

2B15

ラマンイメージングにより明らかになった分裂酵母細胞周期中の物質分布および組成の協奏的变化

(台湾国立交通大学・応用化学¹、東大院理²) ○重藤真介¹、黄傳耿¹、濱口宏夫^{1,2}

【序】 生細胞は細胞周期を通じて、核酸・蛋白質・脂質などの細胞構成物質やオルガネラを正確に複製し娘細胞へと引き継いでいく。この過程は本質的に非常に動的な過程であり、細胞内の物質組成とその分布はさまざまな時間スケールで絶え間なく変化していると考えられる。従来の生化学的なアプローチでは時間的・空間的に平均化された情報しか得られず、生きた細胞中の物質組成や分布の変化を解析することは難しい。本研究では、面内空間分解能 0.3 μm 、時間分解能 \sim 10 分を有する自発ラマンイメージング法を用いて、分裂酵母生細胞の細胞周期(とくにその動的性質)を *in vivo* かつ分子レベルで解明することを目的とした。ラマンスペクトルに現れる多くのラマンバンドの強度マップ(マルチモード・ラマンイメージ)の時間変化を詳細に追跡することにより、細胞分裂の前後で、主要な細胞構成成分である蛋白質と脂質の濃度およびその分布が協奏的に変化することを見出した[1]。

【実験】 試料には分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) を用いた。YES 培地 (yeast extract 0.5%, glucose 3%, agar 1.7%, amino acids 0.02%) で培養した後、単一のコロニーを poly-D-lysine コート・ガラスボトムディッシュ上の PM 培地に移し替えたものを顕微鏡下での測定に用いた。試料の温度は 27 $^{\circ}\text{C}$ とした。

ラマンスペクトルの測定は自作の共焦点顕微ラマン分光装置[1,2]を用いて行った。ラマン励起波長は 633 nm である。試料におけるレーザーパワーは 1 mW とし、レーザー照射による細胞への影響を可能な限り抑えるようにした。積算時間は 1 点あたり 1.5 秒とした。したがって、分裂後の酵母細胞 2 個を含む領域 ($11.5 \times 16 \mu\text{m}^2$) をスキャンするのにかかった時間はおよそ 18 分で、これが本測定の時間分解能を決めている。

【結果と考察】 分裂前後での酵母生細胞のラマンイメージの経時変化(15 時間後まで)を、主な 9 つの振動バンドについて示したものが図 1 である。まず、最左列に示した各時間における光学顕微鏡像から、分裂酵母細胞が細胞周期のどの段階にあるかを大まかに推定することができる。測定開始 0.5 時間後の酵母細胞は G_2 期の終わりから M 期の初めにある。3 時間後までには体細胞分裂が完了して一次隔壁が形成されているのがわかる。この細胞は G_1/S 期に入っていると考えられる。3.5 時間後には細胞質分裂が起き、細胞は 2 個の娘細胞に分裂している (G_2 期)。これ以降 15 時間後まで、2 個の細胞は G_2 期にあると考えられる。

では、ラマンイメージは細胞分裂とともにどのような変化を示すのであろうか? ここでは、9 つのラマンバンドをその帰属[3]によって 3 つのグループに分けた。グループ 1 (1440, 1301

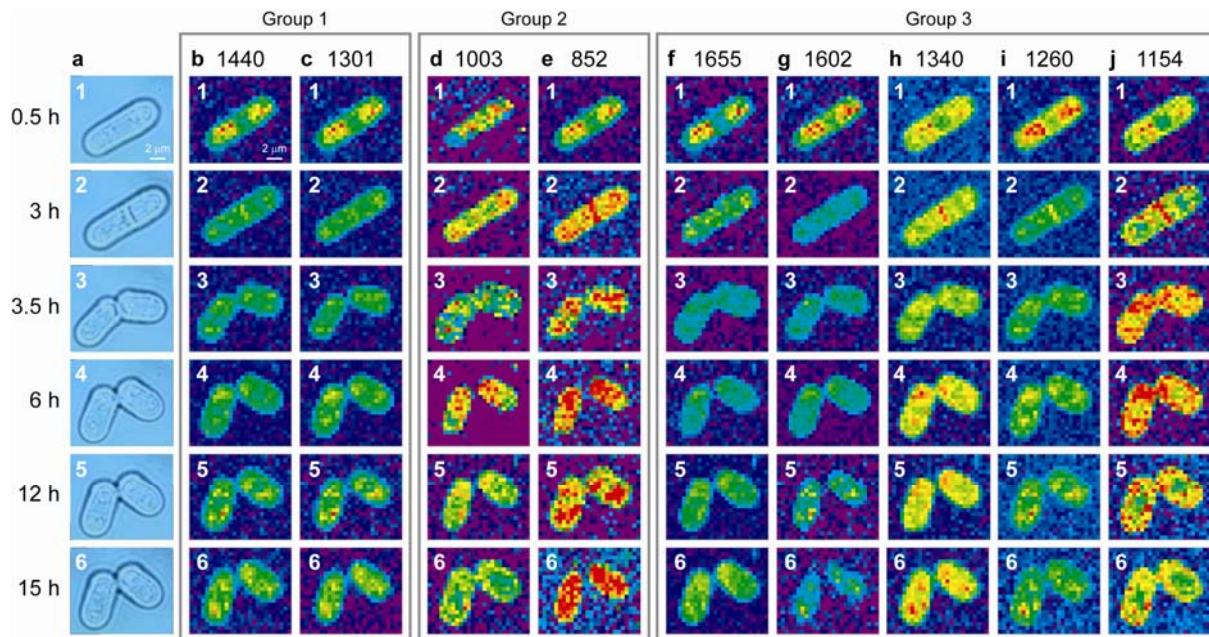


図 1: 分裂酵母 *S. pombe* 細胞の細胞周期ラマンイメージング。

cm^{-1})はリン脂質に、グループ 2 ($1003, 852 \text{ cm}^{-1}$)は蛋白質にそれぞれ帰属されるラマンイメージから成る。また、グループ 3 ($1655, 1602, 1340, 1260, 1154 \text{ cm}^{-1}$)のラマンイメージにはリン脂質、蛋白質、さらに隔壁の構成成分である多糖類が寄与していると考えられる。グループ 1 のラマンイメージから、リン脂質のバンド強度(濃度)が細胞分裂の開始(～3 時間後)とともに減少(赤・黄→緑)しているが、細胞質分裂後(3.5 時間後以降)は増加に転じていることがわかる。一方、グループ 2 のラマンイメージを見ると、蛋白質のバンド強度はリン脂質の減少と協奏的に増加し、細胞分裂後も引き続き増加していることがわかる。結果として、細胞分裂の進行に伴って、比較的リン脂質が多いラマンスペクトルから蛋白質が支配的なスペクトルへと変化していく。

このような動的かつ協奏的な細胞内物質組成および分布の変化は本研究で初めて得られた知見であり、単一細胞レベルでの研究だけでなく、時空特異的なアプローチが生命科学に不可欠であることを示している。今後、ラマン分光イメージングと生化学的な分析手法とを併用することで、この現象の生物学的な意義を解明することを目指す。講演では、脂質および蛋白質の濃度変化を定量的に見積もった結果や多変量解析を用いた結果についても議論する。

【参考文献】

- [1] C.-K. Huang, H. Hamaguchi, and S. Shigeto, *Chem. Commun.* in press.
- [2] H. N. Noothalapati Venkata, N. Nomura, and S. Shigeto, *J. Raman Spectrosc.* in press.
- [3] H.-S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto, and H. Hamaguchi, *Biochemistry*, **44**, 10009 (2005).