

ラマンイメージングによる生細胞内の水の定量

¹東北大院・薬, ²千歳科技大

○竹内瑞貴¹, 梶本真司¹, 李黎明², 中林孝和¹

Quantification of water in living cells by Raman imaging

○Mizuki Takeuchi¹, Shinji Kajimoto¹, Liming Li², Takakazu Nakabayashi¹

¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

² 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:YVO₄ 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⁻¹、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⁻¹ 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*.

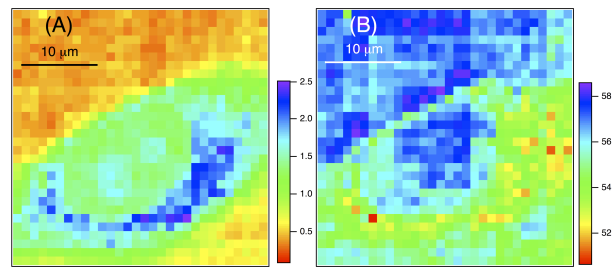


Fig. 1. Raman images of a living HeLa cell. The Raman images were constructed by plotting the integrated Raman intensity in the C-H stretching (A) and O-H stretching (B) band regions.

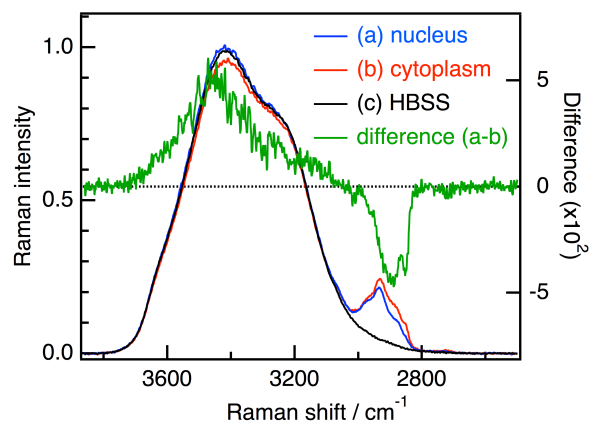


Fig. 2. Average Raman spectra of the nucleus ((a) blue, $n=7$) and the cytoplasm ((b) red $n=7$) of HeLa cells, and the difference Raman spectra (green). A Raman spectrum of Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, (c) black, $n=7$) was also shown.

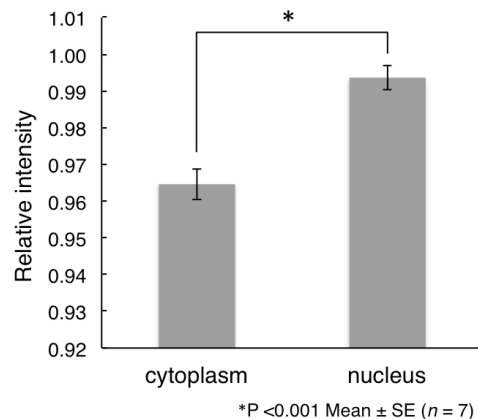


Fig. 3. Integrated O-H stretching Raman intensities of the cytoplasm and the nucleus of HeLa cells divided by the integrated O-H stretching Raman intensity of surrounding solution. The intensities due to biomolecules were subtracted in the analysis.