

学位論文の要約

題目 Response of Nitrogen-Fixing Filamentous Cyanobacteria to Environmental Changes Analyzed by a Parallelized Near Infrared Excitation Spontaneous Raman Scattering Spectral Microscope

(並列型近赤外励起自発ラマン散乱スペクトル顕微鏡を用いた窒素固定型糸状性シアノバクテリア細胞内外の環境応答色素組成変化の究明)

氏名 玉水 公人

序論

シアノバクテリアは地球上で初めて酸素発生型光合成を行った生物であり、その光合成メカニズムは植物や藻類の葉緑体と基本的に同じである。単離された光合成色素タンパク質複合体の構造や *in vitro* での機能解明などは進んでいるが、それらの理解が細胞中における機能の理解と完全につながっているとはいえない。特に、一部の多細胞性シアノバクテリアは周辺環境に応答して個々の細胞で異なる機能を発現する（細胞分化）。このような試料において、細胞分別や抽出処理を行うと細胞間の位置関係を見失うだけでなく、抽出による分子集合体、生体膜高次構造などの性質変化の可能性も考えられる。このため、細胞内部及び細胞間の本来的な位置関係を保存したままで、細胞内部の光合成色素タンパク質の性質や細胞内外の代謝産物の化学的状態を識別できる分光顕微鏡が必要である。

目的

本研究の生物学的な目的は糸状性シアノバクテリアの細胞分化と環境応答の描像を細胞レベルで正確に獲得することである。そして、そのために有効な顕微分光法手法の開発が技術的な目的でもある。細胞内外で機能する色素や色素タンパク質をスペクトル画像化し、それらのスペクトル情報を細胞外で制御された化学環境の色素や色素タンパク質のスペクトル情報と比較することで、人工的環境と生理的環境の違いを知り得る事も期待される。この目的に沿って、近赤外励起ラマン散乱スペクトル顕微鏡の開発に取り組んだ。

開発

ラマン散乱は高い分子識別力を有するが、特に光合成生物の光合成膜に普遍的に含まれるカロテノイドを敏感に検知する。カロテノイドの蛍光は極微弱であるため、蛍光顕

顕微鏡では得られる情報が少ない。また、シアノバクテリアで重要な光捕集系に組み込まれているフィコビリ色素もラマン散乱で検知できるので、カロテノイドの情報と合わせると光合成膜の機能変化を敏感に捉えることができる。そして、光合成色素以外の代謝産物をシアノバクテリア細胞内外で画像化し、それらの細胞内外における化学的狀態を識別することも期待される。光合成生物に対してもラマン散乱分光は従来も利用されてきたが、細胞レベルの画像化が行われた例は非常に少なく、さらに、光合成膜の情報を得た例はさらに限定されている。蛍光分光顕微鏡（蛍光スペクトル、蛍光励起スペクトル、蛍光寿命画像化顕微鏡）の適用例に比べてラマン散乱顕微鏡の利用が圧倒的に少ないことは間違いない。

現在、ラマン散乱の微弱な信号による測定速度を改善するためにコヒーレントアンチストークスラマン散乱（CARS）顕微鏡や誘導ラマン散乱（SRS）顕微鏡などが活発に研究されている。しかし、これらの顕微鏡では高価なレーザー光源が必要である上に、同時検出できる分子振動周波数領域が限定されやすいといった欠点も存在している。一方で自発ラマン散乱は測定速度こそ遅いが、簡便に分子振動周波数の広帯域を同時検出可能であり、ラマンスペクトルが未知である生体分子を探索することもできる。そのため、自発ラマン散乱スペクトル顕微鏡の測定速度を並列化によって向上することができれば十分競争力を有することができると考えられる。測定速度を大幅に向上させるために、焦点面で直線状に成型した励起光による並列励起と 2 次元検出器とイメージング分光器による並列検出によって単一焦点毎スペクトル取得に比べて約 38 倍の高速化を達成した。

本研究では自家発光を極限まで抑えることができる連続発振の近赤外レーザー光(976nm または 1064 nm)を励起源として採用した。また、近赤外光は細胞への損傷度合が低く、植物のように可視光線色素が豊富な試料においても内部に低損失で到達できる。散乱信号光も近赤外領域にあるため、奥深くからの信号を捉えることも比較的容易になる。

遺伝学的に遠隔な 2 種類の糸状性シアノバクテリアの細胞分化

976 nm 励起一点走査型自発ラマン散乱スペクトル顕微鏡を用いて、細胞が連結した糸状性シアノバクテリア、*Anabaena valiiabilis* と *Rivularia IAM m-261* を測定した。これらでは、固定窒素栄養が枯渇した環境下において、一部の細胞が、大気中の窒素ガスから窒素栄養源を生産できる窒素固定細胞（ヘテロシスト）に細胞分化する。ヘテロシスト分化に伴って細胞内の光合成色素組成も変化する。ヘテロシスト（Het）及びヘテロシストに最も近い栄養細胞（Veg1）と 2 番目に近い栄養細胞（Veg2）の 3 細胞をイメージング測定し、その光合成色素量を評価した。この測定から 976 nm 近赤外励起のラマン散乱信号においては、カロテノイド、フィコビリ色素を十分検出できたが、クロロフィル由来の信号が微弱であった。しかし、同時に広い波長範囲（1017 ~ 1175 nm）にわたって自家発光が確認され、これをクロロフ

イルに帰属することができた。得られたスペクトルから細胞単位の光合成色素量を評価した。同一細胞内における光合成色素相関から *Rivurialia* の Het が 2 つのグループに分けられ、栄養細胞からヘテロシストへの段階的な変化が強く示唆された。また細胞間における光合成色素量相関では、*Anabaena* では Het-Veg2 間だけでなく、Veg1-Veg2 間にも有意な差が見つかった。Veg1 は Het が寿命を迎えた時に次のヘテロシストになるので、従来のヘテロシストが老化し細胞死が近づく以前から、Veg1 は既にヘテロシスト分化の準備段階にある可能性が示唆された。

Rivurialia の紫外線吸収色素スキトネミンの酸化還元とヘテロシスト分化

顕微鏡の測定高速化によってより広範囲の空間分布測定や焦点位置を変えた測定が容易になった。*Rivurialia* は紫外線や乾燥ストレスに対して多糖で形成された細胞外鞘を形成し、そこに紫外線吸収色素を蓄積することで内部の細胞を保護する防御機構を有している。特にシアノバクテリア特有の紫外線吸収色素スキトネミンは薬効作用の可能性から美容・医薬品業界から注目されている。スキトネミンはシアノバクテリアのみで見られる分子であり、20 数億年前の酸素大発生の前後から生合成が始まったと考えられている分子である。光合成生物の進化、シアノバクテリアの高い環境適応力を理解する観点からも重要である。スキトネミンには酸化型と還元型の 2 状態が存在し、通常は大気酸素によって酸化型 (OxScy) で存在していることが分かっている。

紫外線ストレスの有無、同一寒天培地における培養期間の長短、窒素飢餓ストレスの有無の複数条件で *Rivurialia* を培養し、細胞外鞘の有無にかかわらず測定を行った。高速化により 100 を超える細胞連結体 (フィラメント) の複数断面を分光撮像した。OxScy を含有する細胞外鞘を形成した一部のサンプルで未報告のラマンバンドを検出した。*Nostoc commune* 由来の固体粉末スキトネミンの酸化還元変化のラマン散乱測定、および量子化学的基準振動解析から、この未知成分は還元型スキトネミン (ReScy) に帰属された。ReScy を生体中で精密に画像化し、その実測ラマンスペクトルを報告したのは本研究が世界で初めてである。ReScy の存在分布をサブ細胞レベルで画像化できたのは、広い分子周波数範囲を一括測定できる我々の顕微鏡だからこそその成果である。

また、ReScy を検出した培養条件を分析すると、ReScy 蓄積はストレス印加時間と共に単調増加するわけではなかった。ReScy が検出されたフィラメントでは、ヘテロシスト分化が未成熟になりやすい傾向が統計的に示唆された。また、OxScy、ReScy の立体分布等に基づいて、スキトネミンの分泌箇所を細胞間接合部の近傍であると推定した。

考察・結論

高速走査可能な並列型近赤外励起自発ラマン散乱スペクトル顕微鏡を開発し、ヘテロシスト形成型糸状性シアノバクテリアの細胞分化と環境応答を分析した。その高い分子識別力や定量性によって、蛍光顕微鏡や吸収顕微鏡では観測できていなかった、ヘテロシストに最近接な栄養細胞とそれ以外の栄養細胞の光合成色素量の違いが認知された。リブラリアにおいては、成熟度の異なるヘテロシストをの明確に識別した。異種間のヘテロシストの違いの認知にも成功した。高速化によってより多くのサンプルをより広範囲で測定できるようになり、生体中の還元型スキトネミンを観測し、スキトネミン酸化還元変化とヘテロシスト分化との相関も報告した。また、その強度分布からスキトネミンの分泌モデルを提案した。