

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510039

研究課題名(和文) 軟X線マイクロCTによるシアノバクテリア生体高分子可視化による有機物量評価

研究課題名(英文) Estimation of Organic Carbon Content of the Cyanobacterium 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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：琵琶湖の難分解性有機物の原因の一つに微小シアノバクテリアを由来とする寒天質状の細胞外代謝産物(EPS)がある。従来法での把握が困難なEPSの軟X線顕微鏡(軟XM)で観察と含有有機物の定量を目指し、以下の結果を得た。(1)生の微小シアノバクテリアを軟XMで観察し、原核細胞オルガネラの確認と同定を行うことができた、(2)試料凍結装置とコンピュータ断層撮影(CT)法を導入し3次元画像を得ることができた、(3)構成元素分析と軟XM像からSynechococcus sp.のEPSと細胞に含まれる有機物量を見積もることができた。

研究成果の概要(英文)：Phytoplankton typically produces large amounts of extracellular polysaccharides (EPS), which is mainly composed of macromolecular heteropolysaccharides. As EPS contains large quantities of organic matter, it may be a major contributor to the increased COD in Lake Biwa. To confirm this speculation, a method for the accurate evaluation of the organic carbon (OC) content of phytoplankton by soft X-ray microscopy (XM) was developed and applied to Synechococcus sp. Soft XM is a non-destructive imaging technique that generates images based on differences in X-ray absorption by light elements, such as, carbon, oxygen, and nitrogen. Based on the X-ray absorption coefficients and gray levels of the XM images, the OC content of EPS-covered cells (0.39-0.47 pg/cell) was found to be 2.0-2.4 times larger than that of EPS-removed cells (0.20 pg/cell). These findings suggest that soft XM could be a useful tool for evaluating the OC content of picophytoplankton and EPS without pretreatment steps.

研究分野：X線顕微鏡学

キーワード：軟X線顕微鏡 微細シアノバクテリア 細胞外代謝産物(EPS) Synechococcus sp. 有機物量評価 X線マイクロCT

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 琵琶湖の内部負荷は、集水域における流入負荷の削減対策により、1990 年以降徐々に減少傾向を示している。しかし、有機汚濁の指標である生物化学的酸素要求量 (BOD) は減少傾向を示しているにもかかわらず、化学的酸素要求量 (COD) は減少傾向を示していない (COD と BOD の乖離現象)。これは、湖内で生産された有機物のうち、生物が分解できない難分解性有機物 (COD) が増加していることを示している。近年、難分解性有機物の発生源の一つとして注目されているものにシアノバクテリアが産生する細胞外代謝産物 (EPS) がある。シアノバクテリアを由来とする有機物には、細胞を構成している生体高分子と EPS がある。EPS は寒天質状の無色透明な物質であるが、大型のシアノバクテリアの EPS は、バックグランドを墨汁で染め光学顕微鏡で観察する墨汁標本検査法により、容積の測定が可能となっている。しかし、細胞径が光学顕微鏡の分解能程度の微小シアノバクテリアの EPS の存在は予測されているにもかかわらず可視化されていないものも多く、これが「COD と BOD の乖離」の原因の一つと考えられる。

(2) 軟 X 線顕微鏡は、主に物質を透過する時の X 線の吸収量の差をイメージングする顕微法である。物質の X 線吸収率は X 線のエネルギーと物質の原子番号に依存する。軟 X 線は、生体を構成する軽元素に対し適度な吸収を持つことから、主に炭素、酸素、窒素などの軽元素で構成されている生体試料でも、染色などの特別な処理を施すことなく良好な X 線像を得ることができる。特に、「水の窓」と呼ばれる酸素の K 吸収端 (543 eV、2.3 nm) と炭素の K 吸収端 (284 eV、4.4 nm) のエネルギー (波長) 域では、X 線の水に対する透過率が生体試料に対する透過率より 1 桁以上高いので、含水試料の観察が可能となる。また、X 線は電子線に比べ高い透過性を持つので、電子顕微

鏡では不可能なバクテリア 1 個を丸ごと観察することができる。

## 2. 研究の目的

琵琶湖に生息している微小シアノバクテリアを軟 X 線顕微鏡で観察し、従来からある分析法や顕微法では把握が困難な微小シアノバクテリア由来の有機物量を計測すること目的とする。具体的には、(1) 生きた状態に近い微小シアノバクテリアの軟 X 線マイクロコンピュータ断層撮影 (CT) 観察と微細構造同定、(2) 粘質鞘を含めた細胞構成元素の分析と X 線吸収率の算出、(3) 細胞容積と X 線吸収率から細胞と EPS 由来の炭素量を換算する方法の確立、を行い軟 X 線顕微法を用いた新しい『水分析法』として提案する。

## 3. 研究の方法

試料として、琵琶湖から分離した微小シアノバクテリア *Synechococcus sp.*、*Phormidium tenue* および小型ケイソウ *Skeletonema potamos* を用いた。目的を達成するため、4 つのサブテーマを設け研究を進めた。

(1) シアノバクテリアの軟 X 線 CT 法観察：CT 法により、琵琶湖より分離した微小バクテリアの 3 次元観察法の開発を目指した。

試料懸濁液を極細のガラスキャピラリイに入れ、風乾試料の場合は水を乾燥させ内壁に付着した試料で、含水試料の場合はピーズワックス等でキャピラリイの口を封じた試料で 3 次元観察を目指した。試料の放射線損傷の軽減と試料固定のため、新クライオ装置を試料ステージに導入することとした。

(2) シアノバクテリアの微細構造同定：軟 X 線顕微鏡で *Synechococcus sp.* と *Phormidium tenue* を詳細に観察し、確認できた微細構造について、透過型電子顕微鏡、低真空クライオ走査型電子顕微鏡、間接蛍光抗体法などで同定を行った。

(3) 細胞の構成元素分析：EPS を持つことが蛍光顕微鏡観察から推定され、軟 X 線顕微鏡で

も存在が確認できた*Synechococcus* sp. のピンク株のEPSと細胞を分離し、それぞれについて化学組成分析を行った。EPSの分離の確認は、軟X線顕微鏡で行った。

(4)細胞容積から炭素量換算する式の構築：*Synechococcus* sp.の細胞とEPSの構成元素分析の結果から、それぞれの線吸収係数を算出した。X線像からEPSと細胞を識別後、それぞれの容積とX線吸収率を求めた。線吸収係数、容積、X線吸収率から細胞とESPに含まれる有機物量の比率を求めた。

*Synechococcus* sp.の細胞に含まれる有機物量を細胞容積と構成要素から見積もり、その値と「細胞とESPに含まれる有機物量の比率」からEPSに含まれる有機物量を算出した。この値の検証を、従来法で求めた粒状有機炭素(POC)と全炭素量(TOC)との比較で行った。

#### 4. 研究成果

(1)微小シアノバクテリアの微細構造同定：未処理の*P. tenue*の緑株と茶株を軟X線顕微鏡で観察し、いくつかの原核細胞オルガネラを確認した。透過型電子顕微鏡、低真空クライオ走査型顕微鏡、間接蛍光抗体法による観察結果から、これらの構造体は、ポリリン酸顆粒体とカルボキシソーム様態体であることが分かった。さらに観察を続けたところ、緑株と茶株の微細構造には大きな違いがあることを分かり、これまで同種とされていた緑株と茶株は異なる種である可能性を得た。さらに詳細な微細構造観察を行い、緑株が新種であるという結論に至るデータを提供することができた (Fottee in press.)。

(2) X線マイクロCT法による観察：新たに導入したクライオ装置は、冷却時の熱振動と試料の霜対策として、冷媒で十分冷却したアルミニウム製のクライオハウス内を冷却ガスで満たす設計とした。この装置の導入により、試料を-100 以下の温度で安定に保持することができるようになった。このクライオ装置を用い3次元観察を行った。風乾試料の場合は

波長2.0 nmを、含水試料の場合は波長2.33 nmを用いた。投影像は試料回転角4度毎に計45枚取得し、露光時間は一画像当たり180秒とした。断層像の再構成はFiltered Back-projection法で、Shepp-Loganフィルターを用いて行った。風乾した*S. potamos*と*P. tenue*の緑株と含水*Synechococcus* sp.と*P. tenue*の緑株の3次元像を得ることができた。

(3) 細胞由来の炭素量換算方法の検討：EPSに含まれる糖類の構成元素の分析結果(表1)からEPSの化学組成を $C_{60}H_{123}O_{57}$ と推定した。EPSには多くの酸素が含まれていた。これよりX線画像でEPSを識別するには酸素のK吸収端より低エネルギー(620 eV、2.0 nm)での観察が最適と判断し、風乾軟X線透過法で観察した軟X線顕微鏡画像からEPSと細胞の含有有機物量の見積もりを行うこととした。観察に用いるX線によるEPSに含まれる糖類の線吸収係数は $1.72 \mu\text{m}$ となる。この値と*Synechococcus* sp.の構成要素(表2)から、EPSには細胞の約1 - 1.4倍の炭素が存在していることが分かった。この結果から、*Synechococcus* sp.に含まれる炭素量0.39 - 0.47 pg/cellのうち、EPSに由来する炭素は0.19 - 0.27 pg/cellと見積もることができた。従来法で求めたTOCは0.47 - 0.95 pg/cell、POCは0.16 pg/cell(フィルターサイズ 0.45  $\mu\text{m}$ )と0.12 - 0.15 pg/cell(フィルターサイズ 0.7  $\mu\text{m}$ )であった。EPSを剥離した細胞がPOCとして検出されたとすると、軟X線顕微鏡法で求めた炭素量は妥当な値であると判断できた(*Geomicrobiology Journal*, in press)。

以上の結果より、本手法を新しい『有機物分析法』として提案することができた。

表1 含有糖類の構成

糖類	EPS
Rhamnose	18.1
Fucose	14.3
Arabinose	1.5
Xylose	10.0
Mannose	26.0
Galactose	8.5
Glucose	21.6

表2 バクテリアの構成要素

	構成率 (%)		
	糖類	タンパク質	灰分
<i>Synechococcus</i> sp.	36.4 ± 1.2	54.5 ± 0.3	6.9 ± 1.5
細胞のみ	25.2 ± 2.7	68.5 ± 0.9	7.0 ± 2.2
EPSのみ	52.1 ± 2.5	40.1 ± 0.6	7.8 ± 1.8

## 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7件)

- Y. Niiyama, A. Tuji, K. Takemoto and S. Ichise, *Pseudanabaena* sp. nov. and *P. subfoetida* sp. nov. (Cyanophyta/Cyanobacteria) producing 2-methylisoborneol from Japan. *Fottea*, 査読有, 16 (19) in press.
- H. Ikegaya, S. Suzuki, S. Ichise, S. Furuta, S. Wakabayashi, T. Ohigashi, D. Bamba, H. Namba, H. Kihara, N. Kishimoto, K. Takemoto, Estimation of Organic Carbon Content of the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. by Soft X-ray Microscopy, *Geomicrobiology Journal*, 査読有, in press, DOI: 10.1080/01490451.2015.1010753
- 竹本邦子, 吉村真史, 大東琢治, 山本章嗣, 一瀬諭, 難波秀利, 木原裕, 軟X線顕微鏡による琵琶湖産糸状カビ臭産生藍藻の細胞内微細構造観察, 査読有, 放射光, 27 (2014) 258-266. (<http://www.jsrr.jp/journal/27-5.html>)
- 竹本邦子, 軟X線顕微鏡と蛍光顕微鏡によるシアノバクテリアの観察, 査読有, 応用物理, 83 (2014) 293-296. (<http://www.jsap.or.jp/ap/2014/04/ob830293.xml>)
- 竹本邦子, 軟X線顕微鏡によるバイオイメージング, 査読無, *OplusE*, 36 (2014) 301-305.
- K. Takemoto, G. Mizuta, A. Yamamoto, M. Yoshimura, S. Ichise, H. Namba, H. Kihara, Soft X-ray imaging of intracellular granules of filamentous cyanobacterium generating musty smell in Lake Biwa, *Journal of Physics: Conference Series*, 査読有, 463 (2013) 1205, DOI:10.1088/1742-6596/463/1/012052
- 竹本邦子, 山本章嗣, 水田剛, 一瀬諭, 吉村真史, 難波秀利, 木原裕, 琵琶湖産の糸状カビ臭産生藍藻 *Phormidium tenue* の細胞内微細構造観察: 軟X線顕微鏡と透視型電子顕微鏡および低真空クライオ走査型電子顕微鏡を用いた比較観察, 査読有, *日本水処理生物学会誌*, 48 (2012) 157-163. (第16回日本水処理生物学会論文賞)

## 〔学会発表〕(計13件)

- 吉村真史, 石井達也, 村上翔一, 竹本邦子, 木原裕, 難波秀利, 太田俊明, 結像型軟X

線顕微鏡のクライオ機構の改良とCT観察, 日本放射光学学会, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県草津市), 2015年1月10-12日.

K. Takemoto, M. Yoshimura, A. Yamamoto, S. Ichise, H. Namba and H. Kihara, IMAGING OF MUSTY-ODOR-PRODUCING FILAMENTOUS CYANOBACTERIA BY VARIOUS MICROSCOPIES, International Conference on X-Ray Microscopy 2014 (XRM2014), Melbourne, 26-31 Oct. 2014. M. Yoshimura, K. Takemoto, T. Ohigashi, H. Namba, H. Kihara and T. Ohta, THREE-DIMENSIONAL OBSERVATION OF SOFT X-RAY MICROSCOPE AT THE SR CENTER OF RITSUMEIKAN UNIVERSITY, International Conference on X-Ray Microscopy 2014 (XRM2014), Melbourne, 26-31 Oct. 2014.

大東琢治, 吉村真史, 竹本邦子, 難波秀俊, 木原裕, 結像軟X線CTによる3次元構造観察, 日本バイオイメージング学会, 大阪大学銀杏会館(大阪府吹田市), 2014年9月4-6日.

竹本邦子, 吉村真史, 一瀬諭, 難波秀利, 木原裕, X線顕微鏡による *Phormidium tenue* とされている琵琶湖産糸状シアノバクテリアの微細構造観察, 日本放射光学学会, 広島国際会議場(広島県広島市), 2014年1月11-13日.

吉村真史, 竹本邦子, 木原裕, 難波秀利, 太田俊明, 軟X線顕微鏡の高度化と現状, 日本放射光学学会, 広島国際会議場(広島県広島市), 2014年1月11-13日.

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, *Phormidium tenue* とされている琵琶湖産糸状藍藻の微細構造観察—XM, TEM, 低真空クライオSEMによる—, 日本水処理生物学会, 神戸市水道局たちばな職員研修センター(兵庫県神戸市), 2014年11月13-15日.

竹本邦子, 一瀬諭, 吉村真史, 難波秀利, 木原裕, 難波秀利, 軟X線顕微鏡によるカビ種物質産生藍藻 *Phormidium tenue* の微細構造観察, 日本バイオイメージング学会, 東京大学薬学部講堂(東京都文京区), 2014年9月14-16日.

竹本邦子, 吉村真史, 大東琢治, 臼井規真, 難波秀利, 木原裕, 結像型軟X線顕微鏡試料システム, 日本放射光学学会, 名古屋大学(愛知県名古屋市), 2013年1月12-14日.

竹本邦子, 一瀬諭, 池谷仁里, 大東琢治, 難波秀利, 木原裕, 軟X線顕微鏡によるピコ植物プランクトンの粘質鞘の解析, 日本バイオイメージング学会, 国立京都国際会館(京都府京都市), 2012年8月26-28日.

竹本邦子, 山本章嗣, 水田剛, 吉村真史,

一瀬諭, 難波秀利, 木原 裕, 軟X線顕微鏡による糸状植物プランクトンの細胞内顆粒の観察, 日本バイオイメージング学会, 国立京都国際会館 ( 京都府京都市 ), 2012年 8月 26-28日.

K. Takemoto, G. Mizuta, A. Yamamoto, M. Yoshimura, S. Ichise, H. Namba and H. Kihara, Soft X-ray Imaging of Intracellular Granules in Filamentous Cyanobacterium, International Conference on X-Ray Microscopy 2012 (XRM2012), Shanghai, 5-10 Aug. 2012.

K. Takemoto, K. Usui, T. Ohigashi, H. Fujii, M. Yoshimura, H. Namba and H. Kihara, Improvement of Cryogenic 3-Dimensional Observation System of Soft X-ray Microscope at the SR Center of Ritsumeikan University, International Conference on X-Ray Microscopy 2012 (XRM2012), Shanghai, 5-10 Aug. 2012.

## 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)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

池谷 仁里 ( IKEGAYA, Hisato )  
兵庫県立大学・理学部・客員研究員  
研究者番号 : 30531579

### (3)研究者協力者

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