

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26610133

研究課題名(和文)透過型超解像度顕微鏡の開発とそれを用いた光合成初期過程の可視化

研究課題名(英文)Development of transmission super-resolution microscope and visualization of early steps of photosynthesis

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：試料を染色することなく超解像度顕微鏡画像を取得するための新規方法の探索を行った。本研究では特に、光合成細菌の光合成初期過程の可視化を目指す。そのため、近赤外領域において高感度で超解像度画像の取得が可能となる装置の開発を行った。代表的な光合成色素について、超短パルス光励起の顕微鏡下で起こることが期待される超高速光学応答や光学非線形性について調べた。クロロフィル分子においては、アンチストークス蛍光が顕著に表れることを見出した。更に、カロテノイド分子の光学応答の理論と実験の整合性を調べた。

研究成果の概要(英文)：A new methodology to observe super-resolution microscopic images using unstained specimens has been investigated. Here we focus our attention on the early steps of photosynthesis; the super-resolution microscope developed in this project was adjusted thus that the highest sensitivity can be attained in the near-infrared region. The optical properties of typical photosynthetic pigments, especially ultrafast phenomena and optical nonlinearity, have been investigated since these phenomena should be prominent in the optical measurements using high-resolution microscopes. It was found that very strong anti-Stokes fluorescence peaks appear from chlorophyll molecules. The ultrafast optical response of carotenoid molecules has also been investigated by comparing the experimental results with theoretical calculations.

研究分野：生体物性物理学

キーワード：顕微鏡法 光合成

1. 研究開始当初の背景

(1) 諸言

顕微鏡の歴史は、約 400 年前にオランダの Janssen 親子や van Leeuwenhoek から始まったとされている。特に van Leeuwenhoek の作製した顕微鏡は空間分解能が $1.4\mu\text{m}$ にも達していたといわれている。現在市販されている通常の光学顕微鏡は、回折限界によって決まる理論的な空間分解能(約 200nm)の極限まで達成している。しかしながら、このことを言い換えると、光学顕微鏡の空間分解能は、400 年の間に僅か 7 倍程度しか向上していないということになる。

この状況は、1994 年にフィンランド(現在は独逸マックスプランク研究所)の S.W. Hell 博士によりなされた理論的な提案に基づく Stimulated-emission depletion (STED) 法の出現により一変した^{1,2}。この原理に基づいた STED 顕微鏡が、数年前よりドイツの Leica 社から市販されている。市販の STED 顕微鏡を用いて効率よく超解像度画像を得ることためには、特別の蛍光ビーズやラベルを用いて試料を染色し、その蛍光顕微イメージを観測する必要がある³。この時得られる情報は、究極的には個々の分子の骨格構造(原子核の配列)や分子の配列である。

光学顕微鏡を用いた場合、その顕微イメージは試料による光の吸収や蛍光過程を反映するために、十分な空間分解能があれば電子の密度分布を知ることにも可能になる。蛍光マーカー等を用いて試料を染色した場合には、個々の試料の電子情報ではなく、単に蛍光マーカーの電子情報が得られるにすぎず、貴重な情報を失うこととなる。染色等をする事なしに無蛍光試料の超解像度顕微鏡画像の取得を可能とすることが可能となれば、『試料をそのままの状態の手軽に観測することができる』という光学顕微鏡の利点を最大限生かすことができる。

(2) 内外の動向

STED 法は、その考案者である S.W. Hell 博士が所属するマックスプランク研究所を中心に、ヨーロッパで活発に研究がおこなわれてきた。米国からの研究報告も急増している。Web of Science で調査したところ、研究開始前年までに発表された STED 法の(単なる顕微鏡観測ではなく)技術革新を目指した報告は、ヨーロッパと米国からの報告が約 67%を占めていた。現在までのところ、日本国内からの報告は非常に限られている。

(3) 光合成初期過程

光合成細菌の光合成系は、自然が創造した超高速かつ高効率な光エネルギー変換機構を達成するための本質的なバイオナノデバイスである。その機構を解明することは太陽光エネルギーの有効利用という観点から眺めた場合、次世代のクリーンエネルギー変換器の基盤技術となり得る。化石燃料や原子力

発電による環境への影響は古くから問題視されているが、これらのエネルギー源に頼らざるを得ない状況は現在も引き続き変わっていない。安全でクリーンなエネルギー変換器の開拓は、急務の研究課題と言える。

光合成初期過程の機能発現には、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 種類の色素蛋白超分子複合体が関係している。Photosynthesis(光合成)という言葉は Ch. R. Barnes によって作られたと言われる。光合成研究は、長い歴史の中で、主に生物学・化学の分野で発展してきた。しかし近年、単結晶 X 線構造解析により、LH₂、及び RC の詳細な構造が徐々に明らかとなってきたことに触発され、光合成色素蛋白複合体の機能、及び機構に対して、物理学的な側面からアプローチをしていくという動きが世界中から出てきた。色素蛋白超分子複合体において非常に興味深い点は、エネルギーの散逸を最小限に抑えた状態で、効率良く、LH₂、及び LH₁ から RC へ太陽光エネルギーを到達させることである。このような高効率のエネルギー伝達効率を達成している物質は、非常に類希な存在であり、その機構を明らかにすることは、新しい物理学概念の形成に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は以下の項目を実施することにより、上述の諸問題を解決することを最終目標としている。そのために有効となるのは透過型超解像度顕微鏡技術の開発と光合成初期過程の解明を実現することである。しかしこれらを達成することは非常に困難であるため、問題の洗い出しと克服のための基盤を確立することを本研究の目的とした。

先述のように STED 法は、空間分解能が非常に高く、光合成膜中に配列した色素蛋白複合体を観測するために、非常に有用な手法と考えられる。光合成色素蛋白複合体中の励起エネルギー移動過程の実時間観測を可能とするためには、超解像度顕微鏡へのパルスレーザーシステムの組み込みを行うとともに、パルスレーザーに対する線形、及び非線形光学応答に対する知見が予め必要となる。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者が構築を行った STED 顕微鏡を改良し、光合成色素の光学応答が顕著に現れる近赤外領域で信号感度の最適化を行う。

(2) 光合成色素分子の超高速光学応答、および光学非線形性を調べ、超解像度顕微鏡観測を行うための最適化条件を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 顕微鏡の最適化

独自に構築した超解像度顕微鏡に、パルス

レーザーを導入した、STED 顕微鏡観測を行うためには2つのレーザー光を、観測試料の電子励起状態に合わせたタイミングで光照射を行う必要がある。従来の STED 顕微鏡観測では、試料を一定の色素で染色をした上で形状観測が行われていたが、今回の研究では、試料それ自体の電子状態の寿命を反映した光学応答を利用し、超解像度顕微鏡画像を得ることを目指している。そのため、試料ごとに時間遅延を最適化できるように、光学系を工夫した。本研究では特に光合成色素の光学応答に着目をするため、光学遅延は数ピコ秒の範囲で変えられるようにしてある。一例として図 1(a)に時間遅延を 10 ピコ秒に合わせた状態を示す。

良質の超解像度顕微鏡画像を得るためには、励起レーザーと STED レーザーが重なった領域で、効率よく蛍光の失活を起こさせる必要がある。光学系を工夫することにより、現在、80%程度の失活を起こさせることに成功している。その結果、図 1(b)、1(c)に示すように、超解像度画像を得ることに成功している。今後さらに高分解能の画像の取得ができるように改良を続ける必要がある。

(2) クロロフィルの非線形光学応答

光合成細菌や高等植物、藻類の光合成の初期過程において光捕集や励起エネルギー伝達の中心的な役割を果たす色素としてクロロフィルをあげることができる。顕微鏡下で蛍光観測を行う際に一般的に用いられる染色液と比較すると、蛍光波長や可視領域のエネルギー構造が類似しているとみなすことができるが、超解像度顕微鏡観測が行われた例はない。STED 顕微鏡法に適應するためには、蛍光波長よりも長波長のレーザー光 (STED 光と呼ぶことにする) を試料に照射したときに蛍光の失活が起こることが必須となる。この現象を確認するために、ジエチルエーテルに分散させたクロロフィル *a* 分子をマクロ配置、及び顕微鏡下で蛍光観測を行った。結果の一例を図 2 に示す。蛍光波長の約 2000cm^{-1} というかなり低エネルギー側に合わせた STED 光を照射した場合、蛍光の失活ではなく増大現象が確認された。このことはすなわち、クロ

ロフィルを多く含む光合成色素蛋白複合体を超解像度顕微鏡観測するためには、STED 法をそのまま適用することができないことを意味する。現在のところ、この蛍光の増大現象は、二光子励起を経たアンチストークス蛍光に起因すると考えている。今後、一光子吸収係数が二光子吸収係数を上回るエネルギー領域の探索が必要となる。

(3) カロテノイドの超高速光学応答

STED 顕微鏡観測を行う際、試料の染色に用いる蛍光物質に必要とされる条件の一つとして、はっきりとした二準位系を形成していることがあげられる。三つ以上の準位をうまく用いることにより、STED 顕微鏡観測を行うための手法もいくつか報告がなされてきているが、一般的にそのような手法は、二準位系の場合に比べ複雑になる。背景で述べたように、染色物質ではなく、試料そのものの蛍光を観測することが可能となれば、たとえば物質間でエネルギーをやり取りする様子を分子スケールで観測可能となる。これを実現するためには、電子状態の時間スケールをあらかじめ見積もり、STED 顕微鏡観測に用いる全てのレーザーの波長と、試料にレーザーを照射するタイミングに対する戦略を立てておく必要がある。このことは、単に効率の良い励起の条件を見積もるというだけではなく、二光子吸収過程などの非線形光学効果により、実効的な誘導放出過程の減少に伴う顕微鏡画像の劣化を最小限に抑える条件を探索することを意味する。特に前述のように、STED 光照射時のクロロフィルの蛍光は複雑であるため、別の蛍光失活経路を探索する必要はある。

このような点を鑑みて、研究実施期間中にいくつかの光合成色素の超高速光学応答、及びエネルギー伝達過程を調査した。ここではその一例として代表的なカロテノイドである β -カロテンについて非線形光学応答の時間変化を調べた結果について述べる。自然界に 700 種類以上存在するといわれているカロテノイドは、光合成初期過程において光捕集や光保護の役割を担う重要な色素として知られている⁴。そこでは、カロテノイドから

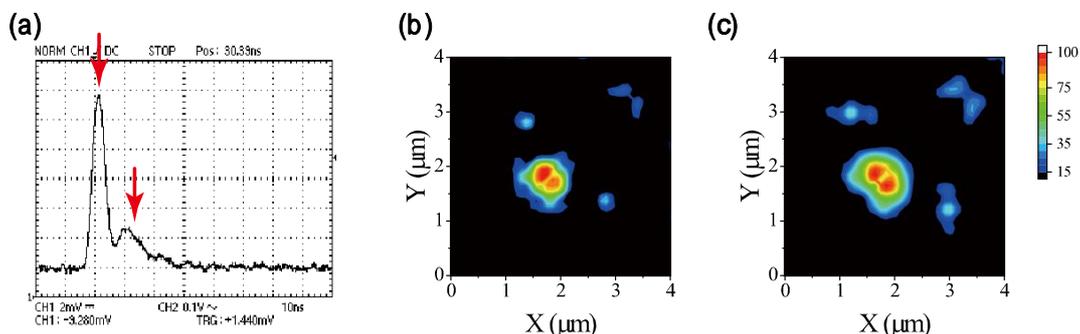


図 1: (a) 顕微鏡測定に用いる 2 つのレーザーパルスの時間遅延の様子。これらのレーザーを用いて測定した超解像度顕微鏡画像(b)と通常の蛍光顕微鏡画像(c)。空間分解能が格段に向上していることが分かる。

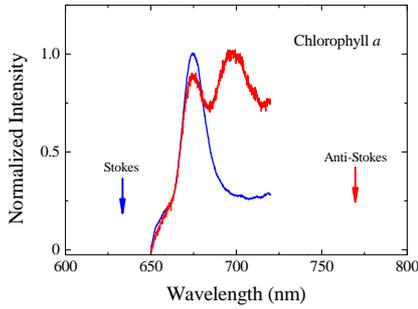


図 2 : (青線) ジエチルエーテルに分散させたクロロフィル *a* 分子の蛍光スペクトル。励起波長は 633nm である。(赤線) 励起を 770nm で行った場合でも蛍光が現れる。そのため 2 つの波長で同時励起を行った場合は、633nm で励起した場合に比べ蛍光の増大現象が現れる。

クロロフィルへの超高速・低エネルギー損失での励起エネルギー移動が起こることから、その機構を明らかにするために、多くの研究グループがコヒーレント分光を試みてきている⁵⁻⁷。「カロテノイドは可視領域にいくつの電子状態を持つのか?」という問いに答えることは、光合成の初期過程を理解し、さらには太陽電池などに応用するうえで非常に重要となってくるが、その詳細についてはいまだ多くの点で謎が残されている。

測定装置の改良により、広いスペクトル領域で三次非線形光学応答を示す四光波混合信号測定が可能となった。図 3(a)のようにβ-カロテンの非線形光学応答を反映して、スペクトルは時間とともにそのピークエネルギーが変化していくことが分かる。図 3(b)で示すように、量子光学の基本原理解に基づいたモデル計算を行った結果と比較をしてみると、一見、「ピークエネルギーが高エネルギー側に移動しながら強度が増加していく」という実験結果をよく再現しているように思われる。しかしながらその時間スケールや信号強度は、実験で観測された値と全く異なっている。また、図 3(c)で示すように、定常吸収スペクトルの実験結果を同じモデルを用いて

解析してみると、同じエネルギー領域においてだけ、不一致がみられる。すなわち本結果は、この領域に隠れた電子状態が存在することを示唆している。

<引用文献>

- S. W. Hell and J. Wichmann, *Opt. Lett.* **19**, 780 (1994).
 S. W. Hell, in *Top. Fluoresc. Spectrosc.*, edited by J. R. Lakowicz (Plenum Press, New York and London, 1997), Vol. 5, p. 361.
 J. B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (Springer, New York, 2006).
 T. Polivka and V. Sundström, *Chem. Rev.* **104**, 2021 (2004).
 G. D. Scholes, G. R. Fleming, A. Olaya-Castro, and R. van Grondelle, *Nat. Chem.* **3**, 763 (2011).
 S. F. Huelga and M. B. Plenio, *Nat. Phys.* **10**, 621 (2016).
 M. Sugisaki, D. Kosumi, K. Saito, R. J. Cogdell, and H. Hashimoto, *Physical Review B* **85**, 245408 (2012).

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 4 件)

- D. Kosumi, T. Horibe, M. Sugisaki, R. J. Cogdell, and H. Hashimoto, "Photoprotection mechanism of light-harvesting antenna complex from purple bacteria," *J. Phys. Chem. B*, **120** (2016) 951-956. [doi:10.1021/acs.jpcc.6b00121] (査読有り)
 H. Hashimoto, M. Sugisaki, and M. Yoshizawa, "Ultrafast time-resolved vibrational spectroscopies of carotenoids in photosynthesis," *Biochim. Biophys. Acta, Bioenergetics*, **1847** (2015) 69-78. [doi:10.1016/j.bbabi.2014.09.001]

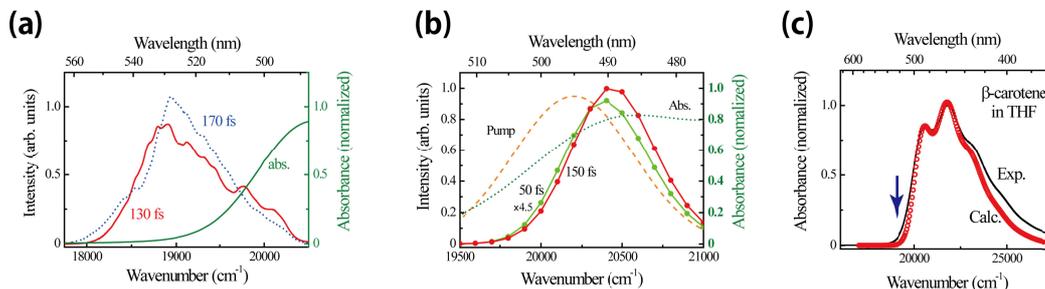


図 3 : (a) β-カロテンの三次非線形光学応答スペクトル。時間の経過とともに、応答のピークが高エネルギー側に移動し、さらにはその強度が増加する。(b) ブラウニアン振動子モデルを用いて三次非線形光学応答スペクトルの時間発展を計算した結果。実験結果をよく反映しているように見えるが、その応答時間や強度について僅かな不一致がみられる。50fs のスペクトルは 4.5 倍拡大して表示してあることに注意。(c) 線形吸収スペクトルの実験(実線)と計算(丸印)の比較。全体的に形状が一致しているように見えるが、矢印の近傍で不一致がみられる。

(査読有り)

D. Kosumi, T. Nishiguchi, M. Sugisaki, H. Hashimoto: "Ultrafast coherent spectroscopic investigation on photosynthetic pigment chlorophyll a utilizing 20fs pulses," *J. Photochem. Photobio. A: Chemistry*, **313** (2015) 72-78.

[doi:10.1016/j.jphotochem.2015.06.025] (査読有り)

N. Tonouchi, D. Kosumi, M. Sugisaki, M. Nango, and H. Hashimoto, "How do surrounding environments influence the electronic and vibrational properties of spheroidene?," *Photosynth. Res.*, **124** (2015) 77-86.

[doi:10.1007/s11120-015-0095-z] (査読有り)

[学会発表] (計 7 件)

杉崎満, 西口智也, 南後守, 天尾豊, 「スペクトル分解をしたβ-カロテンの四光波混合信号」, 日本物理学会 2016 年秋季大会, 金沢大学 角間キャンパス (石川県金沢市), 2016 年 9 月 13 日 ~ 16 日 .

船越良平, 殿内規之, 小澄大輔, 杉崎満, 南後守, 橋本秀樹, 「スフェロイデンにおける振動緩和の溶媒効果」, 日本物理学会 第 70 回年次大会, 早稲田大学 早稲田キャンパス (東京都新宿区), 2015 年 3 月 21 日 ~ 24 日 .

小澄大輔, 堀部智子, 杉崎満, R.J. Cogdell, 橋本秀樹, 「近赤外 5 フェムト秒光パルスを用いた光合成アンテナにおける量子ビートの観測」, レーザー学会学術講演会 第 35 回年次大会, 東海大学 高輪校舎 (東京都港区), 2015 年 1 月 11 日 ~ 12 日 .

殿内規之, 小澄大輔, 杉崎満, 南後守, 橋本秀樹, 「周辺環境は電子及び振動ダイナミクスにどのように影響を及ぼすのか?」, 第 28 回カロテノイド研究談話会, 石川県文教会館 大会議室 (石川県金沢市), 2014 年 9 月 4 日 ~ 5 日 .

H. Hashimoto, D. Kosumi, R. Fujii, M. Sugisaki, M. Iha, K. Sakaguchi, and S. Katsumura, "Ultrafast excited state dynamics of marine carotenoid fucoxanthin and its homologues", 17th International Carotenoid Symposium, Park City, Utah, USA, June 29-July 4, 2014.

[図書] (計 2 件)

D. Kosumi, S. Maruta, R. Fujii, M. Sugisaki, S. Takaichi, R.J. Cogdell, and H. Hashimoto, "A regulation of energy flow in purple bacterial photosynthetic antennas," *Ultrafast Phenomena XIX*, Springer proceedings in

Physics, **162** (2015) 572-575.

D. Kosumi, T. Kajikawa, S. Okumura, K. Yano, M. Sugisaki, K. Sakaguchi, S. Katsumura, and H. Hashimoto, "Elucidation and control ultrafast intramolecular charge transfer dynamics of marine photosynthetic pigments," *Ultrafast Phenomena XIX*, Springer proceedings in *Physics*, **162** (2015) 576-579 .

[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

橋本 秀樹 (HASHIMOTO HIDEKI)

関西学院大学・理工学部・教授
研究者番号：50222211

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

小澄 大輔 (KOSUMI DAISUKE)

熊本大学・パルスパワー科学研究所・准教授
研究者番号：70613149

(4) 研究協力者

船越 良平 (FUNAKOSHI RYOUHEI)

大阪市立大学・大学院理学研究科・大学院
生

江村 秀俊 (EMURA HIDETOSHI)

大阪市立大学・大学院理学研究科・大学院
生