2P261

藍色細菌 *Nostoc* ヘテロシスト細胞内部の光化学系 II ー共焦点レーザー顕微分光法による研究

○杉浦 花菜、柴田 穰、伊藤 繁 (名大院・理・物質理学)

フィラメント形成をする藍色細菌 *Nostoc* sp. KU001 は、栄養細胞 (ve-cell) から窒素固定に特化したヘテロシスト細胞 (he-cell) を分化する。he-cell は酸素発生能がないが、光化学系 II (PS II) が存在するかどうかについては未だ議論がある。本研究では he-cell の細胞毎の蛍光・吸収スペクトルと細胞内の蛍光の空間分布を、高分解能顕微分光法により調べた。測定装置は、共焦点レーザー顕微鏡に分光器を配置し、冷却 CCD (スペクトル測定用) と冷却 PMT (構造スキャン用) で光を検出する。空間分解能 $0.2 \mu\text{m}$ 、波長分解能 1nm 以下で、各細胞のスペクトルを測定した。

PS II のアンテナ色素であるフィコエリスリン (PE)、フィコシアニン (PC) の含量を吸光度から見積ると、he-cell では ve-cell の半分以下だった。しかし蛍光収率は高く、反応中心へのエネルギー移動効率が悪いことが示唆された。赤色、緑色の培養光に関わらず、同様の結果が得られた。ステージ上にクライオスタットを設置し、 40K で測定すると、he-cell にも $684, 694\text{nm}$ の PS II クロロフィル (Chl) 由来の蛍光極大が観測された。蛍光の空間分布の測定から、he-cell 内のフィコビルンは細胞全体にわたって存在し、長波長 Chl は細胞中心付近に、短波長 Chl は極付近に分布していた。これはすべての蛍光が細胞内膜に分布する ve-cell とは異なっていた。これらの結果から、he-cell の色素タンパク質の分布と機能に関する情報が得られた。

ほぼすべての he-cell 内に PE, PC, PS II が存在する。しかし、フィコビリンのアンテナとしての機能は非常に低く、PS II に活性があるか否かは分からない。

K. Sugiura, Y. Shibata and S. Itoh : Photosystem II in heterocyst in *Nostoc* sp. studied by confocal microspectroscopy.

2P263

過渡吸収測定によるアナログ PYP の光反応戻り過程の解析

○曾田 幸司¹、濱田 格雄²、市田 秀樹³、中村 亮介²、松本 健吾¹、兼松 泰男^{2,3}、徳永 史生^{1,2} (¹ 阪大院理、² JST-CREST、³ 阪大 CASI)

Photoactive Yellow Protein (PYP) は、光センサーとして機能する水溶性の光受容蛋白質である。発色団 (*p*-クマル酸) が光吸収後、光反応サイクルが起こるのだが、このサイクルの暗状態への戻り過程において、発色団周辺の水素結合ネットワークの再配置が行われる。今回我々はこの水素結合の再配置を検討するために、暗状態において 2 つの安定構造の存在が知られている、発色団をカフェイン酸に置き換えたアナログ PYP [1] (アミノ酸残基は野生型のままの CAF-WT、アミノ酸残基 E46 を Q に変異させた CAF-E46Q) と元の発色団の PYP (*p*CA-WT,E46Q) の戻り過程に対する過渡吸収測定を行った。その結果、*p*CA-WT,E46Q では 1 成分と考えられたが、CAF-E46Q では吸収スペクトルの長波長側で励起した場合と短波長側で励起した場合とでその戻りの速度に違い (時定数で約 400ms と 1000ms) がみられた。[2] で我々は暗状態において CAF-E46Q では 2 成分存在することを示唆するデータを得たが、今回の結果はこれらに対応するものと考えられる。この結果をふまえて戻り過程の水素結合ネットワーク形成の詳細を当日議論したい。

[1] D. M. F. van Aalten *et al.* *Acta Crystallogr. D* 58, 585-590

[2] 濱田ら、日本物理学会第 59 回年次大会 29pPSB-27

Fig. CAF-E46Q の光照射後の吸収スペクトル変化

K.Soda, N.Hamada, H.Ichida, R.Nakamura, K.Matsumoto, Y.Kanematsu, and F.Tokunaga : Analysis of the recovery process from M intermediate to dark state in the photocycle of analogue PYP by transient absorption spectroscopy

2P262

クロロフィル *d* を持つ *Acaryochloris.marina* のフィコビルン含量と光化学系の関係

○重永 高俊、青山 大輔、中村 洋子、三野 広幸、伊藤 繁 (名大院・理・物質)

クロロフィル *d* (Chl *d*) を主要色素とし、5% 程度の Chl *a* を持つ酸素発生型の光合成原核生物 *Acaryochloris.marina* (*A.marina*) のフィコビルン含量の違いと光化学系の関係を調べた。

A.marina の光化学系 I 反応中心はすでに単離され、Chl *d* がアンテナ色素であるとともにスペシャルペア P740 として働く事が分かっている (Q.Hu *et al.* 1998 PNAS) が、いまだ単離生成されていない光化学系 II については Chl *d*、Chl *a* の役割は分かっておらず、スペシャルペアも確定していない。また、フィコビルン色素と光化学系 II の量的関係もわかっていない。フィコビルン含量の異なる *A.marina* 細胞を培養し、光化学系 I, II の量比、活性、色素含有量を調べる事でこれらの問題を検討した。

フィコビリンのほとんどない細胞では、ESR による signal II 量の測定から、フィコビルン量の多い細胞に比べて Chl *d* あたり PSII 量は約 2 倍になっており、遅延蛍光測定も約 2 倍になっていた。これらの細胞の吸収スペクトル、蛍光スペクトルにも差が見られた。さらにフィコビルン量の違う細胞について、同様な検討を進めている。色素含量と光化学系の関係、エネルギー移動や電子伝達系の変化を検討した。

T.Shigenaga, D.Aoyama, Y.Nakamura, H.Mino and S.Itoh : Phycobilin content influences photosystems in *Acaryochloris.marina* containing chlorophyll *d*

2P264

疎水プローブによる PYP M 中間体における構造変化の検出

○松本 健吾¹、濱田 格雄²、市田 秀樹³、中村 亮介²、兼松 泰男^{2,3}、徳永 史生^{1,2} (¹ 阪大院理・宇宙地球、² JST-CREST、³ 阪大 VBL)

Photoactive Yellow Protein (PYP) は、紅色光合成細菌中に存在し、菌体の光に対する忌避行動において光センサーとして機能していると考えられている光受容蛋白質である。PYP は光励起により、いくつかの中間体を経て再び暗状態へと戻るという光反応サイクルを有しており、その中で最も寿命の長い M 中間体が活性中間体であると考えられている。PYP は M 中間体時に、大きな構造変化を伴い他の蛋白質と相互作用することで、信号を伝達していると考えられており、我々は PYP の M 中間体時における構造変化ならびに機能発現を検証することを目的に研究を行った。我々は疎水プローブとして有名な ANS (1-anilinonaphtalene-8-sulfonate) を PYP 溶液中に混入し、光励起時の蛍光スペクトル測定を行うことで ANS と M 中間体との相互作用を検出することを試みた。また今回の実験では、PYP 野生型に比べ著しく M 中間体の寿命が延びることが報告されている変異体 M100K を用い、実験を進めた。その結果、光励起後の蛍光スペクトルでは、PYP、ANS 単体の蛍光スペクトルとは異なる新たな成分が短波長側に観測された。ANS は溶媒の極性が減少するにつれてそのスペクトルのピークが短波長側へシフトする。このことから、この成分は ANS における PYP の M 中間体時において疎水環境を反映したものであると考えられる。我々はより詳細に検討するために時間分解蛍光スペクトル測定を行なった。本講演では、これら結果の詳細について議論したい。

K. Matsumoto, N. Hamada, H. Ichida, R. Nakamura, Y. Kanematsu, and F. Tokunaga : Detection of conformational change from dark state to M intermediate in a Photoactive Yellow Protein with hydrophobic fluorescent probes