B705

transient ESR によるヘリオバクテリアの FeS センターの構造解析

○宮本 良¹、大岡 宏造²、三野 広幸¹、伊藤 繁¹ (¹ 名大院・理・物質、² 阪大院・理・生物)

絶対嫌気性生物ヘリオバクテリアの光合成反応中心は酸素下での不安定性に邪魔され、構造、機能ともに解明ができてきた。この反応中心は植物光化学系 I の祖先型でありホモダイマー型と考えられ、左右対称な反応中心構造中でどのように電子移動が進むか興味をもたれてきた。我々は *Heliobacterium modesticaldum* 膜表面を用いて閃光照射に伴う transient ESR 測定を行い、極低温 8 K で 1 ms と 10 ms の 2 つの減衰時定数をもつ信号成分を観測した。1 ms の減衰成分は信号強度が強く、スピン分極に由来した信号と考えられる。似たような時定数をもつスピン分極信号は光化学系 I においても観測されるが、観測されたスピン分極スペクトルパターンは光化学系 I で見られる P700 とキノンのラジカル対 (P700⁺ A₀⁻) のものとは大きく異なっていた。また、スピン分極後に観測される P798⁺ (あるいは F_X⁻) 信号の減衰時定数は 77 K 吸収分光で見られた P798⁺F_X⁻ の時定数 10 ms と近かった。このことから観測されたスピン分極 ESR 信号は P798⁺F_X⁻ 由来のもので、スピン分極解消後にラジカル対が 10 ms で電荷再結合すると考えられた。得られた F_X⁻ 信号は光化学系 I で観測された信号に比べ *g*-因子の異方性がかなり小さく対称軸への構造ひずみが小さいことが示唆される。これはホモダイマーであることで対称性が向上したと考えられる。構造についてさらに詳細な解析を進めた。

R. Miyamoto, H. Ohoka, H. Mino and S. Itoh : The structure analysis of FeS centers in *Heliobacterium* by transient ESR

B707

単一クロロゾームの極低温蛍光スペクトル観測

○柴田 稜¹、佐賀 佳央²、民秋 均²、伊藤 繁¹ (¹ 名大院理、² 立命館大院理工)

緑色光合成細菌のアンテナ複合体であるクロロゾームは、脂質一重膜の袋に数百から数千分子のバクテリオクロフィル (BChl) が詰まった構造をしている。クロロゾーム中で BChl は、蛋白質へは結合せずに自己組織化により会合体を形成している。最近、緑色硫黄細菌 *Chlorobium (Chl.) tepidum* の単一クロロゾームの蛍光スペクトル測定が常温で行われ、一つ一つのクロロゾームで蛍光スペクトルのピーク位置が異なることが見出された。これをより詳しく解析するため、我々は単一クロロゾームのスペクトルを、よりシャープなスペクトルの得られる低温で測定するシステムを確立した。この装置では、レーザー共焦点顕微鏡に液体ヘリウムフロー型のクライオスタットを導入し、4 K まで測定可能である。下図は *Chl. Tepidum* のクロロゾームを石英基板上に吸着させた試料の、22 K における蛍光像である。励起波長、観測波長はそれぞれ 488 nm、785 nm である。これまでのところ、クロロゾーム毎の蛍光スペクトルはほとんど同じ波長にピークを持ち、常温の測定で見られた複合体ごとの不均一性は見られていない。ポスターでは、単一クロロゾームの蛍光強度、スペクトルの温度依存性や、励起波長依存性について議論する。

Y. Shibata, Y. Saga, H. Tamiaki, and S. Itoh : Fluorescence spectrum observation of single chlorosome at cryogenic temperature

B706

ヘリオバクテリア光合成反応中心の電子移動機構

○大岡 宏造¹、岩城 雅代²、宮本 良³、三野 広幸³、伊藤 繁³ (¹ 阪大院・理・生物、² ロンドン大・生物、³ 名大院・理・物理)

ヘリオバクテリアの光合成反応中心は、シアノバクテリアや高等植物の系 I 型反応中心と同じ Fe-S タイプである。この光合成細菌はグラム陽性の絶対嫌気性細菌であり、集光性タンパクやアンテナ色素会合体をもたない。反応中心コアタンパクはホモダイマー構造と推測され、含まれる電子伝達成分やそれらの分子内配置・配向性は系 I 型と同じであることが期待される。我々は系 I 型反応中心の電子移動機構の本質を理解するには、最も単純な複合体構成である緑色イオウ細菌の反応中心 (Fe-S タイプ) に関する情報が不可欠であると考え、その生化学的・分光学的解析をこれまで推し進めてきた。今回、始源型反応中心の性質をさらに詳しく調べていく目的で、ヘリオバクテリアの反応中心の研究にも着手することにした。現在までに我々は、好熱性の *Heliobacterium modesticaldum* から安定なコアタンパク標品を単離することに成功している。コアタンパクを用いた低温 77 K での閃光照射実験では、P798⁺ は膜標品と同様に $t_{1/2} = 2$ ms で再還元されたが、二次電子受容体であるキノンの存在を示すデータは得られなかった。さらに膜標品とコアタンパクを用いて、ESR による Fe-S センターの観測を行った。膜標品ではジチオナイト添加によりセンター A、B (F_A および F_B) のシグナルが観測され、これはすでに Nitschke ら (1990 年) により報告されているとおりである。極低温における光照射を試みたところ、膜標品、コアタンパクの両者においてセンター X (F_X) に由来すると思われるシグナルが初めて観測された。ヘリオバクテリアの反応中心の構造と電子移動機構について考察したい。

H. Oh-oka, M. Iwaki, R. Miyamoto, H. Mino and S. Itoh : Electron Transfer Mechanism in the *Heliobacterial* Photosynthetic Reaction Center

B708

固体 2 次元 NMR によるクロロゾームの構造解析

○江川 文子¹、秋庭 健吾¹、溝口 正²、原 一公³、柿谷 吉則³、小山 泰³、藤原 敏道¹、阿久津 秀雄¹ (¹ 阪大・蛋白研、² 立命館大・理工、³ 関西学院大・理工)

緑色光合成細菌のアンテナ複合体クロロゾームは、光エネルギーを集めて一重項エネルギーとして光反応中心に送る。主要構成成分はバクテリオクロフィル c (BChl c) の異性体混合物であり、クロロゾーム中では高次会合体を形成していることが知られている。そこで、固体高分解能 2 次元 NMR を使って、¹³C 標識したクロロゾームとモデル系として単離した R[P,E]BChl c 及び S[I,E]BChl c それぞれの高次会合体の構造解析を行った。

高分解能スペクトルを得るためにマジック角試料回転 (MAS) 下で固体 2 次元 NMR スペクトルを測定した。まず、共有結合している ¹³C-¹³C 相関のみを交差ピークとして観測するために短い混合時間で RFDR 法を、また、ファルネシルのように近くに集まったシグナルを区別して観測するために SPC-5 法を用いて、完全に帰属した。次に、原子間距離が比較的長い ¹³C-¹³C 相関が交差ピークとして観測できるスピン拡散法を使って測定し、2 次元スペクトルを得た。スピン拡散法で分子内相関と分子間相関が区別できないという問題点は、¹³C 標識 BChl c 及び非標識 BChl c を 1:1 で混合した会合体を使うと分子間相関の信号が減少することを利用して解決できる。そこで、分子間相関を解析するために 100 % 標識及び 50 % 標識試料について、スピン拡散法の混合時間を 25 ms、50 ms、100 ms、250 ms、400 ms と変えて測定を行った。短い混合時間で観測された交差ピークは少なく、混合時間が長くなると観測される交差ピークは多くなった。その内、50 % 標識試料で信号強度が落ちた分子間相関は 25 ms から観測された。この短い混合時間で抽出された分子間相関は短い距離情報である。このようにして得られた距離情報を基に、カラム内及びカラム間の構造について検討を行っている。

A. Egawa, K. Akiba, T. Mizoguchi, K. Hara, Y. Kakitani, Y. Koyama, T. Fujiwara and H. Akutsu : Structural Analysis of Chlorosomes by Two Dimensional Solid-State NMR