

レーザー照射下における酵母の時空間分解ラマンスペクトル

(東大院理*, NCTU**) ○和田大我*, 小野木智加朗*, 濱口宏夫**

【序】

顕微ラマン分光は生細胞を分子レベルにおいて、蛍光分光のようにプローブ物質で標識することなく測定できる非常に強力な手法として確立されている。しかし、ラマン信号は弱いため以前までの測定では10秒、ないし100秒単位の積算時間を必要とし、*in vivo*条件下での高速測定は困難であった。当研究室では、光学素子による信号のロスを最小化し、1秒単位でS/N比の良いスペクトルを取得できる顕微ラマン分光装置を開発した。

本研究においては、 1602 cm^{-1} に現れる「生命のラマン分光指標¹」と呼ばれるバンドの強度のレーザー照射による時間変化を観測した。図1に、出芽酵母のミトコンドリアを測定して得られた指紋領域のラマンスペクトルを示す。青枠で囲ったバンドが「生命のラマン分光指標」であり、ミトコンドリアのラマンスペクトルに現れ、その代謝活性を鋭敏に反映する。帰属はまだなされていない。

【実験】

図2に測定に使用した装置のセットアップを示す。試料からの蛍光を抑えるために、励起波長にはHe-Neレーザーの632.8 nmを用いた。対物レンズにてレーザー光を絞りボトムディッシュ上にConcanavalin Aを用いて固定した出芽酵母に照射した。ラマン散乱光は同じ対物レンズによって集められ、分光器へ導入されCCDカメラにて検出される。対物レンズの焦点と、分光器導入直前の $f=200\text{ mm}$ のレンズの焦点とが共役になっており、クロススリットを用いることにより共焦点効果を得て、Z軸方向の空間分解能を確保している。X-Y軸方向の空間分解能は300 nm、Z軸方向の空間分解能は2~3 μm である。試料は出芽酵母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)である。培養開始より3日経過したものを使用した。

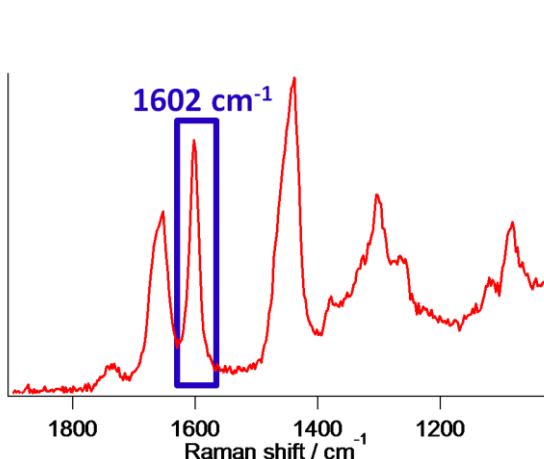


図1:出芽酵母のミトコンドリアのラマンスペクトル(指紋領域)

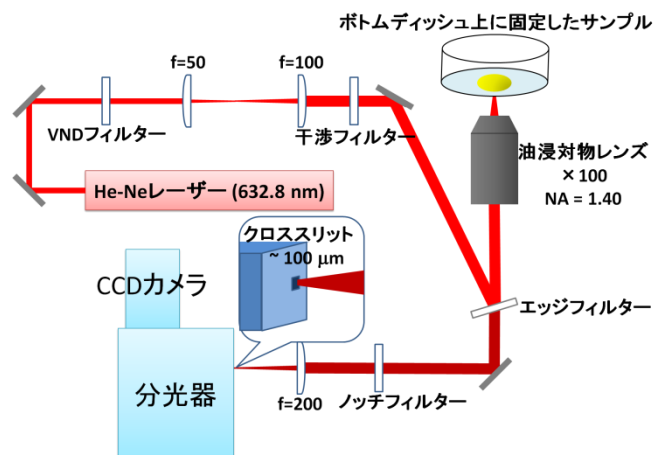


図2:装置セットアップ

【結果と考察】

図 3 に出芽酵母のミトコンドリアのラマンスペクトルを示す。指紋領域及び 3000 cm^{-1} 付近の C-H 伸縮領域を同時に取得した。サンプル A とサンプル B とはそれぞれ同じボトムディッシュ内の異なる個体である。600 秒間露光し続け、最初の 1 秒で取得したスペクトルが青線、最後の 1 秒で取得したスペクトルが赤線である。双方のサンプルともに 1602 cm^{-1} のバンドが減少し、他のバンドには大きな変化は見られない。

図 4 にサンプル A, B それぞれの 1602 cm^{-1} のバンド強度の時間変化を示す。サンプル A は強度が単調に減少しているが、サンプル B においては部分的に急激に変化している。図 5 にサンプル B において急激に変化している部分のスペクトルを示す。図 4 において青線で囲った部分のサンプル B の変化を見ると、171 秒から 173 秒にかけて急激に 1602 cm^{-1} のバンドの強度が減少している様子が見える。

新しい顕微ラマン分光装置の開発により、1 秒の時間分解能、 300 nm の空間分解能でラマンスペクトルが測定できるようになり、数秒のオーダーで起こる単一生細胞内のオルガネラの時間変化を、分子レベルで追跡できるようになった。サンプル B のような時間経過によるスペクトルの急激な変化が起こる原因としては、細胞内のオルガネラの高速移動や律動運動によりオルガネラの密度が部分的に変化していることなどが考えられる。今後の研究により、この未知の細胞内高速過程の本質が解明されるものと期待される。

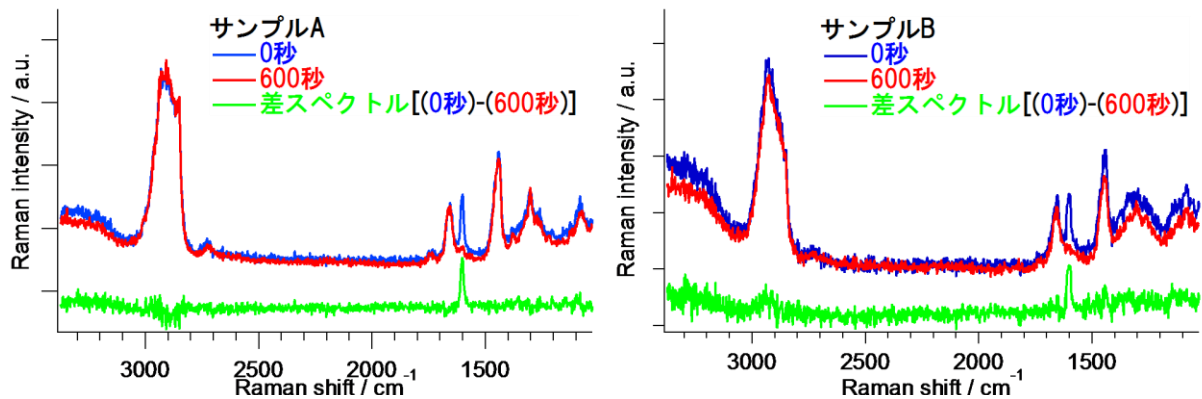


図 3: 出芽酵母のラマンスペクトル レーザーパワー: 5 mW, 露光時間: 1 秒

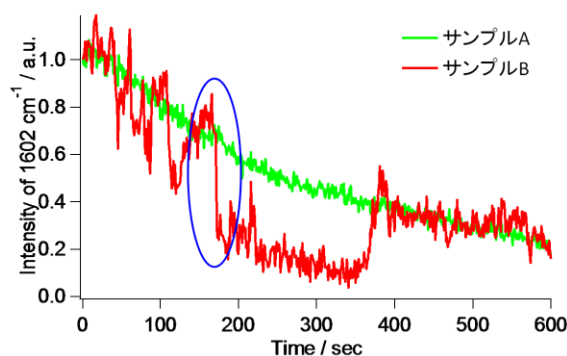


図 4: 1602 cm^{-1} のバンド強度の時間変化

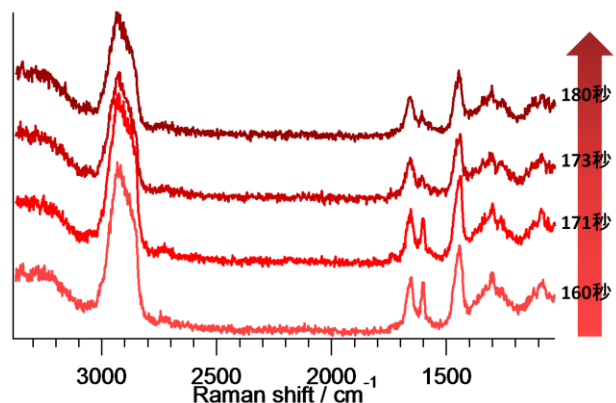


図 5: 160 秒～180 秒間のサンプル B のラマンスペクトルの変化

¹ Y.-S. Huang, et.al., Biochemistry, 44, 10009(2005).