

シアノバクテリア光化学系 I, II におけるカロテノイドからクロロフィルへのエネルギー伝達ダイナミクス

野原大暉^A、加藤駿弥^A、芹川広樹^B、川上恵典^C、神谷信夫^D、小澄大輔^E
熊本大学・理学部^A、熊本大学・自然科学教育部^B、理研・SPring-8^C、
大阪市立大学・人工光合成研究センター^D、熊本大学・産業ナノマテリアル研究所^E
T. Nohara^A, H. Serikawa^B, H. Yamamoto^B, K. Kawakami^C, N. Kamiya^C, and D. Kosumi^D
Department of Physics, Faculty of Science, Kumamoto University^A
Department of Physics, Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University^B
RIKEN, SPring-8^C
Research Center for Artificial Photosynthesis, Osaka-city University^D
Institute of Industrial Nanomaterials, Kumamoto University^E

Natural photosynthetic apparatus efficiently capture sunlight and convert it to chemical potentials in reaction centers. Photosystem I and II (PS I and II) in oxygenic photosynthesis are the membrane photosynthetic pigment-protein complexes consisting of core antennas and reaction centers. They contain photosynthetic chromophores of Chlorophyll *a* (Chl *a*) and β -carotene (Car). PSI has red-chlorophyll (red-Chl) with strong excitonic interactions between Chl molecules. The red-Chls localize the excitation in PSI core antennas and are located closer to PSI-RC. Therefore, the red-Chls may play certain roles to concentrate the excitation near the RC. In the present study, we performed fs pump-probe spectroscopies on the isolated PSI-trimer and PSII-dimer from thermophilic cyanobacterium, *Thermosynechococcus vulcanus* to clarify roles of red-Chls in the Car \rightarrow Chl *a* energy transfer

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、藻類及び一部の細菌類は電子源として水を利用し、水の分解により電子・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電荷分離反応を行う反応中心へ伝達する。酸素発生型光合成生物は、光化学系 I と II (PSI, PSII) と呼ばれる反応中心とコアアンテナからなる色素タンパク複合体を持ち、PSII は光エネルギーを利用した水分解反応により電

子とプロトンを生成し、得られた電子は PSI を経由してフェレドキシン-NADP 複合体に伝達される。好熱性シアノバクテリア由来の

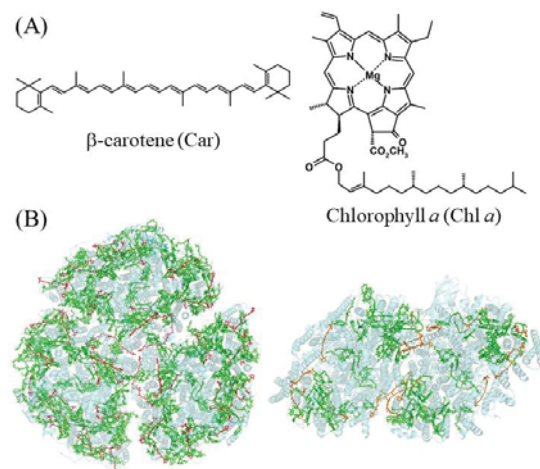


図 1: (A) シアノバクテリア PSI と PSII に含まれる光合成色素 β -carotene (Car) と Chlorophyll *a* (Chl) の化学構造式。 (B) X 線構造解析により得られた PSI-trimer と PSII-dimer の結晶構造図。

PSI と PSII はそれぞれ三量体と二量体構造をとり [1, 2]、単量体 1 ユニットにクロロフィル (Chl *a*) が 96 分子又は 35 分子、 β -カロテン (Car) が 22 分子又は 11 分子含まれる (Fig. 1) [2, 3]。一方、シアノバクテリア由来 PSI 及び PSII は同じ光合成色素を含むものの、光吸収した Car から Chl *a* へのエネルギー伝達は、PSI では高効率であるものの、PSII では低効率であることが報告されている [4, 5]。好熱性シアノバクテリア由来 PSI では、強く相互作用した 2, 3 Chl *a* 分子 (dimer 又は trimer) による吸収・発光エネルギーがレッドシフトした red-Chl が存在する [3]。この red-Chl サイトは反応中心付近に局在することから、コアアンテナから反応中心へのエネルギー伝達におけるボトルネック的な役割を果たしていると考えられている。本研究では、Car から Chl *a* へのエネルギー伝達における red-Chl の役割に着目した。シアノバクテリア由来 PSI 及び PSII におけるフェムト秒ポンプ・プローブ分光を行い、その結果を比較することで Car-Chl *a* エネルギー伝達効率と red-Chl の関連の解明を試みた。

2. 実験

2.1 試料調製 (1) 培養した好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* の細胞を大型遠心機で回収し、バッファーで洗

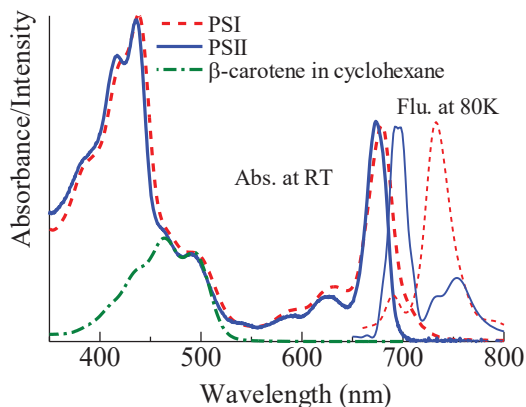


図 2: PSI, PSII 及びシクロヘキサン中の Car の定常吸収スペクトルと 80 K における PSI と PSII の定常発光スペクトル。

浄後に加水分解を行った。(2) 得られた懸濁液を凍結融解法により細胞破壊し、可溶化後に遠心処理することで未破碎細胞及び不可溶化タンパク質を除去した。(3) 細胞破碎後の懸濁液の上澄み (可溶化された試料) を濾過し、弱陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて PSI-trimer を単離した。(4) (3)の操作において、PSII-monomer と PSII-dimer を単離し、強陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて PSII-dimer のみを回収した。

2.2 時間分解分光測定

2.2.1 ピコ秒時間分解発光分光 本研究では、PSI 及び PSII 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, 1 W) 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を用いた。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 [6-8]。各波長における蛍光減衰曲線を時間積分することで、定常発光スペクトルを得た。

2.2.2 フェムト秒ポンプ・プローブ分光 チタンサファイア再生増幅器の出力光を 2 分割し、光パラメトリック増幅器により得た波長可変パルスをもポンプ光とした。プローブ光には 2 mm 厚のサファイアガラスに基本波の一部を集光することで得られる広帯域白色

光を用いた。試料を透過したプローブ光は、分光器に通した後に 512ch.フォトダイオードアレイ (PDA)で検出した。再生増幅器の 1 kHz をマスタークロックとした 0.5 kHz で駆動する光学チョッパーでポンプ光を強度変調し、PDA の検出タイミングと同期した [9, 10]。

3. 結果と考察 図 2 に、PSI と PSII 及びシクロヘキサン中の Car の定常吸収スペクトルを示す。PSI と PSII に観測される 440 nm 及び 680 nm の吸収帯は、それぞれ Chl *a* の Soret 帯と Q_y 帯である。また、シクロヘキサン中の Car で観測される 400~500 nm の吸収帯は、Car の光学許容励起一重項状態 S₂ への吸収を表し、PSI と PSII でも同様の吸収帯が観測された。本研究では、光励起された Car から Chl *a* へのエネルギー伝達を観測するため、励起光波長を 500 nm とした。また、図 2 に 80 K における PSI 及び PSII の発光スペクトルを示す。発光分光測定では、440 nm の励起光を用いて Chl *a* の Soret 帯を励起した。PSII では発光極大が 695 nm であるのに対し、PSI では極大が大きくレッドシフトし 730 nm であった。これは、PSI のコアアンテナで吸収されたエネルギーが反応中心近くに存在する red-Chl に集められていることを示す。

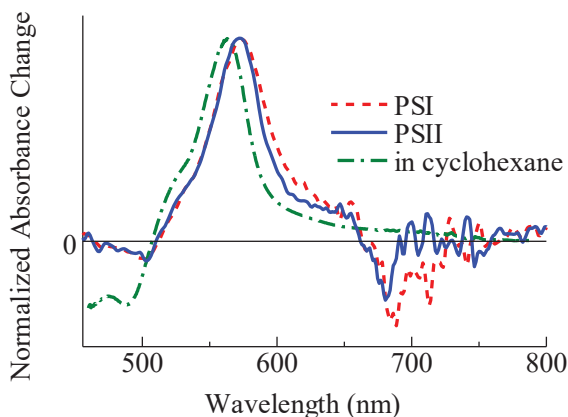


図 3: PSI, PSII 及びシクロヘキサン中の Car における 500 nm 光パルスで光励起後 1.0 ps における光誘起吸収スペクトル。

図 3 に光励起後 1.0 ps における PSI と PSII 及びシクロヘキサン中の Car の光誘起吸収スペクトルを示す。シクロヘキサン中の Car では、500 nm より短い波長領域に基底状態の減少による褪色信号が観測され、また 560 nm をピークとした過渡吸収信号が観測された。この過渡吸収は、光学禁制状態 S₁ から高次の励起状態 S_n への遷移を表す [11, 12]。PSI と PSII でも同様の信号が観測されたが、Car を取り巻く環境の違いを反映し、S₁ 過渡吸収信号がわずかに長波長シフトした。また PSI と PSII では、溶液中の Car では見られなかった負の信号が 670 nm 付近に観測された。この信号は、Chl *a* の Q_y 帯の褪色に相当することから、PSI と PSII に結合する β-carotene が光励起後に Chl *a* へエネルギー伝達を行っていることを表す。

図 4(A)に、シクロヘキサン中及び PSI と PSII に結合した Car の S₁ 過渡吸収信号の時間依存性を示す。観測された過渡吸収信号の時間変化に対し、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、シクロヘキサン中における Car の S₁ 過渡吸収信号の立ち上がりが 150 fs、減衰が 9 ps であることが求められた。これに対し PSI と PSII に結合した Car の S₁ 過渡吸収信号の立ち上がりはそれぞれ 90 fs と

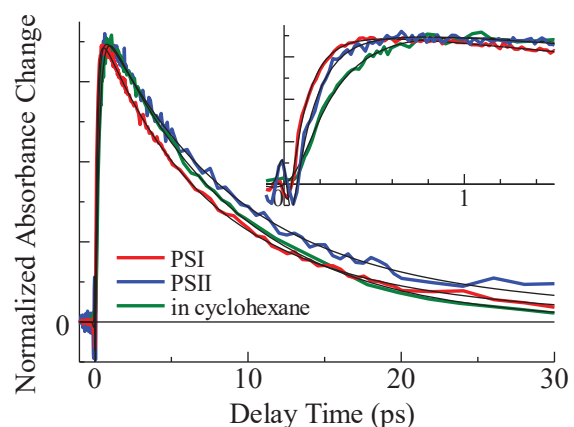


図 4: PSI, PSII 及びシクロヘキサン中の Car の S₁ 過渡吸収信号の時間依存性。

110 fs であり、溶液中のよりも短くなっていた。 S_1 過渡吸収信号の立ち上がりが S_2 寿命に相当することから、PSI と PSII に結合した Car では S_2 から Chl *a* へのエネルギー伝達が起きていることを示す。一方、Car の S_1 寿命は PSII では 9 ps と溶液中と等しく、PSII に結合した Car では S_1 から Chl *a* へのエネルギー伝達は起っていないことを示す。これに対し、PSI では S_1 寿命が 2.2 ps (14%) と 9 ps (86%) の 2 成分あり、PSI では S_1 から Chl *a* へエネルギー伝達を起こす Car 分子と起こさない Car 分子が存在することが明らかになった。好熱性シアノバクテリア PSI では、単量体 1 ユニット当たり 22 分子の Car が結合している [3]。 S_1 過渡吸収信号の減衰に含まれる 2.2 ps の振幅 (14%) より、3~4 分子の Car が S_1 からのエネルギー伝達を可能にし、これらの分子は red-Chl に近接する Car に対応している。本来カロテノイドの S_1 状態は光学禁制状態であるため、Car-Chl *a* 双極子相互作用が小さく Chl *a* へのエネルギー伝達は非効率である [13]。しかしながら、多量体を形成する red-Chl は Chl *a* 分子間の強い相互作用により遷移双極子モーメントが増大し [14, 15]、Car と red-Chl 間の強い相互作用が生じた結果、効率的なエネルギー伝達を可能としたと考えられる。

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色素タンパク複合体 PSI 及び PSII における Car から Chl *a* への超高速エネルギー伝達ダイナミクスをフェムト秒ポンプ・プローブ分光により観測した。溶液中における Car の励起状態ダイナミクスと比較することで、PSII に結合する Car では、Chl *a* へのエネルギー伝達は S_2 からのみ起こり、PSI では S_2 と一部の分子でのみ S_1 からのエネルギー伝達が起こることが明らかになった。

参考文献

- [1] T. Malavath, I. Caspy, S.Y. Netzer-El, D. Klaiman, N. Nelson, *Biochim. Biophys. Acta* **1859** (2018) 645.
- [2] Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen, N. Kamiya, *Nature* **473** (2011) 55.
- [3] P. Jordan, P. Fromme, H.T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, N. Krauß, *Nature* **411** (2001) 909.
- [4] N.E. Holt, J.T.M. Kennis, G.R. Fleming, *J. Phys. Chem. B* **108** (2004) 19029.
- [5] F.L. de Weerd, J.P. Dekker, R. van Grondelle, *J. Phys. Chem. B* **107** (2003) 6214.
- [6] C. Azai, J. Harada, S. Fujimoto, S. Masuda, D. Kosumi, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **403** (2020) 112828.
- [7] H. Yamamoto, M. Taomoto, A. Ito, D. Kosumi, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **401** (2020) 112771.
- [8] R. Akiyoshi, Y. Hirota, D. Kosumi, M. Tsutsumi, M. Nakamura, L.F. Lindoy, S. Hayami, *Chem. Sci.* **10** (2019) 5843.
- [9] D. Kosumi, K. Abe, H. Karasawa, M. Fujiwara, R.J. Cogdell, H. Hashimoto, M. Yoshizawa, *Chem. Phys.* **373** (2010) 33.
- [10] R. Kojima, H. Yamamoto, C. Azai, C. Urugami, H. Hashimoto, D. Kosumi, H. Oh-oka, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **401** (2020) 112758.
- [11] D. Kosumi, K. Yanagi, T. Nishio, H. Hashimoto, M. Yoshizawa, *Chem. Phys. Lett.* **408** (2005) 89.
- [12] D. Kosumi, M. Fujiwara, R. Fujii, R.J. Cogdell, H. Hashimoto, M. Yoshizawa, *J. Chem. Phys.* **130** (2009) 214506.
- [13] T. Polivka, H.A. Frank, *Acc. Chem. Res.* **43** (2010) 1125.
- [14] F.C. Spano, S. Mukamel, *Phys. Rev. A* **40** (1989) 5783.
- [15] D. Leupold, H. Stiel, K. Teuchner, F. Nowak, W. Sandner, B. Ucker, H. Scheer, *Phys. Rev. Lett.* **77** (1996) 4675.