

「生命のラマン分光指標」と分子レベルでの細胞死

東京大学大学院理学系研究科 瀨口宏夫

生命を分子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、超高次分子複合体であり、そこで生起する様々な動的生命現象を分子レベルの素過程に立ち戻って調べるには、時間と空間を分解した分子計測手法の確立と、物理化学的視点に基づく分子構造、ダイナミクスの解析が必須である。最近筆者等は、ラマン分光による生きた酵母単一細胞の分子レベル計測に成功し、いくつかの大変興味深い結果を得ているので、本討論会で紹介し、参加者の皆様に議論して頂きたいと思う。

時空間分解ラマン分光による細胞分裂過程の分子レベル追跡

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（0min）は、蛋白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極めて強いバンドを示す中間的スペクトル（11-31min）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（62min）に変化し、最終的にG2期の細胞壁のスペクトル（72min）となった。

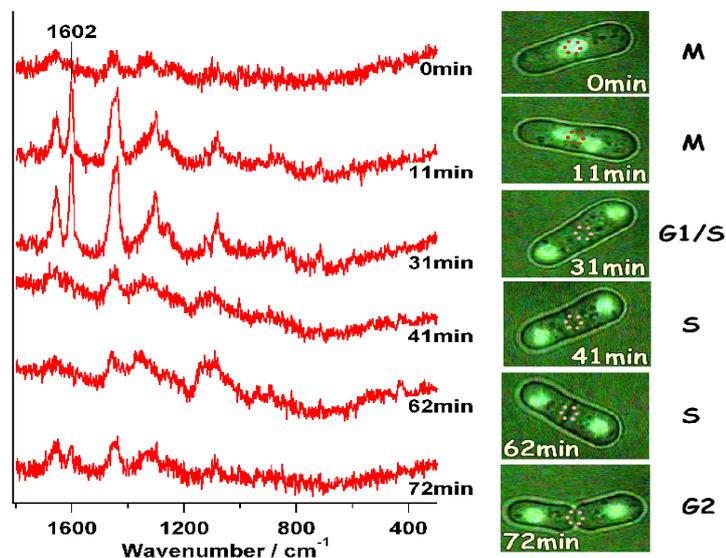


図1. 分裂酵母の時空間分解ラマンスペクトル¹⁾

生命のラマン分光指標の発見

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 1602cm^{-1} に観測されている。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、 1446cm^{-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、 1602cm^{-1} のバンドの像は 1446cm^{-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 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。

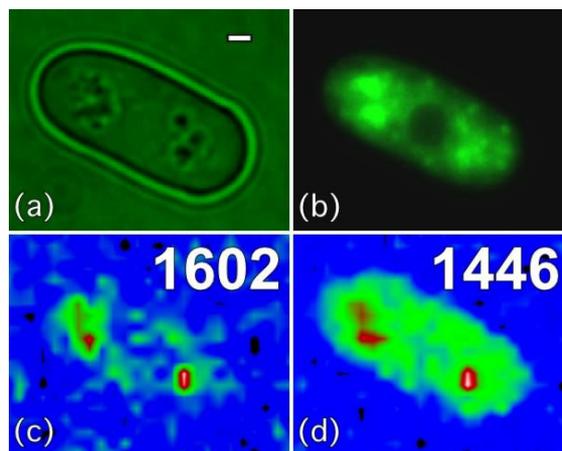


図2 分裂酵母のラマン分子イメージング³⁾

この1602 cm^{-1} のバンドは、ミトコンドリア内の代謝活性を鋭敏に反映する。観察中の分裂酵母の培養液に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 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 cm^{-1} のリン脂質のバンドは、11分までは殆ど変化しないが、その後徐々に幅が広がり、形が崩れた。これらの変化は、呼吸阻害によるミトコンドリア内の代謝活性の低下と、それに続くミトコンドリア膜構造の崩壊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 cm^{-1} のバンドを「生命のラマン分光指標」と呼んでいる。このバンドを与える分子種はまだ特定されていないが、呼吸鎖中に存在する未知の反応中間体である可能性が高い。

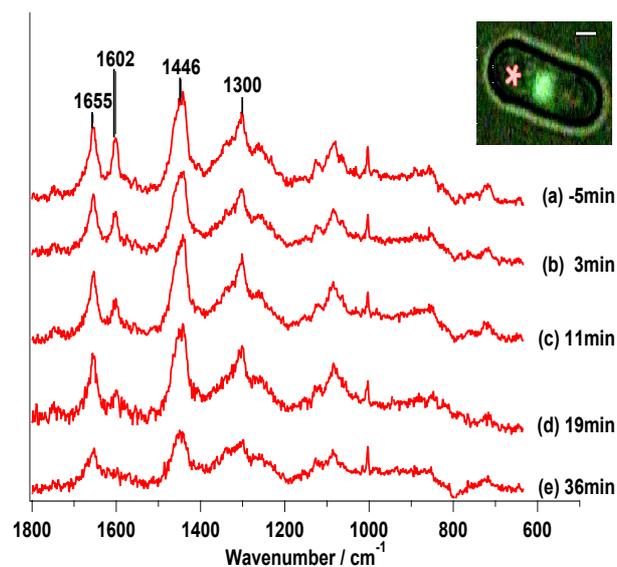


図3. KCNによる呼吸阻害の効果

分裂酵母生細胞のラマンマッピング

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、また細胞内の蛋白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、代謝の活性度の可視化という従来全く不可能であった生細胞の *in vivo* 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最強の手法の一つとなると考えられる。

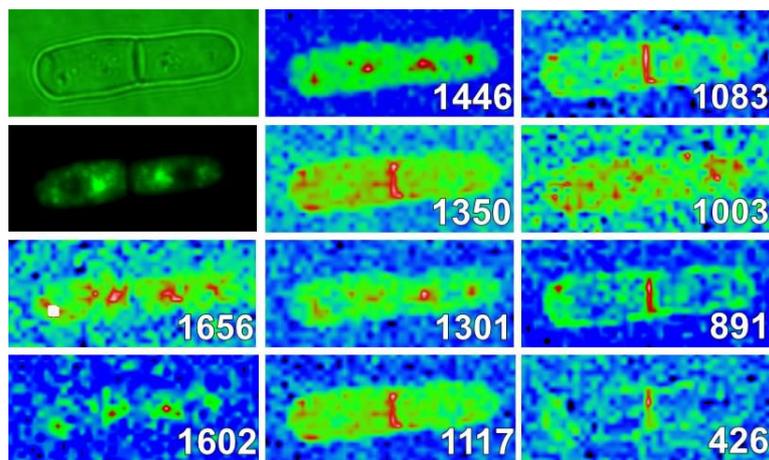
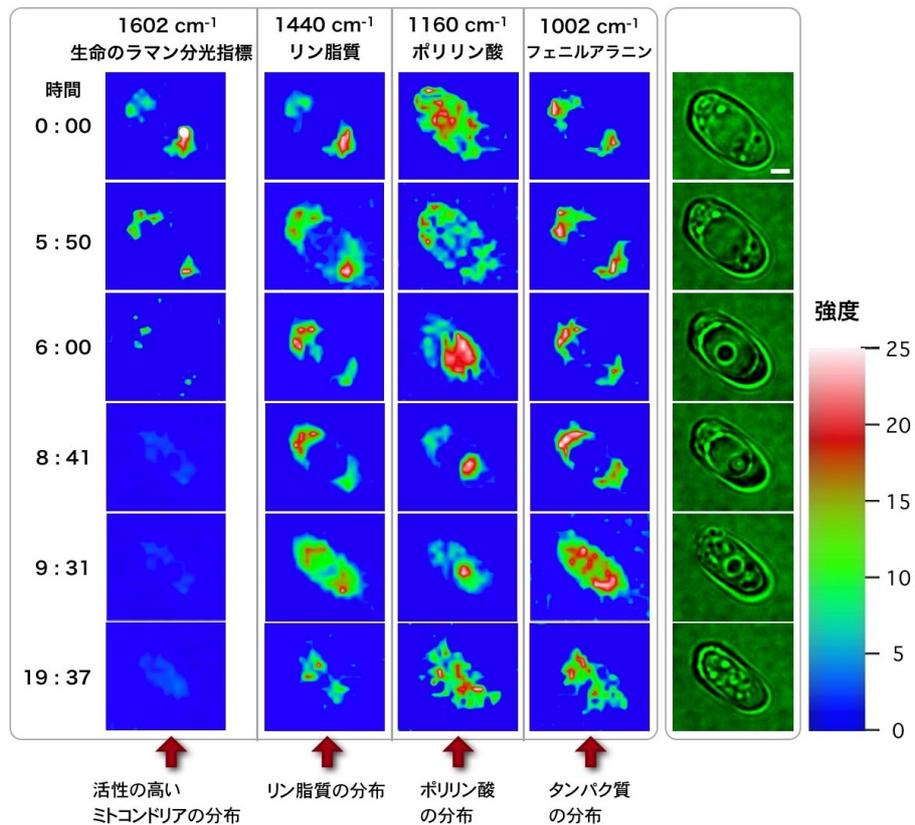


図 4. 分裂酵母生細胞のラマンマッピング³⁾

出芽酵母におけるダンシングボディーの出現と細胞の自然死

出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の液胞には、Dancing Body (DB)と呼ばれる顆粒が時折出現し、激しく動き回ることが知られていた。DBの主成分はポリリン酸であると推測されていたが、我々はラマンスペクトル測定によりDBが微結晶に近いポリリン酸塩であることを明らかにした⁴⁾。明視野顕微鏡下での長時間タイムラプス測定により、出芽酵母液胞内にDBが出現すると、その後液胞が潰れ細胞内が無秩序になり、最終的に細胞死に至ることがわかった。この一連の細胞死過程を時間分解ラマンイメージングにより追跡した結果を図4に示す⁴⁾。光学像より、DB出現後液胞が消失し、最後には細胞内構造が完全に失われていることがわかる。「生命のラマン分光指標」のイメージから、0分および5時間50分後では、ミトコンドリアが活発に代謝活動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。6時間後、DBが突如出現し、それと共にミトコンドリアの代謝活性が著しく低下している。しかしながら、ミトコンドリアの分布に相当する 1440cm^{-1} のラマンイメージに目立った変化は無い。8時間41分後にはDBがブラウン運動を停止し、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、分子レベルでは細胞が死んでいるとみなすことができる。しかし、ミトコンドリアとタンパク質の分布は依然変化していない。19時間37分後には、細胞内のリン脂質、ポリリン酸、タンパク質は分解され、完全に乱雑に分布している。このような乱雑な構造では細胞が生命活動を行うことができないことは明らかである。生化学における細胞死の判断は、このさらに後の段階で、細胞壁が崩れた後の染色によって行われる。しかし、時空間分解ラマン分光を用いれば、これよりずっと早い初期段階で細胞死を判定することが可能である。このように、ラマン分光によりDBの出現、消失、ミトコンドリア代謝活性の消失など一連の細胞自然死過程を時々刻々追跡することができた。生命の最小単位である細胞に、死という概念を適用することの可否

も含めて、分子レベルで生命を論ずるための足がかりが得られた。



出芽酵母自然死の過程のラマンマッピング追跡⁴⁾

文献

- 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, **44**, 10009-10019 (2005).
- 4) Y. Naito, A. Toh-e and H. Hamaguchi: J Raman Spectrosc **36**, 837 (2005).