

共鳴ラマン分光法を利用した珪藻 *Cyclotella* 細胞内のカロテノイドの探索

珪藻は自然環境下において無光層から有光層へと運ばれると急激な光度の上昇に晒されることとなる。この際、光合成器官へのダメージを最小限に抑えるための光保護機構が必要となる。珪藻の有する光保護機構の一つはジアジノキサントフィルサイクル (またはキサントフィルサイクル) と呼ばれるものである。このサイクルは強光下で葉緑体内のジアジノキサントフィル (DD) が脱エポキシ化されてジアトキサントフィル (DT) に変換される機構であり、過剰な光エネルギーを熱として消散するのに重要な役割を果たしている。また、強光下ではこのような DD から DT への変換に加え、DD サイクルに関わる色素の総量自体が増えることが知られている。これらの色素の蓄積は珪藻 *Cyclotella meneghiniana* の場合、光化学II内のフコキサントフィル a/c タンパク質 (FCP) 複合体で主に起こると考えられている。高等植物の光保護機構はキサントフィルサイクルと呼ばれるもので、レーザーラマン顕微鏡を用いた研究により、キサントフィルサイクルで生成されたカロテノイドはアンテナ色素タンパク質に強く結合していることが明らかにされた。しかしながら、植物プランクトンの DD サイクルに関してレーザーラマン顕微鏡を用いて同様の研究を行った知見は無いのが現状である。そこで本研究では、珪藻 *C. meneghiniana* の細胞内のカロテノイドの組成や構造が光条件によってどのように変化するか検証することを目的に、レーザーラマン顕微鏡を用いた分析を行った。

実験には温度 20°C、回転数 120 rpm の条件で攪拌培養した珪藻 *C. meneghiniana* を使用した。低照度の実験区は 40  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、高照度の実験区は 140  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  に光強度を設定し、明暗周期 16 hL:8 hD の条件下でそれぞれ 18 日間培養した。解析は HPLC による色素の分析とレーザーラマン顕微鏡によるラマンスペクトルの測定との2つによった。HPLC による色素分析ではまず試料を完全に乾燥させ、90%アセトンに懸濁して 10 分間の超音波処理を行い色素を抽出した。抽出液は遠心分離にかけ、上清液をカラムに注入し、色素の定性・定量分析を行なった。レーザーラマン顕微鏡によるスペクトルの測定では、励起光として 413.7 nm, 441.6 nm, 457.9 nm, 476.5 nm, 488.0 nm, 496.5 nm, 514.5 nm, 528.5 nm, 570 nm の 9 種類を使用した。また、*C. meneghiniana* の主要光合成色素であるフコキサントフィル、DD,DT のラマンスペクトルの測定は 514.5 nm の励起光を用いて行った。

フコキサントフィル、DD,DT のラマンスペクトルはいずれも 1530 ( $\nu_1$ ), 1160 ( $\nu_2$ ), 1010 ( $\nu_3$ ), 970 ( $\nu_4$ )  $\text{cm}^{-1}$  付近にピークを示した。ピークの位置は 3 種のカロテノイド間で違いが見られ、例えば  $\nu_1$  の位置はフコキサントフィルで 1534  $\text{cm}^{-1}$ , DD で 1529  $\text{cm}^{-1}$ , DT で 1527  $\text{cm}^{-1}$  にそれぞれ観察された。HPLC を用いた分析では、クロロフィル a あたりの各色素の含有量を定量分析した。結果、高照度と低照度の両方の実験区で、フコキサントフィルが  $\beta$  カロテン、DD, DT よりも量がかかなり多いことが分かった。また、 $\beta$ -カロテンとフコキサントフィルは低照度と高照度の実験区間で含有量にほとんど違いが見られなかった。一方、高照度では、DD は 3 倍、DT は 5 倍ほど含有量が多かった。測定したラマンスペクトルの内、570 nm と 528.5 nm の励起光を使用した場合はフコキサントフィルの影響が強く現れた。514.5 nm, 488 nm, 476.5 nm の励起光で測定したラマンスペクトルには DT のスペクトルが強く反映されており、特に  $\nu_4$  付近の 983  $\text{cm}^{-1}$  のピークの強度は大きかった。 $\nu_4$  付近のピークの強度は、カロテノイドのポリエーテル鎖が捻れ構造を持つ時に大きくなることが知られている。よって、*C. meneghiniana* の有する DT はタンパク質に結合し、強い捻れ構造をとっていると推測された。496.5 nm の励起光で測定したラマンスペクトルには DD の共鳴ラマン散乱が見られ、低照度の実験区では DD 由来のピークが 980  $\text{cm}^{-1}$  に弱く現れた一方、高照度の実験区では 983  $\text{cm}^{-1}$  に強いピークが現れていた。低照度と高照度でピークの強度が違うことから、低照度で細胞内に存在する DD はタンパク質にあまり結合せず、平面に近い構造をとっている一方、高照度で生成された DD は強い捻れ構造を持ってタンパク質に結合していると考えられた。本研究ではレーザーラマン顕微鏡を用いることにより植物プランクトンを傷つけることなく、DD サイクルに関わるカロテノイドの情報を引き出すことに成功した。今後は強光下での光保護機構のメカニズムについてもレーザーラマン顕微鏡を用いた分析で明らかにされることが期待されている。