

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21750017

研究課題名（和文） 極低温2光子励起顕微鏡による光合成系エネルギー捕集ダイナミクスの観測

研究課題名（英文） Study of light-harvesting dynamics in photosynthetic system with cryogenic two-photon excitation microscope

研究代表者

柴田 穰 (SHIBATA YUTAKA)

東北大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：20300832

研究成果の概要（和文）：本研究により、世界で初めて極低温用の生物光学顕微鏡において0.9という高い開口数を実現し、液体ヘリウム温度下で300 nm程度の高い空間分解能で生体試料を観測する手法を実現した。開発した顕微鏡では色収差も高い精度で補正され、時-空間-スペクトル分解測定への応用に最適である。現時点での問題は、数10分程度で±100 nm程度サンプル位置が揺らぐという点であり、今後改善していく必要がある。

研究成果の概要（英文）：I have succeeded to develop a novel biological optical microscope with a high numerical aperture of 0.9 operative at cryogenic temperature for the first time. The developed microscope enables the microscope observation of biological samples with a 300-nm spatial resolution even at liquid He temperature. The system is equipped with a chromatic aberration corrected objective lens, and then optimized for the application of the time-space-resolved spectroscopy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎科学・物理化学

キーワード：レーザー走査顕微鏡、顕微分光法、クロロフィル、蛍光顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

高等植物の光合成系タンパク質の構造が次々と解かれ、非常に複雑なこれらのタンパク質の光反応ダイナミクスを構造情報を基に理解するには、反応速度が遅くなる極低温での超高速蛍光分光法による研究が有効であることをこれまでの研究で示していた。

## 2. 研究の目的

蛍光法の利点は、透明試料を必要としないた

め葉をそのままの状態を観測するなどより生きた状態に近いサンプルを対象にでき、また顕微鏡との結合による高空間分解能の観測も可能であることがある。この利点を生かすため、極低温で動作可能な2光子励起顕微鏡を開発し超高速蛍光法と組み合わせることで、高い時間、空間分解能を有する測定システムを構築することを目指した。

## 3. 研究の方法

開発した顕微鏡では、サンプル冷却は既設のHe循環型冷凍機で行う。銅で作成するサンプルルームおよび3次元空間スキャン用のピエゾアクチュエータ、対物レンズは全て断熱真空チャンバー内に固定し、作動距離の短い高NAの対物レンズでも観測可能にする。

#### 4. 研究成果

本研究により、世界で初めて極低温用の生物光学顕微鏡において0.9という高い開口数を実現した。これにより、液体ヘリウム温度下で300 nm程度の高い空間分解能で生体試料を観測する手法を実現することができた。開発した顕微鏡では色収差も高い精度で補正され、時-空間-スペクトル分解測定への応用に最適である。開発した顕微鏡はほとんどの部分が自作であり、波長800 nm、パルス幅約140 fsのパルスレーザーからの光を励起光源としたレーザー走査型の2光子励起顕微鏡である。2光子励起顕微鏡であることから、高い光軸方向の分解能も達成されている。また、適宜励起レーザーを変更することで、1光子励起の共焦点顕微鏡とすることも可能である。サンプルは銅製のサンプルホルダ内で厚さ0.3 mmの窓の中に封じ込まれて真空には露出しない。そのため、wetな生体試料も観察可能となっている。もちろん、開口数0.9は0.3 mmの窓厚を補正した上での値である。サンプルホルダがコールドヘッドに接続されてサンプルが冷却されるが、銅メッシュを介した接続を採用してホルダとコールドヘッドを機械的に分離している。この機構により、従来の極低温顕微鏡で問題となっていたコールドヘッドの伸縮や振動によるサンプル位置の変化が、大幅に抑えられるようになった。現時点でも、数10分程度で±100 nm程度サンプル位置が揺らぐ、という問題が残っており、今後改善していく必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計11件)

1. Hirohisa Miyake, Masayuki Komura, Shigeru Itoh, Makiko Kosugi, Yasuhiro Kashino, Kazuhiko Satoh, and Yutaka Shibata, Multiple dissipation components of excess light energy in dry lichen revealed by ultrafast fluorescence study at 5 K, *Photosynth. Res.*, 110, 39-48 (2011). 査読有
2. 柴田 穰, 光合成系での光捕集過程を構造に立脚して理解する, 光合成研究, 21 卷

(3), 128-134 (2011). 査読無

3. Masayuki Komura, Atsushi Yamagishi, Yutaka Shibata, Ikuko Iwasaki, and Shigeru Itoh, Mechanism of strong quenching of photosystem II chlorophyll fluorescence under drought stress in a lichen, *Physciella melanchla*, studied by sub-picosecond fluorescence spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, 1797, 331-338 (2010). 査読有
4. Hitoshi Tamiaki, Shingo Tateishi, Shosuke Nakabayashi, Yutaka Shibata, and Shigeru Itoh, Linearly polarized light absorption spectra of chlorosomes, light-harvesting antennas of photosynthetic green sulfur bacteria, *Chem. Phys. Lett.*, 484 333-337 (2010). 査読有
5. Yutaka Shibata, Atsushi Yamagishi, Shunsuke Kawamoto, Tomoyasu Noji, and Shigeru Itoh, Kinetically Distinct Three Red Chlorophylls in Photosystem I of *Thermosynechococcus elongatus* Revealed by Femtosecond Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy at 15 K, *J. Phys. Chem. B*, 114, 2954-2963 (2010). 査読有
6. Yoshitaka Saga, Yutaka Shibata, and Hitoshi Tamiaki, Spectral properties of single light-harvesting complexes in bacterial photosynthesis, *J. Photochem. and Photobiol. C*, 11, 15-24 (2010). 査読有
7. Atsushi Yamagishi, Yohei Ikeda, Masayuki Komura, Hiroyuki Koike, Kazuhiko Satoh, Shigeru Itoh, and Yutaka Shibata, Shallow sink in an antenna pigment system of photosystem I of a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*, revealed by ultrafast fluorescence spectroscopy at 17 K, *J. Phys. Chem. B*, 114, 9031-9038 (2010). 査読有
8. Yumiko Kataoka, Yutaka Shibata, and Hitoshi Tamiaki, Intramolecular excitation energy transfer from visible-light absorbing chlorophyll derivatives to a near-infrared-light emitting boron dipyrromethene moiety, *Chem. Lett.*, 39, 953-955 (2010). 査読有
9. Yutaka Shibata, Shingo Tateishi, Shosuke Nakabayashi, Shigeru Itoh, and

Hitoshi Tamiaki, Intensity borrowing via excitonic couplings among Soret and Qy transitions of bacteriochlorophylls in the pigment aggregates of chlorosomes, the light-harvesting antennae of green sulfur bacteria, *Biochemistry*, 49, 7504-7515 (2010). 査読有

10. Yutaka Shibata, Yoshiya Murai, Yosuke Satoh, Yoshimasa Fukushima, Koji Okajima, Masahiko Ikeuchi, and Shigeru Itoh, Acceleration of electron-transfer induced fluorescence quenching upon conversion to the signaling state in the blue-light receptor, TePixD from *Thermosynechococcus elongatus*, *J. Phys. Chem. B*, 113, 8192-8198 (2009). 査読有

11. Yutaka Shibata, Yoshitaka Saga, Hitoshi Tamiaki, and Shigeru Itoh, Anisotropic Distribution of Emitting Transition Dipoles in Chlorosome from *Chlorobium tepidum*: Fluorescence Polarization Anisotropy Study of Single Chlorosomes, *Photosynth. Res.*, 100, 67-78 (2009). 査読有

〔学会発表〕(計27件)

国際会議

1. Yutaka Shibata, Hirohisa Miyake, Masayuki Komura, Makiko Kosugi, Yasuhiro Kashino, Kazuhiko Satoh, Shigeru Itoh Drought-stress induces two excitation-energy dissipation channels in lichen; observation by ultrafast fluorescence spectroscopy  
The 70th Okazaki International Conference on Molecular mechanism of photosynthetic energy conversion: the present research and future prospects, December 4-6, 2010, Okazaki, Japan.  
(Poster)

2. Yutaka Shibata, Atsushi Yamagishi, Masayuki Komura, Tomoyasu Noji, Yohei Ikeda, Hiroyuki Koike, Kazuhiko Satoh, Shigeru Itoh  
Light-harvesting dynamics in photosystem I with and without red chlorophylls studied by cryogenic ultrafast fluorescence spectroscopy  
15th International Congress of Photosynthesis Photosynthetic Light-Harvesting, August 22-27, 2010, Beijing, China.  
(Poster)

3. Makiko Kosugi, Akihisa Miyake, Yasuhiro Kashino, Yutaka Shibata, Kazuhiko Satoh, Shigeru Itoh

Lichen assists the drought-induced fluorescence quenching of photobiont green algae through arabitol

15th International Congress of Photosynthesis Photosynthetic Light-Harvesting, August 22-27, 2010, Beijing, China.

(Poster)

4. Yutaka Shibata, Shingo Tateishi, Shosuke Nakabayashi, Shigeru Itoh, Hitoshi Tamiaki

Intensity borrowing via excitonic couplings between Soret and Qy transitions of bacteriochlorophyll aggregates in chlorosomes

Satellite meeting to the 15th International Congress of Photosynthesis Photosynthetic Light-Harvesting, August 18-22, 2010, Tianjin, China.

(Poster)

5. Yutaka Shibata

Excitation-Energy-Transfer Pathway in Photosystem I Reaction Center Revealed by Ultrafast Fluorescence Spectroscopy  
Fifty Years of Biophysics Research at Nagoya University, March 12-14, 2010, Nagoya University.

(Poster)

6. Yutaka Shibata

Excitonic States of Huge Light-Harvesting Pigment Aggregates in Chlorosomes  
18th ISPPCC Satellite Symposium on Photochemistry and Photobiology of Supramolecular Systems and Coordination Compounds, July 9-11, 2009, Ritsumeikan University, Japan

(Invited)

国内学会発表

1. 柴田 穰、加藤 渉、黄化葉緑化過程の顕微分光観察のための極低温高空間分解能顕微鏡の開発

第52回日本植物生理学会年会、2011年3月16-18日、京都産業大学

2. 柴田 穰、高い空間分解能を有する極低温光学顕微鏡の開発

「光合成初期過程器官の時間・空間分解光」第一回公開シンポジウム、2012年3月13日、立命館大学

3. 柴田 穰、超高速分光と理論解析の融合でここまで分かってきた光合成系の光捕集過程

東北大学多元研ミニシンポジウム「物理化学的手法を活用した生命科学研究の新展開」、2011年1月24日、東北大学

4. 柴田 穰、西 俊輔、川上 恵典、沈 建仁、Thomas Renger、極低温超高速蛍光測定と理論計算の融合で見えてきた光化学系 II の光捕集ダイナミクス

第5回分子科学討論会、2011年9月20-23日、北海道大学

5. 加藤 渉、柴田 穰、開口数 0.9 を有する極低温顕微分光システムの開発

第5回分子科学討論会、2011年9月20-23日、北海道大学

6. 柴田 穰、超高速蛍光実験と理論計算の融合で見えてきた光捕集ダイナミクス

第2回光合成学会シンポジウム、2011年6月3-4日、京都大学  
(招待講演)

7. 柴田 穰、西 俊輔、野地 智康、川上 恵典、沈 建仁、Thomas Renger、結晶構造情報に基づくシミュレーションによる光化学系 II 反応中心の時間分解蛍光スペクトルの解析

日本物理学会 2011 年年会、2011年3月25-28日、新潟大学

8. 柴田 穰、超高速蛍光実験と理論計算の融合で見えてきた光化学系 II の光捕集過程  
阪大蛋白研セミナー「分子科学と生理学が解き明かす植物の光エネルギー変換の新展開」、2011年3月9-10日、大阪大学

9. 加藤 渉、田原 由香里、柴田 穰、共焦点レーザー顕微分光法による黄化 *Zea mays* の光合成系構築過程の解明

日本生物物理学会第 48 回年会、2010年9月20-9月22日、東北大学

10. 柴田 穰、西 俊輔、山岸 篤史、小村 理行、植物型光合成反応中心の光捕集過程：構造情報に基づく理解

日本物理学会 2010 年年会、2010年3月20-23日、岡山大学

11. 柴田 穰、奥井 伸輔、中川 義章、田原 由香里、伊藤 繁、黄化葉の緑化途上における色素-タンパク質複合体形成過程：ピコ秒時間分解蛍光測定による解析

第 51 回日本植物生理学会年会、2010年3月18-21日、熊本大学

12. 田原 由香里、奥井 伸輔、加藤 渉、柴田 穰、伊藤 繁、低温共焦点レーザー顕微スペクトル蛍光法による光合成色素-タンパク質複合体の構築過程の検討

第 51 回日本植物生理学会年会、2010年3月18-21日、熊本大学

13. 西 俊輔、小村 理行、野地 智康、川上 恵典、沈 建仁、高橋 武志、菓子野 康浩、柴田 穰、伊藤 繁、光化学系 II 単量体と二量体でのエネルギー移動の比較：シアノバクテリアと原始紅藻の光化学系 II での共通機構

第 51 回日本植物生理学会年会、2010年3月18-21日、熊本大学

14. 柴田 穰、奥井 伸輔、中川 義章、田原 由香里、伊藤 繁、ピコ秒時間分解蛍光分光法による黄化葉の緑化途上における光合成系タンパク質複合体構築過程の観測

日本生物物理学会第 47 回年会、2009年10月30-11月1日、徳島文理大

15. 田原 由香里、柴田 穰、山本 治、藤田 裕一、伊藤 繁、ラン藻 *Leptolyngbya boryana* における光非依存型プロトクロロフィリド還元酵素欠損株の細胞内色素分布の顕微分光法による解析

日本生物物理学会第 47 回年会、2009年10月30-11月1日、徳島文理大

16. 西 俊輔、小村 理行、野地 智康、川上 恵典、沈 建仁、柴田 穰、伊藤 繁、極低温時間分解蛍光測定による *Thermosynechococcus vulcanus* の光化学系 2 の二量体と単量体のエネルギー移動の比較

日本生物物理学会第 47 回年会、2009年10月30-11月1日、徳島文理大

17. 西 俊輔、小村 理行、野地 智康、川上 恵典、沈 建仁、柴田 穰、伊藤 繁、極低温時間分解蛍光測定による好熱性シアノバクテリア *T. vulcanus* 光化学系 II の二量体と単量体のエネルギー移動の比較

第3回分子科学討論会、2009年9月21-24日、名古屋大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://opc.chem.tohoku.ac.jp/j/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴田 穰 (SHIBATA YUTAKA)  
東北大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：20300832

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：