

粘着鞘に囲まれた *Synechococcus* sp. の 3 次元微細構造観察3D-observation of microstructures of *Synechococcus* sp. with extracellular polysaccharide using soft X-ray microscopy竹本邦子<sup>a</sup>, 吉村真史<sup>b</sup>, 難波秀利<sup>c</sup>, 木原 裕<sup>b</sup>  
Kuniko Takemoto<sup>a</sup>, Masashi Yoshimura<sup>b</sup>, Hidetosi Namba<sup>c</sup>, Hiroshi Kihara<sup>b</sup><sup>a</sup> 関西医科大学, <sup>b</sup> 立命館大学 SR センター, <sup>c</sup> 立命館大学理工学部<sup>a</sup>Kansai Medical University, <sup>b</sup>The SR Center, Ritsumeikan University, <sup>c</sup> Ritsumeikan University

琵琶湖生息し、細胞外に粘質物（細胞外多糖）を持つ微細シアノバクテリア *Synechococcus* sp. を軟 X 線顕微鏡で CT 法を用い観察し、3 次元像の取得を目指した。細胞懸濁液をガラスキャピラリーに封入し、-85°C で凍結することで試料固定を行い、桿菌状の *Synechococcus* sp. の 3 次元ボリュームレンダリング像を得ることができた。

Soft X-ray microscopy (XM) is an imaging modality also known as micro-computed tomography ( $\mu$ -CT). The XM was applied to obtain 3D image of a small cyanobacterium with extracellular polysaccharide, *Synechococcus* sp. Cryo-fixed cell suspension was observed by the XM in cryo-mode at a wavelength of 2.3 nm and -85°C. Three-dimensional images were obtained by a reconstruction algorithm and a volume rendering method. Several short-rod-shaped cells were observed on the inner surface of the glass capillary.

**Keywords:** *Synechococcus* sp., extracellular polysaccharide, soft X-ray microscopy,  $\mu$ -CT

**背景と研究目的:** 琵琶湖では、生物化学的酸素要求量(BOD)が減少傾向を示すのに対し、化学的酸素要求量(COD)は漸増傾向を示すという「BOD と COD の乖離現象」が続いている[1]。この結果は、生物によって分解され難い有機物（難分解性有機物）が増加していることを示しており、この難分解性有機物の発生源の一つとして注目されているのがシアノバクテリアの周囲を取り囲む透明な粘質物（細胞外多糖, EPS: extracellular polysaccharide)である。特に、細胞径が 0.2~2 $\mu$ m 以下の微細なシアノバクテリアでは、細胞径が数 $\mu$ m 以上の大きなシアノバクテリアで行われている「墨汁を流し込み寒天状物質を白く浮き上がらせ、光学顕微鏡で観察する」方法を適応することができないので、EPS の量的な把握が困難となっている。

我々は、光学顕微鏡より分解能が高く、電子顕微鏡より透過率が高い軟 X 線顕微鏡を用い、*Synechococcus* sp. の EPS の可視化および量的把握に成功した[2]。より正確な EPS の定量に向け、*Synechococcus* sp. の EPS の軟 X 線 CT 法での観察に取り組んでいる。昨年は、ガラスキャピラリー内での試料の固定が不十

分で、3 次元構成像を得ることができなかった。

今年度は、試料を凍結固定し、*Synechococcus* sp. の 3 次元観察を目指した。

**実験:** 琵琶湖から分離培養した *Synechococcus* sp. のピンク株を試料として用いた。細胞懸濁液をガラスキャピラリーに培養液と共に封入した。

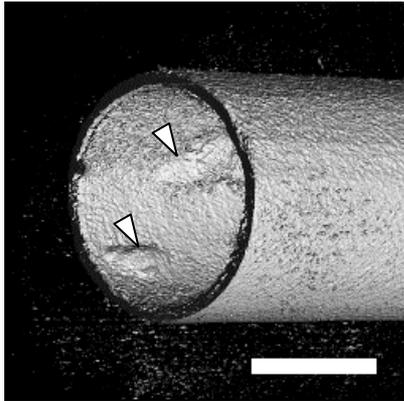
立命館大学 SR センター BL-12 の結像型軟 X 線顕微鏡ビームラインに新たに導入した試料冷却機構を用い、ガラスキャピラリー内の細胞懸濁液を -85°C で凍結し、観察した。観察波長には 2.4 nm を用いた。

**結果, および, 考察:** *Synechococcus* sp. を凍結固定したことで試料を回転させ  $\mu$ CT 像の再構成に必要な投影像を撮影することができた。Fig. 1 にガラスキャピラリーに封入し凍結固定した *Synechococcus* sp. の 3 次元ボリュームレンダリング画像を示す。倍率は約 950 倍であった。複数の桿菌状の *Synechococcus* sp. (白矢印) がガラスキャピラリーの内側面上で確認できる。現在まで、EPS と細胞の識別

には至っていない。今後、観察波長を検討し、EPS と細胞の識別を目指して行きたい。

### 文 献

- [1] 滋賀の環境 2013 (平成 25 年版環境白書)
- [2] Takemoto, K., Ichise, S., Ichikawa, M., Namba, H., and Kihara, H. (2009) X-ray imaging of Picoplankton in Lake Biwa by Soft X-ray Microscope at Ritsumeikan University SR Center. J Phys Conf Ser. 186: Article number 012097.



**Fig. 1.** 3D rendered X-ray microimage of *Synechococcus* sp. (white arrows) in the capillary. The reconstruction was obtained by using a convolution-backprojection algorithm. Wavelength: 2.4 nm, exposure time: 2 min, 45 projections/180° and magnification: 950. Scale bar: 2  $\mu\text{m}$