

3C16

時空間分解ラマン分光による出芽酵母生細胞ミトコンドリア膜のストレス誘起 *cis-trans* 異性化反応の実時間解析

(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] 生細胞の生命活動を分子レベルで解明するために、*in vivo* での分子分光学的研究は不可欠である。我々は、これまでの研究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。本研究では、出芽酵母生細胞に過酸化水素水溶液、もしくは塩化マンガン水溶液を加え、その際のミトコンドリア代謝、構造変化を実時間追跡した。その結果、酸化ストレスや金属ストレスにより、出芽酵母生細胞中でトランス脂肪酸が生成される事がわかった。また、酸化ストレスによって生じた *cis-trans* 異性化反応と同時期にミトコンドリア代謝活性の消失が観測された。

[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。用いた出芽酵母 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、単一酵母生細胞の時空間分解ラマン測定を行った。その後、ガラスボトムディッシュに過酸化水素水溶液、もしくは塩化マンガン水溶液を加え、同一細胞の動的構造変化を追跡した。

[結果と考察] 図 1 に過酸化水素水溶液を投与した出芽酵母 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、過酸化水素水溶液を投与した時間を 0 分とした時の経過時間である。光学顕微鏡写真中の赤丸はレーザースポットを示す。光学顕微鏡写真では、-5 分から 90 分の間で酵母細胞に大きな変化が見られない。図 1 の-5 分の酵母細胞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} のバンドが強く存在する¹⁾。このバンドは、ミトコンドリアでのみ観察される。 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。このことから-5 分のラマンスペクトルはミトコンドリアのものであること、そして、それが正常な状態であることがわかる。 1602 cm^{-1} の「生命のラマン分光指標」は過酸化水素水溶液投与直後に減少し、最終的には消失している。これは、酸化ストレスによりミトコンドリア代謝活性が失われたことを示している。-5 分のラマンスペクトルに検出されている 1655 cm^{-1} のラマンバンドは、リン

脂質の *cis* C=C 伸縮振動に帰属される。これは、モデル化合物であるオレイン酸 (18:1 9t) のラマンスペクトル中にも検出されている²⁾。このことから正常な出芽酵母細胞のミトコンドリア脂質膜は *cis* 構造であることがわかる。過酸化水素水溶液投与後、1655 cm⁻¹ のラマンバンドが 1666 cm⁻¹ にシフトしている。1666 cm⁻¹ のラマンバンドは、リン脂質の *trans* C=C 伸縮振動に帰属される。このバンドは、モデル化合物であるエライジン酸 (18:1 9t) にも検出されている²⁾。このことから、過酸化水素水溶液投与による酸化ストレスにより、出芽酵母生細胞中でトランス脂肪酸が生成される事がわかった。図 2 に-5 分のラマンスペクトルとの差スペクトルを示す。図 2 から、1655 cm⁻¹ のラマンバンドが 1666 cm⁻¹ にシフトしていることが明瞭にわかる。また、1301 cm⁻¹ (*trans* C=C-H の面内変角振動) のラマンバンドが強くなるにつれて、1260 cm⁻¹ (*cis* C=C-H の面内変角振動) のラマンバンドが弱くなる事がわかる。このように、時空間分解ラマン分光により酸化ストレスによる *cis-trans* 異性化反応に関する新たな知見を得る事ができた。

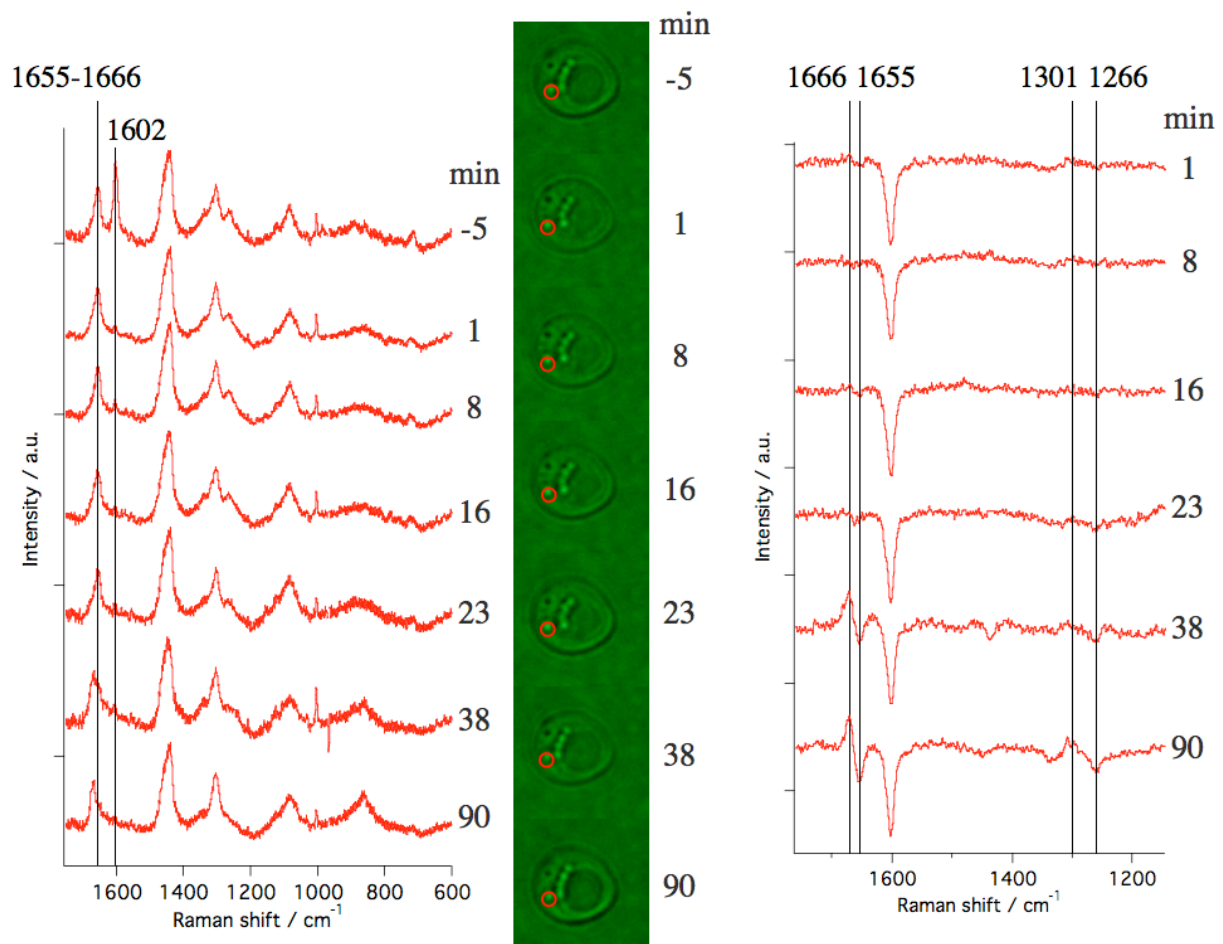


図 1 出芽酵母 4 倍体ミトコンドリアの時空間分解ラマンスペクトルと光学顕微鏡写真 (左)

図 2 出芽酵母 4 倍体ミトコンドリアの差ラマンスペクトル (-5 分を引いたもの) (右)

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

2) Onogi C, Motoyama M and Hamaguchi H, *J. Raman Spectrosc.* **39** (2008) 555-556