

研究報告書

「褐藻類の光合成アンテナに結合した色素の構造と機能の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 28 年 3 月*

研究者: 藤井 律子

1. 研究のねらい

光子束密度の薄い太陽光を用いて化学反応を起こすためには、光子を吸収してそのエネルギーを適切な時定数と量で反応サイトに供給する集光アンテナは極めて重要である。海藻類は、水深 10 m 付近で得られる青緑色の弱い光を高効率で光合成に用いるシステムを持つ。これが光合成アンテナと呼ばれる色素-蛋白質複合体である。本研究では、水圏に生育する光合成生物の持つ光合成アンテナに結合する色素の構造と機能に着目した。

代表的な海洋光合成生物である褐藻類では、フコキサンチン-クロロフィルタンパク(FCP)と呼ばれる光合成アンテナに結合したフコキサンチンというカロテノイドが、緑色光を吸収し、ほぼ 100%という高い効率で励起エネルギーをクロロフィル *a* に伝達している。フコキサンチンは、比較的短い直鎖状のπ電子共役系に電子吸引性のカルボニル基が結合した極性カロテノイドであり、最低一重項励起状態(S_1)付近に分子内電荷遷移(ICT)状態を持つ特長がある。この吸収帯は有機溶媒中では青色領域(450 nm 付近)にあり、FCP に結合した際の緑色領域(530 nm 付近)への大きな赤色シフトは、溶媒の分極率を大きくしても実現できていない。また、みそ汁にわかめを入れると鮮やかな緑色に変色する事によく知られた現象として、FCP に結合するフコキサンチンは加熱に際して不可逆的に解離し、緑色光の吸収能力を失う。これらより、FCP 内でフコキサンチンは、周辺の色素との相互作用が大きい特徴的な配置をとっていると推測できるが、FCP の構造はまだ決定されていない。

そこで本研究ではまず、天然の FCP 内でのフコキサンチンからクロロフィルへのエネルギー伝達が、極性カロテノイドに特有の ICT 状態を主に利用(経路)していることを明らかにする。一方で、フコキサンチンを様々な距離や角度で集積させた構造体(複合凝集系)を創成し、フコキサンチン同士の分子間相互作用が ICT 状態の増幅にどのような関与を示すのかを明らかにする。具体的には、配向したフコキサンチン分子間にスペーサー分子を入れた凝集構造体を創成し、フコキサンチン分子の分子間相互作用を系統的に評価する実験系を構築する。次にこの複合凝集系の励起状態の知見を集積する事により、FCP におけるフコキサンチンの高効率エネルギー伝達の本質を解明すると同時に、光合成アンテナの構造モデルを提案する。

*ライフイベントにより、平成 26 年 10 月～平成 27 年 10 月までさきがけ研究を中断

2. 研究成果

(1)概要

本研究では、日本原種の褐藻類オキナワモズクを、着床前の種に相当する盤状体で培養する事により、培養時の光条件によるばらつきのほぼ無い均質な藻体試料を得、これより一定の色

素組成を持つ FCP を調製する手法を確立した。一方、フコキサンチン単体の励起状態の挙動を時間分解分光、非線形分光により解明し、極性溶媒中では ICT 状態と S_1 状態が区別できる事を明らかにした。そこで FCP のフェムト秒時間分解吸収スペクトルを測定し、FCP に結合したフコキサンチンの各励起状態の寿命を決定し、内部転換の時定数と比較することにより、フコキサンチンの各エネルギー準位からクロロフィル a へのエネルギー伝達効率をそれぞれ決定した。その結果、このエネルギー伝達は主として、フコキサンチンの分子内電荷移動状態 (ICT 状態) とカップルした最低一重項励起状態 (S_1) を経由する事を明らかにした。

また、FCP と類似した緑色領域に吸収帯を持つ光合成アンテナである、シフォナキサンチン-クロロフィル蛋白質 (SCP) を有する緑藻ミルについても、着床前の種に相当する糸状体での培養系および SCP の調製方法を確立した。また共鳴ラマン分光法により、植物の集光性タンパク質複合体 II (LHCII) アンテナではルテインが結合するサイトをシフォナキサンチンが占有するという知見を得た。

人工的にフコキサンチンの配向と距離を制御した複合凝集系を作成する試みとして、多孔質ガラス (ナノ細孔シリカ) にフコキサンチンを吸着させることに成功した。フコキサンチンの初期濃度を制御することにより、有機溶媒中の吸収帯より短波長側 (H-会合体) と長波長側 (J-会合体) に吸収帯を持つ一連のフコキサンチン-シリカ複合体の調製が可能であった。前者のみ CD シグナルを示し、これは、フコキサンチン分子の双極子モーメントを反時計回りの螺旋状に配置する二量体構造をとり、その双極子間距離は7オングストローム程度であることが示唆された。また、他の手法としてラングミュア-ブロッジット累積膜の手法を試みた。ステアリン酸バリウムの膜に β カロテンを添加した混合 LB 膜では、原子間力顕微鏡観察及び直線偏光、角度依存反射吸収スペクトルなどの計測により、1 nm 未満のクラスターが均一に分散しており、脂質膜の疎水性内部に埋まる形で基板にほぼ平行に β カロテンが配置していることを明らかにした。

(2) 詳細

研究テーマ1「フコキサンチン複合凝集系の構築」

フコキサンチンを多孔質シリカに吸着させる試みにおいて、細孔径 6 nm のシリカ (CARiACT Q-6、富士シリシア社製) を用いた場合のみ、添加フコキサンチンの濃度を制御する事により、有機溶媒中の吸収スペクトルより短波長側 (H-会合体、card-pack 型) から長波長側 (J-会合体、head-to-tail 型) までの様々な吸収を示す一連のフコキサンチン-シリカ複合体を作る事に成功した。ここで得られた H 会合体は全て CD スペクトル (極大吸収位置 415 nm に中心を持つコットン効果) を示し、これよりフコキサンチン分子の双極子モーメントが反時計回りの螺旋構造をもった二量体構造を取っている事、またそのフコキサンチン分子同士の距離はおよそ7 Å 程度である事が示唆された[5. (1) 4 参照]。

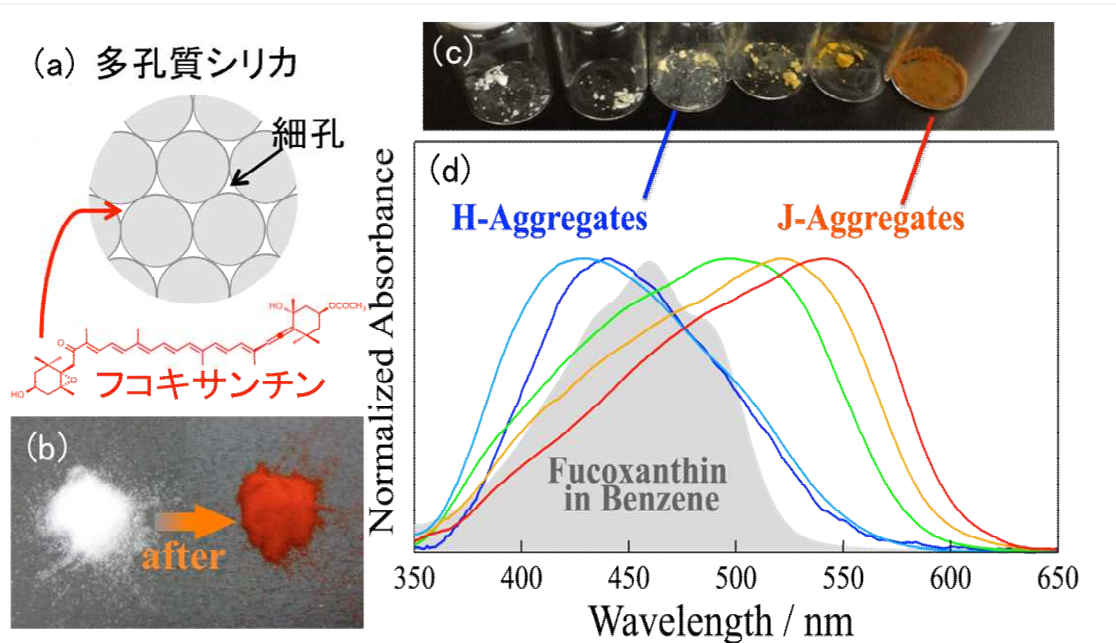


図1 (a)多孔質シリカへのフコキサンチン導入のイメージ図、(b)フコキサンチン導入前後の多孔質シリカ粉末の写真、(c)様々な初期濃度で処理したフコキサンチン導入多孔質シリカの写真、(d)グリセロール入り緩衝溶液に分散して測定した吸収スペクトル[Kita et al 2015 より改変]

分子の配向を制御した凝集系として、LB 膜の作成を行った。ステアリン酸を膜物質として、様々な割合でカロテノイドを混合した混合 LB 膜の作成を行った。ベータカロテン・ステアリン酸混合膜は既報[Hashimoto et al. *Jpn. J. Appl. Phys.* 35 (1996) 281-289.]の条件で積層を確認し、原子間力顕微鏡(AFM)観察により一様な表面を初めて観測し、直線偏光吸収スペクトル、反射吸収スペクトルの角度依存性により、1 nm 未満の均一なクラスターとして β カロテンがステアリン酸の中に分散している事を初めて明らかにした。一方、この手法ではフコキサンチンは数百 nm の大きなクラスターとしてステアリン酸の中に島状に散在し、積層の段階で抜け落ちてしまう事が明らかになった。[Kita et al. *Carotenoid Science* 19 (2014) 43-45.]

研究テーマ2「フコキサンチン複合凝集系の機能の解明」

褐藻類の有する光合成アンテナ FCP は、培養時の光条件により色素組成にも変化が生じるという知見があったが、我々は、日本原種の褐藻類オキナワモズクを、着床前の種に相当する盤状体で培養する事により、培養条件によるばらつきのない均質な試料を得ることに成功して来た[Fujii et al. *Photosynth. Res.* 111 (2012) 165-172; Fujii et al. *Photosynth. Res.* 111 (2012) 157-163]。この培養モズクから調製したFCPについて、フェムト秒時間分解吸収スペクトルを測定し、FCPに結合したフコキサンチンの各励起状態の寿命を決定した。既に我々が解明して来たフコキサンチンの有機溶媒中での励起状態の挙動[Kosumi, Fujii, et al., *J. Lumin.*, 131(3), 2011, 515-518; *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13, 2011, 10762-10770]より、内部転換の時間定数を仮定して解析し、フコキサンチンの各エネルギー準位からクロロフィル a へのエネルギー伝達効率をそれぞれ決定した。その結果、このエネルギー伝達が、主としてフコキサンチンの

分子内電荷移動状態(ICT 状態)とカップルした最低一重項励起状態(S_1)を経由して行われる事を初めて明らかにした[5.1, 5.2を参照]。FCPにおけるフコキサンチンの吸収帯が少なくとも2種類(green, red)あり、その内長波長側の吸収帯を示すもの(red)がこのエネルギー伝達に大きく寄与する事も同時に示唆された。

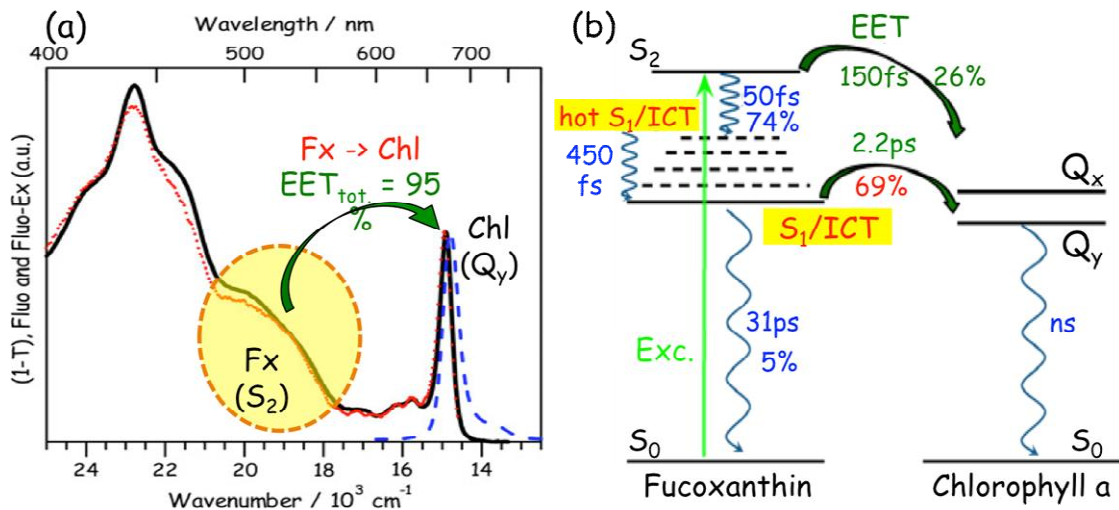


図2 (a)褐藻類オキナワモズク由来の FCP の吸収(黒実線)、蛍光(青破線)、蛍光励起(赤点)スペクトル[Fujii et al. 2012 より改] (b)FCPにおけるフコキサンチンからクロロフィルへのエネルギー伝達模式図[文献 5. (1) 1 より改変]

研究テーマ3「フコキサンチン複合凝集系の構造の解明」

天然系については、褐藻類の光合成アンテナにおけるフコキサンチンの挙動と同様に、カルボニルカロテノイド(シフォナキサンチン)を結合して、青緑色の光を吸収する性質を持つ海洋性藻類ミル類の持つ光合成アンテナ、シフォナキサンチン-クロロフィル蛋白(SCP)の単離精製に成功し、X線結晶構造解析を目指した三次元結晶化に着手している。大型海藻であるミル類の一種、モツレミルを、着床する前の種に相当する糸状体でクローン培養する事により、光照度を制御した生育条件に置ける大量培養方法を確立した [Oka et al. Carotenoid Science 17 (2012) 19-22]。その過程で、光照度を極めて強くした場合にのみモツレミルが全トランスネオキサンチンを蓄積する事を初めて見いだした。この培養糸状体の共鳴ラマンスペクトルの励起波長依存性を測定したところ、この全トランスネオキサンチンは蛋白質との相互作用が低い状態で存在していることが分かった。一方で、カルボニルカロテノイドのシフォナキサンチンが、SCPのルテインの結合部位に結合している事が強く示唆された[5.3 参照]。これは、FCPにおけるフコキサンチンの結合様式とは明らかに異なるもので、シフォナキサンチンはSCP蛋白質の疎水性部位奥深くに結合し、光合成アンテナ蛋白質の構成要素の一つとなる事が推測された。

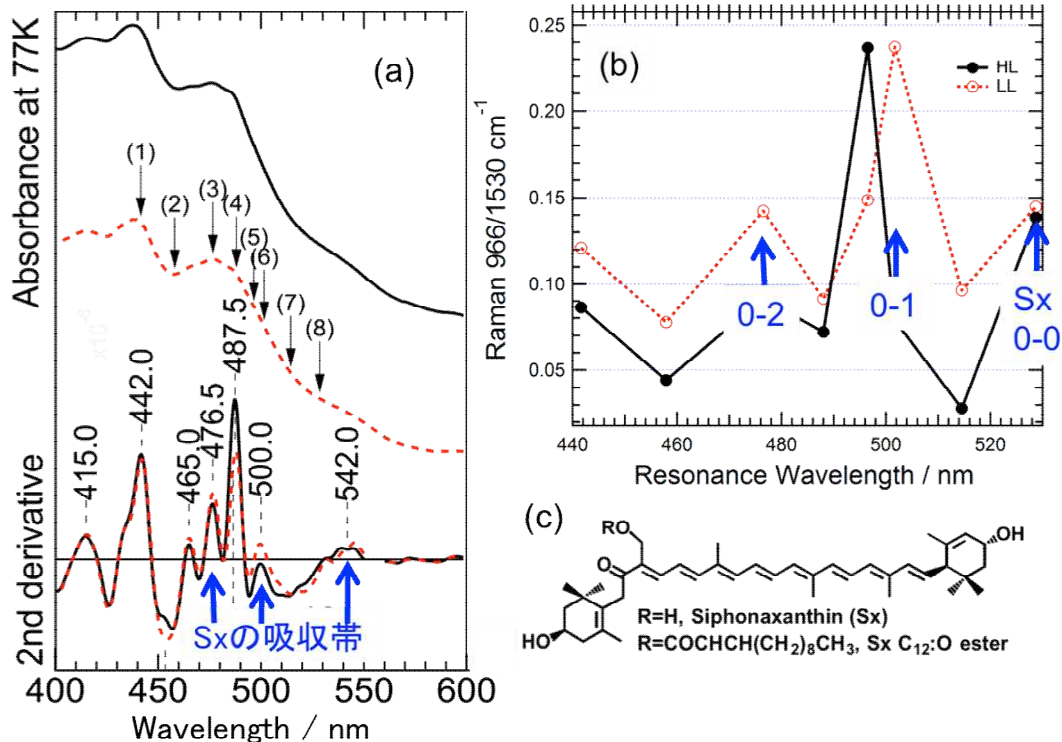


図3 (a)モツレミル系状体の77Kにおける吸収スペクトル及びその二次微分スペクトル、(b)カロテノイドの面外変角振動を示す ν_4 ラマン線の励起波長依存性(高照度:黒実線、低照度:赤点線)、(c)シフォナキサンチンの化学構造式。これらにより帰属したシフォナキサンチン(Sx)の吸収帯(0-0、0-1、0-2遷移)を矢印で示した。SCP はルテインがシフォナキサンチンに置換され、LHCII におけるルテインと同様に、生体内における機能単位である三量体構造の要となっていることが示唆された。[文献 5. (1) 3 より改変]

遺伝子改変により、カルボニルカロテノイドを生合成し、蓄積するレタスの光合成能を評価した[5.5 参照 5; 一部未発表]。このレタスは赤褐色を呈し、チラコイド膜内だけでなく光合成タンパク質(光化学系II、光合成アンテナ LHCII)にもカルボニルカロテノイドを結合している事を確認したが、これらが吸収帯を持つ緑色領域の光を光合成に利用する効率は高くなかった。LHCII には、カルボニルカロテノイドの4-ケトアントラキサンチンが結合したが、ルテインの結合部位ではなく、ネオキササンチンとピオラキサンチンの結合部位を占めていることが示唆された。これらの結合部位ではカルボニルカロテノイドからクロロフィルへのエネルギー伝達が起きない事が示唆された。

3. 今後の展開

褐藻類オキナワモズクの光合成アンテナ FCP におけるフコキサンチンの吸収帯が少なくとも2種類あることがわかってきたが、これらの吸収帯とフコキサンチンの結合様式を関連づけた報告はまだない。しかしながら、高等植物 LHCII におけるルテインの結合部位を占める2分子が短波長側の吸収帯(green)、それ以外の分子が長波長側の吸収帯(red)を司るのではないかと推測されている。一方、研究を開始した緑藻類ミルの光合成アンテナ SCP においては、シ

フコキサンチンの結合部位が、高等植物の光合成アンテナ LHCII におけるルテインの結合部位を占める事を分光法で確認した。よって、この結合部位にカルボニルカロテノイドが結合しても緑色領域(red)に吸収帯を持つ事が可能である事が示唆される。一方、遺伝子改変レタスの LHCII に結合したカルボニルカロテノイド、4-ケトアントラキサンチンは、ビオラキサンチン及びネオキサンチン結合部位に結合しているが、クロロフィルへのエネルギー伝達は行っていない事より、FCP における残りのフコキサンチンの結合は、これらとは異なる事が示唆された。今後は、SCP の結晶成長を更に進めていく一方で、FCP そのものの結晶化スクリーニングも開始し、天然の光合成アンテナに結合する極性カロテノイドの構造に関する知見を増強していく。

現在進めている混合 LB 膜を完成させることで、配向と距離を系統的に制御したフコキサンチン複合凝集系を作り、分光法により電子励起状態を明らかにしていくことにより、会合による励起エネルギーの失活を押さえつつ分子間相互作用が強い状況で分子内電荷分離(ICT)状態が強まる最適構造を提示していく。これを通して、光合成アンテナの本質の理解を深めていく。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

<研究目的の達成状況>

天然の光合成アンテナ FCP に結合するフコキサンチンの励起状態及びエネルギー伝達に関する部分は達成でき、さらに「カルボニルカロテノイド」を結合し、「緑色の光を光合成に利用する」天然の光合成アンテナ SCP に関する知見を深めることができ、光合成アンテナとしての本質を明らかにするための知見を積み上げることができたと考えている。一方で人工的にフコキサンチンの複合凝集系を創成する試みでは、多孔質シリカを用いて安定性を上げ、さらに会合状態を制御することに成功したが、距離と配向を制御する手法である LB 膜については、問題点を浮き彫りにし、それを克服するアイデアまでは得られたが、期間内に完成することができなかった。そのため、全体としての達成状況は8割程度と考えている。

<研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)>

さきがけ研究期間中に所属機関内において身分の変更があり、独立した研究グループ運営を行うこととなったが、学生以外に研究員を雇用したことで十分な研究実施体制を敷く事ができた。

その後、自身のライフイベント(産休、育休)に伴って、さきがけ研究を1年間中断することとなったが、さきがけ研究の制度を活用して、残りの研究期間(半年)を中断後に再開、継続する事が可能となった。このために、その後の居室と研究室の移動、所属していた教授の転出に際しても、研究能力を維持できたと考えている。さきがけの受託研究費に関しては、予定外の大きな支出に関しては増額対応をして頂いたため、およそ計画通りの研究費執行ができたと考えている。

<研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)>

人工光合成を行う上で希薄な光子密度の太陽光のうち、必要なエネルギーのみを集光し、適切に反応サイトに届ける光合成アンテナの役割については、未だ注目度が低いと考えてい

る。その要因の一つは、天然の光合成ではこの役割が極めて複雑な蛋白質間の連携を含むレギュレーションであり、未だ解明されていない事にあるといえる。国内外でもここ数年の間でこの光合成アンテナの示す複雑な役割を解明しようという動きが活発化している。天然の光合成からこの原理を学び、人工光合成へその原理を取り込むという流れは現在しかできないと考えられる。本研究の成果に付帯して、海洋藻類の大量培養、光合成蛋白質の大量調製、そして、無機材料への吸着による安定化、という技術を蓄積している。今後は、天然の光合成アンテナの示す統合的な光エネルギー調整機能の解明を目指した基礎研究を行い、その原理を一般へと発信していく。一方で、天然由来の光合成蛋白質／光合成色素を直接利用するサステナブルでリプレイサブルな光エネルギー変換キットとしての利用を生み出し、海洋藻類の食品以外の付加価値を生み出すことにより、日本で極めて盛んで歴史が深く、古くから日本語の文献が蓄積されており、日本独自の技術が高いと考えられる海藻の養殖業をボトムアップする潮流を生み出し、世界に通用する産業へと発展する事を目指している。そのための共同研究及び共同開発をする体制を整え始めているところである。

<その他領域独自の評価項目などに基づく自身の評価>

本領域では、領域内共同研究及びアウトリーチ活動の推進を奨励された。本研究課題を遂行する上で、領域内外で6件の共同研究を開始する事ができ、また研究協力や助言を得られる国内の研究者同士のつながりを作ることができた。また、アウトリーチ活動として企業向けの講演会を4件行い、一般向けとしてサイエンスカフェを開催し、シニア自然大学院の講師を務め、「光合成研究と人工光合成への展開」について理解を深め、問題提起をして考える機会を作る事ができた。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

人工光合成の実現に向けて、1)自然を理解し、学ぶ、2)自然を真似る、改変する、3)自然を超える、などの科学的アプローチの中で、藤井博士は地球上の光合成活動で、30%以上の比率を占めるとされる海洋における光合成の理解を進める基礎研究として、限られた波長と限られた強度の太陽光捕集の機構解明に挑戦する意欲的な研究提案が採択された。藤井博士は特に水深10m以上でほぼ緑色光のみでも光合成活動に有効に利用し得る褐藻類に着目しそのフコキサンチン-タンパク複合体(FCP)による光捕集機構の解明に取り組んでいる。既にさきがけ採択以前に解明しているフコキサンチン分子固有の有機溶媒中での電子励起状態、その動的挙動の理解を基礎に、さきがけ研究では、光合成系に組み込まれた生体組織でのFCPの動的挙動について超高速分光測定手法を駆使し、緑色光が極めて有効にクロロフィル分子にエネルギー移動することを見出した。また、新たに青緑色の光を吸収する性質を持つ海洋性緑藻の一種、ミル類の持つ光合成アンテナ、シフォナキサンチン-クロロフィル蛋白(SCP)の単離精製に成功し、X線結晶構造解析を目指した三次元結晶化に着手している。また褐藻類(いわゆるモズク類)について企業と連携してその大量培養に取り組むなど応用展開研究にも尽力しておりその研究姿勢と研究努力は高く評価される。

5. 主な研究成果リスト



(1)論文(原著論文)発表

1. Daisuke Kosumi, Mamiko Kita, **Ritsuko Fujii**, Mitsuru Sugisaki, Naohiro Oka, Yuki Takaesu, Tomonori Taira, Masahiko Iha and Hideki Hashimoto, "Excitation Energy-Transfer Dynamics of Brown Algal Photosynthetic Antennas", *J. Phys. Chem. Lett.*, **3(18)**, 2012, 2659-2664.
2. Daisuke Kosumi, **Ritsuko Fujii**, Mitsuru Sugisaki, Naohiro Oka, Masahiko Iha, Hideki Hashimoto, "Characterization of the intramolecular transfer state of marine carotenoid fucoxanthin by femtosecond pump-probe spectroscopy", *Photosynthesis Res.*, **121**, 2014, 61-68.
3. Chiasa Uragami, Denise Galzerano, Andrew Gall, Yusuke Shigematsu, Maïwen Meisterhans, Naohiro Oka, Masahiko Iha, **Ritsuko Fujii**, Bruno Robert, and Hideki Hashimoto, "Light-dependent conformational change of neoxanthin in a siphonous green alga, *Codium intricatum*, revealed by Raman spectroscopy", *Photosynthesis Res.*, **121**, 2014, 69-77.
4. Shohei Kita, **Ritsuko Fujii**, Richard J. Cogdell, Hideki Hashimoto, "Characterization of Fucoxanthin Aggregates in Mesopores of Silica Gel: Electronic Absorption and Circular Dichroism Spectroscopies", *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, **313** (2015) 3-8.
5. **Ritsuko Fujii**, Nami Yamano, Hideki Hashimoto, Norihiko Misawa, and Kentaro Ifuku, "Photoprotection vs Photoinhibition of Photosystem II in Transplastomic Lettuce (*Lactuca sativa*) Dominantly Accumulating Astaxanthin", *Plant Cell Physiol.* (2015) doi:10.1093/pcp/pcv187

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

<主要な学会発表>

1. **Ritsuko Fujii**, Yusuke Shigematsu, Naohiro Oka, Masahiko Iha, Hideki Hashimoto, "Structure of siphonaxanthin bound to the newly isolated photosynthetic antenna from a deep-sea green alga, *Codium intricatum*", 2013.3.4-6, 2012 OCARINA Annual International Meeting-Launch of the Artificial Photosynthesis Research Center-, Osaka, Japan, (Invited Oral)
2. Chiasa Uragami, Denise Galzerano, Andrew Gall, Yusuke Shigematsu, Maïwen Meisterhans, Naohiro Oka, Masahiko Iha, **Ritsuko Fujii**, Bruno Robert, and Hideki Hashimoto, "The Raman Spectroscopic Study on Siphonous Green Alga, *Codium intricatum*, Cultivated at Two Different Kinds of Light Condition", 2014.6.29-7.4, The 17th International Carotenoid Symposium, Park City, Utah, USA, Utah
3. Nami Yamano, **Ritsuko Fujii**, Kentaro Ifuku, Norihiko Misawa and Hideki Hashimoto, "Photosynthetic Pigments Bound to the Pigment-Protein Complexes in Astaxanthin Producing Lettuce", 2014.6.29-7.4, The 17th International Carotenoid Symposium, Park City, Utah, USA, Utah
4. Shohei Kita, **Ritsuko Fujii**, Hideki Hashimoto, "Construction of carotenoid semi-condensed

system: A model of photosynthetic antenna”, 2014/11/24–28, 2014 International Conference on Artificial Photosynthesis (ICARP2014), Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji City, Hyogo, Japan

<受賞>

第一回 大阪市立大学 女性研究者賞 特別賞[岡村賞] 受賞 2015年11月3日

<招待講演(企業向け)>

- 1) 藤井 律子, “褐藻類の光合成アンテナに結合した色素の構造と機能の解明”, 2012/10/15, 人工光合成フォーラム 2012～夢の技術の事業化をめざす～ 第1回, 大阪産業創造館, 大阪 (招待講演)
- 2) 藤井 律子, “海洋性光合成生物の光捕獲戦略”, 2013/8/29, 第2回人工光合成講演会, 新日鐵住金 RE/本館 A31・32 会議室, 富津 (招待講演)
- 3) 藤井 律子, “海洋の光合成における太陽光利用戦略”, 2014/1/23, 新事業開発センター 講演会, 新日鐵住金化学 3F 会議室, 戸畑(北九州)(招待講演)
- 4) 藤井 律子, “海洋藻類に学ぶ太陽光集光の戦略”, 2014/4/8, ライオン大学院講演会, ライオン株式会社 平井研究所プレゼンテーションルーム3, 平井(東京都) (招待講演)