

— いのちの仕組みを見る —

## 分子と生命をつなぐ分光学

理学系研究科 化学専攻 濱口 宏夫 教授

生体があるがままに計測して、生命現象を分子のレベルで解明することは、理学の究極の目標の一つである。生体は複雑な超巨大分子系であり、そこで起こる様々な現象を分子のレベルに立ち戻って調べるには、時間と空間を分解した計測手法の確立と、物理化学的視点に基づく解析が必要となる。本講演では、これまで主として分子構造の研究に用いられていたラマン分光(レーザーを用いた分光法の一つ)の手法を、生命の最小単位である細胞に適用した筆者等の研究を、理学の新しい流れの一つとして紹介する。

図1は、分裂周期のM期からG2期に至る、生きた分裂酵母中心部(右側のイメージ中赤丸で囲んだ領域)の時空間分解ラマンスペクトルである。M期の分裂しかかった核のスペクトル(0 min)は、タンパク質のバンドから構成されている。それが時間と

ともに変化し、ミトコンドリア由来のリン脂質のきわめて強いバンドを示す中間的スペクトル(11-31 min)を経て、S期の多糖類のバンドからなる隔壁のスペクトル(62 min)に変化し、最終的にG2期の細胞壁のスペクトル(72 min)となった。

図1のラマンスペクトルには、既知の生体物質には帰属できない強いバンドが  $1602\text{ cm}^{-1}$  に観測されている。緑色蛍光蛋白質(GFP)でミトコンドリアを標識した分裂酵母のラマンマッピングの実験を行った結果(図2), GFPによるミトコンドリアの像と、 $1446\text{ cm}^{-1}$  のリン脂質のバンドによる像は良い一致を示した。さらに、 $1602\text{ cm}^{-1}$  のバンドの像は  $1446\text{ cm}^{-1}$  のバンドの像に内包されることがわかった。このことから、 $1602\text{ cm}^{-1}$  のバンドを与える分子種はミトコンドリア内に存在することが証明された。

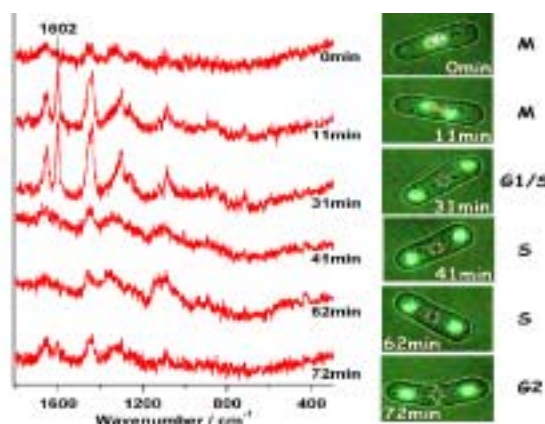


図1. 分裂酵母の時空間分解ラマンスペクトル<sup>1) 3)</sup>

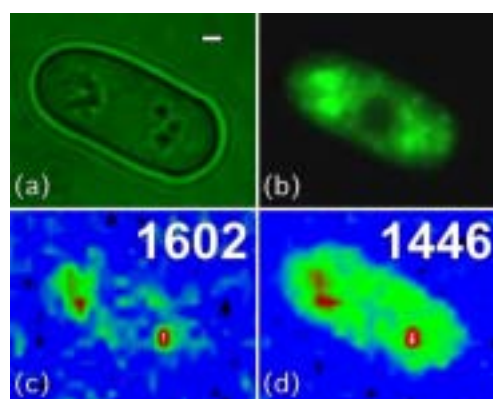


図2. GFP(b)およびラマン(c,d)イメージ<sup>2)</sup>

この1602  $\text{cm}^{-1}$ のバンドは、ミトコンドリア内の呼吸活性を鋭敏に反映する。観察中の分裂酵母の培養液にシアン化カリウム(青酸カリ、KCN)を加えて呼吸を阻害し、その後のラマンスペクトル変化を調べた(図3)。KCN添加後、数分で1602  $\text{cm}^{-1}$ のバンドが急速に強度を失い、36分後には完全に消失した。一方、1655,1446,1300  $\text{cm}^{-1}$ のリン脂質のバンドは、11分まではほとんど変化しないが、その後徐々に幅が広がり、形が崩れた。これらの変化は、KCNによる阻害に起因するミトコンドリア内の呼吸活性の低下と、それに続く膜構造の崩壊の過程を示しているものと考えられる。換言すると、図3のスペクトル変化は、呼吸阻害による酵母細胞の死の初期過程を、分子レベルで捉えたものである。その意味で、筆者らは1602  $\text{cm}^{-1}$ のバンドを「**生命のラマン分光指標**」と呼んでいる。

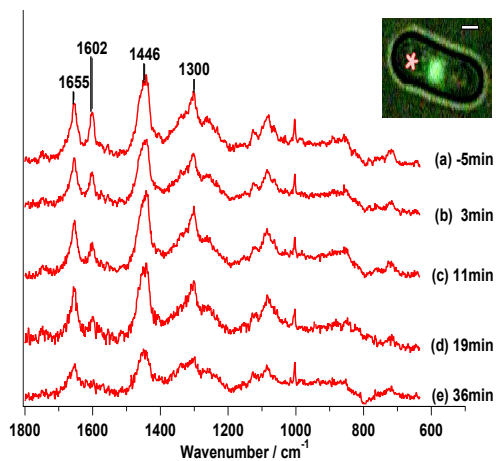


図 3. KCN による呼吸阻害の効果

マッピングの実験を他のラマンバンドについても行うと、図4のような結果が得られた。ミトコンドリア、隔壁、細胞壁などのオルガネラの分子像が明瞭に観察され、また細胞内のタンパク質やリン脂質の分布が可視化されている。とくに、「生命のラマン分光指標」を用いれば、**呼吸活性の可視化**という生細胞のあるがままの機能計測が可能となる。時空間分解ラマン分光は、蛍光色素などによる標識操作を一切必要とせず、生きた細胞をそのまま計測し、細胞内の生体物質の空間分布とその時間挙動、生命活性を直接的に可視化観測する手段を与え、生命を分子レベルで捉えるうえで有力な手法の一つとなると考えられる。

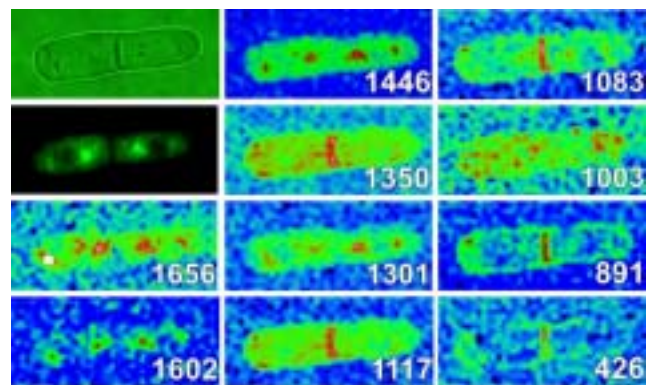


図 4. 分裂酵母生細胞のラマンマッピング

- 1) Y. -S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto and H. Hamaguchi, *J. Raman Spectrosc.*, **34**, 1-3 (2003).
- 2) Y. -S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto, T. Ogura and H. Hamaguchi, *J. Raman Spectrosc.*, **35**, 525-526 (2004).
- 3) Y. -S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto and H. Hamaguchi, *Biochemistry*, **34**, 10016-10027 (2005).