Notice on Plankton Seminar
#16012
09:30-11:30, 15 Sep. (Thu.) 2016 at room #N204

****

Huang, C., M.Ando, H.Hamaguchi and S.Shigeto (2012)
Disentangling Dynamic Changes of Multiple Cellular Components during the Yeast Cell by *in vivo* Multivariate Raman Imaging
Anal Chem **84**: 5661-5668

レーザーラマン顕微鏡と多変量解析を組み合わせて作成したラマン分光イメージで,
酵母の細胞周期における生体分子のダイナミックな変遷を解明する

細胞分裂する際の生体分子の挙動に関する研究は, 分裂酵母や出芽酵母をモデル生物としてこれまで 40 年以上行われてきた。これまで様々な顕微分光測定法が発展してきたが, 中でもラマン分光法は試料に対して非破壊的・低侵襲的で, 染色を必要としないという利点がある。

筆者らは近年, 分裂酵母の 1 種である *Schizosaccharomyces pombe* の細胞分裂過程のラマン分光イメージを作成することに成功した。この際, 単変量解析を用いてラマン分光イメージを作成し, 細胞内における脂質とタンパク質の分布及び濃度が細胞周期の進行とともに変化することを明らかにした。単変量解析は比較的容易にラマン分光イメージを作成することができるというメリットがある一方, ラマンシフトにおいて同じような位置にピークを有する複数の生体分子を区別できないというデメリットがある。例えば, タンパク質のアミド I バンドと不飽和脂質の *cis*-C=C 伸縮振動のピークはともに 1655 cm^{-1} 付近にピークを有しており, 単変量解析では 1655 cm^{-1} 付近のピークをもとに両者の区別は不可能である。多変量解析としては主成分分析 (PCA), クラスター解析, 多変量カーブ分解 (MCR) などの手法が知られており, ピークが重複する複数の生体分子を含む試料のスペクトルから, より多くの化学的な情報を引き出すことが可能である。ラマン分光法への多変量解析の応用は近年様々に行われているが, 単細胞生物の細胞周期のダイナミックな変遷に着目した研究はまだ十分でない。そこで本研究では, 分裂過程の *S. pombe* のラマンスペクトルを経時的に計測し, 多変量解析の 1 つである MCR を用いてラマン分光イメージを作成することを試みた。

S. pombe は PMLU 培地を用い温度 30 ℃で 22 時間培養した。ラマンスペクトルの測定においては励起光は波長 632.8 nm の He-Ne レーザーを用い, 出力は 1 mW とした。測定は *S. pombe* を培地に接種してから 1, 2, 4, 6, 6.5, 10, 14, 18, 22 時間後に行った。また, 測定は細胞上を 0.5 μm の間隔で XY 方向に行い, 細胞全体を網羅するように測定を行った。露光時間は 1 ヶ所につき 1.5 秒とし, 1 つの細胞全体の測定にはおよそ 15 分から 20 分ほど要した。測定して得られたデータは, 多変量解析を容易にするため, まず X 軸方向の測定ポイント, Y 軸方向の測定ポイント, 時間という 3 次元のデータを 1 次元のデータに一元化する前処理を行い, 最終的に「スペクトル」と「X 軸, Y 軸, 時間」の 2 軸からなる 790×6885 の二次元データ (A) を作成した。データ解析では単変量解析と MCR を行った。単変量解析では着目したピークの強度の計算を行い, ラマン分光イメージの作成を行った。MCR とは行列 A が与えられたとき行列 W, H を「A≈WH」と「W, H の全要素が非負」という制約を満たすように求める手法である。行列 A を m×n 行列とした時, 行列 W は m×k 行列, 行列 H は k×n 行列であり, 行列 W は個々の生体分子のスペクトル, 行列 H はそれらの時空間分布を表現していると解釈することができる。k は成分数であり, 解析を行う者が適切な値に設定する必要がある。本研究では k=6, 初期化手法として特異値分解 (SVD) を採用して W と H の初期値を生成し, その後 W と H を段階的に改善するという手法をとった。また, W と H の値の最適化のための手法として Alternate Least Squares (ALS) を採用した。繰り返し回数は 4000 回とした。

単変量解析では 10 個のピークに着目し, *S. pombe* の分裂過程のラマン分光イメージを作成した。また, 10 個のピークの内, 1440 cm^{-1} と 1301 cm^{-1} のピークは脂質, 1003 cm^{-1} と 852 cm^{-1} のピークはタンパク質であると推測することができた。しかし, その他の 6 つのピークに関しては他の生体分子とピークが重複していると考えられたため, ピークの構成物質の推定はできなかった。MCR ではスペクトルを 6 つに分解し, それぞれの時空間分布を示すラマン分光イメージを作成することができた。分解したスペクトルの内 5 つはスペクトルの波形, ラマン分光イメージに示された生体分子の時空間分布, 単変量解析の結果との照合などから, それぞれバックグラウンド, 多糖類, 脂質, 細胞内に多く含まれる主要タンパク質, ごくわずかな微量タンパク質と推定された。脂質とタンパク質に関しては, 細胞分裂の過程でそれぞれの細胞内での濃度がどのように変化していくかという検証も行った。その結果, 脂質と主要タンパク質は細胞分裂直前まであまり濃度が変わらず, 細胞が 2 つの娘細胞に分裂した 6.5 時間後に急激に減少し, その後 15 時間後まで低濃度を保つことが示された。一方, 微量タンパク質は実験開始時から細胞分裂直前まで濃度が上昇し続け, 細胞分裂と同時に急激に減少し, その後再び緩やかに濃度が上昇するという挙動を示した。この微量タンパク質は, レーザー照射によって細胞内に生成したヒートショックプロテインの可能性も考えられる。

本研究では *S.pombe* の細胞分裂における生体分子の挙動をラマンスペクトルの測定と多変量解析法の 1 つである MCR を用いて明らかにすることができた。本手法は解析にあたって特別な下準備を必要とせず, また, スペクトルに関する詳細な予備知識も求められない。よって, 今後は酵母以外の単細胞生物にも本手法を適用した研究が行えると考えられる。

横溝　岳志