

## 論文内容要旨

(NO. 1)

氏名	藤田 祐輝	提出年	令和 3 年
学位論文の 題目	<b>Development of Multifunctional Cryo-Optical Microscope System for Time-Wavelength 2D Image within Intracellular Subdomain</b> (細胞内微視領域での時間分解蛍光分光を目指した低温顕微鏡システムの展開)		

## 論文目次

**Chapter I General Introduction**

1-1 Photosynthesis .....	1
1-2 Thylakoid Reaction .....	1
1-3 Light Harvesting Complex (LHC) .....	3
1-4 History of Study on State Transitions .....	4
1-5 Importance and Purposes of My Research .....	6
1-6 Introduction of STED Microscope .....	8
1-7 Optical Microscope Measurements at Cryogenic Temperature .....	9
1-8 Impact of the Present Study on Society and Industry .....	10
1-9 Outline of this thesis .....	11

**Chapter II Materials and Methods**

2-1 Growth Conditions of <i>Chlamydomonas Reinhardtii</i> .....	18
2-2 Induction of the State Transitions .....	19
2-3 Preparation of Artificial Hybrid Thylakoid Membrane .....	19
2-4 Home-Built Cryogenic Microscope .....	20
2-5 Introduction of the Standard Cryogenic Optical Microscope System .....	21
2-6 Introduction of the Cryogenic FLIM System .....	21
2-7 Introduction of the Cryogenic Streak-Camera Optical Microscope System.....	23
2-8 Introduction of the Cryogenic STED Microscope System .....	24
2-9 Calibration of the Pixel Size .....	25
2-10 Spatial Resolution of the Cryogenic Optical Microscope .....	27
2-11 Wavelength-Calibration for the CCD Camera and the Streak Camera .....	28
2-12 Time-Resolution of the TCSPC and the Streak Camera Measurement .....	29
2-13 Correction of a Photon Detection Delay Related to Fluorescence Wavelength .....	29
2-14 Fitting of Fluorescence Lifetime .....	30
2-15 DAS Analysis .....	31

**Chapter III Experiment with the FLIM System**

3-1 Purpose of This Experiment .....	53
3-2 Intracellular Segregation of PSII and PSI .....	53
3-3 Comparing Spectra in PSII-rich and PSI-rich Regions .....	55
3-4 FLIM Measurement .....	57
3-5 Specific Sub-Cellular Regions with High PSI in State2 Cell .....	60
3-6 Comparing Lifetime in PSII-rich and PSI-rich Regions .....	62
3-7 Two-Dimensional Autocorrelation .....	63
3-8 Validity of Identification of a Fast Lifetime Component .....	64
<b>Chapter IV Streak Camera within Microscopic Area</b>	
4-1 Purpose of This Experiment .....	82
4-2 Experimental Procedure .....	82
4-3 Introduction of the Self-Written Algorithm of LabVIEW Software .....	83
4-4 Performance Evaluation of the Self-Written Algorithm of LabVIEW Software .....	84
4-5 Time Resolved Fluorescence Spectra within Intracellular Subdomain .....	86
4-6 The DAS Analysis for the Obtained Streak Images .....	87
4-7 Validity of Identification of a Fast Lifetime Component .....	91
4-8 Streak Measurement for Bulk <i>Chlamydomonas</i> Cell Suspension .....	92
<b>Chapter V Development Cryogenic STED Microscope System</b>	
5-1 Purpose of This Experiment .....	109
5-2 Optimization of the Delay Stage .....	109
5-3 Effective Donut Shape of the STED Beam .....	110
5-4 Evaluation of the Laser Power Dependence .....	110
5-5 Temperature Dependence of the STED Efficiency .....	112
5-6 Trials with Fluorescent Beads – Non-Donut Shaped STED Beam .....	113
5-7 Trials with Fluorescent Beads – Donut Shaped STED Beam .....	114
5-8 Advantages and Disadvantages of Operating STED at Low Temperature .....	114
<b>Chapter VI Photosynthetic Artificial Membrane</b>	
6-1 Purpose of This Experiment .....	121
6-2 Observation of Patterned Membrane .....	121
6-3 Observation of Patterned Hybrid Membrane .....	122
6-4 Current Challenges and Future Works .....	124
<b>Summary</b> .....	129
<b>References</b> .....	130
<b>Acknowledgements</b> .....	138

## Abstract

Oxygenic photosynthesis is performed by the two photoactive units, photosystem I (PSI) and photosystem II (PSII), that utilize light energy to generate the electron flow from water to NADPH. Photosynthetic organisms have developed mechanisms called state transitions to regulate the excitation balance between the two units, since the balance is constantly disturbed by fluctuation in light quality. The traditional state transitions model assumes shuttling of a light-harvesting complex called LHCII between the two PSs. In addition, some previous studies have suggested the appearance of the isolated LHCII bound to neither PSs, in parallel with the shuttling of LHCII. This isolated or free LHCII down-regulates the energy flow to PSs. These functions have a significant effect on the efficiency of photosynthesis, which is a potential key to improve a crop production. However, there has been no direct observation of the intracellular rearrangements and the excitation energy transfer kinetics of LHCII upon state transitions. Recently, the establishment of cryo-electron microscopy and cryo-electron tomography methods has facilitated our understandings of the molecular structures and intracellular distributions of the photosynthetic proteins. On the other hand, changes in protein-protein interactions in response to the external stimulation, such as the state transitions, are reproduced only under the physiological environment within the chloroplast. My doctoral research has focused on the development of novel cryogenic optical microscope systems that is the first in the world to provide fluorescence spectrum and fluorescence lifetime simultaneously at every pixel position on an image of a cryo-treated specimen. This was achieved by combining the cryo-microscope system with either the time-correlated single photon counting setup or the streak camera. Here, I demonstrate that this system is an innovative imaging method to realize more comprehensive investigation on the dynamic changes in excitation energy transfer kinetics based on the rearrangement of protein supercomplexes in living cells. I have succeeded for the first time in the world in spatially resolving the intracellular PSII-rich and PSI-rich regions by operating the developed system for imaging of a unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* at 80 K. A time-resolved fluorescence spectrum measurement within the identified local regions have revealed the change in the excitation energy transfer kinetics from LHCII to PSs upon the state transitions. Moreover, the simultaneous acquisitions of the spectrum and fluorescence decay kinetics enabled to specify the presence of the highly quenched and red-shifted (to 690-695 nm) LHCII which colocalized in the PSI-rich region upon the state2 induction. The observed red shift of the peak wavelength suggested the formation of LHCII aggregates. In addition, I have challenged to develop a STED microscope system that operates at low temperatures to more clearly resolve segregations of intracellular PSII-rich and PSI-rich regions. Although I have confirmed the advantages of the low-temperature environment for efficient stimulated emission, I could not succeed in improving the spatial resolution probably due to the problem in the quality of the donut-shaped STED beam

(別紙様式 5)

at the focal plane. In parallel with the development of the cryogenic optical microscope system, I also began collaborative research on the development of a novel model sample with thylakoid membrane arranged on the substrate for easy microscopic observation. I devoted my doctoral research to establish a novel in-vivo platform to understand the photophysical and biochemical processes in photosynthesis and to inspire the design of genetically modified crops for improvement of crop production.

## 論文審査の結果の要旨

藤田祐輝が提出した論文は、酸素発生型の光合成において二つ存在する光化学系間の励起頻度のバランスを保つための調節機構であるステート遷移と呼ばれる現象について、独自に開発した低温顕微鏡を用いて行った研究に関するものである。光合成は、光エネルギーを使って水を酸化し酸素を発生する光化学系II (PSII)と、PSII から流れてくる電子を光エネルギーを使ってNADP<sup>+</sup>に渡してNADPHを生成する光化学系I (PSI)の二つの光化学系が直列の太陽電池のように働いている。それぞれの光化学系には、励起エネルギーを光化学系に渡す働きをするアンテナタンパク質(LHC)が結合しており、吸収できる光エネルギー量を増幅している。ステート遷移は古くから知られる調節機構であり、PSII が PSI に比較して過剰に励起された場合に、PSII に結合している LHC の一部が外れて PSI に結合することで、二つの光化学系間の励起バランスを保っていると考えられている。二つの光化学系は、葉緑体内で数 10~数 100 nm 程度離れた場所に分離して局在することが知られており、ステート遷移では LHC が葉緑体内を PSII の領域から PSI の領域へ移動することが想定されている。しかし、これまでこのような LHC の葉緑体内分布の変化を、顕微鏡レベルで可視化するような研究は行われてこなかった。光学顕微鏡の空間分解能は数 100 nm 程度であり、LHC の移動を可視化することは、ギリギリではあるが可能なレベルである。しかし、クロロフィルからの自家蛍光を用いて LHC や光化学系の葉緑体内局在を可視化するには、高度なスペクトル分解や時間分解機能を光学顕微鏡に導入する必要があったため、これまで上記のような研究は実施されてこなかった。藤田祐輝は、独自の分光技術を低温顕微鏡に導入することで、この課題を解決することを目指した。

彼の修士課程での研究では、光合成研究においてモデル生物となっている単細胞の緑藻類であるクラミドモナスをサンプルとして低温顕微鏡を用いた蛍光顕微分光測定により、葉緑体内の PSI、PSII、および LHC の分布を可視化する研究を行っている。なお、ここで低温顕微鏡を使っているのは、80 K ほどの温度では PSI と PSII の蛍光バンドがはっきりと分離したバンドとして観測できること、低温にすることでこれらの成分の蛍光収率が上昇すること、を利用するためである。しかし、蛍光スペクトルのみの測定を行った修士課程での研究では、測定で得られる各成分の細胞内の蛍光の強弱が各成分の濃度の濃淡によるのか、蛍光収率の大小によるのか、明らかにできなかった。そこで、博士後期課程では蛍光寿命も同時に測定できるように装置を拡張することで、葉緑体内局所での各成分の濃度およびエネルギー移動の活性をより定量的に見積もることを目指した。そのため、共焦点顕微鏡で検出される蛍光をビームスプリッターで二つに分離し、一方は以前と同様にスペクトル測定のための分光器と CCD カメラで検出し、もう一方はアバランシェフォトダイオードにより光子計数を行い時間分解蛍光測定が可能となるように装置を拡張した。この方法では、680 nm で検出される LHC の蛍光寿命と、各成分の蛍光スペクトルを顕微鏡像の全てのピクセルにおいて取得できるようになった。ただ、LHC の蛍光減衰速度からは、LHC から光化学系へのエネルギー移動速度と LHC の局所濃度が見積もられることが期待されたが、680 nm で検出される蛍光信号には、PSI および PSII の蛍光がある程度混在していることが分かり、十分に定量的な解析を行うことは困難であることが判明した。

そこで、次にストリークカメラを検出器として用いることができるように低温顕微鏡のさらなる拡張を行った。ストリークカメラは、蛍光寿命とスペクトルを同時に測定できる優れた装置である。一方で、検出感度は高くないため、顕微鏡像の全ピクセルでデータを取得することは困難である。そのため、LabView により独自のプログラムを組み、あらかじめ顕微鏡像を取得して細胞内の PSI-rich および PSII-rich 領域を特定し、その後それぞれの領域でのストリークカメラ測定を行えるようにした。その結果、細胞を壊すことなく、ステート遷移が起こる前後での PSI-rich、PSII-rich それぞれの領域での時間分解蛍光スペクトルのデータを世界で初めて測定することに成功した。さらに、これらのデータに対して Fluorescence Decay-Associated Spectra (FDAS) と呼ばれる解析手法を適用し、各領域におけるエネルギー移動や励起消光過程の有無およびそれらを起こすスペクトル成分を明らかにした。FDAS 解析の結果、特に PSI-rich 領域において、LHC の一部が消光状態となっていることを

初めて明らかにした。さらに、この消光状態にある LHC は凝集して蛍光波長が長波長にシフトしていることも明らかにした。このことから、ステート遷移では LHC が二つの光化学系の間を移動することが想定されているが、どちらの光化学系にも結合せずに凝集して消光状態になる LHC の存在を明らかにした。

低温顕微鏡では、上記のように重要な情報を取得できることが分かったが、一方でその空間分解能は PSI-rich と PSII-rich 領域を分解するにはギリギリであり、空間分解能のさらなる向上が重要であった。このことを実現するため、近年実現されている超解像顕微鏡技術の一つである Stimulated Emission Depletion(STED)技術を低温顕微鏡に導入することを目指した。低温では、STED 法において問題となる振動励起状態からの励起により誘導放出の効率が下がる現象をほぼ完全に抑えることが可能となり、より有効な STED 顕微鏡として運用できると期待される。実験により、実際に低温では振動励起状態からの励起はほぼ完全に抑えられ、高効率な STED 顕微鏡を構築できることが示された。一方で、誘導放出を起こすためにはビームをドーナツ状にする必要があるが、低温顕微鏡下では対称なドーナツ形状の実現が難しく、現時点では残念ながら空間分解能の向上には至っていない。

その他、神戸大学の森垣研究室との共同による人工チラコイド膜の構築とその物性評価の研究にも着手している。まだ、準備段階の研究ではあるが、低温顕微鏡により光合成タンパク質が人工膜にどの程度導入されているかを定量化する測定に成功した。

これらの研究結果は、本人が自立して研究を行うのに必要な能力と学識を有することを示している。したがって、藤田祐輝提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。