

3P081

新規緑藻 *GOD-42* 株の多光子分光イメージング

(筑波大・数理¹,東大院・理²,筑波大・生命環境³)

○大野 智哉¹,石塚 圭¹,瀬川 尋貴²,吉田 昌樹³,渡邊 信³,加納 英明¹

Multi-photon spectroscopic imaging of strain *GOD-42*, a new species of green algae

(Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba¹
Department of Chemistry, School of Science, the University of Tokyo²
Graduate School of Life and Environmental Science, University of Tsukuba³)

○Tomoya Ono¹,Kei Ishitsuka¹,Hiroki Segawa²,Masaki Yoshida³,
Makoto Watanabe³, and Hideaki Kano¹

s1520330@u.tsukuba.ac.jp

【序論】近年、微細藻類が産生する代謝物をエネルギー資源として利用するための研究が世界各地で行われている。中でも、緑藻 *Botryococcus braunii* は、高い脂質蓄積能と光合成による生育という利点から注目を集めている。しかし、この種は生育速度の遅さゆえ、実用化には至っていない。これに対して、2010年新規に単離された緑藻 *GOD-42* 株は *Botryococcus braunii* の3倍の早さで生育するという特徴を持つため、遺伝子組換えなどの研究の進展で脂質生産効率が *Botryococcus braunii* を上回る可能性がある。本研究では、*GOD-42* 株の新規藻類としての特徴の解明や代謝物の様子を、細胞に前処理することなく観測することを目標にした。そこで、単一細胞内における分子の情報を非染色かつ非標識に取り出すことが出来る非線形光学現象を利用して、*GOD-42* 株のマルチモーダル多光子分光イメージングを行った。

【実験系】実験には、当研究室で開発したマルチモーダル多光子分光顕微鏡^[1]を用いた。本装置では、コヒーレント・アンチストークス・ラマン散乱(Coherent Anti-Stokes Raman Scattering; CARS)、第二高調波発生(Second Harmonic Generation; SHG)、第三高調波発生(Third Harmonic Generation; THG)、二光子励起蛍光(Two-Photon Excitation Fluorescence; TPEF)を同時に観測することができる。CARSの発生のために必要な二つの光源としては、自家蛍光回避のため生体の測定に適している近赤外1064 nmに中心波長をもつレーザーをポンプ光として、広帯域の波長成分(1100 nm~1700 nm)を持つ白色レーザー(スーパーコンティニューム光)をストークス光として用いた。測定サンプルには、細胞と培地の懸濁液をスライドガラスとカバーガラスで挟み、プレパラートとした。これを顕微鏡上のピエゾステージにセットし、サンプルスキャンにより各点でのスペクトルを取得した。

【結果・考察】細胞内から得られたスペクトルの一例を図1に示す。近赤外域(800 nm~1000 nm)にはCARSシグナルが検出された。可視域においては532 nmの付近にSHGシグナルが、また680 nm付近にはブロードな形状をした、クロロフィルからのTPEFシグナルが観測された。図内において(*)で示した蛍光の上に重畳した楕状の鋭いピークは、ストークス光の切残しによるものである。また、(†)で示した信号は特異的に大きな強度を与えているが、これはTHGシグナルの二次回折光とストークス光の切残し(*)が重畳しているためである。この信号を用いることで、測定波長領域にないTHGの情

報も取得することが出来た。以上のスペクトルを解析して、各バンドの強度情報から再構成したイメージを図2に示す。(b)のSHGイメージからは中心対称性の崩れた構造を持つ分子の局在が、(c)のTHGイメージからは界面が、(d)のTPEFイメージからは細胞に存在するクロロフィルが可視化されている。(e)と(f)はCARSスペクトルから再構成したイメージである。(e)はC=C-H伸縮に、(f)はCH₂対称伸縮に由来するバンドであり、脂質の局在を表している。このイメージから、光学像(a)において見られる細胞内の小胞には脂質が蓄えられていることが示唆される。このように、色素体を有する生細胞に関しても、様々な分子情報を含んだイメージの取得に成功した。本研究では特に、図3(a)の光学像における四角枠内の細胞からSHGの信号が得られたことに注目した。このSHGシグナルの強度は図2(b)におけるそれより10倍以上大きく、発生源が異なると予想された。この信号が顆粒状に出ていることや、SHG輝点から得られたCARSスペクトルが脂質やタンパク質のものとは異なっていること、そしてモデル物質として測定した片栗粉のスペクトルとの比較図3(c)や既報 [2]により、このSHGの発生源はデンプンであることを同定した。

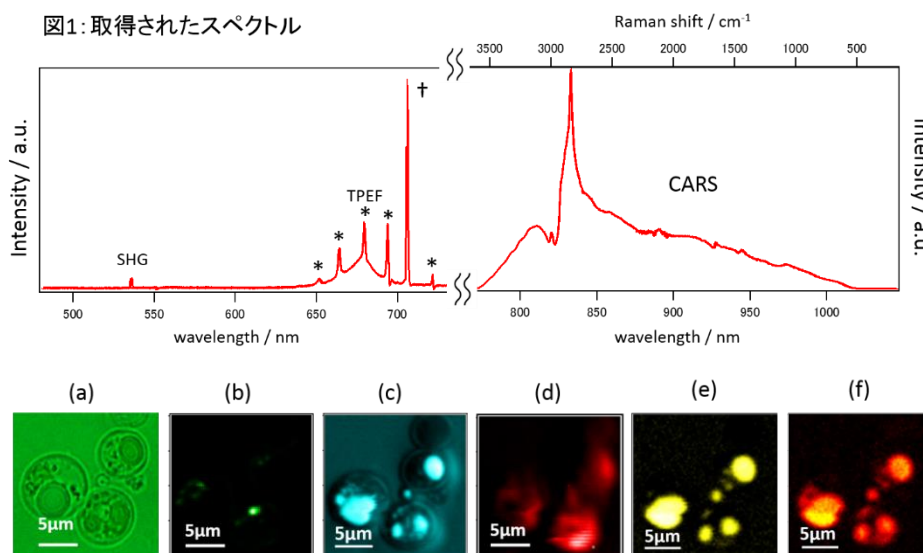


図2: イメージ (a)光学像 (b)SHG像 (c)THG像 (d)TPEF像 (e)3000 cm⁻¹ [C=C-H str.] (f)2844 cm⁻¹[CH₂ str.]

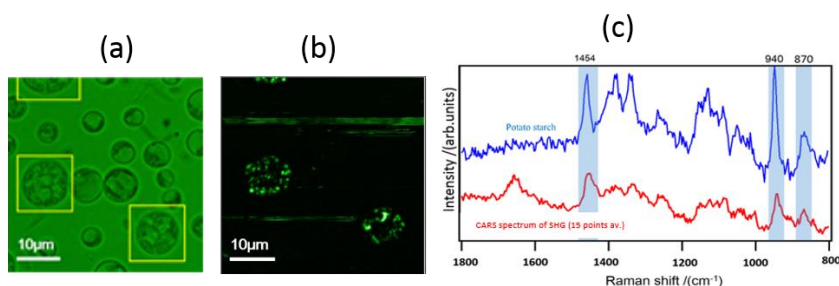


図3: (a)光学像 (b)SHG像 (c)片栗粉でんぷんとSHG輝点でのCARSスペクトルの比較

【参考文献】

- [1]H.Segawa, M.Okuno, V.couderc, H.Kano and H.Hamaguchi, *Opt. Express*, 20, 9551-9557 (2012)
- [2]G.Mizutani, Y.Sonoda, H.Sano, M.Sakamoto, T.Takahashi, S.Ushioda