

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00572

研究課題名(和文) 軟X線マイクロCT法による植物プランクトンの細胞外代謝物が含有する有機物の定量

研究課題名(英文) Estimation of organic carbon content of extracellular polymeric substances of plant plankton by soft X-ray microscopy

研究代表者

楠本 邦子(竹本邦子)(KUSUMOTO, Kuniko (TAKEMOTO, Kuniko))

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80281509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：天然水中に存在し、汚濁物質として問題となっている有機物には、植物プランクトン由来で、他の方法では把握が困難で、主に多糖類から成る細胞外代謝物(EPS)がある。EPSに含まれる有機物量を正確に計測するため、細胞とEPSに含まれる元素を軟X線顕微鏡法で詳細に調べた。X線吸収微細構造(XAFS)による細胞内の構造体の同定とX線マイクロCT法によるEPSの基本構成物質であるアガロースのX線顕微鏡像の取得に成功し、EPSに含まれる有機物量をより正確に計測する方法を開発することができた。

研究成果の概要(英文)：Refractory organic matter is one of the most severe environmental problems of the day in Lake Biwa. The extracellular polymeric substances (EPS) derived from plant plankton cells are mainly polysaccharides and proteins. Generally, EPS is a matter that looks clear inside when viewed under an optical microscope. EPS contains a large amount of water. It is difficult to observe EPS with the microscope and to analyze the components of EPS. Soft X-ray microscopy (XM), X-ray micro-computed tomography (CT) and X-ray absorption fine structure (XAFS) have been applied to observing and analyzing the cell and EPS and succeeded in identifying a prokaryotic organellar. As a result, we improved the soft X-ray microscopy (XM)-based method for estimating the organic carbon content of EPS.

研究分野：軟X線顕微分析

キーワード：軟X線顕微鏡法 植物プランクトン 細胞外代謝物 X線マイクロCT法 X線吸収微細構造 含有有機物量

### 1. 研究開始当初の背景

水域の生活環境では、有機物による汚濁の影響を最も多く受ける。公共用水域の水質は、水質の環境基準項目として、河川では生物化学的酸素要求量(BOD)を、湖沼と海域では化学的酸素要求量(COD)を代表項目として用いている。BODやCODの環境基準の達成率は、平成23年度88.2%、平成24年度88.6%と年々改善されているが、水域別の達成率(平成24年度)を見ると、河川93.1%、海域78.8%に対し、湖沼では55.3%と極めて低い[1]。さらに、汚濁物質の排出抑制策により流域から湖沼への流入汚濁負荷が減少傾向にあるにもかかわらず、全国の湖沼や閉鎖性内湾では難分解性有機物の増加・蓄積が報告されている。琵琶湖でもCODは減少傾向を示していないが、BODについては減少傾向を示している(CODとBODの乖離現象)[2]。

CODとBODの乖離現象は、湖内で生物が分解できない難分解性有機物の増加を示唆している。近年、難分解性の有機物の発生源として問題となっているものに、植物プランクトンが産生する細胞外代謝産物(extracellular polymeric substances, EPS)がある。EPSは細胞表面や周辺に存在する高分子状有機物で、多糖類や蛋白質などからなっている。さらに、多くのシアノバクテリアは大量のEPSを有しており、それらの量的および質的把握が求められている。

EPSは透明なスライム(寒天質)状の物質で観察が難しい。一瀬(滋賀県琵琶湖環境科学研究センター)等は、墨汁染色法により細胞容積を測定し、レクチン染色法により単糖組成を評価した。しかし、EPSに含まれる有機物の定量は、プランクトンの大量培養、細胞数計測、EPSの分離、化学分析など操作手順が多く、時間も掛かる。さらに、ピコ植物プランクトンなどの微細なプランクトンの中にはEPSの存在自体が明確に示されていないものが存在し、現在、量的および質的にも計測対象になっていない種も多い。これもBODの過小評価の原因の一つと推察される。

申請者は、従来法では観察も定量も困難なESPに含まれる有機物を、軟X線顕微鏡(XM)で取得したX線顕微画像から有機物量を計測する方法を考案した。これを、ピコ植物プランクトン *Synechococcus* sp. に適応し、EPSの定量に成功した[3]。軟X線顕微法は、主に物質を透過するX線の吸収量の差をイメージングする顕微法である。X線吸収率は物質により異なり、原子番号が大きいほど大きくなる傾向がある。このため、構成元素に違いがあれば、試料に特別な染色を施すことなくX線像を得ることができる。更に、「水の窓」と呼ばれる酸素と炭素のK吸収端の間の280-540 eVのエネルギー域では、蛋白質や糖等の生体高分子の吸収率が水の吸収率に比べ1桁以上大きい(図1)。このため、生体高分子を水の存在を意識することなく観察することができる。また、X線は電子線に比べて

物質中での単位深さあたりのエネルギー損失が小さいため、電子顕微鏡(EM)よりも高い透過性が見込まれる。XMは分解能ではEMに敵わないが、EMに比べ厚い試料(~10 $\mu$ m)を観察することができる。さらに、焦点深度が大きいのでコンピュータ断層撮影(CT: Computed Tomography)が可能となっており、生に近い状態で試料観察ができる。

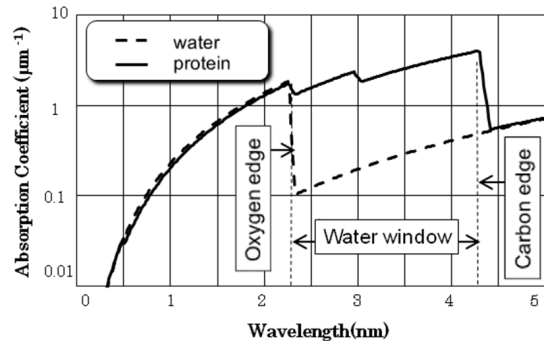


図1 軟X線領域のX線吸収係数 [4]

[1] 平成26年版 環境・循環型社会・生物多様性白書

[2] 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 研究報告書平成21年度, 6(2011)

[3] Y. Niiyama, et. al., *Fottea*, 16(2016) 1-11.

[4] 竹本邦子 et al., 日本水処理生物学会誌, 47(3):131-135 (2011).

### 2. 研究の目的

天然水中に存在する有機物の中で、植物プランクトン由来で、他の分析法や顕微法では把握が困難である主に多糖類からなり、EPSに含まれる有機物量を、軟X線マイクロCT法で計測する方法の確立のため、以下の研究を行った。

(1) EPS観察のための透過型軟XM試料固定法の開発および関連技術の最適化

(2) 細胞とEPSの識別と原核細胞オルガネラの同定

観察対象は、ピコ植物プランクトン *Synechococcus* sp. 以外に、琵琶湖に生息する全ての植物プランクトンとした。

### 3. 研究の方法

(1) EPS観察のための透過型軟XM試料固定法の開発および関連技術の最適化

ピコ植物プランクトン以外の大型の植物プランクトンに適応するため、EPSだけを透過型軟XMで観察する方法として、ガラス管状のセルにEPSのみを充填し、観察する方法の検討を行った。

ガラス管をプーラで局所加熱して引き伸ばし、良好なX線透過率と適度な剛性および形状を持ったガラスキャピラリー(直径10 $\mu$ m以下、ガラス壁厚100nm以下)を作製し、試料セルとした。

ガラスキャピラリーへのEPSの充填法の検討を行った。ガラスキャピラリーへのEPS

充填の検証は、モデル試料（直径 500 nm の着色ポリスチレンラテックス微粒子を含むアガロースゲル）を用いた。分散状態の確認は、軟 X 線マイクロ CT 法で行った。試料を -160 で凍結し XM 観察した。観察には、酸素の K 吸収端より低いエネルギーの X 線を用いた。このエネルギーの X 線は、水の構成要素である酸素に対する透過率が極めて高く、水中のラテックス微粒子でも、高いコントラストの X 線吸収像を得ることができる。一般に、ラテックス球は溶液内で沈殿凝集する。CT 法で、ガラスキャピラリー内で適度に分散したラテックス球を観察することができれば、アガロースゲルがガラスキャピラリーに充填されていることが示される。

## (2) 細胞と EPS の識別と原核細胞オルガネラの同定

X 線顕微画像から、EPS を切り出すためおよび細胞の X 線吸収係数取得のため、細胞と EPS の識別法の検討と原核細胞オルガネラの同定を、主に、走査型透過軟 XM で行った。

試料は *Synechococcus* sp. と *Pseudanabaena foetida* nom. nud. (*Phormidium tenue* 緑株、以下 PTG とする) とした。琵琶湖から単離した PTG を 2 週間から 12 週間培養した。培養は、滋賀県琵琶湖環境科学研究センターで行った。

細胞懸濁液をシリコン窒化膜上に滴下し、風乾した試料を用意した。CT 法には開発したガラスキャピラリーを用いた。高分解能軟 XM 観察および CT は、立命館大学 SR センターの結像型軟 X 線顕微鏡ビームライン (BL-12) で行った。元素マッピングと X 線吸収微細構造 (XAFS) は、分子科学研究所極端紫外光研究施設 (UVSOR) の走査型透過 X 線顕微鏡ビームライン (STXM BL4U) で行った。

## 4. 研究成果

### (1) EPS 観察のための XM 試料の開発および関連技術の最適化

いくつかの方法でガラスキャピラリーへのモデル試料の充填を検討した。吸引法でモデル試料がガラスキャピラリーに吸引されていることを実体顕微鏡で確認後、-160 で XM 観察したところ、ガラスキャピラリー内で分散したラテックス球を観察することができた。アガロースの濃度ごとに適切な EPS 吸引条件を整えた。

有機物量の換算には EPS の X 線吸収係数が必要である。主要な植物プラクトンの EPS は複数の単糖類からなるヘテロ型である。実験と文献から求めた組成比から、X 線吸収係数を計算した。データをテーブル化し、X 線顕微画像から評価できるようにシステムを再構築した。

### (2) 細胞と EPS の識別と原核細胞オルガネラの同定

高分解能 CT を行うため、-160 冷却時に起こっていた試料ドリフト軽減に向けた試料ステージの改良を行った。試料ステージとセルの固定治具を改良し、画像取得ができる程度にドリフトを抑えることができた。

2 週間培養した PTG の細胞内で、酸素の K 吸収端の XAFS を行った。532 eV 付近で高い X 線吸収を示す構造体を確認した。532 eV 付近にカルボニル基 ( $C=O^*$ )  $1s \rightarrow \pi^*$  遷移があることから、カルボニル基に由来する構造体であると同定した。タンパク質や糖は DNA に比べ、532 eV 付近で高い X 線吸収を示すことから、この構造体は細胞を構成するタンパク質や糖類が多く含む構造体と考えた。

対数増殖期の PTG の周辺部には、大きなカルボニル基の偏在は確認されなかった。PTG に EPS は存在しないことが XAFS から示された。確認されている PTG の付着性は、菌体表層に共有結合した莢膜多糖 (capsular polysaccharide, CPS) によるものと推察される。この結果は申請者等が行った走査型 EM 観察の結果とも一致している。酸素が局在する顆粒体において、初めて、XAFS でリンと酸素の結合 (P-O) を確認した。これは、対数増殖期以降の PTG において、ポリリン酸顆粒体の簡易的な同定法となりうる。ポリリン酸顆粒体以外にも複数の構造体を存在することができた。現在、同定を進めている。

12 週間培養した死滅期の PTG の細胞は、外形がはっきりせず、原核細胞オルガネラも確認できなかった。活動していない死細胞であると考えた。これは透過型 EM の結果とも一致している。

対数増殖期の *Synechococcus* sp. で、EPS と考えられる X 線画像を取得し、X 線吸収微細構造 (XAFS) でカルボニル基の存在を確認した。炭素や窒素の K 吸収端の XAFS の結果から、EPS は、単体糖ではなく、タンパク質を含んだ状態で細胞外に存在していることが分かった。*Synechococcus* sp. の X 線イメージから EPS と細胞の実効 X 線吸収係数を求め、それぞれの含有有機物量を求めたところ、全 EPS には細胞と同程度の有機物が存在する可能性があることが分かった。この糖タンパクからなる有機物は *Synechococcus* sp. の細胞内でも局在していた。この結果は、EPS が *Synechococcus* sp. の細胞内で産生していることを示唆している。

以上、EPS を有した植物プランクトンを XM 観察し、得られた X 線画像から、EPS と細胞を識別し、EPS に含まれる有機物量を見積もる方法が確立できた。また、微細な植物プランクトンのいくつかの原核細胞オルガネラを同定し、簡易的な同定法を提案することができた。研究の過程で、ポリリン酸顆粒体は、細胞周期を示す指標構造体となりうる可

能性があることが分かった。成果の一部は、第13回X線顕微鏡国際会議(XRM2016)で報告した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

K. Takemoto, M. Yoshimura, Y. Inagaki and T. Ohigashi, Speciation of Oxygen and Phosphor in *Pseudanabaena foetida* (*Phormidium tenue*) by STXM, UVSOR ACTIVITY REPORT 2017, 査読無, in press.

K. Takemoto, M. Yoshimura, T. Ohigashi, Y. Inagaki, H. Namba and K. H. Kihara, Application of soft X-ray microscopy to environmental microbiology of hydrosphere, *Journal of Physics: Conference Series (JPCS)*, 査読有, 849 (2017) 12010-1-012010-4

DOI:10.1088/1742-6596/849/1/012010

K. Takemoto, M. Yoshimura, Y. Inagaki, and T. Ohigashi, Speciation of Carbon in Prokaryotic Organelles of *Pseudanabaena foetida* (*Phormidium tenue*), UVSOR ACTIVITY REPORT 2016, 査読無, 164-164 (2017)

[https://www.uvsor.ims.ac.jp/eng/activity/2016/pdf/ActivityReport2016\\_5\\_5.pdf](https://www.uvsor.ims.ac.jp/eng/activity/2016/pdf/ActivityReport2016_5_5.pdf)

[学会発表](計 7 件)

竹本邦子, 吉村真史, 大東琢治, 一瀬諭, 難波秀利, 木原裕, 軟X線顕微鏡によるカビ種物質産生藍藻 *Pseudanabaena foetida* (*Phormidium tenue*) の微細構造観察, 第26回日本バイオイメージング学会, 東京薬科大学(東京都八王子市), 2017年9月16日  
竹本邦子, 吉村真史, 一瀬諭, 古田世子, 勢川利治, 小倉明生, 横井貴大, 難波秀利, 木原裕, 結像型軟X線顕微鏡の環境科学への応用: *Pseudanabaena foetida* (*Phormidium tenue*) の微細構造とカビ臭産生能, 第30回日本放射光学会, 神戸芸術センター(兵庫県神戸市) 2017年1月8日

K. Takemoto, M. Yoshimura, T. Ohigashi, H. Namba and K. Kihara, Application of soft X-ray microscopy to environmental microbiology of hydrosphere, The 13th International Conference on X-ray microscopy, Oxford, UK, 17 Aug. 2016

竹本邦子, 吉村真史, 難波秀利, 木原裕, 結像型軟X線顕微鏡による *Pseudanabaena* sp. の細胞内微細構造観察, 第29回日本放射光学会, 東京大学柏の葉キャンパス(千葉県柏市) 2016年1月10日

竹本邦子, 軟X線顕微鏡法によるシアノバクテリア含水試料の細胞内微細構造, 軟X線顕微鏡法によるシアノバクテリア含水試料の細胞内微細構造, 第38回日本分子生物学会, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 12月4日

竹本邦子, 吉村真史, 難波秀利, 木原裕, 放射光を光源とした軟X線顕微鏡によるカビ臭産生シアノバクテリアの観察, 第56回日本組織細胞化学会, 関西医科大学, (大阪府枚方市), 2015年10月4日

市村薫, 竹本邦子, 山本章嗣, 一瀬諭, 吉村真史, 塩野正道, 西村雅子, 水田剛, 難波秀利, 木原裕, 琵琶湖産糸状カビ臭産生藍藻 *Phormidium tenue* の細胞内微細構造観察, 日本顕微鏡学会, 国立京都国際会館(京都府京都市), 2015年5月13日.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
該当なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠本 邦子 (竹本 邦子) (KUSUMOTO, Kuniko (TAKEMOTO, Kuniko))  
関西医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 80281509

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

山本 章嗣 (YAMAMOTO, Akitsugu)  
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・

教授  
研究者番号：30174775  
(平成28年度まで連携研究者)

(4)研究協力者

一瀬 諭 (ICHISE, Satoshi)  
滋賀県琵琶湖環境科学研究センター・環境監視部門・専門員

吉村 真史 (YOSHIMURA, Masashi)  
立命館大学総合科学技術研究機構・専門研究員