

クロロフィル蛍光解析における時空間軸のギャップ*

理化学研究所 光量子工学研究領域 ライセル分子イメージング研究チーム/JST さきがけ
岩井 優和*

クロロフィル蛍光解析によって、エネルギー伝達過程や光合成電子伝達に関する多くの現象がこれまで明らかにされてきた。しかし、異なる時間軸と空間スケールを有する異なる解析で得られた情報から、どのようにして相互認識が可能な共通の結論を導きだすことができるだろうか。この問いに関して、本稿では、共焦点レーザー顕微鏡を用いたクロロフィル蛍光解析における時間軸と空間スケールについて考察し、その問題点をこれまでの研究の紹介を交えて議論したい。

1. はじめに

葉緑体に存在するチラコイド膜には、クロロフィル分子を結合したタンパク質が数多く存在している。クロロフィル分子は太陽光に含まれる光エネルギーを吸収し、そのエネルギーを隣接する同分子に一瞬で受け渡すことができる。その一瞬の出来事が複数の分子間で繰り返し起こることで、光エネルギーはやがて光合成反応中心タンパク質へ伝達され、そこで電気化学エネルギーに変換される。

数多くの研究成果を省いて言葉で記述するとなんだか教科書的であっけない気がするが、秒速約30万キロメートルで移動する光を捕捉し、そのエネルギーを目的の場所まで運ぶ過程には数えきれない経路と障壁があるに違いない。実際すべてが目的地まで難なく到達するわけではなく、そのエネルギー伝達過程でクロロフィル分子から蛍光として再び放出されることがある。このクロロフィル蛍光は光合成反応を研究する上で最も重要な情報の一つであり、その現象は幅広い時間軸と空間スケールで解析されている。しかし、光エネルギーが蛍光として放出される瞬間のクロロフィル分子の振動状態や周辺場の応答については、まだ未解明な部分が多いため、クロロフィル蛍光の解析においては、個々の問題に本質的な時間軸と空間スケールを選択し理解する必要がある。最も重要なことは、異なる時間軸と空間スケールを有する異なる解析で得られた情報から、いかに相互認識の可能な共通の結論を導きだすかである。その判断基

準は、個々の研究者に委ねて良い問題ではない。なぜなら、専門分野の異なる研究者は、それぞれが異なる“想像力”を持っているため、その想像を超えた領域での現象を考察する際、その想像力の差が少なからず影響するからである。もちろん想像と科学は全く別物であるが、専門分野が異なる場合、上記の光合成初期反応過程について想像できる深みは様々であり、その違いによって解釈の本質も異なってくる。

本稿では、共焦点レーザー顕微鏡を用いたクロロフィル蛍光解析における時間軸と空間スケールについて考察し、観察された結果がどこまで共通の現象として識別できるのか、その問題点をこれまでの研究の紹介を交えて議論したい。

2. 異なる時間軸と空間スケールから導き出される情報

1674年、Anthony van Leeuwenhoekは自ら設計した光学顕微鏡を用いて葉緑体を初めて観察した¹⁾。この時、アオミドロ属 *Spirogyra* の葉緑体を“small green globules”とし、緑色の正体が葉緑体であることを記した。無論この時点ではチラコイド膜や光化学系タンパク質などについては知る術がなかった。19世紀に入り、光学顕微鏡の空間分解能が上がり、葉緑体内にドット状の構造があることをHugo von Mohlらは発見し、Arthur Meyerは、その構造を“Grana”と記述した¹⁾。それから約1世紀半経過した現在では、“グラナ”は教科書で紹介されるよく知られた構造だが、緑

* 解説特集「30年後の光合成研究」

* 連絡先 E-mail: miwai@riken.jp

色をしたオルガネラの中に見出した小さなドット状の構造物について、それ以上のことを知る術は当時なかった。20世紀に入り、電子顕微鏡を用いた観察が可能となり、そのドット状構造物を目印に、葉緑体を識別し、その中に存在するグラナが平らな袋状構造物の積み重なったものであることが示された^{2,3)}。電子顕微鏡によって、空間分解能が上がり、トモグラフィー解析によって立体構造まで明らかとなった⁴⁻⁶⁾。現在では、チラコイド膜に存在するタンパク質の配列の様子までも観察されている⁷⁾。

最初は緑色のドット状にしか見えなかったグラナが、電子顕微鏡が持つ空間分解能によって幾層にも重なったチラコイド膜の構造物であることが明らかとなった。グラナ構造の他に、膜が重ならない“ストロマメラ”の構造も電子顕微鏡によって観察されており、それぞれの膜構造の違いには、2種類の光化学系タンパク質 (PSIIとPSI) が別々に局在しているという生化学的解析結果と関連づけられている⁸⁾。電子顕微鏡技術によって、見えなかったものが見えるようになり、チラコイド膜の微細構造情報が明らかとなったが、解析の都合上 (固定サンプルの超薄切片を真空中にて観察するため)、生命現象における時間軸情報を犠牲にしなければならない。ここで当然考えるべき問題点は、ある一瞬における微細構造情報をもとに、どこまで想像を広げることが可能だろうかということである。

光合成研究では、クロロフィル蛍光を観察することで、クロロフィル結合タンパク質の状態について知ることができる⁹⁾。上述したように、クロロフィル分子によって吸収された光エネルギーが光化学系反応中心へ伝達される過程で、励起エネルギーが再び分子から放出されるものがクロロフィル蛍光である¹⁰⁾。PSII反応中心、もしくはPSI反応中心まで伝達された励起エネルギーが、その場で消費されず蛍光として放出される際、各反応中心でのエネルギー量が異なっているため、それぞれの波長に応じた分光測定をすることで蛍光の発信源を識別できる。これに基づき、光エネルギーの吸収様式 (励起方法) を工夫することで、クロロフィル結合タンパク質の配置や相互作用状態について情報を得ることができる¹¹⁾。例えば、PSIIを効率良く励起する光を葉緑体に照射すると、PSIIからの蛍光強度が減少 (もしくは、PSIからのクロロフィル蛍光強度が増加) する。これは、片方の光化学

系の励起状態が変化することで、各光化学系タンパク質への励起エネルギー伝達効率が、何らかの機構によって変化している結果と考えられる¹²⁾。また、パルス変調時間分解蛍光法に基づくクロロフィル蛍光解析¹³⁾によって、同様の変化を生きた細胞を用いて測定することも可能である¹⁴⁾。

タンパク質に結合するクロロフィル分子から放出される蛍光を詳細に解析することで、タンパク質間における分子配置や相互作用についての情報が得られる。これは光合成研究の根幹を担う最も重要な知見である。しかし、クロロフィル分子から放出される微量な蛍光を検出する技術には制限があり、十分な強度を検出するためには、サンプル量を増やすか検出時間を延ばす必要がある。サンプル量 (例えば、細胞数) を増やした場合、異なる個性を持つ可能性のある複数の蛍光の発信源のバルクでの解析となるため、得られる情報は全体の平均値となる。そのため、個別の蛍光について検出することが難しくなり、同時に空間分解能も低くなる。また、検出時間を長くした場合、その時間内で生じる変化を識別することができなくなるため、複数の状態変化を含んだ平均値となる。ここで当然考えるべき問題点は、細胞 (葉緑体) 内で起こる多種多様な物質状態を反映する複雑な (蛍光) 情報をもとに、どこまで想像を広げることが可能だろうかということである。

3. 時間軸と空間スケールはどこまで同時に極限まで近づけられるか

上述した電子顕微鏡観察とクロロフィル蛍光解析は、どちらも光の特性を巧みに利用し、検出方法を工夫することで、それぞれ異なる次元の情報を導きだす。では、顕微鏡による微細領域の特定とその領域における蛍光検出を同時解析することで、異なる時間軸と空間スケールにおける現象をどこまで共通認識することができるだろうか。この問いに関して、共焦点レーザー顕微鏡を基本解析技術として、本稿では考察する。共焦点レーザー顕微鏡を用いることで、レーザー光によるクロロフィル分子の励起とその蛍光の検出を連動させ、更にレンズとピンホールによる光学的断層効果を利用することで、サンプル内のある一点の深度を限定して検出することが可能である¹⁵⁾。サンプル上を走査しながら同様に蛍光を検出することで、ある平面のクロロフィル蛍光強度分布を得ること

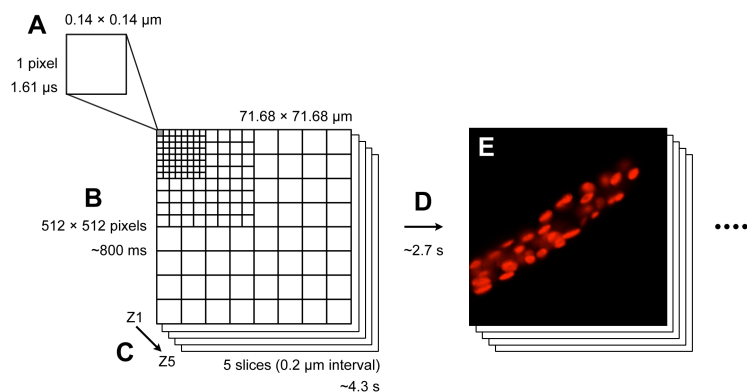


図1 共焦点レーザー顕微鏡を用いたクロロフィル蛍光観察における時空間スケール
一般的な観察条件のある一例を本稿における観察条件とする。A. 一画素。B. 一平面。C. 異なる深度の平面を5枚連続取得することで三次元画像を構築する。D. 次の三次元画像に移る際にZ5からZ1平面に移動するのに要する時間。E. コケ植物ヒメツリガネゴケの原糸体細胞内に存在する葉緑体のクロロフィル蛍光画像。

ができる。ここでは市販されている共焦点レーザー顕微鏡における一般的な観察条件を例に考える(図1)。検出器の性能とここでの観察条件から、1画素(0.14×0.14マイクロメートル)における検出時間は1.61マイクロ秒を費やし、512×512画素(71.68×71.68マイクロメートル)の視野を走査するのに422ミリ秒の時間が必要である。実際には、顕微鏡装置が走査に費やす時間が各画素間に含まれるため、一平面を検出するのに約800ミリ秒を費やす。

まず、1画素の情報を得るのにかかる1.61マイクロ秒の時間について考える(図1A)。この時間スケールは、光エネルギー伝達概念¹⁶⁾からすると、1画素に含まれる全てのクロロフィル結合タンパク質間を励起エネルギーが移動するのに十分な時間である。更に、一平面の情報取得に費やす約800ミリ秒の時間(図1B)があれば、PSIIに到達した励起エネルギーが光誘起電荷分離・電荷移動反応を起こし、チラコイド膜中のキノンプールの酸化還元状態の均衡を崩しだすのに十分な時間である¹⁷⁾。レーザー光による励起効率が高いと仮定すると、一平面に含まれる多くのクロロフィル結合タンパク質が約800ミリ秒の間に全て励起されていることになる。このような状況下では、様々な反応が進行し、一平面におけるエネルギー伝達過程の概念を見出すことは困難である。従って、1画素から得られる確かな情報は、その画素に含まれるクロロフィル分子の存在量のみであり、それ以上のことを証明するにはこの観察条件では難しい。

次に空間スケールについて考える。あくまでも数値

上だが、1画素(0.14×0.14マイクロメートル)には、数十個のタンパク質が存在していると考えられる(図2)。すなわち、必要なタンパク質が存在していれば、一連の光合成反応が円滑に完了できる空間領域である。例えば、1画素内にPSIIとPSI、そしてそれぞれの集光アンテナタンパク質(LHCIIとLHCI)が存在し、吸収した光エネルギーが各光化学系へと伝達される状況が充分にあり得る。また、それに基づく光合成電子伝達系も起こっていても不思議ではない。したがって、数十個のタンパク質が存在し得る1画素から検出されるクロロフィル蛍光のある一つの強度数値には、複数のタ

ンパク質の異なる光エネルギー状態の情報が含まれており、反応中心と集光アンテナタンパク質との結合様式や励起エネルギーの方向性など¹⁷⁾を分析するには極めて困難な空間スケールである。

葉緑体の長辺は約10マイクロメートル以下なので、一平面(71.68×71.68マイクロメートル)の視野となると、数十個の葉緑体が存在し得る(図1E)。一つの葉緑体には、膨大な数のタンパク質が協調しながら存在しており、クロロフィル分子を結合しないタンパク質やストロマ領域に存在するタンパク質も含まれる。電子顕微鏡で観察されるグラナとストロマラメラのよう

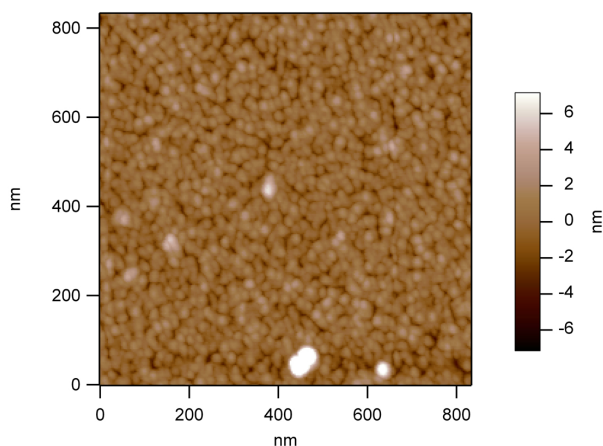


図2 一画素中に存在し得るタンパク質の数

精製した葉緑体チラコイド膜を、マイカ表面に吸着させ、原子間力顕微鏡を用いて、その表面の凹凸をナノスケールで観察した。観察は大気中で行った。個々の粒子がタンパク質を示しており、一画素(140×140 nm)中に少なくとも数十個のタンパク質が存在できることが分かる。カラーバーは高さ(相対値)を示す。

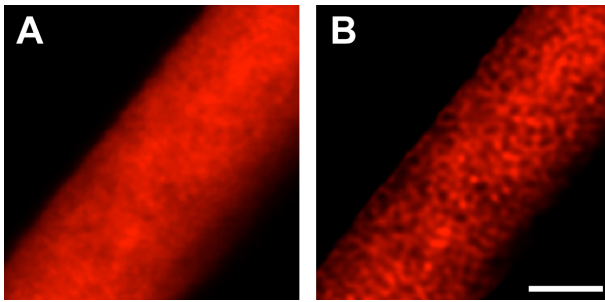


図3 画像解析による非焦点ボケの除去

共焦点レーザー顕微鏡を用いて、寒天培地上に育つコケ植物ヒメツリガネゴケ原糸体細胞内のクロロフィル蛍光の三次元画像を取得した。観察条件は本文中に示した通りである(図1)。寒天培地にアンピシリンを添加し育成することで、葉緑体の分裂を阻害する。その結果、一つの前糸体細胞に一つの巨大な葉緑体を形成する。巨大になった葉緑体は細胞内で動かなくなるので、葉緑体内のチラコイド膜の動態変化を解析するのに適した観察方法である。(A) 画像解析前は非焦点ボケが含まれるため構造が見えにくい、(B) 非焦点ボケを除去することで、葉緑体内の構造が鮮明に確認することができる。スケールバーは5マイクロメートル。

な膜構造の違いも存在する。一個体のオルガネラと言えども極めて複雑な構造を持つ葉緑体には無数のクロロフィル分子が含まれており、その存在する空間を 10×10 マイクロメートルと仮定すると、20ミリ秒以内でそのほとんど全てが均一に励起される。このような状況下で検出されるクロロフィル蛍光から、様々な反応機構に関連する仮説を正しく導きだすことは可能だろうか。不可能とは言わないが、得られた情報を検証するにはこの観察条件だけでは難しい。したがって、この空間スケールで得られる確かな情報は、クロロフィル分子の存在量とその分布のみとなる。

4. 生命現象における時空間軸とその情報取得における時空間軸

共焦点レーザー顕微鏡を用いることで、生きた細胞の微細領域を観察することが可能である。生体内で常に変動する現象を解析する場合、平面だけでなく立体的な追跡が必要となるため、複数の平面情報を連続取得することで立体情報を導きだす。ここでは、上述した平面の画像取得を0.2マイクロメートル毎に5回繰り返し、高さ1マイクロメートル分の三次元画像を取得した(図1C)。この時、各平面間の移動にかかる時間(約1秒)を含めて約4.3秒の取得時間を要する。三次元画像として蛍光を取得した場合、それぞれの平面には、上下に隣接する平面からの情報(いわゆる非焦点ボケ)が混入することが多い。これは光を扱う顕微

鏡装置の特性上、避けられない問題である。しかし、光が顕微鏡装置を通過する時に起こる方向性の変化や広がり度合いを蛍光ビーズ(0.1マイクロメートル)などを用いて、その特性をあらかじめ測定することで、三次元的な情報の混入を画像処理によって除くことができる^{19,20)}。この方法を用いることで、葉緑体に存在するクロロフィル分子の空間分布をより詳細に特定することができる(図3)。次にこの観察条件における時間軸と空間スケールの問題について考察する。

上述した画像処理によって、三次元画像に含まれる非焦点ボケを除去する際、最低でも3枚の異なる深度の平面情報が必要である。ここでは5枚の平面情報を画像処理で用いるが、これらは同時に取得されたものではなく、平面毎に約1秒間のずれが生じている。すなわち、5つの異なる位置の平面情報を用いて得られた三次元画像には、5つの異なる時間の空間情報が混在していることになる。また、葉緑体に存在するクロロフィル分子が約4.3秒間、レーザー光によって連続励起されており、この間に起こりうるエネルギー伝達機構に関する問題はあまりにも複雑すぎる。何度も述べたが、クロロフィル蛍光が検出された空間にクロロフィル分子が存在していたことは確かだと言える。しかし、一つの三次元空間分布を(特に生きた細胞を用いて)解析する場合、時間経過による局在変化を考慮する必要があり、その変化にかかる時間が短く、方向性がランダムであった場合、再構築した三次元空間分布で観察される構造は不確かな情報となる。

ここでの画像取得における時間軸と空間スケールが、どれだけ生命現象による三次元空間分布の変化に対応できるか判断するため、三次元タイムラプス解析を行った。すなわち、クロロフィル蛍光の三次元的空間分布が大きく変化していなければ、画像を連続取得しても検出される強度分布は大きく変化しないはずである。上述した観察条件で三次元画像を連続取得する場合、基準となる深度に戻る(5番目のZ平面から1番目のZ平面までの)時間(約2.7秒)を含めると画像取得間隔は約7秒となる(図1D)。三次元タイムラプス解析の結果、クロロフィル蛍光の空間分布がほとんど変化しないドット状の領域が確認された(図4、黒色領域)。同様な領域は視野に複数存在しており、大きさを見積もると直径(長軸)が平均して約500ナノメートルであることが分かった。このドット状を示すクロロフィル蛍光は、この観察での時間軸と

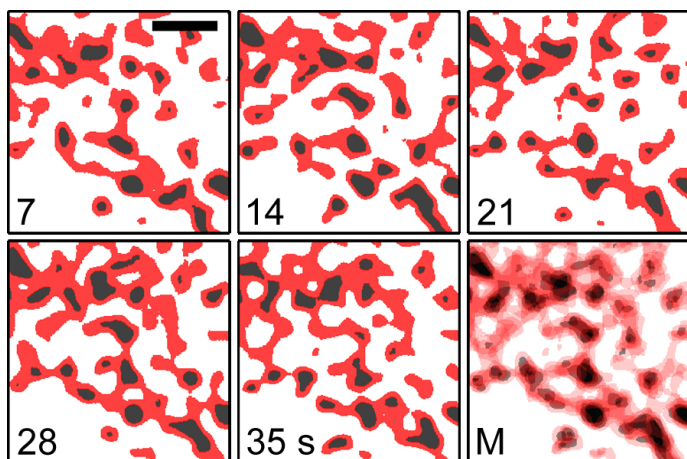


図4 ドット状領域（黒色）と細長い領域（赤色）の経時的局在変化
 三次元タイムラプス解析から、二つの異なる蛍光強度領域を抽出すると、経時的に局在が大きく変わらない領域（黒色）と少なくとも7秒以内で局在を変える領域（赤色）を確認することができた。細長い領域がドット状領域を繋ぐような形状をしている様子が複数確認できる。数字は、経過時間を示し、Mはそれぞれを重ね合わせた図。スケールバーは2マイクロメートル。

空間スケールにおいて経時的に安定しており、その構造情報には時空間軸におけるずれがほとんど含まれていないと考えられる。これまでの電子顕微鏡観察で得られている情報⁴⁻⁶⁾を考慮すると、ドット状に観察された領域はグラナである可能性が高い。

一方、三次元タイムラプス解析でクロロフィル蛍光の空間分布が大きく変化する細長い領域を確認することもできた（図4、赤色領域）。ここでの観察条件を考慮すると、少なくとも7秒以内にこの細長い領域の空間分布は変化している。特徴的な点は、細長い領域が二つのドット状領域を結ぶように存在している点である。電子顕微鏡で観察されているストロマラメラが同様の構造的特徴を示しており³⁻⁶⁾、時間軸と空間スケールの問題点を敢えて無視した場合、この細長い領域はストロマラメラであると考えられる。しかし、一般的にグラナとストロマラメラには、PSIIとPSIがそれぞれ別々に局在すると考えられており⁸⁾、また室温におけるPSIからのクロロフィル蛍光の寄与が数%である²¹⁾ことが知られている。従って、この観察条件では、この細長い領域がストロマラメラであると断定することが困難であるとも考えられる。ここで重要なことは、異なる時間軸と空間スケールを有する異なる解析で得られた知見を、いかに相互認識が可能な共通の結論として導きだせるかである。では、経時的に形状を変化させる細長い領域は一体何か。ここで考えられる仮説は3つある：1) 室温でのクロロフィル蛍

光のほとんどはPSIIとLHCIIに含まれるクロロフィル分子からだと考えられているので、これらのタンパク質が経時的に激しく動く環境下（状態）にある；2) 室温では蛍光検出が難しいPSIへの励起エネルギー移動効率に変化することで、細長い領域における蛍光強度が経時的に変化している；そして、3) チラコイド膜自体が分裂と結合を繰り返している^{22,23)}。ここでの観察条件では、これら3つの可能性について、これ以上言及することが難しい。しかし、三次元タイムラプス解析によって、生体内でのクロロフィル分子の局在領域が少なくとも二種類あることが分かった。最低7秒間は安定している領域とそうでない領域である。

5. 可視化された事象を不可視化しないために

本稿で紹介した共焦点レーザー顕微鏡の観察条件では、上述した時間軸と空間スケールの問題点を完全に解決することは難しい。しかし、これまでに様々な現象が分光学的クロロフィル蛍光解析によって証明されており、それらを顕微鏡で観察される現象と関連づけることは重要である。一方、共焦点レーザー顕微鏡を用いることによって、生体内の微細な空間におけるクロロフィル蛍光の観察が可能となり、上述した時空間的動態変化の情報（図4）を得ることができる。そのような情報は必ずしも通常の生化学的解析によってその実体が解明できるとは限らない²⁴⁾。したがって、クロロフィル蛍光の解析方法やその原理が異なる場合、それぞれに応じた時間軸と空間スケールでの情報解釈をするべきである。また、光合成研究は蛍光解析の先駆的分野であり、一つの手法にのみ偏った解釈はもはやできないため、次元の異なる解析結果を相互に理解していくことも重要である。

本稿では一般的な共焦点レーザー顕微鏡に関して述べたが、クロロフィル分子の励起に用いる光源やクロロフィル蛍光を検出する方法を改良することで、得られる情報の範囲は大幅に広がる。例えば、パルスレーザー光による時間分解蛍光測定を各画素毎で行えば、クロロフィル蛍光寿命を微細領域で解析することができ、タンパク質のエネルギー状態の平面分布図を取得することができる²⁵⁾。また、ニポウディスク方式を用いることで多焦点走査が可能となり、一平面を極めて

短い時間（5ミリ秒以下）で走査することができ²⁶⁾、これを利用することで、本稿で述べた時間軸と空間スケールの問題を大幅に解消することができる。また周波数領域測定法に基づく蛍光寿命解析とニボウディスク方式による検出を融合することで、生体内チラコイド膜の微細な（グラナ・ストロマメラ）構造におけるエネルギー伝達過程（クロロフィル蛍光寿命分布）の三次元タイムラプス解析も可能である。最近では、空間分解能が極めて高い電子顕微鏡観察と光学顕微鏡による蛍光観察を同時に行う電子光子同軸顕微鏡²⁷⁾の開発がされており、クロロフィル蛍光を放出するタンパク質を実際にチラコイド膜上で確認することもいずれ可能となる。将来的に検出器の感度が向上することで、顕微鏡を用いたラマン分光解析²⁸⁾が実用化され、生体内でのチラコイド膜やその他の物質の挙動変化を直接追跡観察することも可能になるだろう。

20世紀に入り電子顕微鏡観察によって見えなかったものが見えるようになり、観察された構造をもとに多くの現象に関わる仮説が提唱されたことは先に述べた。その後も様々な手法による解析が進み、理論と計算で全てシミュレーションすることが可能と言われるほどの膨大な情報が存在する現代において、これまで見えなかった事象が見えるようになった時、その事象をどれだけ本質的で正しく解釈することができるだろうか。見えなかったものを見るようにする際、検出技術が制限となるが、今後も新しい検出技術が開発され、検出感度が桁違いに向上し、これまで見えなかった生命現象が見えた瞬間、その未知なる事象とどれだけ正しく向き合えるだろうか。専門分野が異なり、想像力が異なれば、見えてくる情報の深みは様々となり、解釈の本質に違いが生じる。想像力の乏しさによって、可視化された事象が再び不可視化されないように、複数の時空間軸において広い視野を持つことを常に心がけたい。

6. おわりに

雑木林の間伐の仕事をするある人の言葉がとても印象的だった。「私たちは、樹木の成長のため、森林の光環境の調整のため、そして100年後の木材のため、雑木林の間伐を行っています。」めまぐるしく変動する地球環境と向き合い、長い年月がかかる樹木の成長を考えた場合、それだけの時間軸を想定しなければ、すぐに対策が後手となるそうだ。職業としては異なる

が、その言葉は光合成研究に通ずるものがある。100年後を見据えた長い時間軸と多くの樹木と対峙する広大な空間スケールでの光環境の調整は、もはや想像を絶する環境変化に立ち向かう大実験である。

第4回日本光合成学会での公開シンポジウム「30年後の光合成研究」の開催にともない、自分自身の30年後の研究について考える機会を与えていただいた。そのようなことをこれまで一度も考えたことがなかっただけに、それだけの時間軸を見据えて自分自身の研究と向き合うと、それまで見えなかった何かが見えた気がする。想像が広がることで、不可視が可視化されたのかもしれない。100年後を見据えた雑木林の間伐のような壮大な時空間スケールでの大実験とはならないかもしれないが、100年後の自分自身の研究について想像を広げることで、目の前の直近の課題の中にも、新しく見出す何かがあるかもしれない。そんな探究心を忘れず持ち続けているかどうか、30年後の自分自身にここで問いかけてみたい。

謝辞

本稿で紹介した筆者の研究の一部は、JSTさきがけ「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化と生産物活用のための基盤技術の創出」領域の支援のもと、理化学研究所光量子工学研究領域ライブセル分子イメージング研究チーム（中野明彦チームリーダー）において行われたもので、横野牧生博士（北海道大学）との共同研究による成果です。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。最後に、第4回日本光合成学会公開シンポジウムでの講演（2013年5月31日）と本執筆の機会を与えていただきました田中歩先生（北海道大学）、鹿内利治先生（京都大学）、佐藤直樹先生（東京大学）に感謝いたします。

Received November 20, 2013, Accepted November 29, 2013, Published December 31, 2013

参考文献

1. Gunning, B., Koenig, F. and Govindjee. (2007) A dedication to pioneers of research on chloroplast structure, in *The Structure and Function of Plastids* (Wise, R.R., and Hooper, J.K., Eds.) pp xxiii-xxxi, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
2. Wehrmeyer, W. (1964) Zur klärung der strukturellen variabilität der chloroplastengrana des spinats in profil

- und aufsicht. *Planta*. 62, 272-293.
3. Paolillo, D.J. (1970) The tree-dimensional arrangement of intergranular lamellae in chloroplasts. *J. Cell Sci.* 6, 243-255.
 4. Shimoni, E., Rav-Hon, O., Ohad, I., Brumfeld, V. and Reich, Z. (2005) Three-dimensional organization of higher-plant chloroplast thylakoid membranes revealed by electron tomography. *Plant Cell* 17, 2580-2586.
 5. Mustárdy, L., Buttle, K., Steinbach, G. and Garab, G. (2008) The three-dimensional network of the thylakoid membranes in plants: Quasihelical model of the granum-stroma assembly. *Plant Cell* 20, 2552-2559.
 6. Austin, J.R., 2nd and Staehelin, L.A. (2011) Three-dimensional architecture of grana and stroma thylakoids of higher plants as determined by electron tomography. *Plant Physiol.* 155, 1601-1611.
 7. Daum, B., Nicasastro, D., Austin II, J., McIntosh, J.R. and Kühlbrandt, W. (2010) Arrangement of photosystem II and ATP synthase in chloroplast membranes of spinach and pea. *Plant Cell* 22, 1299-1312.
 8. Anderson, J.M., Insights into the consequences of grana stacking of thylakoid membranes in vascular plants: a personal perspective. (1999) *Aust. J. Plant Physiol.* 26, 625-639.
 9. Vredenberg, W.J. and Duysens, L.M. (1963) Transfer of energy from bacteriochlorophyll to a reaction centre during bacterial photosynthesis. *Nature* 197, 355-357.
 10. Mimuro, M., Nozawa, T., Tamai, N., Shimada, K., Yamazaki, I., Lin, S., Knox, R.S., Wittmershaus, B.P., Brune, D. and Blankenship, R.E. (1989) Excitation energy flow in chlorosome antennas of green photosynthetic bacteria. *J. Phys. Chem.* 93, 7503-7509.
 11. Krause, G.H. and Weiss, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 313-349.
 12. Murata, N. (1969) Control of excitation transfer in photosynthesis I. Light-induced change of chlorophyll a fluorescence in *Porphyridium cruentum*. *Biochim. Biophys. Acta* 172, 242-251.
 13. Schreiber, U., Schliwa, U. and Bilger, W. (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10, 51-62.
 14. Iwai, M., Kato, N. and Minagawa, J. (2007) Distinct physiological responses to a high light and low CO₂ environment revealed by fluorescence quenching in photoautotrophically grown *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.* 94, 307-314.
 15. Inoué, S. (2006) Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy, in *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (Pawley, J.B., Ed.) pp 1-19, Springer Science+Business Media, LLC, New York, USA.
 16. 三室守、秋本誠志、山崎巖 (2003) 「光合成アンテナ系での励起エネルギー転移過程と転移機構 -フェムト秒、ピコ秒領域時間分解蛍光スペクトル法による解析-」 *レーザー研究*, 31, 212-218.
 17. Strasser, R.J., Srivastava, A. and Govindjee. (1995) Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.* 61, 32-42.
 18. Bernhardt, K. and Trissl, H.-W. (1999) Theories for kinetics and yields of fluorescence and photochemistry: how, if at all, can different models of antenna organization be distinguished experimentally? *Biochim. Biophys. Acta* 1409, 125-142.
 19. Agard, D.A. and Sedat, J.. (1983) Three-dimensional architecture of a polytene nucleus. *Nature* 302, 676-681.
 20. Agard, D.A., Hiraoka, Y., Shaw, P. and Sedat, J.W. (1989) Fluorescence microscopy in three dimensions. *Method. Cell Biol.* 30, 353-377.
 21. Owens, T.G., Webb, S.P., Mets, L., Alberte, R.S. and Fleming, G.R. (1987) Antenna size dependence of fluorescence decay in the core antenna of photosystem I: Estimates of charge separation and energy transfer rates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1532-1536.
 22. Cevc, G. and Richardsen, H. (1999) Lipid vesicles and membrane fusion. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 38, 207-232.
 23. Chuartzman, S.G., Nevo, R., Shimoni, E., Charuvi, D., Kiss, V., Ohad, I., Brumfeld, V. and Reich, Z. (2008) Thylakoid membrane remodeling during state transitions in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 1029-1039.
 24. Miyawaki, A. (2011) Proteins on the move: insights gained from fluorescent protein technologies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 656-668.
 25. Iwai, M., Yokono, M., Inada, N. and Minagawa, J. (2010) Live-cell imaging of photosystem II antenna dissociation during state transitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 2337-2342.
 26. Matsuura-Tokita, K., Takeuchi, M., Ichihara, A., Mikuriya, K. and Nakano, A. (2006) Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature* 441, 1007-1010.
 27. Iijima, H., Fukuda, Y., Arai, Y., Terakawa, S., Yamamoto, N. and Nagayama, K. (2013) Hybrid fluorescence and electron cryo-microscopy for simultaneous electron and photon imaging. *J. Struct. Biol.* in press.
 28. Schie, I.W. and Huser, T. (2013) Methods and applications of Raman microspectroscopy to single-cell analysis. *Appl. Spectrosc.* 67, 813-828.

Imaging Chlorophyll Fluorescence at Multiple Spatiotemporal Scales

Masakazu Iwai*

Live Cell Molecular Imaging Research Team, RIKEN Center for Advanced Photonics / JST PRESTO