

培養初期におけるオーランチオキトリウム (*Aurantiochytrium*) の マルチモーダル非線形光学イメージング

¹筑波大院 数理, ²筑波大院 生命環境

○千葉祐介¹, 石塚圭¹, 吉田昌樹², 渡邊信², 加納英明¹

Multimodal nonlinear optical imaging of *Aurantiochytrium* in the early stage of cell culture

○Yusuke Chiba¹, Kei Ishitsuka¹, Masaki Yoshida², Makoto M Watanabe², Hideaki Kano¹

¹ Faculty of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba

² Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

【Abstract】 Algal biomass produced by microalgae has attracted much attention as alternatives of existing energy sources such as fossil fuel and terrestrial plant biomass. In particular, *Aurantiochytrium* species accumulate very high amounts of squalene, which is regarded as one of the most promising next-generation biofuels. Concerning high lipid-accumulation capability, Exploring the cell species with their high growth rate are indispensable Recently, we found that second harmonic generation (SHG) could be used to screen out the cell species with high growth rate in the early stage of cell culture [1]. In the present study, we performed SHG and multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) imaging of *Aurantiochytrium* to investigate the cell growth process in the early stage.

【序】 藻類バイオマスは非耕地での生産が可能であり、脂質蓄積能が高いことから、陸上植物よりも高効率で生育が可能である。様々な藻類の中で特に注目を集めているのが、オーランチオキトリウム(*Aurantiochytrium*)という藻類である。この藻類は、亜熱帯から熱帯のマングローブ域に多く生息し、従属栄養生物であるものの、高い増殖速度や脂質蓄積能を併せ持っている。オーランチオキトリウムは、主にスクアレンを主成分とする炭化水素系オイルを乾燥重量あたり 20%以上産生するため、次世代の石油代替エネルギー源として注目されている。

その一方で、藻類バイオマスの資源実用化には課題も存在する。オーランチオキトリウムの場合、スクアレンがどのような環境条件でどの培養時期に最も多く産生するか、という培養条件を検討する際、現在は破壊検査による組成分析を行っている。しかしながら、スクアレンを多く産生する細胞を効率的にスクリーニングするためには、細胞一つ一つを生きたまま、そのままの状態での分析することが必須である。そこで本研究では、オーランチオキトリウムが急激に増殖する。特に培養初期 (18-24 時間培養後) にターゲットを絞り、Second Harmonic Generation (SHG)及び Coherent anti-Stokes Raman Scattering (CARS)等を用いたマルチモーダル非線形光学イメージングを行った。

【方法】

測定には、我々の研究室で立ち上げた CARS 分光イメージングシステムを用いた。光源にはマイクロチップ Nd:YAG レーザー（中心波長 1064nm）を用いた。1064nm のパルス光を二つの光に分け、一方を ω_1 光、他方をフォトニクス結晶ファイバーに導入し、広帯域スーパーコンティニューム光 ω_2 を発生させた。光源の繰り返し周波数は 33kHz、パルス幅は約 800ps である。出射後の出力は ω_1 が 170mW、 ω_2 が 80mW である。二つの光パルスの光路長を適切に調整し、かつ顕微鏡に同軸上に導入するように最適化した。

実験にはスクアレン産生能の最も高い *Aurantiochytrium mangrovei* 18W-13a 株を用いた。サンプルは、培養 19 時間後に固定した細胞を用いた。細胞の懸濁液をスライドガラス及びカバーガラスで挟みプレパラートとし、これを顕微鏡のステージにマウントし、サンプルをスキャンすることで分光イメージを取得した。イメージングに要する時間はおよそ 8 分であった。

【結果・考察】

図 1 (a) に光学像を示す。同一視野での 2928cm⁻¹ における CARS イメージ及び SHG イメージがそれぞれ (b) 及び (c) に示されている。興味深いことに、細胞内に複数の SHG 輝点(赤矢印)が見られた。この SHG 輝点の位置における平均 CARS スペクトル ($\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトル) を図 1(d) に示す。指紋領域において鋭い特徴的なバンドが多数観測された。特に 670cm⁻¹ における鋭いバンドは、C-S 伸縮振動であると同定できる。以上のように、培養初期において SHG 活性な特殊なオルガネラが出現し、かつそれが C-S 結合を持つことを見出した。

【参考文献】

[1] K. Ishitsuka *et al*, *J.Raman spectosc.* 48, 8 (2017).

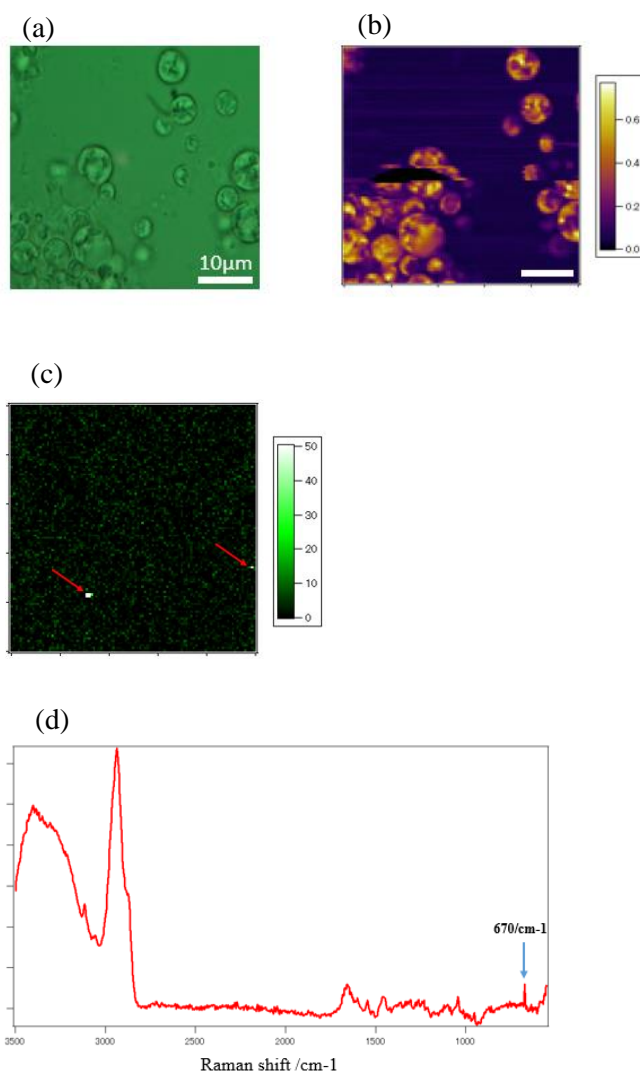


Figure 1(a) optical image, (b) CARS image@2928 cm⁻¹, (c) SHG image, (d) Averaged $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ spectrum at the SHG spots position.