

## 1A15 植物型光合成膜の環境順応変化を捉える顕微分光法の実践と改良

(京大院・理<sup>1</sup>, 阪大院・理<sup>2</sup>) ○熊崎 茂一<sup>1</sup>, Ghoneim Mohammad<sup>1</sup>, 長谷川 慎<sup>1</sup>, 西山 雅祥<sup>1</sup>, 清水 祐吾<sup>1</sup>, 寺嶋 正秀<sup>1</sup>, 大岡 宏造<sup>2</sup>

**【序】** 高い運動自由度を持って最適な生存条件を見つけられる能動的な動物と違って、植物の生は受動的である。しかし、その受動性を支えるのは、高度な柔軟性で、仔細に観察すれば非常に動的ともいえる環境順応機構である。巨視的には、日射方向へ向けて成長する光屈性などが知られているし、微視的なものでは葉緑体内部の光合成光化学反応を担うチラコイド膜の光環境(強度、スペクトル)に応じた構造変化が知られている。

生化学的測定と電子顕微鏡観察の組み合わせによりチラコイド膜の環境順応については長い研究の歴史がある。しかしながら、凍結乾燥などにより固定化されたチラコイド膜の静的な構造を見ただけでチラコイド膜の環境順応変化の全てが分かっているのだろうかという疑問は残る。一方、動的なチラコイド膜の性質の有力な研究手段としては広い意味でのポンプ&プローブ法やパルス変調蛍光測定法が知られておりチラコイド膜中の光化学系I(PSI)や光化学系II(PSII)の状態が高い時間分解能で計測されている。しかし、それらの手法は微細な領域の観察に対しては感度が不十分なことが多い。

我々の中長期的目的は、光学顕微鏡の性質を最大限に活用して、チラコイド膜の環境応答を微細な構造を把握しつつ捉える手法の探索である。電子顕微鏡に比べ、空間分解能はおおよそ2桁劣るものの、生きている試料を3次元的に観察でき、損傷を十分抑制できれば環境応答の観察も可能であろう。ポンプ&プローブ法やパルス変調蛍光測定法で得られている動的性質の知見を微視構造の変化で記述できることが期待される。

本報告では、研究対象として植物と同等の酸素発生型光合成を行うシアノバクテリアを選び、その単細胞以下の微細な領域の蛍光スペクトルを伝播電磁場型光学顕微鏡としてはほぼ極限の空間分解能で観察した実験について報告する。シアノバクテリアの場合、チラコイド膜の蛍光スペクトルはチラコイド膜上のPSI, PSIIそして光捕集系フィコビリゾーム(PBS)からの蛍光が主な成分である。それらは異なる蛍光極大波長を示すが波長が近接しているので、ダイクロイック鏡で分離するのは必ずしも得策ではなく、スペクトルを精密に得ることが精確なチラコイド膜の状況を知るためには好ましい。しかし、定常蛍光スペクトルにはそれらの化学量論比率とエネルギー移動の関係が反映しているはずで、残念ながら両者を分離することは難しい。だが、当面の課題は顕微分光的観察が可能な限り光励起分子の数を最小にした条件で微視的定常蛍光スペクトルがどう見えるべきかという基礎資料を蓄積することである。チラコイド膜に関して単色の蛍光画像の情報は豊富だが細胞以下の微視的領域の精密スペクトルの情報は乏しいからである。

**【試料】** 糸状連結シアノバクテリア(アナベナ *Anabaena* PCC 7120)を液体培地で継代培養した。無機栄養のみでの培地での白色蛍光灯による独立栄養生育条件と、糖も加えて暗所で生育させる従属的栄養生育条件の二つの培養方式を試みた。液体培地から取り出したアナベナをカバーガラスとスライドガラスで挟み込み、美爪塗料で封じて観察試料とした。

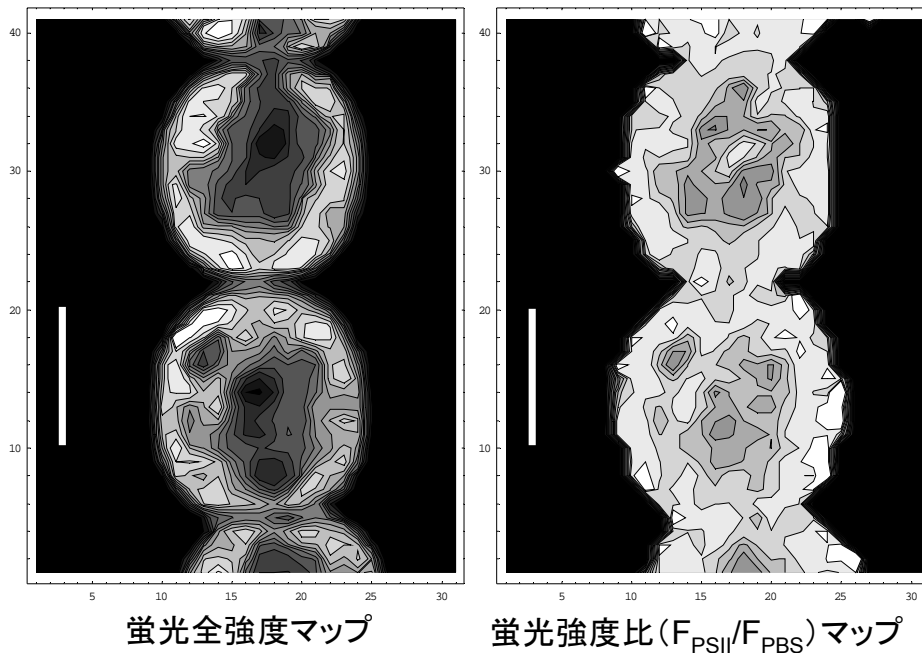
**【顕微分光1号機】** 市販の共焦点顕微分光システム(ナノファインダー、東京インスツルメンツ)に

において励起光はパルスレーザー(820 nm, 0.2 ps, 76MHz, 0.2 mW)を用いた。対物レンズは油浸100倍(NA=1.4)であった。点像分布関数のFWHMは焦点面内方向で0.2 $\mu$ m,光軸方向で0.6  $\mu$ mであった。本稿投稿時点ではアナベナの実験データのほとんどをこのシステムによって得た。

**【顕微分光2号機】** 顕微鏡1とは別に、顕微分光システムを新規に構築した。励起レーザーはパルスレーザー(800 nm, 約0.1 ps, 100MHz)であるが、顕微鏡へ導入する前に共鳴ミラーにより高速な入射角の振動(8 kHz)を加えた。これにより試料中の直線状の領域(約20 $\mu$ m)に集光した。この領域全ての蛍光をイメージ保存型分光器に同時入射した。分光器出口のCCD画素面では縦軸方向に試料中の空間座標 X、横軸方向に波長が異なる蛍光を同時検出した。点像分布関数のFWHMはX軸方向で0.3 $\mu$ m以下,Y軸方向で0.2 $\mu$ m, 光軸方向で0.6  $\mu$ mであった。これにより、3次元走査速度が飛躍的に向上した。この性能の評価とチラコイド膜への応用結果も当日述べる。

**【結果と考察】** アナベナの蛍光スペクトルを基に、全蛍光強度と蛍光強度比のマップを作成して下図に示す(白いほど強度が大きい、または比率が大きいことを示す)。蛍光強度比はPSIIの蛍光スペクトル極大波長とPBSの蛍光スペクトル極大波長における強度の比である。細胞膜に沿ってチラコイド膜が局在していることはよく知られた事実であるが、チラコイド膜が存在しにくい中心部において、周辺部と明瞭に異なる蛍光スペクトルが得られることはこれまで報告されていない新事実である。この蛍光スペクトルの形状変化が自己吸収効果によるスペクトル変形である可能性は同時に測定された顕微吸収スペクトルからの見積もりにより否定された。

講演当日は、暗条件培養試料の結果や、PSIとPSIIの蛍光強度比率分布などについても報告を行う。さらに、蛍光観察用の励起レーザーではなく、観察用のハロゲンランプ光照射条件により現れる変化の規則性も見出した。つまり、近赤外フェムト秒パルスの二光子励起により励起分子数を極限まで減らした結果、第二の光の入力に対する変化も見られるわけで、光環境への応答を高い空間分解能で追跡できることを実証していると思われる。



アナベナの蛍光像を等高線表示したもの。図において白いスケールバーは3マイクロメートルを示す。使用したのは顕微分光1号機である。各空間点で蛍光スペクトルを逐次取得した。