

顕微ラマン分光法を用いた糸状菌 *Aspergillus nidulans* の 伸長過程モニタリング

¹関西学院大理工, ²筑波大生命環境
○安田充¹, 竹下典男², 重藤真介¹

Growth Process Monitoring in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans* Using Raman Microspectroscopy

○Mitsuru Yasuda¹, Norio Takeshita², Shinsuke Shigeto³

¹ School of Science and Technology, Kwansai Gakuin University, Japan

² Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Japan

【Abstract】 A filamentous fungus growing by extending the tip of a hypha is widely known as a mold. Some molds have pathogenicity for animals and plants. Understanding the elongation mechanism of a mold is important in prevention and appropriate treatment of diseases caused by pathogenic molds. In recent years, the elongation mechanism is becoming clear by a super-resolution fluorescence microscopic approach that can obtain detailed information of a target molecule labeled with a fluorescent molecule. In order to understand the mechanism more deeply and in a label-free manner, we focused on Raman microspectroscopy. Raman microspectroscopy can provide otherwise unobtainable molecular information in a living cell without the need of labeling. Since it also enables mapping by molecular species such as amino acids and nucleic acids, it is expected that the application of Raman spectroscopy to a mold gives new insight into the elongation mechanism. In this presentation, we report a Raman microspectroscopic analysis of the elongating filamentous fungus *Aspergillus nidulans*.

【序】 糸状の菌糸からなる糸状菌 (カビ) は, 菌糸の先端を伸長させることで生長する。カビの伸長メカニズムを明らかにすることは, 病原性カビにより引き起こされる感染症の予防や治療につながるため, 医療分野のみならず農業分野における主要な課題となっている。近年, 超解像蛍光顕微鏡法により, 伸長メカニズムが明らかになってきた [1]。様々な生化学反応が細胞内で協同的に作用していることを踏まえると, 伸長メカニズムのさらなる理解を目指すには, 多様な分子の情報を同時に引き出す必要がある。そのような手法として, 我々はラマン分光法に着目した。

ラマン分光法では蛍光分子で標識することなく, 細胞が生きたままの状態でも細胞内分子の情報を得ることができる [2]。このラマン分光法を糸状菌に適用すれば, タンパク質や脂質などの分子情報を獲得できるだけでなく, それらの細胞内分布情報を知ることができる。さらに, 菌糸の伸長過程を時間分解して追跡すれば, 伸長メカニズムの分子レベル解明につながる新たな知見が得られると期待される。そこで本研究は, 伸長メカニズムの理解に向けた基礎研究として, 顕微ラマン分光法を用いた糸状菌 *Aspergillus nidulans* の伸長過程モニタリングを目的とした。

【方法】 糸状菌 *A. nidulans* を培養するため, 塩成分として NaNO₃, KCl, MgSO₄·7H₂O, KH₂PO₄, 微量元素として Hutner's trace elements [3], 栄養補助剤として pyridoxin-HCl, uridine, uracil, 主要な炭素源として glucose を含む最少培地 (液体培地, pH 6.5) を調製した [3]。寒天培地に生長させた *A. nidulans* を, 調製した最少培地を含むガラスボ

トムディッシュに植菌し、室温で24時間以上、培養した。

A. nidulans の菌糸先端部におけるラマン分光イメージングを、60倍の水浸対物レンズを搭載した正立型顕微ラマン分光装置 (XploRA Nano, HORIBA) で行った。イメージング範囲は $8\ \mu\text{m} \times 7\ \mu\text{m}$ ($0.5\ \mu\text{m}$ ステップ, 総点数 255), 1点あたりの露光時間は 5 sec であった。レーザー波長とレーザーパワーはそれぞれ 532 nm, 4.4 mW であった。

【結果・考察】 特異値分解によりノイズ成分を除去したラマンイメージングデータが、主に5つの成分で構成されていると仮定し、多変量データ解析の一種 multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) 法 [2,4] を用いて解析した。結果を Fig. 1 に示す。赤スペクトルは 748, 1125, 1310, 1583 cm^{-1} に観測されたバンドから cytochrome に帰属される [5]。また, 1302 cm^{-1} (CH_2 ねじれ振動) や 1657 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$ 伸縮振動) などのバンドが観測された緑スペクトルは脂質に [4], 1002 cm^{-1} (phenylalanine 環呼吸振動), 1224 および 1337 cm^{-1} (amide III), 1657 cm^{-1} (amide I) にバンドを示す青スペクトルは cytochrome 以外のタンパク質に帰属される [6]。紫と黒のスペクトルはそれぞれ自家蛍光, 培地に対応する。

つぎに、各成分の分布図 (ラマンイメージ) に着目すると、cytochrome は菌糸先端から少し後方に局在しているが、他のタンパク質は菌糸全体に分布している。ここで特に注目すべき点は、他のタンパク質が菌糸先端に集中していることである。この部分では菌糸生長に関与する細胞骨格とそれらに対応するモータータンパク質や小胞により輸送された様々な細胞外分泌酵素などのタンパク質が活発に活動している [1]。したがって、先端付近のタンパク質の局在がラマンイメージで観測されたと考えられる。菌糸分岐部のイメージング結果など、さらなる詳細については当日報告する。

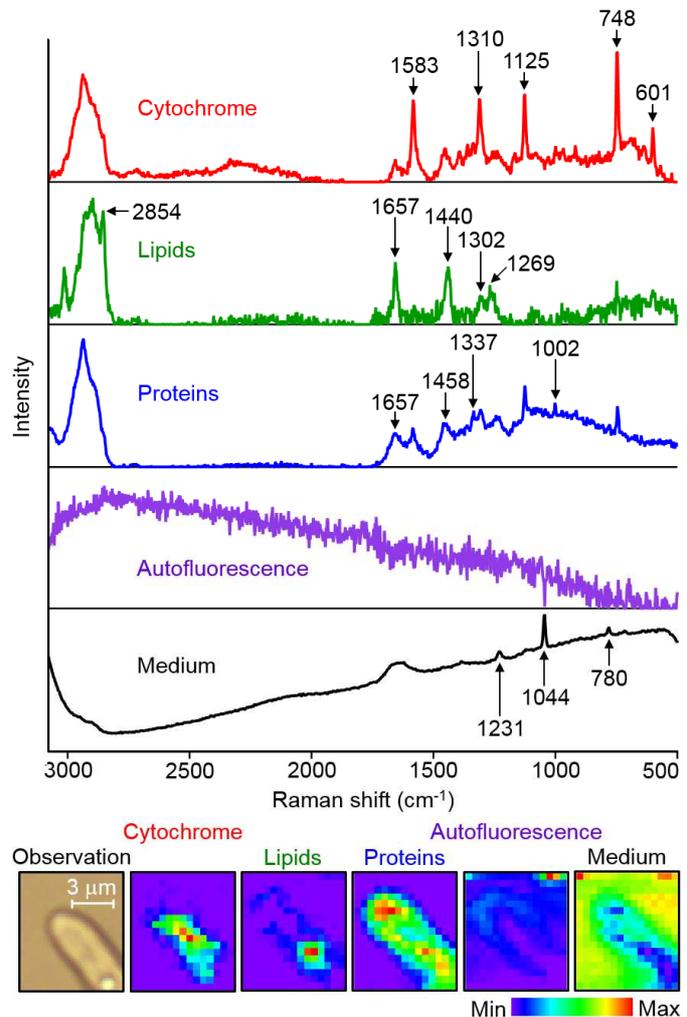


Fig. 1. Raman microspectroscopic imaging of a hypha tip.

【謝辞】 本研究は JST ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト (Grant Number : JPMJER1502) の支援のもと行われた。

【参考文献】

- [1] N. Takeshita *et al.*, *PNAS* **114**, 5701 (2017).
- [2] C.-K. Huang *et al.*, *Anal. Chem.* **84**, 5661 (2012).
- [3] T. W. Hill and E. Kafer, *Fungal Genet. Newsl.* **48**, 20 (2001).
- [4] J.-F. Hsu *et al.*, *Sci. Rep.* **5**, 17541 (2015).
- [5] R. Pätzold *et al.*, *J. Microbiol. Methods* **72**, 241 (2008).
- [6] A. Rygula *et al.*, *J. Raman Spectrosc.* **44**, 1061 (2013).