

シアノバクテリア由来光合成超複合体における エネルギー伝達過程

廣田悠真^A、藤本将吾^B、川上恵典^C、神谷信夫^C、小澄大輔^D

熊本大学理学部^A、熊本大学自然科学研究科^B、大阪市立大学複合先端研究機構^C、
熊本大学パルスパワー科学研究所^D

Y. Hirota^A, S. Fujimoto^B, K. Kawakami^C, N. Kamiya^C, and D. Kosumi^D

Department of Physics, Faculty of Science, Kumamoto University^A

Department of Science, Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University^B

Advanced Research Institute for Natural Science and Technology, Osaka City University^C

Institute of Pulsed Power Science, Kumamoto University^D

Natural photosynthetic apparatus efficiently capture light and convert it to chemical energy. In a primary process of photosynthesis, light-harvesting pigment-protein complexes absorb energy in the blue-green region of the spectrum. The energy is transferred to a reaction center where a charge separation takes place to convert light energy to chemical potential. The light-harvesting antenna complex from cyanobacteria is called as phycobilisome, which is a megacomplex composed of many pigment-protein complexes. In this study, we investigated energy transfer dynamics among the pigment-protein complexes in the phycobilisome from cyanobacteria by picosecond time-resolved fluorescence spectroscopy.

1. はじめに 光合成を行う生物は、光エネルギーを利用して電子源となる物質を分解することで、有機物の合成に必要な化学エネルギーを創出する。陸上植物、藻類、一部の細菌類は電子源として水を利用し、水の分解による電子・プロトンといった化学エネルギーの獲得と同時に、その副産物として地球上の多くの生物に必要な酸素を排出する。

光合成初期過程では、アンテナタンパク質に結合する色素分子が光エネルギーを吸収し、そのエネルギーを超高速かつ高効率に反応中心へ伝達する。酸素発生型光合成の原始的生物として知られるシアノバクテリアは、巨大なアンテナ色素タンパク複合体としてフィコビリソーム (PBS)を持つ。PBSは、多数の色素タンパク複合体がリンカータンパク質により相互作用することで、扇状の巨大超複合体 (分子量: ~1MDa)を形成する^{1,2}。

PBSを構成する色素タンパク複合体として、最外側にフィコエリスリン (PE)、その内側にフィコシアニン (PC)がロッド状に結合し、最内側にコアであるアロフィコシアニン (APC)が結合する。生体膜中において、PBSのコア部分であるAPCは、タンパク質間の相互作用により、光・化学エネルギー変換を

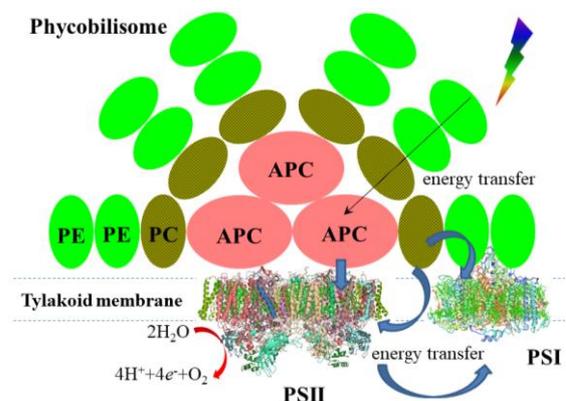


図 1: シアノバクテリアにおけるフィコビリソーム (PBS)、光化学系 I, II (PSI, II)超複合体の原理図。

行う反応中心を持つ光化学系 II (PSII) と結合する (図 1)。PBS を構成する各色素タンパク複合体は、500~600 nm の光を吸収するフィコビル色素を持ち、それぞれのタンパク質と色素分子の相互作用の違いから吸収波長が異なり、PE: 570 nm、PC: 620 nm、APC: 650 nm と外側から内側へ吸収エネルギーが低エネルギー化している。また、PSII は主な色素としてクロロフィル *a* を持ち、670 nm 付近に吸収帯を持つ。このためシアノバクテリアでは、PBS が吸収した光エネルギーを PE→PC→APC→PSII のように伝達すると考えられている³。

これまでの PBS に関しては、細胞を用いた研究では各色素タンパク複合体間のエネルギー伝達が報告されている⁴。また、PBS を構成する色素タンパク複合体又はそのサブユニットレベルでは、詳細な構造⁵及び色素分子間の量子コヒーレンス^{6,7}が報告されている。しかしながら、PBS 超複合体をチラコイド膜から完全な状態で精製することが困難なことから、超複合体レベルでの研究は進んでいない。本研究では、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* から PBS 超複合体を精製し、そのエネルギー

伝達ダイナミクスをピコ秒時間分解蛍光分光で観測した。

2. 実験

2.1 試料調製 (1) 好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* を細胞破壊し、得られたチラコイド膜を洗浄することで PBS を分離した。(2) 分離した PBS を遠心分離し、上澄み部分を限外濾過フィルターで洗浄したものを回収した (図 2(A))。(3) (1) において、PBS を除去したチラコイド膜を可溶化・遠心分離し、トレハロース密度勾配によって精製を行った (図 2(B))。

2.2 時間分解分光測定 本研究では、PBS におけるエネルギー伝達過程を調べるため、時間相関単一光子計数法 (TCSPC) を用いた蛍光寿命測定を行った。光源には、チタンサファイア再生増幅器 (Spitfire Pro, Spectra-Physics: 1 kHz, 100 fs) からの出力光を光パラメトリック増幅器 (TOPAS-C, Spectra-Physics) で波長変換したものを利用した。光源から出た光パルスは試料前で 2 分割し、片方を高速フォトダイオードで検出することで参照信号とし、もう片方は試料に照射した。試料からの発光は分光器を通したのちシングルフォトンアバランシェダイオード (PD-050-CTD, MPD) で検出した。参照信号と発光信号は TCSPC モジュール (SPC-130EM, Becker&Hickel) で受信し、各遅延時間の光子数ヒストグラムを計測することで、減衰曲線を得た。

3. 結果と考察 図 2(C) に、本研究で精製した 2 つの試料の定常吸収スペクトルを示す。図 2(A) を抽出した試料のスペクトルは、PE、PC 色素タンパク複合体による吸収を含み、中でも PC の吸収寄与が大きいことから、PC

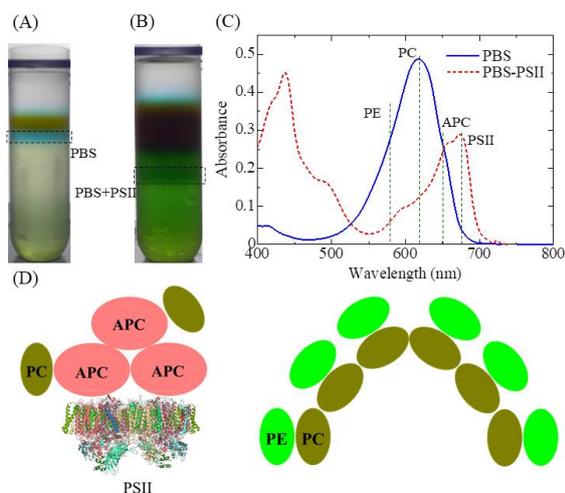


図 2: 生化学調製により得られた(A) PBS 及び (B) PBS-PSII。(C) 精製した PBS (実線) と PBS-PSII (破線) の定常吸収スペクトル。(D) 本研究で得られた PBS 及び PBS-PSII の概略図。

リッチな試料であることが示される。図 2(B) を抽出した試料のスペクトルは、APC と PSII による吸収が観測された。これらの定常吸収スペクトルより、精製された超複合体は、図 2(D) のような PE-PC 及び APC-PSII の会合状態をとっていることが予測される。PBS を構成する色素タンパク複合体 (PE, PC, APC) は、リンカータンパク質を介した弱い相互作用により、比較的弱く結合しているものの、APC と PSII は比較的タンパク質同士が強く相互作用していることが報告されている⁸。このため、本研究における生化学調製では、PE-PC 超複合体 (PBS と表記する) 及び APC-PSII 超複合体 (PBS-PSII と表記する) が得られている。

図 3(A) に、励起波長 570 nm で PE を選択励起し、検出波長 650 nm で PC による蛍光を検出した時の減衰曲線を示す。得られた蛍

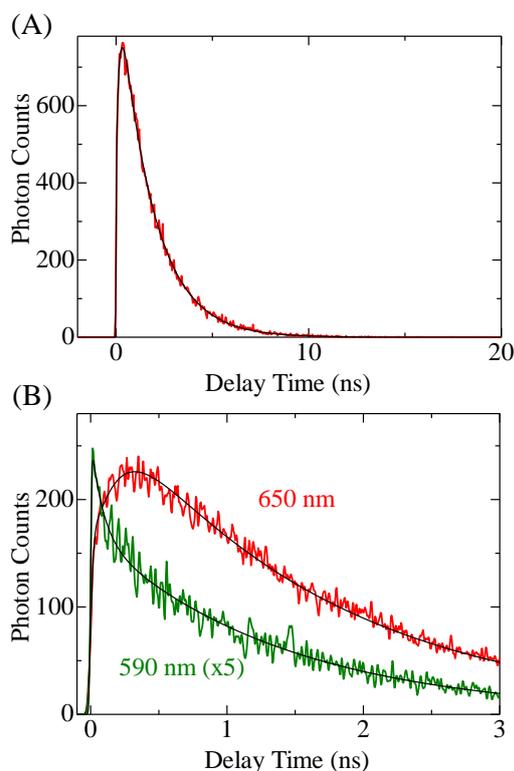


図 3: TCSPC により測定された励起光波長を 580 nm としたときの PBS の蛍光減衰。(A) 測定時間領域を 50 ns、検出波長 650 nm した場合の蛍光減衰。(B) 測定時間領域を 3 ns として観測した検出波長 590, 650 nm における蛍光の時間変化の比較。

光減衰に対し、指数関数による立ち上がり・減衰とガウス関数を仮定した装置関数を畳み込んだ関数でフィッティングを行った。その結果から、立ち上がりが 90 ps、減衰が 1.75 ns であることが求められた。図 3(B) に、同様の実験で検出波長を 590 nm と 650 nm とし、それらの蛍光減衰を比較したものを示す。650 nm で検出される蛍光信号は、PC からの寄与がほとんどであるのに対し、590 nm で検出される蛍光は、PE と PC からの寄与が含まれる。590 nm で観測された蛍光の時間変化を解析したところ、蛍光信号は光励起に伴い瞬時に立ち上がり、その減衰は速い成分 (90 ps) と遅い成分 (1.75 ns) の 2 成分が観測された。遅い減衰成分である 1.75 ns の時定数は、650 nm で観測された減衰成分と一致していることから、PC の寿命であると同定される。また、590 nm で観測された速い減衰成分 90 ps は、650 nm で観測された立ち上がりと一致する。このことから、90 ps の時定数を持つ成分は、PE から PC への励起エネルギー移動を表していると考えられる。タンパク質に結合した状態のフィコビリן色素の蛍光寿命は 1~2 ns なので、PE→PC エネルギー移動は 100% の効率で起こっていると考えられる。

図 4 に PBS-PSII 超複合体における蛍光時

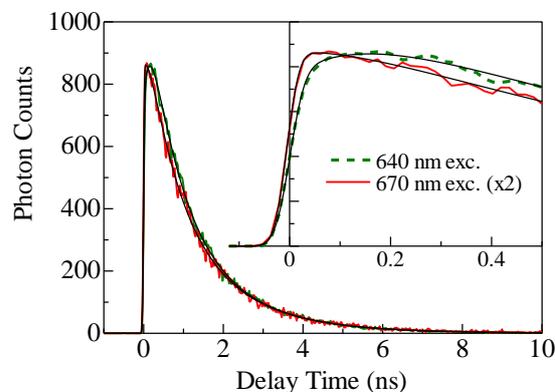


図 4: PBS-PSII 超複合体における蛍光の時間依存性。励起波長は、640 nm (実線) 又は 670 nm (破線)。検出波長は 690 nm。内挿図は速い時間領域を拡大したもの。

間変化を示す。検出波長は 690 nm とし、PSII の寄与が主に含まれる蛍光信号を検出した。励起波長は、640 nm と 670 nm にすることで、APC 又は PSII の選択励起を行った。いずれの励起波長の場合も信号の減衰には 2 成分含まれ、それぞれ 0.79 ns と 1.75 ns であった。1.75 ns の時定数は、PC の蛍光寿命と同等であることから、APC の寿命であると考えられる。0.79 ns の成分は、これまで PSII の研究において同様の時定数が報告されていることから⁹⁾、PSII の減衰を示していると考えられる。また、励起光波長が 670 nm (PSII を励起)の場合には、信号が瞬時に立ち上がっているのに対し、640 nm で APC を励起した場合には、蛍光信号が 0.15 ns の立ち上がりが観測された。この立ち上がり成分は、APC→PSII のエネルギー移動を表していると考えられる。

4. まとめ 本研究では、好熱性シアノバクテリアから調製した光合成超複合体におけるエネルギー伝達移動ダイナミクスをピコ秒時間分解発光分光により観測した。生化学調製により、フィコエリスリン (PE) とフィコシアニン (PC) が結合したフィコビリソーム (PBS) 超複合体とアロフィコシアニン (APC) と光化学系 II (PSII) が相互作用した PBS-PSII 超複合体が得られた。調製された 2 つの超複合体に対して、時間相関単一光子計数法 (TCSPC) を用いたピコ秒時間分解発光分光を行ったところ PE→PC のエネルギー移動は 90 ps、APC→PSII のエネルギー移動は 150 ps であることが明らかになった。

参考文献

- [1] D. Bald, J. Kruij, and M. Rögner, *Photosynth. Res.* **49**, 103 (1996).
- [2] B. A. Zilinskas, and L. S. Greenwald, *Photosynth. Res.* **10**, 7 (1986).

- [3] M. Mimuro, I. Yamazaki, T. Yamazaki, and Y. Fujita, *Photochem. Photobiol.* **41**, 597 (1985).
- [4] Y. Ueno, S. Aikawa, A. Kondo, and S. Akimoto, *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 3567 (2016).
- [5] K. E. Wilk, S. J. Harrop, L. Jankova, D. Edler, G. Keenan, F. Sharples, R. G. Hiller, and P. M. G. Curmi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8901 (1999).
- [6] C. Y. Wong, R. M. Alvey, D. B. Turner, K. E. Wilk, D. A. Bryant, P. M. G. Curmi, R. J. Silbey, and G. D. Scholes, *Nat. Chem.* **4**, 396 (2012).
- [7] E. Collini, and G. D. Scholes, *Science* **323**, 369 (2009).
- [8] J. Barber, E. P. Morris, and P. C. A. da Fonseca, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2**, 536 (2003).
- [9] Y. Shibata, S. Nishi, K. Kawakami, J.-R. Shen, and T. Renger, *J. Am Chem. Soc.* **135** (2013).