

3P064

タバコ培養細胞 BY-2 の時空間分解顕微ラマン分光： 「生命のラマン分光指標」の検出

(東大院理*, 法政大**) ○岡光 理恵*, 清水 隆**, 長田 敏行**, 濱口 宏夫*

【序】 タバコ培養細胞 BY-2 は、非常に均一な細胞集団より成り、1週間で約 100 倍と植物細胞としては類を見ない速度で増殖するという特徴を持つ。そのため、多分野で解析に用いられている重要なモデル植物細胞である。当研究室では、生きた酵母細胞の時空間分解ラマンスペクトルの測定から、ミトコンドリア中に「生命のラマン分光指標」と名づけたラマンバンド (1602cm^{-1}) を確認している¹⁾。この指標が細胞の呼吸・代謝活性を鋭敏に反映し、細胞の生死の判定に決定的な役割を果たすことが期待されている。本研究では、時空間顕微ラマン分光法を用いて、タバコ BY-2 細胞について分子レベルでの分析を行い、酵母以外の生物にも「生命のラマン分光指標」が存在するかどうかを確認することを目的とした。

【実験】 共焦点顕微ラマン分光装置を用い、生きたタバコ BY-2 細胞内のミトコンドリア付近にレーザーを集光し、ラマンスペクトルを測定した。励起光源が He-Ne レーザー (発振波長 632.8nm)、空間分解能がステージ面内で 250nm 、光軸方向で $2\mu\text{m}$ の装置 (図 1) と、励起光源が Ti-sapphire レーザー (発振波長 785nm)、空間分解能がステージ面内で 320nm 、光軸方向で $3.4\mu\text{m}$ の装置 (図 2) を用いて測定した。試料の BY-2 細胞はミトコンドリアを GFP でラベルしてある。 632.8nm 励起の装置では細胞をスライドガラスとカバーガラスにはさんで固定し、サンプル位置では 6mW 、露光時間 100 秒で測定した。 785nm 励起の装置では conA (固定剤) でコートされた石英ガラスボトムディッシュ上に細胞を固定し、サンプル位置では 15mW 、露光時間 120 秒でラマンスペクトルを測定した。

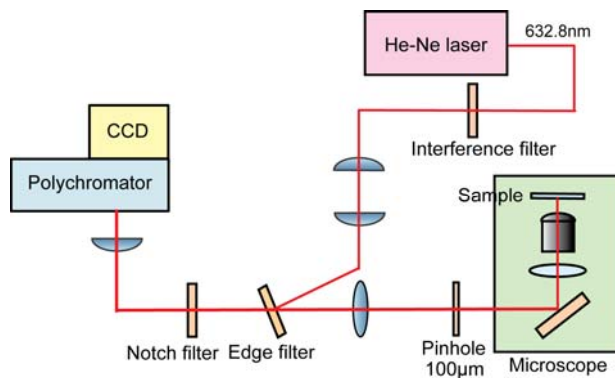


図 1 励起波長 632.8nm 共焦点顕微ラマン装置

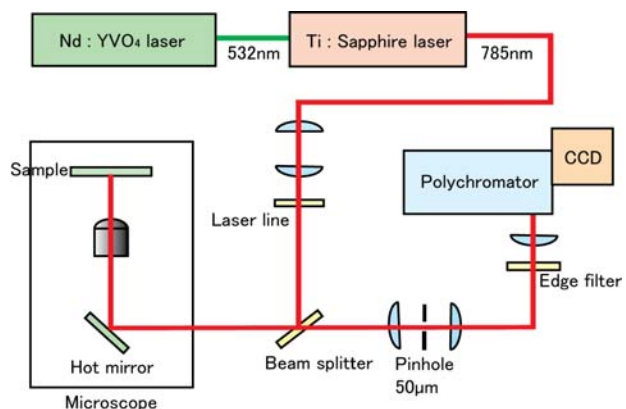


図 2 励起波長 785nm 共焦点顕微ラマン装置

【結果】 図3に632.8nm励起の装置で測定したBY-2細胞のラマンスペクトルを示す。光学像の丸で示した部分にレーザーを照射した。1528 cm^{-1} (C=C伸縮振動)と1156 cm^{-1} (C-C伸縮振動)の強いピークはカロテノイドが含まれていることを示す。1654 cm^{-1} のピークはリン脂質(cis-C=C伸縮振動)とペプチド骨格によるアミドIモードが、1444 cm^{-1} のピークはリン脂質とタンパクのバンド(C-H変角振動)がそれぞれ重なったものと帰属できる。また、1003 cm^{-1} のフェニルアラニンのバンドと1008 cm^{-1} のカロテノイドのバンド(C-H変角振動)も重なって観測された。

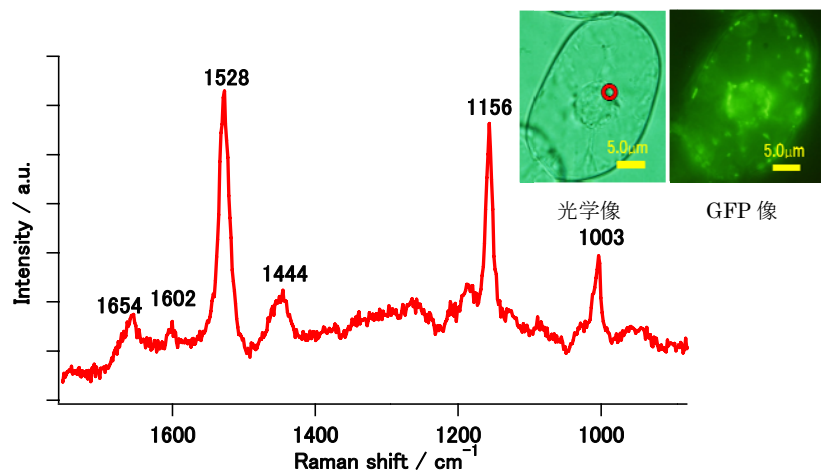


図3 タバコ BY-2 細胞のラマンスペクトル(632.8nm 励起)

1602 cm^{-1} のバンドも確認することができた。光学画像とGFP画像とを比較することにより、レーザーを照射した部分がミトコンドリアであると考えられるため、このバンドはミトコンドリア由来であると結論できる。これが酵母と同じ分子由来のものかどうかを確かめるために、用意したプレパラートを4日後に測定したところ、図4のようになった。BY-2細胞のどこを測定しても1602 cm^{-1} は観測されなかった。栄養状態の悪いBY-2細胞にはこのバンドが見られなかったことから、これは代謝活性を示す「生命のラマン分光指標」であると考えられる。また、785nm励起の装置で測定したBY-2細胞のラマンスペクトルを図5に示す。785nm励起では共鳴ラマン効果によるカロテノイドの強度増大の効果が小さいため、1602 cm^{-1} のピークが相対的に強く観測されたと考えられる。

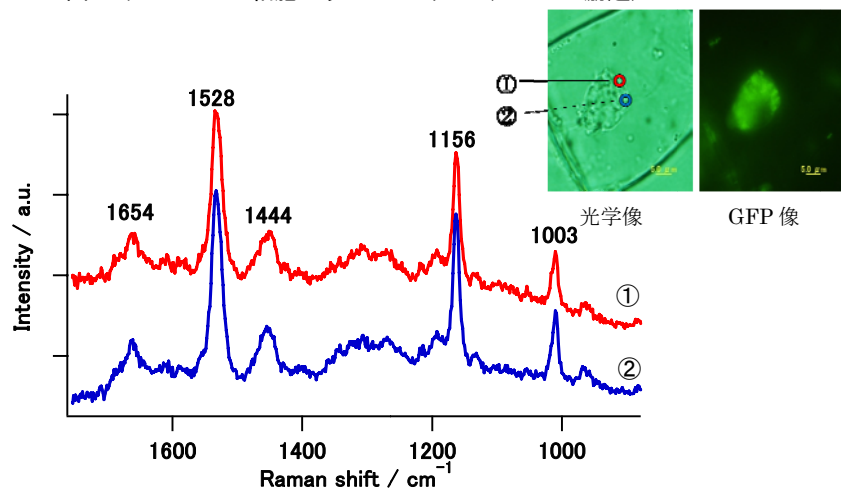


図4 4日後のラマンスペクトル

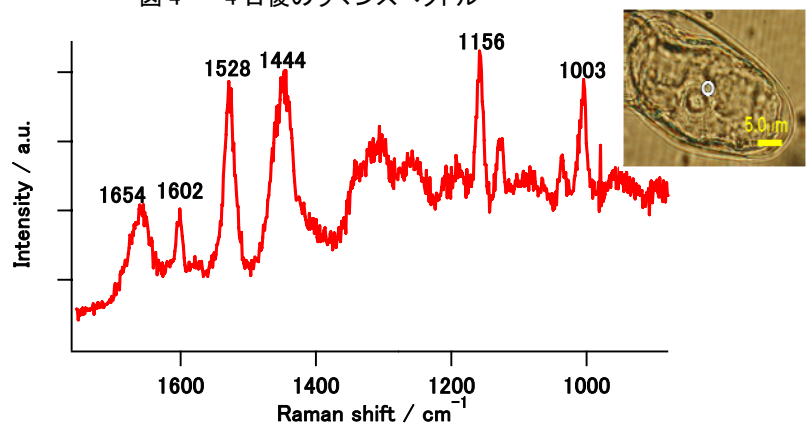


図5 タバコ BY-2 細胞のラマンスペクトル(785nm 励起)

これらの実験結果からタバコ BY-2 細胞にも「生命のラマン分光指標」と考えられる1602 cm^{-1} のバンドが存在することを確認できた。

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