

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03187

研究課題名(和文)ハイスループット単一分子分光による光合成タンパク質のassembly中間体の探索

研究課題名(英文) Search for assembly intermediates of photosynthetic proteins by high-throughput single-molecule spectroscopy

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) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：光合成タンパク質が生体内で構築される機構を探るため、タンパク質の組み立て途上の様子を検出することを目指した。組み立て途上のタンパク質は、生体内では過渡的に生じる希少種であることから、検出は困難である。そこで、分子1個を観測する手法である単一分子検出法を応用し、生体から抽出した分子を全部測定する、という網羅的単一分子検出法という手法を開発した。今回の研究により、サンプル中わずかにしか存在しない、しかし非常に重要な分子を同定する手法を確立することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光合成を駆動するタンパク質の構造は明らかとなり、反応機構解明も進んだ。一方で、複雑な構造が生体内で自発的に構築される機構はほとんど分かっていない。特に100個近い色素分子が、大きなタンパク質分子の所定の位置に正しく結合する機構は全くの謎である。光合成反応を駆動するタンパク質の構築機構が分かれば、人工的に光合成反応を起こす分子機械の合成にもヒントとなると期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to reveal the mechanism based on which photosynthetic proteins are automatically assembled within biological systems, I aimed to detect the intermediate states of their assembly processes. Since such intermediates are generated only transiently and therefore accumulate only a tiny amount, detection of these components are quite difficult. To overcome the difficulty, I extended the single molecule detection technique to perform an exhaustive survey of all the components within a sample. The present development have established a method to characterize components with a tiny amount within a sample.

研究分野：生物物理学

キーワード：低温顕微鏡 タンパク質Assembly 励起スペクトル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

X線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡の単粒子構造解析の技術の飛躍的な向上から、多くの光合成タンパク質の高次構造が高い分解能で解明され、機能発現機構が明らかにされつつある。一方で、多数の色素分子を所定の位置に精密に結合している複雑な構造を持つ光合成タンパク質が、生体内でどのように構築(Assembly)されるのかは、ほとんど明らかになっておらず、光合成研究の最後の謎である。

2. 研究の目的

本研究では、過渡的に生成されると予想される光合成タンパク質の Assembly 中間体を、単一分子分光法を駆使した手法により分光解析することを目指す。時間のかかるタンパク質の精製過程を経ずに生体に含まれる全成分を網羅的に観測することにより、希少な過渡的分子種を分光解析する。

3. 研究の方法

具体的には、以下の4つの方法により研究を進めた。

1) 強光ストレスに晒した植物から抽出したタンパク質の網羅的単一分子分光

植物の光合成系に二つある光化学系のうち、水を酸化して酸素発生を行う PSII は特に光に対して敏感で、通常の光条件下でも定常的に壊れていき、それを補うための PSII 修復系の活発な作用により絶えず壊れた部分を取り換えて機能が維持されている。強光条件に曝すと、修復過程が追い付かずに光阻害を受けた PSII や修復途上の PSII が系に蓄積する。過渡的にしか存在しないこれらの複合体については、精製することが非常に困難であり分光的な解析がほとんど進んでいない。本研究では、強光に晒した植物から可溶化した全タンパク質を網羅的に蛍光分光法により測定し、何千、何万個の分子に対して得られる分光データから上記の過渡種を同定し分光的な解析を行うことを目指す。そのために、これまでに研究室で独自に開発してきた極低温共焦点顕微鏡技術を利用する。

2) 光化学系 I の Assembly 必須因子を含む複合体の単一分子分光

岡山大学高橋裕一郎教授グループは、これまでに光合成研究のモデル生物としてよく研究に用いられてきた単細胞緑藻のクラミドモナスから、PSI の assembly に必須となるタンパク質 ycf3、ycf4 を含む複合体を精製することに成功している[2018 Nature Com. Nellaepalli et al.]. 彼らは、ヒトインフルエンザヘマグルチニン(HA)タグを ycf3、ycf4 に導入したクラミドモナス株を用いることで、アフィニティ精製法により複合体を精製した。得られたサンプルは、PSI の Assembly 中間体を含むことが確実であるが、非常に希少なしか得られないことから分光的な解析は進んでいなかった。また、各標品の分子組成が完全に1種類の組成ということは有り得ず、どちらの標品もいくつかの Assembly 中間体が混ざったヘテロなサンプルである可能性が高い。そこで、分担研究者である高橋グループとの共同研究では、非常に少ないサンプル量でも実施できる単一分子分光法により ycf3-HA 標品および ycf4-HA 標品それぞれの試料の分光解析を試みる。この方法により、各サンプルに含まれる複数の Assembly 中間体の同定も試みる。

3) クロロフィル f を含む PSI の単一分子分光

最近、通常の光合成生物が用いるクロロフィル a よりも吸収波長が 40 nm ほど長波長にシフトしたクロロフィル f を合成するシアノバクテリアが発見された。この生物は、岩石中など光が極めて弱い環境で生息しており、そのような環境下でも得られる長波長光を光合成に利用するためにクロロフィル f を合成するように進化したものと考えられている。面白いことに、この生物は、生息する光環境によりクロロフィル f を合成したりしなくなったりする。そこで、クロロフィル f を合成する光環境に移行途上の細胞から精製したタンパク質では、Assembly 途上のものが見られることが期待された。そこで、クロロフィル f 合成シアノバクテリア *Halomicronema (H.) hongdechloris* の培養および PSI の精製に成功している東京理科大の鞆教授グループとの共同研究により、*H. hongdechloris* PSI の単一分子蛍光分光の研究を行った。ちょうどこの研究を開始した時期に、この *H. hongdechloris* PSI の3次元構造を明らかにする研究が鞆グループから報告された[2020 Nature Com. Kato et al.]. 解明された構造から、PSI に全部で90分子ほど結合するクロロフィル色素のうちの7分子を占めるクロロフィル f が構造上のどの色素に対応するかが明らかにされた。一方で、蛍光スペクトルに含まれるクロロフィル f 由来の3つのピーク (745 nm、755 nm、810 nm) が7分子あるクロロフィル f のそれぞれの分子に由来するかは分かっていなかった。そこで本研究プロジェクトでは、クロロフィル f 由来の蛍光ピークがどの分子から発せられているかを同定することを目指すし、単一分子の蛍光偏光異方性実験による研究を行った。

4) 励起スペクトル顕微鏡の開発

上記3プロジェクトでは、全て単一分子の蛍光スペクトル分光を手法の柱としている。本研究課題では、蛍光スペクトルに加えて蛍光強度の励起波長依存性である蛍光励起スペクトルを迅速

に取得可能とするような技術革新を目指した。そのため、これまでに進めてきた高速励起スペクトル取得を可能とする Dispersive Line Focus 顕微鏡の開発をさらに進め、極低温での測定を可能とする装置開発を行った。

4. 研究成果

1) 強光ストレスに晒した植物から抽出したタンパク質の網羅的単一分子分光

図1に、人工気象器で発芽させ1週間ほど栽培したエンドウの芽生えに対して、強光照射を行い PSII の光阻害を誘導し、その後弱光下に置いて PSII 修復過程を誘導した結果を示す。縦軸は Pulse-Amplitude Modulation (PAM)法により測定した PSII の活性であり、強光処理により徐々に活性が減衰していくのが観測されている(▲)。一方、強光処理の後に弱光下に移すことで PSII 活性の回復過程が見られ(○)、回復過程開始後約 30 分で顕著な修復系の作用があることが分かる。特に 10°C の低温で強光処理をした場合に、PSII 活性の減衰および回復が顕著に起こるといふ先行研究の報告 [1989, 1990 Planta Somersalo & Krause] が再現された。そこで、10°C で1時間の強光照射後、30分の修復期間を経た直後に葉を採取し、液体窒素により急速冷凍すると同時に葉の組織を破碎してチラコイド膜を得た。さらに、界面活性剤によりチラコイド膜から光合成タンパク質を可溶化して得られたサンプルを希釈し、網羅的単一分子分光を行った。図2に結果を示す。この測定により、200を超える粒子の蛍光スペクトルを取得した。多くは、既知の PSI や PSII に帰属される蛍光スペクトルを示したが、これまでのどの光合成タンパク質にも帰属できないスペクトルを示す粒子が5つ見出された。これらはおそらく光阻害後の修復過程に関係する複合体であると考えられる。現在、これらの成分の同定のための実験を、科研費挑戦的研究のプロジェクトとして引き続き行っているところである。

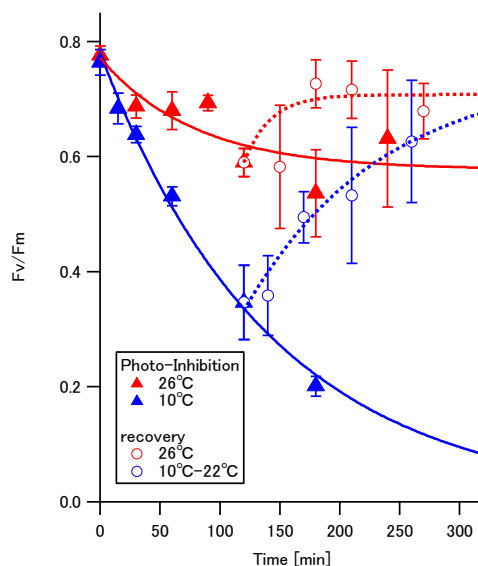


図1 PAM法による PSII 活性の減衰および修復過程による回復。赤は 26°C、青は 10°C での処理。

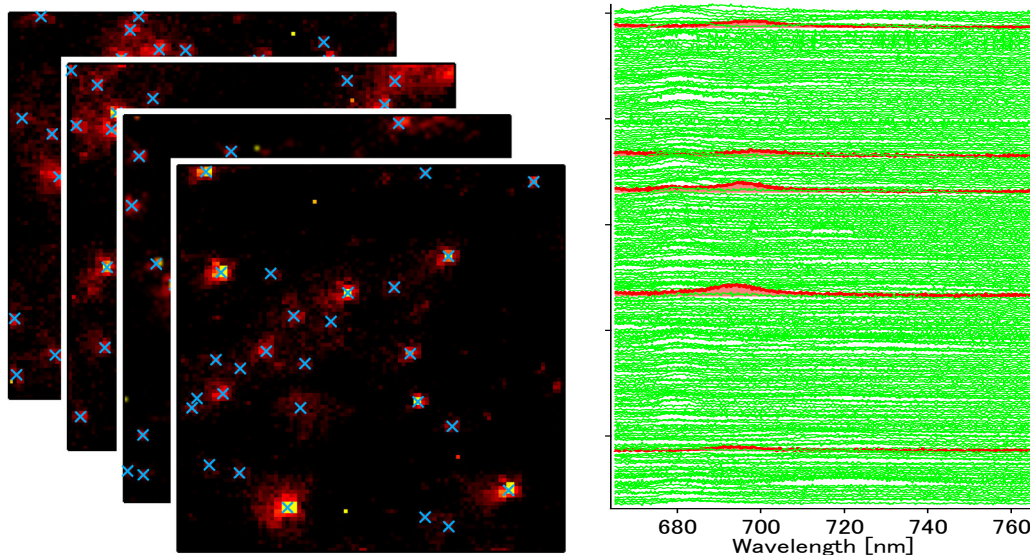


図2 左は、PSII 光阻害後の回復途上の葉から可溶化した全光合成タンパク質の単一粒子像。右は、全粒子のスペクトル。修復途上に帰属されるものを塗りつぶして示す。

2) 光化学系 I の Assembly 必須因子を含む複合体の単一分子分光

ycf3-HA 標品を希釈して得た単一粒子蛍光像を図3左に示す。数多くの輝点が見られることが分かる。ycf3 標品は、精製して得られる量が極めて少ないことから、これまで色素が結合していることも確認されていなかったが、今回の測定により初めてクロロフィルが結合することを示すことができた。図3右には、蛍光像に見られた各輝点の蛍光スペクトルを示す。蛍光スペクトルの形状には非常に大きなバラつきが見られ、ycf3-HA 標品がいくつかの種類 PSI Assembly 中間体を含むヘテロな標品であることが分かった。これらの中には、成熟した PSI の蛍光ピーク波

長と同じ 715 nm にピークを持つものも見られた。ycf4 と比較すると ycf3 は PSI Assembly の比較的始めの方の段階で働いていることがこれまでの分子生物学的な解析から示唆されている。今回の ycf3-HA に対する単一分子分光の結果は、Assembly の早い段階で既に成熟した PSI とほぼ同じ色素組成を持つ粒子があることを示唆するものである。

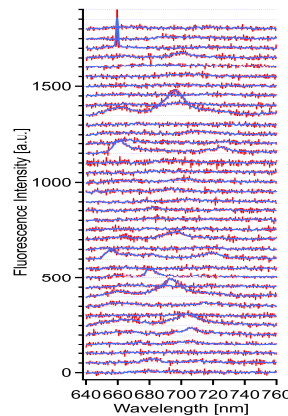
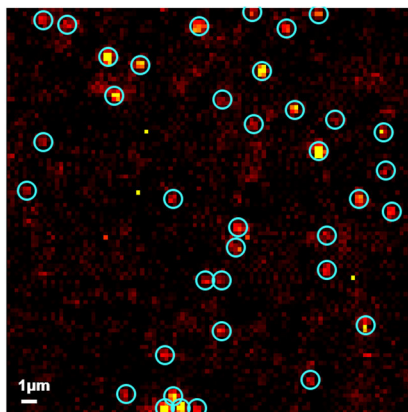


図3 ycf3-HA 標品の蛍光像(左)および各輝点の蛍光スペクトル(右)。

一方、Assembly の比較的遅い段階で働くと考えられている ycf4-HA 標品では、蛍光強度が濃度に依存するという興味深い現象が見出された(図4)。原液に近い濃度では、蛍光像は均一な分布を示すが、希釈を進めるとともに蛍光は弱くなり、 10^4 倍の希釈では蛍光強度が極めて弱くなった。しかし、そこからさらに希釈を進め、 10^5 倍の希釈を行うと、単一分子由来と考えられる輝点が多数観測されるとともに、蛍光強度が増大することが見られた。このことは、ycf4 が光化学系 I のサブユニットを繋ぎとめる足場のような働きをするのと同時に、色素を消光状態にすることで不活性酸素の発生を抑えていることを示唆する。

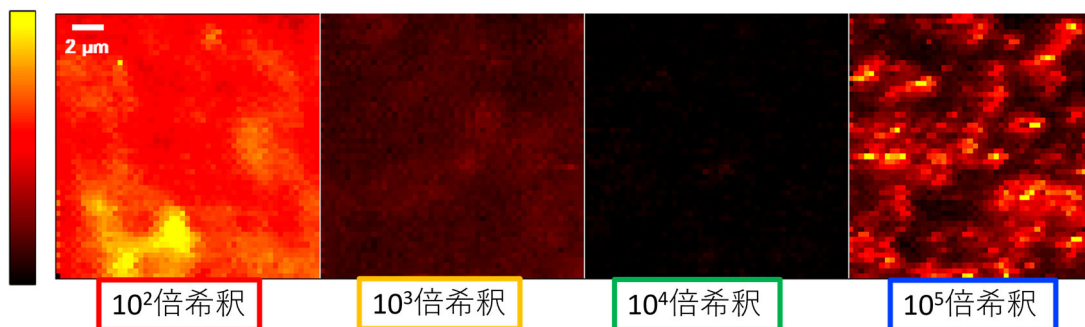


図4 ycf4-HA 標品蛍光像の濃度依存性。

3) クロロフィルfを含む PSI の単一分子分光
 これまで、*H. hongdechloris* PSI の単粒子測定により複数存在する蛍光ピークの偏光の情報を集めてきた。図5に例を示す。このデータは、あらかじめ測定した蛍光像から輝点を見つけ、その輝点上にレーザーを固定した上で検出器前に設置した偏光子をモータにより一定速度で回転させ取得したものである。クロロフィルfの遷移双極子モーメントのタンパク質内での相対配向により、異なる偏光異方性が観測されることが期待される。このことを利用して、既知構造のどのクロロフィルfが各蛍光ピークに対応するかを明らかにする。大量に得られるスペクトルデータに対してクラスタリング解析によりピークごとに情報を分離した。その結果、タンパク質構造を基にした数値計算と比較し、観測された蛍光ピークをクロロフィルfへと帰属することに成功した。一方で、濃度の高い通常の測定では観測できていた最も長波長の 810 nm に位置する蛍光ピークは、単一分子測定では検出されなかった。このピークの非常に大きな長波長シフトの機構を明らかにすることは、物理化学的な意味に加え、なぜこの生物がこのピークを持つのか、どのように光反応に貢献するのか、という生物学的な問いへの答えに繋がる。現在、810 nm の蛍光ピークが単一分子測定では観測されないのは、単一分子測定に必要と

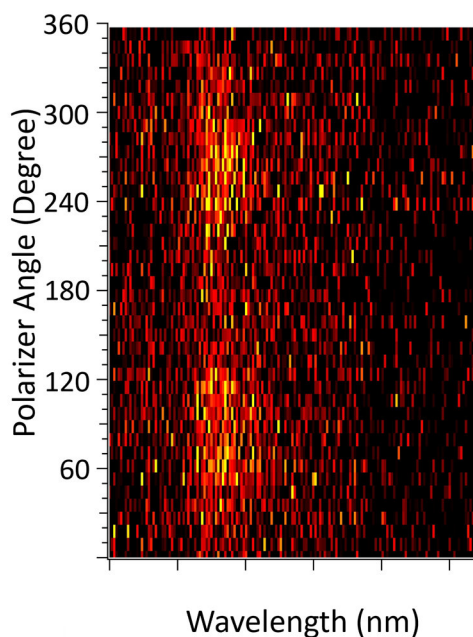


図5 *H. hongdechloris* PSI の単粒子の偏光異方性。縦軸は、検出側に設置した偏光子の角度、横軸は波長。

現在、810 nm の蛍光ピークが単一分子測定では観測されないのは、単一分子測定に必要と

なる希釈過程により、タンパク質の構造変化が誘起されていることが原因ではないかと考えている。*H. hongdechloris* PSIには本質的に凝集状態を取る傾向があり、その凝集状態が810 nmへの大きな長波長シフトを生み出すが、希釈により凝集が解けることで単一分子レベルの測定では810 nmの蛍光ピークは見えなくなる、との仮説である。この仮説を検証するため、単粒子とバルクの中間の濃度での測定や、タンパク質の凝集を抑える効果のある界面活性剤の濃度を系統的に変化させる実験は現在進行中である。

4) 励起スペクトル顕微鏡の開発

本研究課題の期間が始まる以前に、迅速な励起スペクトル測定を可能とする Dispersive Line Focus 顕微鏡の開発を進めてきた。本研究の期間前半は、開発した顕微鏡を実際に室温での測定に利用するための装置の最適化を進めた。研究室で培養しているクラミドモナス細胞の室温蛍光励起スペクトルを測定する装置の原理実証実験を行い、論文として成果を報告した[2020 Biophys. J. Jana & Shibata]。この研究に関してはさらに、クラミドモナスの光捕集過程の調節機構であるステート遷移と呼ばれる現象の前後での細胞内の励起スペクトルの変化を測定する実験も行った。ステート遷移では、二つの光化学系の励起のバランスを保つために、PSI と PSII の間でアンテナタンパク質が移動するという機構が古くから支持されている。しかし、細胞懸濁液での蛍光スペクトルの測定からこのような機構が支持されてきたが、実際に細胞内でアンテナタンパク質の移動に伴うスペクトル変化を検出するような研究はこれまでほとんど行われてきていなかった。本研究では、クラミドモナスのステート遷移前後での励起スペクトルの細胞内分布を測定し、細胞内の各場所でのステート遷移の活性を測定することに成功した。この成果の一部は既に論文にて報告している[2021 Plant Cell Physiol. Zhang et al.]。より詳細な解析を進めたところ、クラミドモナス細胞内のピレノイドと呼ばれる部位周辺でステート遷移の活性が有意に低いことを突き止めた。この成果は現在審査中の論文にまとめている[PNAS Zhang et al. under review]。

研究期間の後半にはさらに、この顕微鏡を極低温で使用できるように改良した。現在、液体窒素を用いた冷却により 80 K で安定に稼働しており、既に単一 PSI の励起スペクトル、蛍光スペクトル同時測定の実験を行い、成果を挙げている(図6)。これにより、今後は本装置を上記の1)~3)のプロジェクトへ応用し、より詳細な情報を得る実験を行う道筋が出来た。

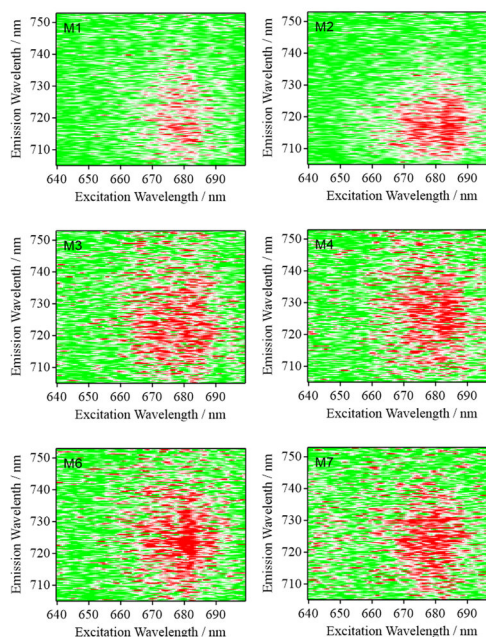


図6 単一 PSI の蛍光波長(縦軸)-励起波長(横軸)二次元プロット。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jana Sankar, Shibata Yutaka	4. 巻 118
2. 論文標題 Development of a Multicolor Line-Focus Microscope for Rapid Acquisitions of Excitation Spectra	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 36 ~ 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2019.11.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawahara Kousuke, Inoue-Kahino Natsuko, Namie Keisuke, Kato Yuki, Tomo Tatsuya, Shibata Yutaka, Kashino Yasuhiro, Noguchi Takumi	4. 巻 9
2. 論文標題 A gold nanoparticle conjugate with photosystem I and photosystem II for development of a biohybrid water-splitting photocatalyst	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Spectroscopy and Imaging	6. 最初と最後の頁 73 ~ 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/BSI-200200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zhang Xian Jun, Fujita Yuki, Tokutsu Ryutaro, Minagawa Jun, Ye Shen, Shibata Yutaka	4. 巻 62
2. 論文標題 High-Speed Excitation-Spectral Microscopy Uncovers In Situ Rearrangement of Light-Harvesting Apparatus in <i>Chlamydomonas</i> during State Transitions at Submicron Precision	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 872 ~ 882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcab047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 SHIBATA Yutaka	4. 巻 61
2. 論文標題 Fluctuating Energy-Transfer Pathway of Photosynthetic Antenna Systems Observed by Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 023 ~ 026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.61.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomofumi Chiba, and Yutaka Shibata	4. 巻 1860
2. 論文標題 Identification of Assembly Precursors to Photosystems Emitting Fluorescence at 683 nm and 687 nm by Cryogenic Fluorescence Microspectroscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta	6. 最初と最後の頁 148090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2019.148090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sankar Jana, Ting Du, Ryo Nagao, Takumi Noguchi, and Yutaka Shibata	4. 巻 1860
2. 論文標題 Redox-State Dependent Blinking of Single Photosystem I Trimers at around Liquid-Nitrogen Temperature	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta	6. 最初と最後の頁 30-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2018.11.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kondo Toru, Shibata Yutaka	4. 巻 19
2. 論文標題 Recent advances in single-molecule spectroscopy studies on light-harvesting processes in oxygenic photosynthesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v19.0013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Rin Taniguchi, Yutaka Shibata, Toshiyuki Shinoda, Tatsuya Tomo, Shen Ye
2. 発表標題 Connecting the spectral properties to the structure of photosystem I containing Chlorophyll-f
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Xianjun Zhang, Yuki Fujita, Ryutaro Tokutsu, Jun Minagawa, Shen Ye, Yutaka Shibata
2. 発表標題 In situ visualization of reversible state transition in live Chlamydomonas cells by noninvasive excitation spectral microscopy
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Fujita, Xianjun Zhang, Touru Kondou, Yutaka Shibata
2. 発表標題 Simultaneous Mapping of Fluorescence Spectra and Lifetimes of Chlorophylls Revealed Accumulation of Quenched LHCII
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yutaka Shibata, Sankar Jana, Ting Du, Ryo Nagao, and Takumi Noguchi
2. 発表標題 Single Molecule Spectroscopy On Photosystem I Revealed The Dynamical Nature Of The Light Harvesting
3. 学会等名 International Conference on Artificial Photosynthesis-2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Xianjun Zhang, Sankar Jana, Shen Ye, Yutaka Shibata
2. 発表標題 Evaluation of the movement of photosynthetic antenna complexes in algal cells by excitation spectral measurements on microscope
3. 学会等名 International Conference on Artificial Photosynthesis-2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 誉宗, 谷口 凜, 柴田 穰, 篠田 稔行, 鞆 達也, 叶 深
2. 発表標題 単一分子分光によるクロロフィル-f を含む光化学系I の蛍光不均一性
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田祐輝, 張先駿, 柴田穰
2. 発表標題 極低温光学顕微分光法による緑藻クラミドモナスのステート遷移の葉緑体内不均一性の観測
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 張 先駿, 藤田 祐輝, 得津 隆太郎, 皆川 純, 叶 深, 柴田 穰
2. 発表標題 Excitation-spectral microscopy uncovers in-situ rearrangement of LHCII in Chlamydomonas during state transitions
3. 学会等名 第11回日本光合成学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口凜, 篠田稔行, 鞆達也, 叶深, 近藤徹, 柴田穰
2. 発表標題 二次元蛍光寿命相関分光による光化学系I タンパク質の単一分子電子移動速度の測定
3. 学会等名 第15回分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金田直也, Sreedhar Nellaepalli, 高橋裕一郎, 叶深, 柴田穰
2. 発表標題 光化学系I assembly中間体の単粒子分光と時間分解蛍光解析
3. 学会等名 2021年度 化学系学協会東北大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田 祐輝, 張 先駿, 金田 直也, 柴田 穰
2. 発表標題 ストリークカメラを検出器とした細胞内局所での時間分解顕微蛍光分光
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 張 先駿, 藤田 祐輝, 金田 直也, 得津 隆太郎, 皆川 純, 叶 深, 柴田 穰
2. 発表標題 励起スペクトル顕微鏡と超解像イメージングで明らかになったステート遷移におけるチラコイド膜の不規則な構造変化
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	高橋 裕一郎 (Takahashi Yuichiro) (50183447)	岡山大学・異分野基礎科学研究所・教授 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鞆 達也 (Tomo Tatsuya) (60300886)	東京理科大学・教養教育研究院神楽坂キャンパス教養部・教授 (32660)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関