4A08　近赤外励起顕微蛍光スペクトルを用いた窒素固定細胞分化過程における光合成膜変化の解析

(京大院理(1)・JST さきがけ(2))　熊崎茂一[1,2], 明里将志[1], 長谷川慎[2]

Transformation of Thylakoid Membrane during Differentiation for Diazotrophic growth Visualized by Microscopic Spectral Imaging

(Grad. Sch. of Sci., Kyoto Univ. & JST-PRESTO) Shigeichi Kumazaki[1,2], Masashi Akari[1], Makoto Hasegawa[1]

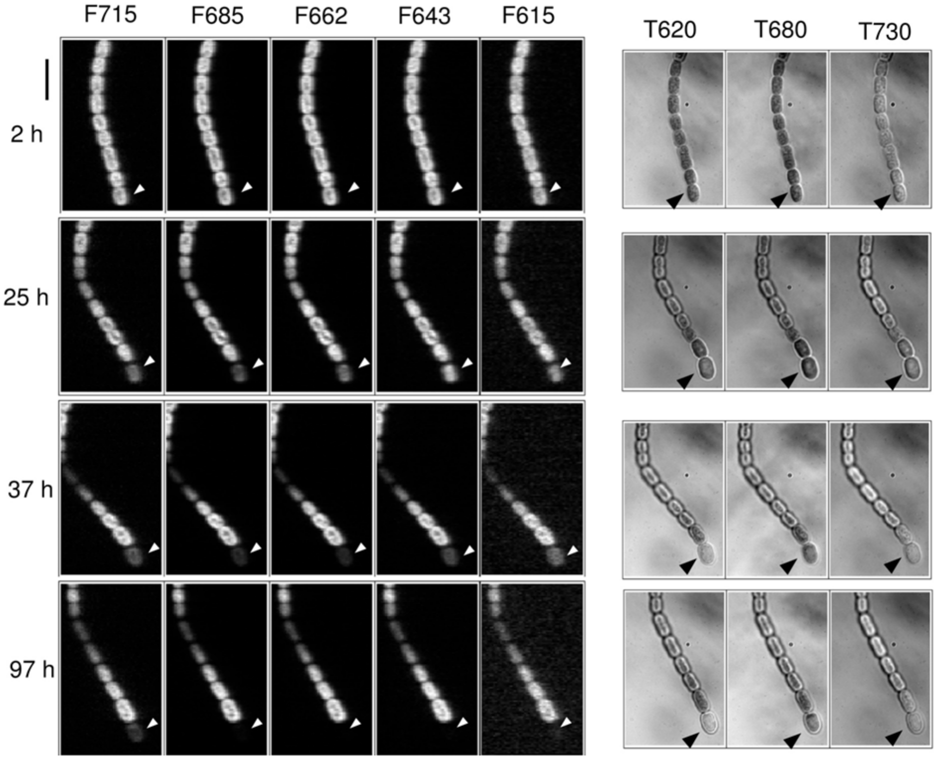
【背景・導入】一部のシアノバクテリアは窒素栄養源が不足する環境でも安定な２原子分子の N_2 からアンモニアなどの窒素化合物を作り出し(窒素固定)、自らの栄養素とすることができるので、最も貧栄養な環境でも生態系の初期基盤形成に不可欠である。窒素固定を行う酵素、ニトロゲナーゼは酸素によって不活性化されてしまうので酸素発生型光合成、とりわけ光化学系 II の反応と共存することができない。糸状に細胞が連結したシアノバクテリアであるアナベナの場合は数個から約２０個の細胞のうちの１個の細胞だけを異型細胞（ヘテロシスト）として細胞分化させ、その異型細胞でのみ窒素固定を行い､異型細胞では光化学系 II の量と活動を低下させる。しかし、光化学系 I は異型細胞でも残存し、光化学反応を維持すると言われている。それは光化学系 I のみで可能な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 生産を維持するためと言われている。ニトロゲナーゼによる窒素固定反応に必要な大量の ATP を供給するために光化学系 I が必要とされる。このように酸素発生型光合成を行う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。また、酸素発生型光合成を持続する異型細胞以外の細胞（栄養細胞）では光化学系 II と光化学系 I は維持されるが、一時的な窒素欠乏が何も引き起こさないはずはない。それらの知見が不足しているのは高い感度で高速に細胞毎の蛍光スペクトルを得る方法が市販の顕微鏡を基本にした装置で未発達であったためであろう。我々は細胞毎の顕微蛍光スペクトルと顕微吸収スペクトルを得ることができるので、これを用いて、窒素欠乏後に異型細胞が形成される生理的な過程の一部始終を観測することを行ったので報告する。

【方法】窒素充足条件下で培養されていた糸状連結シアノバクテリア *Anabaena variabilis* を窒素欠乏培養条件に移植した時刻をゼロ時間とし、その後１２－２４時間ごとに、同一フィラメント上に連結された数個の細胞の顕微蛍光スペクトルと顕微吸収スペクトルを６０－９６時間にわたって観察した。　顕微分光の励起は近赤外パルスレーザー(808 nm)による２光子励起と近赤外連続発振レーザー(785 nm)による１光子励起を採用し、蛍光スペクトルは 600 nm から 755 nm で 2 nm の波長分解能で得た。全ての顕微蛍光スペクトル取得は既報のライン走査型顕微分光システムに依った。顕微吸収スペクトルは、ハロゲンランプと顕微鏡コンデンサの間に置かれた十一色の単色バンドパスフィルターを自動で回転させて１１枚の単色照明明視野像を得て、測定対象細胞の有無による透過率の比から計算した。

【結果】二光子励起顕微蛍光スペクトルでは光化学系 II と光化学系 I からのクロロフィル蛍光、および主に光化学系 II に励起エネルギー供給するフィコビリン色素とタンパク質の複合体（フィコビリゾーム）の蛍光スペクトルが観測された。フィコビリゾームのサブユニット毎に異なる崩壊過程を観測した。近赤外１光子励起では光化学系 I が純度高く検出され、光化学系 I の変化を

これまでにない精度で細胞毎に見積もることに成功した。さらに顕微吸収スペクトルにより細胞毎の色素絶対量の評価も同時に行うことができ、異型細胞でフィコビリゾームの減少が起きるがクロロフィルの吸収スペクトルが残存することが確認できた。

細胞分化誘導後の時間（０時間　－　１０日以上)、励起方式（近赤外２光子励起または近赤外１光子励起)、栄養細胞と異型細胞の区別等により様々な顕微蛍光スペクトルが合計１６２５個得られた。これらを網羅的に解析するため特異値分解を用いてデータ全体を説明するに必要十分な成分蛍光スペクトルを得た。各成分の時間変化の解析から、「光合成膜が酸素発生型から窒素固定支援型へと変貌するダイナミクスを描写する分子モデル」へと到達することができた。



左は蛍光スペクトルイメージングデータから波長を区切って得た単色蛍光画像、右は単色照明明視野像。F685 は中心波長 685nm の蛍光画像、T680 は透過光の中心波長が 680nm であることを示す。白または黒の矢印の先は異型細胞の位置を示す。左端の時間は窒素欠乏後の経過時間。
左端上の黒いスケールバーは 10 µm。

【参考文献】

（１）*S. Kumazaki, M. Hasegawa, M. Ghoneim, Y. Shimizu, K. Okamoto, M. Nishiyama, H. Oh-oka and M. Terazima　(2007)　*J. Microsc.* Vol. 228, 240 – 254.

（１）熊崎茂一*　長谷川慎　(2011)　分光研究, vol. 60 , No.1, pp19-21

（２）熊崎茂一　　(2011)　生物物理　Vol. 51(6), 274-275

（３）M. Hasegawa, T. Shiina, M. Terazima, and S. Kumazaki,* (2010) *Plant Cell Physiology,* 51(2), 225 – 238

（４）M. Hasegawa, T. Yoshida, M. Yabuta, M. Terazima and S. Kumazaki* (2011)
J. Phys. Chem. B, 115, 4184 – 4194,

<* = corresponding author>