

# 好熱性シアノバクテリア由来光捕集アンテナ及び アンテナ-光化学系超複合体におけるエネルギー伝達過程

加藤善大<sup>A</sup>、木田雅俊<sup>B</sup>、廣田悠真<sup>B</sup>、川上恵典<sup>C</sup>、米倉功治<sup>C</sup>、  
神谷信夫<sup>D</sup>、小澄大輔<sup>E</sup>

熊本大学・理学部<sup>A</sup>、熊本大学・大学院自然科学教育部<sup>B</sup>、理化学研究所・SPRING-8<sup>C</sup>、  
大阪市立大学・人工光合成研究センター<sup>D</sup>、熊本大学・産業ナノマテリアル研究所<sup>E</sup>  
Y. Kato<sup>A</sup>, M. Kida<sup>B</sup>, Y. Hirota<sup>A</sup>, K. Kawakami<sup>C</sup>, K. Yonekura<sup>C</sup>, N. Kamiya<sup>C</sup>, and D. Kosumi<sup>D</sup>

Department of Physics, Faculty of Science, Kumamoto University<sup>A</sup>

Department of Science, Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University<sup>B</sup>

RIKEN SPRING-8 Center<sup>C</sup>

The OCU Research Center for Artificial Photosynthesis, Osaka City University<sup>D</sup>

Institute of Pulsed Power Science, Kumamoto University<sup>E</sup>

Natural photosynthetic apparatus efficiently capture sunlight and convert it to chemical potential. In a primary process of photosynthesis, light-harvesting pigment-protein complexes absorb light 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 (PBS), which is a megacomplex composed of many pigment-protein complexes. In this study, we investigated energy transfer dynamics in the intact-PBS and PBS-Photosystem super-complex 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し、電子やプロトンといった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が行われる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、アンテナとして巨大色素タンパク複合体フィコビリソーム (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、半球状・半円状・ロッド状の巨大超複合体 (分子量: ~1MDa) を形成する<sup>1, 2</sup>。PBS は、 $\alpha\beta$ ヘテロダイマーサブユニット

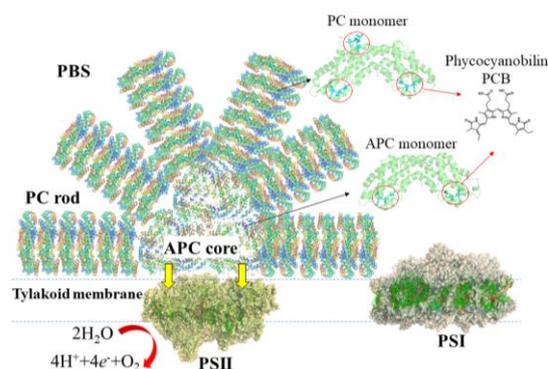


図 1: シアノバクテリアにおけるフィコビリソーム (PBS)-光化学系 I, II (PSI, II) 超複合体の概略図。内装図は、PC, APC monomer と結合する光合成色素フィコシアノビルリン (PCB) の化学構造式。

からなる PC monomer と APC monomer の 3 量体 (PC trimer と APC trimer) が基本構造となり、PC monomer と APC monomer には光合成色素であるフィコシアノビルリン (PCB) がそれぞれ 2 分子と 3 分子結合している (図 1)。PC trimer はロッド状に積層し、PBS の中心部から放射状に外側へ突出する PC rod を形成する。APC trimer は多くの種で 2~4 層からなるディスクを形成し、3 つのディスクからなる APC core を形成する。生体膜中において、PBS のコア部分である APC core 中のリンカータンパク質 ApcE サブユニットが、タンパク質間相互作用により、光・化学エネルギー変換を行う光化学系 II (PSII) と結合する (図 1)。PC monomer および APC monomer は、500~600 nm 波長域の光を吸収する PCB を持つものの、それぞれ構成する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、それぞれの吸収極大は PC monomer で 620 nm、APC monomer で 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* (Chl *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は、PC→APC→PSII で伝達すると考えられている<sup>3</sup>。

これまで我々は、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus* (*T.*) *vulcanus* より intact-PBS を調製する手法を確立し、負染色電子顕微鏡によりその全体構造を決定するとともに<sup>4</sup>、超高速分光を用いてそのエネルギー伝達過程を解明してきた<sup>5</sup>。また先行研究では、細胞試料における各色素タンパク複合体間のエネルギー伝達<sup>6</sup>、PBS を構成するサブユニットの高分解能結晶構造<sup>7,8</sup> 及び色素分子間の量子コヒーレンス<sup>9,10</sup> が報告されている。一方、PBS と光化学系 (PS) が結合した超複合体レベルでの研究はいくつかの報告例があるものの<sup>11,12</sup>、PBS-PS 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、超複合体の構造、エネルギー伝達に関する知見は乏しい。このため我々は、シアノバクテリアにおける集光アンテナ (PBS) と光化学系 (PSII) がどのように相互作用し、効率的にエネルギーを伝達しているかを解明するため、構造・機能の面から研究を行っている。本研究では、好熱性シアノバクテリア *T. vulcanus* から PBS 及び PBS-PS 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。

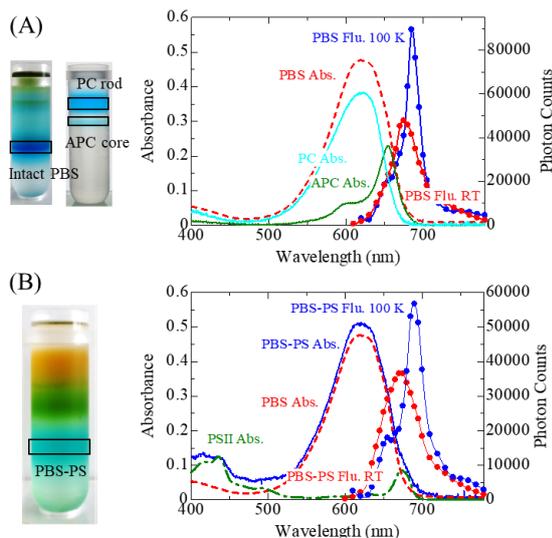


図 2: 生化学調製により得られた(A) intact-PBS, PC rod, APC core 及び、(B) PBS-PS 及び PSII の定常吸収スペクトル。(A) intact-PBS と (B) PBS-PS における室温と 100 K での定常発光スペクトル。

## 2. 実験

### 2.1 試料調製 (1) 好熱性シアノバクテリア *T. 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。(3) (2)において、PBS から脱離した PC rod 及び APC core を生成することで、単離 PC rod 及び APC core とした (図 2(A)).(3) (2)で得られた溶液に対して密度勾配超遠心

分離を行い、PBS-PS を回収した (図 2(B))。得られた試料は、定常吸収スペクトル (UV-3600, SHIMADU)にて確認を行った。

**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)を用いたピコ秒時間分解発光分光測定を行った。光源である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、励起光とした。励起光は試料前でビームスプリッターにより 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 (SP2150, Teledyne Princeton Instruments)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<sup>13,14</sup>。また、各波長で検出した発光信号を時間積分することで、定常発光スペクトルを得た。本研究では、PBS 中の PC rod を選択的に励起し、その後のエネルギー伝達を

観測するため、励起波長は 570 nm とし、励起光強度は 200 nW~1 μW とした。分光器の前に偏光板を置き、励起光と偏光板の相対偏光はマジック角 (54.7°)とした。

**3. 結果と考察** 図 2(A)に、本研究で得られた intact-PBS、PC rod 及び APC core の室温 (296 K)における定常吸収スペクトルを示す。intact-PBS は 620 nm に吸収極大を持ち、そのスペクトルは同じく 620 nm に吸収極大を持つ PC rod と長波長側に寄与する APC core (吸収極大 655 nm)の重ね合わせで表される。570 nm の励起光で測定された蛍光スペクトルは、296 K では 675 nm で蛍光極大を示したのに対し、100 K では 685 nm と大きくレッドシフトし、スペクトルがシャープになった。

図 2(B)に PBS-PS (296 K)の定常吸収スペクトルを示す。Intact-PBS と同様に 620 nm に吸収極大を示したものの、吸収の長波長端 (~680 nm)に PSII の主な光合成色素である Chl *a* の Q<sub>y</sub>、440 nm 近辺に Soret 帯に由来する吸収帯が観測された。570 nm の励起光で測定された 296 K における蛍光スペクトルは、intact-PBS と同様に 675 nm で蛍光極大を示し、intact-PBS と比較すると短波長側に広がり観測された。100 K の発光スペクトル

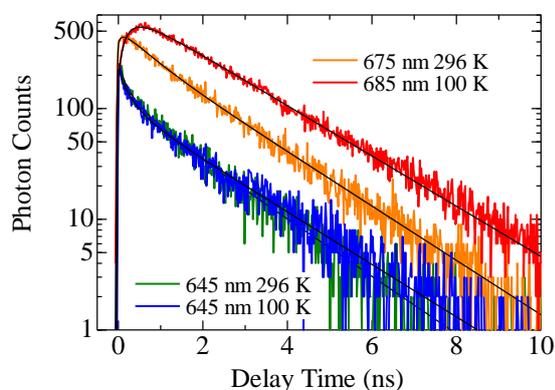


図 3: TCSPC により測定された 570 nm 励起後の intact-PBS の蛍光減衰曲線。細線はフィッティング曲線を表す。検出波長は、短波長側の 645 nm (100 K, 296K)と蛍光ピーク波長 675 nm (296 K)及び 685 nm (100 K)で行った。

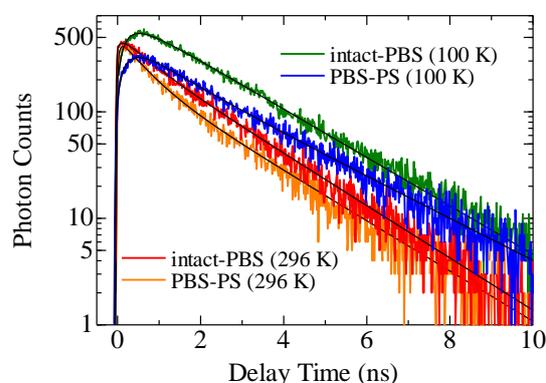


図 4: TCSPC により測定された 570 nm 励起後の 100 K 及び 296K における intact-PBS と PBS-PS の蛍光減衰曲線。細線はフィッティング曲線を表す。検出波長は 675 nm (296 K)及び 685 nm (100 K)。

ルは 690 nm でピークを示し、intact-PBS よりわずかに長波長シフトし、さらに長波長側に広がり観測された。この結果は、PBS で吸収した光エネルギーを PSII へ伝達したことを示している。

図 3 に、励起波長 570 nm で PC を選択励起することで観測された intact-PBS の蛍光減衰曲線を示す。得られた減衰曲線に対し、立ち上がり・減衰を表す指数関数と装置関数を畳み込んだ関数を用い、観測した 600~780 nm の蛍光減衰曲線でグローバルにフィッティングを行った。短波長側を観測した検出波長 645 nm では、主に PC rod の寄与が含まれる。この検出波長では、明確な温度依存性は観測されず、蛍光信号は光励起後瞬時に立ち上がり、比較的速い減衰を示した。蛍光ピーク波長における減衰曲線には、主に APC core の寄与が含まれ、立上りが観測された。またその初期ダイナミクスは、温度に大きく依存していることから、APC core 内部でのエネルギー移動は温度依存性を持つことが考えられる。

図 4 に intact-PBS 及び PBS-PS 超複合体における蛍光減衰曲線を示す。検出波長は 675 nm (296 K) 及び 685 nm (100 K) とした。296 K における intact-PBS 及び PBS-PS 超複合体の減衰曲線を比較すると、PBS-PS 超複合体には速い減衰成分が存在し、PBS 中の APC core から PSII へのエネルギー移動が行われていることを示している。また、100 K における intact-PBS 及び PBS-PS 超複合体の減衰曲線を比較すると、296 K ではその寄与が明確ではなかった PSII の蛍光による長い寿命の成分が観測された。

**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 intact-PBS 及び PBS-PS 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。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、PBS 内部でのエネルギー伝達および、PBS→PSII のエネルギー伝達過程が明らかになった。

## 参考文献

- [1] D. Bald, J. Kruip, 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] K. Kawakami, R. Nagao, Y. O. Tahara, T. Hamaguchi, T. Suzuki, N. Dohmae, D. Kosumi, J.-R. Shen, M. Miyata, K. Yonekura, and N. Kamiya, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* **1862**, 148458 (2021).
- [5] Y. Hirota, H. Serikawa, K. Kawakami, M. Ueno, N. Kamiya, and D. Kosumi, *Photosynth. Res.* **148**, 181 (2021).
- [6] Y. Ueno, S. Aikawa, A. Kondo, and S. Akimoto, *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 3567 (2016).
- [7] 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).
- [8] L. David, A. Marx, and N. Adir, *J. Mol. Biol.* **405**, 201 (2011).
- [9] 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).
- [10] E. Collini, and G. D. Scholes, *Science* **323**, 369 (2009).
- [11] H. Liu, H. Zhang, D. M. Niedzwiedzki, M. Prado, G. He, M. L. Gross, and R. E. Blankenship, *Science* **342**, 1104 (2013).
- [12] L. Chang, X. Liu, Y. Li, C. C. Liu, F. Yang, J. Zhao, and S. F. Sui, *Cell Res.* **25**, 726 (2015).
- [13] C. Azai, J. Harada, S. Fujimoto, S. Masuda, and D. Kosumi, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **403**, 112828 (2020).
- [14] H. Yamamoto, M. Taomoto, A. Ito, and D. Kosumi, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **401**, 112771 (2020).