

レーザーラマン顕微鏡を用いた植物プランクトンの分類と生理生態に関する研究  
(修士論文中間発表)

【背景及び目的】

レーザーラマン顕微鏡とは、レーザー光を試料中の分子に照射してラマン散乱光を発生させ、それらをラマンスペクトルとして記録する装置である。記録されたラマンスペクトルには試料の分子構造やダイナミクスに関する情報が含まれており、スペクトルの解析により、試料の化学的な情報を間接的にまた非破壊的に得ることができる。レーザーラマン顕微鏡は、近年様々な分野での研究に用いられ始めているが、植物プランクトンを対象に行った研究は知見が殆どないのが現状である。特に植物プランクトンの栄養細胞と休眠期細胞(シスト)の化学組成の違いに着目した研究はない。そこで本研究では、①5網の植物プランクトン栄養細胞のラマンスペクトルの測定、②有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* シスト内部の色素体のラマンスペクトルの測定、③赤潮ラフィド藻 *Chattonella antiqua* シスト内部の色素体のラマンスペクトルの測定を行い、結果を比較してカロテノイドを中心とした植物プランクトン細胞の化学組成について検討を行った。以上から、各分類種間の特徴の相違、生活環の中のステージの相違による化学成分(カロテノイド)の変化などを解明する一助とする。

【材料と方法】

① 5網の植物プランクトン栄養細胞のラマンスペクトルの比較

ラマンスペクトルの測定は珪藻12種、渦鞭毛藻5種、ラフィド藻2種、緑藻1種、ユーグレナ藻1種の計5網21種類の海産植物プランクトン培養株について行った。植物プランクトンの培養は改変SWM-3培地を用いて行い、温度20℃、光強度 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 、明暗周期14hL:10hDの条件で約2週間培養したものを実験に供した。

ラマンスペクトルの測定は、植物プランクトンの培養10 $\mu\text{L}$ を24 $\times$ 32nmのカバーガラス2枚に封入して行った。励起光は532nm、レーザーのパワーは0.15mW、分光器の回折格子の溝の数は1200gr/mmとした。スペクトルの測定は1種当たり縦方向に10ヶ所、横方向に10ヶ所の計100ヶ所行い、測定ポイントの間隔は約1 $\mu\text{m}$ 、露光時間はそれぞれ0.2秒とした。データの解析ではIgor Proを使用し、データ解析として主成分分析(PCA)を行った。

② 渦鞭毛藻 *A. tamarense* シスト内部の色素体のラマンスペクトルの測定

シストは2015年1月に岩手県大船渡港で採泥した泥から採取した。ラマンスペクトルの測定はシストの色素体とその外部の2ヶ所について行い、両者のラマンスペクトルの比較を行った。解析は多変量カーブ分解(MCR)を実施した。ラマンスペクトルの測定は①と同様に行った。

③ ラフィド藻 *C. antiqua* シスト内部の色素体のラマンスペクトルの測定

シストは2015年4月に有明海で採泥した泥からピックアップした。ラマンスペクトルの測定、解析は②と同様に行った。

## 【結果及び考察】

### ① 5 網の植物プランクトン栄養細胞のラマンスペクトルの比較

いずれの種もカロテノイド由来のラマンスペクトルが強く出る結果となった。これはカロテノイドの電子吸収帯と励起光の波長が一致し、ラマン散乱光の共鳴現象が発生したためと考えられる。いずれの種のラマンスペクトルも  $1525\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_1$ ),  $1160\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_2$ ),  $1009\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ ) 付近に大きなピークを持っており、 $\nu_1$ はカロテノイドのC=C結合の伸縮振動、 $\nu_2$ はC-C伸縮振動、 $\nu_3$ はメチル基の横揺れ振動に起因していると考えられる。これらのピーク的位置は、プランクトン細胞に含まれているカロテノイドにより違いが認められた。特に渦鞭毛藻のスペクトルでは、カロテノイドの1種であるペリディニンに特徴的なピークが強く現れた。珪藻とラフィド藻のラマンスペクトルにはフコキサンチン、緑藻のラマンスペクトルには $\beta$ -カロテン、ユーグレナ藻のラマンスペクトルにはジアジノキサンチンのラマンスペクトルが認められ、それぞれの分類群に特徴的なパターンが強く反映されていると考えられた。今後これらのカロテノイドのラマンスペクトルを測定し、裏付けを進める予定である。PCAでは珪藻とラフィド藻が1つのグループを形成し、その他の3網はそれぞれ独立したグループであることが確認された。

### ②渦鞭毛藻 *A. tamarense* シスト内部の色素体のラマンスペクトルの測定

シストの色素体とその外部のラマンスペクトルでは、ピーク位置及び波形に差異が認められた。MCRによる解析では、シストの色素体にのみ集中して存在するカロテノイドの存在が示唆された。過去の研究より、カロテノイドの $\nu_1$ のピーク的位置はカロテノイドの共役ポリエン鎖の長さとの関係のあることが分かっている。色素体に集中して存在するカロテノイドの $\nu_1$ は $1519\text{ cm}^{-1}$ と比較的低い位置にあるため、このカロテノイドは長めの共役ポリエン鎖を有する可能性が考えられる。

### ③ラフィド藻 *C. antiqua* シスト内部の色素体のラマンスペクトルの測定

②と同様にシストの色素体とその外部のラマンスペクトルではピーク位置及び波形に差異が確認された。MCRによる解析も同様に行ったが、現時点では色素体に特異的に含まれているカロテノイドがあるかどうかは明らかにならなかった。MCRによる解析の精度を上げることが今後の課題である。

## 【今後の展望】

フコキサンチン、 $\beta$ -カロテン、ジアジノキサンチン、ペリディニンのラマンスペクトルを計測し、①の考察を進める予定である。また、これらのラマンスペクトルを計測することで②と③で行ったMCRによる解析がより深化できると考えている。

横溝 岳志

\*\*\*\*\*

次回のゼミ (11月28日(月) 9:30~, N204にて) は、卒論中間発表です。