

2P-081

顕微蛍光スペクトルと蛍光寿命イメージング顕微鏡による
緑藻の窒素欠乏応答の分光分析

(京大院理¹、JST さきがけ²) ○津田裕美¹,寺嶋 正秀¹,熊崎 茂一^{1,2}

Responses of a green alga to nitrogen deprivation
analyzed by microscopic fluorescence spectra and fluorescence lifetime imaging
(Grad. Sch. of Sci., Kyoto Univ.¹ & JST-PRESTO²)

Yumi Tsuda¹, Masahide Terazima¹, Shigeichi Kumazaki^{1,2}

【序：背景】 光環境の過不足、無機栄養分の増減など、様々な環境ストレスに対し、植物や藻類の葉緑体光化学反応は様々な応答を示す。中でもタンパク質などの生体分子を構成する窒素は必須の元素である。窒素固定能力のない生物では、窒素欠乏によって多くの機能が損なわれるが、一時的な窒素欠乏状態を耐えしのぐ仕組みも備わっていると考えられる。葉緑体も窒素欠乏の影響を免れないが、短期間の応答では、内部のタンパク質を分解し、窒素を再利用する仕組みがあると考えられ、光合成光化学反応が変化していることが期待される。また、微細藻類では、窒素欠乏条件で細胞内に中性脂肪を蓄積するものが存在し、バイオ燃料生産に関連して高い関心が持たれている。

窒素欠乏条件における細胞内の変化はこのように多面的、複雑であり、多様な微細藻類が多様な環境に応じて示す生理的応答が十分明らかになったとは言い難い。多くの場合、細胞集団として細胞の特性、利用価値について評価されるが、より正確な細胞生理の解明には個々の細胞における応答を細胞内の構造と（光合成等の）反応を同時に観察しながら理解することが必要であると考えられる。我々は、細胞を生きたまま観察できる顕微分光から得られる情報を最大化し、葉緑体内エネルギー生産活動を捉えると同時に代謝産物の蓄積も同時に見ることで、藻類生理学に寄与し、有用藻類種の探索・観察・検査に役立てることを目指している。本講演では、窒素欠乏条件に置かれた緑藻の一種 *Parachlorella kessleri* について、顕微蛍光スペクトルと顕微蛍光減衰（数十 ps—数 ns の領域）を通して葉緑体光化学反応の変化を調べた。

【試料・装置・実験条件等】 自作ライン走査型励起蛍光スペクトル顕微鏡は主に励起波長 488nm を用いて、500-750nm の波長範囲、約 2nm の分解能で蛍光スペクトルが画素ごとに得られる[1]。その顕微鏡システムの光学ポートの一つにレーザー走査型共焦点蛍光寿命画像化(Laser-Scanning Confocal Fluorescent)機能を導入した。基本は市販システムであるが、2つの蛍光波長の同時観察が可能である。励起波長は 404nm、装置応答関数は約 0.10ns である。葉緑体(689nm)、中性脂肪染色色素 (BODIPY、540nm) 蛍光の寿命画像を同時に取得した。中性脂肪を蓄積する候補の緑藻として *Parachlorella kessleri* (ここでは単にクロレラと呼ぶ) を選んだ。これは我々自身による研究実績があることに加え[1]、現在まで中性脂肪蓄積に関する報告が無かったからでもある。運動能力が無いため、内部観察が容易である。窒素充足栄養培地(BG-11)で育ったクロレラを窒素欠乏培地(BG-11 からアンモニウム塩と硝酸塩を 2%未満にしたもの: BG-11(n0))へ移植し、20 日余りにわたり細胞の蛍光特性を調べた。

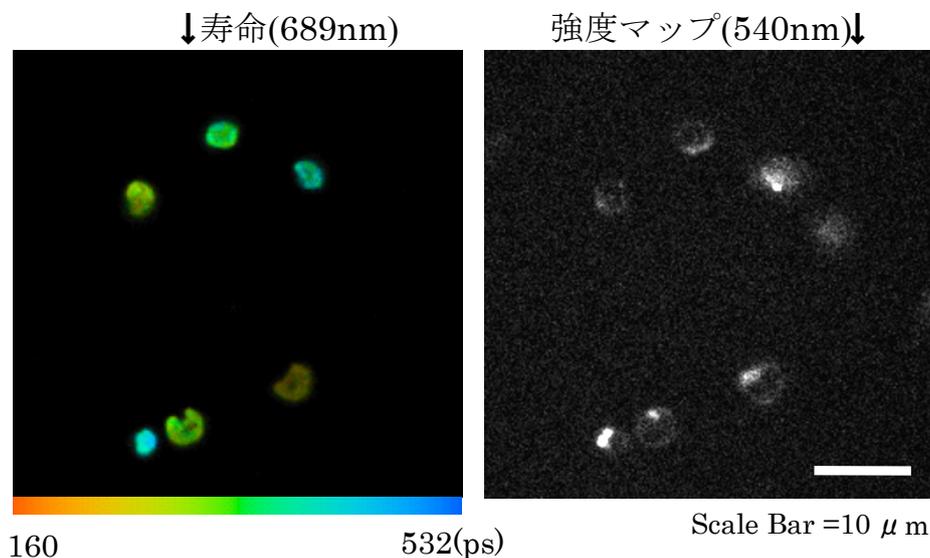
【結果と考察】 長期（数日—数十日）の窒素欠乏により、全体的な傾向として、葉緑体が縮小し、中性脂肪が蓄積することが観測された。BODIPY および葉緑体の蛍光領域を精査すると、蛍光スペクトルの形状変化が中性脂肪蓄積の多寡に依存して見られた。ただし、各蛍光物質(主にクロロフィルと BODIPY)の吸収スペクトルを考慮するとその変化は単純な再吸収効果で説明される可

能性を排除できなかった。蛍光スペクトルは異なる波長の強度比を比べるものであるが、顕微鏡対物レンズの焦点と対物レンズ先端までの間の物質分布に応じて、信号減衰率が波長に依存して変化する可能性がある。蛍光スペクトルの変形が、焦点の物質特性変化を反映するのか、焦点と対物レンズの間の物質分布を反映しているのか区別ができない。

それに対し、蛍光寿命は同じ波長の信号光子の到着時間に依存した信号であるから、寿命というパラメータは焦点と集光面間の光透過率には依存しない[2]。移植後7日目の窒素充足・欠乏両細胞それぞれについて、葉緑体の蛍光寿命画像を得た（下図はその1例）。そして、油脂蓄積量を反映すると考えられるBODIPY蛍光強度と比較した。各画素における蛍光減衰を2指数関数でフィッティングし、各画素の平均寿命を得た。更に、全ての画素の平均寿命を基に、寿命の頻度分布を得た。窒素充足・窒素欠乏共に寿命の分布範囲は100~数百psであった。また、頻度分布は、窒素充足条件下の細胞では一つの鋭い極大を示す、おおよそ対称的な形状であった。窒素欠乏条件下の細胞では鋭い極大はなく、なだらかな寿命分布を示した。すなわち、窒素充足細胞では多くの細胞で寿命分布が似通っていたが、窒素欠乏細胞では葉緑体蛍光寿命は様々であった。中性脂肪の蓄積量と葉緑体寿命の相関関係を現在解析中である。

現段階では、中性脂肪の蓄積評価は染色に依存している。非染色で蓄積量・分子種を判別するために、近赤外励起ラマン散乱スペクトル顕微鏡を準備中である。785nm-820nmでも葉緑体は強い自家蛍光（PSI蛍光が主成分）を示すので[1,3]、976nmまたは1064nmを励起波長に用いる[3]。

窒素欠乏7日目細胞 689nm / 540 nm 蛍光寿命画像



【参考文献】

- (1) M. Hasegawa, T. Yoshida, M. Yabuta, M. Terazima, and S. Kumazaki (2011) *J. Phys. Chem. B*, Vol.115(14), 4184-4194
- (2) S. Ogikubo, T. Nakabayashi, T. Adachi, MS. Islam, T. Yoshizawa, and M. Kinjo, N. Ohta (2011) *J. Phys. Chem. B*, Vol.115(34), 10385-10390
- (3) M. Ando, M. Sugiura, H. Hayashi, and H. Hamaguchi (2011) *Applied Spectroscopy*, Vol. 65(5), 488-492