

顕微ラマン分光法による線虫 *C.elegans* の

脂質顆粒と生殖細胞の分子レベル観察

(東大院理) ○村松勇佑・辛島健・濱口宏夫

【緒言】

我々の研究室ではこれまでに、酵母、BY-2 細胞などの単一細胞に対して顕微ラマン分光法を用いた研究を行ってきた。これらの研究は、生きた単一の細胞を分子レベルで研究することにおいてこの手法が非常に有用であることを示した。^{[1],[2]} 本研究には顕微ラマン分光法を多細胞動物のモデルとして広く用いられている線虫 *C.elegans* に応用し、*in vivo* で脂質顆粒および生殖細胞を観察した。

【実験】

顕微ラマン分光法は 3 次元で空間分解した分子情報が得られる点で、生細胞の研究に非常に有用な手法である。しかし、生きた動物は「動く」ので、細胞の微小領域のラマンスペクトル取得が困難となる。そこで、本研究では *C.elegans* の変異体で最も動きが小さいといわれる *unc-119* を試料として選び、さらに麻酔としてレバミゾールを使用することでこの問題を克服した。プレパラート作製においては、麻酔の液量を調節することで線虫がつぶれずに動きを押さえるようにした。

測定には共焦点顕微ラマン分光装置を用い、生体内の微小領域のラマンスペクトルを得た。He-Ne レーザーからの 632.8 nm の発振線を励起光として用いた。レーザーパワーは試料部で約 7mW、空間分解能は面内方向 250nm、100 μ m のピンホールを用いたときに奥行き方向 2 μ m で測定を行った。

【結果と考察】

図 1 に異なる個体を測定して得られたラマンスペクトルを示す。また、図 2 にはそれらの測定部位に対応した光学像を示した。露光時間は a が 30 s、b、c、d が 100 s、e が 150 s である。

線虫の体内で見られる顆粒を測定して得られたスペクトル a は 1750, 1665, 1440, 1301, 1266, 1125, 1080, 1060 cm^{-1} に脂質に特徴的なラマンバンドを示している。1125, 1060 cm^{-1} の *trans* 型の C-C 伸縮振動、1080 cm^{-1} の *gauche* 型のバンドから、*gauche* 型の割合が多く、この脂質は流動性のあるものであると考えられる。また、1399 cm^{-1} に未知のバンドが観測された。

b、c は未受精卵の細胞質、d は未受精卵の核、e は精子である。これらの生殖細胞のラマンスペクトルでは、タンパク質量の指標として知られる 1004 cm^{-1} のバンド (Phe) とタンパク質の 2 次構造を表す 1660 cm^{-1} のバンド (Amide I) が見られた。特に精子ではタンパク質の密度が高いことがわかる。また、1580, 780 cm^{-1} 付近には核酸塩基のバンドも観測された。

未受精卵の細胞質のスペクトルである b と c を比較すると、b は a のスペクトルに似ており、細胞質中の脂質を含んだ部分を測定したものであることがわかる。

本研究において、初めて線虫のラマンスペクトル取得に成功し、顕微ラマン分光法を生きた多細胞動物の細胞の分析に応用する足がかりが得られた。

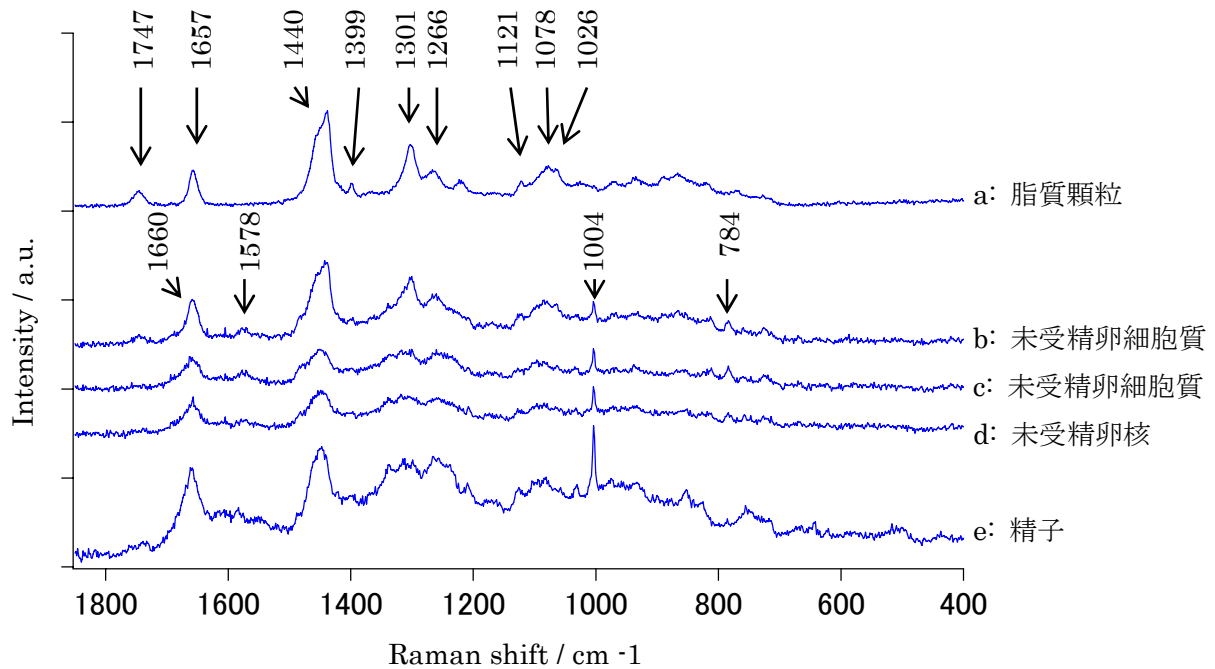


図1 線虫のラマンスペクトル

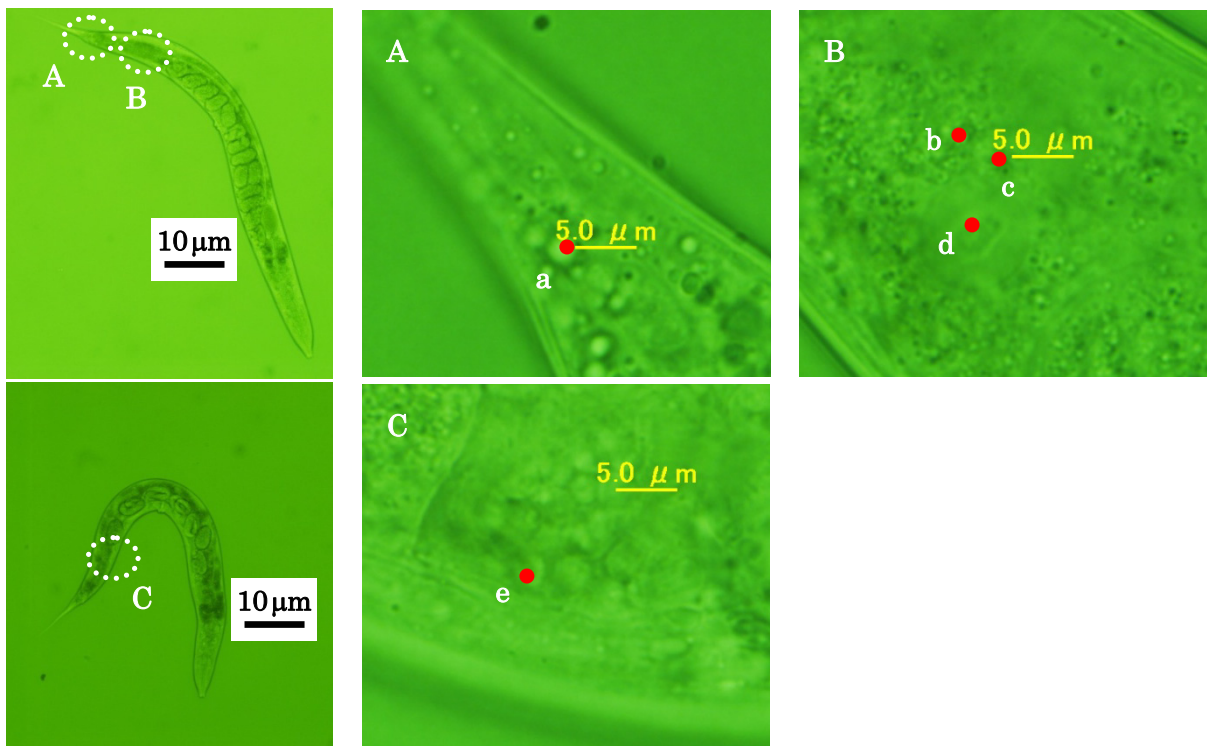


図2 線虫の光学像

- [1] Y.-S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto, and H. Hamaguchi. *Biochemistry* **44**, 10009 (2005)
 [2] Y. Naito, A. Toh-e, and H. Hamaguchi. *J. Raman Spectrosc.* **36**, 837 (2005)