

R1540

微小シアノバクテリアの細胞内微細構造の 3 次元微細構造観察

3D observation of microstructures of micro-cyanobacterium using soft X-ray microscopy

竹本邦子^a, 吉村真史^b, 難波秀利^c, 木原 裕^bKuniko Takemoto^a, Masashi Yoshimura^b, Hidetosi Namba^c, Hiroshi Kihara^b^a 関西医科大学, ^b 立命館大学 SR センター, ^c 立命館大学理工学部^aKansai Medical University, ^bThe SR Center, Ritsumeikan University, ^c Ritsumeikan University

琵琶湖に生息し、粘質性の代謝物を持ち、ピコ植物プランクトンに分類される微小シアノバクテリア *Synechococcus* sp. を軟 X 線顕微鏡で CT 法で良好な 3 次元像の取得を目指し、キャピラリイの壁面に付着することなく *Synechococcus* sp. を凍結固定する方法を検討した。細胞径がキャピラリイの内径に比べ極めて小さい細胞の場合は、細胞が方キャピラリイの内壁に付着したことから、試料の注入から設置までの全ての方法について検討が必要であることが分かった。

The Soft X-ray microscopy (XM) was applied to obtain 3D image of a small cyanobacterium with mucilaginous extracellular polysaccharide, *Synechococcus* sp. To provide a good dispersion of the cells in the capillary, several methods have been attempted. When a cell size is quite smaller than the inner diameter of the capillary, the cell adhered to the inner surface of the glass capillary. This results show that it is necessary to improve the method in itself.

Keywords: *Synechococcus* sp., mucilaginous extracellular polysaccharide, soft X-ray microscopy, μ -CT

背景と研究目的: 琵琶湖に生息し、難分解性有機物の発生源の一つとして注目されている微小シアノバクテリアとその周囲を取り囲む透明な粘質物（細胞外多糖，EPS: extracellular polysaccharide）をより詳細に観察するため、軟 X 線 CT 法での観察に取り組んでいる。これまでに、*Synechococcus* sp. を凍結固定した *Synechococcus* sp. の 3 次元ボリュームレンダリング画像に成功したが、未だ EPS と細胞の識別できる画像を得ることができていない。

CT 用試料セルであるガラスキャピラリイは、XM 試料ステージにおいて垂直下向きに設置されるので、重力の影響を受け、落下し、観察し易い位置や分散状態を保持することが難しい。また、キャピラリイに懸濁液を注入後、懸濁液が流失することもあり、キャピラリイ内に、適度な密度で *Synechococcus* sp. を分散し、凍結固定させることは難しい。

そこで、注入条件や凍結のタイミングなどで、キャピラリイで細胞を適度に分散させ、固定する条件について検討した。

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。吸引法により細胞懸濁液をガラスキャピラリイ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、ガラスキャピラリイ内の細胞懸濁液を -100°C で凍結し、観察した。観察波長は、「水の窓 (2.33 nm)」を用いた。

結果, および, 考察: Fig. 1 に、代表的なガラスキャピラリイに封入し凍結固定した *Synechococcus* sp. の軟 X 線顕微鏡像を示す。キャピラリイの壁面に付着することなく *Synechococcus* sp. が凍結固定しているように見えるが、試料を回転させると、壁面に付着していることが分かる。細胞の周りを囲む細 EPS に粘質性があるため、試料注入ら凍結までの間に、重力等の影響により懸濁液の液面の上下運動が生じると、粘質性の ESP により、キャピラリイの内壁面に付着してしまう。一度壁面に付着した細胞は付着したまま凍結されてしまうのが原因であると考えられる。壁面に付着することなく凍結固定されているような細胞もあるが、その確率は低い。

Synechococcus sp.のような細胞径がキャピラリーの内径に比べ極めて小さい細胞の場合は、方法自体の再検討が必要であると思われる。

論文・学会等発表

[1] X線顕微鏡国際会議 (XRM2016) (予定)

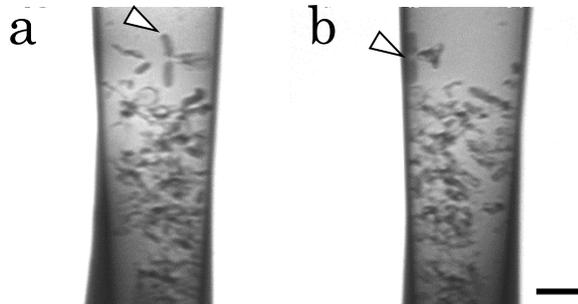


Fig. 1. X-ray microimages of *Synechococcus* sp. in a capillary at different rotating angles. Cells adhere to the surface of the capillary (white arrows). Wavelength: 2.33 nm, exposure time: 2 min, and magnification: 950. Scale bar: 2 μ m