

論文内容の要旨

論文題目

Physicochemical study on single living budding yeast cells by *in vivo* time- and space-resolved Raman spectroscopy

(時空間分解ラマン分光法による単一出芽酵母生細胞の
物理化学的研究)

氏名 内藤 康彰

【序】

生細胞の生命活動を分子レベルで解明する事は、科学の最も重要な課題の一つである。この目的を達成するためには、*in vivo* 条件下での探索的研究が不可欠である。従来の細胞破壊を伴う生化学の手法では、時間、空間情報が平均化されるため、このような研究は不可能である。近年、*in vivo* 細胞観察の主流として用いられている蛍光顕微鏡観察は、標的分子の標識を要求するために、標識可能な既知の分子種からの情報しか得られず、探索的研究には適さない。本研究で用いた時空間分解ラマン分光法は、以下の点から生細胞の *in vivo* 研究に適している。1) 非破壊、非侵襲手法であり、真の *in vivo* 分子情報を得る事ができる。2) 染色を要求しない。そのため、未知の分子種の情報を直接得る事ができ、探索的研究が可能である。3) 分光して得たラマンスペクトルを解析する事により、分子種の詳細な構造情報を得る事ができ、構造変化を実時間で追跡する事が出来る。一方、ラマン散乱は蛍光に比べて強度が弱いために、その検出が困難であるという欠点があるが、近年の技術革新により顕微鏡下で単一生細胞のラマンスペクトルを観測することが可能になった。筆者は、共焦点顕微鏡を用いた時空間分解ラマン分光法により、単一出芽酵母生細胞のラマンスペクトルを解析する物理化学の観点からの生細胞研究を行った。

【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時間と空間を分解して測定した。試料は、野生の出芽酵母細胞「MT8-1」（京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻、植田充美先生提供）を、培地はYPD培地を用いた。酵母細胞を水もしくは培地に懸濁させた状態で、カバーガラスとスライドガラスに挟みワセリン

で封じるか、ガラスボトムディッシュに入れた状態で測定した。細胞の固定剤に、ポリ-L-リジン、または、con Aを用いた。モデル化合物として用いたポリリン酸塩（Na塩、K塩、Li塩、Arg塩、Mg塩、Ca塩）は農業・食品産業総合技術研究機構畜産草地研究所、大友量博士に提供していただいた。図1に本研究で用いた時空間分解ラマン分光装置を示す。図1（上）は632.8 nm励起顕微ラマン分光装置、図1（下）は785 nm励起顕微ラマン分光装置である。632.8 nm励起顕微ラマン分光装置は、東京インストルメンツ社市販の装置を基本にし、筆者が中心となって光学系を組みかえ、改良した。785 nm励起顕微ラマン分光装置は、本研究室で開発されたものである。生細胞とポリリン酸塩水溶液を除くモデル化合物の測定には励起光にHe-Neレーザーの632.8 nmの発振線を、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、面内で250 nmの空間分解能を、また、100 μm のピンホールを用いた時に面外に2 μm の空間分解能を持つ。試料部でのレーザーパワーは約4 mWである。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。

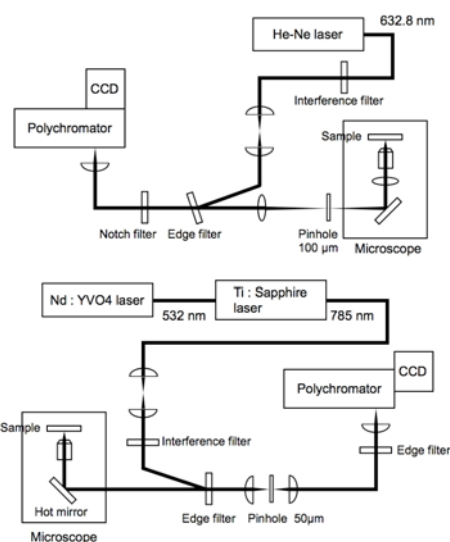


図1 時空間分解ラマン分光装置図

(上) 632.8 nm 励起 (下) 785 nm 励起

【ダンシングボディと細胞自然死】

出芽酵母液胞内には、ダンシングボディと呼ばれる粒子が時折出現することが知られている。出現後ダンシングボディは、液胞内を活発に運動する。その存在は、生化学研究者に広く知られていたが、分離が不可能であるため、研究はほとんどされていなかった。染色による研究からポリリン酸を含む可能性が示唆されていたが、詳細な組成や、出現、消失機構については未知であった。筆者は、ダンシングボディがレーザーにトラップされる事、ダンシングボディの主成分がポリリン酸塩固体である事、ダンシングボディ出現に伴う避けられない細胞死が起こる事を初めて明らかにした。図2に、出芽酵母細胞死過程を示す。出芽酵母の光学顕微鏡観察を行っている時、液胞内にダンシングボディが出現し、後に液胞が消失し細胞が死んでいく様子が観測される。細胞へのレーザー照射の有無、細胞を水または液体培地に懸濁する、細胞位置固定の有無に関わらず、観測した 642 個全ての細胞でこの細胞死過程が起きた。

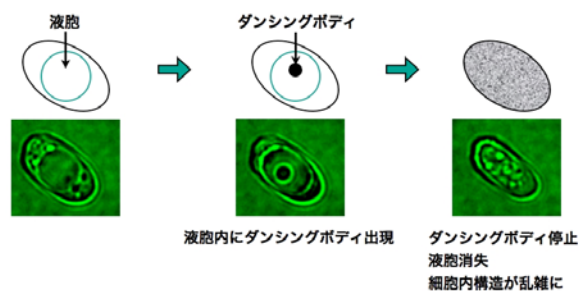


図2 出芽酵母細胞死過程の模式図

【液胞の空間分解ラマンスペクトル】

図3（上）に、液胞の空間分解ラマンスペクトルとモデル化合物のラマンスペクトルを示す。モデル化合物として、ポリリン酸ナトリウム、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 Na_3PO_4 、 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、 $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ （全て水溶液）を選んだ。液胞とモデル化合物のラマンスペクトルの比較から、液胞の 1150 cm^{-1} バンドはポリリン酸の PO_2^- 対称伸縮振動、 690 cm^{-1} バンドはポリリン酸の P-O-P 対称伸縮振動に帰属される。また、 1080 、 880 、 520 cm^{-1} バンドはそれぞれ H_2PO_4^- の P-(OH)₂ 対称伸縮振動、 PO_2^- 対称伸縮振動、変角振動に帰属され、 990 、 540 cm^{-1}

バンドは HPO_4^{2-} の PO_3 対称伸縮振動、 PO_3 変角振動に帰属される。ニリン酸、三リン酸のバンドは検出されていない。図 3 (下) に鎖長の異なるポリリン酸ナトリウム水溶液と液胞のラマンスペクトルの比較を示す。用いたポリリン酸ナトリウム水溶液は、3 種類。鎖長範囲 700 以上、200 から 230 と 29 から 45 である。液胞の PO_2 振動バンドはモデル化合物のラマンバンドを全て包括しているため、液胞内には鎖長範囲が数 10 から 1000 程度のポリリン酸ナトリウム水溶液が含まれている事が明らかになった。

【ダンシングボディの空間分解ラマンスペクトル】

図 4 (上) に、ダンシングボディの空間分解ラマンスペクトルとモデル化合物のラマンスペクトルを示す。モデル化合物には、ポリリン酸ナトリウム結晶と水溶液(鎖長範囲は 700 以上)、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 Na_3PO_4 、 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、 $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (全て水溶液) を用いた。モデル化合物との比較からダンシングボディの主成分は、ポリリン酸塩固体である事がわかった。オルトリン酸、ニリン酸、三リン酸は検出されなかった。ダンシングボディの主な強い 1160 と 700 バンドは、 PO_2 対称伸縮振動と P-O-P 対称伸縮振動に帰属される。図 4 (下) に PO_2 振動バンドの詳細な比較を示す。ダンシングボディは、ポリリン酸ナトリウム水溶液より固体とよく似ている事がわかる。この結果から、ダンシングボディは結晶に近いポリリン酸塩が主成分である事がわかった。生細胞の中にこのような 1 mm もの大きさの結晶様固体が存在する事は極めて驚くべき事である。

【時間分解ラマンイメージングによる出芽酵母細胞死過程の追跡】

図 5 に出芽酵母細胞の光学顕微鏡写真と時間分解ラマンイメージングを示す。図 5(a)は時間分解ラマンイメージ、図 5(b)はそれに対応する光学顕微鏡写真である。光学顕微鏡写真から 5 時間 50 分から 6 時間の間に発芽酵母液胞内にダンシングボディが出現し、8 時間 41 分から 9 時間 31 分の間に液胞が消失し、19 時間 37 分には細胞内構造が失われ無秩序になっている事がわかる。このような無秩序な構造では細胞は生きていく事ができない。この過程を、 1602cm^{-1} 、 1445cm^{-1} 、 1160cm^{-1} 、 1002cm^{-1} におけるラマンイメージング測定により分子レベルで追跡した。 1602cm^{-1} のバンドはミトコンドリア代謝活性を鋭敏に反映している “生命のラマン分光指

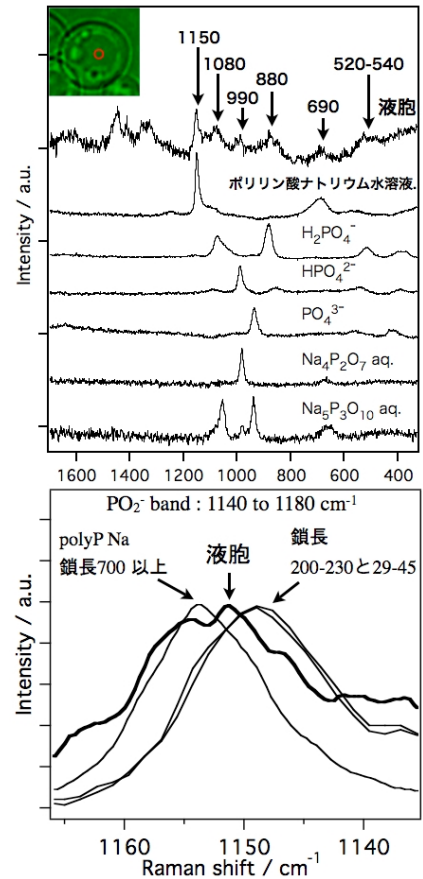


図 3 液胞の空間分解ラマンスペクトル

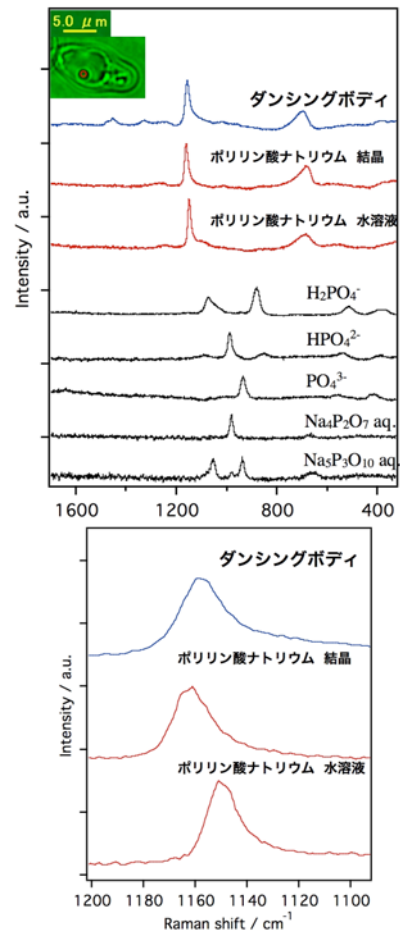


図 4 ダンシングボディの空間分解ラマンスペクトル

標”^[1]、 1445cm^{-1} のバンドは主にリン脂質、 1160cm^{-1} のバンドはポリリン酸、そして 1002cm^{-1} のバンドはタンパク質に帰属される。“生命のラマン分光指標”のイメージから、0分、5時間50分後には、ミトコンドリアは正常で活発に代謝を行っていることがわかる。また、リン脂質とタンパク質は液胞外に局在していることがわかる。6時間後、ダンシングボディが出現し、ミトコンドリアの代謝活性は著しく低下していることがわかる。しかしながら、ミトコンドリアの分布に相当する 1445cm^{-1} のラマンイメージに目立った変化は無い。ポリリン酸(1160cm^{-1})の信号は液胞内で広く分布しているように見えるが、これはダンシングボディがレーザートラップされたためである。8時間41分後にはダンシングボディが運動を停止し、一カ所に局在している。この段階ではミトコンドリアの代謝活性は完全に停止しており、細胞死とみなすことができるが、ミトコンドリアとタンパク質の分布に依然変化は無い。9時間31分後には液胞が消失し、ダンシングボディの残留物が中央に局在している。19時間37分後には、細胞内のリン脂質、ポリリン酸、タンパク質は非局在し乱雑に分布しており、細胞内構造は完全に失われている。このような乱雑な構造では細胞は生命活動を行うことができないと考えられる。生化学的な細胞死の判断は、このさらに後の細胞壁が崩れた段階での染色によって行われる。しかし、時空間分解ラマンイメージングを用いる事により、ずっと早い段階で細胞死を判定することができる。このように、時間分解ラマンイメージングにより細胞死過程が可視化できる事が明らかになった。

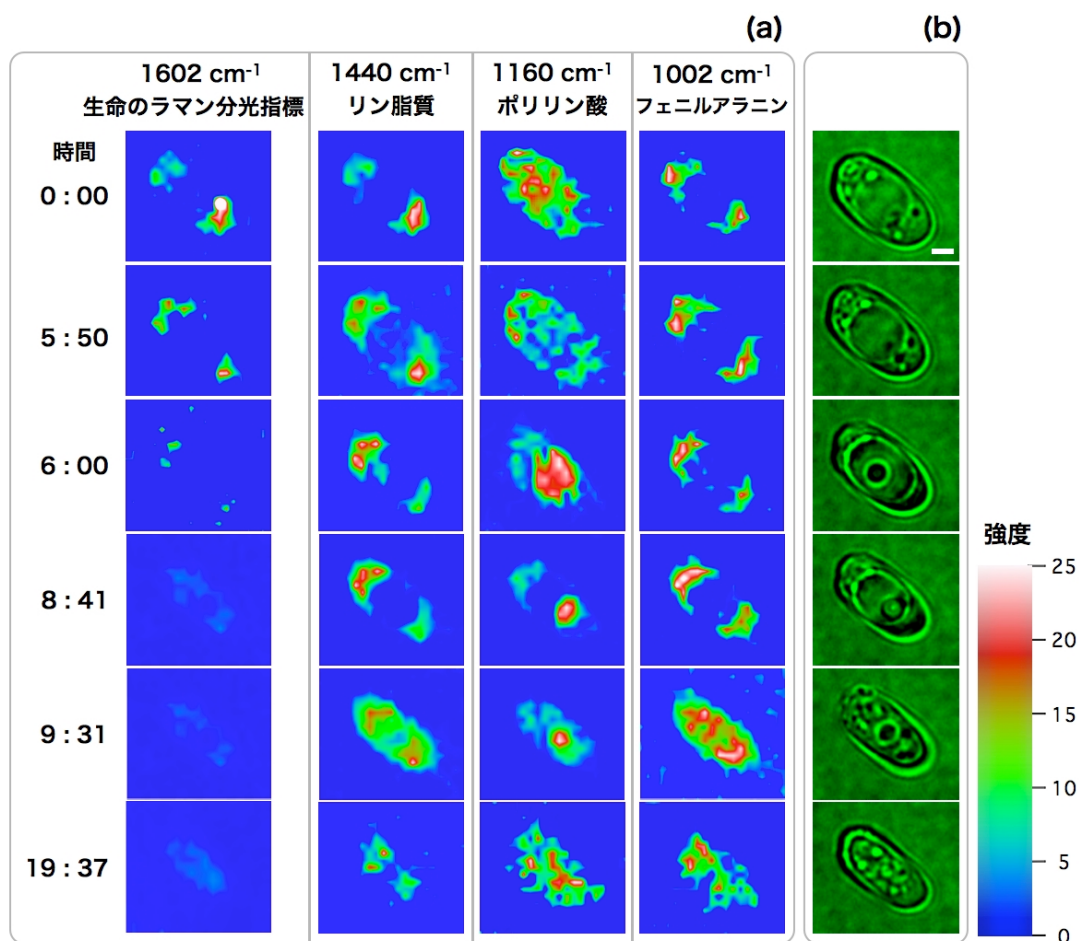


図5 出芽酵母細胞の光学顕微鏡写真と時間分解ラマンイメージング

[1] Yu-San Huang, Takeshi Karashima, Masayuki Yamamoto and Hiro-o Hamaguchi, *Biochemistry* 44, 10009(2005)