

紅色光合成細菌 *Blastochloris viridis* から調製した

光合成膜のフェムト秒時間分解吸収分光

若竹伸幸、下中奨三、陳 岐岱、藤井律子、杉崎 満、橋本秀樹
(大阪市立大学大学院理学研究科)

概要

光合成細菌 *Blastochloris viridis* には生合成経路に依存した共役二重結合数 9,11,12 を持つ5種類のカロテノイド(Car)[1,2-ジヒドロヌロスポレン (共役二重結合数 $n = 9$, 含有率 72%) ; 1,2-ジヒドロリコペン ($n = 11$, 17%) ; 1,2-ジヒドロ-3,4-デヒドロリコペン ($n=12$, 5%) ; ヌロスポレン ($n = 9$, 3%) ; リコペン ($n = 11$, 1%)]が結合している。有機溶媒に溶かしたcarotenoidと *Blastochloris viridis* の光合成膜に結合したカロテノイドのフェムト秒時間分解吸収スペクトル測定の結果から、以下の3つの結論を得た。①481nm励起の時の $n=9$ 及び $n=11$ のCarからバクテリオクロフィルb(Bchl_b)へのエネルギー伝達効率をそれぞれ 38.0%及び 56.7%と決定した。② $n=9$ のCarからBchlへのエネルギー伝達は $S_1 \rightarrow Q_y$ が主な経路で、 $n=11$ の場合は $S_2 \rightarrow Q_x$ が主な経路である。③ $n=11$ のCarで $S_2 \rightarrow Q_x$ 経路でのエネルギー伝達効率は、481nmで励起した方が 523nm励起した時よりも高かった。

1. はじめに

紅色光合成細菌の光合成系は、光合成膜中で励起エネルギーを周辺アンテナ複合体(LH2) → コアアンテナ複合体(LH1) → 反応中心(RC)へと伝播することで生理機能を発現している。励起エネルギーを伝播するために重要な役割を担っているのがカロテノイド(Car)とバクテリオクロフィル(Bchl)である。

Bchl-a を含む LH2 においてさまざまな菌体での Car → Bchl へのエネルギー伝達過程について研究されており、Car の共役二重結合数が異なるとエネルギー伝達効率が異なってくるという報告がなされている。

我々は、*Blastochloris viridis* という菌体

を用いて、エネルギー移動過程の詳細を明らかにすることを試みた。この菌体は RC-LH1 コア複合体のみを有しており、5種類のカロテノイド(Car)と Bchl_b を結合していることが特徴である。励起波長を変えてフェムト秒時間分解吸収分光測定を行うことにより、複雑な Car 組成を持つ系における Car → Bchl への励起エネルギー移動機構の詳細を明らかにできると考えた。

2. 試料と実験方法

①lycopene($n=11$ の Car)は、カゴメ株式会社製品のトマトピューレから抽出した。
② neurosporene($n=11$ の Car) は *Rhodobacter sphaeroides* G1C から抽出し

た。③*Blastochloris viridis* の光合成膜は、菌体を 20mMTris-HCl pH8.0(THB)に分散し、French Press(100MPa)で菌体を破碎した後、遠心分離(12000×g,20min, 4℃)を行った上澄み液を分割し、糖密度勾配(15/40/45/50%,257420×g,4℃)で分画し、45%層に得られた band を光合成膜試料とした。

Blastochloris viridis に含まれる Car の組成割合を求めるために、菌体 1g を 20mMTHB20ml に溶かしホモジナイズした後、卓上遠心器で 30 秒回し上澄み液を除き、アセトン/メタノール(7/2)混合液を加え攪拌した。さらに石油エーテルと飽和食塩水を加え攪拌後、卓上遠心器で分離した。HPLC の展開溶媒に置換した後、分析を行った。展開溶媒は 0.5% N,N-Diisopropylethyamine を含むヘキサンで、カラムは Lichrosorb Si-60 を用いた。

フェムト秒時間分解吸収分光測定では、フェムト秒再生増幅装置から出力されるパルス幅が約 100fs で中心波長 800nm のレーザー光を用いた。光を 2 つに分離し、一方を Optical Parametric Amplifier に通して 480nm~525nm の光に変換して、pump 光として用い、他方をサファイア板に入射することで白色光を出力し、これを probe 光とした。Pump 光をステージ上のミラーを通すことによって、pump 光と probe 光の到達時間差を制御した。吸光度変化は分光器(SpectraPro-300i)と CCD カメラを用いて測定を行った。

3. 実験結果と考察

図 1 は *Blc.viridis* 光合成膜と neurosporene,lycopene の吸収スペクト

ルである。*Blc.viridis* 光合成膜に結合した Car と溶媒中での Car の吸収スペクトルが一致するように同様の誘電率を持つベンゼンを溶媒として用いた。

図 2 は、フェムト秒時間分解吸収スペクトルの結果である。図 2 (a)と(b)でフリーな Carの結果を示している。 $S_1 \rightarrow S_n$ 吸収のピークに着目してフィッティングを行い、時定数をそれぞれの Car 吸収の領域で決定した。Neurosporene の立ち上がり時定数は $(0.49\text{ps})^{-1}$ で、減衰の時定数は $(24.5\text{ps})^{-1}$ と決定した。Lycopene の立ち上がり時定数は $(0.30\text{ps})^{-1}$ で、減衰時定数は、 $(4.67\text{ps})^{-1}$ と決定した。

図 2 (c)と(d)は *Blc.viridis* 光合成膜の時間分解吸収スペクトルであり、励起波長をそれぞれ 523nm 及び 481nm で実験を行った結果を示している。*Blc.viridis* には 5 種類の Car (共役 2 重結合数がそれぞれ $n=9, n=11, n=12$) を含んでいるため、励起波長を変えることによって選択的に特定の共役鎖長を持つ Car を励起することができる。523nm 励起の場合の $S_1 \rightarrow S_n$ 吸収に着

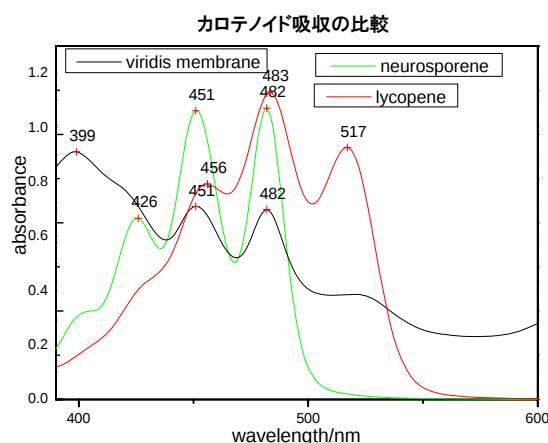


図 1 *Blc.viridis* の光合成膜の吸収スペクトルとベンゼン溶媒中での neurosporene と lycopene の吸収スペクトル

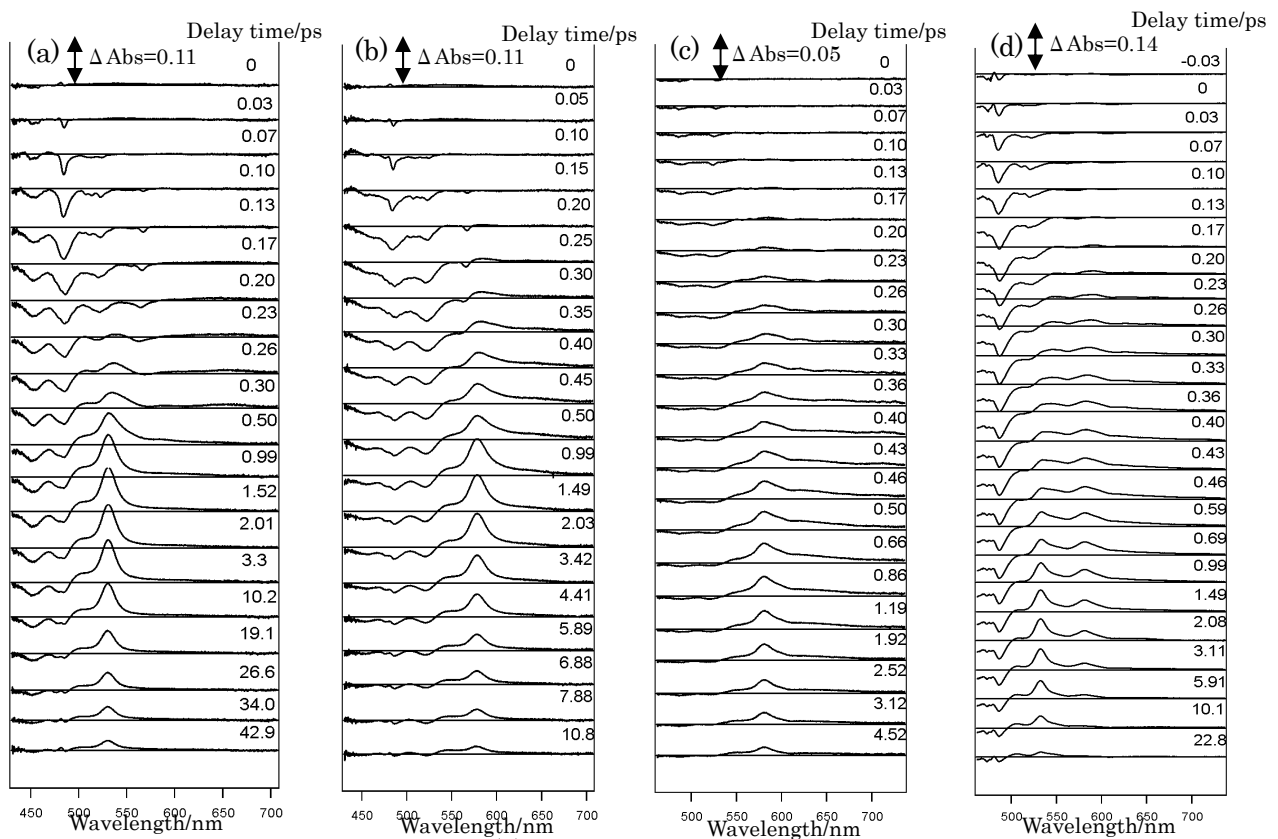


図2 時間分解吸収スペクトルで、(a)はベンゼン中の neurosporene で 481nm 励起したもの、(b)はベンゼン中の lycopene で 481nm 励起したもの、(c)は *Blc.viridis* の光合成膜で 523nm 励起したもの、(d)は *Blc.viridis* の光合成膜で 481nm 励起したもの

目した結果、立ち上がり時定数は $(0.19\text{ps})^{-1}$ 減衰時定数は $(3.94\text{ps})^{-1}$ と決定した。図2(d)では $n=9$ 及び $n=11$ の2つのCarの成分の $S_1 \rightarrow S_n$ 吸収が現れたので、それぞれについての時定数を決定した。 $n=9$ のCarの $S_1 \rightarrow S_n$ 吸収立ち上がり時定数は $(0.46\text{ps})^{-1}$ 、減衰時定数は $(16.2\text{ps})^{-1}$ 、 $n=11$ のCarの立ち上がり時定数は $(0.15\text{ps})^{-1}$ 、減衰時定数は $(4.28\text{ps})^{-1}$ と決定した。

Car $\rightarrow$ Bchlのエネルギー移動を説明するためのモデルを図3のように構築した。このモデルから、Car $\rightarrow$ Bchlへのエネルギー伝達時定数 τ_{ET} は、溶媒中でのCarの時定数 τ_{sol} と *viridis* 光合成膜での時定数 τ から以下のように導出することができる

$$1 / \tau_{ET} = 1 / \tau - 1 / \tau_{sol}$$

この式を用いて、それぞれのpathの時定数を求め、Car $\rightarrow$ Bchlへのエネルギー伝達効率を求めた。523nm励起と481nm励起した時のそれぞれのpathのエネルギー伝達効率を表1に示す。 $\Phi_{2x}, \Phi_{1y}, \Phi_{2x'}, \Phi_{1y'}$ はそれぞれ $n=9$ のCarの $S_2 \rightarrow Qx$ 、 $n=9$ のCarの $S_1 \rightarrow Qy$ 、 $n=11$ のCarの $S_2 \rightarrow Qx$ 、 $n=11$ のCarの $S_1 \rightarrow Qy$ へのエネルギー伝達効率であり、 $\eta_{n=9}, \eta_{n=11}$ は $n=9$ のCar、 $n=11$ のCarからBchlへのエネルギー移動効率を表したものである。

481nm励起において、4つのCar $\rightarrow$ Bchlエネルギー伝達pathの中で Φ_{1y} と $\Phi_{2x'}$ の値が大きい値であることが分かる。これから、Car $\rightarrow$ Bchlへのエネルギー移動は主に $n=9$ のCarの $S_2 \rightarrow Qx$ と $n=11$ のCarの $S_1 \rightarrow Qy$ のpathが支配的であると結論される。

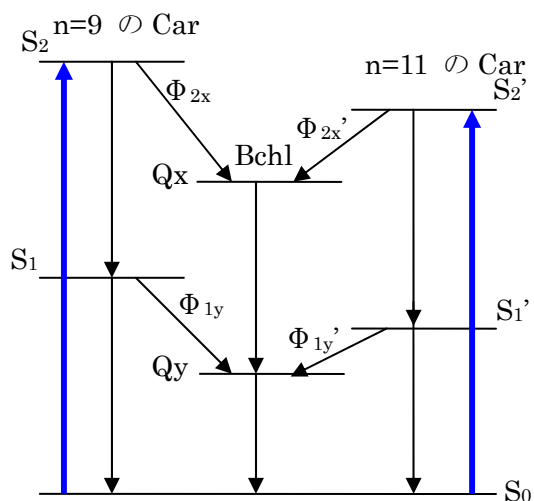


図3 *Blc.viridis* の光合成膜のエネルギー準位モデル

	励起波長	
	481nm	523nm
$\Phi_{2x}(\%)$	6.13	
$\Phi_{1y}(\%)$	33.9	
$\Phi_{2x'}(\%)$	53.6	38.8
$\Phi_{1y'}(\%)$	6.64	10.5
$\eta_{n=9}(\%)$	38.0	
$\eta_{n=11}(\%)$	56.7	45.2

表1 それぞれの path におけるエネルギー移動効率と各 Car でのトータルエネルギー伝達効率

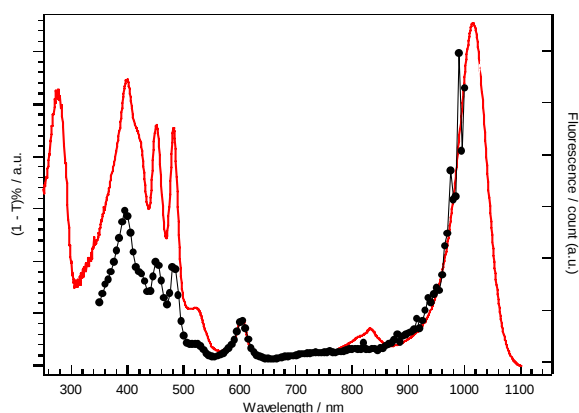


図4 *Blc.viridis* RC-LH1 コアの吸収率と蛍光励起スペクトル

$n=11$ の Car の $S_2 \rightarrow Q_x$ の path に注目して、481nm 励起と 523nm 励起の結果を比較すると 481nm 励起の方がエネルギー伝達効率が高いことが分かる。これは、 $n=11$ の Car は 481nm 励起だと S_2 の高次の振動励起状態へと励起されるので、振動励起状態と振動基底状態からのエネルギー移動が生じているためであると示唆される。

図4は、*Blc.viridis* RC-LH1 コアの吸収率と蛍光励起スペクトルである。 Q_x でノーマライズすると、Car のみを考慮した吸収率と蛍光励起スペクトルの重なりが 42.8% であった。フェムト秒時間分解吸収分光測定からの各 Car のエネルギー移動効率と *Blc.viridis* に含まれている Car の含有量から 481nm 励起におけるエネルギー移動効率は 40.8% であり両者の値は一致することが分かった。

4.参考文献

- [1] R.J.Cogdell, et al., J.Bacteriol. **181**, 3869 (1999)
- [2] D.Polli, et al., Biophys. J **90**, 2486 (2006)
- [3] D.Polli, et al., Synthetic. Metal **139** 893 (2003)
- [4] R.Fujii, et al., Chem. Phys. Lett **369** 165 (2003)
- [5] J.P.Ahang, et al., J.Mole.Struc **598** 65 (2001)
- [6] Ferdy.S.Rondonuwu, et al., Chem. Phys. Lett **390** 314 (2004)
- [7] J.P.Zhang, et al., Chem. Phys. Lett **331** 154 (2000)
- [8] J.P.Zhang, et al., Chem. Phys. Lett **340** 484 (2001)
- [9] A.Damjanovic, et al., Phys. Rev. E **59** 3293 (1999)
- [10] J.P.Zhang, et al., J. Phys. Chem. B **104** 3683 (2000)