

知識天地

輕羅小扇撲流螢：解密螢光

胡宇光研究員（物理研究所）

摘要

螢火蟲發光時氧氣供應的生化機制最近才被解開，但其物理機制仍不清楚，主因為螢火蟲發光器裡氣管系統結構複雜、微小且不易觀察。我們藉由同步輻射相位差斷層掃描系統及穿透式X光顯微鏡獲取發光器裡氣管的構造，經計算發現粒線體作用消耗的氧氣大於由氣管擴散到發光細胞的氧氣。同時藉由共軛焦螢光顯微鏡觀察氣管與神經的分布關係，由影像分析得知，發光作用消耗了絕大部分進入發光細胞的氧氣，而發光的作用機制需藉由神經調控以獲取氧氣。

本文

幾千年以來，神秘的螢火蟲自發螢光現象，吸引不少科學家的關注，藉由各種實驗方法，想一窺究竟；目前，螢光蛋白及酵素也已被分離、萃取、合成，並產生了大量的應用。但是不同於其他可以自發產生螢光之生物體，螢火蟲可以控制螢光的發光，進而利用螢光的閃爍，達到群體聯繫、溝通及求偶的目的。

當螢火蟲發光時，其發光器內複雜的氣管系統藉由與氣孔與外界直接連結，利用擴散方式，氣體經微小的氣管，將氧氣運送到螢火蟲發光器的發光細胞中，並利用發光細胞裡的螢光酵素將螢光素及氧氣結合，使得螢光素因為氧化而發出螢光。並且在氧氣消耗殆盡之後再度回覆穩態。螢火蟲螢光閃爍的調控機制於最近幾年被提出，普遍認為一氧化氮與粒線體是重要的關鍵，為細胞層級開關的角色。現今螢火蟲閃爍機制的主要有兩大推論：1、螢火蟲的氣管系統有很高的氧氣供應效率，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；2、螢火蟲在發光前須先抑制粒線體消耗氧氣能力，如此一來，才有足夠的氧氣提供給發光細胞進而產生螢光反應。要釐清這兩種推論需先了解氣管系統的供氧效率。因為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這件事；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。

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。我們藉由同步輻射X光顯微成像之高穿透力及三維奈米的解析度，成功拍攝螢火蟲發光器完整的三維顯微成像，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。得益於折射率在氣管系統與空氣間的巨大差距，我們利用相位差異顯微術及斷層掃描術取得之邊褐端黑螢尾端（圖一(a)）發光器之影像（圖一(b)、(c)）。同時藉由X光相位差異、斷層攝影術取像暨影像重組（圖一(d)），另結合高解析度穿透X光顯微術影像（圖一(e)、(f)）將螢火蟲發光器中氣管系統經過量測並數值化分析，如此便可精確地計算出氧氣到達發光細胞的流量，並憑藉精準測量螢光的能量消耗，評估氧氣提供螢光發光的整體效率。

利用量測所得的參數結合亨利定律，並以大氣中氧分壓作為極端條件（ $p = 21 \text{ kPa}$ ），可以得到極端條件下邊褐端黑螢與黑翅螢的氧氣流量（ kL ）分別為88.2與73.5 pmol/s ，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（ kL ）分別為21.0 pmol/s 與17.5 pmol/s 。針對邊褐端黑螢，維持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 ，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，由正常粒腺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 ，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。基於已確認之螢光持續的時間與粒線體的關聯，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。

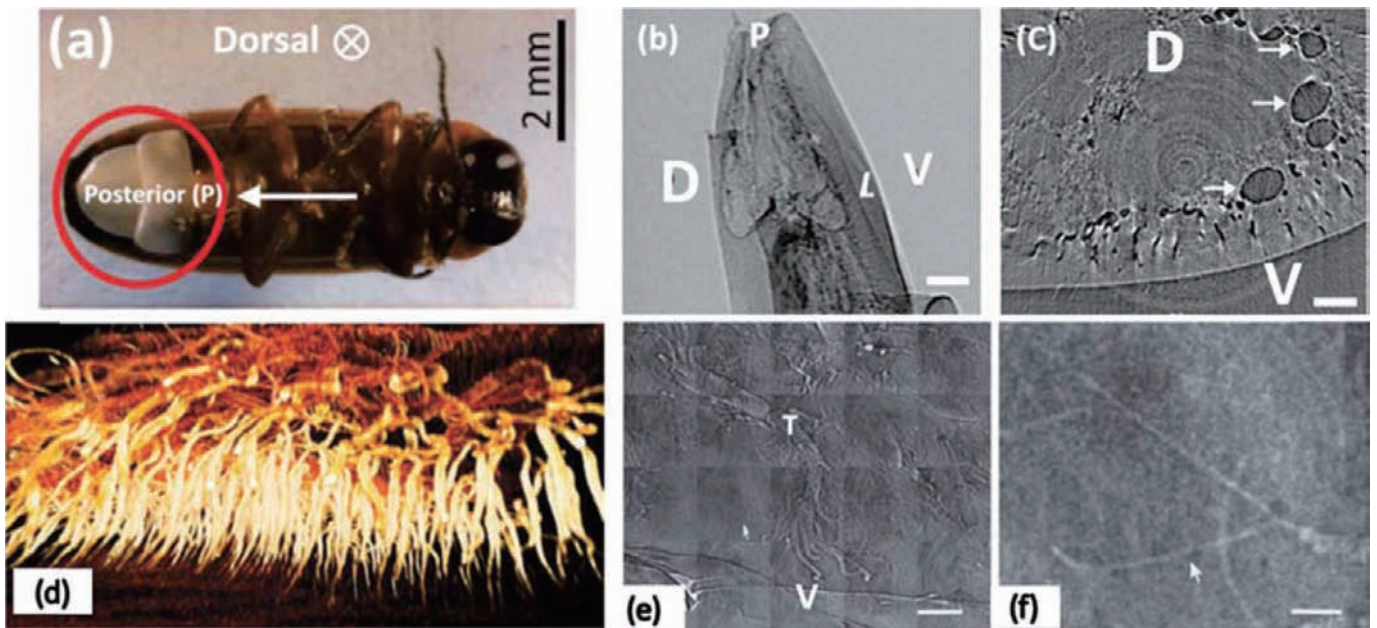
在早期研究螢火蟲的文獻就已經有兩個基本的概念被提出：神經衝動可以啟動螢光和螢光反應的過程，同時氧氣是不可或缺的重要因子，上述實驗結果推論也符合這些概念。過去所提出發光機制的啟動與神經衝動有密不可分的關係，我們也合理推測神經與氣管的分布對螢光發光具有關聯性，因此我們進一步想了解神經與氣管在發光器的分布情形。在過去的螢火蟲相關研究中，所使用來觀察螢火蟲發光器顯微結構的儀器只有一般光學顯微鏡、掃描式電子顯微鏡以及穿透式電子顯微鏡，這些顯微鏡提供了無數精細的超微結構圖片，卻對於所欲觀察的特定細胞或組織無法一目了然，所拍出的圖片僅提供一個宏觀的觀察，將視野下所有的細胞或組織通通納入其中，但是只單憑提升空間上的解析度，並無法從觀測的樣品中獲得足夠的資訊。以目前顯微鏡技術發展來說，在生物樣品觀測方面，以免疫螢光染色法處理樣品，並使用雷射掃描式共軛焦螢光顯微鏡觀察，其原理是利用抗體可辨認特定蛋白質之特性，觀察特定細胞在組織上的分布。

我們利用西方墨點法找出具有專一性的抗體，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，讓我們能夠觀察螢火蟲發光器中神經與氣管之分布情形。雖然在型態分布的觀察上，乍看之下兩個種類的螢火蟲氣管和神經分布有很明顯的不同；但仔細觀察，便可發現其中的相同之處，神經幾乎是沿著氣管走向延伸（圖二(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（圖二(f)、(g)），而臺灣窗螢的神經顆粒小且散亂於微氣管附近（圖二(b)、(c)）。由於抗體所染的顆粒並無法與DAPI所染的細胞核重疊（圖二(c)、(g)），所以我們推測其並非神經元細胞本體，而是神經末梢。

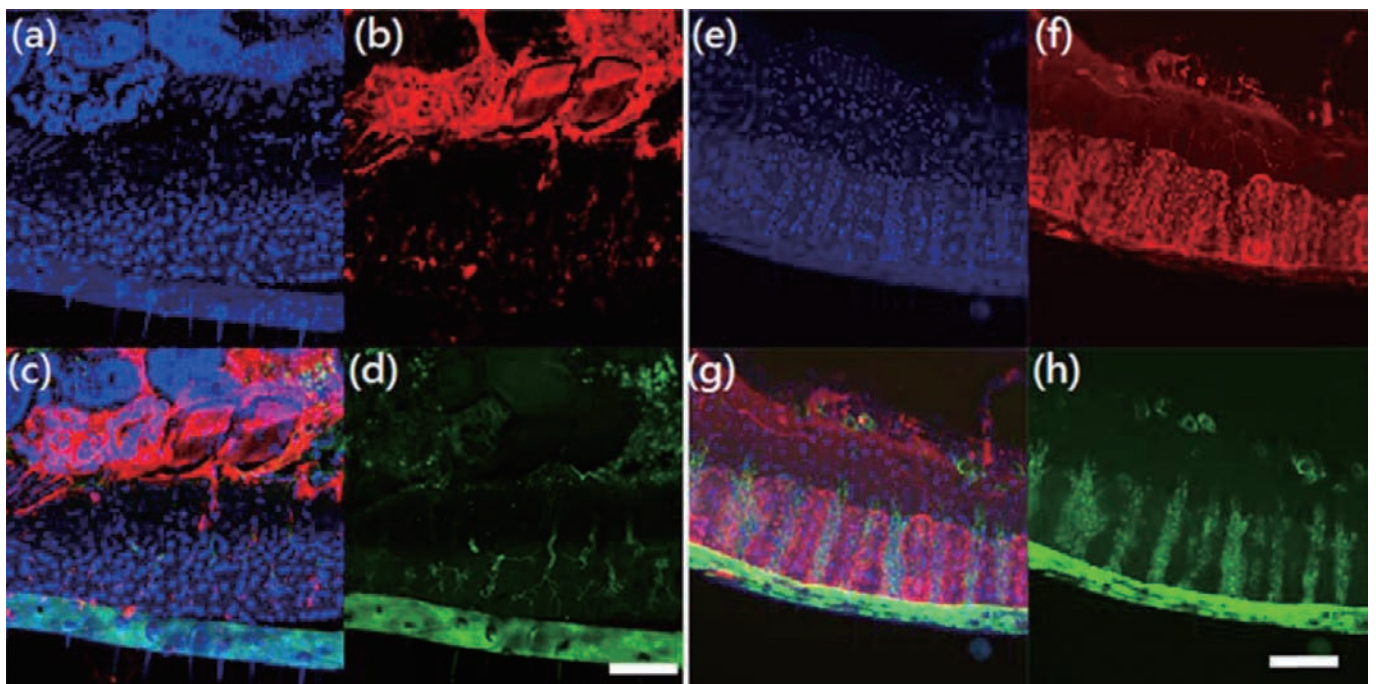
在過去探討昆蟲的氣管時，總是與肌肉聯想在一起。昆蟲完成氣管換氣的機制為直接經由氣管和氣囊進行呼吸作用所成，間接則是由昆蟲體內各部肌肉和器官的運動，因胸部形變也可促進氣管換氣；但就螢火蟲發光器中的氣管而言，似乎是個例外。在實驗結果我們觀察發光器雖然有大量豐富的氣管分布以供應發光所需之氣體，卻沒有發現肌肉的蹤跡，而我們卻觀察到沿著氣管的走向有神經的分布，不論是在邊褐端黑螢或是臺灣窗螢，另外針對神經末端的顆粒，我們發現到其與微氣管有很密切的關係，而微氣管便是供應組織或細胞氧氣位置之所在。根據過去的文獻以及所觀察到的情況推斷，神經末梢似乎是控制螢光發光的關鍵，神經衝動確實與啟動螢光有直接的關係。神經末梢直接與氣管系統的微氣管連接以進行氣體的調節而非經由肌肉控制，是我們在這個實驗結果中發現到最特別之處。

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，在顯微觀察研究裡，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；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，因為該細胞核與神經細胞抗體所染的顆粒沒有重疊（圖二(g)），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 $\sim 100 \mu\text{m}$ 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鈍化粒線體，來造成發光系統可以得到足夠的氧氣供應而產生螢光。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。



圖一：(a)白色部分為邊褐端黑螢發光器的位置，並標示X光影像取像的方向性。(b)相位差異投影之發光器內部結構。圖片中比例尺為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光三維重建影像橫切面圖（體積為0.8 x 0.8 x 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。



圖二：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。