

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 —ミドリゾウリムシを用いたラマン分光測定のための、ミドリゾウリムシの培養と測定用の試料の作成—

生物科学科 准教授

児玉 有紀

目的

細胞内共生過程は真核細胞の進化の原動力である。その過程を理解するモデル材料の一つとしてミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) とクロレラ (*Chlorella* spp.) の共生過程が使われてきた。クロレラを除去したミドリゾウリムシとミドリゾウリムシから単離したクロレラはそれぞれ単独でも生存できる。ミドリゾウリムシの細胞口から取り込まれたクロレラは食胞膜に包まれ、その後食胞膜は宿主のリソソームが融合しない **perialgal vacuole (PV)** 膜に分化する。膜内のクロレラは消化されず、互いに生存に必要な物質を供給し合う相利共生系を構築する。クロレラはミドリゾウリムシに共生することで、PV 膜を通してマルトースなどの糖を細胞外に放出することからも有用微生物であると考えられている。細胞内共生の成立と維持における PV 膜の重要さは明確だが、PV 膜の性質はほとんど明らかにされていない。そこで、ラマン分光法を用いて共生の成立と維持の鍵ともいえる PV 膜の構成成分を解明することで、有用微生物を生物資源として活用するために必要な基礎研究を推進することを目的として行った。

研究成果

ミドリゾウリムシの脱繊毛と麻酔

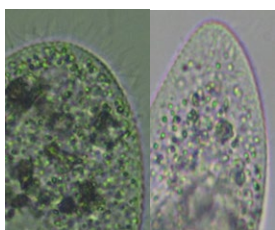


図1 処理前(左)と処理後(右)の細胞

ラマン分光法を使ってミドリゾウリムシ細胞内の食胞膜や、共生クロレラを包む PV 膜を測定するためには、まず繊毛運動の抑制が必要であった。そこで、従来から繊毛虫の繊毛運動の抑制に用いられているエタノール水溶液を使った脱繊毛と塩化ニッケルを使った細胞の麻酔の条件検討を行った。4.3%のエタノール水溶液処理によって、脱繊毛が可能であった。また、0.1 mMの塩化ニッケル処理で細胞が麻酔され、繊毛運動を止めることができた。エタノール水溶液と塩化ニッケル処理の結果、細胞を準備してから1時間以上経過し、繊毛の生え変わりが起こっていても、ゾウリムシの遊泳運動は制御されたまま有効であった(図1)。これらの処理では細胞内の原形質流動までは止めることができなかったため、さらに10 µg/mlのノコダゾール処理を加えた。

ラマンスペクトルの計測

繊毛運動が抑制されると食胞形成も抑制されるので、エタノール、塩化ニッケル、ノコダゾールで処理する前にミドリゾウリムシに無色のラテックスビーズを与え、10分以上インキュベートし、食胞膜を形成させた。食胞膜が形成されていることを光学顕微鏡で確認した後、上記の処理で細胞運動を抑制した結果、ラテックスビーズを取り込んだ食胞膜のラマンスペクトルを測定することができた。

食胞膜の単離

PV 膜は食胞膜由来の膜であるため、食胞膜のラマンスペクトル測定の精度を高めることが必要である。

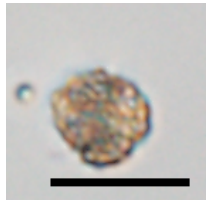


図2 ビーズを取り込んだ食胞のノマルスキー像
Bar = 10 μ m

そこで、1.0, 1.3, 1.6, 2.0 M のショ糖不連続密度勾配遠心法を用いてミドリゾウリムシからの食胞膜の単離を行い、単離食胞のラマンスペクトルを測定することにした。その結果、1.6 M の分画からラテックスビーズを包む食胞膜が回収できた (図 2)。さらに、ラテックスビーズの直径を変えたり、細胞の破碎に用いる界面活性剤の濃度や破碎時間を短縮したり、単離に用いるミドリゾウリムシの細胞数を増やすなど、より質の良い食胞膜単離のための条件検討を行った。

社会への貢献

細胞運動を抑制するために様々な処理が必要ではあるが、ラマン分光法によってミドリゾウリムシでも生きたままで追跡することが可能であることを、島根大学主催の講演会等で地元市民にアピールできたこと。

次年度に向けた検討状況

PV膜単独のラマンスペクトルに先立って、食胞膜の純粋なラマンスペクトル測定するためにこれまでとは異なる対物レンズを用いた測定を行いつつある。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。また、山口大学の藤島教授の研究室で条件検討が行われたPV膜付きクロレラの単離法の再現性を確認し、PV膜が接着したクロレラの割合が高くなるように条件検討を行いたい。

公表論文

無し

学会発表等

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

「繊毛虫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決定」 児玉 有紀, Ana Paula Hata, 山本 達之. 島根県食品工業研究会との交流会 -生物資源科学部ミッション報告会・農林水産業の六次産業化プロジェクトセンター報告会- 2015年2月21日

受賞等

無し

外部資金

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 1,800 千円 (540 千円) , 27年度 1,300 千円 (390 千円)

研究分担者

代表者: 山本 達之