

## デコンボリューションイメージングによる 微細藻類の脂質局在解析

### [1] 組織

代表者：太田 啓之

(東京工業大学大学院生命理工学研究科)

対応者：粟井 光一郎

(静岡大学電子工学研究所)

分担者：臼杵 深

(静岡大学電子工学研究所)

### [2] 研究経過

石油資源の枯渇が懸念され、低炭素社会の実現が叫ばれて久しい。利便性の高い再生可能エネルギーの恒久的供給には、太陽光エネルギーを利用することが最も現実的であるが、現在までのところ、決定的な方法の確立には至っていない。いくつかの選択肢の中で、光合成によるエネルギー生産は、現実的かつ実現可能性の高い方法と考えられている。なかでも近年、光合成をおこなう藻類の資源化が注目を集めている。藻類のうち微細藻類は、光合成で獲得したエネルギーを油脂として細胞内に蓄積することが知られているが、いまだその詳細な機構は明らかとなっていない。本プロジェクトでは、バイオ燃料生産のプラットフォームとして近年注目を集めている微細藻類で油脂（脂質）の蓄積機構を明らかにすることを目的とし、脂質の蓄積を生きた状態のまま高精細で観察する手法の開発に取り組んだ。

光合成生物の多くは、その細胞内に貯蔵物質として脂質を溜め込む。この脂質の詳細な局在を生きたまま解析することは難しく、現在のところ、固定した細胞を電子顕微鏡で観察することが最も高精細の画像が取得できる技術である。しかし、電子顕微鏡観察を行う際には、細胞を樹脂包埋し薄切片化することが必須であり、細胞を樹脂包埋せずに生きた状態、もしくはそれに近い状態で観察する技術は確立していない。近年、エバネッセント光を用いた全反射顕微鏡が開発され、光学回折限界程度の空間分解能（200 nm）で高SN比観察が可能になっている。しかし、エバネッセント光はスライドガラスから数十nm程度離れたところまでしか届かないことから、細胞壁を持つ光合成生物で観察するには、電子顕微鏡観察と同様、樹脂包埋して薄切片化する必要があ

った。

本プロジェクトでは、光学顕微鏡で得た画像にデコンボリューション技術を用いることで画質（コントラスト）を向上し、光学回折限界までの分解能を最大限発揮した画像の取得を試みた。解析ターゲットには、光合成生物の生体膜および貯蔵脂質を用いた。生体膜はおよそ10 nm、貯蔵脂質は0.5~20  $\mu$ mと多様なサイズのlipid dropletを形成することから、様々なサイズの対象を解析するのに適していると考えた。

まず、光学顕微鏡観察像を用いた画像解析を行った結果、可視光を用いて観察した画像では、光の情報量が多すぎ、デコンボリューション解析が困難であることがわかった。そこで、光の情報を制限すること、また画像情報を制限することを目的として、蛍光画像での解析を行うこととした。

光合成生物には強い蛍光を持つクロロフィルが多量に存在する。そこで、クロロフィル蛍光存在下での観察を可能にする条件検討を行った。材料には糸状性シアノバクテリアである *Anabaena* sp. PCC 7120 を用い、脂質染色蛍光試薬として広く利用されている NileRed を用いて脂質を染色し、観察を行った。NileRed の蛍光はピークが637 nmであり、クロロフィルの蛍光（約680nm）と近い。ロングパスフィルタを用いた蛍光観察を行ったところ、クロロフィル、NileRed 両方の蛍光を検出してしまい、観察が難しいことがわかった。そこで、バンドパスフィルタを使い、クロロフィルの蛍光を含む長波長側の光を遮断し、NileRed の蛍光を特異的に検出することを試みた。しかし、クロロフィルの蛍光が非常に強く、バンドパスフィルタを使ってもピークの裾野の部分を拾ってしまい、NileRed 特異的な検出が難しいことがわかった。

次に、BODIPY を用いた画像の取得を行った。BODIPY は近年脂質染色に用いられるようになった蛍光試薬で、様々な蛍光ピークを持つものが存在する。今回は、クロロフィルの蛍光との競合を避けるため、蛍光ピークが503 nmである BODIPY 493/503 を用いた。しかし、いくつかの条件での染色を行ったにも関わらず、細胞をうまく染色するこ

とが出来ず、よい観察像を得ることが出来なかった(図1)。これまで、シアノバクテリアをBODIPYで染色している例はほとんどなく、染色方法に何かしらの工夫が必要であると考えられた。

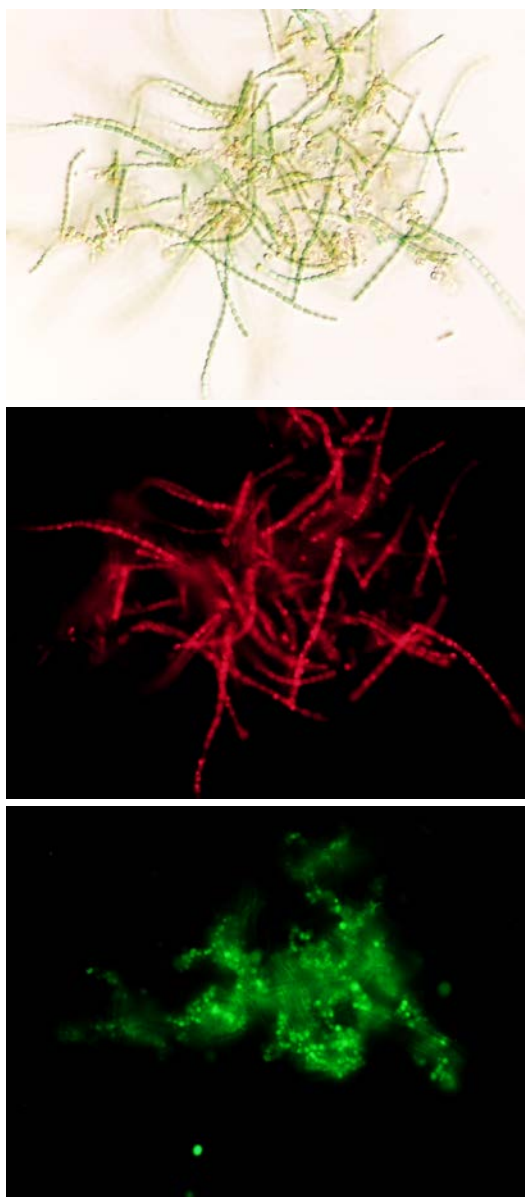


図1. *Anabaena* sp. PCC 7120 のBODIPY (493/503) による染色。窒素欠乏条件下で培養し、ヘテロシストが形成されている細胞で、上段：明視野観察，中段：クロロフィル蛍光観察，下段：BODIPY 蛍光観察を行った。BODIPY による蛍光の強度が弱く、はっきりとした画像が得られていない。また、一部細胞がBODIPYによって染色されていると見られる部分もあるが、均一ではないため、染色法を改善する必要がある。

今後は染色方法を改善するとともに、細胞のどのような時期が染色に適しているかを明らかにし、まず

は蛍光染色画像を得たい。画像が得られ次第、デコンボリューション解析を行うことで、解析方法を確立し、油脂蓄積機構の解明を目指す。

本プロジェクトでの成果発表の機会を設けるため、研究発表会(第27回植物脂質シンポジウム)を招致した。静岡市産学交流センターで11月28日、29日の2日間行われたシンポジウムでは、植物脂質科学研究に関する最新の知見が紹介され、活発な議論が展開された。本プロジェクトの成果にも多くの質問があり、進展にニーズのある研究あることが実感できた。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第1に、光合成生物での油脂蓄積を検出するためには、これまで最も利用されている NileRed では内在性の蛍光物質であるクロロフィルと競合するため、油脂を特異的に染色した画像を取得することが難しいことがわかった。第2に、クロロフィルとの競合を避けるため、波長特性の異なる染色試薬(BODIPY)が有効であるが、生物種によっては、染色が非常に難しいことが分かった。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

本プロジェクトは、これまで接点がほとんどなかった、オプトロニクス分野と植物脂質科学分野の研究者が協力し、細胞を生かしたままでの高精細解析が難しいとされていた、光合成生物の油脂蓄積を解析する手法の開発に取り組んだ。現段階では方法の確立には至っていないが、バイオ燃料の必要性が高まっていることから、本手法開発のニーズは高い。今後は、油脂蓄積過程だけではなく、他の細胞内小器官、例えばミトコンドリアの発達過程を観察する手法へと発展することで、医療分野への応用も期待される。

出張報告（特別教育研究経費を使用した場合について、全員分記載して下さい。）

氏名：太田 啓之

所属：東京工業大学生命理工学研究科

期間：平成26年11月28日～29日

用務先：静岡市産学交流センター

用務内容：第27回植物脂質シンポジウム参加および研究打ち合わせ

主たる対応者：栗井光一郎

氏名：坂本 亘

所属：岡山大学資源植物科学研究所

期間：平成26年11月28日～29日

用務先：静岡市産学交流センター

用務内容：第27回植物脂質シンポジウム招待講演

主たる対応者：栗井光一郎