

平成 21 年 6 月 17 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19850022

研究課題名（和文） 時空間分解ラマン分光法による出芽酵母生細胞の研究

研究課題名（英文） Physicochemical study on single living budding yeast cells by *in vivo* time- and space-resolved Raman spectroscopy

研究代表者

内藤 康彰（NAITO YASUAKI）

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：40453500

研究成果の概要：本研究では出芽酵母細胞の液胞とミトコンドリア代謝活性の相関についての新たな知見を得た。ある培養条件下で出芽酵母生細胞の液胞中にダンシングボディと呼ばれるブラウン運動する顆粒が出現、消失する事が分かった。ダンシングボディとミトコンドリア代謝活性の相関を調べるために、ダンシングボディ出現・消失時におけるミトコンドリアの時空間分解ラマン測定を行った。その結果、ダンシングボディとミトコンドリア代謝活性に強い相関がある事が明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,290,000	0	1,290,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,640,000	405,000	3,045,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：振動分光、バイオイメージング、生物物理、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

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を行う事ができないため、様々な顕微鏡観察が用いられてきた。近年、分子レベルの情報を得る事ができる手法として蛍光顕微鏡観察が主に行われている。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。つまり、生細胞内の各オルガネラは実際に分子レベルでどのような組成であるか、また、その構造変化や動的挙動はどうなっているかの情報を得ることがほとんどできないという問題

点があった。その解決方策となったものが、非破壊で分子レベルでの情報を得ることができる分光手法と顕微鏡を組み合わせた、顕微分光法であった。様々な顕微分光があるが、その中で 1990 年ごろから実用化された共焦点顕微ラマン分光は、以下の利点から生細胞の研究に適している。その利点として、前処理が簡易である事、分子の振動情報が得られる事、水の影響をほとんど受けない事、非破壊測定である事、共焦点であるために面内、面外方向に高い空間分解能を持つ事があげられる。そのため、顕微ラマン分光は、生細胞の測定に対してとても有用な非破壊ツールとして扱われてきた。共焦点顕微ラマン

分光法は生細胞の *in vivo* 測定に適しており、現在までに、原核細胞と真核細胞（出芽酵母細胞、分裂酵母細胞、ヒト細胞）における顕微ラマン分光研究がされている。構造化学的解釈を含む結果は多いが、生化学的に新たな知見を得た結果は少ない。その理由として、大きく三つの理由があげられる。一つ目は、測定により得られる生細胞のラマンスペクトルは前例がほとんど無いためにその解釈が難しい事である。次に、生体試料の準備と同時に、装置光学系の調整と改良を行う事が必要である事があげられる。最後に、物理化学と生化学の両方の観点から見た戦略を立てる事の困難さである。顕微ラマン分光法はまだ生化学の分野に浸透していないことから、物理化学研究者の装置開発研究が非常に多い。生細胞の顕微ラマン分光研究は、国外、国内を合わせても 10 から 20 報程度しか報告されていないが、ほとんどが装置開発研究である。国内においては、まだほとんど行われていない開拓的研究である。そのため、現在ではどのような生細胞を選択し、どの生物現象を追跡するかなどの生化学的観点における研究戦略がより必要である。

2. 研究の目的

本研究の大きな目的は、生命活動を分子レベルで解明する事である。本研究は、時空間分解ラマン分光による出芽酵母生細胞の研究である。出芽酵母生細胞の液胞は、加水分解酵素を多く含むオルガネラである。近年液胞の研究が進められ、液胞には様々な機能がある事がわかってきた。しかし、液胞の組成、機能の分子レベルでの解明は全くされていない。また、出芽酵母細胞にはダンシングボディと呼ばれる顆粒が時折出現する事が広く認識されている。醸造の分野においては、ダンシングボディが出現した酵母を用いると製酒に深みが出る事が経験上知られており、実際に製酒産業にてダンシングボディ出現した出芽酵母が用いられている。しかし、ダンシングボディは単離ができないために組成と機能が全くわかっておらず、研究手法がほとんど無い事から分子レベルでの研究は全くされていないのが現状である。申請者は、生細胞内での液胞、及びダンシングボディの組成を初めて解明し、その出現消失過程と、それに伴う細胞死課程を初めて追跡する事を目的とした。ダンシングボディの出現、消失過程を明らかにし、ミトコンドリアの代謝活性を分子レベルで解明する事を具体的な研究目的とした。学際的研究を目指し、単一分野だけでは達成が難しい分野横断的研究成果を得、有機的複合分野を開拓し、学問領域を越えた幅広く多角的視点で物を見る事により、新たな生化学的手法の確立と、新たな観点の分子レベルでの生細胞研究結果を得る事が目的であ

った。

3. 研究の方法

本研究では、二年間でダンシングボディ出現・消失過程の解明とダンシングボディ出現後の復元過程の解明、また、これら過程におけるミトコンドリアの代謝活性の変化追跡を主に行う予定である。この主な研究に付随して、ダンシングボディ中のポリリン酸塩結晶と外部から投与した金属イオンの相互関係を時空間分解ラマン測定による分子レベル追跡研究を行っていく。オートファジーと金属イオン投与の相関についても分子レベルで追跡していく予定である。

(1) これまでダンシングボディ出現測定をスライドガラスとカバーガラスに挟む事により行ってきたが、ガラスボトムディッシュで観測しダンシングボディ出現した後に新鮮な培地を加えるとダンシングボディが消失し元の酵母細胞に復元する事がわかった。ダンシングボディとミトコンドリアの代謝活性の相関を調べるために、ダンシングボディ出現後の細胞に新鮮な培地を加え時空間分解ラマン測定を行う。生体内の構造変化を速く時間分解観察するために、ラマン顕微分光装置と酵母株の改良を行う。ラマン顕微分光装置の改良は申請者が行い、励起光の顕微鏡への導入や最適な光学系を模索しながら行う。酵母株の改良は、ダンシングボディ出現と醸造技術を経験的に行ってきたサントリー株式会社と共同研究し、株と培地を提供してもらう事により工夫する。サントリー株式会社は通常（2倍体）より大きい4倍体を用いて麦汁培地で醸造を行っている。4倍体は代謝活性が強くラマン測定に適している事を申請者が発見している。ダンシングボディが出現しやすい麦汁培地とラマン測定の容易な4倍体酵母実用株を提供してもらう事により、より効果的に研究を進める事が可能であると期待される。

(2) 出芽酵母は金属イオンが外部から投与された時に、液胞に金属イオンを隔離するという解毒作用がある事が知られているが、帰属イオンがどのように液胞内に隔離されるのかは未知の部分が多い。ポリリン酸にキレートされているのではないかと推測がされているので、酵母細胞に様々な金属イオンを投与し、液胞内の構造変化を追跡する。金属イオン投与における研究では、共同研究者である東京都臨床医学研究所客員研究員・東京大学名誉教授、東江昭夫先生と頻りに議論を行いながら進めていく。酵母細胞の基本的な培養は申請者が行うが、酵母細胞長期保管はこれら共同研究者により行われ、随時提供していただく事により、効率よく研究を行っていく。

4. 研究成果

(1) ダンシングボディと、ミトコンドリア代謝活性の強い相関を明らかにする事ができた。本研究において、ある培養条件下で出芽酵母生細胞の液胞中にダンシングボディと呼ばれるブラウン運動する顆粒が出現、消失する事がわかった。そして、ガラスボトムディッシュで観測しダンシングボディ出現した後に新鮮な培地を加えるとダンシングボディが消失し元の酵母細胞に復元する事がわかった。当初の計画通り、ダンシングボディとミトコンドリアの代謝活性の相関を調べるために、ダンシングボディ出現後の細胞に新鮮な培地を加え時空間分解ラマン測定を行った。そこから生体内のミトコンドリア代謝活性変化を観測することに成功した。時空間分解ラマン分光測定により、ダンシングボディ出現・消失に伴い、ミトコンドリア代謝活性が消失・復元した。これにより、ダンシングボディが出現すると、ミトコンドリア代謝活性が失われるが、ある分岐点より手前でダンシングボディが消失すると、ミトコンドリア代謝活性は復活する事が明らかになった。図1にこの結果を示す。ミトコンドリア代謝活性を強く反映している 1602 cm^{-1} バンド（生命のラマン分光指標）がダンシングボディ出現後には弱くなり、ダンシングボディ消失後にまた強くなっていく様子が分かる。

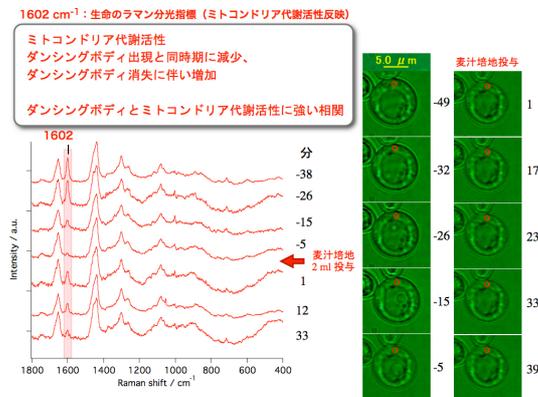


図 1. ダンシングボディ出現・消失におけるミトコンドリア代謝活性の変化

この研究成果を、論文1報発表、学会発表2回発表、図書1冊を共著で執筆し、公表した。本結果は、出芽酵母生細胞のダンシングボディとミトコンドリア代謝活性を結びつけた初めての結果であり、生化学の分野において非常に意味のある結果である。また、ラマン顕微分光法という物理化学の分野の手法が、生化学において意味のある現象を明らかにした数少ない例あり、物理化学の分野においても非常に意義のある結果となった。2007年9月25日に本研究結果の一部を中国の厦門で行われた第35回 Colloquium

Spectroscopicum Internationale においてポスター発表した。物理化学と生化学の橋渡しとしての分野横断的研究を国際的に広める良い機会となった。また、本手法を物理化学者だけでなく、生化学者にも用いてもらうため、2007年に羊土社から発行された「生命科学のための機器分析実験ハンドブック 実験医学別冊」の74-79頁の第2章5節「ラマン顕微分光法 ～生細胞を分子レベルで観る～」を共著で執筆した。総説「日本化学会 生体機能関連化学部会 ニュースレター」を共著で発表した。

(2) 出芽酵母細胞に、金属イオンを加えると液胞に金属イオンを隔離する事が知られている。その際に、液胞内に金属イオンとポリリン酸が結合しているのではないかと推測されている。本研究では、出芽酵母細胞に金属イオンを加える事により、金属イオンと結合したポリリン酸のラマンバンドがどのように変化するか測定した。結果としては、ポリリン酸のラマンバンドは金属イオン投与前後で変化しなかった。しかし、金属イオン投与時において、細胞内ミトコンドリア脂質膜の *cis-trans* 異性化反応の誘起が観測された。ミトコンドリア脂質膜の *cis-trans* 異性化反応が実時間で観測されたのは初めてであり、生化学的に非常に意味のある結果である。また、過酸化水素水溶液を細胞に投与し、酸化ストレスにより細胞内でどのように構造変化が起きるのかを時空間分解ラマン追跡により行った。その結果、酸化ストレス投与時においても、細胞内ミトコンドリア脂質膜の *cis-trans* 異性化反応が誘起される事が明らかになった。以上の結果は、物理化学と生化学の両方の視点からの学際的研究により達成されたものである。これらの結果は、2008年9月26日に福岡で行われた分子科学討論会2008と、2008年11月26日にニュージーランドのクイーンズタウンで行われた第二回バイオイメージング学会で発表された。以下に、酸化ストレスによる細胞内ミトコンドリア脂質膜の *cis-trans* 異性化反応の時空間分解ラマンスペクトル結果を示す。時間は過酸化水素水溶液を酵母に加えてからの時間である。 *cis* 構造を示す、 1655 cm^{-1} バンドと 1266 cm^{-1} バンドが減少し、 *trans* 構造を示す、 1666 cm^{-1} バンドと 1301 cm^{-1} バンドが増加している。この結果から、酸化ストレスにより、ミトコンドリア脂質膜の *cis-trans* 異性化反応が起きていることが分かる。

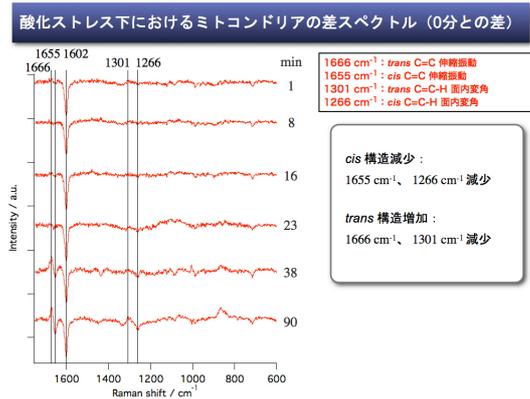


図 2. 過酸化水素水溶液投与時におけるミトコンドリア脂質膜の変化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. 小野木智加朗、内藤康彰、浜口宏夫、*In vivo* 時空間分解ラマン分光による単一生細胞生命活性計測: 「生命ラマン分光指標」と細胞の生の死、*Bioindustry*, 25(2)、46-54 頁、2008、査読無
2. 小野木智加朗、内藤康彰、浜口宏夫、時空間分解ラマン分光法による酵母単一成細胞の分子科学的解析～「生命のラマン分光指標」見た細胞の生と死～、日本化学会生体機能関連化学部会 ニュースレター、22(8)、2-5 頁、2007、査読無
3. Hideaki Kano, Yu-San Huang, Yasuaki Naito, and Hiro-o Hamaguchi、Linear and Non-Linear Raman Microspectroscopy and Imaging of Single Living Cells; Visualization of Life and Death at the Cellular Level、*HANDAI NANOPHOTONICS*, 3、43-56 頁、2007、査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. Yasuaki Naito、SPONTANEOUS CELL DEATH OF A SINGLE BUDDING YEAST CELL TRACED BY IN VIVO TIME-RESOLVED RAMAN IMAGING、第二回国際バイオイメージング学会、2008年11月26日、ニュージーランド
2. 内藤康彰、時空間分解ラマン分光による出芽酵母生細胞ミトコンドリア膜のストレス誘起 *cis-trans* 異性化反応の実時間解析、分子科学総合討論会2008、2008年9月26日、福岡
3. Yasuaki Naito、Dynamic behaviour of the “Raman spectroscopic signature of life” in a starving budding yeast cell、International

conference on Raman spectroscopy、2008年8月19日、イギリス

4. 内藤康彰、時空間分解ラマン分光による出芽酵母生細胞中のダンシングボディの生成消滅とミトコンドリア代謝活性、分子科学総合討論会2007、2007年9月18日、宮城
5. Yasuaki Naito、SPONTANEOUS CELL DEATH AND DYNAMIC BEHAVIOR OF A VACUOLE OF A SINGLE BUDDING YEAST CELL TRACED BY *IN VIVO* TIME- AND SPACE-RESOLVED RAMAN SPECTROSCOPY、Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXV、2007年9月25日、中国

[図書] (計 1 件)

1. 西村善文、羊土社、生命科学のための機器分析実験ハンドブック 実験医学別冊、2007、74-79 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者
内藤 康彰 (NAITO YASUAKI)
学習院大学・理学部・助教
研究者番号: 40453500

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者