

# フェムト秒ポンプ・プローブ分光測定によるAPC core 及びPC rodのエネルギー伝達ダイナミクスの解明

木田雅俊<sup>1</sup>, 廣田悠真<sup>1</sup>, 川上恵典<sup>2</sup>, 米倉功治<sup>2</sup>, 神谷信夫<sup>3</sup>, 小澄大輔<sup>4</sup>  
熊本大学・自然科学教育部<sup>1</sup>, 理研・SPRING-8<sup>2</sup>,  
大阪市立大学・人工光合成研究センター<sup>3</sup>, 熊本大学・産業ナノマテリアル研究所<sup>4</sup>

## Elucidation of energy transfer dynamics of APC core and PC rod by femtosecond pump-probe measurements

Masatosi Kida<sup>1</sup>, Yuma Hirota<sup>1</sup>, Keisuke Kawakami<sup>2</sup>, Koji Yonekura<sup>2</sup>, Nobuo Kamiya<sup>3</sup>,  
Daisuke Kosumi<sup>4</sup>,

*Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University<sup>1</sup>*  
*RIKEN, SPRING-8<sup>2</sup>*

*The OCU Research Center for Artificial Photosynthesis, Osaka City University<sup>3</sup>*  
*Institute of Industrial Nanomaterials, Kumamoto University<sup>4</sup>*

### 【Abstract】

In thermophilic cyanobacteria, photosynthetic antenna pigment-protein complexes phycobilisomes (PBSs) efficiently absorb sunlight energy. The energy is subsequently transferred to photosystem I (PSI) and photosystem II (PSII) to generate electrochemical potentials. PBSs are mainly composed of allophycocyanin (APC) cores and phycocyanin (PC) rods. APC and PC contain photosynthetic pigment phycocyanobilin which absorbs the green-red region of the spectrum. Recent works reported the high-resolution overall structures of PBSs, while the details of energy transfer dynamics have been still a matter of controversial. In this study, we performed femtosecond pump-probe measurements on the isolated PC trimer and APC core from *Thermosynechococcus vulcanus* to clarify detailed energy transfer dynamics at 140 K.

### 【序論】

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。

フィコビリソーム (PBS)は、チラコイド膜内の光学系 II (PSII)と相互作用し、チラコイド膜外に存在する親水性巨大色素タンパク複合体である。シア

ノバクテリア及び紅藻類光合成において PBS は光捕集アンテナとしての役割を持ち、吸収したエネルギーを電荷分離反応が行われる PSII と PSI に伝達している。シアノバクテリア由来 PBS は、 $\alpha\beta$ ヘテロダイマーサブユニットを基本構造とするフィコシアニン (PC) trimer とアロフィコシアニン (APC) trimer によって構成されている。PC trimer と APC trimer は光合成色素としてフィコシアノビルリン (PCB) をそれぞれ2分子と3分子含む。しかし、PCB を取り囲むタンパク質環境の違いによって、PC trimer と APC trimer の

吸収波長が異なる。PC サブユニットには、大多数をしめる CpcA, CpcB やロッド内をつなぐリンカータンパク質がある [1]。また、APC サブユニットには、大多数をしめる ApcA, ApcB だけでなく、PSII と APC core をつなぐリンカータンパク質である ApcE などがあり、その蛍光はそれぞれ約 655 nm と約 675 nm にある [2, 3]。APC trimer は、層状シリンダーが集合し、コア複合体を形成する。また、PC trimer はコア複合体から半球状または半円状的に突出するロッドを形成する [1]。これまで、我々は負染色電子顕微鏡測定により PBS 全体構造を決定し (図 1A) [4]、PC rod を選択励起後、PBS におけるファネル型エネルギー伝達を解明した [5]。一方、室温測定ではスペクトルの不均一広がりや PBS の空間的構造の複雑さにより、詳細なエネルギー伝達経路を解明できていない。本研究では、140 K で PC trimer 及び APC core を単離調製し、フェムト秒ポンプ・プローブ分光を用いてエネルギー伝達ダイナミクスを観測することにより、室温では観測できなかったタンパク質サブユニット内での超高速エネルギー伝達ダイナミクスの解明を試みた。

### 【実験方法】

フェムト秒ポンプ・プローブ分光では、チタンサファイアレーザー (Spitfire Pro, Spectra-Physics: 1 kHz, 100 fs)からの出力光を2分割し、一方を光パラメトリック増幅器 (TOPAS-C, Spectra-Physics)により得た波長可変パ

ルスを用いたポンプ光とした。もう片方はサファイアガラスを用いて発生した広帯域白色光をプローブ光とした。試料を透過したプローブ光は、分光器 (Shimadzu Corp., P0380-01)に通した後、1024ch フォトダイオードアレイ (PDA) (Hamamatsu Photonics K.K., S12198-1024Q)で検出した。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 [6, 7]。ポンプとプローブ光の相対的偏光はマジック角 (54.7°)とした。ポンプ光波長は、570 nm と 660 nm とし、励起光強度はそれぞれ 3  $\mu$ W と 2  $\mu$ W で測定を行った。

シアノバクテリア *T. vulcanus* の細胞を破碎して得られたチラコイド膜を可溶化し、トレハロース密度勾配遠心により PBS を得た。単離調製された

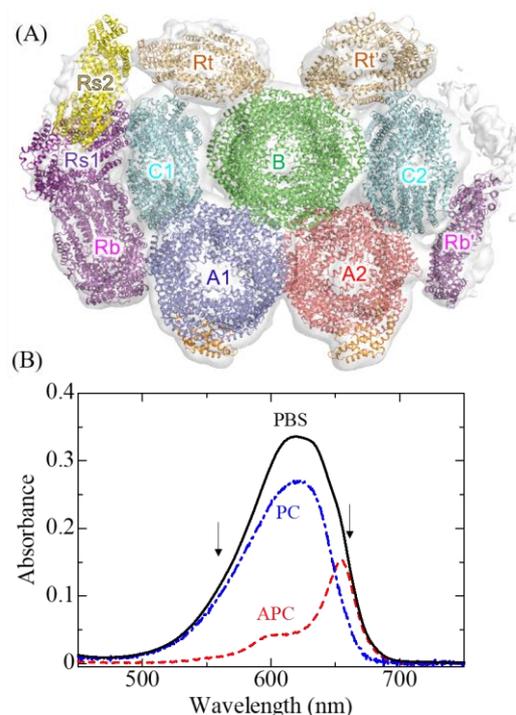


図 1: (A) 負染色電子顕微鏡測定により得られた PBS の全体構造。 (B) PC trimer、APC core 及び PBS の定常吸収スペクトル。

PBS の状態は電子顕微鏡で観察し、タンパク質が解離していないことを確認している。また、PBS を調製する際に遊離した PC rod と APC core を回収・精製することによって、単離 PC trimer と APC core を得た。

### 【結果・考察】

図 1 (B) に PC trimer、APC core、PBS の定常吸収スペクトルを示す。PC trimer は 620 nm を中心に吸収帯を持ち、APC core は 655 nm を中心に吸収帯を持つ。また、PBS の定常吸収スペクトルは、PC trimer、APC core の定常吸収スペクトルの線形結合によって構成されている。

図 2 (A) に 140 K における 570 nm 励起での PC trimer の光誘起吸収スペクトルを示す。630 nm にピークを持ち、それより短い波長では裾を見せる広い褪色信号と、670 nm 付近に過渡吸収信号が観測された。褪色信号は時間の経過とともに長波長シフトした。図 2 (B) に光誘起吸収信号の時間依存性とフィッティング曲線を示す。フィッティングは、信号の立ち上がりと減衰を表す指数関数とガウス関数を仮定した装置関数の畳み込み積分で行い、これにより時定数を決定した。610 nm と 640 nm の褪色信号は、光励起後瞬時に立ち上がり、610 nm の信号はその後減衰したが、640 nm の信号は 610 nm 信号減衰に伴いさらに増加し、その後減衰した。図 2 (C) にグローバル解析により得られた Decay Associated Spectra (DAS) を示す。DAS より、1.4 ps と 27.8 ps の成分が 190 ps と 1880 ps の成分に

エネルギー伝達しており、PC trimer 内のエネルギー伝達を示す。また、1880 ps の成分は PC タンパク質に結合した PCB 本来の寿命を示す。

図 3 (A) に 140 K における 660 nm 励起での APC core の光誘起吸収スペクトルを示す。655 nm を中心とした褪色信号と、その減衰にともなって立ち上がる 675 nm を中心とした褪色信号が観測された。図 3 (B) に光誘起吸収信

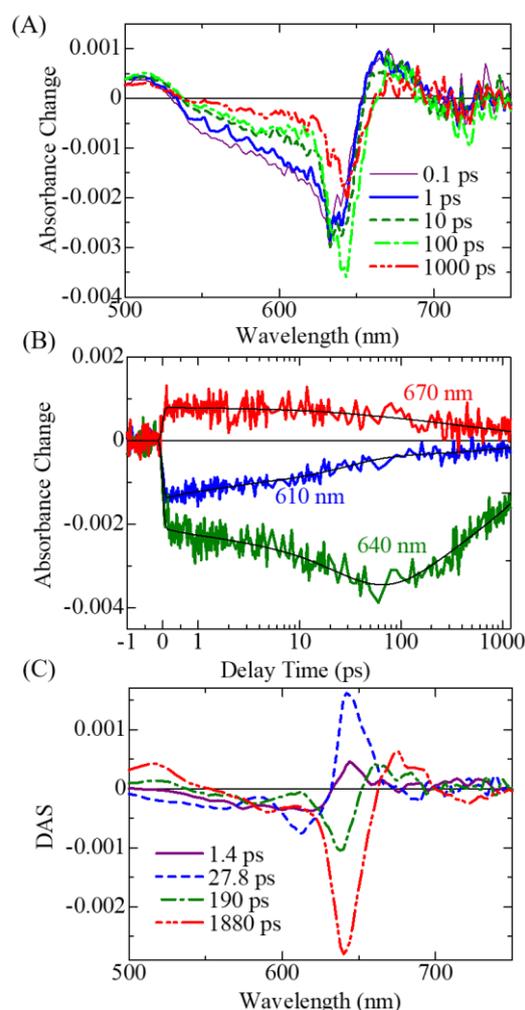


図 2: 140 K における PC trimer を 570 nm 励起後の (A) 光誘起吸収スペクトルと (B) 吸光度変化の時間依存性とそのフィッティング曲線、(C) グローバル解析によって得られた各時定数に対する DAS。

号の時間依存性とフィッティング曲線を示す。656 nm の信号は光励起後瞬時に立ち上がり、その減衰とともに 676 nm の褪色信号が立ち上がっている。図 3 (C) にグローバル解析により得られた各時定数に対する DAS を示す。DAS より、4.9 ps, 37 ps の成分は 1890 ps の成分にエネルギー伝達しており、ApcE へのエネルギー伝達を示す。

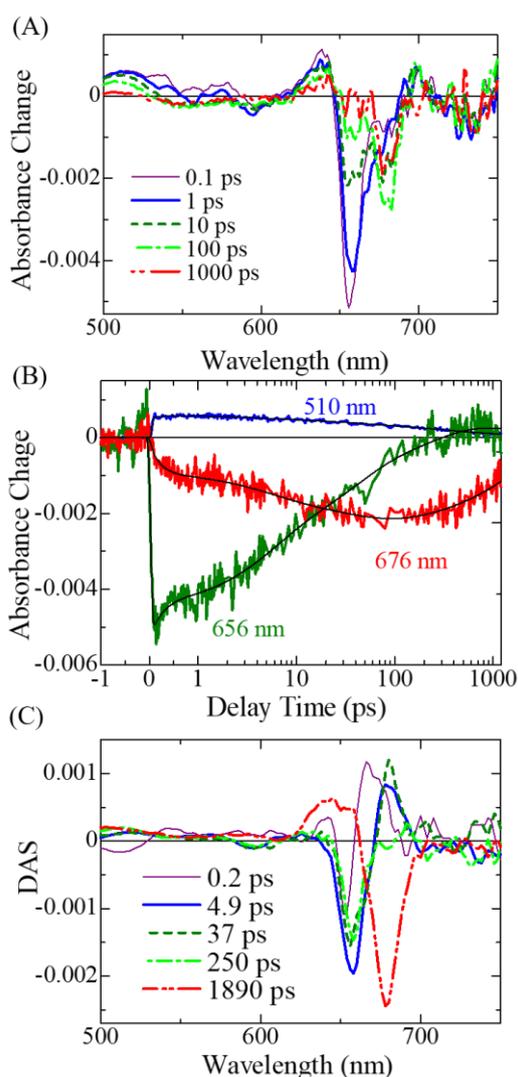


図 3: 140 K における APC core を 660 nm 励起後の (A) 光誘起吸収スペクトルと (B) 吸光度変化の時間依存性とそのフィッティング曲線、(C) グローバル解析によって得られた各時定数に対する DAS。

## 【まとめ】

本研究では、シアノバクテリア *T. vulcanus* から単離調製した PC trimer、APC core のエネルギー伝達ダイナミクスを 140 K でのフェムト秒ポンプ・プローブ分光で観測した。PC trimer の測定では PC monomer 間や monomer 内のエネルギー伝達などが観測でき、APC core の測定によって、ApcE へのエネルギー伝達ダイナミクスを観測できた。

## 【参考文献】

- [1] M. Watanabe, M. Ikeuchi *Photosynth. Res.* **116** (2013) 265.
- [2] Q. Z. Xu, J. X. Han, Q. H. Tang, W. L. Ding, M. Zhou, H. Scheer, K. H. Zhao *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* **1857** (2016) 1607.
- [3] K. Zhao, P. Su, S. Bohm, B. Song, M. Zhou, C. Bubbenzer, H. Scheer *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* **1706** (2005) 81.
- [4] K. Kawakami, R. Nagao, Y. O. Tahara, T. Hamaguchi, T. Suzuki, N. Dohmae, D. Kosumi, J. R. Shen, M. Miyata, N. Kaniya *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* **1862** (2021) 148458.
- [5] Y. Hirota, H. Serikawa, K. Kawakami, M. Ueno, N. Kamiya, D. Kosumi *Photosynth. Res.* **148** (2021) 181.
- [6] D. Kosumi, K. Abe, H. Karasawa, M. Fujiwara, R. J. Cogdell, H. Hashimoto, M. Yoshizawa *Chem. Phys.* **373** (2010) 33.
- [7] R. Kojima, H. Yamamoto, C. Azai, C. Urugami, H. Hashimoto, D. Kosumi, H. Oh-oka *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry.* **401** (2020) 112758.