

## 4P090

共鳴ラマン分光を用いた生細胞中のシトクロムの酸化還元状態の観測と定量的分析  
(東大院・理<sup>1</sup>, NCTU 分子科学研究所<sup>2</sup>) ○柿田 穰<sup>1</sup>, 濱口 宏夫<sup>1,2</sup>

### 【序】

ミトコンドリアは細胞の活動に必要な ATP を合成する細胞内組織として重要な働きをする。近年、精力的にミトコンドリアの研究が行われ、反応機構や多くの性質が明らかになってきた。しかしながら、特定のタンパク質の追跡や抽出精製による分子生物学的アプローチでは、生化学反応に関与する活性分子の酸化還元状態など、電子状態の変化を確認することは不可能であり、反応機構の更なる解明には従来の方法とは異なる手法を用いる必要がある。

共鳴ラマン分光法は、電子吸収との共鳴により信号強度が増幅されるため、電子吸収波長の変化を用いて選択的に活性分子を検出することができる。シトクロムはミトコンドリアの電子伝達系に携わる重要なヘム含有タンパク質であり、その酸化還元状態について共鳴ラマン散乱による膨大な研究が蓄積されている[1]。シトクロム b は複合体Ⅲに含まれ、シトクロム c は複合体Ⅲから複合体Ⅳに電子を受け渡す重要な役割を持つことが知られている。我々はすでに、酵母から単離したミトコンドリアにコハク酸と ADP を加えて呼吸反応を誘起し、共鳴ラマン分光で調べた結果、ミトコンドリア内のシトクロムの酸化還元状態が変化することを観測した[2]。本報告ではマウス由来の動物細胞中においても同様にシトクロム b 及び c の酸化還元状態を定量的に観測し、これらの細胞内分布と変化を観測したので報告する。

### 【実験】

ISO の細胞毒性試験で使われる L929(NCTC)を指数増殖期及び定常期で測定した。対象細胞はミトコンドリアを GFP で染色している。532 nm を励起波長とする共焦点顕微ラマン分光器を用いて、室温下 2mW 照射、積算時間 0.5 秒の測定条件で実験を行った。比較に用いるシトクロム b 及び c のスペクトルは、それぞれヒト由来のシトクロム b<sub>5</sub>、及びウシ由来のシトクロム c を pH7.2 の PBS 中で測定したものである。酸化剤としてヘキサシアノ鉄酸カリウム、還元剤としてアスコルビン酸ナトリウムを加え、各酸化還元状態を維持させた。

### 【結果・考察】

532 nm 励起による同一濃度の各シトクロム溶液の共鳴ラマンスペクトルを図 1 に示す。同一濃度で比較すると還元体に比べ酸化体はラマン強度が 3 分の 1 以下であることがわかる。また、酸化体は 1638 cm<sup>-1</sup> に特徴的なピークを持ち、シトクロム b は c に比べ 1338 cm<sup>-1</sup> に特異的なピークを持つ。同様にシトクロム c の還元体は 604cm<sup>-1</sup> 近傍に特徴的なピークを持つ。またシトクロム a は 532 nm 励起では観測されないこ

とがわかる。これらの特徴を用い、細胞から得られた共鳴ラマンスペクトルの帰属と定量的評価を行う。

図 2 に細胞から得られた代表的な共鳴ラマンスペクトルを示す(図 2: (a))。このスペクトルから、たんぱく質総量のマーカーである 1003

$\text{cm}^{-1}$  バンドの強度で規格化したアルブミンのスペクトルを差し引いた。次に、

観測されている蛍光を差し引くことでスペクトルの直接比較を容易にした(図 2: (b))。

細胞から得られたスペクトルと同様に、各シトクロム溶液の標準スペクトルから蛍光を差し引いた 4 つのスペクトルを用い、これらの線形結合で作ったモデルスペクトルを最小二乗法で最適化を行った(図 2: (c))。これらの操作により、細胞内スペクトルの各シトクロムの成分の比を求めることができた。

図 3 に指数増殖期の細胞の各成分の定量的分布を示す。このように指数増殖期においてはシトクロム c は還元体で存在し、シトクロム b は主に酸化型に平衡がよっている。しかしながら非栄養素下に 5 時間放置後、同じ細胞を測定した結果、この分布に変化が観測された。

上記に加え、定常期の細胞内の分布と指数増殖期の分布を比較し、シトクロムの酸化還元状態の変化についてさらに詳しく考察を進めている。

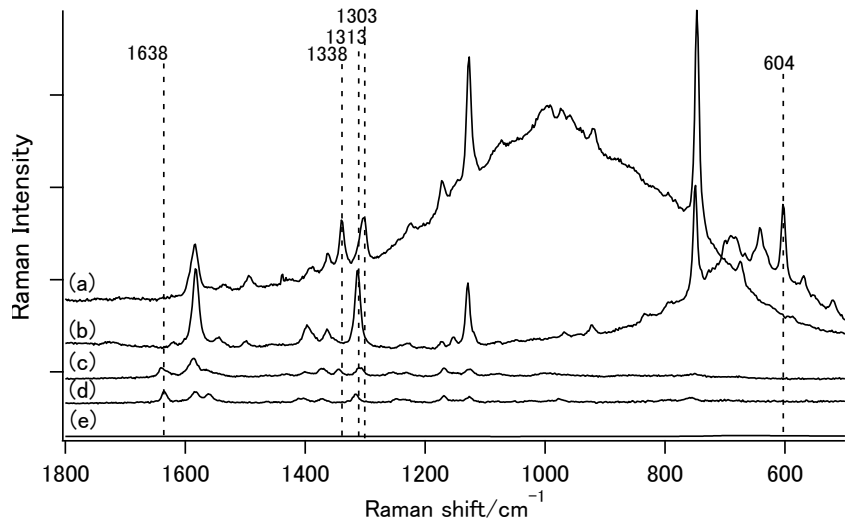


図 1 : (a) CYB 還元体、(b)CYC 還元体、(c) CYB 酸化体、(d)CYC 酸化体 (各 0.56 mgP/mL) (e) CYA 還元体(5.6mgP/mL)の 532 nm 励起によるラマンスペクトル

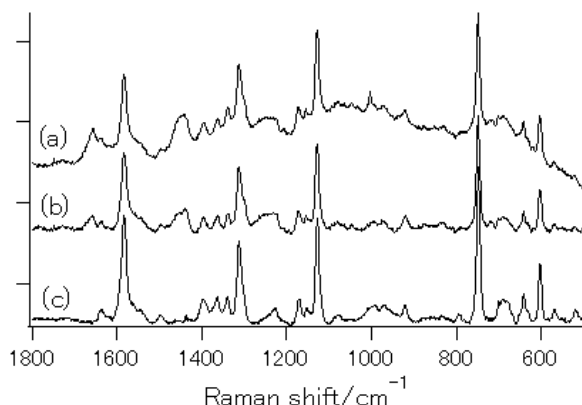


図 2: (a) 細胞中から得られたラマンスペクトル、(b) (a)からアルブミンと蛍光を差し引いたラマンスペクトル、(c) 蛍光を差し引いた各シトクロムの標準スペクトルで構成したモデルスペクトル

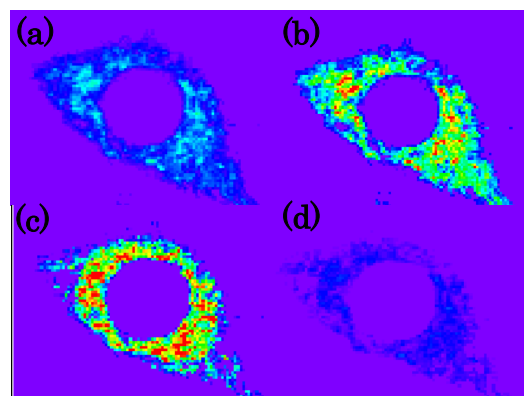


図 3 : (a) CYB 還元体、(b) CYC 酸化体、(c) CYB 酸化体、(d) CYC 酸化体の定量的分布イメージ

[1]: F. Adar and M. Erecinska (1974) *Arch, Biochem, Biophys.* 165, 570-580

[2]: In preparation