

講演番号：1E5p05

講演日時：3月24日 14:34～ 1号館 E5 会場

安定同位体標識ラマンイメージングを用いた糸状菌の代謝ダイナミクスの可視化

Visualizing metabolic dynamics in a filamentous fungus using stable isotope-labeled Raman imaging

○安田 充¹、竹下 典男²、重藤 真介¹ (¹関西学院大理工、²筑波大生命環境)

○Mitsuru YASUDA¹, Norio TAKESHITA², Shinsuke SHIGETO¹ (¹Kwansei Gakuin Univ., ²Univ. of Tsukuba)

【背景・目的】カビである糸状菌は菌糸の先端を伸長することで生長する。菌糸の先端生長機構を調べるため、本研究ではタンパク質や脂質をはじめとする様々な細胞内分子の空間分布情報をもたらすラマンイメージングに着目した。この技術に安定同位体標識法を融合することで、安定同位体標識化合物の取り込みや代謝に伴って変化する細胞内分子のダイナミクスを可視化できるようになり、菌糸の先端生長機構に関する新たな知見を獲得できると考えた。そこで本研究では、安定同位体標識ラマンイメージングを用いた糸状菌の代謝ダイナミクスの可視化を目的とした。

【実験】糸状菌として *Aspergillus nidulans* を使用した。安定同位体標識化合物には C-H 結合部の H を D (重水素) で、または ¹²C を ¹³C で置換した 2 種類のグルコースを使用した。まず安定同位体を含まない通常の液体培地で 1-2 日間、*A. nidulans* を培養した。つぎに、その培地を除去し、安定同位体標識グルコースを含む液体培地を添加して培養した。*A. nidulans* の 532 nm 励起ラマンイメージングを共焦点レーザー顕微ラマン分光イメージングシステム (XploRA Nano, HORIBA) で行った。

【結果・考察】最初に、*A. nidulans* を構成する主な成分を把握するため、通常の液体培地で培養した *A. nidulans* のラマンイメージングデータを、多変量解析の一種である非負値行列因子分解を用いて解析した。その結果、*A. nidulans* のラマンスペクトルは主にシトクロム、その他のタンパク質、脂質、多糖類の 4 成分で構成されることが明らかとなった。つぎに、この解析結果を基に、D 標識グルコースの取り込みのダイナミクスについて調べた。培養時間の経過に伴い、炭素と重水素の結合に由来する C-D 伸縮振動ラマンバンドの出現が観測された。これは *A. nidulans* が D 標識グルコースを取り込んだことを裏付ける。そこで、主要構成成分を含む様々なラマンバンドの強度を用いて分子の空間分布像を解析した。興味深いことに、C-D 結合をもつ分子は菌糸先端の縁に沿って分布していた。これは D 標識グルコースが菌糸先端から選択的に取り込まれたこと、あるいは菌糸先端の代謝活性が高いことを示唆する。そこで今度は、¹³C 標識グルコースを含む液体培地で培養した *A. nidulans* の代謝ダイナミクスの追跡を試みた。培養初期は ¹²C に由来するラマンバンドしか観測されなかったが、時間の経過に伴い、¹³C に由来するバンドが観測された。これは様々な生化学反応を経て ¹³C をもつ分子が合成されたことを意味している。このように、我々は糸状菌代謝を可視化することに成功した。

filamentous fungus, Raman imaging, stable isotope

発表責任者：重藤真介 (shigeto@kwansei.ac.jp)