

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 29日現在

機関番号：14301

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007年～2011年

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

研究成果の概要（和文）：シアノバクテリアや植物葉緑体が示す可視光領域の自家蛍光スペクトルには光合成色素が示す光化学特性などの豊富な情報が含まれている。近赤外レーザー励起の時に放つ蛍光スペクトルについて調べたところ、パルスレーザー励起の時に2光子励起蛍光スペクトルが見られたほかに、連続発振レーザー励起においても1光子励起が原因である蛍光スペクトルが観測された。この近赤外1光子励起では光化学系I蛍光が容易に観測されることが分かり、通常の可視光線励起では低温で専ら測定される光化学系Iを常温で高選択的に観測できる新手法の発見となった。

研究成果の概要（英文）：We have found that photosystem I (PSI)-specific fluorescence spectra of thylakoid membranes of cyanobacteria and chloroplasts was very efficiently observed in the case of continuous wave (CW) near infrared (NIR) excitation around 785–820 nm. It was found that the PSI fluorescence in the case of CW NIR excitation is mainly generated by a one-photon excitation mechanism. This phenomenon will be used for studies of PSI/PSII ratio at physiological temperature, since PSI fluorescence has been conventionally observed at low temperatures like 77 K.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,200,000	0	8,200,000
2008年度	10,100,000	0	10,100,000
2009年度	9,700,000	0	9,700,000
2010年度	3,700,000	0	3,700,000
2011年度	1,600,000	0	1,600,000
総計	33,300,000	0	33,300,000

研究分野：

分子高次系機能解明のための分子科学・先端計測法の開拓による素過程的理解

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：シアノバクテリア、チラコイド膜、葉緑体、顕微分光、光化学系、2光子励起、アンチストークス蛍光、近赤外レーザー

1. 研究開始当初の背景  
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、光環境、栄養環境などに応じて様々な時間スケールで変化していく。その動態観測は固定化した試料に対する電子顕微鏡観察と細胞集団全体での生化学的分析で行われることがほとんどで、チラコイド膜の微細構造毎に光化学的機能、生理的状态を識別する努力は非常に乏しかった。近年発達したレーザー走査共焦点蛍光顕微鏡においても分光情報を十分活用した研究例は稀であったので、顕微鏡技術と分子分光の技術を融合した新しい計測法、研究法の開発が望まれていた。

## 2. 研究の目的

そのチラコイド膜の微細構造毎の光化学的特性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ることと、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ことを追求した。また近赤外レーザーを用いた2光子励起を採用して、植物細胞中に有るがままの葉緑体においても高い解像力で葉緑体内部構造をどこまで観察可能であるのかを究明した。

## 3. 研究の方法

本研究課題の開始以前より開発を進めていたライン走査蛍光スペクトル顕微鏡の完成度を高めた。まず、測定プログラムの改良により走査速度を高め、画素1列からの蛍光スペクトルを0.1秒で読みだす(1画素当たりおよそ500マイクロ秒相当)水準までは到達した。また、同一細胞から顕微吸収スペクトルと顕微蛍光スペクトルを高速かつ高い空間分解能で取得できるように改良した。また、近赤外励起レーザーについて、パルス励起で2光子励起蛍光を見ることを最初の方針としたが、研究過程において、近赤外連続発振励起で短波長シフトした1光子励起蛍光を捉えることの重要性にも気づき、それを行いやすい狭帯域光源を用意して、顕微分光システムに組み込んだ。さらに、それとは独立の蛍光顕微鏡では奥行き方向に解像度を高める4Pi顕微鏡方式を採用して、チラコイド膜研究に適した高解像顕微鏡の開発を進めた。

## 4. 研究成果

(1) 顕微アンチストークス蛍光法による光化学系 I (PSI) 選択的観測法の発見：従来の常識では、PSI の蛍光量子収率は常温では非常に低いために、常温葉緑体の蛍光スペク

トルには光化学系 II (PSII) の寄与が大きく、PSI:PSII を見積もるために専ら液体窒素温度などでの低温試料が用いられてきた。我々は独自開発したライン走査蛍光スペクトル顕微鏡により、パルス近赤外レーザー励起での植物葉緑体蛍光スペクトルの観察を行って葉緑体蛍光の特性を詳しく調べた。その結果、近赤外パルスレーザー励起(800-820nm, 0.2 ps)では可視光線励起の時と同様に PSII 蛍光が支配的であるが、近赤外連続発振レーザー(CW 785 - 820 nm)では PSI 蛍光の割合がこれまでの常識を超えて大きく、PSII 蛍光が相対的に弱く、PSI:PSII の相対比率を常温で容易に得ることが可能であることを発見した。77K において PSI 蛍光を見る場合と違い、PSI を直接励起しているので短波長側に存在する光捕集系からのエネルギー移動とによる影響を受けない形で PSI 存在量に関する情報が得られると考えられる。

(2) 葉緑体顕微アンチストークス蛍光一般性の確認：まず、トウモロコシ葉緑体を用いて、CW レーザーによる励起が1光子励起であり、教科書的事実として知られている葉肉細胞と維管束鞘細胞の間の PSI:PSII 比率の変化が観測可能であることを確かめた。また、77K においては緑藻の一種クロレラと植物の間の PSI 蛍光極大波長の差が異なることが知られている。この蛍光極大波長の差が常温における顕微アンチストークス蛍光スペクトルにおいても整合的に観測されることを確認した。

(3) 顕微アンチストークス蛍光の応用例の実証：アンチストークス蛍光は葉緑体等の光化学系 I の選択励起には特に有効であるが、光化学系 I のみならず、色素会合体などで吸収スペクトルが比較的長波長側に変化しながら蛍光量子収率が低下する場合に長波長吸収分子種を選択的に検出するために有効であることがわかった。実証実験として、クロレラの葉緑体が有機溶媒によって緩やかに崩壊していく過程を人工的に誘導し、その様子を10時間以上にわたって観察した。光化学系 I と光化学系 II の蛍光が減少し、初期には短波長シフトした蛍光が現れ、そして、クロフィル会合体と思われる蛍光スペクトルの少なくとも2種類が現れる様子が観察された。特にアンチストークス蛍光法では蛍光量子収率が低いクロフィル会合体を感度よく捉えることが明確になった。この研究では顕微吸収スペクトルも非常に有効な測定手段で有ることがわかった。11色の単色光を明視野観察の照明光として用い、これを自動的に違う色に交換しながら冷却 CCD の測定を同期して行うという単純な装置ではあるが、クロレラ葉緑体が、有機溶媒で影響

を受けるごく初期には吸収の大きさが変わらないにもかかわらず蛍光強度が大きくなる様子がわかったが、これは明確に蛍光量子収率が大きくなっているということであり、また、色素集合体が形成される様子は吸収スペクトルの長波長側のすそ野の広がりとして蛍光スペクトルと整合的なデータが再現性良く得られた。

(4) 一部のシアノバクテリアは窒素栄養源が不足する環境でも安定な2原子分子の  $N_2$  からアンモニアなどの窒素化合物を作り出し、自らの栄養素とすることができるので、最も貧栄養な環境でも生態系の初期基盤を形成することに不可欠の貢献をしている。窒素固定を行う酵素、ニトロゲナーゼは酸素によって不活性化されてしまうので酸素発生型光合成、とりわけ光化学系 II の反応と共存することができない。そこで、糸状に細胞が連結したシアノバクテリアであるアナベナの場合は数個から20個の細胞のうちの1個の細胞だけを異型細胞として細胞分化させ、その異型細胞でのみ窒素固定を行い、異型細胞では光化学系 II の量と活動を低下させる。しかし、光化学系 I は異型細胞でも残存し、光化学反応を維持すると言われている。それは光化学系 I のみで可能な光エネルギーを利用した循環型電子伝達によりチラコイド膜内外のプロトン濃度勾配を作り出し、ATP 生産を維持するためと言われている。このような細胞分化におけるチラコイド膜のダイナミックな変化を直接顕微分光で捉える研究はこれまでなかった。本研究において各細胞のチラコイド膜の蛍光スペクトル変化の一部始終を観測することに成功した。近赤外パルスレーザーによる二光子励起蛍光スペクトルでは光化学系 II と光化学系 I からのクロロフィル蛍光、および光化学系 II に励起エネルギー供給するフィコビル色素の蛍光スペクトルが観測された。また光化学系 I の高選択性励起を達成する連続発振近赤外レーザー励起では光化学系 I が純度高く検出され、光化学系 I の変化をこれまでにない精度で細胞毎に見積もることに成功した。

(5) 奥行き超解像顕微鏡の開発：2つの対物レンズを対向させて光軸方向の空間解像力を向上させる顕微分光開発に取り組んでいる。ハードウェア部分は基本性能を確認するに十分な完成度に達したが、ソフトウェア構築で難航中である。今後も開発を継続し、チラコイド膜の研究に役立てる予定である。

## 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5件)

### 1) \*熊崎茂一

“アンチストークス蛍光スペクトルと2光子励起蛍光スペクトルによる光合成膜の顕微分光分析” 生物物理, 51(6), 274 - 275 (2011). DOI:10.2142/biophys.51.274

### 2) Makoto Hasegawa, Takahiko Yoshida, Mitsunori Yabuta, Masahide Terazima, and \*Shigeichi Kumazaki

“Anti-Stokes Fluorescence Spectra of Chloroplasts in *Parachlorella kessleri* and Maize at Room Temperature as Characterized by Near Infrared Continuous Wave Laser Fluorescence Microscopy and Absorption Microscopy” J. Phys. Chem. B. 115, 4184 - 4194 (2011) DOI: 10.1021/jp111306k

### 3) \*熊崎茂一 長谷川慎

“ライン走査型2光子励起蛍光スペクトル顕微鏡を用いた植物細胞中の葉緑体内部微細構造観察” 分光研究, 60 (1), 19-21 (2011)

### 4) Makoto Hasegawa, Takashi Shiina, Masahide Terazima and \*Shigeichi Kumazaki

“Selective Excitation of Photosystems in Chloroplasts inside Plant Leaves Observed by Near-Infrared Laser-Based Fluorescence Spectral Microscopy” Plant Cell Physiol. 51, 225 - 238 (2010). doi: 10.1093/pcp/pcp182

### 5) \*Shigeichi. Kumazaki, Makoto Hasegawa, Mohammad Ghoneim, Yugo Shimizu, Kenji Okamoto, M. Nishiyama, H. Oh-oka and M. Terazima,

“A line-scanning semi-confocal multi-photon fluorescence microscope with a simultaneous broadband spectral acquisition and its application to the study of the thylakoid membrane of a cyanobacterium *Anabaena PCC7120*”, J. Microsc. 228, 240 - 254 (2007) DOI: 10.1111/j.1365-2818.2007.01835.x

[学会発表] (計6件)

1)熊崎茂一 「顕微蛍光スペクトル測定で捉えたヘテロシスト形成過程のチラコイド膜変化」日本植物生理学会年会 京都産業大学 2012年3月16日 (一般講演)

2)熊崎茂一 「アンチストークス蛍光の特性：異種葉緑体識別能力と人工的クロロフィル集合体検出」分子科学討論会 2012年9

月 20-23 日 札幌コンベンションセンター  
(一般講演)

3) S. Kumazaki, "Simultaneous Sensing of Photosynthetic Activity and Thylakoid Morphology Realized by Fluorescence and Absorption Spectral Microscopy "

The 70th Okazaki International Conference on Molecular mechanism of photosynthetic energy conversion: the present research and future prospects  
(Okazaki, Aichi, Japan, December 4 – December 6, 2010)

4) 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」日本分光学会 生細胞分光部会平成 21 年度 生細胞分光部会シンポジウム 2009 年 12 月 4 日 首都大学東京 (招待講演)

5) 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」奈良先端科学技術大学院大学主催 シンポジウム「見る生物学 3」 2008 年 11 月 20-21 日(招待講演)

6) S. Kumazaki, "Micro-regulation of oxygenic photosynthesis unveiled by fluorescence microspectroscopy, Nov. 10-12, 2007, The 67th Okazaki Conference, at Okazaki Conference Center, Molecular Science and Chemical Biology of Biomolecular Function  
(invited talk)

[図書] (計 3 件)

1) \*Shigeichi Kumazaki, Makoto Hasegawa, Mohammad Ghoneim, Takahiko Yoshida, Masahide Terazima, Takashi Shiina, Isamu Ikegami "Three-Dimensional High-resolution Microspectroscopic Study of Environment-Sensitive Photosynthetic Membranes"(Ed. by H.Fukumura, M.Irie, Y.Iwasawa, H.Masuhara and K.Uosaki)in Molecular Nano dynamics, Volume 2 Chapter 30, pp589 - 606, Wiley-VCH, (2009).

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)

3) \*Shigeichi Kumazaki, Makoto Hasegawa, Takahiko Yoshida, Tarou Taniguchi, Takashi Shiina and Isamu

Ikegami., "A Line-Scanning Multiphoton Fluorescence Spectromicroscope Applied to the Study of the Thylakoid Membrane in Chloroplasts", Photosynthesis. Energy from the Sun, (Ed. by Allen JF, Gantt E, Golbeck JH, and Osmond B.), Volume I, section 7, 787 – 790, Springer, Dordrecht, The Netherlands. (2008)

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :