

時空間分解ラマン分光による出芽酵母生細胞 内部構造変化の分子レベル追跡

(東大院理) ○内藤康彰、辛島健、山本正幸、濱口宏夫

[序] 出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は最も単純な真核細胞である。取り扱いが簡易で、人の細胞との相同性が非常に高いことから、高等生物細胞の基本的なモデルとして生化学の分野において多岐に渡り研究されている。しかし、細胞を破壊してしまう生化学の手法を用いた研究では、実際に生細胞内で起こる分子過程の実時間分解観測はできない。本研究では共焦点顕微鏡ラマン分光計を用いた時空間分解ラマン分光により、生細胞の実時間 *in vivo* 測定を行った。高い空間分解能で細胞小器官（オルガネラ）、特に液胞の分子レベル解析を行った。その結果、これまで内部構造がよくわかっていなかった液胞内部に、ダンシングボディと呼ばれる粒子が出現し、それがポリリン酸を含むことがわかった。更に、単一生細胞内でのダンシングボディの実時間分解観測を行った。

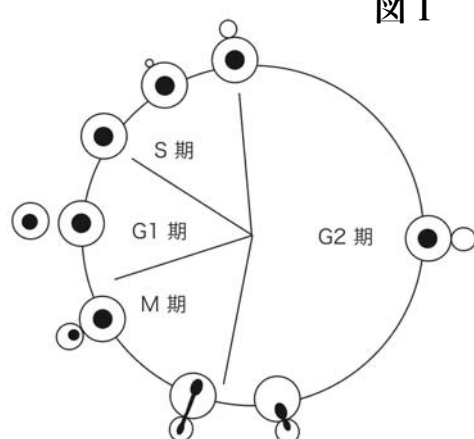


図 1

[実験] 共焦点ラマン顕微鏡を用い、生きた出芽酵母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 He-Ne レーザーの 632.8 nm の発振線を用いた時に、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、100 μm のピンホールを用いた時に奥行き方向に 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 1) が異なる時期の単一出芽酵母生細胞を解析することが可能である。時空間分解スペクトルは全て 300 秒積算で、マッピングは 1 点 10 秒で測定した。

[結果] 図 2 に細胞周期の G2/M 期にある出芽酵母の顕微鏡写真と空間分解ラマンスペクトルを示す。顕微鏡写真の細胞は上段、中段、下段共に同一の細胞である。図 2 の上段にレーザースポットを写真の赤丸で示す。これまでの研究結果から、①のスペクトルは細胞壁、②のスペクトルはミトコンドリア、③のスペクトルは核、もしくは細胞質に由来するものである事がわかっている。④の場所に活発に動く黒い球状の固まりが存在する。この黒い固まりはダンシングボディと呼ばれ、液胞内に時折出現する事が知られている。ダンシングボディはポリリン酸と推測されているが、機能はわかっていないのが現状である。また、下段の写真のようにダンシングボディはレーザー光にトラップされる事が可視下で確認された。④のスペクトルはダンシングボディのスペクトルである。1160 cm^{-1} と、700 cm^{-1} に非常に強いバンドが見つかった。⑤のスペクトルは、ポリリン酸のスペクトルである。④と⑤のスペクトルを比較してみるとダンシングボディの 700 cm^{-1} のバンドは、ポリリン酸のバンドである事がわかった。これより、ダンシングボディの主成分はポリリン酸である事が示された。また、ダンシングボディにはポリリン酸以外に 1160 cm^{-1} の強いバンドがあるが、これはよ

り小さいリン酸カリリン酸イオン、もしくは、縮合リン酸塩かメタリン酸塩ではないかと考えられる。ダンシングボディをから観測されるこれらのラマンバンドを帰属するために様々なリン酸塩のラマンスペクトルと比較する事が必要となる。

図3にダンシングボディの時空間分解ラマンスペクトルを示す。10分まではダンシングボディの存在が光学顕微鏡像で確認され、700 cm^{-1} 、1160 cm^{-1} の強いバンドが存在するが、20分にはダンシングボディは光学顕微鏡像においてもラマンスペクトルにおいても消失する事が確認された。20分から160分まで脂質のスペクトルが現れるが、180分からは多糖類のスペクトルが観測された。185分には液胞内部に黒い固まりが出現し、このスペクトルもまた多糖類のスペクトルであった。この結果から、ダンシングボディは時間の変化に伴い消失、出現をする事がわかった。また、液胞内部で脂質が多く存在する時期、多糖類が多く存在する時期があり、液胞内部構造が時間変化する事が時空間分解ラマン測定により観測された。

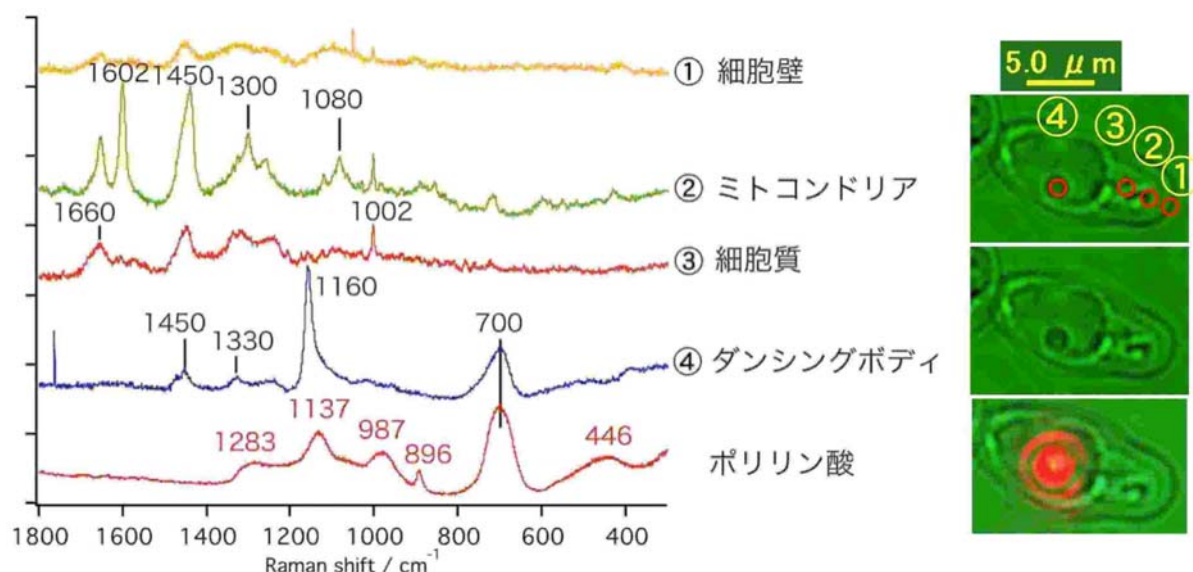


図2 G2-M期における出芽酵母の空間分解ラマンスペクトル（左）と光学顕微鏡写真（右）

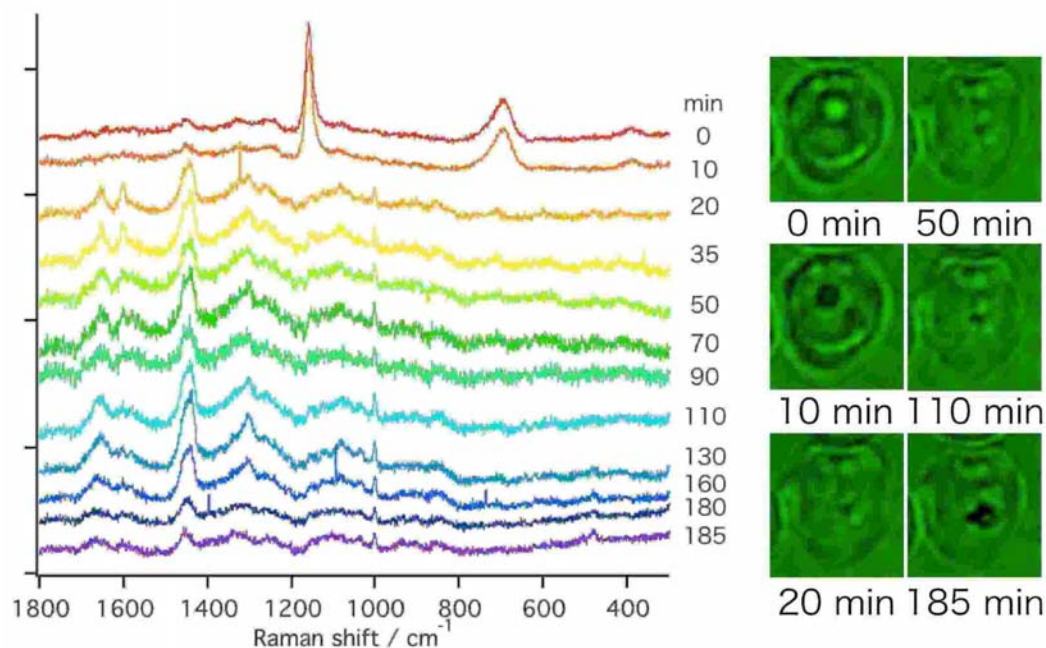


図3 ダンシングボディの時空間分解ラマンスペクトル（左）と光学顕微鏡写真（右）