

3P104

軟X線 1 細胞顕微分光による生きた細胞の炭素窒素比の直接計測
(立命館大・理工¹, 立命館大・生命科学², 立命館大・SR センター³)

○寺本 高啓¹, 浅井 智広², 寺内 一姫²,
吉村 真史³, 太田 俊明³

Direct determination of carbon to nitrogen ratio of living cell
with single cell soft X-ray microscopy

(College of Science&Engineering, Ritumeikan Univ. ¹, College of Life Science, Ritumeikan
Univ. ², SR center, Ritsumeikan Univ. ³)

○Takahiro Teramoto¹, Chihiro Azai², Kazuki Terauchi²,
Masashi Yoshimura³, Toshiaki Ohota³

【序】

近年、細胞生物学的な研究では、観察した細胞の形態や性質を“定量化”することが求められ始めている。例えば細胞の形状を表現する場合でも、単に丸い、四角いといった定性的な情報ではなく、表面の各点での曲率はどれくらいかなどの定量的な情報が求められる。このような研究分野はバイオイメージングインフォマティクスと呼ばれ、画像処理とバイオイメージングの融合分野として確立しつつある。

入射光源として軟 X 線 (波長 : 0.1~10nm) を用いたイメージング法は、光の回折限界で決まる原理的な空間分解能が高い (<100nm) という点に加え、C,N,O など軽元素の内殻 1 s 軌道の電子遷移による元素選択的な観察が可能という特徴を持つ。特に波長 2.3~4.4nm の軟 X 線は「水の窓」領域と呼ばれ、水による吸収に比べてタンパク質をはじめとする生体内の炭素化合物の吸収が強く、細胞の無標識での透過画像撮影が可能である。

糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC7120 は窒素固定を行う原核光合成生物である。その形態は細胞が 1 次元に連なった糸状体であり、多くは光合成を担う栄養細胞であるが、10 個に 1 個程度の割合で窒素固定に特化した異型細胞 (ヘテロシスト) を持つ (図 1)。ヘテロシストと栄養細胞は、どちらも単独では窒素欠乏環境下で生育できず、ヘテロシストが固定した窒素をアミノ酸として栄養細胞に供給し、栄養細胞はヘテロシストに糖や有機酸などの光合成産物を供給している。ヘテロシストの形成には特定のアミノ酸や有機酸の組成変化が深く関わっており、ヘテロシストと栄養細胞では細胞内の炭素窒素比 (C/N 比) が大きく異なっていると考えられている。しかし、これまでに C/N 比の違いを単一細胞レベルで実測した例はなく、ヘテロシスト形成に必要な C/N 比の閾値など、細胞内の C/N 比と細胞分化の定量的な関係は不明である。

本研究では、窒素の K 吸収端前後における軟 X 線を用いた単一細胞のイメージングにより、*Anabaena* sp. PCC7120 におけるヘテロシストおよび栄養細胞のそれぞれの C/N 比の直接決定を試み、バイオイメージングインフォマティクスに細胞内の元素濃度分布という新たな機軸を付加することを提案する。

【実験】

立命館大学 SR センターのビームライン BL12 に設置された軟 X 線顕微鏡を用いて、*Anabaena* sp. PCC7120 の栄養細胞およびヘテロシストの顕微観察を行った。

試料を厚さ 100 nm の Si_3N_4 膜に封入し、光学顕微鏡および蛍光顕微鏡を用いてヘテロシストおよび栄養細胞の位置を確認した。窒素 K 吸収端より短波長(2.98 nm)ならびに長波長(3.11 nm)での観察像を統計的に解析し(栄養細胞:146 個、ヘテロシスト:54 個)、栄養細胞とヘテロシストそれぞれの平均の吸光度を決定した。

【結果と考察】

波長 2.98 nm および 3.11 nm を用いた栄養細胞ならびにヘテロシストの観察画像を図 2 に示す。赤で囲った細胞がヘテロシストであり、周辺の細胞は栄養細胞である。この観察結果からヘテロシストのほうが栄養細胞よりも暗い、すなわち高い吸光度を示すことがわかる。各細胞の吸光度のヒストグラムを図 3 に示す。栄養細胞とヘテロシストではヒストグラムの中心値、分散が異なる。平均の吸光度は、波長 2.98 nm では栄養細胞 0.53、ヘテロシスト 0.73 で、波長 3.11 nm では栄養細胞 0.44、ヘテロシスト 0.51 となり、ヘテロシストのほうが栄養細胞に比べ 1.2~1.4 倍程度高い吸光度を示した。これはヘテロシスト内に特定の化合物が蓄積していることを示唆している。ヘテロシストが栄養細胞からの分化過程では、 α ケトグルタル酸とその含窒素誘導体であるグルタミン酸の濃度比が初期シグナルとなり、ヘテロシスト分化誘導タンパク質や糖の蓄積が誘導されることから、観測された吸光度の差はこれらの化合物の局在化が反映されたものと考えられる。

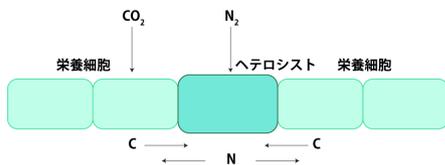


図 1

Anabaena sp. PCC 7120 の
栄養細胞とヘテロシスト

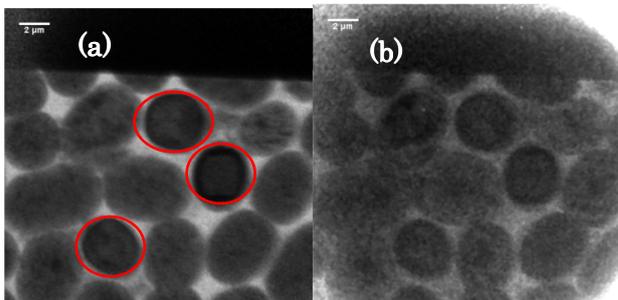


図 2

Si_3N_4 膜に封入した生きた
Anabaena sp. PCC 7120 の
軟 X 線顕微画像(a) $\lambda = 3.11$ nm (b) 2.98 nm

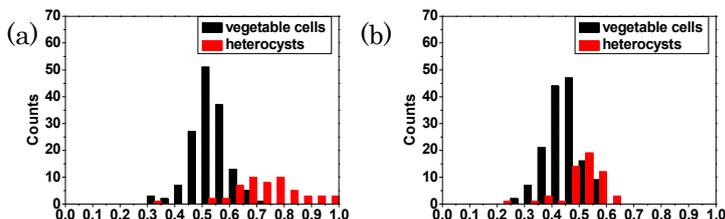


図 3

栄養細胞(黒線)とヘテロシスト(赤線)の吸光度のヒストグラム (a) $\lambda = 3.11$ nm (b) 2.98 nm