

## 軟X線マイクロCT法を用いた細胞外代謝物に含まれる有機物量計測法の開発

### Development of soft X-ray $\mu$ -CT method to estimate extracellular metabolites of cyanobacterium

竹本邦子<sup>a</sup>, 吉村真史<sup>b</sup>, 難波秀利<sup>b</sup>  
Kuniko Takemoto<sup>a</sup>, Masashi Yoshimura<sup>b</sup>, Hidetoshi Namba<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>a</sup>Kansai Medical University, <sup>b</sup>The 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。静止期後期の *Pseudanabaena foetida* nom. nud. (*Phormidium tenue*) の細胞は、外形がはっきりとせず、原核細胞オルガネラも確認できなかったことから、活動していない死細胞であると考えられる。

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 late stationary phase was indistinct and any prokaryotic organelle was not observed. This result suggests that it was a dead cell.

**Keywords:** cyanobacteria, soft X-ray microscopy, intracellular structures, late stationary 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、軟X線顕微鏡(XM)による軟X線CT像で行うことを目指している。細胞外代謝物と細胞の明確に識別できる画像を得るため、観察エネルギー(波長)の最適化を進めている。これまで、通常状態と分裂前から分裂中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た。本課題では、静止期後期の細胞について、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  $\mu$ mol photons/m<sup>2</sup> s (12h明/12h暗)とし、12週間培養した。1  $\mu$ L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。

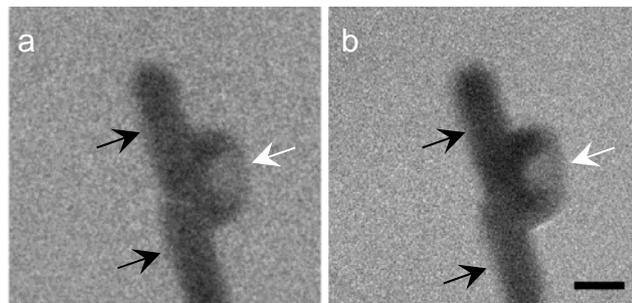
観察は、立命館大学SRセンターBL-12結像型軟X線顕微鏡ビームラインにおいて、常温下で行った。

#### 結果、および、考察

12週間の培養は静止期後期から死滅期に対応すると思われる。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。輪郭は不明瞭で糸状体を形成している2つの細胞(黒矢印)は高いX線吸収を示すが、内部構造は見られない。糸状体に付着している細胞(白矢印)で内部構造が確認できる。どちらの構造も(a)と(b)でX線吸収に顕著な違いは無い。黒矢印

で示された細胞は、通常細胞や分裂中の細胞でみられた原核細胞オルガネラは存在しないことから、活動していない細胞（死細胞）であると考えられる。透過型電子顕微鏡観察を行ったところ、細胞内部の構造が保たれていないものが非常に多く、このような細胞では通常細胞や分裂中の細胞でみられた原核細胞オルガネラは確認できなかった。また、同時に大量のバクテリアの観察できたことから、バクテリアによる分解も進んでいると推察される。

*Synechococcus* sp.の細胞外代謝物は、糖類52%、タンパク質40%、灰分8%で構成され、細胞は糖類25%、タンパク質68%、灰分7%で構成されている [1]。代謝物は、糖の割合が細胞に比べ多いので、糖類を効果的にイメージングする必要がある。534.4 eV付近にC-O\*H のO 1s→3p /s\*遷移があることが知られているので、今後、534.4 eV (2.32 nm)でのイメージングについて検討する予定である。



**Fig. 1.** XM images of air-dried *P. foetida* cells at death 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  $\mu$ m.

#### 参考文献

[1] H. Ikegaya, S. Suzuki, S. Ichise, S. Furuta, S. Wakabayashi, T. Ohigashi, D. Bamba, H. Namba, H. Kihara, N. Kishimoto and K. Takemoto, Estimation of Organic Carbon Content of the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. by Soft X-ray Microscopy *Geomicrobiol. J.*, 32 (2015) 827.

#### 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。