光合成膜中における各アンテナ複合体間のコヒーレントなエネルギー伝達機構を解明するための、人工光合成膜試料の開発が極めて可能であることが示唆された。上述した LH1 複合体の再構成技術と組み合わせることで、色素系を改変した人工の光合成色素蛋白複合体間のエネルギー伝達に関する巨視的コヒーレンスの探索が可能となることが期待される。

#### 4.5 光合成色素カロテノイドおよびアンテナ色素蛋白複合体のサブ20フェムト秒時間分解吸収分光

カロテノイドのアンテナ色素としての機能発現に関して、時間分解能 20 フェムト秒を切る超高速レーザー分光法を適用することにより、従来から知られている一光子許容な $^1B_u^+$ 状態( $S_2$ 状態)と禁制な $2^1A_g$ 状態( $S_1$ 状態)の2つの一重項励起状態の間に、別の一重項励起状態( $S_x$ 状態)が存在し、励起状態の緩和に関与することを実時間で明らかにした。この研究の発展として、一連の共役鎖長を持つ $\beta$ -カロテンホモログ体および光合成細菌より単離精製したカロテノイド分子について同様な測定を行い。最短の共役二重結合数 $N=5$ を持つ場合を除き、全ての化合物において、 $S_2$ 励起状態から $S_1$ 励起状態への緩和過程において $S_x$ 中間励起状態が存在することを実時間で観測した。さらに、 $\beta$ -カロテンの場合に観測された $S_x$ 状態の素性として、二光子励起により生成したコヒーレント過渡状態である可能性を示唆する実験および解析を行った。

溶液中のフリーなカロテノイド分子および LH2 アンテナ色素蛋白複合体に結合したカロテノイドのサブ 20 フェムト秒時間分解吸収分光測定を行い、Simulated Impulsive Raman 過程により生成するコヒーレント振動の観測に初めて成功した。さらに、得られた時間領域信号に対して、十分な時間分解能と周波数分解能を合わせ持つ Wavelet 解析を適用することにより、コヒーレント振動の時間変化(図 3 参照)を同定することに成功した。フェムト秒パルスのチャープを変化させることにより、各コヒーレント振動モードの強度を変化させることができると言う予備的実験に成功しており、本研究の究極到達目標である、光反応制御の実現性が極めて高いことが例示できた。さらに、電子系のコヒーレンスの過渡応答を調べるために、4光波混合の実験を行った。図 4 に記したとおり、光合成色素カロテノイドは極めて高い光学非線型性を有しており、4光波混合信号と同時に6光波混合の信号も明瞭に観測できた。さらに、4光波混合信号強度の時間変化(フォトンエコー)を測定したところ、コヒーレント振動を観測することに成功した。

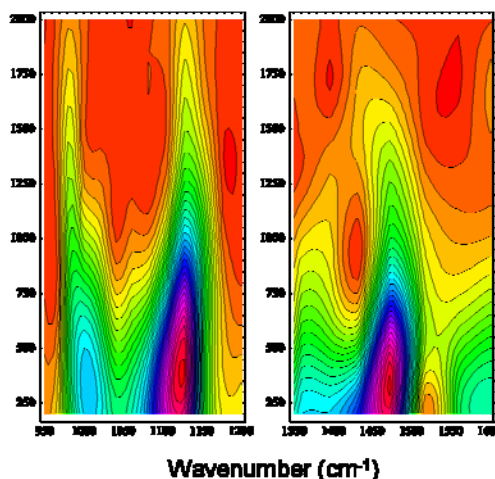


図 3 M15 カロテン分子のコヒーレント振動の時間変化を示す等高線図

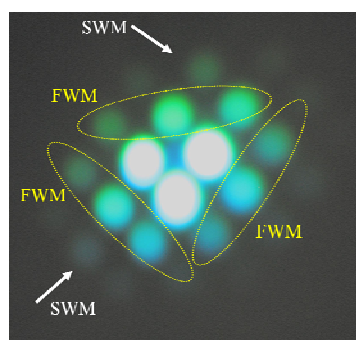


図 4 M15 カロテン分子の4光波(FWM)及び6光波(SWM)信号

## 5. 自己評価

本研究プロジェクトは生命科学、化学、物理の各分野における最先端の科学・技術を融合して初めて実践可能となるものである。光合成系の人為操作に関しては、当初計画を大幅に上回る有意義な研究成果を排出できたと自負している。困難とされる光合成膜蛋白質の結晶化と構造解析に加え、精密有機合成技術を駆使して、光機能の発現に密接に関係する構造部位を積極的に改変したアナログカロテノイドの大量全合成を達成し、それらをカロテノイド欠損光合成細菌より単離精製した光反応中心複合体(RC)に再構築し、その結晶化と構造解析を世界にさががけて達成した。本成果により、RC中におけるカロテノイドの結合部位に関する詳細な情報を取得することが可能となった。またその光機能性に関しても実証することができた。本研究成果の当該分野における波及効果・インパクトは絶大であり、種々の国際・国内学会において招待講演依頼を受けていることから、そのことは明白である。アンテナ複合体に関しては、構成要素をばらばらに還元した状態から、天然体と類似した分光学的性質を有する複合体の再構築技術を確立したのみならず、天然体との微弱な差異を検出する分光学的手法の開発に成功している。さらには、LH2 および RC-LH1 コア複合体をリン脂質二重層膜中に再配列・2次元結晶化することに成功している。今後各種レーザー分光計測等と組み合わせることで、光合成初期過程における超高速・高効率なエネルギー移動の本質理解に繋がるかと確信する。

超高速レーザー分光計測に関しても、革新的な研究成果を排出することに成功した。光合成初期過程において集光作用の中心的役割を担っているカロテノイド分子の光励起後の緩和過程において、従来の時間分解能では観測不能であった中間励起状態の存在を、パルス幅 20 フェムト秒を切るパルスレーザー光源を開発・分光応用することで、実時間で検出することに成功した。本研究成果は当該分野に強烈なインパクトを与えた。そのことは、海外で開催された国際会議で招待講演依頼を受けていることや、Science, Phys. Rev. Lett.等の国際的に権威のある学術雑誌に研究成果を公表していることにより明らかである。同超高速レーザー分光技術を発展させることができ、Stimulated Impulsive Raman 過程に起因するコヒーレント過渡振動の検出に成功している。特筆すべきは、フェムト秒パルスのチャープを変えることで、コヒーレント振動の各モードの相対強度を制御できることが示された点である。この成果は、本プロジェクトの究極目標である光合成初期反応(特にカロテノイドからクロロフィルへの励起エネルギー移動)のコヒーレント制御が極めて実現可能性が高いことを示唆している。したがって、光合成系の光反応制御に関しては大きなハードルをクリアできたものと自負している。フェムト秒パルスのチャープ制御に関して、空間光変調器(SLM)の導入を計画し、実行した。しかしながら、パルス幅 10 フェムト秒を切る極超短パルスレーザー光に対応したSLMは市販されておらず、素子開発から行わねばならないと言う事態が発生し、限られた時間内に装置そのものは完成させるに至ったが、性能を最適化し分光応用に結び付けるには至らなかった。本要素技術は、当該分野における研究を飛躍的に前進させるために必須であり、成功すれば世界ナンバー1かつオンリー1技術となることは明白である。したがって、今後、何らかの予算措置により研究続行の支援が得られることを期待する。パルス幅 10 フェムト秒を切り 500~800nm の範囲で波長可変な非同軸光パラメトリック増幅器(NOPA)の開発とコンパクト化に成功した。この技術開発により NOPA を市販できる程度に実用化させることができた。これもさががけ研究の大きな成果の1つである。

最後に、本研究プロジェクトを成功へと導くために2名の博士研究の方々に献身的な協力を頂戴した。いずれの方々も、研究成果が評価され、プロジェクト終了後にアカデミックポジションに就任している。これも、さががけ研究の大きな成果であると考える。

## 6. 研究総括の見解

光合成膜蛋白質の結晶化と構造解析に加え、光機能の発現に密接に関係する構造部位を積極的に改変したアナログカロテノイドの大量全合成を達成し、光反応中心複合体(RC)に再構築し、その結晶化と構造解析に成功した。更に、超高速レーザー分光計測系を作り上げ、集光作用の

中心的役割を担っているカロテノイド分子の光励起後の緩和過程を、中間励起状態の存在まで含めて解明できた。この様に生命科学、化学、物理の各分野の最先端の科学・技術を融合して、光合成系の人為操作に一步踏み込んだことは評価に値する。

## 7. 主な論文等

### 7.1 学術論文 (52 件)

- (1) G. Cerullo, D. Polli, G. Lanzani, S. De Silvestri, H. Hashimoto, and R.J. Cogdell, *Science* **298** (2002) 2395-2398. "Photosynthetic Light Harvesting by Carotenoids: Detection of an Intermediate Excited State"
- (2) A.W. Roszak, K. McKendrick, A.T. Gardiner, I.A. Mitchell, N.W. Isaacs, R.J. Cogdell, H. Hashimoto, and H.A. Frank, *Structure* **12** (2004) 765-773. "Protein Regulation of Carotenoid Binding: Gatekeeper and Locking Amino Acid Residues in Reaction Centers of *Rhodobacter sphaeroides*"
- (3) D. Polli, G. Cerullo, G. Lanzani, S. De Silvestri, K. Yanagi, H. Hashimoto, and R.J. Cogdell, *Phys. Rev. Lett.* **93** (2004) 163002/1-163002/4. "Conjugation Length Dependence of Internal Conversion in Carotenoids: Role of the Intermediate State"
- (4) K. Yanagi, M. Shimizu, H. Hashimoto, A.T. Gardiner, A.W. Roszak, and R.J. Cogdell, *J. Phys. Chem. B* **109** (2005) 992-998. "Local Electrostatic Field Induced by the Carotenoid Bound to the Reaction Center of the Purple Photosynthetic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides*"
- (5) D. Kozumi, M. Komukai, H. Hashimoto, and M. Yoshizawa, *Phys. Rev. Lett.* **95** (2005) 213601/1-213601/4. "Ultrafast Dynamics of All-*trans*- $\beta$ -Carotene Explored by Resonant and Nonresonant Photoexcitations"

他47件

### 7.2 国際会議発表・招待講演 (16件)

- (1) H. Hashimoto, K. Yanagi, M. Yoshizawa, D. Porri, G. Cerullo, G. Lanzani, S. De Silvestri, and R.J. Cogdell, 311. WE-Heraeus-Seminar on Excited State Processes of Carotenoids in Photosynthesis (2003, October 20-22) Bad Honnef (Germany). "Ultrafast relaxation kinetics of carotenoids after photoexcitation"
- (2) H. Hashimoto, K. Yanagi, A.T. Gardiner, and R.J. Cogdell, International Workshop on the Construction of Nano-Devices Based on Bacterial Light-Harvesting Complexes (2004, June 7-9) Glasgow (UK). "Stark spectroscopy on the native and reconstituted pigment-protein complexes of purple photosynthetic bacteria"
- (3) H. Hashimoto and R.J. Cogdell, Open Workshop on Molecular Modified Electrodes for Clean Energy Conversion (2004, October 1) Panasonic Center, Ariake, Tokyo (Japan). "Molecular Architecture of Native and Reconstituted Pigment Protein Complexes of Purple Photosynthetic Bacteria"
- (4) H. Hashimoto and R.J. Cogdell, International Workshop on Materials Science and Nano-Engineering (2004, December 11-14) Osaka Univ., Suita, Osaka (Japan). "Stark spectroscopy on the native and reconstituted pigment-protein complexes of purple photosynthetic bacteria"
- (5) H. Hashimoto, R. Fujii, K. Yanagi, A.T. Gardiner, A.W. Roszak, N.W. Issacs, H.A. Frank and R.J. Cogdell, 14<sup>th</sup> International Symposium on Carotenoids (2005, July 17-22) Edinburgh (UK). "Structures and Functions of Carotenoids Bound to Reaction Centres from Purple Photosynthetic Bacteria"

他11件



### 7.3 国内学会発表・招待講演（5件）

- (1) 橋本秀樹, 計測自動制御学会制御部門大会(2003年5月)神戸. “光合成の制御”
- (2) R.J. Cogdell, H. Hashimoto, K. Yanagi, D. Polli, G. Cerullo, G. Lanzani, and S.de Silvestri, 第17回カロテノイド研究談話会(2003年9月)釜石. “Excited singlet states of carotenoids and their involvement in photosynthetic light-harvesting”
- (3) 橋本秀樹, 日本分光学会岡山地区講演会(2003年12月)岡山大学. “生体系に対する分光計測とその周辺技術: 紅色光合成細菌の光合成系を対象として”
- (4) 橋本 秀樹, 光合成細菌の色素系と反応中心に関するセミナーXII(2004年6月)京都大学. “紅色光合成細菌の光反応中心及びピコア複合体の構造”
- (5) 橋本秀樹, 日本生物物理学会(2004年12月)京都国際会議場. “紅色光合成細菌のRC-LH1の構造”

### 7.4 一般発表(招待講演以外)

国際会議; 28件, 国内学会; 50件

### 7.5 特許(計4件)

- (1) 腰原伸也、佐島徳武、三沢和彦、橋本秀樹、日本国特許(特願 2003-161889)(2003年6月6日出願). “共役ポリエン分子の光反応制御方法”
- (2) 黒柳和良、高橋宏典、青島紳一郎、橋本秀樹(特願 2003-74260)(2003年3月18日出願). “遠赤外光発生装置”
- (3) 黒柳和良、橋本秀樹、日本国特許(特願 2003-299239)(2003年8月22日出願). “テラヘルツ波発生装置”
- (4) 浦上恒幸、青島紳一郎、伊藤晴康、橋本秀樹(特願 2003-343638)(2003年10月1日出願). “位相特性測定装置”

### 7.6 受賞(1件)

- (1) 平成15年度中谷電子計測技術振興財団研究助成賞

### 7.7 新聞発表(5件)

- (1) 読売新聞, 2005年5月29日(朝刊), “研究室から: 光合成活用発電システム”
- (2) 中日新聞, 2005年10月14日(朝刊), “テラヘルツ波の発生, 検出に成功”
- (3) 静岡新聞, 2005年10月14日(朝刊), “テラヘルツ波有機結晶使い発生成功”
- (4) 中部経済新聞, 2005年10月14日(朝刊), “テラヘルツ波を検出非線形有機結晶使用で”
- (5) 日刊工業新聞, 2005年10月14日(朝刊), “高強度テラヘルツ波発生・検出技術を開発”