

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04356

研究課題名(和文) 極低温顕微分光による光合成研究の新展開

研究課題名(英文) New Frontier of Photosynthesis Research by Using the Cryogenic Optical Microscope

研究代表者

柴田 穰 (Shibata, Yutaka)

東北大学・理学研究科・准教授

研究者番号：20300832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：極低温顕微鏡を利用して、光合成のモデル生物であるクラミドモナスの光合成タンパク質の細胞内偏在を初めて観測した。二つの光化学系の励起バランスを保つ機構であるステート遷移と呼ばれる現象で、光エネルギーを集めるアンテナタンパク質が移動していることを初めて画像計測から明らかにした。また、励起波長を掃引叶となるシステムを構築し、単一光合成タンパク質の励起スペクトル測定を初めて行った。蛍光スペクトルが短波長にシフトしている分子では、励起スペクトルの長波長側の強度が高いことが明らかとなり、励起エネルギーの流れに関する情報が得られた。

研究成果の概要(英文)：By using the developed cryogenic microscope system, intracellular inhomogeneous distributions of photosynthetic proteins of *Chlamydomonas*, a model organism for the photosynthesis study, were observed. The analysis clarified the extent of co-localizations of photosystem proteins and light-harvesting antenna proteins. This results demonstrated that antenna proteins actually shuttles between the two photosystem proteins upon state transition, which is a regulation mechanism of excitation balance of the two photosystems. A system enabling scanning of the excitation wavelength was developed. By using the system, the fluorescence excitation spectra of single photosynthesis proteins were obtained for the first time. Information about the excitation-energy flow within the protein was obtained.

研究分野：光生物学、光合成の生物物理学

キーワード：共焦点顕微鏡 極低温 単一分子分光 ステート遷移

### 1. 研究開始当初の背景

極低温で動作する光学顕微鏡に関しては従来、液体窒素や液体 He などの冷媒を用いるクライオスタットを顕微鏡サンプルステージに固定する方法や、液体 He 中に浸漬可能な対物レンズを用いる手法がとられてきた。前者に関しては、サンプルと対物レンズとの距離を短くすることに困難があり、高い開口数を持つ対物レンズの採用は実質的に不可能であった。後者の場合には、単純な構成の対物レンズを用いることにより色収差の補正が不十分であるという問題があった。低温での顕微鏡イメージングでは、特に光合成系の色素タンパク質のスペクトル狭窄化により高いスペクトル分解能を得ることができることから、細胞中の光合成活性を詳細に観測することが出来るようになる有効な手法になると期待される。また、単一の色素タンパク質を観測するという手法にも適用することが可能であり、他の手法では得られない分子内エネルギー移動効率の揺らぎなどの情報が得られると期待される。しかし、上記の問題があることから、高分解能の極低温顕微鏡イメージングを光合成生物の細胞に適用することは困難であった。研究代表者は、高い色収差補正を施している対物レンズをクライオスタットの断熱真空槽に設置する新しいデザインの顕微鏡を開発し、上記の問題を克服した顕微鏡を実現してきた。

### 2. 研究の目的

(1) 開発してきた極低温顕微鏡をもちいて、光合成光捕集の調節機構の1つであるステート遷移において、葉緑体内部をアンテナタンパク質が移動するという仮説を検証することを目指した。

(2) これまでに開発してきた極低温顕微鏡に、励起波長を掃引する機能を新たに追加することで、試料の蛍光スペクトルのみではなく蛍光励起スペクトルの測定を可能にすることを目指した。フェムト秒レーザーパルス光を幅広いスペクトルを持つ白色光に変換するフォトニック結晶ファイバを用いて得られる白色光を、プリズムにより波長分散させ、ピンホールにより1つの波長のみを透過させる励起分光システムを構築した。この手法を単一分子蛍光測定に応用し、単一光合成タンパク質の励起スペクトル測定の実現を目指した。これにより、単一光合成タンパク質の蛍光強度の揺らぎ(プリンキング)が結合するクロロフィル分子の吸収スペクトルが変化することによるとする仮説の検証を目指した。

(3) フォトニック結晶ファイバにより得られる白色光をプリズムにより分散させ、励起スペクトルを効率よく取得するシステムの構築を目指した。これにより、単一分子の蛍光、励起スペクトル両方の測定の効率を、こ

れまでより飛躍的に向上させることを目指した。

### 3. 研究の方法

図1に、開発した顕微鏡本体部分の断面概略図を示す。自作の真空チャンバー内に、対物レンズ、銅製のサンプルホルダおよびそれを支持するサンプルステージ、市販のクライオスタット(Oxford Inst. Microstat)の銅製コールドヘッド、などが設置される。サンプルホルダは、クライオスタットのコールドヘッドとアース用の平編銅線を介して結合した。平編銅線を介する結合により、サンプルホルダの位置はコールドヘッドに対して相対的

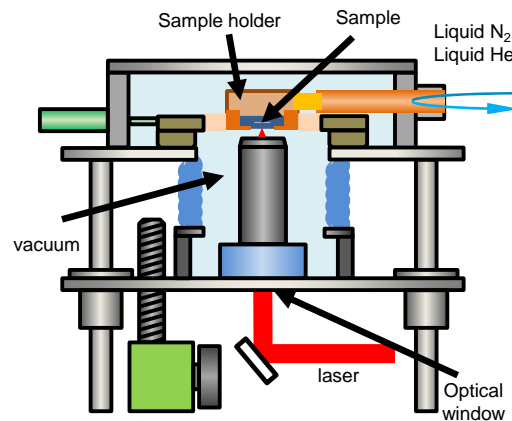


図1: 極低温顕微鏡の概略図

に移動できるようになり、サンプル位置の粗動を可能にしている。ステージ位置は、直交する2本の直線導入機によりチャンバー外部から粗動調整が可能である。

(1) 植物などの酸素発生型の光合成では、photosystem I(PSI)とphotosystem II(PSII)の二つの光化学系タンパク質が働いている。PSIとPSIIのうち、どちらか一方がより強く励起されるような環境に晒された場合に、ステート遷移と呼ばれる光捕集調節機構が働くと考えられている。ステート遷移では、LHCIIと呼ばれるアンテナタンパク質が光化学系の間を移動して、二つの系の間で励起バランスを一定に保つ、と考えられてきた。このことを検証するため、ステート遷移のモデル生物であるクラミドモナスを対象とした研究を行った。ステート遷移を起こす前で80Kにしたサンプルと起こした後に80Kにしたサンプルについて、開発した顕微鏡を用いて顕微分光画像を取得した。この測定では、画像の各ピクセルにおける蛍光スペクトルを取得できる。各ピクセルの蛍光スペクトルをガウス関数の和でフィッティングすることで、葉緑体内のPSI、PSII、およびLHCIIそれぞれの分布を明らかにすることで、ステート遷移前後でLHCIIがPSIとPSIIの間を移動したかを検証する。

(2) 光合成タンパク質 PSI を数 pM にまで希釈することで、レーザーの集光スポット（直径約 350 nm）の中に分子 1 個以下しか存在しない条件とする。このような希薄なサンプルについて、共焦点顕微鏡でレーザー走査しながら画像を測定すると、単一分子が独立した輝点として観測される。顕微画像取得後にレーザーを輝点上に移動させることで、その分子の蛍光スペクトルを取得する。さらに、励起波長を掃引することで、蛍光励起スペクトルを取得する。

(3) フォトニック結晶ファイバからの白色光をプリズムで分散させ、対物レンズ瞳に入射すると、サンプル上で場所ごとに波長が異なる線状の集光スポットが形成される。この集光スポットからの蛍光を同じ対物レンズで集め、分光器スリットへ入射し、CCDカメラで検出することで、CCDカメラの横方向には蛍光波長が異なる信号が、縦方向には励起波長が異なる信号が得られる。

#### 4. 研究成果

(1) 図2に、観測されたクラミドモナス細胞内の光合成タンパク質の分布を示す。植物の葉緑体では、PSI と PSII がはっきりと偏在することが知られるが、クラミドモナスの葉緑体内部では光化学系の偏在はそれほど顕著ではないと考えられていたが、今回の測定ではっきりと PSI と PSII が偏在することが確認された。さらにスペクトルの成分分解により、LHCII の蛍光分布も明らかにすることができた。

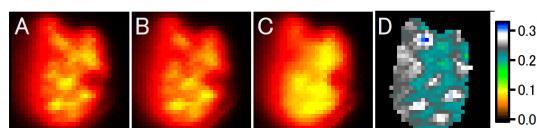


図2：クラミドモナス細胞内の光合成タンパク質、LHCII (A)、PSII (B)、PSI (C) の蛍光分布。D は PSII と PSI の比。

各成分の空間分布の相関を取ることで、LHCII が PSI と PSII のどちらの近くに多く存在するかを見積もった。その結果、ステート遷移の従来モデルで仮定されるように、LHCII の一部が光化学系間を移動していることを明らかにした。一方で、どちらの光化学系にも励起エネルギーを伝達していないと考えられる LHCII の存在が示唆され、ステート遷移の従来モデルは少なくとも一部修正する必要があることを明らかにした。

(2) 単一 PSI の励起スペクトルを初めて測定することに成功した(図3)。励起光の強度が波長ごとに異なることを補正するため、標準試料となる色素ナイルブルーの溶液の測定を行い、補正因子を決定して、正確な測定が可能であることを確認した。単一分子の励起スペクトルは、およそ通常測定で得ら

れる吸収スペクトルおよび励起スペクトルに類似の形状となった。一方で、励起スペクトル短波長側の強度が分子ごとに若干異なることが明らかになった。また、同時に測定

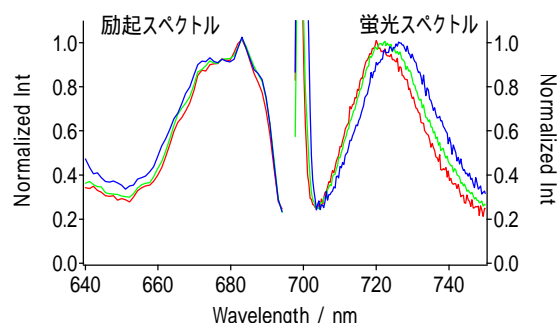


図3：単一 PSI の励起(左) 蛍光(右)スペクトル。同じ色のスペクトルは同じ分子で測定した。

した蛍光スペクトルを見ると、励起スペクトル短波長側の強度が高い分子の場合に、蛍光スペクトルのピークが長波長にシフトする、という傾向が見られた。

この結果から、PSI タンパク質内部でのエネルギー移動の経路について、以下のようなことを示唆された。PSI 内には約 100 個のクロロフィル分子が結合するが、それらは比較的励起エネルギーの高い集団と低い集団に分けられる。蛍光が出るのは、他のクロロフィルより顕著に励起エネルギーが低い長波長クロロフィルと呼ばれている分子である。長波長クロロフィルからの蛍光が短波長にシフトしたときに、励起スペクトルの長波長側が強くなったことから、励起エネルギーが長波長側にあるクロロフィル集団が長波長クロロフィルに直接励起エネルギーを渡していることが予想された。

(3) 図4に示すような光学系を構築した。

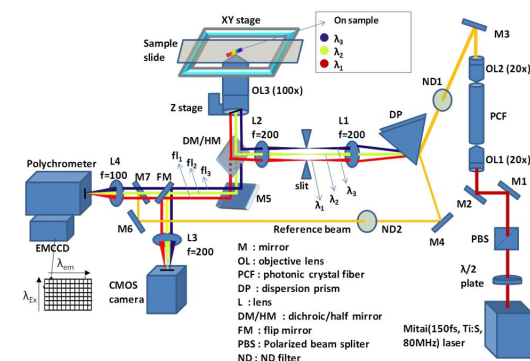


図4：励起-蛍光スペクトル同時測定顕微鏡の概略図。

本助成金により購入した EMCCD を検出器として組み込んだことで、高速なスキャンが可能となった。図5に、開発したシステムにより取得したクラミドモナス細胞の蛍光画像を示す。一度の試料位置掃引により、異なる 50 個の励起波長による蛍光画像が取得することが可能となった。このように、このシステ

ムの原理実証を実現できた。一方、残念なが

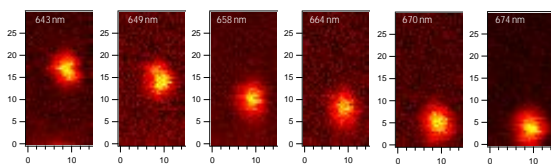


図5：様々な励起波長により、同時に取得されたクラミドモナス細胞の蛍光画像。

ら、資金面の問題から当初目指していた本システムを極低温で動作させるように改造する計画は、実現できなかった。今後の助成金による実現を目指すこととなる。

## 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10件)

Ahmed Mohamed, Ryo Nagao, Takumi Noguchi, Hiroshi Fukumura, and Yutaka Shibata, Structure-based modelling of fluorescence kinetics of photosystem II: relation between its dimeric form and photoregulation, *J Phys Chem B*, 120, 365-376 (2016) DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b09103.

Kazuki Tahara, Ahmed Mohamed, Kousuke Kawahara, Ryo Nagao, Yuki Kato, Hiroshi Fukumura, Yutaka Shibata, and Takumi Noguchi, Fluorescence property of photosystem II protein complexes bound to a gold nanoparticle, *Faraday Discussion*, 198, 121-134 (2017). DOI: 10.1039/c6fd00188b

Naonari Sakamoto, Tsunenobu Onodera, Takuma Dezawa, Yutaka Shibata, and Hidetoshi Oikawa, Highly enhanced emission of visible light from core-dual shell type hybridized nanoparticles, *Part. Part. Syst. Charact.*, 34, 1700258 (2017). DOI: 10.1002/ppsc.201700258

Yutaka Shibata, Ahmed Mohamed, Koichiro Taniyama, Kentaro Kanatani, Makiko Kosugi, and Hiroshi Fukumura, Red shift in the spectrum of a chlorophyll species is essential for the drought-induced dissipation of excess light energy in a poikilohydric moss, *Bryum argenteum*, *Photosynthesis Res.*, 136, 229-243 (2017). DOI 10.1007/s11120-017-0461-0

Jiro Harada, Yutaka Shibata, Misato Teramura, Tadashi Mizoguchi, Yusuke Kinoshita, Ken Yamamoto, Hitoshi Tamiaki, In vivo Excited Energy Transfer of Bacteriochlorophyll c, d, e, or f to

Bacteriochlorophyll a in the Wild-Type and Mutant Cells of the Green Sulfur Bacterium *Chlorobaculum limnaeum*, *Chem. Photo. Chem.*, in press (2017). DOI: 10.1002/cptc.201700164

Hamza Al Kindi, Ahmed Mohamed, Shinji Kajimoto, Hideyuki Horino, Nurbosyn Zhanpeisov, Yutaka Shibata, Izabela I. Rzeznicka, Hiroshi Fukumura, Single bovine serum albumin molecule can hold plural blue-emissive gold nanoclusters: a quantitative study with two-photon excitation, *J. Photochem. Photobiol. A*, 357, 168-174 (2018). doi: 10.1016/j.jphotochem.2018.02.029

Naonari Sakamoto, Tsunenobu Onodera, Hidetoshi Oikawa, Takuma Dezawa, Yutaka Shibata, Fabrication of Au-conjugated polymer hybridized nanoparticles and their optical properties, *e-J. Surf. Sci., Nanotech.* submitted. (2018)

Sankar Jana, Ting Du, Ryo Nagao, Takumi Noguchi, and Yutaka Shibata, Redox-State Dependent Blinking of Single Photosystem I Trimers at around Liquid-Nitrogen Temperature, *Biochim. Biophys. Acta*, submitted (2018).

Yuki Fujita, Wakana Ito, Kento Washiyama, Yutaka Shibata, Imaging of intracellular rearrangement of photosynthetic proteins in *Chlamydomonas* cells upon state transition, *J. Photochem. Photobiol. B*, 185, 111-116 (2018).

Naonari Sakamoto, Yutaro Hirai, Tsunenobu Onodera, Takuma Dezawa, Yutaka Shibata, Hitoshi Kasai, Hidetoshi Oikawa, Hiroshi Yabu, Polymeric Janus Particles with Enhanced Fluorescence Emission from One Hemisphere, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, submitted (2018).

[学会発表](国際計14件、国内計26件)

Ahmed Ali, Ryo Nagao, Takumi Noguchi, Hiroshi Fukumura, Yutaka Shibata Refined Compartment Target Analysis of Photosystem II-Enriched Membrane based on Its Structure 27th International Conference on Photochemistry, June 28-July 3, 2015, International Convention Center Jeju, Jeju, Korea. (Poster)

Yutaka Shibata Single Molecule Spectroscopy of

Photosynthetic Protein at Cryogenic Temperatures  
26th IUPAC Symposium on Photochemistry, April 4-8, 2016, Osaka City Central Public Hall, Osaka, Japan. (Oral)

Yutaka Shibata, Ahmed Mohamed, Hiroshi Fukumura  
Understanding Light-Harvesting and Energy-Dissipation Mechanisms in Natural Photosynthesis Based on the Protein Structure at the Atomic Level  
9th Asian Photochemistry Conference 2016, December 4-8, 2016, Nanyang Technological University, Singapore. (Invited)

Yutaka Shibata  
Photosynthetic Antenna Complexes as Regulation Valve of Excitation Energy  
Physical Chemistry Colloquium on "Ultrafast electronic and structural dynamics", September 19-20, 2017, Sendai, Japan (Invited)

Yutaka Shibata  
Single-Molecule Spectroscopy Study on Photosystem I at Low Temperatures  
8th International Conference "Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability", October 30 - November 4, 2017, Hyderabad, India (Invited)

〔図書〕(計2件)

高速分光測定による電子とエネルギー移動解析, 「光合成のエネルギー変換と物質変換」, 化学同人, 杉浦 美羽, 伊藤 繁, 南後守 編 p48-49, 2015

翻訳...テイツ ザイガー 植物生理学・発生学, 講談社, リンカーン・テイツ, エドゥアルド・ザイガ, イアン M. モーラー 編 第7章, 2017, ISBN-10: 4061538969

〔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://web.tohoku.ac.jp/orgphys/index.html>

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  
野口 巧 (NOGUCHI, Takumi)  
名古屋大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号: 60241246

(3)連携研究者  
( )

研究者番号:

(4)研究協力者  
( )