

4A12

光合成酸素発生系の多周波 ESR 研究

(東北大多元研¹, 岡山大院自然², 分子研³)松岡秀人¹, 沈建仁², 伊東信哉¹, 古川貢³, 中村敏和³, 大庭裕範¹, 山内 清語¹

Multi-Frequency ESR studies of Photosynthetic Oxygen-Evolving System

(IMRAM, Tohoku University¹, Okayama University², Institute for Molecular Science³)
Hideto Matsuoka¹, Jian-Ren Shen², Shinya Ito¹, Ko Furukawa³, Toshikazu Nakamura³, Yasunori Ohba¹, Seigo Yamauchi¹

【序論】水からの酸素発生は、光化学系 II (PSII) に存在する酸素発生中心によって触媒される。我々はこれまで電子スピン共鳴 (ESR) 法を用いて、水分解-酸素発生過程におけるプロトン共役電子移動の機構について明らかにしてきた¹。また最近、著者の一人(沈)は、1.9 Å の高分解能で PSII の結晶構造解析に成功し、酸素発生中心の詳細な構造を初めて明らかにした²。その結果、酸素発生中心は 4 個のマンガン、1 個のカルシウム、5 個の酸素原子から構成される歪んだ椅子型構造を持つことが明確に示された。図 1 には結晶構造解析によって明らかとなった酸素発生中心 MnCa₄O₅ クラスターの構造を示す¹。しかし、酸素発生中心は水分解反応において複数の中間酸化状態をとることが知られており、結晶構造解析で決定された構造がどの酸化状態に相当するのか、まだ明らかとなっていない。本研究ではまず、酸素発生能とクラスター構造との関係を理解するため、Ca の Sr への置換効果について、酸化状態を選別しながら電子・分子構造に関する微細な情報を得ることができる ESR 法を用いて調べた。また、これまで *T. vulcanus* 以外の種から単離・精製した PS II 複合体について、結晶構造解析ならびに ESR による研究が、世界中で行われてきたが、クラスターの電子・分子構造は種によって依存するか否かについてはあまり議論されてこなかった。本研究では ESR 法の観点から、種の違いについても調べた。

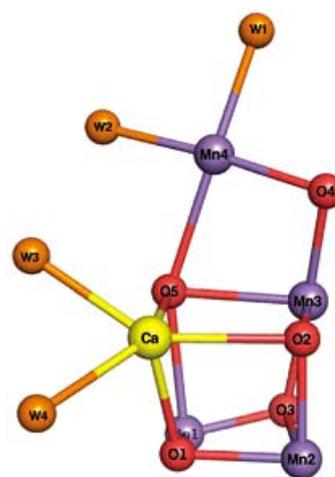


図 1 MnCa₄O₅ の構造。

【実験】試料は好熱性らん藻 *Thermosynechococcus vulcanus* (*T. vulcanus*) から単離・精製した PS II 複合体を用いた。高周波 (94.9GHz) パルス ESR 測定は、マイクロ波パルスブリッジを組み込んだ Bruker 社製 ELEXSYS E600 分光器を用いて行った。また、Q-band (34GHz) パルス ESR/ENDOR 測定は Bruker 社製 ELEXSYS E680 分光器を用いた。

【結果と考察】

a) Ca/Sr 置換の効果

Ca/Sr 置換効果を、電子・分子構造を反映する *g* 値により比較した。図 2 には PSII 凍

結溶液中の酸素発生中心に対して観測した 34GHz および 94.9GHz 帯 ESR スペクトルを示した。なお、黒は補酵素として Ca を、赤は補酵素として Sr が結合している。スペクトルシミュレーションの結果、 g 値を次のように決定した：

(Ca) $g_x = 1.994, g_y = 1.981, g_z = 1.967$

(Sr) $g_x = 1.996, g_y = 1.990, g_z = 1.974$

本測定では、 S_2 状態と呼ばれる参加状態のクラスターに対して測定を行った。 S_2 状態は Mn (III) が 1 つと Mn (IV) が 3 つから構成されると考えられている。配位子場理論から Mn (IV) イオンの g 値は異方性が小さいと期待されることから、決定した g 値の違いは Mn (III) イオンの配位環境の違いを反映していると考えられる。酸素発生中心の補酵素として働く Ca を、Sr に置換することで酸素発生能が半減することが知られており、Mn (III) イオンの配位環境の違いと酸素発生能との相関が示唆された。

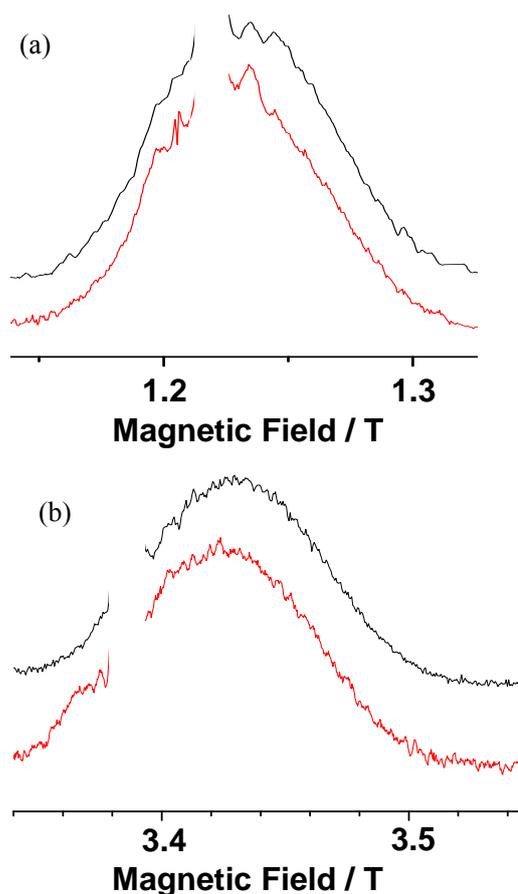


図 2 酸素発生中心の(a)34GHz および (b)94.9GHz 帯 ESR スペクトル. 青:Ca、赤: Sr.

a) スピン格子緩和時間の温度変化測定

各 Mn 核間に働く 6 種類の交換相互作用 J は、Mn クラスターの分子構造および電子構造を直接反映したパラメータである。しかし、それらを実験的に識別して、決定することは不可能なため、本研究では基底スピン状態と励起スピン状態とのエネルギー差 Δ から間接的に交換相互作用の決定を行った。まず Δ の決定は、スピン格子緩和時間の温度変化を測定し、それをアレニウス型 (Orbach 過程) の理論式を用いて解析することで決定した。その結果、シアノバクテリア *T. vulcanus* 由来 PSII の単結晶試料では $\Delta = 32\text{cm}^{-1}$ と求められた。ここで得られた Δ 値を見ると、別の種のシアノバクテリア *T. elongatus* と比べて一桁大きい値であり、種による違いが示唆された。一方で、ほうれん草から単離・精製した PSII に対して決定された Δ 値は本研究で求めた *T. vulcanus* のそれと近い値であった。また、ENDOR 測定からも *T. vulcanus* とほうれん草の類似性が示唆された。

- [1] Hideto Matsuoka, Jian-Ren Shen, Asako Kawamori, Kei Nishiyama, Yasunori Ohba, and Seigo Yamauchi, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 4655-4660 (2011).
- [2] Yasufumi Umena, Keisuke Kawakami, Jian-Ren Shen and Nobuo Kamiya, *Nature*, **473**, 55-60 (2011).

4A13

時間分解 EPR 法による光合成反応中心 の電子的相互作用解析

(静岡大理¹, シカゴ大化学², JST さきがけ³) 小堀康博^{1,3}, ノリス ジェームス²

Time-resolved EPR study on electronic coupling in the photosynthetic reaction center

(Shizuoka Univ.¹, Univ. of Chicago², PRESTO, JST³) Yasuhiro Kobori^{1,3},
James R. Norris Jr.²

【序】光合成反応中心は太陽光を利用して電子伝達を行う中間体分子を効率よく生み出し、エネルギー生産へとつなぐ重要な役割を持つ。バクテリア光合成反応中心の光励起初期過程においては、クロロフィル二量体 (P) が光エネルギーを受容する。このタンパク質複合体によるエネルギー変換の初期過程が、P に生じた励起一重項状態 ($^1P^*$) からフェオフィチン (H_L) への長距離電子移動 (図 1) である。近年 Woodbury らはこの電荷分離過程 (図 1) について、タンパク質の構造変化による応答を考慮した速度論的解析を行い、電子的相互作用が 39 cm^{-1} であると報告した¹。この解析モデルは、図 1 の電荷分離が P 近傍に位置するクロロフィル (B_L) を介した超交換機構によって進行することを前提としている。しかしながら、 $P^+ B_L^-$ 状態を経る二段階の電子ホッピングも有力な機構として考えられており、未だ光合成反応中心の初期電荷分離に関する分子機構は定かではない。そこで本研究では、バクテリア光合成反応中心 *Rhodobacter sphaeroides* R26 のキノン分子を還元し、キノンへの後続電荷シフトをブロックさせた系について初期電荷分離状態の時間分解電子スピン共鳴 (TREPR) スペクトルを観測した。交換相互作用の値から電荷再結合過程に対する電子的相互作用を決定し、初期電荷分離機構に関する知見を得た。

【実験】培養後、精製処理した *Rhodobacter sphaeroides* R26 にアスコルビン酸ナトリウム添加後、連続的

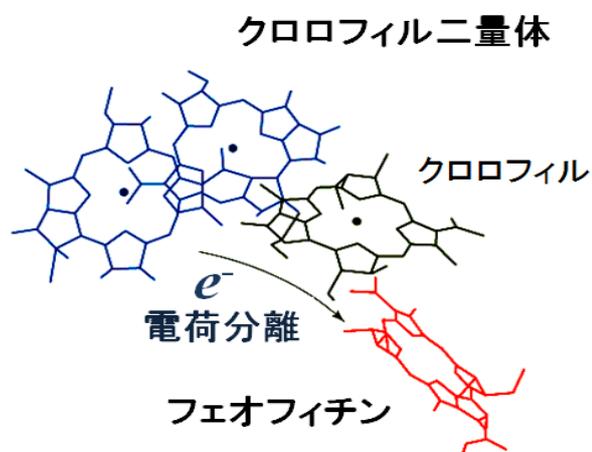


図 1. バクテリア光合成反応中心の初期電荷分離過程に関与する色素分子の配置

にレーザー照射を行いながら温度を下げ、凍結させることによってタンパク質中のキノン分子を還元状態に保ち、後続電子移動をブロックさせた。Xバンド TREPR 測定は、Bruker ER041MR により行った。Nd:YAG レーザー (SP, Quanta-Ray GCR-4) の第二高調波 532 nm を励起光源としナノ秒時間分解計測を行った。測定は 85 K で行った。

【結果と考察】図 2 a にレーザー照射後 50 ns において得られた TREPR スペクトルを示す。このスペクトルは、中心付近の A/E パターンを示す信号 (図 2 b) と、よりブロードなスペクトル (図 2 c) の重ね合わせで説明された。さらに各信号成分 (図中矢印の 322 mT 付近と 329 mT 付近) の経時変化の観測を行ったところ、前者の信号の減衰とともに後者の信号成分が立ち上がった。このことから、図 2 b のスペクトル成分は初期電荷分離状態 $P^+H_L^-$ に、図 2 c の成分はその電荷再結合で生成した励起三重項状態 $^3P^*$ にそれぞれ帰属された。

電荷分離状態 $P^+H_L^-$ の不對電子軌道の重なりによって生じる交換相互作用と電荷再結合速度定数を定量化するために、高速な電荷再結合反応が起こるラジカル対の電子スピン量子系において、量子準位分布や量子コヒーレンス発展の影響を受けたマイクロ波遷移を回転座標系の確率リュービル方程式で表し、TREPR 信号によるスペクトルとその径時変化の両者を解析した。この手法による両者のフィッティングから電荷再結合速度定数 ($k_S = 1.2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$, $k_T = 7.5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$) および、交換相互作用 ($2J = -1.5 \text{ mT}$) を決定した。

以上の解析結果と報告されている再配向エネルギー値などを用い、初期電荷分離状態 $P^+H_L^-$ から各電荷再結合状態 (基底状態、励起三重項状態 $^3P^*$ 、および励起一重項状態 $^1P^*$) に至る過程について、電子的相互作用をそれぞれ求めた。

〈参考文献〉

1. H. Wang, S. Lin, J. P. Allen, J. C. Williams, S. Blankert, C. Laser, N. W. Woodbury, *Science*, **316**, (2007) 747-750.

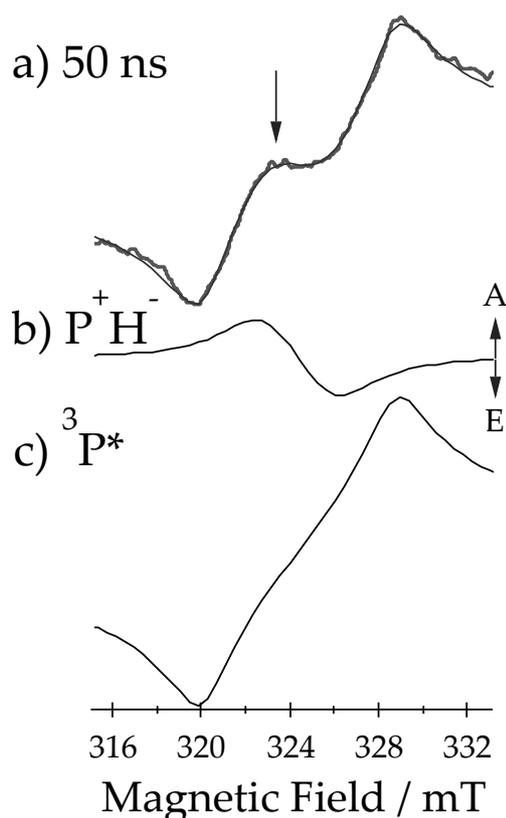


図 2. a) *Rhodobacter sphaeroides* R26 のレーザー照射後 50 ns に得られた TREPR スペクトル b) 確率リュービル方程式による解析で得られた初期電荷分離状態 $P^+H_L^-$ のスペクトル成分と、c) その三重項電荷再結合によって生成した励起三重項状態 $^3P^*$ の成分

4A14

テラヘルツ時間領域分光法によるリゾチーム水溶液中の水和水の観測

(筑波大数理), 青木 克仁, 吉川 弘樹, 白木 賢太郎, 服部 利明

Observation of hydration water in lysozyme aqueous solution by terahertz time domain spectroscopy

(Univ. of Tsukuba) Katsuyoshi Aoki, Hiroki Yoshikawa, Kentaro Shiraki and Toshiaki Hattori

【序】

タンパク質の水和は、タンパク質が機能を発揮する上で重要な役割を果たすと考えられている。タンパク質分子の周りの水和水は、中性子散乱や NMR、X 線回折によって調べられてきた。これらの手法ではナノ秒オーダーの水分子の運動をみることができる。これによって観測できる水和水はタンパク質表面でタンパク質と直接的に強く相互作用する水分子である。その外側に接する水分子は、タンパク質表面で強く水和する水分子を介してタンパク質と間接的に弱く相互作用する水分子である。このような弱く水和する水分子を観測するためには、テラヘルツ分光などの電磁的な手法を用いることが有効であると考えられる。

テラヘルツ分光は、テラヘルツ領域（振動数：0.03 THz - 12 THz）の電磁波を用いる分光法である。水は、Debye 緩和モードにより、ギガヘルツからテラヘルツ領域の電磁波を強く吸収する。テラヘルツ領域における水の吸収係数 α は、水の総双極子モーメント \mathbf{M} の時間自己相関関数のフーリエ変換に比例する：

$$\alpha(\omega) \propto \int_0^{\infty} dt e^{i\omega t} \langle \mathbf{M}(0)\mathbf{M}(t) \rangle. \quad (1)$$

水和水とバルク水では、水分子の回転運動の速さが異なることから、 \mathbf{M} の時間自己相関関数が異なり、それに伴って吸収係数も異なる。

テラヘルツスペクトルから分かるものは、水和水の吸収とタンパク質分子自身の吸収との和である。水和水の状態を知るためには、水和水の吸収がどの程度あるかを知る必要がある。タンパク質水溶液に塩を加えると、タンパク質の水和水の状態は変化すると考えられる。特に、硫酸アンモニウムは、タンパク質を沈殿させる作用があることで知られ、タンパク質と水との相互作用に影響を与えていると考えられている。そこで本研究では、純水および、それにタンパク質または硫酸アンモニウムを加えた水溶液のテラヘルツ分光測定を行い、タンパク質の周りの水和水の動的性質について新たな知見を得た。

【実験】

測定試料はニワトリ卵白リゾチーム(HEWL)水溶液と純水、および、それらに硫酸アンモニウムを加えた水溶液である。HEWL 水溶液は、純水に HEWL 粉末を精製せずに溶かし、280 nm の吸光係数により濃度校正を行って作製した。HEWL の濃度は 202 mg/mL (14.1 mmol/L)とした。硫酸アンモニウムは、HEWL の沈殿が起こらない濃度とした。作成した試料は、厚さ 0.1 mm の自作の合成石英セルに水溶液を封入し、透過型のテラヘルツ時間領域分光法で測定した。テラヘルツ波は、チタンサファイアレーザー（波長 790 nm）からのフェムト秒光パルスを InAs 結晶の(111)面に 45 度で入射して発生させ、ZnTe 結晶を用いた電気光学サンプリング法で検出した。また、

水溶液中に含まれる水の量を調べるため、密度計を用いて水溶液の密度測定を行った。

【結果と考察】

図 1 に純水、HEWL202 mg/mL 水溶液、硫酸アンモニウム 0.25 mol/L 水溶液、および、HEWL 200 mg/mL 硫酸アンモニウム 0.25 mol/L 混合水溶液の吸収係数を示す。はじめに、純水と HEWL202 mg/mL 水溶液の結果について述べる。吸収係数は特徴的なピークを持たないブロードなスペクトルとなった。そして、純水の吸収係数のほうが HEWL 水溶液の吸収係数よりも大きい結果となった。水溶液の吸収係数スペクトルから、水溶液中の水のベースラインを引いたスペクトルを図 2 に示す。これは、水溶液中に含まれる水が全てバルク水と同様に振舞っていると仮定して算出したものである。得られたスペクトルは負となった。タンパク質の周りの水和水は、バルク水よりも動きが遅いため、式(1)より、吸収が小さくなると考えられる。従ってこの結果は、タンパク質自身の吸収よりも、バルク水と水和水との吸収の差のほうが大きいことを示している。

次に、硫酸アンモニウム 0.25 mol/L 水溶液、および、HEWL 200 mg/mL 硫酸アンモニウム 0.25 mol/L 混合水溶液の結果について述べる。硫酸アンモニウム水溶液の吸収係数は、わずかに純水の吸収係数よりも大きくなった。純水に硫酸アンモニウムが溶けると、その分水分子の量が減少する。従って、水の吸収のベースラインは減少すると考えられる。それにもかかわらず硫酸アンモニウム水溶液の吸収係数が増加するのは、硫酸アンモニウム自身の吸収または、その周りの水和水の運動がバルク水よりも激しくなるためであると考えられる。実際に、硫酸アンモニウムのスペクトルから水のベースラインを引くと正のスペクトルとなった (図 2)。HEWL 硫酸アンモニウム混合水溶液の吸収係数は、HEWL 水溶液の吸収係数よりも明らかに大きい。その差は、硫酸アンモニウムのスペクトルから水のベースラインを引いた値よりも 2 倍程度大きかった。従って、HEWL 水溶液に硫酸アンモニウムを加えたときの吸収の増加は、硫酸アンモニウム自身の吸収のほかに、HEWL の周りの水和水の運動が激しくなったこと、または、HEWL と硫酸アンモニウムとの相互作用が原因であると考えられる。

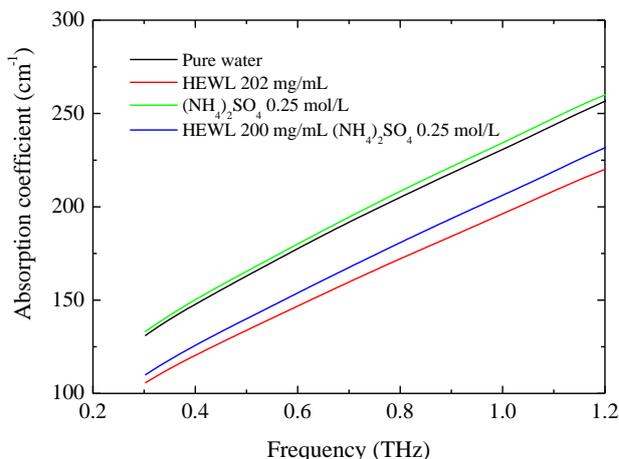


Fig. 1. Absorption coefficients of pure water (black), 202-mg/mL HEWL aqueous solution (red), 0.25-mol/L ammonium sulfate aqueous solution (green), and 200-mg/mL HEWL and 0.25-mol/L ammonium sulfate aqueous solution (blue).

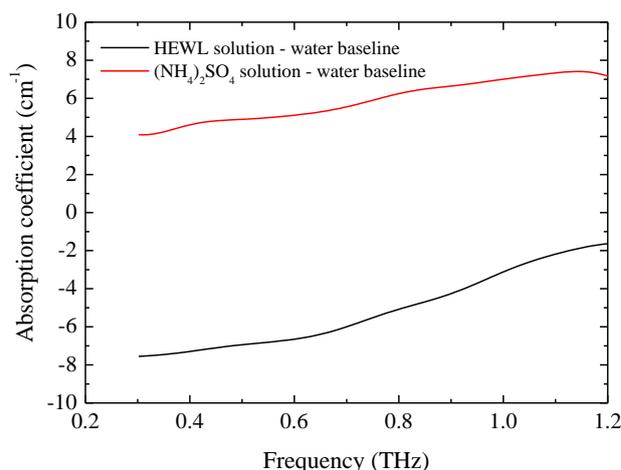


Fig. 2. Absorption spectra of 202-mg/mL HEWL aqueous solution (black) and 0.25-mol/L ammonium sulfate aqueous solution (red) subtracted by the baseline of water in each solution.

4A15

¹³C 同位体標識ラマンイメージングによる
分裂酵母におけるタンパク質の脂肪滴への局在ダイナミクス

(国立交通大学・応用化学) 重藤真介, Hemanth Nag Noothalapati Venkata

Dynamic proteome localization to lipid droplets in single fission yeast cells
by stable isotope-labeled Raman imaging

(National Chiao Tung Univ.) Shinsuke Shigeto, H. N. Noothalapati Venkata

【序】脂肪滴 (lipid droplets) は酵母細胞から哺乳類細胞にいたるまで普遍的に存在するオルガネラである。その主な機能は長らく中性脂肪の貯蔵庫としての静的なものにすぎないと考えられてきたが、実際は非常にダイナミックかつ多面的であることが近年の分子生物学研究から明らかになりつつある。とくに、脂肪滴はタンパク質の輸送や一時的な貯蔵といった重要な細胞内過程に深く関与していることが示唆されている[1]。しかし、そのような密接な機能的相互作用を裏付ける直接的な証拠はまだほとんど得られていない。そこで本研究では、脂肪滴と細胞内タンパク質との関係を生きのまま非破壊で調べるため、¹³C 同位体で標識したグルコースが分裂酵母細胞内に取り込まれ同化されていく過程を顕微ラマン分光およびラマンイメージングを用いて可視化・追跡した。その結果、細胞外から取り込まれた ¹³C から新たに作られたタンパク質が特異的に脂肪滴へ局在化する現象を見出した[2]。

【実験】試料にはミトコンドリアを GFP で標識した分裂酵母を用いた。¹²C-グルコースを含む EMM 培地で前培養した後、単一のコロニーを poly-D-lysine コート・ガラスボトムディッシュ上の ¹³C-グルコースを含む EMM 培地に植菌したものを顕微鏡下での測定に用いた。顕微鏡ステージ上にマウントできる自作の恒温チャンバーを用いることで、長時間のラマン測定が可能となった。

ラマンスペクトルおよびイメージング測定は既報の共焦点顕微ラマン分光装置[3]を用いておこなった。ラマン励起波長は 632.8 nm である。試料におけるレーザーパワーは 1 mW とし、積算時間は 1 点あたり 1.5 乃至 2 秒とした。したがって、1 回のイメージング測定に要した時間は約 16~20 分で、これが本測定の時間分解能を決めている。

【結果と考察】¹³C の酵母細胞内への取り込み過程をモニターするのに最適なラマンバンドを探索するため、まず最初にアンサンブル測定 (n = 25) をおこなった。¹³C-EMM 培地に植菌した時点を時刻ゼロとし、細胞質および脂肪滴の空間分解ラマンスペクトル (25 個の平均) が培養時間とともにどう変化するかを調べた (図 1)。1655 cm⁻¹ 付近のアミド I バンドと *cis*-C=C 伸縮振動バンド、1003 cm⁻¹ のフェニルアラニン環呼吸振動バンドが ¹³C 同位体置換によりそれぞれ 1620, 1595, 967 cm⁻¹ にシフトするのに対

して、CH 変角振動 (1440 cm^{-1}) および CH_2 ねじれ変角振動 (1301 cm^{-1}) のバンドは同位体シフトを示さない。 $967/1003\text{ cm}^{-1}$ バンドは非常にシャープで他のバンドとよく区別でき、各時刻における ^{13}C 同位体置換/非置換のプロテオームを反映しているものと考えられるので、ラマンイメージングではとくにこれらのバンドをタンパク質のマーカースとして用いることにした。脂質のマーカースとしては 1301 cm^{-1} のバンドを用いた。

次に、単一分裂酵母生細胞における ^{13}C 取り込みのダイナミクスをラマンイメージングで計測した (図 2)。この方法では、上述のアンサンブル測定では得られない細胞内物質の濃度変化や分布変化に関する詳細な知見が得られる。 ^{13}C -EMM 培地での培養時間が長くなるにつれて、 1003 cm^{-1} バンドの強度が減少し (図 2C)、それと同時に 967 cm^{-1} バンドが強くなっていく (図 2D) のがわかる。さらに、25 時間後および 31 時間後の、 ^{13}C から新たに合成されたタンパク質 (967 cm^{-1} バンド) の分布が、脂質の分布 (図 2E) と非常に

よく似た局在パターンを示すことが見てとれる。この脂質の分布はミトコンドリアの GFP イメージ (図 2B) とはまったく異なるが、脂肪滴に豊富に存在するエルゴステロールの分布 (1602 cm^{-1} バンド; 図 2F) とはよく一致する。したがって、この結果は ^{13}C -グルコースから合成されたタンパク質が長時間経過後、脂肪滴に局在化する現象を *in vivo* で直接捉えたものと言える。

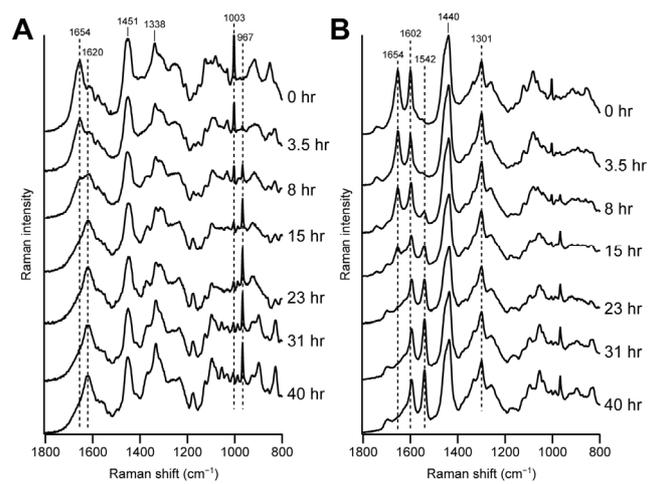


図 1: ^{13}C -グルコース含有培地中の分裂酵母生細胞の細胞質(A)と脂肪滴(B)のラマンスペクトル変化。

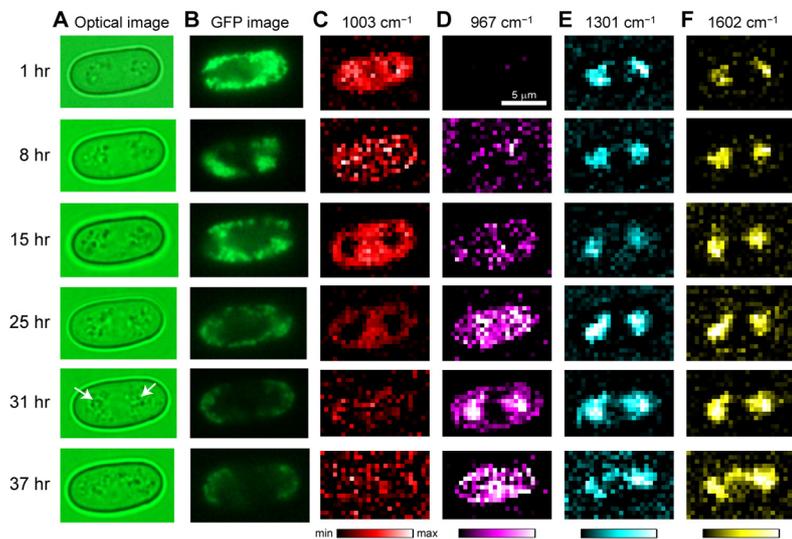


図 2: ^{13}C -グルコース含有培地中の単一分裂酵母生細胞のラマンイメージ変化。(A)光学顕微鏡像、(B)ミトコンドリアの GFP 蛍光像、(C-F) $1003, 967, 1301, 1602\text{ cm}^{-1}$ におけるラマンイメージ。

- [1] M. A. Welte, *Trends Cell Biol.* **17**, 363–369 (2007).
- [2] H. N. Noothalapati Venkata and S. Shigeto, *Chem. Biol.* submitted.
- [3] C.-K. Huang, M. Ando, H. Hamaguchi, and S. Shigeto, *Anal. Chem.* **84**, 5661–5668 (2012).

Presentation number: 4A16

Investigation of cellular heterogeneity in Glioblastoma: IR imaging study

Bhawana Singh^a, Vani Santosh^b, Kumaravel Somasundaram^c and Siva Umapathy^{a*}

a; IPC department, Indian Institute of Science, Bangalore, 560012

b; National Institute of Mental Health and Neuro Sciences, Bangalore, 560029

c; MCBL department, Indian Institute of Science, Bangalore, 560012

Introduction

Fourier transform infrared (FTIR) microspectroscopy has emerged as a potential technique for the analysis of biological samples (1 - 3). In our study, we report the application of FTIR imaging to study grade IV brain cancer. Even though WHO guidelines are available but still histopathological classification of brain cancer remains a challenging area. In medical community, increasing need has been felt for interdisciplinary methodologies to improve the diagnosis of difficult to determine cases in a shorter time frame.

Experiment

Normal and brain cancer tissue samples were collected from National Institute of Mental Health and Neuro Sciences (NIMHANS) Bangalore, India. Sample collection and experiments were approved by the human ethics committee of NIMHANS. Liquid nitrogen cooled FPA detector having 64×64 detector elements was used to collect IR spectroscopic images in reflection mode. Multiple IR images were recorded from a tissue section by moving the sample stage. FTIR hyper-spectral data images were recorded in the range of $950\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ at 4 cm^{-1} spectral resolution and data were analyzed using Cytospec, resolution pro (Varian) and Origin software programmes.

Results and Discussion

This study not only presents the characterization and classification of normal and grade IV brain cancer tissue specimen but also shows the potential FTIR microspectroscopy in identifying different cell types within grade IV brain cancer tissue samples. The advantage of this technique is that it is capable of bringing out the inherent chemical heterogeneity in conjunction with the morphology of the sample. At first, we characterized and classified normal and grade IV brain cancer (glioblastoma) tissue specimen and then within grade IV

brain cancer we identified different cell types. Imaging experiments gave idea about the inherent biochemical nature of the samples which directly co-related with the morphology of the samples. It is well known that grade IV brain cancer show large heterogeneity in tissue morphology. Based on this fact our aim was to take the maximum cellular heterogeneity into account and recognize spectral markers for them. Thus, in our study, within grade IV brain cancer, morphologically different cell types namely fibrillary, pleomorphic, small, giant and lipidized were differentiated spectroscopically.

In short, this study contributes towards improving our understanding towards possible future use of IR imaging in the field of biomedicine for diagnostic purposes, especially it can play an important role, in determining tumour margins or while dealing with frozen sections of soft tissues like brain which often lose their morphology at low temperature.

References:

- (1) Fernandez, Daniel C., Bhargava, Rohit, Hewitt, Stephen M., and Levin, Ira W., *Nature Biotech*, **23**, 469 (2005).
- (2) M. Diem, M. Romeo, S. Boydston-White, M. Miljkovic and C. Matthaus, *Analyst*, **129**, 880 (2004).
- (3) A. Pacifico, Luis A. Chiriboga, P. Lasch and M. Diem, *Vibrational Spectroscopy*, **32**, 107 (2003).

4A17 自家蛍光寿命イメージング：単一細胞内 pH のその場検出

(北大電子研¹・富士フィルム²・北大院先端生命³) 荻窪 真也²・中林 孝和¹・
足立 貴志²・Md. Serajul Islam¹・吉沢 友和¹・金城 政孝³・太田 信廣¹

Autofluorescence Lifetime Imaging: Detection of Intracellular pH in a Single Cell

(Hokkaido Univ., FUJIFILM) S. Ogikubo, T. Nakabayashi, T. Adachi, Md.
Serajul Islam, T. Yoshizawa, M. Kinjo, N. Ohta

【序】 蛍光による細胞観察において、蛍光強度ではなく、蛍光寿命を画像化することにより、各種刺激に対する細胞内の環境変化を検討している。蛍光強度の画像化は、一般に絶対強度を用いるために、蛍光分子の光退色や光学系の変化などによって定量性が低下するのに対し、蛍光寿命は、蛍光分子の種類および周囲の環境のみで決まり、光退色や光学系などには依存しない。そのために、蛍光寿命は蛍光強度に比べて定量性に優れ、蛍光寿命の僅かな変化は、蛍光分子の周囲の環境変化または反応速度の変化に対応させることができる¹⁻⁶。

本研究では、生体組織内に元から存在する蛍光物質(自家蛍光成分)の蛍光寿命イメージングを用いた細胞内環境計測を提案する。細胞は、色素染色を行わなくても自家蛍光と呼ばれる生体組織内に元から存在する蛍光分子からの蛍光を示し、自家蛍光を用いることによって、染色による試料への負荷がなくなり、また染色時間を必要としないために、手術などにおいて迅速な判断が可能となる。本発表では、細胞内に存在する NADH(nicotinamide adenine dinucleotide)の自家蛍光寿命を用いて細胞内 pH を無染色でイメージングできることを示す⁷。

【実験】 蛍光寿命イメージングシステムは、フェムト秒レーザーと共焦点蛍光顕微鏡を用い、画像の各点において時間ゲート法によって蛍光寿命画像を得る構成とした²⁻⁶。培養細胞としてガン細胞である HeLa 細胞を用い、様々な pH に調整した緩衝溶液内で培養を行い、画像を測定した。緩衝溶液中またはバルクの HeLa 細胞内の NADH の蛍光減衰曲線の測定は、石英セル内に NADH の水溶液または HeLa 細胞を入れ、時間相関光子計数法を用いて測定した。イオノフォアを用いて細胞内外の pH を等しくさせ、細胞外の pH を測定することによって細胞内の pH の値を得ている。

【結果】 NADH の分子構造を Fig. 1 に示す。NADH は代表的な補酵素であり細胞内に広く存在する。蛍光はニコチンアミド基から発し、細胞に

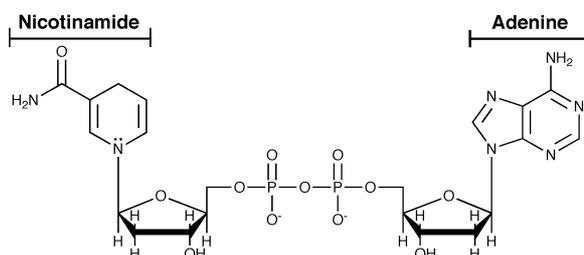


Fig. 1 Chemical structure of NADH

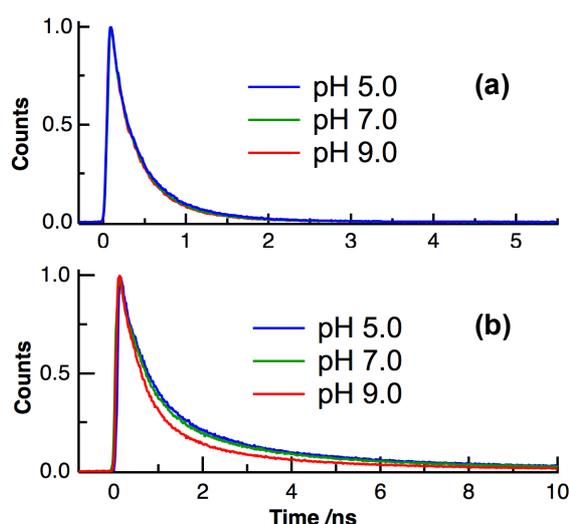


Fig. 2 Representative fluorescence decay profiles of NADH in buffer solution (a) and in HeLa cells (b) at different pH of 5.0, 7.0 and 9.0. Excitation and detection wavelengths were 370 and 440–450 nm, respectively.

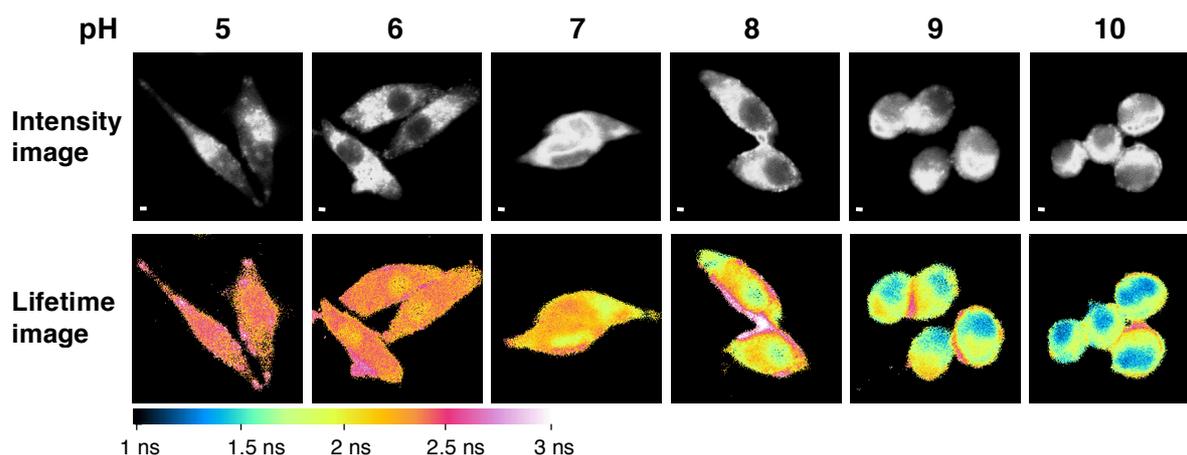


Fig. 3 Fluorescence intensity images (upper) and corresponding fluorescence lifetime images (lower) of autofluorescence of HeLa cells at the intracellular pH indicated at the top. Excitation and detection wavelengths were 370 and 417–477 nm, respectively.

350–400 nmの光を照射すると、440 nmをピークとしたNADHの蛍光が観測される。Fig. 2にNADHの蛍光減衰曲線のpH依存性を示す。緩衝溶液中においては、NADHの蛍光減衰曲線の形状はpHによって変化せず、緩衝溶液中ではNADHの蛍光寿命はpHに依存しないことがわかる。しかしFig. 2bに示すように、細胞内では、細胞内pHに応じてNADHの蛍光減衰曲線が変化し、細胞内pHの増加に伴い蛍光寿命の値が減少している。観測された蛍光寿命の細胞内pH依存性は、細胞内でのNADHとタンパク質との分子間相互作用のpH変化を観測していると考えられる。細胞内での蛍光減衰曲線は3成分の指数関数にて再現され、すべての成分の蛍光寿命が細胞内pHの増加に対して減少することがわかった。

実際に、HeLa細胞内におけるNADHの蛍光寿命イメージングの細胞内pH依存性を測定した結果をFig. 3に示す。Fig. 3において、上がHeLa細胞内のNADHの蛍光強度画像、下が対応する蛍光寿命画像である。細胞内pHは強度画像の上に示してある。蛍光強度画像では、NADHの細胞内濃度に応じて蛍光強度に細胞内位置依存性があり、強く光っている領域がミトコンドリア、強度が弱い円形の領域が核に対応する。一方、蛍光寿命画像では、細胞内pHが小さくなるにつれて、蛍光寿命の値が長くなっている。ミトコンドリアと核内でのNADHの蛍光寿命の細胞内pH依存性をFig. 4に示す。細胞内pHの増加に対してNADHの蛍光寿命が単調に減少している。また、蛍光寿命には細胞内位置依存性があり、核内のNADHの蛍光寿命が、他の領域よりも短くなっている。イオノフォアを用いてFig. 4のようなNADHの蛍光寿命と細胞内pHとの間の検量線を作成することによって、細胞内pHを蛍光色素で染色することなく無染色で定量イメージング測定が行えることがわかる。我々の知る限りでは、細胞内イオン濃度を無染色でイメージングした初めての例となる。

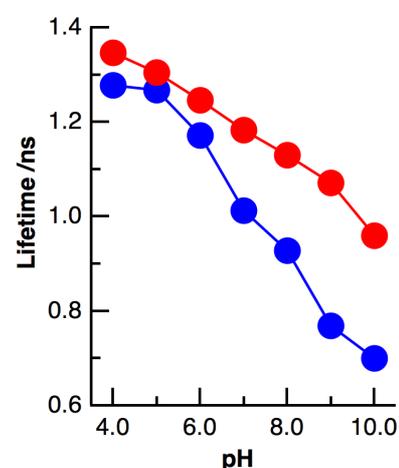


Fig. 4 Plots of the fluorescence lifetimes as a function of pH using the values obtained at mitochondria (red) and at nuclei (blue).

1. 中林, 太田 光化学 42 (2011) 52.
2. 中林, 太田 日本レーザー医学会誌 30 (2010) 441.
3. N. Ohta, T. Nakabayashi *Molecular Nanodynamics* (Wiley-VCH) (2009) 607.
4. 中林, 太田 分析化学 58 (2009) 473.
5. 中林, 太田 ナノイメージング (エヌ・ティー・エス) (2008) 245.
6. 中林, 太田 ぶんせき (2007) 597.
7. S. Ogikubo, et al. *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 10385.

ナノ秒パルス電場誘起細胞機能変化と蛍光寿命イメージング分光

(北大電子研) Kamlesh Awasthi・中林 孝和・本間 将人・太田 信廣

Monitoring Response of Cells to Nanosecond Pulsed Electric Fields with Fluorescence Lifetime Microscopy

(RIES, Hokkaido Univ.) K. Awasthi, T. Nakabayashi, M. Honma, N. Ohta

【序】 細胞内には実験室系では達成することができないような強い局所電場が存在することが指摘されている。また、細胞への電場印加は電気穿孔法(Electroporation)として広く用いられており、外部電場により細胞膜に可逆的な細孔を空け、細胞内に遺伝子や薬剤を導入できることが知られている。一方、ナノ秒、ピコ秒の非常に短いパルス幅の電場を細胞に印加することにより、細胞膜を傷つけることなく、細胞内部の状態を変化させられることが指摘されている[1-3]。したがって、細胞内外の電場を組み合わせることにより細胞内のダイナミクスや機能の制御が可能であり、様々な応用も可能と考えている。本研究では、蛍光寿命イメージングシステムにマイクロ電極チャンバーを組み合わせ、細胞へのナノ秒パルス電場効果を単一細胞レベルで調べる実験を行った。楕円形金電極間で培養したHeLa細胞にナノ秒パルス電場を印加し、プログラム化された細胞死であるアポトーシスを誘起することができることを示すことができた。

【実験】 製作した楕円形金電極のパターンとそのイメージ像をFig. 1に示す。細胞の電極チャンバーとして、カバーガラス上に楕円形金電極を作成している。約0.1 mmの金電極の間隙で細胞を培養し、細胞の外部電場による変化について、倒立型の蛍光寿命

イメージングシステムを用いて観測する。40 Vの電圧で約4 MV m⁻¹の電場を試料に印加することができる。電極の高さは、約0.02 mmである。ナノ秒パルス電場の印加は、自作のパルス電場発生装置を用い、繰り返し周波数1 kHz、パルス幅は約50 nsである。細胞は蛍光タンパク質(EGFP)が発現した付着細胞であるHeLa細胞を用いた。Fig. 2に0.1 mmの金電極の間隙内で培養されたHeLa細胞の明視野画像を示す。上下の金

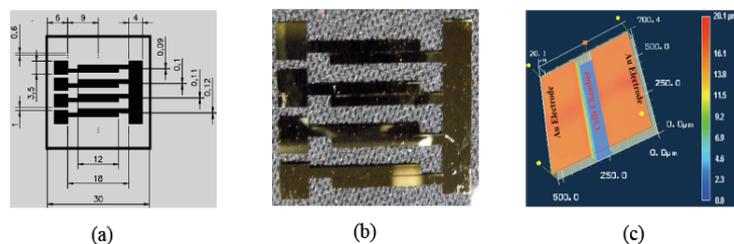


Fig. 1 (a) Design of the electrode microchamber. (b) Top view of the four-channel Au electrodes constructed on a cover glass. (c) 3D-image of the electrode.

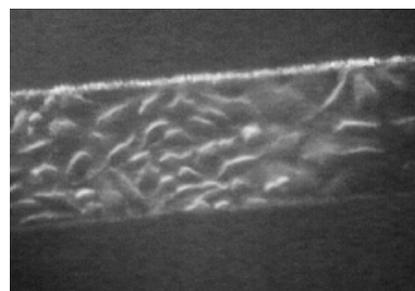


Fig. 2. Image of HeLa cells in spacing of the constructed Au electrodes.

電極の間に多数の細胞が付着していることがわかる。蛍光寿命イメージングシステムは、フェムト秒レーザーと共焦点蛍光顕微鏡を用い、画像の各点において時間ゲート法によって蛍光寿命画像を得る構成とした[4]。励起波長と蛍光波長は、それぞれ440 nmと515-560 nmである。

【結果】 Fig. 3に単一HeLa細胞のナノ秒パルス電場効果の一例を示す。(A)が電場印加前、(B)が 4 MV m^{-1} のパルス電場を1kHzで60秒間印加した後に測定した画像である。左がHeLa細胞内のEGFPの蛍光強度画像、右が対応する蛍光寿命画像であり、電場印加前と印加後の蛍光寿命のヒストグラムをFig. 3Cに示す。電場を印加することによって、アポトーシス特有の構造が観測される (Fig. 3B)。さらに外部電場によりEGFPの蛍光寿命が短くなる。印加前が約2.3 nsであるのに対し、印加後は約2.1 nsとなった。外部電場が無いときには、蛍光強度および蛍光寿命画像共に時間変化がないことから、ナノ秒パルス電場によってアポトーシスを誘起できたことがわかる。細胞にアポトーシスを起こすためには、アポトーシス誘導試薬を細胞に導入する方法が一般に用いられる[5]。本結果は、ナノ秒パルス電場を用いることにより、試薬を必要とせずに短時間でアポトーシスを誘起できることを示している。

EGFPはポリペプチド鎖の円筒の内部に、発色団が存在する構造を持つ。パルス電場の印加によりアポトーシスが誘起され、発色団周囲の環境の変化に伴ってEGFP発色団周囲の局所電場が変化し、発光状態の無輻射緩和速度が増加すると考えている[5]。EGFPが発現したHeLa細胞の蛍光寿命ヒストグラムについて、印加パルス電場数依存性の結果をFig. 4に示す。5から20パルスの印加でも蛍光寿命ヒストグラムに変化が観測される。アポトーシス特有の細胞の形態像の変化は、20パルス程度では全く観測されないことから、EGFPの蛍光寿命を用いることによって、アポトーシスの初期過程を高感度に検出できることを示唆している。

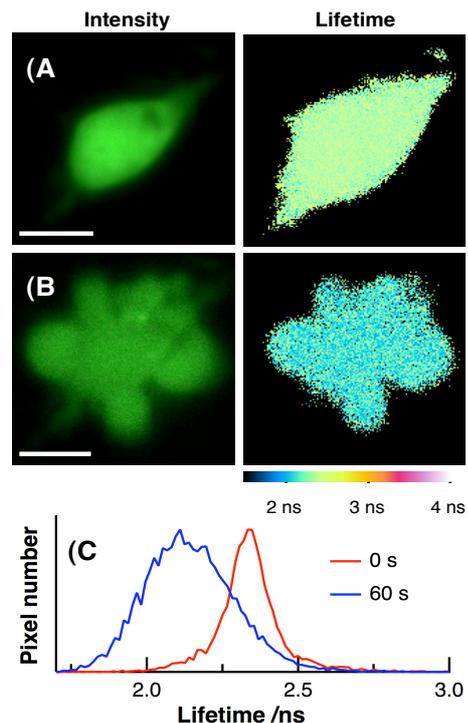


Fig. 3 Fluorescence intensity images (left) and fluorescence lifetime images (right) of a HeLa cell expressing EGFP before (A) and after (B) application of nanosecond pulsed electric fields. The histograms of the fluorescence lifetime of the images of (A) and (B) are shown in (C). Scale bars are 20 μm .

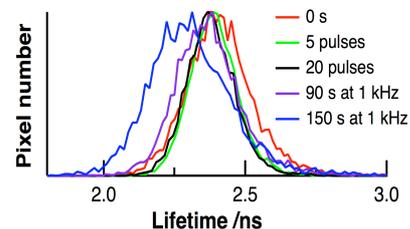


Fig. 4 The histograms of the fluorescence lifetime of HeLa cells expressing EGFP before and after application of five and twenty nanosecond pulses of 4 MV m^{-1} . The histograms of the same cells after application of 4 MV m^{-1} at 1 kHz for 90 s and 150 s are also shown in this figure.

- [1] Y. Sun, et al. **IEEE Trans. Nanobiosci.** 4 (2005) 277.
- [2] K. H. Schoenbach, et al. **IEEE Trans. Plasma Sci.** 36 (2008) 414.
- [3] L. Tang, et al. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 390 (2009) 1098.
- [4] N. Ohta, et al. **SPIE**, 7190 (2009) 71900R1.
- [5] T. Ito, et al. **Photochem. Photobiol. Sci.** 8 (2009) 763.

振動和周波検出赤外超解像顕微鏡による日本人黒髪の 超解像赤外分光イメージング

(東工大・資源研) 酒井誠、菊地克也、田島朋樹、藤井正明

Super-resolving IR imaging of Japanese black hair by using VSFG detected IR super-resolution microscope

(Tokyo Tech.) Makoto SAKAI, Katsuya KIKUCHI, Tomoki TAJIMA, Masaaki FUJII

【序】毛髪はケラチタンパク質からなる直径 30-120 μm 程度の階層構造をもつ繊維である。日本人黒髪の毛髪横断面の透過像を図 1 に示すが、中心部がメデュラ、外側を覆っている薄い層がキューティクルであり、メデュラとキューティクルの間の毛髪の85%以上の大部分を占めるのがコルテックスである。コルテックス領域では、 α ヘリックス構造のケラチタンパク質が繊維状に集合して中間径フィラメント (IF) を形成し、毛髪の伸長方向にファイバー状に並んでいることが知られている[1]。近年、毛髪のマクロ形状や物性にはコルテックスの内部微細構造が大きな影響を与えたとの観点から振動分光を中心とした内部構造解析が行われてきた。その一方で、黒髪にはメラニンという色素 (図 1 中のコルテックス領域に色の濃い部分として観察されている) が多く含まれており、蛍光を発するため通常のラマン顕微鏡による観察は困難であり、測定には脱色処理をした毛髪や白髪などメラニンが少ないものを用いる必要がある。また、赤外顕微鏡では、空間分解能が赤外波長で一意にきまる回折限界によって制限されてしまい10 μm 程度と極めて低く、コルテックス内部の局所的な観察は事実上不可能であった。

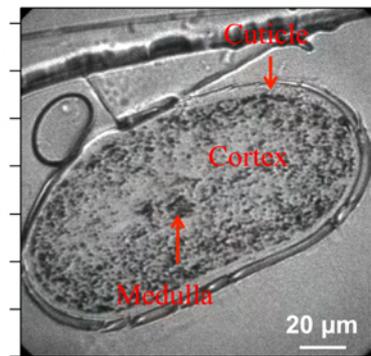


図 1: 日本人黒髪の横断面の透過像 (試料の厚さ: 3 μm)

本研究では、振動和周波発生 (VSFG) 法を光学顕微鏡技術に応用し、赤外光の回折限界を突破した高い空間分解能 (すなわち赤外超解像) を有する赤外顕微鏡[2]を用いて日本人黒髪の超解像赤外分光イメージングを行った。本手法では、メラニンの発光よりも短波長に発生する VSFG 光を検出するため、脱色処理等の必要なくそのまま日本人黒髪の観察が可能であると同時に、空間分解能も VSFG 光の波長 (すなわち可視波長) で一意に決まる回折限界まで向上できるため、図 1 の透過像と同程度の解像度で赤外分光イメージングが可能である。加えて、VSFG 法は 2 次の非線形光学過程であり、非線形感受率 χ^2 に依存するため、反転対称性の破れる表面 (界面) に極めて敏感である。このため、表面に積層した膜構造の観測や表面に吸着した分子配向の観測など数多くの表面 (界面) の分子科学的研究が行われてきた。今回我々は、VSFG 法の特徴である分子配向に関する情報の抽出も期待して超解像赤外分光イメージングを行った。

【実験】励起光源である赤外光と可視光は再生増幅器によって増幅された Ti : Sapphire レーザーのピコ秒パルス波長を波長変換することで得られ、それぞれ赤外光 5-9 μm (1111-2000 cm^{-1}) および可視光 613 nm の光を用いた。これらの光をビームコンバイナーで同軸に合わせ、 CaF_2 レンズ ($f = 100 \text{ mm}$) を用いて毛髪試料に照射した。試料からの VSFG 光は背面から対物レンズ ($\text{NA} = 0.4$) を用いて集め、ノッチフィルター、赤外カットフィルター、バンドパスフィルターを通した後に

結像レンズにより ICCD カメラ上に結像した。毛髪試料には、日本人の黒髪をエポキシ樹脂に包埋した後、マイクロトームで毛髪横断面を切り出し CaF₂ 基板上に載せ、エタノールで馴染ませることにより基板上に半固定したものをを用いた。毛髪の厚さは 3 μm である。毛髪試料は花王株式会社の伊藤隆司博士、長瀬忍氏に提供して頂いた。

【結果と考察】日本人黒髪に VSFG 法を適用し、超解像赤外分光イメージングを行った結果を図 2 に示す。(a) は透過像である。(b) は (a) に対してアミド III バンドの振動数に相当する赤外光 (1260 cm⁻¹) を入射して得られた赤外イメージである。その結果、コルテックス領域では強い発光が観測されるとともに、通常の赤外顕微鏡では観察不可能な、約 1 μm の微小構造 (透過像中で見られるような濃淡) が明瞭に観察されている。前述したように、コルテックス領域には α ヘリックス構造のケラチタンパク質が多く存在しており、今回の結果はアミド III バンド領域において高感度で α ヘリックス構造を検出したものと結論した。一方で、メデュラやキューティクルの発光は非常に弱い、または、全く観測されないことが明らかになった。メデュラ部分は籠がいくつも重なったような形をしており、非ケラチタンパク質で構成されているといわれているため、VSFG 発光が弱いと考えられる。また、キューティクル領域ではケラチタンパク質がランダムコイル構造をとっていると報告されている[1]。ランダムコイル構造の場合、2 次の非線形感受率 χ^2 がほぼ 0 となるので理論上 VSFG は発生しない。これはキューティクル領域から VSFG 発光が全く観測されないことと良い一致を示す。

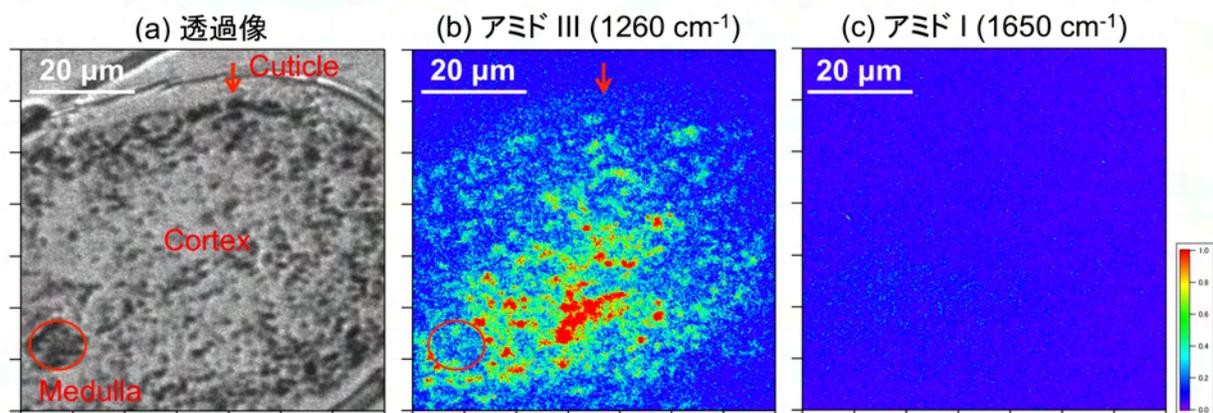


図 2：日本人黒髪の超解像赤外分光イメージング。
(a) 透過像、(b) アミド III における赤外像、(c) アミド I における赤外像

図 2 (c) は赤外振動数をアミド I バンド (1650 cm⁻¹) に変えて赤外イメージングを行った結果である。アミド III バンドの結果と相反して、発光がまったく観測されていないことが明らかとなった。アミド I バンドは主に C=O 伸縮振動モードに対応し、アミド III バンドは C-N 伸縮振動モードに対応する。α ヘリックス構造の場合、両者の振動モードは垂直な関係にあり、分子配向が VSFG 発光強度に大きく影響を与えたことが考えられる。今回の測定においては、α ヘリックス構造がアミド III のみ検出可能な方向へ配向していることを強く示唆している。講演では、測定条件からの検討も含めて分子配向について詳細に議論する。

【参考文献】 [1] Nagase, S.; Shinozaki, T.; Tsuchiya, M.; Tsujimura, H, *J. Soc. Cosmet. Chem.* **43** (2009) 3. [2] Inoue, K.; Fujii, M.; Sakai, M, *Opt. Express* **17** (2009) 12013.