

3P081

酵母生細胞の「生命のラマン分光指標」のバンド強度の
励起波長依存性と共鳴ラマン効果

(東大院理*、NCTU**) 小野木智加朗*、瀧口宏夫*,**

【序】単一生細胞の代謝活性を、*In vivo* 条件下で観測することは、細胞内の動的な情報を得る上では不可欠である。タンパク質の構造解析など、静的な構造情報は蓄積されつつあるが、生きた細胞の中で、どのような分子がどのような挙動を示すかを直接観察する手法は未だ確立されていない。我々は、ラマン分光法を用いて、分子レベルで、生細胞の代謝活性を調べる研究を行ってきた。その中で発見された、代謝活性のインジケータの一つとして、「生命のラマン分光指標」がある¹。「生命のラマン分光指標」とは、酵母生細胞のミトコンドリアのラマンスペクトルにみられる 1602 cm^{-1} ラマンバンドである。ミトコンドリアの呼吸活性を阻害する KCN や、酸化剤である過酸化水素を加えることで、急激に減少し、それに対し、栄養枯渇状態におかれた酵母細胞に培地を加えると、このバンドの増加が見られる。これらの結果から、我々は「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と考えており、生細胞中の代謝活性の分子レベルでのインジケータとして、期待している。しかし、このバンドを与える分子種は未だ特定されていない。 1602 cm^{-1} のバンドは、細胞内に含まれる主要成分である、脂質のラマンバンドと同等の強度を示している。このことから共鳴ラマン効果の可能性についての検討がなされてきた。共鳴ラマン効果とは、励起光が試料分子の電子共鳴にかかる場合に、ラマン散乱光が非常に強く増強される現象であり、その分子種を選択的に検出することが可能となる。本研究においては、異なる励起波長で測定された、酵母のラマンスペクトルを比較することにより、 1602 cm^{-1} のバンドに共鳴ラマン効果が寄与しているかどうかの検証を行った。

【実験】試料には出芽酵母 4 倍体 (*S. cerevisiae* と *S. bayanus* の接合体、サントリ株式会社より提供)を用いた。培地は YPD 培地(Glucose 2%, Yeast Bacto Peptone 2%, Yeast Extract 1%) を高温高圧滅菌したものを、30 °C で 12 時間以上、振とう培養を行った。細胞は定常期の細胞を用いた。空間分解ラマンスペクトルの測定は、研究室で自作された顕微ラマン分光装置を用いて行われた。励起光の波長は、532, 632.8, 785 nm を用いた。各波長につき、異なる顕微ラマン分光装置を用いた。細胞間には個体差による代謝活性がある。今回は、同一の培養条件で培養された、多数の細胞を測定し、その平均をとることで個体差による誤差を押さえている。以下に示す図においては、各波長の実験につき、10 個体の値を平均し用いている。試料位置でのレーザーパワーは、それぞれ、0.5, 5, 15 mW である。

【結果と考察】図1に、各励起波長で励起された酵母単一生細胞内のミトコンドリアの空間分解ラマンスペクトルを示す (A: 532 nm, B: 632.8 nm, C: 785 nm)。どのラマンスペクトルにも共通することは、リン脂質に帰属されるラマンバンドが多くみられることである。代表的なバンドを上げると、1655 (C=C 伸縮)、1440 (C-H 変角)、1301 (CH₂ねじれ)、1260 (C=C-H 面内変角) cm⁻¹ などである。これらは、生細胞内のオルガネラの膜構造を反映していると考えられる。また、リン脂質は可視領域に吸収を持たず、これらのバンドは、励起波長の変化により共鳴ラマン効果を得ることは考えにくく、また、リン脂質に帰属されるバンド間の相対強度も、励起波長の変化に対して大きな変化を見せない。よって、これらのバンドの中でも強度が一番強い1440 cm⁻¹のバンドをもって規格化を行っている。また、532 nm 励起 (A) のスペクトルのみ、750 cm⁻¹ にバンドを持つが、これは共鳴ラマンによる還元型シトクロムCのラマンバンドであると考えられる。このバンドに関しては、別途報告する。次に1602 cm⁻¹のバンド強度に注目すると、それらは励起波長により大きく変化していることが見て取れる。532 nm 励起のスペクトルにおいては、1440 cm⁻¹のバンドより強い強度を見せているのに対し、632.8 nm 励起のスペクトルにおいては1440 cm⁻¹のバンドのそれと同程度、785 nm 励起のスペクトルにおいては、1440 cm⁻¹のバンドの半分程度の強度となっている。励起光のエネルギーに対して、1602 cm⁻¹のバンド強度をプロットしたものが図2である。785 nm 励起に比べ、532 nm 励起においては3倍以上の強度の増強があることが分かる。これより、1602 cm⁻¹のバンドには共鳴ラマン効果によるバンド強度の、増強があると考えられる。

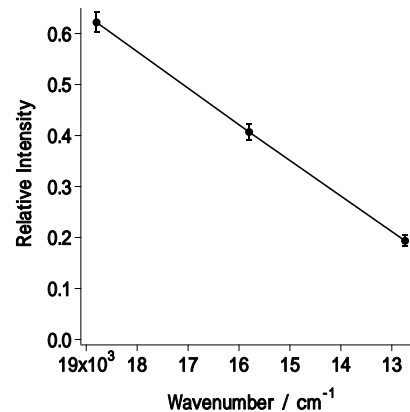
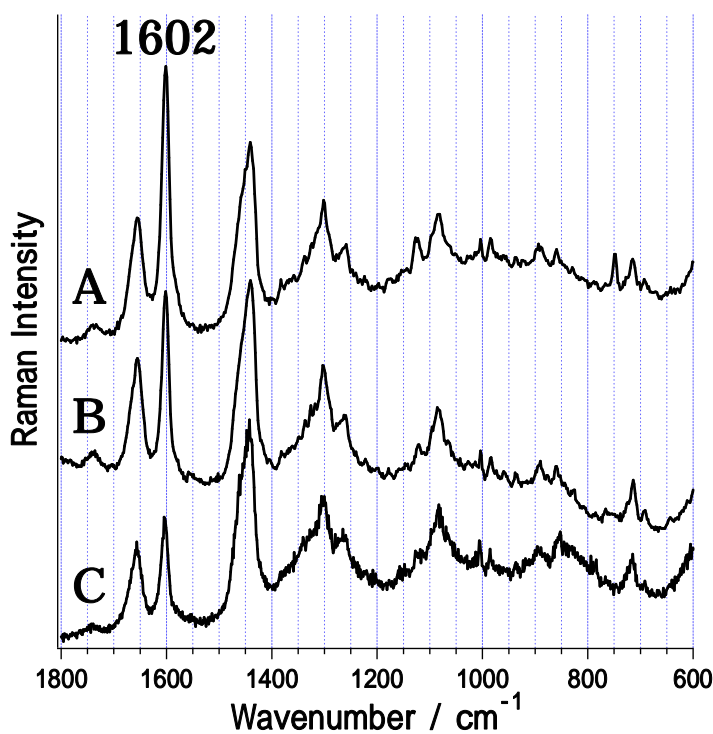


図1 (左) 酵母の空間分解スペクトル。

A: 532, B: 632.8, C: 785 nm 励起

図2 (上) 1602 cm⁻¹のバンドの励起プロフィール

【参考文献】

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