

## ストップフローと過渡回折格子法を組み合わせた 蛋白質反応検出法

<sup>1</sup>京大院理

○中曽根祐介<sup>1</sup>, 宝本俊輝<sup>1</sup>, 寺嶋正秀<sup>1</sup>

### Time-resolved study of protein reactions using the transient grating method combined with a stopped-flow apparatus

○Yusuke Nakasone<sup>1</sup>, Shunki Tarakamoto<sup>1</sup>, Masahide Terazima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Kyoto University, Japan

**【Abstract】** The transient grating (TG) method is a unique and powerful technique to study the reaction dynamics of protein from the view point of diffusion coefficient ( $D$ ) change.<sup>1</sup> In order to detect the TG signal, however, the reaction must be triggered by light, and consequently, the target had been limited to photosensor proteins. In this study, we combined the TG method with stopped-flow technique to expand the number of target molecule. In order to optimize the system (e.g. mixing efficiency, time resolution, sample consumption), we have developed a new stopped-flow apparatus utilizing a microchannel mixing cell. Using this system, we can monitor the protein reactions with only 2  $\mu$ l sample consumption for a mixing. Additionally, we labeled proteins with a photochromic compound to detect the TG signal and succeeded in detection of  $D$  change upon mixing of two solutions. We will present the detail of the system and application to protein reactions at the conference.

**【序】** 過渡回折格子 (TG) 法を用いることで、吸収変化では捉えきれないタンパク質の構造変化や分子間反応を、拡散係数変化という観点から高感度に時間分解検出できる<sup>1</sup>。しかし、その原理上、光で反応を駆動できる対象にのみ適用可能であったため、測定対象は光センサー蛋白質に集中していた。そこで我々は、研究対象の飛躍的な拡大を目的とし、ストップフロー (SF) 法と TG 法を組み合わせた新規手法 (SF-TG 法) の開発に取り組んだ。つまり溶液混合により反応を開始し、その後のタンパク質ダイナミクスを TG 法により高感度に検出することがねらいである。これにより酵素反応やタンパク質複合体の離合集散過程、シグナル伝達反応やフォールディング反応など様々な系に適用可能な新規手法が誕生する。ただし、TG 信号を得るためには光に反応する目的分子が必要であり、また高速混合後の乱流が残っていると拡散係数を正確に決定できない。本研究では、これらの問題点を克服し SF-TG を実用化するために、ストップフロー装置を新規に開発し、光反応性の無いタンパク質から TG 信号を得るための工夫を行った。本討論会では技術開発の詳細に加え、実際にタンパク質の集合反応 (時計タンパク質 KaiC のヘキサマー形成反応) を捉えた例を報告する。

**【方法】** SF-TG 法の実用化に向けて取り組むべき課題は以下の 3 点である。

- ① サンプル消費量の低減：一回の混合に要するサンプル量を極限まで抑える。
- ② 時間分解能の向上：溶液の高速混合により生じる乱流を短時間で止める。
- ③ S/N 比の高い TG 信号の取得：光反応性分子でタンパク質をラベルする。

これらの課題を達成するために、まずストップフロー装置を独自に開発し、マイクロ流路を用いた溶液混合を行った。混合部および測定窓を小型化することで一度の測定に要するサンプル量を約  $2\ \mu\text{l}$  に抑えることに成功した（市販の装置： $200\ \mu\text{l}$  程度）。また素早く乱流を止めるために、応答速度の高いバルブを配置して流路の開閉を高速制御するシステムを立ち上げた。これにより、TG 測定におけるデッドタイムが  $70\ \text{ms}$  まで改善した（市販の装置： $1\ \text{s}$  程度）。さらに S/N 比の高い TG 信号を得るためにフ

ォトクロミックな分子であるスピロピランでタンパク質をラベルし、紫外光励起に伴う吸収スペクトル変化を利用して TG 信号を得ることに成功した。Fig.1 に TG 法の概略図（測定波長）およびスピロピランでシアノバクテリア由来の時計タンパク質 KaiC をラベルして実

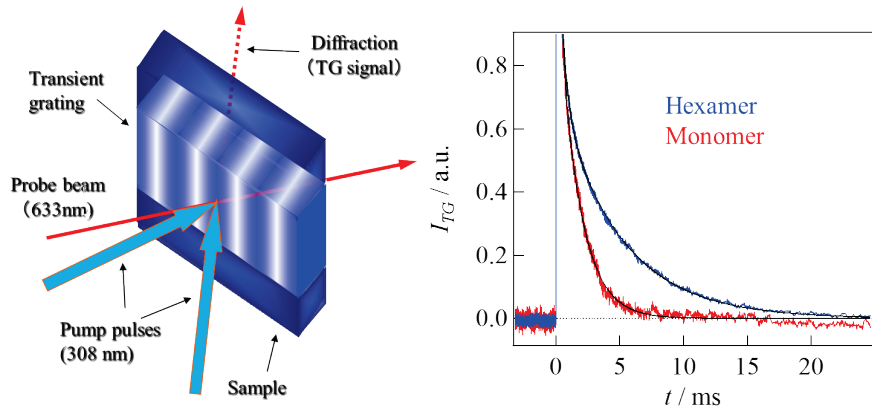


Fig.1 (left) Setup for TG measurement. (right) TG signals of monomer and hexamer of KaiC. 実際に得られた TG 信号を示す（モノマー（赤）とヘキサマー（青）の分子拡散信号）。

【結果・考察】 KaiC は ATP 非存在下ではモノマーとして、ATP 存在下ではヘキサマーとして存在する。Fig.1 に示したようにモノマーとヘキサマーは異なる拡散係数を持つことがわかった ( $D_{\text{monomer}} = 8.8 \times 10^{-11}\ \text{m}^2/\text{s}$ ,  $D_{\text{hexamer}} = 3.7 \times 10^{-11}\ \text{m}^2/\text{s}$ )。そこで、モノマー-KaiC と ATP を高速混合し、その後の拡散係数変化を捉えることで、ヘキサマー形成ダイナミクスの検出を行った。Fig.2(left) に高速混合後の遅延時間を変えて測定した TG 信号を示す。

遅延時間を長くするほど、拡散信号の減衰速度が遅くなる様子が観測されたが、これはヘキサマーの形成過程を捉えていることに他ならない。各遅延時間で得られた拡散係数をプロットすると Fig.2(right)

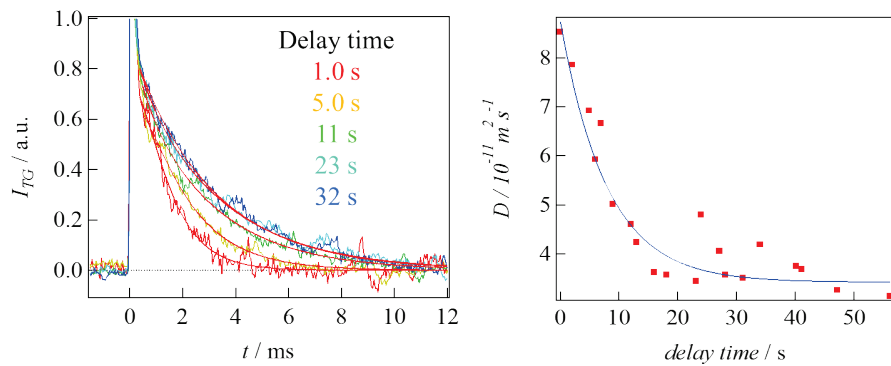


Fig.2 (left) TG signals obtained at several delay times. (right)  $D$  value against delay time.

のような時間変化を示した。一指数関数でよく再現でき、得られた時定数は  $7.9$  秒であった。Fig.3 にヘキサマー形成過程のスキームを示す。

KaiC はモノマーがアグリゲーションしやすく、きれいな信号が取れていないため、現在はモノマーを安定化する条件下で再実験を行っている。KaiC 複合体の離合集散はヘキサマー間でのモノマーユニットの交換反応に重要と考えられており、本研究で得られた知見はそのダイナミクスを知る手がかりになると期待される。

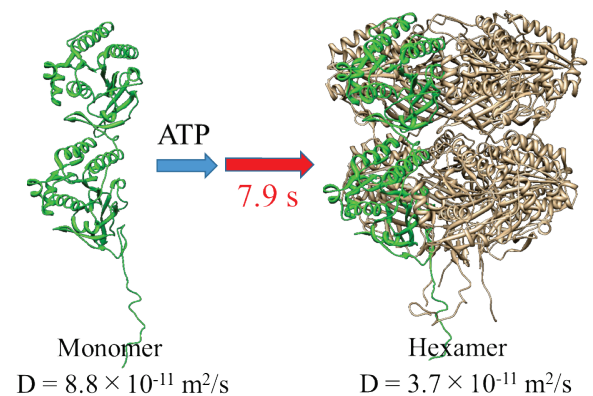


Fig.3 Reaction scheme of hexamer formation of KaiC

【参考文献】 [1] M, Terazima. *Phys Chem Chem Phys.* **13**, 16928 (2011).

## 全反射顕微鏡を用いた蛍光寿命相関分光法の開発と生体膜研究への応用

埼玉大院理工

○乙須拓洋, 山口祥一

## Development of total internal reflection fluorescence lifetime correlation spectroscopy and its application to the study of biomembrane

○Takuhiro Otsu, Shoichi Yamaguchi

Department of Applied Chemistry, Saitama University, Japan

**【Abstract】** Biological membrane is a complex lipid bilayer which is composed of lipids, membrane proteins, cholesterol, and so on. To fully understand the relationship between the complexity of the membrane and various biological functions expressed on the membrane, one needs to analyze the dynamics of multiple molecules simultaneously. To this aim, we developed fluorescence lifetime correlation spectroscopy with total-internal reflection microscopy (TIR-FLCS). High depth resolution achieved by the evanescent-wave and the correlation analysis of fluorescence lifetime in TIR-FLCS enables us to elucidate the diffusion and the conformational dynamics of multiple molecules in/on a supported lipid bilayer (SLB), a model membrane formed on a glass coverslip, without suffering from the substantial background signals from the bulk phase. The usefulness of TIR-FLCS is demonstrated by analyzing the diffusion of fluorescent lipids in inner and outer leaflets of SLB.

**【序】** 生体膜は様々な組成の脂質や膜蛋白質, コレステロールなどからなる非常に複雑な二次元膜であり, その複雑性により生体膜特有の機能を発現している. それゆえ生体膜機能の真の理解のためには, 生体膜を構成する様々な分子の動きを同時計測し, それらの協動的な挙動について理解する必要がある. この点に関して, 我々は蛍光寿命の違いに基づいて試料内の異なる分子種を検出, 解析する手法として二次元蛍光寿命相関分光法 (2D FLCS) の開発とその応用を行ってきた[1,2]. 本研究ではこれまで主に水溶性生体高分子を対象として応用がなされてきた 2D FLCS を生体膜研究に応用するため, 全反射顕微鏡 (TIR) と 2D FLCS を組み合わせた新たな手法として TIR-FLCS の開発を行った.

**【方法】** Fig. 1 には開発を行った装置の概略図を示す. 装置の基本設計は通常的全反射顕微鏡と同様だが, 蛍光寿命の相関解析を行うためパルスレーザーと単一光子検出器を導入している. パルスレーザーにはピコ秒ダイオードレーザー (510 nm, 50 MHz) を用い, 検出されるすべての蛍光光子に対して, 実験開始からの検出時間であるマクロタイム( $T$ )と励起パルスから蛍光光子検出までの発光遅延時間であるミクロタイム( $t$ )を記録した. 解析では得られた光子データをもとに異なる $\Delta T$ での二次元発光遅延時間マップを作成し, global 2D MEM 解析を行うことで独立蛍光寿命成分の抽出を行った[1]. その後得られた独立蛍光寿命成分から各成分の蛍光減衰カーブを算出し, それらを FLCS 解析に適用することで各成分の相関カーブを抽出した[3] (Fig. 2).

**【結果・考察】** Feasibility Study として, 蛍

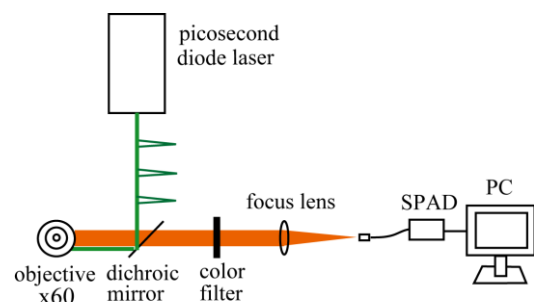
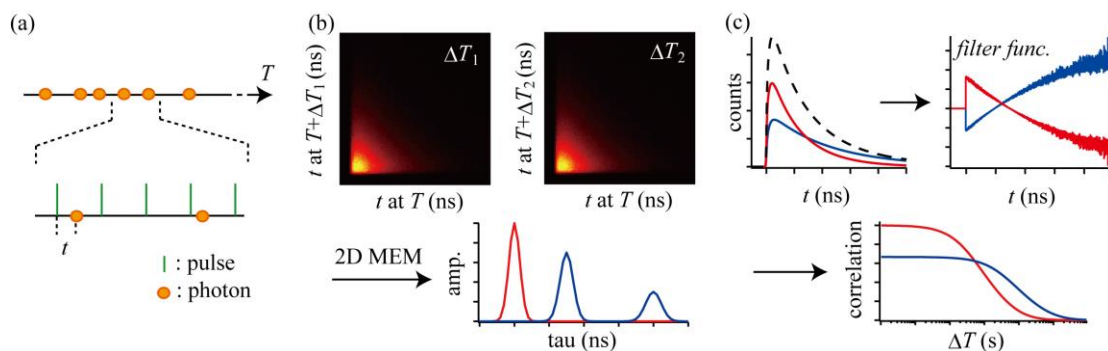


Fig.1. TIR-FLCS instrument

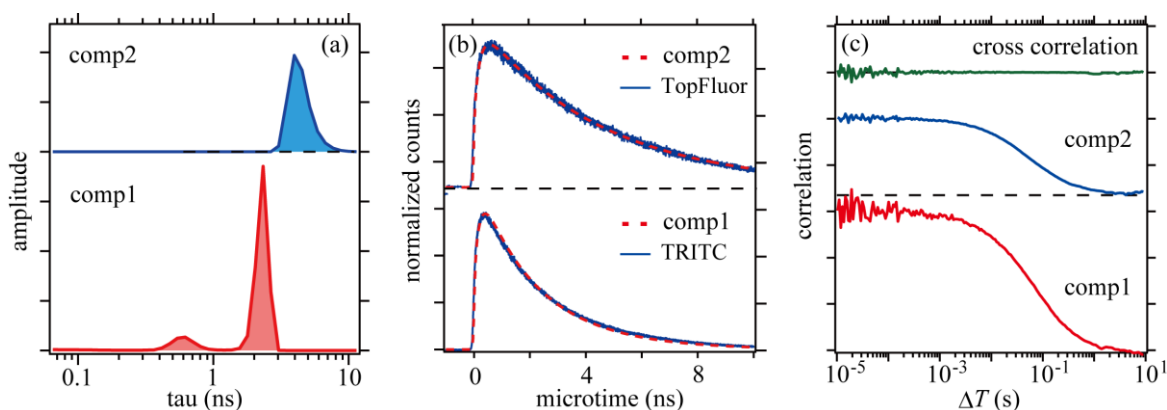


**Fig.2.** (a) Schematic of photon data. (b) 2D FLCS. (c) FLCS.

光寿命の異なる 2 つの蛍光脂質 (TRITC-DHPE, TopFluor PC) を含む支持脂質二重膜 (SLB) をガラス基板上に作製し, 2 成分の検出ならびに各相関カーブの抽出を試みた. まず得られた光子データに対し 2D FLCS により独立蛍光寿命成分を抽出した. 結果を Fig.3a に示すが, 解析の結果 2 成分が検出された. そこでこれらの成分について帰属を行うべく, ラプラス変換を行うことで蛍光減衰カーブを算出し, 各蛍光脂質単独で別途測定した蛍光減衰カーブと比較を行った. その結果, 短寿命成分である comp1 は TRITC-DHPE, 長寿命成分である comp2 は TopFluor PC のデータと良好な一致を示した (Fig. 3b). この結果は, 2D FLCS により膜中に含まれる 2 つの分子種の蛍光寿命を正確に解析できることを示す結果となった.

次に各成分の蛍光相関カーブを抽出すべく, 2D FLCS で得られた蛍光減衰カーブを用いてフィルター関数を算出し, FLCS により各蛍光脂質の蛍光相関カーブの解析を行った. 得られた結果を Fig. 3c に示す. 図に示すように, 両成分の拡散時間はほぼ同じ値を示した. またこれらの拡散時間は各蛍光脂質単独で得られた拡散時間と良好な一致を示した. さらにこれら 2 成分の相互相関を算出した結果, 相互相関は解析を行った全  $\Delta T$  領域にわたり  $\sim 1$  であった. この事は TRITC-DHPE と TopFluor PC がお互い独立な分子種であることと整合している. 以上より, 今回開発を行った TIR-FLCS は SLB 中の複数の分子種由来の信号から, 各成分の蛍光寿命ならびに蛍光相関カーブを正確に抽出できる事が示された.

発表では本手法を用いて SLB を構成する 2 つの単脂質膜 (inner leaflet (ガラス基板側), outer leaflet (バルク側)) 中での脂質の拡散を測定した結果について議論を行う.



**Fig.3.** (a) Independent lifetime distributions. (b) Fluorescence decay curves of comp1 (red, lower) and comp2 (red, upper) as well as those of TRITC-DHPE (blue, lower) and TopFluor PC (blue, upper). (c) Autocorrelations of comp1 (red) and comp2 (blue), and the cross-correlation between these components (green).

### 【参考文献】

- [1] K. Ishii and T. Tahara, *J. Phys. Chem. B* **117**, 11414-11422, 11423-11432 (2013).
- [2] T. Otsu, K. Ishii, and T. Tahara, *Nat. Commun.*, **6**, 7695 (2015).
- [3] P. Kapusta, M. Wahl, A. Benda, and J. Enderlein, *J. Fluoresc.*, **17**, 43 (2007).



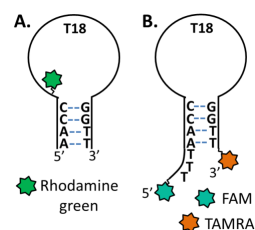
## Development of dynamic quenching based two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy for studying microsecond conformational dynamics of singly labeled biopolymers

○Bidyut Sarkar<sup>1</sup>, Kunihiro Ishii<sup>1,2</sup>, Tahei Tahara<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>*Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN, Japan*  
<sup>2</sup>*RIKEN Center for Advanced Photonics, RIKEN, Japan*

**[Abstract]** Single molecule FRET (smFRET) is widely employed to study conformational dynamics of biopolymers. FRET requires multiple dye labeling and provides conformational information through the distance between two dyes. Here, we report a new method to study microsecond-resolved conformational dynamics of biopolymers with only single dye labeling by combining dynamic fluorescence quenching and two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy (DQ 2D FLCS). Dynamic quenching makes the fluorescence lifetimes of individual conformers different when the solvent accessibility around the dye is different. 2D FLCS distinguishes these conformers and provides their interconversion timescale with  $\mu$ s-time resolution. Applying DQ 2D FLCS to a singly-labeled hairpin DNA, we successfully resolved  $\sim 50$   $\mu$ s dynamics between the ‘open’ and ‘folded’ states. This new method can be utilized to study dynamic changes in the local environment of a biopolymer, which is complementary to the information about global dynamics obtained with smFRET.

**[Introduction]** The functions of biopolymers, such as proteins or polynucleotides, are governed by their conformations, and more importantly, by fluctuations among the conformational ensembles. In contrast to ensemble measurements which observe the average behavior of biopolymers, single molecule measurements can detect individual conformers and their interconversion dynamics. However, conventional smFRET methods can usually probe conformational transitions only on a ms and slower timescales. Moreover, FRET requires multiple fluorophore labeling and is sensitive only for a limited range of dye-pair distance.

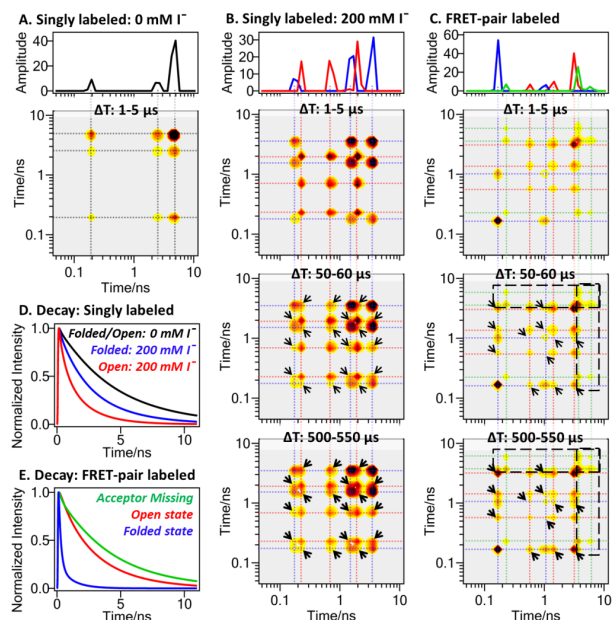
In this work, we report on a single-dye based single molecule method by employing 2D FLCS and dynamic fluorescence quenching. 2D FLCS is a novel single molecule tool that distinguishes the conformers based on their fluorescence lifetimes, and it provides  $\mu$ s-resolved reaction kinetics [1]. Dynamic quenching is a process in which some external quenchers (e.g. iodide ion) non-radiatively de-excite a fluorescent dye by collision [2]. Because dynamic quenching results in shortening of the fluorescence lifetime of a dye, if it is applied to a dye-labeled biopolymer, different conformers become distinguishable with different fluorescence lifetimes reflecting different solvent accessibilities around the dye. We named this new method “dynamic-quenching based 2D FLCS (DQ 2D FLCS)”, and here we report its first application to the conformational dynamics of a singly-labeled hairpin DNA (Fig.1A). For comparison, we also performed conventional 2D FLCS study on a FRET-pair labeled DNA (Fig.1B).



**Fig. 1.** Schematic of (A) singly labeled and (B) FRET-pair labeled hairpin DNA.

**[Methods]** 2D FLCS measurements were performed on 5 nM DNA samples at pH 8 (10mM TRIS-HCl), following a protocol described earlier [1]. 200 mM NaI was used for dynamic quenching experiments. For the control experiments, 200 mM NaCl was used instead of NaI. Individual lifetime distributions and 2D lifetime correlation maps were obtained from the global 2D MEM analyses on 2D emission delay maps as explained in [1].

**[Results and Discussion]** The 2D FLCS measurement on the singly labeled DNA in the absence of a quencher yields a single lifetime distribution (Fig. 2A). In contrast, two lifetime distributions separate out upon addition of the quencher (200 mM I<sup>-</sup>, Fig. 2B). Fig. 2D shows the fluorescence decays calculated from the two lifetime distributions as well as that obtained without the quencher. It is clear that the dye is dynamically quenched in both the states, although the average fluorescence lifetime, i.e. the degree of quenching, is significantly



**Fig. 2.** (A-C) Lifetime distributions of distinguishable species (top panels) and corresponding 2D lifetime correlation maps at specified delay times (bottom panels) for singly labeled DNA without iodide (A) and with 200 mM iodide (B), and for FRET pair labeled DNA (C). The cross-peaks between the blue and red distributions in (B, C) are marked with black arrows. The cross-peaks of the green distribution with red/blue distributions in (C) are expected within the black broken boxes. (D, E) Fluorescence decays of individual states corresponding to the lifetime distributions in A-C are shown in corresponding colors for singly labeled DNA (D) and for FRET-pair labeled DNA (E).

different. Since it is expected that the open state of the hairpin DNA is more solvent exposed than the folded state, we assign the shorter lifetime distribution (red distribution in Fig. 2B) to the open state and the longer one (blue distribution) to the folded state. The multi-peak feature in these lifetime distributions possibly arises from sub- $\mu$ s local dynamics within each state.

The appearance of cross-peaks between the open and folded states is seen in the 2D lifetime correlation map at  $\Delta T=50-60 \mu$ s (Fig.2B, marked with black arrows). It indicates the reaction between these two states. Further intensification of the same cross-peaks indicates the progress of reaction at  $\Delta T=500-550 \mu$ s. A quantitative analysis of the cross-peak intensity suggests  $\sim 50-100 \mu$ s timescale for this dynamics.

The 2D FLCS measurement on the FRET-pair labeled DNA yields three lifetime distributions (Fig 2C; corresponding fluorescence decays are shown in Fig. 2E). We assign the shortest lifetime distribution (blue distribution) to the folded state, because a short dye-pair distance in the folded state should result in high FRET efficiency and a short donor fluorescence lifetime. The red distribution, with longer fluorescence lifetime corresponding to a longer dye-pair distance, is assigned to the open state. These two states show cross-peaks at  $\Delta T=50-60 \mu$ s (Fig 2C, black arrows), which further intensify at  $\Delta T=500-550 \mu$ s. This dynamics is similar to that observed from DQ 2D FLCS. Note that the third state (green distribution) is assignable to acceptor-missing molecules, because it has the longest fluorescence lifetime and shows no cross-peaks with other two states as indicated with the black broken boxes in Fig. 2C.

The 2D FLCS measurement on the FRET-pair labeled DNA yields three lifetime distributions (Fig 2C; corresponding fluorescence decays are shown in Fig. 2E). We assign the shortest lifetime distribution (blue distribution) to the folded state, because a short dye-pair distance in the folded state should result in high FRET efficiency and a short donor fluorescence lifetime. The red distribution, with longer fluorescence lifetime corresponding to a longer dye-pair distance, is assigned to the open state. These two states show cross-peaks at  $\Delta T=50-60 \mu$ s (Fig 2C, black arrows), which further intensify at  $\Delta T=500-550 \mu$ s. This dynamics is similar to that observed from DQ 2D FLCS. Note that the third state (green distribution) is assignable to acceptor-missing molecules, because it has the longest fluorescence lifetime and shows no cross-peaks with other two states as indicated with the black broken boxes in Fig. 2C.

In summary, we developed DQ 2D FLCS method which can investigate  $\mu$ s-resolved dynamics of local solvent accessibility of a singly dye-labeled biopolymer. The application to hairpin DNA showed a consistent result with the FRET-based 2D FLCS measurement. The information about the site-specific solvent exposure obtainable from DQ 2D FLCS shed new light on the dynamics of biopolymers and is complementary to the dye-pair distance information obtained from FRET measurements.

## [References]

- [1] Ishii, K.; Tahara, T. *J. Phys. Chem. B* **117**, 11414 & 11423 (2013).
- [2] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3<sup>rd</sup> ed.; Springer: New York (2006).

## 細胞にナノ秒パルス電場を与えると何が起こるか

<sup>1</sup>台湾国立交通大学・応用化学系, <sup>2</sup>東北大院・薬  
○太田信廣<sup>1</sup>, Kamlesh Awasthi<sup>1</sup>, 中林孝和<sup>2</sup>

**What happens in live cells with application of  
nanosecond pulsed electric field?**

○Nobuhiro Ohta<sup>1</sup>, Kamlesh Awasthi<sup>1</sup>, Takakazu Nakabayashi<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>*Department of Applied Chemistry and Institute of Molecular Science,  
National Chiao Tung University, Taiwan*  
<sup>2</sup>*Department of Pharmaceutical Science, Tohoku University, Japan*

**【Abstract】** Effects of nanosecond pulsed electric field (nsPEF) on dynamics and function of live cells have been examined with fluorescence intensity and lifetime microscopy by detecting autofluorescence of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). Morphological change as well as the change in fluorescence lifetime of NADH have been observed after application of nsPEF having a pulsed width of 10 - 50 ns and a strength of 0 – 45 kV cm<sup>-1</sup>, indicating that apoptosis was induced by nsPEF. Apoptosis induced by nsPEF has been confirmed by comparing the autofluorescence lifetime of NADH after application of nsPEF and the lifetime of NADH obtained after addition of apoptosis inducer (chemicals). It is shown that the measurement of fluorescence lifetime image (FLIM) provides a sensitive and noninvasive detection of the progress of apoptosis induced by application of nsPEFs. It is also shown that autofluorescence lifetime of NADH is different from each other between normal and cancer cells and that the effects of nsPEF on normal and cancer cells are different from each other.

**【序】** 演者らは、これまで、「光」と「電場」をキーワードとして、分子の回転運動や光誘起電子移動反応等のダイナミクスを電場により制御できることを示してきた。そのことは分子集合体である生体における機能やダイナミクスを電場により制御できることを示唆している。ところで、細胞への電場効果として既に **electroporation** として良く知られているものがある。これは細胞に電場を作用していくと、細胞膜表面に電荷が蓄積され、そして膜の反対側には対イオンが蓄積し、膜内の電場勾配が発生し、ついには放電が起こり、膜表面に穴があき、膜内外の浸透性が変化する。このことを利用して、ドラッグデリバリーや遺伝子デリバリーが可能となる。ところで、細胞の状態は等価回路で置き換えることができ[1]、細胞膜における電荷の充電時間を計算してみると 100~200 ナノ秒と予測される。したがって、もし作用する電場のパルス時間幅がこの充電時間よりもはるかに小さい場合は、蓄積が起こる前にパルス電場は細胞内に深く浸透し、細胞内のダイナミクスや機能に影響を与えることが予想される。本研究では生細胞に nsPEF を作用させた時の変化を蛍光顕微分光法により調べた。

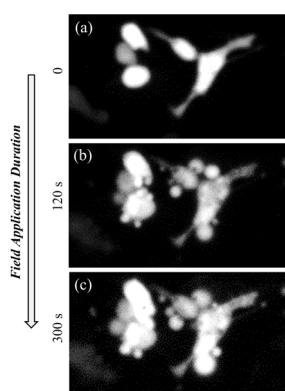
**【方法 (実験・理論)】**

楕型のマイクロ電極 (電極間隔が 100 μm, 深さが 20 μm) を UV-フォトリソグラフィ

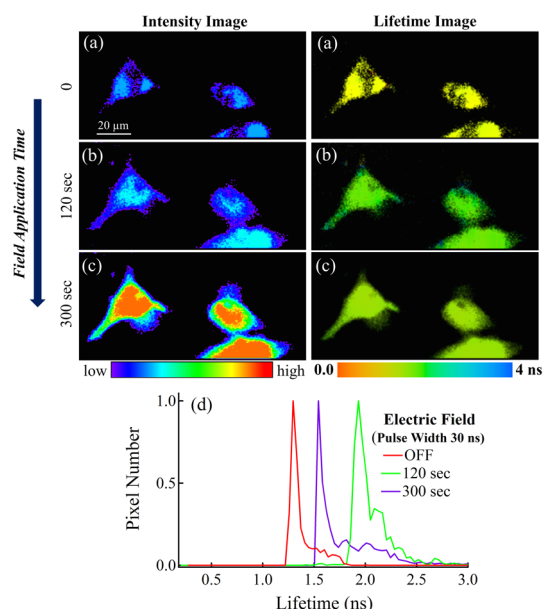
一法にて作成し、この電極間に細胞が入るように培養した [2]。用いた nsPEF のパルス幅は 10、20、30、50 ns であり、印加電場の最大は  $45 \text{ kV cm}^{-1}$  であった。対象とした細胞の一つは HeLa 細胞である。またラット胎児由来の正常細胞と癌細胞を用いた比較も行った。検出に用いた蛍光寿命顕微分光は、フェムト秒チタンサファイアレーザー、時間相関単一光子計数法に基づく蛍光寿命計、および共焦点蛍光顕微鏡を組み合わせた装置を用いて行った。

### 【結果・考察】

緑色蛍光蛋白質 (EGFP) を発現させた HeLa 細胞に nsPEF を作用させると、細胞にもよるが細胞形状の変化 (Fig. 1)、PS 反転、アポトーシス誘導物質をいれた際と同様の EGFP 蛍光寿命の変化、が見られ nsPEF によりアポトーシスが誘導されることがわかる [2]。自家蛍光観測により、細胞内への影響を最小限にすることができることから [3]、NADH 自家蛍光の観測に基づいて、nsPEF 効果を調べた。その一例を Fig. 2 に示す [4]。細胞のモルフオロジーの変化およびアポトーシス誘導物質を導入した際に見られると同様の NADH 蛍光寿命の変化が見られ、これらは電場のパルス幅に依存する。また、正常細胞と癌細胞の NADH の蛍光寿命が観測でき [5]、その nsPEF 効果を調べると、強い電場ではいずれも nsPEF によりアポトーシスを示すが、弱い電場では癌細胞のみがアポトーシスを示すことがわかり、nsPEF を用いた drug free cancer therapy の可能性が示唆される [6]。



**Fig. 1.** Structural change induced by electric field in EGFP-expressing HeLa Cells. Fluorescence intensity image of EGFP as a function of application duration of applied electric field.



**Fig. 2.** Autofluorescence intensity images (left) and the corresponding lifetime images (right) of NADH in HeLa cells, observed before and after the application of electric field with the application time of 120 and 300 s, respectively (from top to bottom). The pulse width of the electric field was 30 ns. The histograms of the autofluorescence lifetime of the images of (a), (b) and (c) are shown in (d).

### 【参考文献】

- [1] K. H. Schoenbach, R. P. Joshi, J. F. Kolb, N. Chen, M. Stacey, P. F. Blackmore, E. S. Buescher, S. J. Beebe, *Proc. IEEE*, **92**, 1122 (2004).
- [2] K. Awasthi, T. Nakabayashi and N. Ohta, *J. Phys. Chem. B* **116**, 11195 (2012).
- [3] N. Ohta and T. Nakabayashi, in *Natural Biomarkers for Cellular Metabolism, Biology, Techniques, and Applications* (eds. Ghukasyan, V. V. & Heikal, A. A.) pp. 41-64 (CRC Press, 2014).
- [4] K. Awasthi, T. Nakabayashi and N. Ohta, *ACS Omega* **1**, 396 (2016).
- [5] K. Awasthi, D. Moriya, T. Nakabayashi, L. Li and N. Ohta, *J. Photochem. Photobiol. B* **165**, 256 (2016).
- [6] K. Awasthi, T. Nakabayashi, L. Li and N. Ohta, *ACS Omega* **2**, 2916 (2017).



## ラマンイメージングによる生細胞内の水の定量

<sup>1</sup>東北大院・薬, <sup>2</sup>千歳科技大

○竹内瑞貴<sup>1</sup>, 梶本真司<sup>1</sup>, 李黎明<sup>2</sup>, 中林孝和<sup>1</sup>

### Quantification of water in living cells by Raman imaging

○Mizuki Takeuchi<sup>1</sup>, Shinji Kajimoto<sup>1</sup>, Liming Li<sup>2</sup>, Takakazu Nakabayashi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

<sup>2</sup> Chitose Institute of Science and Technology

**【Abstract】** We report direct observation of spatial distribution and quantification of water molecules inside a living HeLa cell and a budding yeast cell using Raman images of the O-H stretching band. We found that the O-H stretching Raman intensity of the nucleus was higher than that of the cytoplasm, indicating that water density is lower in the cytoplasm than in the nucleus. The shape of the O-H stretching band of the nucleus is different from that of the cytoplasm, suggesting that hydrogen-bonding networks and/or Raman bands of biomolecules are different between the nucleus and the cytoplasm. The results of intensities of C-H stretching bands also indicated that the concentration of biomolecules in the nucleus is lower than that of the cytoplasm. We concluded that the nucleus is less crowded with biomolecules than the cytoplasm.

**【序】** 本発表ではラマンイメージングを用いた細胞内の水の分布および水素結合状態に関する結果について報告する。細胞内は分子クラウディングといわれる生体分子で高度に混み合う状態であり、排除体積効果、誘電率の変化などの分子クラウディングに伴う効果によって、生体分子の構造および機能が、細胞内と緩衝液中で異なることが知られている。細胞内におけるシグナル伝達も分子クラウディングの影響を強く受けている。分子クラウディングは、細胞内での生体分子の機能を理解する上で重要な要素の一つであるが、分子クラウディングを定量的に評価する方法は確立されていない。蛍光を用いた細胞内の粘性係数、拡散係数の測定では、これらの係数の変化が、細胞内の巨視的な係数の変化なのか、色素と生体分子の過渡的な吸着の影響なのかを簡単に判別することができない。蛍光分光は色素分子を用いた間接的な方法であり、細胞内の分子クラウディングの評価に用いるのは難しいと思われる。

そこで本研究では、ラマン顕微鏡を用いて、分子クラウディングを構成する細胞内の水分子の直接観測を行った。水の O-H 伸縮振動バンドのイメージングを行い、細胞内の水の空間分布をラベルフリーで得ることに成功した。本研究より、核の方が細胞質よりも水の濃度が高く、分子クラウディングの効果が小さいことがわかった[1]。

**【方法 (実験・理論)】** ラマンイメージングには二次元多共焦点ラマン顕微鏡 (Phalanx-R, 東京インスツルメンツ)を用いた。Nd:YVO<sub>4</sub> cw レーザー (Spectra-Physics) を励起光源 (波長 532 nm) とし、10x10 点の格子点状に分割した。励起光を倒立顕微鏡に導入後、油浸対物レンズで試料に集光した。100 点からの散乱光を光バンドルファイバーを用いて分光器と冷却 CCD に導き、100 点のラマンスペクトルを同時に検出した。試料はヒト由来の細胞株である HeLa 細胞と分裂酵母 (*S. cerevisiae*) を用い、ガラスボトムディッシュ内に培養された状態で行った。C-H イメージングには CH 伸縮振動バンドの低波数側の 2846~2913cm<sup>-1</sup>、O-H イメージングには O-H 伸縮振動バンドの高波数側の 3314~3673cm<sup>-1</sup> の領域の積分強度を用いた。

**【結果・考察】** Fig. 1 に単一 HeLa 細胞の C-H イメージング(A)と O-H イメージング(B)の結果を示す. C-H 画像では, 核の方が細胞質よりもラマン散乱強度が低いのに対し, O-H 画像では反対に核の方が細胞質よりも強度が高いという結果が得られた. この結果は, C-H 結合の密度は核よりも細胞質の方が高く, O-H 結合の密度は, 逆に細胞質よりも核の方が高いことを示している. 実際に, 核のスペクトルから細胞質のスペクトルを引いた差スペクトルを求めると, O-H 伸縮振動バンドの領域に正のピークが, C-H 伸縮振動バンドの領域に負のピークが観測された(Fig. 2).

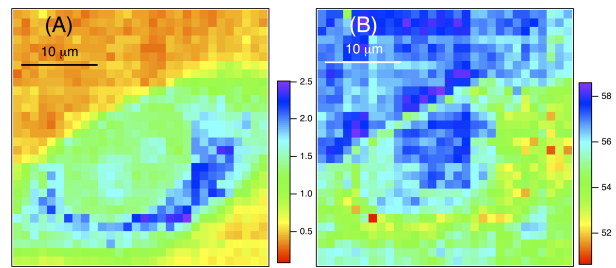
さらに, 核の O-H 伸縮振動バンドのスペクトル形は緩衝液(水)と同一であるのに対し, 細胞質のスペクトル形は緩衝液とは異なり, 差スペクトルも元のバンドの形とは異なっている(Fig. 2). 細胞質において, 生体分子の N-H および O-H のバンド強度が無視できない割合で存在することが原因であると考えられ, 細胞質の方が生体分子の密度が高いことを支持する. また, 核は緩衝液に近い水素結合状態をとっていることがわかる.

細胞内における生体分子の N-H および O-H バンドの寄与を除き, 水由来の O-H 伸縮振動バンド強度について, 核と細胞質で比較を行った(Fig. 3). 細胞外の培地の O-H バンドの積分強度の比としてプロットしている. 核と細胞質では核の方が約 3%水の濃度が高く, 核と緩衝液では水の密度に大きな差がないことが示された. これらの結果は, 先のスペクトルの形の結果と一致しており, 核の方が細胞質よりも水の密度が高く, 生体分子の密度が低いことを意味している. すなわち, 核は細胞質よりも生体分子で混み合っていない, 疎であることが示された. 分裂酵母においても, HeLa 細胞と同様の結果が得られた.

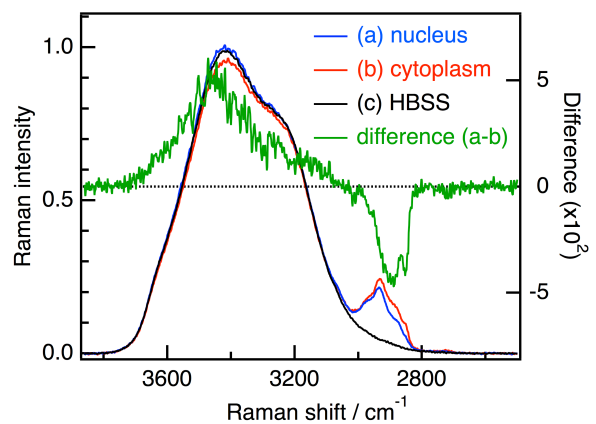
以上より, O-H 伸縮振動バンドを用いて, 核の方が水の密度が高いことを示した. O-H のラマンバンドを用いた細胞内の水の空間分布の画像化は, ラベルフリーで細胞内状態を検出する新たな手法となることができる[1].

**【参考文献】**

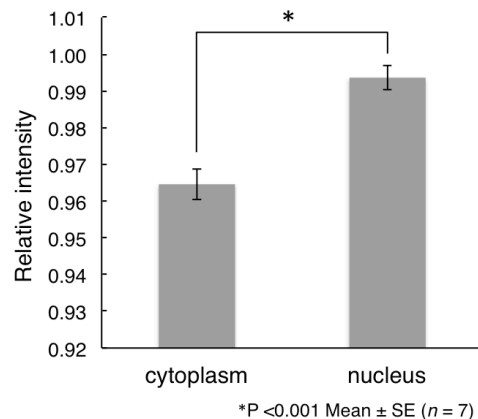
[1] M. Takeuchi, S. Kajimoto, T. Nakabayashi, *submitted*.



**Fig. 1.** Raman images of a living HeLa cell. The Raman images were constructed by plotting the integrated Raman intensity in the C-H stretching (A) and O-H stretching (B) band regions.



**Fig. 2.** Average Raman spectra of the nucleus ((a) blue,  $n=7$ ) and the cytoplasm ((b) red  $n=7$ ) of HeLa cells, and the difference Raman spectra (green). A Raman spectrum of Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, (C) black,  $n=7$ ) was also shown.



**Fig. 3.** Integrated O-H stretching Raman intensities of the cytoplasm and the nucleus of HeLa cells divided by the integrated O-H stretching Raman intensity of surrounding solution. The intensities due to biomolecules were subtracted in the analysis.

## ハイパースペクトルラマンイメージングにより明らかになった 浴室バイオフィルムの化学組成とその不均一空間分布

関学大院理工

○佐々木舞, 安田充, 重藤真介

### Chemical Compositions and Their Heterogeneous Distributions in Bathroom Biofilms Revealed by Hyperspectral Raman Imaging

○Mai Sasaki, Mitsuru Yasuda, Shinsuke Shigeto

*Graduate School of Science and Technology, Kwansai Gakuin University, Japan*

**【Abstract】** More than 90% of microorganisms on the earth are considered to inhabit structured communities known as biofilms that are formed at surfaces or interfaces. Biofilms are found in a diversity of environments ranging from deep sea to soil to home. Bacteria in biofilms have different features from the free-floating counterpart. Among many kinds of biofilms, household biofilms, such as those around water pipes, kitchens, and bathrooms, are arguably most familiar to us, but little has been understood about those household biofilms and their fundamental properties. In the present work, we use Raman microspectroscopy, which enables nondestructive chemical-component analysis without staining, to study biofilms formed in a bathroom (“pink biofilms”). We reveal the chemical compositions and their localizations in pink biofilms using hyperspectral Raman imaging analysis with multivariate curve resolution–alternating least-squares (MCR–ALS) method.

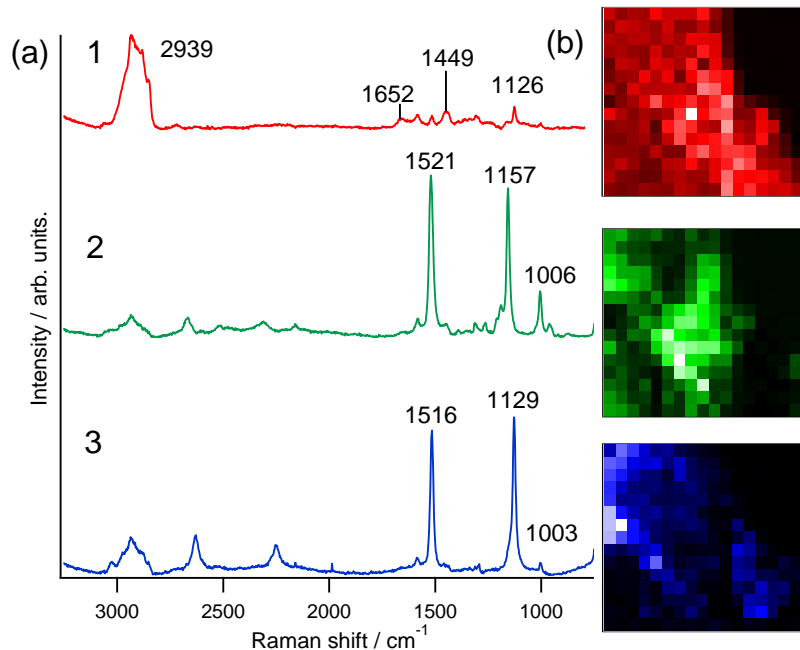
**【序】**身の回りには様々な微生物が存在しており、そのうちの多くはバイオフィルムと呼ばれる構造を持ったコミュニティーを形成する。バイオフィルム中の微生物は浮遊状態のそれとは大きく異なる性質・機能を示すことが知られているが、そのメカニズムの分子レベルでの解明はまだ進んでいないのが現状である。本研究では、染色を必要とせず非破壊でバイオフィルムを解析可能な顕微ラマン分光法を用いて、浴室に形成され汚れの原因となるバイオフィルム(“ピンクバイオフィルム”[1])の構成成分とそれらの空間的な分布に関する知見を得ることを目的とした。Multivariate curve resolution–alternating least-squares (MCR–ALS)法[2]を用いたハイパースペクトルラマンイメージングにより、カロテノイドなどの重要な2次代謝産物の局在を明瞭に可視化することができた。

**【方法 (実験・理論)】**自宅浴室の排水溝付近から採取したバイオフィルムを試料とした。スライドガラス上に乗せ、蒸留水でおだやかに洗浄した後、余分な水分を除去してからカバーガラスを被せて封じたものをラマン分光測定に用いた。空間分解ラマンスペクトルの測定には、正立型の共焦点顕微ラマン分光装置(XploRA Nano, HORIBA)を用いた。励起波長は532 nm、試料におけるレーザーパワーは約4.4 mW、露光時間は1点あたり10 s(積算2回)であった。

得られたラマンイメージング結果は多変量データ解析の一種であるMCR–ALS法を用いて解析した。MCR–ALSは、ある非負行列 $\mathbf{A}$  ( $m \times n$ )を、成分数に対応するパラメーター $k$ を仮定し、交互最小二乗アルゴリズムを用いて $\|\mathbf{A} - \mathbf{WH}\|^2$ が最小となるように非負行列 $\mathbf{W}$  ( $m \times k$ )と $\mathbf{H}$  ( $k \times n$ )を求める方法である。特異値分解や主成分分析とは異なり、分解された行列 $\mathbf{W}$ ,  $\mathbf{H}$ の成分が負にならないため、物理的に解釈しやすい解が得

られる点が大きな特徴の一つである。マッピング測定によって得られた多数の空間分解ラマンスペクトルから成る行列を **A** として MCR-ALS 解析を行うことで、データを構成する化学成分のラマンスペクトルとその空間分布についての情報を得ることができる[2]。

**【結果・考察】** 浴室バイオフィルム試料中の  $17 \times 15$  点(ステップ  $2 \mu\text{m}$ ) の領域で測定した空間分解ラマンスペクトルデータを、成分数  $k=4$  を仮定し MCR-ALS 法を用いて解析した。4つの成分のうち生体分子に由来する主要成分3つのスペクトルを図1(a)に、それらの空間分布(ラマンイメージ)を図1(b)に示す。成分1は微生物中のタンパク質や脂質によるものであると考えられる。成分2は、 $1521$ ,  $1157$ ,  $1006 \text{ cm}^{-1}$  に特徴的な3本のラマンバンドを示す。これらはそれぞれ C=C 伸縮振動、C-C 伸縮振動、C-CH<sub>3</sub> 横揺れ振動に帰属されることから、成分2はカロテノイドであると判断できる[3]。カロテノイドは活性酸素による酸化を防ぐ抗酸化作用があることが知られており、浴室の環境で有利に生存していくためにバイオフィルム中の微生物が生産した可能性が考えられる。成分3は2と非常に良く似たスペクトルパターンを示し、C-C 伸縮振動領域のバンドのピーク位置(成分2では  $1157 \text{ cm}^{-1}$  であるが、成分3では  $1129 \text{ cm}^{-1}$  に観測されている)以外は、成分2のスペクトルとほぼ重なるため、当研究室のこれまでの研究では詳細な解析が困難であった。しかし、今回の MCR-ALS を用いた解析で独立した成分として分離できたことにより、ラマンスペクトル全体に基づいた考察を行うことが初めて可能となり、成分3が共役二重結合部分にメチル基を持たないカロテノイド類似のポリエン化合物[4]であることがわかった。図1(b)のラマンイメージも成分2と3で大きく異なる分布を示しており、それらが類似性の高いラマンスペクトルを示してはいるが異なる物質であるという結論を支持している。以上の結果は、MCR-ALS と組み合わせたラマン分光イメージングが、様々な微生物、物質から構成される極めて不均一な系であるバイオフィルムの非破壊分析に対して非常に有用であることを示している。成分2と3が異なる微生物に由来する物質である可能性を調べるため、現在、微生物を単離したうえでバイオフィルムを形成させそれらのラマンイメージングを行うことを試みている。



**Fig. 1.** Results of hyperspectral Raman imaging of a bathroom biofilm using the MCR-ALS method. (a) Raman spectra and (b) corresponding Raman images of the major three components.

#### 【参考文献】

- [1] F.-F. Xu, et al. *Microbes Environ.* **84**, 5661 (2012)
- [2] C.-K. Huang, M. Ando, H. Hamaguchi, S. Shigeto, *Anal. Chem.* **84**, 5661 (2012)
- [3] Y.-T. Zheng, M. Toyofuku, N. Nomura, S. Shigeto, *Anal. Chem.* **85**, 7295 (2013)
- [4] H. Okamoto, S. Saito, H. Hamaguchi, M. Tasumi, C. H. Eugster, *J. Raman Spectrosc.* **15**, 331 (1984)

## ナノ秒パルス電場の印加による細胞内 イオン濃度の変化の計測

<sup>1</sup>東北大院薬, <sup>2</sup>国立交通大学

○堀井湧介<sup>1</sup>, 平松弘嗣<sup>2</sup>, 梶本 真司<sup>1</sup>, 中林 孝和<sup>1</sup>

### Measurements of Changes in Intracellular Ion Concentrations with the Application of Nanosecond Pulsed Electric Fields

○Yusuke Horii<sup>1</sup>, Hirotsugu Hiramatsu<sup>2</sup>, Shinji Kajimoto<sup>1</sup>, Takakazu Nakabayashi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Japan

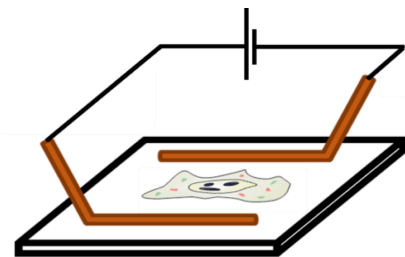
<sup>2</sup> Department of Applied Chemistry, National Chia Tung University, Taiwan

**【Abstract】** Nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) are expected to be applicable to pharmacy and medicine because nsPEFs induce changes in intracellular environments without significant damage of cell membranes. However, the mechanism of nsPEFs-induced changes in intracellular environments still remains unclear. In the present study, we have constructed the electrodes for applying nsPEFs to cultured cells and investigated the change in intracellular ion concentrations due to nsPEFs by spectroscopic techniques. Application to 1000 pulses induced cell deaths and intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  increased by the influx of extracellular  $Ca^{2+}$  through the damage of cell membranes. Application to 10 pulses also induced the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  without the change in cell shape, which comes from the generation of transient nanopores in cell membrane. The dynamics of generation of nanopores was discussed on the basis of obtained results.

**【序】**近年、メカノバイオロジーの医学・薬学研究への応用が注目を集めている。メカノバイオロジーの応用として、物理的刺激による細胞や生体の変化があり、低温プラズマ、パルス電場、微弱電流、そしてナノサイズの力学的摂動などの物理的刺激に対するがん細胞の選択的死滅などの研究が進められている。しかし、その治癒現象の機構の多くは不明であり、実際に応用するためには、メカノバイオロジーの生体応答の機構解明が必須である。現在、主に生化学的手法を用いて機構の解明が進められており、物理的刺激に応答するチャネルなどが調べられている。しかし、生化学的な立場のみではなく、「膜やタンパク質の化学構造が物理的刺激によってどのように変化するのか」「物理的刺激によって細胞内の様々なイオン濃度や膜の流動性などの物理パラメーターはどのように変化するのか」など、構造化学・物理化学の立場から検討することも、生体応答機構の理解において極めて重要であると考えられる。

本研究では、メカノバイオロジーとしてナノ秒パルス電場(nsPEFs)を用い、電場印加による細胞応答機構を検討した。ナノ秒などの非常に短いパルス電場を細胞に印加することによって、細胞膜を損傷させることなく、イオン濃度の変化やアポトーシスを効果的に誘起できることが報告されている<sup>1-3</sup>。本研究では、細胞に nsPEFs を印加する電極を作成し、蛍光およびラマン顕微分光などを用いて細胞内応答機構を検討した。

**【実験】** 細胞に電場を印加する微小電極は、 $\phi$



**Fig. 1.** Schematic image of the application of nsPEFs to cultured cell.



50  $\mu\text{m}$  のタングステンワイヤー（金メッキ）を銅棒（ $\phi 2$ 、）にハンダ付けすることで作成した（Fig. 1）<sup>4</sup>。この電極を XYZ 微調ステージに取り付け、顕微鏡の明視野で細胞を選択して電場印加測定を行った。ナノ秒パルス電場の印加は、現有装置(Avtech)を用い、パルス幅 8 ns、6~8  $\text{MV m}^{-1}$  の矩形波パルス電場を 2 kHz の繰り返し周波数で印加している。

【結果・考察】 製作した微小電極を用いて、培養状態にある HeLa 細胞に nsPEFs を印加し、細胞状態の電場効果を検討した。Fig. 2 に nsPEF を 1000 パルスを加えた場合と 10 パルスを加えた場合の例を示す。パルス数が多い場合は、細胞は速やかに細胞死を示し、 $\text{Ca}^{2+}$  検出試薬を用いると、細胞内での  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度増加が観測された。細胞死に伴う膜損傷によって、細胞外から  $\text{Ca}^{2+}$  が流入したことが原因であると考えられる。しかし、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度増加は、パルス数が少なく、細胞形状が全く変化しない場合でも観測された。培地に  $\text{Ca}^{2+}$  を除去するキレート剤を導入すると蛍光強度が大きく減少することから、同様に培地に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  の流入によることがわかる。ナノ秒パルス電場の印加によって、細胞膜に過渡的な穴(ナノポア)が生じることが流入の原因であると考えられる。

ナノ秒パルス電場の印加に伴う  $\text{Ca}^{2+}$  検出色素の時間変化を Fig. 3 に示す。蛍光強度の時間変化は細胞内での  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度の時間変化を表している。1000 パルスを加えた場合では、秒以下の速度で立ち上がり、数百秒の時定数で減衰する。パルス電場の印加に伴う膜損傷による  $\text{Ca}^{2+}$  の流入と膜チャネルを介した  $\text{Ca}^{2+}$  の放出による減衰に対応できると考えられる。一方、10 パルスを加えた場合では、蛍光強度に立ち上がりが観測され、その後、減少する。細胞膜に穴が形成されると、その流入速度は本時間分解能以下であると考えられることから、観測された立ち上がりの原因は、細胞膜にて形成されるナノポアの成長過程を観測していると考えている。蛍光の時間変化について、電場強度およびパルス数依存性などから詳細を検討している。

【参考文献】

- [1] K. Zhang, J. Guo, Z. Ge, J. Zhang, *Sci. Rep.* **4**, 5836 (2014).  
 [2] K. Awasthi, T. Nakabayashi, N. Ohta, *ACS OMEGA* **1**, 396 (2016).  
 [3] K. Awasthi, T. Nakabayashi, L. Li, N. Ohta, *ACS OMEGA* **2**, 2916 (2017).  
 [4] 堀井, 平松, 中林, 第54回日本生物物理学会, 2Pos193 (2016).

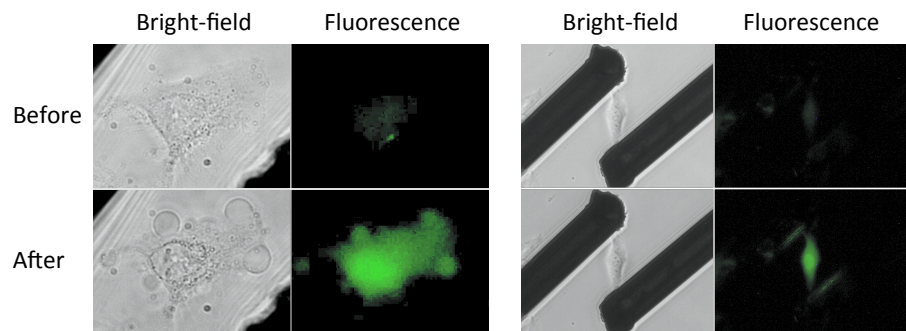


Fig. 2. Representative results of bright-field and fluorescence images of a single HeLa cell before and after the application of nsPEFs; (left) 1000 pulses, (right) 10 pulses.

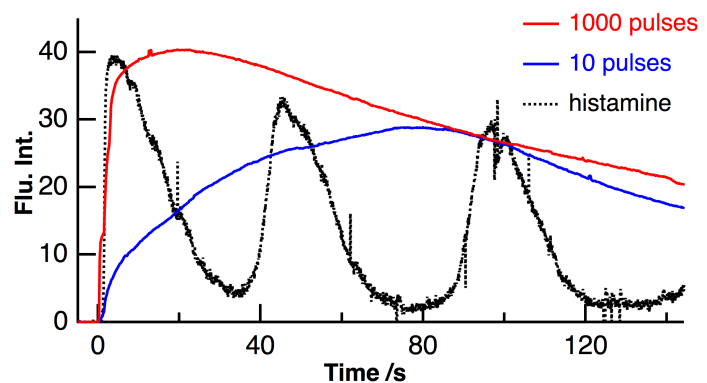


Fig. 3. Time courses of fluorescence of  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive dye (Fluo-4) in a HeLa cell after the application of nsPEFs; (red) 1000 pulses, (blue) 10 pulses. Time course of fluorescence of  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive dye after histamine stimulation is also shown for comparison (black, intensity is normalized).

## Information-theoretical Data Analysis Approaches to Raman Micro-spectroscopic Images

Khalifa Mohammad Helal<sup>1</sup>, Harsono Cahyadi<sup>4</sup>, J. Nicholas Taylor<sup>2, 3</sup>, Akira Okajima<sup>5</sup>, Yasuaki Kumamoto<sup>5</sup>, Hideo Tanaka<sup>5</sup>, Yoshinori Harada<sup>3, 5</sup>, Tamiki Komatsuzaki<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup>*Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Japan;* <sup>2</sup>*Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University, Japan;* <sup>3</sup>*JST/CREST;* <sup>4</sup>*Dept. of Methodologies for Medical Research, Kyoto Prefectural Univ. of Medicine, Japan;* <sup>5</sup>*Dept. of Pathology and Cell Regulation, Kyoto Prefectural Univ. of Medicine, Japan*

**[Abstract]** Raman micro-spectroscopic imaging is a non-invasive and label-free live cell imaging technique where the images contain spatial and spectral information of molecular vibrations, e.g., in single cells. The spectral features are unique to specific bio-molecules such as cytochrome C, lipids, etc. As Raman images contain much information but signals in raw spectra are weak, development of useful data processing methods are needed. Here, we develop information-theoretical data analysis approaches to Raman micro-spectroscopic images. Data obtained from two different disease types of rat hepatic steatosis were analyzed. Due to background contamination and large noise fluctuations in raw spectra, we preprocessed the data with several data analysis tools such as recursive polynomial fitting, singular value decomposition, etc., to enhance discriminating features of them. An information-theoretical soft clustering method using rate-distortion theory is used to classify the disease types. We show how Raman imaging is useful for differentiating cellular conditions.

**Keywords:** Raman imaging, Preprocessing, Clustering, Information theory, Rate-distortion theory.

**[Introduction]** Raman imaging is expected to provide a new means to diagnose diseases and differentiate the types of diseases even in the case that morphologies in single cells may be unaltered. Raman imaging gives structural and chemical information about not only specific molecules but also the whole sample being analyzed, so that one does not need to identify marker proteins. The data are hyperspectral Raman images where each pixel represents a spectrum containing rich molecular information. Multivariate statistical methods are very useful for processing of Raman and IR spectral data because of their ability to analyze the vast spectral distribution and discriminate between spectra of different samples that show only very minor changes [1, 2]. Preprocessing of the Raman data is required to reduce effects of unwanted signals [1, 3]. It is thus needed to establish a theoretical and algorithmic platform to differentiate the underlying cell types, the stage of disease, and prediction of disease by referencing spectral differences in terms of molecular fingerprints buried in Raman signal.

**[Brief concept of clustering analysis in Raman shift feature space]** Figure 1 provides a sketch of spatiotemporal Raman spectra in a high dimension where each point corresponds to

a Raman spectrum after application of appropriate preprocessing. To quantify differences among the spectra, we choose the Manhattan ( $l_1$ ) distance metric, which is known to provide the best discrimination between the different points in high dimensional data spaces [4]. The Manhattan distance between spectra  $S_i$  and  $S_j$  is  $d_{ij} = \sum_w |S_i(w) - S_j(w)|$ , where  $w$  is the spectral dimension (wavenumber). The information-theoretical rate-distortion theory [5, 6] is implemented as a clustering scheme, enabling the low S/N ratio of Raman spectra to be better considered in comparison to a standard clustering scheme. This theory clusters a set of spectra into a smaller number of groups via minimization of the functional  $\mathcal{F} = I(C;S) + \beta \langle d \rangle$  with respect to the conditional probability  $p(C_k|S_i)$ , through an iterative calculation. Here  $C$  denotes a set of clusters to be obtained,  $S$  denotes a given set of spectra,  $I(C;S)$  is the mutual information between

$C$  and  $S$ ,  $\langle d \rangle$  is the mean distortion among all spectra within each cluster and averaged over all clusters, and  $\beta$  is a Lagrange multiplier. From this feature space, cell types, conditions, and time evolution, in terms of Raman fingerprints of molecules in the system, can be classified. In this presentation, we

show our recent analysis on liver tissues of different disease types of rat hepatic steatosis. The identification of disease types of rat hepatic steatosis so far relies mainly on the morphological information of tissues. We discuss how Raman spectra can differentiate and predict disease-related changes in biomolecular composition of the liver tissue.

### Phenotypic state dynamics in the feature space

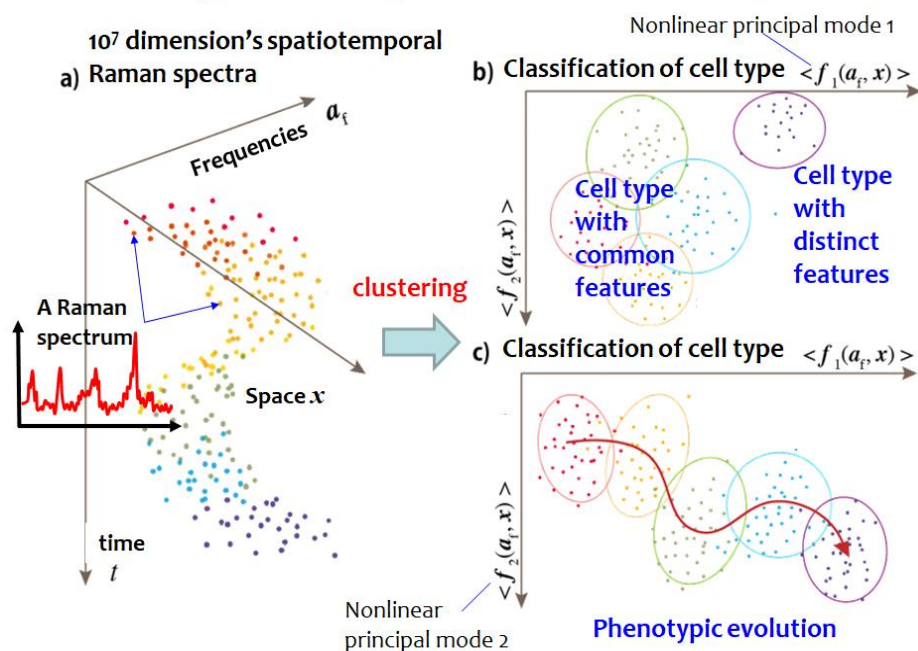


Figure 1

### [References]

- [1] Gautam *et al.* *EPJ Tech. Instrumentation*. (2015) 2:8
- [2] O'Connell *et al.* *Appl Spectrosc.* (2010) 64:1109–21
- [3] T. Bocklitz *et al.* *Anal. Chim. Acta.* (2011) 704:47–56.
- [4] C. Aggarwal, A. Hinneburg and D. Keim. On the surprising behavior of distance metrics in high dimensional space. In *Proceedings of 8<sup>th</sup> International Conference on Database Theory (ICDT)*, (2001).
- [5] C. Shannon. A Mathematical Theory of Communication. *Bell Sys. Tech. J.* **27**, 379-423, 623-656 (1948)
- [6] J. N. Taylor *et al.* *Sci. Rep.* (2015) 5:9174