

一定の深さにおける細胞膜粘度評価法の開発

¹学習院大理, ²東工大化生研, ³京大院薬

○林春菜¹, Manjusha Joshi², 高田直人³, 高屋智久¹, 中村浩之², 申惠媛³, 岩田耕一³

Attempt to evaluate viscosity of plasma membranes at fixed depths

○Haruna Hayashi¹, Manjusha Joshi², Naoto Takada³, Tomohisa Takaya¹,
Hiroyuki Nakamura², Hye-Won Shin³, Koichi Iwata¹

¹ Faculty of Science, Gakushuin University, Japan

² Synthetic Organic Division, Tokyo Institute of Technology, Japan

³ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Japan

【Abstract】 Viscosity of a medium can be estimated by measuring the fluorescence lifetime of *trans*-stilbene with picosecond time-resolved fluorescence spectroscopy because its photoisomerization rate constant shows a good correlation with the viscosity of the surrounding media. Recently, we evaluated the viscosity inside the lipid bilayer membranes of DMPC liposomes at fixed depths by using fatty acids with a *trans*-stilbene moiety as probe molecules. The result indicates that these lipid bilayers have lateral distribution of the viscosity at fixed depths. In this research, we estimated the viscosity inside membranes of HeLa cells at fixed depths by measured fluorescence lifetime of enclosed *trans*-4-hydroxystilbene and fatty acids modified with *trans*-stilbene. The measurement suggests that membranes of HeLa cells are more heterogeneous in the lateral direction than artificial lipid bilayers.

【序】 細胞膜近傍での化学反応によって細胞内外の物質輸送やシグナル伝達などの機能が実現している。これらの機能は通常的人工ベシクルにはなく細胞がもつ特別なはたらきである。反応場としての細胞膜を理解するためには、その粘度や極性といった基礎的な物性の測定が重要である。われわれは、人工脂質二重膜中に可溶化したスチルベン修飾脂肪酸のけい光寿命から、人工脂質二重膜の粘度が深さにより変化することを明らかにした。また、一定の深さにおいて2種類の粘度が得られたことから、脂質二重膜には疎密の不均一性が存在すると結論づけた。この結論は、脂質ラフトの存在と矛盾しない。本研究では、*trans*-4-ヒドロキシスチルベン (*t*SB-OH) およびスチルベン修飾脂肪酸をプローブ分子として細胞膜に封入し、そのけい光スペクトルおよびけい光減衰の測定から細胞膜の粘度の算出を試みた。

【方法 (実験・理論)】

HeLa 細胞の細胞膜中に封入した *t*SB-OH のけい光寿命をピコ秒時間分解けい光分光計により測定した。再生増幅された Ti:sapphire レーザーの出力を OPA を経て時間幅 40 fs、波長 320 nm のパルス光に変換し、この光を励起光として試料に照射した。得られたけい光を分光器に導入して、ストリークカメラによって時間分解検出した。試料部では、HeLa 細胞を培養液とともに 1cm 角セルに入れて温度可変のセルホルダー中に保持するか、あるいは培養フラスコをそのまま室温 (25°C) で保持した。

【結果・考察】

ピコ秒時間分解けい光分光測定によって *t*SB-OH を封入した HeLa 細胞と *t*SB-OH を含まない細胞の時間分解けい光スペクトルをそれぞれ 37°C で得た (Fig. 1.(a))。また、それらの差スペクトルから細胞膜中に封入された *t*SB-OH の時間分解けい光スペクトル

ルとして得た (Fig. 1.(b)). また、波長 375 nm から 530 nm における *t*SB-OH のけい光減衰曲線を得た (Fig. 2.). けい光寿命の逆数は放射減衰速度定数と光異性化速度定数の和で表すことができる。アルカン溶液中において、*t*SB の光異性化速度定数は溶媒の粘度と相関をもって変化する[1, 2]。 *t*SB-OH にも同様の相関があることを確認し、光異性化速度定数と粘度の較正曲線を作成して、*t*SB-OH の周囲での粘度を見積もることに成功した。 Fig. 2. のけい光減衰曲線は、単一指数関数では再現できない。細胞膜の中でも不均一な粘度の分布が検出できた。リポソーム脂質二重膜中に封入した場合と比べて単一指数関数減衰からの解離が大きくなっている。このけい光減衰曲線を三重指数関数で近似して得られた寿命から、細胞膜には面内方向に粘度が 20 倍以上異なる領域があることが明らかとなった。これは、脂質ラフトに対応する密な部分と非ラフトに対応する疎な部分に封入されたそれぞれの *t*SB-OH の周囲の粘度を反映していると考えられる。また、脂質二重膜では温度変化によってゲル相から液晶相に転移すると粘度が小さくなるのに対して[2]、細胞膜では 30°C や 44°C よりも 37°C において最も粘度が小さくなることが示唆された。温度依存性の詳細、およびプローブ分子としてスチルベン修飾脂肪酸を用いた実験結果について当日議論する。

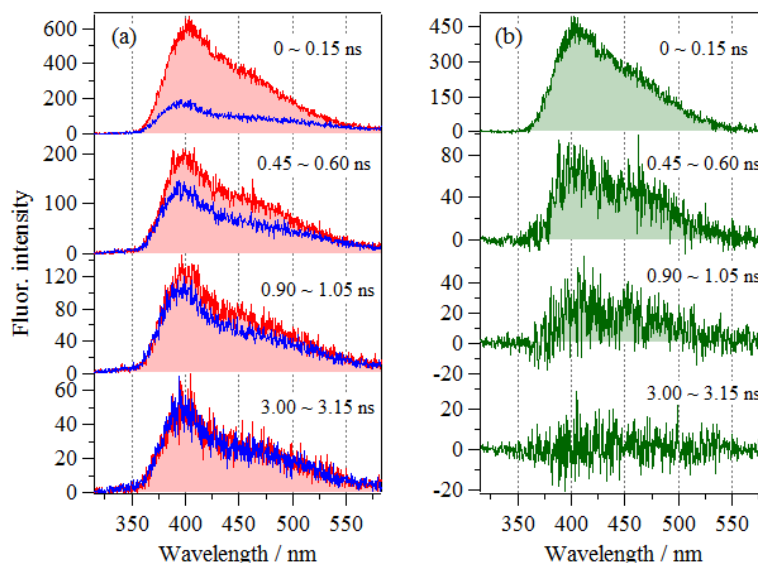


Fig. 1. (a) Time-resolved fluorescence spectra of a HeLa cell with (red) and without (blue) enclosed *t*SB-OH and (b) fluorescence signals of *t*SB-OH obtained after subtracting the HeLa cell fluorescence (green).

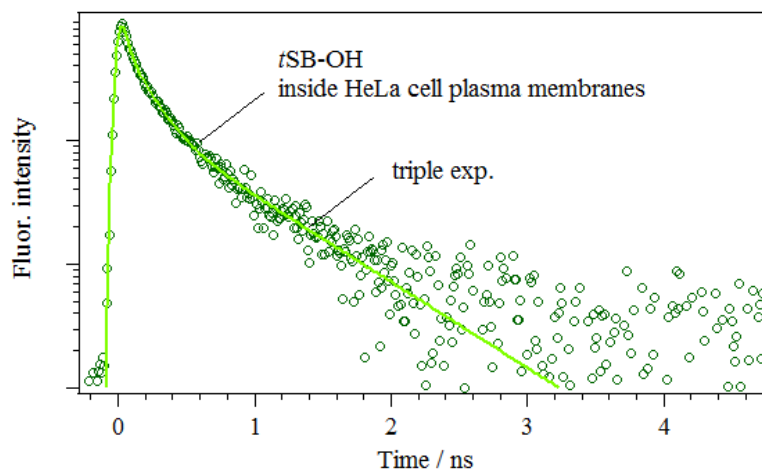


Fig. 2. Fluorescence decay curve of *t*SB-OH inside HeLa cell plasma membranes.

【参考文献】

- [1] S. H. Courtney, S. K. Kim, S. Canonica and G. R. Fleming, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **82**, 2065 (1986).
 [2] Y. Nojima and K. Iwata, *J. Phys. Chem. B* **118**, 8631 (2014).