

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 理 学 )	氏名	玉水 公人
論文題目	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)		
(論文内容の要旨)			
<p>多数の細胞が連結して生育する糸状性シアノバクテリアでは細胞毎に異なる生理機能を発現する場合がある。例えば、固定窒素欠乏環境では一部の細胞だけが空気中の窒素分子を還元できるヘテロシスト (異形細胞) となり、他の酸素発生型光合成を行う細胞 (栄養細胞) と分業を行う。また紫外線が強い環境ではUVA吸収色素を細胞外鞘部分に蓄積し細胞内部を守る。高度な多細胞連携を行う糸状性シアノバクテリアの生理状態を細胞個別に正確に理解する方法論を洗練することは生物学のみならず微小空間を扱う物理化学にも重要である。従来、蛍光分光画像法や吸収分光画像法で多くの知見が得られてきたが、光合成膜のカロテノイドや細胞外鞘の紫外線吸収色素は極微蛍光性のため、微小領域での観察例が乏しい。本論文では、シアノバクテリアのみならず高等植物等の奥行きのある光合成生物にも通用すると期待される近赤外光 (976nm または1064nm) を励起波長とする自発ラマン散乱スペクトル顕微鏡を独自の設計で構築した。これを糸状性シアノバクテリア (<i>Anabaena variabilis</i> と <i>Rivularia</i> IAM M-26 1) に対して適用し、極微蛍光性分子を通じて幾つかの新知見を得た。</p> <p>アナベナはモデル生物の一つであり、そのヘテロシスト分化には多くの知見がある。一方、リブラリアは、アナベナと遺伝学的に遠隔であり、既報の蛍光分光・吸収分光顕微鏡を用いた研究において、両者のヘテロシストで残留する光化学系Iの光捕集能力には明確な違いが認められている。本研究は、既報研究のアナベナとリブラリアの差異を再確認した上に、カロテノイドとフィコビリンのラマン散乱およびクロロフィルが示す発光を同時に分析し、隣接細胞間の比較も行った。その結果、リブラリアのヘテロシストが光合成膜の性質が明確に異なる2つの集団に分かれる事を示した。この二極化とも言うべき現象は過去のヘテロシスト研究では全く報告されておらず、片方の状態から他方の状態へ素早く細胞の性質が遷移することが示唆された。また、ヘテロシストに最近接な栄養細胞の性質が、それ以外の栄養細胞の性質と異なり、ヘテロシスト分化の準備状態であることを示唆することができた。</p> <p>励起レーザーを線状に広げ、線状領域内の全点のラマン散乱スペクトルをInGaAsカメラの一度の撮像で得る顕微鏡を開発し、1点毎走査に比べ38倍の走査速度の増大を実現した。全スペクトル (750 - 1750 <math>\text{cm}^{-1}</math>, およそ1.6<math>\text{cm}^{-1}</math>毎) 同時取得で1画素当たり53msという走査速度は同等試料に非線形ラマン散乱顕微鏡の用いた報告例にも劣らない。これを用いて130本の細胞連結体のラマン散乱スペクトル撮像を行った。特に乾燥または紫外線照射で誘導される紫外線色素 (スキトネミン) を分析した結果、スキトネミンの還元型と酸化型、およびカロテノイド、フィコビリンを同時に撮像することに成功した。その結果、還元型スキトネミンが出現するフィラメントではヘテロシスト分化が進んでいないと言う相関関係を見出した。この相関関係を説明する分子機構は未解明だが、細胞内外の酸化還元レベルと細胞分化の関わりを見出した全く前例の無い知見であり、今後の糸状性シアノバクテリアの細胞分化と細胞内外酸化還元反応の研究に重要な示唆を与えると期待される。</p>			

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

研究目的と背景を述べた第一章の後、第二章では、装置開発の第一段階として976nm連続発振レーザーを用いた一点毎走査型のラマン散乱スペクトル顕微鏡の詳細、およびそれを用いた成果が記述されている。光合成膜の非蛍光性分子であるカロテノイドとフィコビリリン（後者は蛍光でも検出可能）が識別され、この2つの信号を基にヘテロシスト細胞分化の程度が判断可能であることが2種類のヘテロシスト形成型シアノバクテリア（リブラリアとアナベナ）で示された。一方、クロロフィルのラマン散乱は非常に微弱であったが、その代わりにクロロフィル由来の発光が他分子のラマン散乱検出を妨害しない程度の強度で観測され、その発光の一部が多光子励起による可能性が強度依存性から示された。このクロロフィル発光とカロテノイドまたはフィコビリリンのラマン散乱との相関を見ることで、リブラリアではヘテロシストが明確に2つの細胞生理状態に区別された。片方は栄養細胞と似た光合成膜を有し、他方は栄養細胞とは異なる性質を示しているため、前者は系Iと系IIの比率を栄養細胞に近い割合で維持し、後者は系Iに対して大幅な系IIの減少が起きていると考えられる。これはヘテロシスト分化の生物種による多様性が直接示された希少例であろう。

第三章では、微弱なラマン散乱を高速に広い空間から収集するために光学系の並列化を行った装置開発について記述されている。一点毎走査方式に比べ、38倍という高速化は高解像度で広い空間領域を分析するために重要な進歩であり、その結果として、リブラリアが紫外線や乾燥のストレスによって蓄積するスキトネミンという色素について、比較的稀にしか観測されない還元型スキトネミンが発現する細胞連結体の観測例を報告している。既報の研究が無い還元型スキトネミンのラマン散乱であることを確認するため、固体粉末のスキトネミンの化学的酸化還元を行った場合のラマン散乱スペクトルを計測し、さらに共同研究者による基準振動解析の結果も利用している。新たに検出された分子種は還元型スキトネミンであり、その前駆体である単量体型スキトネミンではないことが確認された。

第四章では、還元型スキトネミンの蓄積を高感度で客観的に判定するスペクトル基準が提案された。これを利用して、スキトネミンの還元型と酸化型の両方が検出されるリブラリア細胞連結体10例と還元型が検出されないが酸化型スキトネミンが検出される80例、およびスキトネミンが検出されない40例に関する結果を総合し、UVA照射時間と培養寒天の乾燥度に対する還元型スキトネミンが出現の環境依存性を可視化した。そして、還元型スキトネミンが検出される細胞連結体ではヘテロシスト分化が進み難いという法則性を見出している。さらに、フィコビリリンと還元型スキトネミンのラマン散乱が空間的に混ざりにくい3次元画像から、還元型スキトネミンが蓄積しやすい箇所として細胞間接合部のペリプラズム空間が示唆された。

本論文は、非蛍光性分子の複数種類を識別し高速に画像化できる近赤外励起自発ラマン散乱スペクトル顕微鏡の独自の開発を行い、それを的確に利用して糸状性シアノバクテリアの細胞分化と環境応答の詳細な生物分子科学的知見を提供している。分子分光學と顕微光學にも顕著な貢献をしている。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和6年1月17日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降