

## 4A09

# 時空間分解ラマン分光による出芽酵母細胞死の分子レベル追跡

(東大院理) ○内藤康彰、東江昭夫、濱口宏夫

[序] 細胞の動的構造と機能を知る上で生細胞の *in vivo* 研究は不可欠である。破壊を伴う生化学的手法ではこのような研究は不可能であるため、染色による顕微鏡観察が主として用いられてきた。しかし、この手法は染色対象となる標的分子が既知であることを前提としているため、現象の探索的研究には適さない。我々は、非破壊手法であるラマン分光を用いる事により、様々な生細胞の分子レベルでの *in vivo* 観測を行ってきた。本研究では、最も単純な真核細胞であり、高等生物細胞の基本的なモデルとして扱われている出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を研究対象とした。共焦点顕微ラマン分光を用いる事により、x-y 平面上で 250 nm、奥行き方向に 1.7  $\mu\text{m}$  という高い空間分解能で出芽酵母細胞死の分子レベルでの非破壊 *in vivo* 追跡を行った。その結果、液胞内に主にポリリン酸イオンから成るダンシングボディと呼ばれる粒子が出現すると同時に、ミトコンドリア代謝活性が停止し、後に液胞が潰れ、最後には細胞内の脂質、蛋白質が分解されるプロセスが見出された。この一連の出芽酵母細胞自然死過程は、本研究により初めて明らかにされたものである。

[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  $\mu\text{m}$  のピンホールを用いた時に奥行き方向に 1.7  $\mu\text{m}$  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。また、ピエゾステージを走査する事により、特定のラマンバンドの強度分布を測定した。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 1 秒で測定した。

[結果] 図 1 にダンシングボディが出現した出芽酵母の単一生細胞の時空間分解ラマンイメージングと顕微鏡写真を示す。酵母細胞のミトコンドリアのラマンスペクトルには、代謝活性を反映する「生命のラマン分光指標」と呼ばれる  $1602\text{ cm}^{-1}$  のバンドが存在する<sup>1,2)</sup>。また、これまでの研究結果から、ダンシングボディの非常に強い  $1160\text{ cm}^{-1}$  と、 $700\text{ cm}^{-1}$  のバンドはポリリン酸イオンのバンドである事がわかっている<sup>2)</sup>。ラマンイメージングは、 $1602\text{ cm}^{-1}$  (生命のラマン分光指標)、 $1440\text{ cm}^{-1}$  (リン脂質)、 $1160\text{ cm}^{-1}$  (ポリリン酸イオン)、 $1002\text{ cm}^{-1}$  (蛋白質中のフェニルアラニン残基) のバンドを用いて行った。 $1602\text{ cm}^{-1}$  のラマンイメージは代謝活性の高いミトコンドリアの分布を示している。また、 $1440\text{ cm}^{-1}$  のラマンイメージはミトコンドリア脂質二重膜の形状を、 $1160\text{ cm}^{-1}$  のラマンイメージはポリリン酸イオンの分布を、 $1002\text{ cm}^{-1}$  のラマンイメージは蛋白質中のフェニルアラニン残基の分布を示している。各バンドのラマンイメージは一度

に測定され、一回の測定にかかる時間は約9分である。6時間と8時間41分の顕微鏡写真中央に存在する粒子がダンスングボディである。顕微鏡写真から、5時間50分から6時間の間にダンスングボディが突然に出現し、8時間41分から9時間31分の間に液胞が消失し、9時間31分から19時間37分の間に細胞内の構造が崩壊する事がわかる。この一連の細胞構造変化は、培地、レーザー照射の有無に関わらず、光学顕微鏡で観測した全ての細胞において生じた。1602  $\text{cm}^{-1}$  のラマンイメージから、0分と5時間50分では、代謝活性の高いミトコンドリアが細胞内に分布している事がわかる。よって、この時間における細胞は、正常な細胞であるとみなす事ができる。5時間50分と6時間の間に、ダンスングボディが出現し活発に液胞内を動き回り、同時にミトコンドリア代謝活性が低くなった。8時間41分ではダンスングボディが停止し、ミトコンドリア代謝活性がほぼ完全に失われた。9時間31分においては、液胞が消失し、細胞内構造が失われている事がわかった。19時間37分では、細胞内のリン脂質、ポリリン酸イオン、タンパク質は完全に乱雑に分布している。このような乱雑な構造では細胞は生命活動を行う事ができないと考えられる。この一連の細胞自然死過程は、計画的細胞死やアポトーシス様細胞死と深く関わっていると推測される。時空間分解ラマン分光法により、出芽酵母細胞死の未知の機構が解明される事が期待される。

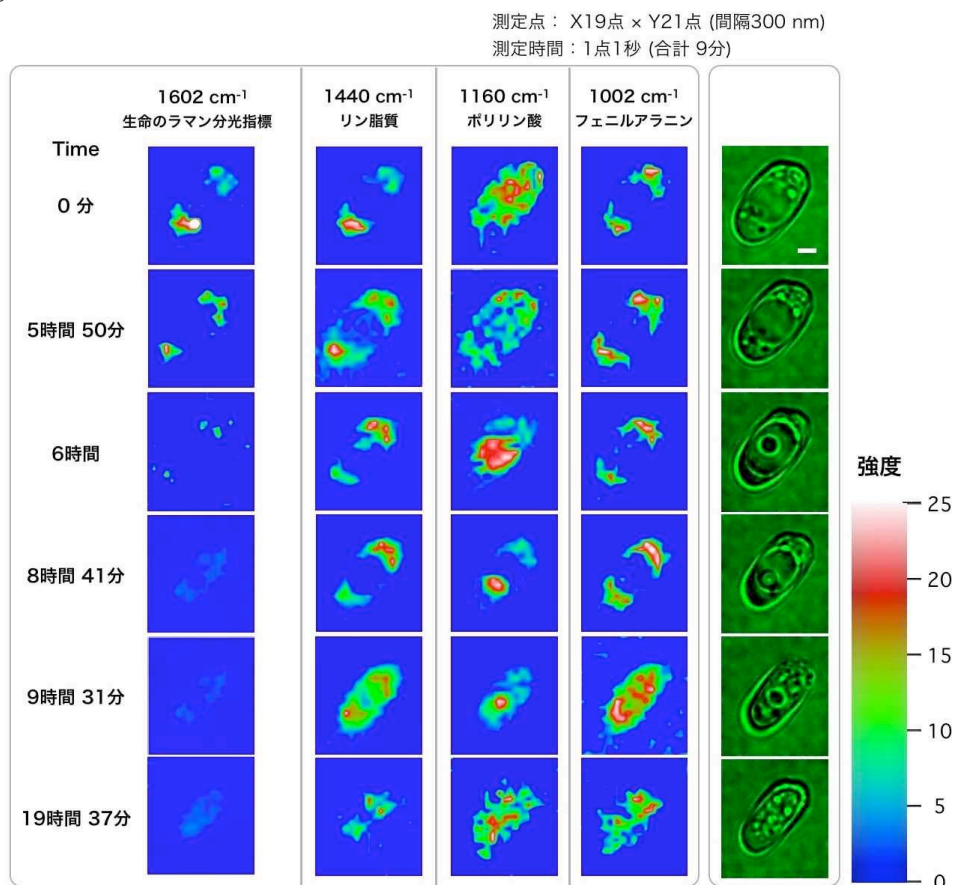


図1 出芽酵母細胞の時空間分解ラマンイメージングと顕微鏡写真

- 1) Huang Y-S, Karashima T, Yamamoto M, Ogura T, Hamaguchi H. *J. Raman Spectrosc.* **35**(2005)525.
- 2) Naito Y, Toh-e A, Hamaguchi H. *J. Raman Spectrosc.* in press.