

時空間分解ラマン分光による分裂酵母の細胞周期の分子レベル観察： *in vivo*でのミトコンドリアの呼吸活性度の可視化

(東大院理) ○黄郁珊・辛島健・山本正幸・濱口宏夫

【序】生細胞内の分子の挙動を実時間、実空間で観測することは極めて重要である。これまで細胞内の分子やオルガネラを特異的蛍光色素によって可視化する方法が主として用いられて来た。一方、共焦点ラマン顕微鏡を用いた時空間分解ラマン分光によれば、このような染色操作をすることなく、細胞内多数の分子の分布を同時に可視化できる。われわれはこの物理化学的手法で、細胞周期による生細胞内の物質変化を分子レベルで捉える研究を行っている。今討論会では、細胞内の呼吸活性度を時空間分解ラマン分光で検証、可視化した結果を発表する。実験対象として使われた分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) は隔壁形成による2分裂で増殖し、細胞周期の研究にとって重要なモデル生物である。前回の討論会では、生細胞と死細胞のラマンスペクトルの比較から 1602 cm^{-1} に観測された未知のラマンバンドが呼吸活性と強く関連していることを報告した。今回、単一細胞について呼吸阻害の実験からこの相関をさらに確認し、それに加えて 1602 cm^{-1} のラマンバンドのラマンイメージング測定を行ったので、その結果を示す。

【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、レーザービームを生きた細胞に集光する。632.8nmの励起光を用い、250nmの空間分解能で酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)細胞内のオルガネラを解析することが可能である。呼吸阻害剤としてKCNを試料に投与して細胞の呼吸を阻害させ、核の近傍に存在するミトコンドリアの 1602 cm^{-1} ラマンバンドの強度の時間変化を測定した。試料部でのレーザーパワーは約3 mWであり、露光時間は180秒=3分間である。ラマンイメ

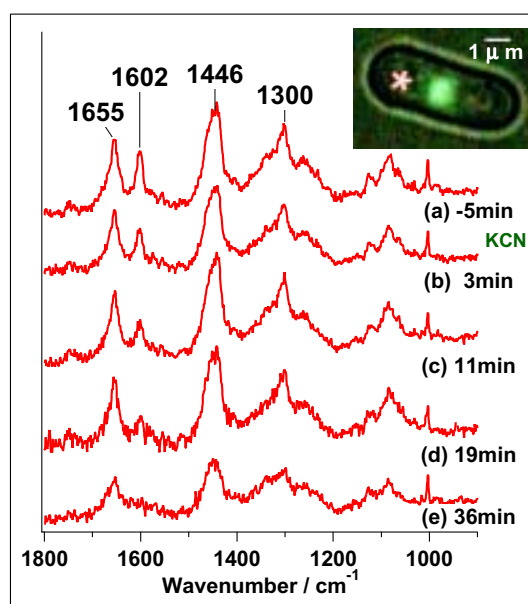
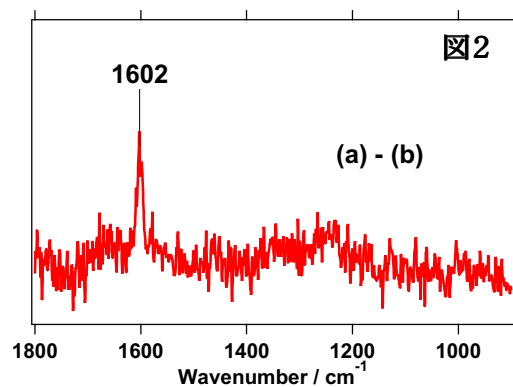


図1 ミトコンドリアの時空間分解ラマンスペクトル。呼吸阻害剤の影響で、 1602 cm^{-1} のラマンバンドが徐々に消えた。

ージング測定にはサンプルをピエゾステージで1ステップ/2秒間、1ステップ=500 nmで移動させ3 mWのレーザーでスキャンした。細胞のラマン信号を収集し、得られたシグナルの強度を色(強→弱を赤→青)で表して二次元的なイメージングを作成した。

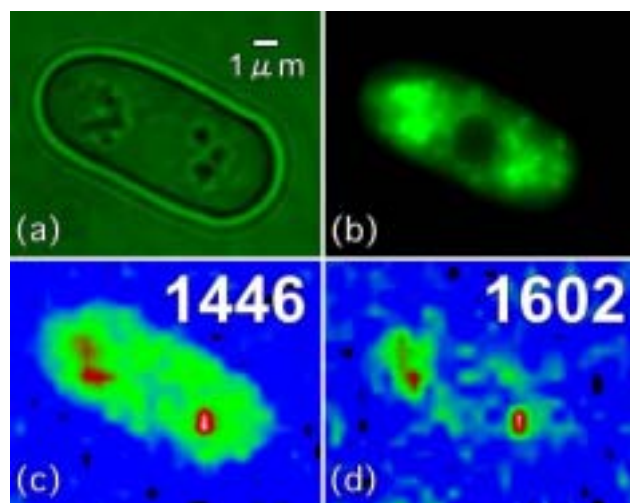
【結果】図1に示すのは酵母のミトコンドリアの時空間分解ラマンスペクトルである。ミトコンドリアは呼吸を通じて細胞にエネルギーを供給して細胞の生死の決定をしている、ということが知られている。図中のGFP蛍光顕微鏡写真により、細胞核はこの細胞の真中にあることがわかった。レーザーはこの細胞核の近傍(*)でマークした)に集光されているが、この

位置から観測されたスペクトル(a)はミトコンドリアのスペクトルであるため、レーザーはミトコンドリアに当たっていることが確認できた。KCNを投与する5分前のスペクトル(a)に強い1602 cm⁻¹のラマンバンドが観測された。KCN投与後3、11、19、36分のスペクトル (b) ~ (e)からわかるように、1602 cm⁻¹のラマンバンドの強度は徐々に弱くなり、最後に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活性と強く関連を持つことを示唆している。後期に見える脂質バンド (1655 cm⁻¹は不飽和脂肪酸の cis C=C 伸縮振動、1446 cm⁻¹はC-Hの変角振動、1300 cm⁻¹はCH₂のねじれ振動に帰属することができる。いずれも生体膜の主要構成成分のバンドである)の強度及び形の変化は、呼吸活性の低下がミトコンドリアの膜の崩壊を引き起こした結果と考えられる。1602 cm⁻¹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、KCN投与直前と直後の差スペクトル(図2)をこの分子種のスペクトルと考えてよい。図2により、この分子は単純な構造



を持つ小分子である可能性が高い。ミトコンドリア内の呼吸に関与するFe···O₂···Cu と Fe=O₂などの可能性が考えられる。図1のラマンスペクトル変化は顕微鏡観察でわからない細胞の死の初期過程を見ているものと考えられる。その意味で我々は1602 cm⁻¹のバンドを「生命の分光指標」¹⁾と呼んでいる。図3に示すのは酵母の(a)顕微鏡写真(b)ミトコンドリアのGFP蛍光写真と(c) 1446 cm⁻¹ (d) 1602 cm⁻¹ 両ラマンバンドのラマンイメージングである。図(c) はC-Hの変角振動を測って脂質の分布をマッピングした結果であるから、細胞膜を含めてリン脂質膜を持つ全てのオルガネラが検出されており結果は細胞の形になる。なかに2重膜を持つミトコンドリアは他のオルガネラに比べてリン脂質の密度が高いから、そのラマンバンドが強く観測される。図(d)のパターンは図(b)の明るい部分と図(c)の赤い点に一致することが判明した。この結果は、1602 cm⁻¹ラ

マンバンドを与える分子種の分布はミトコンドリアのものと一致することを示しており、ミトコンドリア中に存在することを証明した。また、ラマンイメージングはGFPのように生体分子の分布を可視化するだけでなく、生理作用の活性度の可視化もできることを意味する。本研究は生細胞に関する研究の基礎を固める化学と生物学の新しい掛け橋になるものと期待される。



¹⁾ YS Huang, T. Karashima, M. Yamamoto, T. Ogura and H. Hamaguchi. *J. Raman Spectrosc.* 2004; **35**:525

図3 ミトコンドリアがGFPで標識された酵母の顕微鏡写真: (a) 白色光 (b) GFPの蛍光とラマンイメージングの結果: (c) 脂質のC-Hの変角振動 (d) 「生命の分光指標」1602 cm⁻¹ラマンバンド。