

深海に棲む微生物からの発光の顕微鏡観察

— 時間分解マルチ分光反応画像解析装置(TRMSIA)による時空解析 —

松村竹子*¹・福田武司*²・柄谷肇*³

1. 緒言

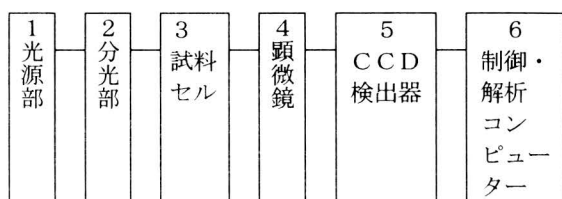
顕微鏡で生物を観察し、小さな生物の営みを目の当たりにするすばらしさは、多くの生物学徒を魅了する。近年、顕微鏡観察の手法は光学系、および画像処理技術の発展に伴い急速に進歩している。

しかしながら、顕微鏡下で起こっている化学反応そのものの変化を画像として捉え、かつ反応にともなう化学種の濃度変化を定量的に捉える方法は装置的にも重装備になり、価格面でも高価である。

著者らは長年、周期性を示す時空間変化を示す Belousov-Zhabotinsky 反応の研究を行ってきたが、最近、化学反応の時空間変化を顕微鏡で観察し、分光スペクトルの時空間変化として定量的に解析する時間分解マルチ分光反応画像解析装置を考案した。この装置は、英語訳 Time Resolved Multi-Spectroscopic Image Analyzer を略記して TRMSIA と名付けた。TRMSIA は、分光分析法、顕微鏡、高性能 CCD カメラ、制御コンピュータを組合せて構成されている。

要な光学系や検出器の最適化を考慮して設計した。

フィルタ回転器は、(1) 10 枚のフィルタが装填可能、(2) 各実験内容に合わせてフィルタを交換可能、(3) シャッターの開閉に同期して回転、という特徴を有している。フィルタ回転器単体のフィルタ切換最高スピードは 150ms であった。すりガラスを光源と試料台の間に組み込んで、試料セルに均一に光が照明されるように光学系を設計した。顕微鏡は、BZ 反応系のパターン観測のための実体顕微鏡、および生物発光観測用の落射顕微鏡を研究に合わせて用いた。CCD は 512*512 のピクセルサイズをもつ科学計測用の高感度タイプを、暗電流をさらに低減するために冷却機構を付加して、顕微鏡に C マウント方式で取り付けられるようにした。高速時間分解画像計測のため 2*2 のビニング動作を行い、200 ms/frame の時間分解能を実現した。制御・解析用コンピュータには、高速 CPU と大容量ハードディスクを備えたものを用意した。制御プログラムは本システム専用に製作し、CCD とフィルタ回転器の性



分光用の光源には 150W の高輝度キセノンランプを用いた。150W のキセノンランプの他に、紫外線励起による生物発光を観察するため、150W の水銀キセノンランプを光源として用意した。分光部には、波長走査速度、光量などの点を考慮し、高速フィルタ回転器を用い、分光画像の高速時間分解に必



Fig. 1 TRMSIA の全景

*¹ 奈良教育大学 *² 三重県立川越高等学校 *³ 京都工芸繊維大学

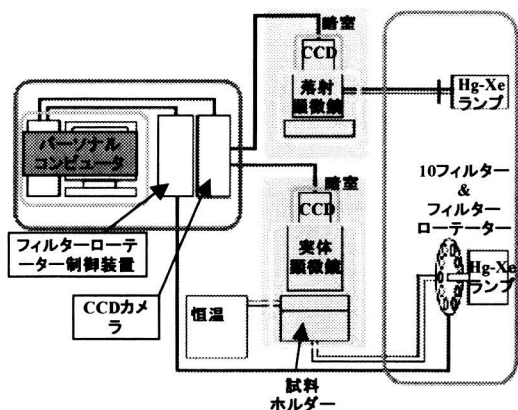


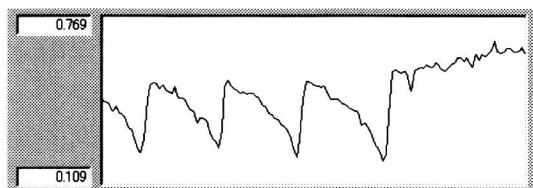
Fig. 2 TRMSIAの構成図

2.1 BZ 反応における触媒の酸化還元パターンの解析能を最大限に活用できるようにした。解析法としては、試料の濃度を定量するために reference 画像に対する試料画像の対数演算機能や、任意 2 点間のラインプロファイルの時間変化をプロットしてパターンの変化速度を計算する機能などを加えた。Fig.1 は TRMSIA の実写真であり、Fig.2 は簡単な模式図である。

Belousov-Zabotinsky 反応(BZ 反応)は、非線形化学反応の典型的な反応で、シャーレ上に BZ 反応試薬を入れると触媒の呈色に基づくターゲットパターン(水紋模様)を生じる。Fig. 3 は、TRMSIA で観測



3a Sequential images of BZ reaction (λ = 500 nm) Time interval = 5s, Color image 32.0 mm square



3b Absorbance change in BZ reaction

Fig. 3 ラインプロファイルによる画像解析

3a: BZ 反応の連続画像,

3b: 触媒 (Ru(bpy)₃²⁺) の吸光度変化

された Ru(bpy)₃²⁺ を触媒とする BZ 反応の連続反応画像である。

2.2 海洋に棲む発光微生物

海洋に広く分布して生息する発光微生物は、基本的には、還元型フラビンモノヌクレオチド (FMNH₂)、分子状酸素、及び長鎖脂肪酸アルデヒドを基質とする微生物ルシフェラーゼ (L'ase) 触媒回路によって、発光 (λ_{max} ~ 490 nm) している。L'ase 触媒回路の前段階は、FMN の FMNH₂ への還元反応で、この還元に要する 2 電子は呼吸鎖電子伝達系から供給されるものと考えられる。L'ase 触媒回路のターンオーバーは比較的遅く、これと関連して、L'ase 触媒回路は外的な刺激に対する感受性の強いことが推察される。外的刺激に対する応答を解析するには、刺激を受ける前後の細胞内発光関連タンパク質レベルなどを検知することが重要である。一方、迅速な応答を与える刺激に対しては、刺激前後の発光挙動を時系列で追跡することが有効である。これまで、発光の時系列測定では、時間分解発光スペクトルや目的波長の発光-時間曲線の測定などが有益な知見を与えてきた。これらに加えて、発光微生物の形態と発光を時系列的に同時に観察することが可能となれば、より多面的に刺激と発光挙動との関係を解析することが

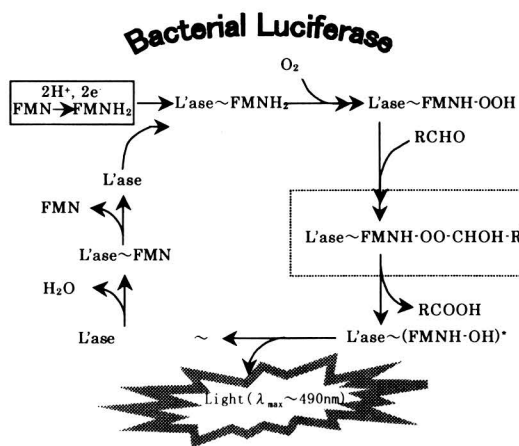


Fig. 4 L'ase バクテリアの発光スキーム

可能となり、微生物の発光生理を詳しく説明できるものと期待される。

今回、開発した TRMSIA を用いて微生物発光の化学刺激に対する時空間応答を解析した。

実験に供した *Photobacterium phosphoreum* strain bmFP (PpbmFP) は、筆者(柄谷)らが参加した白鳳丸研究航海 (KH-95-2 および KH-00-1) において、太平洋上の数十に及ぶサンプリングステーションにおいて分離した菌株の1つである。無菌採水にはニスキンバタフライ採水器を用い、それぞれのステーションにおいて、様々な深度において採水した。海水は直ちに船内実験室において、滅菌処理を施したヌクレオポアフィルター上、無菌ろ過した。次に、フィルターを海水主成分の寒天培地上に置き、20 °C で 24 時間培養した。ろ集された海洋微生物は、フィルターをとおして栄養を取り、フィルター上にコロニーを形成する。発光微生物は裸眼で観察できる光を発光コロニーを形成することから、容易に他の微生物から分離することができる。PpbmFP は種々の発光コロニーの1つより単離し、遺伝子工学的手法に基づいて、属種名を同定した。顕微鏡観察に供する場合、純培養した PpbmFP を白金耳を用いて寒天培地上に塗末し、発光コロニーを形成させた。観察には、CCD カメラ (ユニソク C5310CCD) を具備した蛍光顕微鏡 (オリンパス BX-50) を観測部とする TRMSIA システムを用いた。発光測定は、励起光源刺激に対する応答測定の場合、発光寒天プレート顕微鏡試料台に載せ、シングルコロニーを視野に入れた (倍率: $\times 40$)。化学刺激として、L'ase 基質アルデヒドを外部から与えた。具体的には、炭素数の異なる種々の揮発性アルデヒド溶液をプレートに滴下し、コロニーから発する青色発光の空間分布を画像として捕らえた。

Fig. 5 はアルデヒド添加前に撮像した2つのシングルコロニーの顕微鏡発光画像を示す。図は発光コロニーに見られる興味深い2つの特徴を示している：
i) 発光コロニーが同心円様に成長し、外側に近い同心円に沿って高度が高くなる ii) コロニーの同心円型

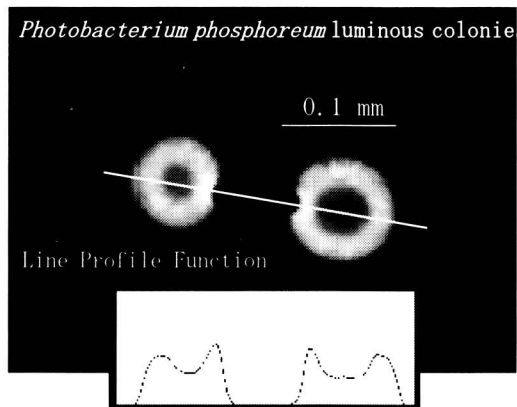


Fig. 5 顕微鏡で捉えたシングルコロニーの発光

コロニーの中央部よりもむしろ培地に近い周辺部において発光の輝度が高い。このような特徴的な発光挙動はほとんどすべてのコロニーにおいて観察された。さらに、図に示しているように、ラインプロファイル解析によって、シングルコロニーの空間的発光パターンを、空間座標上において定量的に捉えることが可能となった。

次に、L'ase 基質アルデヒドと同等な基質能を発現する揮発性長鎖アルデヒドを 5 から 100 μl の範囲で滴下して、アルデヒドによる化学刺激を受けた後のコロニーの発光挙動を、発光画像として 1 秒毎に数分間連続的にモニターした。

実験は次のように行った。

1. シャーレを顕微鏡に乗せて測定するスポットを決める。
2. 測定する場所に合うように寒天シャーレのふたに穴をあける。
3. フィルムをした 2 ドデカノールを入れたカップをシャーレの中に入れる。
4. シャーレに穴をあけた上蓋をかぶせる。
5. モニターでスポットを確認して、カップに穴をあける。
6. 測定を開始する。

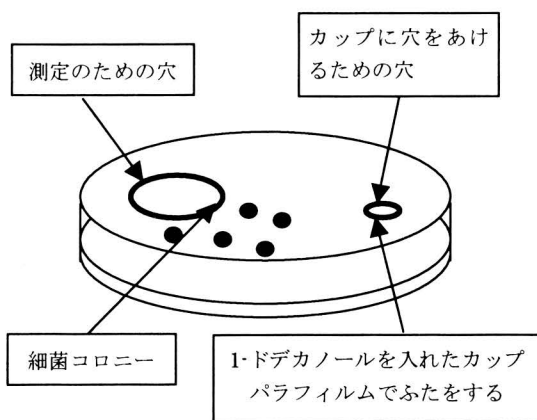


Fig. 6 化学刺激を与える実験方法

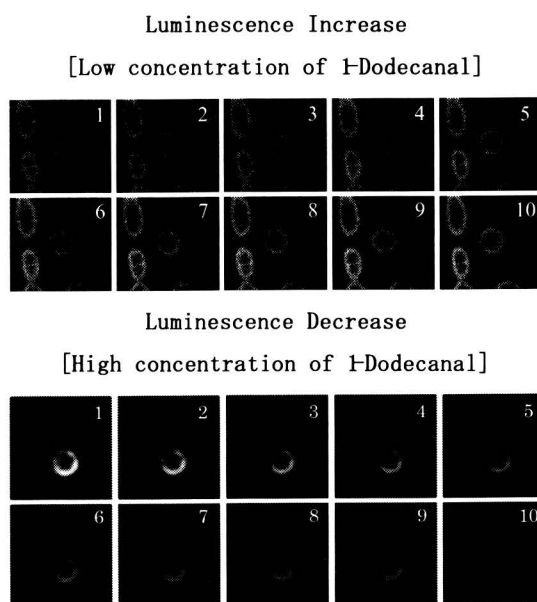


Fig. 7 L'ase バクテリア発光強度の時間変化

Fig. 7は、滴下アルデヒド量が大きく異なる2つの実験例を示している。いずれの場合においても、刺激を受けた後、発光コロニーからの発光が大きく変化すること、この変化は、発光画像の輝度を時間分解することによって定量的に解析できることがわかった。これまでの予備的な実験から、刺激として加えたアルデヒドの量が大きいときには、発光強度は時間と共に低下すること、一方、アルデヒドの量

が小さいとき、発光強度は時間とともに増加することが判った。ラインプロファイル解析法を用いることによって、この画像として捉えた発光強度の変化は、時間的にだけでなく、空間的にも解析することが可能であった。また、画像解析法を駆使して得られたこれらの発光挙動の解析結果は、*in vitro* L'ase 反応で測定される発光挙動と比較的によく対応していることが判った。このことから、TRMSIAが外的刺激に対する微生物の発光応答の生物学的研究において有効であることが示唆された。

広い海洋において、浮遊して生息する発光微生物からの発光を観察することはきわめて困難である。これは単に、発光微生物密度が低いことによるのではなく、密度が低いときには発光能をほとんど発現できないことに起因する。しかしながら、魚との共生によって発光器官で増殖したり、あるいはコロニーを形成すると、細胞間のコミュニケーションによって誘導される物質が結果的に発光能を発現させることが知られている(文献3)。また、L'ase触媒回路への電子供給によって開始される発光は、電子供給源である呼吸系と密接にリンクしていることが推察される。

今回の実験結果から、時間分解反応画像解析を用いることによって、海面下500mの海洋に棲む発光性微生物から発するメッセージを科学的に読み取ることが可能であることが確かめられた。ダイナミックな分析手法が、空間的な画像解析と結びつくことによって、分析化学は生き物の世界の営みまで、探索のフィールドを広げることが出来るという感触を楽しみながら、研究を続けたいと願っている。

この研究は、長年分光機器の開発を手がけてきたユニソク株式会社社長の長村俊彦氏とBZ反応の時空間パターンの研究をしてきた松村との話し合いの中で着想され、ユニソク技術者の中川達央氏が装置設計を担当し、リサーチアシスタントの相原良一氏、岡崎紀明氏、鈴木健二氏の実験による検討を経て、開発された。若い化学者、技術者の熱い議論が、装置開発の原動力になった。この開発は科学研究費(基

盤 B 研究課題番号 10554046) によって行われた。これらのことを感謝してここに報告する。

文 献

- 1) Matsumura, T., Fukuda, T. and Karatani, H., Nakagawa, T., Nagamura, T., *Anal. Sci.*, 2001, i543-i545(2002)
- 2) Karatani, H., et al., *Photochem. Photobiol.*, 71, 230-236 (2000).
- 3) Hastings, J. W., Neelson, K. H., *Annu. Rev. Microbiol.* 31, 549- 595 (1977).
- 4) Nakagawa, T., Nagamura, T., Karatani, H., Matsumura, T., *Bunseki Kagaku*, 52, 139-145 (2003)