

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370060

研究課題名(和文) 新開発の極低温蛍光顕微鏡で観測する光合成タンパク質の動的性質

研究課題名(英文) Study of Dynamical Aspect of Photosynthetic Proteins Observed with the Newly Developed Cryogenic Microscope

研究代表者

柴田 穰 (Shibata, Yutaka)

東北大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20300832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：極低温で動作可能な高空間分解能の顕微鏡を開発した。この装置を用いて、緑藻クラミドモナスの光合成調節機能であるステート遷移現象において、実際にアンテナタンパク質LHCIIがチラコイド膜内部を移動するのかを検証する研究を行った。光合成タンパク質光化学系I(PS I)において、単一分子蛍光分光を行い、これまで知られていなかった蛍光の明滅、プリンキング現象が90 K程度の温度で観測されることを発見した。PS Iの構造揺らぎとの関連を考察した。また、光化学系IIの時間分解蛍光スペクトルの温度依存性を、構造に立脚したシミュレーションにより再現することに成功した。

研究成果の概要(英文)：I developed a cryogenic microscope with a high spatial resolution. Using the developed system, I studied the dynamic movements of the antenna proteins, LHCII, during the state transition, which is a typical light-adaptation function of a green alga, chlamydomonas. I conducted the single-molecule fluorescence spectroscopy for a photosynthetic protein, photosystem I (PS I). I observed for the first time the blinking of fluorescence from single PS I at around 90 K. I considered the imprecation of this observation for the conformation fluctuation of PS I. I succeeded in reproducing the temperature dependence of the time-resolved fluorescence spectra of photosystem II using a microscopic model calculation based on the structure.

研究分野：生物物理学

キーワード：1分子分光 顕微蛍光分光 極低温 光化学系I クラミドモナス

1. 研究開始当初の背景

植物の光合成の明反応は、二つの光化学系、光化学系 I (PS I) と光化学系 II (PS II) で駆動される。PS II では、Mn-Ca クラスタにおいて水から電子が引き抜かれ廃棄物として酸素分子を発生する。その電子はシトクロム *b₆f* などを経由して PS I に運ばれ、高い還元力を持つ NADPH が合成される。

(1) 近年、顕微鏡と蛍光分光法を結合した蛍光顕微分光法を用いた研究により、生きた植物細胞に含まれる葉緑体において、グラナ領域とストロマラメラ領域を空間分解可能であることが多くの研究者によって示されてきた。生化学的にグラナ、ストロマラメラ領域を分離、解析した研究から、PS II はグラナ領域に、PS I はストロマラメラ領域に多く局在することは古くから知られていた。一方で、PS II に結合する周辺アンテナタンパク質である LHCII は、ステート遷移と呼ばれる現象において PS II に結合する状態、PS I に結合した状態、の間をダイナミックに変動していると仮定されている。このように、グラナ領域とストロマラメラ領域の光合成タンパク質組成はダイナミックに変化するものであるとの描像がある。こういった描像は必ずしも直接観測により確認されている訳ではなく、いくつかの間接的な証拠に基づいている。顕微分光によりグラナ領域とストロマラメラ領域を分離観測できるという事実は、チラコイド膜のダイナミックな光合成タンパク質組成の変化を直接生きた状態で観測できる可能性を示すものである。しかし室温での顕微蛍光分光では、PS I の蛍光収率はほぼ 0 であり観測される蛍光はほぼ PS II からのものとなり、PS I 蛍光の寄与は観測されない。したがって、顕微分光によりグラナ領域であるとされた部位は、あくまで構造上の特徴からグラナであると推定されているにすぎず、そこにどれだけの PS II、PS I が存在するか、といった情報を取り出すことは不可能であった。

液体窒素温度程度の極低温では、PS I の蛍光バンドは 720 ~ 740 nm にピークを持つ特徴的なものとなり、その収率も飛躍的に増大し容易に観測可能となる。極低温での PS II の蛍光は、PS I の 720 nm 付近の蛍光バンドとは大きく異なる二つのバンドを 685 nm および 695 nm に持つ。このように、極低温では PS I、PS II の両光化学系はそれぞれ特徴的な蛍光スペクトルを示し、分光学的な分離が可能となる。極低温でグラナとストロマラメラを分離できるような顕微蛍光分光が実現すれば、上述したようなチラコイド膜のダイナミックな動態が直接観測できるようになると期待されていた。このような状況の中、研究代表者はこれまでの研究から極低温でも高い空間分解能を実現する顕微鏡を開発してきており、その高い性能を実証していた。

(2) 単一の光合成系タンパク質からの蛍光スペクトルや励起スペクトルを観測する 1 分子分光は、近年光合成タンパク質の構造揺らぎのダイナミクスを明らかにする上で他にない新しい情報を提供してきた。単一光合成タンパク質の蛍光波長が、時間とともに揺らぐ現象などが観測されており、興味を持たれている。単一の光合成タンパク質と言っても、内部には多くの色素分子が高密度に結合する非常に複雑な系であり、一部の励起状態は複数の色素分子間に拡がった非局在励起状態を形成していると考えられている。単一の光合成タンパク質の蛍光波長が揺らぐ現象は、タンパク質および結合する色素分子の僅かなコンフォメーション変化が非局在励起状態のエネルギーを変化させ、それがエネルギー移動経路を変化させることで、蛍光を出す状態を変化させていることが原因である、との解釈がなされてきた。

PS I において単一分子蛍光分光が精力的に行われており、上述したような蛍光波長の時間揺らぎなどの興味深い現象が報告されている。一方で、これまでに報告されてきた PS I の単一分子分光は液体 He を用いた 1 ~ 2 K という極低温での実験がほとんどで、コンフォメーション揺らぎが活発になるより高い温度での研究は、非常に興味深い研究ターゲットであるにも関わらずこれまで報告がなかった。

(3) PS II の中心部分は PS II core complex と呼ばれ、中心部分の光誘起電子移動反応を担う反応中心 (RC) とその両側に結合するアンテナタンパク質 CP43、CP47 で構成される。PS II core complex には 35 個のクロロフィル *a* (Chl *a*) 分子と 2 個のフェオフィチン *a* (Phea) が結合する。本研究開始直前には、1.9 Å という高い分解能でシアノバクテリア由来の PS II の X 線結晶構造が解明されていた。にもかかわらず、PS II 内部での光捕集ダイナミクスを既知のタンパク質構造に立脚して理解するという方向の研究はあまり進展してこなかった。これは、結合する 37 個の色素分子個々のサイトエネルギーが明らかではなかったことが主な原因である。ここでサイトエネルギーとは、結合サイトでの周囲のタンパク質との相互作用の影響を受けた色素分子の励起エネルギーのことである。PS II の 37 個の色素分子は、それぞれ微妙に異なるタンパク質環境に結合しており、その結果サイトエネルギーも微妙に異なる。光誘起電子移動を行う Primary Donor (PD) 分子に向かってサイトエネルギーがだんだんと低くなるようなロート型のエネルギー配列に調整されて、高効率な光捕集が実現しているものと考えられてきたが、実際どうなっているか、明らかではなかった。

Thomas Renger らのグループは、過去に報告されたスペクトルへのフィッティングを用いるという手法により、PS II に結合す

る全色素分子のサイトエネルギーを決定する研究を精力的に行ってきた。2008年には、決定されたサイトエネルギーを用いて室温での光捕集ダイナミクスをシミュレーションにより再現できることを報告している。しかし、決定されたサイトエネルギーの信頼性を評価するには、さらなる実験結果との比較が必要であった。

2. 研究の目的

(1) 遺伝子操作が容易であり多くの研究分野においてモデル生物となっているクラミドモナスは、ステート遷移についても多くの研究が行われている。単細胞生物であることから、顕微鏡観察に適しており、チラコイド膜内の PS I、PS II の分布の不均一性の観察を、開発した極低温顕微鏡を用いて行うことを目指した。さらに、クラミドモナスの培養系を新たに立上げ、ステート遷移におけるアンテナタンパク質の移動を検証する実験を極低温顕微鏡により行うことを目指した。

(2) PS I の単一分子ではない通常バルクの蛍光分光で、80 K 以下では蛍光収率はほぼ一定なのに対して、80 K 以上においては温度上昇とともに著しく収率が減少することが知られている。そこで、蛍光収率が強い温度依存性を示す 80 K から 150 K 程度の温度範囲で PS I の単一分子蛍光分光を初めて行い、液体 He 温度で見られていた蛍光波長の揺らぎが温度上昇に伴いどのように変化するかを観測することを目指した。

(3) Johannes Kepler 大学 Linz 校の Thomas Renger 教授とは、2010 年に一時的に彼の研究室へ滞在した時から共同研究を行っている。彼らがこれまでに開発を進めてきた、構造に立脚したマイクロスコピックな理論モデルを用いて、研究代表者らが行ったピコ秒時間分解蛍光スペクトルの温度依存性をシミュレーションで再現することをめざした。そのため、プログラムの一部を改変するとともに、既に報告されていたサイトエネルギーをさらに最適化する。

3. 研究の方法

開発した顕微鏡は、レーザー走査型共焦点顕微鏡になっている。励起光走査は 1 対のガルバノ鏡ペアにより行う。現時点で励起レーザーは、CW HeNe レーザー、CW 青色ダイオードレーザー、フェムト秒チタンサファイア (Ti:S) レーザーの 2 倍波による 1 光子励起モード、基本波による 2 光子励起モード、を選択できるようになっている。蛍光は分光器で分光された後、液体窒素冷却の CCD カメラまたはアバランシェフォトダイオードにより検出される。分光器の入り口は 2 枚の直行するスリットで構成され、矩形の共焦点ピンホールとして機能する。

図 1 に、開発した顕微鏡本体部分の断面概

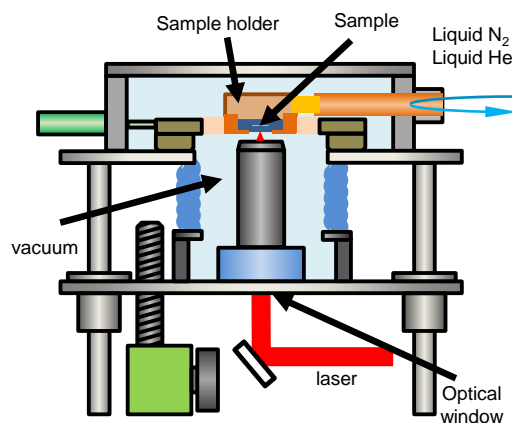


図 1：極低温顕微鏡の概略図

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) クラミドモナスを培養する実験系を新たに立ち上げた。基礎生物学研究所の皆川純教授グループよりクラミドモナス細胞を送っていただき、培養を開始した。

(2) 研究分担者の野口巧名古屋大教授グループから、好熱性シアノバクテリアから精製した PS I タンパク質を提供していただき、単一分子分光の実験に用いた。

(3) 共同研究者の Thomas Renger 教授と協力し、最新の PS II の高分解能結晶構造を用いて、彼らが開発した手法により励起子相互作用強度の計算を、Mead というプログラムを用いて行った。得られた励起子相互作用強度を用いて PS II の吸収スペクトルや円偏光 2 色性スペクトル、直線偏光 2 色性スペクトルのフィッティングを行い、これまでに報告されていたサイトエネルギーの最適化を行った。

4. 研究成果

(1) 図 2 に、極低温顕微鏡により 94 K において観測したクラミドモナスの蛍光イメージを示す。図 2 上段は 685 nm の PS II の蛍光波長の信号で再構成したイメージ、中段は 715 nm の PS I の蛍光バンドで再構成したイメージである。上段と中段に示された蛍光イメージが、異なる場所で明るくなっているの

が分かる。このことは、図 2 下段に示した二つの波長の蛍光強度の比を示す Ratio Map を見ればより明瞭である。そもそもクラミドモナスの葉緑体では、植物のものほど明確なグラナ、ストロマラメラといったチラコイド内部構造が発達していないとされる。しかし、免疫染色法を用いた電子顕微鏡による先行研究によると、グラナ様の構造は若干見られそこに PS II が多く存在することを示す報告がされている。本研究で見られた PSI、PS II の不均一な分布は、上述の先行研究の結果を裏付けるものであるとともに、極低温光学顕微鏡により PSI と PS II の不均一分布を明ら

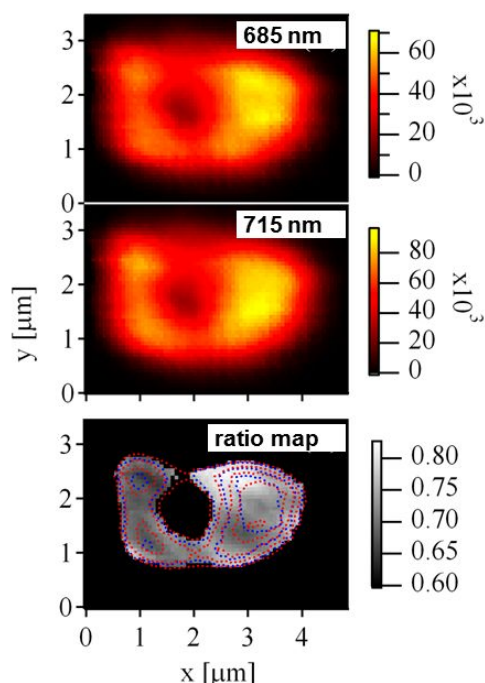


図 2 : クラミドモナスの蛍光イメージ

かにできることを示す初めての成果である。クラミドモナスによるステート遷移前後でのアンテナタンパク質の移動を確認する実験を行うため、極低温でも透明性を保ちかつ液体培地と同様にステート遷移を示すような溶媒条件の探索を行った。DMSO、グリセリン等のガラス化溶媒を混合した溶媒を試したが、いずれも十分なステート遷移能を示さなかった。最終的に、有機溶媒は用いずに Tricine 緩衝液を用いることで、極低温で高い透明性を保ちつつ、ステート遷移も通常の液体培地と同程度に観察されることが分かった。このような溶媒条件のもと、ステート遷移前後での極低温蛍光イメージを取得する実験を行い、各ピクセルでの蛍光スペクトルを複数のガウス関数に分解する解析を行った。一番短波長側にピーク波長を持つガウス関数成分が、LHCII 由来の蛍光バンドであると考えられる。これまでの測定結果によると、ステート遷移により LHCII が PS II から PS I へ移動していることを示す細胞が確かにあることを確認した。一方で、期待さ

れたような LHCII の移動を示さない細胞も少数ながら見られることも分かった。現在、観測する細胞数を増やして、統計的に解析することを目指しさらなる研究を行っている。

(2) 図 3 に、シアノバクテリアから精製した PSI 量体の単一分子蛍光スペクトルの時間依存性を示す。図 3 の横軸は波長、縦軸は時間である。分子 1 および分子 2 では、蛍光強度が強くなったり弱くなったりを繰り返す明滅が見られた。この蛍光強度の明滅は、単一分子分光ではよく見られる現象で、プリンキングと呼ばれる。液体 He 温度での PS I 単一分子分光の先行研究ではプリンキングの報告はなく、90 K 付近の高い温度にすることで初めてプリンキングが見られたと考えている。分子 3 では明確なプリンキングは見られていない。このように、全ての分子がプリンキングを示す訳ではなく、これまでに調べた分子のうち 1 割 ~ 2 割の分子でプリンキングが見られることが分かった。

PSI の反応中心色素である P700 は、現在の実験条件ではほぼカチオンラジカル状態となっていることが予想される。P700 のカチオンは、非常に強力な消光剤として機能することが知られる。現時点では、このプリンキングはコンフォメーション揺らぎにより PS I 内部でのエネルギー移動経路が変化したことによる、と解釈している。蛍光が明るい状態でのエネルギー移動経路では、励起エネルギーは P700 カチオンには集中せず長波長の蛍光を出す色素に集中し高い蛍光収率となる。一方、蛍光の暗い状態ではエネルギー移動経路が変化して P700 カチオンへ励起エネルギーが集中するようになり、消光される、という機構を考えている。

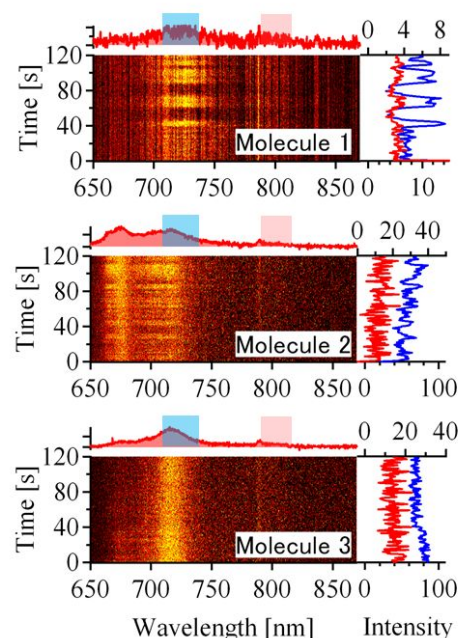


図 3 : 3 つの PS I 分子からの蛍光スペクトルの時間変化

現在、より精密な統計解析を行うことを目指して、さらに多くの単一 PS I でのデータを収集する実験を進めている。それと同時にプリンキングの特性の温度依存性についても調べる実験を行っている。

(3) PS II は以下に述べるような蛍光スペクトルの温度依存性を示す。180 K では 683 nm 付近に弱い蛍光ピークが見られるが、77 K に温度を下げると 685 nm と 695 nm の二つのピークが顕著となる。さらなる温度降下により 685 nm のピーク強度が増大し、5 K では 695 nm のピークは見かけ上消失する。このような温度依存性は、PD よりもわずかに低いサイトエネルギーを持つ色素が少なくとも二つあるエネルギー配置を考えることで定性的には説明できる。室温から 100 K 程度の温度までは、これらの低エネルギー色素に励起エネルギーが渡った場合にも、エネルギーギャップを超えるのに十分な熱エネルギーが供給されるため、PD へのアップヒルのエネルギー移動が可能である。そのため、光化学反応は依然高効率に実現され、蛍光収率も低いままである。しかし 77 K まで温度を下げると、低エネルギー色素から PD へのエネルギーギャップを超える熱エネルギーが供給されず、一旦そこに励起エネルギーが到達した場合は脱出できなくなり 695 nm の蛍光として放出される。さらに温度が下がると、より浅いトラップから PD へのエネルギー移動も起こらなくなるため、685 nm の蛍光強度が増大する。

PS II の蛍光ダイナミクスの温度依存性をシミュレートするため、梅名らの最新の PS II の構造を基に励起子相互作用の強さを計算しなおした。得られた値を用いて、Rengerらの研究に倣い PS II のサブユニットの円偏光 2 色性、直線偏光 2 色性、吸収スペクトルが実験に合うようにサイトエネルギーを決定した。こうして得られたサイトエネルギーを使って計算した PS II の蛍光ダイナミクスの温度依存性は、180 K では広い波長範囲で速い蛍光減衰が見られる、77 K では 695 nm の遅い蛍光が、5 K では 685 nm の遅い蛍光がそれぞれ主要な蛍光成分となる、といった実験結果の特徴を見事に再現した。静的なスペクトルを再現するように決定したサイトエネルギーを用いて、ダイナミックな蛍光減衰を広い温度範囲で再現できたことは、驚きに値する。37 個全てのサイトエネルギーの正しい値が求まっているかは今後の検証が必要であるが、少なくともエネルギー移動のおおまかな経路は再現できているものと思われる。

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 9 件)

柴田 穰, 光合成系の光捕集過程を構造に立脚して理解する: 理論と実験の融合で見てきたこと, 日本物理学会誌, 査読有 69 巻 (9), (2014) 639-643. <http://www.jps.or.jp/books/gakkaiishi.php>

Yutaka Shibata, Wataru Katoh, Tomofumi Chiba, Keisuke Namie, Norikazu Ohnishi, Jun Minagawa, Hanayo Nakanishi, Takumi Noguchi, and Hiroshi Fukumura, Development of a novel cryogenic microscope with numerical aperture of 0.9 and its application to photosynthesis research, *Biochim. Biophys. Acta*, 査読有 1837(2014) 880-887. DOI:10.1016/j.bbabi.2014.03.006

Yutaka Shibata, Shunsuke Nishi, Keisuke Kawakami, Jian-Ren Shen, Thomas Renger, Photosystem II does not possess a simple excitation energy funnel: time-resolved fluorescence spectroscopy meets theory, *J. Am. Chem. Soc.* 査読有 135, (2013) 6903-6914. DOI: 10.1021/ja312586p

Yutaka Shibata, Wataru Kato, and Yukari Tahara, Study of Cell-Differentiation and Assembly of Photosynthetic Proteins during Greening of Etiolated *Zea mays* Leaves Using Confocal Fluorescence Microspectroscopy at Liquid-Nitrogen Temperature, *Biochim. Biophys. Acta*, 査読有 1827, (2013) 520-528. DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.02.001

[学会発表](計 14 件)

柴田 穰, 開口数 0.9 の極低温顕微鏡の開発と光合成タンパク質の 1 分子分光への応用, 日本分析化学会 第 63 年会特別シンポジウム, 2014 年 9 月 17 日, 広島大学 (広島県東広島市)((招待講演)

柴田 穰, 理論と実験の融合で見てきた植物型光合成の超高速光反応, 第 11 回 AMO 討論会, 2014 年 6 月 6 日, 大阪大学 (大阪府豊中市)((招待講演)

浪江 慶祐, 加藤 渉, 中西 華代, 野口 巧, 福村 裕史, 柴田 穰, 新しく開発した極低温顕微鏡による光化学系 I の 1 分子蛍光分光, 第 55 回日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 18 日, 富山大学 (富山県富山市)

Keisuke Namie, Tomofumi Chiba, Mizu Kajihara, Wataru Kato, Hiroshi Fukumura, Yutaka Shibata, Application of the home-built cryogenic microspectroscopy system with numerical aperture of 0.9 to photosynthetic organisms, 16th International Photosynthesis Congress,

August 14, 2013, Saint Louis (USA)
Yutaka Shibata, Ahmed Ibrahim Ali
Mohamed, Shunsuke Nishi, Keisuke
Kawakami, Jian-Ren Shen, Ryo Nagao,
Takumi Noguchi, Hiroshi Fukumura,
Thomas Renger, Light-harvesting
dynamics in photosystem II: a
combination of time-resolved
fluorescence spectroscopy and
microscopic theory, 16th International
Photosynthesis Congress, August 14,
2013, Saint Louis (USA)

千葉 智史 (CHIBA, Tomofumi)

杜 婷 (DU, Ting)

〔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：
出願年月日：
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

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

浪江 慶介 (NAMIE, Keisuke)