

R1548

琵琶湖のシアノバクテリアの細胞外代謝物の X 線顕微鏡観察

Soft X-ray microscopy observation of mucilaginous extracellular polysaccharide of micro-cyanobacterium

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, ^cRitsumeikan University

琵琶湖生息する微細シアノバクテリア *Synechococcus* sp. と粘質性の細胞外代謝物を軟 X 線顕微鏡で可視化するため、寒天を利用した新しい細胞保持法を検討した。細胞懸濁液を模したラテックス球懸濁液を寒天液と混合した後、ガラスキャピラリー管に注入し常温固定後、クライオ軟 X 線顕微鏡で観察したところ、適当な密度でラテックスを管内で固定できていることを確認できた。

To observe a small cyanobacterium with extracellular polysaccharide, *Synechococcus* sp., a new cell fixation method for soft X-ray microscopy (XM) was applied. A polystyrene latex microspheres suspension as a cell model suspension was used. A mixture of the latex sphere suspension and an agar solution was injected into a glass capillary. After fixating at room temperature, the latex spheres were observed by the XM at cryo-mode. A good dispersion of the latex spheres was well observed in the capillary.

Keywords: *Synechococcus* sp., extracellular polysaccharide, soft X-ray microscopy, agar

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。この原因が、クライオ CT 用試料セルであるガラスキャピラリー内で、適度な密度で *Synechococcus* sp. を分散できなかったためであると考え、寒天を利用した細胞の分散と固定法を検討した。

実験: *Synechococcus* sp. の代わりに、ポリスチレン (PS) ラテックス球 (Polybead® Polystyrene Blue Dyed Microspheres 0.5µm) を試料として用いた。PS ラテックス球懸濁液と寒天液と混合し、2 (w/v) % の寒天液になるよう調整後、素早くガラスキャピラリーに注入し、常温で保持し、PS ラテックス球を寒天内に固定した。

観察は、立命館大学 SR センター BL-12 結

像型軟 X 線顕微鏡ビームラインで行った。試料冷却機構を用い、ガラスキャピラリー内のラテックス懸濁液を -160°C で凍結観察した。観察は 2.33 nm の波長を用いて行った。

結果, および, 考察: 光学顕微鏡で寒天中に PS ラテックス球が適度に分散していることを確認後、試料ステージに設置し、冷却した。寒天液は冷却中も XM でライブ観察を行い安定し存在していることを確認した。試料槽内の温度が -100°C に到達した後、XM 観察し、良好な PS ラテックス球像を確認した。その後、ガラスキャピラリーを回転させ、PS ラテックス球がガラスキャピラリー内壁に接触することなく寒天溶液中に凍結固定した状態で存在していることを確認した (Fig. 1)。また、寒天の X 線による吸収によるバックグラウンドの顕著な増加は認められてなかった。現在、3 次元ボリュームレンダリング画像の作成を進めている。

今後、この手法による *Synechococcus* sp. 観察と、EPS を識別のための手法の開発を目指す予定である。

論文・学会等発表

[ここに入力]

[1] X線顕微鏡国際会議 (XRM2016) (予定)

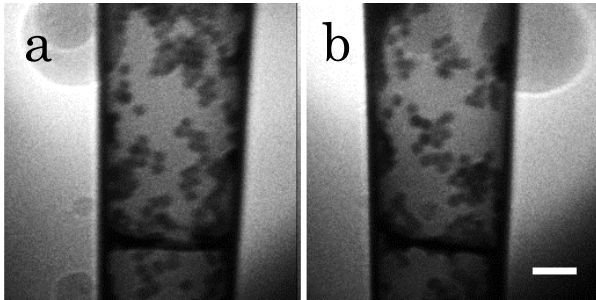


Fig. 1. X-ray microimages of PS latex microspheres in the capillary at 0° (a) and 90° (b). Wavelength: 2.33 nm, exposure time: 20 s, and magnification: 950. Scale bar: 2 μm