

# 研究報告書

## 「油生産緑藻の葉緑体と細胞全体生理の相関を見る多角的顕微分光分析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 熊崎 茂一

### 1. 研究のねらい

微細藻類を用いて中性脂質等のバイオ燃料原料物質を生産する試みが注目されている。しかし、未だエネルギー収支上では正味のエネルギー生産には至っていない。光合成生物をエネルギー生産や有用物質生産に活かすために様々な培養方法が検討される必要があり、また野生に存在する未知の有用藻類を探索する努力も必要である。さらに、微細藻類に限定せず、植物やシアノバクテリア等に着目することも重要である。いずれにせよ、細胞毎、細胞内部位毎、多細胞生物の組織毎に、生理的条件下で光合成活動や各種代謝産物の増減を詳しく調べられることによって光合成生物の理解を深め、利用方法を探索する必要がある。生体破碎、分離技術を用いることなく細胞生理の研究をするためには光学顕微鏡、できれば情報豊富が顕微分光が理想的な道具である。ただし、顕微分光には原理的にも技術的にも改良の余地が多い。得られる情報の意味や最適な測定条件を精査し、目的に合った解析ソフトウェアも必要である。本課題では光合成生物の研究に適合した顕微蛍光減衰測定、顕微蛍光スペクトル測定、顕微ラマン散乱スペクトル測定系を開発、改良することを基本とする。可能な限り既存の分析手法の能力を超える顕微分光法の開発を目指した。それらの技術をなるべく多角的に用いて、シアノバクテリア、緑藻、植物等が示す、光環境応答、栄養欠乏に対する様々な応答、および細胞分化に伴う細胞生理の変化についての得られる情報の質と量を大幅に改善する。その結果として光合成生物学に関する新しい知見の獲得も目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

窒素はタンパク質や核酸の構成原子であり生体に欠かせないものである。しかし大多数の光合成生物は大気中に大量に存在する $N_2$ を直接利用できず、環境に既に固定されたアンモニウム塩、硝酸塩、亜硝酸塩などを直接または間接的に利用する。環境中の窒素栄養が不足すると中性脂肪を細胞内に蓄積する藻類が多く知られており、本研究で特性を調べた緑藻の一種 *Parachlorella kessleri* (ここでは単にクロレラと呼ぶ) も同様である。窒素充足培地または窒素欠乏培地に一定時間おかれたクロレラを顕微蛍光スペクトル画像と蛍光寿命画像で調べ、葉緑体活動の変化と中性脂肪の蓄積を同時かつ精密に観測することができた。

一部のシアノバクテリアは $N_2$ を窒素栄養源とすることができる(窒素固定)。窒素固定を行うニトロゲナーゼは酸素によって不活性化されるので酸素発生型光合成と共存することができない。糸状細胞連結型のシアノバクテリアの一部ではおよそ数個から約20個の細胞のうちの1個の細胞だけを異型細胞(ヘテロシスト)として細胞分化させ、その異型細胞でのみ窒素固定

を行い、異型細胞では酸素発生型光合成活動を低下させる。通常の栄養細胞から異型細胞が形成される数十時間という時間の間に起こる変化は劇的なものであるが、その詳細を細胞毎に調べる試みはこれまで不十分であった。この時間経過を同一細胞について約 100 時間にわたりタイムラプス顕微分光観測を実現した。異型細胞が形成する途上の光合成膜上で進行する分子構成変化の詳細が初めて明らかになった。

光合成生物における葉緑体活動は細胞全体の活動と密接に関係しており、葉緑体の生理的状态とそれと関連しながら変化していく細胞内の代謝産物の変化を知ることは重要である。本課題を通じて、通常蛍光が弱く観測しにくい光化学系 I の蛍光スペクトル観測[論文 3]や蛍光寿命観測を行い、それを光合成生物の細胞分化の研究に応用する手法を確立することができた。また非蛍光性分子を非染色で可視化するラマン散乱スペクトル測定について、自家蛍光の妨害を受けずに光合成生物から得られる技術基盤を構築した。その結果、より高速に光合成生物のラマン散乱スペクトル画像を得ることが容易になった。

## (2) 詳細

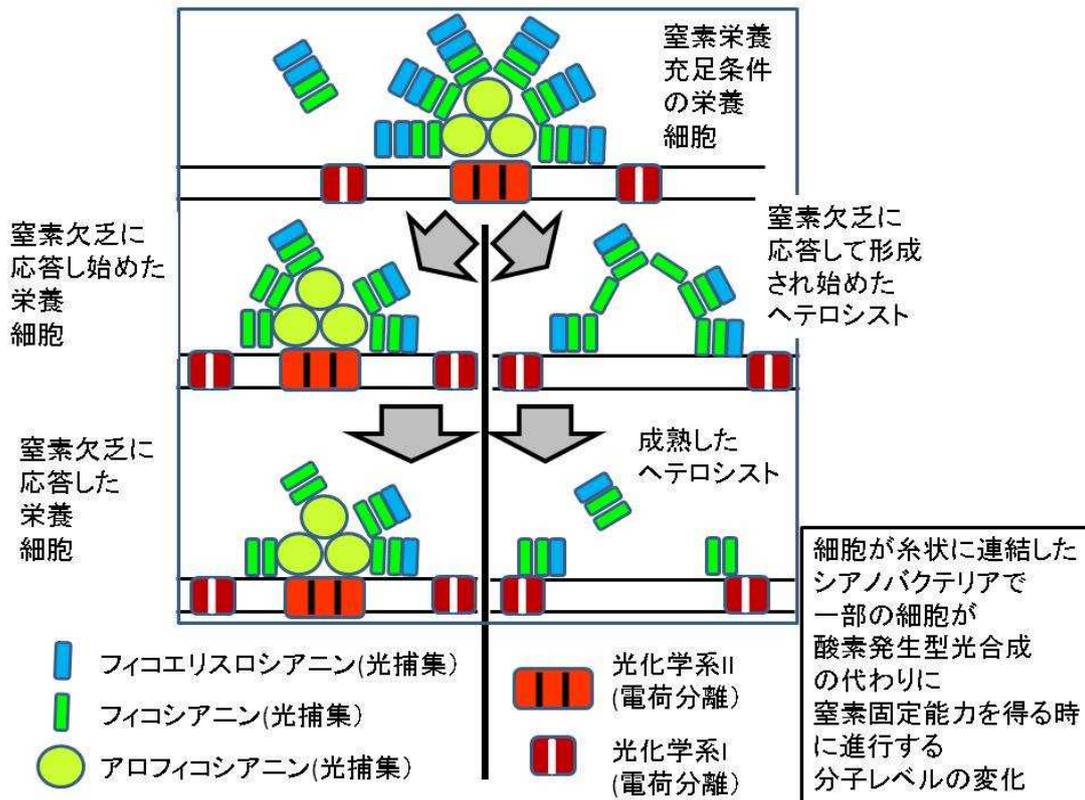
### 研究テーマ A「蛍光分光顕微鏡の高度化、特に蛍光寿命イメージング法の導入による、細胞内油脂と葉緑体活動の可視化」

全ての画素で蛍光スペクトルを高速に得ることができる顕微分光システムにおいて、2つの波長領域で完全同時に蛍光寿命の画像を得ることができるように顕微分光システムの増強を行った。さらに、多数の焦点面の蛍光寿命画像を自動連続的に得て、3次元的な蛍光寿命の立体画像を得ることができるようになった。主な使用例はクロロフィル自家蛍光(約690nm)と中性脂肪を染色した色素の蛍光(例: BODIPY, 510-570 nm)を同時に得ることである。クロロフィル蛍光は主に光化学系 II の蛍光寿命を、BODIPY 蛍光強度から中性脂肪の蓄積量を見ることが出来る。クロレラの細胞において、窒素欠乏が引き起こす葉緑体の蛍光スペクトルと蛍光寿命の変化、および同時に進行する中性脂肪の蓄積を見た。単一細胞内の葉緑体の縮小にも関わらず蛍光スペクトルの変化は再吸収効果で説明できる程度であった。つまり、葉緑体本来の蛍光スペクトルにはほとんど変化がなく、蛍光スペクトルの僅かな変形は葉緑体の縮小により蛍光透過率の波長依存性が小さくなることで大方説明できた。一方、蛍光寿命で見ると窒素欠乏培地の細胞と窒素充足培地の細胞の間の差異を敏感に検知することができた。

また、植物などで葉緑体の分化が見られる場合、光化学系 I と光化学系 II の化学量論比が変化することがある。顕著な代表例は C4 植物における維管束鞘細胞と葉肉細胞における葉緑体の機能分化である。また糸状シアノバクテリアでも酸素発生型光合成を行う栄養細胞の一部から窒素固定細胞(ヘテロシスト)を形成する際に光化学系 II の量と活動を低下させる。しかし、光化学系 I はヘテロシストでも残存し、光化学反応を維持すると言われている。それは系 I が光エネルギーを利用した循環型電子伝達によりチラコイド膜内外のプロトン濃度勾配を作り出し、ATP を生産するためと言われている。窒素固定反応には大量の ATP が必要である。これらのように光化学系 I が残存する場合、蛍光スペクトルと蛍光寿命によって光化学系 I と光化学系 II の区別をすることが重要である。蛍光寿命顕微画像を用いてシアノバクテリアと C4 植物の両方において光化学系 I と光化学系 II の区別を細胞毎、葉緑体毎に行えることを実証した。

## 研究テーマ B 「光合成生物の栄養環境変化への応答と成長段階による変化の顕微分光による研究」

研究テーマAでも言及した糸状シアノバクテリアのヘテロシスト分化の研究では、最低5つの蛍光色素タンパク質の変化を追跡する必要がある。また、それら5つの蛍光スペクトルは狭い波長領域でお互いに重なっているため十分な波長分解能で顕微蛍光スペクトルを得なければ個々の細胞で進行する事象を十分な精度で記述できない。



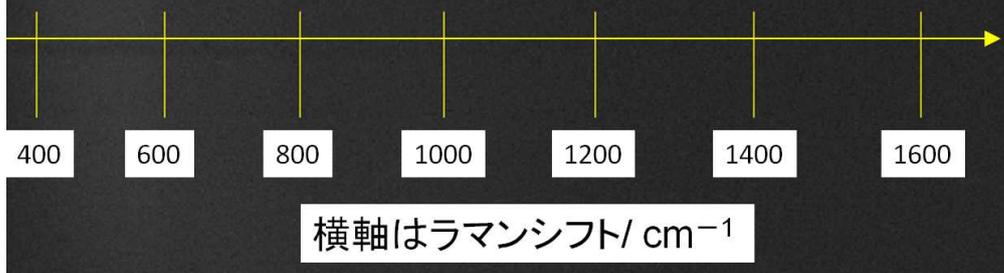
従来から開発、改良してきたライン走査蛍光スペクトル顕微鏡では、2nm の波長分解能で 500-760nm の波長領域の蛍光スペクトルを得ることができるので、このような生理現象を追跡することには最適である。88 色の蛍光画像(600 - 760nm)を同時に取得する設定で、栄養細胞がヘテロシストに変化する全過程を単一細胞毎に約 100 時間追跡することに成功した。励起には 808nm パルスレーザーの 2 光子励起と 785nm 連続発振レーザーの 1 光子励起を用いた。このパルスレーザー2 光子励起では 5 種類の色素タンパク質の全てを励起して蛍光を見ることができる。785nm 連続発振レーザー1 光子励起の場合は光化学系 I のみが実質的に励起され、光化学系 I 選択的蛍光像を見ることができる[論文 2,3]。これらの異なる励起条件、異なる細胞分化段階、窒素固定を行うようになる細胞と分化しないことが決定した細胞などの 1625 個の単一細胞蛍光スペクトルを特異値分解で統一かつ網羅的に解析することで異型細胞が形成する途上の光合成膜上で進行する分子構成変化が明らかになった[論文 1]。

## 研究テーマ C 「深近赤外励起ラマン散乱スペクトル測定による非蛍光性細胞構成成分分子

## の検出」

微弱なラマン散乱スペクトル測定における蛍光の妨害を避けるために励起レーザーをなるべく長波長に選択することがしばしば行われる。葉緑体やシアノバクテリアでは 785nm-820nm の連続発振レーザーを用いたとしても、系 I のアンチストークス蛍光によって自家蛍光が強く発せられることが本研究課題でも正確かつ多種類の酸素発生型光合成生物で確認されている [論文 1,2,3]。このため励起光を 976nm に選んでラマン散乱スペクトル顕微鏡を構築した。励起光が長波長側になるにつれてラマン散乱断面積(観測対象分子を一定にしたときの入射光強度に対する散乱信号光の強度を表す)は急激に下がっていく。信号が弱くなる中でも高速走査を実現するためにはライン状の励起または多数焦点励起等を行って並列化を行うことが望ましい。このため自作レンズ式イメージング分光器を構築し、近赤外カメラ(0.9 - 1.6 mm で高感度)と組み合わせてラマン散乱光の観測に用いた。多細胞藻類の一種に適用して、細胞内のカロテノイドについては自家蛍光の妨害をほとんど受けずに容易に検出可能であることが実証できた。実際の細胞の観察に用いる上で広い領域を高い解像度で走査することが欠かせない。そのためには上記のような並列化を実現する必要があるが、それは現システム的设计上では励起レーザー光学系のみを改良することで直ちに実現できる状況になった。

深近赤外カメラを用いた976nm励起ラマン散乱スペクトル測定  
(多細胞の緑藻の葉緑体のカロテノイドが主に見えている)  
現在は単一焦点励起だが、これを多焦点励起、線状励起  
にすることで高速化が実現できる。



### 3. 今後の展開

私の推進する顕微分光法を利用する多くの植物科学に関わる共同研究が進行中である。これらを継続発展させることで、顕微分光の強みを生かして植物科学の分野に貢献したい。

それらの植物科学に関わる共同研究の推進と並行して、本研究課題で開発、改良、構築した

多角的な顕微分光のハードウェア、ソフトウェアを益々発展させていく。短期的には励起波長の可変性で改良していく。中長期的には、単細胞生物に限定されずに、植物の奥深い内部で高い解像力を実現しながら顕微分光が行えるようにする方針である。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

当初、研究対象生物を、中性脂肪を蓄積する緑藻に絞っていた。しかし、さきがけ研究を遂行しながら、顕微分光システムと解析ソフトウェアの多角化と高機能化が進行した。また私自身の光合成生物学の知識がわずかなりとも広く、深くなり、共同研究の申し込みが増えたことで、研究対象生物や生理現象が大きく広がった。研究期間中の経験で、顕微分光システムの性能だけ追求する段階から、光合成が関わる幅広い生理現象に顕微分光を適用する研究姿勢に移行できたと思っている。窒素欠乏が引き起こす緑藻細胞中の中性脂肪の蓄積は一種のストレス応答であり、窒素欠乏が長引けばやがては細胞死に至る途中の過渡現象である。それはバイオ燃料を生み出すという立場では重要ではあるが、緑藻の生命力の限界を示している。それとは対照的に、窒素欠乏を窒素固定能力で克服できるシアノバクテリアという存在と能力は特筆するに値する。根粒細菌等、ごく限定的な生物種のみが窒素固定能力を持つ。酸素発生型光合成と窒素固定能力を併せ持つシアノバクテリアの機能や細胞分化を示す細胞形態・生態には人類が学ぶべき要素が非常に多い。そういう高機能なシアノバクテリアの有名な生理現象において生理学的現象を分子レベルで記述することに顕微分光分析が役に立ったということには達成感を感じてよいのではないかと思っている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

近年、藻類を用いてバイオ燃料を生産しようとする試みが注目される一方で、エネルギー収支の視点からは正味のエネルギー生産は達成できていない現状で、多くの研究努力が望まれている。

熊崎茂一博士は、自身の超高速計測技術、顕微分光技術、に関する先端的研究実績を基礎に非破壊型リアルタイム分析、空間・時間分解分光分析手法を生体材料観察、解析に適用し得る手法を開発するという意欲的研究提案を行い採択された。研究開始後、若干の誘導期間はあったが、光合成生物の研究に適合した顕微蛍光減衰測定、顕微蛍光スペクトル測定、顕微ラマン散乱スペクトル測定系の開発に成功した。

具体的な測定事例としては、クロレラを顕微蛍光スペクトル画像と蛍光寿命画像で調べ、葉緑体活動の変化と中性脂肪の蓄積を同時かつ精密に観測することに成功している。また、窒素固定能力を持つ異形細胞(ヘテロシスト)が数十時間の間に通常の栄養細胞から形成される過程をリアルタイムで、同一細胞について約 100 時間にわたりタイムラプス顕微分光観測を実現した。2nm の波長分解能を有するライン走査蛍光スペクトル顕微鏡と網羅的スペクトル解析、およびユニークな近赤外励起により狭い波長領域に混在する多種類の色素タンパク質

の増減を分離観測することに成功している。

また光合成生物組織中の非蛍光性分子をラマン散乱スペクトルにより可視化する技術基盤の構築にも貢献した。生体材料に適用可能な非破壊リアルタイム顕微分光システムの構築と実試料の観測例について、今後は、いっそうの論文発表の形で示すことにより、大きい波及効果を期待したい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Shigeichi Kumazaki*, Masashi Akari and Makoto Hasegawa<br>"Transformation of Thylakoid Membranes during Differentiation from Vegetative Cell into Heterocyst Visualized by Microscopic Spectral Imaging",<br>Plant Physiology, (2013) 161, 1321 – 1333                                                                                                                         |
| 2. Shigeichi Kumazaki* "Anti-Stokes fluorescence of oxazine 1 in solution with continuous wave laser excitation at 785 nm", Chemical Physics (2013), 419, 107-112.                                                                                                                                                                                                                |
| 3. Makoto Hasegawa, Takahiko Yoshida, Mitsunori Yabuta, Masahide Terazima and Shigeichi Kumazaki*, "Anti-Stokes Fluorescence Spectra of Chloroplasts in Parachlorella kessleri and Maize at Room Temperature as Characterized by Near Infrared Continuous Wave Laser Fluorescence Microscopy and Absorption Microscopy" Journal of Physical Chemistry B, (2011) 115, 4184 – 4194. |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 1) \*熊崎茂一 長谷川慎

“ライン走査型 2 光子励起蛍光スペクトル顕微鏡を用いた植物細胞中の葉緑体内部微細構造観察” 分光研究 (2011), vol. 60 , No.1, pp19-21.

#### 2) 熊崎茂一

“アンチストークス蛍光スペクトルと 2 光子励起蛍光スペクトルによる光合成膜の顕微分光分析” 生物物理(2011) Vol. 51(6), 274-275.