

論文内容の要旨

論文題目 **Structure changes and bioactivity of single living yeast cells studied by *in vivo* time- and space-resolved Raman spectroscopy**

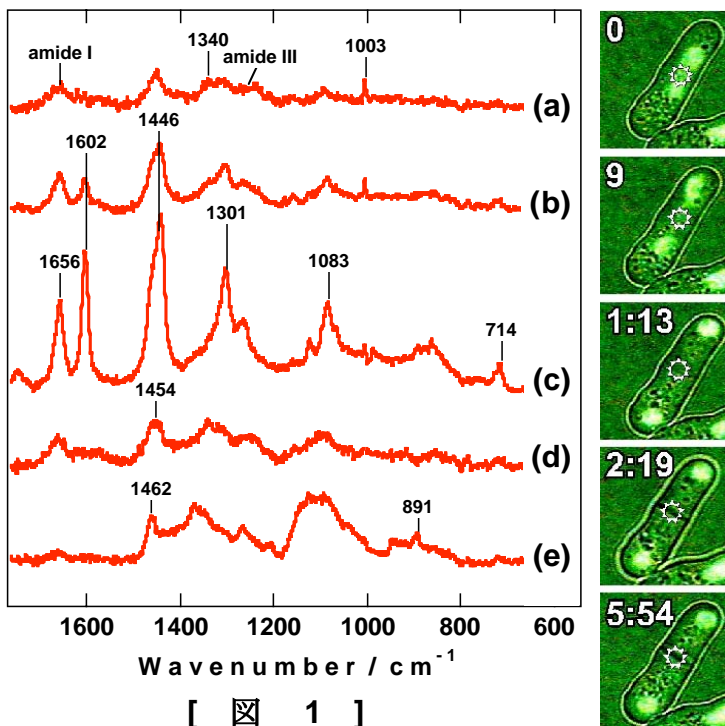
(*In vivo* 時空間分解ラマン分光による

生きた単一酵母細胞の構造変化と生物活性の研究)

氏 名 黄 郁珊

【序】 本研究は生きた単一細胞の機能、反応と構造に対応する物質の変化を実時間、実空間、*in vivo*、分子レベルで捉えることを目的としている。すなわち本研究は物理化学的な観点から、生細胞内のできごとを観察するので、物理化学と生物化学の境界領域に位置する研究である。実験手法としては時空間分解ラマン分光法を採用して、研究対象には、生物化学者に頻繁に利用され、遺伝学的な手法も確立されている分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) を選んだ。研究内容は以下の三つのテーマに分けられる。1.化学物質で標識することなく、生きた細胞の細胞分裂を時空間分解ラマンスペクトルで記録することによって、細胞周期による生細胞の物質変化を分子レベルで捉えることに成功した。2.生きた細胞のスペクトル中に、生命活性と強い相関を持ち、未知の分子種のものと思われる強いラマンバンドが観測された。このバンドの帰属を究明するため、生きた細胞の呼吸阻害剤に対する反応をラマンスペクトルで記録し、呼吸酵素の活性とこのラマンバンドの関連を明らかにした。3.このラマンバンドを与える分子種の細胞内の分布をラマンイメージング測定して、細胞活性の可視化を行った。

【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し、ラマンスペクトルを測定した。632.8 nm の励起光を用い、全長約 10 μm の分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)に対し、250 nm の空間分解能で細胞内のオルガネラの時間変化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、ミトコンドリアのラマンスペクトルの経時変化を測定した。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、



[図 1]

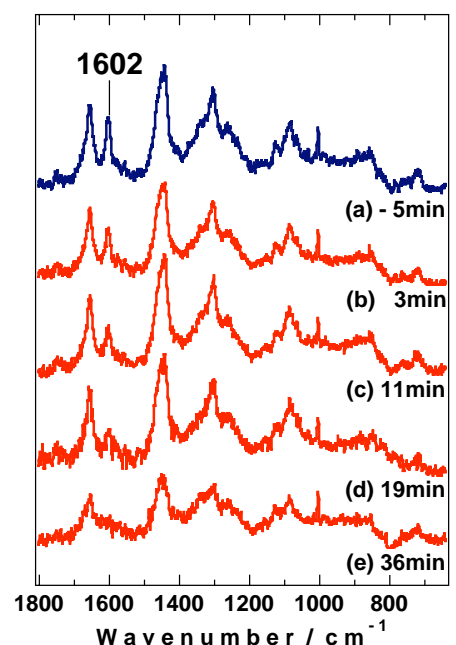
中央に集光され、ビームスポットの位置は図1の細胞写真中の☆で示される。スペクトルは実験開始の (a) 細胞核から、開始後9分 (b) の細胞質、1時間13分 (c) のミトコンドリア、2時間19分 (d) の新生隔壁、5時間54分 (e) の成熟した隔壁まで細胞分裂によるオルガネラの生成と移動に対応して変化した。スペクトル (a) の主なバンドはタンパク質に帰属することができる。すなわち $1655\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ 、 $1250\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ 領域はペプチド骨格によるアミド I、アミド III モードの振動； 1448 cm^{-1} 、 1340 cm^{-1} は CH_2 の変角振動； 1003 cm^{-1} は phe 残基のバンドである。スペクトル (b) と (c) に観測された 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、 1301 cm^{-1} は CH_2 のねじれ振動、 714 cm^{-1} はリン脂質の頭部グループ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リン脂質のバンドである。 $1000\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ の領域のバンドは脂質の炭化水素のコンフォメーション情報を含んでいる。この領域にある三本のバンドのうち、真ん中の 1083 cm^{-1} のバンドはゴーシュ形による信号であり、両側のトランス形のバンドより強く観測された。この結果はミトコンドリアの膜が流動性に富んでいることを示している。 1602 cm^{-1} のバンドの帰属は不明であるがこのバンドについて後に呼吸阻害の実験結果に基づいて議論する。スペクトル (d) と (e) はよく似ており、いずれも糖類のスペクトルである。しかし糖の多量体化を反映して両スペクトルに差異が見られた。それは新生隔壁の成熟に伴い、スペクトル (d) の 1454 cm^{-1} の還元型バンドがスペクトル (e) の 1462 cm^{-1} の非還元型のバンドへシフトしたことで、単糖類をつなぐグリコシド結合のバンド (891 cm^{-1}) がスペクトル (e) に現れたことである。

2. 生きた細胞の呼吸阻害剤に対する反応: 細胞内外の情報交換と情報伝達を解明するのに薬やストレスの細胞に対する効果が研究さ

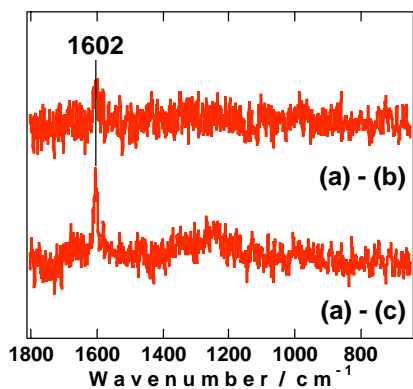
1 ステップ = 500 nm で移動させ 3 mW のレーザーでスキャンした。細胞のラマン信号を収集し、得られたシグナルの強度を色 (強→弱を赤→青) で表して二次元的なイメージを作成した。

【結果・考察】

1. 細胞分裂による細胞内構造変化: 細胞分裂は細胞の持つ機能の中、最も重要なものであり、細胞分裂についての理解は細胞の研究で非常に重要な課題である。本研究による生細胞の細胞分裂の時空間分解ラマン測定の結果から、ラマンスペクトルは細胞周期により顕著に変わることが分かった。その結果を図1に示す。この実験では、レーザーは細胞の



[図 2]

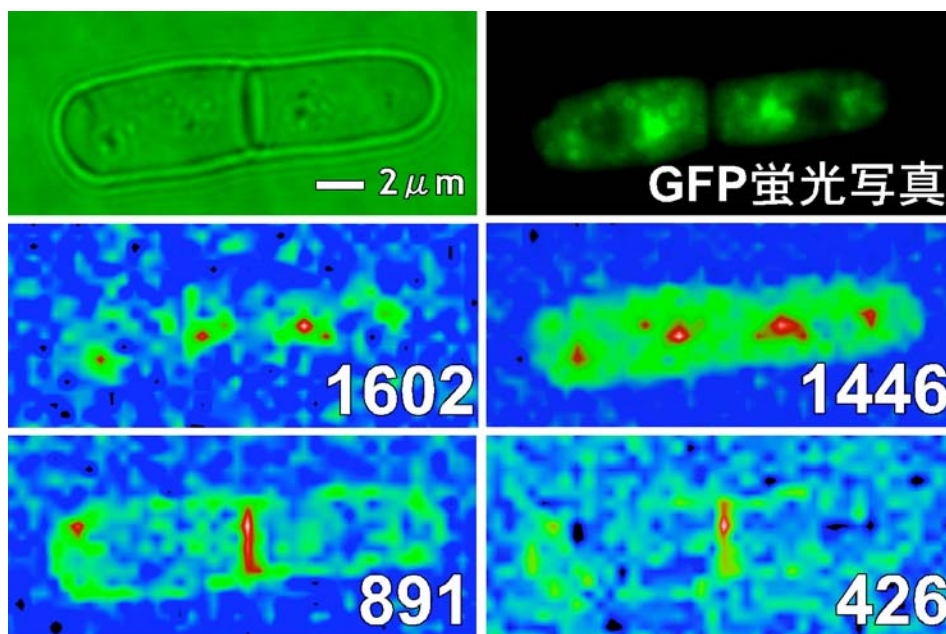


[図 3]

れてきた。しかし、そのメカニズムをどこまで解明できるのかは、細胞内で引き起こされた一連の生化学的応答をどれくらい早く検出できるのかに依存する。本実験では呼吸阻害剤を試料に投与して細胞の呼吸を阻害させ、その反応を記録した。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から、本実験の持つもう一つの意味は、細胞分裂実験で見た”細胞の生”と全く逆な”細胞の死”を観察することである。図 2 に示すのは投薬された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。レーザーはこの細胞のあるミトコンドリアに集光した。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 3、11、19、36 分後のスペクトル (b) - (e) からわかるように、 1602 cm^{-1} のラマンバンドの強度は激減して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い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の強度、位置及び形の変化は、呼吸活性の低下がミトコンドリアの膜の構造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 3) をこの分子種のスペクトルと考えてよい。図 3 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 $\text{Fe}\cdots\text{O}_2\cdots\text{Cu}$ と $\text{Fe}=\text{O}_2$ などの可能性が考えられる。図 2 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 1602 cm^{-1} のバンドを「生命のラマン分光指標」と名付けた。

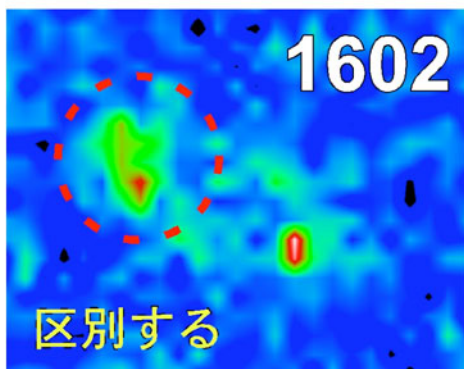
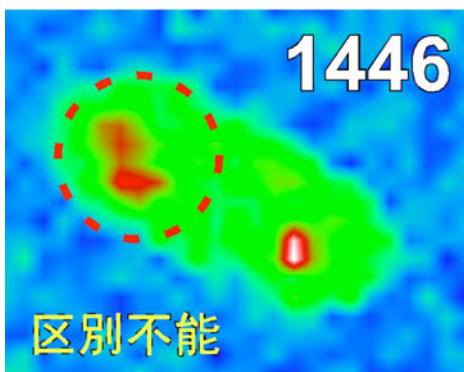
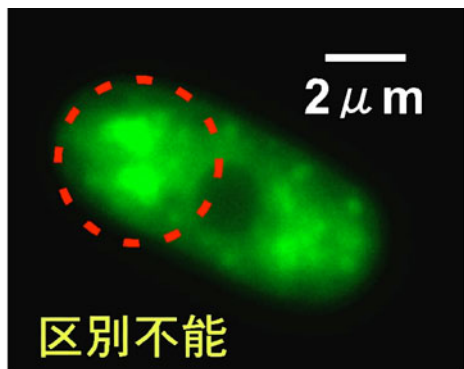
3. 細胞の活性の可視化：細胞の生体機能を可視化する従来の方法では、外来のプローブを細胞に導入する必要がある。GFP によるバイオイメージング技術はその一例である。本実験は生きた細胞のラマン信号を画像化することにより、多数の分子の分布を一遍に解析して(20 個のバンドに対応する分子の分布を 10

分以内に同時に解析できるが、ここにその中の 6 つの結果を示す)、より効率よくかつ直接に細胞の生体機能を可視化した。ですから 1602 cm^{-1} のバンド、脂質のバンド(1446 cm^{-1} , 1301 cm^{-1})とタンパク質のバンド(1003 cm^{-1})、糖のバンド(891 cm^{-1} , 426 cm^{-1})のラマンイメージを測定することにより、細胞内の 1602 cm^{-1} のラマンバンドを与える分子種の分布、脂質の分布、タンパク質の分布と糖の分布に対応する図 (図 4) が得ら



[図 4]

れる。ミトコンドリアに局在する GFP 融合タンパク質の局在と、 1602 cm^{-1} のラマンバンドの局在とを比較した結果、2つのパターンは一致した。よって、この 1602 cm^{-1} のバンドを与える分子種はミトコンドリアに局在することが証明された。C-H の振動による脂質分布をマッピングした結果は、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くてラマンバンドがより強く観測されから、図中の点在する赤い部分に対応する。蛋白質は細胞全体に均一に分布しているように見える、糖類は細胞壁より隔壁に集中しているように見える。



【 図 5 】

この 1602 cm^{-1} のラマンバンドを与える分子種のラマンイメージングを利用してミトコンドリアの活性度の差を区別することもできる。ここに一つの例 (図 5) を示す。図 5 に示すのは酵母の (a) ミトコンドリアの GFP 蛍光写真と (b) 1446 cm^{-1} (c) 1602 cm^{-1} 両ラマンバンドのラマンイメージングである。赤い円で囲まれたのはある二つのミトコンドリアのグループである。GFP の蛍光イメージから見ると、この二つのミトコンドリアのグループはサイズも GFP の蛍光強度も非常によく似ていて、あまり区別できない。 1446 cm^{-1} の脂質のバンドのラマンイメージもこの二つのグループにはほぼ同濃度の脂質が存在していることを示している。一方 1602 cm^{-1} のバンドのラマンイメージでは、下のグループは上のグループより色が赤く観測される。これは下のグループの中から、より強い 1602 cm^{-1} のラマンバンドが検出され、つまり下のミトコンドリアのグループの方が上のミトコンドリアのグループより活性が高いことを示していて、両グループの活性が異なることを示唆している。このように 1602 cm^{-1} のラマンバンドのイメージを測定すれば、GFP 標識のようにミトコンドリアの分布を可視化するだけでなく、さらにミトコンドリアの活性を可視化することもできる。そもそもミトコンドリアは外観が同じように見えても、実際それぞれの活性度が異なる。ラマンイメージ測定はその違いを見分けることができる。

【まとめ】本研究は物理化学の手法を生細胞に適用することによって、新しい領域を開拓することを試みた。細胞分裂の時空間分解ラマンスペクトルは細胞周期に伴う生体分子の構造や分布の変化を実時間、実空間的に記録した。一方、細胞の死の初期過程を記録

する実験では、ミトコンドリアの時間変化ラマンスペクトルを測定した。「生命のラマン分光指標」である 1602 cm^{-1} ラマンバンドの強度は呼吸阻害剤の投与に素早く応答して激減した。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。ラマンイメージングによりこのラマンバンドを与える分子種の分布を可視化することに成功した。これは生きた酵母細胞内のミトコンドリアの活性度をマッピングしていることを意味する。本研究は細胞の機能、反応と構造を解明して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。