

## 資源微生物の細胞内の分子動態の顕微ラマン分光法による分析 —ラマンスペクトル測定と解析—

生命工学科 教授

山本 達之

### 目 的

ユーグレナやケイソウなどの光合成微生物を利用した油脂生産や、酵母などのアルコール発酵微生物を用いたバイオエタノール生産の試みが広く行われているが、油脂やアルコールなどの分子が、細胞内のどの部位で生合成されているのか、未だに不明な点が多い。これら、資源となる分子が、細胞内のどこで合成され、蓄積されるのかを明らかにすることが、合成された資源分子を細胞から取り出すために重要な情報である。そこで、“分子の指紋”であるラマンスペクトルを目印に、これら分子の合成動態や、蓄積過程を視覚的に明らかにすることを目指す。また、真核生物の共生進化の原理を理解するためのモデル系である、ミドリゾウリムシと共生クロレラの共生系成立過程をラマン分光法によって観察する。共生系成立の鍵は、食胞膜から PV 膜への分化が握っているが、PV 膜の分子組成も不明である。そこで、PV 膜のラマンスペクトル測定結果から、分子組成の推定を行う。

### 研究成果

#### 課題 1. 飢餓状態の分裂酵母株 (L968) の孢子形成過程における生体分子分布の観察

分裂酵母の孢子形成は、接合、減数分裂、前孢子膜の形成、孢子壁の形成の順に進む。その各ステージにおける、ラマンマッピングを得ることができた。その結果を解析した結果、孢子壁の形成の際に、1330, 1125, 920, 850 $\text{cm}^{-1}$  のラマンバンドの強度が増大することが分かった。これらのラマンバンドと、マンノース、 $\beta$ -1,3 グルカン、キチン、キトサンのラマンバンドとの比較から、孢子壁形成の初期過程で糖類の蓄積が起こり、最終的には、キチン層が形成されると推定された。

#### 課題 2. 「ユーグレナが産生する脂質分子の細胞内分布の観察」

農工大の田中教授らが開発した、ゲルによる細胞固定法を用いた結果、鞭毛運動や、ねじりもじり運動を抑えて、ユーグレナ細胞のラマンマッピングを測定することができた。その結果、カロテノイド、シトクローム、脂質などの分子の細胞内動態を視覚化することに、世界で初めて成功した。現在は、嫌気、好気環境の各々の条件下で、脂質分子の細胞内動態のラマンマッピング測定を試みている。

#### 課題 3. 「ミドリゾウリムシの共生クロレラを覆う PV 膜を構成する分子構造の推定」

ミドリゾウリムシの繊毛を除去し、原形質流動を抑えて、クロレラを覆う食胞膜のラマンスペクトルを測定することができた。PV 膜のラマンスペクトル測定は出来ていない。これは、PV 膜の厚さが数百 nm 以下しかないために、レーザーのビームスポット系よりも小さいためである。そこで、ラマン分光装置を、より明るい光学系に改良しつつある。また、成蹊大学の青柳准教授の協力を得て、TOF-SIMS 法によって、食胞膜と PV 膜の官能基の 2 次元マッピング測定を行う予定にしている。

### 社会への貢献

ラマン分光法によって、微生物の代謝をあるがままに、生きたままで追跡することが可能であることを、3 つの事例を通して明らかにすることができた。これらの成果は、島根大学主催の講演会等で地元市民にアピールできた。

**次年度に向けた検討状況**

現在進行中の3つの課題は、順調に進んでいるが、27年度末から、クワガタムシ♀の体内で発見された、新規酵母を用いた、キシロース資化の可能性を検討する研究を産総研の深津武馬研究室と共同で開始し、新規酵母のラマンスペクトル測定に成功した。次年度は、いもち病菌の菌糸のラマンマッピングも行って、菌糸内の毒素の動態の観察も試みる予定である。いずれも、エネルギー資源、農作物の耐病対策など、COC事業の観点から重要な研究である。

**著書**

1. 「ラマン分光法」濱口宏夫 編, 「ライフサイエンスへの応用」分担執筆, 講談社(2015年3月出版予定)

**学会発表等**

1. Raman spectroscopic study on biological tissues and living cells, T. Yamamoto, M. Kawamukai, Y. Kinoshita and H. Hamaguchi, 5th International Conference on Perspectives in Vibrational Spectroscopy, Trivandrum, India, Jul. 08-12, 2014, invited
2. The effect of  $\alpha$ -lipoic acid included by  $\gamma$ -cyclodextrin on the growth of fission yeasts, T. Yamamoto, R. Ikarashi, T. Kaino, M. Kawamukai, K. Terao, D. Nakata, N. Ikuta, M. Ando, S. Shigeto, H. Hamaguchi, The 24th International Conference on Raman Spectroscopy, Yena, Germany, Aug. 10-15, 2014
3. Raman spectroscopic analysis of the PV membrane of symbiotic *Chlorella variabilis* in *Paramecium bursaria*, A. P. Hata, Y. Kodama and T. Yamamoto, Biomedical Molecular Imaging 2014, Taipei, Taiwan, Nov., 06-08, 2014
4. 山本達之, "新しい医療診断技術「ラマン分光法」とは何か?", 島根大学公開講座, 2014年7月19日, 島根大学.
5. 山本達之, "未来を開く光, ラマン光を解説する", 島根大学公開市民講座, 2014年8月31日, パルメイト出雲.
6. 山本達之, "生命のきらめきを視る", 島根大学法人化10周年記念行事, 2014年10月11日, 島根大学.
7. 山本達之, "島根大学「医・生物ラマンプロジェクトセンター」による取り組み", 日本学会会議中国・四国地区会議公開学術講演会, 2014年12月6日, くにびきメッセ
8. Invited Lecture, "Biomedical applications of Raman spectroscopy", Banaras Hindu University, Department of Chemistry, 9<sup>th</sup>, Dec., 2014
9. Biomedical Applications of Raman spectroscopy –Medical diagnosis–, Tatsuyuki Yamamoto, Makoto Kawamukai, Yoshikazu Kinoshita, Atsushi, Nagai, Hiro-o Hamaguchi, 2nd Weak Intermolecular Interaction, 2015年3月5日, 学習院大学, invited(予定)

**受賞等**

なし

**外部資金**

1. 科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究「ミドリゾウリムシ・クロレラ共生系のPV膜分化機構のラマン分光法による解明」平成26年度2,340千円, 27年度1,690千円 間接経費含む。