

糸状菌の顕微ラマン代謝イメージング

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

Microspectroscopic Raman Metabolic Imaging of a Filamentous Fungus

○Mitsuru Yasuda¹, Norio Takeshita², Shinsuke Shigeto¹

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

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

【Abstract】 A filamentous fungus grows by elongating the tip of the hypha. In order to investigate the elongation mechanism, a combined approach of Raman microspectroscopic imaging with stable isotope labeling is used in this work. A Raman band of a stable isotope-labeled compound usually shifts to the lower frequency side with respect to that of the unlabeled compound. By utilizing this characteristic, the localization of a stable isotope that is incorporated into various biomolecules via intracellular biosynthetic reactions, that is, the distribution of the metabolic activity can be visualized. In this study, we demonstrated microspectroscopic Raman metabolic imaging of a filamentous fungus using stable isotope (deuterium) labeling. When the filamentous fungus was cultivated in a liquid medium containing deuterium-labeled glucose, deuterium was found to be localized in the hyphal tip. This result suggests that the metabolic activity was significantly higher in the hyphal tip than the other region or that the deuterium-labeled glucose was incorporated selectively from the hyphal tip.

【序】 糸状の菌糸からなる糸状菌は菌糸の先端を伸長することで生長する。菌糸が伸びる仕組みを代謝の観点から調べるため、本研究では顕微ラマン分光法と安定同位体標識法を利用する。重い安定同位体で標識された化合物のラマンバンドは非標識化合物に比べて低波数側へ同位体シフトする。このラマンバンドの経時変化を追跡することで、安定同位体が細胞内の生合成反応により様々な生体分子に取り込まれた後、どこに局在しているのかを細胞を壊すことなく知ることができ、細胞の代謝活性を非破壊で評価できる [1]。本発表では、重水素で標識したグルコースを用いた糸状菌の顕微ラマン代謝イメージングについて報告する。

【方法】 糸状菌にはモデル生物として広く利用されている *Aspergillus nidulans* を使用した。また、安定同位体標識化合物として C-H 結合の水素 (H) をすべて重水素 (D) で置換したグルコース (以下、グルコース-D と記す) を使用した。最初に、安定同位体を含まない液体培地で糸状菌を 24–48 h、室温で培養した。つぎに、その液体培地を除去し、グルコース-D を含む液体培地を加えた。この培養期間中における糸状菌のタイムラプスラマンイメージングを、60x 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 14x20 点 (0.5 μm 間隔)、1 点あたりの露光時間は 1 sec、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】 糸状菌のタイムラプスラマンイメージングの結果を Fig. 1 に示す。パネル A はグルコース-D を含む液体培地で培養したときの糸状菌の光学顕微鏡像である。白矢印で示した部分では培養 3.0 h 後に隔壁が観察された。この隔壁の形成により、糸状菌がイメージング測定の間も生きていたことが保証される。

パネル A の‘×’印で示した位置におけるラマンスペクトルをパネル B に示す。2150 cm^{-1} 付近に C-D 伸縮振動バンドが観測された。このバンドは~2940 cm^{-1} 付近の C-H 伸縮振動バンドが同位体シフトしたことによるものである。C-D 伸縮振動バンドの存在は糸状菌が細胞内にグルコース-D を取り込んだことを裏付ける。一方、黒矢印で示したシャープなバンドは共鳴ラマン効果によるシトクロム由来のバンドである。

つぎに、パネル A の菌糸先端部におけるマッピング像をパネル C に示す。各マッピング像はバンド強度より作成した。イメージ b では、C-H 結合を含む分子は培養初期の時点で菌糸先端の中央部に局在しているが、時間の経過に伴い、C-H 結合を含む分子が菌糸後方から先端に向かって移動しているように見える。これは生物学的な知見に基づくと、菌糸が伸びるために必要な生体物質が菌糸先端へ輸送されているためと考えられる。

一方、イメージ c に示す安定同位体 D で置換された代謝産物の分布は、菌糸先端部で逆 U 字型の局在パターンを示している。またこの分布は時間の経過に伴って菌糸の後方部へと広がっている。これはグルコース-D が菌糸先端部から選択的に取り込まれた、あるいは菌糸先端部の代謝活性が後方部よりも高いことを示唆している。さらに、イメージ d より、C-H 結合に比べ、C-D 結合をもつ分子の相対量が時間とともに増大していることから、安定同位体 D が生合成反応により様々な生体分子へと取り込まれたことが示唆された。

以上より、糸状菌内の代謝活性を可視化する顕微ラマン分光法と安定同位体標識法との融合技術は、菌糸が伸びる仕組みを代謝の観点から明らかにする強力なツールとして利用できることが証明された。イメージ e の還元型シトクロム b/c (750 cm^{-1}) やタンパク質に由来するイメージング f のアミド I (1650 cm^{-1}) と菌糸伸長の関係については当日報告する。

【謝辞】 本研究は JST ERATO Grant Number JPMJER1502 (N. T. and S. S.) および光科学技術研究振興財団 (M. Y.) の支援のもと行われた。

【参考文献】

[1] H. N. N. Venkata and S. Shigeto, *Chem. Biol.* **19**, 1373 (2012).

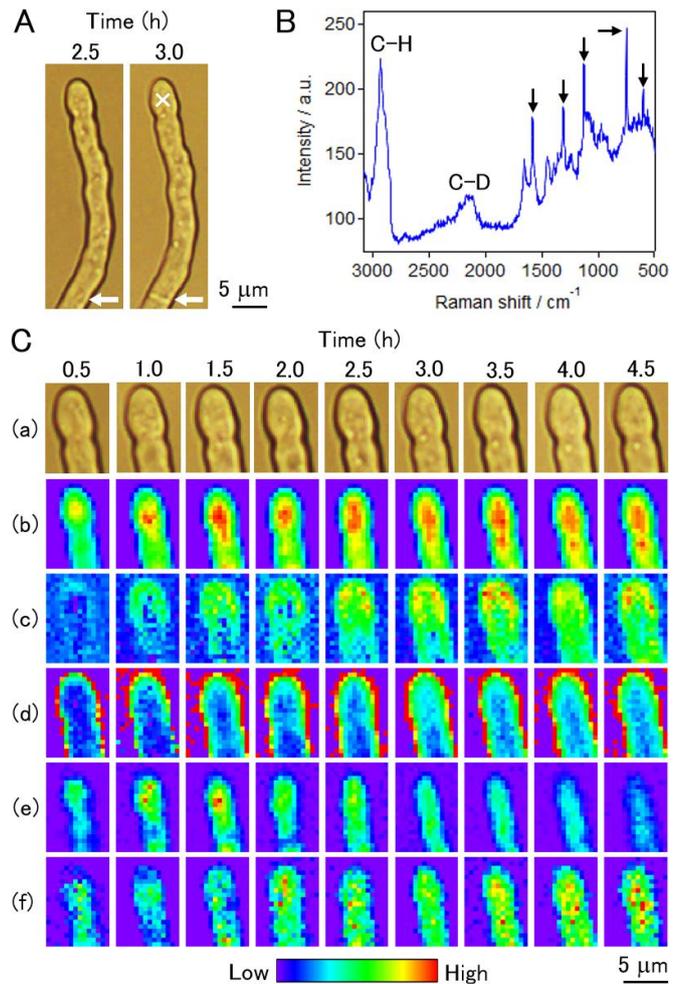


Fig. 1. Time-lapse Raman imaging of *A. nidulans*. Panel A: optical images. Panel B: space-resolved Raman spectrum measured at point X in panel A. Panel C: Mapping images. (a) optical images, (b) C-H, (c) C-D, (d) C-D/(C-D+C-H), (e) reduced cytochrome b/c, and (f) amide I.