

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

Observation of mucilaginous extracellular polysaccharide of micro-cyanobacterium

竹本邦子^a, 吉村真史^b, 難波秀利^b
Kuniko Takemoto^a, Masashi Yoshimura^b, Hidetoshi Namba^b

^a関西医科大学, ^b立命館大学 SR センター
^aKansai Medical University, ^bThe SR Center, Ritsumeikan University

e-mail: takemoto@hirakata.kmu.ac.jp

微細シアノバクテリアを軟 X 線顕微鏡で明瞭に観察するための観察エネルギー最適化に向け、酸素の吸収端前後のエネルギーで観察できる細胞内微細構造について調べた。対数増殖期の *Pseudanabaena foetida* nom. nud. (*Phormidium tenue*) の細胞内で、カルボニル基 (C=O*) に由来する構造が確認できた。この構造は、細胞分裂期関連する

To optimize a soft X-ray microscopy (XM) observation energy for cyanobacteria with extracellular polysaccharide, intracellular structures of cyanobacteria were observed at energies above and below the K absorption edge of oxygen. XM images of *Pseudanabaena foetida* nom. nud. (*Phormidium tenue*) cells at logarithmic growth phase showed a structure comprising C = O*.

Keywords: cyanobacteria, soft X-ray microscopy, intracellular structures, logarithmic growth phase

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由来の有機物の定量を目指している。このため、シアノバクテリア細胞と、細胞が産生する代謝物を軟 X 線顕微鏡(XM)による軟 X 線 CT 法で詳細に観察する方法の開発に取り組んでいる。これまでに、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の取得に成功したが、細胞外代謝物と細胞を明確に識別できる画像を得ることができていない。細胞の固定と観察エネルギー(波長)に課題があると考え、昨年、クライオ CT 用試料セルであるガラスキャピラリイ内で、適度な細胞密度で *Synechococcus* sp. を分散させるための方法として、寒天を利用した分散固定法の検討を行った。その結果、*Synechococcus* sp. のモデル試料として直径 0.5 μm の PS ラテックス球の分散固定に成功した。ガラスキャピラリイを回転させ複数の方向から XM 観察することで、PS ラテックス球がガラスキャピラリイ側壁接触することなく分散していることも確認できた。

これまで、通常状態のシアノバクテリアを、主に酸素 (O) の吸収端前後のエネルギーを用い観察し、観察波長の最適化を進めてきた。本課題では、分裂前から分裂中の細胞について、観察エネルギーと細胞内構造の関係について調べた。

実験

試料は、*Synechococcus* sp. 細胞に比べ細胞径が大きく、細胞内の構造観察が容易な *Pseudanabaena foetida* nom. nud. (*Phormidium tenue* 緑株) を試料とした。琵琶湖から単離した *P. foetida* を、滋賀県琵琶湖環境科学研究センターで継体培養してきた細胞を使用した。藍藻用の CT 培地で、20°C、50 μmol photons/m² s (12h明/12h暗) とし、2株を用いて2週間培養した。1 μL 細胞懸濁液をシリコン窒化膜 (SiN 膜) 上に滴下後、風乾した試料を用意した。

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において、常温下で行った。

結果、および、考察

2週間の培養は対数増殖期に対応するので、分裂前から分裂中のシアノバクテリアが観察できると期待される。Fig. 1に620 eV (2.0 nm)と532 eV (2.33 nm)で観察した*P. foetida*の代表的なXM像を示す。通常細胞の細胞でみられたポリリン酸顆粒と考えている構造は見られない。細胞内に強いX線吸収を示す長軸方向に伸びた構造体(黒矢印)と、細胞の両極に構造体(白矢印)が確認できる。黒矢印で示した構造体は、Fig. 1b でより強いX線吸収を示している。白矢印で示した構造体のX線吸収は、(a)と(b)で顕著な違いは無い。532 eV付近にカルボニル基(C=O*) O 1s→π*遷移があることが知られていることから、黒矢印と白矢印で示した構造体は異なる原核細胞オルガネラであると考えら得る。タンパク質や糖類はDNAに比べ、532 eV付近で高いX線吸収を示すことから[1]、黒矢印で示した構造体は白矢印で示した構造体に比べタンパク質や糖類が多く含まれると考えられる。細胞分裂期には、DNAの凝集した構造体や染色体のような構造体が現れ[2]、現在、これらの構造体の同定に向けた解析を進めている。

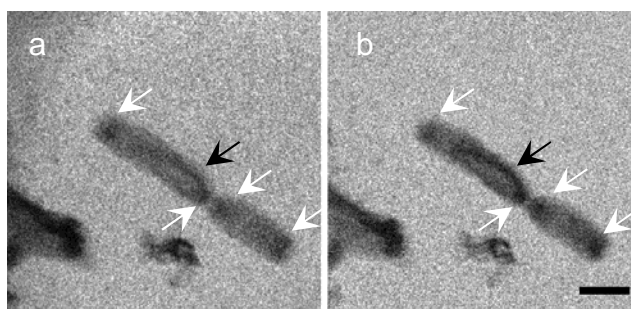


Fig. 1. XM images of air-dried *P. foetida* cells at logarithmic growth phase. Images were taken at 620 eV, 2.0 nm (a) and at 532 eV, 2.33 nm (b). Exposure time was 120 s. Scale bar is 2 μ m.

参考文献

- [1] S. Mitsunobu, S. Ming, H. Makita and T. Ohigashi, UVSOR ACTIVITY REPORT 2013 (2014) 157.
- [2] K. Murata, S. Hagiwara, Y. Kimori and Y. Kaneko, Scientific Reports 6 (2016) 34934

研究成果公開方法／産業への応用・展開について

- ・本研究成果は、2018年度放射光学会で公開予定である。