

3P085 近赤外光励起アンチストークス蛍光イメージングを利用した  
光合成膜顕微分光

(京大院・理<sup>1</sup>, 科学技術振興機構 さきがけ<sup>2</sup>, 京府大 生命環境<sup>3</sup>)

○熊崎 茂一<sup>1,2</sup>, 明里 将志<sup>1</sup>, 長谷川 慎<sup>1</sup>, 寺嶋 正秀<sup>1</sup>, 椎名 隆<sup>3</sup>

Anti-Stokes Fluorescence Imaging of Thylakoid Membrane by Near-Infrared Laser Excitation (1:Grad. Sch. of Sci., Kyoto Univ., 2:JST-PRESTO and 3:Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Kyoto Prefectural Univ.)

Shigeichi Kumazaki<sup>1,2</sup>, Masashi Akari<sup>1</sup>, Makoto Hasegawa<sup>1</sup>, Masahide Terazima<sup>1</sup> and Takashi Shiina<sup>3</sup>.

[背景] 常温葉緑体の自家蛍光では光化学系 II (系 II) とその光捕集複合体(LHCII)の蛍光が支配的で、光化学系 I(系 I)とその主な光捕集複合体(LHCI)の蛍光がしばしば無視されるほど弱いことが葉緑体の分光学的な研究が始まって以来の常識であった。系 I や LHCI の蛍光を見るためには 77K 等の低温が用意され、それは確かに狭いエネルギー領域に重なりあう蛍光成分を区別するために有効であった。低温の光合成膜を顕微分光で研究する試みもあり、それは一定の成功を収めてはいるものの、系 I や系 II が関わる光合成膜の生理的な変化を直接に実時間で観察するためには常温で系 I の情報も得られることが望ましい。我々は常温で系 I 蛍光をとらえて画像化する手法を提案し(文献 1,2)、それが実際の細胞分化の途上における光合成膜の変化をとらえることができることを実証してきた(文献 3)。

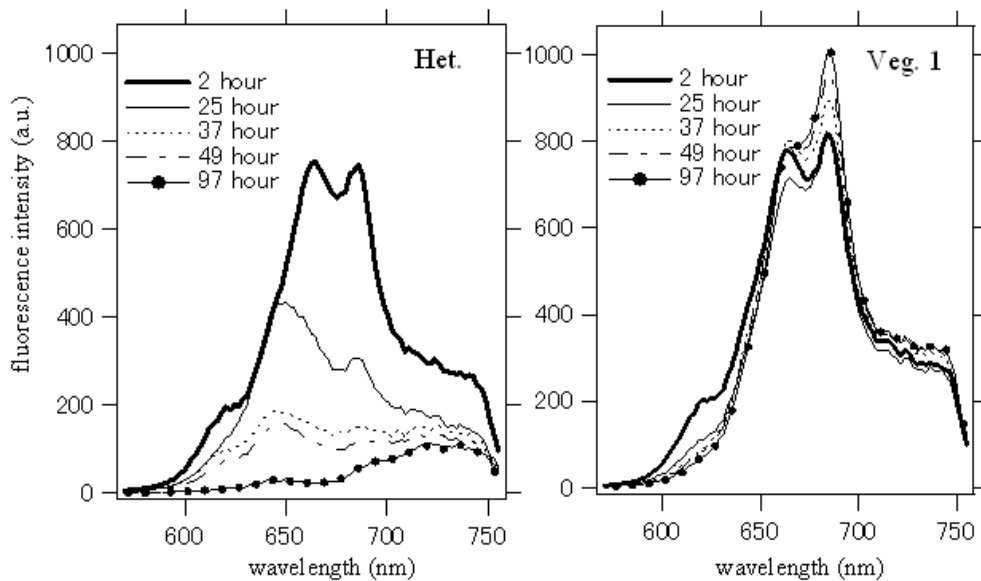
今回の講演では、第一の内容として、この文献 3 で報告した内容について詳細な解説を行う。糸状連結シアノバクテリアで 10-20 個の細胞の内 1 個で進行する細胞分化を顕微蛍光スペクトルで追跡し、色素タンパク質複合体がある規則性を持って崩壊し、細胞機能が変化していく様相の全貌をとらえることに成功した。

第二の内容はアンチストークス蛍光の発生確率に関する基礎研究である。光合成色素ではないが、クロロフィルの吸収極大波長(およそ 680nm)よりやや短波長に吸収極大波長(646 nm)を示すレーザー色素溶液(Oxazine 1 in ethanol)について、785nm 励起と 488nm 励起の比較でアンチストークス蛍光発生確率の定量的評価を行った(文献 4)。このような定量的評価はまだ例が少なく、今後の一般性理解に向けて有用であると期待される。

[光合成膜が酸素発生を停止して窒素固定と共存できる様式へ転換される生理的変化追跡]

糸状シアノバクテリア(*Anabaena variabilis*)の自家蛍光スペクトルは PEC(蛍光極大 619 nm), PC(645 nm), APC(661 nm)と略記されるアンテナ色素複合体と系 II(685 nm)、系 I(730 nm)の 5 つの蛍光成分で説明できることが特異値分解とグローバル蛍光成分解析により判明した。成分分解する前の単一細胞の蛍光スペクトル変化を次ページに示す。窒素固定能力を持つに至る異型細胞(Het.:heterocyst) とそれに隣接する栄養細胞 (Veg. 1: vegetative cell) の蛍光スペクトルを比較している。栄養細胞においては PEC や PC の成分のみが顕著に減少しているが APC は維持されており、系 II 蛍光はわずかに増加すら示す。成分分解により、異型細胞では系 II 蛍光が APC 蛍光と同時に消失していることが分かった。これらアンテナ色素を見るためには 808nm パルスレーザーによる 2 光子励起を用いたが、785nm 連続発振

レーザー励起アンチストークス蛍光画像の場合、PEC, PC, APC, 系 II が劇的に小さくなり、ほぼ系 I のみの信号が得られる。異型細胞分化途上の系 I 濃度がほぼ一定であるということ、アンテナ色素からのエネルギー移動の影響されず世界で初めて決定することができた。

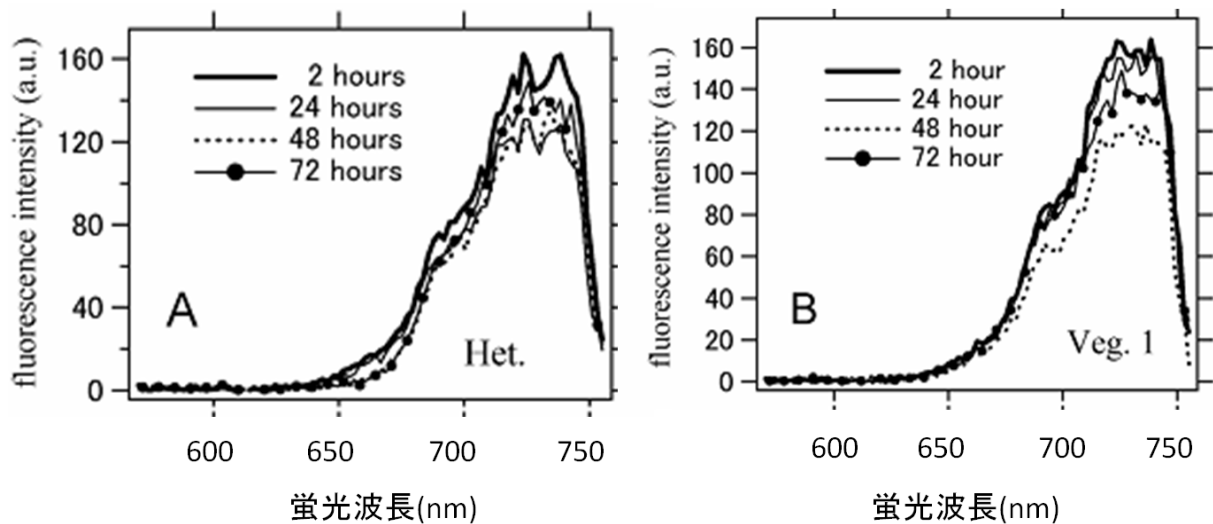


上図 808nm パルスレーザーによる単一細胞2光子励起蛍光スペクトル (7細胞平均)

下図 785 nm 連続発振レーザーによる単一細胞1光子励起蛍光スペクトル(7細胞平均)

### 異型細胞(ヘテロシスト)

### 栄養細胞1



紙面の都合により、アンチストークス蛍光発生確率の定量的評価については当日詳細を述べる (文献4)。

[文献] (1) M.Hasegawa, T. Shiina, M. Terazima, and S. Kumazaki,\* (2010) Plant Cell Physiol. 51(2), 225 – 238.

(2) M. Hasegawa, T. Yoshida, M. Yabuta, M. Terazima and S. Kumazaki\* (2011) J Phys. Chem. B, 115, 4184 – 4194.

(3) S Kumazaki\*, M. Akari and M. Hasegawa (2013) Plant Physiology, 161, 1321 – 1333.

(4) S Kumazaki\* (2013) Chem. Phys. 419, 107–112.