

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650133

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文) A Raman spectroscopic study of differentiating mechanism of PV membrane of symbiotic system with Paramecium bursaria and chlorella

研究代表者

山本 達之 (Yamamoto, Tatsuyuki)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：60230570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物同士の共生進化のモデル系である、ミドリゾウリムシとクロレラ系の共生の鍵を握る、食胞膜からPV膜への変化に伴う分子組成変化を、ラマン分光法により解明することを試みた。銀ナノ粒子を用いた表面増強ラマンスペクトル測定は、残念ながら上手くいかなかったが、食胞膜由来と思われるラマンスペクトル成分を、クロレラのラマンスペクトルから分離して得ることができた。この結果によって、食胞膜とPV膜の分子成分をラマンスペクトル法によって比較することが原理的に可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The PV membrane of Paramecium bursaria is a key membrane to keep symbiosis successfully with co-living chlorella cells within it. In this study, we tried to measure Raman spectra of PV membrane, which is formed by differentiation from vacuole membrane of Paramecium bursaria. At first trial, we tried to measure Surface Enhanced Raman spectra of vacuole membrane and PV membrane using Ag nano-particles. However, this trial was not successful because reliable and reproducible SERS spectra of these membrane were not obtained. Then we measured normal Raman spectra of vacuole membrane and succeeded in extract Raman spectral component attributable to vacuole membrane. This success means it is theoretically possible to compare Raman spectra of vacuole membrane and PV membrane.

研究分野：生命分子分光学

キーワード：ラマンスペクトル 共生進化 ミドリゾウリムシ クロレラ PV膜 食胞膜

1. 研究開始当初の背景

細胞内共生過程は、真核生物進化の重要な原動力である。細胞内共生を理解するためのモデル系として、ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) にクロレラ (*Chlorella* spp.) が取り込まれ、共生系として成立する過程が古くから注目を集めてきた。両者の共生により、宿主は酸素やマルトースを受け取る一方、共生藻は窒素源や二酸化炭素を受け取るという相利共生系を構成する。両者は単独でも生存可能であることから、細胞内共生による新たな真核細胞が誕生する進化の初期段階にあると思われる。研究分担者の児玉は、パルスチェイス法などを駆使して、この共生系の分子機構を精力的に明らかにしてきた[1]。その結果、以下のことが明らかになった。共生クロレラは1つずつ共生胞の一種である perialgal vacuole (PV) 膜に包まれている。PV 膜には宿主のリソソームが融合しないので、PV 膜内のクロレラは消化されることなく細胞質内で安定して維持される。PV 膜は宿主の細胞表層直下に接着する能力を持っていて、宿主が細胞分裂する際の娘細胞への均等分配を保証している。さらに、PV 膜上には共生クロレラと宿主との物質交換を可能にしているトランスポーターが存在していると考えられている。このように、ミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生において、PV 膜の重要性は明確である。しかし、PV 膜の単離法が確立されていないため、PV 膜の構成成分に関する情報は皆無である。そこで、食胞膜の PV 膜への分化過程を、生化学的手法に依らない新規手法で解析できないか検討してきた。一方、研究代表者の山本は、生きた分裂酵母などに特定の薬物を投与した際の代謝変化を、顕微ラマン分光法によって細胞内小器官ごとに追跡する分光学的手法を開発してきた[2]。そこで、食胞膜が PV 膜に変化する過程の解析に、顕微ラマン分光法を適用し、分子レベルで追跡する新規研究の構想が生まれた。

2. 研究の目的

細胞内共生は、真核生物進化過程の重要な出来事の一つであるが、その成立過程は必ずしも明らかではない。その過程を理解するためのツールとして、ミドリゾウリムシへのクロレラの共生過程が、モデル系として古くから注目を集めている。この共生過程の鍵が、ミドリゾウリムシの細胞口を経たクロレラの食胞膜への取り込みと、それに続く食胞膜の PV 膜への分化であるとされている。PV 膜の重要性は明確であるが、その単離法が確立されていないため、PV 膜の構成成分に関する情報さえ皆無である。

そこで、従来この分野に用いられたことのない分光学的手法、すなわち「分子の指紋」である振動スペクトルを与える「ラマン分光法」を用いて、PV 膜分化に伴う分子構造の変化を物理化学の視点から明らかにし、細胞

内共生の成立過程の究明に寄与することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

クロレラを除去したミドリゾウリムシに、非蛍光性のラテックスビーズを捕食させて食胞膜に取り込ませる。ミドリゾウリムシの運動を抑制するために、アルコール水溶液処理を行って繊毛除去した後に、顕微ラマン分光スペクトルを測定する。ラテックスビーズを中心に行ったラマン分光測定によって、食胞膜が PV 膜に変化する過程を追跡する。測定したラマン分光スペクトルを、multivariate 解析して、膜を構成する種々の分子のスペクトルに分解する。食胞膜中の各分子種の分布や強度が、PV 膜に変化する過程で、どのように変化するのか解析する。研究代表者(山本)と研究分担者の役割分担は以下の通りであった。

山本：ラマン分光測定と解析 児玉：ミドリゾウリムシを用いた系の準備
ラテックスビーズを用いた、食胞膜 PV 膜のモデル系の調製(児玉担当)

ラテックスビーズの取り込み：ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria* の Yad1w 株 (syngen3、接合型)) が持つ貪食性を利用して、クロレラ細胞(直径: 2~4 μm)と同程度のサイズの微粒子(非蛍光性のラテックスビーズ、Polybead Polystyrene Microspheres (2.5 % Solids-Latex), 直径 1.00 μm, フナコシ株式会社製)を、細胞口から取り込ませ、ビーズを食胞膜に包ませた。

食胞膜の形成と食胞の単離

a. シロゾウリムシの濃縮

シロゾウリムシ(クロレラを除去したミドリゾウリムシ)が入っている培養液を2度濾過した後、超音波にかけたナイロンメッシュ(オープニング 15 μm)に通し濃縮した。培養液の赤色が残っているため、無色になるまで超純水で洗浄した。試験管に移した後、手動式遠心機で遠心をかけて上澄みを取り除いた。この操作を約 1 ml になるまで行った。

b. 食胞膜の形成

試験管に、1 ml の試料に対して 6 μl のビーズを混合した。時々ピペティングをし、15 分後、ビーズを取り込んだゾウリムシを顕微鏡で観察した。SERS を利用した実験では、ビーズと同時に適量の銀ナノ粒子を加えた。

c. 食胞の単離

ショ糖不連続密度勾配遠心法を用いた。別の試験管に、各濃度の TSCM 液を 1.5 ml ずつ慎重に入れた(2.0 M, 1.6 M, 1.3 M, 1.0 M の順に)。試料が入った試験管に、試料の 2 倍量の細胞破壊用 TSCM 液を加えた。5 分後、試料を各濃度の TSCM 液が入った試験管に全て移した。これを遠心機にかけた(4,700 g, 10 分間)。遠心分離後、各層を顕微鏡で観察し、単離された食胞が観察できる層を取り出した。少量をスライドガラスに乗せ、カバー

ガラスをしてプレパラートを作製した。

顕微ラマンスペクトルの測定：繊毛運動を抑制（繊毛運動による活発な遊泳を抑えるために 5% アルコール水溶液処理して、繊毛除去）したミドリゾウリムシを含む培地をボトムディッシュ等に入れ、ラテックスビーズを覆った食胞膜のラマンスペクトルを測定した（励起波長 633 nm，強度 2.0 mW）。

ラマンスペクトルの MCR 解析：測定したラマンスペクトルに含まれているスペクトル成分から、脂質、色素、タンパク質などの成分を、multivariate 法によって抽出を試みた。食胞膜が PV 膜に変化する際の、各スペクトル成分の経時変化の追跡を試みた。マッピング測定を行った際、多変量カーブ分解（MCR）法を用いて解析を行った。MCR 法とは、測定した全スペクトルデータ（行列 A）、スペクトルの構成成分を反映したもの（行列 W）、それぞれの構成成分の強度分布（行列 H）を $A=WH$ とし、 $\| |A-WH| \|^2$ が最小となる W と H を非負拘束条件下で再計算と反復により最適化して求める方法である。この方法により、各スペクトルを形状ごとに分類することができる。本実験では、反復を 3000 回行った。

表面増強ラマン散乱スペクトル（SERS 測定）測定：通常のラマン測定によって食胞膜の良好なラマンスペクトルが得られなかった場合に備えて、当初の計画の一部を変更して、銀ナノ粒子（Silver, dispersion nanoparticles, 直径 100 nm, SIGMA-ALDRICH 社製）をミドリゾウリムシに取り込ませて、表面増強ラマンスペクトル測定（SERS 測定）を行った。この測定により、ラマンスペクトル強度の増強効果を期待した。

4. 研究成果

(1) 食胞膜と PV 膜のラマンスペクトル測定

シロゾウリムシにラテックスビーズのみを食べさせ、食胞を単離しラマン分光測定を行った。以下の測定条件で、14 個の食胞についてマッピング測定を行い、前述した多変量カーブ分解（MCR）法を用いて解析を行った。

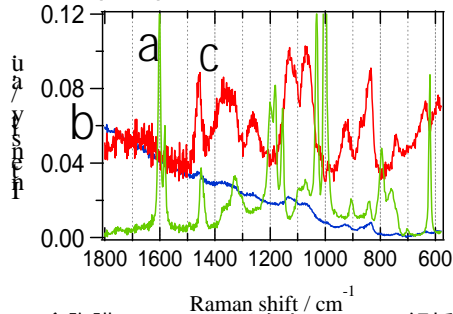


図 1. 食胞膜のラマンスペクトル(MCR 解析後)

その結果、図 1 のようなラマンスペクトル（MCR 解析後）を得た。ラマンマッピングは、 $0.6 \mu\text{m}$ （各点 5 秒積算）間隔で測定した。図 1 の a, b, c の各ラマンスペクトル成分強度のマッピング結果を図 2 に示す。

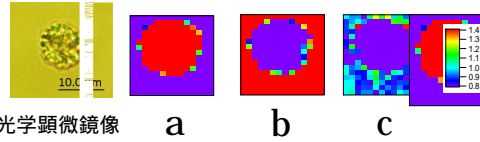


図 2. 食胞膜の光学顕微鏡像と a, b, c の各スペクトル成分のラマンマッピング像

図 2 で、赤く現れる領域ほど、ラマン強度が強い領域であることと、図 1 のラマンスペクトルパターンを合わせて考察すると、つの主要成分は各々、a: ラテックスビーズ、b: 培地のスクロース、c: 食胞膜と归属できた。食胞膜に归属したラマンスペクトル成分を取り出したものを、図 3 に示す。

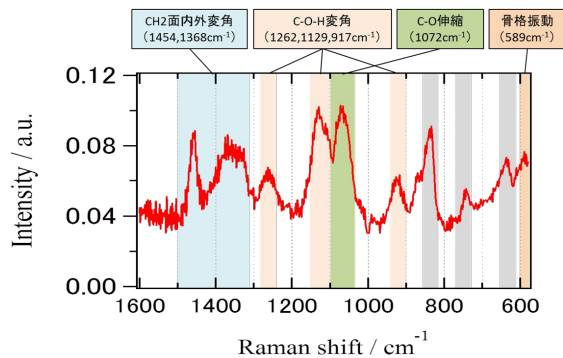


図 3. 食胞膜のラマンスペクトル

図 3 は、多糖類の典型的なラマンスペクトルであることから、MCR 解析を更に進めることで、食胞膜の成分に関する情報が得られると期待される。残念ながら、本研究の期間内に、PV 膜に分化した膜のラマンスペクトル成分を得ることはできなかった。

(2) 食胞膜の SERS 測定

シロゾウリムシにラテックスビーズと銀ナノ粒子を食べさせ、食胞を単離しラマン測定を行った。食胞の端（食胞膜）にレーザーが当たるようにし、食胞膜のラマンスペクトルの測定を試みた。食胞膜が薄く、内側のラテックスビーズを測定してしまう可能性もあるため、食胞膜に包まれていない単体のラテックスビーズの測定も行った。

マッピング測定の前に、1 次元の SERS 測定を以下の測定条件でおこなった。励起波長 633 nm，レーザー強度：2.0 mW，露光時間：15 秒，積算：4 回

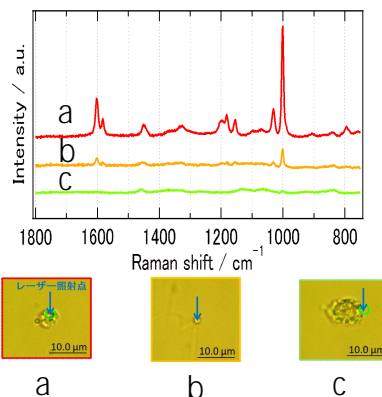


図4. 食胞膜のSERS (a, b, cの各点)

aとcは、食胞膜があると思われる食胞の端にレーザが当たるようにしたときの、(b)は食胞膜に包まれていない単体のラテックスビーズを測定したときのスペクトルである。10個の食胞について測定を行い、2種類のSERS (a)と(c)が得られた。(a)のスペクトルは、単体のビーズ(b)とほぼ同じバンドをもつスペクトルであると言えるため、食胞膜の内側にあるラテックスビーズ由来のラマンスペクトルであると推定した。SERSに特徴的な鋭いスペクトルが得られなかったことから、ミドリゾウリムシに、銀ナノ粒子が効率的に取り込まれなかった可能性が高い。(c)のスペクトルは、バックグラウンドであるスクロースのスペクトルを引いた状態で特徴的なスペクトルが見られなかったため、食胞膜の外側にあるスクロース由来のSERSであると推定した。

食胞膜のSERS測定が困難であったため、PV膜のSERS測定は試みなかった。

結論と補足

ミドリゾウリムシの食胞膜のラマンスペクトルを測定した。MCR解析の結果、食胞膜に含まれると思われる、多糖類のラマンスペクトルを、初めて分離することに成功した。研究計画申請時には予定していなかった、SERS測定も試みたが、残念ながら良好なSERSを得ることは出来なかった。今後、PV膜のラマンスペクトルを行って、食胞膜からPV膜に分化した際の、ラマンスペクトル変化を解析し、分化に伴う成分分析を試みる。

引用文献

Y. Kodama and M. Fujishima, *Protist*, Vol.163, 2012, 658-670
T. Nishida et al, *J. Mol. Struct.*, Vol.48, 2013, 375-381

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 9件)

Hemanth Noothalapati, Suguru Uemura, Naoki Ohshima, Yoshikazu Kinoshita, Masahiro Ando, Hiro-o Hamaguchi and Tatsuyuki Yamamoto, Towards the development of a non-bioptic diagnostic technique for eosinophilic esophagitis using Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*, 査読有, Vol.85, 2016, 7-10
DOI: 10.1016/j.vibspec.2016.03.016
Keita Takezawa, Keisuke Yoshikiyo and Tatsuyuki Yamamoto, Thermodynamic and structural studies on the complexation of

guanidino-appended α -cyclodextrin derivatives with p-nitrophenolate ion for consideration, *J. Mol. Struct.* 査読有, Vol.1108, 2016, 80-86

DOI: 10.1016/j.molstruc.2015.11.080
Kodama Yuuki and Masahiro Fujishima, Differences in infectivity of endosymbiotic *Chlorella variabilis* that are cultivated outside the host *Paramecium bursaria* for 50 years and that are immediately isolated from the host cells after 1 year reendosymbiosis, *Biology Open*, 査読有, Vol.0, 2015, 1-7
DOI:10.1242/bio.013946

〔学会発表〕(計 34件)

A Raman Spectroscopic Study On The Spore Formation Process Of Fission Yeast At Starvation State, T. Yamamoto, T. Sasaki, H. Noothalapati, T. Kaino, M. Kawamukai, and H. Hamaguchi, Pacificchem ハワイコンベンションセンター(ホノルル), 2015年12月15-20日

New development of a Raman diagnosis for Eosinophil Esophagitis, T. Yamamoto, S. Uemura, H. Noothalapati, N. Oshima, Y. Kinoshita, M. Ando and H. Hamaguchi, *Biomedical Molecular Imaging 2015*, Xitou (台湾) 2015年11月6-7日

〔図書〕(計 3件)

山本達之, ラマン分光法 4.2章 生命科学分野 (p.109 - 126) 講談社サイエンスフィク, 2015, 205

Yuuki Kodama and Masahiro Fujishima, Cilia/flagellar and ciliates/flagellates (Insight into the *Paramecium-Holospora* and *Paramecium-Chlorella* symbioses) (p.203 - 227) Schweizerbart Science Publisher, 2014, 299

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2件)

名称: ラマン散乱光の観測方法、ラマン散乱光の観測装置及びプログラム

発明者: 山本達之, ヘマンス ヌータラパティ, 上村魁, 浜口宏夫, 安藤正浩

権利者: 島根大学, 分光科学研究所

種類: 発明

番号: 特願 2016-007565

出願年月日: 2016年1月19日

国内外の別: 国内

名称: 共鳴ラマン分光法を利用した生体組織内好酸球の検出方法、組織内好酸球浸潤性疾患の検査方法、及び生体組織内好酸球の検出

装置

発明者：山本達之，木下芳一，大嶋直樹，濱口宏夫，安藤正浩
権利者：島根大学，分光科学研究所
種類：：発明
番号：特願 2015-015612
出願年月日：2015 年 1 月 29 日
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

山本 達之 (YAMAMOTO Tatsuyuki)
島根大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：60230570

(2)研究分担者

児玉 有紀 (KODAMA Yuuki)
島根大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号：80582478

(3)連携研究者

川向 誠 (KAWAMUKAI Makoto)
島根大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：70186138