

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23654151

研究課題名(和文) 時間分解超解像度顕微分光法による光合成膜内で指向性を持つ励起エネルギー流の可視化

研究課題名(英文) Visualization of directional energy flow in a photosynthetic membrane by means of time-resolved super-resolution microscopy

研究代表者

杉崎 満 (Sugisaki, Mitsuru)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：20360042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：光合成初期過程を明らかにするために、その光学応答が重要となる近赤外領域で高い感度を持つ超解像度顕微鏡を構築し、その評価を行った。構築した装置を用いて顕微画像測定を行ったところ、通常の蛍光顕微鏡配置における空間分解能は回折限界で制限されるが、超解像度顕微鏡配置においては100ナノメートル程度を達成することができた。この値は、用いた顕微鏡ステージの最小ステップにより制限されていると考えられる。また、時間分解ユニットの作製と評価も行った。

研究成果の概要(英文)：A microscope with a super-high spatial resolution, especially in the near infrared spectral region, has been constructed to elucidate the early events of photosynthesis, and its performance has been tested. Images taken using the conventional fluorescence microscope configuration were spatially diffraction-limited. However, it was found that a spatial resolution of around 100 nm has been attained when the super-resolution configuration was employed, which is limited by the mechanical steps of the sample stage of the microscope used in the experiment. An add-on unit for taking time-resolved micro-images was also constructed and its temporal resolution was measured.

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・生物物理・化学物理

キーワード：顕微鏡 光合成

1. 研究開始当初の背景

(1) 緒言

光合成は、地球上に降り注ぐ太陽光エネルギーの実に 50% を有効利用する、自然が創造した最高の光エネルギー変換機関である。この初期過程を担うのは、光合成膜中に規則正しく配列した 5~10 ナノメートルのアンテナ色素蛋白超分子複合体という天然のナノデバイスである。

紅色光合成細菌の光合成初期過程における機能発現には、LH2, LH1 と呼ばれる 2 種類のアンテナ色素蛋白複合体と光反応中心複合体 (RC) の合計 3 種類の色素蛋白複合体が関係している (図 1)。周辺アンテナ複合体 LH2 で補集された太陽光の励起エネルギーは、複数の LH2 を経由し最終的に LH1-RC コア複合体に非常に高効率に到達する。このアンテナ複合体間の高効率エネルギー伝達のメカニズムを解決するためには、光合成膜中に配列した状態で観測することが必要となる。

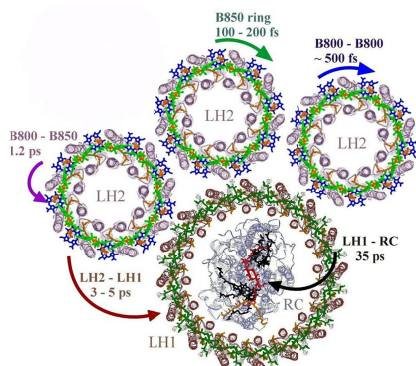


図 1: 色素蛋白超分子複合体の構造。エネルギー伝達の時定数も併せて記されている。

(2) 内外の動向

光合成膜から単離精製したアンテナ複合体一個の顕微発光測定に関しては、オランダ・ライデン大学の T.J. Aartsma 博士、及びドイツ・バイロイト大学の J. Köhler 博士により報告がなされている。今後、光合成膜中に配列したままの色素蛋白複合体の観測が望まれる。しかし現在一般的に行われている顕微分光法では、装置の空間分解能が観測対象物に比べ余りにも乏しいため、新しい方法論が必要となる。

色素蛋白複合体が光合成膜中に配列した様子は、電子顕微鏡 (EM) や原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて観測がなされている。しかしこれらの手法は、基本的には試料の形状や凹凸を調べるために使われるため、光合成の本質である光応答を調べることができないという不都合が生じてしまう。

本研究代表者は、これまで国内外において顕微分光測定用装置を自作し、半導体量子ドットや光合成生物の物性測定を行ってきた。例えば図 2 に示した装置は、過渡吸収顕微測定を行うために構築したものである。時間分解能は約 300 フェムト秒、空間分解能は 2 μm

程度である。このような装置を用いることにより、例えば孤立した単一分子の光学特性の時間応答についての知見を得ることが可能となる。すなわち、アンサンブル平均の中に埋もれた情報を引き出すことができる。しかしながら、例えば、空間分解能よりも狭い領域に複数の分子が存在するような場合において、その分子間の相互作用を直接観測することは非常に困難である。特に、光応答する波長領域が重なっている多数の分子の場合には、いくら顕微分光装置を用いたとしても得られる情報は、マクロ配置にて得た情報と何ら変わらないものになってしまう。

前述したように、光合成アンテナ色素蛋白複合体の大きさは 5~10 ナノメートルであり、これは現有の顕微分光装置の空間分解能に比べて圧倒的に小さい。このような小さな色素蛋白複合体が光合成膜中に密に詰まっているために、通常の顕微分光装置を用いて光合成膜中に配列した色素蛋白複合体の光学応答を観測することは不可能となる。もちろん、色素蛋白複合体を単離することにより、単体の光学応答を観測することは可能ではある。しかし光合成初期過程のエネルギー伝達機構を明らかにするためには、色素蛋白複合体が光合成膜中に配列したまま、色素蛋白複合体間で行われている相互作用を光学的な手法にて直接観測することが不可欠となる。

(3) 超解像度顕微鏡について

光学顕微鏡の空間分解能は約 200 ナノメートルである。これは 19 世紀に E. Abbe や L. Rayleigh によって完成された光の回折理論から理解することができる。顕微鏡が持つ 400 年の歴史を大きく塗り替える出来事として、

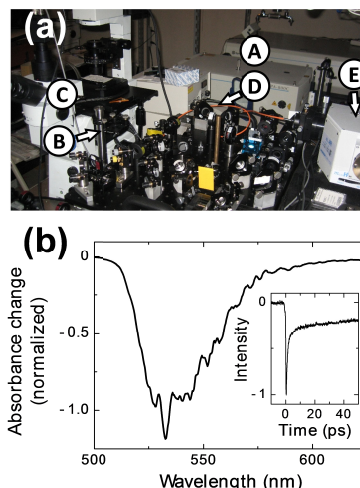


図 2: (a) 研究代表者が構築した顕微分光システム。A: 光源レーザー, B: ペリスコープ, C: 顕微鏡, D: 光ファイバー, E: 分光器。(b) 装置の性能評価のために測定した、色素蛋白複合体と同程度の粒径を持つ CdSSe 量子ドットの過渡吸収スペクトルとその時間変化。

これまで常識となっていた回折限界を大きく上回る分解能を持つ光学顕微鏡法が複数報告され、近年、注目を集めている。その代表が 1994 年に第 1 報が行われた Stimulated Emission Depletion (STED) 法である。最新の報告によると、特殊な条件下ではあるが、その空間分解能は 2 ナノメートルほどまで向上している。そのため、このような手法を応用すれば、光合成膜中に配列したままの色素蛋白複合体間における相互査証の詳細を、直接、光学的な手法にて観測することが可能になるものと期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、通常の光学顕微鏡よりも格段に優れた空間分解能を達成する超解像度顕微分光法により、光合成細菌の光合成膜中に配列した色素蛋白複合体の可視化を実現するための手法を確立することを目的とする。更にこの空間分解能を保ったまま、励起エネルギーの伝達経路を 100 フェムト秒の時間分解能で可視化するという新たな手法についても、同時に実現させる。これらの手法を確立することにより、色素蛋白複合体の配列と励起エネルギーの拡散経路の関係をマッピングし、高効率励起エネルギー伝達のキーマニズムとなる伝達経路が解明されることになることと期待される。

## 3. 研究の方法

上述の目標を達成するために、以下の手順で研究を行った。

(1) STED 法を用いた超解像度顕微鏡を構築しその評価を行う。その際、光合成色素の光学応答が顕著に表れる近赤外領域で感度がよくなるような設計にする。

(2) 超解像度顕微鏡を用いて得られた蛍光信号の時間応答を調べるように、カーゲート法を用いたユニットを作製しその評価を行う。

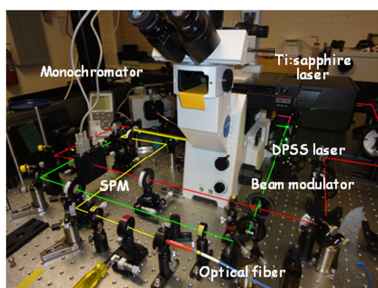


図 3 : (a) 本研究課題で構築した超解像度蛍光顕微システム。励起光光源には小型のヘリウムネオンレーザー、半導体固体レーザーを用いた。近赤外領域のダンプ光光源にはチタンサファイアレーザーを用いた。蛍光信号は、光ファイバーを使ってフィルター分光器に取り付けた光電子増倍管で検出した。

## 4. 研究成果

### (1) 超解像度顕微鏡を構築とその評価

上述の実際に構築した装置の図 3 に示す。超解像度顕微鏡では励起光と(不要な蛍光を消去するための)ダンプ光を用いるため、2 台のレーザー光が必要となる。本研究においては近赤外領域の信号測定が可能となるように装置の設計を行っている。具体的には、光合成膜中で光捕集により得たエネルギーを伝達する際に中心的な役割を果たす、クロロフィルの光学特性が顕著となる波長領域での信号測定が必要となる。そのために、不要な蛍光を消光するための光源としてチタンサファイアレーザーを用いた。このレーザーは連続光とパルス光を切り替えて発振させることができるが、最小数の光学部品を用いて顕微鏡を構築できるように、連続光発振を選択した。このことにより、不確定要素を最小限に抑えることができる。また、もう一方の光源(励起光)には半導体固体レーザー(発振波長 532 ナノメートル)とヘリウムネオンレーザー(発振波長 633 ナノメートル)を切り替えて使用できるようにした。これは光合成初期過程において、光捕集の重要な役割を果たすカロテノイドの波長に合わせるための選択である。すなわち、これらのレーザーの組み合わせにより、カロテノイドで光捕集されたエネルギーが、クロロフィル間を伝達していく様子が観測できるような設計となっている。顕微鏡内にレーザー光を導く前に、ダンプ光のビーム形状を位相変調により、円形からドーナツ型に変形をさせる。その後、ダイクロイックミラーを用いて励起光とダンプ光を同軸とした上で顕微鏡内に導いた。顕微鏡には倍率×100 の油浸対物レンズを取り付けた。試料からの信号は、再び励起光と同軸を戻り、途中でダイクロイックミラーとハーフミラーで分離したのちに光ファイバーで検出器へと導いた。

床からの振動により信号が不安定となることを避けるために、光学除振台の上に配置した光学部品の光軸の高さはなるべく低くなるようにした。また、顕微鏡の筐体を用いて対物レンズ周りの安定性も高めるようにした。

微小領域からの信号を検出する際には、微弱蛍光を観測するための工夫が必要となる。特に超解像度顕微鏡においては、ダンプ光として強いレーザー光を用いるため、余計な散乱光を取り除く必要がある。そのため、本研究で構築した装置においては、誘電体ミラーと複数の光学フィルターを用いることにより信号の波長選択を行う。ロックインアンプを用いて励起光散乱を周波数領域で取り除く、ということを行った。更に必要に応じてフィルター分光器を用いて励起光とダンプ光の波長領域をカットした。

構築した装置を用いて観測した顕微画像の一例を図 4 に示す。試作した装置の信号検出が容易となるように、試料としては一般的

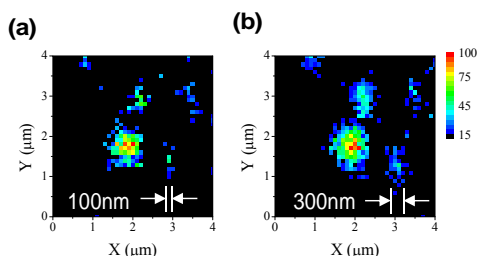


図 4: 海藻由来のジェル中に分散させたクロロフィル色素の(a)超解像度蛍光イメージと(b)通常の蛍光顕微イメージ。測定領域の大きさは  $4\mu\text{m}\times 4\mu\text{m}$  である。(a)の最も小さな液滴を見ると  $100\text{nm}$  の空間分解能があることが分かる。通常の蛍光顕微鏡(b)では回折限界のため、同じ液滴を観測しても、輝点の大きさが  $300\text{nm}$  程度に広がってしまう。

な蛍光色素を用いた。ただしこの色素は、目標とするクロロフィルに近い波長特性を有するために、「近赤外領域で高い感度特性を持たせる」という設計方針を確認する上で適していると考えられる。図 4 では、顕微鏡の試料ステージを移動させながら  $100$  ナノメートル間隔で測定を行った。この移動間隔は、用いた試料ステージの最小分解能で決まっている。今回用いた STED 法は、通常の蛍光顕微鏡法の延長であるためにこれらの手法間の切り替えは簡単に行うことが可能である。図 4(a)の超解像度顕微鏡配置、および図 4(b)の通常の蛍光配置の画像はともに、試料中の同じ領域を観測した結果である。両方の画像で輝点と同じ位置に現れていることから、それぞれが試料からの蛍光を表していることが分かる。通常の蛍光配置である図 4(b)においては、最小の輝点の大きさはおよそ  $300$  ナノメートルである。これは光の回折限界で制限されている。同じ位置に現れる蛍光を超解像度顕微鏡配置で観測すると、輝点の大きさが、 $100$  ナノメートル程度に減少していることが見て取れる。このことは、近赤外領域で高い効率を持つ超解像度顕微鏡の構築に成功したことを意味している。

前述したように、今回作製した装置の最小分解能は、用いた試料ステージにより  $100$  ナノメートルに制限されている。試料の移動方法、もしくはビームのスキャン方法を改良することにより、光学配置の大きな変更なしにさらに高分解能の装置にすることができると期待される。また、図 4 をよく見ると、いくつかショットノイズが現れていることが分かる。これは高効率の検出器を用いることにより改善できると考えている。これらの改良については、今後の課題としたい。

## (2) カーゲートユニットの構築

時間分解画像を取得するために、カーゲート法を用いたユニットを作製した。その外観を図 4(a)に示す。ノイズを軽減するために、

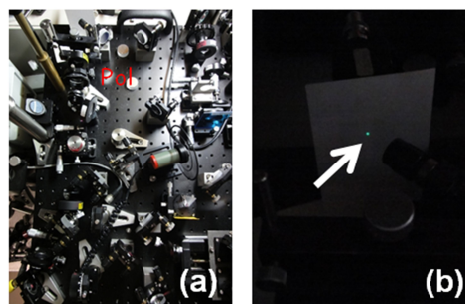


図 5: (a) 偏光板 (Pol) を用いたカーゲート法による時間分解顕微画像を得るためのユニット。(b) 実際に観測される信号の一例として、カーシャッターを透過した光を名刺に映し出した画像を示す。

顕微鏡と同様にロックイン検出を行うようにした。カー媒質としては無蛍光ガラスを用いた。時間分解能は  $300$  フェムト秒程度であった。これは、画像のコントラストをよくするために、厚い偏光素子を用いたことにより、ゲート光のパルス幅が広がったことに起因する。しかしながら図 1 にあるように、本研究において重要となる時間領域よりも十分早い応答時間となっていることが分かる。

図 4(b)はカーシャッターを透過した光を名刺に映し出した写真である。この結果、透過光の強度は目視でも観測できるほど、十分な効率を持っていることが分かる。このユニットと超解像度顕微鏡との組み合わせた画像取得法の確立については、引き続き研究を行っていく必要がある。現在の問題としては、検出器の感度が不足していることがあげられる。顕微鏡の画像の質の向上に向けた装置の改良を継続していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

(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 8 件)

Generation of coherently coupled vibronic oscillations in carotenoids, M. Sugisaki, D. Kosumi, K. Saito, R.J. Cogdell, and H. Hashimoto, Phys. Rev. **B81** (2012) 245408/1-10, 査読有。

10.1103/PhysRevB.85.245408

Excitation of Coherent Vibronic Oscillations in Carotenoid Molecules by Means of Four-Wave Mixing Spectroscopy: Intermolecular Coupling, M. Sugisaki, D. Kosumi, K. Saito, R.J. Cogdell, and H. Hashimoto, Carotenoid Science, **16** (2011) 50-56, 査読有。

〔学会発表〕(計 17 件)

杉崎 満, 小澄 大輔, 橋本 秀樹, 「超解像度顕微鏡の構築とその評価」, 日本物理学会 第 69 回年次大会, 平成 25 年度

日本分光学会年次講演会, 2014年03月  
25日~2014年03月28日, 東海大学  
杉崎 満, 小澄 大輔, 橋本 秀樹, 「カロ  
テノイドにおける超高速光学応答のヘ  
テロダイン検出」, 日本物理学会 2011年  
秋季大会, 2011年9月21日~9月24日,  
富山大学

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/phys/PBM/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉崎 満 (SUGISAKI MITSURU)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号: 20360042

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

藤井 律子 (FUJII RITSUKO)

大阪市立大学・複合先端研究機構・准教授  
研究者番号: 80351740

橋本 秀樹 (HASHIMOTO HIDEKI)

大阪市立大学・複合先端研究機構・教授  
研究者番号: 50222211