

4B10

「生命のラマン分光指標」の同位体置換効果とその起源

(東大院理) ○小野木智加朗、濱口宏夫

【序】生細胞内の代謝活性をその場観察により分子レベルで計測することは、生命科学の発展において極めて重要であり、不可欠である。それは遺伝子解析やタンパク質機能解析では解き明かせない代謝過程に関する疑問を分子科学により補うことである。我々は代謝活性計測のインジケータとして酵母細胞のミトコンドリアのラマンスペクトルにみられる 1602cm^{-1} のラマンバンド、「生命のラマン分光指標」について研究を進めてきた。このラマンバンドは生細胞の代謝活性を鋭敏に反映する¹。ミトコンドリアの呼吸を阻害する KCN や、酸化ストレスである過酸化水素を加えることで、「生命のラマン分光指標」のバンド強度は急激に減少、消失する。一方で、水中の栄養条件の悪い酵母に培地を加えると、「生命のラマン分光指標」のバンド強度は増加する。これらの実験結果より、「生命のラマン分光指標」が生細胞の代謝活性を反映していることは疑いない。ゆえにこの「生命のラマン分光指標」を与える分子種は、細胞内での代謝プロセスを司る重要な分子であると考えられるが、その帰属はいまだ明らかになっていないのが現状である。どの分子種が「生命のラマン分光指標」を与えるかが判明すれば、「生命のラマン分光指標」によりプローブできる代謝プロセスを特定することができ、それによる生細胞の代謝活性モニタリングの広範囲な応用につなげることが可能となる。本研究では同位体置換効果による「生命のラマン分光指標」の帰属特定を試みた。同位体置換効果は分子中の原子の質量の変化が、分子振動の振動数の変化として検出できるものであり、振動スペクトルの帰属において信頼性の高い情報が得られる手法として多用されてきた。今回は同位体を含む培地中で培養した酵母のラマンスペクトルの変化をもとに、「生命のラマン分光指標」の帰属について議論する。

【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。培地は完全合成培地 (Glucose 2%, Nitrogen base w/o amino acid 0.67%, amino acid mixture 0.2%) を用いた。非置換のアミノ酸については個別に購入し、粉碎、混合した。同位体としては $^{13}\text{C}\text{-D-Glucose}$, $^2\text{H}\text{-D-Glucose}$, ^{13}C , ^{15}N -amino acid mixture, $^2\text{H}_2^{16}\text{O}$, $^1\text{H}_2^{18}\text{O}$ を用い、完全合成培地中の対応する成分をそれぞれ置換して培養を行った。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細胞を用いた。

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 及びチタンサファイアレーザの 785 nm を用いた。試料位置でのレーザーパワーは 6 mW , (632.8 nm)、 15 mW , (785 nm) である。積算時間はすべて 300 秒である。

【結果と考察】図1に、完全合成培地(A)、 ^{13}C -D-Glucose 培地(B)、 ^2H -D-Glucose 培地(C)により培養された酵母のラマンスペクトルを示す。(A)のスペクトルは通常の酵母のラマンスペクトルを示しており、強い 1602 cm^{-1} のバンドが存在する。また、 1656 cm^{-1} にリン脂質の *cis*-C=C 伸縮振動、 1440 cm^{-1} に C-H 変角振動、 1741 cm^{-1} に C=O 伸縮振動がみられる。(B)のスペクトルにおいて ^{13}C 置換による明瞭な同位体置換効果が測定された。表1に同位体置換効果を示したバンドの ^{12}C 条件下と ^{13}C 条件下でのラマンシフトを示す。「生命のラマン分光指標」は 1602 cm^{-1} から 1542 cm^{-1} の変化を見せた。この波数の比($1542/1602$)は $^{12}\text{C}^{12}\text{C}$ 結合の換算質量と $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ 結合のそれとの比の2乗根ときわめて

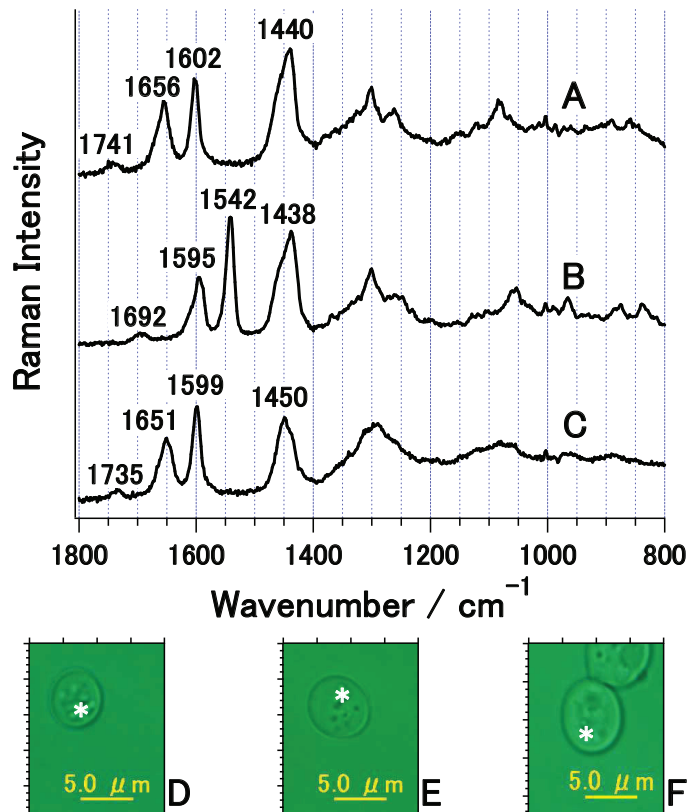


図1： $^{12}\text{C}, ^1\text{H}$ -D-Glucose(A)、 $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -D-Glucose(B)、 $^{12}\text{C}, ^2\text{H}$ -D-Glucose(C)中で培養された出芽酵母のラマンスペクトル。D,E,FはそれぞれA,B,Cの光学像。レーザースポットの位置は白いアスタリスクであらわされている。

よい一致を見せた。これは 1602 cm^{-1} のバンドが炭素間結合の伸縮振動に由来することを意味し、 1602 という波数を考慮すると、C=C 伸縮振動に帰属されると考えられる。(C)のスペクトルを見ると、わずかであるが、「生命のラマン分光指標」に、重水素による同位体置換効果が認められた(表1)。 1602 cm^{-1} のバンドは 3 cm^{-1} の同位体シフトにより、 1599 cm^{-1} にあらわれた。DFT 計算により、C=C 二重結合の炭素に水素が結合している不飽和炭化水素鎖は、重水素置換により少なくとも 10 cm^{-1} 以上のシフトを示すことが分かっている。

1602 cm^{-1} のバンドは、重水素置換効果が異常に小さいことから、水素が結合していない炭素による C=C 結合であると推察される。また、アミノ酸、水による同位体置換は、「生命

	$^{12}\text{C}, ^1\text{H}$	$^{13}\text{C}, ^1\text{H}$	$^{12}\text{C}, ^2\text{H}$
1602 cm^{-1}	1602	1542	1599
C=C str.	1656	1595	1651
C=O str.	1741	1692	1735

表1：各バンドの同位体置換及び非置換のラマンシフト

のラマン分光指標」によるシフトを示さず、 1602 cm^{-1} のバンドを与える分子種がグルコースから合成されことを示唆する。我々は、最も可能性の高い分子種として、ミトコンドリアの電子伝達で重要な役割を果たすセミユビキノンを考えている。

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