

# 1 分子蛍光分光による光合成タンパク質の光捕集機構の解明

## Study of Light-Harvesting Mechanism of Photosynthesis Protein by Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy

代表研究者 東北大学 柴田 穰 Tohoku University Yutaka SHIBATA  
協同研究者 名古屋大学 野口 巧 Nagoya University Takumi NOGUCHI

A novel cryogenic optical-microscope system was developed. In the developed system, the objective lens is set inside of the cryostat adiabatic vacuum space. Being isolated from the sample when it was cooled, the objective lens was maintained at room temperature during the cryogenic measurement. Therefore, the authors were able to use a color-aberration corrected objective lens with a numerical aperture of 0.9. The lens is equipped with an air vent for compatibility to the vacuum. The system was applied to the fluorescence spectroscopy of single isolated photosystem I complexes at 90 K. The fluorescence, assigned to be emitted from a single photosystem I trimer, showed an intermittent fluctuation called blinking, which is typical for a fluorescence signal from a single molecule.

### 研究目的

通常の溶液の分光測定では、たくさんの溶質分子が集まった集団としての系からの応答の平均値が測定される。分光学的に1つの分子（粒子）からの蛍光や散乱を検出する単一分子（粒子）分光を行うことで、集団での平均化を完全に排除して通常の分光測定では得られない様々な情報を取得できるようになる。例えば、分子の吸収スペクトルや蛍光スペクトルのピーク波長が、その分子の局所的な環境変化の結果として変化するスペクトル拡散と呼ばれる現象が単一分子分光法により測定されている。また、蛍光強度がランダムに明滅を繰り返す **blinking** と呼ばれる現象も単一分子の蛍光を測定したときにしばしば見られる。**blinking** も、色素分子の環境の揺らぎと関係していると考えられるが、その機構はまだよく分かっていない。このように分子環境の揺らぎのダイナミクスなど確率的に起こる事象の観測に、1分子分光測定は非常に強力な手段となる。

植物の光合成タンパク質 Photosystem I (PS I) においても、1分子分光の研究例がいくつか報告され

てきた。PS Iは巨大な光合成タンパク質であり、一つの複合体あたり約 100 個の葉緑素クロロフィル (Chl) 分子を結合している。室温では、これらの Chl 分子が吸収した光子エネルギーは極めて高速に電荷分離反応に使われるため、蛍光の量子収率は非常に低い。低温にすることで電荷分離反応の収率は下がり、次第に蛍光強度も高くなる。これまでの PS I の 1 分子分光の研究例では、蛍光収率が高くなる液体 He 温度以下での測定がほとんどであった。単一 PS I 分子の蛍光スペクトルに反映される揺らぎのダイナミクスが、温度上昇とともにどのように変化するかは興味深い。そこで、本研究では液体窒素温度よりも高い温度での単一 PS I の蛍光スペクトルの振る舞いを明らかにすることを目指した。

単一分子分光を実現するためには、低温で使用可能な顕微鏡を用いる。従来の低温顕微鏡では、対物レンズの開口数(Numerical Aperture, NA)が0.6を超えることは困難であった。例えば、クライオスタットの外側に長作動距離タイプの対物レンズを設置する従来の方式 (Fig. 1 左下) では、NA は概ね 0.6 を超

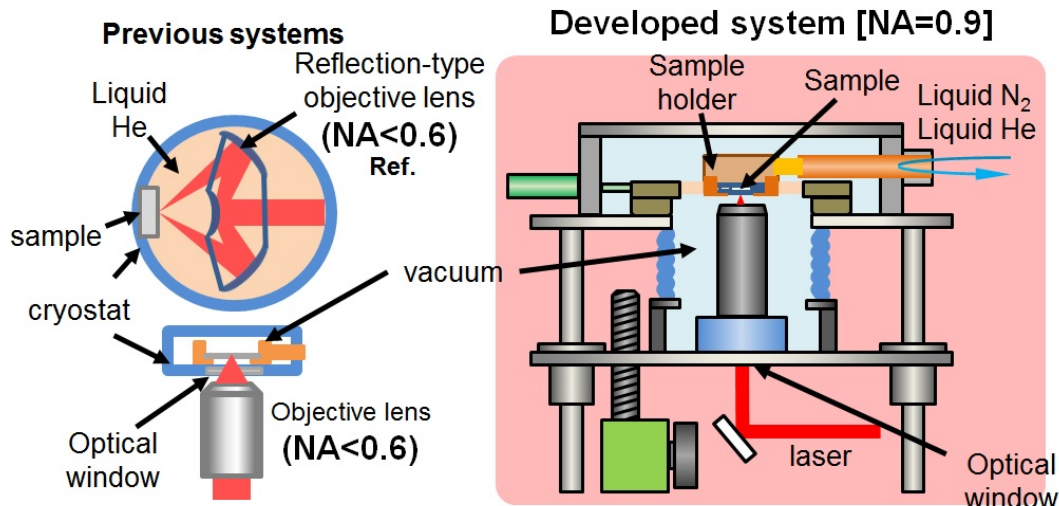


Fig. 1. Comparison of cryogenic microscope systems between previous and the present methods.

えることはなかった。また、クライオスタットの内側に反射型の対物レンズを設置した場合 (Fig. 1 左上) でも、作動距離の大幅な短縮は可能なものの構造が単純な単レンズの対物レンズを使用するため、多くの場合  $NA < 0.6$  であった。 $NA$  を大きくできないことは、空間分解能が低く抑えられるだけでなく、サンプルからの蛍光の集光効率も低くなってしまふことから、本研究で実現を目指した低温での光合成タンパク質の1分子分光を行う上では致命的な欠点であった。

本研究では、クライオスタットの断熱真空槽内に対物レンズを設置した新しい方式 (Fig. 2 右) の極低温顕微鏡を開発した。この方式によって、作動距離を大幅に短縮することが可能となり、大きな  $NA$  の対物レンズを採用できるようになった。 $\sim 10^{-5}$  torr の高真空中で使用するため、レンズに挟まれた空間の空気を抜くための空気孔のある特注の対物レンズを使っている。このような工夫をしたことで、極低温での顕微鏡として初めて  $NA 0.9$  を実現できた。検出器は、本助成金で購入したイメージング分光器 (MS2004i, SOL instruments) に結合した液体窒素冷却 CCD (PyLoN:100BR eXelon, Princeton Instruments) を使用し、感度の高い1分子蛍光測定に最適な測定システムとなっている。

## 研究経過

開発した装置を実験に用いるには、いくつかの課題を克服する必要があった。サンプル冷却には連続的な液体窒素のフローを用いているが、フローのためのポンプの振動がサンプルに伝わり空間分

解能が低下するという問題があった。これに対しては、サンプルホルダとコールドヘッドを柔軟な銅製のメッシュで繋ぐようにし、また液体窒素流路にステンレス製の重りを挿入して振動を機械的に低減させることにより、解決した。他にも、サンプルホルダを固定するステージが冷却とともに収縮してサンプル位置が移動するという問題があった。ステージを熱膨張率がきわめて小さい石英製に改め、また熱収縮が収まるまで 2-3 時間待ってから測定を始めるようにすることで、この問題も克服した。

シアノバクテリア *Synechocystis* PCC 6803 から精製した PSI trimer は、共同研究者の名古屋大学野口巧教授グループから頂いた。25 mM  $MgCl_2$ 、0.4 mM (0.02% w/v) n-dodecyl  $\beta$ -D-maltoside ( $\beta$ -DM)、5 mM アスコルビン酸ナトリウムを含む pH7.5 20 mM Tricine-NaOH 緩衝液で Chl 濃度が 20  $\mu$ M となるように希釈した。この溶液にさらに緩衝液を加えて測定する濃度にまで希釈し、遠心分離器で凝集体を沈殿させサンプルとした。サンプル溶液 2-3  $\mu$ l を、直径 10 mm、厚さ 0.3 mm の石英ガラス基板 2 枚の間に真空グリースを塗布したテフロン製のリングを挟んで封入した。

1 分子分光測定を行う準備として、濃度の異なる PSI trimer 溶液の蛍光顕微鏡画像を取得し、PSI trimer の分散の様子を確認した。測定した濃度は、700 pM、70 pM、7 pM である。励起は、HeNe レーザーの 633

nm の波長で行い、レーザー強度はサンプル上で 100  $\mu\text{W}$  である。

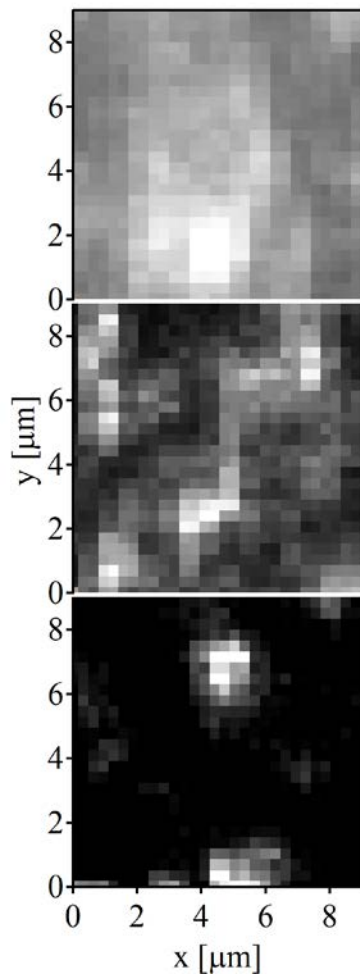


Fig. 2. Concentration dependence of fluorescence images of PS I trimer.

Fig. 2 に各濃度で得られた典型的な蛍光画像を示す。各画像における蛍光強度のスケールは濃度ごとに異なる。700 pM では、画像全体から蛍光信号が検出されているが、70 pM では蛍光信号はまばらとなり、7 pM ではスポット状の輝点が見られるようになった。本測定に使用した顕微鏡システムの光軸方向の空間分解能がおよそ 1.3  $\mu\text{m}$  であることを考慮すると、溶液の濃度が 7 pM のときには 10  $\mu\text{m}$   $\times$  10  $\mu\text{m}$  の観測領域に平均で 0.6 個の分子が検出されると見積もることができる。こうした見積もりと Fig. 2 に示された蛍光画像の濃度依存性の測定から、7 pM のサンプルで観測されているスポット状の輝点一つ一つは単一の PS I trimer に対応していると結論付けた。

先行研究では、1.4 K における単一 PS I trimer の蛍

光スペクトルのピーク位置が Chl 分子周囲の環境変化に応じて時間とともにジャンプする様子が報告されている。本研究でも、レーザーを 1 つの PS I trimer 位置に固定して連続して蛍光スペクトルを測定し、その時間発展を追跡した。2 つの単一 PS I trimer についての結果を、Fig. 3 に示す。Fig. 3 (A-2)、(B-2) のイメージは、各時間における蛍光スペクトルを示しており、1 s 積算の蛍光スペクトルが 120 本並んでいる。Fig. 3 (A-1)、(B-1) に示したのは、測定した 120 s 間の平均の蛍光スペクトルである。試料温度は 90 K であった。低温において、PS I から放出される蛍光は、数個の red Chl と呼ばれる PS I に特有の Chl 分子からのものであることが知られている。red Chl とは、通常の Chl の蛍光波長 680-690 nm よりも顕著に長波長にシフトした 730 nm 付近に蛍光を示す Chl のことである。おそらくタンパク質内で Chl 分子が二量体や三量体を形成していることにより、吸収、蛍光波長が長波長シフトしていると考えられている。Fig. 3 に示した二つの分子では、どちらも red Chl からの蛍光が見られる。

Fig. 3 (A) に示した分子では、蛍光強度がランダムに強くなったり弱くなったりする blinking と呼ばれる現象が見られた。一方 Fig. 3 (B) の分子では、蛍光強度は時間的にほぼ一定で blinking は見られない。Fig. 3 (A-1) の蛍光スペクトルを詳しく見ると、0-40 s では蛍光強度が減少し、50-60、80-90、110 s あたりではほとんど蛍光を放出していなかったことがわかる。0-40 s においては、ある程度の蛍光強度があることから、PS I trimer のうち、1 つもしくは 2 つの monomer が発光しているのかもしれない。また、蛍光が消光する時間幅には規則性がなく、1-数 10 s まで様々であった。このような blinking は、蛍光タンパク質 Green Fluorescent Protein や半導体量子ドットまで、様々な系で観測されている。色素の構造変化などの原因が提案されているが、その機構の詳細はまだ分かっていない。また、blinking は 1 分子からの発光に特有の現象で、逆説的に blinking が観測されたことにより今回の実験で得られた蛍光が 1 分子からの発光であることが支持された。今回のように、光合成の反応中心タンパク質 1 分子を、低温で測定して blinking が観測されたのは、私の知る限りにお

いて初めてのことである。

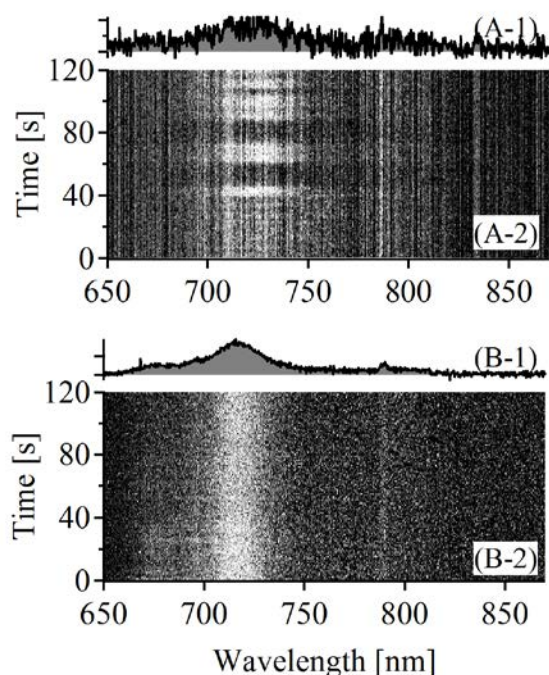


Fig. 3. Typical time-dependences of single PS I fluorescence spectra.

### 考察

単一の PSI trimer の蛍光において、blinking が観測された原因について考える。PSI trimer と同じように多数の Chl が結合した光捕集タンパク質の LHC I においても、蛍光の明滅が観測されている。このタンパク質に固有のエネルギートラップによる消光が原因であると考察されている。ただし、LHC I の 1 分子分光測定は、室温での測定であった。また、LHC I は光捕集タンパク質であり、PSI のような光誘起電荷分離反応は起こらない。

今回の測定をおこなった励起光強度 100  $\mu\text{W}$  においては、PSI の反応中心 P700 は常に酸化された P700<sup>+</sup> として存在していると考えられる。また、P700<sup>+</sup> は励起エネルギーを非常に高効率に消光するクエンチャーとして機能することが知られている。P700<sup>+</sup> の吸収スペクトルは red Chl の蛍光スペクトルと重なりが大きいので、red Chl から P700<sup>+</sup> へのフェルスター型のエネルギー移動が起こっていると考えられている。以上のようなことから、本研究で初めて見出された PS I の blinking は、以下のような状況により引き起こされていると考えている。red Chl からの蛍光が観

測されている明状態では、red Chl から P700<sup>+</sup> へのエネルギー移動効率が低い状態にあり、励起状態は消光することなく蛍光が放出される。一方、蛍光が暗状態では、red Chl から P700<sup>+</sup> へのエネルギー移動の効率が高くなり蛍光は消光される。条件でない時間分解蛍光分光測定からは、P700<sup>+</sup> へのエネルギー移動の速度はであると報告されている。ただし、この値で分子集団での平均値である。今回の実験の一つ一つの PS I 分子に着目するとエネルギー移動速度が時間的に揺らいでおり、上で述べた blinking の原因となっているのではないかと

と暗状態の間を行き来させる要因は、タンコンフォメーション変化であると推察して)低い 1.4 K においては、Chl とアミノ残基との水素結合の開裂と生成によって、スペクトルを引き起こすコンフォメーション変化が考察されていた。測定を行った -90 K では、より大きなコンフォメーション変化が生じているのかもしれない。コンフォメーション変化によって red Chl から P700<sup>+</sup> へのエネルギー移動を媒介する Chl の吸収波長が変わることで、P700<sup>+</sup> へのエネルギー移動効率が劇的に変化する、という機構を現在のところ考えている。

開発した極低温顕微鏡は、開口数が大きいと高い空間分解能で顕微画像を取得可能である。そのため、細胞内の異なる蛍光スペクトルを示す Chl 成分の分布を明らかにする研究にも強力なツールとなる。このような方向の研究も既に開始しており、実際に単細胞の光合成生物において、その細胞内の異なる蛍光波長を持つ Chl 成分の分布を空間分解して検出できることを実証した。今後は、生きた細胞を対象にした研究も展開して行きたい。

### 研究の発表

#### 口頭発表

1. 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」、2012年1月24日、東北大学（招待講演）
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

分解分光」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、西 俊輔、川上 恵典、沈 建仁、Thomas Renger、Possible non-photochemical quenching mechanism within photosystem II core complex (日本語タイトル: 光化学系 II コア複合体での非光化学的消光の可能性), 日本生物物理学会第 50 回年会、2012年9月22-9月24日、名古屋大学
4. 柴田 穰、西 俊輔、川上 恵典、沈 建仁、Thomas Renger、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 2, 日本物理学会 2013 年 年会、2013年3月26-29日、広島大学

#### ポスター発表

1. Keisuke Namie, Wataru Kato, Hiroshi Fukumura, Yutaka Shibata, Development of cryogenic microspectroscopy system with numerical aperture of 0.9 applicable to biological systems. 7th Asian Photochemistry Conference 2012, November 12-15, 2012, Osaka, Japan.
2. 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 11-16, 2013, Saint Louis, USA.
3. 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 11-16, 2013, Saint Louis, USA.
4. 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、2012年3月16-18日、京都産業大学
5. 柴田 穰、浪江 慶祐、千葉 知史、梶原 瑞、加藤 渉、福村 裕史、開口数 0.9 の極低温光学顕微鏡の開発とその植物細胞内色素イメージングへの応用、日本生物物理学会第 51 回年会、2013 年

10月28-10月30日、京都国際会館

6. 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 53 回日本植物生理学会年会、2014年3月18-20日、富山大学
7. Ahmed Ali、柴田 穰、長尾 遼、野口 巧、福村 裕史、Dedicated comparison of light-harvesting dynamics between the cyanobacterial and the higher plant photosystem II, 第 53 回日本植物生理学会年会、2014年3月18-20日、富山大学
8. 田原 一輝、河原 弘典、浪江 慶祐、井上 名津子、長尾 遼、加藤 祐樹、靱 達也、柴田 穰、福村 裕史、菓子野 康浩、野口 巧、光合成タンパク質と金属ナノ粒子による水素発生人工光合成ナノデバイスの開発、第 5 回光合成学会年会、2014年5月30-31日、近畿大学

#### 誌上発表

1. 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*, 1827, 520-528 (2013).
2. 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.* 135, 6903-6914 (2013).
3. Yutaka Shibata, Wataru Kato, 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*, 1837, 880-887 (2014).
4. 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えてきたこと, *日本物理学会誌*, in press, (2014).
5. 柴田 穰, 加藤 渉, 浪江 慶祐, 開口数 0.9 を持つ極低温顕微鏡の開発, *分光研究*, 63 巻, 3 号, in press (2014).