1Pp058

時空間分解ラマン分光による出芽酵母生細胞の研究

（東大院理）○内藤康彰、白神清三郎、植田充美、濵口宏夫

[序]　出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）は最も単純な真核細胞である。分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）と並び、高等生物細胞の基本的なモデルとして多岐に渡り研究されているが、物理化学の観点からの研究はまだほとんどされていないのが現状である。本研究では共焦点顕微ラマン分光を用いて、高い空間分解能で細胞小器官（オルガネラ）の分子レベルでの *in vivo* 観察を行った。また、細胞周期の時空間分解観察を行う事によりオルガネラの変化の分子レベルでの解析を試みている。

[実験]　共焦点ラマン顕微鏡（図 1）を用い、生きた出芽細胞内の微小領域にレーザーを集光し、細胞内の様々な場所でのラマンスペクトルを測定した。励起光に 632.8 nm を励起波長とする He-Ne レーザーを用いた時に、x-y 平面上で 250 nm の空間分解能での測定が可能である。また、奥行き方向には 100 μm のピンホールを用いた時に 1.7 μm の空間分解能を持つ。試料部におけるレーザーパワーは約 4 mW である。この手法により、細胞分裂周期（図 2）が異なる時期の単一の出芽酵母生細胞を解析することが可能である。測定結果は全て 300 秒積算で測定したものである。

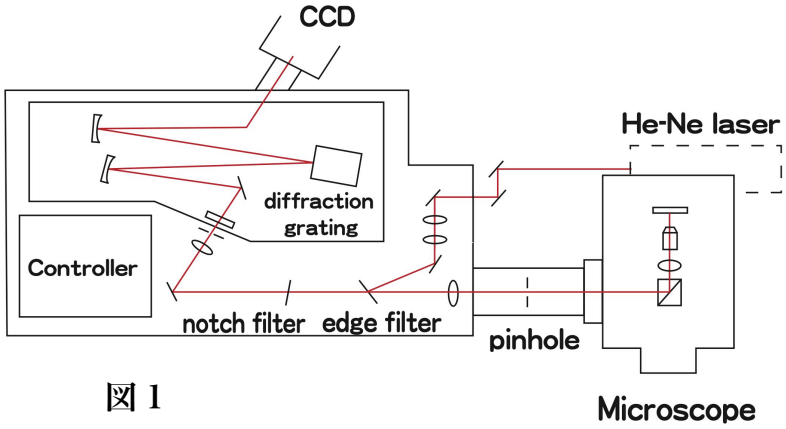


図 1

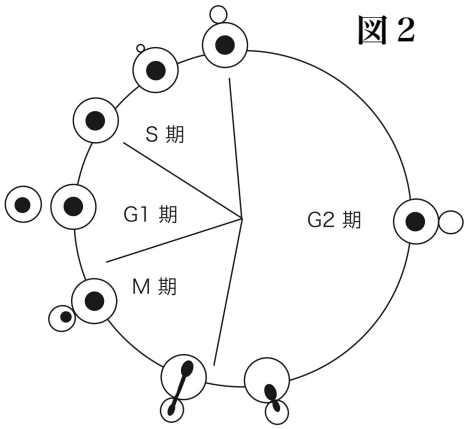
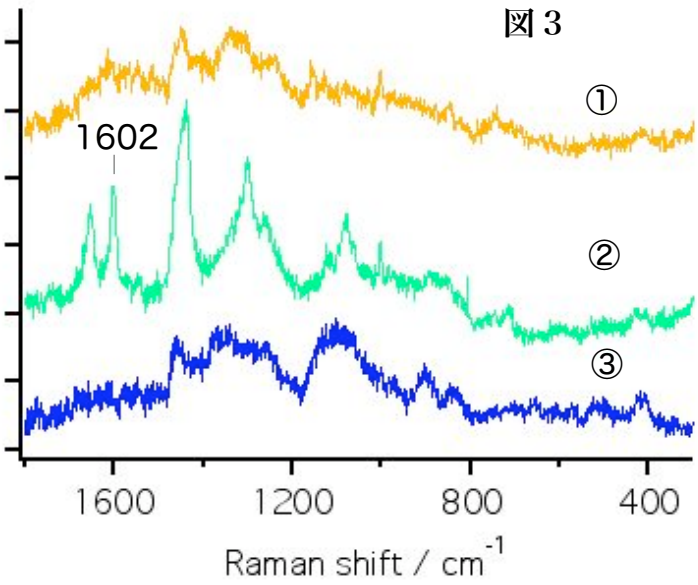
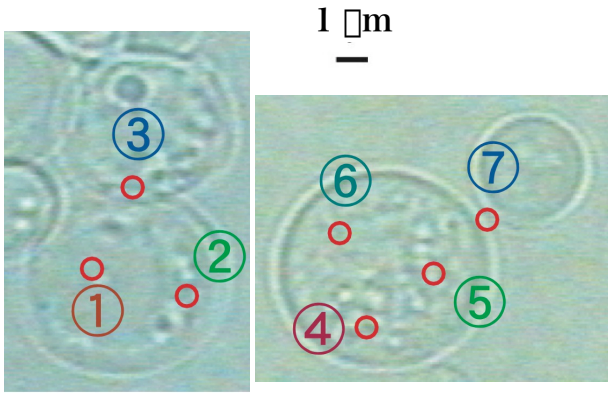


図 2

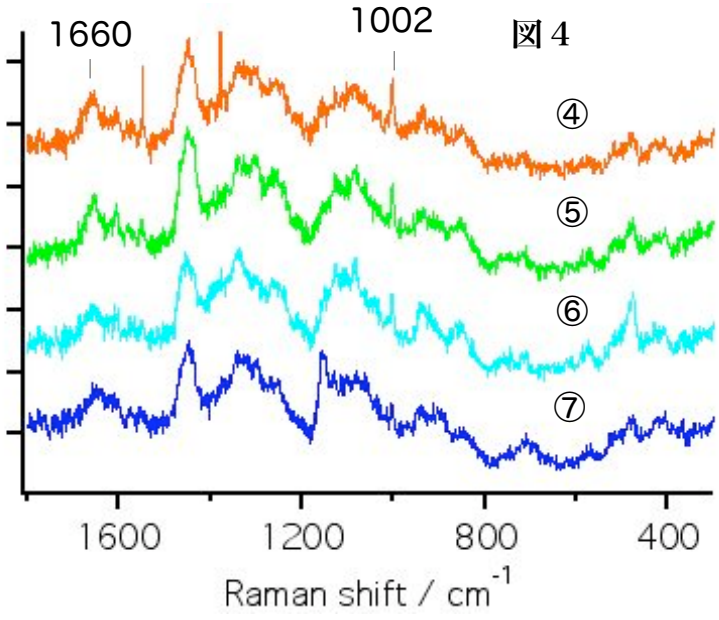
[結果]　図 3 に細胞周期の M 後期～G1 期にある出芽酵母の空間分解ラマンスペクトルを示す。図からわかるように細胞内の場所によりラマンスペクトルが顕著に異なる事がわかった。

その中で②のスペクトルは生体膜の主要構成成分である phosphatidylcholine のラマンスペクトルに類似している[1)]。ミトコンドリアは 2 重膜に覆われているオルガネラである事から、②のスペクトルはミトコンドリア由来のものであると考えられる。また、分裂酵母細胞内におけるミトコンドリアと推察されているスペクトルとも非常によく似ている。分裂酵母と同様に出芽酵母のスペクトルにも 1602 cm^{-1} の帰属できない未知の分子種によると思われるピークが観測されている。また、③のスペクトルは細胞壁の主要成分である多糖類の β-1,3 glucan のスペクトルと類似している[1)]。①のスペクトルは核、あるいは液胞のスペクトルを測定した





ものであるが、他の場所と異なりラマンシグナルの他に蛍光も検出される事がわかった。①のスペクトルが核由来のものかどうかを判別するためには核を染色する必要がある。図４は細胞周期の G2 後期～M phase の出芽酵母の空間分解ラマンスペクトルを示している。図３のスペクトルと異なり細胞内の場所の違いによるラマンスペクトルの顕著な変化が見られなかった。④、⑤、⑥のラマンスペクトルを見てみると非常に類似していることがわかる。これらのスペクトルには、蛋白質に特有なアミド I (～1660 cm^{-1})やフェニルアラニン(1002 cm^{-1})のバンドが観測され、G2 後期～M 期の細胞内には蛋白質が高密度に存在することがわかった。以上の研究により、空間分解ラマン分光法により、出芽酵母生細胞内の細胞周期に伴う物質変化を分子レベルにて観測できた。



今後の研究では、より詳細に細胞周期の時期を特定するために出芽細胞の核を染色することを計画している。核を染色し細胞周期の時期が特定できるようになれば、分裂酵母細胞と同様に同一細胞の細胞周期の実時間分解測定を行うことができる[1)]。また、図３の①のスペクトルの蛍光による阻害を除去するためにより長波長のレーザーを用いることも試みている。今回の研究により、時空間分解ラマン分光法で、細胞の一部のオルガネラや表面のみを高い空間分解能で測定し、そこで起こる反応を追跡することが可能であることが示された。

[参考文献]　1) Y.Huang and H.Hamaguchi et al,. *J.R.S.* **34**, 1-3 (2003)