

1 分子レベルでみた光合成反応中心タンパク質の分光特性

(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

Spectroscopic characteristics of photosynthetic reaction center at the single-molecule level

(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】 太陽光の光エネルギーは光合成反応中心 (RC) タンパク質で電気化学エネルギーへと変換される。RC の反応効率は極めて高い。結合分子の相対配置や化学ポテンシャルが最適化されていることがわかっている。一方で、熱揺らぎや反応に伴う局所構造変化など動的因子の重要性も示唆されてきている。理論研究が進む中、実験的なアプローチは難航している。通常行われるモル数程度のタンパク質を対象にしたアンサンブル測定では、局所的な構造変化の情報など不均一幅に埋没してしまい解析できない。そこで RC の 1 分子スペクトル解析を行うことにした。

近年、1 分子スペクトル測定からタンパク質の色素結合サイトの構造や物性が解析されるようになってきた。しかし、ほぼ全てが光合成アンテナ複合体を対象にしたものであり、光エネルギー/電気化学エネルギー変換反応で中心的な役割を果たす RC 電子移動系が 1 分子レベルで解析された例はない。RC は複数の色素が結合する複雑な系であり、電子移動経路に結合する 1 分子だけを分光するのは難しい。そこで本研究では光合成細菌ヘリオバクテリアの RC (hRC) を解析に用いた (図 1)。hRC はバクテリアクロロフィル *g* (Bchl *g*) が 30 分子程度結合する小さなアンテナ系しか持たない。電子移動担体 A_0 としてクロロフィル *a* (Chl *a*) が 2 分子結合し、電子移動やエネルギー移動に関与する。ホモダイマー構造の hRC では 2 つの Chl *a*- A_0 が完全に等価な配置をとる。Chl *a*- A_0 は Bchl *g* と吸収ピーク波長が異なるため選択励起でき、励起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 Chl *a*- A_0 1 分子の蛍光励起スペクトルが測定可能である。一方で、hRC の蛍光量子収率は極めて低く、極低温 (6 K) でも 2 % 以下しかない (図 2)。微弱な蛍光をもとに可視光域の極低温蛍光励起スペクトルを測定する必要がある。そこで、我々のグループで独自開発した極低温用反射型対物レンズ (開口数 0.6) を共焦点顕微鏡に組み込み、新たに開発した波長可変光源と合わせて測定に用いた。RC 内電子移動系で機能する色素の 1 分子スペクトル解析に初めて成功した。

【実験】 hRC 標品は *Heliobacterium modesticaldum* から単離・精製した。F_A/F_B 結合タンパク質 (PshB) は除去されている。buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% poly vinyl alcohol-EG40, 0.2 mM β -DDM, 10 mM ascorbate) で 10 pM 程度に希釈し、CaF₂ 基板にスピンコートした後、クライオスタット (Optistat SXM, Oxford 社) にセットした。hRC は絶対嫌気性なので精製から測定まで全てを脱酸素条件下で行った。蛍光励起スペクトル測定では励起波長スキャンの速度を下げ (1.6 nm/s)、1 点 (0.5 nm 刻み) 当たりの積算時間を長く (0.3 s) した。

【結果と考察】 2D 蛍光イメージを観測して輝点位置を求め、そこで蛍光励起スペクトルを測定した。図 3 に強光励起した際の結果を示

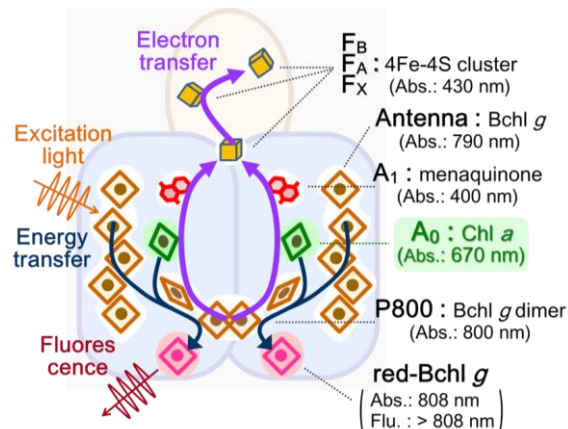


図 1: 光合成細菌ヘリオバクテリア反応中心タンパク質 (hRC) の推定構造

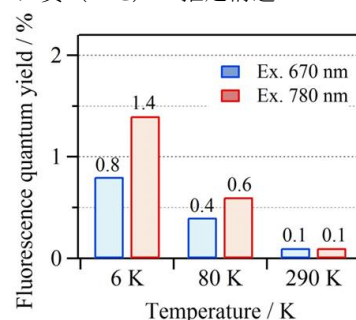


図 2: hRC の蛍光量子収率。670 nm, 780 nm 励起はそれぞれ Chl *a*- A_0 , Bchl *g* 励起に対応する

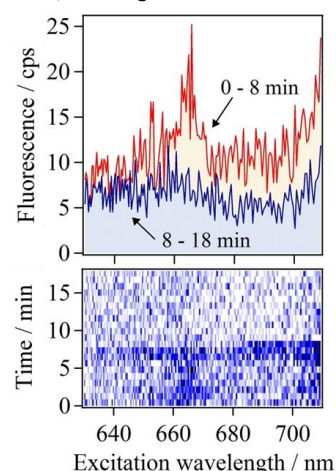


図 3: hRC の蛍光励起スペクトル。強光 (ca. 400 W/cm²) で励起。赤と青のスペクトルはそれぞれ光退色前後を示す。測定温度は 6 K。

す。8 min を境にスペクトルが1ステップで消滅した。1ステップの光退色は単一 hRC が観測できていることを示す。退色後のスペクトル(青)が平らでないのは励起光強度に波長依存性があるためなので、以降のスペクトルは励起光強度で規格化し補正した。

図4は hRC の蛍光励起スペクトルを示す。(a)はアンサンブル hRC、(b-e)は単一 hRC から得た。(a)のピーク1と2はそれぞれ Chl *a*-A₀ と Bchl *g* に対応する。単一 hRC スペクトル(b)にも同様の位置にピーク3と4が観測された。これらのピークを同定するため飽和特性を調べた(図5)。ピーク1(Chl *a*-A₀)とピーク2(Bchl *g*)は異なる特性を示した。同様に単一 hRC のピーク3と4も異なる特性を示し、ピーク3は Chl *a*-A₀ と似ていた。これより、670 nm 付近に観測されるピークは Chl *a*-A₀ 由来と結論した。

単一 hRC スペクトル(c)では 670 nm 付近に2つのピーク5と6が観測された。そこで励起偏光依存性を測定し比較した(図6)。ピーク5と6で異なる偏光依存性を示した。この結果から、670 nm 付近に観測される2つのピークは hRC に結合する2つの別々の Chl *a*-A₀ に由来すると結論した。1つの hRC 内で全く等価な配置をとる2つの Chl *a*-A₀ でも異なるピーク波長・線形を示し、局所構造が異なる。スペクトル(e)のように、Chl *a*-A₀ の遷移双極子の向きによっては2つのピークが観測されない場合もあった。また、スペクトル(e)のようにピークが2つ以上観測される場合もあり、ピークシフトが生じている可能性が考えられた。

図7は11個の単一 hRC で観測された Chl *a*-A₀ ピークの波長分布を示す。アンサンブルスペクトルの Chl *a*-A₀ ピークを再現するピーク波長分布が得られた。670 nm 付近に観測されたピークが Chl *a*-A₀ 由来であることを裏付ける結果である。

以上のように hRC 内電子移動系の1分子解析が可能となった。完全に対称的なホモダイマー構造の hRC も局所的には不均一であり、2つの Chl *a*-A₀ ピークを区別できる。それを利用し Chl *a*-A₀ 1分子の選択励起も可能である。図8は、Chl *a*-A₀ 1分子のピーク(図中矢印で示す。図4cのピーク5と同じもの。)を長時間励起して光退色させた際のスペクトル変化を示す。光照射から150 s で光退色した(挿入図)。光退色後は励起していた Chl *a*-A₀ のピークが消滅し、Bchl *g* ピークを含めた全体の強度が1/3に減少した。hRC に部分的な負荷が加わった結果である。このようにエネルギー移動経路を個別に解析することが可能である。また、Chl *a*-A₀ 1分子をプローブとして hRC 内の2つの電子移動経路を個別に解析することもできる。

常温ではサブナノ秒スケールで常に構造が揺らいでおり、太陽光条件下で生じる RC の光子吸収間隔よりもずっと短時間で構造は変化する。エネルギー移動や電子移動が毎回若干ずつ異なる構造で生じていることが予想される。これらの局所的な構造変化と機能の相関関係の解明に向けて今後大きく前進できる。

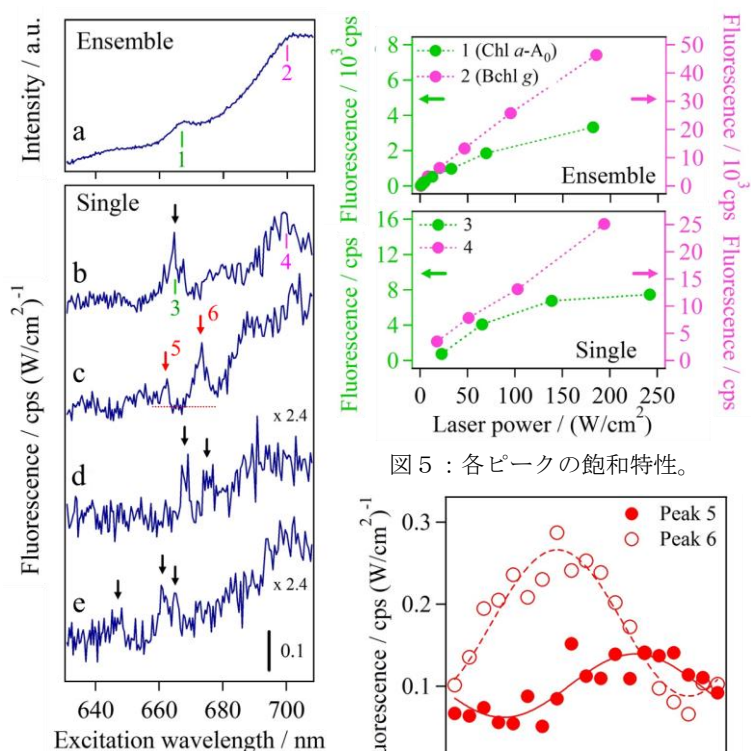


図4：hRC の蛍光励起スペクトル。(a) アンサンブル hRC、(b) 単一 hRC。測定温度は 6 K。励起光強度は ca. 50 W/cm²。

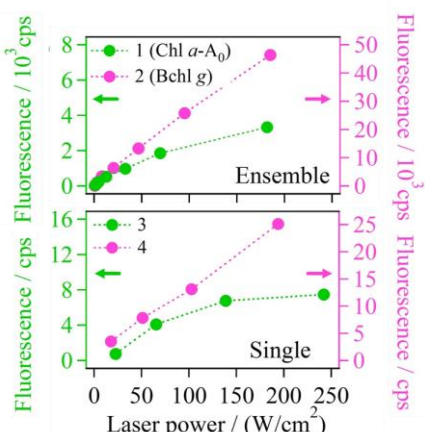


図5：各ピークの飽和特性。

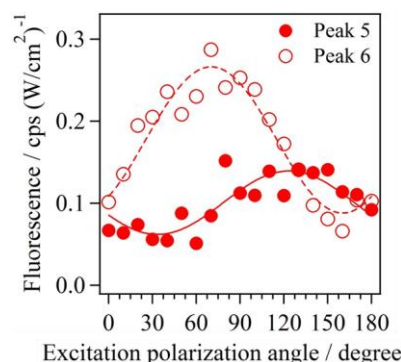


図6：各ピークの励起偏光依存。ピーク強度は図4c中の赤点線をゼロ点として求めた。

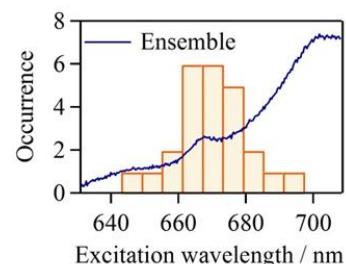


図7：単一 Chl *a*-A₀ 分子のピーク波長分布

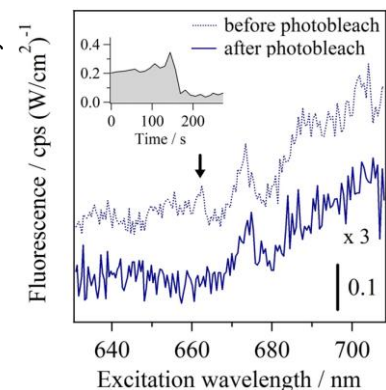


図8：単一 hRC の部分的な光退色。挿入図は矢印位置で励起しながら測定した蛍光強度の時間変化。光退色後のスペクトル(実線)は強度を3倍にして表示した。