

軟X線顕微分光による生きたシアノバクテリア中の 細胞内元素分布の可視化

¹立命館大理工, ²立命館大生命科学, ³立命館大SRセンター
○寺本高啓¹, 浅井智広², 吉村真史³, 寺内一姫², 太田俊明³

In vivo visualization of intracellular elemental distribution in cyanobacteria by soft X-ray microspectroscopy

○Takahiro Teramoto¹, Chihiro Azai², Kazuki Terauchi²,
Masashi Yoshimura³, Toshiaki Ohta³

¹ College of Science&Engineering, Ritumeikan Univ.

² College of Life Science, Ritumeikan Univ.

³ SR center, Ritsumeikan Univ.

【Abstract】 By using a soft X-ray with wavelengths from 2.3 to 4.4nm (called “water window region”), cells could be microscopically observed *in vivo* without preparations such as staining and slicing. Filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 is a photosynthetic prokaryote assimilating nitrogen. Most of cells in the filament are “vegetative” and responsible for oxygenic photosynthesis, while atypical cells named “heterocysts” are specialized for nitrogen fixation. It is believed that the intracellular carbon-nitrogen ratio (C / N ratio) is deeply related to the heterocyst differentiation from vegetative cell when nitrogen deprivation, but the quantitative information is unknown so far. In this study, we developed a method to determine the C / N ratio of a cell *in vivo* by using a soft X-ray microscopy and applied it to the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. We successfully demonstrated that the C/N ratio of heterocyst is significantly lower than that of vegetative cell.

【序】

照明光源として「水の窓」と呼ばれる軟 X 線(波長: 2.3~4.4 nm)を用いた軟 X 線顕微鏡は、1). 波長が短いため高い空間分解能(<100nm)が達成可能、2). 厚み 15 μ m 程度までの試料は断片化を行わずに観察可能、3). C や N など軽元素の内殻 1s 軌道に由来する吸収があるためタンパク質など生体関連分子を元素選択的に観察できる、といった特徴を持つ。これらにより軟 X 線顕微鏡では、生きたままの細胞を色素標識や断片化などの前処理を行わずに高分解能で顕微観察することができる。

糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 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。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。栄養細胞からヘテロシストへの分化は、栄養細胞中の特定の有機酸の蓄積が引き金となると考えられており、同時に細胞内の炭素窒素比(C/N 比)も大きく変化していると考えられている。しかし、これまでに C/N 比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 K 吸収端前後における軟 X 線を用いた軟 X 線顕微分光法により、生きた細胞における C/N 比を直接決定することを目指した。

【方法 (実験・理論)】

実験は立命館大学 SR センターの軟 X 線顕微鏡ビームライン BL12 にて行った。本研究で使用した軟 X 線顕微鏡は、使用波長を 2.3~4.4nm の間で選択可能($E/\Delta E=300$)、空間分解能 72nm、倍率 600 倍のスペックを持つ明視野顕微鏡である。

試料(糸状性シアノバクテリア)は厚さ 100 nm、 $250 \times 250 \mu\text{m}^2$ の 2 枚の 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。その後、窒素 K 吸収端付近より短波長(2.98 nm)ならびに長波長(3.11 nm)の軟 X 線を用いた軟 X 線顕微鏡で細胞を透過観察した。細胞の有無の顕微画像を撮影し、それらの画像から入射軟 X 線に対する各細胞の吸光度を求めた。

窒素 K 吸収端近傍の軟 X 線に対し、吸光度に寄与する細胞の構成元素は C と N に限定できる。そのため吸光度 $A(\lambda)$ は $A(\lambda) = (\varepsilon_c(\lambda)c_c + \varepsilon_N(\lambda)c_N)\ell$ と記述できる。ここで $\varepsilon_i(\lambda)$ 、 c_i はそれぞれ元素 i (i は C または N) の吸収断面積と濃度、 ℓ は光路長である。2 つの異なる波長での吸光度の比から以下のような関係式が得られる。ここで R は C/N 比である。

$$\frac{A(\lambda_1)}{A(\lambda_2)} = \frac{\varepsilon_c(\lambda_1)R + \varepsilon_N(\lambda_1)}{\varepsilon_c(\lambda_2)R + \varepsilon_N(\lambda_2)} \quad (1)$$

$$R = \frac{c_c}{c_N} \quad (2)$$

【結果・考察】

図 1 に軟 X 線顕微鏡で観察したシアノバクテリアの顕微画像を示す。これらの軟 X 線顕微画像から 1 細胞あたりの吸光度を求め、式(1)を用いて C/N 比を求めた。図 2 は栄養細胞(131 個)とヘテロシスト(54 個)それぞれの C/N 比をヒストグラムで表示したものである。それぞれの細胞におけるヒストグラムの中心値と分散は、栄養細胞で 4.56、10.7 となり、ヘテロシストでは 2.42、1.38 であった。ヘテロシストでは栄養細胞より C/N 比が低い、すなわち N の相対比が高いことが示された。

講演では、上記詳細を説明するとともに 2 次元顕微画像および 3 次元トモグラフィ画像から細胞内の C/N 比を直接可視化することに成功したので合わせて報告する。

【参考文献】

- [1] T.Teramoto, M.Yoshimura, C.Azai, K.Terauchi, &T.Ohta, *J.Phys. Conf.* **849**, 012005 (2017).

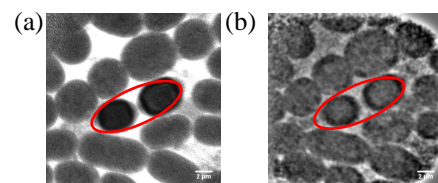


図 1. *Anabaena* sp. PCC 7120 の (a)軟 X 線 ($\lambda=3.11\text{nm}$) (b)軟 X 線($\lambda=2.98\text{nm}$)顕微画像。赤丸：ヘテロシスト、他：栄養細胞

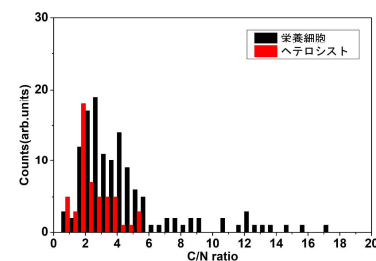


図 2. *Anabaena* sp. PCC 7120 の栄養細胞およびヘテロシストの C/N 比