

4B05

アンチストークス蛍光による葉緑体中の光化学系 I スペクトルの観測

(京大院・理¹, 京府大・人環²)

○長谷川 慎¹, 椎名 隆², 寺嶋 正秀¹, 熊崎 茂一¹

[序]

植物などの行う光合成明反応では光エネルギーを還元力(NADPH)と自由エネルギー(ATP)として蓄える。NADPHを合成するには励起された光化学系 II (系 II) から光化学系 I (系 I) へと電子伝達される必要があり、またその過程で生じるチラコイド膜をはさんだプロトン濃度勾配を利用し ATP が合成される。一方系 I は非循環的電子伝達によりチラコイド膜をはさんだプロトン濃度勾配をつくり ATP を合成することもできる。上述したように系 I と系 II は電子伝達を行う必要があるにもかかわらず、電子顕微鏡による研究などからこれらは空間的にある程度分離されていることが知られている。我々は系 I と系 II の三次元分布およびチラコイド膜の三次元構造について、電子顕微鏡では得られない光化学的な情報を直接得るためにラインスキャン二光子励起スペクトル顕微鏡を作成し、実験と解析を行ってきた (装置の詳細は参考文献)。

トウモロコシを含む C4 植物では、効率よく炭素固定を行うために維管束鞘細胞でのみカルビンベンソン回路を行う。維管束鞘細胞で必要とされる炭素と還元力は葉肉細胞から C4 酸として運搬されるため、維管束鞘葉緑体は NADPH を合成する必要がなく系 II 量は葉肉細胞葉緑体に比べ大幅に減少する。これに伴い、チラコイド膜 3 次元構造も変化している。しかし、そのような葉緑体機能分化の成熟段階を生理的な条件下の葉緑体で直接観測するような研究例は乏しく、顕微分光の有用性を探る上で、重要な研究対象であると思われる。

系 I と系 II の蛍光波長は異なるが、常温での系 I 蛍光は非常に弱く系 II 蛍光の裾野に埋もれており、一般に系 I 蛍光のみを選択的に観測することは難しいと思われてきた。本報告では、系 I 蛍光を高い確率で励起できるアンチストークス蛍光法を利用して、系 I 純度の高い蛍光スペクトルを得て、葉緑体の蛍光スペクトル解析に利用する新しい方法を提案する。

[実験]

トウモロコシの葉は摂氏 25 度の栽培室で育て、顕微観察試料を二つの方法で作成した。一つ目は、7 mm 角に切り取った葉をそのままカバーガラスとスライドガラスで水とともに封入し、葉の表面から観察した (表面観察)。二つ目は葉脈に垂直な断面で薄片化したものをカバーガラスとスライドガラスに封入した (断面観察)。維管束鞘葉緑体は断面観察でのみ観測可能であった。励起は 805 nm の近赤外レーザーを用い、モードロック発振 (0.2 ピコ秒、76MHz) での二光子励起と連続発振 (CW) での一光子励起を適宜使い分けて、葉緑体の蛍光スペクトルを得た。

[結果]

葉肉細胞葉緑体・維管束鞘細胞葉緑体についてそれぞれパルスと CW で励起した場合の葉緑体全体の蛍光スペクトルは図 1 のようになった。明視野像では図 2.a のように見える葉肉細胞葉緑体をパルスレーザーで励起した場合の蛍光画像は図 2.b のようになったのに対し、CW で励起した場合の蛍光画像は図 2.c のようになった。

[考察]

図1の葉肉細胞葉緑体の二光子励起蛍光スペクトルでは系II由来と考えられる680nm付近の蛍光強度が非常に強く、730nm付近では目立った極大は無い。一方、維管束鞘細胞葉緑体では系I由来と考えられる730nm付近の蛍光極大が現れた。これは維管束鞘細胞で存在する系Iの

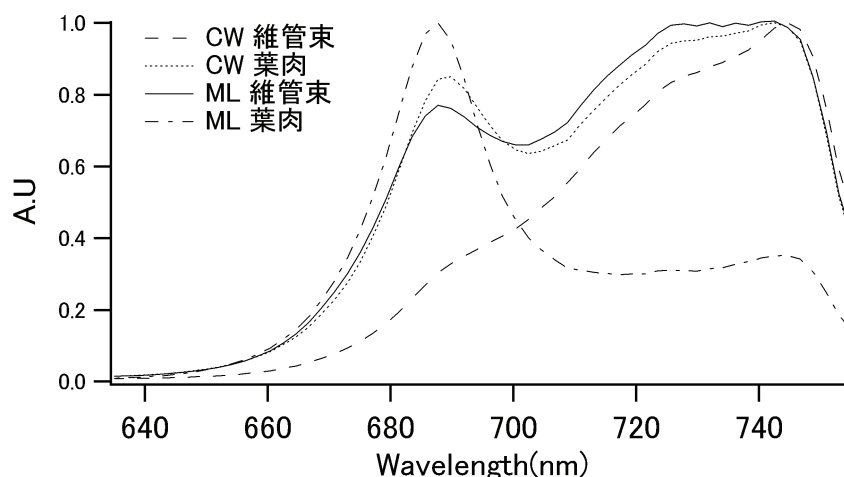


図1 維管束鞘細胞・葉肉細胞葉緑体の二光子励起蛍光・アンチストークス蛍光スペクトル

の蛍光の極大と考えられる。さらに、アンチストークス蛍光では、葉肉、維管束鞘のいずれの場合でも、2光子励起の場合に比べ730nm付近の蛍光が非常に強く現れた。二光子励起に比べ、810nmの1光子励起では系I/系IIの励起比率が非常に大きいと考えられる。系Iは系IIより長波長にクロロフィル電子吸収ピークをもつため、アンチストークス蛍光が検出しやすい。

図2.bの二光子励起蛍光画像では図2.aの明視野よりはっきりと内部の細かな構造が存在しているのに対し、図2.cではそのような構造が見られなかった。これには二つの理由が存在すると考えられる。まず二光子励起で主に見ている系IIはグラナ部分に集中しているのに対し、CW励起で主に見ている系Iは葉緑体内に比較的均一に分布しているためであると考えられる。第二には、アンチストークス蛍光では二光子励起より空間分解能が低くなるため、実際には有り得る微細構造が見えていない可能性もある。

図1のスペクトルから系Iと系IIのスペクトルを算出し、それを3次元空間全点においてフィッティングに用い、これまでよりも正確に系Iと系IIの空間分布を見積もることが可能になった。この解析結果などは講演当日に発表する。

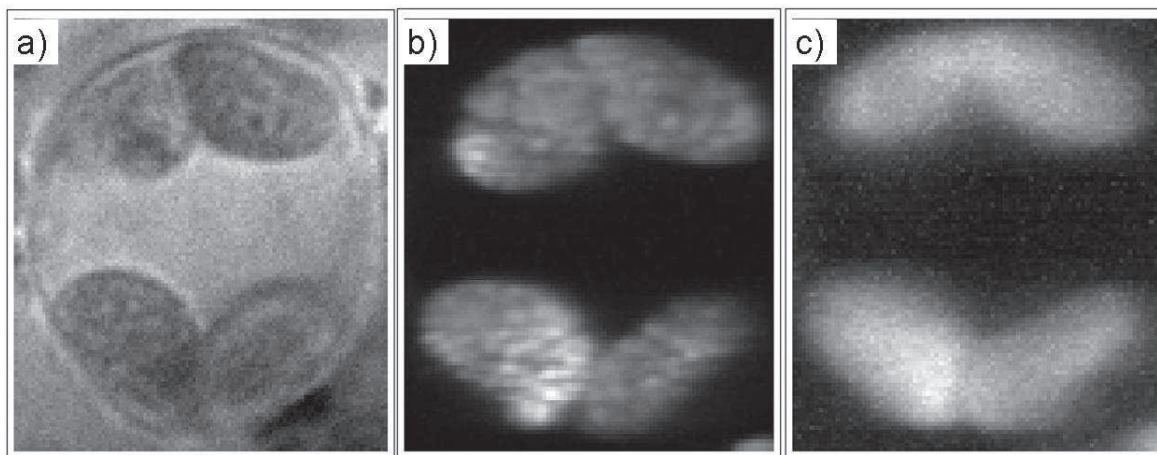


図2 葉肉細胞の a)明視野像, b)二光子励起蛍光画像, c)アンチストークス蛍光画像 画像領域は約15 μ m \times 17 μ m

[参考文献]

- 1) S.Kumazaki et al. Journal of Microscopy, Vol. 228, Pt 2 2007, pp. 240–254