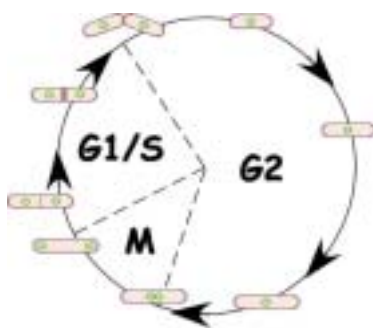


時空間分解ラマン分光による酵母の細胞周期の 分子レベル観察: KCNによる呼吸阻害の効果

(東大院理) ○黄郁珊・辛島健・山本正幸・濱口宏夫

【序】分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) は隔壁形成による2分裂で増殖する。このため、分裂酵母は高等生物細胞にも共通する細胞分裂のモデルとして利用され、特に細胞周期の研究にとって重要なモデル生物であり、今もっとも理解が深まっている生物である。しかしながら、酵母の細胞周期に関する物理化学的な研究はほとんどないのが現状である。従来の生物化学手法は酵母内の分子を時空間的に平均値を観測するのにに対し、本研究では物理化学的な手法(共焦点顕微ラマン)で、細胞周期による生きた酵母細胞内の物質変化を分子レベルで捉まえることに成功した[1]。しかし得られたスペクトル中、 1602cm^{-1} には未知の分子種のもと思われるラマンバンドが強く観測された。今討論会では呼吸が阻害された細胞のスペクトルとの比較により、呼吸酵素の活性と 1602cm^{-1} ラマンバンドの関連を議論する。



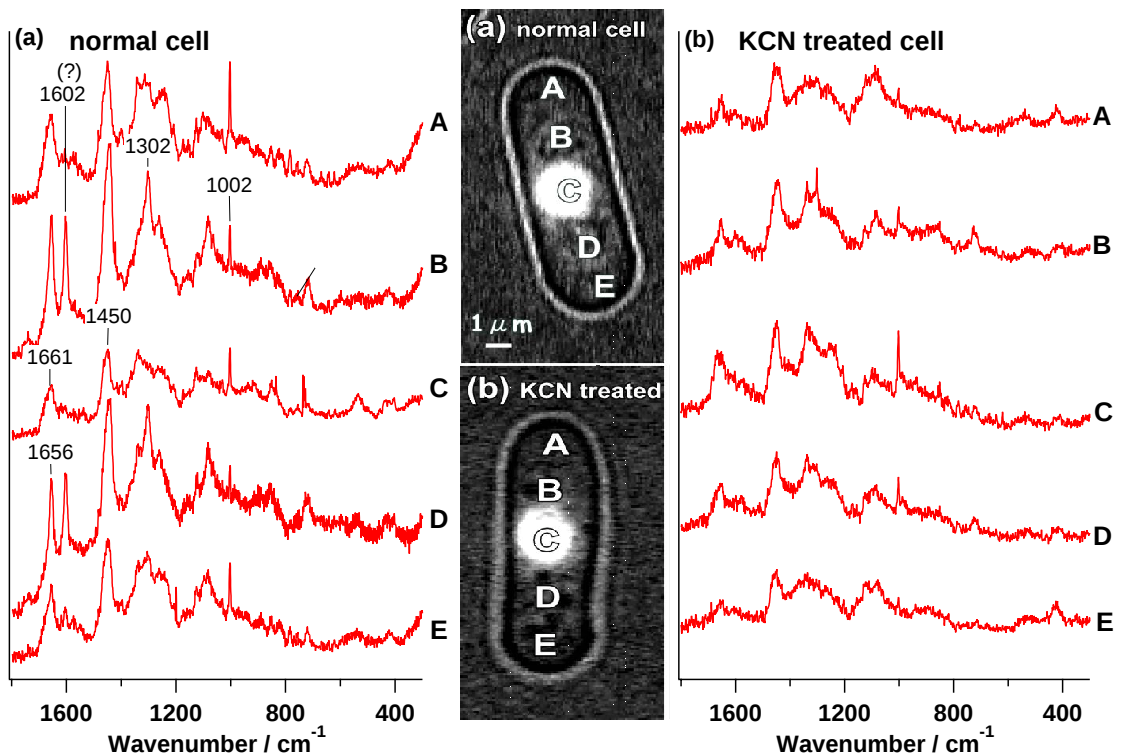
【実験】共焦点ラマン顕微鏡(東京インスツルメンツ製

Nanofinder[®])の対物レンズを通して、レーザービームをGFPで細胞核を標識した生きた分裂酵母内のいくつかの場所に集光し、細胞分裂周期(左図)の異なる時期にある酵母のラマンスペクトルを測定した。632.8nmの励起光を用い、250nmの空間分解能で単一酵母細胞を解析することが可能である。試料部でのレーザーパワーは約3mWである。この程度のパワーのレーザー光の照射では酵母細胞が十分活性を持ったままの状態を観察

することができる。試料の前処理にKCN水溶液を使用した。蒸留水で洗浄した酵母を濃度 30mg/L のKCN水溶液に分散させて3時間放置する。一方、対照組の酵母は液体培地に分散させて3時間放置する。ラマンスペクトルの測定を行う前に、前処理された酵母を再び蒸留水で洗浄してさらに蒸留水に分散させた後、poly-L-lysine をコートしたスライドガラス上にのせる。試料の乾燥を防ぐためにワセリンをカバーガラスの周囲とスライドガラスの間を塗り固める。これにより、ブラウン運動による揺動を抑えることができる。また、餌を全く与えないことで、分裂速度を低下させる。このことによって、1時間程度の測定時間でも細胞全体を十数点に空間分解したラマンスペクトルを得ることができた。

【結果】右図は細胞周期の G2 期にある酵母の空間分解ラマンスペクトル(300cm^{-1} から 1800cm^{-1})を示す。(a)は対照とする正常細胞の結果であり、(b)は呼吸がKCNにより阻害された細胞の結果である。顕微鏡写真に見られるように、細胞核の位置をGFPからの発光により明確に知ることができる。(a)のスペクトルに観測されるバンドのうち、 1661cm^{-1} は蛋白質主鎖のアミド I 振動、 1656cm^{-1} は不飽和脂肪酸のcisC=C伸縮振動、 1450cm^{-1} はC-Hの変角振動、 1302cm^{-1} は CH_2 の

ねじれ振動、 1002cm^{-1} は蛋白質を構成する芳香族アミノ酸phenylalanineの環振動のバンドに帰属することができる。その中でとくにB, Dのスペクトルは生体膜の主要構成成分であり、グリセリン脂質phosphatidylcholine のスペクトルによく似ており、ミトコンドリアに由来するものであると考えられる。ミトコンドリアは、呼吸を通じて細胞にエネルギーを供給して細胞の生死の決定をしているということが知られている。したがって細胞の呼吸を阻害してスペクトルを観測すればB, Dのスペクトルがミトコンドリア由来であると確定することができる。呼吸の阻害剤として細胞に投与したKCNは、ミトコンドリア内膜の酸化酵素に含まれる鉄イオンと結合し、失活させることにより細胞の呼吸を不可能にすることが知られている。図の写真からわかるように、KCN投与の効果は顕微鏡では区別がつかない。一方、ラマンスペクトルでは(a)と(b)を明瞭に区別することができる。すなわち(b)のスペクトルからわかるように、KCNによる呼吸阻害の効果はミトコンドリア由来と考えられるスペクトル(b)のB, Dに最も大きな変化を起こし、特に 1602 cm^{-1} のラマンバンドは観測されなくなった。この結果は、 1602 cm^{-1} のラマンバンドが呼吸酵素の活性と強く関連を持つことを示唆する。このバンドを与える分子種はまだ明らかになっていないが、ミトコンドリア内の呼吸に関与する小分子である可能性が考えられる。現在、この 1602 cm^{-1} ラマンバンドの強度の時間変化および異なる波長でのスペクトル測定について検討中である。



[1] Huang YS, Karashima T, Yamamoto M, Hamaguchi H. *J. Raman Spectrosc.* 2003; **34**:1.