

以 X 光影像探討螢火蟲發光機制

中央研究院物理研究所 胡宇光、王民良

國立清華大學分子與細胞生物研究所 李家維、蔡岳霖、徐素婷

國立清華大學物理系 洪在明

行政院農業委員會特有生物研究保育中心 何健鎔

國立臺灣大學昆蟲學系 楊恩誠、吳文彥

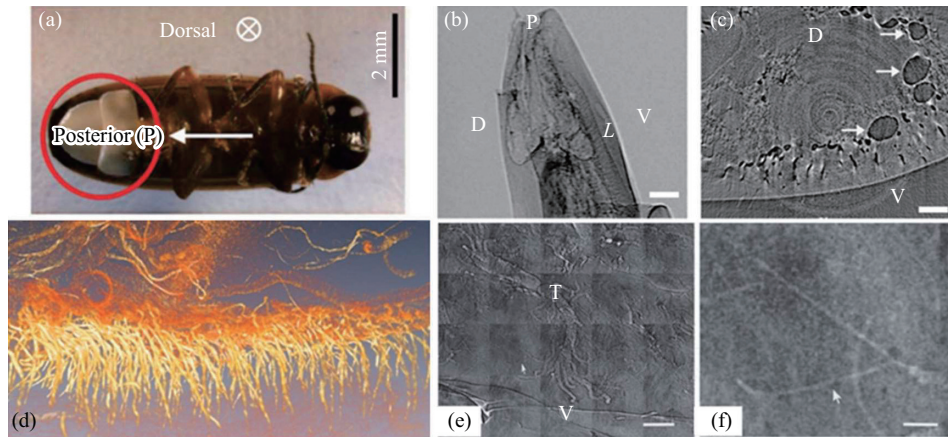
X 光成像術(radiology)是 X 光應用最廣的領域。近年來，得益於同步輻射光源產生 X 光的優異性能，使的 X 光顯微成像在解析度、影像對比與品質方面有突破性的進展。同步光源的高空間同調性應用在創新的超高解析度 X 光顯微術時，其結果特別地引人注目。利用小劑量的 X 射線輻射即可獲得高品質的 X 光顯微影像及動態影片。這些技術除了在傳統材料科學的研究分析外，並已在生物及醫學研究產生了重要的應用。本文將探討近期我們以兩種 X 光顯微技術並結合免疫螢光染色來解開螢火蟲的發光機制。

自古以來，螢火蟲神秘的自發螢光現象，總是吸引大家的目光。科學家藉由各種實驗方法，想一窺其中之奧秘；不同於其他可以自發產生螢光之生物體，螢火蟲可以控制自身發光器的發光頻率，進而利用閃爍的螢光，來聯繫群體、進行溝通及求偶[1, 2]。螢光蟲的發光器具有複雜的氣管系統，當需要發光時其與外界連結的氣孔，會以擴散的方式將氧氣經由微小的氣管運送到發光器內的發光細胞中，接著利用細胞中的螢光酵素將螢光素與氧氣結合，並將螢光素氧化而發出螢光。待氧氣消耗殆盡後再度回到穩態[3, 4]。目前認為一氧化氮與粒線體是調控螢火蟲螢光閃爍的重要關鍵[5]；現今螢火蟲閃爍的機制主要有兩大推論：1、螢火蟲的氣管系統有極佳的氧氣供應效率，可提供發光細胞大量的氧氣，同時滿足粒線體和螢光反應對氧氣的需求[6]；2、螢火蟲在發光前須先抑制粒線體消耗氧氣能力，如此，才有足夠的氧氣提供給發光細胞進而產生螢光反應[7]。欲釐清這兩種推論需先了解氣管系統的供氧效率。前者認為氣管系統供氧效率極高，可以不用考慮粒線體是否會與螢光反應競爭

氧氣；而後者認為氣管系統所供應的氧氣，不能同時滿足粒線體與螢光反應。然而傳統生物學的觀察方式，無法對活體昆蟲進行超過光學解析度的即時影像分析，因此無法判別螢火蟲發光器的氧氣供應假說。

目前在生物及生物醫學領域中，發展超過光學顯微解析度的新式顯微術是一個極為重要的方向，而能夠偵測到個別細胞甚至其細胞內的結構無疑是最重要的目標。在不斷的努力研究下，我們利用同步輻射的全景 X 光顯微鏡觀察組織檢體，已可以觀察到組織內之細胞內部結構。同時我們使用本實驗室製作之菲涅爾波帶片進一步來放大 X 光影像。我們的菲涅爾波帶片之製作已達領先於世界之奈米製程技術[8]使用此波帶片，X 光影像可達到小於 30 奈米[9]之空間(Rayleigh)解析度，同時影像擷取時間亦可小於 50 ms。

本實驗主要是利用架設於同步輻射中心的 X 光顯微系統來觀察螢火蟲發光器氣管內的結構，並藉由三維奈米顯微成像技術，我們成功拍攝到螢火蟲發光器完整的三維顯微影像，包括螢火蟲體內極為複雜的微氣管結構，以及直徑小於 200 奈米之支氣管[10]。同時得益於折射率在螢火蟲氣管系統與空氣間的巨大差異[11]，利用相位差異顯微術及斷層掃描術取得邊褐端黑螢尾端(圖一(a))發光器之影像(圖一(b)、(c))。並藉由 X 光相位差異、斷層掃描攝影術暨影像重組術(圖一(d))，同時結合高解析度穿透式 X 光顯微術所取得之影像(圖一(e)、(f))，可將螢火蟲發光器中氣管系統經過量測並數據化分析，如此可精確地計算出氧氣到達發光細胞的流量，憑藉精準測量螢光的能量消耗，可以評估氧氣提供螢光發光

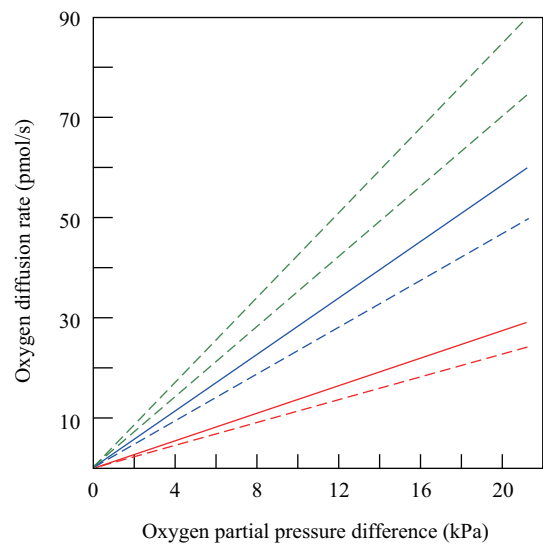


圖一 (a)紅圈處為邊褐端黑螢發光器，箭頭標示 X 光影像取像的方向。(b)X 光相位差顯微術取得之發光器內部結構。圖片中的比例尺為 400 微米。(c)典型的斷層影像經重組後顯現螢火蟲臀部的橫切面。箭頭所指的灰黑色圓圈為氣管結構。圖片中比例尺為 100 微米。D：背部；V：腹部；P：臀部；L：發光器。(d)邊褐端黑螢之三維氣管系統影像。以 10 倍物鏡拍攝之 X 光三維影像橫切面圖（體積為 $0.8 \times 0.8 \times 0.6$ 立方毫米），清楚顯示氣管直徑小於 700 奈米。(e-f)邊褐端黑螢之穿透式 X 光顯微術影像。圖片中比例尺分為 10 微米(e)及 2 微米(f)。微氣管(箭頭所指)的分支都是成對出現。

的整體效率。

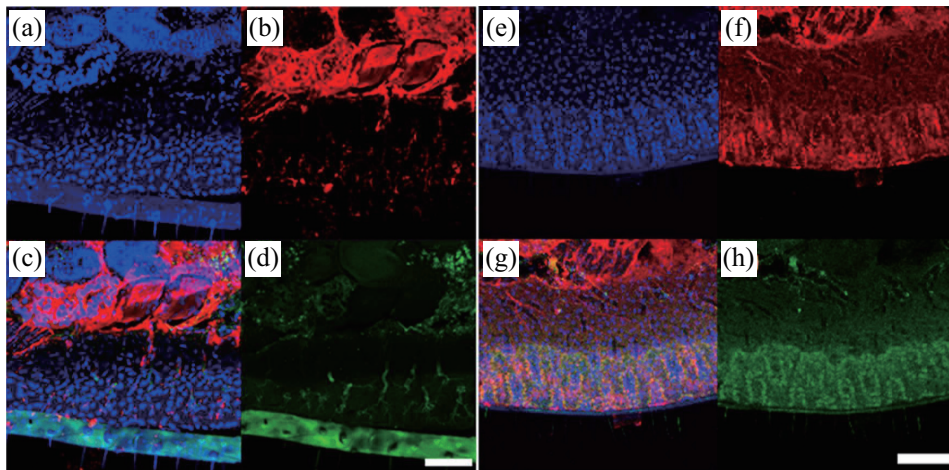
利用量測所得螢火蟲發光器氣管面積，結合亨利定律，並以大氣中氧分壓作為極端條件($p = 21$ kPa)，可以得到極端條件下邊褐端黑螢與黑翅螢的氧氣流量(k_L)分別為 88.2 與 73.5 pmol/s (圖二)，而若是利用較符合實際生理條件的螢火蟲翅膀肌肉裡氣管與粒腺體之間的氧分壓作為參數，可以得到邊褐端黑螢與黑翅螢的氧氣流量(k_L)分別為 21.0 pmol/s 與 17.5 pmol/s。針對邊褐端黑螢，維持其粒線體功能以及螢光發光的氧氣消耗速率分別為 127 pmol/s 以及 18.6 pmol/s (圖二)，因此氣管內氧氣流量不足以維持完整的粒線體功能，而僅與螢光發光的需氧量相當。因此，如同前述所提的推測，由正常粒線體活動至生物螢光間的氧氣供應轉換是必須的。同樣的，黑翅螢的氧氣擴散速率上限為 17.5 pmol/s，亦不足以供應粒線體與螢光發光的氧氣消耗速率：分別為 66.3 pmol/s 與 11.0 pmol/s (圖二)，因此結論如同邊褐端黑螢之推論：氧氣供應轉換機制是必須的。

承上述分析結果，螢火蟲發光的能量消耗相較於其他生理活動是較為少量的，邊褐端黑螢僅需 $2 \text{ nmolO}_2/\text{g body/s}$ 以及少於 $3 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ 的氣管面積對組織體積比，即可維持發光器的運作。



圖二 估算氧氣由微氣管到組織的擴散速率(pmol/s)。紅、藍、綠曲線分別代表不同的 k_L 值； k_L 值分別為 1.0×10^{-4} 、 2.0×10^{-4} 及 3.0×10^{-4} m/s。實線及虛線分別代表邊褐端黑螢及黑翅螢。

基於已確認之螢光持續的時間與粒線體之關聯，可以證實在正常代謝狀況時，粒線體將消耗所有氣管系統所提供之氧氣，完全阻隔氧氣進入發光細胞中的發光系統[6]。



圖三 臺灣窗螢發光器氣管與其他細胞組織的分布關係(a-d)。發光器中細胞核分布(a)、神經(b)與氣管(d)的分布。神經(b)(紅色)與氣管(d)(綠色)皆由反光層延伸進入發光層，神經末梢顆粒聚集於微氣管附近(c)；邊褐端黑螢發光器氣管與其他細胞組織的分布關係(e-h)。發光器中神經(f)與氣管(h)的分布，神經(f)(紅色)由反光層延伸進入發光層，同樣的氣管(h)(綠色)垂直的由反光層延伸至發光層，分支後的神經末梢顆粒大量分布於發光層的氣管周圍(g)。發光器中氣管與細胞的分布(g)在發光層的緊靠氣管(綠色)周圍有大量的細胞核(藍色)聚集，其餘的細胞則分散於氣管之間。圖片中比例尺為 100 微米。

在早期研究螢火蟲的文獻就已經有兩個基本的概念被提出：神經衝動可以啟動螢光和螢光反應的過程，同時氧氣是不可或缺的重要因子[12]，上述實驗結果推論也與這些概念符合。過去所提出發光機制的啟動與神經衝動有密不可分的關係[5, 13, 14]，我們也合理推測神經與氣管的分布對螢光發光具有關聯性。為進一步了解神經與氣管在發光器的分布情形，在過去的螢火蟲相關研究中，用來觀察螢火蟲發光器顯微結構的儀器只有一般光學顯微鏡、掃描式電子顯微鏡以及穿透式電子顯微鏡，但對於欲觀察的特定蛋白卻無法明確指出。

我們以免疫學的方式生產足以辨認邊褐端黑螢及臺灣窗螢發光器中神經與氣管上的特定蛋白質[15, 16]，並以西方點墨法確認其專一性。此抗體讓我們能夠觀察螢火蟲發光器中神經與氣管之分布情形。在型態學的觀察上，這兩個種類的螢火蟲其氣管和神經分布有很明顯的不同；但仔細觀察下，可發現其中的相同處，如圖所示這些神經幾乎是沿著氣管走向而延伸(圖三(c)、(g))。邊褐端黑螢神經延伸至發光層時，在氣管旁的神經分支末端有明顯顆粒(圖三(f)、(g))，而臺灣窗螢的神經顆粒小且散亂於微氣管附近(圖

三(b)、(c))。然而抗體所染的位置與 DAPI 所染的細胞核並無重疊(圖三(a)、(c)及(e)、(g))，所以我們推測其並非神經元細胞本體，而是神經末梢。

之前探討昆蟲的氣管時，總是與肌肉聯想在一起[17, 18]，認為昆蟲完成氣管換氣的機制為直接經由氣管和氣囊進行呼吸作用所成，同時昆蟲體內各部肌肉和器官的運動及胸部形變也可促進氣管換氣。然而螢火蟲發光器中的氣管，似乎是個例外。經 X 光及免疫染色結果顯示發光器雖然有大量豐富的氣管分布以供應發光所需之氣體，卻沒有發現肌肉的蹤跡，而我們觀察到不論是在邊褐端黑螢或是臺灣窗螢其神經是沿著氣管的走向分布。另外針對神經末端的顆粒，我們發現到其與微氣管有很密切的關係，而微氣管便是供應組織或細胞氧氣位置之所在。根據過去的文獻以及所觀察到的情況推斷，神經末梢似乎是控制螢光發光的關鍵，神經衝動確實與啟動螢光有直接的關係。我們推測神經末梢可直接與氣管系統的微氣管連接以進行氣體調節而非經由肌肉所控制。

過去針對同一種類螢火蟲閃爍的成蟲與不閃爍的幼蟲所做的生理構造之比較，閃爍的

Photuris 成蟲發光器的發光層中，氣管末端構造脆弱，外圍由特化的氣管終端細胞包圍，該特化的氣管終端細胞是神經衝動傳導的標的，進一步控制氧氣進出發光組織[13]；在同樣會閃爍的邊褐端黑螢的發光層中，雖然我們無法藉由免疫螢光染色染出這個特化細胞及氣管末端的分布，但我們藉由 DAPI 染色，發現到在發光層氣管旁有細胞核密集聚集的現象，因為該細胞核並無與染神經細胞的抗體所染的顆粒重疊，所以我們可以確定這些細胞核並非神經元細胞本體，同時我們經由 X 光顯微影像術所建構的三維影像計算這些密集分布在氣管周圍的細胞核，發現其平均數量約 50 個/垂直氣管(vertical trachea)，由於每根分支氣管通過特化的氣管終端細胞後便分支成兩支微氣管，此數量大致符合過去由穿透式 X 光顯微鏡拍攝發光層中的微氣管數量：每根長度約 100 μ m 的垂直氣管大約包含 110 支微氣管，因此，我們推測這些在氣管旁的密集細胞核可能是特化的氣管終端細胞。

綜合上述結果，我們推論出螢火蟲螢光發光的控制需藉由粒線體的鈍化來達成，例如藉由一氧化氮合酶(NOS)受到神經系統刺激產生快速擴散的一氧化氮以鈍化粒線體來造成發光系統可以得到足夠的氧氣供而產生發出螢光。一氧化氮與粒線體的生化結合極為短暫，一氧化氮消逝而粒線體消耗氧氣速率高於氧氣從氣管系統到發光細胞的擴散速率時，螢光素將會因為缺乏氧氣而逐漸回復穩態，並終止發光反應。此種間歇性的氧氣供給，也就是造成調控螢光閃爍現象的主要機制。

參考文獻

- [1] M. A. Branham, J. W. Wenzel. *Cladistics*. 19, 1 (2003).
- [2] J. F. Anal Biochem Cladistics-the International Journal of the Willi Hennig Society Cladistics-the International Journal of the Willi Hennig Society Eur Radiol Case. *Integr Comp Biol*. 44, 250 (2004).
- [3] L. P. da Silva, J. C. G. E. da Silva. *Chemphyschem*. 13, 2257 (2012).
- [4] I. Presiado, Y. Erez, R. Simkovitch, S. Shomer, R. Gepshtein, L. P. da Silva, J. C. G. E. da Silva, D. Huppert. *J. Phys. Chem. A.*, 116, 10770 (2012).
- [5] J. R. Aprille, C. J. Lagace, J. Modica-Napolitano, B. A. Trimmer. *Integr. Comp. Biol.*, 44, 213 (2004).
- [6] B. A. Trimmer, J. R. Aprille, D. M. Dudzinski, C. J. Lagace, S. M. Lewis, T. Michel, S. Qazi, R. M. Zayas. *Science.*, 292, 2486 (2001).
- [7] C. H. Hanna, T. A. Hopkins, J. Buck. *J. Ultrastruct. Res.*, 57, 150 (1976).
- [8] T. N. Lo, Y. T. Chen, C. W. Chiu, C. J. Liu, S. R. Wu, I. K. Lin, C. I. Su, W. D. Chang, Y. Hwu, B. Y. Shew, C. C. Chiang, J. H. Je, G. Margaritondo. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 40, 3172 (2007).
- [9] Y. S. Chu, J. M. Yi, F. De Carlo, Q. Shen, W. K. Lee, H. J. Wu, C. L. Wang, J. Y. Wang, C. J. Liu, C. H. Wang, S. R. Wu, C. C. Chien, Y. Hwu, A. Tkachuk, W. Yun, M. Feser, K. S. Liang, C. S. Yang, J. H. Je, G. Margaritondo. *Appl. Phys. Lett.*, 92 (2008).
- [10] M. K. Peterson, J. Buck. *Biol. Bull.*, 135, 335 (1968).
- [11] R. Meuli, Y. Hwu, J. H. Je, G. Margaritondo. *Eur. Radiol.*, 14, 1550 (2004).
- [12] J. W. Hastings, J. Buck. *Zoological Bulletin*. 111, 13 (1956).
- [13] H. Ghiradella, J. T. Schmidt. *Integr Comp Biol*. 44, 203 (2004).
- [14] G. S. Timmins, F. J. Robb, C. M. Wilmot, S. K. Jackson, H. M. Swartz. *The Journal of experimental biology*. 204, 2795 (2001).
- [15] T. Ikeya, S. Hayashi. *Development*. 126, 4455 (1999).
- [16] R. Loesel, S. Weigel, P. Braunig. *J. Neurosci. Methods.*, 155, 202 (2006).
- [17] H. J. F. Amer. *Zool.*, 37, 9 (1997).
- [18] T. Weis-Fogh. *The Journal of experimental biology*. 47, 561 (1967).