

緑色硫黄細菌光合成反応中心におけるカロテノイドの 光捕集及び光保護機能

西村和城^A、木田雅俊^B、稲垣知実^C、浅井智広^C、小澄大輔^D

熊本大学・理学部^A、熊本大学・大学院自然科学教育部^B、

立命館大学・生命科学研究科^C、熊本大学・産業ナノマテリアル研究所^D

K. Nishimura^A, M. Kida^B, T. Inagaki^C, C. Azai^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

Graduate School of Life Science, Ritsumeikan University^C

Institute of Industrial Nanomaterials, Kumamoto University^D

Photosynthetic apparatus efficiently captures sun-light and transfer the energy to a reaction center (RC), while is safely dissipates excess energy as heat to protect their organism. Photosynthetic apparatus of green sulfur bacteria contains a peripheral antenna chlorosome, Fenna-Matthews-Olson (FMO) proteins and a RC. FMO proteins and RC mainly binds photosynthetic pigment bacteriochlorophyll *a* (BChl *a*) and in addition, RC contains 4 chlorophyll *a* (Chl *a*) and 4 carotenoid (Car) molecules. It has not been clarified whether Cars bound to RC from green sulfur bacteria play functions of light-harvesting or photoprotection. In this study, we investigated energy transfer dynamics in the FMO-RC complexes from green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum* by femtosecond pump-probe spectroscopy to clarify function of Cars in green sulfur bacterial photosynthesis.

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。緑色硫黄細菌は、還元型硫黄化合物を電子供給体として炭素固定を行い、光向き独立栄養的に生育する非酸素発生型光合成生物である。その電子伝達系反応中心 (RC) は光化学系 I 型に属し、*Chlorobaculum (C.) tepidum* は光合成色素として近赤外光を吸収するバクテリオクロロフィル *a* と *c* (BChl *a*, BChl *c*) を持つ¹。集光アンテナには、主に BChl *c* で構成される巨大色素タンパク複合体クロロソームを持ち、効率的に太陽光を集光する。クロロソームで捕獲されたエネルギーは、電荷分離反応が行われる RC へと伝達される。クロロソームと RC の間には BChl *a* で構成される Fenna-

Matthews-Olson (FMO) タンパク質が存在し²、エネルギー伝達の橋渡しとなっていることが知られる。

緑色硫黄細菌は絶対嫌氣的性質のため、生化学調製には高度な技術を要し、RC の構造は永らく解明されてこなかったが、2020 年にクライオ電子顕微鏡による *C. tepidum* 由来 FMO-RC 超複合体の高分解能三次元構造が解明された³。これにより、RC には主たる光合成色素 BChl *a* の他に、酸素発生型光合成生物が持つ Chl *a* を 4 分子とカロテノイド (Car) を 4 分子含むことが明らかになった (図 1 (A))。Car は、(B)Chl が吸収することのできない 500 nm 付近の光を吸収し、(B)Chl へ伝達する光捕集⁴と過剰なエネルギーを熱として逃がす光保護機能を持つ⁵。*C. tepidum* の RC には、クロロバクテンと γ -カ

ロテン配糖体が結合していることが報告されている⁶。これまで我々は、野生種の *C. tepidum* の細胞と遺伝子改変により配糖体を切断した γ -カロテンを生育した変異体の細胞を比較し、RC 中の BChl *a* で速い消光が観測されたことを報告した⁷。このことは配糖体 Car が、過剰に供給された Bchl *a* の励起エネルギーを散逸させていることを示唆している。

本研究では、緑色硫黄細菌 *C. tepidum* 由来 RC に含まれる Car の役割を解明することを目的とし、100 フェムト秒ポンプ・プローブ分光により、その超高速ダイナミクスの観測を行った。

2. 実験 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)からの出力光を二分割し、片方は光パ

ラメトリック増幅器 (TOPAS-C, Spectra-Physics)で波長変換しポンプ光とした。もう片方は、サファイア結晶に集光し広帯域白色光を発生させプローブ光とした。レーザーパルスの繰り返し周波数 1 kHz をマスタークロックとし、500 Hz で駆動する光チョッパーにより、ポンプ光の強度変調を行った。試料を透過したプローブ光は、分光器を通したのち 1024ch フォトダイオードアレイで検出した。検出はマスタークロックと同期し、500 Hz ごとにポンプ光 on/off による吸光度変化スペクトルを得た^{8,9}。ポンプ光とプローブ光の相対偏向はマジック角 (54.7°)とし、ポンプ光強度は 10 μ W とした。

試料は、緑色硫黄細菌 *C. tepidum* の細胞より FMO-RC 複合体を調製した。調製された試料の状態は、定常吸収スペクトル (UV-3600, SHIMADU)で確認を行った。

3. 結果と考察 図 1(A)に、*C. tepidum* より調製した FMO タンパク質及び FMO-RC 複合体の定常吸収スペクトルを示す。FMO タンパク質の吸収スペクトルは 370 nm、603 nm、808 nm にピークが観測され、それぞれ Soret 帯、Q_x 帯、Q_y 帯に相当する。BChl *a* 本来の Q_y 帯は、~780 nm に吸収を持つが、FMO 中では強い分子間相互作用により、吸収帯が長波長シフトしている。FMO-RC ではさらに 500 nm 付近に Car の光学許容一重項状態 S₂ と 670 nm に Chl *a* の Q_y 帯による吸収が観測された。

図 2(A)に 140 K 及び 296 K における FMO-RC 複合体に結合する Car を 505 nm 光パルスで励起後の光誘起吸収スペクトルを示す。光励起直後である 0.1 ps では、500 nm 付近に Car の S₀ 基底状態が減少したことによる負の褪色信号が観測された。光励起後 1.0 ps では、550 nm に正の過渡吸収信号が観測された。この信号は Car の光学許容状態 S₂ を

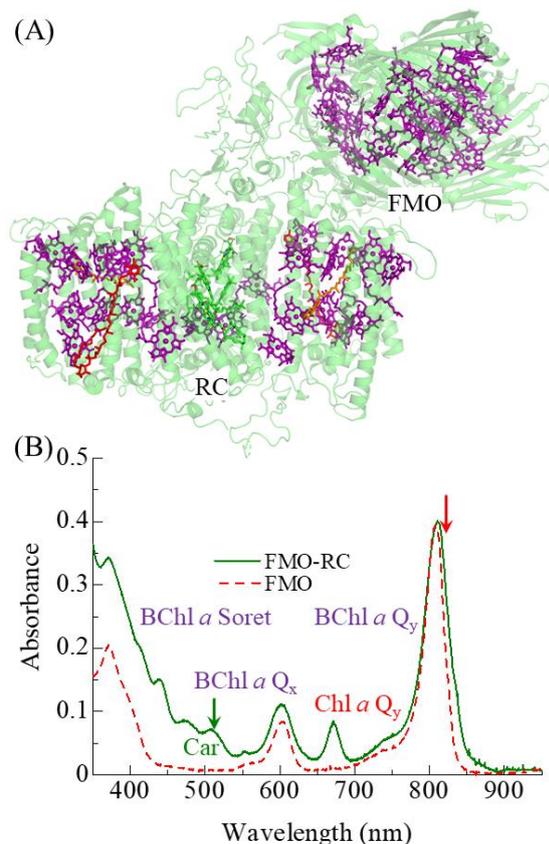


図 1: (A) 高分解能低温電子顕微鏡により決定された *C. tepidum* 由来 FMO-RC 複合体の色素とタンパク質の三次元配列。(B) *C. tepidum* から調製した FMO タンパク質及び FMO-RC 複合体の定常吸収スペクトル。

励起後、 S_2 より緩和した S_1 から高次の励起状態 S_n への遷移を表す。この S_1 過渡吸収信号は、遅延時間10 psではほとんど消失していた。また、800 nmより長波長側ではBChl *a*の Q_y 帯の褪色信号が観測された。この信号は遅延時間0.1 psで現れ、時間の経過とともに信号が増大している。505 nmの励起光でCarを励起後にBChl *a*の信号が観測されていることから、Car→BChl *a*のエネルギー移動が起こっていることが示される。140 Kと296 Kのスペクトルを比較すると、140 Kでは不均一広がりが抑制されたことによりスペクトル構造が現れている。特にBChl *a*の Q_y 褪色ではこの効果が顕著に表れ、810 nmと830 nmにピークが観測された。

図2(B)に、励起波長505 nmでFMO-RC複合体を光励起後に観測された信号の時間変化を示す。得られた信号の時間依存性に対し、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。Carの S_1 過渡吸収

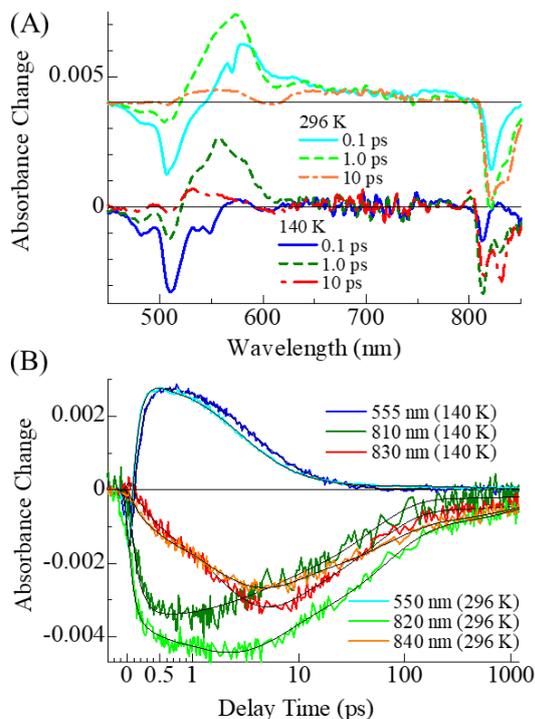


図2: FMO-RC複合体における505 nm励起後の(A)光誘起吸収スペクトルと(B)その時間依存性。細線はフィッティング曲線を表す。

信号は、 S_2 より緩和した S_1 の寿命で減衰する。したがって、その立ち上がり・減衰時間が S_2 と S_1 の寿命に相当する。先行研究では、溶液中のクロロバクテンと γ -カロテンの S_2 と S_1 寿命は、それぞれ220 fsと5.4~7.1 psと報告されている^{10,11}。これに対してRC中での S_2 と S_1 寿命は、100 fs (296 K)と120 fs (140 K)、1.9 ps (296 K)と2.3 ps (140 K)であり、BChl *a*へのエネルギー移動により本来の寿命より短くなっていた。140 Kと296 Kのダイナミクスを比較すると、 S_2 と S_1 寿命ともに140 Kでは長くなり、温度の低下とともにCar→BChl *a*のエネルギー移動速度が低下している。このことは、140 Kにおけるスペクトル不均一広がりの減少による重なり積分が小さくなったこと、周辺タンパク質により決まる色素分子間の配向因子が小さくなったことが原因であると考えられる。

図3(A)に140 K及び296 KにおけるFMO-RC複合体を820 nm光パルスで励起後の光誘起吸収スペクトルを示す。光励起後、

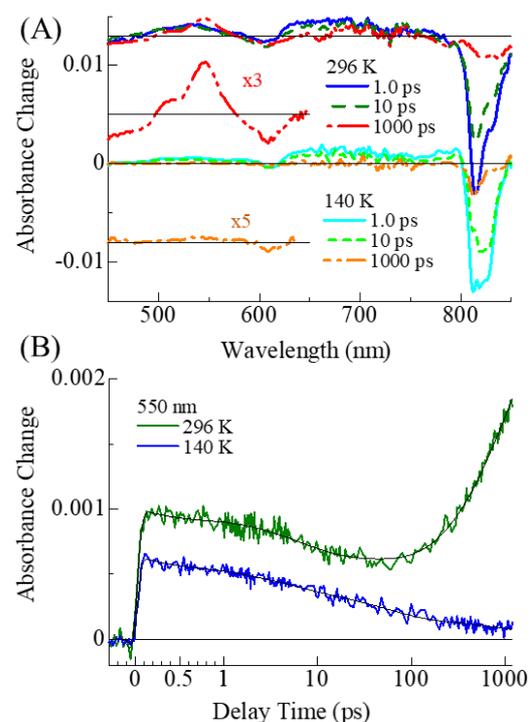


図3: FMO-RC複合体における820 nm励起後の(A)光誘起吸収スペクトルと(B)その時間依存性。細線はフィッティング曲線を表す。

810~840 nm に BChl *a* の Q_y 褪色信号と可視域全域にブロードな過渡吸収信号が観測された。これらの信号は、遅延時間の経過とともに減少したものの、296 K では 550 nm に新たな過渡吸収信号が現れた。この信号は、Car の三重項励起状態 T₁ による過渡吸収であると考えられる^{5, 12, 13}。光合成タンパク質で観測される Car の三重項励起状態 T₁ は光保護機能として、分子内項間交差と三重項間エネルギー移動 BChl *a* S₁ (Q_y) → BChl *a* T₁ → Car T₁ により、~20 ns の時間スケールで生成されることが報告されている¹²。一方、本研究で観測された Car T₁ 信号は、1 ns 以下の時定数で立上がっていることから (図 3(B))、異なる機構で Car T₁ が生成していると考えられる。また興味深いことに 140 K では Car T₁ 信号が観測されなかった。これまで T₁ 生成の温度依存性として一重項分裂 (singlet fission) が報告されており¹⁴、本研究で観測された Car T₁ は BChl *a* S₁ (Q_y) の一重項分裂により生成されている可能性が示唆された。

4. まとめ 本研究では、緑色硫黄細菌 *C. tepidum* 由来 RC に含まれる Car の役割を解明することを目的とし、*C. tepidum* より調製した FMO-RC 複合体における 100 フェムト秒ポンプ・プローブ分光を行った。Car を励起後の励起状態ダイナミクスでは、超高速かつ高効率な Car → BChl *a* のエネルギー移動が観測され、RC に結合する Car は光捕集機能を果たしていることが示された。一方、BChl *a* 励起後には、296 K で Car T₁ 信号が 1 ns 以下の立上り時間で観測された。この信号の生成過程は温度依存性を示し、140 K では観測されなかった。本研究で観測された Car T₁ 生成は、従来報告された光保護機能による Car T₁ 生成よりも効率的であり、解明されていない新たな機構が働いていると考えられる。

参考文献

- [1] C. J. Gisriel, C. Azai, and T. Cardona, *Photosynth. Res.* **149**, 329 (2021).
- [2] R. E. Fenna, and B. W. Matthews, *Nature* **258**, 573 (1975).
- [3] J.-H. Chen, H. Wu, C. Xu, X.-C. Liu, Z. Huang, S. Chang, W. Wang, G. Han, T. Kuang, J.-R. Shen, and X. Zhang, *Science* **370**, eabb6350 (2020).
- [4] T. Polivka, and H. A. Frank, *Acc. Chem. Res.* **43**, 1125 (2010).
- [5] H. A. Frank, and R. J. Cogdell, *Photochem. Photobiol. Sci.* **63**, 257 (1996).
- [6] S. Takaichi, and H. Oh-oka, *Plant Cell Phys.* **40**, 691 (1999).
- [7] C. Azai, J. Harada, S. Fujimoto, S. Masuda, and D. Kosumi, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **403**, 112828 (2020).
- [8] R. Kojima, H. Yamamoto, C. Azai, C. Urugami, H. Hashimoto, D. Kosumi, and H. Oh-oka, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **401**, 112758 (2020).
- [9] Y. Hirota, H. Serikawa, K. Kawakami, M. Ueno, N. Kamiya, and D. Kosumi, *Photosynth. Res.* **148**, 181 (2021).
- [10] M. Fuciman, P. Chabera, A. Zupcanova, P. Hribek, J. B. Arellano, F. Vacha, J. Psencik, and T. Polivka, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 3112 (2010).
- [11] D. M. Niedzwiedzki, and L. Cranston, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 13245 (2015).
- [12] D. Kosumi, T. Horibe, M. Sugisaki, R. J. Cogdell, and H. Hashimoto, *J. Phys. Chem. B* **120**, 951 (2016).
- [13] D. M. Niedzwiedzki, D. J. K. Swainsbury, D. P. Canniffe, C. N. Hunter, and A. Hitchcock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **117**, 6502 (2020).
- [14] M. B. Smith, and J. Michl, *Chem. Rev.* **110**, 6891 (2010).