

業績紹介：ライン走査 2 光子励起蛍光スペクトル顕微鏡の開発と ラン藻細胞内光合成膜スペクトル変化規則性の発見

熊崎茂一（京大院理・計画研究代表者）

論文題目：" A Line-Scanning Semiconfocal Multiphoton Fluorescence Microscope with a Simultaneous Broadband Spectral Acquisition and its Application to the Study of the Thylakoid Membrane of a Cyanobacterium *Anabaena PCC7120*"

著者：Shigeichi Kumazaki*, Makoto Hasegawa, Mohammad Ghoneim, Yugo Shimizu, Kenji Okamoto, Masayoshi Nishiyama, Hirozo Oh-oka, Masahide Terazima (*=corresponding author)

雑誌巻号：J. Microsc. 228, 240 - 254 (2007)

植物細胞中の葉緑体中のチラコイド膜は水を電子供給源として光エネルギーから化学エネルギーを生産する酸素発生型光合成の明反応を担う実体である。葉緑体はもともとラン藻（シアノバクテリア）が他の細胞内で取り込まれ、宿主細胞と共生関係になったことが起源と考えられている。ラン藻チラコイド膜もやはり酸素発生型光合成を行う上に、構造が比較的単純であるため、しばしば酸素発生型光合成の反応機構の研究対象とされる。

ラン藻チラコイド膜中の色素タンパク複合体に結合して光合成反応に電子励起エネルギーを供給する色素には大別して、フィコビルン、カロテノイド、クロロフィルがある。フィコビルンはフィコビリゾームに含まれ、カロテノイドとクロロフィルは光化学系 I と光化学系 II に含まれる。そしてチラコイド膜は通常の光環境下の生育では中心部ではなく細胞外縁部に多く存在することが電子顕微鏡や光学顕微鏡で確認されてきた。しかし、細胞内でのチラコイド膜上の細かな違い、例えば中心部と外縁部でチラコイド膜が異なる特性を持つか等という事には関心が払われてこなかった。

光学顕微鏡でスペクトルを得ることは古くから行われてきているはずだが、私が調べた限り、細胞内部のチラコイド膜蛍光スペクトルの細かな差異等に関する記述は非常に乏しい。確かに散乱や再吸収効果により、蛍光強度（スペクトル）のみによる議論は信頼性が低いと言う側面も確かにある。かといって蛍光減衰曲線を多数の波長に対して得るのは現時点では巨額

の投資を必要とし、かつ照射レーザー光量も非常に大きくなる。試料から出てくる蛍光を無駄なく収集するという意味において、蛍光スペクトルを 1 回の露光時間で得ることは、試料損傷を最小にせねばならない生物学において非常に理に適う。しかし、スペクトルに分散させて検出することは非常に長い画像取得時間を要するので、走査時間を短縮する工夫が必要となる。

このような考えに基づき、共鳴振動ミラー (7.9kHz) を利用して線状領域を近赤外フェムト秒パルスレーザーで照射し、その領域全体の蛍光スペクトルをイメージング分光器を通して一度の CCD カメラ露光で任意の波長範囲に渡って取得できる“ライン走査 2 光子励起蛍光スペクトル顕微鏡”を製作した。全ての歪みを除去するソフトウェア処理後、685nm の蛍光の点像分布関数の FWHM で、0.39 μ m（スリット平行）、0.33 μ m（スリット直交）、0.59 μ m（奥行）を得た。

この新造顕微分光装置でシアノバクテリアのチラコイド膜構造を調べ、フィコビルン蛍光とクロロフィル蛍光の比率を画像にしたのが下図（A、scale bar = 2.0 μ m、クロロフィル／フィコビルン）である。中心部ほどクロロフィル蛍光の比率が小さくなっている。同じ焦点位置で、ハロゲンランプ照明光をプローブ光として透過率の絶対値スペクトル（B が透過率平均値画像）も各点で求めたが、再吸収・散乱によるスペクトル変形の影響では説明できない。

この現象の分子メカニズムや出現条件の詳細にはさらに追求する余地がある。しかし、定量的な顕微分光法の適用で生細胞という非平衡な反応場が見せる不思議な秩序の一例が明らかになったとは言えよう。

