4D09

光化学系Ｉタンパク質複合体の単一分子蛍光分光

[1]東北大院理，[2]岡山大異分野基礎研，[3]名大院理
○柴田 穣[1]，小林 誉宗[1]，杜 婷[1]，ジャナ サンカー[1]，長尾 遼[2]，野口 巧[3]

Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy of Photosystem I Complex

○Yutaka Shibata[1], Takanori Kobayashi[1], Ting Du[1], Sankar Jana[1], Ryo Nagao[2], Takumi Noguchi[3]
[1] *Department of Chemistry, Tohoku University, Japan*
[2] *Research Institute for Interdisciplinary Science, Okayama University, Japan*
[3] *Division of Material Science (Physics), Nagoya University, Japan*

【Abstract】 We have studied the fluorescence blinking of a photosynthetic reaction-center protein, photosystem I (PS I), by using the single-molecule spectroscopy. Each PS I binds ca. 100 chlorophyll (Chl) molecules. Since it is quite unlikely to suppose that the 100 Chl molecules bound to a single PS I turn into the dark state at the same time, we interpret the blinking to be induced by the fluctuation in the energy-transfer pathway within the complex. A slight change in the excitation energy modifies the overall energy-transfer pathway within the complex, and then modulates the efficiency of the excitation-energy flow to the emitting pigments. To verify this scenario, we have extend the capability of the homebuilt cryogenic microscope so that we can conduct measurements of fluorescence excitation spectra of single PS I. We could measure the fluorescence excitation spectra of single PS I trimers for the first time with the developed system.

【序】 光化学系 I（photosystem I; PS I）は，酸素発生型の光合成において働く二つの光化学系のうちの 1 つである。我々はこれまで，PS I の極低温単一分子蛍光分光の研究を行い，80 K ほどの極低温において単一 PS I 三量体からの蛍光強度が明滅するブリンキングが見られることを見出してきた[1]。PS I には，1 つの反応中心あたり約 100 分子のクロロフィル（Chl）をアンテナとして結合しており，三量体の結合色素数は約 300 となる。これらの Chl のうち，励起エネルギーが通常の Chl よりも有意に低い Red Chl と呼ばれるものが 10%弱含まれており，低温では Red Chl へ励起エネルギーが流れてそこから 730 nm 付近の長波長にシフトした蛍光が発せられる（Fig. 1）[2]。我々は，このような巨大な系におけるブリンキングを説明するため，アンテナ Chl のわずかな励起エネルギーの揺らぎによって複合体内部のエネルギー移動経路が変化して Red Chl へ流れ込む励起エネルギー量が変化することで，明状態と暗状態の間のスイッチングが起こるというモデルを考えてきた。このモデルの

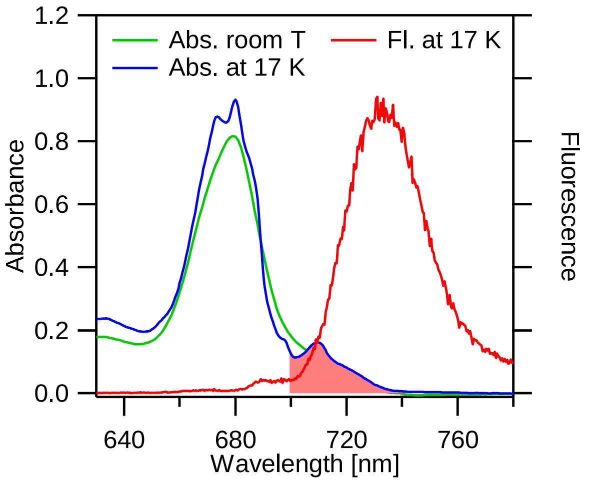

Fig. 1. Absorption and emission spectra of PS I.

検証のためには, Red Chl 以外の Chl の吸収ピークの揺らぎを検出する必要がある。こうした測定を実現するため，我々は励起レーザー波長を掃引して単一 PS I の励起スペクトル測定を行うことを可能とするシステムを開発した。

【方法（実験・理論)】 *Synechosystis* PCC6803 から単離した PS I を, 0.02% ドデシルマルトシドを界面活性剤として含む pH7.5, 20 mM の Tricine 緩衝溶液で 20 pM となるまで希釈し，サンプルとした。単一分子分光は，当研究室で開発してきた極低温顕微鏡を用いた。真空対応の対物レンズ（NA0.9, ×100, Mitutoyo）をクライオスタットの断熱真空槽に設置することで，対物レンズとサンプルとの距離を可能な限り短縮して，極低温においても空間分解能，集光効率ともに高く維持した測定が可能となっている。励起光には，フェムト秒 Ti:S レーザー（MAITAI, Spectra Physics）からのパルスをフォトニック結晶ファイバに入射して得られる白色光を用いた。プリズムで分光した後にピンホールを通すことで，単色光を得ている。波長掃引は，プリズム直後の鏡の角度を掃引することで行った。本装置により，波長分解能約 1～2 nm が実現している。リファレンスサンプルとしてナイルブルーを用い，市販の蛍光光度計（F4500, Hitachi）を用いて測定した励起スペクトルと，極低温顕微鏡を用いて測定した励起スペクトルとの比を取ることで，補正因子を求めた。

【結果・考察】 開発した極低温顕微鏡を用いて，世界で初めて単一 PS I の蛍光励起スペクトルを取得することに成功した。Fig. 2 に，いくつかの単一 PS I 三量体について測定した励起スペクトルを示す。Inset は，レーザー走査により取得した，ある一つの PS I 三量体の蛍光像を示す。単一 PS I の励起スペクトルは，蛍光像測定後に検出された輝点の中心にレーザーを移動し，そこで励起波長を掃引しながら蛍光スペクトルを測定することで得た。Fig. 2 に示した励起スペクトルはまだ preliminary なデータではあるが, Fig. 1 で示した 17 K の吸収スペクトルで期待される位置にピークを持つ励起スペクトルとなっている。実験で用いたサンプルでは, PS I 分子はランダム配向している。そのため，蛍光を発する Red Chl の遷移双極子モーメントが光軸方向に垂直に近い分子からの蛍光は強く検出されるはずである。Fig. 2 に見られる強度のバラつきは，各分子の配向の違いを反映している可能性がある。また，各分子で異なる位置にスペクトルのピークが見られ，Chl 周囲のタンパク質環境の不均一性を反映したバラつきが観測されている可能性もある。講演では, Blinking と励起スペクトルの揺らぎについて議論する。

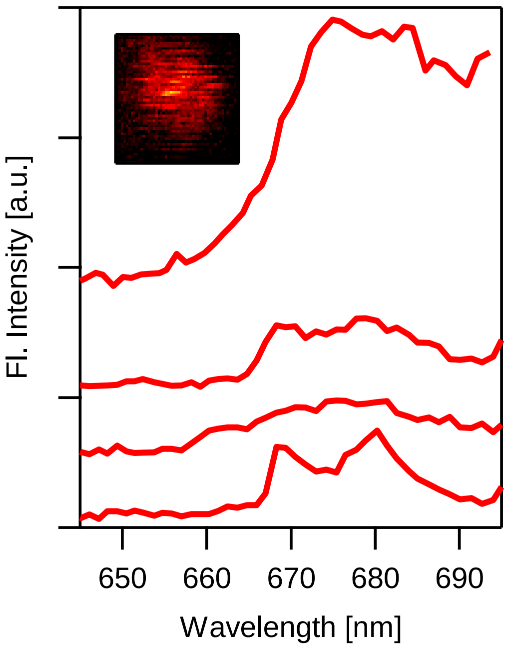

Fig. 2. Examples of fluorescence excitation spectra of single PS I trimers. Inset shows a typical fluorescence image of a single PS I.

【参考文献】

[1] Y. Shibata *et al*., *Biochim. Biophys. Acta* **1837**, 880 (2014).

[2] Y. Shibata *et al*., *J. Phys. Chem. B* **114**, 2954 (2010).