

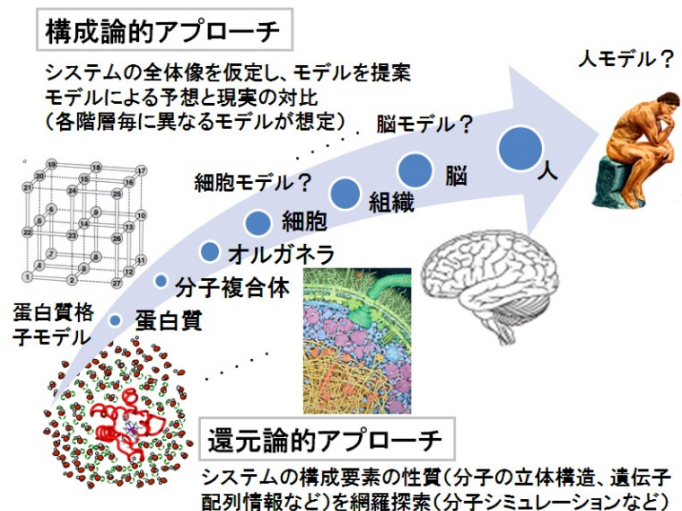
## 複雑分子系を読み解くための新しい1分子理論

(北大電子研) Chun Biu Li, 小松崎民樹

### New molecule theories to decipher complex molecule systems in single molecule biology

(Hokkaido Univ., Research Inst. for Electronic Sci.) Chun Biu Li, Tamiki Komatsuzaki

【序】分子複合体⇒細胞⇒脳などの生命階層において、どこまで分子科学が貢献できるか、は普遍的かつ挑戦的な問いである。飛躍的な計算機性能の向上により、ちょうど蛋白質の折り畳みの計算シミュレーションが不可能であった1970年代に、二次元格子モデルで折り畳みの分子論が試みられたように、細胞内化学反応、細胞分化を模倣する細胞モデルなど新たな試みもなされている。しかしながら、階層毎にモデルを構成するアプローチでは、自然と乖離する可能性は常に存在し、一方で、系が巨大になればなるほど、現実問題として、大きな仮定(例えば、細胞内の蛋白質を質点で近似)なしには、シミュレートすることも極めて困難である。そのような巨大な複雑分子系に対してどのような分子理論的アプローチがあり得るであろうか？ひとつにはシステムの構成要素の性質を参照しつつ、適時、近似を導入しながら、シミュレートする還元論的なアプローチであろう。一分子計測技術等の飛躍的な進展により、「観測」の在り方が大きな変貌を遂げ、サブミリ秒程度の時間分解能で、一分子レベルの大規模構造変形や細胞の分化の経時変化をin vivoで直接観測できるようになってきた[1]。本研究では還元論的なアプローチと構成論的なアプローチを補完する新しい戦略、すなわち、(分子の微環境情報を反映した)1分子時系列データから、背後に存在する(であろう)モデル(細胞モデルなど)を予め規定するのではなく、複雑環境下での分子の“状態”、“状態遷移ネットワーク”、“エネルギー地形”などを彫り起こす実践型の新しい分子理論、に関する我々の最近の研究成果を報告する[2-7]。



【理論】酵素反応におけるDynamic disorderとは一分子レベルにおいて非指数型キネティクスが顕在化することを意味する。非指数型キネティクスは酵素の構造間遷移の時間スケールと $E+S \rightleftharpoons ES \rightarrow E+P$ の反応時間スケールが拮抗する濃度領域で生じる。その濃度領域では、酵素が完全に構造緩和する前に次の反応が生起するため、構造の記憶が反応のキネティクスに影響を及ぼすためである[8]。このDynamic disorderの起源を論じるうえで、観測された時系列そのものから背後に存在する状態遷移ネットワーク、キネティクススキーム(KS)、が抽出できれば、極めて有用な情報を与えるものと期待される。しかしながら、一般に、dwell-time 時系列データが与えられたとき、自己相関関数などのキネティクスを再現するキネティクススキーム(KS)は原理的に無数に存在する。換言すると、dwell-time 時系列データの統計的な相関情報からKSを一義的に同定することができない。我々は「すべての可能なKSのなかで、同等の最大予測性能をもち、最小かつ客観的(unbiased)なKSをデータから抽出する方法論を新規に開発した。

端的にいうと、最小のKSを時系列情報から求められる(定常状態分布関数で評価される)すべての高次相関を再現するKSの集合で一番状態数が少ないものとして定義する。更に、最小のKSの集合の中から、観測された時系列データから読み取れる情報を越えて系に対する性質を導入しない

という基準に立って、最も unbiased な KS を定義する。恣意性の強弱を情報理論におけるシャノンのエントロピーに基づいて評価し、最も unbiased な KS を同定する(詳細な説明は当日行う予定)。

【結果と考察】 図1にEscherichia coli  $\beta$ -galactosidaseの一分子酵素ターンオーバー実験により得られたdwell-time 時系列データに対する我々の方法論を適用した結果を示す。(a)-(d)に一分子酵素反応実験の概略を、(e)には蛍光発光する生成物が共焦点領域に存在している間だけ光子が観測されるバースト時系列を示している。バースト間の“dark” dwell time  $t$  は触媒反応のターンオーバー時間に対応している。(f)は異なる基質濃度 $[S]$ におけるターンオーバー時間のLog-linearヒストグラムを示しており、基質濃度 $100 \mu\text{M}$ では非指数型キネティクスに移行することが分かる。(g)は $50 \mu\text{M}$  および  $100 \mu\text{M}$  におけるDwell timeの自己相関関数を示しており、 $100 \mu\text{M}$ では、顕著な分子記憶が存在することが分かる。(h)はデータ駆動的に抽出された  $50 \mu\text{M}$  および  $100 \mu\text{M}$  におけるKSを示している。現在のターンオーバーサイクルの「状態」(円)およびその状態からの遷移(矢印)を黒の実線で、前回および次回のサイクルのものを灰色の実線で表している。円の面積は相対的な滞在確率の大きさ、矢印の太さは遷移確率の大きさを反映している。また、ここでは、簡単のために、各状態からの遷移のうち、自分自身への状態遷移は省略している。(f)および(g)における実線はこれらのKSから求められた解析解を意味しており、基質濃度依存の実験データを忠実に再現していることが分かる。データ駆動的に再構成されたKSは、様々な基質濃度に対する一分子酵素反応の分子記憶、非指数型キネティクス(dynamic disorder)の起源を論じるうえで、背後に存在する状態と状態間の遷移の繋がりに関する重要な情報を提供するものである。

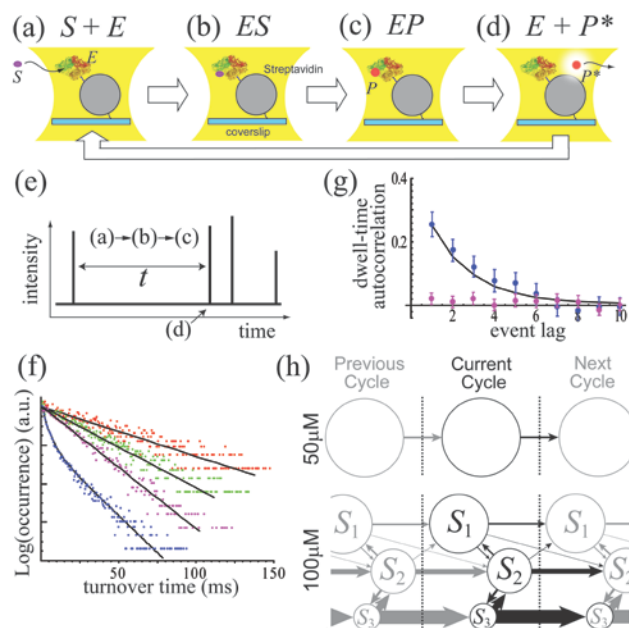


図 1: バースト時系列から構成された、一分子酵素反応ターンオーバー実験における最小かつ最大予測性能をもつ unbiased KS。(a)-(d) 一分子酵素反応実験の概略( $S$ : 基質,  $E$ : 酵素,  $ES$ : 酵素-基質対,  $EP$ : 酵素-生成物対,  $P^*$ : 蛍光を発する生成物)。(e) 蛍光強度のバースト時系列。(f) 異なる基質濃度 $[S]$ におけるターンオーバー時間のLog-linear ヒストグラム: $[S]$  (red:  $10 \mu\text{M}$ , green:  $20 \mu\text{M}$ , purple:  $50 \mu\text{M}$ , blue:  $100 \mu\text{M}$ )。ドットが実験値、実線が KS から求められた解析解。(g)  $[S]=50 \mu\text{M}$  および  $100 \mu\text{M}$  における Dwell time 自己相関関数。実線が KS から求められた解析解。(h)  $[S] = 50 \mu\text{M}$  および  $100 \mu\text{M}$  における KS。現在のターンオーバーサイクルの状態およびその状態からの遷移を黒の実線で、前回および次回のサイクルのものを灰色の実線で示している。

#### 【参考文献】

1. "Single Molecule Biophysics: Experiment and Theory" *Adv. Chem. Phys.* **146** ed. by T. Komatsuzaki, S. Takahashi, M. Kawakami, H. Yang & R. Silbey, John-Wiley & Sons, Inc.(2012)
2. 小松崎民樹 "1分子実験を読み解くための新しい実践型分子理論を目指して", **第二次先端ウォッチング調査:融合領域の創生「高次分子システムのための分子科学:実験と理論の挑戦」**, 公益社団法人日本化学会学術研究活性化委員会編 31-34 (2012)
3. Kamagata K, Kawaguchi T, Iwahashi Y, Baba A, Fujimoto K, Komatsuzaki T, Sambongi Y, Goto Y & Takahashi S, *J. Amer. Chem. Soc.* **134**, 11525 (2012).
4. Baba A & Komatsuzaki T, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**, 1395 (2011).
5. Li CB, Yang H, & Komatsuzaki T, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 14732 (2009)
6. Li CB, Yang H, & Komatsuzaki T, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 536 (2008).
7. Baba A & Komatsuzaki T, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 19297 (2007).
8. English BP, Min W, van Oijen AM, Lee KT, Luo G, Sun H, Cherayil BJ, Kou SC, & Xie XS. *Nat. Chem. Bio.*, **2**, 87 (2006)

## 4A02

# 海洋細菌から見つかった新規なアミノ酸配列を持つロドプシンの機能解明

(名工大院・工<sup>1</sup>, 東大大気海洋研<sup>2</sup>) 井上圭一<sup>1</sup>, 鷲崎涼<sup>1</sup>, 吉澤晋<sup>2</sup>,  
吉住玲<sup>1</sup>, 木暮一啓<sup>2</sup>, 神取秀樹<sup>1</sup>

## Functional and Molecular Scientific Studies of a New Rhodopsin from Ocean

(Nagoya Inst. Tech.<sup>1</sup>, AORI, Univ. Tokyo<sup>2</sup>) Keiichi Inoue<sup>1</sup>, Ryo Susaki<sup>1</sup>, Susumu Yoshizawa<sup>2</sup>,  
Rei Abe-Yoshizumi<sup>1</sup>, Kazuhiro Kogure<sup>2</sup>, Hideki Kandori<sup>1</sup>

【序】微生物型ロドプシンは真正細菌や古細菌など、微生物の細胞に存在する光受容型膜タンパク質であり、発色団としてレチナールを結合した7回膜貫通型ヘリックス構造を持つ。微生物型ロドプシンの最大の特徴はその多様性に富んだ機能で、有名なバクテリオロドプシン (BR) に代表される光駆動型の外向きプロトンポンプや、内向きクロライド (Cl<sup>-</sup>) ポンプ、カチオンチャネル、走光性のための光受容センサーなど様々な働きを持つものが存在する。2000年以降海洋環境における広範なメタゲノム解析が進み、5,000種類以上の微生物型ロドプシンが主に海洋に住む海洋細菌などから発見されている。そのほとんどはBRと同様に光のエネルギーを使ってプロトンを外向きに輸送するプロテオロドプシン (PR) に分類され、BR、PRの両方においてレチナールのSchiff塩基のカウンターイオンであり、プロトンポンプ機能に重要なアスパラギン酸 (BR: Asp85) が保存されている。しかし最近我々は海洋細菌 *α*-proteobacteria の一種 *Fulvimarina pelagi* のゲノム中にこのアスパラギン酸が失われた特徴的な配列を持つロドプシン (FR) があることを見出した (表1)。さらにFRではプロトンポンプ型ロドプシンで重要なBR: Asp96の位置にあるカルボン酸も失われており、このことからFRの性質は海洋環境中で大部分を占めるプロトンポンプ型ロドプシンのものとは大きく異なる可能性が示唆される。そこで今回FRの機能を調べると共に、過渡吸収法や赤外分光法を用いてその分子論的な性質について研究を行った。

Residue Number in BR (in <i>Fulvimarina</i> Rhodopsin)	82 (107)	83 (108)	84 (109)	85 (110)	86 (111)	87 (112)	88 (113)	89 (114)	90 (115)	91 (116)	92 (117)	93 (118)	94 (119)	95 (120)	96 (121)
BR	R	Y	A	D	W	L	F	T	T	P	L	L	L	L	D
PR	R	Y	I	D	W	L	L	T	V	P	L	L	I	C	E
<i>Fulvimarina</i> Rhodopsin	R	Y	G	N	W	T	I	T	V	P	I	L	L	T	Q

表1. *F. pelagi* のロドプシン(FR)のアミノ酸配列

【実験】FRの遺伝子は*F. pelagi*のゲノムからPCRでクローニングし、それをpET21aに組み込んだ発現プラスミドを作製した。これを用いて大腸菌 (C41株) を形質転換し、大量発現を行った。FRのポンプ機能の測定は、この大腸菌の懸濁液に光を照射し、それに伴うpH変化をpH電極を用いて検出することで行った。一方、分光測定には大腸菌からNi-NTAを用いて精製したタンパク質を用いた。過渡吸収測定では励起光にNd<sup>3+</sup>:YAGレーザーの倍波 (λ=532 nm, 5.6 mJ/cm<sup>2</sup>) を用い、ICCD linear detector および光電子増倍管を用いて過渡吸収スペクトルと特定のProbe波長での吸収変化の時間変化の測定を行った。



【結果と考察】まず FR のポンプ機能を調べるため、FR を発現させた大腸菌の懸濁液に光を照射して生じる外液の pH 変化を測定した (図 1)。プロトンポンプである PR では光を照射すると細胞外へ  $H^+$  がくみ出されるため pH は減少する (図 1 上) が、FR ではそれとは逆の pH が増加する変化が見られた。この変化はプロトノフォアである CCCP を加えると増大することから FR はプロトンを直接輸送していないことが示唆され、また膜電位を解消する  $TPP^+$  を加えたところ pH 変化が完全に消失した。これらの結果から FR の光励起に伴う pH の増加はプロトン以外のイオンの輸送に伴う二次的なプロトン移動に起因するものであることが示された。さらに懸濁中液の塩を変えて同様の測定を行ったところ、アニオン依存的に信号強度が変化し、 $SO_4^{2-}$  存在下では完全に信号が消失したことから、FR は光で  $Cl^-$  をはじめとする一価の陰イオンを内向きに輸送するクロライドポンプであることが明らかとなった。

一方精製した FR の過渡吸収測定を行ったところ、図 2 の様に K、 $K \rightleftharpoons L$ 、O といった中間体が含まれるフォトサイクル反応を示すことが明らかになった。これまで FR と同様のクロライドポンプとして古細菌 *Halobacterium salinarum* などが持つハロロドプシン (HR) が知られていたが、HR の場合始状態より Blue-shift した L 中間体が最も顕著に蓄積するのに対し、FR のフォトサイクル中では逆に Red-shift した O 中間体が L よりも圧倒的に多く蓄積する結果となった (図 2 左)。このことから機能は似通っていても FR と HR の分子論的な性質には大きな差があることが示唆され、講演ではさらに詳細な点について議論する。

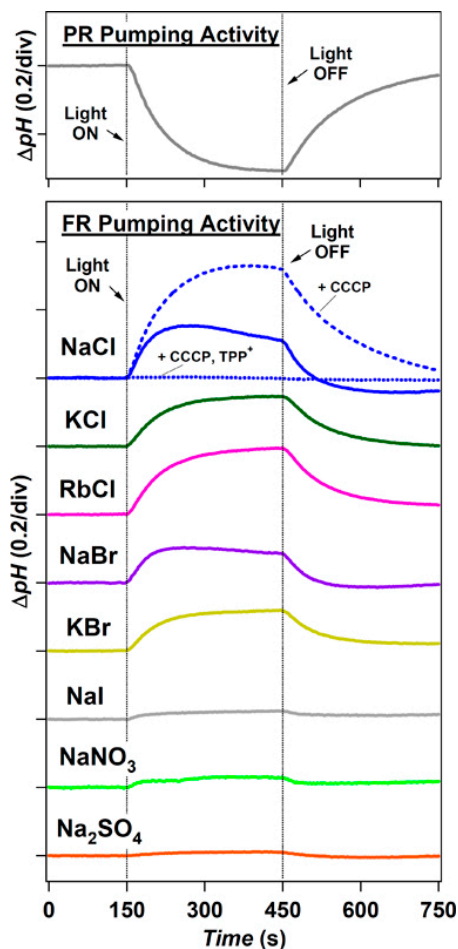


図 1. PR (上) と FR (下) の光誘起ポンプ活性

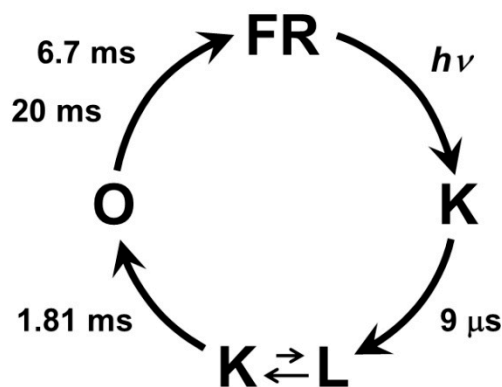
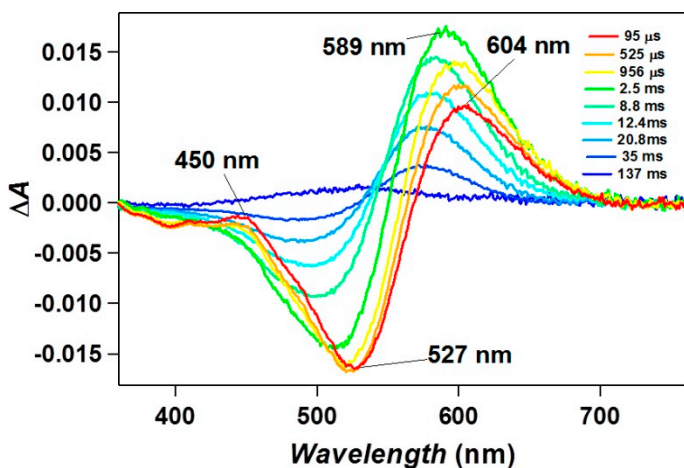


図 2. FR の過渡吸収スペクトル (左) とフォトサイクル (右)

4A03

## ロドプシンの活性中心における水の水素結合強度の違い

(京大・生命科学系キャリアパス<sup>1</sup>, 名工大院・工<sup>2</sup>, JST さきがけ<sup>3</sup>)

齋藤圭亮<sup>1</sup>, 神取秀樹<sup>2</sup>, 石北央<sup>1,3</sup>

## Difference of H-bond strengths of water in the active center of rhodopsin

(Kyoto Univ.<sup>1</sup>, Nagoya Inst. of Tech.<sup>2</sup>, JST PRESTO<sup>3</sup>)

Keisuke Saito<sup>1</sup>, Hideki Kandori<sup>2</sup>, Hiroshi Ishikita<sup>1,3</sup>

【序】プロトンポンプ機能を持つ bacteriorhodopsin (BR)とポンプ能を持たない *Anabaena* sensory rhodopsin (ASR)は、互いに高い相同性を持つ蛋白質である。その活性中心には発色団としてレチナールが存在しここで光異性化反応が起こる。レチナール近傍にある水分子 W402 は BR と ASR で共通に存在し[1, 2], BR においてはプロトンポンプに参与していると考えられている。W402 は BR と ASR とで保存されているアスパラギン酸残基(それぞれ Asp85 と Asp75)と水素結合を形成している(図 1)。フーリエ変換赤外分光(FTIR)実験によると、重水素置換した W402 の O-D 伸縮振動数は BR のほうが ASR に比べて約  $300\text{ cm}^{-1}$  低い(=水素結合が強い)ことが報告されている[3, 4]。本研究では両蛋白質間で水素結合強度が異なる理由を、蛋白質構造に立脚した理論解析によって明らかにした[5]。

【計算手法】 全ての計算は BR および ASR の X 線結晶構造[1, 2]を基にした。連続体モデルを用いた静電ポテンシャル計算により、保存 Asp の  $pK_a$  を算出した。全ての蛋

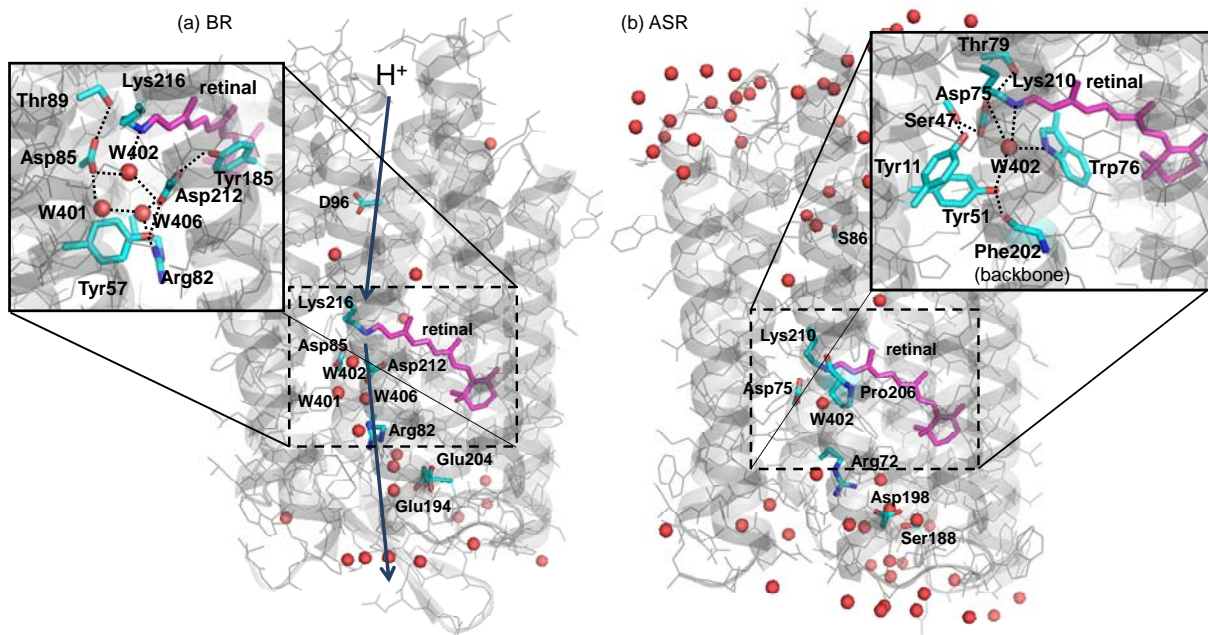


図 1: (a)BR および(b)ASR の全体構造と活性中心の水素結合ネットワーク[1, 2]。BR はプロトンポンプ能を持つが ASR は持たない。赤い球は水分子を表す。

白質環境を考慮に入れた QM/MM (quantum mechanical/molecular mechanical)法を用いて、構造最適化、振動数解析および水素結合ポテンシャルの計算を行った。QM 領域として W402 に関与する水素結合ネットワーク内の全残基と水分子(図 1)を含めた。

【結果と考察】BR における Asp85 の  $pK_a$  の計算値は 1.5 となり, ASR における Asp75 の計算値-5.1 に比べて大きかった。この  $pK_a$  差は、水素結合ポテンシャルの形(図 2)に違いを生じさせる：

(1) ポテンシャルの右肩(Asp 側)の高さは ASR より BR のほうが低い(図 2 矢印 1)。これは BR の Asp の  $pK_a$  が ASR より大きいことを反映している。  
 (2) ポテンシャルにおける左(W402 側)の well は ASR よりも BR のほうが緩やかにカーブしている(図 2 矢印 2)。well のカーブが緩やかなほど W402 の O-D 伸縮振動数は低くなる。実際、振動数解析の計算結果においても、BR の振動数は ASR に比べて  $300\text{ cm}^{-1}$  小さくなった。このことは FTIR の実験[3,4]と合致する(表 1)。

(3) W402 側と Asp 側の両方を含めたポテンシャル全体の well の幅は Asp と W402 間の水素結合距離を反映している。BR のこの幅は ASR に比べて小さく(図 2 矢印 3)、水素結合距離が短い(=結合強度が強い)ことを意味する。実際、構造最適化の結果、BR では W402-Asp 水素結合距離(結晶構造では  $2.6\text{ \AA}$ )は  $2.57\text{ \AA}$  と短い一方, ASR ではその距離(結晶構造では  $2.7\text{ \AA}$ )は  $2.71\text{ \AA}$  と長くなった。

【結論】水分子 W402 の水素結合の強弱は、結合先の保存 Asp 残基(BR では Asp85, ASR では Asp75)の  $pK_a$  の大小に起因する。このことが究極的に BR と ASR のプロトンポンプ能の有無を決定していると考えられる。

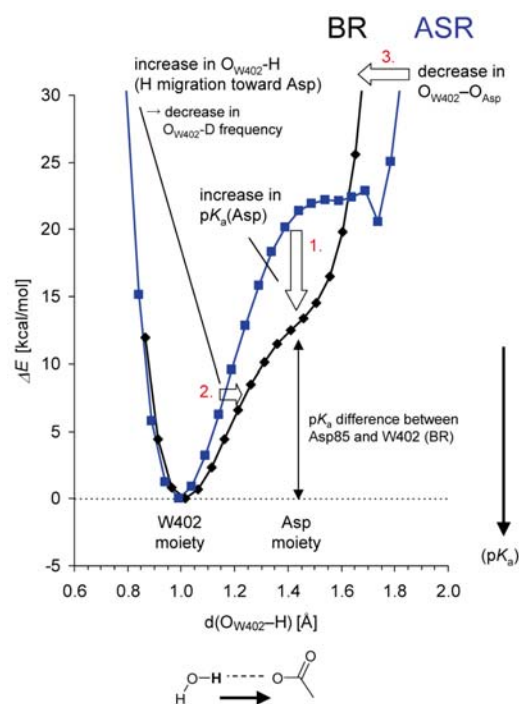


図 2: BR(黒)と ASR(青)における水分子 W402 と保存 Asp 間の水素結合ポテンシャル。左の well は水素原子が W402 に、右の肩は Asp に所属している状態を表す。肩の高さは W402 と Asp の  $pK_a$  差を反映している。左の well のカーブが緩いほど W402 の O-D 伸縮振動数は小さくなり、全体の well の幅が狭いほど水素結合距離は短くなる。

表 1: W402 の O-D 伸縮振動数の実験値と計算値との比較 [ $\text{cm}^{-1}$ ]

	FTIR実験	QM/MM計算
BR	2171 [3]	2078
ASR	~2500 [4]	2376
差	~300	298

## References:

- [1] Luecke, H., Schobert, B., Richter, H. T., Cartailler, J. P., Lanyi, J. K. (1999) *J Mol Biol* **291**, 899.
- [2] Voageley, L., Sineschekov, O. A., Trivedi, V. D., Sasaki, J., Spudich, J. L., Luecke, H. (2004) *Science* **306**, 1390.
- [3] Shibata, M., Kandori, H. (2005) *Biochemistry* **44**, 7406.
- [4] Furutani, Y., Kawanabe, A., Jung, K. H., Kandori, H. (2005) *Biochemistry* **44**, 12287.
- [5] Saito, K., Kandori, H., Ishikita, H. (2012) *J. Biol. Chem.*, in press.

ロドプシンとイソロドプシンの光応答性に関する  
非断熱 *ab initio* トラジェクトリ法による理論的研究

(京都大福井セ<sup>1</sup>、上智大学理工<sup>2</sup>) Wilfredo C. Chung<sup>1</sup>、南部伸孝<sup>2</sup>、石田俊正<sup>1</sup>

A theoretical study on photo-responses of rhodopsin and isorhodopsin

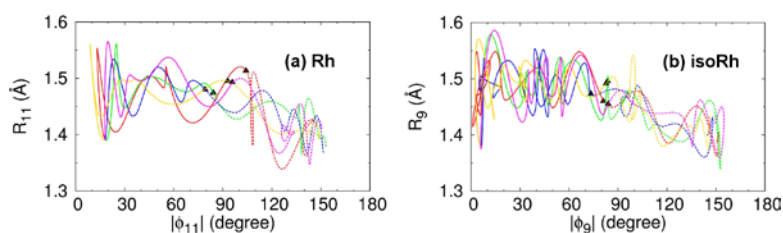
(FIFC, Kyoto Univ.<sup>1</sup>, Sophia Univ.<sup>2</sup>) Wilfredo C. Chung<sup>1</sup>, Shinkoh Nanbu<sup>2</sup> and Toshimasa Ishida<sup>1</sup>

Rhodopsin (Rh) has 11-cis retinal as chromophore and is the photosensitive chemical found on the outer segment of rod-like cells in the retina, the light-sensing structure of eyes. Isorhodopsin (isoRh) is an Rh analogue that contains 9-cis retinal embedded in the same opsin environment. Despite their similarity, the photoisomerization period and quantum yield are largely different. Rhodopsin photoisomerization is experimentally known to be faster and more efficient

Here, we carried out Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) trajectory surface hopping (TSH) direct dynamics calculations for Rh and isoRh with 162 runs for each in order to understand the origin of discrepancies in the rate and efficiency[1]. The transition probability is estimated on the basis of Zhu-Nakamura (ZN) theory[2]. Comparison is made with our previous *in vacuo* calculations[3,4]. The QM treatment was at the CASSCF(6,6) level with the mechanical embedding using the 6-31G basis set. The MM part is described by AMBER.

The simulation reproduced faster and more efficient isomerization in rhodopsin than in isorhodopsin. The reaction times in Rh and isoRh were 187 and 344 fs, and the quantum yields were 0.52 and 0.31. The corresponding experimental values are 200 and 600 fs for the reaction times and 0.65 and 0.22 for the yields. The opposite rotation of  $\phi_9$  and  $\phi_{11}$  ('wring-a-wet-towel' motion) takes place upon photoexcitation, which also does without opsin. The wring-a-wet-towel motion is dynamically enhanced in comparison with the one expected from locations of the MECI.

Figure 1 shows the diagram of the active twist angle and the length of the active bond for five typical trajectories for Rh and isoRh. Fast and straightforward dynamics in Rh is shown in Figure 1(a) whereas complicated excited-state dynamics is illustrated in the isoRh case in Figure 1(b). The faster and more efficient photoisomerization of Rh than of isoRh is due to a straightforward and fast excited-state dynamics for Rh in



**Figure 1.** Change in length of the active bond  $-C_n-C_{n+1}-$  against the absolute value of the dihedral angle  $C_{n-1}-C_n-C_{n+1}-C_{n+2}$  for typical (a) Rh ( $n=11$ ) and (b) isoRh ( $n=9$ ) trajectories leading to the all-trans form. The solid and dashed lines show that trajectories are in the excited and ground states and the black triangles correspond to transition from the excited state to the ground state.



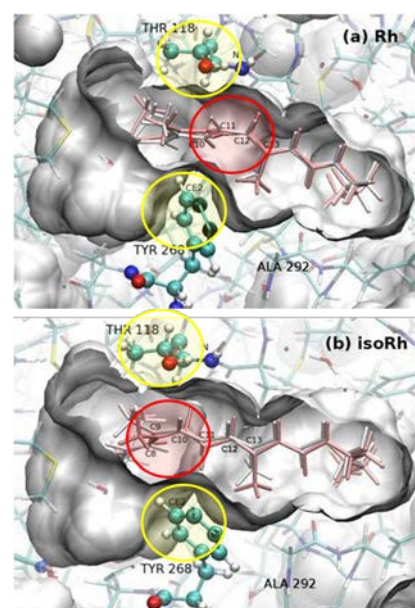
contrast with a complicated dynamics in a back and forth fashion especially in the excited state for isoRh. This difference would be mainly due to the dihedral that needs to be twisted in the isoRh case (-C9=C10-) is situated within the narrow gap between Thr118 and Tyr268 as shown in Figure 2(b). In Rh, the twisting area (-C11=C12-) is off from the two sandwiching residues as shown in Figure 2(a).

Photoexcitation of Rh gives only bathoRh (and the reactant) whereas the isoRh excitation yields a 9,11-dicis analog in addition to bathoRh (and the reactant). The rigorous selectivity in rhodopsin would be another reason why rhodopsin is selected biologically.

Comparison with our previous opsin-free investigations reveals that opsin tends to confine the twist of the active dihedral to only one direction. When the opsin environment was totally ignored, the calculated quantum yield was only 0.27 and 0.13, respectively in sharp contrast with the values of 0.51 and 0.31 in opsin, respectively. This would be mainly due to the unidirectional rotation in opsin environment. The twist-confinement totally blocks simultaneous twisting of  $\phi_9$  and  $\phi_{11}$  (=C10-C11=C12-C13=) and enhance the quantum yields. Also found is the fact that the opsin funnels transitions into the vicinity of minimum energy conical intersections (MECI). The opsin would prevent inefficient, premature hops especially in the isoRh case.

The present simulation reveals that the Weiss-Warshel model for cis-trans photoisomerization is not applicable for rhodopsin because the branching ratio after transition is crucial. In the model, it is assumed that a trajectory goes back and forth around the crossing point in the excited state. In their scheme, if the transition takes place when the trajectory go forth, the product is generated and if it does when the trajectory go back, the ground state reactant is regenerated. The analysis of trajectories, however, reveals that the picture totally breaks down, and that branching ratio at the first transition is crucial.

The present ZN-QM/MM-TSH is found to be a promising approach to investigate reactions in biomolecules.



**Figure 2.** Superimposed structures of Frank-Condon geometry (gray) and geometry at the MECI (pink) for isorhodopsin. The twisting parts of retinal (red circle) and sandwiching Thr118 and Tyr268 (yellow circles) are highlighted. The twisting part is sandwiched between the two residues.

- [1] W. C. Chung, S. Nanbu, and T. Ishida, *Chem. Lett.* 40, 1395 (2011); *J. Phys. Chem. B*, 116, 8009 (2012). [3] H. Nakamura, *Nonadiabatic Transition: Concepts, Basic Theories and Applications*, Second Ed., World Scientific, Singapore, 2012. [4] T. Ishida, S. Nanbu, and H. Nakamura, *J. Phys. Chem. A*, 113, 4356(2009).[5] W. C. Chung, S. Nanbu, and T. Ishida, *J. Phys. Chem. A*, 114, 8190(2010).



## 4A05

### ハロロドプシンの光サイクル初期過程におけるタンパク質構造ダイナミクス： 塩化物イオンの効果

(阪大院理<sup>1</sup>、名工大院工<sup>2</sup>) 下尾祐未<sup>1</sup>, 水野操<sup>1</sup>, 神取秀樹<sup>2</sup>, 水谷泰久<sup>1</sup>

#### Protein Dynamics in Primary Process of the Photocycle of Halorhodopsin: Effect of Chloride Ion in the Binding Site

(Osaka University<sup>1</sup> and Nagoya Institute of Technology<sup>2</sup>) Yumi Shimoo<sup>1</sup>, Misao Mizuno<sup>1</sup>,  
Hideki Kandori<sup>2</sup>, and Yasuhisa Mizutani<sup>1</sup>

【序】ハロロドプシン (HR) は古細菌中に存在し、塩化物イオン (Cl<sup>-</sup>) を輸送する光駆動イオンポンプである。そのレチナル発色団の近傍にはCl<sup>-</sup>イオン結合部位が存在し、発色団の光異性化に駆動されたタンパク質の構造変化がイオンの移動を誘起する。本研究では、時間分解紫外共鳴ラマン (UVR) 分光法を用いて、レチナル発色団の光異性化に対するタンパク質部分の応答について、Cl<sup>-</sup>イオンの効果を調べた。実験結果に基づき、タンパク質部分の初期過程の構造変化について議論する。

【実験】HR は、大腸菌中で発現させ、クロマトグラフィーを用いて精製した。測定試料には、HR を界面活性剤 (DDM) を含んだ 10 mM MOPS バッファー (pH 7.0) に可溶化したものを用いた。Cl<sup>-</sup>イオン結合形 (purple-form) は 150 mM NaCl を、アニオン非結合形 (blue-form) は 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を上記の溶液に加えて調製した。ピコ秒時間分解紫外共鳴ラマンスペクトル測定はポンプ・プローブ法により行った (ポンプ光波長 586 nm、プローブ光波長 225 nm、装置応答時間 3.4 ps)。測定試料を液膜状に流し、そこにポンプ光、プローブ光を照射し、タンパク質からのラマン散乱光を観測した。可視共鳴ラマンスペクトルは、blue-form、purple-form、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>イオン結合形、Br<sup>-</sup>イオン結合形、N<sub>3</sub><sup>-</sup>イオン結合形の試料について、アルゴンイオンレーザーの波長 514.5 nm の発振線を用いて測定した。

【結果と考察】図 1 に purple-form と blue-form の時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルを示す。各遅延時間におけるスペクトルは、光反応によるスペクトル変化が非常に小さいため、プローブ光とポンプ光を照射して測定したスペクトルから、プローブ光のみを照射して測定したスペクトルの差スペクトルである。それぞれのスペクトルにおいて、W で示されるトリプトファン (Trp)

残基由来のバンドおよび Y で示されるチロシン (Tyr) 残基由来のバンドが負の強度を持ち、反応中間体では、バンド強度が減少することがわかった。この強度変化は、光励起に伴うタンパク質の構造応答を反映している。また、purple-form、blue-form とともに、W3 バンドを構成する成分のうち、高波数側の成分が強度減少を示した。差スペクトルにおける各バンド強度の時間変化を図 2 に示す。purple-form では、光励起に伴い、1616 cm<sup>-1</sup> のバンド (W1 バンドと Y8a バンドが重なったもの) および W3 バンドは装置応答時間内で強度が減少する

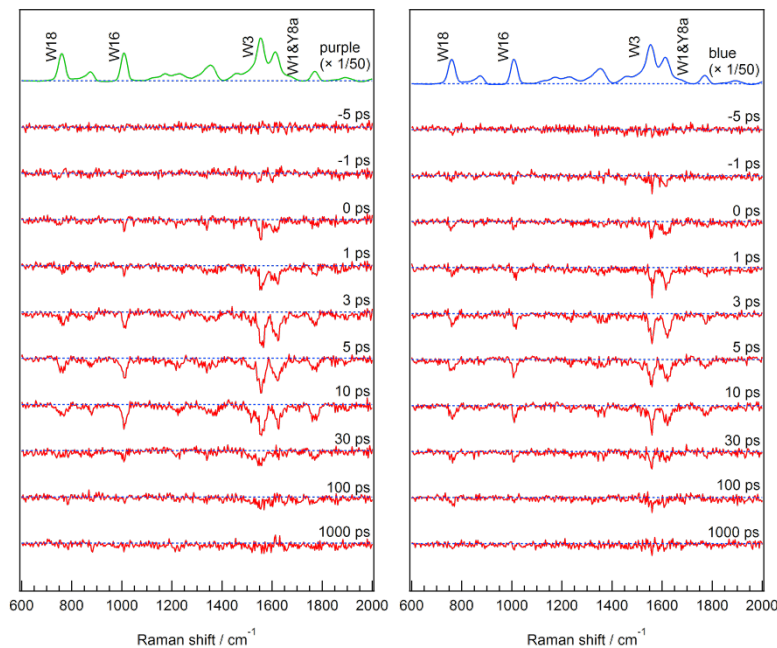


図 1. HR のピコ秒時間分解紫外共鳴ラマンスペクトル。左は purple-form、右は blue-form のものである。

のに対して、W16 および W18 バンドは強度減少に約 2 ps の時定数をもつ成分があることがわかった。これらの 4 本のバンドはその後強度を回復し、回復はいずれのバンドも時定数 19 ps をもつ指数関数でよく表すことができた。blue-form についても同様に、W16 および W18 バンドの強度減少の遅れと約 20 ps の強度回復が観測された。以上のように、タンパク質の構造応答には Cl<sup>-</sup>イオンの効果はみられなかった。

これに対して、発色団の C=C 伸縮振動バンドには Cl<sup>-</sup>イオンの有無によって、またイオンの種類によって波数の違いがみられた (blue-form, 1520.0 cm<sup>-1</sup>; purple-form, 1525.0 cm<sup>-1</sup>; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>結合形, 1529.4 cm<sup>-1</sup>)。さらに、レチナールの吸収極大波長にもイオン依存性がみられた。

2 つの実験結果から、アニオンは静電相互作用によってレチナールの電子状態に影響を及ぼすが、タンパク質の初期過程の構造変化には大きな影響を及ぼさないことが明らかになった。HR の IR 分光法による研究で、シッフ塩基と近傍の水分子との水素結合の強さは purple-form と NO<sub>3</sub><sup>-</sup>イオン結合形とで大きな違いがないことが報告されている<sup>1</sup>。また、上に述べた可視共鳴ラマンスペクトルの結果において、purple-form と NO<sub>3</sub><sup>-</sup>イオン結合形の C=C 伸縮振動バンドの波数の差 (-4.4 cm<sup>-1</sup>) と、purple-form と blue-form のそれ (+5.0 cm<sup>-1</sup>) とは絶対値が同程度であり、Cl<sup>-</sup>イオンの有無による差は、上記 2 種類のアニオンの差と同程度の効果しか生まないと推測できる。したがって、purple-form と blue-form の間においてもシッフ塩基の水素結合には大きな差がないと考えられる。光異性化に伴うシッフ塩基の動きがタンパク質の構造変化の引き金であるとすると、2 つの form の間でタンパク質の構造応答の速さに大きな差がなかったことを説明できる。

観測された HR の強度回復の時定数は、これまでに報告された古細菌型ロドプシンのバクテリオロドプシン、センサーロドプシン II の値とよく似ていた<sup>2,3</sup>。これらのタンパク質では、レチナール周辺にある 3 つの Trp 残基は保存されている。したがって、類似した時定数は、光異性化に伴う古細菌型ロドプシン共通の動的特性を反映していると考えられる。

ラマンバンドの強度減少の速さはバンドによって異なっていた。このような挙動は、他の古細菌型ロドプシンでは見られておらず、HR で初めて観測されたものである。これは、時間変化の速い Trp 残基と遅い Trp 残基がスペクトル変化に寄与しているためだと考えることができる。しかし、実験結果を定量的に再現するためには、速い残基と遅い残基のスペクトルに、大きな相対強度の差があることを仮定しなければならないため、この可能性については現在検討中である。

【謝辞】HR の試料調製に関して、出村誠教授 (北海道大学)、古谷祐詞准教授 (分子科学研究所)、須藤雄気准教授 (名古屋大学) にご助言を頂きました。

<sup>1</sup> Nakashima, K., Nakamura, T., Takeuchi, S., Shibata, M., Demura, M., Tahara, T., and Kandori, H. (2009) *J. Phys. Chem. B*, **113**, 8429-8434. <sup>2</sup> Mizuno, M., Shibata, M., Yamada, J., Kandori, H., and Mizutani, Y. (2009) *J. Phys. Chem. B*, **113**, 12121-12128. <sup>3</sup> Mizuno, M., Sudo, Y., Homma, M., and Mizutani, Y. (2011) *Biochemistry*, **50**, 3170-3180.

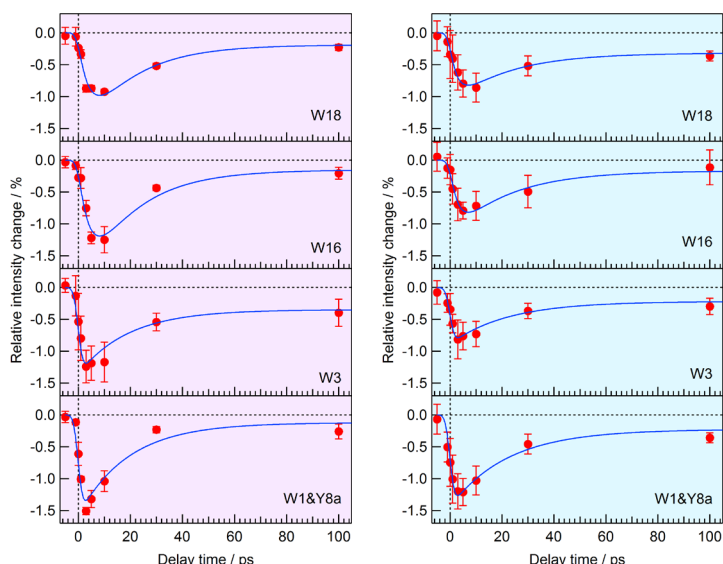


図 2. HR のバンド強度の時間変化。(左) purple-form、(右) blue-form。●は各遅延時間における相対強度変化。実線は、次の関数でフィットしたものであり、以下の時定数で最もよくフィットした。フィッティング関数:  $A_1 \times \exp(-t / \tau_{\text{recovery}}) + A_2$  (W3, W1&Y8a バンド)  $A_1' \times (-\exp(-t / \tau_{\text{bleach}}) + \exp(-t / \tau_{\text{recovery}})) + A_2'$  (W18, W16 バンド)  
purple-form:  $\tau_{\text{bleach}} = 2 \pm 1$  ps,  $\tau_{\text{recovery}} = 19 \pm 4$  ps  
blue-form:  $\tau_{\text{bleach}} = 3 \pm 1$  ps,  $\tau_{\text{recovery}} = 22 \pm 3$  ps

## センサリーロドプシン I の光反応ダイナミクスの研究

(名工大院・工<sup>1</sup>、名大院・理<sup>2</sup>)川本健一<sup>1</sup>、井上圭一<sup>1</sup>、谷ヶ崎仁<sup>2</sup>、須藤雄気<sup>2</sup>、本間道夫<sup>2</sup>、神取秀樹<sup>1</sup>

## Study on light reaction dynamics of sensory rhodopsin I

(Nagoya Institute of Technology<sup>1</sup>, Nagoya University<sup>2</sup>)Kenichi Kawamoto<sup>1</sup>, Keiichi Inoue<sup>1</sup>, Jin Yagasaki<sup>2</sup>, Yuki Sudo<sup>2</sup>, Michio Homma<sup>2</sup>  
and Hideki Kandori<sup>1</sup>

【序】微生物型ロドプシンの一種である Sensory rhodopsin I (SRI) は緑～赤色光に集まる正の走光性と、青色光から逃避する負の走光性の光受容体として機能する。光を受けた SRI は構造変化を起こし、情報変換タンパク質 (HtrI) の構造変化を誘起することで、鞭毛の回転方向を制御するためのシグナル伝達が行われる (図 1)。我々は走光性シグナル伝達メカニズムの解明に向けて、古細菌 *Haloarcula vallismortis* 由来の SRI (*HvSRI*) を用いた研究を行った。*HvSRI* は研究が進んでいる *Halobacterium salinarum* 由来の SRI (*HsSRI*) とよく似たタンパク質である (アミノ酸の identity 69 %) が、可溶化状態や低塩濃度条件下で安定であるため、様々な測定が可能である。また、発色団レチナールのプロトン化シッフ塩基のカウンターイオンである Asp76 の pKa は 6.6 であり、*HsSRI* と同様に生理条件下である中性付近では酸性型と塩基性型の 2 形態をとる。今回の研究では両形態の光反応中の分子構造変化を観測するため過渡回折格子法 (TG 法) による測定を行った。

## 【実験】

TG 法は光励起した試料の屈折率の変化を測定することで体積変化や分子拡散といった分子全体の動きを過渡的に捉えることができる手法であり、2 本の励起光 (532 nm) をサンプル溶液中で交差するように入射し、生じた干渉縞によって分子を光励起させ、周期的な屈折率変化を起こさせる。そして、ブラッグ条件を満たしたプローブ光 (808 nm) を入射することで生じる回折光の信号強度を光電子増倍管によって検出することで屈折率の変化を測定することができる (図 2)。

試料として、*HvSRI* を pH 5 のバッファに溶かし

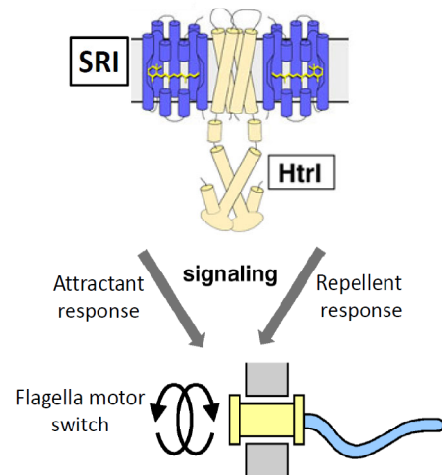


図 1. SRI によるシグナル伝達

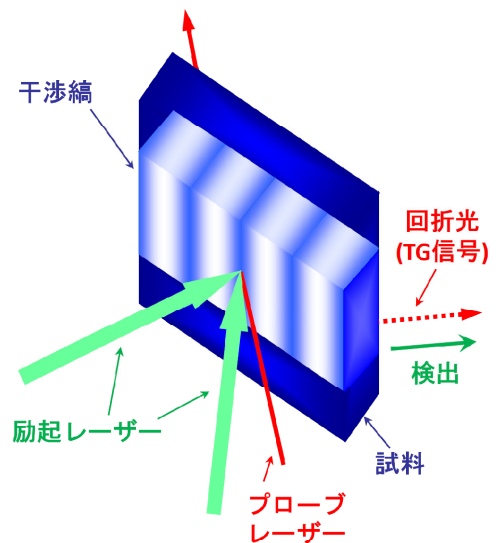


図 2. 過渡回折格子法 (TG 法)



たものを酸性型、pH 8.5 のバッファーに溶かしたものを塩基性型として用いた。

【結果】

酸性型および塩基性型 *HvSRI* から得られた TG 信号を図 3 に示す。酸性型と塩基性型では TG 信号に大きく違いがみられることから両者の構造変化は大きく異なっていると考えられる。また、酸性型、塩基性型ともに数ミリ秒の時間領域において過渡吸収変化が見られなかったのに対して TG 信号には屈折率の変化を伴う成分が見られた (図 4)。この変化は分子の体積変化に寄与するものと考えられ、*HvSRI* の部分モル体積が変化していることを示している。また、体積変化は酸性型と塩基性型で逆の変化を示すことがわかり、始状態におけるカウンターイオンのプロトン化、脱プロトン化状態による違いが光反応時の構造変化に違いを及ぼしていると考えられる。

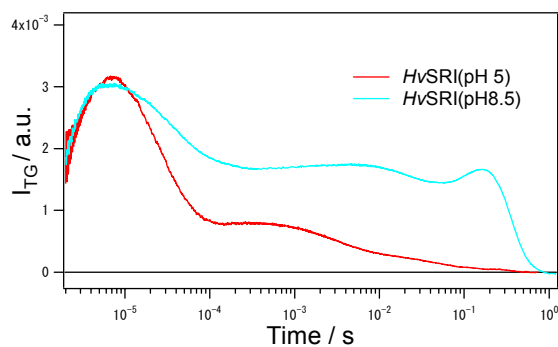


図 3.酸性型 (赤線) 及び塩基性型 (青線) *HvSRI*

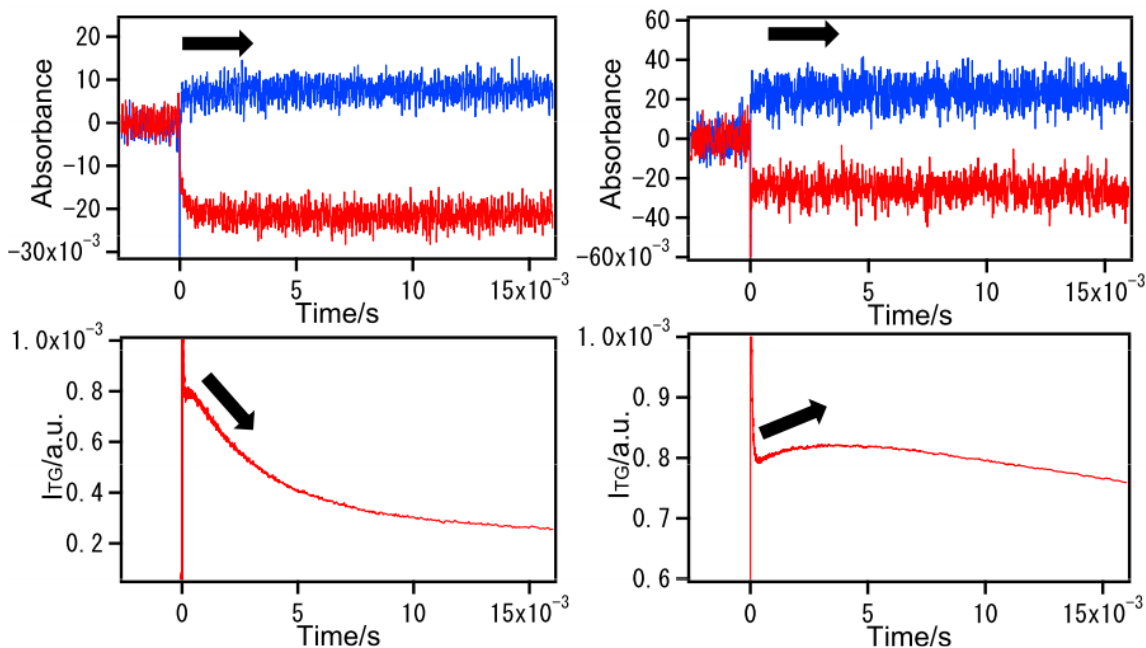


図 4.酸性型 (左)、塩基性型 (右) *HvSRI* の過渡吸収変化 (上) と TG 信号 (下)

次に、2本の励起光から成す角度を変えることで干渉縞の格子波数を変え、拡散信号の変化から分子の拡散定数を求める実験を行なった。その結果、基底状態において酸性型の拡散定数は  $D = 5.94 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  で分子量 104 kDa と単量体に相当するのに対し、塩基性型の拡散定数は  $D = 1.90 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  で 3155 kDa とおよそ 30 量体に相当することがわかった。さらに、酸性型では基底状態及び励起状態の拡散定数に大きな違いが見られなかったが、塩基性型の M 中間体では拡散定数が  $D = 3.83 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  となり、387 kDa に相当すること、すなわち、基底状態と M 中間体で分子構造が異なることがわかった。この拡散定数の過渡的な変化について、当日の発表で詳細な議論を行う。

## 光合成バクテリア反応中心における電子トンネル移動機構

(京大院・理) 鬼頭・西岡 宏任, 安藤 耕司

## Electron Tunneling Mechanisms in Bacterial Photosynthetic Reaction Center

(Kyoto Univ.) Hirotaka Kitoh-Nishioka, Koji Ando

序) 光合成や内呼吸などの生体エネルギー変換では、蛋白質環境下におけるクロロフィルやヘムなどの redox center 間の電子移動反応が重要な役割を果たしている。この生体電子移動は、redox center 間を電子が長距離(5~30 Å)トンネル移動することで反応が実現されている。そのため、トンネル媒体である蛋白質の構造や化学的性質が、Marcus の式中の電子的相互作用項( $T_{DA}$ )を介して反応速度( $k_{DA}$ )に大きく影響する。

$$k_{DA} = \frac{\hbar}{2\pi} |T_{DA}|^2 \frac{1}{\sqrt{4\lambda\pi k_B T}} \exp\left[-\frac{(-\Delta G - \lambda)^2}{4\lambda k_B T}\right]$$

例えば、同程度の redox center 間距離の電子移動であっても、蛋白質環境の違いで反応速度が四桁も異なる測定結果が得られることがある。しかし、トンネル媒体として蛋白質がどのように電子移動の速度( $T_{DA}$  値)を制御しているのかはよく分かっていない。特定のアミノ酸残基が、電子移動をガイドする(トンネル)導線として働いているのだろうか? 蛋白質の電子状態に基づく理論解析がこの長距離電子トンネル移動のメカニズムを理解する上で重要となるが、redox center に加えて巨大な蛋白質に対して通常の非経験的量子化学計算を用いると計算コストが膨大になってしまう。

そこで、我々はフラグメント分子軌道(FMO)法を利用した新しい電子移動経路解析法を開発した[1]。常行らの FMO-LCMO 法[2]を利用すると、FMO 計算から得られる結果から、フラグメントの MO を基底とする系全体の一電子 Hamiltonian を作ることができる。フラグメントの局在化軌道を利用することで、効率的に  $T_{DA}$  計算や経路解析のための摂動計算を実行することができる。本研究では、我々の手法を光合成バクテリア *Blastochloris viridis* の反応中心(RC)蛋白質に適用した[3,4]。

**Method)** FMO-LCMO Hamiltonian を基に、3つの異なる摂動法から  $T_{DA}$  を求めた。

- (1)系全体のフロンティア軌道に対する一般化 Mulliken-Hush(GMH)法 [3,4]
- (2)Bridge Green 関数(GF)を使って縮約した有効2状態 Hamiltonian の非対角項から計算 (Bridge GF) [1,3,4]
- (3)fragment MO 間の重なりを考慮した Lippmann-Schwinger 方程式に基づく散乱理論 (LS)から計算(本研究では4次の項まで考慮) [4]

トンネル経路は、(2)の結果から fragment 間のトンネリングカレント[1]として計算ができ、(3)の結果からも fragment MO 間の相互作用の伝播という形式で解析することが可能である。また、Hamiltonian をフラグメントの valence MO のみで構築する(FMO-LCVMO 法)ことで、 $T_{DA}$  計算とトンネル経路解析部分の計算コストを大幅に減少させることができる。[1,3,4]

(以下では、系全体に対して通常の制限/非制限 Hartree-Fock 法を用いて得られた結果は RHF/UHF と記し、FMO-LCMO 法の結果と区別した。)

計算例) 第一キノン(MQ)から第二キノン(UQ)への電子移動に対する適用例を紹介する。X線結晶構造データ(1PRC)を用いて、図1(a)のように電子状態計算に用いるモデル系を構築した。天然では図のように高スピン( $S=2$ )状態の非ヘム鉄( $\text{Fe}^{2+}$ )が存在している。 $\text{Fe}^{2+}$ を枯渇させたRCや他の二価金属イオンに置換したRCでも電子移動速度の測定値はほとんど変わらないことから、 $\text{Fe}^{2+}$ は電子移動経路として使われていないと考えられている[5]。そこで、図1(a)のモデル系に加えて、 $\text{Fe}^{2+}$ を取り除いた場合と $\text{Zn}^{2+}$ に置き換えた場合に対しても、我々の経路解析法を適用した。図1(b)-(d)は、トンネリングカレントの計算結果である。天然の $\text{Fe}^{2+}$ が存在する場合は $\text{Fe}^{2+}$ とHis L190が主要経路になっており、 $\text{Zn}^{2+}$ に置き換えるとHis M217の経路としての役割が強くなり、 $\text{Fe}^{2+}$ が枯渇した場合はHis M217とHis L190のみで電

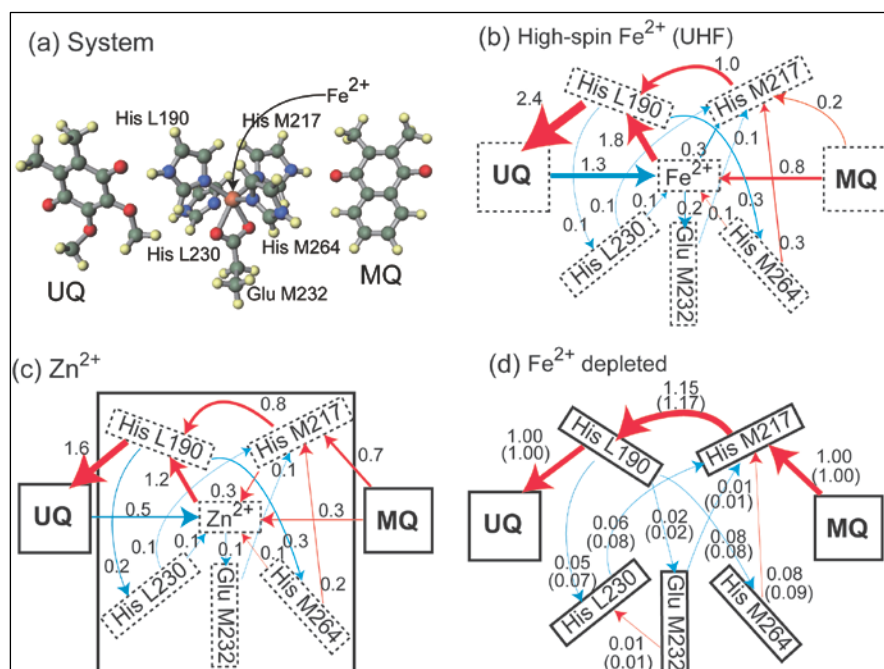


図1 (a)モデル系(b)-(d)トンネリングカレントの計算結果(solid squareはFMO計算のフラグメントを表わしている。6-31G(d)を使用)

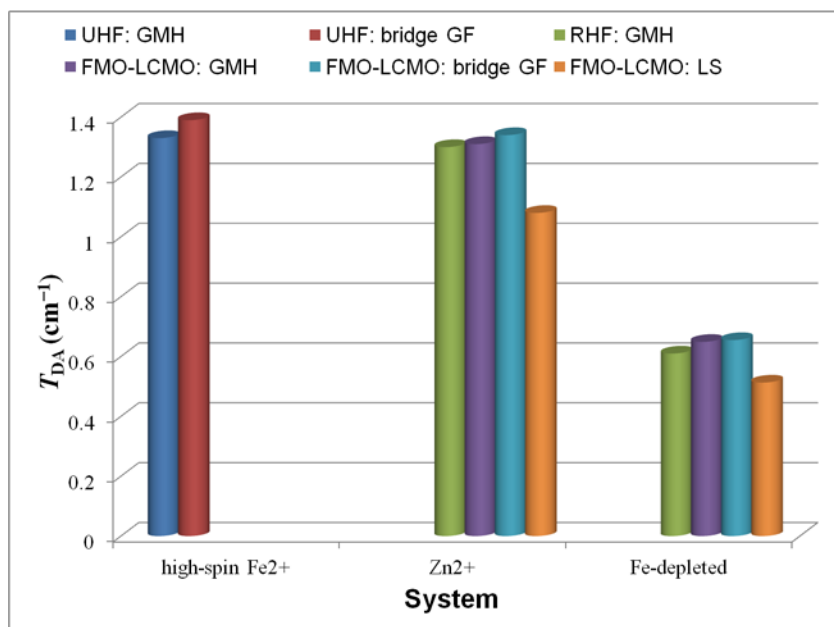


図2  $T_{DA}$ の計算結果(6-31G(d)を使用)

子移動が起こっていることが分かった。

図2は $T_{DA}$ の計算結果である。図1で示したように $\text{Fe}^{2+}$ の枯渇・ $\text{Zn}^{2+}$ への置換によって主要トンネル経路が大きく変わったのに対して、その経路を使って伝播される $T_{DA}$ 値自体は天然のものどあまり変わっておらず、実験[5]とよく対応する結果となった。謝辞) 本研究の一部は京都大学学術情報メディアセンターのスーパーコンピュータ共同研究制度(若手奨励枠)による。

引用文献) [1] H. Nishioka and K. Ando, *J. Chem.*

*Phys.* **134** (2011) 204109. [2] S. Tsuneyuki *et al.*, *Chem. Phys. Lett.* **476** (2009) 104. [3] H. Kitoh-Nishioka and K. Ando, submitted. [4]第15回理論化学討論会(2D2b). [5] Debus *et al.* *Biochemistry* **25** (1986) 2276.



#### 4A08 近赤外励起顕微蛍光スペクトルを用いた窒素固定細胞分化過程における光合成膜変化の解析

(京大院理(1)・JST さきがけ(2)) 熊崎茂一<sup>1,2</sup>, 明里将志<sup>1</sup>, 長谷川慎<sup>2</sup>

Transformation of Thylakoid Membrane during Differentiation for Diazotrophic growth Visualized by Microscopic Spectral Imaging (Grad. Sch. of Sci., Kyoto Univ. & JST-PRESTO) Shigeichi Kumazaki<sup>1,2</sup>, Masashi Akari<sup>1</sup>, Makoto Hasegawa<sup>1</sup>

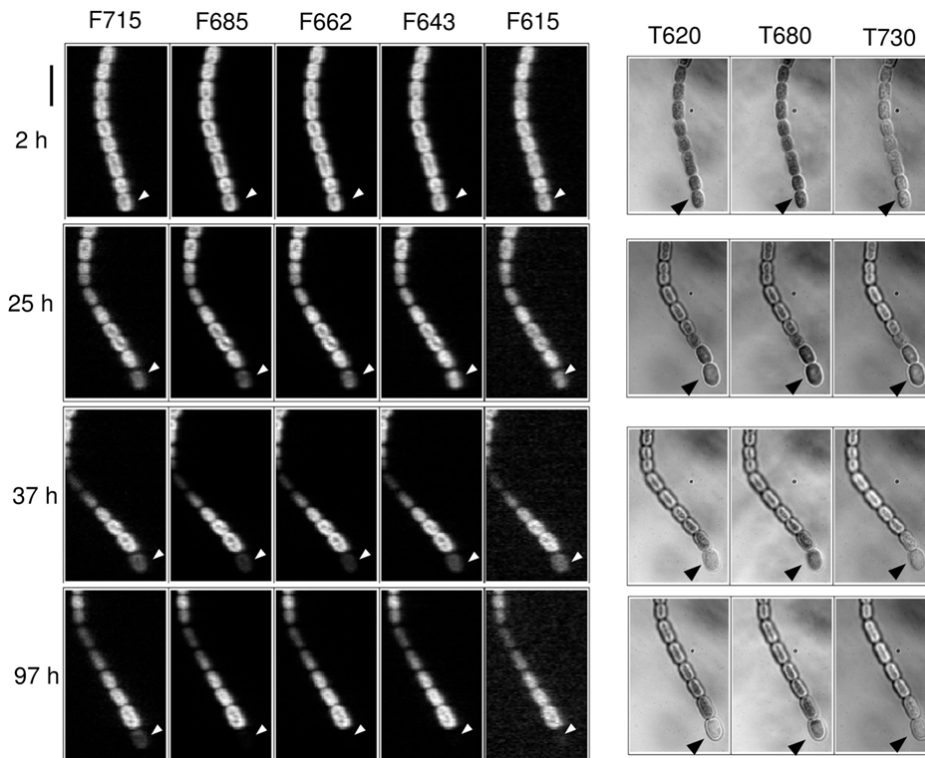
【背景・導入】一部のシアノバクテリアは窒素栄養源が不足する環境でも安定な2原子分子のN<sub>2</sub>からアンモニアなどの窒素化合物を作り出し(窒素固定)、自らの栄養素とすることができるので、最も貧栄養な環境でも生態系の初期基盤形成に不可欠である。窒素固定を行う酵素、ニトロゲナーゼは酸素によって不活性化されてしまうので酸素発生型光合成、とりわけ光化学系IIの反応と共存することができない。糸状に細胞が連結したシアノバクテリアであるアナベナの場合は数個から約20個の細胞のうちの1個の細胞だけを異型細胞(ヘテロシスト)として細胞分化させ、その異型細胞でのみ窒素固定を行い、異型細胞では光化学系IIの量と活動を低下させる。しかし、光化学系Iは異型細胞でも残存し、光化学反応を維持すると言われている。それは光化学系Iのみで可能な光エネルギーを利用した循環型電子伝達によりチラコイド膜内外のプロトン濃度勾配を作り出し、ATP生産を維持するためと言われている。ニトロゲナーゼによる窒素固定反応に必要な大量のATPを供給するために光化学系Iが必要とされる。このように酸素発生型光合成を行う通常の栄養細胞から異型細胞が形成される数十時間という時間の間に起こる変化は劇的なものであるが、その詳細を細胞毎に調べる試みはこれまで不十分であった。また、酸素発生型光合成を持続する異型細胞以外の細胞(栄養細胞)では光化学系IIと光化学系Iは維持されるが、一時的な窒素欠乏が何も引き起こさないはずはない。それらの知見が不足しているのは高い感度で高速に細胞毎の蛍光スペクトルを得る方法が市販の顕微鏡を基本にした装置で未発達であったためであろう。我々は細胞毎の顕微蛍光スペクトルと顕微吸収スペクトルを得ることができるので、これを用いて、窒素欠乏後に異型細胞が形成される生理的な過程の一部始終を観測することを行ったので報告する。

【方法】窒素充足条件下で培養されていた糸状連結シアノバクテリア *Anabaena variabilis* を窒素欠乏培養条件に移植した時刻をゼロ時間とし、その後12-24時間ごとに、同一フィラメント上に連結された数個の細胞の顕微蛍光スペクトルと顕微吸収スペクトルを60-96時間にわたって観察した。顕微分光の励起は近赤外パルスレーザー(808 nm)による2光子励起と近赤外連続発振レーザー(785 nm)による1光子励起を採用し、蛍光スペクトルは600 nmから755 nmで2 nmの波長分解能で得た。全ての顕微蛍光スペクトル取得は既報のライン走査型顕微分光システムに依った。顕微吸収スペクトルは、ハロゲンランプと顕微鏡コンデンサの間に置かれた十一色の単色バンドパスフィルターを自動で回転させて11枚の単色照明明視野像を得て、測定対象細胞の有無による透過率の比から計算した。

【結果】二光子励起顕微蛍光スペクトルでは光化学系IIと光化学系Iからのクロロフィル蛍光、および主に光化学系IIに励起エネルギー供給するフィコビリן色素とタンパク質の複合体(フィコビリゾーム)の蛍光スペクトルが観測された。フィコビリゾームのサブユニット毎に異なる崩壊過程を観測した。近赤外1光子励起では光化学系Iが純度高く検出され、光化学系Iの変化を

これまでにない精度で細胞毎に見積もることに成功した。さらに顕微吸収スペクトルにより細胞毎の色素絶対量の評価も同時に行うことができ、異型細胞でフィコビリゾームの減少が起きるがクロロフィルの吸収スペクトルが残存することが確認できた。

細胞分化誘導後の時間（0時間 – 10日以上）、励起方式（近赤外2光子励起または近赤外1光子励起）、栄養細胞と異型細胞の区別等により様々な顕微蛍光スペクトルが合計1625個得られた。これらを網羅的に解析するため特異値分解を用いてデータ全体を説明するに必要な成分蛍光スペクトルを得た。各成分の時間変化の解析から、「光合成膜が酸素発生型から窒素固定支援型へと変貌するダイナミクスを描写する分子モデル」へと到達することができた。



左は蛍光スペクトルイメージングデータから波長を区切って得た単色蛍光画像、右は単色照明明視野像。F685 は中心波長 685nm の蛍光画像、T680 は透過光の中心波長が 680nm であることを示す。白または黒の矢印の先は異型細胞の位置を示す。左端の時間は窒素欠乏後の経過時間。

左端上の黒いスケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

#### 【参考文献】

(1) \*S. Kumazaki, M. Hasegawa, M. Ghoneim, Y. Shimizu, K. Okamoto, M. Nishiyama, H. Oh-oka and M. Terazima (2007) *J. Microsc.* Vol. 228, 240 – 254.

(1) 熊崎茂一\* 長谷川慎 (2011) 分光研究, vol. 60, No.1, pp19-21

(2) 熊崎茂一 (2011) 生物物理 Vol. 51(6), 274-275

(3) M. Hasegawa, T. Shiina, M. Terazima, and S. Kumazaki,\* (2010) *Plant Cell Physiology*, 51(2), 225 – 238

(4) M. Hasegawa, T. Yoshida, M. Yabuta, M. Terazima and S. Kumazaki\* (2011) *J. Phys. Chem. B*, 115, 4184 – 4194,

<\* = corresponding author>

4A09

光合成励起エネルギー移動における電子量子コヒーレンス

(分子研<sup>1</sup>, UC Berkeley<sup>2</sup>) 石崎 章仁<sup>1</sup>, Graham R. Fleming<sup>2</sup>

Electronic Quantum Coherence in Photosynthetic Excitation Energy Transfer

(IMS<sup>1</sup>, UC Berkeley<sup>2</sup>) Akihito Ishizaki<sup>1</sup>, Graham R. Fleming<sup>2</sup>

Photosynthesis provides the energy source for essentially all living things on Earth, and its functionality has been one of the most fascinating mysteries of life. Photosynthetic conversion of the energy of sunlight into its chemical form suitable for cellular processes involves a variety of physicochemical mechanisms. The conversion starts with the absorption of a photon of sunlight by one of the light-harvesting pigments, followed by transfer of electronic excitation energy to the reaction center, where charge separation is initiated. At low light intensities, surprisingly, the quantum efficiency of the transfer is near unity. A longstanding question in photosynthesis has been the following: *How does light harvesting deliver such high efficiency in the presence of disordered and fluctuating dissipative environments? Why does not energy get lost?* The precise mechanisms of these initial steps of photosynthesis are not yet fully elucidated from the standpoint of molecular science.

Recently, the technique of two-dimensional electronic spectroscopy has been applied to explore photosynthetic light harvesting complexes. The observation of long-lived quantum superposition or coherence between eigenstates of electronic excitations (excitons) in a pigment-protein complex [1] stimulated a huge burst of activity among experimentalists and theorists. Much of the interest arose because the finding of electronic quantum coherence is a “warm, wet, and noisy” biological system was considered very surprising. The initial experiments were carried out at 77 K, but more recent studies by two groups have detected coherence lasting at least 300 fs at physiological temperatures [2,3]. In addition extensive electronic coherence was observed in the most important light harvesting complex on Earth, the light harvesting complex II (LHCII) [4]. These observations have led to the suggestion that electronic quantum coherence might play a role in achieving the remarkable efficiency of photosynthetic light harvesting. At the same time, the observations have raised questions regarding the role of the surrounding protein in protecting the quantum coherence. In order to elucidate origins of the long-lived electronic quantum coherence and its interplay with the protein environment, we have investigated appropriate theoretical frameworks and concepts [5,6].

We begin by describing the electronic states of the pigment-protein complexes (PPCs). Consider a PPC consisting of  $N$  pigments. To describe excitation energy transfer (EET), we restrict the electronic spectra of  $m$ th pigment in a PPC to the ground state  $|\varphi_{mg}\rangle$  and the first excited state  $|\varphi_{me}\rangle$ . When the  $m$ th and  $n$ th pigments are situated in close proximity and the  $m$ th pigment is excited, the excitation energy may be transferred to the  $n$ th pigment. Usually photosynthetic EET in the single excitation manifold composed of  $\{|m\rangle \equiv |\varphi_{me}\rangle \prod_{k(\neq m)} |\varphi_{kg}\rangle\}_{m=1,\dots,N}$  is well described with the following Hamiltonian:

$$H_{\text{PPC}} = \sum_{m=1}^N [H_{me}(\mathbf{x}) + \sum_{k(\neq m)} H_{kg}(\mathbf{x})] |m\rangle\langle m| + \sum_{m,n} \hbar J_{mn} |m\rangle\langle n|. \quad (1)$$

Here,  $H_{ma}(\mathbf{x})$  ( $a = g, e$ ) is the Hamiltonian describing dynamics of the set of the relevant nuclear coordinates including protein degrees of freedom associated with an electronic state



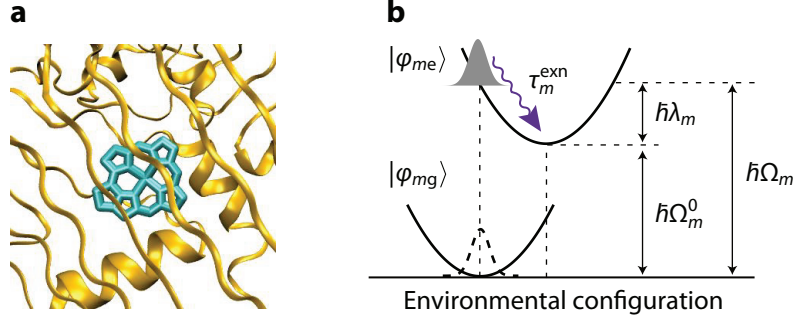


Figure 1: Schematic illustration of the  $m$ th pigment embedded in a protein (a) and the electronic ground and excited states of the  $m$ th pigment,  $|\varphi_{mg}\rangle$  and  $|\varphi_{me}\rangle$ , affected by nuclear motion of the protein environment (b).

$|\varphi_{ma}\rangle$ . We assume that nuclear dependence of the electronic coupling  $J_{mn}$  is vanishingly small as usual. The normal mode treatment is usually assumed for the PPC nuclear dynamics, because anharmonic motion with large amplitudes and slow timescales produces static disorder on timescales irrelevant to photosynthetic EET. Thus,  $H_{ma}(\mathbf{x})$  can be modeled as a set of displaced harmonic oscillators,

$$H_{mg}(\mathbf{x}) = \epsilon_{mg}(\mathbf{x}_{mg}^0) + \sum_{\xi} \frac{\hbar\omega_{m\xi}}{2} (p_{m\xi}^2 + q_{m\xi}^2), \quad (2)$$

$$H_{me}(\mathbf{x}) = H_{mg}(\mathbf{x}) + \hbar\Omega_m - \sum_{\xi} \hbar\omega_{m\xi} d_{m\xi} q_{m\xi}, \quad (3)$$

where  $\mathbf{x}_{mg}^0$  is the equilibrium configuration of the nuclear coordinates associated with the electronic ground state of the  $m$ th pigment, and  $q_{m\xi}$  is the dimensionless normal mode coordinate with accompanying frequency  $\omega_{m\xi}$  and momentum  $p_{m\xi}$ . The Franck-Condon transition energy is given as  $\hbar\Omega_m = \epsilon_{me}(\mathbf{x}_{mg}^0) - \epsilon_{mg}(\mathbf{x}_{mg}^0)$ , and  $d_{m\xi}$  is the dimensionless displacement. After electronic excitation in accordance with the vertical Franck-Condon transition, reorganization (or solvation) takes place from the nuclear configuration  $\mathbf{x}_{mg}^0$  to the actual equilibrium configuration in the excited state  $\mathbf{x}_{me}^0$  with dissipating reorganization energy defined as  $\hbar\lambda_m = \epsilon_{me}(\mathbf{x}_{mg}^0) - \epsilon_{me}(\mathbf{x}_{me}^0)$ . This reorganization proceeds on a finite timescale,  $\tau_m^{\text{rxn}}$  (Fig. 1). Indeed, information on this timescale can be experimentally accessible (in principle) with the help of the dynamic Stokes shift measurement or photon echo peak shift measurement.

In this talk, we show that this finite timescale is significant for explaining experimentally observed long-lived electronic coherence. On the basis of this observation, we would like to examine the following question: *What do we learn about photosynthetic light harvesting from the long-lived electronic coherence?* [7]. In particular, we would like to get some insight into the question of the preceding page regarding how natural photosynthetic light harvesting systems avoid local trapping of electronic excitations, which yields a situation that electronic excitation energy gets lost in the presence of disordered and fluctuating dissipative environments.

**References:** [1] G. S. Engel, *et al.* Nature **446**, 782 (2007). [2] E. Collini, *et al.* Nature **463**, 644 (2010). [3] G. Panitchayangkoon *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **107**, 12766 (2010). [4] T. R. Calhoun *et al.* J. Phys. Chem. B **113**, 16291 (2009). [5] A. Ishizaki, *et al.* Phys. Chem. Chem. Phys. **12**, 7319 (2010). [6] A. Ishizaki & G. R. Fleming, Annu. Rev. Condens. Matter Phys. **3**, 333 (2012). [7] Y.-C. Cheng & A. Ishizaki, J. Chem. Phys. Spotlight Collections. To appear.