

2C06

時空間分解ラマン分光による出芽酵母液胞中のダンシングボディの生成消滅とミトコンドリア代謝活性

(東大院理¹、学習院大・理²、臨床研³) ○内藤康彰^{1,2}、東江昭夫³、濱口宏夫¹

[序] 細胞の生と死を分子レベルで解明する事は、科学の大きな目的の一つとして数えられる。生細胞の生命活動を分子レベルで解明するために、分子レベルでの *in vivo* 研究は不可欠である。我々は、これまでの発表で時空間分解顕微ラマン分光法が生細胞の *in vivo* 観測に非常に有用な手法である事を示した。そして、出芽酵母生細胞の細胞自然死過程を時間分解ラマンイメージングにより追跡し、細胞死過程を可視化する事に成功した¹⁾。その結果、ポリリン酸塩が主成分であるダンシングボディと呼ばれる顆粒が液胞内に出現すると同時期に、ミトコンドリア代謝活性が消失する事を明らかにした。また、前回の分子構造総合討論会ではダンシングボディの出現と、その後に自然に起こる液胞消失の追跡結果を報告した。本研究では、顕微鏡下で液胞内にダンシングボディ出現後、麦汁培地を投与する事により液胞の消失前に、ダンシングボディを消失させる事に成功した。そして、このダンシングボディ出現、消失過程におけるミトコンドリア代謝活性変化を時空間分解ラマン分光法により追跡した。ミトコンドリア代謝活性はダンシングボディ出現と同時期に減少、消滅し、ダンシングボディ消失と共に再び増加する事がわかった。

[実験] 共焦点顕微ラマン分光装置を用いて、出芽酵母 4 倍体生細胞内の微小領域にレーザーを集光し、細胞内の様々な場所でのラマンスペクトルを測定した。励起光に He-Ne レーザーの 632.8 nm の発振線を用いて、x-y 平面上で 250 nm の空間分解能での測定を行った。また、100 μm のピンホールを用いた時に奥行き方向に 2 μm の空間分解能を持つ。試料部におけるレーザーパワーは約 5 mW、積算時間は 150 秒である。出芽酵母 4 倍体と麦汁培地はサントリー株式会社より提供されたものである。麦汁培地で静置培養された酵母細胞を水中に懸濁させ、酵母細胞懸濁液 1 ml を con A 塗布ガラスボトムディッシュに置き、単一酵母生細胞の光学顕微鏡観察及び、時空間分解ラマン測定を行った。その後に、ガラスボトムディッシュに麦汁培地を 2 ml 加え、同一細胞の動的構造変化を追跡した。

[結果と考察] 図 1 にダンシングボディが出現、消失した出芽酵母 4 倍体単一生細胞ミトコンドリアの時空間分解ラマンスペクトルと光学顕微鏡写真を示す。ラマンスペクトルと写真に示した時間は、麦汁培地投与した時間を 0 分とした時の経過時間である。光学顕微鏡写真によると、-49 分では液胞内にダンシングボディが存在していないが、-32 分から-26 分の間にダンシングボディが出現し、-26 分から-5 分の間にダンシングボディが成長している事がわかる。さらに、1 分の写真から麦汁培地投与後すぐにダンシングボディが消失している事がわかる。これまでに報告した細胞死過程で起こる液胞消失はここでは観測されていない。図 1 の酵母細胞のミトコンドリアのラマンスペクトルには、代謝活性を

反映する「生命のラマン分光指標」と我々が呼んでいる 1602 cm^{-1} のバンドが存在する²⁾。 1602 cm^{-1} 以外のラマンバンドは主にリン脂質由来のものである。代表的なものとして 1440 cm^{-1} にリン脂質の CH 変角振動バンドが検出されている。また、 1002 cm^{-1} にフェニルアラニンの環振動のラマンバンドが観測されている。ミトコンドリアの時空間分解ラマンスペクトルから、ダンシングボディ出現と同時期に 1602 cm^{-1} の「生命のラマン分光指標」が減少し、麦汁培地投与後ダンシングボディが消失すると同時に 1602 cm^{-1} バンド強度が増加する事がわかった。これにより、ダンシングボディ出現とミトコンドリア代謝活性は強い相関がある事が明らかになった。その後、12分以降で 1602 cm^{-1} バンドが再度減少しているが、これは麦汁培地 2 ml 投与では高いミトコンドリア代謝活性を維持し続ける事ができないからであると考えられる。また、この過程においてリン脂質のラマンバンドに大きな変化は観測されなかった。これまでに報告した細胞死過程ではダンシングボディ出現後、ミトコンドリア代謝活性が消失し、活性が復活する事無く、後に液胞消失、細胞内構造が乱雑になった¹⁾。本研究の結果から、ダンシングボディ出現後すぐに培地を投与する事により、細胞死を回避する事ができる事が明らかになった。そして、どの段階で細胞死を免れる事ができるか、生死の分岐についての情報を得る事ができた。時空間分解ラマン分光法により、細胞の生と死に関する新たな知見を得る事ができた。

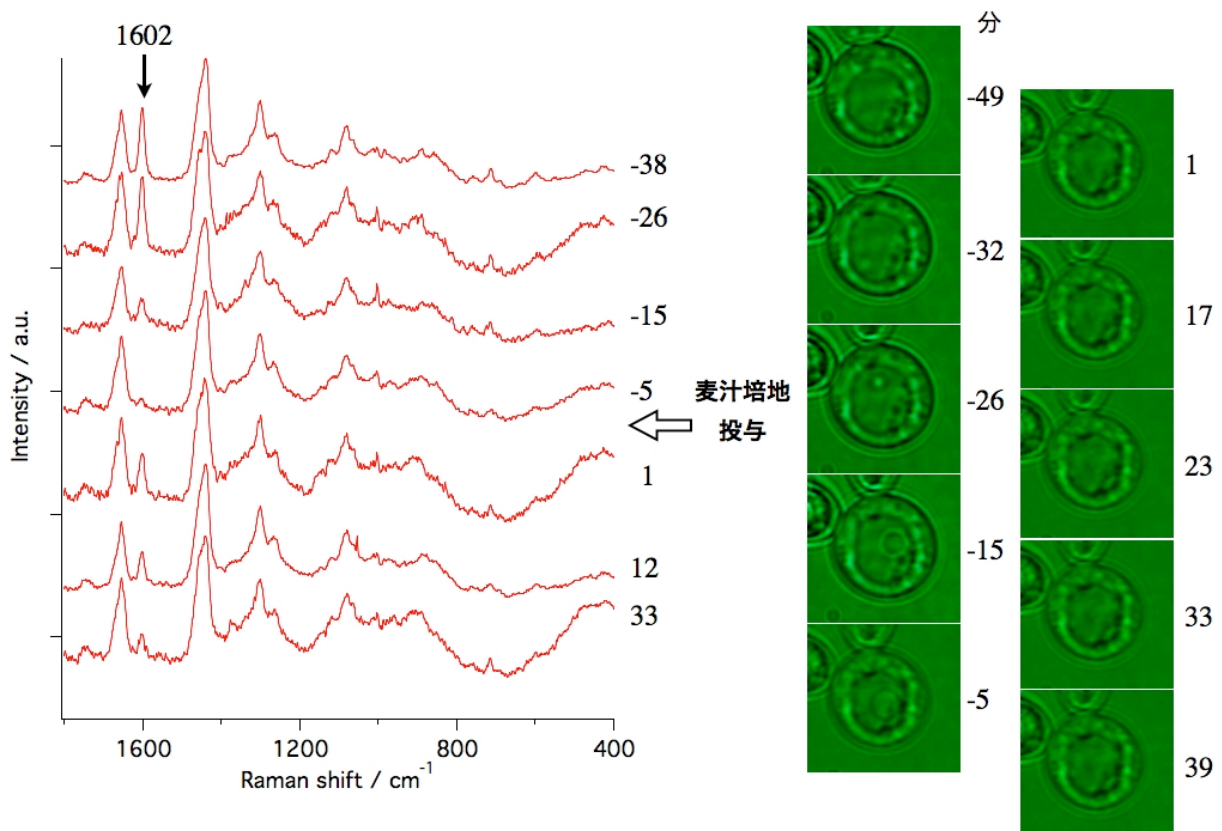


図1 出芽酵母4倍体ミトコンドリアの時空間分解ラマンスペクトルと光学顕微鏡写真

1] Naito Y, Toh-e A, Hamaguchi H. *J. Raman Spectrosc.* **36** (2005) 837-839

2] Huang Y-S, Karashima T, Yamamoto M, Hamaguchi H, *Biochemistry* **44**, 10009(2005)