

## 2B02

### アンチストークス蛍光の特性：異種葉緑体識別能力と 人工的クロロフィル会合体検出

(1)京大院理、(2)JST さけがけ) 長谷川 慎<sup>1</sup>, 吉田 隆彦<sup>1</sup>, 藪田 光教<sup>1</sup>, 寺嶋 正秀<sup>1</sup>,  
○熊崎 茂一<sup>1,2</sup>

**【序】** 植物の葉緑体やシアノバクテリアが示す自家蛍光ではクロロフィルが最も長波長に現れる。生理的な温度におけるクロロフィル自家蛍光では、二つの光化学系色素-タンパク質複合体 (PSII と PSI) のうち PSII からの寄与が支配的であり、PSI からの蛍光を観測するためには 77K などの低温蛍光測定が用いられてきた。生理的温度で PSI のみの蛍光を観測するという例外的な現象は PSII が失われた C<sub>4</sub> 植物 (トウモロコシなど) の維管束鞘葉緑体やシアノバクテリアの異型細胞などに限られた現象であった。近赤外パルスレーザー励起 2 光子励起蛍光スペクトル顕微鏡 [1,2] によって PSI と PSII が含まれるチラコイド膜の微細構造を観察する試みの途上で、我々は「785nm - 820 nm で発振する連続発振レーザー (CW レーザー) によってもクロロフィル蛍光スペクトルが観測され、そのスペクトル形状は近赤外パルスレーザー励起や可視光線励起の場合とは異なり、PSI の蛍光スペクトルが強く観測される」という現象を見出した [3]。励起レーザー強度依存性、励起レーザー波長依存性の解析から、少なくとも見かけ 1 光子励起の現象である [3]。PSI の蛍光が相対的に強くなる原因は PSI の吸収スペクトルの裾野が PSII に比べて圧倒的に強く近赤外領域まで伸びているためであると考えられ、励起波長に比べて大幅に短波長シフトした蛍光が観察されるので既報の論文に倣ってアンチストークス蛍光と呼んでいる [4]。この顕微分光法は常温で PSII:PSI の相対蛍光強度を光学顕微鏡の空間分解で画像化するために有効であるが、これまでトウモロコシ葉緑体で我々が実証したのみであったので、得られる PSI 蛍光スペクトルに関する信頼性が不確かであった。本報告では低温蛍光スペクトルの極大波長がトウモロコシとは異なる緑藻の一種クロレラについても近赤外レーザーパルス 2 光子励起蛍光スペクトルと近赤外 CW レーザー 1 光子励起蛍光スペクトルの比較を行った。また、同じ緑藻において、培養液に有機溶媒が混入した場合に引き起こされるクロロフィル会合体の形成過程の顕微分光観察を行った。クロロフィル会合体は単量体的クロロフィルに比べ、大幅に長波長側に吸収がシフトするため、近赤外 CW レーザーによる直接励起によりアンチストークス蛍光の強度が大きいと期待されたからである。

**【試料・方法】** トウモロコシ生葉 (*Zea mays*) と緑藻クロレラ (*Parachlorella kessleri*, 本稿ではクロレラと呼ぶ) は閉じ込め型セル中に水および培養液と共に封入し、油浸 100 倍の対物レンズで観察した。2 光子励起蛍光は 808 nm, 0.2 ps, 76MHz のレーザー、1 光子励起アンチストークス蛍光は 785 nm の CW レーザーで得た。クロレラに人工クロロフィル会合体を形成させる処置は、通常の培養液をアセトンと混合 (体積比 85:15) することで実現した。

**【結果と考察】** 本クロレラにおいては 77K で系 I 蛍光スペクトルの極大波長が 725nm であり、トウモロコシなどの植物が 735-740nm に極大波長を示すのに比べ短波長である。この特徴を常温の系 I アンチストークス蛍光スペクトルが示すのか否かに着目した。クロレラの場合、連続発振レーザー (785 nm) によって増大する系 I 特有成分の極大波長は 710 nm であった [5]。トウモロコシでは葉肉細胞葉緑体と維管束鞘細胞葉緑体の両方において、系 I 特有成分の極大波長は 730-740 nm

と得られた。よって、低温での系1蛍光スペクトルの極大波長と全く同じではないにせよ、低温系1蛍光との相関関係があることが明確に示された。

アセトン入りの培養液に移植されたクロレラ細胞が示す蛍光スペクトル変化を近赤外パルス励起とCW励起の両方、および顕微吸収スペクトルで経過を追跡した[5]。10時間以内の変化の全ての種類の蛍光スペクトルは5つのスペクトル成分に分解された[5]。それらのスペクトル成分に分解して時間変化を表示した画像を下に示す。人工的なプロセスながら、有機溶媒が緑藻細胞にもたらす変化を、細胞内部構造、スペクトル変化成分の両面から同時に明らかにした世界初の観測例と考えられ、藻類の工学的利用のためにも有用な情報が含まれていると期待される。

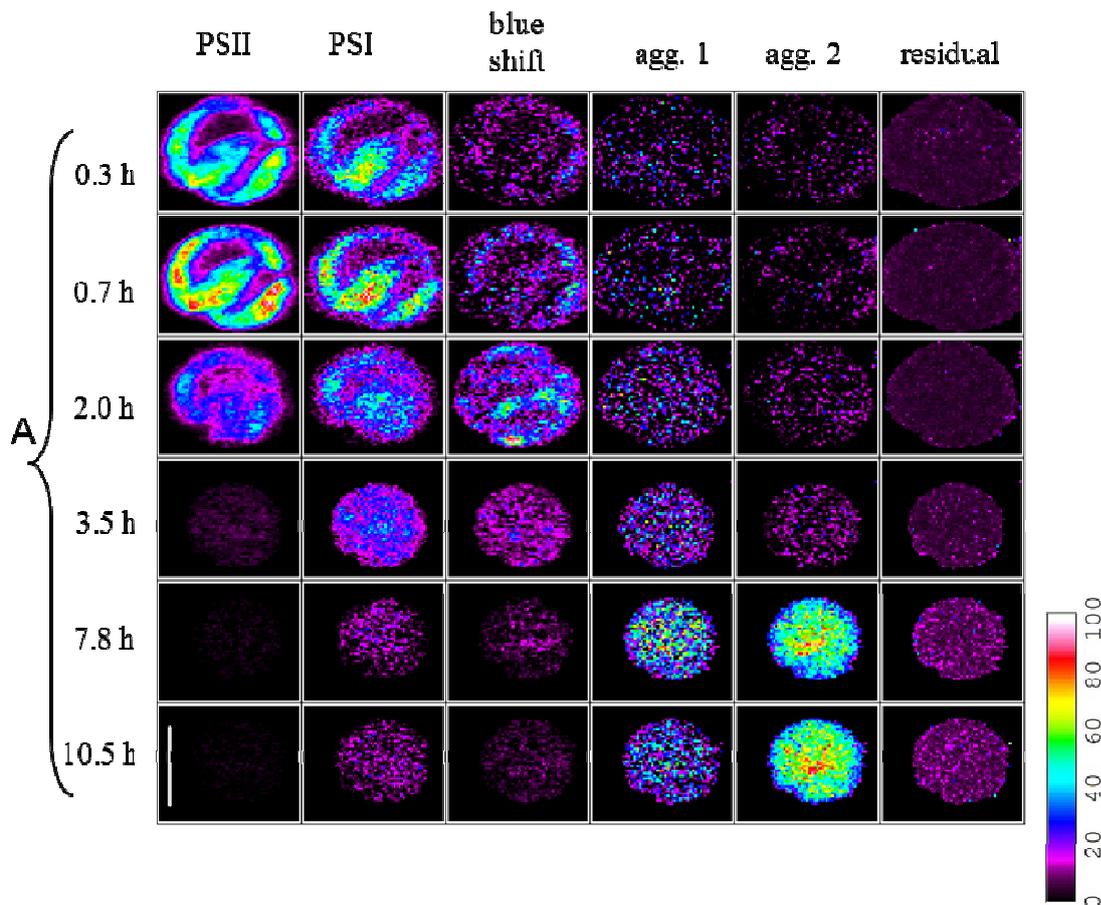


Fig. Five fluorescence components in a *P. kessleri* cell treated with acetone. Bar=5.0  $\mu$ m

[文献] [1] \*S. Kumazaki M. Hasegawa, M. Ghoneim, Y. Shimizu, K. Okamoto, M. Nishiyama, H. Oh-oka and M. Terazima *J. Microsc.* 228, 240 - 254, (2007).

[2] \*熊崎茂一, 長谷川 慎, 分光研究, 60(1), 19 - 21 (2011)

[3] M. Hasegawa, T. Shiina, M. Terazima, and \*S. Kumazaki, *Plant Cell Physiol.*, 51(2), 225 - 238 (2010).

[4] E. Kato and T. Murakami, *Polym. Gels and Netw.*, 6, 179 - 190, (1998).

[5] M. Hasegawa, T. Yoshida, M. Yabuta, M. Terazima and \*S. Kumazaki, *J. Phys. Chem. B*, 115, 4184 - 4194, (2011).

\* corresponding address => kumazaki と kuchem.kyoto-u.ac.jp の間にアットマーク