

3P079

In vivo 時空間分解ラマン分光法による出芽酵母ミトコンドリア代謝活性解析 ～ATP 合成阻害剤の影響～

(東大院理) ○小野木智加朗、濱口宏夫

【序】細胞内の生命活動において重要な役割を担う種々のタンパク質や DNA などの機能性生体高分子の構造やダイナミクスの解析は、生命科学の発展に不可欠である。これらの機能性高分子の静的構造が分子生物学の発展の中でその多くが解き明かされてきた一方、それらの分子が生きた細胞内でどのような構造を取り、機能を発現しているか、については研究が十分に進んでいないのが現状である。そこで我々は生きたままの単一細胞の内部の分子種の構造や、反応ダイナミクスに関する情報を得るため、時空間分解ラマン分光法を用いている。ラマン分光法は生細胞の分析に適した特徴をもっている。それは、水の妨害を受けにくい点、非侵襲非破壊分析である点、測定対象中の分子種の分子振動情報が得られる点である。このラマン分光法を共焦点顕微鏡と組み合わせることで、生細胞中のラマンスペクトルの空間分解測定と、その時間変化の追跡を可能にした手法が時空間分解ラマン分光法である。

我々の研究グループでは早くからラマン分光法の生細胞への適用に積極的に取り組んでおり、その過程で、生きた酵母の代謝活性を反映するラマンバンドを発見し、“生命のラマン分光指標”と名付けた[1]。“生命のラマン分光指標”は、酵母のミトコンドリアのラマンスペクトル中の 1602 cm^{-1} に現れる、非常に強く鋭いラマンバンドで、生きた酵母のミトコンドリアのラマンスペクトル中にしか存在しない。“生命のラマン分光指標”はその帰属がまだ明らかにされていないが、呼吸阻害剤として KCN を加える実験において、その強度が減少し、最終的に消失することが分かっている。

本研究では、“生命のラマン分光指標”が電子伝達系に由来するものなのか、その後の ATP 合成の過程に由来するものなのかを明らかにするために、脱共役剤を添加する実験を行った。脱共役剤は電子伝達系と ATP 合成経路の共役を解除し、電子伝達系に影響を与えることなく、ミトコンドリアの ATP 合成を阻害する薬剤である。脱共役剤の添加により、酵母単一生細胞中のミトコンドリアのラマンスペクトルにどのような変化が生じるについて検証した。

【実験】試料には出芽酵母の4倍体 (*S. cerevisiae* と *S. bayanus* の接合体、サントリー株式会社より提供) を用いた。培地は炭素源を Glucose とした YPD 培地とその炭素源を Glycerol に置換したもの2種類を用いた。Glycerol を用いる培地中では、酵母は解糖系が機能せず、電子伝達系のもので生育する。培養は 30°C 、12 時間以上行い、測定には対数増殖期または定常期のものを用いた。添加用の脱共役剤は CCCP(Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone) を Ethanol 溶液として各種濃

度に調整し用いた。

ラマンスペクトルの測定は顕微ラマン分光装置によって行った。励起レーザー光は He-Ne レーザーの 632.8 nm を用いた。試料位置でのレーザーパワーは 1 mW, (ボトムディッシュ使用時)、6 mW, (スライドグラス使用時) である。

【結果と考察】CCCP の効果を確認するために CCCP を最終濃度 20 μM で加え、OD₆₀₀ を測定した(図 1)。図中のグラフはそれぞれ、Glucose 培養の Control(●)、Glucose 培養の CCCP, 20 μM 添加(●)、Glycerol 培養の Control(▲)、Glycerol 培養の CCCP, 20 μM 添加(▲)である。OD₆₀₀ は 600 nm の光の透過度(Abs.) から細胞の増殖を確認する手法であり、OD₆₀₀ の増加は細胞が増殖したことを示している。CCCP の最終濃度 20 μM で、酵母の増殖が停止している(図 1、▲)。Glycerol 培養では解糖系は機能しないため、この結果は最終濃度 20 μM で CCCP の効果が十分に現れていることを示している。したがって、Glucose 培養の Control(●)と CCCP, 20 μM 添加(●)の生育の差異は、CCCP によって ATP 合成が阻害されたことのみ起因すると考えられる。

26 時間 Glucose 培養した酵母のミトコンドリアのラマンスペクトルを図 2 に示す。両者のスペクトルには明らかに 1602 cm^{-1} のバンドが存在することが分かる(図 2、1,2)。これらの事実から脱共役剤の存在下でも酵母のスペクトルは 1602 cm^{-1} のラマンバンドを持つことが分かった。

これらの結果より、脱共役剤の CCCP は 1602 cm^{-1} のラマンバンドに影響しないことが分かった。我々のグループの先行研究により 1602 cm^{-1} のバンドは KCN により消失することが判明している[1]。KCN が電子伝達系に作用すること、また、脱共役剤は電子伝達系自体に影響を与えないことから、1602 cm^{-1} のラマンバンドを与える分子種は電子伝達系に由来する分子種である可能性が高いと考えられる。

[1]Huang Y.-S., et al. *Biochemistry* 44, 10009-10019 (2005)

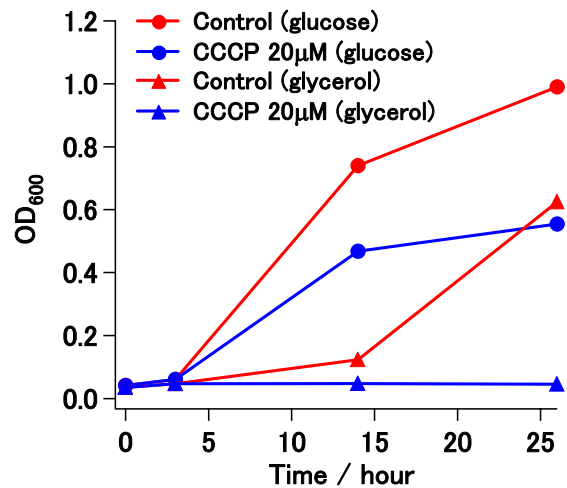


図 1 : OD₆₀₀ による増殖曲線

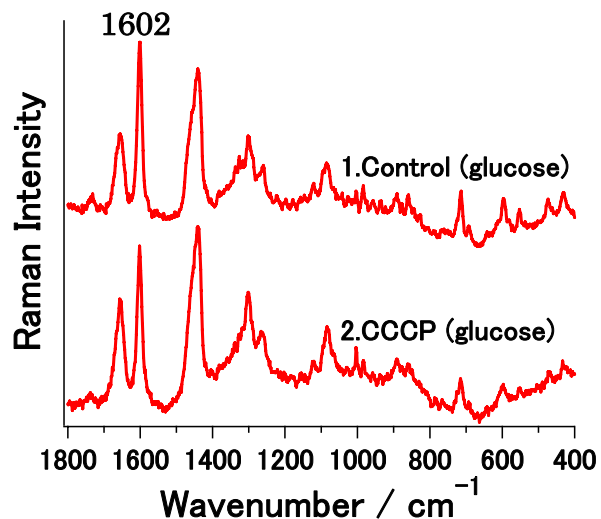


図 2 : 26 時間後の酵母のミトコンドリアのラマンスペクトル