

数 K の単一分子分光法による光合成アンテナタンパク質の 発光励起スペクトルに現れる構造変化の起源探求

(総研大・学融合センター¹、名工大院・工²、総研大・先端研³、東工大院・理⁴)

○大友 康平¹、出羽 毅久²、南後 守²、渡辺 正勝^{1,3}、松下 道雄⁴、藤芳 暁⁴

【序】生理条件下、タンパク質は様々な準安定構造をとりながら生理機能を呈している。よって、生理機能を理解する上で、準安定構造の研究は重要である。しかし、準安定構造を行き来する際のタンパク質の局所構造変化は不均一であり、集団平均においては情報が埋もれ、実験的に知見を得ることが困難な場合がある。このような背景から、液体ヘリウムで数 K に急冷したタンパク質中の発色団の電子状態変化に由来する電子吸収波数の変化（スペクトル拡散）を時系列で追跡できる単一分子分光法が注目を集めている [1]。近年、小井川らは、紅色細菌の光捕集を担うタンパク質-色素複合体 light-harvesting 2 (LH2) 複合体 (図 1 (a)) を試料として、液体ヘリウム低温下の単一分子分光法を適用した [2]。小井川らは周囲の温度変化（数十 K）が単一複合体のスペクトル拡散に与える影響を検証し、色素のスペクトルの時間変化を通じて、その近傍のタンパク質を含む局所構造変化を検知できることを示した。

LH2 複合体には色素として 27 個のバクテリオクロロフィル *a* (BChl*a*) が含まれており、結合部位の違いから、9 個が B800 帯、18 個が B850 帯と呼ばれる吸収帯を形成する (図 1 (a))。LH2 複合体の B800 帯の発光励起スペクトルの時間平均を図 1 (b) に示す。発光励起スペクトルは測定対象からの発光強度を励起レーザー波長の関数として描いたもので、吸収スペクトルと等価とみなせる。1.5 K における単一 LH2 複合体の B800 帯 (図 1 (b) 下段) の線幅は、集団平均のもの (図 1 (b) 上段) や、77 K のもの (図 1 (b) 中段) と比べて十分に細い。図 1 (b) 下段のスペクトルの時間平均において、各色の矢印で示した吸収帯の重心の時間変化を追跡したものを図 1 (c) に同色で示す。図 1 (c) のように、数 K においては個々の BChl*a* を識別して時系列追跡することが可能である。これは、B800 帯を形成する BChl*a* の各々の距離が十分に離れていることから、光励起が個々の BChl*a* に局在していることに起因する。小井川らは、同一 LH2 複体内に温度依存的にスペクトル拡散頻度を変える BChl*a* と、スペクトル拡散頻度が温度に依存しない BChl*a* の 2 種類が存在することを見出した。スペクトル拡散を引き起こす構造変化の起源は未だ研究途上であり、本知見は重要である。しかし、LH2 複合体が曝されている温度を数十 K の範囲で変化させる手法は、ある温度からある温度へ変化させる際、約 1 時間を要するという欠点を持つ。タンパク質の準安定構造は常に自発的に変化している点からみても、この過程は速やかであることが望ましい。そこで発表者らは、液体ヘリウム中の同試料に対し、水の変角振動に共鳴する波長の中赤外光を照射し、溶媒を通じて局所的に LH2 複合体に熱揺動を与える光学系の開発を試みた。今回開発した励起光と中赤外光を同軸で入射できる光学系を用い、B800 帯のスペクトル拡散に熱が与える影響を検証した結果を本発表にて報告する。

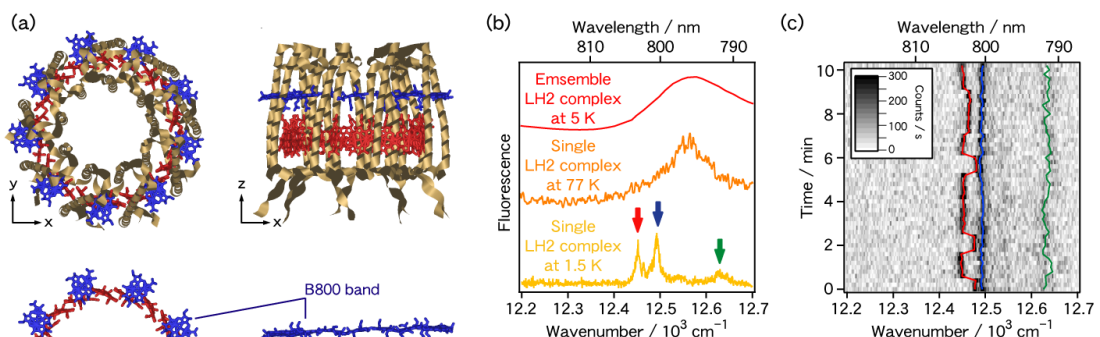


図 1. 紅色細菌 *Rhodobacter Sphaeroides* 由来 LH2 複合体の立体構造 (PDB code: 2FKW) と B800 帯の発光励起スペクトル。(a) 上段: タンパク質主鎖構造と発色団 BChl*a* の立体配置, 下段: BChl*a* のみの立体配置。(b) 発光励起スペクトルの時間平均 (上段: 5 K における LH2 複合体の集団平均, 中段: 77 K における単一 LH2 複合体, 下段: 1.5 K における単一 LH2 複合体)。(c) (b) の 1.5 K における単一 LH2 複合体の発光励起スペクトルの時間変化。

【実験】約 30 pM の紅色細菌 *Rhodobacter Sphaeroides* 由来 LH2 複合体の界面活性剤ミセル水

溶液を CaF_2 基板にスピンドットし、超流動液体ヘリウムで 1.5 K に急冷したものを試料とし、一体成形反射対物レンズ [3] を用いた自作のレーザー走査型共焦点顕微鏡 (図 2) で発光励起スペクトルを測定した。本光学系は近赤外光源である Ti-Sa レーザーの直線偏光を B800 帯励起光源とし、中赤外光源である量子カスケードレーザーの円偏光を試料に同軸入射することで、LH2 複合体の B800 帯の発光励起スペクトルに与える中赤外光による熱揺動を液体ヘリウム低温下において検証することが可能である。

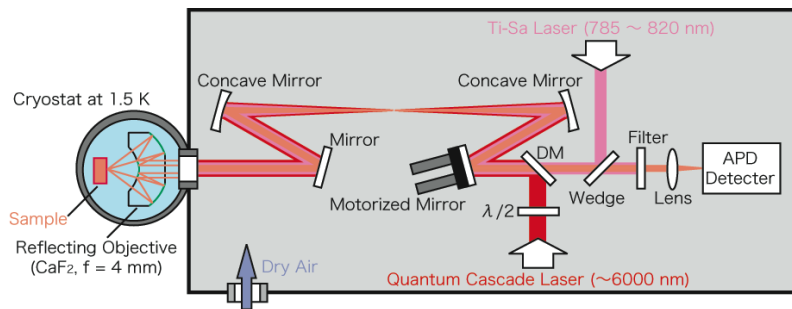


図 2. 測定に用いた自作レーザー走査型共焦点顕微鏡の概略。二光線 (近赤外光源として Ti-Sa レーザー、中赤外光源として量子カスケードレーザーを使用) を同軸に合わせ、平行光として超流動液体ヘリウム (1.5 K) で充たされたクライオスタット内へ導き入れ、 CaF_2 製、焦点距離 4 mm の一体成形反射対物レンズで回折限界まで絞り、試料に入射する。蛍光は再度一体成形反射対物レンズで集光し、平行光として光路を逆行させ、蛍光以外をダイクロイックミラーにて反射することで除去した後、APD 検知器に導く。

【結果と考察】 1.5 K における単一 LH2 複合体に熱揺動を与え、B800 帯の発光励起スペクトルを測定した結果を図 3 に示す。近赤外光のみで励起したスペクトルの各吸収帯の重心の時間変化を追跡したところ、青線で重心を示した BChla はほぼ一定の吸収帯を持ち、赤線の BChla はスペクトル拡散により 2 つの吸収帯を行き来する様子が読み取れた (図 3 (a))。これは、青線の BChla は 1.5 K において、1 つの準安定構造をとるのに対し、赤線の BChla は局所構造変化を経て、2 つの準安定構造をとることを示している。一方、熱揺動を与えた際のスペクトルの時間変化を近赤外光のみで励起したものと比較すると、青線の BChla の時間変化に有意差がみられなかったのに対し、赤線の BChla はスペクトル拡散頻度が増大し、2 つの準安定状態を頻繁に行き来する様子が読み取れた (図 3 (b))。この違いはスペクトルの時間平均にも現れており、青線の BChla に対応する青矢印で示した吸収帯は熱揺動の有無に関わらずほぼ同じ形状であるのに対し、赤線の BChla に対応する赤矢印で示した 2 つの吸収帯は熱揺動により強度比が変化していた (図 3 (c), (d))。また、77 K における単一 LH2 複合体のスペクトル (図 1 (b) 中段) における B800 帯の線幅と比較しても、LH2 複合体は中赤外光による熱揺動で、少なくとも 77 K までは温められていないことがわかる。なお、同試料に中赤外光照射、非照射を連続で数回繰り返しても、本結果は再現された。LH2 複合体の立体構造 (図 1 (a)) において、B800 帯を形成する 9 つの BChla は全て等価である。しかし、図 3 にスペクトルを示した単一複合体中には、非熱依存性の BChla と、準安定構造を変化させる頻度が熱揺動により高くなる BChla の 2 種類が含まれている。LH2 複合体中の BChla の基底状態には、周囲の環境の差異により様々なエネルギー準位が存在し、準位間には 1.5 K では越えることの困難なポテンシャル障壁が存在する。後者の BChla はこのようなポテンシャル障壁を越えることのできる熱エネルギーを中赤外光から獲得し、スペクトル拡散頻度を増大させたものと推測できる。本結果は小井川らの報告と矛盾しない。本研究により、温度 1.5 K の単一 LH2 複合体に対し、可逆的に熱揺動を与えることができる光学系が完成した。今後、本光学系を用いてスペクトル拡散の起源探求を推し進める予定である。

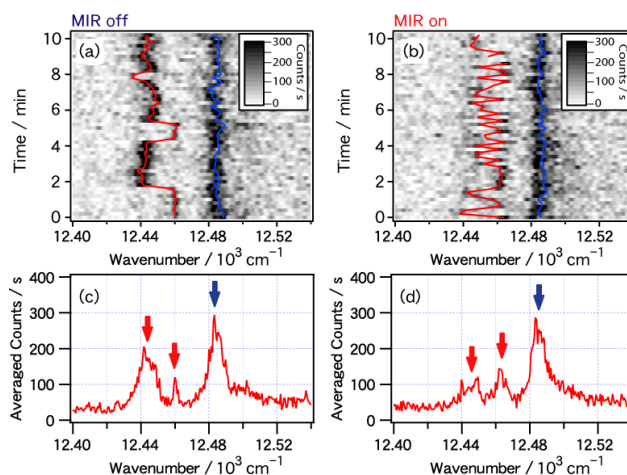


図 3. 1.5 K における単一 LH2 複合体の発光励起スペクトルの熱依存性。(a) 近赤外光のみで励起した単一 LH2 複合体の発光励起スペクトルの時間変化。(b) (a) の時間平均。(c) 中赤外光を同軸で入射した単一 LH2 複合体の発光励起スペクトルの時間変化。(d) (c) の時間平均。

- [1] van Oijen, A.M., Ketelaars, M., Köhler, J., Aartsma, T.J., and Schmidt, J. *Science* 1999, 285, 400.
 [2] Oikawa, H., Fujiyoshi, S., Dewa, T., Nango, M., and Matsushita, M. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 4580.
 [3] Fujiwara, M., Fujiyoshi, S., and Matsushita, M. *J. Opt. Soc. Am. B* 2009, 26, 1395.