

**京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書**

2022 年 1 月 13日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 京 都 大 学 大 学 院 理 学 研 究 科 化 学 専 攻

職 名 准 教 授

氏 名 熊 崎 茂 一

助 成 の 種 類	令和2年度 ・ 研究活動推進助成		
申請時の科研費 研究 課 題 名	植物細胞内単一葉緑体の防御から崩壊までを観測する顕微分光イメージング		
上記以外で助成金を 充 当 し た 研 究 内 容	糸状性シアノバクテリアの細胞分化の単一細胞レベル精密分光評価／顕微分光イメージング装置の改良／植物葉緑体の成長段階に依存した光化学・膜構造評価		
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名) 信州大学繊維学部・特任准教授・野末はつみ		
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等)【1】(原著論文)H. Nozue et al., Physiologia Plantarum, 172, (2021), 1983 - 1996. 【2】(online学会発表、口頭) Tamamizu and Kumazaki, 第62回日本植物生理学会年会, 2021/3/14-16【3】(online学会発表、口頭) Tamamizu and Kumazaki, 2020年度日本分光学会年次講演会, 2020/10/26-28		
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)		
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000	円
	使用した助成金額	1,000,000	円
	返納すべき助成金額	0	円
	助成金の使途内訳	費 目	金 額
		光学素子、薬品等消耗品	387,362
		備品(分解能校正基板)	195,250
		ソフトウェア	384,890
		学会参加費	9,152
	専門書籍	22,596	
	試料送料	750	
当財団の助成に つ い て	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) まず、報告書の提出が大幅に遅れましたことをお詫び申し上げます。そして、科研費がなかなか採択されない中で、貴重な助成金を受け取ることができ、十分な感謝の言葉がありません。そのようなご支援を受けた後にも関わらず、2021年度春開始の科研費も採択されなかったことは、深く反省しているところです。引き続き、自らの研究計画の改良と研究成果の発表の努力を続けていきます。		

研究内容・研究成果・今後の見通し

「植物細胞内単一葉緑体の防御から崩壊までを観測する顕微分光イメージング」という当初の課題では、単一葉緑体レベルにおける防御、成長過程、制御された死（崩壊）、老化などを念頭に研究を進めた。その一部で、下記（原著論文1）のように出版できた内容は、信州大学・繊維学部の野末はつみ准教授と共に行った共同研究である。植物葉の葉肉細胞の葉緑体中の光合成膜は、成長段階に依存して、膜集合形態を変えることが知られてきた（H. Nozue et al., 2017 等）。過度に詳しくは説明しないが、比較的若い葉（シロイヌナズナ）では SG 型と呼ばれる光合成膜形態が、週齢が高くなると IG 型と呼ばれる形態が増える。そして、花茎が出現した後では、現れる若い葉で IG 型が、さらに出現した花茎を切除した後に現れる若い葉では、SG 型が現れる。その変化が葉緑体機能にどのような影響をもたらし、また光合成膜の構成分子にどのような変化があるか、明確で統一的な情報が不足していた。今回の研究で、可逆的な SG-IG の転換が葉緑体クロロフィル蛍光寿命の変化を通じても捉えられることを明らかにした。また、蛍光スペクトル顕微鏡を用いて、単一葉緑体ごとのクロロフィル蛍光スペクトルの変化としても捉えられる事も示した。光透過率が光の波長によって変化するため、通常は葉肉組織内部の顕微蛍光スペクトルの解析は困難である。しかし、本研究では近赤外 2 光子励起蛍光と近赤外 1 光子励起アンチストークス蛍光（励起波長より短波長側の蛍光を見る特殊な方法（Hasegawa et al., 2010 等）を同一の葉緑体から取得することで、異なる葉内部の葉緑体間の比較であっても、葉緑体クロロフィル蛍光スペクトルの違いを高い信頼性で得ることに成功した。そして、IG 型の方が光化学系 II の光障害が起こりやすく、その原因は、光化学系 II の損傷速度よりは、どちらかといえば光化学系 II の修復速度が劣化していることに起因することも明らかにした。とはいえ、この研究成果では、真に単一葉緑体レベルの情報を得た研究成果とは言い難い。投稿前なので詳細は記さないが、強い光で起こる葉緑体の傷害に関する研究で、真に単一葉緑体レベルの有用な情報に関しては、別の研究として論文発表を準備中である。

蛍光スペクトル顕微鏡や蛍光寿命顕微鏡は葉緑体やシアノバクテリアの光合成機能を高い解像度で観測するために有用であるが、光合成機能に多面的に影響するカロテノイド等の非蛍光性分子を直接見ることはできない。そのため、参考論文1のような自発ラマン散乱スペクトル顕微鏡（ラマン顕微鏡）の開発も進めている。およそ3年前から、ラマン顕微鏡の走査速度を向上させる光学系の改良を開始し、参考論文1時点のものに比べ、同種の試料の撮像で比較して30倍以上の高速化を達成した。我々のラマン顕微鏡は1064nm という、多くの生体分子の電子状態と共鳴的な相互作用をしにくい励起波長を使っており、生体内部への透過性は高い。厚みがある植物組織への応用を意識してこのような励起波長を選んでいる。1064nm を励起波長としながら高い空間分解能を有する顕微鏡、特に高い走査速度を有する顕微鏡は稀である。原因の一つはスペクトル撮像に用いる近赤外カメラの性能が従来それほど良くなかったためである。我々が数年前に別予算で入手してラマン顕微鏡に組み込んでいる InGaAs カメラ（540×640 画素、電子冷却温度が摂氏マイナス80度）を利用できることが重要な技術的要素の一つとなっている。この顕微鏡を、細胞が数珠つなぎに連結して生育する糸状性シアノバクテリアの一種（*Rivularia* M-261）に適用したところ、細胞外鞘に蓄積することが知られている紫外線吸収色素スキトネミン、および主に光合成膜中に分布するカロテノイド、フィコビリンを同時に撮像することに成功した。また、栄養ストレスや紫外線ストレスによって、スキトネミンの化学状態の変化が見られること、そして従来の報告例が無いスキトネミンの高濃度部位の観測にも成功した。1064nm という励起波長では、ラマン散乱の効率（散乱断面積）は低いので、信号取得（撮像）に時間はかかるが、それでも、*Rivularia* 細胞の深さ（高さ）が異なる5断面の画像を得ることに成功しており、細胞内部と細胞周囲の立体的な情報も判別しやすくなっている。この研究成果について目下投稿準備中である。国内の植物関連学会と分光光学関連の学会において、暫定的かつ部分的な中間的な成果発表も行った（下記の online 学会発表 1, online 学会発表 2）。今後、カロテノイドの電子励起状

態を選択した励起で共鳴ラマン散乱を得るために、可視光線励起も行えるようにラマン顕微鏡を改良する予定である。また、ラマン顕微鏡の利用では、現在はシアノバクテリアが中心的な研究題材となっているが、ある程度共通な特性を有する葉緑体の研究にも有用なので、植物葉緑体の諸現象の観測にも利用していきたいと考えている。

最後に、あらためて今回のご支援に深く感謝し、「成果の概要」とさせていただきます。

(論文投稿と学会発表に関する情報のリスト)

(原著論文1) Hatsumi Nozue*, Takashi Shigarami, Shinji Fukuda, Takayuki Chino, Ryouta Saruta, Kana Shirai, Masayuki Nozue, and Shigeichi Kumazaki, "Growth-phase dependent morphological alteration in higher plant thylakoid is accompanied by changes in both photodamage and repair rates" *Physiologia Plantarum*, 172, (2021), 1983 – 1996.

(参考論文1) Kouto Tamamizu and Shigeichi Kumazaki
" Spectral microscopic imaging of heterocysts and vegetative cells in two filamentous cyanobacteria based on spontaneous Raman scattering and photoluminescence by 976 nm excitation "
Biochimica et Biophysica Acta, 1860, (2019) 78 - 88 .

(online 学会発表1、口頭) Tamamizu and Kumazaki、「並列高速化近赤外励起ラマン散乱顕微鏡による糸状性シアノバクテリア細胞分化の分析」第62回日本植物生理学会年会, 2021/3/14-16

(online 学会発表2、口頭) Tamamizu and Kumazaki、「並列化自発ラマン散乱顕微鏡で見る糸状シアノバクテリアの細胞分化」2020年度日本分光学会年次講演会, 2020/10/26-28