

光合成反応中心タンパク質の極低温 1 分子分光

(東工大・理工¹, 阪大・蛋白研², 阪大・理³)

○近藤 徹¹, 武藤 梨沙², 栗栖 源嗣², 大岡 宏造³, 藤芳 暁¹, 松下 道雄¹

Single molecule spectroscopy of photosynthetic reaction center at cryogenic temperature

(1: Dept. Phys., Tokyo Tech., 2: IPR, Osaka Univ., 3: Dept. Biol. Sci., Osaka Univ.)

○Toru Kondo¹, Risa Mutoh², Genji Kurisu², Hirozo Oh-oka³, Satoru Fujiyoshi¹, Michio Matsushita¹

【序】 生体内で生じる電子移動反応は高度に最適化されており非常に効率が高い。その原因として電子移動担体の相対配置や化学ポテンシャルなどの静的な因子が考えられており、実験・理論の両面から研究されてきた。一方で、反応に伴う電子移動担体結合サイトの構造変化など動的な因子の重要性も示唆されている [1]。我々は、生体試料を反応中に急冷して、変化した構造をそのままトラップし、極低温で 1 分子分光を行うことで、補因子の結合サイトの構造変化などを明らかにする。極低温の 1 分子分光は集団平均や熱揺らぎの影響をほとんど受けずに解析でき、これまでにいくつかのタンパク質で色素結合サイトの構造や物性の評価に成功しており [2-4]、今回の系にも適用できると考えている。

本研究の対象は光合成細菌ヘリオバクテリアの反応中心タンパク質 (hRC) である。電子移動担体 A₀ 1 分子のスペクトルを測定し、電子移動反応で誘起される構造変化を調べる。hRC の結晶構造は未同定だが、植物やシアノバクテリアの光化学系 I 型 (PS I) RC と高い相同性を持つ。図 1 に hRC の推定構造を示す。光励起により P800 で電荷分離が生じ、P800 → A₀ → A₁ → F_X → F_A/F_B と電子が移動する。このときの量子収率はほぼ 100 % に達する。hRC は主要色素として Bchl g (吸収: 800 nm) を多く持つが、電子移動担体 A₀ として 2 つの Chl a (吸収: 670 nm) も結合している。吸収波長の違いから Chl a は Bchl g と区別可能であり、電子移動経路のタンパク質構造変化を A₀ のスペクトルから調べられる。A₀ を励起するとエネルギーは高速で red-Bchl g に移動し蛍光放出されるため、A₀ 1 分子の蛍光励起スペクトルを検出する必要がある。そこで可視光領域の波長可変光源と 1 分子分光顕微鏡を作製し、A₀ の励起蛍光スペクトルを測定した。

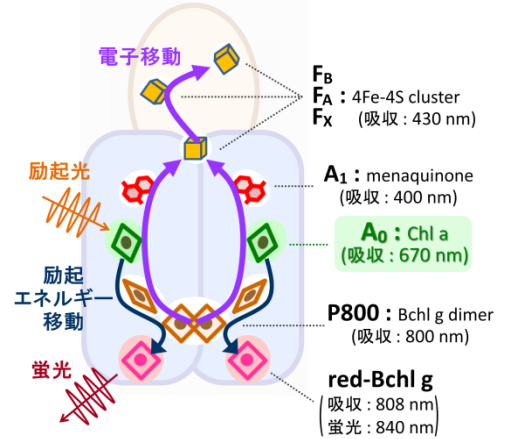


図 1 : 光合成細菌ヘリオバクテリア反応中心タンパク質 (hRC) の推定構造

【実験】 図 2 に作製した光学系を示す。フェムト秒レーザー 750 nm 光を焦点距離 f=2 の非球面単レンズでフォトニック結晶ファイバーにカップルした。広帯域のスーパーコンティニューム (SC) 光が発生するので、f=9 対物レンズでコリメートした。f=-100, 500 レンズペアでビーム直径を 5 倍 (約 17 mm) に拡大し、プリズムで分光した。ビーム径を大きくしたことでプリズムのスペクトル分解能が向上する。プリズムから 400 mm の位置に f=400 レンズを置いてテレセントリックな配置にし、プリズムで分散した光を光軸平行に揃えた。目的の波長の光を f=-50 レンズでコリメートし、f=9 対物レンズでシングルモードファイバー (SMF) にカップルした。電動ステージを走査し 500 - 800 nm の範囲で波長を変え

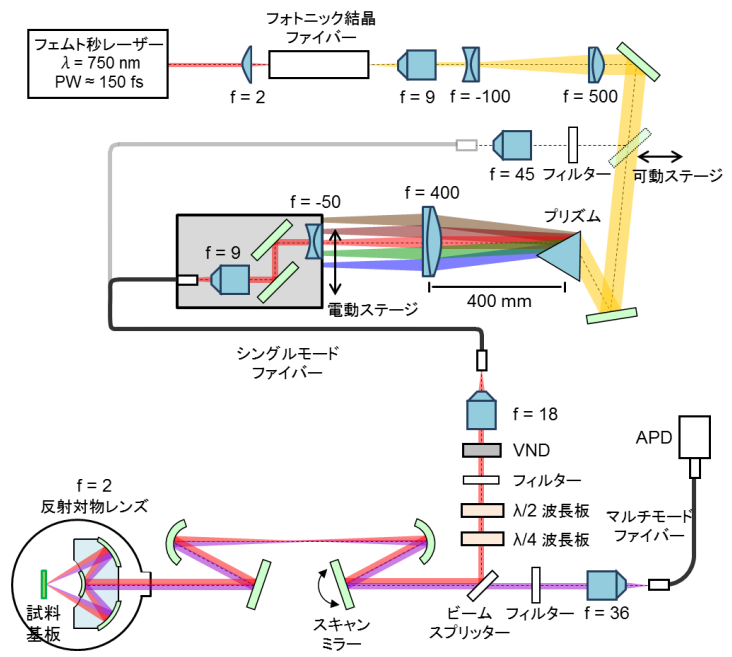


図 2 : 作製した 1 分子分光顕微鏡

られる。ミラー・レンズを配置したベースプレートごと電動ステージで動かすことで、光源出力の安定化を図った。プリズム前にミラーを挿入し SC 光をそのまま出力することもできる。SMF の出力光は 2 枚の波長板で楕円偏光にし、ビームスプリッター・スキャンミラーの順に反射した。2 枚の凹面ミラーを通過後、反射対物レンズで光を集光し試料基板上的 1 分子を励起する。スキャンミラーを動かして反射対物レンズへの光入射角度を走査し、試料基板上的 2D イメージ像を得る。2 枚の凹面ミラーは 4f 光学系を形成しており、入射角度を変えても光は対物レンズ瞳を通過する。独自に開発された反射対物レンズは極低温条件下でも回折限界性能で動作し色収差もない[5]。試料からの蛍光 (800 nm より長波長) は励起光と同光路を逆に進む。ビームスプリッターを透過するので、APD で光子数をカウントした。

hRC 標品は *Heliobacterium modesticaldum* から単離・精製した。buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% poly vinyl alcohol-EG40, 0.22 mM β -DDM, 10 mM ascorbate) で 17.5 pM まで希釈し、CaF₂ 基板にスピコート後、クライオスタット (Optistat SXM, Oxford 社) にセットした。

【結果と考察】 図 3 に SMF から出力された励起光スペクトルを示す。波長は 677 nm 付近に設定した。シャープな励起光を得ることができた。図 4 にクライオスタット直前で測定した励起光強度とスペクトル幅を示す。強度は最大で 24 uW 程度であった。これは試料基板表面で約 1.2 kW/cm²@633 nm に相当し、十分な出力である。スペクトル幅は 1.2 nm 程度であった。

図 5 に 80 K で 785 nm 励起光を用いて測定した 2D 蛍光イメージ像を示す。励起光は SC 光を 785 nm バンドパスフィルター (2 nm 幅) に通すことで得た。楕円偏光なので遷移双極子モーメントの向きに依らず励起する。観測された輝点はそれぞれが 1 hRC に対応する。エアリーディスク半径は 720 nm 程度と見積もられた。これは理論値 667 nm の 1.08 倍であり、回折限界程度の十分な分解能である。

輝点位置に励起光スポットを固定し、励起波長を 640 nm から 750 nm までスキャンし蛍光光子数を測定した。図 6A にスペクトルの時間変化を示す。広い波長範囲にピークが観測された。40 分を境に全てのピークが同時に消えており、1 つの hRC に由来するピークであることを示唆する。図 6B にピーク消滅前後のスペクトルを示す。赤線と青線はそれぞれ図 6A の赤・青矢印で示す時間領域の積算平均スペクトルに対応する。642, 658 nm にシャープなピークが、700-740 nm 範囲にはブロードなピークが見える。Bchl *g* の吸収ピークには 700-740 nm に肩があり、今回観測された 700-740 nm のブロードなピークは 1 hRC に多数結合する Bchl *g* のピークが重なって見えていると考えられる。一方、シャープなピークが観測された 642, 658 nm は Chl *a* の Q_y 吸収帯に近く、hRC の電子移動担体 A₀ 由来であると考えられる。

参考文献

- [1] McMahon B. H., *et al.* (1998) *Biophys. J.*, 74, 2567-2587.
- [2] Oikawa, H., *et al.* (2008) *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 4580-4581.
- [3] Fujiyoshi, S., *et al.* (2011) *Phys. Rev. Lett.*, 106, 078101.
- [4] Baier, J., *et al.* (2009) *Biophys. J.*, 97, 2604-2612.
- [5] Fujiwara, M., *et al.* (2009) *J. Opt. Soc. Am. B*, 26, 1395-1399.

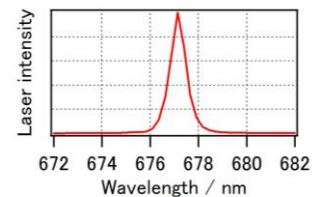


図 3 : 励起光スペクトル。

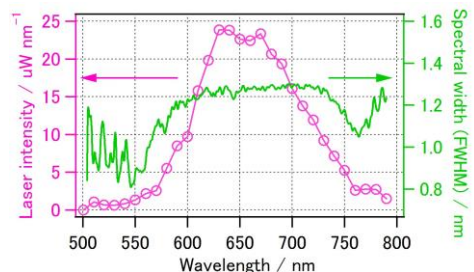


図 4 : 励起光強度 (ピンク) とスペクトル幅 (緑)

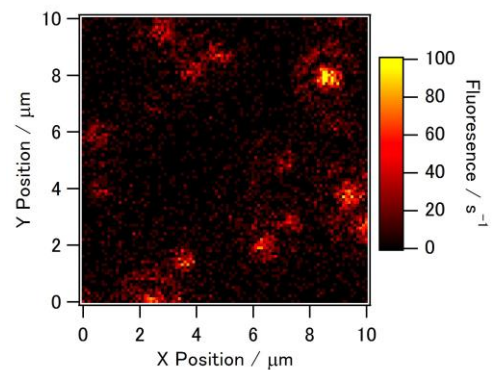


図 5 : 80 K で測定した 2D 蛍光イメージ像。楕円偏光の 785 nm 光 (0.9 kW/cm²) で励起した。

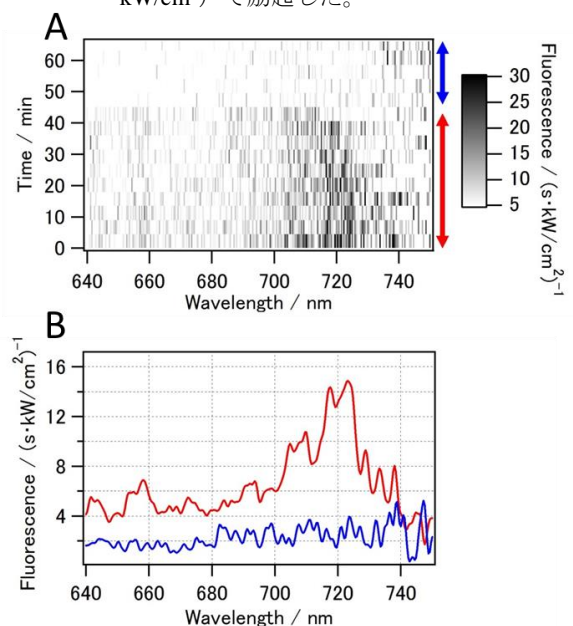


図 6 : 1 hRC の励起蛍光スペクトル。蛍光強度は光強度 1 kW/cm² 当たりの値に規格化した。(A) 時間変化、(B) ピーク消滅前後の積算平均スペクトル。隣接 5 点でスムージングした。