

修士論文内容の要旨

ふりがな	よこみぞ たけし	
氏名	横溝 岳志	
専攻名	海洋生物資源科学専攻	
入学年度	平成 27 年 4 月	
指導教員名	主査 今井一郎 特任教授	副査 酒井隆一 教授 副査 山口篤 准教授
論文題目	レーザーラマン顕微鏡を用いた植物プランクトンの カロテノイドの分析に関する研究	
<p>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。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、それを比較・解析することにより、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先進的な研究に用いられ始めているが、植物プランクトン分野の研究はほとんど行われてないのが現状である。特に植物プランクトンの休眠期細胞やシストのラマンスペクトルを測定し、考察した研究は見当たらない。そこで本研究では、(1) 植物プランクトン 5 網のラマンスペクトルの測定及びカロテノイド 3 種の標準ラマンスペクトルの測定、(2) 有毒渦鞭毛藻 <i>Alexandrium tamarense</i> シスト内部の赤褐色色素体のラマンスペクトルの測定、(3) 赤潮ラフィド藻 <i>Chattonella</i> シスト内部の濃褐色色素体のラマンスペクトルの測定を行い、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、各分類群間の特徴の相違や生活環の中のステージの相違によるカロテノイドの違いに関して考察を行なった。</p> <p>(1) 植物プランクトン 5 網のラマンスペクトルの測定及びカロテノイド 3 種の標準ラマンスペクトルの測定:ラマンスペクトルの測定は珪藻 11 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 20 種の海産植物プランクトンの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°C 光強度 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$、明暗周期 14 hL:10 hD の条件で約 2 週間培養したものを測定に供した。</p> <p>ラマンスペクトルの測定は、植物プランクトンの培養 10 μL をカバーガラス 2 枚に封入して行った。励起光は 532 nm、レーザーのパワーは 0.15 mW、分光器の回折格子の刻線数は 1200 gr/mm とした。ラマン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 μm、露光時間はそれぞれ 0.2 秒とした。データ解析は主成分分析 (PCA) により行った。カロテノイドの標準ラマンスペクトルの測定は β-カロテン、フコキサンチン、ジアジノキサンチンの 3 種類について行った。β-カロテンはエタノールとシクロヘキサンに溶解させたもの (濃度はそれぞれ 6</p>		

mg L⁻¹, 400 mg L⁻¹), フコキサンチンはエタノールに溶解させたもの (濃度は 300 mg L⁻¹) のラマンスペクトルの測定も行った。

分析に用いたいずれの種も、カロテノイド由来のラマンスペクトルが強く表れる結果となった。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 cm⁻¹ (v₁), 1160 cm⁻¹ (v₂), 1009 cm⁻¹ (v₃) 付近に大きなピークを持っており、v₁はカロテノイドのC=C結合の伸縮振動、v₂はC-C伸縮振動、そしてv₃はメチル基の横揺れ振動に起因していると考えられる。ラマンスペクトルの波形は植物プランクトンに含まれているカロテノイドによって相違が認められた。特に渦鞭毛藻のラマンスペクトルでは、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β-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それぞれ強く反映されていると考えられた。PCA解析の結果、植物プランクトンのラマンスペクトルを4つのグループに分けることに成功した。最も大きなグループはフコキサンチンを主要なカロテノイドとして含む、珪藻、ラフィド藻、渦鞭毛藻 *Karenia mikimotoi* によって構成されていた。*K. mikimotoi* 以外の渦鞭毛藻、緑藻、及びユーグレナ藻は、それぞれ独立したグループを形成した。カロテノイド3種のラマンスペクトルはそれぞれの結果においてピーク位置及び波形に差異が認められた。特にβ-カロテンでは1190 cm⁻¹と1211 cm⁻¹付近のピーク、フコキサンチンでは1179 cm⁻¹付近のピークが特徴的であった。また、同じカロテノイドであっても溶媒に溶けているか否かでピークの位置に多少の違いが出ることも判明した。

(2) 有毒渦鞭毛藻 *A. tamarense* シスト内部の赤褐色色素体のラマンスペクトルの測定:シストは2015年1月に岩手県大船渡湾で採取した海底泥から探索し、分離した。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) によった。ラマンスペクトルの測定は (1) と同様に行った。

シストの色素体とその外部のラマンスペクトルを比較すると、ピーク位置及び波形に差異が認められた。MCRによる解析より、*A. tamarense* シストの色素体及び色素体の外部のラマンスペクトルを5つの成分に分解することができた。この5つの成分の内1つはシストの色素体にのみ集中して存在しており、ラマンスペクトルの波形からペリディニン以外のカロテノイドであると考えられた。このカロテノイドの種類を特定することはできなかったが、v₁のピークの位置が1519 cm⁻¹と比較的低い位置に観察されたことから、長めの共役ポリエン鎖を有するカロテノイドであることが示唆された。

(3) 赤潮ラフィド藻 *Chattonella* シスト内部の濃褐色色素体のラマンスペクトルの測定

シストは2015年4月に有明海から得た海底泥試料よりピックアップした。ラマンスペクトルの測定は (1) 及び (2) と同様に行った。

(2) の渦鞭毛藻 *A. tamarense* の場合と同様に、シストの濃褐色色素体とその外部のラマンスペクトルでは、ピークの位置及び波形に差異が確認された。色素体の外部のラマンスペクトルは *C. antiqua* の栄養細胞のラマンスペクトルと類似していたことから、フコキサンチンが多く含まれていると考えられる。一方、濃褐色色素体のラマンスペクトルにはフコキサンチンのラマンスペクトルの特徴である1179 cm⁻¹付近のピークが表れていなかった。*Chattonella* のシストに関しても、色素体を構成するカロテノイ

ドの種類を特定することはできなかったが、ラマンスペクトルのピーク位置や波形から判断すると、 β -カロテン様のカロテノイドではないかと考えられる。

本研究では、ラマンスペクトルの測定と解析を行うことにより、植物プランクトンに含まれてい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、シストの発芽過程のラマンスペクトルを経時的に測定するなど、生理、生態、生活環等に焦点を当てた応用的の研究の進展が期待される。また、1064 nm など近赤外領域の波長を励起光として用いるならば、クロロフィルやタンパク質等のラマンスペクトルの分析が可能である。このようにカロテノイド以外の主要な生体物質に着目した研究も視野に入ることから、将来的に革命的な研究の進展が期待される。