

2P080

顕微蛍光スペクトルと顕微吸収スペクトルの同一細胞における測定法開発 とシアノバクテリア細胞分化への応用

(京大院・理) ○明里将志、長谷川慎、藪田光教、吉田隆彦、寺嶋正秀、熊崎茂一

[序]

シアノバクテリアは植物と同様に酸素発生型の光合成を行うチラコイド膜を持っている。細胞が糸状(フィラメント状)に連結したシアノバクテリアであるアナベナには窒素欠乏条件で異型細胞(ヘテロシスト)と栄養細胞に機能分化を示すものがある。ヘテロシストでは空気中の窒素を取り込んでアンモニアを合成する窒素固定が行われる。この窒素固定を行う酵素はニトロゲナーゼである。ニトロゲナーゼは酸素に弱く、そのためにヘテロシストでは酸素発生型の光合成が行われない。このような背景から栄養細胞がヘテロシストへと分化する過程において、チラコイド膜の変化が生じる。今回我々は栄養細胞からヘテロシストへの変化の過程を分光学的に追跡するために二光子励起半共焦点ラインスキャン顕微鏡を用い(文献1)、さらに同一細胞において顕微吸収スペクトルの測定も可能とする装置改良を行った。これにより、チラコイド膜に含まれる光合成色素の濃度と蛍光量子収率を区別することができるようになった。

[実験]

アナベナは *Anabaena PCC7120*、*Anabaena variabilis* の二種類を摂氏 29 度で窒素欠乏条件にした BG11 液体培地で育てた。顕微鏡観察試料は液体培地から採取したものをカバーガラスとスライドガラスで封入した。今回の実験ではヘテロシストが多数見られる状態でのアナベナの観察を行った。顕微蛍光測定のための励起はパルスレーザー(805nm, 76MHz, 0.2ps)による二光子励起を用いて、顕微吸収測定はハロゲンランプを11枚のバンドパスフィルター(半値幅 10nm)で特定の波長だけを透過させることにより測定した。

[結果、考察]

Anabaena PCC7120、*Anabaena variabilis*それぞれについて栄養細胞、ヘテロシストの顕微蛍光、吸収スペクトルを測定した(図1、図2ではある単一の *Anabaena variabilis* のフィラメントのスペクトルを記す)。図2の吸収スペクトルにおいて、670-680nm 付近にはクロロフィル(Chl)の吸収極大があり、ヘテロシストの Chl 吸収は栄養細胞に比べ約 50%程度残っている。一方で 620nm の吸収は主に PBS(フィコビリゾーム)のフィコビリリン色素である。ヘテロシストでは PBS が大幅に減少している。ヘテロシストで残っている 620nm の吸収は、680nm 付近に残っている Chl の吸収を考慮すると、Chl の振電バンドで説明される。

図1の蛍光スペクトルでは栄養細胞と比べてヘテロシストの蛍光強度は全体的に低くなっているが、特に光化学系Ⅱ (PSⅡ)由来と考えられる680nmの蛍光、PBS由来と考えられる660nmの蛍光が非常に減少している。一方で730nm付近の光化学系Ⅰ (PSⅠ)由来の蛍光は660、680nmの蛍光ほど減少していない。一般的にPSⅡの方がPSⅠよりも量子収率が高いと言われているので、ヘテロシストのChlはほとんどPSⅠ由来と考えられる。過去の文献では超音波処理により栄養細胞とヘテロシストを分離して色素タンパク組成を調べた例がある(文献2)。我々の場合フィラメントを非破壊で栄養細胞とヘテロシストを区別して、定量的な分析が可能となった。ヘテロシスト分化の途中過程を追跡できるよう現在努力中である。*Anabaena PCC7120*、*Anabaena variabilis* 共により詳細な解析結果の報告は当日に発表する。

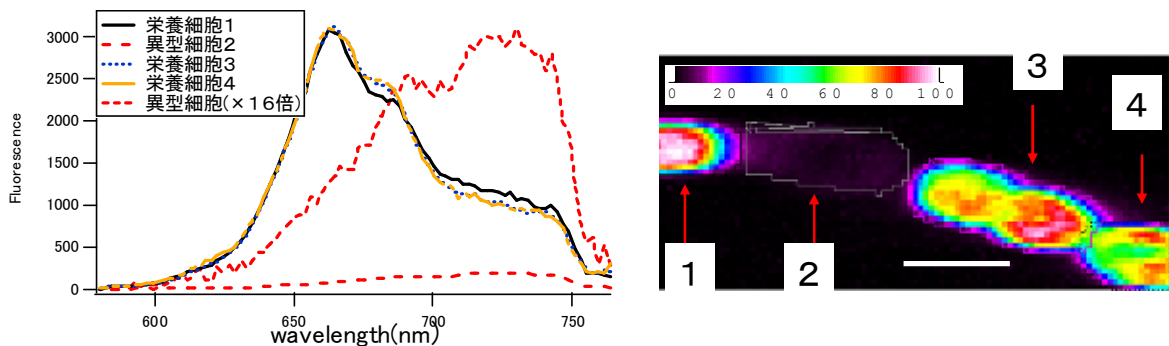


図1 顕微蛍光スペクトルとその蛍光像 スケールバー=5 μ m

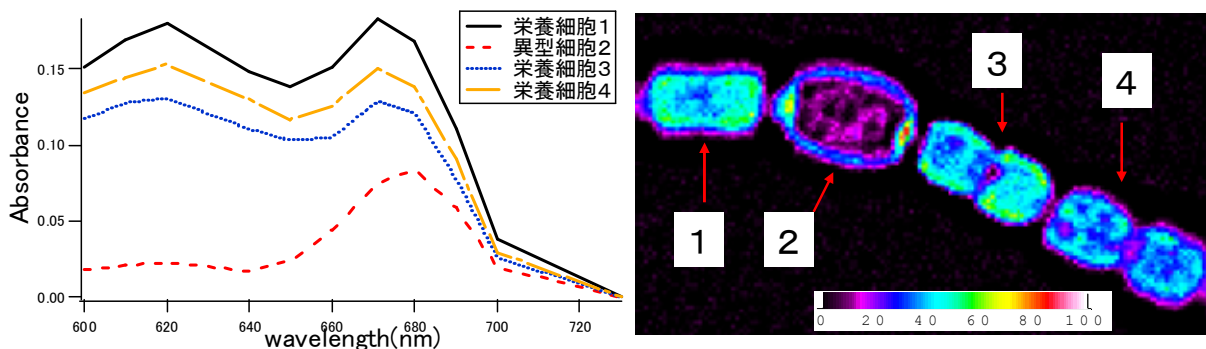


図2 顕微吸収スペクトルとその吸収像

[参考文献]

- 1、S.Kumazaki et al. Journal of Microscopy, Vol.228,2007,pp.240-254
- 2、T.Cardona et al. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics Volume 1787, Issue 4, April 2009, Pages 252-263