

1064 nm 励起ラマン分光によるシアノバクテリア菌体内光合成色素の

in vivo 状態解析(東大院理^{*}, 愛媛大・無細胞センター^{**}, NCTU 分子科学研究所^{***})○安藤正浩^{*}, 杉浦美羽^{**}, 林秀則^{**}, 濱口宏夫^{***}

【序】顕微ラマン分光法は、前処理を必要とせず、非浸襲で分子レベルの解析を行うことができる等の利点を持ち、生体試料の *in vivo* 解析に応用が進んでいる。試料からの自家蛍光による妨害や、励起光照射による損傷などの問題を軽減するため、生体試料の測定には近赤外励起が有効である場合が多い。これまで我々は、1064 nm 励起マルチチャンネル顕微ラマン分光装置を開発し、生体試料の空間分解測定に応用してきた。本発表では、酸素発生型光合成を行う真正細菌であり、葉緑体の起源としても知られているシアノバクテリアの *in vivo* ラマン測定に応用した結果を報告する。シアノバクテリアは、多種類の光合成色素を含むため、その強い自家蛍光によりこれまで単一菌体内の *in vivo* ラマン分光測定は困難であった。1064 nm の長波長の励起光を用いることで、自家蛍光の妨害を受けることなく、明瞭なスペクトルを得ることができるようになり、さらに光合成色素の菌体内分布情報を得ることが可能となった。

【実験】1064 nm 励起マルチチャンネル顕微ラマン分光装置では、検出器の選定が問題となる。本研究では、指紋領域となる波長域 (1-1.4 μm) で十分な感度を持つ、近赤外イメージインテンシファイア(受光素子 InP/InGaAsP; 浜松ホトニクス)を検出器として用いることで、生細胞などの試料においても十分な S/N のスペクトルが得ることができた。励起光には、Q スイッチ Nd:YAG レーザーからの基本波(1064 nm, 10 kHz, 30 ns)を用い、x100 / NA1.3 の対物レンズを用いて試料に集光した。ラマン散乱光は同対物レンズにより後方散乱光を集めた後、分光器に導入、上述の検出器で検出した。本装置は、共焦点光学配置により、面内 0.7 μm , 奥行き 3.1 μm の空間分解能を有している。また、波数分解能は 10 cm^{-1} である。

試料には、光合成研究に広く用いられている好熱性シアノバクテリア、*Thermosynechococcus elongatus* を用いた。室温条件下で、スライドガラスとカバーガラスに挟むことで菌体を固定し、測定に用いた。励起光を 1 mW 以上照射するとフォトブリーチ等の影響が見られた。測定の際はこれを避けるためサンプル位置で 0.5 mW の強度とした。マッピング測定においては、0.3 μm 間隔で試料を移動させ、各点 10 秒の露光時間で測定した。続く各バンド強度による画像構成においては、特異値分解によりノイズ成分を除去することで各スペクトルの S/N を向上させた後、各ラマンバンドをローレンツ関数でフィッティングすることで面積強度を算出し、マッピング画像を得た。

【結果と考察】シアノバクテリアは、~800 nm の近赤外励起であっても、光合成色素からの強い自家蛍光によりラマン散乱測定は困難であった。今回、1064 nm というより長波長の励起光を用いることで、蛍光の妨害を避け、大きく S/N を向上した測定が可能となった。図 1 a に得られたラマ

ンスペクトルを示す。また、*T. elongatus* の持つ光合成色素である、カロテノイド、クロロフィル a、フィコビルリン、各々の代表的な 1064 nm 励起ラマンスペクトルを図 1b に示す。これらスペクトルの比較により、シアノバクテリアの測定で得られた殆ど全てのバンドは、光合成色素の何れかに帰属されることが分かる。すなわち、カロテノイド(1008, 1157, 1523 cm^{-1})、クロロフィル a (1225, 1325 cm^{-1})、フィコビルリン(1279, 1369, 1586, 1635 cm^{-1})である。これらの色素は可視領域に電子吸収を持つことから、前期共鳴ラマン効果によって選択的に観測されたものと考えられる。

続いて、単一菌体のマッピング測定をした結果を図 2a に示す。全長約 5 μm の菌体内部において、各光合成色素の分布情報が

明瞭に可視化されている。同一色素に帰属したバンドはどれも類似した強度分布を示しており、これは上述の帰属を裏付ける結果である。また、各色素同士の分布を比較すると、カロテノイドの分布が他の 2 種と大きく異なっていることが分かる。これに合わせ、C=C 伸縮振動に当たる $\sim 1523 \text{ cm}^{-1}$ バンドのピーク位置をプロットした結果と比較すると(図 2b)、カロテノイド濃度の高いところで低波数側にシフトしていることが分かる。このバンドは、カロテノイドの会合により低波数シフトすることが知られており、それを示唆するものではないかと考えられる。

以上のように、1064 nm 近赤外光を用いることで、これまで困難であった光合成試料の空間分解ラマン分光測定が可能となった。カロテノイドは強光阻害の防止剤としての機能が知られており、今回得られた知見はその機構解明につながるものと期待される。

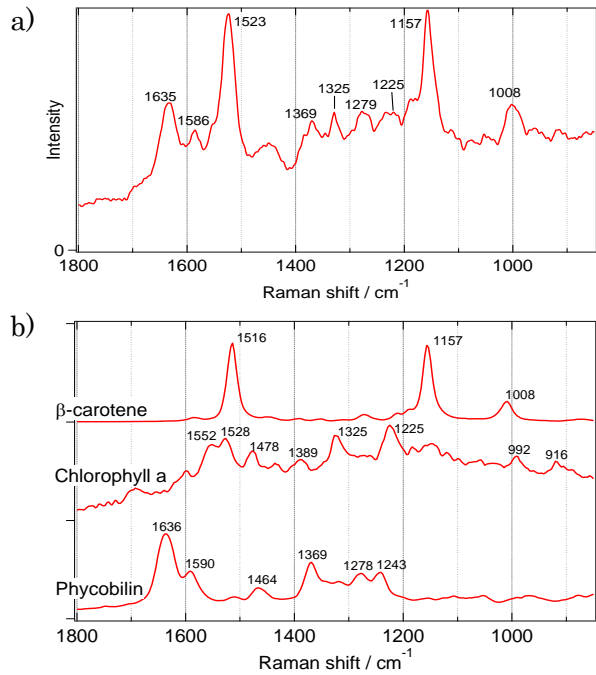


図 1. *T. elongatus* (a) および光合成色素 (b) の 1064 nm 励起ラマンスペクトル

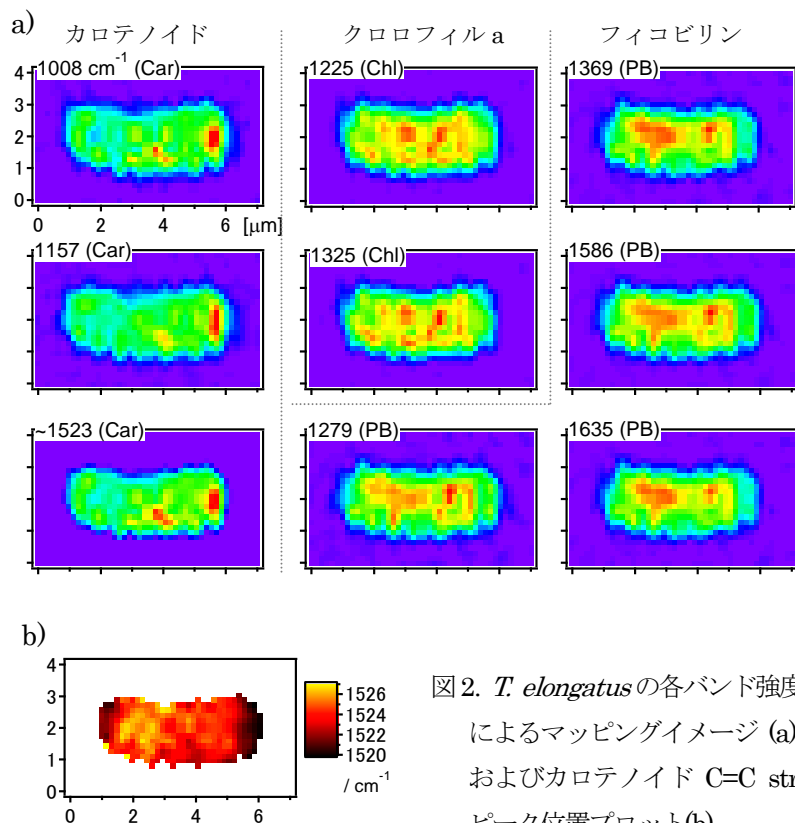


図 2. *T. elongatus* の各バンド強度によるマッピングイメージ (a)、およびカロテノイド C=C str. ピーク位置プロット(b)。