

4A15

¹³C 同位体標識ラマンイメージングによる
分裂酵母におけるタンパク質の脂肪滴への局在ダイナミクス

(国立交通大学・応用化学) 重藤真介, Hemanth Nag Noothalapati Venkata

Dynamic proteome localization to lipid droplets in single fission yeast cells
by stable isotope-labeled Raman imaging

(National Chiao Tung Univ.) Shinsuke Shigeto, H. N. Noothalapati Venkata

【序】脂肪滴 (lipid droplets) は酵母細胞から哺乳類細胞にいたるまで普遍的に存在するオルガネラである。その主な機能は長らく中性脂肪の貯蔵庫としての静的なものにすぎないと考えられてきたが、実際は非常にダイナミックかつ多面的であることが近年の分子生物学研究から明らかになりつつある。とくに、脂肪滴はタンパク質の輸送や一時的な貯蔵といった重要な細胞内過程に深く関与していることが示唆されている[1]。しかし、そのような密接な機能的相互作用を裏付ける直接的な証拠はまだほとんど得られていない。そこで本研究では、脂肪滴と細胞内タンパク質との関係を生きたまま非破壊で調べるため、¹³C 同位体で標識したグルコースが分裂酵母細胞内に取り込まれ同化されていく過程を顕微ラマン分光およびラマンイメージングを用いて可視化・追跡した。その結果、細胞外から取り込まれた ¹³C から新たに作られたタンパク質が特異的に脂肪滴へ局在化する現象を見出した[2]。

【実験】試料にはミトコンドリアを GFP で標識した分裂酵母を用いた。¹²C-グルコースを含む EMM 培地で前培養した後、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 ¹³C-グルコースを含む EMM 培地に植菌したものを顕微鏡下での測定に用いた。顕微鏡ステージ上にマウントできる自作の恒温チャンバーを用いることで、長時間のラマン測定が可能となった。

ラマンスペクトルおよびイメージング測定は既報の共焦点顕微ラマン分光装置[3]を用いておこなった。ラマン励起波長は 632.8 nm である。試料におけるレーザーパワーは 1 mW とし、積算時間は 1 点あたり 1.5 乃至 2 秒とした。したがって、1 回のイメージング測定に要した時間は約 16~20 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】¹³C の酵母細胞内への取り込み過程をモニターするのに最適なラマンバンドを探索するため、まず最初にアンサンブル測定 (n = 25) をおこなった。¹³C-EMM 培地に植菌した時点を時刻ゼロとし、細胞質および脂肪滴の空間分解ラマンスペクトル (25 個の平均) が培養時間とともにどう変化するかを調べた (図 1)。1655 cm⁻¹ 付近のアミド I バンドと *cis*-C=C 伸縮振動バンド、1003 cm⁻¹ のフェニルアラニン環呼吸振動バンドが ¹³C 同位体置換によりそれぞれ 1620, 1595, 967 cm⁻¹ にシフトするのに対

して、CH 変角振動 (1440 cm^{-1}) および CH_2 ねじれ変角振動 (1301 cm^{-1}) のバンドは同位体シフトを示さない。 $967/1003\text{ cm}^{-1}$ バンドは非常にシャープで他のバンドとよく区別でき、各時刻における ^{13}C 同位体置換/非置換のプロテオームを反映しているものと考えられるので、ラマンイメージングではとくにこれらのバンドをタンパク質のマーカーとして用いることにした。脂質のマーカーとしては 1301 cm^{-1} のバンドを用いた。

次に、単一分裂酵母生細胞における ^{13}C 取り込みのダイナミクスをラマンイメージングで計測した (図 2)。この方法では、上述のアンサンブル測定では得られない細胞内物質の濃度変化や分布変化に関する詳細な知見が得られる。 ^{13}C -EMM 培地での培養時間が長くなるにつれて、 1003 cm^{-1} バンドの強度が減少し (図 2C)、それと同時に 967 cm^{-1} バンドが強くなっていく (図 2D) のがわかる。さらに、25 時間後および 31 時間後の、 ^{13}C から新たに合成されたタンパク質 (967 cm^{-1} バンド) の分布が、脂質の分布 (図 2E) と非常に

よく似た局在パターンを示すことが見てとれる。この脂質の分布はミトコンドリアの GFP イメージ (図 2B) とはまったく異なるが、脂肪滴に豊富に存在するエルゴステロールの分布 (1602 cm^{-1} バンド; 図 2F) とはよく一致する。したがって、この結果は ^{13}C -グルコースから合成されたタンパク質が長時間経過後、脂肪滴に局在化する現象を *in vivo* で直接捉えたものと言える。

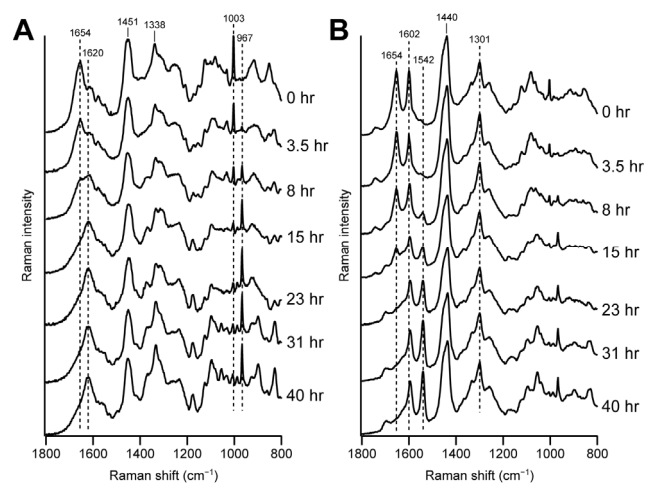


図 1: ^{13}C -グルコース含有培地中の分裂酵母生細胞の細胞質(A)と脂肪滴(B)のラマンスペクトル変化。

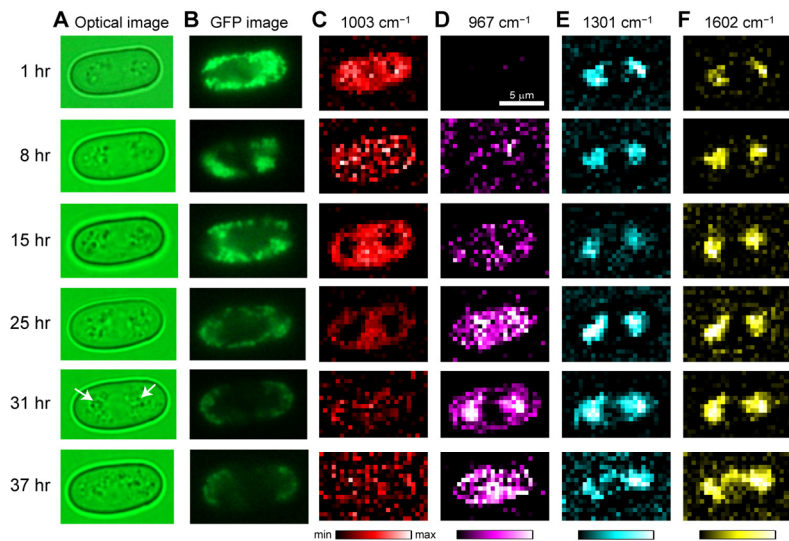


図 2: ^{13}C -グルコース含有培地中の単一分裂酵母生細胞のラマンイメージ変化。(A)光学顕微鏡像、(B)ミトコンドリアの GFP 蛍光像、(C-F) $1003, 967, 1301, 1602\text{ cm}^{-1}$ におけるラマンイメージ。

- [1] M. A. Welte, *Trends Cell Biol.* **17**, 363–369 (2007).
- [2] H. N. Noothalapati Venkata and S. Shigeto, *Chem. Biol.* submitted.
- [3] C.-K. Huang, M. Ando, H. Hamaguchi, and S. Shigeto, *Anal. Chem.* **84**, 5661–5668 (2012).