

2P096 ラマン分光法を用いた細胞内環境および細胞内分子の その場解析

(東北大薬¹, 東北大院薬²) ○竹内 瑞貴¹・堀井 湧介²・平松 弘嗣^{1,2}・
中林 孝和^{1,2}

In situ observation of environments and molecules inside cells using Raman
spectroscopy

(Tohoku Univ.) ○M. Takeuchi¹・Y. Horii²・H. Hiramastu^{1,2}・T. Nakabayashi^{1,2}

【序】 各種外来刺激に対する細胞内環境の変化や細胞内にある生体分子の構造変化のその場観測を行うことを目指している。本発表では、ラマン分光法を用いた結果について報告する。ラマン分光法は、細胞内分子の構造情報を直接得ることができ、また分子間振動バンドの観測から、細胞内分子の分子間相互作用に関する知見を得ることができる。蛍光顕微観測では得ることが難しい分子の微小構造変化や細胞内環境変化の情報を得ることが期待される。さらに、細胞内分子を測定することで、ラベルフリーでの研究が可能であるなどの利点を持つ。

本研究では、深紫外共鳴ラマン分光法と低振動ラマン分光法の結果を中心に紹介する。励起光の波長と深紫外域にあるタンパク質のアミノ酸残基の吸収波長を一致(共鳴)させることによって、アミノ酸残基のラマン散乱強度を顕著に増加させることができる。細胞内測定においても、深紫外共鳴ラマン分光法は有効であり、細胞内にある生体分子のラマンスペクトルを高感度に測定することができる。細胞内分子の深紫外共鳴ラマンスペクトル変化から、外部摂動に対する細胞内の状態変化について様々な情報を得ることが期待される。

低波数領域の振動スペクトルの測定によって、主に分子間振動バンドを観測することができ¹、近年テラヘルツ領域のスペクトルとして盛んに研究が行われている。細胞は分子クラウディングと呼ばれる無数の生体分子で高度に混み合っている状態であることが知られており、細胞内の低波数領域のラマンスペクトルを測定することによって、細胞内の分子クラウディング状態の外部摂動による変化を測定することを目的とした。

【実験】 深紫外共鳴ラマン測定では、光源にイントラキャビティのAr⁺レーザー(Coherent)を用い、芳香環を持つアミノ酸残基やヒスチジンが吸収する244と229 nmを励起波長とした²。低振動ラマン測定は、顕微ラマン分光装置(日本分光)を用いている。試料には人由来の細胞株であるHeLa細胞を用い、大量培養および遠心分離器で回収・洗浄した後、回転セルに導入し、深紫外共鳴ラマン測定を行った。低振動ラマンおよび非共鳴ラマンスペクトルの測定では、ディッシュ内で培養された状態で単一細胞レベルの測定を行った。

【結果・考察】 <深紫外共鳴ラマン> Fig. 1に HeLa 細胞のラマンスペクトルについて、深紫外である 229 nm 励起光とした共鳴ラマンスペクトルと 488 nm を励起光とした非共鳴ラマンスペクトルを比較した結果を示す。非共鳴ラマンでは、脂質のバンドやタンパク質のアミドバンドが観測されるのに対し、229 nm 励起では、共鳴するトリプトファン(W)とチロシン(Y)のラマンバンドが選択的に観測されることがわかる。

深紫外共鳴ラマン散乱を用いた細胞内計測として、pH 依存性について検討した。HeLa 細胞を懸濁させる緩衝液の pH を変化させ、HeLa 細胞の深紫外ラマンスペクトルを測定した (Fig. 2)。各 pH で測定したスペクトルをチロシン Y9a のバンド強度で規格化した。pH の増加に従って、チロシンのラマン強度に対するトリプトファン (W) のラマン強度が増加することがわかる (Fig. 3)。トリプトファン残基のモデル化合物とチロシンの混合溶液の光退色の実験では、pH による相対強度の変化や光退色に差が見られないことから、相対強度の pH 依存性は、細胞内のトリプトファンの吸収の pH 変化を共鳴ラマンバンドの変化として観測していると考えられる。

<非共鳴ラマン> ガラスベースディッシュ上の HeLa.S3 細胞について、共焦点条件下で低振動ラマンスペクトルの測定を行った (Fig. 4)。主に水の分子間振動のラマンバンドが観測されている。細胞に焦点を合わせたときと周囲の培地 (水溶液) のラマン強度を比較すると、 180 cm^{-1} 付近のブロードなバンドが細胞内は細胞外と比べて強度が低くなっている。水を含めた細胞内分子の低振動ラマンスペクトルを観測しており、現在、細胞死などに伴う変化について検討している。

講演では他の波数領域の可視ラマンスペクトルを解析した結果およびポリエチレングリコール水溶液を用いて分子クラウディング状態を模倣した系と比較した結果について紹介する。

1. T. Nakabayashi, N. Nishi, J. Phys. Chem. A 106 (2002) 3491. 2. T. Fujimaki, K. Nishiya, T. Miura, T. Nakabayashi, submitted.

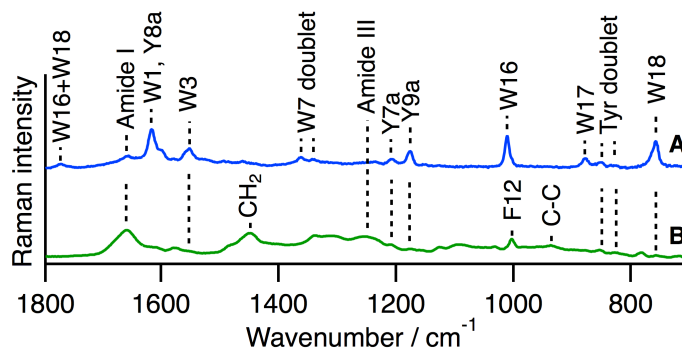


Fig. 1. HeLa 細胞の深紫外共鳴 (A, 229 nm 励起) および非共鳴 (B, 488 nm 励起) ラマンスペクトル

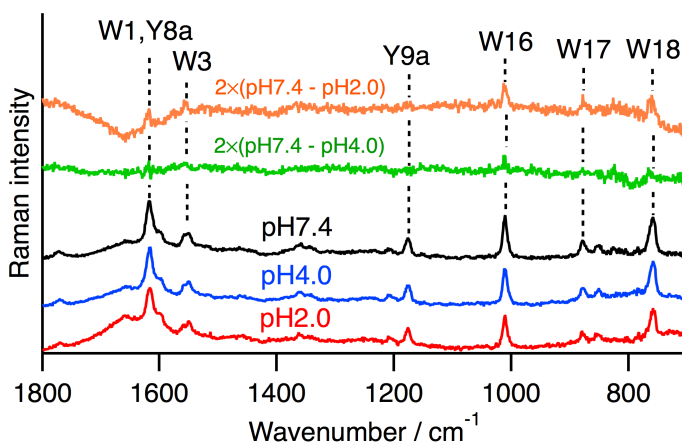


Fig. 2. HeLa 細胞の深紫外共鳴ラマンスペクトルの pH 依存性。各スペクトルは Y9a 強度で規格化している。異なる pH 間での差スペクトルを上 2 つに示す。

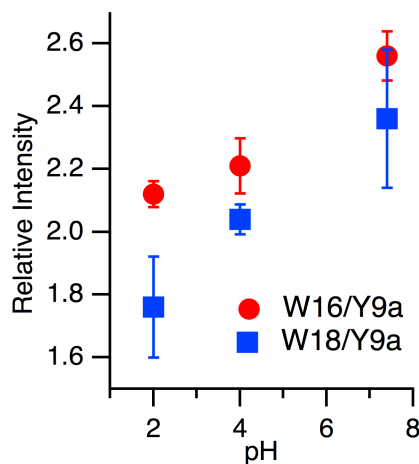


Fig. 3. Y9a に対する W16, W18 相対強度の pH 依存性

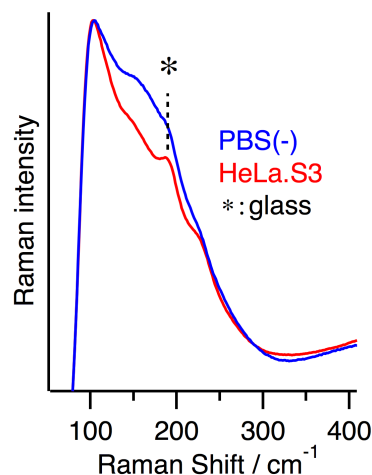


Fig. 4. HeLa.S3 細胞の低振動ラマンスペクトル。488 nm 励起。* はガラスによる散乱。