

1A16

時空間分解ラマン分光による出芽酵母液胞内リン酸代謝の動的挙動追跡

(東大院理¹、蓄草研²、臨床研³) ○内藤康彰¹、大友量²、東江昭夫³、濱口宏夫¹

[序] 生細胞の動的構造と機能を分子レベルで解明するために、分子レベルでの *in vivo* 研究は不可欠である。我々は、前回までの発表で時空間分解顕微ラマン分光法が生細胞の *in vivo* 観測に非常に有用な手法である事を示した。また、出芽酵母生細胞の細胞自然死過程を時間分解ラマンイメージングにより追跡し、細胞死過程を可視化する事に成功した¹⁾。本研究では、モデル化合物のラマンスペクトルとの比較により、出芽酵母液胞内に存在するポリリン酸塩水溶液と、液胞内に出現するダンシングボディと呼ばれる顆粒の主成分であるポリリン酸塩の同定を試みた。また、時空間分解ラマン分光によるダンシングボディ出現過程の追跡により、ダンシングボディ出現の際、液胞膜内側に小胞が出現しそれが分離してダンシングボディになる事がわかった。

[実験] 共焦点顕微ラマン分光装置を用い、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。モデル化合物として、精製したポリリン酸塩 (Na 塩, K 塩, Li 塩, Arg 塩, Mg 塩, Ca 塩) を固体、水溶液で測定した。生細胞とポリリン酸塩固体の測定には励起光に He-Ne レーザーの 632.8 nm の発振線を用いた。ポリリン酸塩水溶液の測定には励起光に Ti-Sapphire レーザーの 785 nm の発振線を用いた。励起光に 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 2 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。Ti-Sapphire レーザーの 785 nm の発振線を用いた時の試料部のレーザーパワーは約 30mW である。

[結果と考察] 図 1 に鎖長 700-800 程度のポリリン酸塩固体 (Na 塩, K 塩, Li 塩, Arg 塩, Mg 塩, Ca 塩) とダンシングボディのラマンスペクトルを示す。左側にポリリン酸の PO_2 振動に帰属される 1149-1173 cm^{-1} のラマンバンド、右側に P-O-P 振動に帰属される 650-710 cm^{-1} のラマンバンドを示す。ポリリン酸塩とダンシングボディの PO_2 振動由来のバンドを比較すると、ダンシングボディはポリリン酸ナトリウムとよく一致する。ダンシングボディのバンド幅が広いのは比較しているモデル化合物より鎖長分布に幅があるためと推測される。一方、P-O-P 振動由来のバンドを比較すると、ダンシングボディはポリリン酸カルシウムと最もよく一致する。ポリリン酸ナトリウムは水溶性、ポリリン酸カルシウムは難溶性である。前回の発表で、時間分解ラマンイメージングによって、ダンシングボディ出現前後において液胞内水溶液中のポリリン酸塩濃度が変化しない事が示されている¹⁾。以上の結果から、液胞内水溶液中をブラウン運動するダンシングボディは、水溶性のポリリン酸ナトリウムが濃度上昇により析出したものではなく、液胞中のカルシウム濃度上昇によって難溶性のポリリン酸カルシウムが析出し顆粒となったものであると考えられる。ダンシングボディと鎖長 700-800 程度の

ポリリン酸カルシウムでは PO_2 振動由来のバンドが異なっているため、今後は鎖長の異なったポリリン酸カルシウムを測定し、比較を行う予定である。

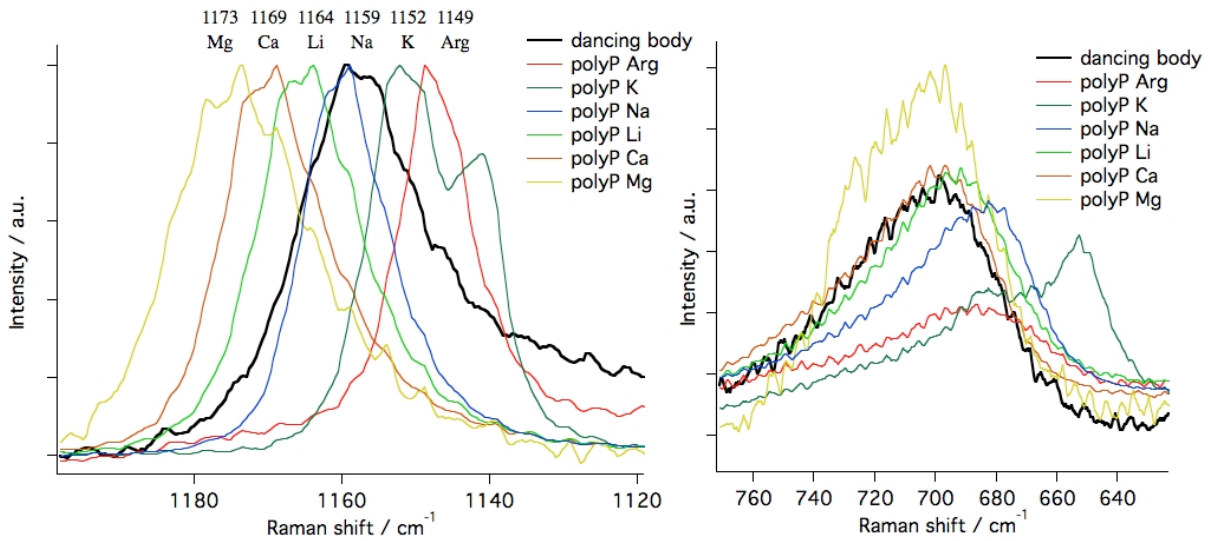


図 1 ポリリン酸 (Na, K, Li, Arg, Mg, Ca) とダンシングボディのラマンスペクトル

図 2 に、ダンシングボディが出現した出芽酵母単一生細胞の時空間分解ラマンスペクトルと顕微鏡写真を示す。積算時間は 50 秒である。顕微鏡写真によると、測定開始から 640 秒で液胞膜上部の内側膜壁に付着した胞が出現した。640 秒から 810 秒の間、胞は一部が液胞膜に付着した状態で活発に動いていた。810 秒から 900 秒の間に胞が液胞膜から分離し、ダンシングボディとなり、活発にブラウン運動を行った。900 秒から 1000 秒の間にダンシングボディはより大きくなり、その後、液胞が消失した。時空間分解ラマンスペクトルによると、0 秒から 640 秒では液胞内部には液胞特有のラマンスペクトルが得られ、720、810 秒において胞にタンパク質が多く含まれる事がわかった。900 秒から 1900 秒ではダンシングボディのラマンスペクトルが得られ、1900 秒から 1990 秒の間にダンシングボディが消失した。

以上の結果から、胞はポリリン酸代謝に関わる酵素を多く含んでいる事が推測された。時空間分解ラマン分光法により、ダンシングボディ出現消失過程におけるポリリン酸代謝に関する新たな知見が得られた。

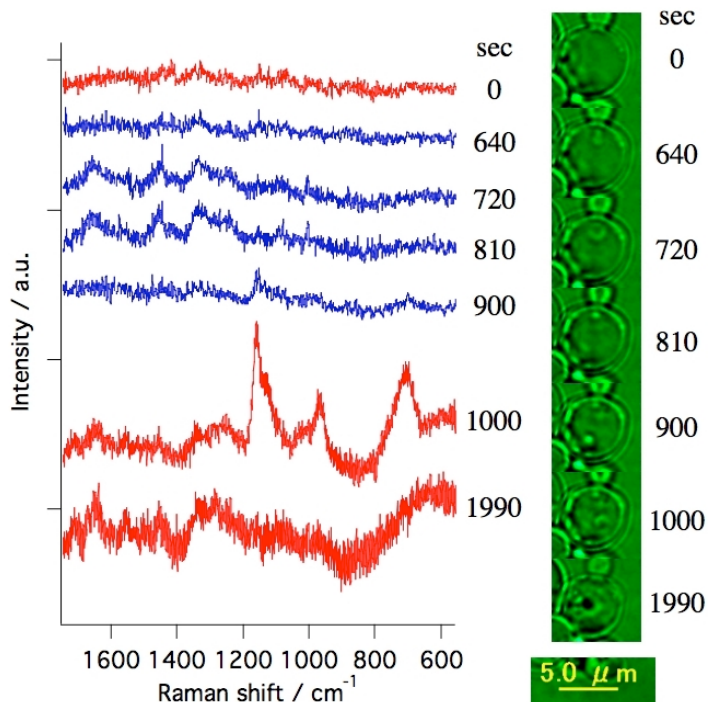


図 2 出芽酵母生細胞の時空間分解ラマンスペクトル