

## タンパク質構造ダイナミクスで制御される 光合成過剰光エネルギー散逸機構の単一分子分光解析

<sup>1</sup>マサチューセッツ工科大学, <sup>2</sup>MIT-Harvardエキシトン工学センター, <sup>3</sup>ヴェローナ大学  
○近藤徹<sup>1,2</sup>, Pinnola Alberta<sup>3</sup>, Chen Wei Jia<sup>1</sup>, Dall'Osto Luca<sup>3</sup>, Bassi Roberto<sup>3</sup>,  
Schlau-Cohen Gabriela<sup>1,2</sup>

### Single-molecule spectroscopy unveiled protein dynamics regulating photoprotective energy dissipation in photosynthesis

○Toru Kondo<sup>1,2</sup>, Alberta Pinnola<sup>3</sup>, Wei Jia Chen<sup>1</sup>, Luca Dall'Osto<sup>3</sup>, Roberto Bassi<sup>3</sup>,  
Gabriela Schlau-Cohen<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Massachusetts Institute of Technology, USA

<sup>2</sup> MIT-Harvard Center for Excitonics, USA

<sup>3</sup> Department of Biotechnology, University of Verona, Italy

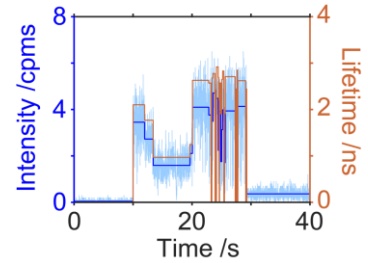
**【Abstract】** Sunlight drives photosynthetic organisms. The excess light energy, on the other hand, can produce harmful photoproducts causing photodamages to the system. Thus, the photoprotective mechanism, known as non-photochemical quenching (NPQ), has been developed in the evolutionary process. In light-harvesting antenna complexes, a carotenoid (Car) draws the excess energy from neighboring chlorophylls (Chls), and safely dissipates it as heat. It is essential for photosynthetic organisms to survive in the natural light condition, where the solar intensity fluctuates temporally on various time scales due to clouds, shadows, sunrise, and weather variation. The quenching function was proposed to be strongly linked with protein dynamics around Chl and Car molecules. However, the molecular mechanisms are not understood. One of the most critical challenges is that the significant but small conformational changes are averaged out in ensemble experiments. To overcome the limitation, we applied the single-molecule spectroscopy to a light-harvesting complex stress related (LHCSR) protein that is a key gene product for the NPQ function, and identified individual conformations and dynamics regulating the photoprotective energy dissipation.

**【序】** 光合成生物は太陽光を利用して莫大な化学エネルギーを生み出し、地球上生物の生命活動を支える。光合成系には光捕集アンテナタンパク質 (LHC) が結合し、高効率な光吸収を可能にする。一方で、過剰な光エネルギーは光損傷を引き起こし危険である。そのため強光に曝された場合は過剰な光エネルギーを散逸して生体を守る光保護 (非光化学的消光、NPQ) 機構が機能する。LHC には主要色素としてクロロフィル (Chl) とカロテノイド (Car) が結合し、Car が Chl から励起エネルギーを奪い安全に熱として放出する。しかし、自然環境下では太陽光強度は刻一刻と変化するため (日の出・日の入、晴れ→曇りなどの一時的な天候変化など)、熱散逸機能は動的である必要がある。Chl - Car 周りのタンパク質構造ダイナミクスの理解が重要となるが、通常分光測定では個々のタンパク質で生じる微小かつ不規則な構造ダイナミクスはアンサンブル平均化されて解析が難しい。そこで我々は1分子分光法を用い、近年 NPQ 因子として注目される光合成アンテナタンパク質 LHCSR [1,2] を解析した。タンパク質ダイナミクスという視点から光合成光保護機構の解明を行った [3]。

**【実験】** 測定には自作の共焦点顕微鏡を用いた。800 nm の fs レーザーを非線形結

晶ファイバ (PCF) に集光して白色光を発生させ、光学フィルタで 640 nm を取り出し励起光として用いた。Ni-NTA コートしたカバーガラスに His-tag 修飾した LHCSR を固定し 1 分子測定を行った。蛍光はアバランシェフォトダイオード (APD) で検出して時間相関単一光子計測 (TCSPC) を行い、強度と寿命の時間変化を測定した。

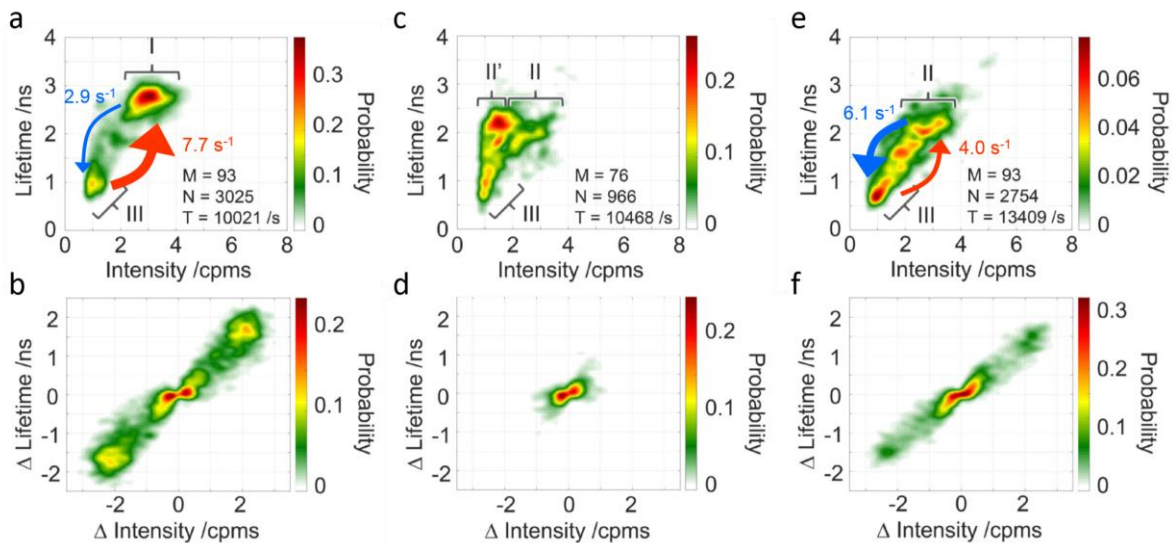
**【結果】** 単一 LHCSR の蛍光時間変化を調べると強度と寿命が時間と共に揺らいでいた (Fig. 1)。これは Chl-Car 周りの局所的な構造ダイナミクスを反映している。蛍光強度と寿命の 2 次元ヒストグラムから、活性化 (蛍光が高強度・長寿命) 状態と消光 (蛍光が低強度・短寿命) 状態を同定した (Fig. 2a)。蛍光強度と寿命の変化量を解析すると、2 状態間の遷移が頻繁に生じていた (Fig. 2b)。状態遷移速度を解析すると、消光状態から活性化状態への遷移の方が速かった (Fig. 2a, red arrow)。活性化状態にバイアスが掛かったダイナミクスであることを示している。



**Figure 1.** Time trace of fluorescence intensity and lifetime of single LHCSR.

実際の生体系では光反応の頻度が上がると生体膜内の pH が低下する。pH 低下は①タンパク質の構造変化と②Car 変換酵素活性の上昇及び Car 分子の構造変化 (Vio→Zea) を誘起する。そこで、低 pH 条件及び Car-Zea 結合条件で LHCSR を解析したところ、低 pH はダイナミクスを抑制して消光状態を安定化し (Fig. 2c, d)、Car-Zea はダイナミクスのバイアス方向を反転させエネルギー散逸能を強化すると分かった (Fig. 2e, f)。pH 低下によるタンパク質構造変化は、光強度変化→pH 変化→構造変化、という 2 ステップ応答であり早い時間スケールで生じる。一方、Car 分子構造変化は、光強度変化→pH 変化→酵素活性変化→Car 分子構造変化、という 3 ステップ応答であり、遅い時間スケールで生じる。これら時間スケールの違う 2 つの応答機構を組み合わせることで光環境の変化に対応している。タンパク質の柔軟性を上手く利用した光合成光反応のフィードバック制御機構であり、生体系の巧妙さを示している。

**【参考文献】** [1] Peers, G. *et al.*, *Nature* **462**, 518 (2009). [2] Pinnola, A. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1857**, 1870 (2016). [3] Kondo, T. *et al.*, *Nat. Chem.* **9**, 772 (2017)



**Figure 2.** a,c,e, Fluorescence intensity-lifetime probability distributions of single LHCSR with Car-Vio at pH 7.5 (a) and 5 (c) and with Car-Zea at pH 7.5 (e). The total numbers of molecules (M) and data points (N) and the sum of dwell times of each substate (T) used to make each histogram are shown in the lower right of each plot. b,d,f, Fluorescence intensity-lifetime transition probability distributions for each sample.