

Heliobacterium modesticaldum 光合成反応中心への選択励起における 励起エネルギー移動および電子移動反応

小島理沙^A、山元颯太^B、浅井智広^C、小澄大輔^B、大岡宏造^A

^A大阪大学大学院理学研究科

^B熊本大学パルスパワー研究所

^C立命館大学生命情報学科

Energy and electron transfer processes upon selective excitation in reaction center of *Heliobacterium modesticaldum*

Risa Kojima^A, Yamamoto Hayata^B, Chihiro Azai^C, Daisuke Kosumi^B, Hirozo Oh-oka^A

^AGraduate School of Science, Osaka University

^BInstitute of Pulse Power Science, Kumamoto University

^CCollege of Life Sciences, Ritsumeikan University

We have investigated excitation energy transfer and electron transfer processes within isolated photosynthetic reaction center (RC) from *Heliobacterium modesticaldum* using femtosecond transient absorption difference spectroscopy at room temperature. Selective excitation of bacteriochlorophyll (BChl) *g* pigment pools (B770 and B810), and the primary electron acceptor A_0 , 8¹-hydroxychlorophyll *a* (8¹OH-Chl-*a*_F) was applied. The decay-associated difference spectra (DADS) obtained by a global fit analysis ranging from 450 nm to 850 nm revealed very rapid energy transfer processes (< 1 ps) and a subsequent trapping process to form the initial charge separation state of $P798^+A_0^-$. Upon excitation at 670, 770, and 810 nm, the 20-ps decay components of B813 along with the bleaching of the absorption of A_0 were obtained in all resultant DADS analyses, indicating that the trapping process of the excited state of B813 to a special pair of P798 occurred with a time constant of 20 ps as reported previously. The 1.9-2.1-ps components were also observed upon excitation at 670 and 810 nm, suggesting some excitation equilibration to form thermally relaxed excited state. The spectral shape of nondecaying component was similar to the one attributed to the charge separated state between $P798^+$ and A_0^- ($P798^+A_0^-$), however the maximal bleaching peak resided at 792 nm.

1. はじめに

光合成は光エネルギーを化学エネルギーに変換する反応であり、生体膜内に埋め込まれた複数のタンパク質複合体によって形成される光合成電子伝達系で進行する。光合成反応の初期過程ではタンパク質複合体に結合した色素集団が光エネルギーを吸収し、色素間で励起エネルギー移動を行う。励起エネルギーは最終的に光合成反応中心(RC)内のスペシャルペア(P; Primary electron donor, クロロフィル

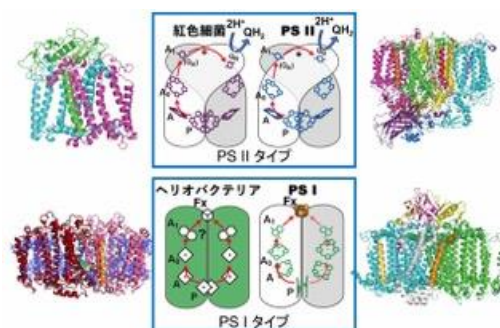


図1. 反応中心 (RC) の分類

(Chl)色素二量体)を励起し、励起状態の P が電子を放出する電荷分離反応が起こる。P から放出された電子は RC 内で電子移動を行い、最終的に生体反応を支える NAD(P)H などの還元力に変換される。RC は植物や光合成細菌にとって最も重要なエネルギー変換装置である。

RC は末端電子受容体の種類によって光化学系 II (PS II)タイプと光化学系 I (PS I)タイプに分類される。植物やシアノバクテリアでは両タイプの RC が連結した反応経路を構成するが、非酸素発生型の光合成細菌はどちらか一方のみを持ち、紅色細菌は PS IIタイプのみ、ヘリオバクテリアや緑色硫黄細菌は PS Iタイプのみを持つ(図 1)。これまでに紅色細菌の RC や PS II、PS I の立体構造が報告されてきたが、最近になってヘリオバクテリア RC (hRC)の立体構造も報告された[1]。しかしながら、hRC は PS Iタイプと考えられているにもかかわらず、構造中にはキノン分子が存在していなかった。一方、我々のグループは ESP-EPR 測定において P^+MQ^- に由来する分極信号を観測しており[2]、キノン分子が RC 内の電子移動に関与していると考えている。しかし、過渡吸収測定においてはキノンと考えられる成分は観測されておらず、 A_1 としてのキノンの存在は否定されている。また、ヘリオバクテリアの膜に光を照射するとキノンが還元されてキノール(MQH_2)が生成されることから[3]、hRC 内のキノンは A_1 としてではなく別の機能を持って存在している可能性が考えられる。これは PS Iとは電子移動経路が大きく異なる可能性があることを意味している。

Heliobacterium modesticaldum の hRC 内には 54 個のバクテリオクロフィル g (BChl-g)、4 個の BChl-g'、2 個の 8^1 -hydroxychlorophyll a (8^1OH -Chl- a_F)が含まれている[1]。hRC の Q_y 吸収帯は 778 nm、

793 nm、808 nm に吸収ピークを示す色素集団を持つことが報告されているが[4]、*Hbt. modesticaldum* ではさらに長波長側の 813 nm に red-chlorophyll タイプの吸収ピークを持つ [5]。ここではこれらの色素集団をそれぞれ B778、B793、B808、B813 と呼ぶことにする。またスペシャルペア P は、798 nm に酸化還元差スペクトルの吸収ピークを持つことから P798 と呼ぶ(P800 と呼ばれる場合もある)。RC 内には P798 のほかにアクセサリ色素(Acc: BChl g)、一次電子受容体(A_0 : 8^1OH -Chl- a_F)、末端電子受容体(F_X : [4Fe-4S]クラスター)が存在している。図 2 には PS I と hRC の電子移動

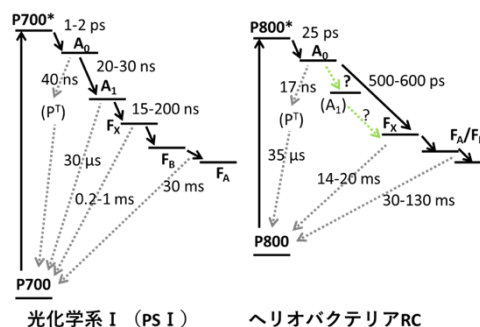


図 2. RC 内の電子移動経路

経路を示している。

本研究では好熱性の *Hbt. modesticaldum* 由来の hRC を用い、初期電荷分離反応の過程を超高速度分光法により測定した。その結果、アンテナ BChl g 間の励起エネルギー移動では最も長波長側に位置する B813 にエネルギー移動した後、 $P798^+A_0^-$ の電荷分離状態が生成されてくる様子を観測した。

2. 実験方法

Hbt. modesticaldum から hRC を精製し [2]、50 mM Tris-HCl (pH8)、10 mM アスコルビン酸ナトリウム、1 mM β -DDM を含む緩衝液に $OD_{788} = 0.5$ (光学距離 2 mm) とな

るように懸濁した。測定サンプルには 10 mM ジチオナイト、20 μ M 1-methoxy-PMS となるように加えている。測定にはフェムト秒ポンプ・プローブ分光(1 kHz)を用い、励起光強度は 810, 770 nm 励起では 5 nJ/pulse、670 nm 励起では 10 nJ/pulse とした。観測されたデータをグローバル解析し、decay-associated difference spectra (DADS) および evolution-associated difference spectra (EADS)を得た。本実験は RC 精製から測定に至るまで、すべての操作を嫌気条件下、暗所または dim-light(緑色 LED 光源)下で行った。

3. 実験結果と考察

フェムト秒ポンプ・プローブ測定は室温で測定し、励起波長は 810、670、770 nm とした。測定サンプルには 10 mM ジチオナイトを加えており、hRC は強還元条件下にある。このような条件下では F_X は還元状態であるため、 A_0 から F_X への二次電子移動は起こらず、電荷分離状態 ($P798^+A_0^-$) 形成後は A_0^- から $P798^+$ への電荷再結合反応のみが観測され、1 kHz の繰り返し測定では $P798$ は open 状態であると判断してよい。

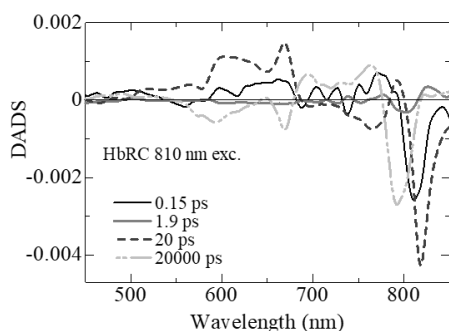


図 3. 励起波長 810 nm における DADS

図 3 は励起波長 810 nm で観測された DADS である。810 nm 励起では BChl g の色素集団のうち長波長側に吸収ピークをもつ B808/B813 を励起することができる。グ

ローバル解析では 0.15、1.9、20 ps、および非減衰成分(20000 ps として fitting)の 4 成分が得られた。810 nm で励起後、励起エネルギーは B808 から B813 に 0.15 ps で移動していることが分かる。その後、B813 に蓄積した励起エネルギーは 20ps で減衰し、初期電荷分離状態 $P798^+A_0^-$ が形成された。このことは 20 ps で消失する $A_0(8^1OH-Chl-a_F)$ に由来するスペクトルが 670 nm に観測されることから支持される。また 1.9 ps の成分は励起状態の B808 の一部が内

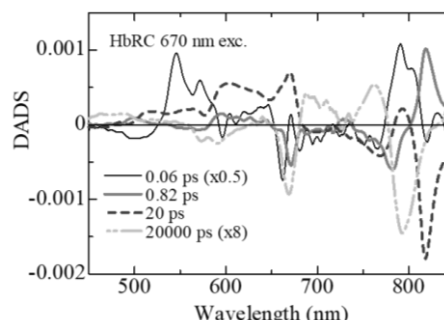


図 4. 励起波長 670 nm における DADS

部緩和したものと考えられる。

図 4 は励起波長 670 nm の DADS である。670 nm は $8^1OH-Chl-a_F$ の Q_y 吸収帯であり、hRC 内ではダイマー当たり 2 分子存在し、一次電子受容体 A_0 として機能している。この A_0 を励起した際には、0.06、0.82、20 ps および非減衰成分(20000 ps として fitting)の 4 成分が得られた。0.06 および 0.82 ps 成分はアンテナ BChl g 間の素早い励起エネルギー移動を示している。20 ps 成分および非減衰成分は 810 nm 励起の結果と同じである。また過去に、Chl a を直接励起するとアンテナ BChl g 励起の場合よりもより $P798^+$ の退色信号が大きくなると報告されている[4]が、今回の測定ではそのような現象は観測されなかった。

図 5 は励起波長 770 nm のときに観測された DADS である。770 nm はアンテナ

BChl *g* の最も短波長側の色素集団を励起する波長である。670 nm 励起と同じ時定数成分に、新たに 2.1 ps 成分が加わり、全部で 5 成分となった。2.1 ps の成分は 810 nm 励起で観測された 1.9 ps の成分と同じく、アンテナ BChl *g* の内部緩和ではないかと

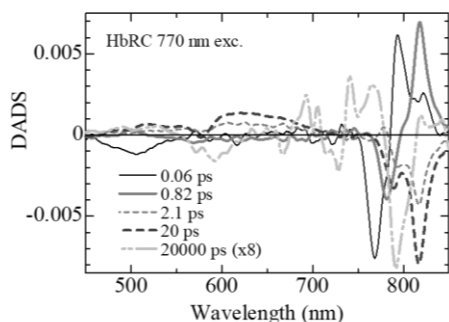


図 5. 励起波長 770 nm における DADS

考えている。

これらの 3 つの励起波長での測定において、初期電荷分離状態 $P798^+A_0^-$ は時定数 20 ps で形成されていることが分かった。これは過去の報告と一致するが、 $P798^+$ の立ち上がり成分 ($P798$ に由来するスペクトル) は DADS 解析では検出されなかった。この結果から、電荷分離への trapping 過程は $B813^*P798A_0 \rightarrow B813P798^+A_0^-$ であると考えられる。 $P798^+$ の立ち上がり成分についてはこれまでの研究においても報告例はない。その原因として、 $P798^+$ の立ち上がり成分が周辺のアンテナ色素の減衰成分と対消滅している可能性が考えられる。

またどの励起波長においても、 $P798^+A_0^-$ で $P798^+$ の減衰を示す退色ピークが 798 nm ではなく 793 nm であった。過去に、 P の励起三重項状態 (P^T) は 793 nm に退色ピークが観測されることが報告されている [6,7]。しかしこの場合、 $P798^+A_0^-$ は 20-30 ns で電荷再結合して P^T を形成し、その後、約 35 μ s で減衰する。長波長側で観測された非減衰成分のスペクトルは、

$P798^+A_0^-$ の形成に由来する 798 nm のブリーチに 793 nm のブリーチが重なっているように見える。このグローバル解析は 20000 ps という時間領域で得られた結果であり、実際の測定領域は約 1000 ps であるため、793 nm のブリーチを P^T の減衰に帰属することは不自然である。そのため 798 nm のブリーチは、 $P798^+$ 形成によるアンテナ BChl *g* の電場シフトか、アンテナ色素 B793 自体のブリーチが原因と考えることが妥当と思われる。BChl *g* の Q_x ピーク (580 nm 周辺) も分裂していることから、複数の色素成分の状態変化がこの時間領域で観測されていると推測される。

今回の測定ではジチオナイト存在下で励起エネルギー移動から $P798^+A_0^-$ までの反応を観測した。キノンの関与を含めた二次電子移動以降の電子移動についても詳細に調べ、電荷分離の初期過程を明らかにすることが今後の目標である。

参考文献

- [1] C. Gisriel, et al., (2017) *Science*, 357, 1021-1025.
- [2] T. Kondo, et al., (2018) *J.Phys. Chem. B*, 122, 2536-2543
- [3] T. S. Kashey, et al., (2018) *Photosynth. Res.*, 138 (1) 1-9
- [4] S. Neerken et al. (2000) *Biochemistry*, 39, 3297-3303
- [5] A. Chauvet et al., (2013) *Photosyn Res.*, 116, 1-9
- [6] H.W.J. Smit et al., (1987) *Biochem Biophys Acta*, 893, 232-240
- [7] H.W.J. Smit et al., (1989) *Biochem Biophys Acta*, 973, 212-219

謝辞

本研究は JSPS 科研費 18K06153, 新学術領域研究 18H05163, 19H04724 の助成を受けたものです。