

時空間分解ラマン分光による出芽酵母呼吸欠損株の代謝活性の分子レベル解析

(東大院理) ○小野木智加朗, 濱口宏夫

【序】生命科学においてはタンパク質や DNA といった生体分子の静的立体構造の決定とともに生体内で行われている生化学反応のダイナミクスについての情報を得ることが大きな目標となっている。そのような研究において生きたままの生体試料の内部の分子種の振動構造や、反応ダイナミクスに関する情報を得るための強力な手法として時空間分解ラマン分光法が用いられてきた。ラマン分光法は蛍光の妨害を受けやすいという欠点はあるものの、生体試料に対して非破壊分析であり、生細胞が持つ分子種についての情報を得ることが可能である。蛍光顕微鏡などと異なりあらかじめ処理を施す必要もないため未知の分子種の情報も得ることが可能であり、生きた細胞の内部にしか存在しない生化学反応の中間体を検出することも可能である。このラマン分光法に共焦点顕微鏡を組み合わせることにより高い空間分解能による、単一生細胞の分子レベル解析が可能となる。本研究では生体試料の分子レベル解析として時空間分解顕微ラマン分光法を用いて出芽酵母の単一生細胞の分子科学的解析を行った。出芽酵母は真核生物のモデル生物とされており、その性質は高等生物の細胞にもおよそ当てはまると考えてよい。また、我々の研究により酵母のミトコンドリアのラマンスペクトルから発見された 1602cm^{-1} のラマンバンド、『生命のラマン分光指標』は酵母の代謝活性と密接に関連していることが分かっている。そこで、この 1602cm^{-1} のラマンバンドに注目して出芽酵母の野生株と、ミトコンドリア DNA を取り除くことで好気呼吸を失活させた呼吸欠損株(0)の比較を行った。

【実験】ラマンスペクトルの測定には共焦点顕微ラマン分光装置を自作して使用した。

図 1 に装置図を示す。励起光源には He-Ne レーザー (発振波長 632.8nm , CW 発振) を用いた。空間分解能はステージ面内において 250nm 、光軸方向において $2\mu\text{m}$ ($100\mu\text{m}$ のピンホールによる) であり、時空間分解スペクトルを測定するときは時間分解能を 100 秒とした。ラマンシグナルはポリクロメーターで分光した後 CCD カメラ (-65°) で検出した。試料は出芽酵母の野生

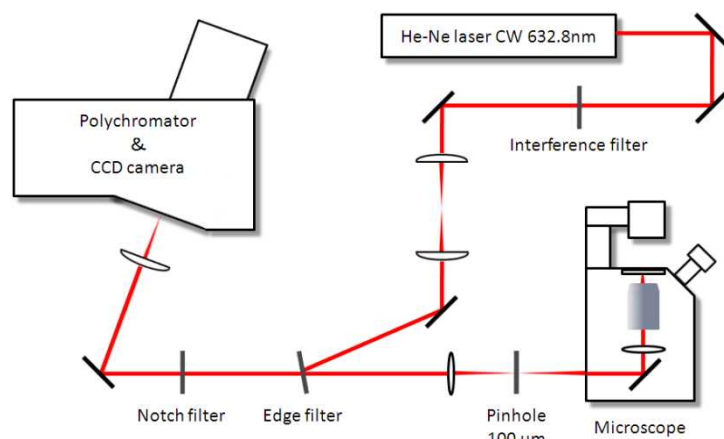


図 1 : 共焦点顕微ラマン装置

株並びに呼吸欠損株を好気条件下で培養し、プレパラートを作成して測定に用いた。

【結果と考察】図2、図3はそれぞれ野生株と呼吸欠損株のミトコンドリアの時間分解ラマンスペクトルである。野生株のスペクトルにおいては好気呼吸の活性を反映する 1602cm^{-1} が非常に強く表れていることが分かる(図2中の矢印)。また好気呼吸が失活しているとされていた呼吸欠損株にも野生株同様に非常に強い 1602cm^{-1} がみられる。このことは従来好気呼吸が失活しているとされていた呼吸欠損株が好気呼吸を行っていることを示すと同時に、 1602cm^{-1} のラマンバンドが従来の手法では検出できなかった呼吸活性を検出できる指標である可能性を示している。また、呼吸欠損株の時間分解ラマンスペクトルを見ると 1602cm^{-1} が急激に減少していることが分かる(図3中の矢印)。野生株と測定条件は変えていないため、これは励起に用いた He-Ne レーザーの照射によるものと考えられ、 1602cm^{-1} のラマンバンドを示している分子種の光吸収によるブリーチが見えていると考えられる。この時間分解スペクトルについて SVD 解析(特異値分解)を行ったところ時間変化する成分から、 1602cm^{-1} と同じ時間スケールで減少するバンドが多数発見された。 1602cm^{-1} のラマンバンドを持つ未知の分子種と密接に関連した振動バンドであると考えられ、酵母の呼吸活性を司る分子の構造について重要な知見が得られた。

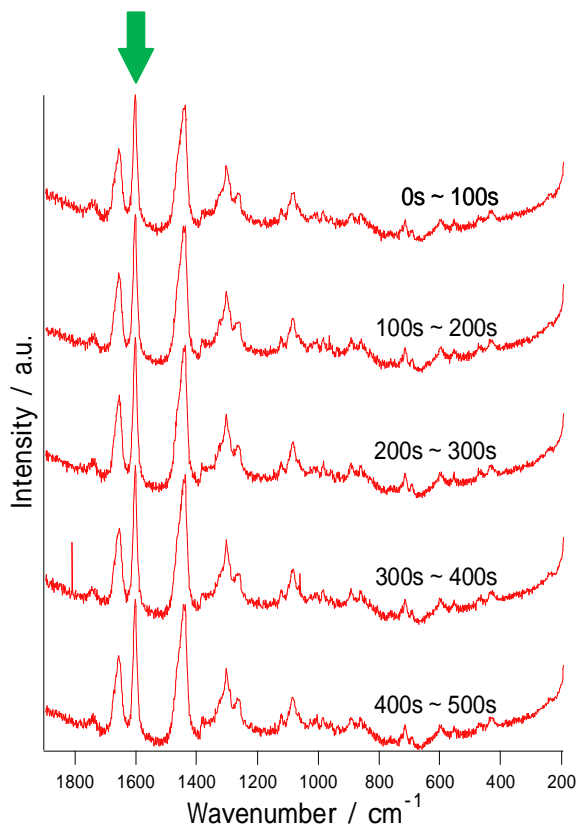


図2：野生株の時間分解ラマンスペクトル

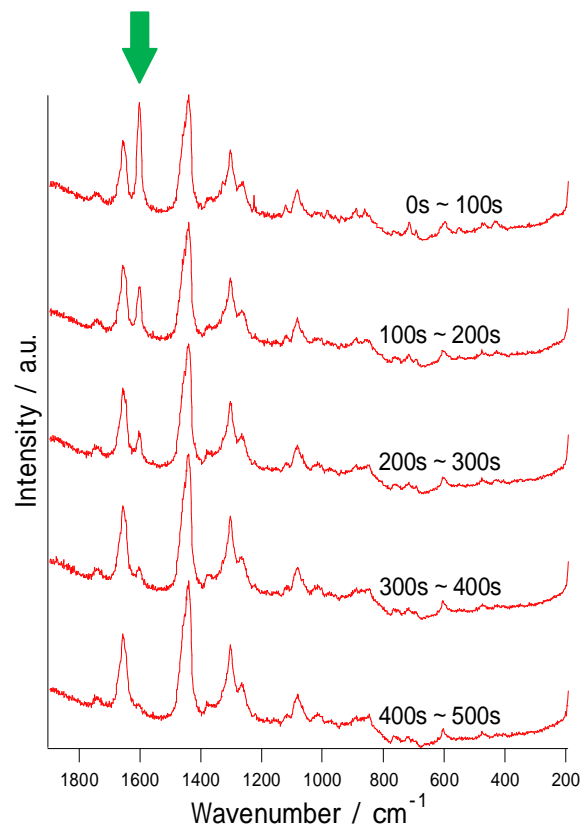


図3：呼吸欠損株の時間分解ラマンスペクトル