

研究種目：特定領域研究  
研究期間： 2007～2011  
課題番号：19056012  
研究課題名(和文)光合成膜タンパク質間相互作用と膜形態変化を時空間で追跡する3次元超解像顕微分光法  
研究課題名(英文) Three-dimensional super-resolution spectromicroscopy to trace inter-protein interactions and morphological changes in photosynthetic membranes on spatial and temporal domains  
研究代表者  
熊崎茂一 (KUMAZAKI SHIGEICHI)  
京都大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：40293401

研究分野：理工系

科研費の分科・細目：477

キーワード：生物物理化学、電子・エネルギー移動、色素体機能・光合成、光計測

#### 1. 研究計画の概要

酸素発生型光合成反応は、植物などの葉緑体とシアノバクテリア細胞内のチラコイド膜(光合成膜)で行われるが、その光化学的性質と微細構造は、成長、細胞機能分化、環境などに応じて様々な時間スケールで変化していく。その有様を生理的条件下で直接捉えるための研究方法論と必要な顕微分光法を開発するのが本研究課題の目的である。従来の回折限界を超える空間分解能の達成をチラコイド膜の観察で達成すし、蛍光スペクトル、顕微吸収スペクトルをはじめとする多角的な分光手法の統合により、葉緑体毎や微細構造毎の光化学反応に関する詳細な情報を得る。

#### 2. 研究の進捗状況

二光子励起レーザーの励起波長や強度による蛍光スペクトルの変化を詳細に調べた結果、葉緑体の蛍光スペクトルに光化学系IIの蛍光と光化学系Iの蛍光が混在していることが明確になった。特に近赤外連続発振レーザーでも大幅に短波長にアンチストークスシフトした蛍光が得られ、それが光化学系Iの選択励起が高いことが判明した。吸収スペクトル顕微鏡の稼働を開始し、これは細胞ごとにチラコイド膜含有色素存在量とそれらの蛍光量子収率を見積もるのに有効であることが判明した。クロレラとアナベナにおける環境順応変化を研究するのに役立っている。従来の回折限界を超えた空間分解能を達成する顕微鏡の独自開発を行っており、クロロフィル蛍光を見るために最適な構成を考慮して設計を進めている。その重要な要素

である上下の等価光学系の倍率と焦点距離を一致させるべく対物レンズと結像レンズについて詳細に焦点距離を調べ、2000分の一以内で焦点距離と倍率が一致する干涉光学系をそろえる準備ができた。これを用いると従来よりも奥行き方向の空間分解能を4倍以上改善できる見込みである。

#### 3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。研究内容については、いくつかの重要な発見をすることができた。またライン走査顕微分光器の改良が進んで、装置開発も進んでいる。ただし、21年度の予算の一部を繰り越すことになったのは予期せぬ高価な装置の故障と新規購入物品の納期の遅れである。故障は予期できぬことであるが、納期については計画の見通しが甘かった部分もあるので、注意していきたい。

#### 4. 今後の研究の推進方策

奥行き超解像顕微分光の開発を引き続き推進する。超解像効果の基本的現象の確認に重きを置く。緑藻クロレラにおいて、可視光線と近赤外励起違いについて特に集中的に調べる。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

1) M. Hasegawa, T. Shiina, M. Terazima and S. Kumazaki "Selective Excitation of

Photosystems in Chloroplasts inside Plant Leaves Observed by Near-Infrared Laser-Based Fluorescence Spectral Microscopy” *Plant Cell Physiology* 51, 225 - 238 (2010). (査読あり)

2) \*S. Kumazaki, M. Hasegawa, M. Ghoneim, Y. Shimizu, K. Okamoto, M. Nishiyama, H. Oh-oka and M. Terazima

“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*” *Journal of Microscopy*, Vol. 228, 240 - 254, (2007) (査読あり)

〔学会発表〕(計 16 件)

1) 熊崎茂一「葉緑体内部構造を見るための 2 光子励起蛍光スペクトル顕微鏡の諸様式」2009 年 12 月 4 日、日本分光学会、生細胞分光部会シンポジウム(招待講演) 首都大学東京、八王子、東京

2) 熊崎茂一「顕微蛍光スペクトルで解析する葉緑体とシアノバクテリアのチラコイド膜自家蛍光」シンポジウム「見る生物学 3」2008 年 11 月 14 日(招待講演) 奈良先端科学技術大学院大学、奈良県生駒市

3) S. Kumazaki “Simultaneous broadband fluorescence spectral imaging of a cyanobacterium and chloroplasts facilitated by line-scanning of multiphoton excitation pulses” *Focus on Microscopy*, 2008, April. 15. Awaji Yumebutai, Hyogo, Japan.

4) 熊崎茂一「酸素発生型光合成膜微細構造変化を直接捉える顕微分光法」2008 年 3 月 10-11 日、分子科学研究書研究会「分子の視点から見る光合成」セミナー(招待講演) 分子科学研究所、愛知県岡崎市

5) S. Kumazaki, “Micro-regulation of oxygenic photosynthesis unveiled by fluorescence microspectroscopy” 2007, November, The 67th Okazaki Conference “Molecular Science and Chemical Biology of Biomolecular Function” 2007, November, 10 - 12, Okazaki, Aichi, Japan (招待講演)

〔図書〕(計 2 件)

1) \*S. Kumazaki, M. Hasegawa, M. Ghoneim, T. Yoshida, M. Terazima, T. Shiina, I. Ikegami (章著)

" Three-Dimensional High-resolution

Microspectroscopic Study of Environment-Sensitive Photosynthetic Membranes ", In “Molecular Nano Dynamics”, H. Fukumura, M. Irie, Y. Iwasawa, H. Masuhara and K. Uosaki eds., (Wiley-VCH, 2009), Vol. 2, Chap. 30, pp. 589-606.

2) 熊崎茂一「葉緑体の内部をレーザーで探る」(章著)「反応すれば形が変わるナノの世界～細胞から結晶まで～」2009 年、pp. 108 - 117、クバプロ (ISBN 978 - 4 - 87805 - 099 - 2)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕