

【序】 我々は光合成で光エネルギー捕獲の役割を担う色素とタンパク分子の複合体の光励起状態について興味を持っている。今回、一個一個の複合体を低温で分光測定するために、液体ヘリウム温度で測定可能な共焦点レーザー蛍光顕微鏡を製作した。液体ヘリウムクライオスタット中の励起スポットの大きさは約 900 nm、発光の検出効率は約 0.1 % であり、一個の複合体の蛍光を測定できた。

【共焦点レーザー走査顕微鏡】 製作した装置を図 1 に示す。この蛍光顕微鏡は、光源の Ti:S レーザー、ピンホール、傾きを上下左右に変えられるミラー、検出器(APD, PerkinElmer 社)からなる。背景光を減らすため、ピンホールの像と検出器の像が試料上で重なる共焦点の配置をとっている。顕微鏡の分解能は 900 nm 程度であり、対物レンズの NA 0.55 で決まる回折限界にはほぼ達している。この顕微鏡は、試料と対物レンズは固定したままでレーザーのスポットを試料上で走査して画像情報を取得する。レーザーのスポットの走査は、光路の中間にあるミラーの傾きを変えることで実現する。スポット走査の最小ステップは約 100nm である。

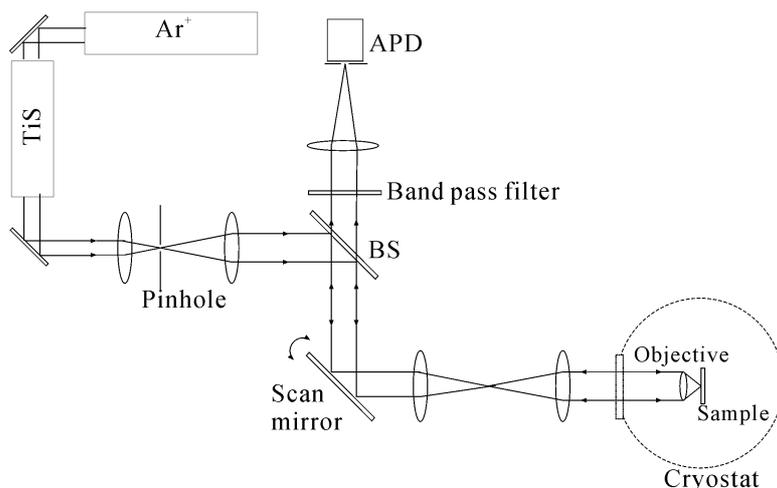


図 1

【一分子蛍光観測と分光測定】

試料濃度を十分薄めると、個々の複合体の発光を蛍光画像上で独立した輝点として観測できる。一個の複合体にレーザースポットを合わせ、レーザー波長を掃引しながら発光強度を記録することで個々の複合体の発光励起スペクトルを測定した。

励起光は 780 nm から 870 nm の波長範囲で掃引し、ストークスシフトした蛍光を APD で検出する。蛍光波長に合わせたバンドパスフィルター(中心波長 906.5 nm、バンド幅 50 nm、dr. Hugo Anders 社)を用いて励起波長の背景光を遮断した。この装置の蛍光の検出効率は約 0.1 % である。

コンピュータ制御による励起波長の掃引は速さ 0.3 nm/sec、再現性 0.01 nm である。現在、スペクトルの時間変化を追うために、掃引を高速化すべくプログラムを改良している。これにより掃引速度 4 nm/sec を見込んでいる。

【液体窒素温度における光合成色素・タンパク複合体の測定】

液体窒素温度で紅色光合成細菌 *Rhodospseudomonas acidophila* の光捕集色素・タンパク複合体 LH2 を観測した。OG ミセルで可溶化した LH2 の濃度 10^{-10} mol/l の溶液に PVA (wt1%) を加えたものを石英基板上にスピコートした。励起光強度 20 W/cm^2 で観測したところ、LH2 を 1 分子から数分子含むミセルからの発光を捕らえることができた(図 2)。その中で一分子のみ含むミセルを図 3 に示す。蛍光強度は 400 counts/sec で、蛍光像の分解能は 900 nm 程度である。図 4 は LH2 一分子の発光励起スペクトルである。検出器のダークカウントは約 400 count/sec で、一分子の発光は励起波長が 862 nm のときに最大で 400 count/sec ほどである。400 count/sec の発光が一分子によることは、図 5 に示したような階段状の光退色によって確かめられた。図 5 の測定では分子を光退色させるために励起光強度を一桁強めてある。

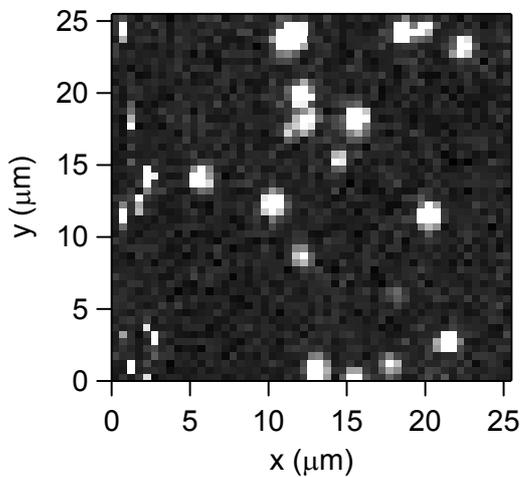


図 2

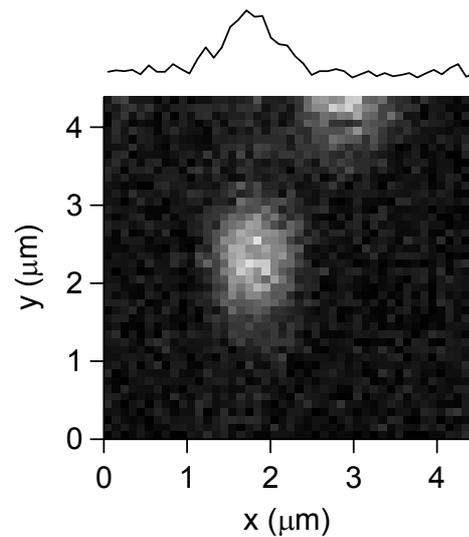


図 3

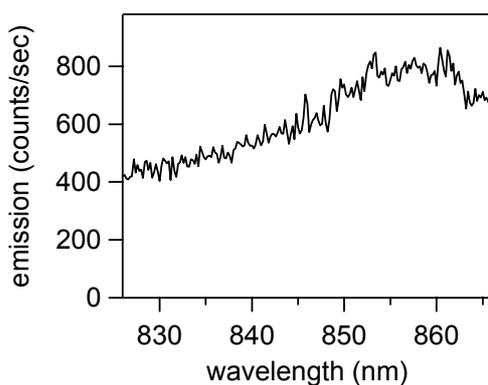


図 4

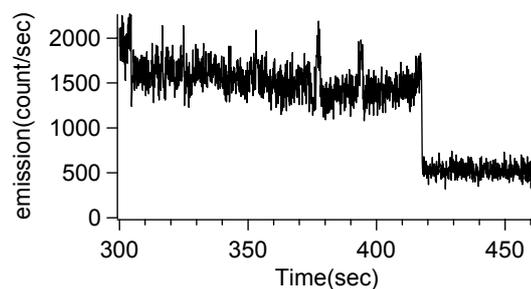


図 5

【謝辞】 光合成色素・タンパク複合体は名古屋工業大学応用化学科・南後守教授、出羽毅久助手、小川真貴子さん、篠原清さんに提供していただきました。スピコートでは東京工業大学化学科の浅野素子助手にお世話になりました。