

Notice on Plankton Seminar

#15008

9:30-11:30, 15 July (Wed.) 2015 at room #N204

Collins, A. M., H. D. T. Jones, D. Han, Q. Hu, T. E. Beechem and J. A. Timlin (2011)

Carotenoid Distribution in Living Cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae)

PLoS ONE 6: 9

e24302. doi: 10.1371/journal.pone.0024302

緑藻 *Haematococcus pluvialis* の生細胞におけるカロテノイドの分布

カロテノイドはテトラテルペノイド色素の1つで、植物、細菌、菌類、動物といった幅広い生物に含まれている。光合成生物においてカロテノイドは吸光色素としての役割と、過度に強い光を消散する光保護作用の役割を果たしている。このように光合成に不可欠で、葉緑体内に存在しているカロテノイドは1次カロテノイドと呼ばれている。一方、光合成に関与しておらず、葉緑体外に存在しているカロテノイドは2次カロテノイドと称される。藻類の一部の種はストレス環境下で細胞内の脂質体に2次カロテノイドを蓄えることが知られている。*Haematococcus pluvialis* は淡水に生息する緑藻で、高光強度等の生育に不適切なストレス環境下において、カロテノイドの1種で赤色のアスタキサンチンを細胞内で合成・蓄積することが知られている。このアスタキサンチンの合成・蓄積は、 β -カロテンが葉緑体の膜を通過してアスタキサンチンに変化し、脂質体に貯蔵されて起こると考えられているが、生細胞でその過程を直接観察した研究はないのが現状である。本研究では共焦点ラマン顕微鏡とMCR (multivariate curve resolution, 多変量カーブ分解) を用いて、*H. pluvialis* の細胞内におけるアスタキサンチンの時空間的な蓄積の遷移を観察することを目的とした。

H. pluvialis の栄養細胞の培養には、Bold's Basal 培地に規定量の3倍のチッ素とビタミンを加えた培地を使用し、光強度 $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期 12 hL: 12 hD、温度 24-27°C の条件下で培養した。また、*H. pluvialis* がパルメロイド (細胞外多糖類を分泌して群体全体が寒天質に包まれた状態) を形成している時には改変 BG-11 培地を使用した。*H. pluvialis* にアスタキサンチンを産生させる際は、栄養細胞とパルメロイド状細胞をチッ素制限の BG-11 培地に懸濁し、光強度 $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の高光強度の条件下で数日間の培養を行った。*H. pluvialis* の観察には WiTec alpha3000R 共焦点ラマン顕微鏡を用い、励起光は 532 nm の波長のものを使用した。励起光の照射で得られた細胞全体のラマンスペクトルから、MCR を用いて細胞内に存在する色素であるアスタキサンチン、 β -カロテン、クロロフィルに由来するスペクトルをそれぞれ抽出し、これら3種の色素の細胞内における分布を示す画像を作成した。

H. pluvialis の培養の結果、チッ素制限かつ高光強度のストレス条件下の *H. pluvialis* のパルメロイド状細胞は、24時間後からアスタキサンチンを生成し、5日後にはアスタキサンチンを大量に蓄積した不動胞子を形成することが確認された。ラマン顕微鏡を用いた観察より、生育に適切な条件下での *H. pluvialis* の細胞では、クロロフィルと β -カロテンは葉緑体内に分布する一方、アスタキサンチンはほとんど存在しなかった。逆にストレス条件下でアスタキサンチンを生産したパルメロイド状細胞では、クロロフィルは葉緑体内に分布していたが、 β -カロテンは葉緑体外に存在しており、その位置はアスタキサンチンの分布と一致した。この結果より、 β -カロテンがアスタキサンチンの生合成の前駆体であること、また、 β -カロテンからアスタキサンチンへの変化が葉緑体外で行われていることが示唆された。

本研究により *H. pluvialis* の細胞内におけるカロテノイド生成のメカニズムの一端が明らかにされた。今後はより短い波長の励起光を用い、ルテイン等の他の色素にも注目することによって、カロテノイド生成のメカニズムが解明できると考えられる。また、今回の実験ではスペクトルの分析にMCRを用いたが、この手法を用いることにより共鳴ラマン散乱光や自家蛍光を含む細胞全体の複雑なスペクトルから必要とする物質のスペクトルを抽出することが可能であった。本研究の手段・方法は、生物の生体システムに関する他の研究にも応用可能と考えられる。

横溝 岳志