単一分子分光による光合成アンテナ複合体の光励起状態の解明

Single-Molecule Spectroscopy of Photo-excited States of Photosynthetic Antenna Complex

代表研究者　東京工業大学　松下 道雄　Tokyo Institute of Technology　Michio MATSUSHITA

The first step of the photosynthesis is energy transfer from photo-excited pigments to the reaction center where charge separation takes place. This energy transfer process is difficult to study on molecular basis because molecular properties are averaged over structurally heterogeneous ensemble of the light-harvesting (LH) pigment-protein complexes. Recent developments of lasers and photo-detectors enable spectroscopy of individual molecules, providing direct access to photo-physics of individual complexes. We have built a laser-scanning confocal fluorescence microscope operating at liquid helium temperature. The sample is kept at 1.5 K to fix conformation of the protein. In order to investigate LH complexes in natural environment, LH complexes extracted and purified in the micelle of LDAO or OG are transferred into lipid bilayer by dialysis. LH complex to lipid bilayer ratio of 5:3000 turned out to produce aggregate of LH complexes. Photo-bleaching of the aggregate indicates energy transfer among complexes. Emission from an aggregate of 4-5 complexes decay exponentially to the level of a single complex, and the remaining emission is bleached in one step.

研究目的

光合成過程で最も重要な光捕集機構の解明は、光と物質の相互作用研究の中でも特に大きな意味を持つ。近年、優れたレーザーと高感度蛍光検出法の組み合わせにより単一分子の分光学的観測が可能になってきた。本研究はこのような最近の実験手法を取り入れて光捕集機構の核心を明らかにしようとするものである。

植物や光合成細菌は光合成における集光効率を高めるために、一個の光合成反応中心の周りに100個以上のクロロフィル色素を配置し、これらが光捕集のためのアンテナとして働く。そして、アンテナ色素から反応中心へのエネルギー移動は90%を超える驚異的な効率で進む。このアンテナ色素は多数の色素とタンパク質との複合体として生体膜中に二次元組織化されている。エネルギー移動機構を理解する第一歩は色素・タンパク複合体の光励起状態の解明である。色素・タンパク複合体は無数の立体構造を持つので、個々の立体構造における励起状態を明らかにすることがエネルギー移動の解明に不可欠である。本研究はこのような観点から一個一個の色素・タンパク複合体の分光学的研究を行う。

研究経過

我々は14年度に新規研究室を立ち上げるに当たり、低温で単一分子からの発光が検出できる装置の製作から開始した（Fig. 1参照）。

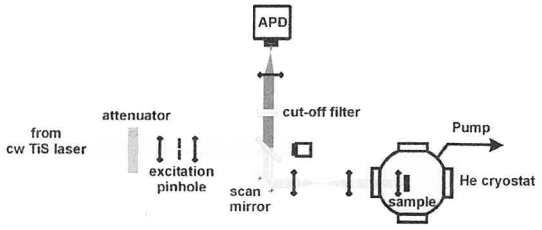

Fig. 1　Low-temperature laser scanning confocal fluorescence microscope

製作したのは、液体ヘリウムクライオスタット中に試料を置き、極低温での測定が可能な共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡である。光源はArイオンレーザー励起のcwTiSレーザーで、発振波長は780～920 nmである。励起レーザービームはピンホールに集光してモードを整えた後、平行ビームにしてヘリウムクライオスタット中の対物レンズに導いた。対物レンズにはn.a.0.55の非球面単レンズを用いた。レンズの焦点距離は1.45 mmであり、液体ヘリウムの屈折率が1.025と空気とわずかに異なるため、液体ヘリウム中では焦点距離が約50 μm短くなる。従って液体ヘリウム中で試料に対する対物レンズの焦点合わせを行わなければならない。そのために、1 μmの精度で焦点合わせができる試料ステージを製作した。試料中の単一分子からの発光は同じ対物レンズで集められ、ビームスプリッターを通して検出器へ導かれる。励起光波長の迷光を取り除くために、バンドパスフィルターを5枚重ねてアイソレーション12 dBを達成した。検出器には単一光子検出アヴァランシェ・フォトダイオードを用いた。検出効率は900 nmで約30 %、ダークカウントは約20 counts/secである。

組み上げた共焦点蛍光顕微鏡の空間分解能は800 nmと回折限界に近い性能を持ち(Fig. 2)、

試料の発光の検出効率は約 0.5 %、発光の検出限界はおよそ 500 photon/sec でパワーにして 10^{-16} W のオーダーである。

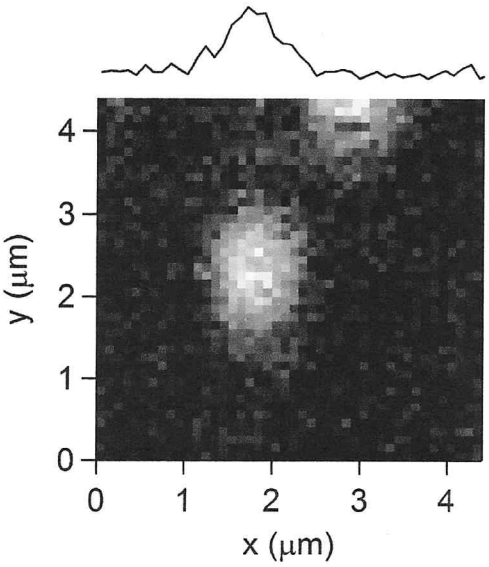

Fig. 2　Fluorescence image of single LH complexes

考察

この装置を用いて、光捕集(Light-Harvesting)色素・タンパク複合体（LH 複合体）について、一個の LH 複合体の発光を観測できることを確かめた。複合体はミセルとして可溶化し、その pM 程度の薄い溶液にポリマーを加えてスピンコートすることでポリマー薄膜中に分散させた。顕微鏡の焦点である 1 μm^2 中に一個以下の複合体しか存在しない濃度で一個の複合体からの発光を捉えることができた。発光観測は液体ヘリウム温度だけでなく、液体窒素温度でも十分可能であった。発光体は一個であることは、クライオスタット中に酸素を導入して複合体を光退色させたとき、観測している発光信号が一段階で零になったことで確認した（Fig. 3）。

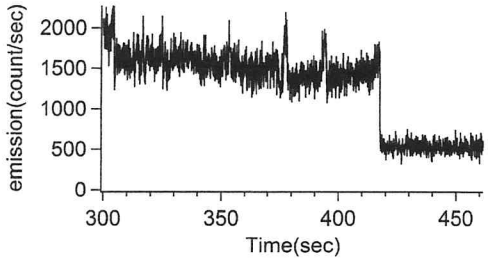

Fig. 3　Photo-bleaching of one light-harvesting complex

新しい現象としてLH複合体間の励起エネルギー移動を示唆する光退色が見つかった。LH複合体の会合体の光退色を液体窒素温度で調べたところ、複合体の数と同じ段数を持つ階段状の退色は見られず、複合体が一個になるまで徐々に発光が減少し、最後の一個の複合体は一段階で退色した（Fig. 4）。このことは、複数の複合体うちで発光を担っているのは一個の複合体であり、他の複合体は光吸収体として振る舞っていると考えると説明できる。一個の複合体には27個のバクテリオクロロフィル色素が含まれているので、その一個一個が順番に光化学反応によって光を吸収できなくなっていると解釈できるからである。

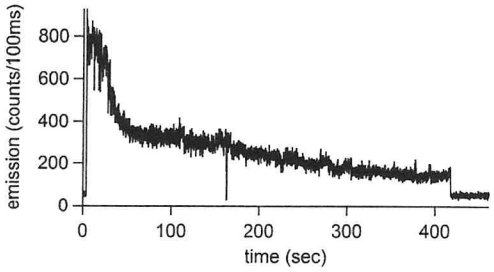

Fig. 4　Photo-bleaching of an aggregate of light-harvesting complexes

共焦点顕微鏡は試料中の一点の微弱な発光を観測するのに適しているが、試料全体を知るには照射ビームを試料上で走査しなければならない。そこで、試料上に発光分子がどのように分布しているかを調べるために、100 μm 四方を照射してその中の単一発光分子を観測できる wide field 照射顕微鏡の光学系を共焦点顕微鏡に付け加えた。現在は顕微鏡をより明るいものにするために、対物レンズの改良に取り組んでいる。現在使用している対物レンズは、1) n.a.が小さい　2) 空気中で設計されているので液体ヘリウムの屈折率 1.025 の影響を受ける　3) 色収差がある、という三つの問題を抱えている。これらを解消すべく、n.a.0.65 の非球面単レンズ、n.a.1.06 の GRIN レンズ、n.a.0.65 の反射型対物レンズの三種類を検討している。

最終的には天然の環境である脂質二重膜中に一個一個孤立した LH 複合体を分光測定することが目標である。このため、脂質二重膜中で LH 複合体が会合しない条件を探すために、脂質に対する LH 複合体の濃度や脂質分子の種類を変えた実験を行っている。

LH2 複合体のミセルの試料は名古屋工業大学応用化学科南後研究室から提供していただいた。

研究発表

口頭発表

1．松下道雄；「光合成アンテナ複合体の単一分子分光」、日本物理学会 2003 年秋の分科会（岡山、2003）

2．小井川浩之、星野創、加藤太朗、松下道雄；「単一分子分光のための低温共焦点蛍光

顕微鏡の製作」、分子構造総合討論会 2003（京都、2003）

3．星野創、小井川浩之、加藤太朗、松下道雄；「単一分子分光による光合成アンテナ複合体の研究」、日本物理学会 2004 年春の年会（福岡、2004）

4．加藤太朗、小井川浩之、星野創、内山大輔、キムチャンマン；「単一分子分光のための低温共焦点顕微装置の製作」、日本物理学会 2004 年春の年会（福岡、2004）